

**NMR-spektroskopische Charakterisierung
cytosolischer Domänen des shaker Kaliumkanals Kv1.4 und
Untersuchungen an einem prokaryotischen zellfreien
Proteinsynthesesystem**



**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

vorgelegt von

Johannes Hiltl

aus

Regensburg

im Jahr

2015

Das Promotionsgesuch eingereicht am: 28.05.2015

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Unterschrift:

Kurzzusammenfassung

Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, welche den Transport von Ionen durch die Zellmembran gewährleisten. Der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.4 besteht aus vier identisch aufgebauten Untereinheiten, welche eine zentrale Kanalpore im Inneren umschließen. Er besitzt lange Proteinketten, welche ins Cytosol hineinragen und regulatorische Aufgaben für die Kanalaktivität oder die Organisation der Zelle übernehmen. Von zentraler Bedeutung für den Kanal ist die Kv1.4 T1-Tetramerisierungsdomäne, welche für die tetramere Grundstruktur des Kanals verantwortlich ist. Sie ist direkt unterhalb der Kanalpore lokalisiert und an der Kanalregulation beteiligt. Weitere cytosolische Domänen sind das Kv1.4 Ball-Inaktivierungspeptid, verantwortlich für die N-Typ Schnellinaktivierung und der C-Terminus von Kv1.4, welcher an regulatorischen Zellfunktionen beteiligt ist. In dieser Arbeit haben wir ^{15}N $^{1/2}\text{H}$ isotopenmarkierte, isolierte cytosolische Kv1.4 Domänen unter Verwendung der 2D-NMR Spektroskopie in verschiedenen Zusammenstellungen auf ihre Wechselwirkungen und ihre Bindungscharakteristiken hin untersucht. Zentrale Untersuchungsdomäne war die T1-Tetramerisierungdomäne und ihr wechselseitiges Zusammenspiel mit dem Inaktivierungspeptid und dem C-Terminus. Wir haben gezeigt, dass das Inaktivierungspeptid bevorzugt auf der der Membran zugewandten Oberseite des T1-Tetramers nahe der Kanalpore bindet (AS V73, I77, F75, R69) und einen negativ kooperativen Bindungscharakter besitzt ($K_D = 13,6\text{-}31,2 \mu\text{M}$, $n = 0,67\text{-}0,89$). Die gegenseitigen Interaktionsbereiche wurden mittels elektrostatischen Oberflächendarstellungsprogrammen verglichen und ein mögliches Bindungsmodell erstellt. Wir konnten zeigen, dass möglicherweise bereits ein Inaktivierungspeptid zur Inaktivierung des Kv1.4 Ionenkanals ausreicht. Der Kv1.4 C-Terminus besetzt im Gegensatz zum Inaktivierungspeptid eher seitliche Bereiche des T1-Tetramers (L20, R42, N43, N44; $K_D = 0,61\text{-}0,73 \text{ mM}$; $n = 1$). Dem bis jetzt als eher unstrukturiert geltenden Protein konnte mehr als ein definierter Konformationszustand (AS Y43-S59) zugesprochen werden. Es konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus in der Lage ist das Inaktivierungspeptid von der T1-Domäne partiell zu verdrängen, was eine Beteiligung an der Rückführung des Kanals in den geschlossenen Ruhezustand nahelegt. In diesem Zusammenhang wurde die Bindung zwischen dem Gerüstprotein PSD-95 mit seiner PDZ2-Domäne und dem C-Terminus mit der T1-Domäne untersucht. Der Bindungscharakter konnte näher charakterisiert werden und legt nahe, dass das PSD-95 Gerüstprotein eher nur regulatorischer Funktion ist.

Die zellfreie Proteinsynthese (CFPS) ist eine Methode zur Herstellung von Proteinen *in vitro*. Das System ist offen und enthält keine Zellwand, was die Möglichkeit bietet zytotoxische oder Membranproteine herzustellen. Das S30 *E. coli* Extrakt wird lysierten Zellen entnommen und vereint die ribosomalen Translationsbestandteile in sich. Dem CFPS-Ansatz zugegeben werden Transkriptionsfaktoren, DNA-Templates und für die Reaktion nötige Energie und Energieregenerationssysteme. Hauptproblem der zellfreien Proteinexpression ist die geringe Produktivität. Hier wurde ein System mit einer Leistung von 500 µg/ml verwendet. Alle relevanten Bestandteile des zellfreien Systems sind bekannt und wie im PURE-System rekonstruiert herstellbar. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von zusätzlich zugegebenen Translationsfaktoren (IF-1, IF-2, IF-3; EF-Tu, EF-Ts, EF-G, RF-1, RF-2, RF-3, RRF) auf die Syntheseleistung des Systems untersucht. Dabei konnten wir zeigen, dass die Translationsfaktoren im S30-System bereits im optimalem Verhältnis vorliegen. Bei der CFPS laufen stets unerwünschte Nebenreaktionen ab. Eine Möglichkeit diese Nebenreaktionen zu unterdrücken ist die Senkung der Reaktionstemperatur, die allerdings die Produktivität des Systems reduziert. Hierzu wurde die 5`untranslatierte Region (5` UTR) des 'cold-shock' Gens von CspA von *E. coli* als ein mRNA-leader in die CFPS-Reaktionen eingesetzt. Die Temperatur konnte dadurch reduziert und gleichzeitig die Syntheseausbeute erhöht werden. Die sinkende Enzymaktivität der T7-RNA Polymerase bei tiefen Temperaturen konnte durch Zugabe von T7-RNA Polymerase ausgeglichen werden. Dies ermöglichte eine Synthesesteigerung von über 30 % zum Normalansatz. In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von hydrostatischem Druck auf die CFPS-Reaktion untersucht. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass steigende hydrostatische Drücke die Synthese im CFPS-System inhibieren, die Reaktion bei nachlassendem Druck aber reversibel ist. Ab gewissen Grenzwerten (100 MPa) wird die Funktionalität des CFPS-Systems von anliegendem hydrostatischen Druck jedoch dauerhaft zerstört.

Summary

Ion channels are integral membrane proteins, that provide a transport mechanism for ions across the cell membrane. The voltage-dependant potassium channel $K_v1.4$ consists of four identical subunits that enclose a central channel pore. It comprises elongated protein tails, that extend into the cytosol and have regulatory function for the channel activity and cell organization. Of crucial relevance for the potassium channel is the $K_v1.4$ T1-tetramerization domain, controlling the tetrameric architecture of the channel. It is located immediately below the channel pore and contributes to its regulation. Other intracellular $K_v1.4$ domains are the N-terminal 'ball' peptide, responsible for the N-type fast inactivation and the $K_v1.4$ C-terminus, contributing to regulatory cell functions. In this study we examined ^{15}N $^{1/2}\text{H}$ isotope labeled, isolated cytosolic $K_v1.4$ domains by 2D-NMR spectroscopy in varying constellations concerning their mutual interplay and binding characteristics. Central domain of the study was the T1-tetramerization domain and its interaction with the inactivation peptide and the C-terminus. We have shown, that the inactivation peptide prefers binding on the membrane oriented top side of the T1-tetrameric domain (V73, I77, F75, R69) close to the channel pore and displays a negatively cooperative binding character ($K_D = 13,6\text{-}31,2 \mu\text{M}$, $n = 0,67\text{-}0,89$). Their mutual interaction areas were compared by an electrostatic surface visualization program and a binding model was developed. It was shown that possibly a single inactivation peptide is sufficient for the inactivation of the $K_v1.4$ channel. In contrast to the inactivation peptide the $K_v1.4$ C-terminus occupies lateral areas of the T1-domain (L20, R42, N43, N44; $K_D = 0,61\text{-}0,73 \text{ mM}$; $n = 1$). The C-terminus, so far assumed to be an intrinsically disordered protein, was assigned more than one specific conformation state (Y43-S59). It was shown, that the C-terminus is able to partially displace the inactivation peptide from the T1-domain. This suggests a participation of the C-terminus in the transformation of the channel into its initial, active state. In this context a binding between the scaffold protein PSD-95 with its PDZ2-domain and the C-terminus with the T1-domain was explored. The binding character was analyzed closer and suggests a merely regulatory function of the PSD-95 scaffold protein.

The cell-free protein synthesis (CFPS) is a technique for the production of proteins *in vitro*. The system is open and comprises no cell wall, which enables the synthesis of cytotoxic or hydrophobic membrane proteins. The S30 *E. coli* extract is extracted from lysed cells and contains the ribosomal translation factors. Transcription factors, DNA-templates and the required energy and energy regeneration systems are added to the CFPS reaction sample. The main challenge of the cell free protein expression is its low productivity. For this study a system with a 500 µg/ml productivity was used. All components of the cell-free system are established and reconstructable as in the PURE system. We investigated the impact of additionally implemented translation factors (IF-1, IF-2, IF-3; EF-Tu, EF-Ts, EF-G, RF-1, RF-2, RF-3, RRF) onto the CFPS productivity and were able to show, that the translation factors in the S30 system have already the optimum composition regarding the productivity. The CFPS is always accompanied by unfavorable side reactions. These side reactions can be decreased by a reduction of the expression temperature, that in turn decreases the productivity of the CFPS. By use of the 5`untranslated region of the cold-shock gene of CspA (*E. coli*) as a mRNA leader in CFPS, protein yield was increased despite decreasing expression temperatures. The decreasing enzyme activity of T7-RNA Polymerase at low temperatures was compensated by the addition of T7-RNA Polymerase. This enabled an enhancement of the protein yield of more than 30 % compared to the standard reaction. In a further experiment the influence of hydrostatic pressure to the CFPS reaction was studied. Increasing hydrostatic pressure inhibits protein synthesis in the CFPS system, but the reaction is reversible upon release of the hydrostatic pressure. However, above a critical value (100 MPa) the functionality of the CFPS system is destroyed permanently by hydrostatic pressure.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 CFPS: Geschichte und Eigenschaften	2
1.2 CFPS: Durchführung, Anwendungsgebiete und Grenzen	3
1.3 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle.....	4
1.3.1 Aufbau und Struktur der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle.....	6
1.3.2 Die 3D-Kristallstruktur des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.2	9
1.3.3 Aktivierung und Inaktivierung von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen	10
1.3.4 Intrazelluläre Kv1.4 Strukturen.....	13
1.3.4.1 Die Kv1.4 T1-Tetramerisierungsdomäne	15
1.3.4.2 Das N-terminale Kv1.4 Ball-Inaktivierungspeptid	17
1.3.4.3 Der Kv1.4 C-Terminus	19
1.3.5 Zusammenspiel der N-Typ und C-Typ Inaktivierung beim Kv1.4 Kanal	21
1.3.6 Der C-Terminus und das PSD-95 Protein	23
1.4 Ziele der Arbeit.....	24
2. Material	26
2.1 Bakterienstämme.....	26
2.2 Plasmidvektoren	26
2.3 Proteine (Enzyme).....	26
2.4 Oligonukleotide.....	27
2.5 Kits und Kitbestandteile	27
2.6 Chromatographie-Säulen (ÄKTA System)	27
2.7 Ausgangsplasmide.....	28
2.8 Wichtige Verbrauchsmaterialien	28
2.9 Chemikalien.....	28
2.10 Geräte	28
2.11 Computerprogramme	29
3. Methoden	31
3.1 Mikrobiologische Methoden.....	31
3.1.1 Kulturmedien von Bakterien	31
3.1.2 Bestimmung der Bakteriendichte	32
3.1.3 Glycerinkulturen von Bakterien	32
3.1.4 Bakterienkulturen auf festen Nährmedien	32

3.1.5 Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien	33
3.1.6 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	33
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.1 Spektrophotometrische Messung der Nukleinsäurekonzentration	33
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.2.2.1 Primerdesign	34
3.2.2.2 PCR-Reaktion.....	34
3.2.2.3 Kolonie-PCR.....	35
3.2.3 Restriktionsverdau	36
3.2.4 Reinigung von Vektoren und PCR-Fragmenten in Lösung	37
3.2.5 Agarose Gelelektrophorese	37
3.2.6 Reinigung von Vektoren und PCR-Fragmenten aus Gelen.....	38
3.2.7 TOPO ^R TA Cloning ^R Kit	38
3.2.8 Ligation.....	38
3.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
3.3 Proteinbiochemische Methoden	39
3.3.1 SDS-PAGE nach Laemmli (1970).....	39
3.3.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	40
3.3.3 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	40
3.3.4 Nickel-Affinitätschromatographie.....	41
3.3.5 Proteaseverdau.....	43
3.3.6 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen.....	43
3.3.7 Dialyse von Proteinen	43
3.3.8 Gelfiltration.....	44
3.3.9 Konzentrieren proteinhaltiger Lösungen	45
3.3.10 Fällen von Proteinen	45
3.3.11 Gefriertrocknung von Proteinen.....	45
3.4 Methoden zur Zellfreien Proteinsynthese	46
3.4.1 RNase freies Arbeiten	46
3.4.2 Herstellung der S30 <i>E. coli</i> Extrakte	46
3.4.3 Durchführung der CFPS-Reaktion	47
3.4.4 Promega S30 T7 High-Yield Protein Expressionssystem	49
3.4.5 Quantifizierung zellfrei exprimierter Chloramphenicol-Acyltransferase (CAT)	49
3.5 NMR-Spektroskopie	50

3.5.1 NMR-Probenzusammensetzung	50
3.5.2 Spektren und Pulsprogramme	50
3.5.3 NMR-Experimente und Formeln	51
4. Ergebnisse der Charakterisierung der cytosolischen Kv1.4-Domänen	53
4.1 Die Kv1.4 T1-Konstrukte	53
4.1.1 Expression und Aufreinigung der Kv1.4 T1-Konstrukte	54
4.1.2 Vergleich der Kv1.4 T1-Konstrukte	55
4.1.3 Das Kv1.4 T1-Strukturmodell	59
4.2 Das Kv1.4 IP75 (<i>inactivation peptide</i>)-Konstrukt	60
4.3 Das Kv1.4 C84-Konstrukt.....	62
4.3.1 MD-Simulation des Kv1.4 C84-Konstrukt	64
4.3.2 Kv1.4 C84-Temperaturreihe.....	66
4.3.3 Protein-Protein Interaktionsexperiment des Kv1.4 IP75-Peptides mit Kv1.4 C84.....	67
4.4 Titrationsexperimente: Kv1.4 T1K mit seinem N-terminalen Inaktivierungspeptid Kv1.4 IP75	68
4.4.1 Protein-Protein Titration zwischen dem Kv1.4 T1K-Tetramer und dem Kv1.4 IP75-Peptid	69
4.4.2 Protein-Protein Interaktion zwischen Kv1.4 IP75 und Kv1.4 T1K.....	72
4.5 Titrationsexperimente: Kv1.4 T1K mit dem C-terminalen Kv1.4 C84 Peptid.....	74
4.5.1 Protein-Protein Titration zwischen dem Kv1.4 T1K-Tetramer und dem Kv1.4 C84-Peptid	74
4.5.2 Protein-Protein Interaktion zwischen Kv1.4 C84 und Kv1.4 T1K.....	77
4.6 Protein-Protein Interaktion: Das N-terminale Kv1.4 IP75-Inaktivierungspeptid mit der Kv1.4 T1K-Domäne und dem C-terminalen Kv1.4 C84-Peptid.....	79
4.7 Elektrostatische Protein-Oberflächendarstellung	84
4.8 Protein-Protein Interaktion: Die Kv1.4 T1-Domänen mit dem N-terminalen Inaktivierungspeptid Kv1.4 IP75 und dem C-terminalen Kv1.4 C84-Peptid	87
4.8.1 Beschreibung der Protein-Protein Interaktion des Kv1.4 T1Ktag-Konstrukt (mit His ₆ -tag) mit dem Kv1.4 IP75- und Kv1.4 C84-Peptid.....	87
4.8.2 Die Protein-Protein Interaktion des Kv1.4 T1K-Konstrukt (ohne His ₆ -tag) mit dem Kv1.4 IP75- und Kv1.4 C84-Peptid	89
4.9 Die PSD-95 PDZ2-Domäne	94
4.9.1 Protein-Protein Titration des C-terminalen Kv1.4 C84-Peptides mit dem PSD-95 PDZ2-Protein	95
4.9.2 Protein-Protein Titration: Das C-terminale Kv1.4 C84-Peptid mit dem Kv1.4 T1K-Tetramer und der PDZ2-Domäne.....	99

4.10 Die Kv1.4 C84-Mutante	104
4.11 Protein-Protein Interaktion des Kv1.4 T1K-Tetramers mit dem Kv1.4 C84M-Peptid	107
5. Ergebnisse der Untersuchungen an dem CFPS-System.....	110
5.1 Die CFPS-Reaktion unter Zugabe von Translationsfaktoren	110
5.1.1 Aufreinigung der Translationsfaktoren.....	110
5.1.2 Einfluss der Translationsfaktoren auf die CFPS-Reaktion	112
5.2 Die CFPS-Reaktionen bei niedrigen Temperaturen	114
5.2.1 Die CFPS-Reaktion bei unterschiedlichen Temperaturen und mit unterschiedlichen 5`UTR-Sequenzen.....	115
5.2.2 CFPS-Reaktionen bei unterschiedlicher Temperatur und T7-RNA Pol. Konzentration	117
5.3 Die CFPS-Reaktion und der pH-Wert	118
5.4 Die CFPS-Reaktion unter Einfluss von hydrostatischem Druck.....	120
5.4.1 Drucksystem und Reaktionsbedingungen.....	121
5.4.2 Auswirkung von Druck auf die CFPS-Reaktion	122
6. Diskussion der Ergebnisse um den Kv1.4 Kanal	126
6.1 Vergleich der Kv1.4 T1-Konstrukte	126
6.2 Der N- und C-Terminus des Kv1.4 Kanals.....	128
6.3 Interaktion zwischen dem Kv1.4 N- und Kv1.4 C-Terminus.....	129
6.4 Protein-Protein Titrationsexperimente	129
6.5 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 T1K-Konstrukt und dem Kv1.4 Inaktivierungspeptid	130
6.6 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 IP75-Inaktivierungspeptid und der Kv1.4 T1K-Domäne.....	132
6.7 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 T1K-Konstrukt und dem Kv1.4 C84-Peptid.....	133
6.8 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 C84-Peptid und der Kv1.4 T1K-Domäne.....	134
6.9 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 T1K-Konstrukt und dem Kv1.4 C-Terminus (Mutation).....	135
6.10 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 T1K-Tetramer mit dem Kv1.4 C- und Kv1.4 N-terminalen Peptid.....	136
6.11 Protein-Protein Interaktion des Inaktivierungspeptides Kv1.4 IP75 mit der Kv1.4 T1-Domäne und dem Kv1.4 C-Terminus	138
6.12 Ladungsverteilung an Proteinstrukturen	139
6.13 Bindungsmodell des Kv1.4 Inaktivierungspeptides mit der Kv1.4 T1K-Domäne....	141

6.14 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 C84-Peptid und der PDZ2-Domäne	143
6.15 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 C-Terminus, dem Kv1.4 T1K-Tetramer und der PDZ2-Domäne.....	144
6.16 Ausblick	147
7. Diskussion der Ergebnisse um das CFPS-System	148
7.1 Rekonstruktion der Translationsmaschinerie in <i>E. coli</i> S30 CFPS-Systemen	148
7.2 CFPS unter Niedrigtemperatur.....	149
7.3 CFPS und der pH-Wert	151
7.4 CFPS unter hydrostatischem Druck.....	152
8. Zusammenfassung	154
9. Literaturverzeichnis	158
10. Anhang	168
10.1 Abkürzungsverzeichnis.....	168
10.2 Abbildungen	171
10.3 Tabellenverzeichnis.....	173
10.4 Abbildungsverzeichnis	174
10.5 Sequenzielle Zuordnungen der cytosolischen Kv1.4 Konstrukte	179
10.6 NMR-Experimente: Protein-Protein Titrationen.....	190
11. Erklärung	215
12. Danksagung	216

1. Einleitung

Unter dem Proteom wird die Gesamtheit aller Proteine eines Lebewesens oder eines Virus verstanden. Das Proteom wird aus dem Genom, dem Speicher des Erbmateriale abgelesen und synthetisiert. Das menschliche Genom, ein relativ statischer und unveränderbarer Faktor wurde im Jahre 2003 durch das Humangenomprojekt (Collins et. al, 2003) aufgeklärt. Nur 11 Jahre später wurde der erste Katalog vorgestellt, welcher ansatzweise das komplette Proteom des Menschen umfasste (Wilhelm et. al, 2014). Hierbei wurden die unterschiedlichsten Zellgewebe auf ihre Protein Zusammensetzung untersucht. Es wurden genau 20356 protein codierende Gene, aus denen tausende Proteinspezies entstehen können, im gesamten Organismus detektiert (The Human Protein Atlas). Es wurde ersichtlich, dass das Proteom ein hoch flexibler und dynamischer Faktor ist, welcher dem Aufgabengebiet der Zelle mit Proteinsynthese und -abbau angepasst ist. Beeinflussende Faktoren können mitunter Einflüsse aus der Umwelt, wie Kälte, Krankheiten oder Medikamentenzufuhr sein. Dem Forschungsgebiet der Proteomik wird nun die Aufgabe zu Teil, Proteine in Bezug auf ihre Funktion, ihre Struktur und ihren Reaktionsmechanismen hin zu untersuchen. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, wurden Methoden entwickelt, Proteine rekombinant unter Verwendung verschiedenster Organismen herzustellen. Hierbei etablierte sich vor allem der Modellorganismus *E. coli* als Proteinfabrik schlechthin durch seine einfache Gestaltung und Handhabung (Farrokhi et al., 2009; Freischmidt, 2011). Bedauerlicherweise sind nicht alle Proteine, welche von Interesse sind, auch herstellbar. Die Erfolgsrate beläuft sich auf ca. 30 Prozent (Graslund et al., 2008). Jedes Protein bedarf seines eigenen Expressions- und Aufreinigungsprotokoll, welches oft aufwendig und langwierig zu erarbeiten ist. Wünschenswert ist die Anhebung dieser doch eher mageren Quote. Eine vielversprechende Methode könnte die zellfreie Proteinsynthese sein (Nirenberg und Matthaei, 1961). Hierbei wird das Protein unter Verwendung von *E. coli* oder Weizenkeimextrakten aus der passenden DNA im Reagenzglas synthetisiert (Abschn. 1.1 und 1.2).

Nach erfolgreicher Separation und Isolation eines Proteins stellt sich dem Forschungsgebiet der Proteomik die Herausforderung der Identifizierung und der Charakterisierung. Dazu wurden eine Vielzahl von Methoden und Techniken entwickelt. Nicht mehr wegzudenken sind die spektroskopischen Methoden, wie z.B. die NMR-Spektroskopie. Speziell diese Methode ermöglicht die Untersuchung der Proteine in ihrer löslichen, natürlich

vorkommenden Form auf atomarer Ebene. Sie kommt zum Einsatz, um dreidimensionale Proteinstrukturen (Wüthrich K., 1990) zu erstellen, oder um Bereiche von Proteinen auf ihre Funktion und Dynamik hin zu untersuchen. Wichtiges Thema dieser Arbeit ist einerseits die Untersuchung eines zellfreien *E. coli* S30 Systems und andererseits die Untersuchung cytosolischer Domänen des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.4.

1.1 CFPS: Geschichte und Eigenschaften

Die zellfreie Proteinsynthese (CFPS - 'cell-free protein synthesis') beschäftigt sich mit der rekombinanten Herstellung von Peptiden und Proteinen ohne die Anwesenheit einer lebenden Zelle. Hierbei werden alle transkriptions- und translationsrelevanten Bestandteile der Proteinherstellung in einem Reagenzglas vereint (Nirenberg und Matthaei, 1961). In dieser Arbeit wurde speziell mit einem prokaryotischen S30 CFPS-System von *E. coli* gearbeitet (Abschn. 3.4). Nebenbei existieren noch eukaryotische (z.B. Weizenkeim, Retikulocyten) und rekombinant rekonstruierte (PURE-System, NEB) CFPS-Systeme (Spirin und Swartz, 2008). *E. coli* Systeme erweisen sich bei CFPS-Systemen als die Produktivsten. Innerhalb von 12 Stunden ist es möglich mehr als 2 mg/ml Protein zu erhalten (Kim et al., 2006). Die Entdeckung der CFPS-Systeme geht zurück bis in die 50er Jahre. Hier wurde entdeckt, dass isolierte tierische und bakterielle Homogenate Proteinsyntheseaktivität besitzen (Winnick, 1950; Siekevitz, 1952; Gale und Folkes, 1954). Ein paar Jahre später wurde entdeckt, dass Ribosomen das zentrale Element der Proteintranslation sind (Roberts, 1958). In den folgenden Jahren wurden die translationsaktiven Homogenate in ihrer Zusammensetzung verfeinert und z.B. von überflüssigen Zelltrümmern isoliert und mit zusätzlichen Additiven, wie energiereichen Nukleotiden versetzt (Keller und Zamecnik, 1956). Bis ins Jahr 1961 war es nur möglich, endogene mRNA zu produzieren. Nirenberg und Matthaei (1961) gelang es schließlich, die endogene mRNA zu entfernen und die CFPS-Reaktion mit exogener zu verwirklichen. Für die heute uns bekannte CFPS-Reaktion fehlte nur noch die Verwendung der stabilen DNA anstatt der instabilen mRNA als Template. Dies wurde durch eine Kopplung von Transkription und Translation im Jahre 1967 ermöglicht (De Vries und Zubay, 1967). Zu guter Letzt wurde die Translation von der Transkription durch die Verwendung von T7-RNA Polymerasen entkoppelt (Nevin und Pratt, 1991).

Der entscheidende Bestandteil eines offenen CFPS-Systems ist das translationsaktive S30 *E. coli* Zellextrakt. Die Herstellung basiert auf dem Protokoll von Pratt (1984), welches von

Freischmidt (2011) in seiner Herstellung und Proteinausbeute verbessert wurde. (Abschn. 3.4). Für eine erfolgreiche CFPS-Reaktion gilt es ein paar Vorschriften bei der Herstellung und Durchführung zu beachten. Es muss stets RNase frei gearbeitet werden, um die mRNA zu stabilisieren. Zu diesem Zweck wurden RNase defiziente *E. coli* Stämme entwickelt (Jun et al., 2008). Dies hatte den Vorteil, dass nun lineare, stabile DNA PCR-Fragmente als Template verwendet werden konnten. Wichtig in einem CFPS-System war noch die Entwicklung eines Energieregenerationssystems, welches es ermöglichte, eine Energiehungrige CFPS-Translation länger am Leben zu erhalten (Calhoun und Swartz, 2007). Zusätzlich mussten zur CFPS-Optimierung noch Ionenkonzentrationen, wie z.B. das Mg²⁺-Ion dem System optimal angepasst werden. Magnesium ist essentiell für die enzymatische Aktivität im System ist. Während der CFPS-Reaktion kommt es zur Anhäufung von anorganischem Phosphat, welches Komplexe mit Mg²⁺-Ionen bildet. Somit wird die Mg²⁺-Konzentration gesenkt und das System kommt zum Erliegen (Kim et al., 2006).

1.2 CFPS: Durchführung, Anwendungsgebiete und Grenzen

Vor einer erfolgreichen CFPS-Anwendung stellt sich stets die Frage nach der Herkunft des Zellextraktes und nach der benötigten Proteinausbeute. So sind z.B. posttranskriptionale Modifikationen an Proteinen nur bei eukaryotischen CFPS-Systemen möglich. Um nun die Proteinausbeute dem Ziel optimal anzupassen, werden unterschiedliche CFPS-Modi verwendet. Wird wenig Protein in vielen Ansätzen benötigt, wird ein statisches Batch-Verfahren mit einem kleinem Reaktionsvolumen angewendet. Das Batch-Verfahren ist meist die erste Wahl, da es einfach vorzubereiten ist und kurze Reaktionszeiten besitzt. Wird mehr Protein benötigt, kommen Dialysemodi zum Einsatz. Hierbei wird das Reaktionsvolumen vergrößert und die Reaktion kontinuierlich mit neuer Energie versorgt. Zusätzlich werden störende Nebenprodukte (z.B. anorganisches Phosphat) abtransportiert. Diese Reaktionen können weit mehr als 10 Stunden aufrecht erhalten werden und ein mehrfaches an Protein als im Batch-Verfahren herstellen (Kim und Choi, 1996). Hauptanwendung der CFPS-Reaktion war in den frühen 50ern die Aufklärung des Translationsapparates. Heutzutage dient die CFPS-Reaktion vor allem zur Herstellung von schwer exprimierbaren Proteinen (Jackson et al., 2004). CFPS-Ansätze besitzen keine Zellmembran, stellen ein offenes System dar und besitzen nicht die Integrität einer lebenden Zelle (Freischmidt, 2011). So ist es möglich cytotoxische Proteine zu synthetisieren. Der offene Charakter ermöglicht es zudem eine Fülle an zusätzlichen

Substanzen in dem System zu platzieren. So können Protein-Faltungshelfer, oder Detergenzien welche hydrophobe Bereiche eines Proteins stabilisieren zugegeben werden (Schneider et al., 2010). Einen weiteren Anwendungsbereich stellt das Labeln von Proteinen dar. Hierbei kann kostengünstiger als *in vivo* gearbeitet werden. Zusätzlich können unnatürliche Aminosäuren in das Protein integriert werden (Stigers et al., 2010). Von Vorteil ist zudem, dass ein hoher Durchsatz an unterschiedlichen Ansätzen parallel und in kurzer Zeit möglich ist. Die Leistung der CFPS-Reaktion wird einem bewusst, wenn man bedenkt, dass nur ein PCR-Produkt als Template und nur wenige Minuten für eine CFPS-Reaktion benötigt werden. Somit können in kurzer Zeit ganze Proteinbibliotheken eines Organismus und zusätzlich seine Protein-Protein Interaktionen getestet werden (Freischmidt, 2011). Das Hauptproblem der CFPS-Reaktion ist, dass sie nicht an die Leistung eines *in vivo* Systems heranreicht. Alle Schritte der Translation laufen verlangsamt ab. So ist z.B. die Initiation um den Faktor 340 verlangsamt. Dies wird mitunter auf die mRNA Sekundärstrukturbildung zurückgeführt. Auch die Ribosomen kommen im CFPS-System um den Faktor 26 geringer vor als im lebenden System. Hierbei konnte die Syntheserate bei erhöhter Zugabe von Ribosomen nicht gesteigert werden (Freischmidt, 2011; Underwood et al., 2005). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die CFPS-Reaktion viel Potential besitzt, jedoch noch viele Probleme gelöst werden müssen. Es existieren viele Optimierungsansätze, wie z.B. das Herstellungsverfahren der S30-Extrakte zu verbessern, oder die mRNA zu optimieren (Freischmidt et al., 2013). In dieser Arbeit wird versucht das CFPS-System in Bezug auf seine Zusammensetzung hin zu optimieren, die Auswirkung von hydrostatischem Druck zu beschreiben und Proteine bei tiefer Temperatur zu exprimieren. Zur Übersicht werden die Ziele der einzelnen Themenbereiche vor dem jeweiligen Ergebnisteil angesprochen (Abschn. 5).

1.3 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

Zellen und Zellkompartimente werden in biologischen Systemen durch Biomembranen getrennt. So ist es möglich, dass zwei vollkommen unterschiedliche Zellmilieus gleichzeitig nebeneinander existieren können. Sie sind jedoch nicht unabhängig und benötigen Türen und Fenster zur Kommunikation mit der Außenwelt. Dies bewerkstelligen Membranproteine, welche in die Biomembran integriert sind. Membranproteine sind eine bedeutungsvolle Proteinklasse. Etwa ein Drittel aller medikamentösen Wirkstoffe interagiert mit ihnen (Kaptein und Wagner, 2015). Zusätzlich wird der Transport von

elektrisch geladenen Teilchen über eine Klasse von membranständigen Ionenkanälen bewerkstelligt. Transportiert werden die positiv und negativ geladenen Teilchen stets passiv entlang ihres jeweiligen elektrochemischen Konzentrationsgradienten. Ionenkanäle bewerkstelligen eine Fülle an physiologisch relevanten Aufgaben. So regulieren sie z.B. die Aufrechterhaltung des Säure-Base Haushaltes und die Aufnahme und Ausscheidung von Stoffen in den unterschiedlichen Milieus (Grivel et al., 2014). Vor allem sind sie an der Erregungsweiterleitung in den Muskel- und Nervenzellen beteiligt. Diese Weiterleitung läuft elektrochemisch über spannungsabhängige Kaliumkanäle ab. Diese öffnen oder schließen sich in Abhängigkeit des vorherrschenden Membranpotentials, werden als K_V -Kanäle bezeichnet und in 12 phylogenetisch verwandte Familien unterteilt (Abb. 1.1; Grizel et al., 2014). Die K_V -Kanäle spielen eine zentrale Rolle in einer Vielfalt von zellulären Prozessen, wie z.B. der Erregung und Erregungsweiterleitung von Zellen (Yellen, 2002), der Zellapoptose (Pal SK et al., 2006), dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung, der Freisetzung von Neurotransmittern und Hormonen (Singer-Lahat et al., 2007) und dem reibungslosen Funktionieren der Herztätigkeit (Wang Q et al., 1996). Ein Funktionsverlust der K_V -Kanalaktivität kann zu einer genetischen Dysfunktion wie Epilepsie (Watanabe et al., 2000), zur Taubheit, zu Herz-Rhythmus Störungen und zur Tumorentstehung führen. Zudem wurden Fehlregulationen an K_V -Kanälen der Entstehung von Multiple Sklerose zugesprochen. (Beekwilder et al., 2003; Grizel et al., 2014). Um gegen diese Fülle an Krankheiten anzukommen, ist es essentiell die Funktion und den Regulationsmechanismus des K_V -Kanals näher zu verstehen. Nur so können neue Medikamente entwickelt werden, welche direkt in die Regulation des Kanals eingreifen könnten. Bekannt ist, dass die Kanalaktivität durch medikamentöse Aktivatoren und Blocker beeinflusst werden kann (Milescu et al., 2013).

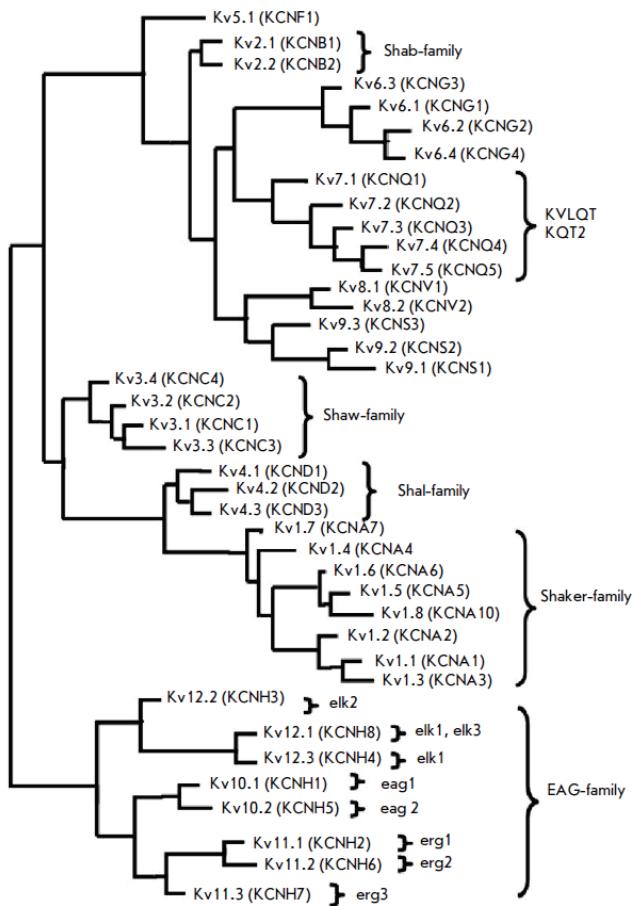


Abb. 1.1: Phylogenetischer Baum der spannungsabhängigen Kaliumkanäle. Die evolutionäre Verwandtschaft basiert auf einem Aminosäuresequenz Alignment. Gleiche Familien sind in Klammern zusammengefasst. Für die spannungsabhängigen Kaliumkanäle existieren zwei unabhängige Nomenklaturen. Die **K_v-Nomenklatur**: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). **KCN-Nomenklatur** (Klammer): Gene Nomenclature Committee of the Human Genome Organisation. (Grizel et al., 2014)

1.3.1 Aufbau und Struktur der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle

Der spannungsabhängige Kaliumkanal ist ein transmembranständiges Protein. Es besteht aus vier unabhängigen Untereinheiten, welche eine tetramere Grundstruktur einnehmen und im Inneren eine zentrale Kanalpore umschließen (Abb. 1.2). Diese Kanalpore ermöglicht den Ionentransport zwischen den Zellkompartimenten. Spannungsgesteuerte Calcium- und Natriumkanäle teilen diese Grundstruktur, jedoch sind die vier Tetramere durch eine Polypeptidkette miteinander verbunden (Yellen, 1998). Die vier Untereinheiten können homotetramer, oder heterotetramer, mit zwei oder mehr nicht identischen Untereinheiten vorkommen (Grizel et al., 2014). Der Aufbau eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals lässt sich in zwei unterschiedliche Strukturelemente unterteilen. Einen zentralen, transmembranständigen, porenbildenden Bereich und einen cytosolisch gelegenen Bereich. Beide Bereiche liegen auf der gleichen Peptidkette (Abb. 1.2). Der Transmembranbereich liegt hoch konserviert in der K_v-Familie vor. Der Cytosolische besitzt

meist mehr oder weniger strukturierte Bereiche, welche regulatorische Funktionen übernehmen und in den K_v -Kanalfamilien unterschiedlich ausgeprägt vorliegen. Er wird in Abschnitt 1.3.4 näher besprochen. Der Zusammenschluss aus beiden Strukturelementen wird als $K_v\alpha$ -Untereinheit bezeichnet. Zusätzlich können spannungsgesteuerte Kaliumkanäle cytosolisch an unabhängige, regulatorische Hilfsproteine binden. Diese werden in der Literatur als $K_v\beta$ -Untereinheiten bezeichnet. $K_v\alpha$ -Untereinheiten bilden die Kanalpore, wobei $K_v\beta$ -Helperproteine der Funktion und Regulation der $K_v\alpha$ -Untereinheit dienen.

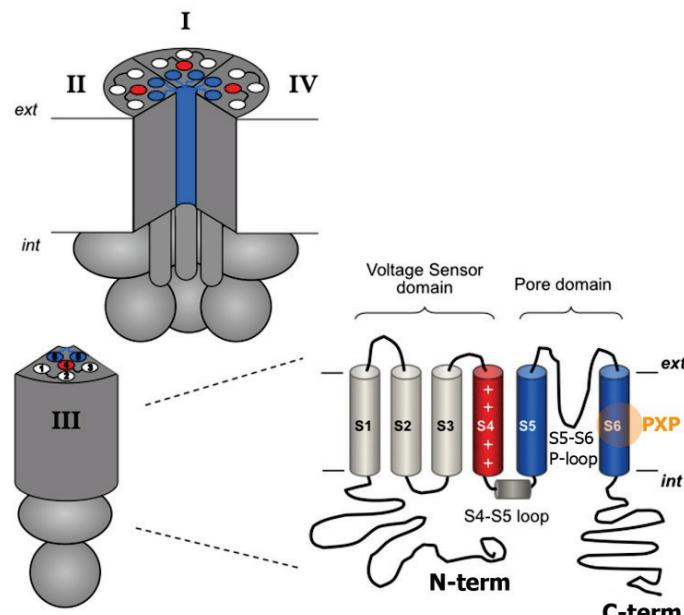


Abb. 1.2: Tetramere Grundstruktur eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals (K_v). Rechts ist ein $K_v\alpha$ -Monomer im klassischen 6-Transmembran (6-TM: α -Helix S1 bis S6) Modell dargestellt. Je nach K_v -Familie können die C- und N-terminalen Reste an Länge und Funktion variieren. Die Helices S1 bis S4 bilden den VSD-Spannungssensor ('voltage-sensing domain'), wobei S4 reich an positiv geladenen Aminosäuren (Arginin) ist. Die Helices S5 und S6 bilden den inneren, hydrophilen Teil der Pore (blaue α -Helices). Die S6 Helix besitzt ein flexibles PXP-Motiv (Prolin-X-Prolin), welches einen Knick in der S6 Helix induziert. Oben ist der tetramere Aufbau eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals dargestellt. Eine $K_v\alpha$ -Untereinheit wurde herausgenommen, um eine Innenansicht zu ermöglichen. Der S5-S6 (P-Loop) ist an dem Kalium-Selektivitätsfilter beteiligt. (modifiziert nach Barros und de la Pena, 2012)

Jede der vier Kanaluntereinheiten besteht aus einer durchgängigen Polypeptidkette, welche 6 transmembranständige α -helikale Bereiche S1 bis S6 ausbildet (Abb. 1.2). Helix S5 und Helix S6 schließen an die zentrale hydrophile Ionenpore. Der Spannungssensor wird von den Helices S1 bis S4 gebildet, wohingegen S4 eine hohe Dichte an positiv geladenen Aminosäuren besitzt. Diese fungieren als Hauptspannungssensor (Yellen, 2002). S1 bis S4 werden in Abb. 1.3 als VSD ('voltage-sensing domain') bezeichnet. Zusätzlich existieren noch Loop-Regionen zwischen den einzelnen TM Helices wie z.B. der S4-S5 Sensorbereich,

welcher als elektrischer Kopplungssensor wirkt oder eine S5-S6 Loop-Region, welche eine zusätzliche kleine Porenhelix (P-Loop) enthält und einen Kalium-Selektivitätsfilter ausbildet. Ein hoch konservierter S6 Helixbereich besteht aus zwei Prolinen, welche gewöhnlich durch ein Val getrennt sind (PXP-Motiv). Diese Region ist flexibel und bei der Kanalöffnung beteiligt (Grizel et al., 2014). In dem hoch konservierten Kv-Transmembranbereich (TM) sind drei funktionelle Elemente verbaut. Ein Kalium-Selektivitätsfilter (SF), ein Spannungssensor (VSD) und Elemente, welche den Verschluss der Kanalpore ermöglichen und regulieren ('gating elements'). Auf die Funktion des Spannungssensors und die Aktivierung eines spannungsabhängigen Kaliumkanals wird in Abschnitt 1.3.3 eingegangen. Zum besseren Verständnis der TM-Domänen wird in Abbildung 1.3 die dreidimensionale Struktur eines spannungsabhängigen Kaliumkanals dargestellt.

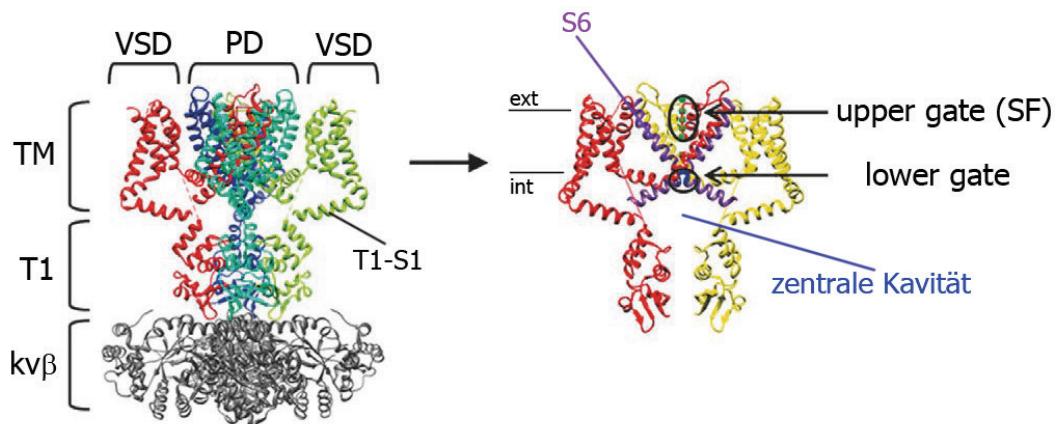


Abb. 1.3: Struktur eines Kv-Kanals: (links) Kristallstruktur des homotetrameren Kv1.2 Kanals (Abschn. 1.3.2). Die vier Kv α -Untereinheiten (UE), bestehend aus den Transmembran- (TM) und den T1-Domänen sind je unterschiedlich farbig dargestellt (rot, gelb, grün, blau). Die Kv β -UE ist grau abgebildet. Die TM und die T1-Domäne sind über den T1-S1 Linker miteinander verbunden. (rechts) Abbildung zweier Kv α -UE mit den verschließbaren Kanalbereichen. 'Upper gate': enthält den Selektivitätsfilter für Kaliumionen (SF). 'Lower gate': die S6-Helix wird lila dargestellt und enthält das PXP-Sequenzmotiv. Die zentrale Kavität ist wasser- und ionengefüllt. (modifiziert nach Grizel et al., 2014)

Spannungsabhängige Kaliumkanäle besitzen zwei Elemente, welche den Verschluss und die Öffnung des Kv-Kanals bedingen. Ein 'Upper Gate', geformt durch den P-Loop und den Selektivitätsfilter auf der Extrazellulären Seite der Membran und ein 'Lower Gate', geformt aus der S6 Helix, welche die Pore nach innen verschließt. Die S6 Helix blockiert oder akzeptiert durch seine dynamische Lage das Eintreten der Ionen in den Kanal. Das 'Upper Gate' (SF) ist beim Kaliumionendurchtritt offen. Beim nicht Vorhandensein von Ionen kommt es zum Kollaps des Filters und somit zum Verschluss des Kanals. Dies ist vor allem

bei der C-Typ Inaktivierung von Interesse und wird in Abschnitt 1.3.5 näher erläutert (Grizel et al., 2014). Bei den meisten K_v -Kanälen ist das 'Lower Gate' das Hauptaktivierungstor, welches durch externe Stimuli, wie ein Membranpotential aktiviert wird (Abschn. 1.3.3). Der zur extrazellulären Seite gerichtete Porenteil beinhaltet den Selektivitätsfilter (SF), welcher den Durchtritt von Kaliumionen durch den Kanal ermöglicht (Abb. 1.3, 'Upper Gate'). Der Selektivitätsfilter schließt mit einer wassergefüllten zentralen Kavität zur cytosolischen Seite hin ab. Der SF-Filter besitzt die Aminosäuresequenz TVGYG. Transportiert werden Kaliumionen durch Abstreifen ihrer Hydrathülle und der Bindung an Carbonyl-Sauerstoffatome in der zentralen Pore. Die Ionen bewegen sich aufgrund der elektrostatischen Abstoßung, ohne eine stabile Bindung auszubilden nach dem "Eimerkettenprinzip" energieneutral durch die Membran (MacKinnon, 2003; Schreier, 2006). In der Literatur wird neben den beiden Kanal-Gating-Elementen aus Abbildung 1.3 noch von einem weiterem Gating-Element gesprochen. Intrazelluläre, cytosolische Domänen wie das N-terminale Ball-Peptid (Abschn. 1.3.4.2), oder Inaktivierungspeptide als Teil von $K_v\beta$ -Helferproteinen (Vacher und Trimmer, 2011) sind in der Lage den Kanalverschluss durchzuführen. Hierbei kann die Regulation direkt (Ball-Peptid), oder indirekt über eine induzierte Konformationsänderung stattfinden (Barros et al., 2014). Die Aldoketoreduktase z.B. ist als $K_v\beta$ -Hilfsprotein an der Kanalaktivität, an der Lokalisierung des Kanals und an den spannungsabhängigen Änderungen des Kanals beteiligt. Mitunter kann sie Träger eines Inaktivierungspeptides sein (Kohout und Isacoff, 2008). Der Zusammenbau der $K_v\alpha$ -Untereinheit findet im endoplasmatischen Retikulum statt, wo ein formstabilier Komplex gebildet wird (Shi et al., 1996). K_v -Kanäle können medikamentös durch Aktivatoren und Blocker reguliert werden. So bindet z.B. das Tarantula-Toxin an die S1-S4 Domäne des $K_v2.1$ Kanals und verhindert dadurch eine Öffnung des Kanals durch die Stabilisierung des geschlossenen Zustandes. Ein gegenteilig wirkendes Medikament ist das Hanatoxin. Es erleichtert die Depolarisation des Kanals (Milescu et al., 2013).

1.3.2 Die 3D-Kristallstruktur des spannungsgesteuerten Kaliumkanals $K_v1.2$

Um die Funktionen und Mechanismen eines Proteins besser verstehen zu können, ist es hilfreich die aufgelöste 3D-Struktur eines Proteins zu kennen. Bei den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen konnte so z.B. der Mechanismus der Kanalöffnung aufgeklärt werden (MacKinnon, 2003; Schreier, 2006). Die erste komplett gelöste 3D-Struktur eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals wurde im Jahre 2005 um die

Arbeitsgruppe von R. MacKinnon vorgestellt. Der Kv1.2 Kanal wurde mit einer Auflösung von 2,9 Å (PDB 2A79) vorgestellt. Die Struktur bestand aus einer Kv α - und einer Kv β -Untereinheit (Abb. 1.4). Nicht zu sehen war das N- und das C-terminale Ende des Kanals, sowie der T1-S1 Linker zwischen der T1-Domäne (Abschn. 1.3.4) und der S1 Helix des Transmembranbereiches (TM). Da vor allem der TM-Bereich der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle hoch konservativ vorliegt, kann die Struktur auf alle Kv-Familienmitglieder (Abb. 1.1) übertragen werden (Schreier, 2006).

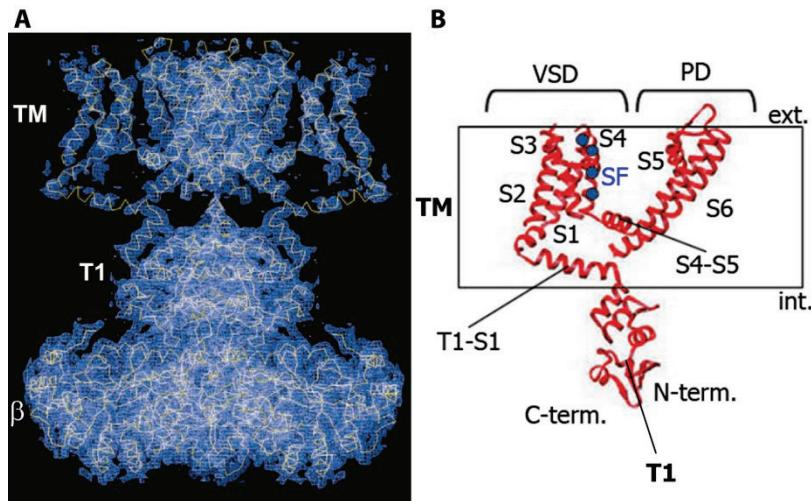


Abb. 1.4: Elektronendichtekarte und strukturelle Orientierung auf dem Kv1.2-Ionenkanal. (A) Elektronendichtekarte und Kristallgitter (Auflösung 2,9 Å) der Kv1.2 Kanalstruktur im Komplex mit einer Kv β -Untereinheit (Long et al., 2005a/b). (B) Darstellung eines Kv α -Monomers. (modifiziert nach Grizel et al., 2014)

1.3.3 Aktivierung und Inaktivierung von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen

Der gängige Aktivierungs- und Inaktivierungszyklus eines Kv-Kanals sieht folgendermaßen aus. Trifft ein elektrochemisches Potential an einem spannungsgesteuerten Kaliumkanal ein, kommt es zu einer induzierten Strukturänderung. Der Kanal muss von seinem geschlossenen Zustand, welcher keinen Ionentransport zulässt, in seinen offenen, aktiven Zustand übergehen. Nach der Aktivierung geht der Kanal wieder in seinen inaktiven Zustand zurück, was über einen vorrübergehenden Zustand der Kv-Inaktivierung geht. Diese drei Kv-Zustände (offen, geschlossen, inaktiv) werden in Abbildung 1.5 dargestellt. Cytosolisch gelegene, intrazelluläre Kv-Bereiche (Abschn. 1.3.2 und 1.3.4) sind an der Kanalregulation und an dem Prozess der Inaktivierung beteiligt. Diese Beteiligung wurde 1973 von Armstrong et al. das erste Mal beschrieben und resultierte in dem klassischen

'Ball-and-Chain' Mechanismus (Abb. 1.5). Er fand heraus, dass ein spannungsabhängiger Kaliumkanal nach einem proteolytischen Verdau nicht mehr in der Lage war in seinen inaktiven Zustand zurückzukehren. Ein weiteres Experiment konnte den Mechanismus der schnellen K_v -Inaktivierung aufdecken und die erste cytosolische Domäne, welche an der Kanalinaktivierung beteiligt ist direkt beschreiben. Ein K_v -Kanal der Taufliege *Drosophila* wurde um ca. 20 AS N-terminal verkürzt. Hierbei konnte das gleiche wie bei Armstrong (1977) beobachtet werden. Der Ionenkanal kehrte nicht in seinen inaktiven Zustand zurück. Daraufhin wurde ein Modell erstellt, indem die N-terminale Domäne (Ball-Peptid) in den Kanal hineingeht und ihn verstopft (Hoshi et al., 1990). Mit dieser Theorie wurde auch das Modell der N-terminalen Schnellinaktivierung (N-Typ Inaktivierung) beschrieben. Jahre später wurde noch die langsamere C-Typ Inaktivierung beschrieben, welche den K_v -Kanal über Strukturänderungen reguliert (Yellen, 1998; Abschn. 1.3.5).

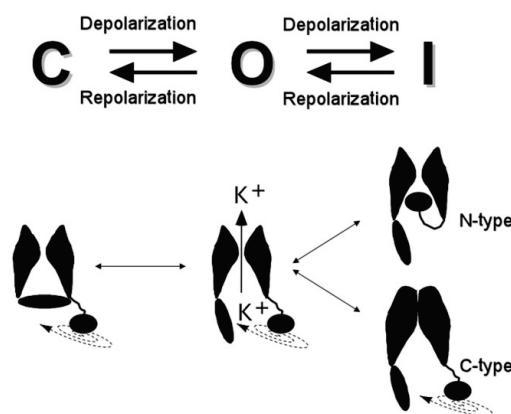


Abb. 1.5: Konformationszustände des spannungsabhängigen K_v -Kanals. (oben) Mögliche K_v -Kanal Konformationen und deren Auslöser. Es gibt drei Zustände: closed (C), open (O) und inactive (I). (unten) Es sind je zwei $K_v\alpha$ -Untereinheiten mit dem Ball-Peptid ('Ball-and-Chain') und die Kanalpore eingezeichnet. Der Kanal wird durch zwei Mechanismen inaktiviert. Die schnelle N-Typ Inaktivierung verschließt den K_v -Kanal mit dem Ball-Peptid. Die C-Typ Inaktivierung führt zu Konformationsänderungen im K_v -Kanal. Abschnitt 1.3.5 beschreibt die beiden Inaktivierungsmechanismen. (Barros und de la Pena, 2012)

Mit der genaueren Beschreibung der Kanalinaktivierung kam die Frage auf, wie das Aktionspotenzial an einer Membran nun zu einem geöffneten Kanal führt. Die Kanalaktivierung an sich ist heutzutage noch eines der am meisten diskutierten Probleme im Gesamtverständnis der K_v -Kanäle. Hierbei existiert eine Fülle von unterschiedlichen Modellen und experimentellen Daten, welche in der Arbeit von Grizel et al. (2014) zusammengefasst worden sind. Grundsätzlich läuft die Aktivierung und die Inaktivierung des K_v -Kanals über unterschiedliche strukturelle Konformationen und Intermediärzustände ab. Ausgangspunkt einer Aktivierung ist der Spannungssensor an der S4 Helix (Abb. 1.2).

Dieser besitzt positiv geladene Aminosäuren (Arginin), welche bei einem ankommenden Aktionspotential mit einer Verschiebung der S4 Helix in der Membranebene reagieren (Schönherr et al., 2002; Yusaf et al., 1996). Zusätzlich besitzt die S4 Helix eine Rotationsfreiheit bei der Aktivierung um ca. 180° (Glauner et al., 1999). Dies deutet schon darauf hin, dass die S4 Helix stabile intermediäre Zustände ausbilden kann. Zum besseren Verständnis der Kanalaktivität wird im folgenden ein einfaches Aktivierungsmodell, das Paddle-Modell, welches bei der Entdeckung einer KvAP Kristallstruktur im Jahre 2003 entstanden ist, vorgestellt.

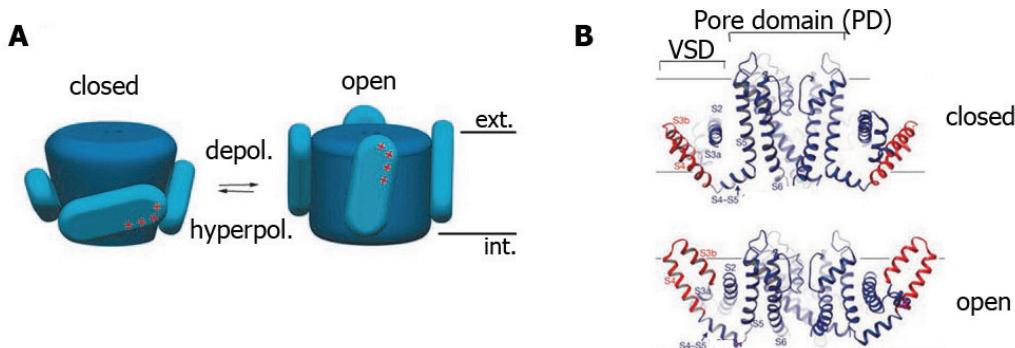


Abb. 1.6: Paddle-Modell: Aktivierung eines Kv-Kanals. (A) Hellblaue Paddles sind in der VSD-Domäne lokalisiert. Mit einem roten "+" sind positiv geladene Arginine in der S4-Helix markiert. (B) Paddle-Modell, übertragen auf die KvAP-Struktur (Jiang et al., 2004) im Offen und Geschlossen Zustand. Paddle S3-S4 ist rot markiert. Zur Erklärung siehe Text. (Grizel et al., 2014)

Das Paddle-Modell wurde etabliert, als die Kristallstruktur von KvAP im Jahre 2003 veröffentlicht worden ist. Es entspricht der damaligen Vorstellung (Jiang et al., 2003; Grizel et al., 2014). Hierbei sind im Paddle-Modell die S3-S4 Helices rund um die Porenachse angeordnet und an der intrazellulären Oberfläche der Membran lokalisiert (Abb. 1.6, Bild A). Ein Teil der S3 Helix und der S4 Helix werden als Paddle bezeichnet. Positive Ladungen von Aminosäuren auf der S4 Helix liegen nahe der intrazellulären Oberfläche des Kanals, wo ein negatives Membranruhepotential vorliegt. Als Reaktion auf eine Depolarisation, wandern die Paddles simultan durch die Membran der Membranaussenseite entgegen. Somit wird die S3-S4 Helix mitgezogen und eine Konformationsänderung induziert. Dieses einfache Modell war der Beginn zum Verständnis der Kanalaktivierung. Mittlerweile haben sich viele Modelle etabliert, welche stets aktualisiert und auch wieder verworfen werden. Um den Kanalöffnungsmechanismus im Gesamten verstehen zu können, muss davon ausgegangen werden, dass es mehrere Kaliumkanal Strukturzustände gibt, welche elektrochemisch und strukturell komplex miteinander gekoppelt sind (Jenson et al., 2012; Bett et al., 2011).

1.3.4 Intrazelluläre Kv1-4 Strukturen

Die Struktur und Funktion der Transmembrandomäne (TM) wurde in den vorherigen Kapiteln besprochen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich hierbei um eine hoch konservative Struktur- und Funktionsform, vorkommend bei allen Kv-Kanälen handelt. Jetzt stellt sich die Frage, wie die cytosolischen Domänen der Kanäle mit der TM-Domäne interagieren. Die cytosolischen Strukturdomänen sind bei den spannungsabhängigen Kanälen weniger hoch konserviert als der TM-Bereich. Da im Zentrum dieser Arbeit der Kv1.4 Ionenkanal steht, wird nun speziell auf die strukturell ähnlichen Kv1 bis Kv4 Ionenkanäle eingegangen (Abb. 1.1). Wie in Abschnitt 1.3.1 kurz erwähnt können die N- und C-terminalen Peptidketten des Kv-Proteins cytosolische Domänen mit unterschiedlichen Funktionen ausprägen (Abb. 1.2). Generell stellt sich die Frage, welche cytosolischen Domänen es gibt, wie sie angeordnet sind und welche Funktion sie besitzen. Das Muster ihrer Anordnung mit der TM-Domäne wird in Abb. 1.7 dargestellt. Zentral unter der TM-ständigen Kanalpore hängt die Tetramerisierungsdomäne T1. Diese ist der S1 Helix im TM-Segment N-terminal auf der Peptidkette angelagert (Abb. 1.8) und ist, wie ihr Name schon andeutet an der Bildung der tetrameren Struktur des Kanals beteiligt. Sie ist durch eine T1-S1 Linkerregion mit dem TM-Bereich verbunden. Der Aufbau zwischen dem TM-Bereich, der T1-Domäne und des S1-T1 Linker wird als '*Hanging Gondola*' bezeichnet (Pischalnikova und Sokolova, 2009). Zwischen der T1-Domäne und dem TM-Bereich liegt ein offener Spaltbereich, welcher den Durchtritt von Kaliumionen zulässt. Der T1-Domäne ist auf der Peptidstruktur N-terminal ein Ball-Peptid angelagert (Abb. 1.8). Dies ist für die schnelle N-Typ Kanalinaktivierung zuständig (Abschn. 1.3.3). C-terminal ist der TM-Domäne, also der S6 Helix folgend ein weiteres Peptid angelagert (Abb. 1.8). Es liegt unstrukturiert und ungefaltet vor, ist frei im Cytosol beweglich (Abb. 1.7, blau) und übernimmt, soweit bekannt regulatorische Kanalfunktionen, welche in Abschnitt 1.3.4.3 näher beschrieben werden (Meyer, 2005; Schreier, 2006).

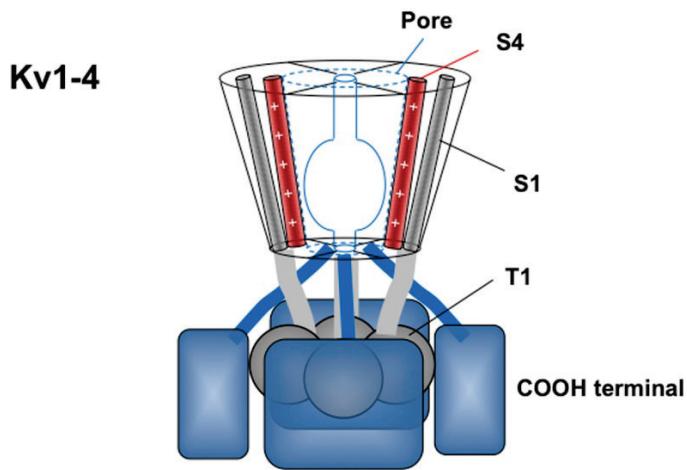


Abb. 1.7: Grundaufbau der Kv1-Kv4 Kanäle. Die Kv-Kanäle besitzen eine homotetramere Anordnung und umschließen eine zentrale Kanalpore durch die Membran. Der S4-Spannungssensor (Abschn. 1.3.3), welcher der hydrophilen Kanalpore zugewandt ist, ist rot gekennzeichnet. Der Kanalpore zentral unterhalb liegt die homotetramere T1-Domäne, welche für die Tetramerisierung der Kv-Kanäle verantwortlich ist. Der transmembrane zentrale Kanal ist durch vier S1-T1 Linker mit der T1-Domäne verbunden. Dieses Strukturmodell wird als '*Hanging Gondola*' bezeichnet. Das C-terminale (COOH terminal) Peptid (Abschn. 1.3.4.3) ist unstrukturiert, höchst flexibel und besitzt einen freien Aktionsradius um die T1-Domäne. (Barros et al., 2012)

Im Laufe der Jahre war es möglich, Strukturmodelle von eher geordneten cytosolischen Domänen zu gewinnen. Die erste homotetramere Kv1.1 T1-Struktur wurde im Jahre 1998 von Kreusch et al. veröffentlicht. Im Jahre 2013 folgte die bis dato höchst aufgelöste T1-Struktur des Kv1.3 Kanals von Kremer et al. mit einer Auflösung von 1.2 Å. Ball-Peptidstrukturen wurden 1997 von Kv3.4 (Antz et al.) und 2003 von Kv1.4 (Wissmann et al.) veröffentlicht. Auf die Kv1.4 Struktur wird in Abschnitt 1.3.4.2 näher eingegangen. Über die Struktur des C-Terminus ist wenig bekannt. Ihm konnten zwar Funktionen zugeordnet werden, jedoch aufgrund seiner ungeordneten Natur keine definierte Sekundärstruktur. Zusätzlich wurden noch andere cytosolische Regionen in den Kv-Kanälen identifiziert, welche z.B. an der Oberflächenexpression, an der Kv-Oligomerisierung und an Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt sind (Barros et al., 2012). Die gängigsten cytosolischen Domänen werden in Abb. 1.8 dargestellt.

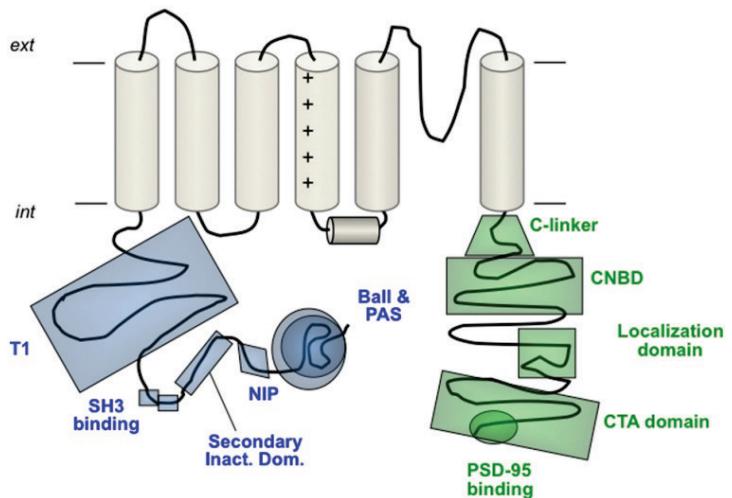


Abb. 1.8: Einteilung cytosolischer Strukturen und funktioneller Domänen von Kv1 bis Kv4 Kanälen. Nicht jeder Kv-Kanal besitzt jede funktionelle Domäne. Im N-terminalen Bereich liegt das Ball-Peptid, verantwortlich für die N-Typ Inaktivierung (Abb. 1.5), eine NIP-Domäne, welche den Kv1.6 vor Schnellinaktivierung schützt, eine zweite Inaktivierungsdomäne welche für den Kv1.4 vorhergesagt wurde (Wissmann et al., 2003), eine doppelte SH3-Bindedomäne beim Kv1.5 Kanal und eine T1-Tetramerisierungsdomäne bei den Kv1-Kv4 Kanälen. Im C-terminalen Bereich befinden sich vor allem Domänen, welche der Lokalisation und der Flexibilität des Kanals dienen. Teils existiert im C-Terminus eine PDZ-Bindedomäne, welche das PSD-95 Protein (post-synaptic density) bindet (Abschn. 1.3.6). (Barros et al., 2012; Moore et al., 2014)

Interessant ist, dass die Anwesenheit einer cytosolischen Domäne bei zwei unterschiedlichen Kv-Kanalfamilienmitgliedern nicht automatisch die gleiche Funktion innehat. So benutzt z.B. der Kv1 Kanal das Ball-Peptid zur alleinigen N-Typ Kanalinaktivierung, wohingegen es bei dem Kv4 Kanal eine untergeordnete Rolle für die Inaktivierung besitzt. Kv4 wird durch eine Kopplung zwischen dem Spannungssensor ('upper gate') und dem cytoplasmatischen Kanaltor ('lower gate') inaktiviert (Abb. 1.3; Gebauer et al., 2004; Barghaan et al., 2008/09). Zusätzlich wird die Kv4 Inaktivierung durch eine Bindung zwischen einem amphipathischen N-terminalen Peptidbereich und positiven Ladungen auf dem C-terminus bestimmt (Jerng und Covarrubias, 1997). Im folgenden werden die cytosolischen Domänen besprochen, welche relevant für diese Arbeit sind.

1.3.4.1 Die Kv1.4 T1-Tetramerisierungsdomäne

Die T1-Domäne vereint in sich zentrale Elemente der Kanalfunktion. Sie ist verantwortlich für den Zusammenschluss vierer Kv α -Monomere zu einem funktionstüchtigen, tetrameren Kv-Kanal (Gulbis et al., 1999). Lokalisiert ist die T1-Domäne auf der Kv-Peptidkette zwischen dem äußersten N-terminus, welcher als Kanalinaktivierungspeptid fungieren kann und der

S1-Helix des TM-Segmentes (Abb. 1.8). Sie ist direkt zentral unter der Kanalpore, nahe der cytoplasmatischen Kanalöffnung lokalisiert (Barros et al., 2014). Eine große Anzahl an unterschiedlichen K_v T1-Strukturen wurde bereits gelöst. In Abbildung 1.9 wird die T1-Tetramerisierungsdomäne von Kv1.1 der Seeschnecke (*Aplysia californica*, PDB 1A68, Kreusch et al., 1998) gezeigt. Sie besitzt einen mehrstöckigen, tetrameren Aufbau, welcher in eukaryotischen K_v -Kanälen (Kv1.1 bis Kv1.6) hoch konserviert vorliegt (Liu et al., 2005).

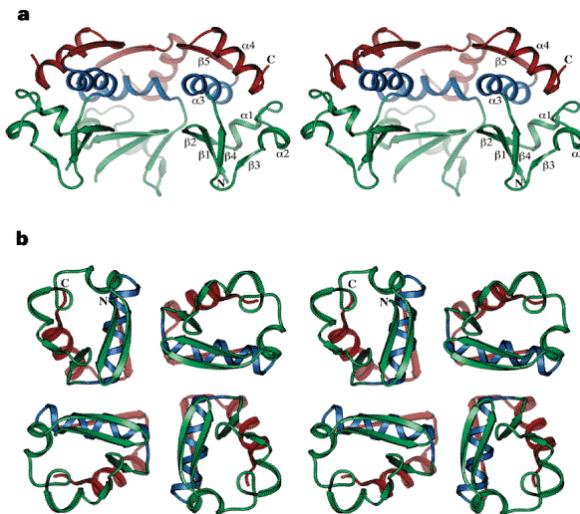


Abb. 1.9: Kristallstruktur einer T1-Domäne. Kv1.1 T1-Tetramer der Seeschnecke (*Aplysia californica*, PDB 1A68). **(a)** Seitenansicht (die Zellmembran liegt oben, das Cytosol unten) **(B)** Ansicht von oben und unten auf das T1-Tetramer. (Kreusch et al., 1998; Schreier, 2006).

Das T1-Tetramer wird mittig von einer Pore durchzogen, welche jedoch nicht mit dem Durchtritt von Kaliumionen in Verbindung gebracht wird (Kremer et al., 2013). Die C-terminale, der Kanalpore zugewandte Seite ist unpolär und reich an α -helicalen Abschnitten. Die N-terminale β -Faltblatt reiche Seite ist dem Cytosol zugewandt und besitzt einen eher polaren Charakter (Minor et al., 2000). Dieser polare Strukturbereich dient als Bindestelle zu $K_v\beta$ -Hilfsproteinen (Abschn. 1.3.1; Gulbis et al., 2000). Im Inneren der T1-Domäne liegt der hoch konservierte hydrophobe Hauptkern, welcher durch die Ausbildung von Wasserstoff- und Salzbrücken stabilisiert wird (Liu et al., 2005). Die Interaktionsflächen zwischen den T1-Domänen in dem T1-Tetramer sind eher hydrophiler Natur, was für eine regulatorische, kurzzeitige und flexible Interaktion spricht (Minor et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass schon minimale Änderungen an der T1-Domäne die Kanaleigenschaften deutlich verändern. So resultierte eine einfache Mutation (T46V) in einem stabileren K_v -Kanal, welcher den geschlossenen Zustand bevorzugte (Minor et al., 2000). Neueste Entdeckungen postulieren, dass das T1-Tetramer nicht einfach starr

vorliegt, sondern unterschiedliche Konformationen während der dynamischen Kanalfunktion einnehmen kann (Kremer et al., 2013). Hierbei wird für die Funktion der Kanalaktivität ein Gleichgewicht an unterschiedlichen T1-Konformationszuständen vorhergesagt, welche an die funktionellen Kanalzustände gekoppelt sind (Kremer et al., 2013). Die T1-Domäne geht zusätzlich Wechselwirkungen mit anderen cytosolischen Kv-Domänen ein. Seine Interaktion mit dem N-terminalen Inaktivierungspeptid wird im folgenden Abschnitt 1.3.4.2 besprochen.

1.3.4.2 Das N-terminale Kv1.4 Ball-Inaktivierungspeptid

In Abschnitt 1.3.3 wurde über die Inaktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen berichtet. Hierbei wurde über die schnelle N-Typ Kanalinaktivierung mittels Ball-Peptid berichtet. Zusätzlich existiert noch eine langsamere C-Typ Inaktivierung, welche in Abschnitt 1.3.5 beschrieben wird. Wie in Abschnitt 1.3.4 beschrieben befindet sich eine lange, relativ unstrukturierte und flexible Peptidkette (174 Aminosäuren) der Kv1.4 T1-Domäne N-terminal angehängt (Fan et al., 2012). Am äußersten N-terminalen Ende befindet sich die 20-25 Aminosäuren lange Ball-Peptidsequenz (Bett et al., 2011). Diese bindet bei der Kanalinaktivierung in die Kanalpore und verschließt ihn somit (Abb. 1.10; Bild B). Bei Verlust des N-terminalen Peptides an der Kanalstruktur geht die N-Typ Schnellinaktivierung verloren (Hoshi et al., 1990). Das für diese Arbeit relevante N-terminale Inaktivierungspeptid von Kv1.4 wurde im Jahre 2003 von Wissmann et al. gelöst. Abbildung 1.10 (Bild A) zeigt die NMR-Struktur der ersten 55 Aminosäuren des N-terminalen Kv1.4 Inaktivierungspeptides. Nicht alle Kv-Ionenkanäle sind Träger von N-terminalen Inaktivierungspeptiden. Hierbei können mitunter auch Inaktivierungspeptide an Kv β -Hilfsproteinen befestigt sein (Abschn. 1.3.1). Zusätzlich zu dem Ball-Peptid wurde eine zweite Inaktivierungsdomäne identifiziert (Abb. 1.8). Diese sollte in der Lage sein, den Kanal bei der N-Typ Inaktivierung zum Cytosol hin zusätzlich abzuschließen und liegt etwas hinter dem Ball-Peptid (Wissmann et al., 1999).

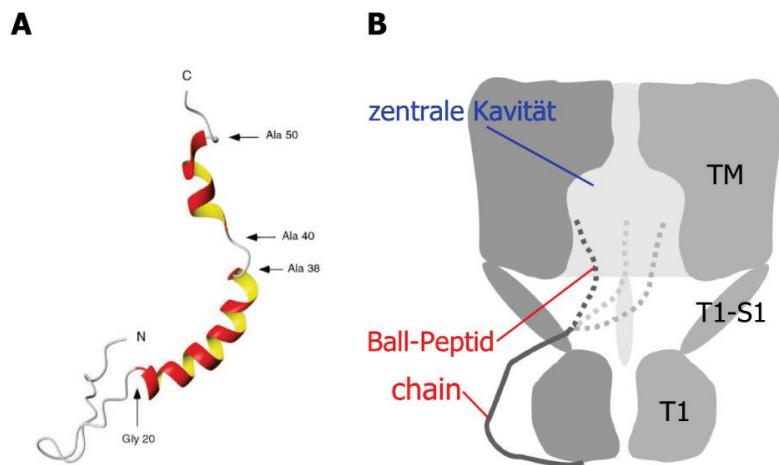


Abb. 1.10: Struktur und Orientierung des N-terminalen Inaktivierungspeptides im Kv-Kanal. (A) Struktur der ersten 60 Aminosäuren (AS) von Kv1.4 (Wissmann et al., 2003). N-terminal ist das Ball-Peptid (ca. 20 AS) lokalisiert. Anschließend folgt eine α -Helix (AS 20-38), welche mehrere positive Ladungen besitzt und in der Lage ist mit dem T1-S1 Linker elektrostatische Wechselwirkungen einzugehen (Fan et al., 2012). Die zweite, kürzere α -Helix (AS 40-50) besteht aus hydrophoben AS und dient möglicherweise zum Abschluss und zur Positionierung des Ball-Peptides in der Kanalpore (Wissmann et al., 2003). (B) Orientierung und Lage des Ball-Peptides in der Kanalpore. (modifiziert nach Venkataraman et al., 2014)

Es konnte gezeigt werden, dass das Ball-Peptid bei der N-Typ Inaktivierung an der Innenseite des Kanals in der zentralen Kavität bindet (Abb. 1.3; Zhou et al.; 2001. Baker et al., 2006). Nicht eindeutig geklärt ist die Funktion der Kette, welche zwischen dem Inaktivierungspeptid und der T1-Domäne auf dem Peptidstrang lokalisiert ist. (Abb. 1.10; Bild B). Hierbei wurde ein Mechanismus eingeführt, welcher die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen N-terminus und dem neg. geladenen T1-S1 Linker verknüpft (Fan et al., 2012). Dies würde die Orientierung des Ball-Peptides zu dem Kanalinneren elektrostatisch unterstützen und zudem die Wegfindung des Ball-Peptides erleichtern. Zudem wurde erkannt, dass eine Verbindung zwischen T1-Domäne und S4-S5 Linker eine wichtige Rolle für die schnelle Inaktivierung besitzt (Holmgreen et al., 1996; Baker et al., 2006). Weniger bekannt ist über die Lokalisation des Ball-Peptides während des Kanalöffnungsmechanismus. Spekuliert wird darüber, ob das cytosolische Inaktivierungspeptid um die T1 Domäne gewickelt, oder im cytosolischen Raum frei lokalisiert vorliegt (Abb. 1.7 und Abb. 1.10). Bei der Kanalöffnung, also bei einer Depolarisation der Membran kommt es zu einem offenen Bereich des Kanals an dem S1-T1 Linker, so dass das Ball-Peptid in den Kanal zu einer Tasche (Kavität) oberhalb der T1 Domäne eindringen kann (Baker et al., 2006; Barros et al., 2012.; Gulbis et al., 2000). Dieser Spalt ist für das Ball-Peptid groß genug (Varhsney et al., 2004). Zusätzlich wurde gezeigt,

dass ein einzelnes Ball-Peptid für die erfolgreiche Inaktivierung eines Kv-Kanals ausreicht (Venkataraman et al., 2014).

1.3.4.3 Der Kv1.4 C-Terminus

Neben der schnellen N-Typ Kanalinaktivierung (Abschn. 1.3.4.2) existiert bei Kv-Kaliumkanälen noch die langsame C-Typ Inaktivierung. Diese wird in Abschnitt 1.3.4.4 genauer besprochen. Die N-Typ Inaktivierung wird durch das N-terminale Ball-Peptid (Abschn. 1.3.4.2), hingegen die C-Typ Inaktivierung durch Konformationsänderungen (z.B. Kollaps Selektivitätsfilter) in der gesamten Kv-Kanalstruktur ausgelöst (Wang et al., 2011; Bett et al., 2012). Über die Rolle des C-Terminus bei der N-Typ und C-Typ Inaktivierung ist wenig bekannt. Bekannt ist, dass es bei einer schrittweisen Deletion des C-Terminus nie zu einem kompletten Verlust der C-Typ Inaktivierung kommt (Bett et al., 2010). Jedoch kommt es bei einer C-terminalen Verkürzung des Kv-Kanals zu einer Verlangsamung der C-Typ Inaktivierung ohne die Spannungsabhängigkeit oder Ionenselektivität des Kanals zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich an der C-Typ Inaktivierung beteiligt sein könnte (Sankaranarayanan et al., 2005; Schreier, 2006). Bei anderen Kv-Kanälen ist ein Zusammenspiel von N- und C-terminalen Resten an der Inaktivierung beteiligt (Hatano et al., 2004). Hierbei stellt sich die Frage, wie intrazelluläre Domänen bei der C-Typ Inaktivierung strukturverändernde Informationen, vor allem auf weit entfernte Bereiche wie die Kanalpore oder den Selektivitätsfilter übertragen können. Spannungsabhängigen Kaliumkanäle regulierten ihre Ionenleitfähigkeit über konformationelle Strukturänderungen nach einem eintreffenden Membranpotential. Die Verschiebung zwischen unterschiedlichen Kv-Konformationszuständen scheint ein Grundmechanismus zu sein. So wäre es durchaus denkbar, dass cytosolische Domänen die Kv-Struktur mehr oder weniger umfassend beeinflussen können (Wang et al., 2011). Die Arbeitsgruppe um Uysal et al. (2011) konnte den Einfluss von cytoplasmatischen Domänen am Selektivitätsfilter auf das Level der Inaktivierung des KcsA Kalium-Kanals zeigen. Im Falle des Kv C-Terminus konnte noch keine 3D-Struktur gelöst werden. Wissenschaftliche Ergebnisse deuten an, dass sie höchst unstrukturiert und flexibel vorliegt (Meyer, 2005; Magidovich et al., 2007). Elektronenmikroskopische Bilder (EM-Bilder) konnten hier wichtige Informationen über die Lage des C-Terminus in dem Kv-Ionenkanal liefern (Sokolova et al., 2003). Hierbei wurde ein Kv-Wildtyp mit einer Kv-(ΔC)-Mutante verglichen (Abb. 1.11).

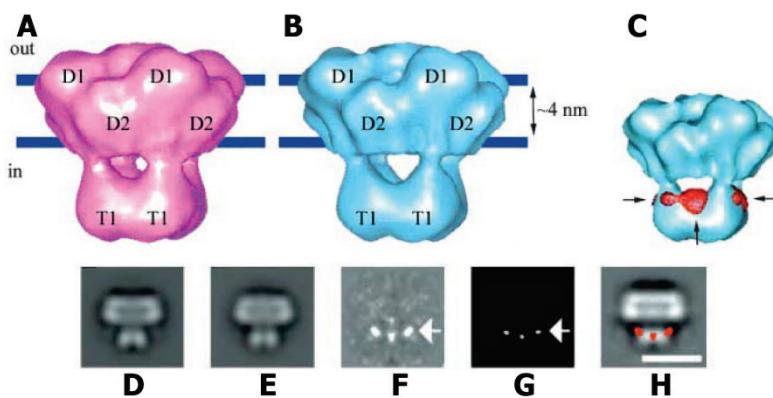


Abb. 1.11: 3D-Struktur und EM-Bilder eines spannungsgesteuerten K_v WT und K_v ΔC Kanals.
(A)(D) 3D-Struktur des K_v WT-Kanals. D1 und D2 sind transmembranständige Domänen. T1 entspricht der T1-Tetramerisierungsdomäne (Abschn. 1.3.4.1). Blaue Linien repräsentieren die Zellmembran. **(B)(E)** 3D-Struktur des K_v ΔC -Kanals. **(C)(F)(H)** Unterschied zwischen dem K_v WT und dem K_v ΔC -Kanal. In Strukturbild C und H sind die unterschiedlichen Bereiche rot markiert. Diese Bereiche entsprechen der Lage des C-Terminus. **(G)** Bereiche mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen dem K_v WT und K_v ΔC Kanal. (modifiziert nach Sokolova et al., 2003)

Abbildung 1.11 verdeutlicht, dass das C-terminale Peptid eines K_v -Kanals bei einer Strukturdarstellung nahe der T1-Tetramerisierungsdomäne lokalisiert ist. Es liegt nicht frei schwimmend im Cytosol vor, sondern ist an die T1-Domäne angelagert. Dies ist möglich, da das Ende der S6-Helix (Abb. 1.2) sich in der unmittelbaren Umgebung befindet. Die Arbeitsgruppe um Sokolova et al. (2003) konnte zeigen, dass sich das C-terminale Peptid bei An- und Abwesenheit eines $K_v\beta$ -Hilfsproteins unterschiedlich an die T1-Domäne anlagerte. Bei Anwesenheit von $K_v\beta$ reichte das Peptid über die komplette T1-Domäne bis zu dem $K_v\beta$ Protein in einer getreckten Konformation hinab. Ohne $K_v\beta$ -Hilfsprotein lief der C-Terminus die T1-Domäne hinab, vollführte eine Art konformationelle Umorientierung und lief die T1-Domäne wieder hinauf (Abb. 1.12). Aufgrund der geringen Auflösung der elektronenmikroskopischen Bilder ist dies jedoch schwierig zu beweisen. Klar ist, dass das C-terminale Peptid mit der T1 Domäne interagiert (Sokolova et al., 2003). Nicht geklärt ist, ob oder welchen Einfluss diese Bindung auf die Kanalinaktivierung besitzt. Das C-terminale Peptid besitzt am äußersten Ende ein PDZ-Bindemotiv (EDTV-Sequenzmotiv, Sheng et al., 1995). Dies bindet mit dem PSD-95 (Post-Synaptic Density-95) Protein, welches in Abschnitt 1.3.6 näher erläutert wird.

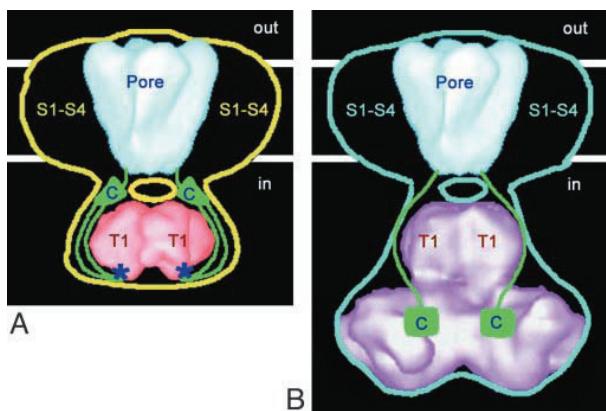


Abb. 1.12: Mögliche Lokalisation des Kv C-terminus an der Kv T1-Domäne. Der Kv C-Terminus ist an die Kv T1-Domäne angelagert und nicht frei im Cytosol beweglich. **(A)** Kv-Kanal ohne Kv β -Untereinheit **(B)** Kv-Kanal mit Kv β -Untereinheit. (Sokolova et al., 2003)

1.3.5 Zusammenspiel der N-Typ und C-Typ Inaktivierung beim Kv1.4 Kanal

Der spannungsgesteuerte Kv1.4 Kanal wird über ein Zusammenspiel der N- und C-Typ Inaktivierung, welche im Kanal molekular getrennt sind, reguliert. Grundlegend wird davon ausgegangen, dass es mehr Konformationszustände, als nur einen Open und einen Close Zustand des Ionenkanals gibt (Abb. 1.5; Bett et al., 2011; Cuello et al., 2010). Es müssen fließende Zwischenzustände existieren, welche die schnelle N-Typ Inaktivierung und langsamere C-Typ Inaktivierung miteinander verknüpfen (Bett et al., 2011). Zusammenfassend sei erwähnt, dass die schnelle N-Typ Inaktivierung durch das Ball-Peptid nur stattfindet, wenn der Kanal sich im Offen-Zustand befindet (Ayer et al., 1997). Durch die Deletion des N-Terminus geht die N-Typ Inaktivierung verloren (Armstrong et al., 1977). Die C-Typ Inaktivierung findet bereits statt, bevor der Kanal in den Offen-Zustand übergeht (Bett et al., 2011), da sie zusätzlich stets für die Rückführung des Kanals in seinen inaktiven Zustand verantwortlich ist (Ayer et al., 1997). Die C-Typ ist weniger gut definiert als die N-Typ Inaktivierung. Neben den Kaliumkanälen konnte sie außerdem bei den Calcium Kanälen detektiert werden (Zhang et al., 1994). Die C-Typ Inaktivierung ist durch extrazelluläre und intrazelluläre Einflüsse beeinflussbar. So ist sie abhängig von der extrazellulären Ionenkonzentration (Lopez-Barneo et al., 1993) und kann durch Mutationen auf der extrazellulären Seite nahe der Porenöffnung manipuliert werden (Busch et al., 1991). Mittels Quinidine kann sie intrazellulär gehemmt werden (Wang et al., 2003), ist vom osmotischen Zelldruck abhängig und wird durch intrazelluläre Mutationen an der Porenseite beeinflusst (Jiang et al., 2003). Das Zusammenspiel aus Kanalaktivierung und Inaktivierung läuft über viele Konformationszustände ab. Bei der Kanalaktivierung durch ein

Aktionspotential fließen ungehindert Kaliumionen durch die Pore. Der Kaliumstrom im Selektivitätsfilter stabilisiert nun die Porenstruktur (Consiglio et al., 2004). Dadurch liegt der Kanal in einen Strukturzustand vor, wo das Ball-Peptid binden kann (Ayer et al., 1997). Durch dessen Protein-Protein Interaktion kommt es zu einer erneuten Strukturänderung des Kanals, indem Kaliumionen aus dem Selektivitätsfilters verschwinden. Durch Zusammenbruch des Selektivitätsfilters geht der Kanal schneller in einen C-Typ Inaktivierungszustand über (Morales et al., 1996). Durch die oben erwähnte Abhängigkeit der C-Typ Inaktivierung von inneren und äußeren Einflüssen, ist es nicht verwunderlich, dass N-Typ induzierte Strukturänderungen am Kanal die C-Typ Inaktivierung beschleunigen und induzieren (Bett et al., 2011). Die Bindung des N-terminal gelegenen Ball-Peptides wird hier als eine Art Katalysator gesehen, um die C-Typ Inaktivierung zu beschleunigen (Bett et al., 2011). Für die C-Typ Inaktivierung müssen zwei Bedingungen erfüllt sein. Ein Zusammenbrechen des Selektivitätsfilters und eine allosterische Kopplung zwischen dem Bereich des cytosolischen Kanalendes, sowie auch auf der extrazellulären Seite des Kanals (Fedida et al., 2001). Hierbei stellt sich die Frage, inwiefern die T1-Domäne und der C-Terminus bei der C-Typ Inaktivierung involviert sind. Für die T1 Domäne werden, wie auch bei der Transmembrandomäne des Kv-Kanals mehrere Konformationszustände vorausgesagt (Kremer et al., 2013).

Eine weitere Studie beschäftigt sich mit dem Einfluss der S6 Helix mit seinem PXP-Motiv (Abb. 1.2) auf die Kanalaktivität und seine unterschiedlichen Strukturkonformationen. Das PXP-Motiv erhöht die Flexibilität in der S6 Helix, was eine schnelle Kanalöffnung ermöglicht (Abb. 1.3; Ding et al., 2005). Mutationsversuche in der PXP-Region können zum Funktionsverlust des Kanals führen (Imbrici et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass großflächige Kv-Strukturveränderungen für die C-Typ Inaktivierung, sowie auch für die N-Typ Inaktivierung nötig sind (Bett et al., 2012). Hierbei konnte ein Zusammenhang zwischen dem Selektivitätsfilter und der Orientierung der S6 Helix für die Kanalaktivierung sowie auch Inaktivierung detektiert werden (Cuello et al., 2010).

1.3.6 Der C-Terminus und das PSD-95 Protein

PSD-Proteine (Post-Synaptic Density) gehören in die Familie der Gerüstproteine. Sie werden auch als SAP-Proteine (Synapse-Associated Protein) bezeichnet. Diese umfasst vier Familien: PSD-95, SAP-97, SAP-102 und SAP-93 (chapsin-110) (Kim und Sheng, 2004). Das PSD-95 Protein gehört zu den Membran-assozierenden Guanylkinasen (MAGUK). Durch die Palmitoylierung zweier N-terminal lokalisierter Cysteine liegt es in der Membran verankert vor (Pegan et al., 2007; Topinka und Bredt, 1998). Jedes PSD-Protein ist aus den gleichen Domänen zusammengesetzt, welche in Abbildung 1.13 dargestellt sind. Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V -Kanäle) interagieren über ihr PDZ-Bindemotiv lokalisiert am äußersten C-Terminus (Abb. 1.8) mit den PSD-95 Proteinen über ihre PDZ-Domänen. Zwei physiologisch relevante Zusammenhänge dieser Protein-Protein Interaktion sind bis heute geklärt. Erstens wird so die Dichte von multimeren, K_V -Kanalhaltigen Komplexen im postsynaptischen Spalt reguliert und zweitens kann das PSD-95 Protein die Expression des K_V1 Kanals in cVSMc-Zellen (cerebral vascular smooth muscle cells) regulieren (Magidovich et al., 2007; Christopher et al., 2014). Dies wird über eine Phosphorylierung durch die Protein Kinase A durch ein Zusammenspiel zwischen dem K_V1 Kanal und dem PSD-95 Protein ermöglicht (Joseph et al., 2011).

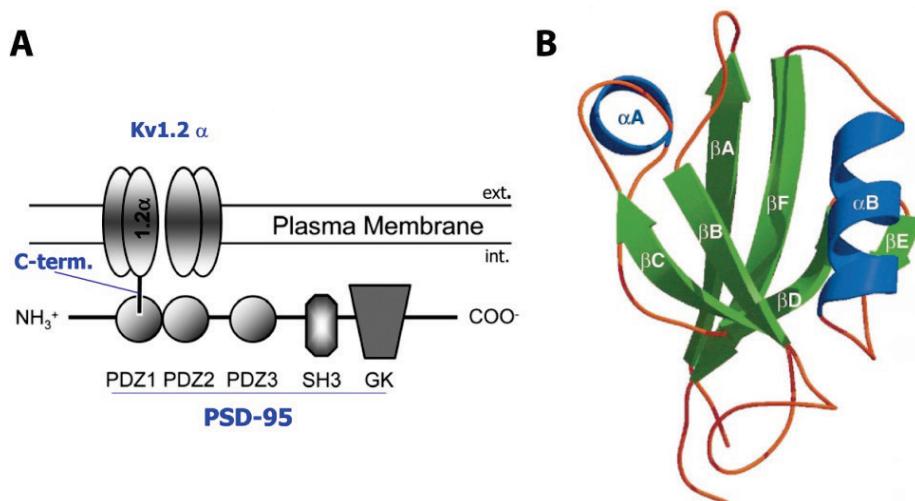


Abb. 1.13: Schematische Darstellung von PSD-95 und der PDZ2-Domäne von PSD-95 (Post-Synaptic Density 95). (A) Darstellung der Interaktion zwischen dem C-terminalen Ende von $K_V1.2$ mit der PDZ1 Domäne des PSD-95 Proteins. Das PSD-95 Protein besitzt drei PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne (Src-homology) und eine GK-Domäne (guanylate kinase). **(B)** 'Ribbon'-Darstellung der PDZ2-Domäne von PSD-95. (modifiziert nach Moore et al., 2014; Tochio et al., 2000)

1.4 Ziele der Arbeit

Die Arbeit ist in zwei voneinander unabhängige Themenblöcke unterteilt. Der erste Themenblock beschäftigt sich mit der zellfreien Proteinsynthese und untersucht das zellfreie Proteinexpressionssystem auf Einflüsse wie Temperatur, hydrostatischen Druck und seine Auswirkung auf zusätzlich zugegebene translationsrelevante Proteine. Zentrales Element von Themenblock zwei ist der spannungsgeladene Kaliumkanal Kv1.4. Hierbei stehen die Wechselwirkungen und Einflüsse seiner cytosolischen Domänen untereinander im Mittelpunkt.

Die zellfreie Proteinsynthese besitzt im Vergleich zu der klassischen Proteinproduktion im lebenden Organismus zahlreiche Vor- und Nachteile. Der größte Vorteil ist, dass das System offen, unabhängig und damit flexibel in seiner Zusammensetzung von einer Zelle als lebende Institution ist. Es kann mit Substanzen, wie z.B. Membranprotein stabilisierenden Detergenzien zusätzlich ausgestattet werden. Somit können schwer zu synthetisierende und auch für den Expressionswirt normal zytotoxische Proteine synthetisiert werden. Größter Nachteil jedoch ist, dass das zellfreie System im Vergleich zu der Synthese von Proteinen im herkömmlichen Sinn mit der Syntheseausbeute nicht konkurrieren kann. Zudem gibt es keine Garantie, dass auch jedes Protein in der zellfreien Synthese zuverlässig hergestellt werden kann. Somit ist es nötig die limitierenden Grenzen eines zellfreien Proteinsynthesystems zu erweitern. Dazu werden in der Wissenschaft die unterschiedlichsten Ansätze verfolgt. Von der Optimierung der Herstellung des Extraktes, bis zur Optimierung des Energieregenerationssystems wird alles versucht. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den unterschiedlichen Untersuchungsansätzen. Zum Beispiel wird der Einfluss von hydrostatischem Druck auf den Proteinsyntheseapparat im zellfreien System untersucht. Basierend auf der Arbeit von Freischmidt (2011) wurde die zellfreie Proteinsynthese bei niedrigerer Temperatur weiter erforscht. Bei der zellfreien Proteinsynthese laufen stets unspezifische Nebenreaktionen ab, welche die Syntheseleistung dramatisch reduzieren. Bei einer Temperatursenkung werden diese, genau wie aber auch die Syntheseausbeute reduziert. Die Proteinausbeute der zellfreien Synthese konnte jedoch unter Optimierung der mRNA Sekundärstruktur bei dem Testprotein wieder deutlich gesteigert werden. Zusätzlich sinkt bei einer Temperaturreduzierung die Aktivität von transkriptions- und translationsrelevanten Enzymen. Ziel war nun die sinkende Aktivität der transkriptionsrelevanten T7-RNA Polymerase durch mehr Zugabe wieder zu erhöhen. Somit sollte wieder mehr Protein

synthetisiert werden. Ein weiterer Ansatz basierte zudem auf der Arbeit von Freischmidt (2011). Damals wurde versucht das zellfreie Proteinsynthesesystem in seiner Zusammensetzung in Bezug auf translationsrelevante Proteine zu optimieren. Diese Optimierung wurde erneut aufgegriffen und weitere translationsrelevante Protein zusammensetzungen getestet. Zu guter Letzt wurde in dem Themenblock der zellfreie Proteinsynthese der pH-Wert bei einer CFPS-Reaktion NMR-spektroskopisch verfolgt.

In der Forschung um spannungsgesteuerte Kaliumkanäle werden zwei Ziele großgeschrieben. Einerseits wäre man gerne im Besitz einer hochauflösenden 3D-Struktur eines Gesamtkanals mit allen seinen cytosolischen Domänen und andererseits wüsste man gerne mehr über das gegenseitige Zusammenspiel der cytosolischen Domänen. Viel ist bekannt darüber, welche Eigenschaften und welchen Einfluss die cytosolischen Domänen auf die Kanalaktivität besitzen und welche physiologischen Reaktionen sie induzieren und hervorrufen können. Weniger bekannt darüber ist, was diese Aktivitäten auf der jeweiligen Struktur der unterschiedlichen Domänen auslösen. Mit dem nun stetig steigendem Wissen um die dreidimensionalen Strukturen der cytosolischen Domänen ist es nun möglich, diese Domänen rekombinant herzustellen und ihre Wechselwirkungen biotechnologisch zu untersuchen. In dieser Arbeit wird dies unter Verwendung der NMR-Spektroskopie durchgeführt. Sie besitzt den großen Vorteil, dass Proteine in löslicher und physiologisch korrekter Umgebung untersucht werden können. Zudem ermöglicht sie den direkten Blick auf die atomare Ebene. So ist es bei NMR-spektroskopischen Protein-Protein Interaktionsversuchen theoretisch möglich, jede Aminosäure zu betrachten, zu verfolgen und Veränderungen zu detektieren. Das zentrale Protein in diesem Themenblock stellt die T1-Tetramerisierungsdomäne des Kv1.4 Kaliumkanals dar. Ziel dieser Arbeit ist es die T1-Domäne in Wechselwirkung mit den jeweilig äußersten N- und C-Terminalen Enden des Kv1.4 Ionenkanals zu untersuchen. Diese sind in der physiologischen Kanalstruktur eng aneinander orientiert. Um ein besseres Verständnis für spannungsabhängige Kaliumkanäle zu erhalten, werden die Ergebnisse mit Erkenntnissen aus der Literatur verglichen. Zudem ist Ziel die jeweiligen N- und C-terminal gelegenen Sequenzabschnitte näher zu charakterisieren. Der C-Terminus des Kv1.4 Ionenkanals wird zusätzlich auf seine Interaktion mit der PDZ2-Domäne des PSD-95 Proteins hin untersucht. Ziel ist es herauszufinden, welche Beziehung der C-Terminus, die T1-Domäne und das PSD-95 Protein zueinander besitzen.

2. Material

2.1 Bakterienstämme

Tab. 2.1: Bakterienstämme

STAMM	GENOTYP
<i>E. coli</i> TG-1 (Lucigen)	F'[traD36 lacI ^q Δ(lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺] glnV (supE) thi-1 Δ(mcrB-hsdSM)5 (r _K ⁻ m _K ⁻ McrB) thi Δ(lac-proAB)
<i>E. coli</i> XL1-Blue (Stratagene)	endA1 gyrA96 (nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ) M15] hsdR17 (r _K ⁻ m _K ⁺)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS (Novagen)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm
<i>E. coli</i> Rosetta™(DE3)pLysS (Novagen)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE2 (Cam ^R)
<i>E. coli</i> BL21 Star™(DE3) (Invitrogen)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm rne131 (DE3)
One Shot® TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i> (Invitrogen)	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ ⁻

2.2 Plasmidvektoren

Tab. 2.2: Plasmidvektoren

PLASMID	
pET-14b (Novagen)	T7-Prom., Ap ^R , N-term. His ₆ -Tag, Thrombin-SST
pET-19b (Novagen)	T7-Prom., Ap ^R , N-term. His ₁₀ -Tag, Enterokinase-SST
pET-20b+ (Novagen)	T7-Prom., Ap ^R , C-term. His ₆ -Tag, Thrombin-SST
pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen)	Kan ^R , Ap ^R ,
pK7-CAT (Kim et al., 1996)	5'UTR identisch pET-14b, Kan ^R

2.3 Proteine (Enzyme)

Die folgende Tabelle enthält alle verwendeten Proteine (Enzyme), welche für diese Arbeit verwendet wurden.

Tab. 2.3: Proteine (Enzyme)

PROTEIN (ENZYM)	Hersteller
Aminoacyl-tRNA Synthetasen (<i>E. coli</i>)	Sigma Aldrich
Creatinkinase	Roche
DNase I	Roche
Lysozym	GERBU Biotechnik GmbH
Murine RNase Inhibitor	New England Biolabs
Phusion™ - High Fidelity DNA-Pol.	Finnzymes (New England Biolabs)
Restriktionsenzyme	Fermentas (Thermo Scientific)
RiboLock™ - RNase Inhibitor	Fermentas (Thermo Scientific)

RNase-free DNase Set	Qiagen
T4 DNA-Ligase	Fermentas, New England Biolabs
Taq DNA-Polymerase	Fermentas, New England Biolabs, Qiagen
Thrombin	Merck

2.4 Oligonukleotide

Tabellarisch werden alle Oligonukleotide aufgelistet, die als Primer in PCR-Reaktionen verwendet worden sind. Hierbei sind die Schnittstellen unterstrichen, Vorsequenzen kursiv und die Start- und Stopcodons gelb hervorgehoben. Türkis hervorgehoben ist die Sequenz einer Thrombinschnittstelle.

Tab. 2.4: Oligonukleotide

NAME	Sequenz 5'→3'	T _{Ann}
PSD-95/PDZ2		
5' - NdeI	<i>CCCCAT</i> ATG CTGGAAATGAAAGTGATGGAA	58°C
3' - BamHI	<i>CCCGGATC</i> CTT AGCTCGGTTTCGCCAC	56°C
C84M		
5' - NdeI	<i>CCCCAT</i> ATG GAAACCGAAAATGAAGAACCA	54°C
3' - XbaI	<i>CCCCAT</i> GAGA ACATCGGTTCAACGGC	54°C
T1K		
5' - NdeI	<i>CCCCAT</i> ATG GAACGCGTTGTTATTAAATGTAA	58°C
3' - XbaI	<i>CCCCTCGAGG</i> TCGCGCGCGACCAGACCCAGCTGATAGAATTTCAG	60°C

2.5 Kits und Kitbestandteile

Tab. 2.5: Kits und Kitbestandteile

KIT	Hersteller
Ni-NTA Spin Columns	Qiagen
PureYield™ Plasmid Miniprep System	Promega
QUIAGEN® Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
S30 T7 High-Yield Protein Expression System	Promega
TOPO TA® Cloning Kit	Invitrogen
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system	Promega

2.6 Chromatographie-Säulen (ÄKTA System)

Tab. 2.6: Chromatographie - Säulen (ÄKTA System)

SÄULE	Säulenvolumen	Material/Hersteller
HisTrap™ HP	1 - 5ml	Ni-NTA (GE)
Ni-NTA Superflow	zw. 10-50 ml	Ni-NTA (GE)
HiTrap Benzamidine FF (high sub)	1 - 5 ml	Benzamidine (GE)
HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	120 ml	Superdex 75 (GE)
HiLoad 26/600 Superdex 200 pg	320 ml	Superdex 200 (GE)

2.7 Ausgangsplasmide

Tab. 2.7: Ausgangsplasmide

DNA-Konstrukt	Inhalt/Verwendung	Hersteller
pK7-CAT	Test-Plasmid (CFPS)	Dr. Roland Hofweber (2006)
pK7-csCAT	Test-Plasmid (CFPS)	Dr. Axel Freischmidt (2011)
TL-Faktoren	Test-Plasmide (CFPS), CFPS Zusätze	Dr. Axel Freischmidt (2011)
(IF, EF, TF) - pET-14/20+		
pET-20b - T1K	T1K-Domäne (K _v 1.4)	Dr. Christina Schreier (2006)
pET-41a - IP75	N-Term. Inaktivierungspeptid (K _v 1.4)	Dr. Ralf Wissmann (2003)
pET-19b - C84	C-Term. Peptid (K _v 1.4)	Doris Wiedemann (2005)
pAR1219	T7-RNA Polymerase	Dr. Roland Hofweber (2006)

2.8 Wichtige Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.8: Wichtige Verbrauchsmaterialien

Material		Hersteller
ZelluTrans/Roth T1	19mm - MWCO 3500	Roth
ZelluTrans/Roth T2	50mm - MWCO 6000-8000	Roth
Steritol	100ml - 500 ml	Millipore
Flaschenaufsatzfilter		
Vivaspin	2, 6, 20 ml	Sartorius Group, Göttingen

2.9 Chemikalien

Verwendete Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Merck, usb, MP Biomedicals und Roth in Analysequalität bezogen. Isotopenreine Chemikalien ¹⁵NH₄Cl und D₂O (99%) wurden von Spectra Stable Isotopes, Columbia (MD, USA) bezogen. Von anderen Herstellern bezogene Chemikalien werden im Methodenteil erwähnt.

2.10 Geräte

Tab. 2.9: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
4°C Kühlschrank		Privileg
-20°C Kühlschrank		Liebherr
-80°C Kühlschrank	VX530 Series 2	Jouan
Agarose Gelkammer	Rotiphorese ^R Kammer Professional II	Rotiphorese ^R
Brutschrank	EB 53	Jouan
CCD Kamera	E.A.S.Y. 429 K	Herolab
Digital Graphic Printer	UP-D 890	Sony
Eismaschine	AF 100	Scotsman
Feinwage	CP64, BP61S	Sartorius

FPLC-Anlage	ÄKTAfplc™, ÄKTA-micro	GE Healthcare
Heizblöcke	Dri-Block® DB-2D, QBD1	Techne, Grant
Heizblock mit Schüttler	Thermomixer compact/comfort	Eppendorf
HPLC	System Gold® 125 Solvent Module mit System Gold® 166 Detector	Beckmann
Inkubator	AJ 110	INFORS AG
Lyophilisation	Kühlfalle RCT 60 mit SpeedVac RC 10	Jouan
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph
Mikrowelle	R-26ST	Sharp
Netzgerät	Power Pac 300	Bio-Rad
NMR-Spektrometer	Bruker Avance 600/800 MHz mit Cryoprobe TXI Avance Probenkopf	Bruker Biospin GmbH
Ofen	Max. 250°C	Heraeus
pH-Meter	Φ 32 pH Meter	Beckmann
Photometer	Lambda Bio +	PerkinElmer
Schüttler	PROMAX 1020	Heidolph
SDS-Gelkammer	Mini-Gele	cti
Sterilbank	MSC. 12 GS V G 2XE	Jouan
Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf
Tischzentrifugen	Biofuge pico Mini Spin	Heraeus Eppendorf
Transilluminator	White/UV Transilluminator	Ultra-Violet Products
Ultraschallgerät	J-17A	Branson
Ultrazentrifuge	L-70	Beckmann
Vortex	Vortex-Genie 2™	Scientific Industries
Waage	PM600	Mettler
Wasseraufbereitung	PURELAG Ultra	Elga
Wasserbad	Heiz und Schüttelfunktion	Memmert
Zentrifugen	Model J-6B, Avanti™ J-20, Acanti™ J-25	Beckmann

2.11 Computerprogramme

Tab 2.10: Computerprogramme

Programm	Verwendung	Hersteller/URL
Abalone	Biomolecular simulations (MD)	Agile Molecule
Adoble Creative Suite 5.5	Bildbearbeitung	Adobe
Auremol™	Auswertung und Darstellung von NMR-Spektren	Department of Biophysics and Physical Biochemistry RGBG/GER Bruker Biospin GmbH
Bioedit	DNA-Sequenzanalysen	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html
EMBL und NCBI	Datenbanken für DNA- und Proteinsequenzen	http://www.ebi.ac.uk/embl/ und http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Databse/
EASY IMAGE Plus	CCD Kamera	Herolab
ExPASy -Compute pi/MW tool	pi MW Berechnung	http://web.expasy.org/compute_pi/
Gold Chromatography	HPLC-Steuerung	Beckmann

Data System V**1.7**

NEBcutter V2.0	Restriktionsschnittstellen DNA	http://tools.neb.com/NEBcutter2/
NCBI Blast	DNA/Protein Sequenzvergleiche	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Office Suite 2007	Graphen, Textbearbeitung	Microsoft
Origin^R V6.0	Datenanalyse	Microcal Software, Inc.
RNAfold	RNA Sekundärstrukturberechnung	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi
SigmaPlot 10	Datenanalyse	Systat Software 2006
Translate Tool	Translation von DNA in Proteininsequenzen	http://expasy.org/tools/dna.html
Topspin NMR 3.1	NMR-Software	Brucker Biospin GmbH
UNICORN™	ÄKTAfplc™ Steuerung	Amserham
Control System		

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kulturmedien von Bakterien

Flüssigkulturen von Bakterien wurden als Übernachtkulturen (ÜNK) angezogen. Hierbei wurde das erforderliche Volumen mit den gewünschten Antibiotika (Tab. 3.2) versetzt und mit Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur, von einer Agarplatte oder aus einer flüssigen Bakterienkultur mittels einer sterilen Pipettenspitze angeimpft. ÜNK wurden in der Regel über Nacht zwischen 30° C und 37° C und unter Schütteln zwischen 180 - 220 rpm inkubiert. Unterschiedliche Medien werden in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1: Flüssigmedien von Bakterien

Medium	Bestandteile	Lagerung
LB-Medium	10 g/l Bakto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl	Autoklavieren Lagerung bei 4° C
2xYT Medium	16 g/l Baktro-Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl	Autoklavieren Lagerung bei 4° C
NMM (New Minimal Medium) nach S. Wohlgemuth (Geyer et al. 1997)	<u>Minimalmedium:</u> (900 ml) Na ₂ HPO ₄ (7,5g); KH ₂ PO ₄ (3,0g); NaCl (0,5g); MgSO ₄ x 7 H ₂ O (0,25g); CaCl ₂ x 2 H ₂ O (0,014g) <u>SL-6 Stammlösung:</u> (1 l) ZnSO ₄ x 7H ₂ O (100mg); MnCl ₂ (30mg); H ₃ BO ₃ (300mg); CoCl ₂ x 6 H ₂ O (200mg); CuCl ₂ x 2 H ₂ O (10 mg); NiCl ₂ x 6 H ₂ O (20mg); Na ₂ MoO ₄ (30mg) <u>10 x SL-4 Stammlösung:</u> (45 ml) EDTA (250mg); FeSO ₄ x 7 H ₂ O (100mg)	Sterilfiltration (Steritop-Filter, Millipore) Lagerung bei 4° C Sterilfiltration Lagerung bei 4° C Sterilfiltration (stets frisch ansetzen)
	<u>Ansatz NMM:</u> (1 l) Minimalmedium 900 ml SL-Mix 10 ml Glucose 2 g/L (C ₁₂ /C ₁₃) NH ₄ Cl 1 g/L (N ₁₄ /N ₁₅)	Sterilfiltration Lagerung bei 4° C Lösungsmittel: H ₂ O/D ₂ O

Tab. 3.2: Antibiotika Stammlösungen

Antibiotikum	Stammlösung	Lösungsmittel	Lagerung	Konzentration im Medium
Ampicillin	50 mg/ml	H ₂ O	-20° C	1:1000 (50µg/ml)
Carbenicillin	50 mg/ml	H ₂ O	-20° C	1:1000 (50µg/ml)
Kanamycin	50 mg/ml	H ₂ O	-20° C	1:1000 (50µg/ml)
Chloramphenicol	34 mg/ml	Ethanol	-20° C	1:1000 (34µg/ml)

3.1.2 Bestimmung der Bakteriendichte

Die Bakteriendichte wurde photometrisch ermittelt. Hierbei wurde die optische Dichte des Bakterienmediums bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen eine Nullprobe (Medium ohne Bakterien) bestimmt. Eine OD₆₀₀ von 1 entsprach bei einem Zentimeter Schichtdicke der Küvette einer Bakterienzahl von 8x10⁸ Zellen pro ml.

3.1.3 Glycerinkulturen von Bakterien

Bakterien wurden bei -80° C als Glycerinkulturen gelagert. Hierzu wurden 900 µl einer ÜNK mit 200 µl 87 % Glycerin (15 % Endkonzentration) versetzt, in flüssigem Stickstoff (N₂) eingefroren und bei -80° C gelagert.

3.1.4 Bakterienkulturen auf festen Nährmedien

Zur Herstellung von Agarplatten wurde LB-Agar (Tab. 3.3) bei 90° C im Wasserbad oder in der Mikrowelle verflüssigt. Nach einer Abkühlphase auf ca. 60° C wurde das passende Antibiotikum zugegeben und das Medium in Petrischalen gegossen. Nach Erstarren des LB-Agars wurden die Petrischalen umgedreht (Kondenswasser) und in einem 37° C Brutschrank getrocknet. Die Agarplatten waren mehrere Wochen bei 4° C haltbar. Aufgetragen wurden Bakterien mit einer sterilen Pipettenspitze, oder einem Drigalskipatell. Bakterienkolonien wurden meist auf Agarplatten über Nacht im Brutschrank bei 37° C gezogen.

Tab. 3.3: LB-Agar

Lösungen	Herstellung	Lagerung
LB-Agar	LB-Medium (siehe Tab. 3.1) 15 g/l Agar	autoklavieren Lagerung bei 4° C
Antibiotika	Antibiotika (siehe Tab. 3.2)	(siehe Tab. 3.2)

3.1.5 Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien

Bakterien zur DNA Fremdaufnahme wurden nach Chung *et al.* (1989) chemisch kompetent gemacht. Ein Milliliter einer ÜNK, des kompetent zu machenden Bakteriums wurde bei 37° C und 200 rpm in einem 100 ml Volumen bis zu einer OD von 0,3 - 0,4 gezogen und anschließend auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden 10 min bei 4° C, mit 3000 g abzentrifugiert und das Pellet in 2,5 ml ($^{1/40}$ Kulturvolumen) TSS (4° C) resuspendiert. Je 100 µl TSS Zellvolumen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80° C gelagert.

Tab. 3.4: TSS-Medium

Lösung	Herstellung	Lagerung
TSS "transformation and storage solution"	LB Medium (Tab. 3.1) 10% (w/v) PEG 3350 oder 8000 5% (v/v) DMSO 40 mM Mg ²⁺ (MgSO ₄ oder MgCl ₂)	pH 6,5 Sterilfiltration Lagerung bei -20° C

3.1.6 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Ein Aliquot eines chemisch kompetenten Bakteriums (Abschn. 3.1.5) wurde auf Eis aufgetaut und mit ca. 10 bis 200 ng Plasmid-DNA vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 30 bis 60-sekündiger Hitzeschritt bei 42° C, wonach der Ansatz sofort wieder auf Eis gestellt wurde. Unter Zugabe von 800 µl LB-Medium wurde der Ansatz bei 37° C eine Stunde bei 200 rpm geschüttelt. Davon wurden 100 µl auf einer Agarplatte (Abschn. 3.1.4) mit passendem Antibiotikum (Tab. 3.2) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37° C inkubiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Spektrophotometrische Messung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierbei wurde die OD₂₆₀ einer beliebigen Nukleinsäure in Lösung bestimmt und gegen eine Nullprobe (z.B. H₂O, Puffer) gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entsprach bei DNA 50 ng/µl, bei RNA 40 ng/µl und bei Oligonukleotiden 30 ng/µl.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um DNA *in vitro* selektiv zu vermehren. Hierbei wird die Reaktion in drei Schritte unterteilt. Bei der Denaturierung wird die zu replizierende doppelsträngige DNA aufgeschmolzen. Beim Annealing lagern sich spezifisch designete Oligonukleotide (Abschn. 3.2.2.1) am 5'-Ende des DNA-Einzelstrangs an. Abschließend repliziert eine hitzestabile DNA-Polymerase den Einzelstrang vom 5' zum 3' Ende und ein neuer Doppelstrang entsteht bei der Elongation. Dieses Prinzip wird mehrmals wiederholt, sodass es zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Doppelstrangs kommt. In dieser Arbeit wurden ausschließlich proteincodierende DNA-Sequenzen kloniert. Benötigte Sequenzen konnten bei Datenbanken wie EMBL (Heidelberg) oder NCBI (National Center for Biotechnology) herausgesucht werden. Anschließend wurden passende Primer (Abschn. 3.2.2.1) und passende DNA-Quellen (z.B. cDNA von *Rattus Norvegicus*) bestimmt.

3.2.2.1 Primerdesign

Speziell designete Oligonukleotide (DNA-Primer) sind bei PCR-Reaktionen (Elongation) der Startpunkt für RNA Polymerasen (Abschn. 3.2.2). DNA-Primer sind sequenzspezifisch, hybridisieren nicht untereinander und bilden keine Sekundärstrukturen aus. Beide Primer (5' und 3') müssen in etwa die gleiche Annealingtemperatur aufweisen, welche mit einer Formel (s.u.) bestimmt wurde. Hierbei wurden nur die Basen berechnet, welche mit der DNA hybridisieren.

$$T_{\text{Annealing}} = 2^{\circ}\text{C} \cdot (A + T) + 4^{\circ}\text{C} \cdot (C + G)$$

3.2.2.2 PCR-Reaktion

Bei PCR-Reaktionen wurde die Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes, NEB) verwendet. Das Pipettierschema wird in Tabelle 3.5 dargestellt. Als Template-DNA konnte Plasmid-DNA (10-100 ng) oder genomische DNA (100-500 ng) verwendet werden. Die Reaktion erfolgte im PCR-Thermocycler mit dem in Tabelle 3.6 angegebenem Programm. Das Ergebnis der Reaktion wurde mittels der Agarose Gelelektrophorese (Abschn. 3.2.5) überprüft.

Tab. 3.5: Pipettierschema einer PCR-Reaktion (Phusion-Polymerase)**Ansatz**

- template-DNA
- 10 µl 5x Phusion Reaktionspuffer
- 5 µl dNTPs (2 mM je Nukleotid; New England Biolabs)
- 0,5 µl Phusion™ DNA-Polymerase (2 U/µl; Finnzymes)
- 1 µl 5`Primer (10 µM)
- 1 µl 3`Primer (10 µM)
- add. H₂O 50 µl

Tab. 3.6: PCR-Programm (Phusion Polymerase)

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	2 min	98° C	1
Denaturierung	30 s	98° C	
Annealing	30 s	Primer- spezifisch	ca. 35 Zyklen
Elongation	20 s/ 1000 bp	72° C	
Finale Elongation	7-10 min	72° C	1
Kühlung	∞	4° C	∞

3.2.2.3 Kolonie-PCR

Mittels Kolonie-PCR konnte überprüft werden, ob DNA-Plasmide erfolgreich in ein Bakterium transformiert wurden. Hierbei konnten Primer, welche an die DNA-Sequenz oder an das Plasmid binden verwendet werden. Kolonie-PCRs wurden mit der Taq DNA-Polymerase (New England Biolabs) durchgeführt. Hierzu wurde der Reaktionsansatz aus Tabelle 3.7 zusammenpipettiert und in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurde der zu untersuchende Bakterienklon mittels eines sterilen Holzzahnstochers gepickt, eine Kontrolle auf einer zusätzlichen Agaroseplatte fixiert und das Stäbchen in das Reaktionsgefäß gesteckt. Kolonie-PCRs wurden mit dem in Tabelle 3.8 gezeigtem Programm im PCR-Thermocycler durchgeführt.

Tab. 3.7: Pipettierschema einer Kolonie-PCR**Ansatz**

- 2,5 µl Taq DNA-Polymerase 10x (Puffer/MgCl₂)
- 2,5 µl dNTPs (2 mM je Nukleotid; New England Biolabs)
- 0,25 µl 5`Primer (10 µM)
- 0,25 µl 3`Primer (10 µM)
- 0,5 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl NEB, Qiagen, Fermentas)
- add. H₂O 25 µl

Tab. 3.8: PCR-Programm einer Kolonie-PCR

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	2 min	95° C	1
Denaturierung	30 s	95° C	
Annealing	30 s	Primer- spezifisch	ca. 30 Zyklen
Elongation	60 s / 1000 bp	72° C	
Finale Elongation	10 min	72° C	1
Kühlung	∞	4° C	∞

Das Ergebnis der Reaktion wurde mittels der Agarose Gelelektrophorese (siehe 3.2.5) überprüft. Zur besseren Kontrolle konnte das DNA-Fragment mittels Restriktionsenzymen (Abschn. 3.2.3) zusätzlich aus dem Plasmid herausgeschnitten werden.

3.2.3 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme (Fermentas, NEB) ermöglichen es, DNA an sequenzspezifischen, palindromischen Stellen zu spalten. Hierbei können je nach verwendetem Restriktionsenzym unterschiedliche DNA-Überhänge ("sticky ends") entstehen. Wurde das Plasmid und das DNA-Fragment mit dem selben Restriktionsenzym geschnitten, entstanden identische, einzelsträngige DNA "sticky ends", welche miteinander verbunden werden konnten (Abschn. 3.2.8). Im Anschluss der Reaktion erfolgte ein 10-minütiger Hitzeschritt zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme bei 90° C. Der Reaktionsansatz wird in Tabelle 3.9 dargestellt. Mittels der Agarose Gelelektrophorese (Abschn. 3.2.5) konnte der Erfolg überprüft werden.

Tab. 3.9: Pipettierschema Restriktionsverdau

Ansatz	Reaktion
- 1 µg DNA	37° C
- 2 µg 10x Reaktionspuffer	15 min
- 1 µl je Restriktionsenzym	
- add. 20 µl H ₂ O µl	

3.2.4 Reinigung von Vektoren und PCR-Fragmenten in Lösung

Plasmide und DNA-Fragmente mussten nach einem Restriktionsverdau (Abschn. 3.2.3) oder bei Klonierungsschritten von unnötigen Verunreinigungen zur erfolgreichen Weiterverarbeitung befreit werden. Dazu wurde das Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) und das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet.

3.2.5 Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von unterschiedlich großen DNA-Fragmenten aufgrund ihrer negativen Ladungsdichte. Damit wandert in einem elektrischen Feld eine kleine Nukleinsäure schneller durch eine stabile, homogene Agarosematrix zur positive geladenen Anode als eine große Nukleinsäure. Die Trennschärfe ist von der Agarosekonzentration im SB-Puffer abhängig. Bei 1 %igen Gelen wird eine optimale Auftrennung von Fragmenten zwischen 500-7000 bp ermöglicht.

Tab. 3.10: Lösungen für die Agarose Gelelektrophorese

Lösungen	Herstellung	Lagerung
SB-Puffer	10mM NaOH → Borat bis pH 8,0	20x Pufferstammlösung Lagerung bei RT
6x DNA-Ladepuffer	60% Glycerin 60mM EDTA 0,25% Xylenxyanol 0,25% Brompholblau	Lagerung bei 4°C
Ethidiumbromid SYBR Green I		Lagerung 4°C (dunkel)

In der Mikrowelle wurden ein Gramm Agarose in 100 ml 1x SB-Puffer erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 50° C wurde 1 µg/ml Ethidiumbromid oder SYBR Green I zugegeben. Anschließend wurde die Lösung in die Gelapparatur gegossen (Gelkamm) und bis zum Erstarren gewartet. Aufgetragen wurden die DNA-Proben (1:6 Verdünnt mit DNA-Ladepuffer) und ein Standard-DNA-Leiter (100 bp, 1 kbp, New England Biolabs), zur Bestimmung von Fragmentgrößen. Die Elektrophorese fand bei ca. 120 V statt und konnte mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und mit einer Kamera dokumentiert werden.

3.2.6 Reinigung von Vektoren und PCR-Fragmenten aus Gelen

Plasmide und DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des Wizard^R SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega) und des QIAEX II^R Gel Extraction Kits (Qiagen) wiedergewonnen. Hierbei wurden die gewünschten Banden auf dem Agarosegel (Abschn. 3.2.5) mit einem Skalpell ausgeschnitten und mittels der Kits aufgereinigt.

3.2.7 TOPO^R TA Cloning^R Kit

Das Topo^R TA Cloning^R Kit (Invitrogen) wurde verwendet, um PCR-Fragmente in einem TOPO^R Vektor zwischenzulagern. Hierbei gab es zwei Vorteile. Erstens konnte das DNA-Insert in einer Glycerinkultur stabil gelagert und mittels *E. coli* beliebig vermehrt werden und zweitens konnte garantiert werden, dass die Restriktionsenzyme die Fragmente aus dem pCR^R 2.1-TOPO^R Vektor richtig heraustrennten (Test durch Agarose Gelelektrophorese, Abschn. 3.2.5). Somit konnte der Erfolg der Ligation mit dem gewünschten Zielvektor gesteigert werden.

3.2.8 Ligation

Bei der Ligation wird ein DNA-Fragment mit einem Plasmid verknüpft. Bedingung war, dass beide Teile mit dem identischen Restriktionsenzymen geschnitten worden sind (Abschn. 3.2.3). Es galt, je länger das Insert ist, desto länger wurde die Ligation angesetzt. Bei der Transformation wurde der komplette Ligationsansatz (Abschn. 3.1.6) eingesetzt.

Tab. 3.11: Pipettierschema Ligationsansatz

Ansatz	Reaktion
- 100-200 ng Plasmid	1-3 min bei 37° C
- ca. 4-facher Überschuss des Inserts zum Plasmid	ÜN bei 16° C
- 2 µl T4-DNA Ligase 10x Reaktionspuffer (Fermentas, NEB)	
- 1 µl T4-DNA Ligase (5 U/µl; Fermentas, NEB)	
- add. H ₂ O 20 µl	

3.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde isolierte Plasmid-DNA für Klonierungen, Transformationen, DNA-Sequenzierungen und für die CFPS ('cell-free protein synthesis') benötigt. Hierbei kam das Quiagen^R Plasmid Midi Kit (Qiagen) oder das PureYield^R Plasmid Miniprep System (Promega) zum Einsatz. Plasmid-DNA wurde im Gefrierschrank bei -20° C gelagert.

3.2.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GENEART AG (Life Technologies, Regensburg) und von der Firma SEQLAB GmbH (Göttingen) durchgeführt. Dazu wurden 10 µl DNA (100 ng/µl) benötigt. Primer zum Sequenzieren, wie z.B. der T7-Promotorprimer wurden zur Verfügung gestellt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Die SDS-PAGE ('sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis') ist eine analytische Methode zur Trennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Durch die Anwendung von SDS werden die Proteine denaturiert und mit negativen Ladungen versehen. Somit wandern die Peptidketten in einem Acrylamid-Gel ihrer Größe entsprechend in einem elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode und werden aufgetrennt. Das SDS-Gel besteht aus Sammel und Trenngel (Tab. 3.13). Die Proteine wurden bei 95° C 10 min mit SDS-Probenpuffer (1:1) aufgekocht und vor dem Auftragen kurz gevortext. Die Elektrophorese fand bei 32 mA für ca. 60 min statt. Tabelle 3.12 beinhaltet die nötigen Lösungen.

Tab. 3.12: SDS-PAGE Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Lagerung
Lösung A	Rotiporese [®] Gel 30 (37,5:1; 30% (w/v) Acryamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid; Roth)	lichtgeschützt RT
Lösung B	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	RT
Lösung D	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	RT
SDS	20 % (w/v) SDS (Natriumdodecylsulfat)	RT
APS	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	-20° C
TEMED	Roth	4° C
Laufpuffer	6 g/l Tris 28,8 g/l Glycin 1 g/l SDS	RT keine pH Einstellung nötig

1x SDS-Probenpuffer	100 mM Tris-HCl 1 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerin 5 % (v/v) Mercaptoethanol Spatelspitze Bromphenolblau	lichtgeschützt RT
----------------------------	---	----------------------

Tab. 3.13: Pipettierschema Trenngel und Sammelgel

Lösungen	Trenngel					Sammelgel
	8 %	10 %	12 %	15 %	16 %	8 %
Lösung A	2,5 ml	3,13 ml	3,75 ml	4,5 ml	4,8 ml	1,5 ml
Lösung B/D	5 ml (B)	5 ml (B)	5 ml (B)	5 ml (B)	5 ml (B)	2,55 ml (D)
20 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
H₂O	2,35 ml	1,7 ml	1,05 ml	0,35 ml	50 µl	5,85 ml
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

3.3.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

SDS-Gele aus Abschnitt 3.3.1 konnten mittels Coomassie Blue (Tab. 3.14) unspezifisch angefärbt werden. Hierbei wurde das SDS-Gel in Coomassie-Färbelösung in der Mikrowelle aufgekocht und für 10 min auf einem Schüttler geschwenkt. Anschließend wurde mit Coomassie Entfärber nach dem gleichen Prinzip entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Tab. 3.14: Färbe- und Entfärbelösung

Lösung	Zusammensetzung
Coomassie Färbelösung	2 g/l Coomassie Brilliant Blue R250 0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue G250 45 % (v/v) Ethanol (100 %) 10 % Essigsäure (100 %)
Coomassie Entfärber	20 % Ethanol (100 %) 10 % Essigsäure (100 %)

3.3.3 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Proteine wurden rekombinant mittels *E. coli* (Rosetta™, BL21) exprimiert. Ausgangsbasis jeder Proteinexpression war eine Übernachtkultur (Abschn. 3.1.1) des passenden *E. coli* Stammes mit integriertem DNA-Plasmid Konstrukt. Eine neue Flüssigkultur wurde im Verhältnis 1:20 angeimpft und das Bakterium bei 30° C bis 37° C unter Schütteln (160-220 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 bis 0,9 (Abschn. 3.1.2) inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (100 µM - 1 mM Endkonzentration; Sigma) induziert. Die

Expressionsbedingungen waren stets dem Konstrukt angepasst. Standardmäßig wurde 4 Stunden bei 37° C mit 1 mM IPTG exprimiert. Anschließend wurden die Bakterien (10 min, 3000 g, 4° C) geerntet und bei -20° C gelagert. Mit einer SDS-PAGE (Abschn. 3.3.1) konnte die Proteinexpression überprüft werden.

3.3.4 Nickel-Affinitätschromatographie

Proteinmotive, bestehend aus mehreren Histidinen, binden stets an Materialien, welche mit Nickel-Chelaten überzogen sind. Dies entspricht dem Funktionsprinzip der Ni-Affinitätschromatographie. Rekombinante Proteine sind hierbei N- oder C-Terminal mit His₆₋₁₀-tag Bereichen verbunden und werden über diese Bereiche selektiert. Diese Aufreinigungen sind sowohl im nativen, sowie auch im denaturierten Proteinzustand möglich. Die benötigten Pufferlösungen werden in Tab. 3.15 dargestellt. Das Protein wurde nativ über unterschiedliche Imidazolkonzentrationen und denaturierend über unterschiedliche pH-Werte selektiert.

Tab. 3.15: Pufferbedingungen der Nickel-Affinitätschromatographie

Lösungen	nativ (4° C)	denaturierend (RT)
Lysepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol; pH 8,0	6 M GdmHCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 5 mM Imidazol; pH 8,0
Lysozym/DNase I	100 mg/ml Lysozym Spatelspitze DNase I	
Waschpuffer I	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol; pH 8,0	6 M GdmHCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 5 mM Imidazol; pH 6,3
Waschpuffer II		6 M GdmHCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 5 mM Imidazol; pH 5,9
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 200 mM Imidazol; pH 8,0	6 M GdmHCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 5 mM Imidazol; pH 4,5

Je nach benötigter Proteinausbeute, wurden unterschiedliche Volumen an Ni-NTA Säulenmaterial eingesetzt. Kleine Proteinmengen wurden unter Zuhilfenahme der Ni-NTA Spin Columns (Qiagen) gewonnen und große Mengen über selbst gebaute Säulen bis zu einem Volumen von 50 ml Ni-NTA Säulenmaterial.

Bei der denaturierenden sowie bei der nativen Aufreinigung wurden unterschiedliche Zellaufschlüsse durchgeführt. Bei nativen Aufreinigungen wurde das Bakterienpellet in Lysepuffer 50:1 (50 Flüssigkultur : 1 Lysepuffer) gelöst und die Zellwand mittels eines Lysozym/DNase-Mix (Lysozym 1 mg/ml Endkonzentration) aufgeschlossen. Hierbei wurde mindestens 1 h bei 4° C im Becherglas mit Rührfisch gerührt. Mittels Zentrifugation (30 min, 13.000 g, 4° C) wurde das Pellet vom Überstand (enthält rekombinantes Protein) getrennt. Bei der denaturierenden Aufreinigung wurde das Zellpellet 3 h unter Röhren im Lysepuffer (Tab. 3.15) aufgeschlossen. Anschließend wurde mehrmals sonifiziert (5-10 s) und das Zellpellet (enthält rekombinantes Protein) vom Überstand durch Zentrifugation (2 h, 20.000 g, 24° C) getrennt.

Die Aufreinigungsverfahren unter nativen und denaturierenden Bedingungen waren bis auf die Verwendung von unterschiedlichen Puffern bei unterschiedlicher Temperatur identisch. Zuerst wurden die Ni-NTA Säulen mit Lysepuffer äquilibriert (2 Säulenvolumen, SV) und im Anschluss mit der proteinhaltigen Lösung beladen. In einem Waschschritt (2-4 SV Waschpuffer, Tab. 3.15) wurden überschüssige Verunreinigungen von dem rekombinanten, gewünschtem Protein entfernt. Dieser Schritt wurde 2-4 mal mit unterschiedlichen Waschpuffern wiederholt. Eluiert wurde unter Verwendung des Elutionspuffers (Tab. 3.15). Stets wurden mehrere Fraktionen genommen und diese mittels SDS-Gelelektrophorese (Abschn. 3.3.1) auf ihre Zusammensetzung kontrolliert. Schwer nativ aufzureinigende Proteine konnten an der ÄKTAfpc™ mittels eines Imidazolgradienten eluiert werden. Je nach Zugänglichkeit der Histidine eluieren Proteine bei unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen.

Nativ aufgereinigte Proteine konnten mittels Dialyse (Abschn. 3.3.7), Gelfiltration (Abschn. 3.3.8) oder Konzentratoren (Abschn. 3.3.9) direkt auf den gewünschten Puffer eingestellt werden. Hierbei stellte die Gelfiltration einen zusätzlichen Reinigungsschritt dar. Denaturierend aufgereinigte Proteine lagen nach der Ni-Affinitätschromatographie als unstrukturierte Peptidketten vor. Die Rückfaltung in den nativen, gefalteten Zustand erfolgte über eine Dialyse (Abschn. 3.3.7). Hierbei wurde das Denaturierungsmittel (GdmHCl) schrittweise durch Zufügen eines GdmHCl freien Puffers reduziert. Der zugefügte Puffer entsprach dem NMR-Messpuffer (150 mM KP_i; pH 6,5, gegebenenfalls 20 mM DTE). Um letzte GdmHCl Reste zu entfernen wurde eine préparative Gelfiltration (Abschn. 3.3.8) durchgeführt. Gelagert wurden Proteine bei -80° C.

3.3.5 Proteaseverdau

Die Abspaltung der Zielproteine von den His₆₋₁₀-tags (Abschn. 3.3.4) erfolgte durch die Serinprotease Thrombin. Thrombin wurde dem Ansatz in der Konzentration von 5 U pro 100 ml zugegeben. Anschließend wurde ca. eine Stunde bei Raumtemperatur verdaut. Dies entspricht nur einem Standardwert und musste jedem Protein individuell angepasst werden. Entfernt wurde Thrombin über eine Benzamidinsäule (bindet spezifisch Serinproteasen) oder über eine präparative Gelfiltration. Stets wurden alle Schritte mittels der SDS-PAGE überprüft und so die Bedingungen angepasst.

3.3.6 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen

Die Konzentration der Proteine wurde mittels Bradford, UV- und NMR-Spektroskopie bestimmt. Der Bradford-Test ist der am wenigsten genaue, war jedoch für das CFPS-System (Herstellung: Abschn. 3.4.2; CAT-Test: Abschn. 3.4.6) unverzichtbar. Methodisch wurde hierbei am Photometer die OD₅₉₅ der Bradfordlösung als Nullwert im Vergleich zu einer Probe mit Bradfordlösung und Protein vermessen. Unter Verwendung einer erstellten BSA-Eichgerade konnte so die Proteinkonzentrationen bestimmen werden. UV-spektroskopisch wurde die Proteinkonzentration unter Zuhilfenahme des 'ExPASy ProtParam tools' bestimmt. NMR-spektroskopisch konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden, indem das DSS-Signal (interner NMR-Standard) gegen die spezifischen Signale des Proteins (Methylgruppen um DSS, oder bei ungefalteten Proteinen an ihren H_{β,γ}-Protonen) verglichen wurde.

3.3.7 Dialyse von Proteinen

Die Dialyse ermöglicht das Überführen von Proteinen in neue Puffer (inkl. Proteaseverdau, Abschn. 3.3.5) und die Rückfaltung von Proteinen (Abschn. 3.3.4). Die in dieser Arbeit verwendeten Dialyseschläuche waren von den Firmen Roth und Pierce. Vor Gebrauch wurden Dialyseschläuche erst 20 min in H₂O und anschließend 20 min in dem Zielpuffer eingelegt. Anschließend wurden die Dialyseschläuche mit Proteinhaltigen Lösungen gefüllt, verschlossen und mit Schwimmern versehen. Dialysiert wurde mindestens 2 h bei leichtem Rühren.

3.3.8 Gelfiltration

Die Gelfiltration ist eine Flüssigchromatographie, in der gelöste Stoffe aufgrund ihrer Größe aufgetrennt werden. Das Trennprinzip besteht darin, dass unterschiedlich große Moleküle unterschiedliche Diffusionsvolumina besitzen. Gelfiltrationsläufe wurden an der ÄKTATMflpc (GE Healthcare) mit einer HiLoadTM 26/600 Säule (320 ml, GE Healthcare) durchgeführt. Geeichte Gelfiltrationssäulen gaben zudem Aufschluss über das Molekulargewicht (MW, M_R [Da]) eines Proteins. Hierbei wurden Retentionsvolumina von unterschiedlich großen Testsubstanzen (Gel Filtration LMW Calibration Kit, GE Healthcare, Abb. 3.1, Bild A) ermittelt und daraus eine Eichgerade erstellt (Abb. 3.1, Bild B). Somit konnte das Retentionsvolumen einer unbekannten Proteinprobe Aufschluss über ihre Größe [Da] geben. Die Eichgerade (Abb. 3.1) wurde mit freundlicher Genehmigung von Malte Andrasch zur Verfügung gestellt.

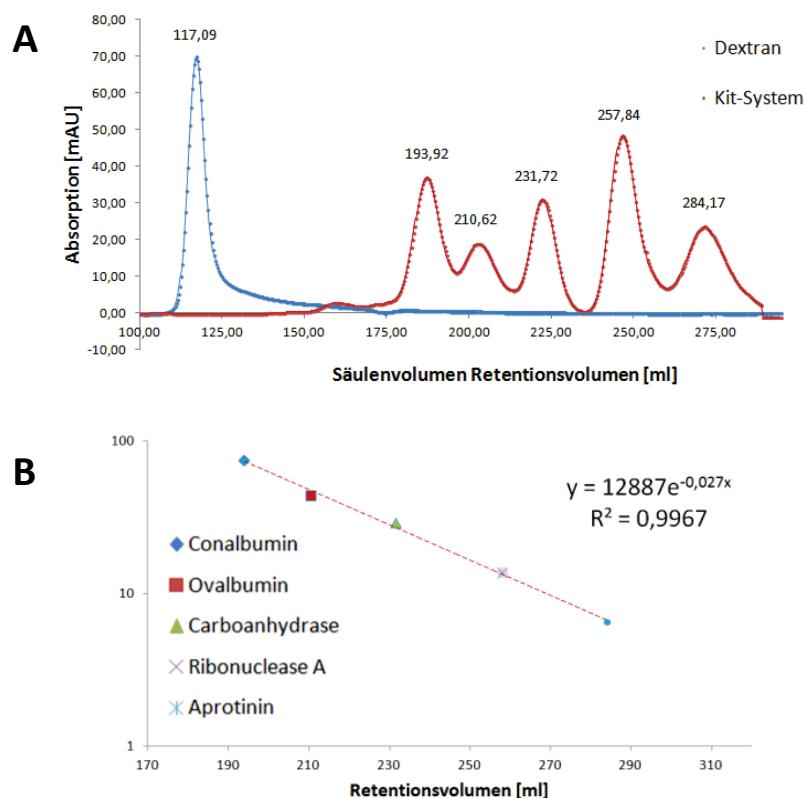


Abb. 3.1: Eichung einer 26/600 Gelfiltrationssäule (320 ml Säulenvolumen). (A) Der Gelfiltrationslauf zeigt das Retentionsvolumen der einzelnen Testsubstanzen (Gel Filtration LMW Calibration Kit, GE Healthcare): Dextran (162,14 kDa) bei 117,09 ml, Conalbumin (75 kDa) bei 193,92 ml, Ovalbumin (44 kDa) bei 210,63 ml, Carboanhydrase (29 kDa) 231,72 ml, Ribonuclease A (13,7 kDa) bei 257,84 ml und Aprotinin (6,5 kDa) bei 284,17 ml. (B) Erstellung einer Eichgeraden. (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Malte Andrasch).

3.3.9 Konzentrieren proteinhaltiger Lösungen

Proteinlösungen wurden unter Verwendung von Konzentratoren der Vivaspin Serie (Sartorius Stedim Biotech) aufkonzentriert. Der Proteingröße und dem Volumen der Proteinlösung passend, wurde ein Konzentrator (Ultrafiltrationsmembran: 1000 bis 10.000 MWCO; 1 bis 20 ml Volumen) ausgewählt. Vor Benutzung wurden die Konzentratoren mit H₂O und Puffer gespült. Anschließend wurde die Proteinlösung mittels Zentrifugation aufkonzentriert.

3.3.10 Fällen von Proteinen

Proteine in wässrigen Lösungen können mittels der Acetonfällung aufkonzentriert werden. Dies war von Nutzen, um verdünnte Proteinlösungen auf einem SDS-Gel darzustellen. Hierbei wurde ein Volumen Proteinlösung mit drei Volumen Aceton (-20° C) vermischt und über Nacht bei -20° C inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (13.000 g, 4° C, 15 min), der Überstand verworfen und das Pellet Luftgetrocknet. Dies wurde in Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abschn. 3.3.1). Dieser Vorgang eignete sich zudem, um Proteine in neue Puffer zu überführen, da die Aceton-Fällung nativ ist.

3.3.11 Gefriertrocknung von Proteinen

Proteine in wässriger Lösung können gefriergetrocknet werden. Hierbei geht das gefrorene H₂O direkt in den gasförmigen Zustand über (Sublimation). Vorsicht ist bei der Pufferzusammensetzung geboten, da zu hohe Salzkonzentrationen problematisch sein können (senken den Schmelzpunkt der Lösung, da nur das Wasser sublimiert). Als Gerät wurde eine SpeedVac (RC10, Kühlafalle RCT 60; Jouan) verwendet. Die Proben wurden in einem 1,5 ml Reaktionscup in flüssigem Stickstoff gefroren, mit Parafilm (kleine Löcher) bedeckt und in die Lyophilie gestellt. Lyophilisiert wurde über Nacht.

3.4 Methoden zur Zellfreien Proteinsynthese

3.4.1 RNase freies Arbeiten

Die zellfreie Proteinexpression (CFPS - 'cell-free protein synthesis') findet *in vitro* statt. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass RNase frei gearbeitet wird. Die für die Herstellung benötigten Glaswaren, Rührfische, Glasspatel und Pinzetten wurden zur Inaktivierung der RNasen 8 h bei 200° C im Ofen gebacken. Sonstige Materialien, wie z.B. Pipettenspitzen bestanden aus RNase freiem Plastik. Die für die Herstellung des S30-Zellextraktes (Abschn. 3.4.2) benötigten Zentrifugenbecher und Dialyseklammern wurden mit RNase AWAY® (Roth) besprüht, anschließend mit RNase freiem Wasser (PURELAG Ultra, Elga) gespült und luftgetrocknet. Zudem waren alle benutzen Materialien und Pufferlösungen RNase frei.

3.4.2 Herstellung der S30 *E. coli* Extrakte

Das Herstellungsprotokoll der S30-Extrakte aus *E. coli* wurde von Axel Freischmidt (2011) übernommen und basierte auf den Protokollen von Pratt et al. (1984) und Kigawa et al. (2004). Im Folgenden wird das Herstellungsprotokoll erläutert.

Tab. 3.16: Medien für die CFPS

Lösungen	Herstellung	Lagerung
2xTY-Medium	16 g/l Bakto-Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl	autoklavieren 4°C
S30-Puffer	10 mM Tris-Aacetat; pH 8,2 60 mM KOAc 14 mM Mg(OAc) ₂	50x fach Herstellung sterilfiltrieren 4°C
β-Mercaptoethanol	6 mM in 1x S30 Puffer	frisch
DTT	1 M in 1x S30 Puffer	frisch
NaCl	4 M 1x S30 Puffer	sterilfiltrieren, 4°C

Ausgangsbasis der S30-Zellextrakte war der DNase defiziente *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen). Ausgehend von einer 100 ml Übernachtkultur (ÜNK, Abschn. 3.1.1) wurden 1,5 l vorgewärmtes 2xTY-Medium mit 10 ml ÜNK angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 (ca. 2 h) kultiviert. Die Zellen wurden in ihrem Wachstumsstadium durch 10-minütiges Schwenken des 1,5 l Kolbens in einem Eisbad fixiert und durch Zentrifugation geerntet (4° C, 4.000 g, 10 min). Es wurde ab jetzt stets auf 4° C gearbeitet und die benötigten

Materialien vorgekühlt. Unter Verwendung eines Glasstabes wurde das Bakterienpellet resuspendiert und in 250 ml S30-Puffer mit β -Mercaptoethanol (β -Me) gelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4° C, 4000 g, 10 min) und erneut in 100 ml S30-Puffer (mit β -Me) resuspendiert. Dieser Schritt wurde zwei weitere Male wiederholt um die Zellen gut zu waschen. Zuletzt wurden die Zellen bei 10.000 g 10 min zentrifugiert und das Pellet in 8 ml S30-Puffer mit DTT resuspendiert. Durch Ultraschall (2 x 2-3 s) wurden die Zellen aufgebrochen. Anschließend wurde das Pellet vom Überstand durch Zentrifugation (30.000 g, 4° C, 30 min) getrennt. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand erneut in einem neuen Zentrifugenbecher zentrifugiert (30.000 g, 4° C, 30 min). Das Zelllysat wurde nun auf 400 mM NaCl (4 M Stammlösung) eingestellt und für 45 min bei 42° C in einem Wasserbad präinkubiert (Ribosomen von endogener RNA befreien; Klammert *et al.*, 2007). Im Anschluss wurde das Lysat gegen 2 Liter S30 Puffer (1 mM DTT aus 1 M Stammlösung) in Dunkelheit bei 4° C zwei Stunden dialysiert (ZelluTrans V-Serie - 15 kDa). Eine zweite, identische Dialyse wurde über Nacht bei 4° C durchgeführt. Das Dialysat wurde bei 10.000 g (4° C) 20 min abzentrifugiert und die Konzentration durch den Bradford Test bestimmt (Abschn. 3.3.6). Die S30-Extrakte wurden bis zu einer Konzentration von 50 bis 60 mg/ml aufkonzentriert und auf eine DTT Konzentration von 6,5 mM eingestellt. Die nun fertigen S30-Lysate wurden aliquotiert (1,5 ml Eppendorf Cup) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gelagert wurden die S30-Zelllysate bei -80° C oder im lyophilisiertem (Abschn. 3.3.11) Zustand.

3.4.3 Durchführung der CFPS-Reaktion

Die in dieser Arbeit durchgeführten CFPS-Reaktionen wurden im Batch Maßstab (30-100 μ l) durchgeführt. Alle CFPS-Komponenten für die Reaktion (Tab. 3.17 und Tab. 3.19) wurden auf Eis aufgetaut und pipettiert. Tabelle 3.18 beschreibt die Zusammensetzung des LMY-Reagenz aus Tabelle 3.17. Die CFPS-Reaktionsansätze (Tab. 3.19) wurden je nach Anwendung bei unterschiedlichen Zeiten und Temperaturen in einem Eppendorf Thermomixer bei 500 rpm inkubiert. Die Reaktion wurde im Anschluss 10 min auf Eis gestoppt. Die erfolgreiche Proteinexpression konnte auf einem SDS-Gel (Abschn. 3.3.1) überprüft werden. Das CFPS-Testprotein, die Chloramphenicol-Acyltransferase (CAT) konnte quantifiziert werden (Abschn. 3.4.5).

Tab. 3.17: Lösungen für die CFPS

Lösungen	Herstellung	Lagerung
Mg(OAc)₂	400 mM in H ₂ O	-20°C
Creatinkinase	20 mg/ml in 100 mM HEPES-KOH; pH 7,5	frisch
Creatinphosphat	1 M in H ₂ O	frisch
T7-RNA Polymerase	2,7 mg/ml in 100 mM NaCl, 50% Glycerin	-20°C
Complete Protease Inhibitor (EDTA free; Roche)	1 Tablette in 2 ml H ₂ O	-20°C
Aminosäure-Mix	Je 10 mM (kein Tyrosin) in 20 mM KOH, pH 7,5; 5 mM DTT	-20°C
LMY	siehe Tab. 3.18	-20°C

Tab. 1.18: Herstellung LMY (90,7 ml)

Komponente	Herstellung (ml)	Konzentration LMY	Konzentration CFPS
1 M HEPES-KOH; pH 7,5	18	198,46 mM	58,03 mM
40% PEG4000	31,4	13,85 %	4,05 %
3 M Kaliumglutamat	20,9	691,29 mM	202,14 mM
56,2 mg Tyrosin	-	3,42 mM	1 mM
17,5 mg/ml E. coli tRNA	3	579 µM	169,3 µg/ml
0,55 M DTT	1	6,06 mM	1,77 mM
100 mM ATP	3,8	4,19 mM	1,23 mM
Je 100 mM GTP, CTP, UTP	2,7	je 2,98 mM	je 0,87 mM
2,7 mg/ml Folinic Acid	4	119 µg/ml	34,8 µg/ml
100 mM cAMP	2	2,21 mM	646 µM
2,2 M NH₄OAc	3,9	94,6 mM	27,66 mM

Tab. 3.19: Pipettierschema einer CFPS-Reaktion (30µl-Ansatz)

Komponente	Volumen	Konzentration in der CFPS
Template-DNA (1 µg/µl)	1 µl	33,33 µg/ml
S30 E. coli Extrakt	10,55 µl	17,58-21,1 mg/ml
T7-RNA Polymerase	0,42 µl	37,8 µg/ml
Creatinkinase	0,375 µl	0,25 mg/ml
Protease Inhibitor	1,2 µl	-
Aminosäure-Mix	3 µl	je 1 mM
400 mM Mg(OAc)₂	0,3 µl	4 mM
H₂O	2,455 µl	-
2,51 µl 1 M Creatinphosphat (CP) + 9,07 µl LMY	11,2 µl	80,92 mM (CP)

3.4.4 Promega S30 T7 High-Yield Protein Expressionssystem

Das Promega S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega) wurde neben dem eigenem CFPS-System (Abschn. 3.4.3) verwendet. Hierbei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die Ansätze wurden auf das CFPS-System in Abschn. 3.4.3 geeicht. Es wurden 1 µg Template Plasmid-DNA (Tab. 3.19) in 30 µl Ansätzen verwendet.

3.4.5 Quantifizierung zellfrei exprimierter Chloramphenicol-Acyltransferase (CAT)

Die gebildete Chloramphenicol-Acyltransferase (CAT) einer CFPS-Reaktion (Abschn. 3.4.3) konnte direkt aus dem Reaktionsansatz quantifiziert werden (Shaw et al., 1975; Kigawa *et al.* 2004). Der Test bestand aus einem gekoppelten Enzymtest. In der ersten Reaktion wurde ein Acetyl-CoA (Tab. 3.20) zu einem Coenzym A und einer freien SH-Gruppe durch die CAT umgesetzt. In der zweiten Reaktion wurde DTNB (Roth) durch die freie SH-Gruppe zu 5-Thio-2-Nitrobenzauat umgesetzt. Dieses Produkt hat ein Absorptionsmaximum bei 412 nm. Somit konnte unter Verwendung eines UV-Spektrometers die Umsatzrate ermittelt werden.

Tab. 3.20: Benötigte Lösungen für die CAT-Testlösung

Lösungen	Herstellung	Lagerung
Tris-HCl; pH 7,8	100 mM	RT
Acetyl-CoA (Trilithiumsalz, Applichem)	5 mg/ml → 175 µl Aliquots	-80°C
Chloramphenicol	5 mM	-20°C
DTNB (5,5'-Dithio-Bis(Nitrobenzoic Acid); Sigma Aldrich)	-	RT

Tab. 3.21: CAT-Testlösung (20 ml)

Lösungen	Volumen/Gewicht	Konzentration	Lagerung
Tris-HCl; pH 7,8	19,2 ml	96 mM	frisch
DTNB	8 mg	0,4 mg/ml	
Chloramphenicol	400 µl	100 µM	
Acetyl-CoA	328 µl	100 µM	
H ₂ O	72 µl	-	

Der Reaktionsansatz wird in Tabelle 3.21 dargestellt. Ein CFPS-Reaktionsansatz (Abschn. 3.4.3) wurde 1:300 mit 4° C kaltem 100 mM Tris-HCl pH 7,8 verdünnt. Davon wurden 6 µl in 800 µl einer eiskalten CAT-Testlösung (Tab. 3.21) pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 30 min

bei 37° C und 300 rpm in einem Eppendorf Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis gestoppt (ca. 5 min) und der Ansatz im Photometer bei 412 nm gegen eine Nullprobe vermessen und ausgewertet.

$$c \text{ (CAT)} = \frac{\Delta A_{412} \cdot v}{\varepsilon \cdot d \cdot t \cdot E}$$

Hierbei ist ΔA_{412} die Absorptionsänderung bei 412 nm, v der Verdünnungsfaktor, ε der Extinktionskoeffizient von DTNB (13600 l/(mol · cm)), d die Dicke der Küvette (1 cm), t die Inkubationszeit (30min) und E die Enzymaktivität der Chloramphenicol-Acyltransferase (CAT) pro mg (150 U/mg).

3.5 NMR-Spektroskopie

3.5.1 NMR-Probenzusammensetzung

Alle NMR-Proben bestanden aus dem jeweiligen Protein in seinem Puffer, aus 8 % D₂O und aus 0,1 mM DSS als internen Standard. Alle NMR-Proben wurden in 5 mm Norell Round Bottom NMR tubes (502-7 HT^{PLUS}) vermessen. Das gängige Probenvolumen betrug 500 µl mit einer Proteinkonzentration von 0,1 mM bis 1 mM.

3.5.2 Spektren und Pulsprogramme

Alle Spektren wurden mit einem Bruker Avance 600 MHz NMR-Spektrometer mit CryoprobeTM TXI Probenkopf und einem Bruker Avance 800 MHz NMR-Spektrometer mit CryoprobeTM TCI Probenkopf aufgenommen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Pulsprogramme (PP: hsqcf3gpph19, trosyf3gpphs19pr.fs, noesygppr.1d.pr) waren Standardpulsprogramme der Firma Bruker Biospin (Karlsruhe).

Das zweidimensionale 2D-[¹⁵N, ¹H] TROSY-HSQC Spektrum (trosyf3gpphs19pr.fs; Pervushin, 2000) erlaubte die Beobachtung der Amidstickstoffatome der Proteinauptkette. Je Aminosäure wurde nur ein Signal detektiert und somit eine Überlagerung vermieden. Eine Signalverstärkung mit einer zugleich sinkenden Linienvbreiterung konnte durch eine Perdeuterierung (²H) der Proteinprobe erreicht werden. Da die H^N Protonen mit der wässrigen Lösung austauschten, konnten so spezifisch die N^H Stickstoffatome beobachtet

werden. Die 2D-[¹⁵N,¹H] TROSY-HSQC Spektren wurden vor allem bei Titrationsexperimenten (Abschn. 3.5.3) verwendet.

Die chemischen Verschiebungen von ¹H wurden direkt, die von ¹⁵N indirekt nach der Methode von Wishart et al. (1995) auf DSS referenziert. Alle Spektren wurden unter Verwendung von Topspin Version 2.1 und 3.1 (Bruker) prozessiert.

3.5.3 NMR-Experimente und Formeln

NMR Protein-Protein Interaktionsexperimente wurden durchgeführt, um Bindungsbereiche zwischen zwei Proteinen zu detektieren. Zu Beginn des Experimentes wurden die Konzentrationen der zu vermessenen Proteine bestimmt (Abschn. 3.3.6). Im Anschluss wurde ein 2D-[¹⁵N,¹H] TROSY-HSQC Spektrum eines ¹⁵N markierten, gegebenenfalls perdeuterierten Proteins aufgenommen. Bei Proteinen mit bekannter sequenzieller Zuordnung konnten die Signalveränderungen den jeweiligen Sequenzpositionen zugeordnet werden. Ein beliebiger, unmarkierter Ligand (Protein) wurde nun zugegeben und ein weiteres 2D-[¹⁵N,¹H] TROSY-HSQC Spektrum mit identischen Parametern aufgenommen. Dieser Schritt konnte nun beliebig oft gewählt werden, sodass auch Protein-Protein Titrationen zur Bestimmung der Bindungsaffinität möglich waren. Wichtig hierbei war, dass die Ausgangskonzentration des vorgelegten, markierten Proteins stets gleich blieb. Veränderungen der Signalintensitäten (Volumen) und der Signalpositionen wurden unter Verwendung des Topspins und des Auremol™ Softwarepaket ausgewertet.

Ausgewertet wurden vorrangig die kombinierten, chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{\text{comb.}}$, siehe Formel (A)) und die Änderungen der einzelnen Intensitäten der AS-Signale. Beide Werte wurden je gegen die Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins in einem Balkendiagramm aufgetragen. In Formel A ist w_H und w_N der Wichtungsfaktor der jeweiligen Aminosäure und $\Delta\delta_H$ und $\Delta\delta_N$ die Änderung der chemischen Verschiebung von ¹H bzw. ¹⁵N (Schumann et al., 2007).

$$(A) \quad \Delta\delta_{\text{comb.}} = \sqrt{(w_H \cdot \Delta\delta_H)^2 + (w_N \cdot \Delta\delta_N)^2}$$

Bei den Signalveränderungen wurden nur die Signale der jeweiligen Aminosäure betrachtet, deren $\Delta\delta_{\text{comb.}}$ größer war, als die korrigierten Standartabweichungen (SD) zu Null (Formel (B); Schumann et al., 2007). Hierbei ist x der Stichprobenmittelwert und n der

Stichprobenumfang.

$$(B) \quad SD = \sqrt{\frac{\sum(x)^2}{(n-1)}}$$

Die mikroskopische Bindungskonstante und der Hill-Koeffizient (n) wurde durch Auftragung der kombinierten, chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta$ comb.) gegen die Konzentrationen des jeweils zugegebenen Liganden (Protein) nach Rosnizeck et al. (2014) bestimmt (Formel (C)).

$$(C) \quad y = y_0 \cdot \frac{\left(x - N \cdot P \cdot \frac{y}{y_0} \right)^n}{K^n + \left(x - N \cdot P \cdot \frac{y}{y_0} \right)^n}$$

Hierbei entspricht y_0 der $\Delta\delta$ comb.-Änderung bei Sättigung, N der Anzahl der Bindungsstellen des vorgelegten Proteins, P der Proteingesamtkonzentration des vorgelegten Proteins, K der Konzentration des Liganden (Protein) bei Halbsättigung und n dem Hill-Koeffizient.

4. Ergebnisse der Charakterisierung der cytosolischen Kv1.4- Domänen

4.1 Die Kv1.4 T1-Konstrukte

Das Kv1.4 T1-Konstrukt (T1K) besteht aus den Aminosäuren 175-262 des Kv1.4 *shaker* Kaliumkanals (*Rattus Norvegicus*). In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Kv1.4 T1-Konstrukte verwendet (Abb. 4.1). Das Kv1.4 T1 (101 AS) Konstrukt basierte auf der Arbeit von Schreier (2006). Diesem Protein war ein C-terminal gelegener His₆-tag angegliedert. Dieser ermöglichte die Proteinaufreinigung über eine Nickel-Affinitätschromatographie (Abschn. 3.3.4). Das zweite Konstrukt, das Kv1.4 T1 (92 AS) unterschied sich vom Kv1.4 T1 (101 AS) darin, dass eine Thrombinschnittstelle zwischen der Aminosäuresequenz des T1-Konstruktes und dem C-terminalen His₆-tag integriert worden ist (Abb. 4.1). Beim Kv1.4 T1 (92 AS) konnte der His₆-tag mittels Thrombin abgespalten werden. Dieses Konstrukt wurde kloniert, da der C-terminale Bereich der nativ Homotetramer vorliegenden Kv1.4 T1-Domäne einen bindungsrelevanten Bereich zu anderen Makromolekülen, welche für diese Arbeit relevant waren darstellt. Somit konnten alle positiven Ladungen der Histidine des His₆-tags im C-terminalen Bereich des Kv1.4 T1-Homotetramers entfernt werden. Im folgenden wird das Kv1.4 T1 (101 AS) Konstrukt auch als T1Ktag und das Kv1.4 T1 (92 AS) Konstrukt auch als T1K bezeichnet.

T1Ktag: Kv1.4 - 101 AS
T1K: Kv1.4 - 108/92AS

ME**RVVINVGSLRFETQMKTIAQ**FPETLLGD**PEKRTQY**
 ME**RVVINVGSLRFETQMKTIAQ**FPETLLGD**PEKRTQY**
 FDPLRNEY**FF**DRN**RPSFDAILYQQQSG**GRLK RPVNVP
 FDPLRNEY**FF**DRN**RPSFDAILYQQQSG**GRLK RPVNVP
 FDI**TEEVKFY**QLG**KLAAL**EHHHHHH
 FDI**TEEVKFY**QLG**LVPR**:**GSL**GHHHHHH



Abb. 4.1: Aminosäuresequenzen (AS) der Kv1.4 T1-Konstrukte. Links: AS-Sequenzen des T1Ktag (Kv1.4 T1 - 101 AS (Schreier, 2006); M_r 12,06 kDa) und des T1K (Kv1.4 T1 - 108/92 AS; M_r 11 kDa) Konstruktes. **Rechts:** Räumliche Darstellung eines T1Ktag Monomers in Cartoon (PyMOL™). **Farbschema:** grün: α-Helix, dunkelblau: β-Faltblatt, rot: His₆-tag plus Linker, hellblau: Thrombinschnittstelle (rot gestrichelte Linie entspricht der Schnittstelle). (Aufbau T1-Struktur: vgl. Abb. 1.7)

4.1.1 Expression und Aufreinigung der Kv1.4 T1-Konstrukte

Beide Kv1.4 T1-Konstrukte lagen im pET-20b(+) Vektor (Novagen) vor und wurden rekombinant mittels *E. coli* RosettaTM (DE3) pLysS exprimiert (Abschn. 3.3.3). Beide Kv1.4 T1-Konstrukte verhielten sich bei Expression und Aufreinigung ähnlich. In LB-Medium wurde stets bei 1 mM IPTG 6 Stunden bei 37° C und 200 rpm exprimiert. Aufgrund der Größe des Kv1.4 T1-Homotetramers (M_R ca. 38 bis 44 kDa, siehe Abb. 4.3) wurden ¹⁵N markierte Kv1.4 T1-Proteine zusätzlich zu 70 % (3 0% H₂O, 70 % D₂O) perdeuteriert (²H). Die Wachstums- und Proteinexpressionsbedingungen von *E. coli* RosettaTM (DE3) pLysS in NMM-Medium (Abschn. 3.1.1) änderten sich hierbei erheblich. In NMM-Medium wurde bei 0,1 mM IPTG über Nacht (üN) bei 30° C und 200 rpm exprimiert. Zudem mussten *E. coli* RosettaTM (DE3) pLysS Zellen mit dem Kv1.4 (108/92AS) Konstrukt (Abb. 4.1) stets an das NMM-Medium üN adaptiert werden. Hierbei wurden *E. coli* Zellen zuerst in LB-Medium vermehrt und anschließend ca. 100 µl davon in einem kleinen Volumen (ca. 10 ml) NMM-Medium adaptiert, bis es zum Anwachsen der flüssigen Zellkultur kam. Bei erfolgreicher Adaptation konnten die Volumen des NMM-Kulturmediums dem Proteinbedarf angepasst werden.

Aufgereinigt wurden die Kv1.4 T1-Konstrukte unter Verwendung der Nickel-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen (Abschn. 3.3.4). Beide Kv1.4 T1-Konstrukte wurden in ihre native Proteinstruktur zurückgefaltet, indem das denaturierende Agens (GdmHCl) aus der Affinitätschromatographie mittels Dialyse langsam ausverdünnt wurde (Abschn. 3.3.4). Anschließend wurde eine Gelfiltration (Abschn. 3.3.8) durchgeführt, um Verunreinigungen aus der Probe zu entfernen und die molekulare innere Masse (M_R) des Proteins zu bestimmen. Zudem wurde bei diesem Schritt das Kv1.4 T1-Protein in den passenden NMR-Messpuffer umgepuffert. Ausgangspuffer aller Proteinproben in der NMR-Spektroskopie war 150 mM KPi, pH 6,5. Cysteinhaltige Proteinproben wurden stets mit 20 mM DTT versehen, um Disulfidbrückenbindungen zu vermeiden. Das T1K (Kv1.4 T1K - 92 AS) Konstrukt wurde nach der Gelfiltration direkt mit Thrombin verdaut (Abschn. 3.3.5). Hierbei wurde die Thrombinschnittstelle 2 h bei Raumtemperatur unter Verwendung der Dialysetechnik (Abschn. 3.3.7) gespalten. Abbildung 4.2 zeigt einen erfolgreichen Thrombinverdau. Überschüssiges Thrombin konnte mittels einer Benzamidinsäule und eines weiteren Gelfiltrationsschrittes vollständig entfernt werden. Thrombin schnitt das T1K (Kv1.4 T1 - 92 AS) Konstrukt nicht willkürlich. Beide Kv1.4 T1-Konstrukte wurden bei -80° C gelagert.

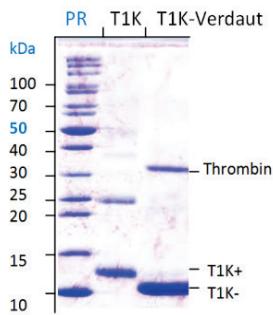


Abb. 4.2: Verdau des T1K ($K_v1.4\ T1 - 92AS$) Konstruktes mit Thrombin. 16 % SDS-Gel nach Coomassie Färbung. Auftragung: PagerulerTM Protein Standard, unverdautes $K_v1.4\ T1$ (108AS), verdautes $K_v1.4\ T1$ (92AS) mit Thrombin. Das Protein konnte in hoher Reinheit gewonnen werden und wurde nicht von Thrombin willkürlich beschädigt. $K_v1.4\ T1$ (108AS) 12,14 kDa, $K_v1.4\ T1$ (92AS) 11,12 kDa, Thrombin 36,7 kDa). ('ExPASy - Comute pl/MW tool')

4.1.2 Vergleich der $K_v1.4\ T1$ -Konstrukte

Beide $K_v1.4\ T1$ Fragmente wurden auf ihren Oligomerisierungszustand mittels analytischer Gelfiltration untersucht. Die molekulare innere Masse (M_R) und der Oligomerisierungszustand eines $K_v1.4\ T1$ -Proteins konnte durch eine an Testproteinen geeichte Gelfiltrationssäule (GE Supadex 26/600) ermittelt werden (Abb. 3.1). In natürlicher Umgebung liegt die T1 Domäne im homotetrameren Zustand vor (Abb. 4.4, Kreusch und Choe, 1998). Für das T1Ktag-Konstrukt (Abb. 4.1) wurde ein theoretischer M_R von 48,56 kDa und für das T1K-Konstrukt ein M_R von 44,48 kDa errechnet ('ExPASy pl/MW tool').

Experimentell konnte bei dem T1Ktag-Konstrukt ein M_R von 44,48 kDa und bei dem T1K Konstrukt ein M_R von 38,29 kDa bestimmt werden (Abb. 4.3). Bei beiden T1-Konstrukten befanden sich die experimentell bestimmten M_R -Werte etwas unter den theoretisch berechneten Werten. Um einen Zerfall der homotetrameren T1-Domäne in Monomere auszuschließen, wurden die Proben drei Tage bei 4° C gelagert und deren Zusammensetzung bei einer weiteren analytischen Gelfiltration untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass beide T1-Konstrukte ihren homotetrameren Zustand beibehielten.

Jedoch waren beide $K_v1.4\ T1$ -Konstrukte etwas unterschiedlich in ihrer Handhabung. Das T1Ktag-Konstrukt (Abb. 4.1) konnte problemlos und beliebig oft eingefroren und wieder aufgetaut werden. Das T1K-Konstrukt (Abb. 4.1) hingegen konnte nur im Wasserbad bei ca. 25° C schnell aufgetaut werden. Bei anderer Handhabung fiel es schnell aus und musste unter Proteinverlust wieder aufwändig rückgefaltet werden. Bevor die $K_v1.4\ T1$ -Proteine in der NMR-Spektroskopie zum Einsatz kamen wurden sie stets bei 20.000 g 30 min bei 4° C zentrifugiert, um ausgefallenes Protein zu isolieren. Aufgetautes $K_v1.4\ T1$ -Protein war im Kühlschrank bei 4° C mehrere Tage stabil haltbar.

Das T1K-Konstrukt besitzt eine positive Ladung in seiner Schnittstelle (Abb. 4.1). Zusätzlich wurde ein $K_v1.4\ T1$ -Konstrukt kloniert, welches keine Ladung in seiner Schnittstelle besitzt

(umgedrehte Thrombinschnittstelle: SGRPVL, vgl. Abb. 4.1). Dieses Konstrukt war bei der Rückfaltung in seinen nativen Zustand nicht stabil und konnte nicht verwendet werden.

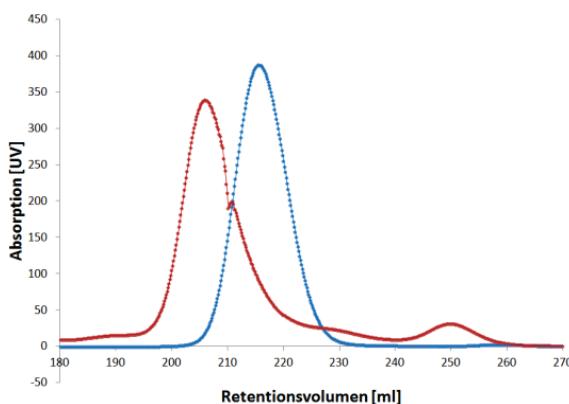


Abb. 4.3: Analytische Gelfiltrationsläufe der Kv1.4 T1-Konstrukte.

Darstellung der Analytischen Gelfiltrationsläufe:
Rot zeigt den Gelfiltrationslauf der T1Ktag-Domäne (Abb. 4.1): Retention nach 206,38 ml entspricht einem M_R von 44,48 kDa.

Blau zeigt den Gelfiltrationslauf der T1K-Domäne ohne His₆-tag (Abb. 4.1): Retention nach 215,51 ml entspricht einem M_R von 38,24 kDa. (Eichgerade, Filtrationssäule und Formel siehe Material und Methoden, Abschn. 3.3.8.)

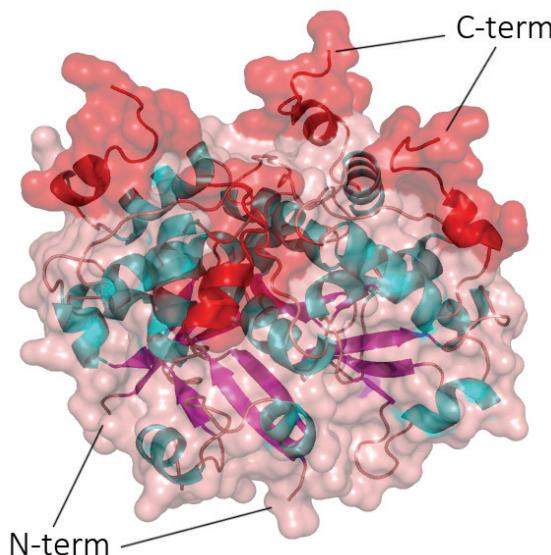


Abb. 4.4: Räumliche Darstellung des T1Ktag (Kv1.4 T1 - 101 AS) und des T1K (Kv1.4 T1 - 92 AS) Homotetramers.

Farbschema: türkis: α -Helix, lila: β -Faltblatt, pink: Oberflächendarstellung, rot: His₆-tag. Die C-Termini sind der Zellmembran und die N-Termini dem Cytosol zugewandt. Darstellung der dreidimensionalen Struktur beider Kv1.4 T1-Konstrukte als Homotetramer (PyMOL™). Die Zusammensetzung der Konstrukte wird in Abb. 4.1 erläutert. Der His₆-tag wird im C-terminalen Bereich der homotetrameren Domäne in rot dargestellt. (Abschn. 4.1.3; Kreusch und Choe, 1998)

Schwerpunkt dieser Arbeit stellte die NMR-spektroskopische Untersuchung des T1K (Kv1.4 T1 - 92 AS) Konstruktes in Wechselwirkungen mit seinen natürlichen, physiologisch relevanten Proteinbindern (Abschn. 4.2 und 4.3) dar. Um diese Protein-Protein Wechselwirkungen untersuchen zu können, wurde die Zuordnung des T1Ktag (Kv1.4 T1 - 101 AS) Konstruktes (Schreier, 2006) auf das T1K (Kv1.4 T1 - 92 AS) Konstrukt übertragen. Hierbei wurde im Radius des einzelnen zugeordneten T1Ktag-Signals das jeweils nächstliegende Signal dem neuen Konstrukt zugeordnet. Nur so war es möglich, die kombinierten chemischen Verschiebungen und die relativen Volumenänderungen der einzelnen Signale bei der 2D-NMR-Spektroskopie zu untersuchen. Allen NMR-spektroskopischen proteinbindungsrelevanten Untersuchungen lagen 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektren, aufgenommen bei 293 K zugrunde.

Abbildung 4.5 zeigt das zugeordnete 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektrum des T1Ktag (blau) und das zugeordnete 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektrum des T1K-Konstruktes (rot).

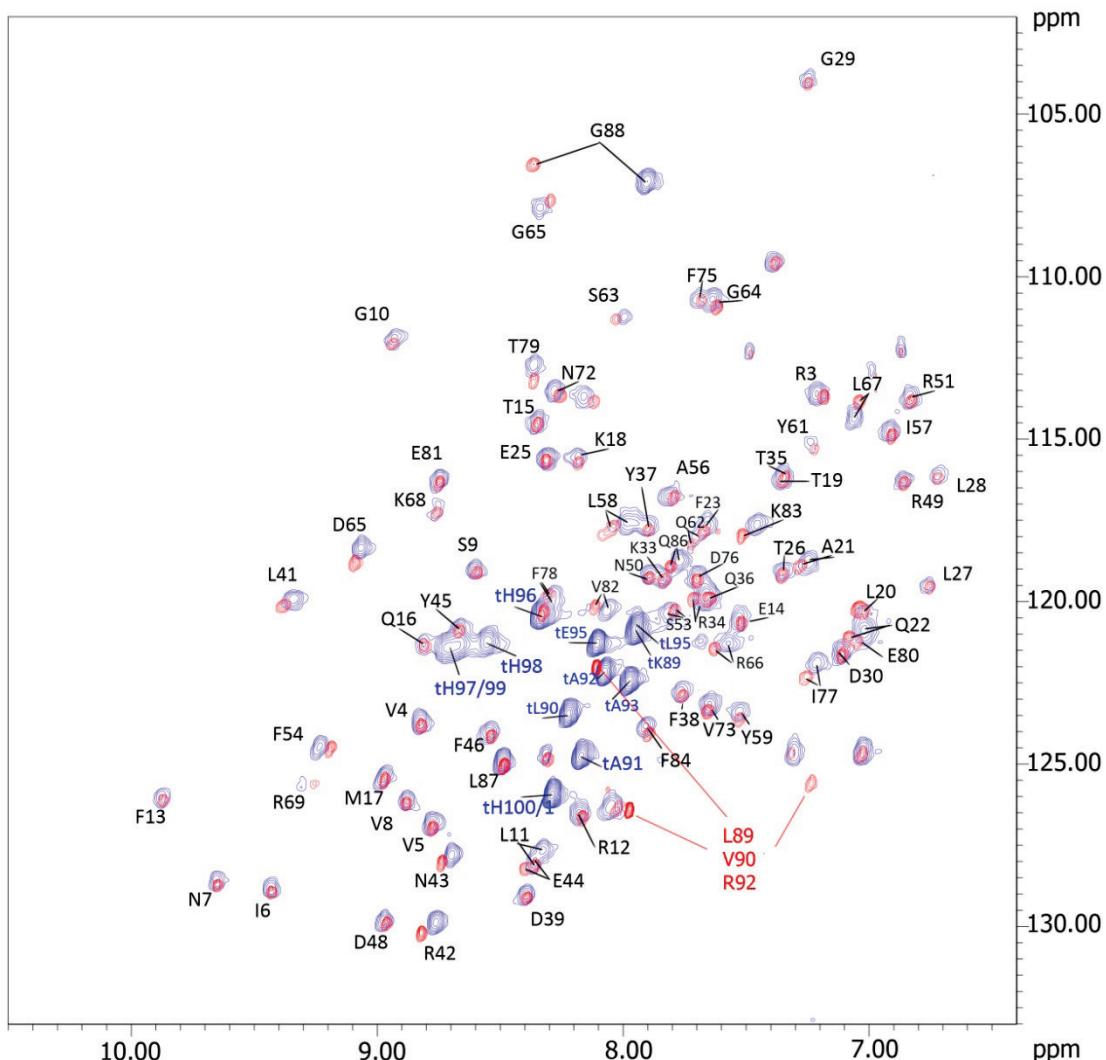


Abb. 4.5: Zugeordnete 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektren der K_v1.4 T1-Konstrukte.

(Blau) T1Ktag (K_v1.4 T1 - 101 AS) mit His₆-tag. Signale, welche dem His₆-tag und dem Linkerbereich aus Abb. 4.1 (rot) zugeordnet wurden, sind mit einem zusätzlichen Buchstaben t gekennzeichnet. Messbedingungen: 400 μM T1Ktag in 300 mM KPi-Puffer; pH 6,8. Aufgenommen bei 600 MHz (Bruker Spektrometer) und 290 K [TD (F2: 8192, F1: 512); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.12, F1: 0.1)]. **(Rot)** T1K (K_v1.4 T1 - 92 AS) ohne His₆-tag. Mögliche Signale der Aminosäuren L89, V90 und R92 aus der Thrombinschnittstelle (Abb. 4.1) werden in roter Schrift dargestellt. Messbedingungen: 320 μM T1K in 150 mM KPi-Puffer; pH 6,5. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.12, F1: 0.1)]. (Zuordnungen vgl. Anhang)

Abbildung 4.4 verdeutlicht, dass die vier C-Terminal gelegenen His₆-tags des K_v1.4 T1-Konstruktes auf der Oberseite der Proteinstruktur lokalisiert sind. Von Interesse war nun, welche Auswirkung der Verlust von vier Histidinreichen Sequenzen bei dem T1K-Konstrukt auf die räumliche Struktur der T1-Domäne besaß. In Abb. 4.5 wird deutlich, dass die

spezifischen Signale der Aminosäuren (AS) beider Kv1.4 T1-Konstrukte leicht abweichende chemische Verschiebungen aufweisen. Zur genaueren Untersuchung wurden 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektren beider Kv1.4 T1-Konstrukte auf ihre kombinierte chemische Verschiebung der einzelnen AS-Signale miteinander verglichen. Beide Kv1.4 T1-Spektren wurden bei leicht unterschiedlichen NMR-Messbedingungen aufgenommen (Abb. 4.5). Das T1Ktag-Konstrukt wurde an einem 600 MHz Spektrometer (Bruker) bei 290 K in einem 300 mM KP_i-Puffer (pH 6,8) aufgenommen. Das T1K-Konstrukt wurde mit einem 800 MHz Spektrometer bei 293 K in einem 150 mM KP_i Puffer (pH 6,5) aufgenommen. Das Ergebnis dieser Untersuchung wird in Abb. 4.6 und in Abb. 4.7 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass es Unterschiede im Bereich des His₆-tags auf der Kv1.4 T1-Oberflächenstruktur gibt.

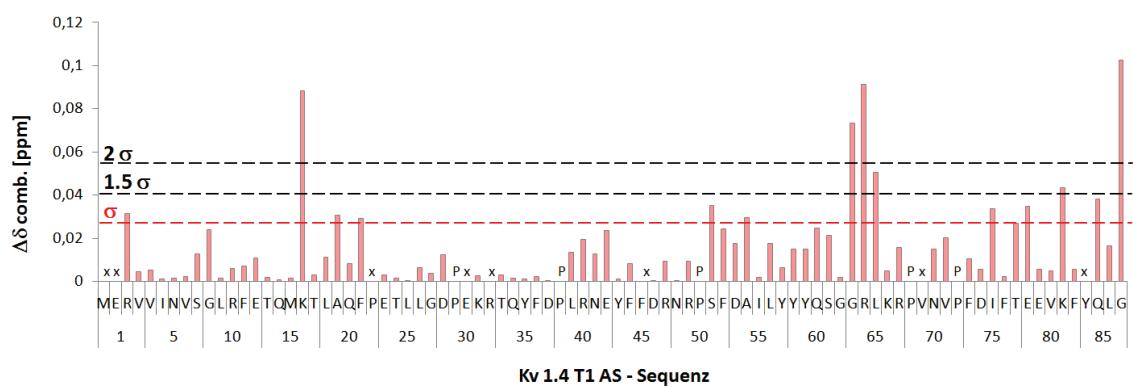


Abb. 4.6: Vergleich von T1Ktag (Kv1.4 T1 - 101 AS) mit dem T1K (Kv1.4 T1 - 92 AS) Konstrukt. Aufgetragen ist der Betrag der kombinierten chemischen Verschiebungen [$\Delta\delta$ comb.] von T1Ktag zu T1K gegen die Aminosäuresequenz des Kv1.4 T1-Konstrukt. (---) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale.

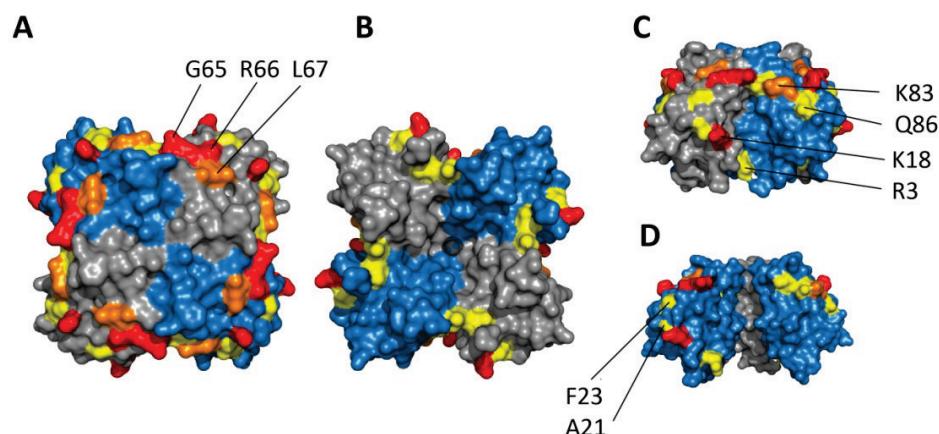


Abb. 4.7: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.6 auf das Kv1.4 T1-Strukturmodell (Abschn. 4.1.3). Der Wert der kombinierten chemischen Verschiebungen wird auf dem Modell farbig markiert. Farbschema: Verschiebungen (rot) oberhalb von 2σ , (orange) oberhalb von $1,5\sigma$, (gelb) oberhalb von 1σ , (blau, grau) Kv1.4 T1-Monomere. Ansicht der T1K-Domäne ohne His₆-tag von (A) oben, (B) unten, (C) der Seite und (D) Innen.

4.1.3 Das Kv1.4 T1-Strukturmodell

Um Ergebnisse aus NMR-spektroskopischen Protein-Protein Interaktionsversuchen an der tetrameren T1-Domäne des Kv1.4 *shaker* Kalium-Kanals (Abb. 4.4) besser darstellen zu können, wurde ein räumliches, dreidimensionales Modell der homotetrameren Kv1.4 T1-Domäne erstellt. Basierend auf der Kristallstruktur von Kv1.3 T1 (Kremer et al., 2013; PDB 4BGC) wurde ein Kv1.4 T1-Modell (Baskaran, unveröffentlicht) errechnet. Sie sind zu 85 % homolog zueinander (vgl. Anhang, Abb. 10.1). Abbildung 4.8 zeigt die tetramere Struktur von Kv1.3 T1. Die Monomere (Abb. 4.8, Bild A und B) liegen nicht rechtwinklig angeordnet und starr vor. Sie sind in der Lage sich zu verschieben und zu verdrehen, was für ein dynamisches T1-Homotetramer spricht (Kremer et al., 2013). Abbildung 4.1 zeigt ein Monomer der Kv1.4 T1-Domäne in Cartoon PyMOL™ Darstellung und Abbildung 4.4 zeigt die Oberflächendarstellung der Homotetrameren Kv1.4 T1-Struktur. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der C-terminale His₆-tag entfernt und somit die Aminosäuren in der Struktur von Baskaran (unveröffentlicht) entfernt.

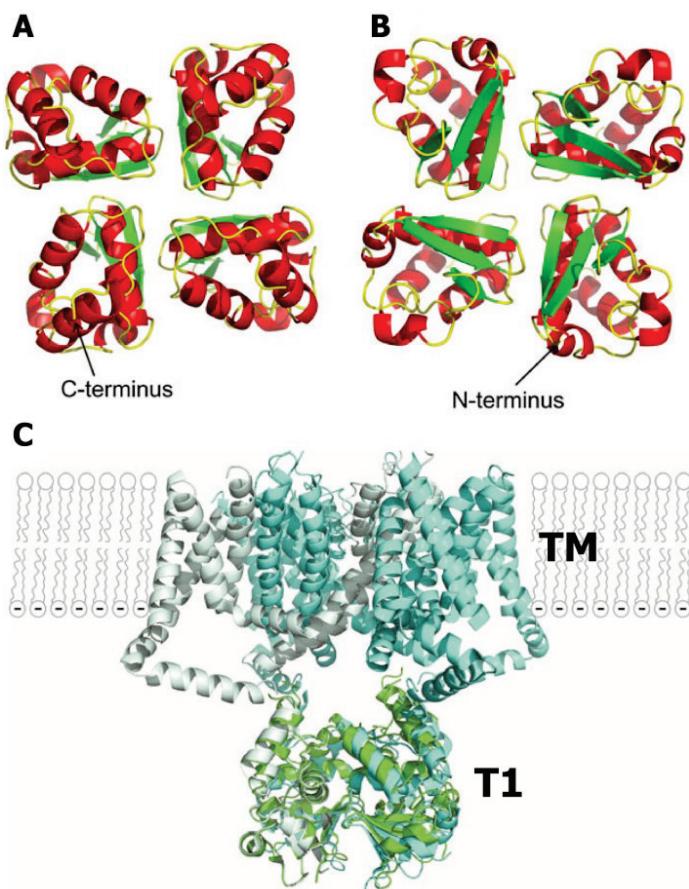


Abb. 4.8: Kv1.3 T1-Modell des *shaker* Kaliumkanals (*Homo sapiens*). (A) Ansicht von oben auf das T1-Tetramer. **(B)** Ansicht von unten auf der T1-Tetramer. **(C)** Das Kv1.3 T1-Tetramer (hellgrün) ist auf die Struktur von Kv1.2 (PDB 2A79) ohne Kvβ-Untereinheit übertragen. (Kremer et al., 2013)

4.2 Das Kv1.4 IP75 (*inactivation peptide*)-Konstrukt

Der N-terminale Bereich eines Kv1.4 *shaker* Kaliumkanals beinhaltet das schnell inaktivierende Ball-Peptid. Im Jahr 2003 wurde die Struktur von Wissmann (PDB 1KN7) gelöst. Dieses Konstrukt beinhaltet die Aminosäuren 1 bis 75 des Kv1.4 *shaker* Kaliumkanals (*Rattus Norvegicus*). Hierbei werden die ersten 37 Aminosäuren dem Inaktivierungsbereich des Kanals zugesprochen (Tseng-Crank et al., 1993). Aminosäure 1 bis 25 besitzt einen hydrophoben, ungefalteten Charakter, wohingegen die Aminosäuren 26 bis 37 hydrophil und mit drei positiven Ladungen versehen sind. Diesen Ladungen werden elektrostatische Wechselwirkungen mit der Kv1.4 Kanalpore zugesprochen. (Tseng-Crank et al., 1993). C-Terminal ist das Peptid reich an Glycinen und äußerst flexibel. Zudem besitzt das Peptid zwei α -Helices, welche über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind (Abb. 4.9).

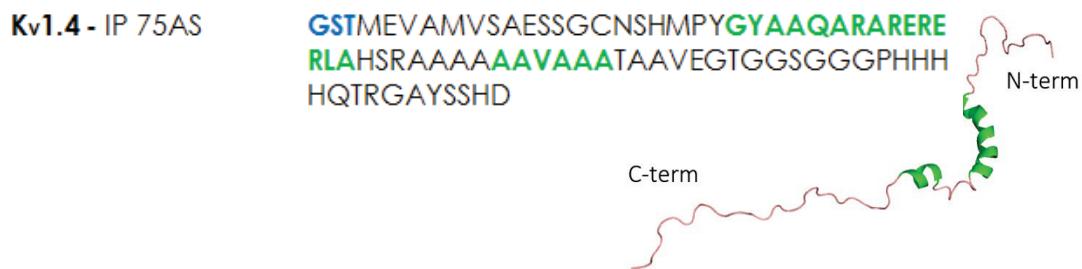


Abb. 4.9: Aminosäuresequenz (AS) des Kv1.4 IP75-Konstruktes.

Farbschema: (grün) α -Helix: AS 20-38 und AS 40-50. (blau) drei AS einer Protease Schnittstelle. (Oben) Aminosäuresequenz des Kv1.4 IP75-Konstruktes (M_R 7,8 kDa). (Unten) Räumliche Darstellung eines Kv1.4 IP75-Peptides in Cartoon (PyMOLTM) mit N- und C-terminaler Orientierung. (Struktur: Wissmann 2003; PDB 1KN7)

Das Kv1.4 IP75-Konstrukt wurde von Wissmann et al. (1999) und Schreier (2006) verwendet. Es lag in einem pET-41a (Novagen) Vektor vor und wurde mittels *E. coli* RosettaTM (DE3) pLysS exprimiert. Der pET-41a Vektor besaß einen N-Terminalen GST-tag, welcher die Löslichkeit des Peptides erhöhte und einen N-Terminalen His₆-tag, welcher zur affinitätschromatographischen Aufreinigung verwendet wurde. Beide tags konnten mittels Thrombinschnittstelle von Kv1.4 IP75 getrennt werden. Die Expression des Peptides in LB-, sowie NMM-Medium stellte keinerlei Probleme dar. In LB-Medium wurde das Protein mit 1 mM IPTG vier Stunden bei 37° C und 200 rpm exprimiert. NMM Kulturen (¹⁵N) wurden stets über Nacht mit 0,2 mM IPTG bei 30° C und 200 rpm exprimiert. Aufgereinigt wurde nativ nach Ni-NTA affinitätschromatographischen Standardmethoden welche in Abschnitt 3.3.4 beschrieben sind. Das isolierte Kv1.4 IP75-Konstrukt wurde mittels Thrombin bei RT (ca. 4 h) unter Verwendung der Dialysetechnik von seinen tags abgespalten (Abb. 4.10). Hierbei

wurde das Protein direkt gegen den NMR-Messpuffer (150mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT) dialysiert. Anschließend wurde das Kv1.4 IP75-Protein über eine Gelfiltrationssäule von der Protease Thrombin isoliert (Abschn. 3.3.8). Das Peptid wurde durch Thrombin nicht beschädigt und erwies sich als äußerst stabil. Gelagert wurde das Konstrukt bei -80 ° C. Im Folgenden wird das Konstrukt auch als IP75 bezeichnet.

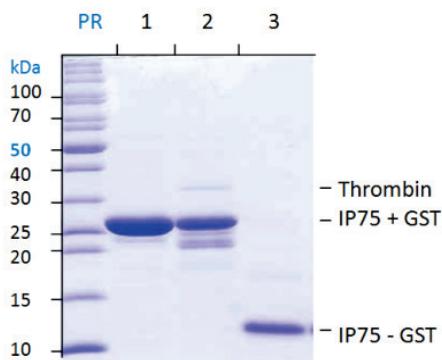


Abb. 4.10: Verdau des GST-IP75 Konstruktes mit Thrombin. 16 % SDS-Gel nach Coomassie Färbung. Auftragung: Pageruler™ Protein Standard. (1) unverdautes GST-IP75 Protein. (2) GST-IP75 mit Thrombin plus schon abgespaltenes GST-Protein. (3) Isoliertes IP75-Peptid nach Gelfiltration. Das Protein konnte in hoher Reinheit gewonnen werden und wurde nicht von Thrombin beschädigt.

Die Peptidstruktur wurde von R. Wissmann (2003) bei 278 K in einem 50 mM KPi-Puffer; pH 4,4 mit 10 mM DTT gelöst (Abb. 4.9). Da alle Experimente dieser Arbeit bei 293 K in einem 150 mM KPi-Puffer; pH 6,5; 20 mM DTT durchgeführt worden sind, mussten die einzelnen AS-Signale noch übertragen werden. Mittels einer pH- und Temperaturreihe konnten die Signale vollständig zugeordnet werden. Abbildung 4.11 zeigt ein 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC von IP75.

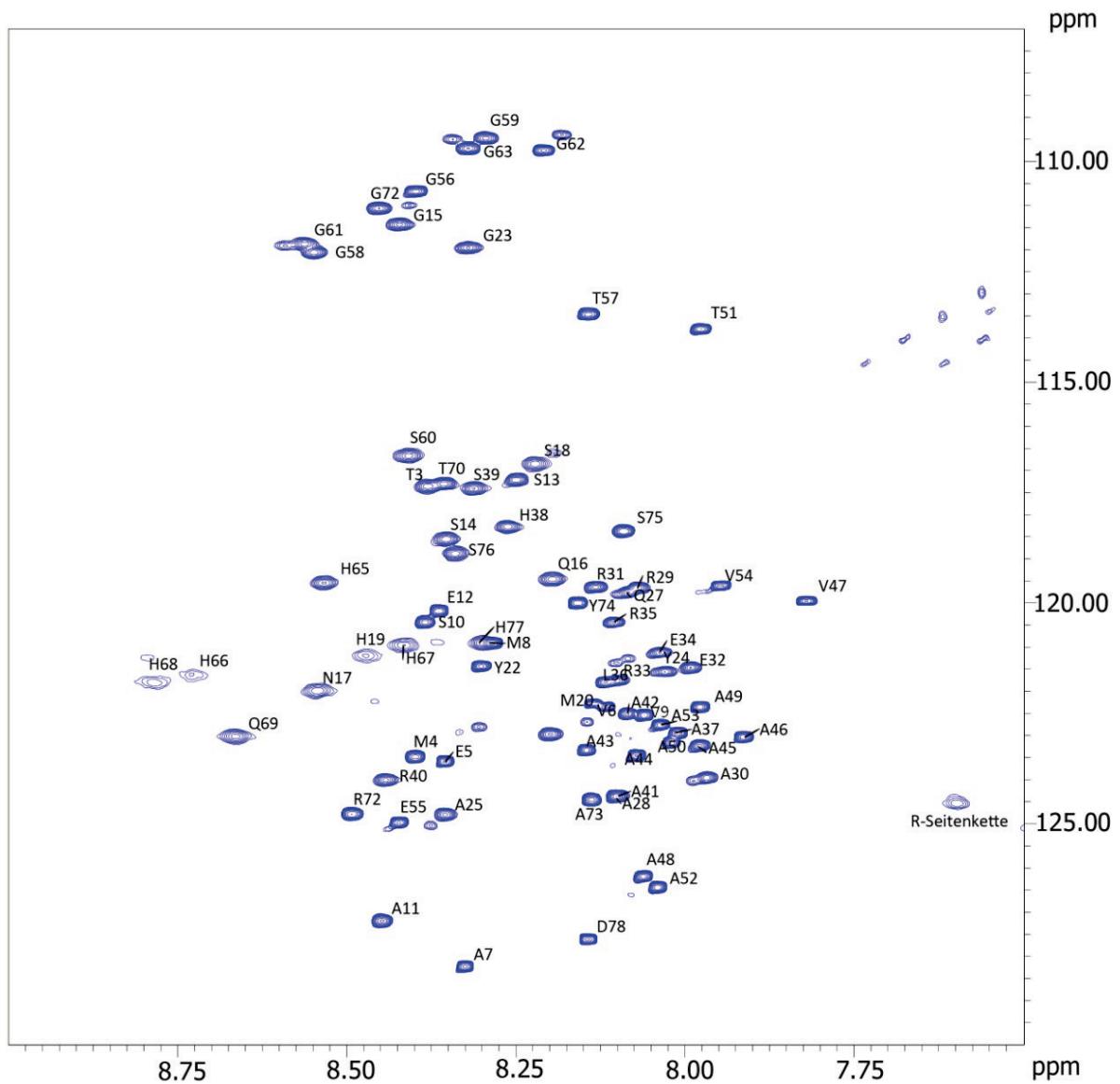


Abb. 4.11: Zugeordnetes 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektrum des Kv1.4 IP75-Peptides.

Messbedingungen: 200 µM Kv1.4 IP75-Peptid in 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.08, F1: 0.1)]. (Zuordnungen vgl. Anhang)

4.3 Das Kv1.4 C84-Konstrukt

Das Kv1.4 C84-Plasmid DNA-Konstrukt wurde von Wiedemann (Institut für Biophysik und physikalische Biochemie, Universität Regensburg) übernommen. Es beinhaltet die Aminosäuren 572 bis 655 des Kv1.4 *shaker* Kaliumkanals von *Rattus Norvegicus* und ist somit direkt nach der S6 Helix cytosolisch lokalisiert (Abb. 1.2). Das Konstrukt wird in Abbildung 4.12 dargestellt.

K_v1.4 - C84 **MGHHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMETENEQTQLT**
QNAVSCPYLPNSNLLKKFRSSTSSSLGDKSEYLEMEEGV
KESLRGKEEKCQGKGDDSETDKNNCSNAKAVETDV

Abb. 4.12: Aminosäuresequenz (AS) des K_v1.4 C84-Konstruktes

Farbschema: (rot) His₁₀-tag mit Linkerregion, welche eine Enterokinaseschnittstelle enthält. (orange) C-terminales PDZ - Bindemotiv. Das K_v1.4 C84-Peptid besteht aus 108 Aminosäuren (M_R 12,8 kDa).

Das Konstrukt lag in einem pET-19b Plasmid (Novagen) vor und wurde mittels *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLysS exprimiert. Die Proteinexpression wurde in LB-Medium, sowie auch in NMM-Medium über Nacht bei 30° C und 200 rpm mit 1 mM IPTG durchgeführt. Das Konstrukt wurde in 'inclusion bodies' eingeschlossen, so dass denaturierend mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt wurde (Abschn. 3.3.4, Abb. 4.13). Der His₁₀-tag wurde nicht entfernt, da alle Ergebnisse vorangegangener Experimente (Schreier, 2006; Meyer, 2005) mit dem His₁₀-tag erzielt wurden. Die Bildung von Disulfidbrücken durch Cysteine wurde unter Verwendung von 20 mM DTT verhindert. Entstandene K_v1.4 C84-Dimere konnten bei der Proteinaufreinigung mittels eines Gelfiltrationsschrittes detektiert und entfernt werden (Abschn. 3.3.8). Das sequentielle Assignment, nötig für die Auswertung von NMR-Messungen wurde von S. Meyer (2005) durchgeführt. Abbildung 4.14 zeigt ein 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC von K_v1.4 C84. Im folgenden wird das K_v1.4 C84-Peptid vereinfacht auch als C84 bezeichnet.

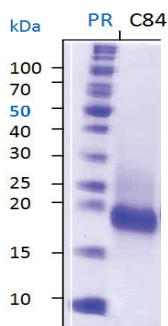


Abb. 4.13: Reinheitskontrolle von K_v1.4 C84.

16 % SDS-Gel nach Coomassie Färbung. Auftragung: Pageruler™ Protein Standard. K_v1.4 C84-Peptid (M_R 12,8 kDa). Das Peptid läuft etwas höher, als erwartet. Dies ist im denaturierten, sowie auch im normalen Milieu der Fall. Meyer (2005) zeigte, dass alle Cysteine frei zugänglich sind. Entscheidend ist hierbei eine sorgfältige Aufreinigung.

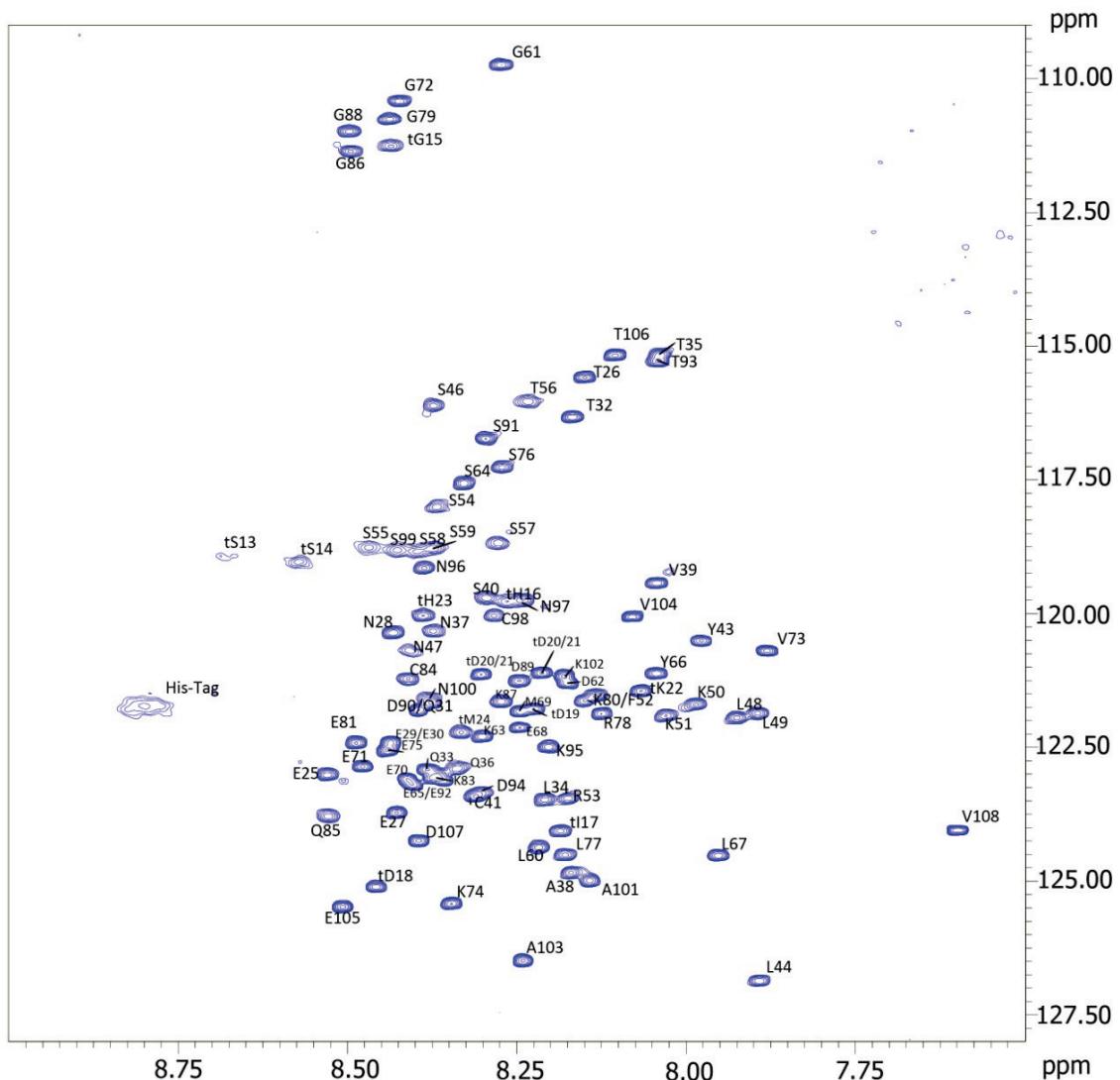


Abb. 4.14: Zugeordnetes 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektren des Kv1.4 C84-Peptides.

Messbedingungen: 400 µM C84 in 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.04, F1: 0.1)]. (Zuordnungen vgl. Anhang)

4.3.1 MD-Simulation des Kv1.4 C84-Konstruktes

Das sequentielle Assignment von C84 wurde 2005 von Simon Meyer durchgeführt. Ihm war es nicht möglich definierte Strukturbereiche in dem C84-Peptid zu identifizieren. Es wird davon ausgegangen, dass das Peptid unstrukturiert und ungefaltet vorliegt (Meyer, 2005). Unter Verwendung gängiger Programme zur Sekundärstrukturbestimmung von Proteinen wie z.B. PredictProteinTM, JpredTM oder Yaspin konnten zudem keine verlässlichen Sekundärstrukturelemente definiert werden. Es existiert somit kein räumliches Proteinmodell des C84-Peptides. Um die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit mit diesem Peptid besser darstellen zu können, wurde eine MD ('Molecular dynamics')-

Simulation durchgeführt. Ziel war nicht die richtige Struktur, oder Faltung von C84 zu bestimmen, sondern ein räumliches Modell zu erschaffen, welches die Darstellung und das Verständnis der Ergebnisse vereinfachen sollte.

Hierbei wurde das Programm "Abalone" Biomolecular Modelling (Windows, Version 1.8.87, Agile Molecule) verwendet. Da MD-Simulationen äußerst rechen- und zeitintensiv sind, wurden nur die einfachsten Simulationen durchgeführt. Ausgangsbasis war die C84 AS-Sequenz aus Abb. 4.12, welches als lineares Peptid in Wasser bei 310 K, 1 atm mit dem AmberII Kraftfeld (2,5 fs timestep, 10K duration) vorgelegt wurde. Das Ergebnis wird in Abbildung 4.15 dargestellt. Insgesamt wurden mehrere Simulationen mit unterschiedlichen Kraftfeldern in unterschiedlichen Medien bei unterschiedlicher Temperatur durchgeführt. Auffällig war, dass stets in dem Raum um die Aminosäuren S46 bis K63 Strukturbereiche entstanden, welche eine definiertere Ordnung und Form als die umliegenden Peptidbereiche einnahmen. Dieser Bereich wird in Abb. 4.15 rot dargestellt. Der N- und C-terminale Bereich des Peptides blieb meist linear. Aufgrund der fehlenden Rechenleistung wird im Laufe dieser Arbeit nicht näher auf MD-Simulationen eingegangen. Das C84 MD-Modell wird jedoch für die Darstellung der Ergebnisse um das C84-Peptid benutzt.

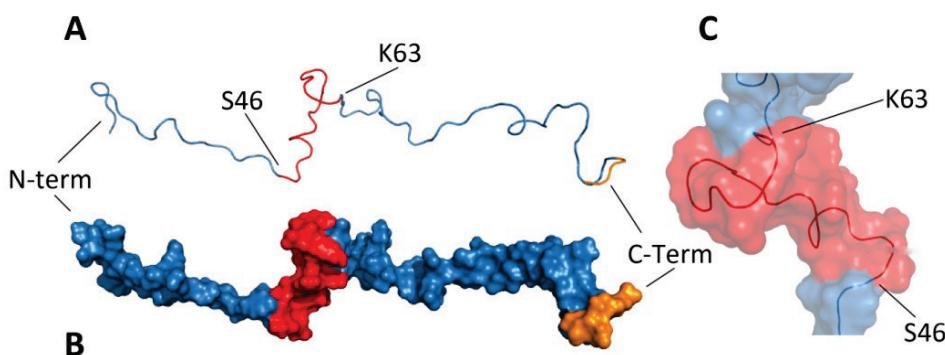


Abb. 4.15: MD-Simulation von Kv1.4 C84 ("Abalone" Biomolecular Modelling, Agile Molecule). Farbschema: (rot) AS-Bereich S46 bis K63 (siehe Text). (orange) C-terminales PDZ-Bindemotiv. Ausgangsbasis der Strukturrechnung war ein lineares Peptid mit der Kv1.4 C84-Peptidsequenz aus Abb. 4.12 ohne His₁₀-tag und ohne Linkerregion. **(A)** 'Ribbon'-Darstellung von C84. **(B)** Oberflächendarstellung von C84. **(C)** 'Ribbon'- und Oberflächendarstellung von C84 (S46 bis K63). Rechenparameter der MD-Simulation: 310 K, 1 atm, H₂O ohne Ionen, AmberII Kraftfeld (2,5 fs timestep, 10 k duration), short optimization (remove 20 clashes).

4.3.2 K_v1.4 C84-Temperaturreihe

2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC NMR-Experimente mit ¹⁵N markiertem C84 konnten nur bei vollständiger Zuordnung der Aminosäuren ausgewertet werden. Hierbei musste das sequentielle C84-Assignment von 278 K (Meyer, 2005) auf 293 K mittels einer Temperaturreihe übertragen werden. Hierbei konnten zudem Informationen über die strukturelle Beschaffenheit von C84 gewonnen werden. Abbildung 4.16 stellt die kombinierten chemischen Verschiebungen, ausgewertet nach Kjaergaard (2011) und die relativen Volumenveränderungen (Auremol™) der einzelnen AS-Signale dar. Auffällig ist, dass der Bereich um das PDZ-Bindemotiv und ein mittlerer Bereich von Aminosäure Y43 bis Aminosäure S59 mehr als eine lokale C84-Konformation andeuten (Abb. 4.16, blau). Das Ergebnis aus Abbildung 4.16 wird in Abbildung 4.17 auf das C84 MD-Modell (Abschn. 4.3.1) übertragen.

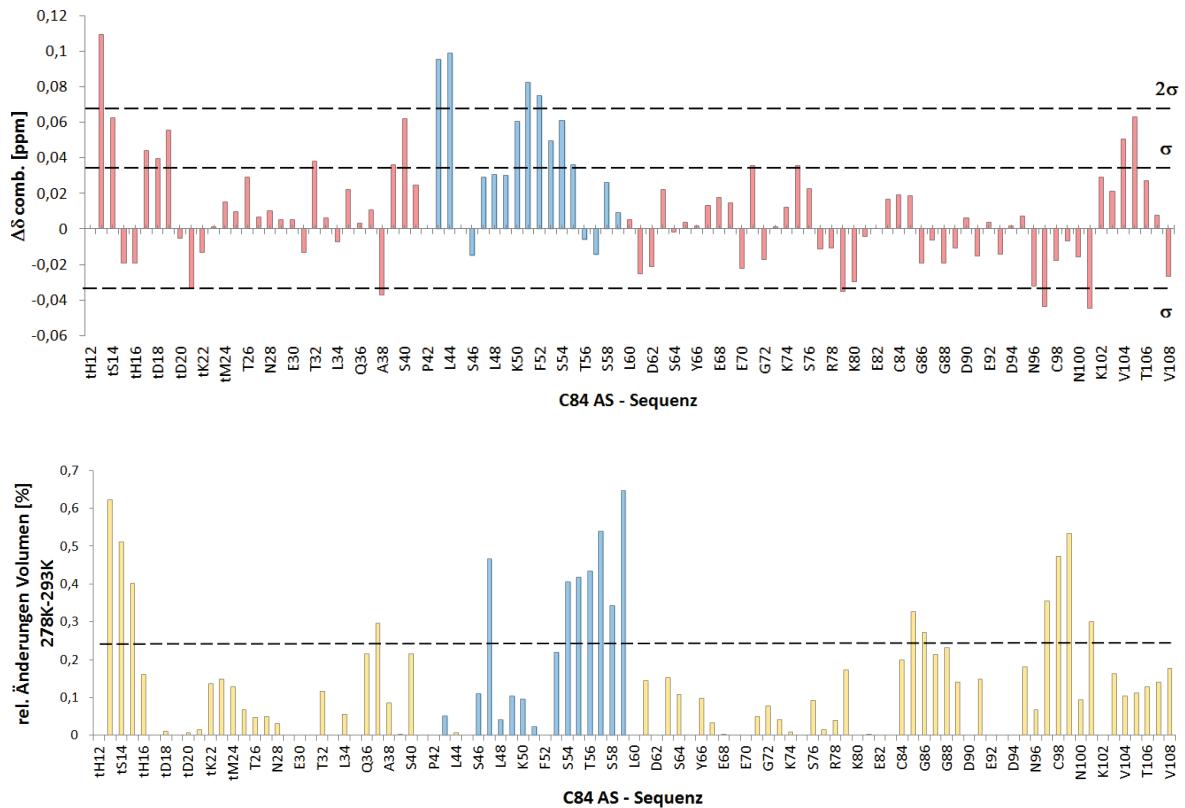


Abb. 4.16: Ergebnis der K_v1.4 C84-Temperaturreihe von 278 K auf 293 K. Säulendiagramme: (rot) Differenz der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta_{\text{comb.}}$ [ppm]. (orange) relative Änderungen der Volumen [%]. (blau) AS-Bereich: AS Y43 bis AS S59 (siehe Text). (---) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). Verglichen wurde ein 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum von C84 bei 278 K zu einem 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K. Messbedingungen: 240 μ M C84 in 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) [TD (F2: 8192, F1: 512); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0,04, F1: 0,1)].

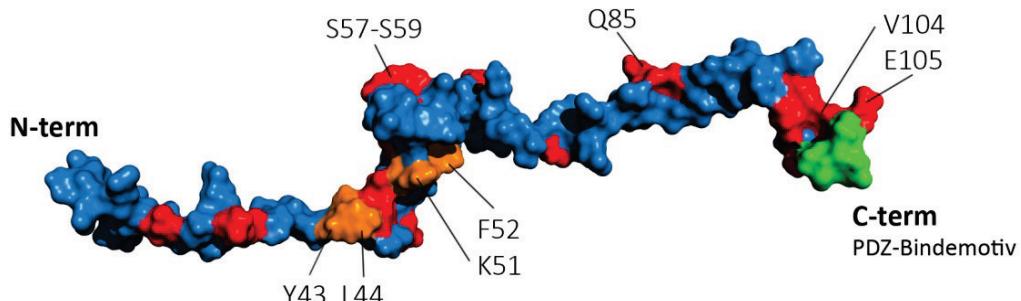


Abb. 4.17: Darstellung der Ergebnisse aus Abb. 4.16 auf dem C84 MD-Modell.

Farbschema: (rot) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen oberhalb von σ . (orange) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen oberhalb von 2σ . (grün) PDZ - Bindemotiv.

4.3.3 Protein-Protein Interaktionsexperiment des Kv1.4 IP75-Peptides mit Kv1.4 C84

Bei diesem Versuch wurde untersucht, ob das IP75-Inaktivierungspeptid und das C84-Peptid miteinander interagieren und sich im NMR-Spektrum beeinflussen. Hierbei wurde ^{15}N -markiertes IP75 (127 μM) vorgelegt und anschließend unmarkiertes C84-Peptid im 3,5-fachen Überschuss zugegeben (442 μM). Dabei wurde bei 293 K ein 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Spektrum von ^{15}N IP75 ohne und ein 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Spektrum mit C84 aufgenommen. Bei dem Verhältnis von 1 : 3,5 war keine relevante Änderung der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ comb. [ppm] oder eine Volumenänderung der einzelnen IP75 NMR-Signale detektierbar (Abb. 4.18). Die chemischen Verschiebungen, sowie die Änderungen der Volumen wurden unter Verwendung von AuremolTM ('automatic peak picking') ausgewertet. Die $\Delta\delta$ comb. und $\Delta\delta H^N$ bewegen sich zwischen 0,001 ppm und 0,002 ppm, was dem vorgegebenem Peak Picking Raster von AuremolTM entspricht.

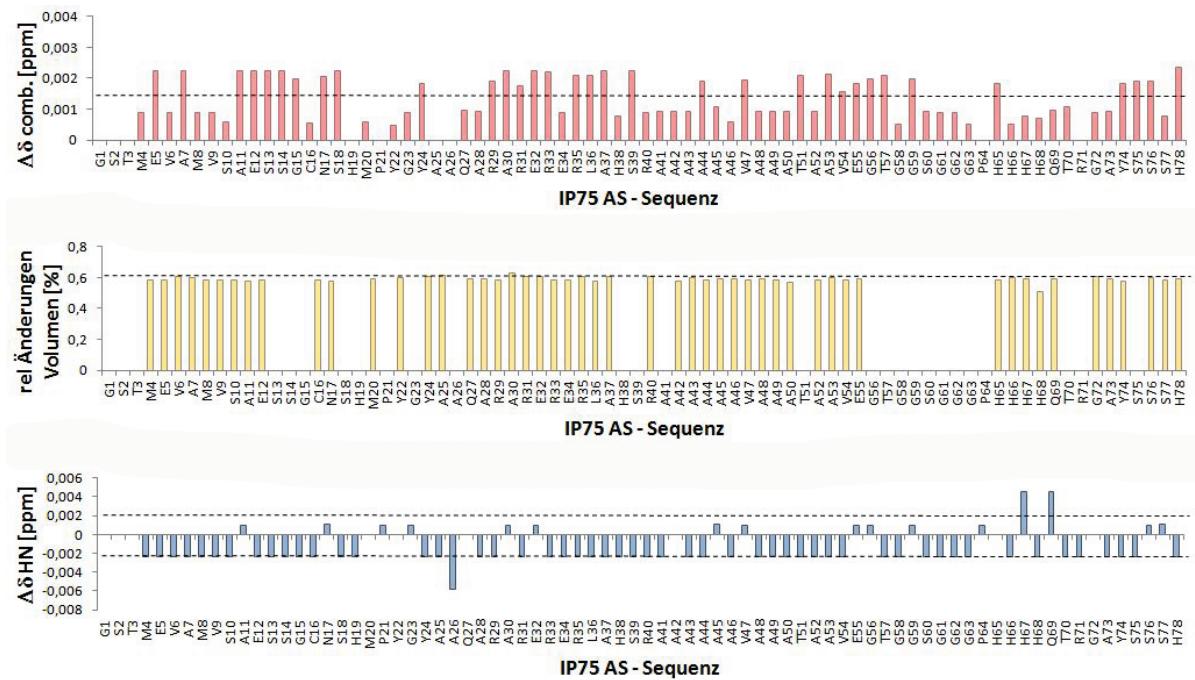


Abb. 4.18: Ergebnis der ^{15}N IP75 Protein-Protein Interaktion mit dem unmarkierten C84-Peptid. Säulendiagramme: (rot) Betrag der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ comb. [ppm]. (orange) relative Änderungen der Volumen [%]. (blau) Differenz der kombinierten chemischen Verschiebungen von $\Delta\delta \text{H}^{\text{N}}$ [ppm]. (---) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). Verglichen wurde ein 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Spektrum von ^{15}N IP75 bei 293 K zu einem 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Spektrum von ^{15}N IP75 und C84 (Verhältnis 1 : 3,5) bei 293 K (siehe Text). Messbedingungen: 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) [TD (F2: 8192, F1: 256); NS 8; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.12, F1: 0.1)].

4.4 Titrationsexperimente: Kv1.4 T1K mit seinem N-terminalen Inaktivierungspeptid Kv1.4 IP75

In den beiden folgenden Abschnitten 4.4.1 und 4.4.2 wird dargestellt, wie sich das T1K-Homotetramer (Abschn. 4.1, ohne His₆-tag) zu seinem N-Terminus gelegenen Inaktivierungspeptid IP75 (Ball-Peptid) in Bezug auf ihre gegenseitige Wechselwirkung verhält. Abschnitt 4.4.1 betrachtet die Interaktion von Seiten der T1K-Domäne und Abschnitt 4.4.2 die Seite des IP75-Peptides.

4.4.1 Protein-Protein Titration zwischen dem K_V1.4 T1K-Tetramer und dem K_V1.4 IP75-Peptid

Die T1K-Domäne wurde mit ihrem N-terminalen Inaktivierungspeptid, dem IP75 (Ball-Peptid) bei 293 K titriert. Die Konzentration der ^2H ^{15}N T1K-Domäne wurde mittels UV-Spektroskopie ('ExPASy - ProtParam tool') bestimmt. Hierbei wurde die Probe mit einer unmarkierten T1K-Probe, deren Konzentration mittels NMR- und UV-Spektroskopie bestimmt worden ist, in Verhältnis gesetzt, um so exakte Konzentrationen in der perdeuterierten Probe einstellen zu können. Bei der Titration (2D-[^{15}N , ^1H]-TROSY-HSQC Spektren) wurden 480 μM ^2H ^{15}N T1K (entspricht der Monomerkonzentration) vorgelegt. Anschließend wurde die T1K-Probe mit unmarkiertem IP75 ausgehend von einem T1K-Homotetramer (120 μM) zu 0.1 IP75 Teilen in Verdoppelungsschritten bis zu einem 4-fachen Überschuss von IP75 zum T1K-Tetramer titriert. Abbildung 4.19 zeigt das Ergebnis dieser Titration. Verglichen wurde hier das Ausgangsspektrum von ^2H ^{15}N T1K ohne IP75-Peptid mit dem Spektrum bei 2-fachem Überschuss von IP75 zur T1K-Domäne (Abb. 4.19). Abbildung 4.20 stellt das Ergebnis aus Abb. 4.19 auf dem T1K-Strukturmodell (Abschn. 4.1.3) dar.

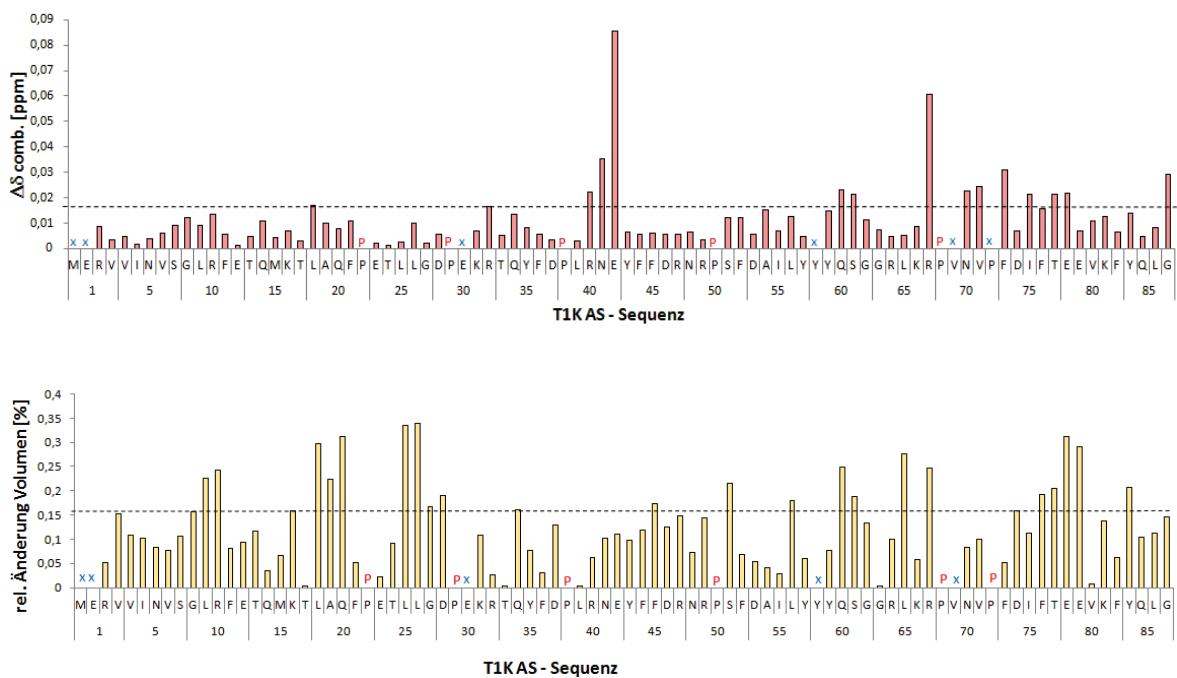


Abb. 4.19: Ergebnisse der ^2H ^{15}N T1K Protein-Protein Titration mit einem unmarkierten IP75-Peptid. Säulendiagramme: (rot) Betrag der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ comb. [ppm]. (orange) Relative Änderungen der Volumen [%]. (---) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. Verglichen wurde ein 2D-[^{15}N , ^1H]-TROSY-HSQC Spektrum von ^2H ^{15}N T1K bei 293 K zu einem 2D-[^{15}N , ^1H]-TROSY-HSQC Spektrum von

¹⁵N T1K und IP75 (Verhältnis 1 (T1K-Tetramer) : 2) bei 293 K (siehe Text). Messbedingungen: 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.12, F1: 0.1)].

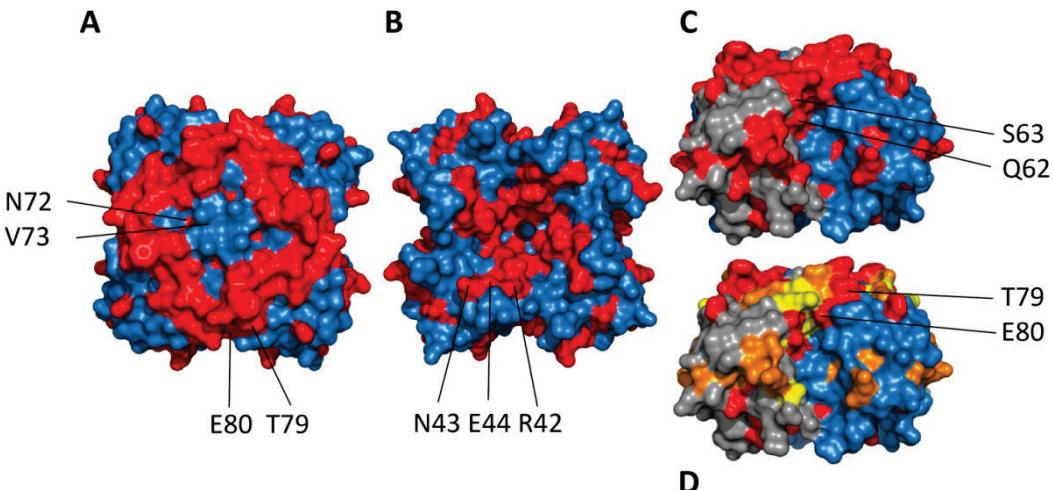


Abb. 4.20: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.19 und Abb. 4.21 auf die T1K-Struktur. Farbschema: (rot) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen oberhalb von σ . (orange) Relative Änderungen der Volumen oberhalb von σ . (gelb) Aminosäuren, welche in mehrere Zustände bei der Protein-Protein Titration aufspalten (Abb. 4.21, siehe Text). (blau, grau) Kv1.4 Monomere. Ansicht der T1K-Domäne ohne His₆-tag von (A) oben, (B) unten, (C) der Seite und (D) Innen.

Die Signale mancher T1K-Aminosäuren spalten im Verlauf der Titration in mehrere Zustände auf, was typisch für einen langsamen Austausch ist. Dies wird in Abbildung 4.21 gezeigt, wo ein Verhältnis von einem IP75-Peptid zu einem T1K-Homotetramer dargestellt ist. Bei Betrachtung von 4.19 (rotes Säulendiagramm) fällt auf, dass vor allem kombinierte chemische Änderungen bei den C-terminal gelegenen Aminosäuren auftreten. Strukturell liegen diese besonders im oberen Bereich des T1K-Homotetramers (Abb. 4.20, Bild A). Im unteren Bereich des T1K-Homotetramers kommt es vermehrt zu Änderungen der Volumen der einzelnen Signale. Werden die Ergebnisse der Aufspaltung einzelner Aminosäuren hinzugenommen (siehe Abb. 4.21 und Abb. 4.22) kann davon ausgegangen werden, dass die Bindestellen des IP75 mit dem T1K-Homotetramer sich in dessen oberen Bereich befinden, bzw. an der Seite der T1K-Domäne zwischen den T1K-Monomeren entlang verlaufen.

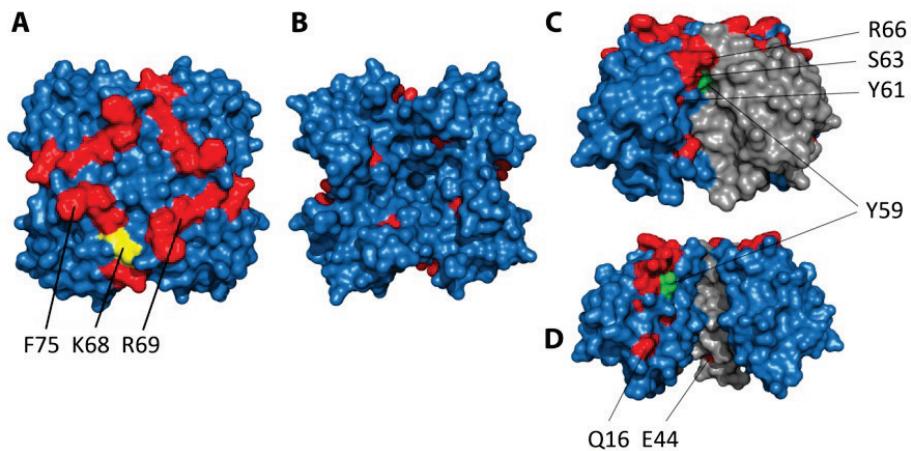


Abb. 4.21: Darstellung der Resonanzsignale, welche im Verlauf der Titration aufspalteten. Farbschema: (rot) Aminosäuren, welche in mehrere Zustände bei einem Verhältnis von einem T1K-Homotetramer zu einem IP75-Peptid aufspalten. (gelb) Aminosäure K68 (Abb. 4.22). (grün) Aminosäure Y59 (Abb. 4.22). (blau, grau) Kv1.4 Monomere. Ansicht: T1K von (A) oben (B) unten (C) der Seite und (D) innen. [SI (F2: 16384, F1: 8192); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.12, F1: 0.1)].

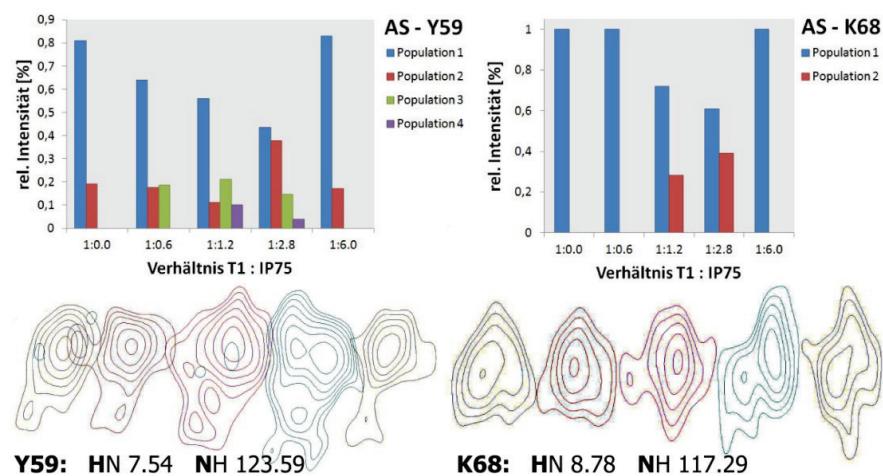


Abb. 4.22: Darstellung der Aminosäuren Y59 und K68, deren Signale im Verlauf der Protein-Protein Titration aufspalten. Dargestellt sind je die relativen AS-Signalintensitäten zu dem Konzentrationsverhältnis des T1-Tetramers zu dem IP75-Peptid (1 T1K-Tetramer: 1 IP75-Peptid). Y59 weist zwischen einem Konzentrationsverhältnis von 1 : 0,6 bis 1 : 2,8 vier mögliche Zustände und K68 zwischen einem Konzentrationsverhältnis von 1 : 1,2 bis 1 : 2,8 zwei mögliche Zustände auf. Lokalisation der AS auf dem T1K-Strukturmodell siehe Abb. 4.21. [SI (F2: 16384, F1: 8192); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.12, F1: 0.1)].

Zusätzlich wurde die Affinität des IP75-Peptides zu dem T1K-Homotetramer bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass ein IP75-Peptid an ein T1K-Homotetramer bindet (Abb. 4.23). Bei der Annahme, dass ein IP75-Peptid an ein T1K-Homotetramer bindet, musste davon ausgegangen werden, dass ein komplexer Bindungsmechanismus zwischen den beiden Proteinen existiert.

Unter Verwendung einer Fit-Funktion aus Abschn. 3.5.3 war es möglich Informationen über die Bindungskonstante K_D und den Hill-Koeffizienten n zu erhalten. Bindungsrelevante Aminosäuren wurden im Verlauf der Titration verfolgt und ein Fit zu den Datenreihen erstellt. Das Ergebnis wird in Abb. 4.23 dargestellt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Bindung zwischen den Interaktionspartnern sich im μM -Bereich (8,66 bis 37,19 μM) befindet und eine negative Kooperativität ($n < 1$) existiert. Der Hill-Koeffizient n bewegt sich zwischen 0,64 und 0,89.

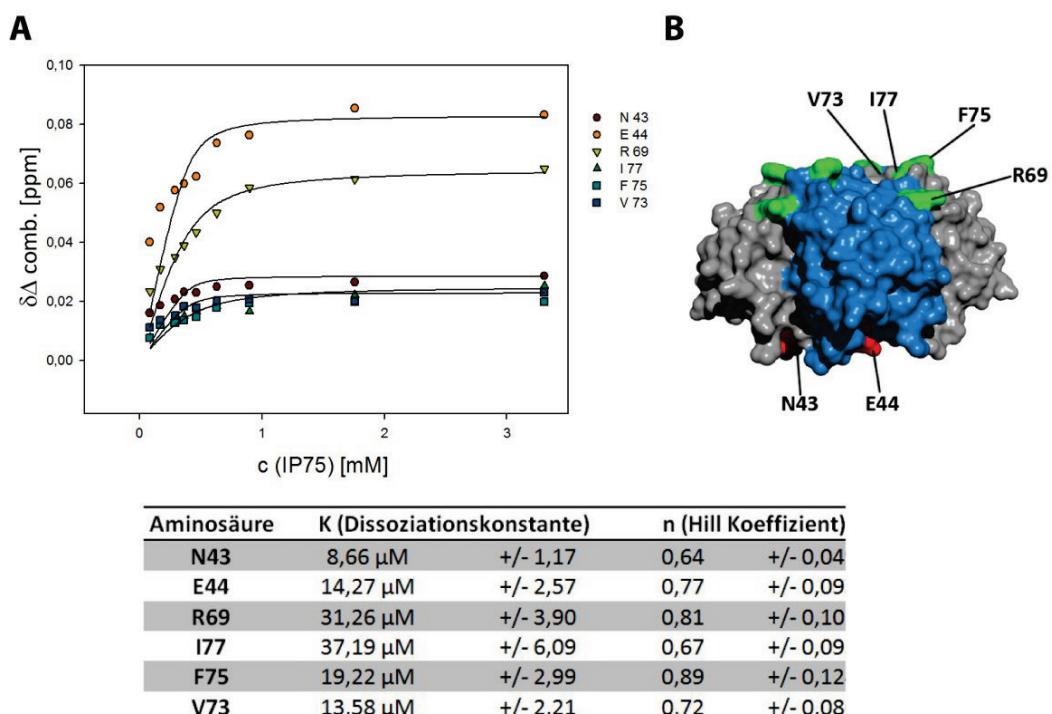


Abb. 4.23: Beträge der Verschiebungen von sechs ausgewählten, deutlich verschobenen Signalen des T1K-Konstrukt aufgetragen gegen die Konzentration des IP75-Peptides. (A) Stöchiometrisch entspricht die Zahl 1 auf der x-Achse einem IP75-Peptid zu einem T1K-Homotetramer. Der K_D konnte mit Werten zwischen 8,66 und 37,19 μM bestimmt werden. Der Hill Koeffizient n bewegte sich zwischen 0,64 und 0,89, was kleiner $n = 1$ ist und somit einer negativen Kooperativität entspricht. (B) Darstellung der relevanten Aminosäuren auf der T1K-Struktur. Die Messpunkte wurden mit Gleichung (C) in Abschnitt 3.5.3 unter der Annahme von vier Bindungsplätzen auf der T1K-Struktur gefittet. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.12, F1: 0.1)].

4.4.2 Protein-Protein Interaktion zwischen Kv1.4 IP75 und Kv1.4 T1K

Die Wechselwirkung zwischen der T1K-Domäne und seinem natürlichen Inaktivierungspeptid, dem IP75 wird in diesem Kapitel von Seiten des IP75-Peptides betrachtet. Hierbei wurden 100 μM ^{15}N markiertes IP75 vorgelegt und mit 400 μM (T1K-Monomerkonzentration) unmarkiertem T1K versehen. Aufgenommen wurden hierbei zwei

2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektren, eines mit und eines ohne T1K-Protein bei 293 K. Abbildung 4.24 zeigt das Ergebnis der Auswertung und Abbildung 4.25 die Übertragung der Ergebnisse auf die Struktur des IP75-Peptides. Insgesamt konnten Wechselwirkungen über den gesamten Bereich des Peptides detektiert werden. Von besonderem Interesse sind die Signalverschiebungen der Aminosäuren im C-terminalen glycinreichen Bereich, welcher in Abschn. 4.6 näher besprochen wird.

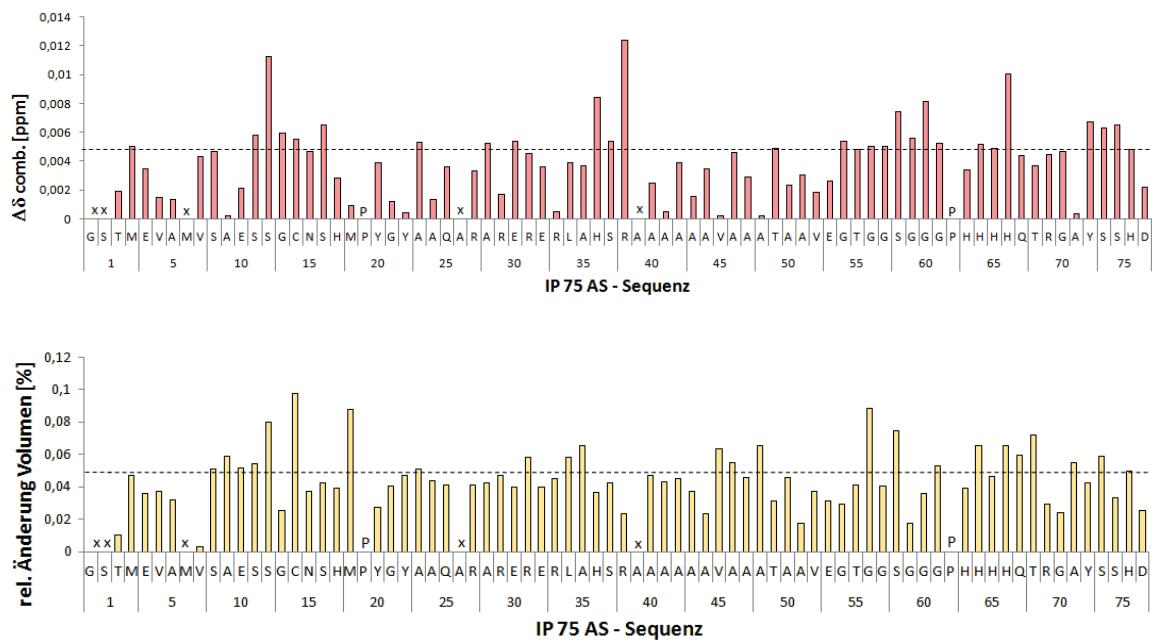


Abb. 4.24: Ergebnisse der ¹⁵N IP75 Protein-Protein Interaktion mit dem T1K-Homotetramer. Säulendiagramme: (rot) Betrag der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ comb. [ppm]. (orange) Relative Änderungen der Volumen [%]. (--) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. Verglichen wurde ein 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum von ¹⁵N IP75 bei 293 K zu einem 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum von ¹⁵N IP75 und T1K (Verhältnis 1 (T1K-Tetramer) : 1 IP75) bei 293 K (siehe Text). Messbedingungen: 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.08, F1: 0.1)].

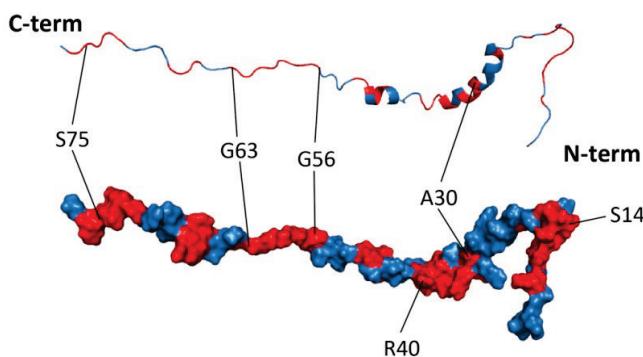


Abb. 4.25: Darstellung der Ergebnisse aus Abb. 4.24 auf der IP75-Struktur. Farbschema: (rot) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen oberhalb von σ .

4.5 Titrationsexperimente: K_v1.4 T1K mit dem C-terminalen K_v1.4 C84 Peptid

In den beiden folgenden Abschnitten 4.5.1 und 4.5.2 wird dargestellt, wie sich das T1K-Homotetramer (Abschn. 4.1, ohne His₆-tag) zu dem C-terminal gelegenem C84-Peptid in Bezug auf ihre gegenseitige Wechselwirkung verhält. Abschnitt 4.5.1 betrachtet die Protein-Protein Interaktion von Seiten der T1K-Domäne und Abschnitt 4.5.2 die Seite des C84-Peptides.

4.5.1 Protein-Protein Titration zwischen dem K_v1.4 T1K-Tetramer und dem K_v1.4 C84-Peptid

Die T1K-Domäne wurde mit dem C-terminalen C84-Peptid titriert. Die 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektren der Protein-Protein Titration wurden bei 293 K durchgeführt. Hierbei wurde in Verdoppelungsschritten angefangen bei 1 : 0,1 (1 T1-Tetramer : 0,1 C84) bis zu einem 8-fachen Überschuss von C84 titriert. Abbildung 4.26 zeigt das Ergebnis der Titration. Analog wie in Abschn. 4.4.1 wurde ein T1K-Spektrum mit C84 und eines ohne C84 ins Verhältnis gesetzt (1 T1K Tetramer : 4 C84 Peptiden). In Abb. 4.27 wird das Ergebnis aus 4.26 auf die T1K-Struktur übertragen. Hierbei lässt sich gut erkennen, dass das C84-Peptid andere Bereiche auf der T1K-Domäne beeinflusst, als das IP75 Peptid (vgl. Abschn. 4.4.1).

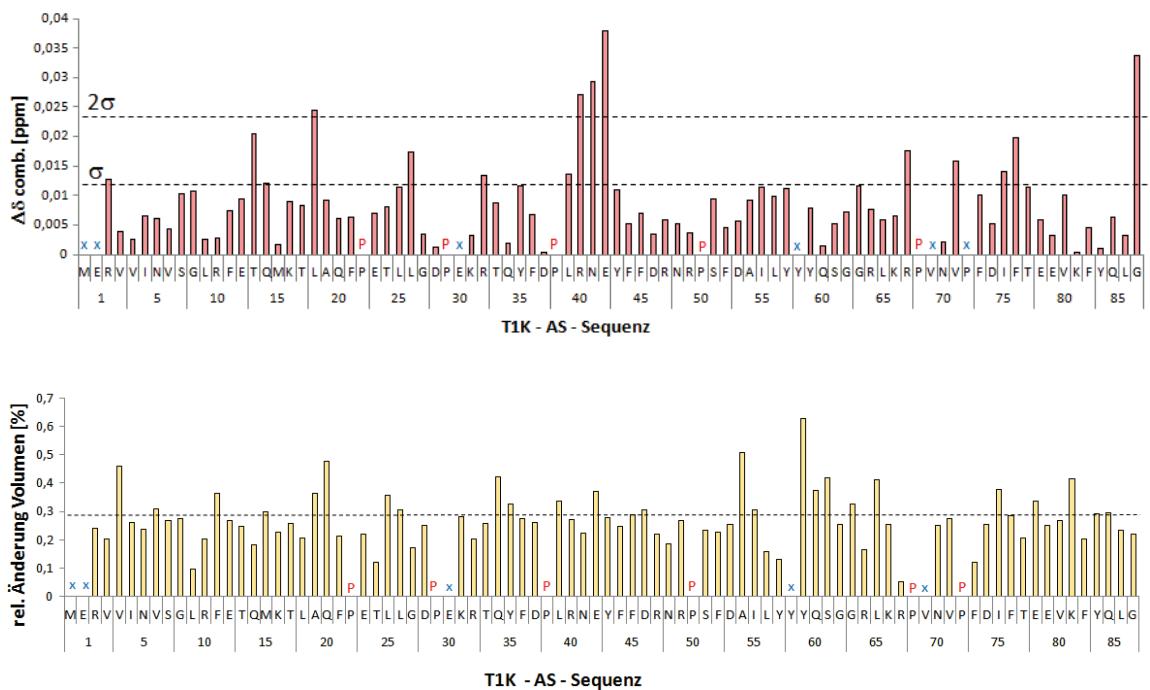


Abb. 4.26: Ergebnisse der ^2H ^{15}N T1K Protein-Protein Titration mit einem unmarkierten C84-Peptid. Säulendiagramme: (rot) Betrag der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ comb. [ppm]. (orange) relative Änderungen der Volumen [%]. (---) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. Verglichen wurde ein 2D- $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY-HSQC Spektrum von ^2H ^{15}N T1K bei 293 K zu einem 2D- $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY-HSQC Spektrum von ^{15}N T1K und C84 (Verhältnis 1 (T1K-Tetramer) : 4) bei 293 K (siehe Text). Messbedingungen: 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.12, F1: 0.1)].

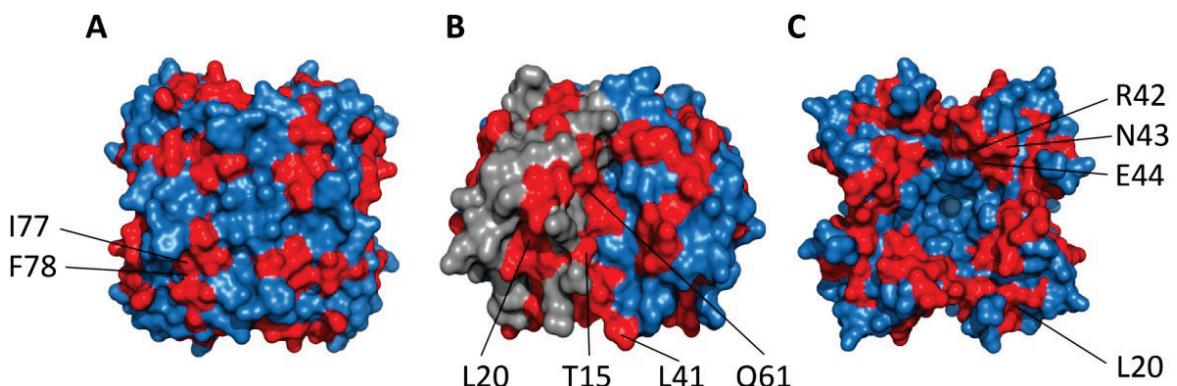


Abb. 4.27: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.26 auf die T1K-Struktur. Farbschema: (rot) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen oberhalb von σ . (blau, grau) T1K-Monomere. Ansicht der T1K-Domäne ohne His₆-tag von (A) oben, (B) der Seite und (C) Innen.

Zusätzlich wurde die Affinität des C84-Peptides zu dem T1K-Homotetramer bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass mehr als ein C84-Peptid an eine T1K-Domäne bindet (Abb. 4.27). Bindungsrelevante Aminosäuren wurden bei der Protein-Protein Titration verfolgt

und ein Fit zu den Datenreihen erstellt. Hierbei wurde die Fit-Formel aus Abschn. 3.5.3 verwendet, welche es ermöglicht gleichzeitig Informationen über die Bindungskonstante K_D und den Hill Koeffizienten n zu erhalten. Das Ergebnis wird in Abb. 4.27 dargestellt. Es wurde von vier möglichen Bindungsstellen auf dem T1-Tetramer ausgegangen.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die mikroskopische Bindungskonstante zwischen den Interaktionspartnern sich im mM-Bereich (0,61 bis 0,73 mM) befindet. Die Bindung ist in etwa um den Faktor 20 geringer als die Bindung zwischen der T1K-Domäne und dem IP75-Peptid (Abb. 4.23). Der Hill-Koeffizient deutet die Zahl 1 an, was keinen kooperativen Effekt vermuten lässt.

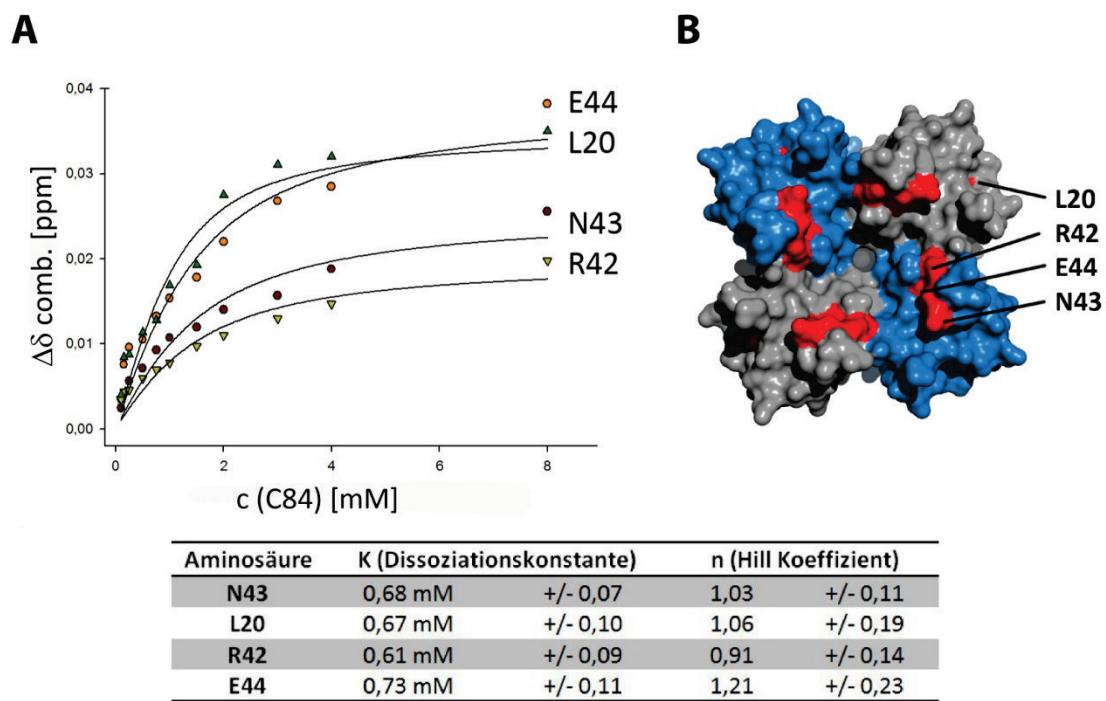


Abb. 4.28: Beträge der Verschiebungen von vier ausgewählten, deutlich verschobenen Signalen des T1K-Konstrukt aufgetragen gegen die Konzentration des C84-Peptides. Stöchiometrisch entspricht die Zahl 1 auf der x-Achse einem C84-Peptid zu einem T1K-Homotetramer. Bei Betrachtung kann davon ausgegangen werden, dass mehrere C84-Peptide an einer Bindungssättigung an dem T1K-Homotetramer beteiligt sind. Der K_D konnte mit Werten zwischen 0,61 und 0,73 mM bestimmt werden. Die Raten wurden mit Gleichung (C) in Abschnitt 3.5.3 unter der Annahme von vier Bindungsplätzen gefittet. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.12, F1: 0.1)].

4.5.2 Protein-Protein Interaktion zwischen Kv1.4 C84 und Kv1.4 T1K

Die Wechselwirkung zwischen der T1K-Domäne und dem C84-Peptid wurden nun von Seiten des C84-Peptides untersucht. Hierbei wurden 100 µM ¹⁵N markiertes C84-Peptid vorgelegt und mit 400 µM unmarkiertem T1K der monomeren Einheiten im Tetramer versehen. Aufgenommen wurden hierbei zwei 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektren, eines mit und eines ohne T1K-Probe. Der Versuch wurde bei 293 K und bei 278 K durchgeführt. Abbildung 4.29 zeigt das Ergebnis der Auswertung und Abbildung 4.30 die Übertragung der Ergebnisse auf die Struktur des C84-Peptides bei beiden Temperaturen. Hierbei kommt es zu Wechselwirkungen über den gesamten Strukturbereich des Peptides. Betrachtet man das Ergebnis genauer wird sichtbar, dass es gerade im Bereich der Aminosäuren S46 bis K63 zu kombinierten chemischen Verschiebungen und zu Volumenänderungen kommt (Abb. 4.29). Dies entspricht exakt dem gleichen Bereich, welcher sich schon bei der MD-Simulation (Abschn. 4.3.1) und bei der Temperaturreihe (Abschn. 4.3.2) auffällig verhielt.

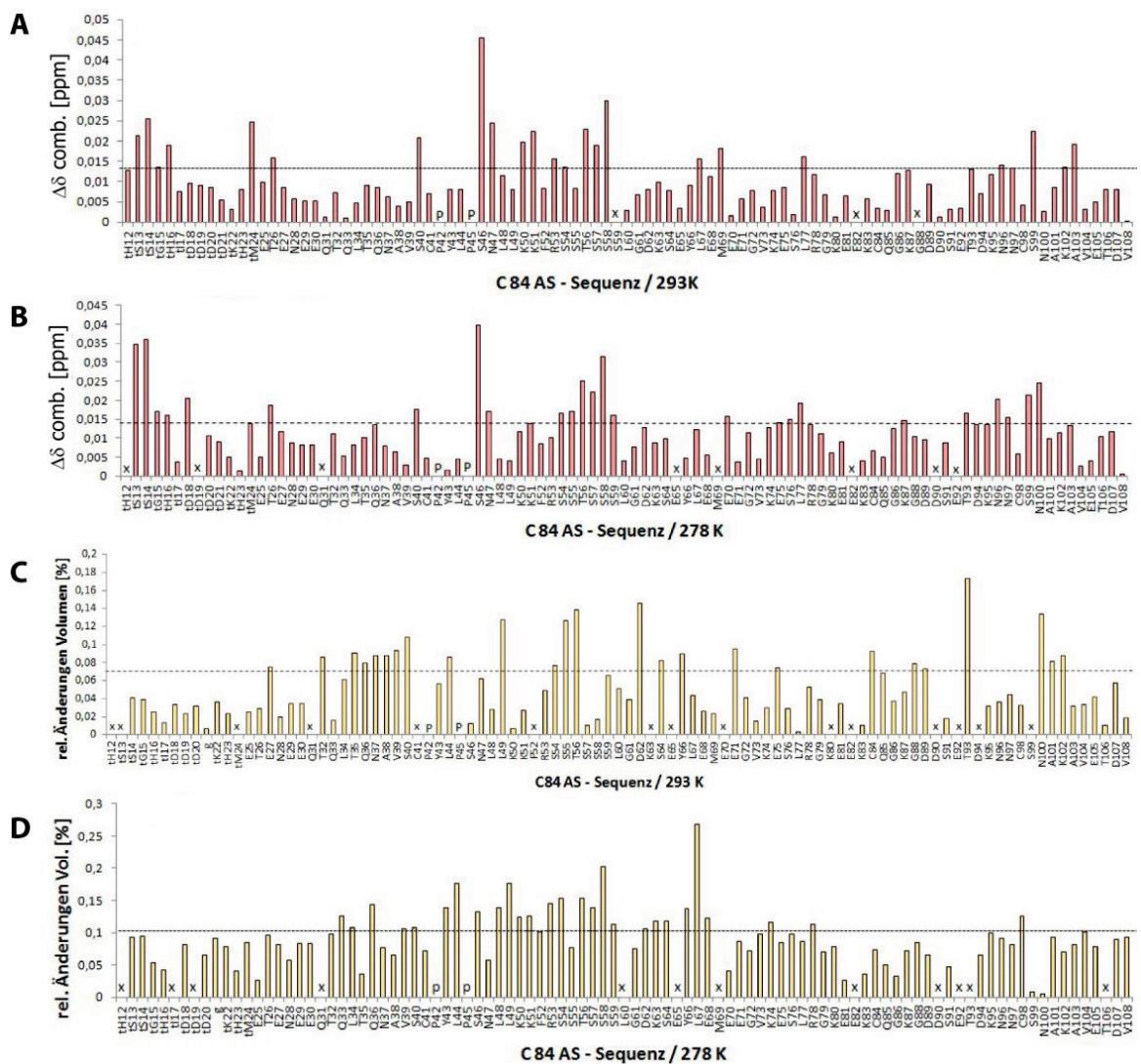


Abb. 4.29: Ergebnisse der ^{15}N C84 Protein-Protein Interaktion mit dem T1K-Homotetramer. Säulendiagramme: (rot) Betrag der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta \text{ comb.}$ [ppm]. (orange) Relative Änderungen der Volumen [%]. (--) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. Verglichen wurden ein 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Ausgangsspektrum von ^{15}N C84 (100 μM) ohne T1K mit einem 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Spektrum mit ^{15}N C84 (100 μM) und T1K (400 μM , Monomerkonzentration) (Verhältnis 1 C84 : 1 T1K-Tetramer). Das Experiment wurde bei 278 K (Säulendiagramm B und D) und bei 293 K (Säulendiagramm A und C) durchgeführt. Messbedingungen: 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.05, F1: 0.1)].

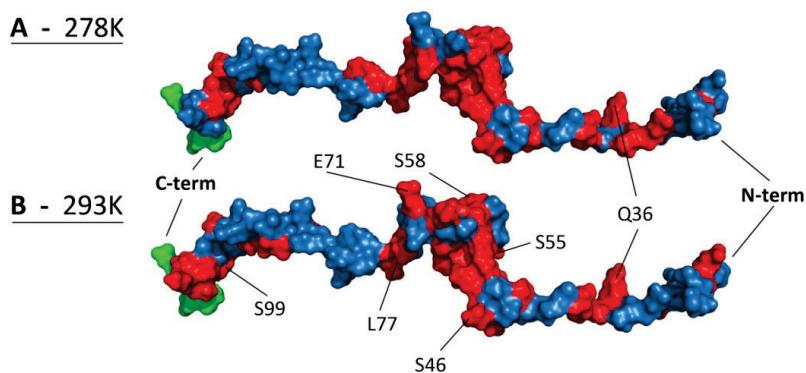


Abb. 4.30: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.29 auf die Struktur des C84-Peptides. Farbschema: (rot) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen oberhalb von σ . (grün) PDZ-Bindemotiv. (A) Protein-Protein Interaktion bei 278 K. (B) Protein-Protein Interaktion bei 293 K.

4.6 Protein-Protein Interaktion: Das N-terminale Kv1.4 IP75-Inaktivierungspeptid mit der Kv1.4 T1K-Domäne und dem C-terminalen Kv1.4 C84-Peptid

Im folgenden Experiment wurde die Interaktion zwischen der T1K-Domäne (Abschn. 4.1, ohne His₆-tag), dem N-terminalen Inaktivierungspeptid IP75 und dem C84-Peptid untersucht. Die Untersuchung wurde auf Seiten des IP75-Peptides vorgenommen. Für das Experiment wurden 100 μ M ¹⁵N markiertes IP75 vorgelegt und ein 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K aufgenommen. Anschließend wurden 400 μ M unmarkiertes T1K zugegeben, was einem Verhältnis von 1 : 4, also ein Peptid auf ein T1K Homotetramer bedeutete. Davon wurde erneut ein 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K aufgenommen. Im nächsten Schritt wurde dem Ansatz C84 im 6-fachen Überschuss zu IP75 zugegeben und erneut ein 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K aufgenommen. Stets wurden die Konzentrationen der vorliegenden Proteine auf ihre Ausgangswerte ausgeglichen. Zusammengefasst lag maximal ein IP75-Peptid auf einem T1K-Tetramer mit vier möglichen Bindungsstellen vor. Hierzu kamen zusätzlich sechs C84-Peptide auf die vier möglichen Bindungsstellen des T1K-Tetramers. Theoretisch könnten so auch erst drei Bindungsplätze des T1-Tetramers besetzt werden, bevor das IP75 verdrängt wird. Beim anschließenden Vergleich der drei NMR-Spektren untereinander konnten Zusammenhänge zwischen den drei Proteinen und vor allem der direkte Einfluss des C84-Peptides auf den IP75/T1K-Komplex verdeutlicht werden. Abb. 4.31 zeigt die ausgewerteten kombinierten chemischen Verschiebungen. Dieses Ergebnis wird in Abb. 4.32 auf die Struktur des IP75-

Peptides übertragen. Die Änderungen der Volumen der einzelnen AS-Signale wird in Abb. 4.33 und Abb. 4.34 gezeigt.

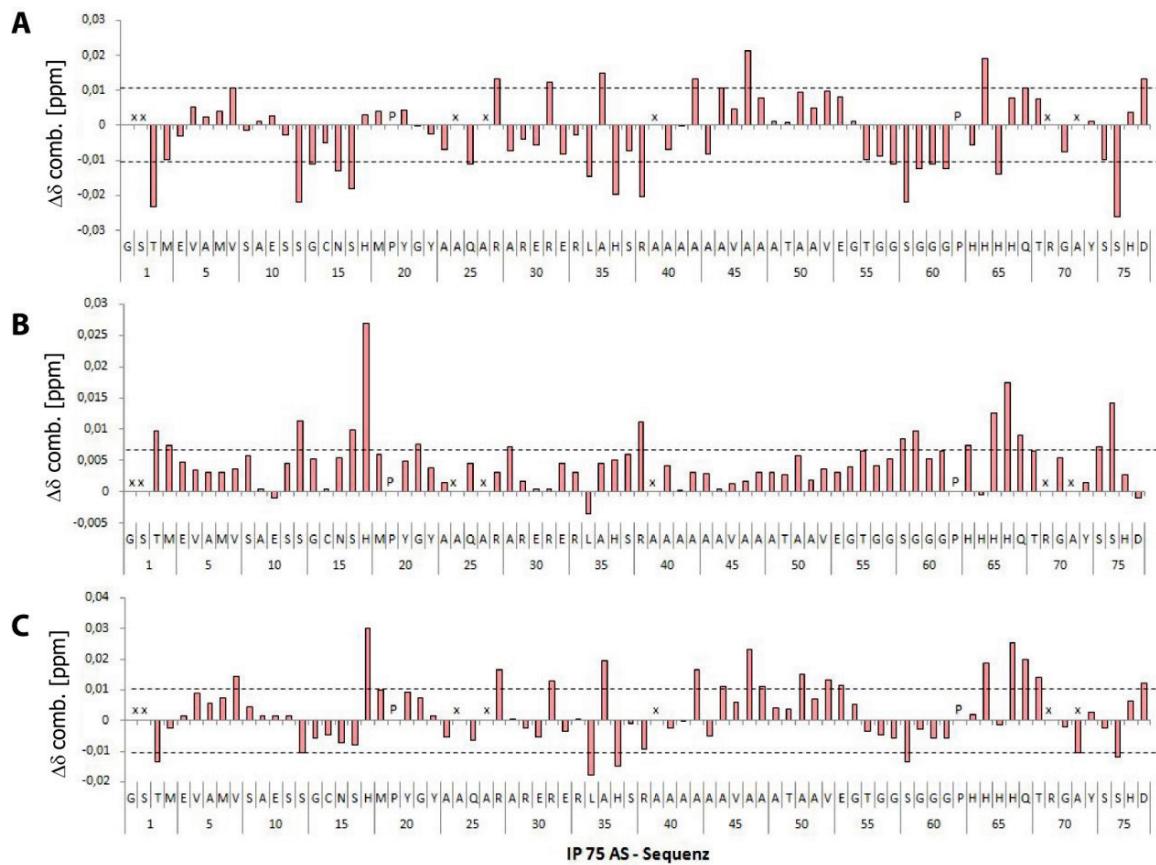


Abb. 4.31: Darstellung der chemischen Verschiebungen aus der Protein-Protein Interaktion von ^{15}N IP75 mit der T1K-Domäne und dem C84-Peptid. Säulendiagramme: (rot) Differenz der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ comb. [ppm]. (--) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. **(A)** Beschreibt die Änderungen an IP75, welche durch die T1K-Domäne ausgelöst werden. (Verhältnis 1 IP75 : 1 T1K-Tetramer). **(B)** Zeigt die Änderungen, welche C84 an dem IP75/T1K-Komplex bewirkt. (Verhältnis 1 IP75/T1K-Komplex : 6 C84) **(C)** Zeigt die Summe der Änderungen an IP75 nach der Zugabe der T1K-Domäne und des C84-Peptides. Messbedingungen: 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.08, F1: 0.1)].

Dieses Experiment verdeutlicht, welchen Einfluss das C84-Peptid auf den IP75/T1K-Komplex besitzt. In Abschnitt 4.3.3 konnte bereits geklärt werden, dass die beiden Peptide IP75 und C84 bei den dort gewählten NMR-spektroskopischen Bedingungen nicht miteinander wechselwirkten. Somit sind alle strukturellen Änderungen, welche C84 an dem IP75/T1K-Konstrukt auslöst, direkt in Zusammenhang mit seiner Bindung an die T1K-Domäne zu verstehen. Von Interesse war, ob C84 nun in der Lage ist, IP75 partiell oder komplett von der T1K-Domäne zu verdrängen. Der Einfluss der T1K-Domäne auf die Struktur des IP75-Peptides wurde bereits in Abschn. 4.4.2 erläutert. Analog dazu kam es in diesem Versuch zu

Wechselwirkungen mit der T1K-Domäne über den gesamten Bereich des IP75-Peptides. Dies wird in Abb. 4.32 (Bild 1) veranschaulicht. Es kommt zwischen dem IP75-Peptid und der T1K-Domäne zu Wechselwirkungen an der Ball-Domäne (Abb. 4.32, Bild 1, Kreis B1) und in einem weiteren glycinreichen, äußerst flexiblen Bereich (Abb. 4.32, Bild 1, Kreis A1). Dieser glycinreiche Bereich entspricht in etwa den Aminosäuren G56 bis G64 (vgl. Abb. 4.31). Bei Zugabe von C84 zu dem IP75/T1K-Komplex kommt es nun zu Änderungen bevorzugt in diesem glycinreichen Bereich. Dies wird in Abb. 4.32 (Bild 2, Kreis A2) bildlich dargestellt. Wird nun der Kreis A3 in Abb. 4.32 (Bild 3) betrachtet, fällt auf, dass das C84-Peptid einen direkten Einfluss auf das IP75-Peptid an dem T1K/IP75-Komplex besitzt. Dort wird der Gesamteinfluss des C84-Peptides und der T1K-Domäne auf das IP75-Peptid dargestellt (Abb. 4.32, Bild 3).

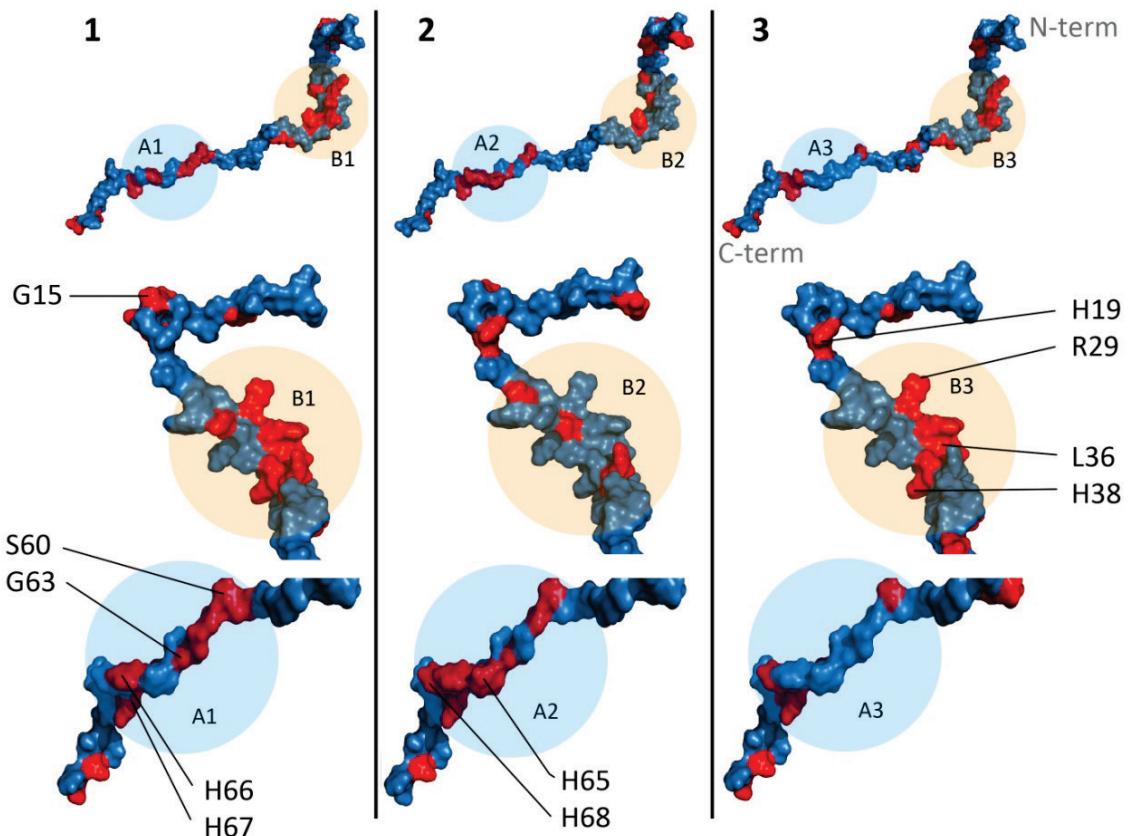


Abb. 4.32: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Abb. 4.31. Farbschema: (rot) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen oberhalb von σ . Identische Strukturbereiche sind zur besseren Orientierung mit blauen (A) bzw. orangen (B) Kreisen hinterlegt. (1) Zeigt die Änderungen an IP75, welche durch die T1K-Domäne ausgelöst werden. (Verhältnis 1 IP75 : 1 T1K Homotetramer). (2) Zeigt die Änderungen, welche C84 an dem IP75/T1K-Komplex bewirkt. (Verhältnis 1 IP75/T1K-Komplex : 6 C84; dargestellt nur IP75). (3) Zeigt die Änderungen an IP75, welche nach der Zugabe der T1K-Domäne und dem C84-Peptid entstehen.

Um den Einfluss des C84-Peptides auf den IP75/T1K-Komplex besser verstehen zu können, wurden zusätzlich zu den kombinierten chemischen Verschiebungen (Abb. 4.31) die relativen Änderungen der Volumen der einzelnen Signale bei diesem Proteinbindungsexperiment untersucht. Dieses Ergebnis wird in Abbildung 4.33 gezeigt. Die Ergebnisse werden von der strukturellen Darstellung auf der IP75-Peptidstruktur in Abb. 4.33 zusammengefasst.

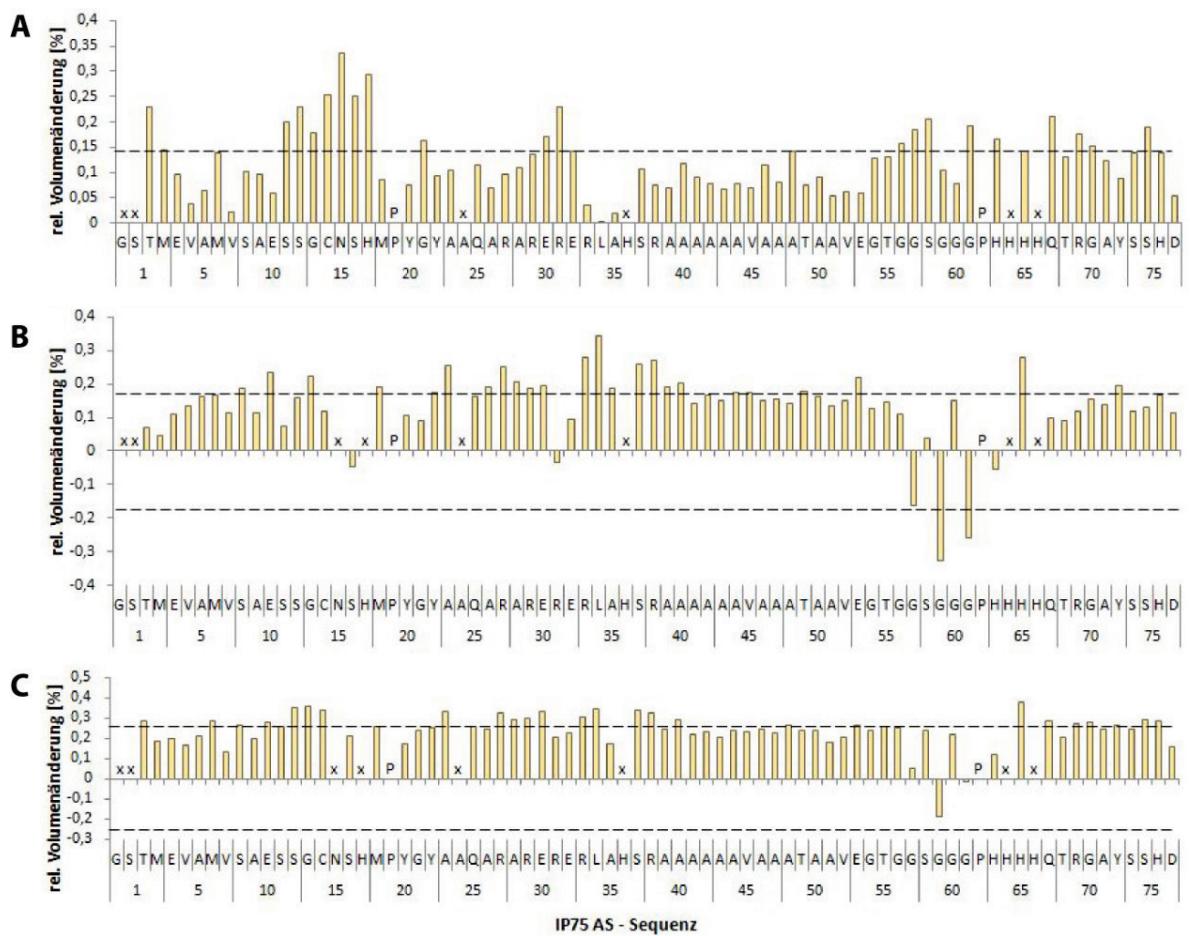


Abb. 4.33: Volumenänderungen bei der Protein-Protein Titration von ^{15}N IP75 mit der T1K-Domäne und dem C84-Peptid. (orange) Relative Änderungen der Volumen [%]. (---) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. **(A)** Beschreibt die Änderungen an IP75, welche durch die T1K-Domäne ausgelöst werden. (Verhältnis 1 IP75 : 1 T1K-Tetramer). **(B)** Zeigt die Änderungen, welche C84 an dem IP75/T1K-Komplex bewirkt. (Verhältnis 1 IP75/T1K-Komplex : 6 C84) **(C)** Zeigt die Änderungen an IP75, welche nach Zugabe der T1K-Domäne und des C84-Peptides entstehen. NMR-Messbedingungen analog Abb. 4.31.

Werden die Änderungen der Volumen der einzelnen AS-Signale aus Abb. 4.33 genauer betrachtet, fällt auf, dass es bei der Bindung der T1K-Domäne an das IP75-Peptid vor allem zu Änderungen im Ball-Bereich (S14 bis G23), sowie auch zu Änderungen im glycinreichen, flexiblen Abschnitt (G58 bis G72) des IP75-Peptides kommt (Abb. 4.33, Bild A). Dies wird in

Abb. 4.34 in Bild 1 und Bild 4, zusammen mit den kombinierten chemischen Verschiebungen aus Abb. 4.31 dargestellt. Hierbei entsprechen rot markierte Aminosäuren den Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen (Abb. 4.31) und orange gekennzeichnete den Änderungen der Volumen der einzelnen Signale der Aminosäuren (Abb. 4.33). Wird nun C84 dem IP75/T1K-Konstrukt zugegeben, kommt es zu Änderungen der Volumen über den gesamten Bereich des IP75-Konstrukt. Dies wird in Abb. 4.34 in Bild 2 und Bild 5 gezeigt. Vor allem die Änderungen im N-terminalen Bereich des IP75-Peptides, ausgelöst durch das C84-Peptid bleiben erhalten, auch wenn die gesamte Veränderung des IP75-Peptides durch die T1K-Domäne und das C84-Peptid betrachtet wird (Abb. 4.34, Bild 3). Dies spricht für eine bindungsinduzierte Strukturänderung des IP75-Peptides. Der glycinreiche Bereich des IP75-Peptides (G56 bis G72), zeigt bei Zugabe von T1K eine Volumenabnahme in den spezifischen Signalen, was als eine gegenseitige Kontaktstelle verstanden werden kann (Abb. 4.33, Bild A). Schon die Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen deuten auf solch eine Kontaktstelle hin. Wird nun C84 zu dem IP75/T1K-Komplex gegeben, kommt es zu einer Zunahme der Volumen in dem glycinreichen Bereich, was auf eine Ablösung des IP75-Peptides vom T1K in diesem Bereich hindeutet. Dies ist ein weiteres Indiz für einen möglichen Bindungsbereich zwischen dem IP75 und dem T1K-Tetramer in diesem Abschnitt. Bild 6 in Abbildung 4.34 zeigt zusammenfassend, welchen Einfluss C84 und T1K auf das IP75-Peptid im glycinreichen flexiblen Abschnitt besitzen. Im nächsten Kapitel (Abschn. 4.7) wird die elektrostatische Ladungsverteilung auf der T1K-Domäne und dem IP75-Peptid betrachtet. Hierbei steht vor allem der glycinreiche IP75-Bereich im Fokus.

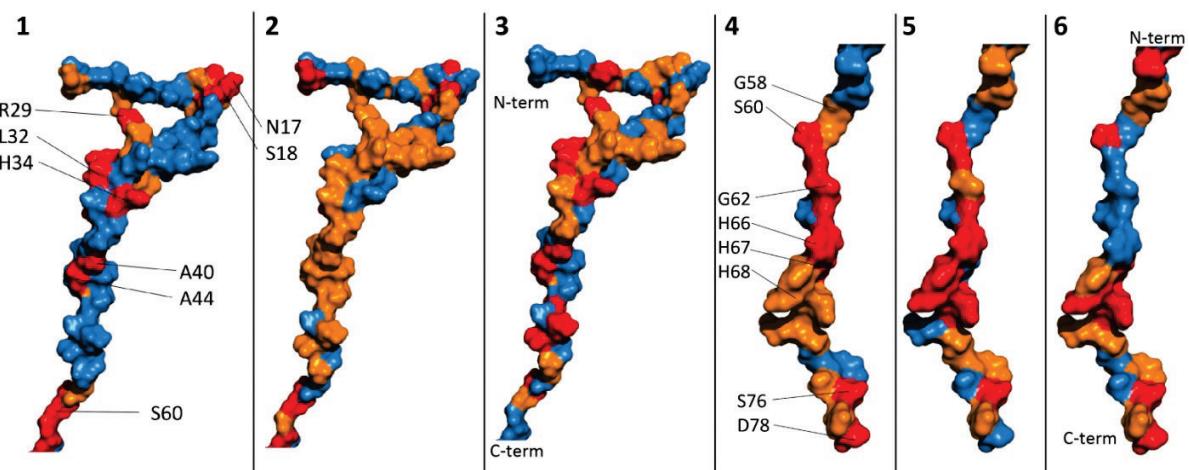


Abb. 4.34: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus und Abb. 4.31 und Abb. 4.33 auf der räumlichen Struktur des IP75-Inaktivierungspeptides. Bild 1 bis 3 stellt die obere Hälfte des Peptides und Bild 4 bis 6 die untere Hälfte des IP75-Peptides dar. In rot markiert sind jeweils die Aminosäuren mit kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ comb. [ppm] oberhalb der Standardabweichung zu Null (vgl. 4.31). Zusätzlich markiert sind in orange die Aminosäuren mit Volumenänderungen [%] oberhalb der Standardabweichung zu Null (vgl. 4.33). (1) und (4) zeigen die Änderungen an IP75, welche durch die T1K-Domäne ausgelöst werden. (Verhältnis 1 IP75 : 1 T1K Homotetramer). (2) und (5) zeigen die Änderungen, welche C84 an dem IP75/T1K-Komplex bewirkt. (Verhältnis 1 IP75/T1K-Komplex : 6 C84; dargestellt nur IP75). (3) und (6) zeigen die Änderungen an IP75 nach Zugabe der T1K-Domäne und des C84-Peptides.

4.7 Elektrostatische Protein-Oberflächendarstellung

Zur besseren Charakterisierung und zum besseren Verständnis der Protein-Protein Wechselwirkung zwischen der homotetrameren T1K-Domäne und seinem N-terminalen Inaktivierungspeptid IP75 wurden Strukturmodelle erstellt, welche die Ladungsverteilung auf der Oberfläche eines Proteins darstellen. Dafür wurde die Funktion von PyMOL™ - 'vacuum electrostatics' verwendet. Hierbei wird mittels einer 'quasi-Coulombic-shaped convolution function' ein Mittelwert über einen definierten Ladungsbereich gemittelt und dieser qualitativ farblich dargestellt. Eher negativ geladene Bereiche des Proteins werden in roter Farbe und eher positiv geladene in blauer Farbe dargestellt. Ladungsneutrale Bereiche werden in weißer Farbe dargestellt. Abbildung 4.35 zeigt das Ergebnis einer elektrostatischen T1K-Oberflächendarstellung. Zum Vergleich werden in Abbildung 4.35 die Ergebnisse aus Abbildung 4.20 zur Protein-Protein Wechselwirkung zwischen der T1K-Domäne und dem N-terminalen Inaktivierungspeptid IP75 dargestellt.

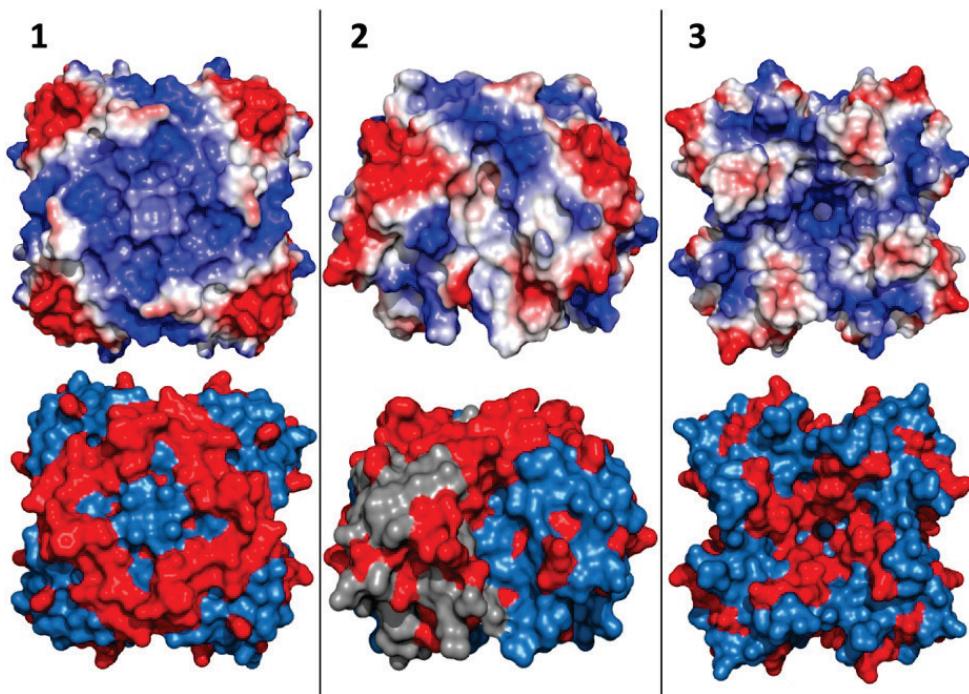


Abb. 4.35: Graphische Darstellung des T1K-Homotetramers mit seiner Elektronen- und Ladungsdichteverteilung (oben) und mit seinen Protein-Protein Kontaktstellen mit dem N-terminalen Inaktivierungspeptid IP75 (unten). (oben) 'vacuum electrostatics' Darstellung von PyMOL™ (blau: positiv geladene Bereiche; rot: negativ geladene Bereiche; weiß: neutral geladene Bereiche). (unten) Mit roter Farbe werden alle signifikanten Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta$ comb.), der Volumen und der sich aufspaltenden Aminosäuren dargestellt. Die T1K-Monomere sind blau und grau eingefärbt. (vgl. Abb. 4.20). (1) T1K Ansicht von oben, (2) von der Seite und (3) von unten.

Bei Betrachtung von Abbildung 4.35 fällt auf, dass das IP75-Peptid bevorzugt mit positiv geladenen Oberflächenstrukturen auf der T1K-Domäne in Wechselwirkung tritt. Hierbei bindet IP75 in einer 'Furche' zwischen den einzelnen T1K-Monomeren (Abb. 4.35, Bild 2 unten). In Abschnitt 4.6 wurde der C-terminal gelegene, glycinreiche, flexible Bereich des IP75-Peptides als möglicher Bindungsbereich zur T1K-Domäne identifiziert. Im Großen und Ganzen wäre nun zu erwarten, dass negativ geladene Bereiche des IP75-Peptides an der Interaktion mit der T1K-Domäne in diesem Bereich beteiligt sind. Um die Plausibilität dieses Modells zu prüfen, wurde die Elektronendichtevertteilung des IP75-Peptides in Abb. 4.36 dargestellt. Zusätzlich neben der Ladungsverteilung, wurden noch bindungsrelevante Daten des IP75-Peptides mit seinen Interaktionspartnern, dem T1K-Tetramer und dem C84-Peptid aus Abschnitt 4.6 in Abbildung 4.36 aufgenommen.

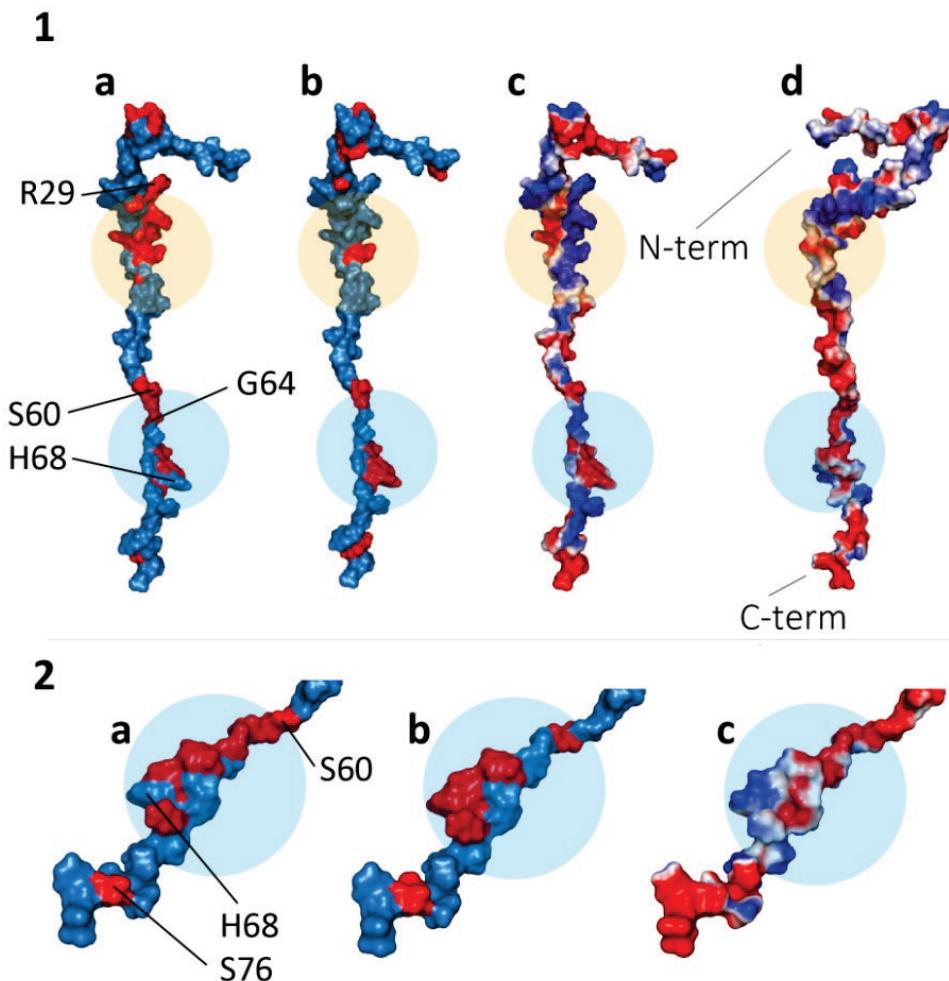


Abb. 4.36: Darstellung des IP75-Inaktivierungspeptides in der Elektronen- und Ladungsdichteverteilung und die Protein-Protein Interaktionsdaten des IP75-Peptides mit der T1K-Domäne und dem C84-Peptid aus Abschnitt 4.6. Darstellung: (1) Stellt die Gesamtstruktur des IP75-Peptides dar. (2) Zeigt den glycinreichen, flexiblen Bereich des IP75-Peptides. In roter Farbe wurden die Aminosäuren auf der Peptidstruktur markiert, welche sich in Abb. 4.31 oberhalb von σ befinden. (1a, 2a) Zeigt die Änderungen an IP75, welche durch die T1K-Domäne ausgelöst werden. (1b, 2b) Zeigt die Änderungen, welche C84 an dem IP75/T1K-Komplex bewirkt (dargestellt nur IP75). (1c, 1d, 2c) 'vacuum electrostatics' Darstellung von PyMOL™ (blau: positiv geladene Bereiche; rot: negativ geladene Bereiche; weiß: neutral geladene Bereiche). Blaue und orange Kreise verdeutlichen die gleichen Strukturbereiche auf der IP75-Peptidstruktur und dienen zur besseren Orientierung.

Bei Betrachtung von Abb. 4.36 (Bild 1c, 1d und 2c) fällt auf, dass der bindungsrelevante C-terminale Bereich des IP75-Peptides einen überwiegend negativ geladenen Charakter besitzt. Dies unterstützt das aufgestellte Protein-Protein Bindungsmodell, da die bindungsrelevanten Stellen der T1K-Domäne einen eher positiven Charakter besitzen (Abb. 4.35).

4.8 Protein-Protein Interaktion: Die Kv1.4 T1-Domänen mit dem N-terminalen Inaktivierungspeptid Kv1.4 IP75 und dem C-terminalen Kv1.4 C84-Peptid

In Abschnitt 4.4.1 wurde die Protein-Protein Wechselwirkung zwischen der T1K-Domäne mit seinem N-terminalen Inaktivierungspeptid IP75 beschrieben. Die Charakterisierung der Protein-Protein Interaktion zwischen der T1K-Domäne und dem C-terminalen C84-Peptid wurde in Abschnitt 4.5.1 gezeigt. Im folgenden wird beschrieben, welchen Einfluss beide Peptide bei gleichzeitiger Anwesenheit auf die T1K-Domäne ausüben. Dabei wurde untersucht, ob die beiden Peptide auf dem T1K-Tetramer möglicherweise zusammenwirken oder sich gegenseitig partiell oder vollständig verdrängen. Dieses Experiment wurde von Schreier (2006) mit dem T1Ktag-Konstrukt (Abschn. 4.1) bereits durchgeführt. Um diese Messdaten mit dem neuen T1K-Konstrukt (Abschn. 4.1, ohne His₆-tag) zu vergleichen, wurde in dieser Arbeit das exakt gleiche Experiment durchgeführt. Somit war es möglich zwei unabhängige Datensätze zu vergleichen und den Einfluss des His₆-tags zu beobachten. In Abschnitt 4.8.1 wird der Datensatz von Schreier (2006) und in Abschnitt 4.8.2 das identische Experiment mit der T1K-Domäne dargestellt. Es wurden bei beiden Messreihen 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektren bei einer Temperatur von 293 K aufgenommen. Die genauen Messbedingungen sind, soweit vorhanden, in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

4.8.1 Beschreibung der Protein-Protein Interaktion des Kv1.4 T1Ktag-Konstruktes (mit His₆-tag) mit dem Kv1.4 IP75- und Kv1.4 C84-Peptid

Für diese Protein-Protein Interaktionsstudie wurde laut Schreier (2006) dem ²H ¹⁵N T1K Ansatz so viel IP75-Peptid zugegeben, dass es im 5,7-fachen Überschuss zum T1Ktag-Monomer vorlag. Anschließend wurde das C84-Peptid so zugegeben, dass es im Verhältnis 1 : 1 mit dem N-terminalen IP75-Peptid vorlag. Jeweils wurde ein 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum aufgenommen und die kombinierten chemischen Verschiebungen ausgewertet. Abbildung 4.37 zeigt die strukturelle, räumliche Darstellung der Ergebnisse von Schreier (2006) auf dem T1Ktag (plus His₆-tag) Modell (Ergebnisse Schreier (2006); vgl. Anhang, Abb. 10.3). Hierbei wurden nur die kombinierten chemischen Verschiebungen aufgetragen. Es lagen keine Daten darüber vor, welchen Einfluss die Protein-Protein Wechselwirkungen auf den His₆-tag mit seinem Linker besaß. Somit wird dieser Bereich einfarbig (Abb. 4.37, dunkelgrau) in dem T1Ktag-Strukturmodell dargestellt.

Abbildung 4.37 Bild 1 zeigt die Wechselwirkungen des T1Ktag-Tetramers mit dem IP75-Peptid. Hierbei wird ersichtlich, dass IP75 vor allem im oberen Bereich mit der T1Ktag-Struktur interagiert. Bild 2 in Abbildung 4.37 stellt die Interaktionsbereiche des C84-Peptides mit der T1Ktag-Domäne ohne IP75 dar. Hierbei kommt es zu Wechselwirkungen im eher seitlichen und unteren Bereich des T1Ktag-Konstruktes. Das Dritte Bild in Abbildung 4.37 stellt den Fall dar, wo beide Peptide dem T1Ktag-Homotetramer zugegeben wurden. Hierbei kann man schön sehen, dass die Wechselwirkungsbereiche an dem T1Ktag eher denen des C84-Konstruktes als denen des IP75-Peptides entsprachen (Abb. 4.37, Bild 3, AS K33). Bild 4 in Abbildung 4.37 verdeutlicht speziell, welche Signale bei den kombinierten chemischen Verschiebungen sich eher reduzierten oder verstärkten. Gelb markierte Bereiche zeigen eine Signalzunahme und hellgrün markierte Bereiche eine Signalabnahme. Hierbei konnte aus den Daten von Schreier (2006) nicht eindeutig geklärt werden, ob eine Signalabnahme (Abb. 4.37, Bild 4, hellgrün) einen kompletten Signalverlust, oder nur eine Reduzierung der Intensität der Wechselwirkung bedeutete.

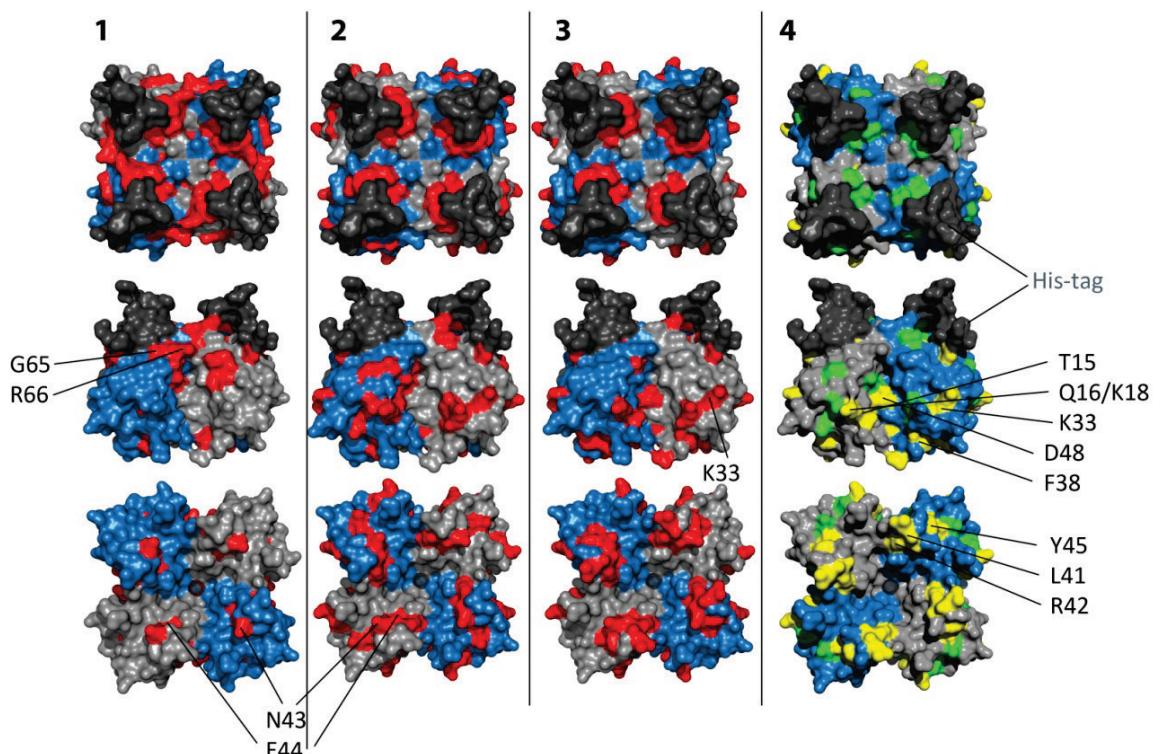


Abb. 4.37: Graphische Darstellung der Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen den beiden Peptiden IP75 und C84 mit der T1Ktag-Domäne auf der T1Ktag-Struktur (Datensatz: Schreier 2006). Farbschema: (hellblau, grau) T1Ktag-Monomere. (dunkelgrau) His₆-tag mit Linker (Abschn. 4.1). (rot) Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen oberhalb von σ . (hellgrün) Signalabnahme der Intensität der Wechselwirkung zwischen den Proteinen. (gelb) Signalzunahme der Intensität der Wechselwirkung zwischen den Proteinen. Dargestellt wird die T1Ktag-Domäne bei Bild 1, 2, 3 und 4 je von oben, von der Seite und von unten. **(1)** Die T1Ktag-Domäne in Wechselwirkung mit dem IP75-Inaktivierungspeptid, **(2)** die T1Ktag-Domäne in Wechselwirkung mit dem C84-Peptid, **(3)** die T1Ktag-Domäne in Wechselwirkung mit dem IP75-Peptid und dem C84-Peptid, **(4)** Bild 4 entspricht Bild 3.

Bei genauerer Betrachtung von Abb. 4.37 wird ersichtlich, dass vor allem spezifische Signale in Zusammenhang mit dem C84-Peptid bei Anwesenheit aller drei Proteine in einem Ansatz an der T1Ktag-Domäne dominieren. Vor allem die Aminosäure K33 (Abb. 4.37, Bild 3) und die Aminosäuren um den Bereich N43 bis E44 (Abb. 4.37, Bild 2) zeigen schön, dass C84 das T1Ktag-Homotetramer beeinflusst. Bei diesem Versuch konnte keine Aussage darüber getroffen werden, wo das IP75-Peptid an der T1Ktag-Domäne verbleibt. Da das IP75-Peptid eher im oberen Bereich des Peptides bindet (vgl. Abschn. 4.4.1), wäre es z.B. möglich, dass der His₆-tag die Bindung zum IP75-Peptid beeinträchtigt. Einen Hinweis darauf können die Ergebnisse des Vergleichsansatzes ohne His₆-tag aus Abschnitt 4.8.2 geben.

4.8.2 Die Protein-Protein Interaktion des Kv1.4 T1K-Konstrukt des (ohne His₆-tag) mit dem Kv1.4 IP75- und Kv1.4 C84-Peptid

Um die Ergebnisse aus Abschnitt 4.8.1 von Schreier (2006) zu reproduzieren und einen Vergleichsdatensatz zu besitzen, wurde das exakt gleiche Experiment wiederholt. Einziger Unterschied war, dass die T1K-Domäne ohne His₆-tag eingesetzt wurde (Abschn. 4.1). Vor allem das IP75-Peptid bindet im oberen Bereich der T1K-Domäne (vgl. Abschn. 4.4.1). Durch Abtrennung des His₆-tags sollte dem IP75-Peptid dieser Bereich besser zugänglich gemacht werden. Versuchstechnisch wurde die ²H ¹⁵N markierte T1K-Domäne vorgelegt und ein 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K aufgenommen. Anschließend wurde unmarkiertes IP75 im 5,7-fachen Überschuss zum T1K-Monomer zugegeben und erneut ein 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K aufgenommen. Final wurde dem Ansatz C84 im 5,7-fachen Überschuss zum T1K-Monomer zugegeben und das letzte 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K aufgenommen. Diese drei Spektren wurden ins Verhältnis gesetzt.

Analog wie in Abschn. 4.8.1 wurden zunächst vor allem die Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen (Abb. 4.38) betrachtet. Die Betrachtung der relativen Änderungen der Volumen erfolgt im Anschluss in Abb. 4.40. Der Einfluss des IP75-Peptides auf die T1K-Domäne unterscheidet sich geringfügig von den Ergebnissen aus Abschnitt 4.4.1. Dies wurde darauf zurück geführt, dass dem jetzigen T1K-Ansatz IP75 in einer weit größeren Konzentration zugegeben worden ist. Graphisch werden diese Ergebnisse auf die T1K-Struktur in Abb. 4.39 und Abb. 4.41 übertragen.

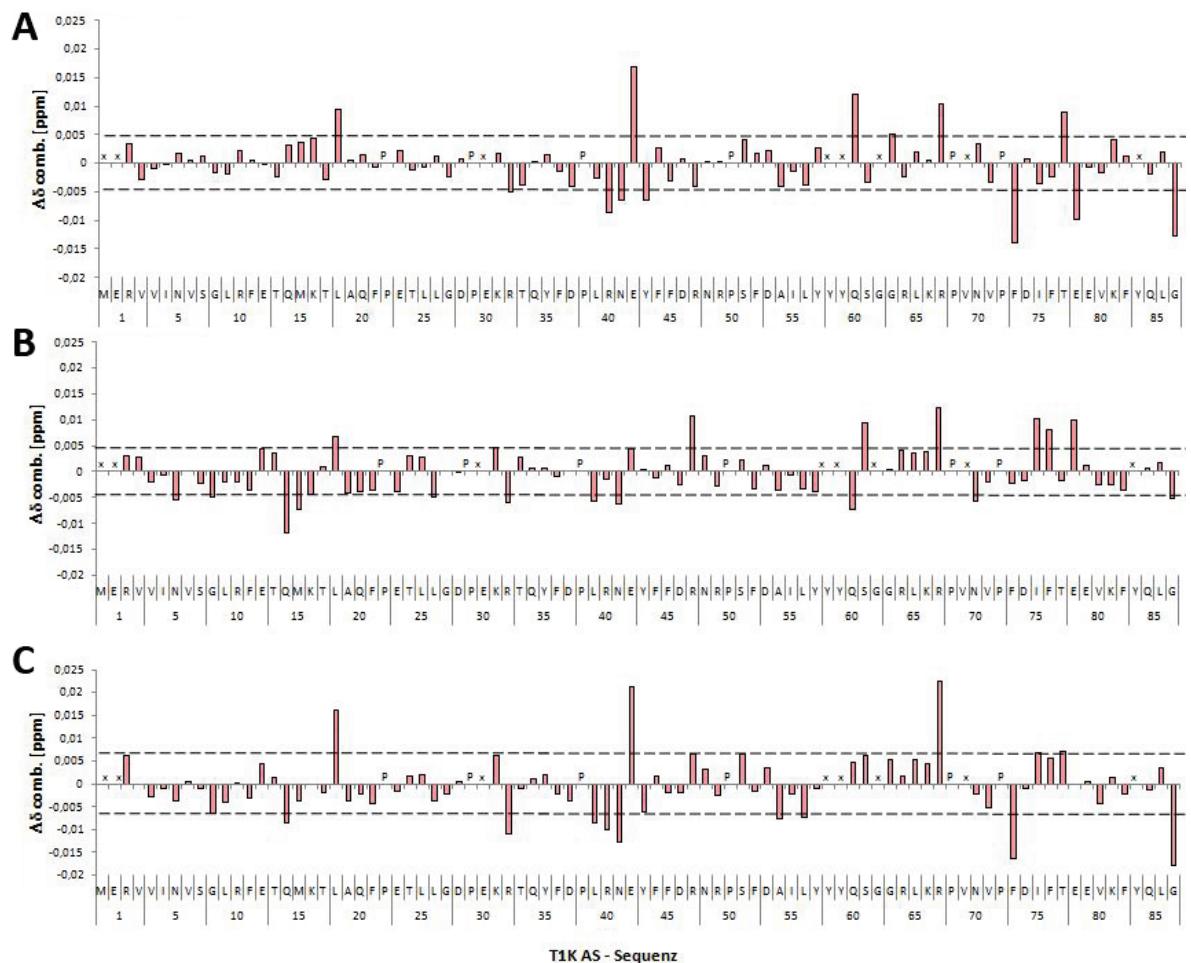


Abb. 4.38: Darstellung der chemischen Verschiebungen aus der Protein-Protein Titration von ^2H ^{15}N T1K mit den beiden Peptiden IP75 und C84. Säulendiagramme: (rot) Differenz der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ comb. [ppm]. (---) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. **(A)** Beschreibt die Änderungen an T1K, welche durch das IP75-Peptid ausgelöst werden. (Verhältnis 1 T1K-Monomer : 5,7 IP75). **(B)** Zeigt die Änderungen, welche C84 an dem T1K/IP75-Komplex bewirkt. (Verhältnis 1 IP75 : 1 C84). **(C)** Zeigt die Änderungen an der T1K-Domäne, welche nach der Zugabe des IP75- und des C84-Peptides entstehen. Messbedingungen: 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 8192, F1: 8192); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 1.2, F1: 0.1)].

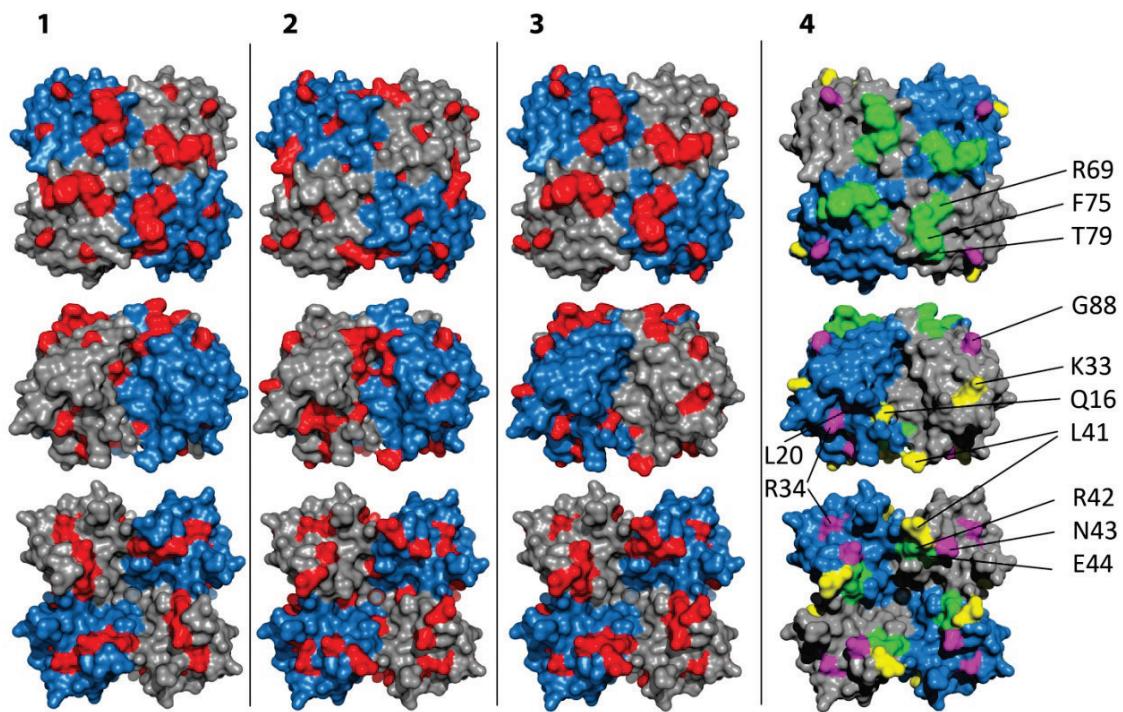


Abb. 4.39: Graphische Darstellung der Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen den beiden Peptiden IP75 und C84 mit der T1K-Domäne auf der T1K-Struktur. Farbschema: (hellblau, grau) T1K-Monomere. (rot) Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen oberhalb von σ (vgl. Abb. 4.38). (hellgrün) IP75 spezifische Signale. (gelb) C84 spezifische Signale. (lila) gemeinsame Signale von IP75 und C84. Dargestellt wird die T1K-Domäne bei Bild 1, 2, 3 und 4 je von oben, von der Seite und von unten. **(1)** Die T1K-Domäne in Wechselwirkung mit dem IP75-Inaktivierungspeptid. **(2)** Die T1K-Domäne in Wechselwirkung mit dem C84-Peptid. **(3)** Die T1K-Domäne in Wechselwirkung mit dem IP75- und dem C84-Peptid. **(4)** Bild 4 ist analog Bild 3. Die Signale aus Bild 3 werden den einzelnen Peptiden zugeordnet und farblich hervorgehoben (siehe Farbschema).

Bild 4 in Abbildung 4.39 verdeutlicht bindungsrelevante Bereiche auf der Oberflächenstruktur der T1K-Domäne, welche durch die beiden Peptide IP75 und C84 bei ihrer gleichzeitigen Anwesenheit beansprucht werden. Hierbei wurden die Signale den einzelnen Peptiden farblich zugeordnet. Zum besseren Verständnis dieser Abbildung wurden die Volumen der einzelnen AS-Signale ausgewertet. Abbildung 4.40 zeigt das Resultat dieser Auswertung.

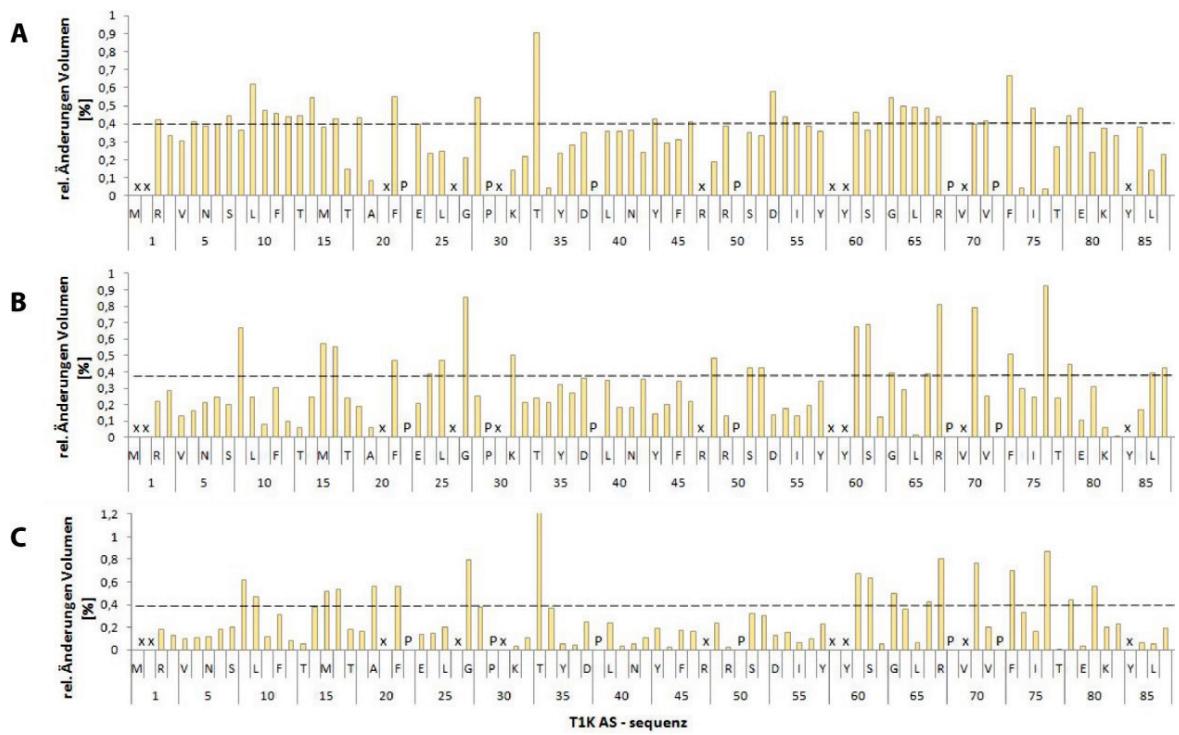


Abb. 4.40: Volumenänderungen bei der Protein-Protein Interaktion von ^2H ^{15}N T1K mit den beiden Peptiden IP75 und C84. (orange) Relative Änderungen der Volumen [%]. (---) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. **(A)** Beschreibt die Änderungen an T1K, welche durch das IP75-Peptid ausgelöst werden. (Verhältnis 1 T1K Homotetramer : 5,7 IP75). **(B)** Zeigt die Änderungen, welche C84 an dem T1K/IP75-Komplex bewirkt. (Verhältnis 1 IP75 : 1 C84). **(C)** Zeigt die Änderungen an der T1K-Domäne, welche nach der Zugabe des IP75 und des C84 Peptides entstehen. NMR-Messbedingungen analog Abb. 4.38.

In Abbildung 4.41 werden diese Ergebnisse aus Abbildung 4.38 und Abbildung 4.40 auf die Struktur von T1K übertragen. Hierbei werden die Effekte aus der Änderung der kombinierten chemischen Verschiebung und der Änderung der Volumen einzelner Signale angezeigt, welche das C84-Peptid an dem IP75/T1K-Komplex auslöst. Hierbei kommt es zusätzlich zu den bleibenden IP75-Signalen (Abb. 4.41, hellgrün, z.B. AS E80 und T79) und den neu auftretenden C84-Signalen (Abb. 4.41, gelb, z.B. AS K33 und L27) auch zum Verlust einzelner IP75-Signale (Abb. 4.41, orange). Gut zu erkennen ist, dass sowohl das IP75-Inaktivierungspeptid, sowie auch das C84-Peptid einen gleichzeitigen Einfluss auf die T1K-Domäne besitzen.

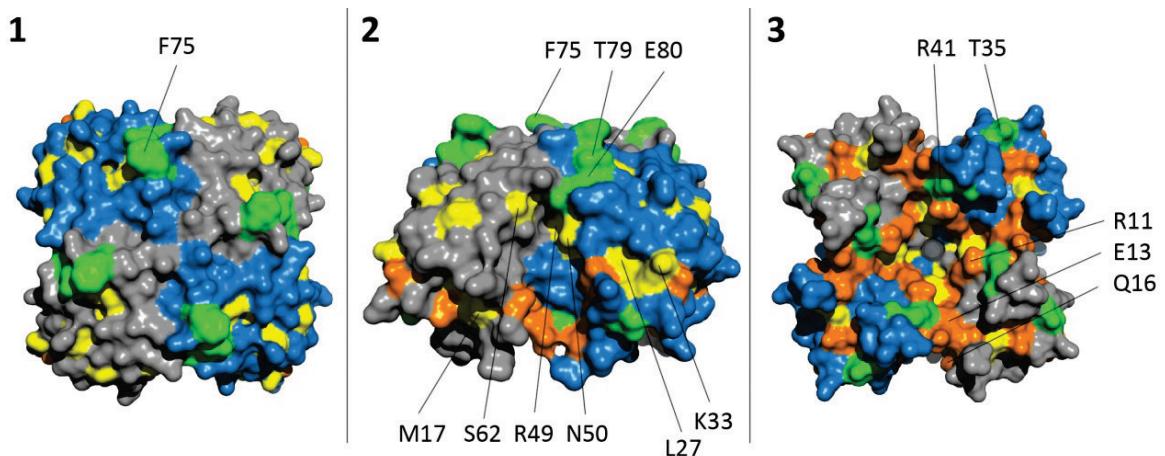


Abb. 4.41: Graphische Darstellung der Wechselwirkung beider Peptide mit der T1K-Domäne auf der T1K-Proteinstruktur. Ziel der Darstellung ist es den Einfluss des C84-Peptides auf den T1K/IP75-Komplex zu beschreiben. Dargestellt wird die T1K-Domäne in Bild 1 von oben, in Bild 2 von der Seite und in Bild 3 von unten. Farbschema: (hellblau, grau) T1K-Monomere. (hellgrün, gelb, orange) Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen oberhalb von σ aus Abb. 4.38 und Abb. 4.40. Die spezifischen AS-Signale auf der T1K-Struktur werden in verschiedene Farben unterteilt und unterschiedlichen Effekten zugesprochen: (**gelb**) entspricht den Signalen, welche neu durch C84 entstehen, wenn C84 an den T1K/IP75 Komplex bindet. (**hellgrün**) Entspricht den Signalen, welche von IP75 bleiben, wenn C84 an den T1K/IP75 Komplex bindet. (**orange**) entspricht den Signalen von IP75, die verschwinden, wenn C84 an den T1K/IP75 Komplex bindet.

Beim Vergleich der beiden Datensätze aus Abschnitt 4.8.1 (T1Ktag) und Abschnitt 4.8.2 (T1K) wurde mit beiden Konstrukten das gleiche Ergebnis hinsichtlich der beeinflussten Bereiche erzielt. Ebenfalls gab in beiden Versuchsreihen Bereiche, die von beiden Konstrukten beeinflusst wurden (vgl. Abb. 4.37, Bild 4 und Abb. 4.39, Bild 4). Unterschiede zwischen den beiden Konstrukten bei dem Interaktionsmuster traten vor allem im Bereich des His₆-tags auf.

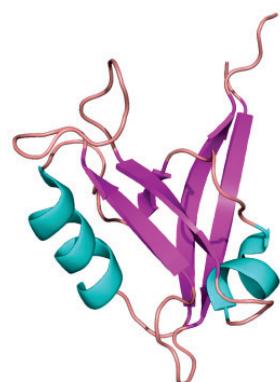
4.9 Die PSD-95 PDZ2-Domäne

Mitglieder der *shaker* Kaliumkanalfamilie weisen in ihren letzten vier Aminosäuren ein konserviertes ETDV-Sequenzmotiv auf (Abb. 4.12, C84-Peptid). An dieses Motiv binden z.B. PDZ-Domänen des PSD-95 (Post-Synaptic Density Protein 95) Proteins. Zur gezielten Durchführung einer Protein-Protein Interaktionsstudie zwischen dem C-terminalen Ende des K_v1.4 Kanals und dem PSD-95 Protein wurde die PDZ2-Domäne des PSD-95 Proteins kloniert. Sie besteht aus den Aminosäuren 157 bis 249 des PSD-95 Proteins von *Rattus Norvegicus* (Abb. 4.42).

Psd95 - Pdz2

```
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLEMKVMEIKLIKGPK
GLGFSIAGGVGNQHIPGDNSIYVTKIIEGGAHKD
GRLQIGDKILAVNSVGLEDVMHEDAVAALKNTYDV
VYLKVAKPS
```

Abb. 4.42: Aminosäuresequenz (AS) und Struktur der PDZ2-Domäne von PSD-95. Farbschema: (rot) His₆-tag plus Linkerregion. (türkis) α -Helix. (lila) β -Faltblatt. **(oben)** Die PDZ2-Domäne umfasst die Aminosäuren 157 bis 249 des PSD-95 Proteins (12,251 kDa). **(Rechts)** 3D-Struktur der PDZ2-Domäne in Cartoon (PyMOL™). (Tochio H., 2000; PDB 1QLC)



Das Konstrukt lag im Plasmidvektor pET-14b (Novagen) vor und wurde mittels NdeI und BamHI einkloniert. Exprimiert wurde das Protein unter Verwendung von *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLysS in LB- und NMM-Medium unter Standardbedingungen (1 mM IPTG, 37° C, 4 h, 200 rpm). Aufgereinigt wurde nativ unter Verwendung einer Nickel-Affinitätschromatographie (Abb. 4.43) und einer nachfolgenden Gelfiltration. Das Konstrukt besitzt ein M_r von 12,251 kDa ('ExPASy pi/MW tool') und lag final in einem 150 mM KPi; pH 6,5 NMR-Messpuffer vor. Aufgrund der fehlenden sequenziellen Zuordnung konnten keine Daten von Seiten der PSD-95 PDZ2-Domäne evaluiert werden. Abbildung 4.44 zeigt ein von Pegan und Choe (2007) veröffentlichtes Spektrum der PSD-95 PDZ2-Domäne zusätzlich zu einem eigen aufgenommenem PSD-95 PDZ2 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektrum. Die PSD-95 PDZ2-Domäne wird im Folgenden auch als PDZ2 bezeichnet.

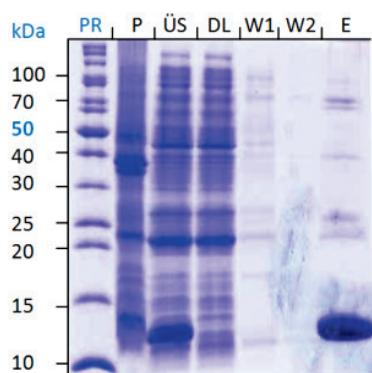


Abb. 4.43: Aufreinigung und Reinheitskontrolle der PDZ2-Domäne von PSD-95. 16 % SDS-Gel nach Coomassie Färbung. Auftragung: Pageruler™ (Protein Standard), Zellpellet, Überstand, Durchlauf, Waschfraktion 1, Waschfraktion 2, Elutionsfraktion (PDZ2: 12,53 kDa).

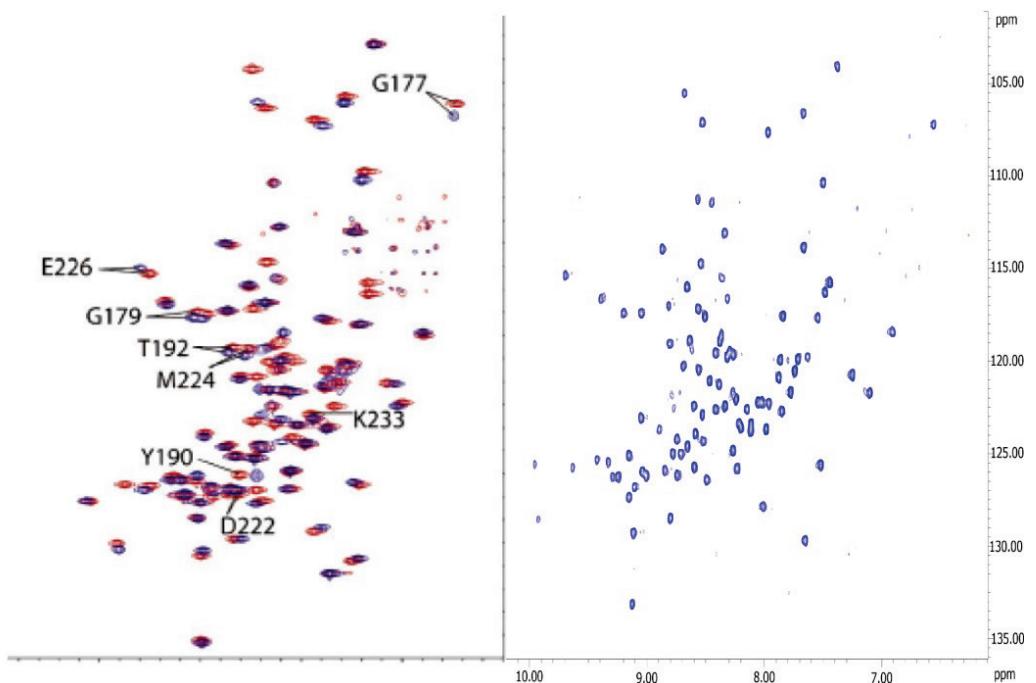


Abb. 4.44: 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum der PDZ2-Domäne von PSD-95. (links) [¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum von PSD-95 PDZ2 ohne Bindepartner (blau) und mit Kir 2.1 Peptid (rot) (Pegan und Choe, 2007). (rechts) Nicht zugeordnetes [¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum von PSD-95 PDZ2 (Abb. 4.42). Messbedingungen: 200 µM PSD-95 PDZ2 in 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 8; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.12, F1: 0.1)].

In den folgenden Abschnitten wird die Wechselwirkung der PDZ2-Domäne mit ihrem spezifischen Protein-Protein Bindungspartner, dem C84-Peptid (Abschn. 4.3) untersucht. Abschnitt 4.9.1 behandelt die Protein-Protein Interaktion des C84-Peptides mit der PDZ2-Domäne. In Abschnitt 4.9.2 werden das C84-Peptid und die PDZ2-Domäne in Bezug auf die homotetramere T1K-Domäne (Abschn. 4.1) untersucht.

4.9.1 Protein-Protein Titration des C-terminalen K_y1.4 C84-Peptides mit dem PSD-95 PDZ2-Protein

Die Protein-Protein Interaktion des C84-Peptides mit der PDZ2-Domäne von PSD-95 wurde NMR-spektroskopisch charakterisiert. Hierbei wurde eine Protein-Protein Titration zwischen den beiden Proteinen durchgeführt. Versuchstechnisch wurden 200 µM einer ¹⁵N markierten C84-Probe vorgelegt und anschließend mit einer steigenden Konzentration von unmarkiertem PDZ2-Protein versehen. Bei jedem Schritt wurde ein 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K aufgenommen. Da von einem Bindungsverhältnis von 1 zu 1 ausgegangen worden ist, wurde bis zu einem 1,5-fachen Überschuss von PDZ2 mit dem

C84-Peptid titriert. In Abbildung 4.45 wird das Ergebnis der Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen und die relativen Änderungen der Volumen der einzelnen AS-Signale zwischen dem C84-Ausgangsspektrum und dem Endspektrum der Protein-Protein Titration (1 C84 : 1,5 PDZ2) dargestellt (Abb. 4.48). Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass das PDZ-Bindemotiv auf dem C84-Peptid von PDZ2 gebunden wird. Aminosäuren, welche sich im Bindungsbereich der beiden Proteine befinden, verschwinden vollständig, was typisch für einen langsam Austausch ist. Dies ist auf eine Linienverbreiterung der Signale zurückzuführen (Abb. 4.45). Zusätzlich kommt es zu auffälligen kombinierten chemischen Verschiebungen in dem Bereich um die Aminosäuren Y43 bis S55 (Abb. 4.45, blau). Diese Aminosäuren sind in den NMR-Spektren in Abbildung 4.48 zusätzlich gekennzeichnet. Die Aminosäuren K50 und S55 in diesem Bereich wurden auf ein Bindeverhalten mit dem C84-Peptid hin untersucht (Abb. 4.46). Hierbei konnten K_D -Werte um 0,74 mM (S55) und 0,78 mM (K50) bestimmt werden. Es wurden somit zwei unterschiedliche Bindestellen des C84-Peptides mit dem PDZ2-Protein identifiziert.

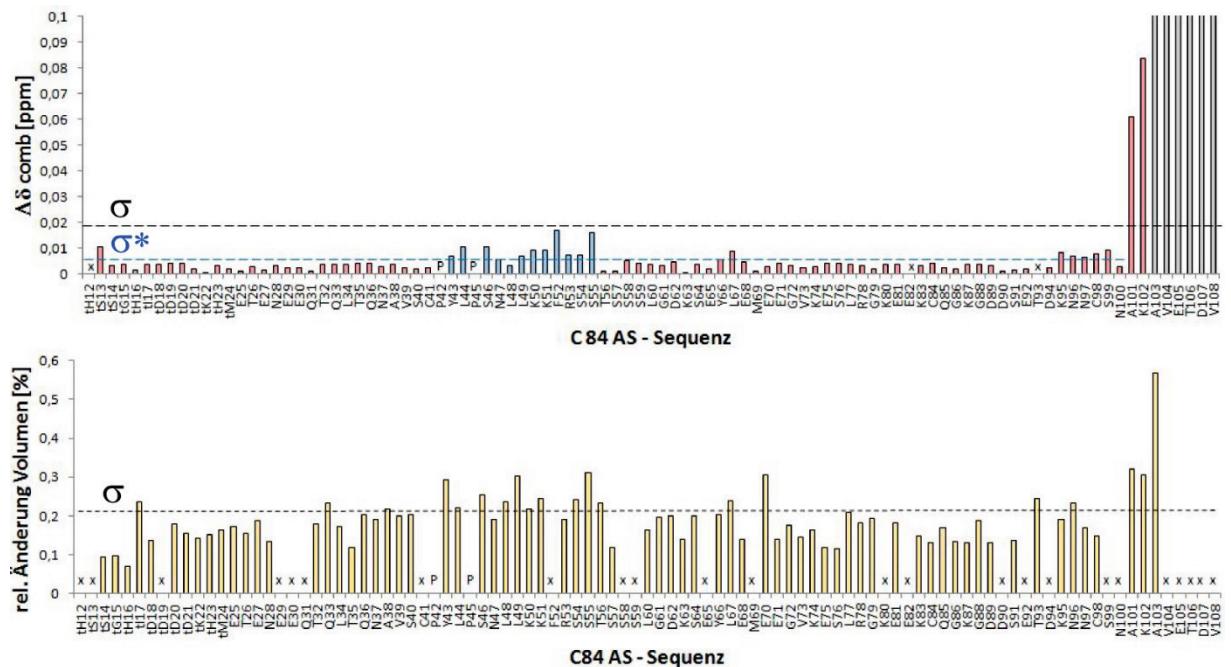


Abb. 4.45: Ergebnis der Protein-Protein Interaktion von ^{15}N C84 mit PDZ2. Säulendiagramme: (rot) Betrag der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ comb. [ppm]. (orange) relative Änderungen der Volumen [%]. (blau) AS-Bereich: AS Y47 bis AS S55 (vgl. Text). (--) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (--) σ^* = Korrigierte Standardabweichung zu Null von AS tH12 bis AS N100 (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. Verglichen wurde das 2D- $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY-HSQC Spektrum von C84 (200 μM) mit einem 2D- $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY-HSQC von C84 mit PDZ2 (Verhältnis 1 : 1,5). Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.06, F1: 0.1)].

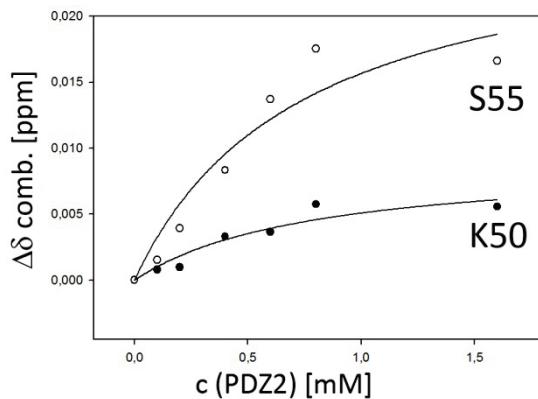


Abb. 4.46: Bindungscharakterisierung zwischen dem C84-Peptid und dem PDZ2-Protein. Beträge der kombinierten chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta$ comb. [ppm]) von zwei stark verschobenen Signalen des C84-Peptides aufgetragen gegen die Konzentration des PDZ2-Proteins. Stöchiometrisch entspricht die Zahl 1 auf der x-Achse ein C84-Peptid zu einem PDZ2-Protein. Bei Betrachtung kann davon ausgegangen werden, dass ein C84-Peptid ein PDZ2-Protein bindet. Der K_D konnte mit Werten zwischen 0,74 mM bei AS S55 und mit 0,78 mM bei AS K50 bestimmt werden. NMR-Messbedingungen analog Abb. 4.45.

Das Ergebnis der Protein-Protein Interaktion aus Abbildung 4.45 wird auf das C84 MD-Modell (Abschn. 4.3.1) in Abbildung 4.47 übertragen. In Abbildung 4.45 kommt es in dem Bereich von Aminosäure Y43 bis S57 vermehrt zu Volumenänderungen. Dies spricht für eine Bindung zwischen den Proteinen und zusätzlich wird die Beobachtung aus Abschnitt 4.3.2 bekräftigt, dass das C84-Peptid in diesem AS-Bereich transiente Strukturen, mit einer begrenzten Lebensdauer ausbilden kann.

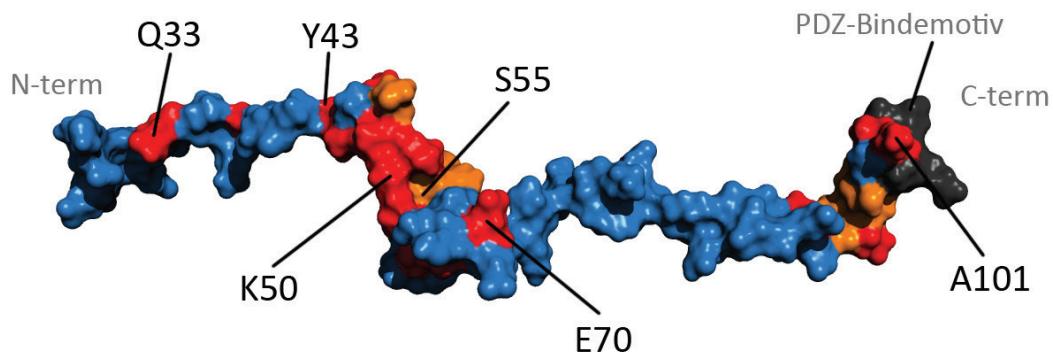


Abb. 4.47: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.45 auf das C84 MD-Strukturmodell. Farbschema: (rot) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen oberhalb von σ . (orange) Änderungen aus der kombinierten chemischen Verschiebungen oberhalb von σ^* . (grau) PDZ-Bindemotiv.

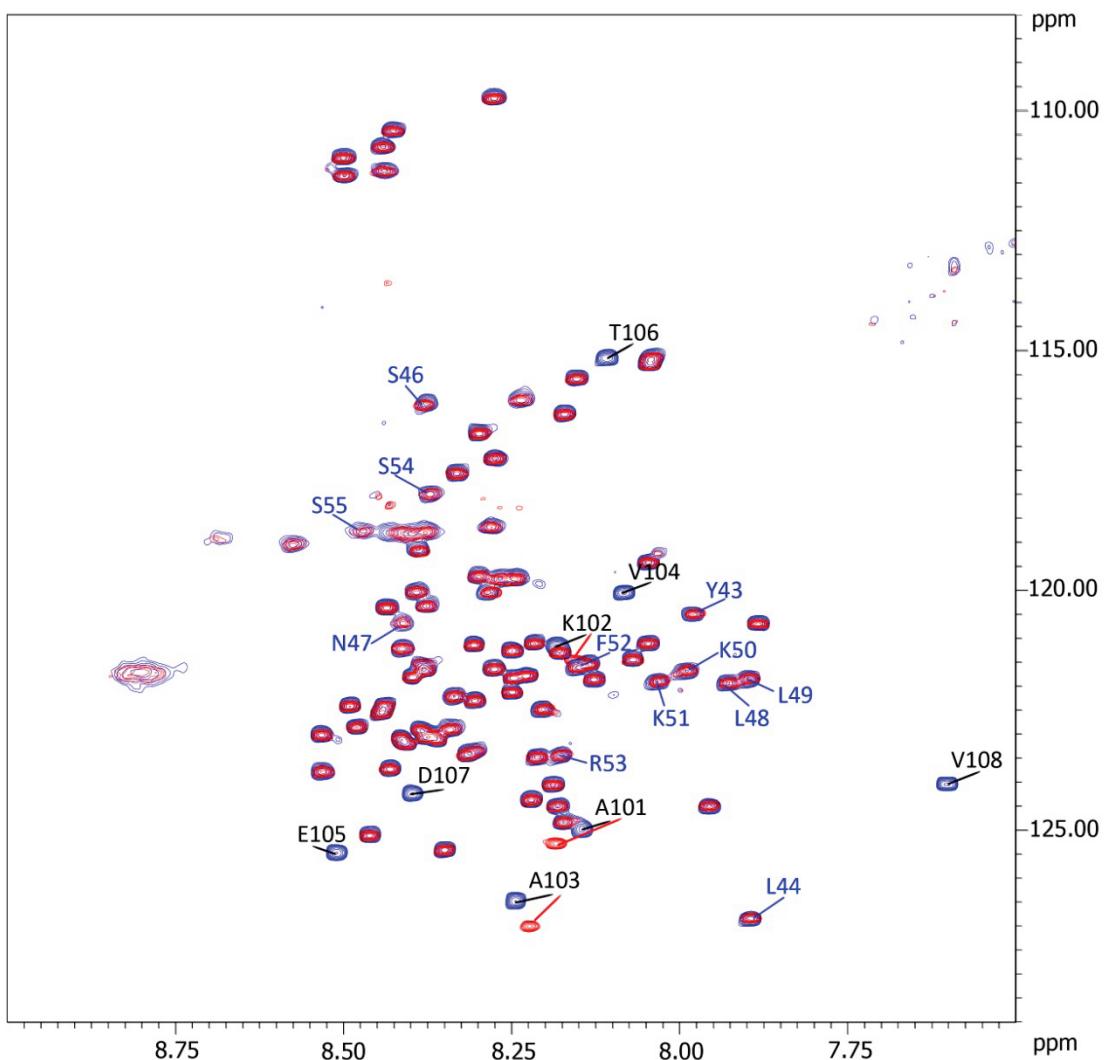


Abb. 4.48: 2D- $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TROSY-HSQC Spektren des C84-Peptides mit dem PDZ2-Protein. (Vollständige C84-Zuordnung siehe Abb. 4.14). Hervorgehoben sind die C-terminalen, PDZ2 bindungsrelevanten Aminosäuren A101 bis V108 (schwarze Beschriftung) und der Aminosäurebereich von Y43 bis S55 (blaue Beschriftung, vgl. Abb. 4.45). NMR-Spektren: (blau) ^{15}N C84. (rot) ^{15}N C84 plus PDZ2 (Verhältnis 1 : 1,5). Messbedingungen: 150 mM KPi-Puffer; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.06, F1: 0.1)].

Trotz fehlender sequenzieller Zuordnung von PSD-95 PDZ2 wurde ein Protein-Protein Bindungsnachweis von ^{15}N markiertem PDZ2-Protein mit unmarkiertem C84-Peptid unternommen. Hierbei wurden 150 μM ^{15}N PDZ2 mit 300 μM C84 versetzt. Es wurde je ein 2D- $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TROSY-HSQC bei 293 K aufgenommen, welche in Abb. 4.49 abgebildet sind. Hierbei zeigen sich starke chemische Verschiebungen der AS-Signale, so dass von einer Bindung zwischen den beiden Proteinen ausgegangen werden kann.

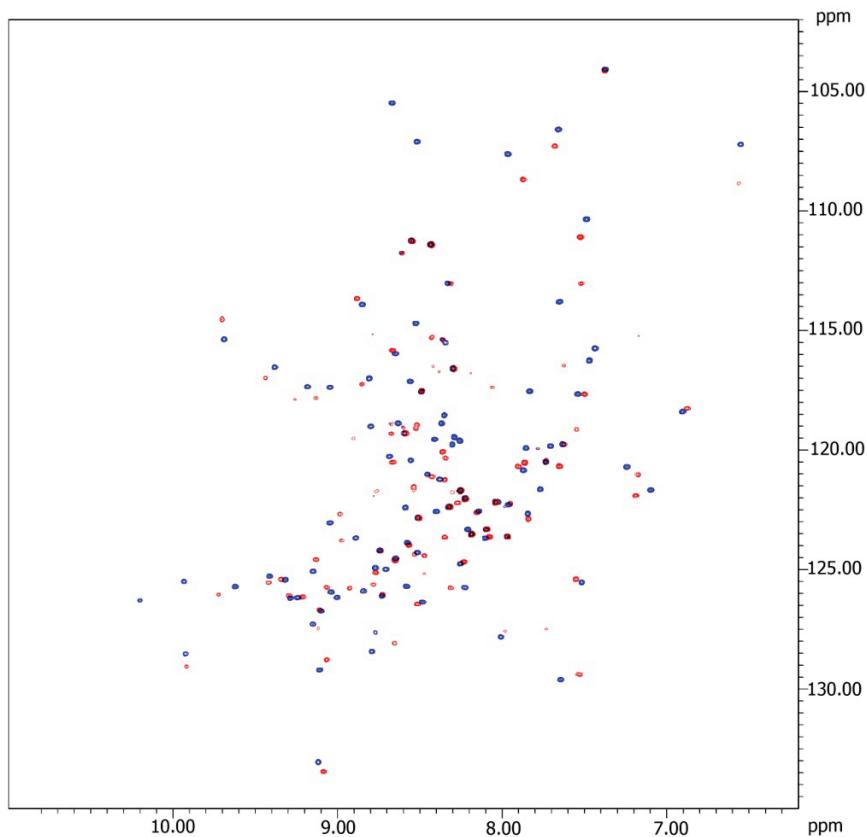


Abb. 4.49: 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektren des ¹⁵N PDZ2-Proteins mit dem C84-Peptid. (blau) ¹⁵N PDZ2. (rot) ¹⁵N PDZ2 mit unmarkiertem C84 (Verhältnis 1:2). Messbedingungen: 150 mM KPi-Puffer; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 1.0, F1: 0.1)].

4.9.2 Protein-Protein Titration: Das C-terminale Kv1.4 C84-Peptid mit dem Kv1.4 T1K-Tetramer und der PDZ2-Domäne

In diesem Experiment wurde die Interaktion zwischen dem T1K-Homotetramer, dem C84-Peptid und der PDZ2-Domäne untersucht. Die Untersuchung der Protein-Protein Interaktion wurde auf Seiten des C84-Peptides vorgenommen. Ziel des Versuchs war es herauszufinden, ob die PDZ2-Domäne einen regulatorischen Einfluss auf den C84/T1K-Komplex besitzt. Ist das PDZ2-Protein in der Lage C84 von der T1K-Domäne zu lösen, oder induziert es möglicherweise Konformationsänderungen in dem Komplex. Für das Experiment wurden 100 µM ¹⁵N C84-Peptid vorgelegt und ein 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K aufgenommen. Anschließend wurden 400 µM unmarkiertes T1K-Monomer für ein 1 : 1 Verhältnis (1 C84-Peptid auf 1 T1K-Homotetramer) zugegeben und ein weiteres 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K aufgenommen. Final wurden 100

μM PDZ2 (1 PDZ2 : 1 C84) dem Ansatz zugesetzt und ein 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K aufgezeichnet. Diese Spektren werden in Abbildung 4.53 gezeigt. Dabei wurde die Differenz der kombinierten chemischen Verschiebungen und der Betrag der Änderungen der einzelnen Volumen ausgewertet. Abbildung 4.50 und Abbildung 4.51 zeigen das Ergebnis des jeweiligen Experimentes. Die C84-Wechselwirkung mit dem T1K-Konstrukt wurde in Abschnitt 4.5.2 bereits besprochen. Zusammenfassend sei gesagt, dass es eher im mittleren C84 AS-Sequenzbereich (S46 bis S58) vermehrt zu Signalveränderungen der einzelnen Aminosäuren kommt (Abb. 4.50, Bild A und Abb. 4.51, Bild A). Das C-terminale PDZ-Bindemotiv wird nicht beeinflusst. Bei Zugabe von PDZ2 findet eine Wechselwirkung mit dem C84-Peptid, beschrieben in Abschnitt 4.9.1 statt. Das PDZ2-Protein bindet an das C84-Peptid, wobei es zu signifikanten Änderungen in dem Bereich von AS Y43 bis AS S57 kommt (siehe Abb. 4.50, Bild B). Die Ergebnisse aus 4.50 und 4.51 werden auf die MD-Struktur von C84 in Abbildung 4.52 übertragen.

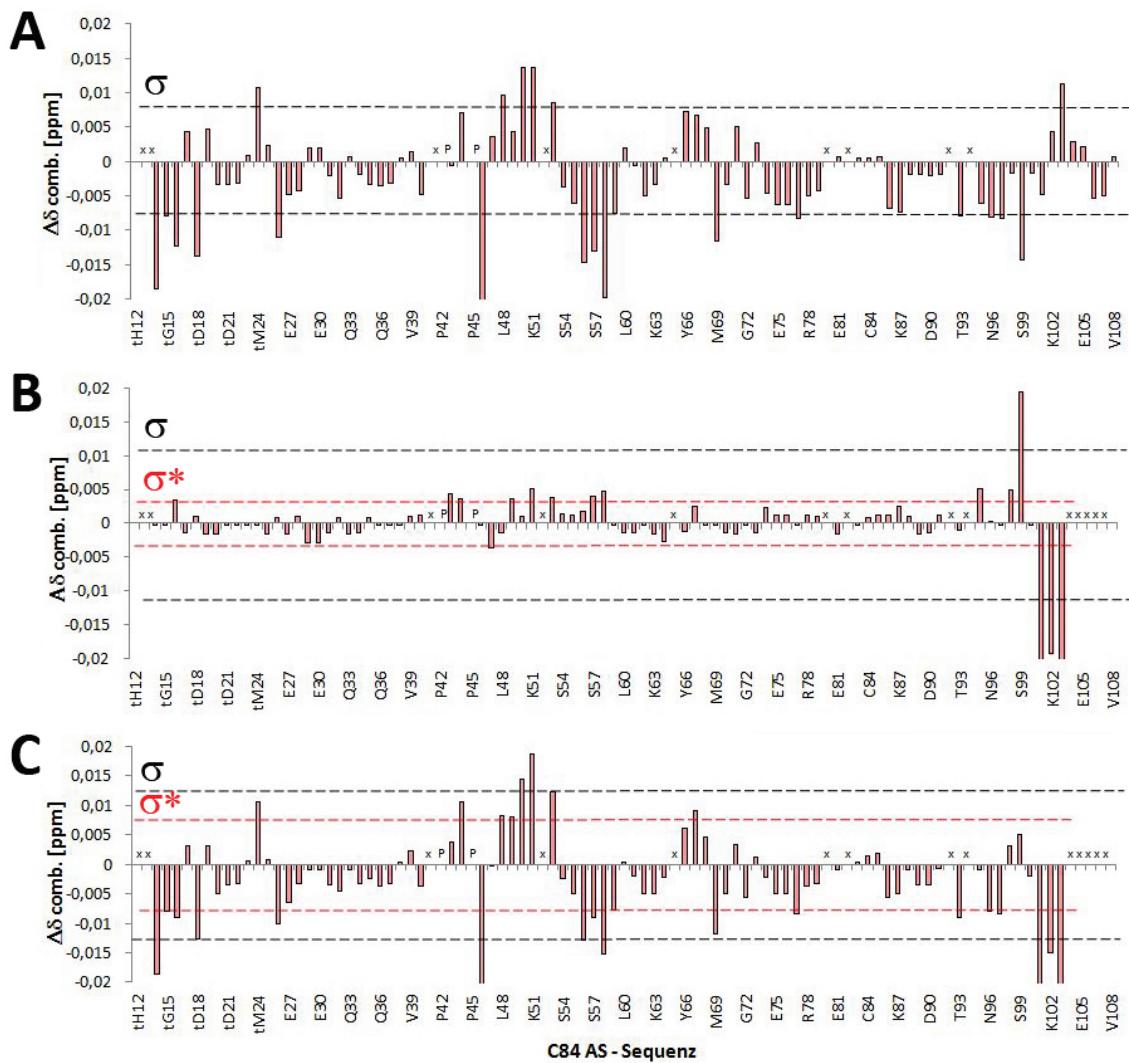


Abb. 4.50: Darstellung der chemischen Verschiebungen aus der Protein-Protein Titration von ^{15}N C84 mit der T1K-Domäne und dem PDZ2-Protein. Säulendiagramme: (rot) Differenz der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta \text{ comb. [ppm]}$. (---) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (---) σ^* = Korrigierte Standardabweichung zu Null von AS tH12 bis AS N100 (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. **(A)** Beschreibt die Änderungen an C84, welche durch die T1K-Domäne ausgelöst werden. (Verhältnis 1 C84 : 1 T1K-Tetramer). **(B)** Zeigt die Änderungen, welche PDZ2 an dem T1K/C84-Komplex bewirkt. (Verhältnis 1 PDZ2 : 1 T1K-Homotetramer : 1 C84). **(C)** Zeigt die Änderungen an dem C84 Peptid, welche nach der Zugabe der T1K-Domäne und dem PDZ2-Protein entstehen. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.06, F1: 0.1)].

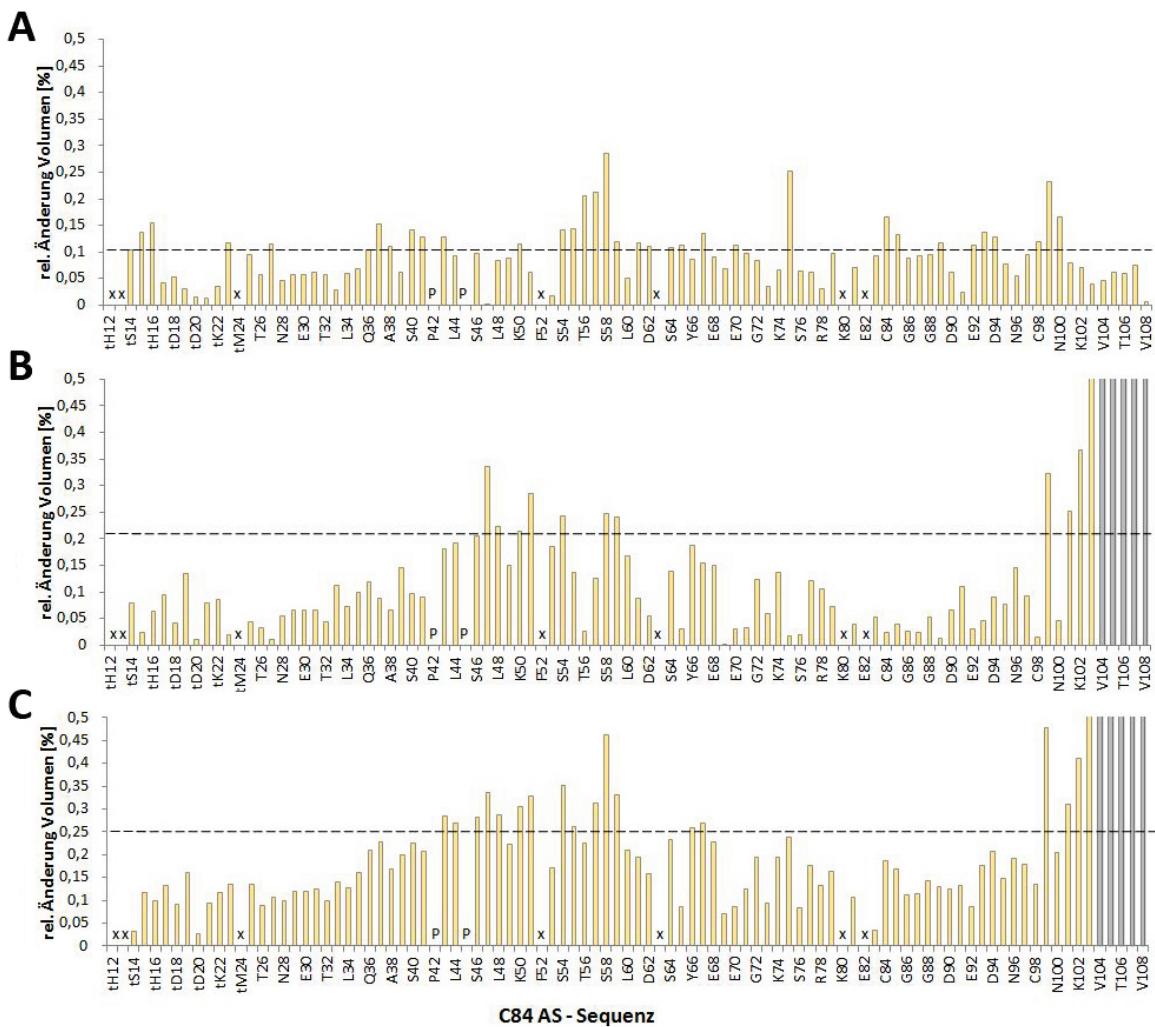


Abb. 4.51: Volumenänderungen bei der Protein-Protein Titration von ^{15}N C84 mit der T1K-Domäne und dem PDZ2-Protein. (orange) Betrag der relativen Änderung der Volumen [%]. (---) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. **(A)** Beschreibt die Änderungen an C84, welche durch die T1K-Domäne ausgelöst werden. (Verhältnis 1 C84 : 1 T1K-Tetramer). **(B)** Zeigt die Änderungen, welche PDZ2 an dem T1K/C84-Komplex bewirkt. (Verhältnis 1 PDZ2 : 1 T1K-Homotetramer : 1 C84). **(C)** Zeigt die Änderungen an dem C84 Peptid, welche nach der Zugabe der T1K-Domäne und dem PDZ2-Protein entstehen. NMR-Messbedingungen analog Abb. 4.50.

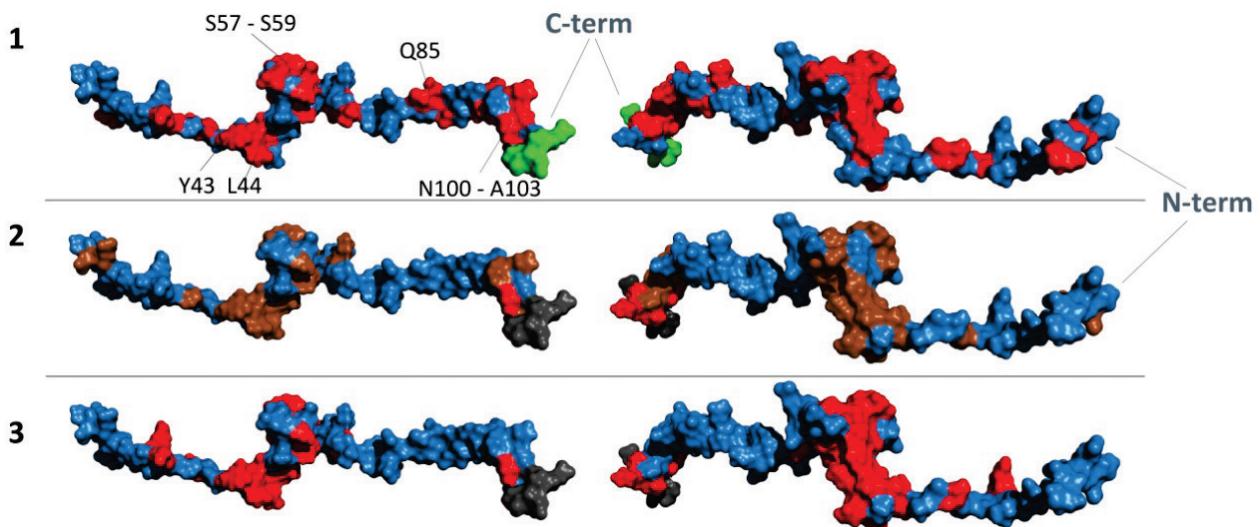


Abb. 4.52: Graphische Darstellung der Protein-Protein Interaktionsergebnisse aus Abb. 4.50 und 4.51 auf dem C84 MD-Modell. Farbschema: (rot) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen oberhalb von σ . (braun) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen oberhalb von σ^* . (grün, grau) PDZ-Bindemotiv. Dargestellt wird die C84-Peptidstruktur in Bild 1, 2 und 3 aus je zwei verschiedenen Blickwinkeln. (1) Zeigt die Änderungen an C84, welche durch die T1K-Domäne ausgelöst werden. (2) Zeigt die Änderungen an dem C84/T1K-Komplex, welche durch PDZ2 ausgelöst werden (dargestellt nur C84). (3) Zeigt die Änderungen an C84, welche durch PDZ2 und die T1K-Domäne ausgelöst werden.

Die Funktion des PSD-95 Proteins wurde in Abschn. 1.3.6 erläutert. Seine Hauptaufgabe ist die Lokalisation des spannungsgeladenen $K_v1.4$ Kaliumkanals über den C-Terminus in der Zellmembran. Die kombinierten chemischen Verschiebungen in Abbildung 4.50 Bild A zeigen, dass das C84-Peptid an das T1K-Tetramer bindet. Zusätzlich kommt es zu einer signifikanten Volumenabnahme in dem AS-Bereich S54 bis S59 (Abb. 4.52, Bild 1). Bei Zugabe von PDZ2 kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen dem PDZ-Bindemotiv auf dem C-Terminus und der PDZ2-Domäne (Abb. 4.50, Bild B). Hierbei zeigt Abbildung 4.50 Bild B, dass es in dem Bereich um die AS S54 bis S59 zu einer Abschwächung der Bindung zwischen dem T1K-Tetramer und dem C84-Peptid kommt (vgl. zudem Abb. 4.50, Bild C, AS-Bereich S54 bis S59). Abbildung 4.51 Bild B zeigt, dass es zur Reduzierung der Volumen in dem AS-Bereich von S46 bis S59 auf dem C84-Peptid kommt. Dies spricht für eine bindingsinduzierte Strukturänderung des C84-Peptides. Zusammenfassend schwächt die Zugabe des PDZ2-Proteins die Bindung zwischen dem T1K/C84-Komplex und induziert eine Strukturänderung auf dem C84-Peptid.

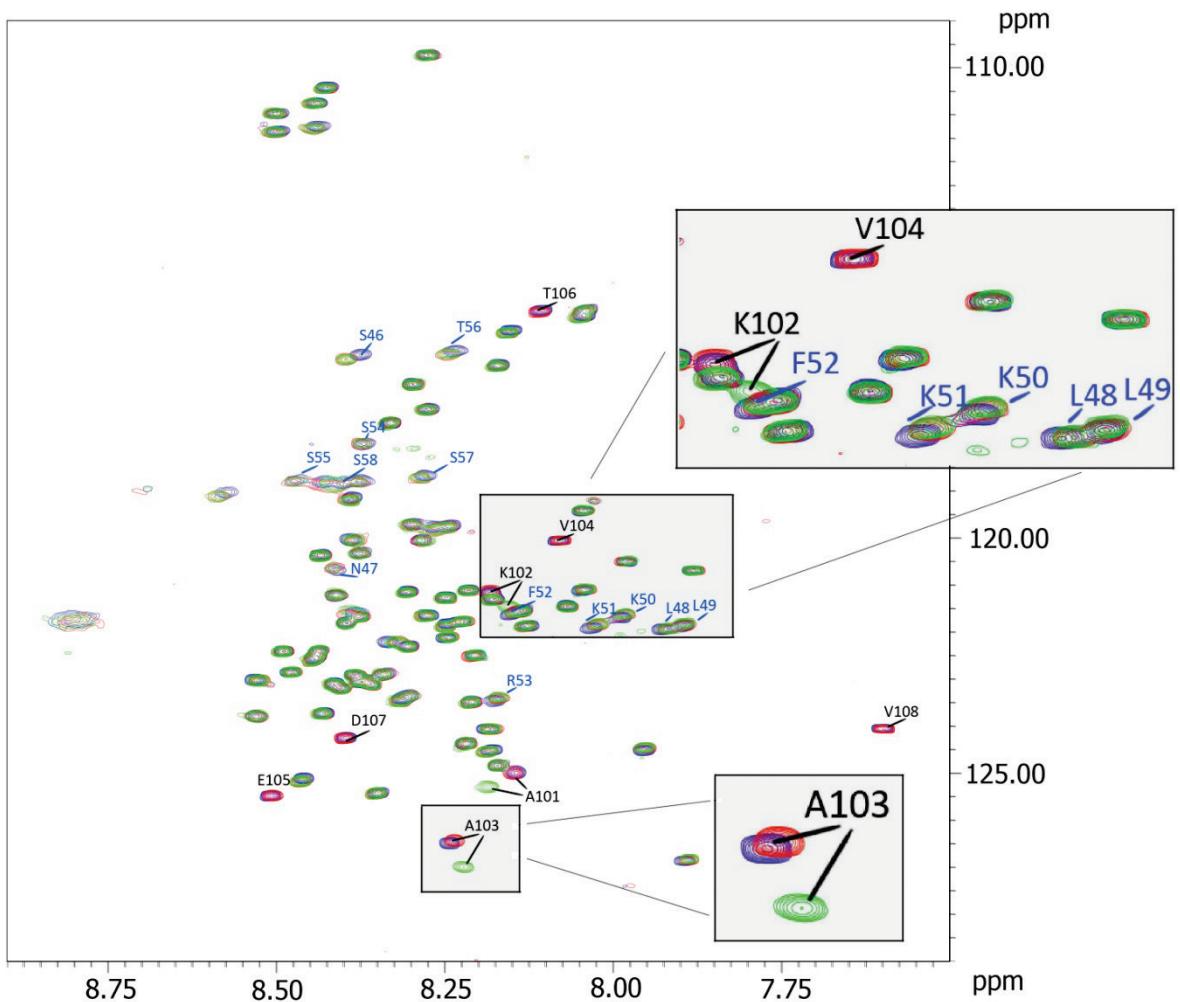


Abb. 4.53: 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC NMR-Spektren des ¹⁵N C84-Konstruktes mit der T1K-Domäne und seinem Bindepartner, der PDZ2-Domäne. NMR-Spektren: (blau) ¹⁵N C84. (rot) ¹⁵N C84 mit T1K (Verhältnis: 1:1 T1-Tetramer). (grün) ¹⁵N C84/T1K-Komplex mit dem PDZ2-Protein (Verhältnis 1:1:1). Beschriftung Aminosäuren: (blau) AS S46 bis S58: C84-Peptidbereich, wo es zu AS-spezifischen Signalveränderungen kommt. (Abb. 4.50 und Abb. 4.51). (schwarz) Aminosäuren, welche im PDZ-Bindemotiv auf dem C84-Peptid liegen und verschwinden. NMR-Probenpuffer: 150 mM KPi Puffer; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.06, F1: 0.1)].

4.10 Die Kv1.4 C84-Mutante

Protein-Protein Interaktionsexperimente unter Verwendung der 2D-NMR-Spektroskopie geben keine Auskunft darüber, wie interagierende Proteine strukturell zueinander orientiert sind. Um Kontaktstellen zu definieren, sollten Spin-Labels (z.B. MTS), welche kovalent oder auch nicht kovalent an Cysteine binden können zum Einsatz kommen. NMR technisch bedeutet dies, dass Protein Spin-Label Komplexe Protein-Protein Wechselwirkungen entweder blockieren, oder je nach Spin-Label AS-Signale nahe einer

Protein-Protein Kontaktstelle auslöschen könnten. Optimal für die Spin-Label Beladung ist es, wenn nur ein einziges und gut zugängliches Cystein im Peptid oder Protein vorhanden ist. Von Interesse wäre gewesen, direkte Kontaktstellen von den Peptiden IP75 und C84 mit der T1K-Domäne zu bestimmen. Das IP75-Peptid (Abschn. 4.2) besitzt nur ein Cystein und ist somit für eine Spin-Label-Beladung geeignet. Das C84-Peptid jedoch besitzt drei Cysteine C18, C61 und C75 (Abschn. 4.3 und Abb. 4.54). Eine C84-Mutante mit nur einem einzigen Cystein (C18) wurde bei der Firma GeneArt AG (life technologiesTM) synthetisiert. Die Cysteine C61 und C75 wurden durch die Aminosäure Adenin ausgetauscht (Abb. 4.54). Vereinfacht wird die Kv1.4 C84-Mutante als C84M bezeichnet.

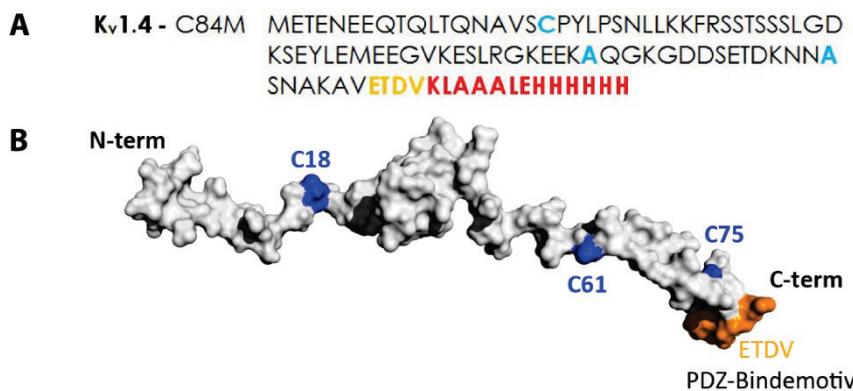


Abb. 4.54: Aminosäuresequenz der Kv1.4 C84-Mutante (C84M) und Darstellung der Lage der Cysteine auf der C84-Peptidstruktur zur besseren Orientierung. Farbschema: (rot) His₆-tag mit Linker. (gelb) PDZ- Bindemotiv. (blau) Cystein 18, Cystein 61, Cystein 75. **(A)** Aminosäuresequenz des Kv1.4 C84M-Konstruktes (M_r 10,8 kDa). **(B)** Dargestellt ist die C84 MD-Struktur (Abschn. 4.3.1). Hervorgehoben sind die Cysteine und ihre Position in der C84-Peptidkette.

Die C84M-Nukleotidsequenz wurde in den Plasmidvektor pET-20b(+) mittels NdeI und XbaI einkloniert. Dies erwies sich als Fehler, da durch den C-terminalen Affinitätstag die PDZ-Bindedomäne nicht mehr frei zugänglich für das PDZ2-Protein war (Abschn. 4.9.1). Durch die unterschiedlich lokalisierten Affinitätstags entspricht Cystein 18 bei der C84M Cystein 41 bei dem C84-Peptid (C84-Konstrukt siehe Abschn. 4.3). Dennoch konnte davon ausgegangen werden, dass das Konstrukt für ein Spin-Label Experiment mit der T1K-Domäne geeignet war. Protein-Protein bindungsrelevante strukturelle Ereignisse auf dem C84-Peptid waren vor allem in der Mitte der C84 AS-Struktur zu detektieren (Abschn. 4.5.2 und Abschn. 4.9.1). Aus diesem Grund wurde auch das Cystein 18 als einziges Cystein behalten und nicht C61 und C75 ausgetauscht. Exprimiert und Aufgereinigt wurde die Mutante nach dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen C84-Protokoll. Abbildung 4.55 zeigt ein 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektrum des C84M-Peptides im Vergleich zu dem C84-Peptid.

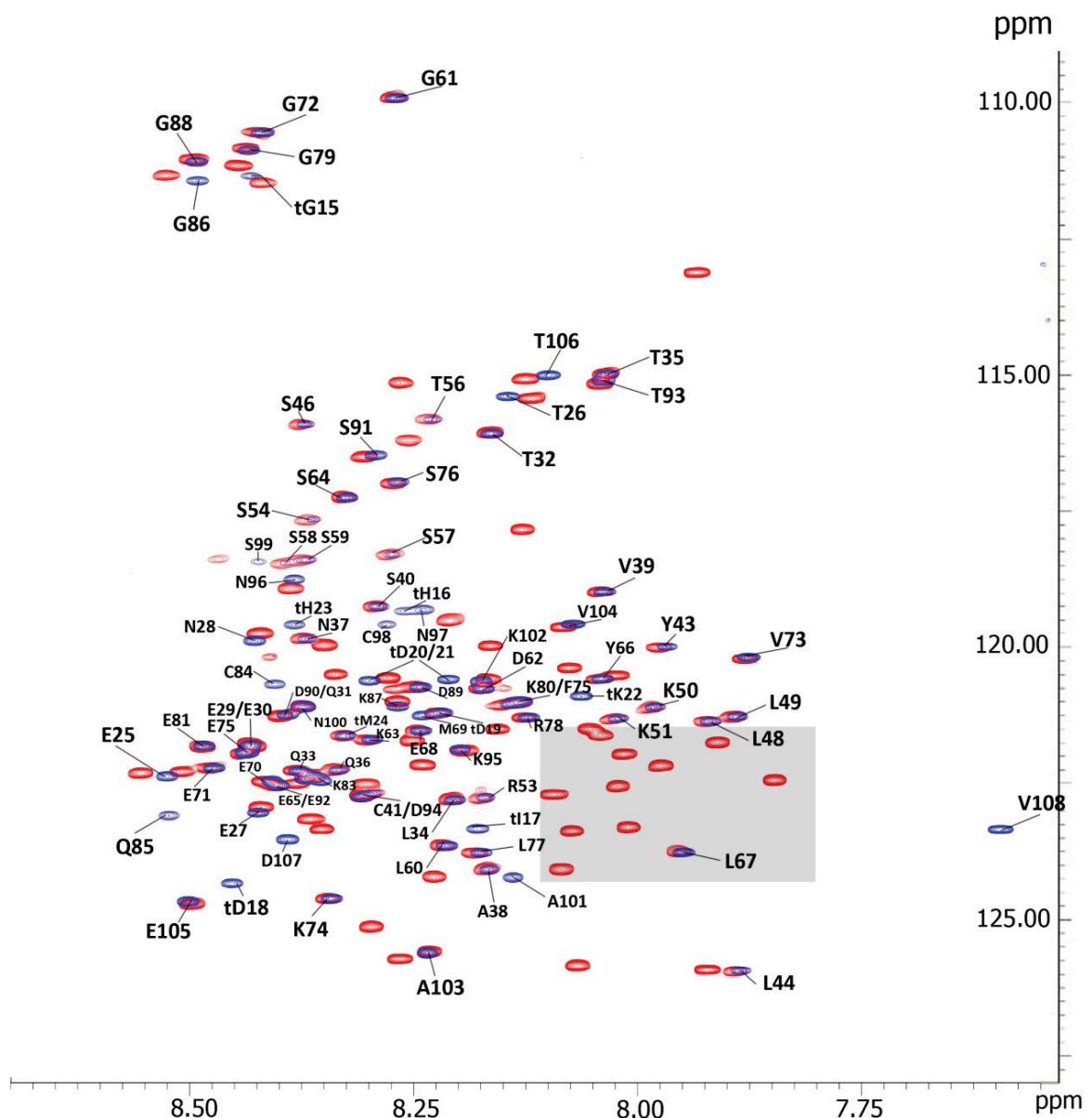


Abb. 4.55: 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektren des C84- und C84M-Peptides. (blau) Zugeordnetes 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum des C84-Peptides. Messbedingungen: 400 µM C84 in 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 512); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.06, F1: 0.1)]. (rot) Nicht zugeordnetes 2D-[¹⁵N, ¹H]-TROSY-HSQC Spektrum des C84M-Peptides. Messbedingungen: 550 µM C84M in 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker Spektrometer) und 293 K [TD (F2: 8192, F1: 512); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.06, F1: 0.1)]. (grau) Das graue Viereck stellt den C-terminalen, his₆-tag Bereich des C84M-Peptides dar (Abb. 4.54).

4.11 Protein-Protein Interaktion des Kv1.4 T1K-Tetramers mit dem Kv1.4 C84M-Peptid

In diesem Experiment wurde das C84M-Peptid auf seine Interaktion mit der T1K-Domäne hin untersucht. Ziel war es den Einfluss des C84M-Peptides mit dem des C84-Peptides (Abschn. 4.5.1) in Bezug auf ihre jeweiligen T1K-Wechselwirkungen hin zu vergleichen. Dadurch, dass zwei der Cysteine durch Alanine (C61A, C75A) ausgetauscht worden sind, erschien es möglich bindungsrelevante Bereiche zwischen der T1K-Domäne und den beiden unterschiedlichen C84-Peptiden zu detektieren. Für den Versuch wurden 250 μM (Konzentration Monomer) ^2H ^{15}N markiertes T1K vorgelegt und ein 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K aufgenommen. Anschließend wurden 300 μM unmarkiertes C84M-Peptid zugegeben und ein erneutes 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Spektrum bei 293 K aufgenommen. In Abbildung 4.56 (rot) wird das Ergebnis der Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen zwischen den beiden Spektren dargestellt. Zusätzlich werden sie mit den Daten aus Abschnitt 4.5.1 (Abb. 4.26), welche die Bindungsdaten zwischen dem C84-Peptid und dem T1K-Tetramer enthalten, verglichen (Abb. 4.56, blau).

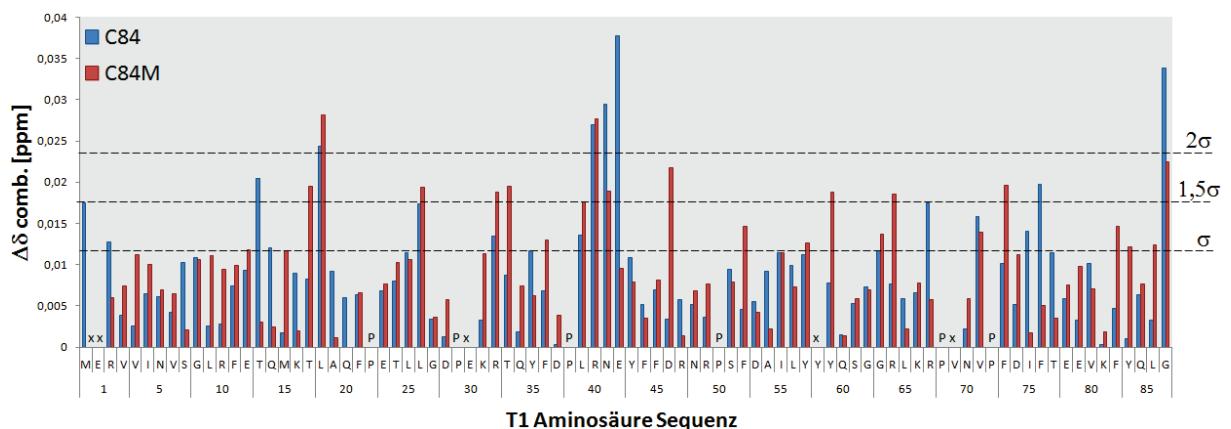


Abb. 4.56: Vergleich des C84- und C84M-Peptides bei der Interaktion mit dem T1K-Tetramer. Säulendiagramme: (rot, blau) Betrag der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ comb. [ppm]. (---) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. (blau) Verdeutlicht die Änderungen an T1K, welche durch das C84-Peptid ausgelöst werden (Messbedingungen vgl. Abb. 4.26). (rot) Verdeutlicht die Änderungen an T1K, welche durch das C84M-Peptid ausgelöst werden. Probenzusammensetzung siehe Text. Messbedingungen: 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTT. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker NMR-Spektrometer) [TD (F2: 8192, F1: 1024); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.12, F1: 0.1)].

Das Ergebnis aus Abbildung 4.56 wird in Abbildung 4.57 auf das T1K-Modell zur besseren Übersicht übertragen. Hierbei wird deutlich, dass das C84M-Peptid, genau wie das C84-Peptid Wechselwirkungen über die komplette Oberflächenstruktur mit der T1K-Domäne

eingeht. Diese entsprechen jedoch nicht exakt den gleichen, wie bei dem C84-Peptid (Abb. 4.56). Ob dieses Verhalten auf die jeweils unterschiedlich N- oder C-terminal angelagerten His_{6/10}-tags, oder auf die beiden Cysteinmutationen zurückzuführen ist, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen.

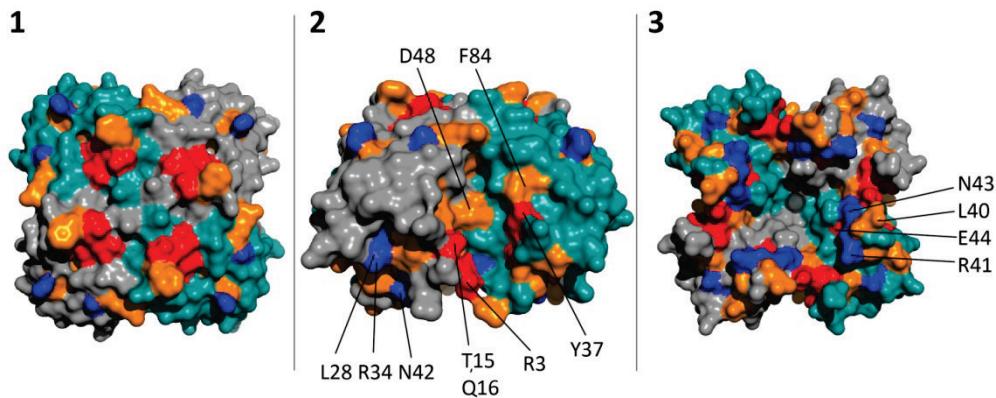


Abb. 4.57: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.56 auf die T1K-Struktur. Farbschema: (rot, orange, blau) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen oberhalb von σ . (grau, grün) T1K-Monomere. Ansicht der T1K-Domäne von (1) oben, (2) der Seite und (C) unten. **(Rot)** Einfluss von C84 auf die T1K-Domäne. **(Orange)** Einfluss von C84M auf die T1K-Domäne. **(Blau)** Gemeinsame Kontaktstellen von C84 und C84M mit der T1K Domäne.

Zur genaueren Untersuchung wurde der Betrag der relativen Änderungen der Volumen der einzelnen T1K AS-Signale des NMR-Experimentes (Abb. 4.56, T1K zu C84M) untersucht. Das Ergebnis wird in Abbildung 4.58 dargestellt und in Abbildung 4.59 auf die Struktur der homotetrameren T1K-Domäne übertragen. In dieser Abbildung (Abb. 4.59) wurden speziell die Bindungsbereiche herausgearbeitet, welche nur das C84-Peptid mit der T1K-Domäne betreffen und nicht das C84M-Peptid mit der T1K-Domäne. Diese Areale könnten bindungsrelevante Bereiche der beiden Cysteine (C61, C75) des C84-Peptides zum T1K-Tetramer darstellen.

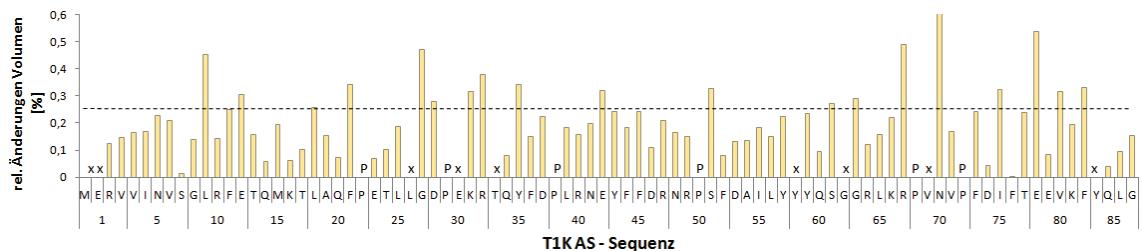


Abb. 4.58: Volumenänderungen bei der Protein-Protein Interaktion von ${}^2\text{H}$ ${}^{15}\text{N}$ T1K mit dem C84M-Peptid. (orange) Betrag der relativen Änderung der Volumen [%]. (---) σ = Korrigierte Standardabweichung zu Null (Abschn. 3.5.3). (P) AS Prolin. (x) nicht zugeordnete Signale. Messbedingungen siehe Abb. 4.56.

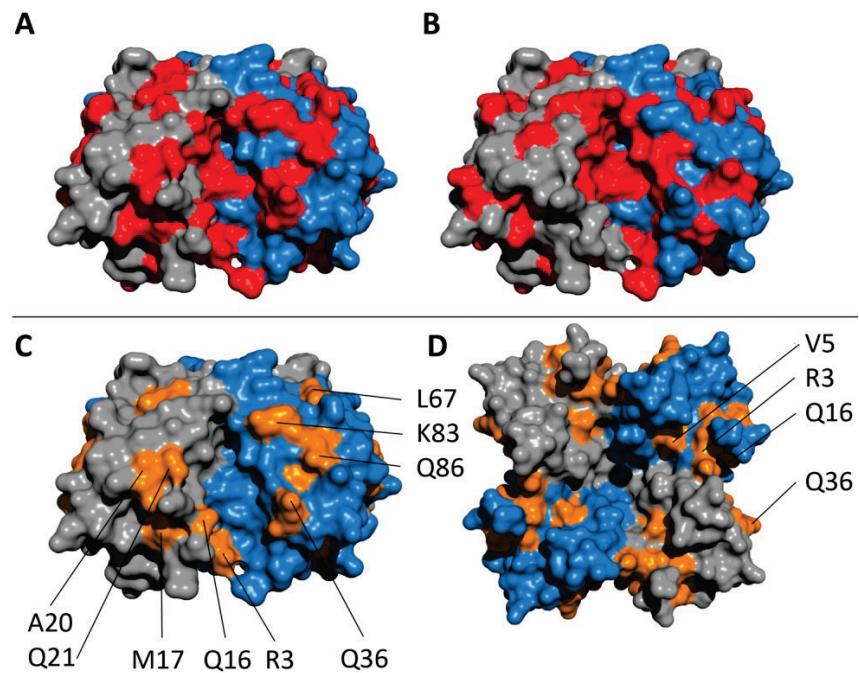


Abb. 4.59: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.56 und Abb. 4.58 auf die T1K-Struktur. Farbschema: (rot, orange) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen oberhalb von σ . (blau, grau) T1K-Monomere. Ansicht der T1K-Domäne von (A, B, C) der Seite und (D) unten. Darstellung: (A) Die T1K-Domäne in Wechselwirkung mit dem C84-Peptid (entspricht Abb. 4.27). (B) Die T1K-Domäne in Wechselwirkung mit dem C84M-Peptid. (C) und (D) Veränderungen auf der T1K-Struktur, welche durch das C84-Peptid, jedoch nicht durch das C84M-Peptid ausgelöst werden.

5. Ergebnisse der Untersuchungen an dem CFPS-System

5.1 Die CFPS-Reaktion unter Zugabe von Translationsfaktoren

Bei der Translation (TL) übersetzen Ribosomen die Sequenz der mRNA in die Peptidsequenz der Aminosäuren (AS). Die Translation wird in drei Schritte unterteilt: die Initiation (Binden der Ribosomen an die mRNA unter Initiation der AS-Synthese), die Elongation (kontinuierlicher Aufbau der AS-Sequenz) und die Termination (TL-Ende plus Recycling der Ribosomen für einen neuen TL-Zyklus) (Myasnikov et al., 2009). Essentiell für die TL sind mehrere Proteine, welche als Translationsfaktoren bezeichnet werden (Abb. 5.1). Laut Underwood et al. (2005) ist die Syntheseleistung von Proteinen im zellfreien System (CFPS - 'cell free protein synthesis') dem im lebenden Organismus weit unterlegen. Schon Freischmidt (2011) versuchte die Syntheseleitung der CFPS zu verbessern, indem er die TL-Maschinerie rekonstruierte und der CFPS-Reaktion zusätzliche TL-Faktoren integrierte. Hierbei konnte die CFPS-Syntheseleistung nur unter Zugabe von dem TL-Faktor EF-Tu und EF-Ts deutlich gesteigert werden (Freischmidt et al., 2010). Ziel dieser Arbeit war es nun die Syntheseleistung der CFPS zu steigern, indem ihr ein komplettes, spezifisch an die Initiation, die Elongation und die Termination angepasstes TL-Faktoren Ensemble zugegeben wurde. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Initiation, die Elongation und die Termination im Gesamten der geschwindigkeitshemmende Schritt bei der CFPS-Reaktion wäre.

5.1.1 Aufreinigung der Translationsfaktoren

Die zehn an der Translation (TL) beteiligten Proteinfaktoren (IF-1, IF-2 ,IF-3 , EF-Tu ,EF-Ts ,EF-G ,RF-1 , RF-2 ,RF-3 ,RRF) wurden von Freischmidt (2011) kloniert. Alle TL-Faktoren (Abschn. 2.7) wurden mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie über einen His₆-tag aufgereinigt (Abschn. 3.3.4). Exprimiert wurden die Proteine in LB-Medium 4 Stunden bei 37° C (200 rpm) in 1 mM IPTG mittels *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Die Proteinaufreinigung wurde mit dem Ni-NTA Spin Columns Kit (Qiagen) unter nativen Bedingungen durchgeführt. Unter Verwendung des Standardprotokolls mit seinen Standardpuffern (Abschn. 3.3.4) konnten die TL-Faktoren rein gewonnen werden (Abb. 5.1). Freischmidt (2011) zeigte, dass der His₆-tag keinen negativen Einfluss auf die CFPS-Reaktion besaß und zudem alle zehn TL-

Faktoren physiologisch aktiv waren. Die TL-Faktoren wurden in einen 50 mM HEPES-KOH pH 7,5; 100 mM NaCl Puffer überführt und je auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt.

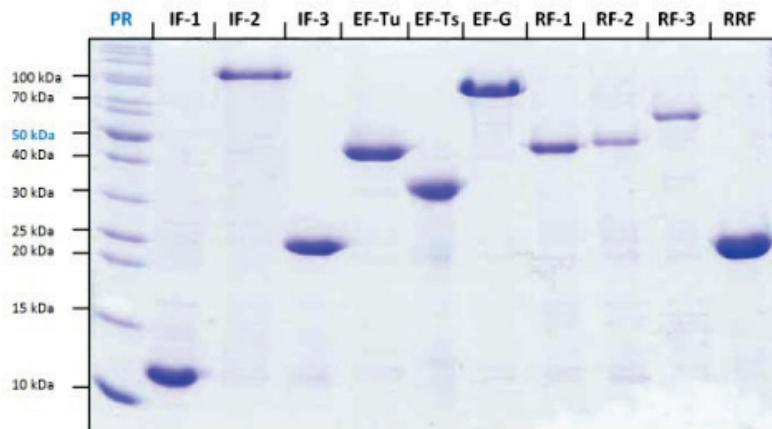


Abb. 5.1: Aufgereinigte TL-Faktoren (Initiationsfaktoren (IF), Elongationsfaktoren (EF) und Terminationsfaktoren (TF)). 16 % SDS-Gel nach Coomassie-Färbung. Auftragung von links nach rechts: Pageruler™ Protein Standard, IF-1 (8,3 kDa), IF-2 (97,4 kDa), IF-3 (20,6 kDa), EF-Tu (43,3 kDa), EF-Ts (30,4 kDa), EF-G (77,6 kDa), RF-1 (39,9 kDa), RF-2 (41,3 kDa), RF-3 (59,6 kDa), RRF (Ribosomen Releasing Faktor; 20,6 kDa);

Um die Reinheit und die physiologisch korrekte Faltung eines TL-Faktors darzustellen, wurde der Initiationsfaktor IF-I (8,3 kDa) ^{15}N markiert (NMM-Medium, Abschn. 3.1.1) und ein 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$] HSQC Spektrum bei 298 K aufgenommen (Abb. 5.2). Exprimiert wurde der IF-1 Faktor in NMM-Medium bei 0,2 mM IPTG 6 Stunden bei 37° C (180 rpm). Aufgereinigt wurde der IF-1 Faktor unter Verwendung der nativen Nickel-Affinitätschromatographie unter Standardbedingungen (Abschn. 3.3.4).

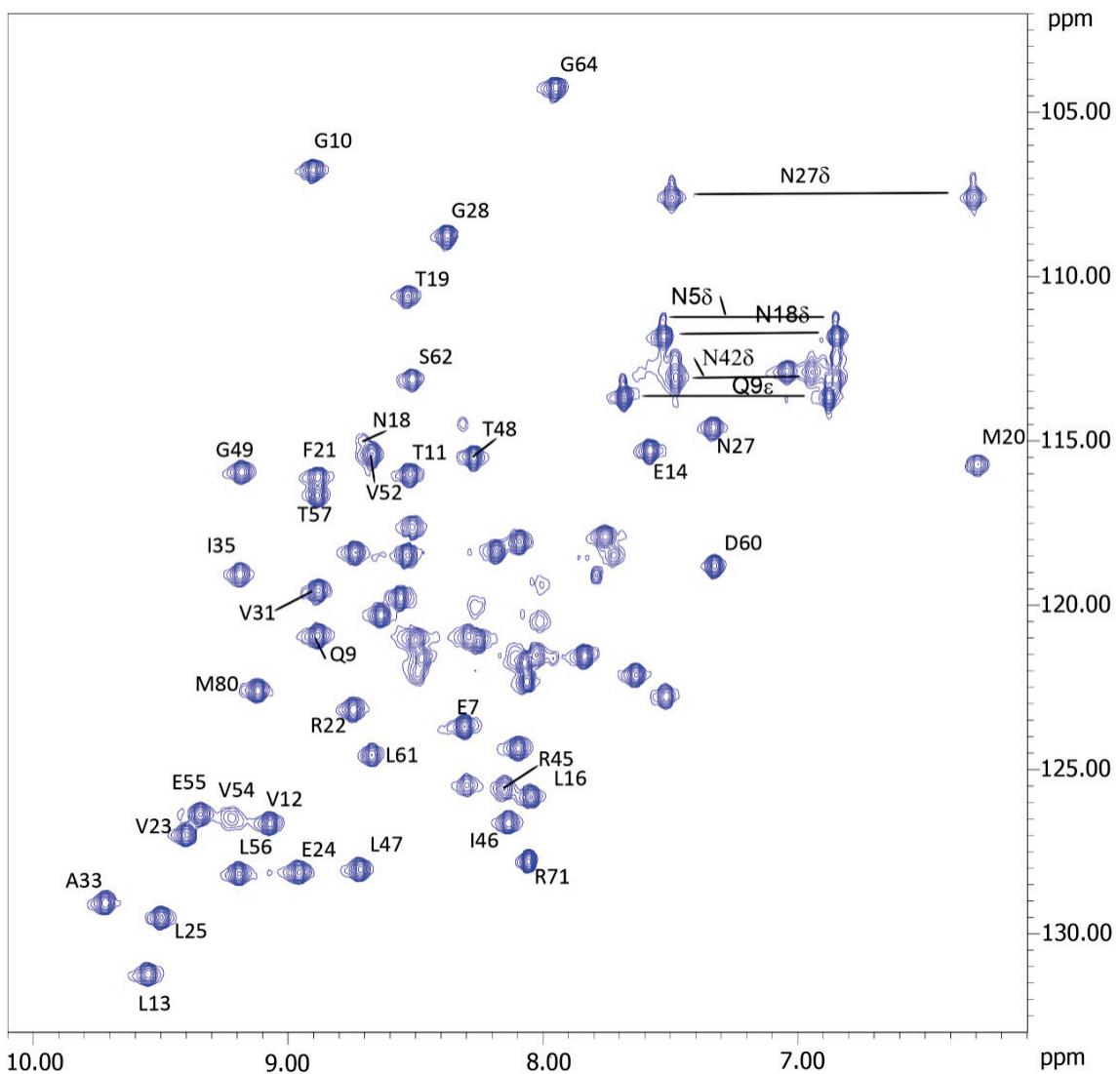


Abb. 5.2: Zugeordnetes 2D-[¹⁵N, ¹H] HSQC Spektrum des Initiationsfaktors IF-1 (8,3 kDa). Messbedingungen: 400 µM IF-1 in 50 mM PBS-Puffer; pH 7,4. Aufgenommen bei 800 MHz (Bruker Spektrometer) und 298 K [TD (F2: 2048, F1: 128); NS 16; SI (F2: 4096, F1: 2048); GM-Filter; LB (F2: -6, F1: -8); GB (F2: 0.12, F1: 0.1)]. Zugeordnet wurde das Spektrum, soweit möglich nach Sette et al. (1997).

5.1.2 Einfluss der Translationsfaktoren auf die CFPS-Reaktion

Jeder TL-Faktor (Abb. 5.1) wurde auf seinen Einfluss auf die CFPS-Synthese hin einzeln untersucht. Im Anschluss wurde die CFPS-Syntheseleistung im Hinblick auf die Zugabe von kompletten TL-Ensembles, bestehend je aus den gemeinsamen Initiations-, den Elongations- oder den Terminationsfaktoren hin untersucht (Abb. 5.1). Die zugegebene Konzentration orientiert sich an den Ergebnissen von Freischmidt (2011) und dem PURE-System (NEB). Verfahrenstechnisch wurde dem normalen CFPS-Batch Reaktionsansatz

(Abschn. 3.4.3) zusätzliches Protein in Form der TL-Faktoren vor dem CFPS-Reaktionsstart zugegeben. Hierbei wurde der Einfluss der zusätzlich zugegebenen TL-Faktoren ab einer Konzentration von 0,25 µM bis zu einer Endkonzentration von zusätzlichen 4 µM getestet. Abbildung 5.3 zeigt das Ergebnis dieser Studie. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle Initiationsfaktoren einzeln einen inhibitorischen Einfluss auf die CFPS-Reaktion besitzen (Abb. 5.3, Bild 1). Bei den Elongationsfaktoren konnte durch EF-Tu (2 µM) eine 12 %ige und durch EF-Ts (1 µM) eine 8 %ige Steigerung der CFPS-Syntheserate erreicht werden. EF-G hatte einen inhibitorischen Effekt auf das CFPS-System (Abb. 5.3, Bild 2). Bei den Terminations-, oder Releasingfaktoren konnte durch RF-2 (1 µM) eine 5 %ige Steigerung und durch RF-3 (0,5 µM) eine 3 %ige Steigerung der CFPS-Syntheserate erzielt werden. RF-1 und RRF besaßen einen inhibitorischen Effekt auf die CFPS-Reaktion (Abb. 5.3, Bild 3). Somit konnte durch Verwendung einzelner TL-Faktoren die CFPS-Syntheserate zwischen 3 % und 12 % erhöht werden.

Im folgenden wurden die Translationsfaktoren auf ihre Wirkung als gemeinsames IF, EF oder RF-Ensemble auf ihren Einfluss bei der CFPS-Reaktion hin untersucht. Abbildung 5.3 (Bild 4) beschreibt dieses Experiment. Hierbei wurden die jeweiligen Initiationsfaktoren, die jeweiligen Elongationsfaktoren und die jeweiligen Terminationsfaktoren in je gleicher Konzentration dem CFPS-Ansatz zugegeben. Dies bedeutet z.B. dass dem IF-Ansatz 1 µM IF-1, 1 µM IF-2 und 1 µM IF-3 gleichzeitig zugegeben wurde und deren Einfluss auf die CFPS Syntheserate ermittelt wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Initiations- und Terminationsensembles einen inhibitorischen Effekt auf die CFPS-Syntheserate besaßen. Bei den Elongationsfaktoren konnte eine Synthesesteigerung um ca. 15 % (bei je 1 µM EF-Faktor) erzielt werden. Ein stark additiver Effekt der TL-Faktoren auf die CFPS-Syntheserate blieb jedoch aus.

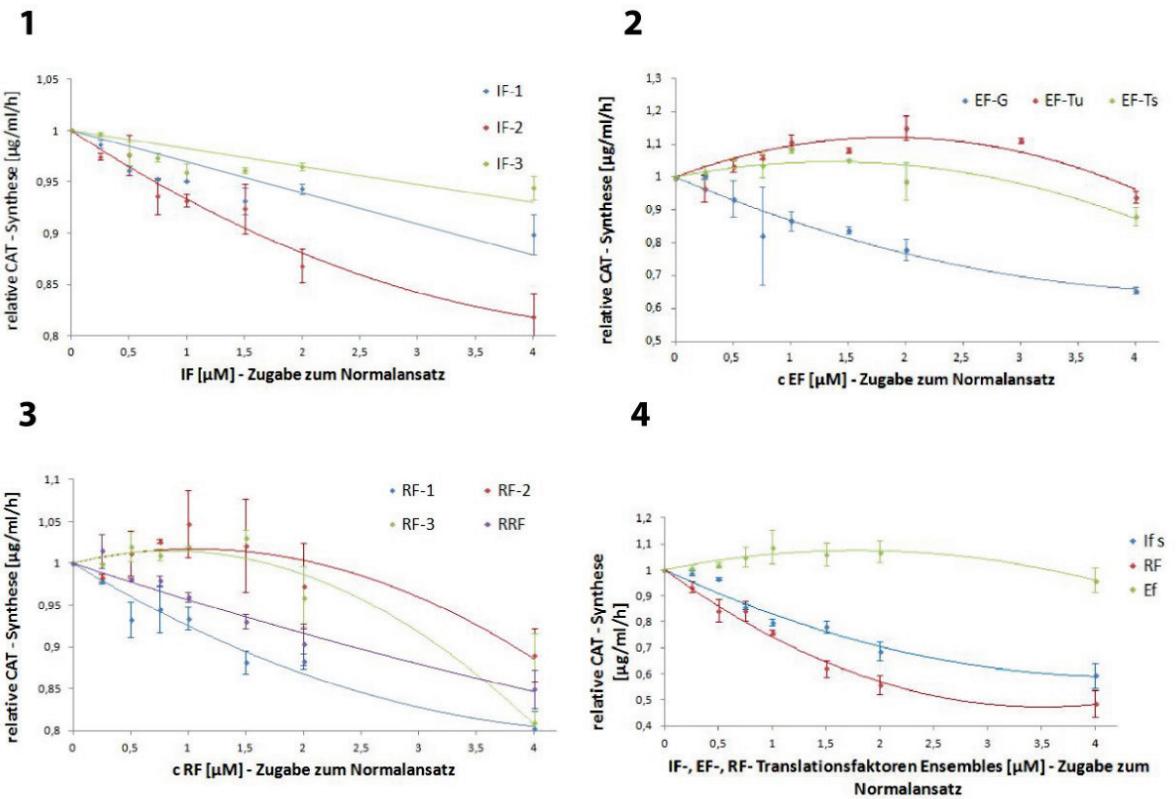


Abb. 5.3: Einfluss der TL-Faktoren auf die CFPS-Syntheseleistung. Aufgetragen ist jeweils die relative Synthese des synthetisierten CAT (Chloramphenicol-Acyltransferase)-CFPS Testproteins (Abschn. 3.4.5) in % gegen die Zugabe der TL-Faktoren in µM zum Reaktionsansatz. **(1)** Einfluss der Initiationsfaktoren (IF-1, IF-2, IF-3) auf die CFPS-Reaktion. **(2)** Einfluss der Elongationsfaktoren (EF-Tu, EF-TS, EF-G) auf die CFPS-Reaktion. **(3)** Einfluss der Terminations-, Releasingfaktoren auf die CFPS-Reaktion. **(4)** Einfluss der einzelnen TL-Ensembles (Ifs, RFs, RFs) auf die CFPS-Reaktion.

5.2 Die CFPS-Reaktionen bei niedrigen Temperaturen

Die CFPS-Reaktion ('cell free protein synthesis') wird regulär bei 37° C durchgeführt (Abschn. 3.4.3). Bei dieser Temperatur wird meist die größte Proteinausbeute erzielt (Freischmidt, 2011). Bei einer CFPS-Reaktion laufen stets unerwünschte Nebenreaktionen ab, welche die Syntheseleistung des Systems negativ beeinflussen. Hierbei fällt vor allem die unspezifische Hydrolyse von Nukleotiden (Kim und Swartz, 2001) und die schnellere Degradation von Proteinen bei hoher Temperatur ins Gewicht (Schindler et al., 1999). Der pH-Wert des CFPS-Puffersystems kann zudem einen negativen Einfluss auf die CFPS-Reaktion haben (Schwarz, 2004). Dies wird in Abschnitt 5.3 genauer erläutert. Ziel war es nun die CFPS-Reaktion bei einer niedrigeren Temperatur durchzuführen, um die erwähnten negativen Einflüsse zu minimieren. Das Problem hierbei war, dass eine Senkung der Reaktionstemperatur einer CFPS-Reaktion keine erhöhte Syntheseleistung der CFPS mit sich

brachte (Freischmidt, 2011). Zur Steigerung der CFPS-Syntheseleistung bei niedriger Temperatur wurde die 5`UTR-Region ('untranslated region') des CFPS-Testprotein CAT (Abschn. 3.4.5) durch die 5`UTR-Region des Kälteschockproteins CspA ausgetauscht. Diese als Thermosensor wirkende 5`UTR-Sequenz besitzt bei unterschiedlichen Temperaturen unterschiedliche Konformationen (Abb. 5.4). Somit wird in der Zelle sichergestellt, dass nur bei niedriger Temperatur das CspA Protein als Reaktion auf Kältestress exprimiert wird. Abbildung 5.4 stellt die unterschiedlichen RNA-Konformationen des 5`UTR-CspA Bereiches dar. Ein zusätzliches Problem bei CFPS-Reaktionen unter Niedrigtemperatur war, dass speziell Enzyme an Aktivität verlieren. Hierbei war vor allem die T7-RNA Polymerase (Abschn. 5.2.2) von Interesse, welche die Nukleotidsequenz der DNA in die Nukleotidsequenz der mRNA transkribiert.

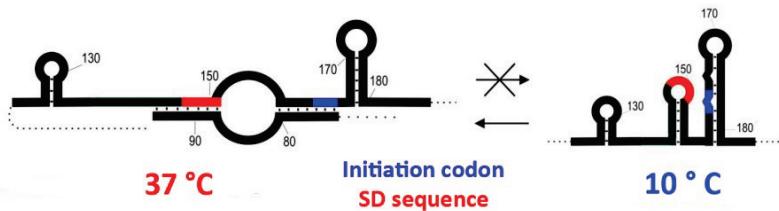


Abb. 5.4: Graphische Darstellung der 5`UTR mRNA Sekundärstruktur von CspA bei 37° C und 10° C. Bei 37° C kommt es zu einer definierten 5`UTR mRNA Sekundärstruktur, weshalb die Translationsrelevante Shine-Dalgarno Sequenz (SD) und das Startcodon (Initiation codon) in einer doppelsträngigen Konformation nicht zugänglich sind. Bei einer Temperatur von 10° C ist die 5`UTR mRNA-Sekundärstruktur für das Ribosom zugänglich. (Giuliodori et al., 2010; modifiziert nach Freischmidt, 2011)

5.2.1 Die CFPS-Reaktion bei unterschiedlichen Temperaturen und mit unterschiedlichen 5`UTR-Sequenzen

Bei der CFPS-Reaktion unter Niedrigtemperatur wurden zwei Ziele verfolgt. Erstens sollte die CFPS-Reaktionstemperatur unter Verwendung der 5`UTR von CspA ohne Verlust der Proteinausbeute verringert werden (Abschn. 5.2.1) und zweitens sollte die dabei geringere T7-RNA Polymerase Aktivität durch erhöhte Zugabe ausgeglichen werden (Abschn. 5.2.2). Die Aktivität der T7-RNA Polymerase beträgt bei 37° C 100 %, bei 30° C 70 %, bei 25° C 40 %, bei 20° C 20 % und bei 15° C nur noch 7 % (Chamberlin und Ring, 1973).

Versuchsanansatz 1 basiert auf den Ergebnissen von Freischmidt (2011). Das pK7-CAT (CAT) und das 5`UTR CspA-CAT (csCAT) Konstrukt wurden von ihm zur Verfügung gestellt (Abschn. 2.7). Die CFPS-Reaktionen wurde mit dem S30 T7 High-Yield Protein Expression System

(Promega, Abschn. 3.4.4) durchgeführt. Hierbei wurden Reaktionen im 30 µl Batch-CFPS Modus bei unterschiedlichen Temperaturen (15° C, 20° C, 25° C, 30° C, 37° C) vier Stunden ohne Schütteln durchgeführt. Abbildung 5.5 zeigt das Ergebnis der Proteinexpression unter Verwendung beider CAT-Konstrukte bei unterschiedlichen Temperaturen. Hierbei zeigt sich, dass die CAT-Synthese bei dem Konstrukt ohne 5'UTR CspA-Sequenz bei verminderter Temperatur deutlich abnimmt. Bereits bei 25° C sind nur noch 7 % der Standardausbeute bei 37° C zu detektieren (Abb. 5.3, Bild 1: rote Säulen). Die CFPS-Reaktion des csCAT-Konstruktet zeigte im Vergleich zum CAT-Konstrukt eine verbesserte Syntheseleistung bei allen Reaktionstemperaturen unterhalb der Standardreaktionstemperatur von 37° C (Abb. 5.3, Bild 1: blaue Säulen). Bei 30° C konnte das csCAT-Konstrukt die Syntheseleistung gegenüber der Normalreaktion bei 37° C mit dem CAT-Konstrukt um ca. 8 % erhöhen. SDS-Gelbilder der jeweiligen CFPS-Reaktionen werden in Abb. 5.3 (Bild 2a und 2b) dargestellt.

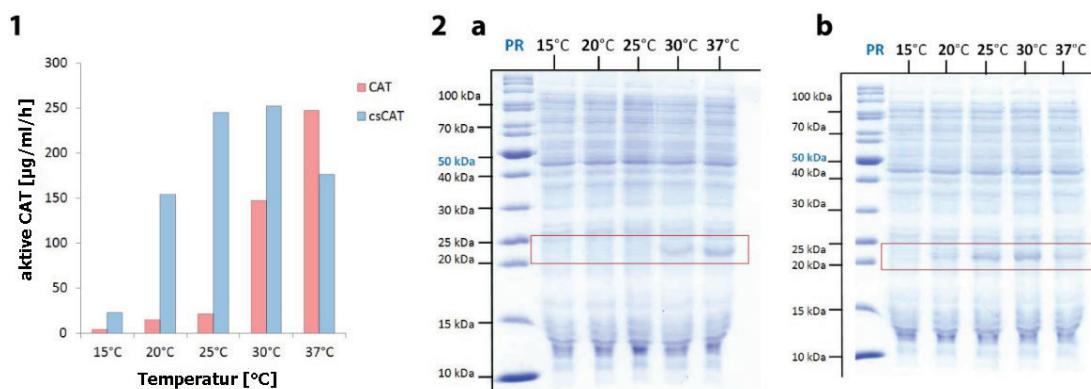


Abb. 5.5: CFPS-Reaktionen von CAT und csCAT (5'UTR CspA Sequenz) bei unterschiedlichen Temperaturen. (1) Die quantifizierte Ausbeute des CAT-Proteins (rot) ist bei der optimalen Reaktionstemperatur von 37° C am höchsten und fällt bei einer Temperaturverminderung deutlich ab. Die csCAT-Synthese (blau) ist über den Temperaturbereich von 20° C bis 37° C deutlich quantifizierbar. Bei 30° C wird mehr csCAT synthetisiert als bei der CAT-Normalreaktion bei 37° C. (2) 16% SDS-Gel nach Coomassie Färbung. Aufgetragen sind 1 µl CFPS-Reaktionslösung nach einer Expressionsdauer von 4 Stunden. Die SDS Gele verdeutlichen die CFPS-Reaktionen aus Bild 1. (a) CAT-Synthese. (b) csCAT-Synthese. (Rotes Quadrat) zeigt das CAT-Protein (25,6 kDa).

5.2.2 CFPS-Reaktionen bei unterschiedlicher Temperatur und T7-RNA Pol. Konzentration

Abschnitt 5.2.1 beschreibt die erfolgreiche Etablierung eines CFPS-Systems, welches es ermöglicht, das CAT-Protein bei niedriger Temperatur unter Verwendung einer 5`UTR CspA-Sequenz herzustellen. Im dem folgenden Ansatz wurde nun versucht, die sinkende Aktivität der T7-RNA Polymerase (T7-RNA Pol.) bei verringriger Reaktionstemperatur durch erhöhte Zugabe von T7-RNA Pol. auszugleichen. Die Reaktionen wurden im 30 µl Batch CFPS-Modus mit dem S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega, Abschn. 3.4.4) bei unterschiedlichen Temperaturen vier Stunden ohne Schütteln durchgeführt. Für diesen Versuch wurde die T7-RNA Pol. von Fermentas (200 U/µl) verwendet. Die CFPS-Reaktionen wurden bei 20° C, 25° C, 30° C und 37° C durchgeführt. Der Aktivitätsverlust der T7-RNA Pol. bei niedriger Temperatur (Abschn. 5.2.1) wurde durch die Zugabe der T7-RNA Pol. ausgeglichen. Bei jedem Temperaturschritt lag somit die identische T7-RNA Polymerase-Aktivität bei unterschiedlicher T7-RNA Pol. Konzentration vor. Dazu wurde der CFPS-Reaktion bei 20° C 400 U T7-RNA Pol., bei 25° C 150 U T7-RNA Pol. und bei 30° C 50 U T7-RNA Pol. zugegeben. Unglücklicherweise hatte der Lagerpuffer der T7-RNA Pol. (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 mM DTT; 0,1 g bovine serum albumin ml⁻¹; 0,03 % (v/v) ELUGENT™ detergent; 50 % (v/v) Glycerol) auf die CFPS-Reaktion negative Auswirkungen. Vor allem das Glycerol inhibierte die CAT-Ausbeute der CFPS-Reaktion bei steigender Zugabe deutlich (Abb. 5.6, Bild 1: blaue Säulen). Um den negativen Effekt zu quantifizieren, wurden bei diesem Versuch zusätzliche Kontrollproben integriert. Bei diesen wurden der CFPS-Reaktion Ladepuffer in der selben Menge integriert, die auch in den zugegebenen T7-RNA Pol. von Fermentas enthalten war. Bild 2 in Abbildung 5.6 zeigt die Ergebnisse des Experimentes, bei dem versucht wurde, die Aktivität der T7-RNA Pol. bei sinkender Temperatur auszugleichen. Verwendet wurde das 5`UTR csCAT-Konstrukt. Es wurden je gleiche CFPS-Ansätze bei vier unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Zusätzlich wird die CAT-Synthese bei 37° C unter Standardbedingungen zum Vergleich dargestellt. Bei jeder Temperatur wurde je ein Versuch mit csCAT alleine, mit csCAT und Lagerpuffer und mit csCAT und mit zusätzlicher T7-RNA Pol. durchgeführt. Der Einfluss des Lagerpuffers wird bei den CFPS-Reaktionen bei 20° C deutlich (Abb. 5.6, Bild 2). Hier inhibiert das überschüssige Glycerol die CFPS-Reaktion. Die Reaktionen bei 25° C und 30° C zeigen einen erfolgreichen Ausgleich des Aktivitätsverlustes der T7-RNA Pol. bei einer Temperatursenkung. Der Lagerpuffer besaß einen inhibierenden Effekt auf die csCAT-Synthese, welcher jedoch von der zugegebenen T7-RNA Pol. ausgeglichen werden konnte.

Die CFPS-Reaktionen bei 25° C und 30° C verdeutlichen dies gut. Insgesamt wurde in diesem Ansatz mehr CAT synthetisiert als in dem Ansatz ohne zusätzliche T7-RNA Pol.. Abbildung 5.6 (Bild 3) stellt den Unterschied einer CFPS-Reaktion mit dem CAT-Konstrukt bei 37° C gegen eine CFPS-Reaktion bei 25° C mit dem csCAT-Konstrukt und unter Zugabe von T7-RNA Pol. dar. Hierbei konnte die CFPS-Reaktion um bis zu 30 % gesteigert werden.

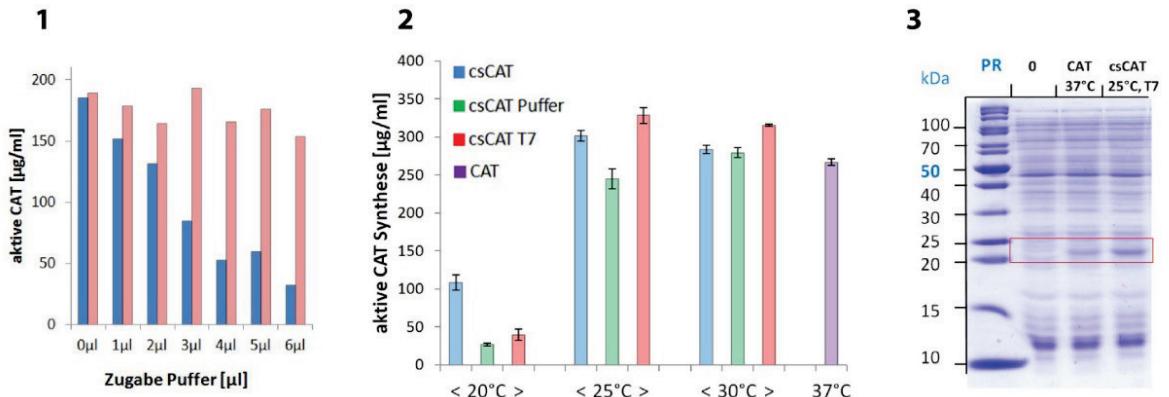


Abb. 5.6: Einfluss von Glycerol und zusätzlicher T7-RNA Polymerase bei niedriger Temperatur auf die CFPS-Reaktion. (1) Einfluss von Glycerol auf eine 30 µl CFPS-Reaktion. (blau) Reaktion mit zugegebenem Glycerol (50 %). (rot) CFPS-Reaktion ohne Zusätze. (2) Vergleich der Standard-CAT Synthese (pK7-CAT, 37° C) mit der 5'UTR CspA CAT-Synthese bei verschiedenen Reaktionstemperaturen mit und ohne Ausgleich der T7-RNA Polymerase Aktivität. Jede CFPS-Reaktion wurde 4 h unter Verwendung des S30 CFPS Kits durchgeführt. Bei jeder Temperatur (20° C, 25° C, 30° C) wurden drei Reaktionen, eine ohne Zusätze (blau), eine mit einer angepassten Konzentration der T7-RNA Pol. (rot) und eine mit dem gleichen Volumen des Lagerungspuffers statt der zusätzlichen T7-RNA Pol. (grün) ausgeführt. Die Aktivität der T7-RNA Pol. wurde mit 50 U bei 30° C, 150 U bei 25° C und 400 U bei 20° C angepasst. (lila) Standard CAT-Reaktion bei 37° C ohne Zusätze zum Vergleich. (3) 16 % SDS-Gel nach Coomassie Färbung. Aufgetragen sind 1 µl der Reaktionslösung nach einer Expressionsdauer von 4 h. Auftragung: Pageruler™, Nullkontrolle, CAT 37° C ohne Zusätze, csCAT-Reaktion bei 25° C mit T7-RNA Pol. Aktivitätsausgleich. Deutlich zu erkennen ist die Steigerung der Expressionsrate um ca. 30 %. (Rotes Quadrat) zeigt das CAT-Protein (25,6 kDa).

5.3 Die CFPS-Reaktion und der pH-Wert

In Abschnitt 5.2 wurde erwähnt, dass der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf die CFPS-Syntheseleistung hat. Hierbei gilt, dass nur ein stabiler pH-Wert hohe Ausbeuten des zu exprimierenden Proteins garantiert. Der optimale pH-Wert zur Proteinsynthese im zellfreien S30 *E. coli*-System (Abschn. 3.4.3) liegt bei pH 6,8 (Jewett und Swartz, 2004). In dem verwendeten System kommt ein HEPES-KOH Puffer mit einem pKa von 7,5 zum Einsatz. Dies ermöglicht einen Einsatzbereich von pH 6,8 bis pH 8,2. Laut Calhoun und Swartz (2005) kommt es in den ersten paar Minuten einer CFPS-Reaktion zu einem leichten,

signifikanten pH-Anstieg (ca. 0,2-0,3 pH-Einheiten) in dem hier verwendeten Puffer/Energie-System (Abschnitt 3.4.3, Zusammensetzung CFPS-System). Dieser Anstieg geht nach ca. 5 bis 15 min (je nach Puffersystem) in eine stationäre pH-Phase über. Entfernt sich der pH-Wert zu weit von dem CFPS-Reaktionsoptimum, kommt es zu einem Einbruch der Syntheseleistung (Calhoun und Schwartz, 2005). Unter Verwendung der NMR-Spektroskopie wurde der pH-Verlauf einer CFPS-Reaktion bei zwei unterschiedlichen Temperaturen 4° C (277 K) und 37° C (310 K) verfolgt. Ziel war es Rückschlüsse zu gewinnen, wie sich der pH-Wert in einer CFPS-Reaktion über einen definierten Zeitrahmen verhält.

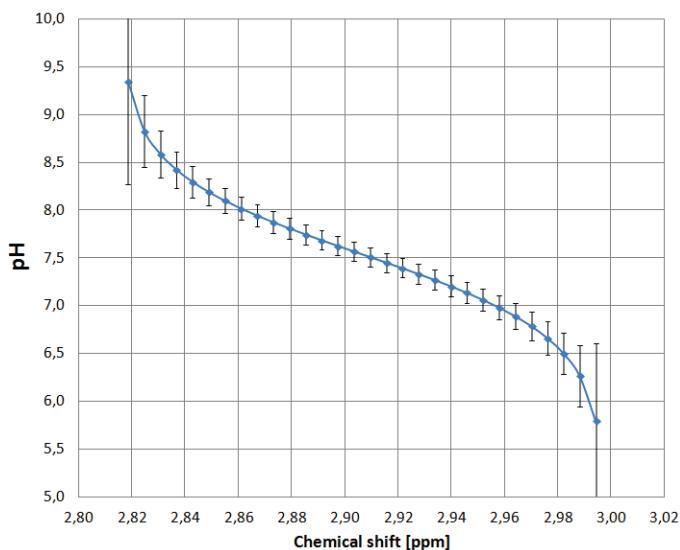


Abb. 5.7: HEPES-KOH NMR pH-Reihe. Darstellung einer HEPES NMR pH-Reihe aufgenommen an einem 600 MHz Spektrometer bei 310K. HEPES-KOH pKa 7,54; Delta A: 2,81. Delta HA: 2,99 (pH-Reihe, durchgeführt von Sander und Eberhardt).

Gemessen wurde je ein 500 µl Batch-CFPS Ansatz (Abschn. 3.4.3) bei unterschiedlich langen Reaktionszeiten an einem 600 MHz NMR-Spektrometer (Bruker, noesygppr1d Pulsprogramm). Zur pH-Bestimmung wurde die chemische Verschiebung des HEPES-KOH Puffers (Abb. 5.7: HEPES-KOH pKa 7,54; Delta A 2,81; Delta HA 2,99) in der CFPS-Reaktion über einen definierten Zeitraum verfolgt (Abb. 5.8). Die CFPS-Reaktion bei 310 K wurde über einen Zeitraum von 130 min verfolgt und alle 2 min und 40 sec ein 1D-NMR Spektrum aufgenommen. Die CFPS-Reaktion bei 277 K lief bei tiefer Temperatur 660 min über Nacht. Hierbei wurde alle 21 min und 30 sec ein 1D-NMR Spektrum aufgezeichnet. Die CFPS-Reaktion bei 310 K wies nach der spektroskopischen Untersuchung eine Konzentration von 126 [µg/ml/h] CAT und die Reaktion bei 277 K eine Konzentration von 23 [µg/ml/h] CAT auf (Abschn. 3.4.5). Die niedrige Proteinausbeute bei 277 K war zu erwarten, da bei so niedrigen Temperaturen normalerweise keine Proteinexpression stattfindet. Abbildung 5.8 zeigt das Ergebnis dieses Experimentes.

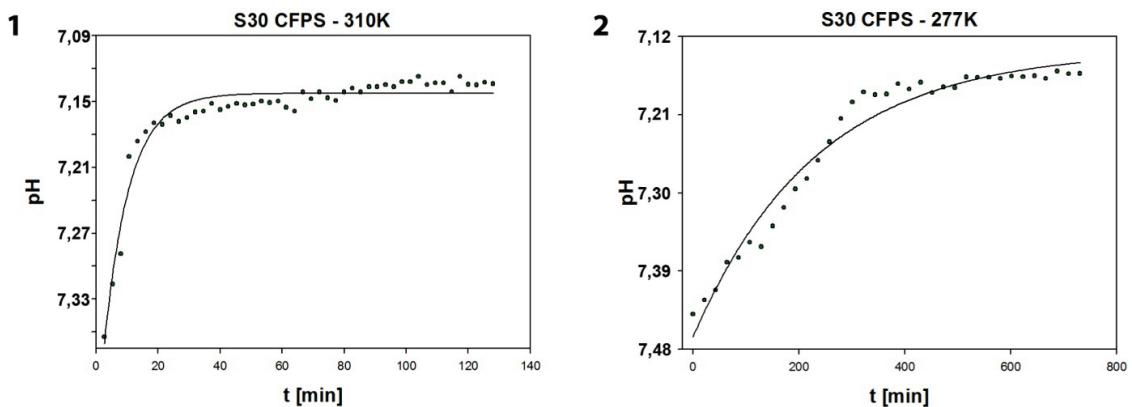


Abb. 5.8: pH-Änderungen einer CFPS-Reaktion über einen definierten Zeitrahmen bei 277 K und 310 K. Aufgetragen ist je der pH-Wert von HEPES-KOH gegen die Reaktionszeit [min] der CFPS-Reaktion. (1) CFPS-Reaktionsverlauf bei 310 K (37° C). Über einen Zeitraum von 130 min wurde alle 2 min 40 s ein 1D-NMR Spektrum aufgenommen (noesygppr1d). Eine pH-Änderung von 0,23 findet in den ersten 20 min der Reaktion statt. Hierbei ändert sich der pH von 7,36 auf 7,13. Das CFPS-Extrakt wies eine Aktivität von 126 [μ g/ml/h] auf. (2) CFPS-Reaktionsverlauf bei 277 K (4° C). Über einen Zeitraum von 660 min wurde alle 21 min 30 s ein 1D-NMR Spektrum aufgenommen. (noesygppr1d). Die pH-Änderung findet über einen Zeitraum von über 300 min statt. Er änderte sich von pH 7,46 auf pH 7,15 um einen pH-Wert von 0,31. Das CFPS-Lysat wies eine geringe Aktivität von 23 [μ g/ml/h] auf.

Abbildung 5.8 verdeutlicht, dass sich beide Reaktionen innerhalb des HEPES-KOH Pufferbereichs befinden. Es wurden zwei unterschiedliche CFPS-Reaktionsansätze verwendet. Präparationsbedingt wurden unterschiedliche pH-Ausgangswerte detektiert (Abb. 5.8). Die CFPS-Reaktion bei 310 K veränderte den pH von 7,36 auf pH 7,13 um 0,23 pH-Einheiten. Die CFPS-Reaktion bei 277 K wurde von pH 7,46 auf pH 7,15 um 0,31 pH-Einheiten verschoben. Bild 1 in Abb. 5.8 verdeutlicht die Ergebnisse von Calhoun und Schwartz (2005). In den ersten 20 min kommt es zu einer pH-Verschiebung um ca. 0,2-0,3 pH-Einheiten. Anschließend bleibt der pH-Wert stabil. Es konnte beobachtet werden, dass die pH-Anpassung auf ein stabiles pH-Plateau bei niedrigerer Reaktionstemperatur deutlich länger dauert.

5.4 Die CFPS-Reaktion unter Einfluss von hydrostatischem Druck

Im folgenden wurde der Effekt des hydrostatischen Druckes auf die Proteinsynthesefähigkeit eines *E. coli* S30 CFPS-Systems untersucht. Die Proteinsynthese an sich ist bekannt dafür, eines der druckempfindlichsten Systeme in der Zelle zu sein (Landau, 1967). Im Jahre 1997 wurde ein Peptidsynthese-Experiment von Lu und Ruan mit isolierten Ribosomen aus Rattenlebern durchgeführt. Dort konnte gezeigt werden, dass Ribosomen in einem zellfreien System mit steigendem Druck deutlich an Aktivität verlieren. Ab einem

Druck von 90 MPa konnte keine Syntheseaktivität mehr festgestellt werden. Dieser Effekt war jedoch bis zu einem gewissen hydrostatischen Druck reversibel. Laut Schwarz und Landau (1972) kommt es bei der zellfreien Synthese ab einem Druck von 20 MPa zu ersten deutlich Inhibitionssanzeichen und ab ca. 68 MPa zum kompletten Verlust der Systemaktivität durch Dissoziation der Ribosomen (Gross et al., 1993). Weitere Studien zeigten zudem, dass der Druck in der Lage ist, biologische Prozesse zu optimieren, wie z.B. die Entwicklung und Fruchtbarkeit bei Froscheiern oder das Entstehen des Lebens in der Tiefsee (Jannasch und Taylor, 1984). Im folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss der hydrostatische Druck auf ein bakterielles *E. coli* S30 CFPS-System besitzt. Zudem wurde untersucht, ob das *E. coli* S30 CFPS-Extrakt (Abschn. 3.4.2) nach einer Druckinaktivierung wieder in den Zustand der Proteinsynthese überging.

5.4.1 Drucksystem und Reaktionsbedingungen

Zentrales Element des Drucksystems war ein massiver hohler Metallzylinder, welcher nach einer Seite hin offen und dort mit einem Deckel verschraubar war. Der Schraubverschluss war mit einem Ventil versehen, welches über ein Leitungssystem mit einer Spindelpresse verbunden war. Durch diese Spindelpresse konnte der Druck unter Verwendung des Druckfluides Wasser aufgebaut werden. Der Versuchsaufbau war bis zu einen hydrostatischen Druck von 200 MPa einsetzbar. Die CFPS-Reaktion wurde in einem 100 µl Cup (STRIP Tubes 0,1 ml (VE1000) für Rotor-Gene; LTF) in dem Metallzylinder durchgeführt. Das Reaktionsgefäß zeichnete sich dadurch aus, dass der Klappverschluss fest und der sonstige Bereich für eine Druckübertrag (Volumenreduzierung) auf die CFPS-Reaktion weich und flexibel war. Der Verschluss wurde zusätzlich mit Parafilm mehrmals vorsichtig umwickelt, um ein Eindringen des Druckfluides in das Reaktions-Cup zu verhindern. Das Reaktionsgefäß wurde mittels unterschiedlicher pH-Lösungen auf seine Undurchlässigkeit bei unterschiedlichen Drücken und Druckzeiten hin überprüft (pH-Papier) und als stabil befunden. Die CFPS-Reaktionsproben wurden stets zügig bei 4° C präpariert. Verfahrenstechnisch wurden 100 µl eines S30 CFPS-Batch Ansatzes (Abschn. 3.4.3) in ein Reaktionsgefäß eingefüllt und mit Parafilm umwickelt. Der Metallbehälter, derweil lagernd auf 4° C wurde anschließend mit dem Gefäß bestückt, mit eiskaltem Wasser befüllt und mit dem Drucksystem verbunden. Anschließend wurde der Druckbehälter in ein vorgewärmtes 37° C warmes Wasserbad überführt und der Druck angelegt. Bei den hier verwendeten 100 µl Batch-CFPS Ansatz wurden kleinere Syntheseleistungen als bei den Standardreaktionen

erreicht. Dies lag einerseits an der Größe des Batch-Ansatzes, dem Reaktionscup und an der nicht geschüttelten Probe (500 rpm, Abschn. 3.4.3). Alle CFPS-Reaktionen wurden 40 min bei 37° C durchgeführt, 10 min auf 4° C inhibiert und anschließend auf ihre CAT-Aktivität (Abschn. 3.4.5) hin getestet.

5.4.2 Auswirkung von Druck auf die CFPS-Reaktion

Drei unterschiedliche Versuche wurden durchgeführt. Erstens wurde die CFPS-Reaktion im Gesamtansatz auf ihre Druckempfindlichkeit über einen bestimmten Druckbereich zwischen 0 MPa und 100 MPa hin untersucht. Zweitens wurde die CFPS-Reaktion einen bestimmten Zeitrahmen unter Druck gesetzt und somit inhibiert. Nach einer definierten Zeitspanne wurde der Druck abgelegt und die Reaktion auf ihre noch vorhandene Aktivität hin untersucht. Und drittens wurde nur das *E. coli* S30-Zellextrakt (Abschn. 3.4.2) isoliert vom restlichen CFPS-Reaktionsansatz dem hydrostatischen Druck ausgesetzt, somit inhibiert und auf seine Wiederherstellungsfähigkeit hin untersucht.

Im ersten Versuch wurde die komplette CFPS-Reaktion bei unterschiedlichen Drücken von 0 MPa bis 100 MPa durchgeführt. Hierbei wurde zusätzlich zu dem Druck-CFPS-Normalansatz wurde eine 0-Probe durchgeführt, mit der die jeweilige CFPS-Reaktion verglichen wurde. Somit sollte schon bei der Versuchsvorbereitung entstandenes, synthetisiertes Protein an Bedeutung verlieren. Die Reaktion fand bei 37 ° C 40 min lang statt. Abbildung 5.9 zeigt das Ergebnis dieser Versuchsreihe. Hierbei konnte beobachtet werden, dass bei steigendem Druck die Syntheseleistung kontinuierlich abfiel. Von 15 MPa auf 20 MPa konnte ein Syntheseeinbruch von 75 % auf 48 % detektiert werden. Bei 40 MPa wurden nur noch 22 % des Ausgangswertes einer CFPS-Reaktion erreicht. Ab einem hydrostatischen Druck von 60 MPa kam die CFPS-Reaktion fast komplett zum Erliegen.

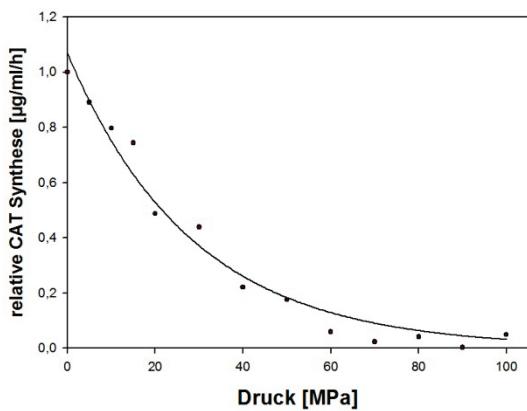


Abb. 5.9: Dargestellt wird der Effekt von hydrostatischem Druck auf die CFPS-Aktivität. Aufgetragen ist die relative CAT-Synthese [$\mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$] gegen den hydrostatischen Druck [MPa]. Die CFPS-Reaktionen wurden 40 min bei 37°C in einem beheizten Wasserbad bei unterschiedlichen Druckspitzen durchgeführt. Hierbei kommt es zu einem kontinuierlichen CFPS-Aktivitätsabfall bei steigendem hydrostatischem Druck. Ab einem Druck von 60 MPa kommt es zum Stillstand der CFPS-Reaktion.

Beim zweiten Versuch wurde die Wiederherstellungsfähigkeit des CFPS-Systems nach einem definierten Druck über eine gewisse Zeitspanne hin untersucht. Hierbei wurden zwei Druckbereiche aus Abb. 5.9 ausgewählt: 20 MPa (50 %ige CFPS-Aktivität) und 60 MPa (keine CFPS-Reaktion). Zusätzlich wurde eine CFPS-Reaktion ohne jegliche Einwirkung von Druck zum direkten Vergleich hinzugenommen. Die Versuchsansätze wurden wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben zusammengebaut und der Druck je bei 20 MPa und 60 MPa zehn Minuten bei 37°C an das CFPS-Reaktionsgefäß angelegt. Anschließend wurde der Druck gelöst und die Reaktion einmal 10 min (Ansatz bei 20 min), und einmal 20 min (Ansatz bei 30 min) bei 37°C fortgesetzt. Für jede Zeit (10 min, 20 min, 30 min) und für jede Druckreaktion (20 MPa, 60 MPa) wurde stets ein eigener CFPS-Reaktionsansatz verwendet. Das Ergebnis der Versuchsreihe wird in Abbildung 5.10 dargestellt. Jeder Messpunkt basiert auf jeweils einer CFPS-Reaktion.

Hierbei zeigte sich, dass beide CFPS-Reaktionen im Anschluss der Druckeinwirkung ihre Proteinsynthese fortsetzen konnten. Die CFPS-Reaktion bei 20 MPa konnte sich etwas schneller regenerieren, als die bei 60 MPa. Auffällig war, dass alle drei CFPS-Reaktionen in dem Zeitfenster von 10 bis 30 min, eine ähnliche Aktivität aufzeigten. Die CFPS-Reaktion ohne Druckeinfluss (0,1 MPa) erzielte in dieser Zeit 35 % ihrer CAT-Gesamtausbeute (Abb. 5.10). Die beiden anderen Reaktionen erzielten in diesem Zeitbereich im Verhältnis zu der Reaktion ohne Druck 27 % (20 MPa) und 21 % (60 MPa) CAT-Ausbeute (Abb. 5.10).

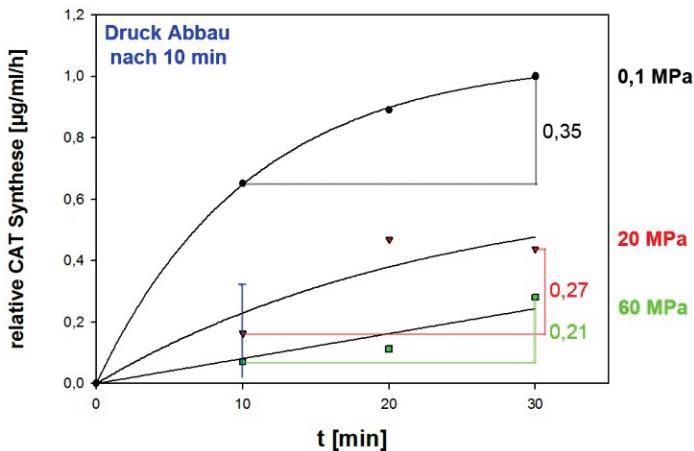


Abb. 5.10: Wiederherstellung des CFPS-Reaktion nach einem Druckabbau. Aufgetragen ist die relative CAT-Synthese [$\mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$] gegen die Reaktionszeit [min]. Dargestellt ist eine CFPS-Reaktion ohne jeglichen Druckeinfluss (0,1 MPa), eine CFPS-Reaktion bei 20 MPa und eine bei 60 MPa. Alle drei CFPS-Reaktionen starten bei 0 [min] und bei 37° C (Versuchsaufbau, Abschn. 5.4.1). Die CFPS-Reaktionen bei 20 MPa und 60 MPa wurden je 10 min einem hydrostatischen Druck von 20 bzw. 60 MPa ausgesetzt. Anschließend wurde der Druck gelöst und die CFPS-Reaktion weiter durchgeführt. Für jeden Messpunkt wurde nur ein Messwert mit je einem einzelnen CFPS-Ansatz aufgezeichnet. Beide CFPS-Reaktionen, welche 10 min unter Druck gesetzt worden sind, regenerieren sich wieder und synthetisieren CAT-Protein. Hierbei regeneriert sich die CFPS-Probe bei 20 MPa schneller, als die bei 60 MPa. Alle drei CFPS-Ansätze erreichen in der Zeit von 10 min bis 30 min eine ähnliche Gesamtausbeute an synthetisiertem Protein. Die CFPS-Reaktion ohne Druckeinfluss (0,1 MPa) erzielte in dieser Zeit 35 % ihrer CAT-Gesamtausbeute. Die beiden druckrelevanten Reaktionen erzielten in diesem Zeitfenster im Verhältnis zu der Reaktion ohne Druck 27 % (20 MPa) und 21 % (60 MPa) CAT-Ausbeute. Dies entspricht bei der Reaktion von 20 MPa ca. 77 % und bei der Reaktion von 60 MPa ca. 60 % der Aktivität des CFPS-Systems zu dem Normalansatz (0,1 MPa) in dem Zeitfenster von 10 min bis 30 min.

Der letzte Versuch sollte Aufschluss darüber geben, ob translationsrelevante Ribosomen, welche den größten und wichtigsten Bestandteil des *E. coli* S30-Zelllysates ausmachen ihre Aktivität nach einer Druckaktivierung wiedererlangen könnten. Hierbei wurden die *E. coli* S30-Lysate modifiziert nach Lu und Ruan (1997) behandelt. Mehrere S30-Zelllysat Proben wurden isoliert von restlichen CFPS-Reaktionskomponenten (Abschn. 3.4.2) je 30 min bei 0° C und bei unterschiedlichen Drücken von 20 MPa bis 200 MPa inkubiert. Anschließend wurde das S30-Extrakt über Nacht bei -20° C gelagert und vor Reaktionsbeginn 30 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die CFPS-Reaktion bei 37° C nach dem Batch-Standardprotokoll durchgeführt (Abschn. 3.4.3). Jede Druckreaktion wurde nur einmal durchgeführt. Das Ergebnis wird in Abb. 5.11 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die durch den hydrostatischen Druck beeinflussten S30-Extrakte alle in ihrer Aktivität in der CFPS-Reaktion einbüßten. Je höher der Druck, desto schlechter war die Aktivität des S30-Lysates. Bei einem Druck von 80 MPa konnten rund 60 % des zu produzierenden CAT-Testproteins wieder hergestellt werden. Ab 100 MPa war es nur noch möglich ca. 20 % des

Testproteins zu produzieren. Ab 150 MPa war kein Testprotein mehr detektierbar. Hierbei kam es zu einer irreversiblen Schädigung der Lysat-Komponenten durch hydrostatischen Druck.

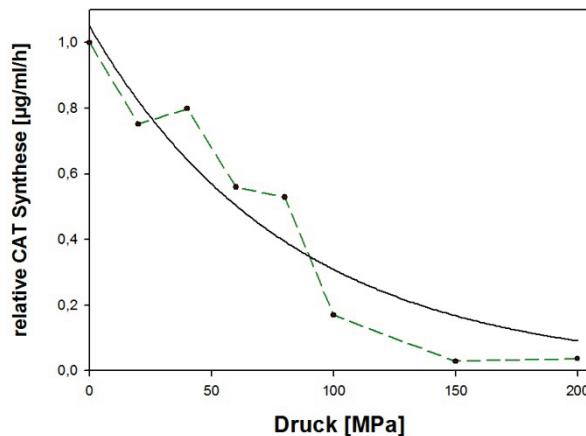


Abb. 5.11: Dargestellt wird der Effekt von hydrostatischem Druck auf isolierte S30-Zelllysate. Aufgetragen ist die relative CAT-Synthese [$\mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$] gegen den hydrostatischen Druck [MPa]. Das S30-Zelllysat wurde isoliert vom Rest des Reaktionsansatzes dem hydrostatischen Druck ausgesetzt und nach einer längeren Ruhepause (siehe Text) seine noch erhaltene Aktivität in einer CFPS-Reaktion bestimmt. Die CFPS-Reaktionen wurden nach der Batch-Standardmethode durchgeführt (Abschn. 3.4.3). Hierbei kommt es zu dem Effekt, dass je höher der angelegte Druck an dem S30-Lysat, desto inaktiver das S30-Lysat und somit die CFPS-Reaktion. Ab einem Druck von 100 MPa ist das S30-Lysat mit dem Hauptbestandteil der Ribosomen kaum mehr regenerierbar.

6. Diskussion der Ergebnisse um den Kv1.4 Kanal

Im Mittelpunkt der NMR-spektroskopischen Untersuchung standen die cytosolischen Domänen des spannungsabhängigen Kv1.4 Kaliumkanals (Abschn. 1.3.4). Zentrales Protein stellte die T1-Tetramerisierungsdomäne dar. Ziel war es die Protein-Protein Wechselwirkungen der strukturell nahe liegenden N- und C-terminalen Kv1.4 Kanalenden zu dem T1-Tetramer näher zu charakterisieren. Abbildung 6.1 zeigt den physiologischen Kv1.4 Kanalaufbau und die Lage der cytosolischen Domänen zur zentralen, membranständigen Kanalpore. Zusätzlich wurden bekannte Abstände und Größen in dem Kv1.4 Kanal nach Fan et al. (2012) eingezeichnet. Die Interaktion verschiedener Kv1.4 Domänen ist von entscheidender Bedeutung für eine reibungslose Kanalinaktivierung. Diese Inaktivierung wurde mittels elektrophysiologischer Versuche bereits mehrfach detektiert und beschrieben (Abschn. 1.3.5; Bett et al., 2010). Themenschwerpunkt der Diskussion ist die Wechselwirkung cytosolischer Kv1.4 Domänen auf struktureller und molekularer Ebene. Darüber hinaus wird die Wechselwirkung der PDZ2-Domäne des Gerüstproteins PSD-95 mit der Kv1.4 T1-Domäne und dem Kv1.4 C-Terminus näher charakterisiert.

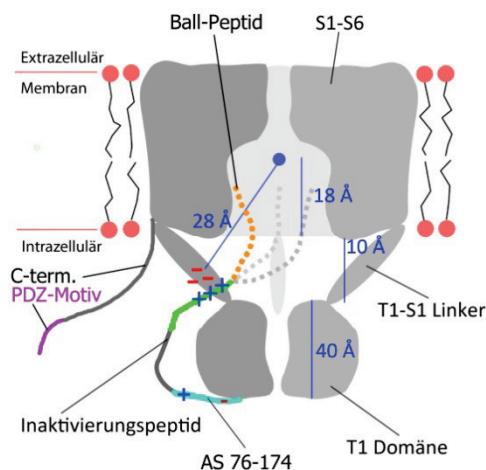


Abb. 6.1: Schematischer Aufbau eines spannungsabhängigen Kv1.4 Kaliumkanals. Eingezeichnet sind die für die Arbeit relevanten, cytosolischen Kv1.4 Domänen und die ungefähren Abstände mancher Kanalbereiche untereinander nach Fan et al. (2012). (Bild modifiziert nach Venkataraman et al., 2014)

6.1 Vergleich der Kv1.4 T1-Konstrukte

Zwei unterschiedliche Kv1.4 T1-Konstrukte wurden verwendet (Abschn. 4.1). Beide unterschieden sich lediglich durch die Anwesenheit oder das Fehlen eines C-terminal

anliegenden His₆-tags. Das Kv1.4 T1 (T1Ktag) Konstrukt wurde von Schreier (2006) übernommen und lag zu 95% sequenziell zugeordnet vor. In 150 mM Kaliumphosphatpuffer (KP_i); pH 6,5 lag es in seiner löslichen, homotetrameren Struktur vor. Jedes T1Ktag-Monomer besaß in der tetrameren Anordnung einen nicht abspaltbaren His₆-tag, welcher auf der der Zellmembran zugewandten Seite lokalisiert wäre (vgl. Abb. 6.1, Kv1.4 T1-Struktur: Abb. 4.4). Durch wissenschaftliche Arbeiten der letzten Jahre stellte sich dieser Bereich als bindungsrelevanter Bereich für das N-terminal gelegene Inaktivierungspeptid heraus (Abb. 6.1; Venkataraman et al., 2014; Baker et al., 2006; Barros et al., 2012; Gulbis et al., 2000). Mit dieser Kenntnis wurde ein neues Kv1.4 T1 (T1K) Konstrukt ohne His₆-tag in diesem Bereich erstellt. Die Expression und Aufreinigung entsprach exakt dem des T1Ktag Konstruktes (Abschn. 4.1.1). Unter Verwendung einer analytischen Gelfiltration konnte der homotetramere Zustand beider T1-Domänen erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 4.3). Beide Kv1.4 T1-Konstrukte zeigten in der Gelfiltration keine zusätzlichen, parallel existierenden Gleichgewichtszustände. Basierend auf der sequenziellen Zuordnung des T1Ktag-Konstruktes durch Schreier (2006) konnte die Zuordnung auf das Kv1.4 T1-Konstrukt ohne His₆-tag übertragen werden (Abschn. 4.1.2). Aufgrund der Größe der tetrameren Struktur (Abb. 4.3, ca. 38 kDa (T1K), ca. 44 kDa (T1Ktag)), wurde NMR-spektroskopisch mit 2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC Spektren gearbeitet und die Kv1.4 T1-Proteine zusätzlich perdeuteriert. Somit konnte die Linienbreite bei den NMR-Experimenten reduziert werden. Die beiden Kv1.4 T1-Konstrukte wurden NMR-spektroskopisch auf ihre Struktur hin charakterisiert und verglichen (Abb. 4.6). Die NMR-Messproben beider Konstrukte unterschieden sich leicht durch die Salzkonzentration und den pH-Wert des Puffers (vgl. Abb. 4.5). Das T1Ktag-Konstrukt wurde in 300 mM KP_i-Puffer; pH 6,8 und das T1K-Konstrukt in 150 mM KP_i-Puffer; pH 6,5 aufgenommen. Die unterschiedliche Salzkonzentration führte laut Schreier (2006) zu keiner Strukturänderungen des T1Ktag-Tetramers und ist somit vernachlässigbar, sodass nur der leicht voneinander abweichende pH-Wert einen zusätzlichen Effekt auf die tetrameren Proteinstrukturen besitzen könnte (Abb. 4.6). Das T1K-Konstrukt unterschied sich von dem T1Ktag-Konstrukt durch strukturelle Änderungen, insbesondere auf der der Membran zugewandten Seite, wo auch der His₆-tag lokalisiert war. Somit konnte der Einfluss des His₆-tags auf die Gesamtstruktur des Kv1.4 T1-Tetramers beschrieben werden (Abb. 4.7). Die vier Kv1.4 T1-Monomere werden weitgehend über hydrophile Wechselwirkungen in tetramerer Form zusammen gehalten (Minor et al., 2000). Diese Interaktionsbereiche schienen bei beiden Kv1.4 T1-Tetrameren stabil zu sein, da die Bestimmung der T1K-Struktur mittels Gelfiltration einen tetrameren Zustand beschrieb (Abb. 4.3) und in dem Innenbereich der Kv1.4 T1-Konstrukte keine signifikanten

Änderungen detektiert werden konnten. Über den Einfluss des His₆-tags bei biologischen Experimenten gibt es mehrere Studien. Eine Studie von Majrek et al. (2014) beschreibt z.B., wie der His-tag strukturelle Änderungen an Proteinen induzieren und somit molekularbiologische Experimente verfälschen kann. Eine andere Studie von Freischmidt (2011) zeigte jedoch, dass jedes von zehn aufgereinigten His₆-markierten Proteinen aktiv in seiner physiologischen Funktion war. Der Einfluss des His₆-tags müsste also in jedem Fall überprüft werden.

6.2 Der N- und C-Terminus des Kv1.4 Kanals

Die sequenzielle Zuordnung des Kv1.4 Inaktivierungspeptides (IP75-Konstrukt, Abb. 4.11) und des Kv1.4 C-Terminus (C84-Konstrukt, Abb. 4.14) waren bekannt. Das C84-Konstrukt wurde nach den Vorgaben von Schreier (2006) exprimiert und aufgereinigt. Für das IP75-Peptid wurde ein neues Protein-Aufreinigungsprotokoll entwickelt, welches in Abschnitt 4.2 beschrieben ist. Bei beiden Peptiden musste die sequenzielle Zuordnung auf die NMR-Messbedingungen in 150 mM KPi-Puffer; pH 6,5 bei 293 K übertragen werden. Dies war ohne weitere Probleme für beide Peptide möglich. Über die Struktur und Faltung des Kv1.4 C-Terminus ist wenig bekannt (Meyer, 2005). Es wird davon ausgegangen, dass er als relativ unstrukturiertes und ungefaltetes Peptid vorliegt. Es besitzt regulatorische Funktionen bei Kv-Kanälen (Abschn. 1.3.4.3; Abschn. 1.3.6; Magidovich et al., 2007; Meyer, 2005). Um mehr über seine strukturelle Integrität zu erfahren, wurde eine Temperaturreihe von 278 K bis 293 K durchgeführt. Hierbei konnten temperaturabhängige strukturelle Eigenschaften des C84-Peptides identifiziert werden. Von jedem Signal einer Aminosäure wurden die kombinierten chemischen Verschiebungen und die Änderungen der Volumen detektiert (Abb. 4.16). Hierbei konnte ein Aminosäurebereich von Y43 bis S59 als besonders signifikant für diese Änderungen identifiziert werden. Dieser Bereich wurde als Ort definiert, der wahrscheinlich mehr als eine lokale Konformation besitzt. In den späteren Kapiteln um den Kv1.4 C-Terminus wird erneut auf diesen Bereich eingegangen (Abschn. 6.14, Abschn. 6.15). Sokolova et al. (2001, 2003) ist es gelungen elektronenmikroskopische Bilder eines spannungsabhängigen Kv-Kanals aufzunehmen und die mögliche Lage des C-Terminus auf der Kanalstruktur zu bestimmen (Abb. 1.11). Hierbei wurde eine mögliche, strukturelle konformationelle Umorientierung des Kv C-Terminus im mittleren Peptidbereich in Wechselwirkung mit der Kv T1-Domäne mikroskopisch beschrieben (Abb. 1.12). Dieser Peptidbereich könnte dem Bereich aus der C84-Temperaturreihe (AS Y43 bis

S59) entsprechen, da beide Areale mittig in der Peptidstruktur lokalisiert sind. Um NMR-spektroskopische Daten des C84-Peptides besser darstellen zu können, wurde in dieser Arbeit eine MD-Simulation durchgeführt (Abschn. 4.3.1). Die Simulationsbedingungen waren einfach strukturiert und konnten deshalb keinen Aufschluss über die wirkliche Struktur des C84-Peptides in Lösung geben. Hierzu müssten komplexere Modelle mit mehr Informationen (z.B. H-Brücken) konzipiert werden.

6.3 Interaktion zwischen dem Kv1.4 N- und Kv1.4 C-Terminus

Es konnte gezeigt werden, dass die isolierten N- und C-Termini (IP75-Peptid, C84-Peptid) des Kv1.4 Ionenkanals bei den gewählten Versuchsbedingungen nicht miteinander interagierten (Abschn. 4.3.3). Dies hat vor allem die Auswertung der Protein-Protein Titrationsexperimente mit drei Proteinen erleichtert. Zu betonen ist, dass die Kv-Familienmitglieder (Abb. 1.1) variierende cytosolische Domänen besitzen, deren Aufgaben zusätzlich noch variieren (Abschn. 1.3.4). So wird z.B. die Inaktivierung des Kv4 spannungsabhängigen Kanals über die Wechselwirkung eines amphiphatischen Bereiches auf dem N-Terminus und einer positiven Ladung auf dem C-terminus bestimmt (Jerng und Covarrubias, 1997).

6.4 Protein-Protein Titrationsexperimente

Die Protein-Protein Titrations- und Interaktionsexperimente wurden unter Verwendung der 2D-NMR-Spektroskopie (2D-[¹⁵N,¹H]-TROSY-HSQC) durchgeführt. Von den Signalen der jeweiligen Aminosäuren (AS) wurden die kombinierten gewichteten Änderungen der chemischen Verschiebungen und die Änderungen der Volumen detektiert und ausgewertet (Abschn. 3.5.3). Betrachtet wurde bei dieser Methode das H^N Proton auf der Hauptkette des Proteins oder Peptides. Alle Titrationen wurden mit der T1K-Domäne ohne His₆-tag durchgeführt (Abschn. 4.1). Die Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen erwiesen sich als nicht sehr groß. Dies wird damit erklärt, dass vor allem die Interaktionsbereiche zwischen den einzelnen cytosolischen Kv1.4 Domänen im schnellen Austausch liegen, um einen physiologisch schnellen Kanal(in)aktivierungsmechanismus zu gewährleisten. Zum Erhalt guter NMR-Datensätze wurde hier mit hoher Auflösung gemessen (8096 Datenpunkte in der direkten und 1024 Datenpunkte in der indirekten

Ebene). Die Auswertung der Volumen erwies sich als äußerst diffizil. Die Volumen wurden unter Zuhilfenahme des automatischen 'peak picking tools' von AuremolTM bestimmt. Problematische Fälle, wie z.B. überlagerte Aminosäuren wurden manuell mittels des Softwarepakets Topspin 3.1 gepickt und ihre Volumen soweit möglich bestimmt.

6.5 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 T1K-Konstrukt und dem Kv1.4 Inaktivierungspeptid

Das Protein-Protein Titrationsexperiment zwischen der T1K-Domäne und dem Inaktivierungspeptid (IP75) lieferte einen fest definierten Interaktionsbereich zwischen den beiden Bindepartnern auf der Oberflächenstruktur des T1K-Tetramers (Abschn. 4.4.1). Die Qualität der NMR-Spektren war durchwegs gut für die Evaluierung geeignet. Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen traten vor allem im oberen Bereich der T1K-Domäne, also an der der Zellmembran zugewandten Seite auf (Abb. 4.20). Abbildung 6.1 verdeutlicht am Kv1.4 Kanalschema, dass diese Oberfläche als Interaktionsbereich in Frage kommt. Zudem wird dieses Strukturareal als bindungsrelevant für diese beiden cytosolischen Domänen in der Literatur beschrieben (Abschn. 1.3.4.2). Das T1K-Tetramer besitzt zwischen zwei T1-Monomeren an der Außenfläche eine zentral durch beide Monomere laufende 'Furche' (Struktur Abb. 4.20). Im oberen Bereich der 'Furche' und an der Oberseite des T1K-Tetramers treten bei der Protein-Protein Titration Aufspaltungen einzelner Resonanzsignale in mehrere unterschiedliche Zustände auf (Abb. 21). Wenn nun davon ausgegangen wird, dass jede Aminosäure in dem tetrameren T1K-Komplex genau 4-mal vorkommt und diese zusammen nur ein Signal in dem 2D-TROSY-HSQC Spektrum ergeben, spricht dies für eine Art Protein-Protein Wechselwirkung. Hierbei entstehen konformationelle, lokal unterschiedliche T1K-Monomere in dem T1K-Tetramer. Zusätzlich zu den Signalaufspaltungen und den Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen wurden die Änderungen der Volumen detektiert (Abb. 4.19). Diese traten auf der gesamten Struktur des T1K-Tetramers auf. Das IP75-Peptid ist so lang, dass es von oben, bis unten umfassend an das T1K-Tetramer binden könnte. Die Auswertung der Volumen zeigt auch, dass es im Innenbereich des T1K-Tetramers zu Änderungen von Signalen kommt (Abb. 4.20, Bild B). Dies kann prinzipiell auf eine Konformationsänderung der T1K-Quartärstruktur, sowie auch auf eine direkte Interaktion zurückzuführen sein. In der 'Furche' zwischen zwei T1K-Monomeren lassen sich neben den Wechselwirkungen im oberen T1-Bereich die meisten Signaländerungen detektieren (Abb. 4.20). Diese lokalen

Strukturänderungen auf dem T1K-Tetramer lassen auf eine direkte Interaktion mit dem IP75-Peptid schließen. Das Inaktivierungspeptid bindet bevorzugt im oberen T1K-Bereich und gleichzeitig zwischen zwei T1K-Monomeren am T1K-Tetramer (Abb. 4.20). Über die Orientierung des T1K-Tetramers zu dem IP75-Peptid ließ sich keine Aussage treffen, da keine Daten über z.B. NOE-Signale existieren.

Im physiologisch vorkommenden Kv-Kanal bindet das Inaktivierungspeptid nur in der Kanalpore, wenn der Kanal im Offen-Zustand vorliegt und verschließt dann die Kaliumionen leitende Kanalpore (Abb. 1.5, Abschn. 1.3.5). Um nur im Offen-Zustand binden zu können, wird davon ausgegangen, dass es verschiedene Kv-Kanalkonformationen gibt (Grizel et al., 2014; Bett et al., 2010). Die T1-Tetramerisierungsdomäne, welche für die tetramere Struktur des Kanals sorgt, ist mit großer Sicherheit auch bei den Konformationsänderungen im Kanal involviert. Hierbei konnte Kremer et al. (2013) zeigen, dass das Kv1.3 T1-Tetramer nicht rechtwinklig starr vorliegt, sondern dynamische Konformationszustände erlaubt (Abschn. 4.1.3). Somit kann das Inaktivierungspeptid nur bei bestimmten T1-Konformationen binden.

Der Bindungsmechanismus und die Affinität zwischen dem T1K-Tetramer und dem IP75-Peptid wurden auf Seiten des T1K-Tetramers bestimmt. Um die Protein-Protein Bindung zu charakterisieren, wurden sechs Aminosäuren mit den größten kombinierten chemischen Verschiebungen ausgewählt und deren Verhalten bei unterschiedlichen IP75-Konzentrationen im Verlauf der Protein-Protein Titration verfolgt (Abb. 4.23). Vier Aminosäuren wurden von der Zellmembran zugewandten T1K-Oberseite und zwei Aminosäuren von seitlicher Lokalisation auf dem T1K-Tetramer untersucht (Abb. 2.23). Alle sechs Aminosäuren zeigten das gleiche Bindungsverhalten. Es konnte festgestellt werden, dass prinzipiell erst einmal ein Inaktivierungspeptid an ein T1K-Homotetramer mit einer mikroskopischen Bindungskonstante von Werten zwischen 8,66 µM und 37,19 µM bindet (N-Typ Inaktivierung, Abschn. 1.3.5). Bei allosterisch regulierten Proteinen existiert der Begriff der Kooperativität. Proteine, zusammengesetzt aus mehreren Untereinheiten, verhalten sich je nach Anzahl ihrer aktiven Bindungspartner unterschiedlich (Monod et al., 1965; Rosnizeck et al., 2014). In diesem Fall war es möglich, eine negative Kooperativität (Abb. 4.23, Hill Koeffizient: $n < 1$) zwischen den Bindungspartnern nachzuweisen. Das T1K-Tetramer besitzt theoretisch vier Bindungsplätze für das Inaktivierungspeptid. Das erste Inaktivierungspeptid bindet mit hoher Affinität an das T1K-Tetramer, wofür auch die Affinitätsraten sprechen und hemmt im Anschluss die Bindung anderer Inaktivierungspeptide an das T1K-Tetramer. Danach geht das System in einen Zustand

niedrigerer Affinität zwischen den Bindepartnern über und ein weiteres Inaktivierungspeptid kann nur schwer binden. Im Großen und Ganzen sollten nun zwei Prozesse ablaufen. Einerseits entstehen lokale Strukturänderungen auf dem T1K-Tetramer, was wiederum quartäre Strukturänderungen verursachen kann und andererseits sollte das Inaktivierungspeptid die anderen Inaktivierungspeptide hindern das T1K-Tetramer zu binden. Diese beiden Prozesse werden in Abbildung 4.22 an zwei Aminosäuren Y59 und K68 beschrieben. Wie oben erwähnt, kommt es bei der Protein-Protein Titration zu Aufspaltungen von Resonanzsignalen (Abb. 4.21). Dieses Aufspaltungsmuster ist bei der Protein-Protein Titration konzentrationsabhängig. Die Aminosäure Y59, welche seitlich an dem T1K-Kanal in der 'Furche' liegt spaltet in maximal vier mögliche Zustände bei der Titration auf. Die Aminosäure K68, welche auf der T1K-Strukturoberseite liegt in maximal zwei (Abb. 4.22). Bei steigender IP75-Konzentration im Verhältnis zum T1K-Tetramer kommt es zu einem Verlust der Signalaufspaltung und es existiert wieder nur ein Signal. Dies bedeutet, dass je höher die IP75-Konzentration in der Titration wird, es desto wahrscheinlicher ist, dass mehrere IP75-Peptide an das T1K-Tetramer binden. Die verschiedenen Übergangszustände bei den Aufspaltungen der jeweiligen Resonanzsignale lassen unterschiedliche Aussagen zu. Bei der Aminosäure K68 auf der T1K-Oberfläche wäre es möglich, dass sich die IP75-Peptide gegenseitig strukturell behindern und deswegen dort nur ein IP75-peptid vorliegt. Dies würde die Aufspaltung in zwei mögliche Zustände erklären, da nur z.B. ein Inaktivierungspeptid dort lokalisiert vorliegen würde. Die seitlich gelegene Aminosäure Y59 kann maximal vier Zustände aufweisen, da möglicherweise an jedes Monomer des T1K-Tetramers ein IP75-Peptid binden und somit mehrere konformationelle Zustände der T1K-Struktur vorliegen können.

6.6 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 IP75-Inaktivierungspeptid und der Kv1.4 T1K-Domäne

Die Protein-Protein Interaktion aus Abschnitt 6.5 wird nun aus Sicht des Inaktivierungspeptides betrachtet. Die NMR-spektroskopische Auswertung war unproblematisch, da es sich um ein kleines, monomeres Peptid handelte. Es besaß eine hohe Signalintensität und eine schmale Linienbreite. Bei der Interaktion zwischen dem IP75-Peptid und der T1K-Domäne konnten Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebung und Änderungen der Volumen über den gesamten Bereich des IP75-Peptides detektiert werden (Abb. 4.25). Es kam zu strukturellen Änderungen an der N-terminal

gelegenen Ball-Domäne, an den beiden starr strukturierten α -Helices und an dem glycinreichen, flexiblen 'random coil' C-terminalen Ende des IP75-Peptides (Struktur: Abb. 4.9, Abschn. 4.4.2). Jede Wechselwirkung trat gruppenweise und nie an einzelnen Aminosäuren auf. Vor allem die Wechselwirkungen des glycinreichen Endes von Aminosäure G56 bis S75 werden in Abschnitt 6.11 näher diskutiert.

6.7 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 T1K-Konstrukt und dem Kv1.4 C84-Peptid

Analog zur T1K-Titration mit dem IP75-Inaktivierungspeptid aus Abschn. 6.5 wurde die Interaktion des T1K-Homotetramers mit dem Kv1.4 C-Terminus (C84-Peptid) NMR-spektroskopisch untersucht. Es wurden die Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebung und die Änderungen der Volumen detektiert (Abb. 4.26). Es konnten eindeutige lokale Strukturänderungen auf dem T1K-Tetramer identifiziert werden. Diese befanden sich auf der T1K-Oberfläche vor allem an der seitlichen und unteren Ebene (Abb. 4.27). Im Unterschied zum Inaktivierungspeptid kommen in der oberen, der Membran zugewandten Seite der T1K-Domäne wenig Strukturänderungen vor. Es kam zu keinen Aufspaltungen der Resonanzsignale einzelner Aminosäuren (Abschn. 6.5). Zusätzlich kam es nur zu lokalen Protein-Protein Wechselwirkungen und zu keinen großflächigen strukturellen Änderungen an der Quartärstruktur von T1K. Dies ist in Abbildung 4.27 Bild C ersichtlich, wo es zu keinen Änderungen innerhalb der tetrameren T1K-Struktur bei der Protein-Protein Titration kommt. Sowohl beim C84-Peptid, sowie auch beim IP75-Peptid kommt es auf der T1K-Struktur zu teils identischen kombinierten chemischen Verschiebungen einzelner Resonanzsignale. Auffällig waren hier vor allem die Aminosäuren N43 und E44, welche auch schon bei Schreier (2006) als bindungsrelevante Aminosäuren für beide Peptide mit dem T1Ktag-Konstrukt definiert wurden. Diese beiden Aminosäuren wurden auf Seiten des T1K-Tetramers auf ihre Affinität zum C84-Peptid hin untersucht (Abb. 4.28). Für die Bestimmung der Bindungskinetik wurden die stärksten Signale von vier Aminosäuren in einer Protein-Protein Titrationsreihe verfolgt (Abb. 4.28). Es konnte festgestellt werden, dass mehr als ein Peptid an ein T1K-Tetramer binden kann. Bei einem Titrationsverhältnis von einem C84-Peptid zu einem T1K-Tetramer konnten bei theoretisch vier möglichen Bindestellen vier Peptide an die T1K-Struktur binden. Es wurden mikroskopische Bindungskonstanten von 0,61 mM bis 0,73 mM errechnet. Im Vergleich zum Inaktivierungspeptid bindet der C-

Terminus die T1K-Domäne deutlich schlechter und weist keinen kooperativen Effekt auf. Der Hill-Koeffizient besaß Werte zwischen 0,91 und 1,20, was im experimentellen Fehler ungefähr 1 bedeutete (Abb. 4.28). Die unterschiedlichen Bindungskonstanten sprechen für unterschiedliche Aufgaben der beiden N- und C-terminalen Kv1.4 Peptide. Der Kv1.4 N-Terminus ist an der N-Typ Kanal-Schnellinaktivierung beteiligt (Abschn. 1.3.5), wohingegen der Kv1.4 C-Terminus eher zelluläre, konformationelle Regulationsmechanismen unterstützt (Abschn. 1.3.4.3, Abschn. 1.3.6).

6.8 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 C84-Peptid und der Kv1.4 T1K-Domäne

Der Kv1.4 C-Terminus (C84-Peptid) beginnt im Kv1.4 Ionenkanal direkt nach der S6 Helix des Kv1.4 Transmembranbereiches (TM) (Abb. 6.1). Es wird davon ausgegangen, dass der C-Terminus relativ unstrukturiert und frei beweglich im Cytosol (Magidovich et al., 2007), oder der T1K-Domäne anliegend (Sokolova et al., 2003) vorkommt. Das äußerste C-terminale Ende des C84-Peptides wird kaum an der Bindung mit T1K beteiligt sein, da sich dort das PDZ-Bindemotiv zur Bindung mit einer PDZ-Domäne von PSD-95 befindet (Moore et al., 2014, Abschn. 1.3.6). Von der Bindung zwischen dem T1K-Tetramer und dem C84-Peptid würde man erwarten, dass der Kontaktbereich im mittleren Abschnitt des Kv1.4 C-Terminus, also nicht an dem PDZ-Bindemotiv oder nahe des S6 TM-Bereiches liegen würde (vgl. Abb. 6.1). Dieses Bindungsexperiment wurde bereits 2006 von Meyer mit dem T1Ktag-Konstrukt durchgeführt (Abschn. 4.1). Damals konnten keine Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen einzelner Signale von C84 bei der T1Ktag-Titration detektiert werden. Jedoch wurde ein Bereich zwischen den Aminosäuren T32 und S55 auf der C84-Peptidstruktur detektiert, dessen Signale signifikant an Intensität bei dem Protein-Protein Interaktionsversuch verloren. Dieser Bereich wurde als Interaktionsbereich zwischen dem C84-Peptid und der T1Ktag-Domäne auf dem C84-Peptid definiert. Durch den Sequenzvergleich verschiedener C-terminaler Reste von spannungsabhängigen Kv-Kanälen konnte Meyer (2006) ein konserviert vorkommendes Sequenzmotiv (LKKFRS) definieren. Diesem Sequenzmotiv sprach er einen bindungsrelevanten Charakter zu der T1Ktag-Domäne zu. Das identische Experiment wurde mit dem T1K-Konstrukt ohne His₆-tag bei zwei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt (Abschn. 4.5.2). Bei einer tiefen Temperatur von 278 K, also mit einem starreren Proteingerüst und bei 293 K, mit einem flexibleren und dynamischeren Proteingebilde. Beide Experimente brachten in etwa das

gleiche Ergebnis. Es zeigten sich Änderungen an lokal begrenzten Strukturbereichen auf der C84-Peptidstruktur, welche in Abbildung 4.30 auf der C84-Struktur dargestellt werden. Es konnten Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebung und Änderungen der Volumen detektiert werden. Durch die Protein-Protein Interaktion bei 278 K konnte ein bindungsrelevanter Bereich von Aminosäure S46 bis D62 auf dem C-Terminus mit dem T1K-Tetramer detektiert werden. Bei 293 K wurde ein bindungsrelevanter Bereich von Aminosäure S46 bis E68 charakterisiert.

Wird dieses Ergebnis mit Abschnitt 6.2 verglichen, fällt auf, dass es sich bei dem C84-Peptid erneut um den Bereich handelt, dem mehrere lokale Konformationen oder transiente Übergangszustände zugesagt werden. Zusätzlich würde dieser Interaktionsbereich zwischen dem T1K und C84-Peptid zu der physiologischen Lage des Kv1.4 C-Terminus in dem Kv1.4 Kanal passen.

6.9 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 T1K-Konstrukt und dem Kv1.4 C-Terminus (Mutation)

Das C-terminale Kv1.4 C84-Konstrukt besitzt drei Cysteine (Abb. 4.12). Es wurde ein neues C-terminales Kv 1.4 Peptid hergestellt, wo zwei Cysteine durch zwei Alanine ausgetauscht wurden (C84M-Peptid, Abb. 4.54). Zwischen diesem C84M-Peptid und dem T1K-Tetramer wurde ein Protein-Protein Interaktionsexperiment auf Seiten von T1K durchgeführt, welches möglicherweise Aufschluss über die Lage und die Bindungscharakteristik der beiden wegmutierten Cysteine liefert. Das C84M-Konstrukt erwies sich als schwer zu exprimieren und problematisch bei der Aufreinigung. Es konnte nur in geringen Mengen bei großem Expressionsansatz rein gewonnen werden. Eine Übertragung der sequenziellen Zuordnung des C84-Peptides auf das C84M-Peptid war nur teilweise möglich (Abb. 4.55). Zusätzlich erschienen in dem 2D-TROSY-HSQC weitere Signale, welche dem C-terminal gelegenem His₆-tag zugeordnet worden sind. Problem beider C-terminaler Kv1.4 Konstrukte (C84, C84M) war jeweils der N- oder C-terminal angehängte His₆₋₁₀-tag (Konstrukte: Abschn. 4.3 und Abschn. 4.10). Durch die C-terminale Lage des His₆-tags wurde das PDZ-Bindemotiv bei dem C84M-Konstrukt inaktiv (Abb. 4.54, Bild A). In Abbildung 4.59 sind die Areale auf der T1K-Struktur herausgearbeitet, welche an der Wechselwirkung mit dem C84-Peptid, aber nicht mit dem C84M-Peptid beteiligt sind. Vor allem im seitlichen Bereich des T1K-Tetramers kommt es hier zu Änderungen der

Bindungscharakteristik. Ob diese Änderungen durch die beiden ausgetauschten Cysteine, oder durch den unterschiedlich angebrachten His-tag ausgelöst werden, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Um diesen Unterschied im Detail zu klären, könnte das C84M-Peptid in einem Spin-Label Experiment untersucht werden.

6.10 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 T1K-Tetramer mit dem Kv1.4 C- und Kv1.4 N-terminalen Peptid

Eine Kanalschnellinaktivierung findet nur statt, wenn der spannungsabhängige Kv1.4 Kanal nach einer vorherigen Konformationsänderung aus dem Geschlossen-Zustand im Offen-Zustand vorliegt (Abb. 1.5; Bett et al., 2012). Die N-Typ Schnellinaktivierung entspräche der Bindung des Inaktivierungspeptides in die Kv-Kanalpore in zusätzlicher Wechselwirkung mit der Kv1.4 T1-Domäne (Abb. 6.1; Venkataraman et al., 2014). Diese N-Typ Inaktivierung wird also durch eine Konformationsänderung des Kv-Gesamtkanals, inklusive seiner T1-Domäne ermöglicht (Bett et al., 2012; Kremer et al., 2013). Bei den unterschiedlich vorkommenden Kv-Konformationszuständen und der räumlich nahen Orientierung der cytosolischen Kv-Domänen scheint es wahrscheinlich, dass der in naher Umgebung orientierte Kv1.4 C-Terminus (Abb. 6.1) an der Regeneration des Kanals in seinen inaktiven Ausgangszustand beteiligt ist. Bei Sankaranarayanan et al. (2005) wurde beschrieben, dass eine schrittweise Deletion des C-Terminus eines Kv-Kanals zu einer Verlangsamung der C-Typ Inaktivierung führt (Abschn. 1.3.4.3). Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss das C84-Peptid auf einen Komplex, bestehend aus T1K und IP75-Peptid hat.

Die kombinierte Titration des T1K-Tetramers mit dem Kv1.4 Inaktivierungspeptid (IP75) und dem Kv1.4 C-Terminus (C84) wurde zweimal durchgeführt. Es wurde der Einfluss beider Peptide auf das T1Ktag-Konstrukt mit His₆-tag und auf das T1K-Konstrukt ohne His₆-tag untersucht (Abschn. 4.1). Versuchstechnisch wurde hierbei dem jeweiligen T1K-Tetramer zuerst das IP75-Peptid und anschließend das C84-Peptid zugegeben (Abschn. 4.8). Somit wurde der Einfluss des Kv1.4 C-Terminus auf den Proteinkomplex untersucht. Das Experiment mit dem T1Ktag-Konstrukt wurde von Schreier (2006) durchgeführt und basiert auf ihren Messdaten (vgl. Anhang Abb. 10.3). Der Datensatz, bestehend aus den relevanten Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen wurde graphisch dargestellt. Bei Zugabe beider Kv1.4 Peptide zu dem T1Ktag-Tetramer konnten bindungsrelevante Signale sowohl dem Kv1.4 C-Terminus als auch dem Kv1.4 Inaktivierungspeptid einzeln

zugeordnet werden. Schreier (2006) konnte zeigen, dass die spezifischen Signale des C84-Peptides auf dem T1Ktag-Tetramer eher zunahmen und spezifische Signale des IP75-Peptides eher abnahmen (Abb. 4.37). Zusätzlich entstanden unabhängige, neue Signale welche für einen gewissen synergetischen Effekt zwischen den beiden Peptiden sprechen (vgl. Anhang Abb. 10.3). Aus ihrer Arbeit konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Veränderungen einen vollkommenen Signalverlust oder nur eine Signalreduzierung darstellten. Dies bedeutet, dass das C84-Peptid das IP75-Peptid tendenziell verdrängt, ohne aussagen zu können, ob dies nun vollständig oder partiell passiert. Sicher ist nur, dass beide Peptide bei unseren Versuchsbedingungen keine Wechselwirkung miteinander eingingen und alle Änderungen auf der T1Ktag-Struktur stattfanden (Abschn. 6.3). Hauptkritikpunkt dieses Experimentes war, dass das IP75-Peptid, wie schon in Abschnitt 6.5 erläutert an der Membran zugewandten Oberseite auf dem Kv1.4 Tetramer bindet. Dort ist bei dem T1Ktag-Konstrukt der His₆-tag lokalisiert. Aus diesem Grund, wurde der gleiche Versuch, jetzt nur mit dem T1K-Konstrukt bei identischen experimentellen Bedingungen wiederholt. Hierbei wurde erneut der Einfluss des C84-Peptides auf den Komplex, bestehend aus T1K-Tetramer und IP75-Peptid untersucht (Abschn. 4.8.2). Es wurden die Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen und die Änderungen der Volumen ausgewertet (Abb. 4.38, Abb. 4.40). Hierbei wurde in Abbildung 4.41 der Einfluss des Kv1.4 C-Terminus auf den T1K/IP75-Komplex und speziell die Änderungen der spezifischen IP75-Signale graphisch dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass das C84-Peptid vor allem im Seitlichen und im unteren Bereich spezifische IP75-Signale verdrängte (Abb. 4.41, Bild 2 und Bild 3). Spezifische Signale des IP75-Peptides im oberen Bereich blieben vorhanden (Abb. 4.41, Bild 2). Bei Betrachtung von Abbildung 4.41 Bild 3 fällt auf, dass es bei der Zugabe des C84-Peptides zu Änderungen der Signale im Innenbereich des T1K-Tetramer kommt. Dies spricht für eine Änderung der Quartärstruktur. Basierend auf Abbildung 4.41 kann von einer partielle Verdrängung von IP75 an dem T1K-Tetramer durch das C84-Peptid ausgegangen werden.

Werden diese Ergebnisse nun auf den physiologischen Mechanismus des Kv1.4 Kanals übertragen, muss beachtet werden, dass sich vor allem im oberen Bereich der Kv1.4 T1-Domäne die Zellmembran und an den Seiten die fest verankerten, flexiblen T1-S1 Linker befinden, welche die Kv1.4 T1-Domäne mit dem Kv1.4 Transmembranbereich verknüpfen (Abb. 6.1). In einem möglichen Modell des Kanal(in)aktivierungsmechanismus auf Basis der Ergebnisse unterliegt der Kanal beim Übergang in den aktiven Zustand einer globalen Konformationsänderung, die auch seine T1-Domäne betrifft (Kanalöffnungsmechanismus

Abschn. 1.3.3, Kremer et al., 2013). Dies ermöglicht jetzt dem Inaktivierungspeptid in die Kanalpore über der T1-Domäne zu binden, da es nur bei einem Offen Zustand binden kann (Abschn. 1.3.5). Diese Protein-Protein Interaktion zwischen den cytosolischen Domänen stellt eine lokale Wechselwirkung zwischen Aminosäuren dar, die erneut in einer globalen Konformationsänderung des Kanals resultiert (Bett et al., 2012; Grizel et al., 2014). Diese globale Kv1.4 T1-Konformationsänderung bereitet unter Umständen die Bindung des C-Terminus vor. Der C-Terminus ist hier möglicherweise an einer Kanalinaktivierung oder Rückführung in seinen inaktiven Ausgangszustand über die Bindung an der T1-Domäne und die Verschiebung von Konformationen beteiligt. Dies könnte die Ablösung des Inaktivierungspeptides verstärken. Gerade der Einfluss des C-Terminus im seitlichen Bereich des T1-Tetramers macht Sinn, da der obere Bereich der kanalzugewandten T1-Domäne wieder frei für den nächsten Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus werden müsste (Abb. 4.39). Das Inaktivierungspeptid muss zur Regeneration des Kanals in seinen inaktiven Ausgangszustand auf jeden Fall aus dem Kanal und von der oberen T1-Oberfläche verdrängt werden. Physiologisch könnte der Einfluss des C-Terminus an der T1-Domäne so wohl zu einer kompletten und nicht nur partiellen Verdrängung des Inaktivierungspeptides wie in Abb. 4.41 führen. Beide Experimente mit und ohne His₆-tag zeigen im Wesentlichen das gleiche Ergebnis. Um eine bessere Aussage über diese Beobachtung treffen zu können, müsste dieser Interaktionsversuch mit angepassten Proteinkonzentrationen in einer Protein-Protein Titrationsreihe durchgeführt werden.

6.11 Protein-Protein Interaktion des Inaktivierungspeptides Kv1.4 IP75 mit der Kv1.4 T1-Domäne und dem Kv1.4 C-Terminus

Die gewonnenen Daten aus der Titration des T1K-Tetramers mit den beiden Peptiden sprachen für eine partielle Verdrängung des Inaktivierungspeptides (IP75) von dem T1K-Tetramer (Abschn. 6.10). Zur genaueren Betrachtung dieser Bindungen wurde nun die Seite des Inaktivierungspeptides näher untersucht (Abschn. 4.6). ¹⁵N markiertes IP75-Peptid wurde mit dem T1K-Tetramer im Verhältnis 1 : 1 (1 IP75 : 1 T1K Tetramer) versetzt und deren Wechselwirkung auf Seiten des IP75-Peptides detektiert. Somit konnte sichergestellt werden, dass das T1K-Tetramer mit nur einem Inaktivierungspeptid besetzt vorlag.

Hierbei kam es wie schon in Abschnitt 6.6 zu Änderungen auf der kompletten Oberfläche des Inaktivierungspeptides. Abbildung 4.32 zeigt wie schon Abb. 4.25, dass Änderungen der

kombinierten chemischen Verschiebungen an dem unstrukturierten, glycinreichen Terminus, an den α -Helices und an der Ball Domäne entstanden (IP75-Struktur: Abb. 4.2). Bei Zugabe vom C84 zu dem Proteinkomplex, welcher aus T1K und IP75 besteht, entstanden vor allem an dem glycinreichen Abschnitt des Inaktivierungspeptides signifikante C84-induzierte Strukturänderungen auf dem IP75-Peptid (Abb. 4.32, blaue A-Kreise). Daraus kann geschlossen werden, dass IP75 von dem C84-Peptid in diesem Bereich von der T1K-Domäne verdrängt wird. Wichtig zu betonen ist hier, dass die beiden Peptide in Abwesenheit der T1K-Domäne bei unseren Versuchsbedingungen keine Wechselwirkung miteinander eingehen (Abschn. 6.3). Der beim IP75-Peptid signifikante Bereich betrifft die Aminosäuren S60 bis H67. Werden nun die Änderungen der Volumen (AS S60 - H67) in diesem Bereich betrachtet, kam es zu dem Effekt, dass die Bindung der T1K-Domäne an das IP75-Peptid zu einer signifikanten Volumenabnahme führte. Dies wurde als ein Kontaktbindebereich zwischen T1K und IP75 definiert. Bei Zugabe des C-Terminus kam es bei dem IP75-Peptid in dem Bereich von Aminosäure S60 bis H67 zu einer besonders signifikanten Volumenrücknahme, was als eine Ablösung des IP75-Peptides von dem T1K-Tetramer verstanden werden kann (Abb. 4.33 und Abb. 4.34). Dieser Bereich wurde in Abschnitt 6.13 für die Erstellung eines Protein-Protein Bindungsmodells zwischen dem T1K-Tetramer und dem IP75-Inaktivierungspeptid verwendet. Bei Zugabe des K_V1.4 C-Terminus zu dem T1K/IP75-Komplex induziert dieser Volumenänderungen über den gesamten Strukturbereich des IP75-Peptides (Abb. 4.34, Bild 2). Dies wird durch eine konformationelle Umstrukturierung des IP75-Peptides erklärt, z.B. durch eine Modifikation der Protein-Protein Bindung des IP75-Peptides an das T1K-Tetramer.

6.12 Ladungsverteilung an Proteinstrukturen

Das Computerprogramm PyMOL™ ermöglicht die Darstellung der Ladungsverteilung auf der Strukturoberfläche von Proteinen. Positive Ladungsbereiche werden blau, neutrale weiß und negative rot dargestellt. Um ein möglichst gutes Protein-Protein Interaktionsmodell zwischen dem T1K-Tetramer und dem Inaktivierungspeptid (IP75) in Abschnitt 6.13 zu erstellen, wurde die Ladungsverteilung bei beiden Interaktionspartnern in Abschnitt 4.7 untersucht. Grundlegend kann davon ausgegangen werden, dass positive Ladungsbereiche eher affin zu negativen und negative eher zu positiven sind.

Interaktionsbereiche des IP75-Peptides mit dem T1K-Tetramer wurden bevorzugt auf der positiv geladenen T1K-Oberflächenstruktur identifiziert (Abb. 6.2, Bild 2a, gelber Bereich). Interaktionsbereiche auf der IP75-Struktur traten über die gesamte Peptidstruktur auf (Abb. 6.2, Bild 1b, gelber Bereich). Vor allem der glycinreiche, flexible IP75-Terminus (Abb. 6.2, 1a, grauer Kreis) zeigt eine stark negative Ladungscharakteristik. Die gegensätzliche Ladungsverteilung auf dem beiden Proteinen legt eine wahrscheinliche Bindung in diesem Bereich nahe.

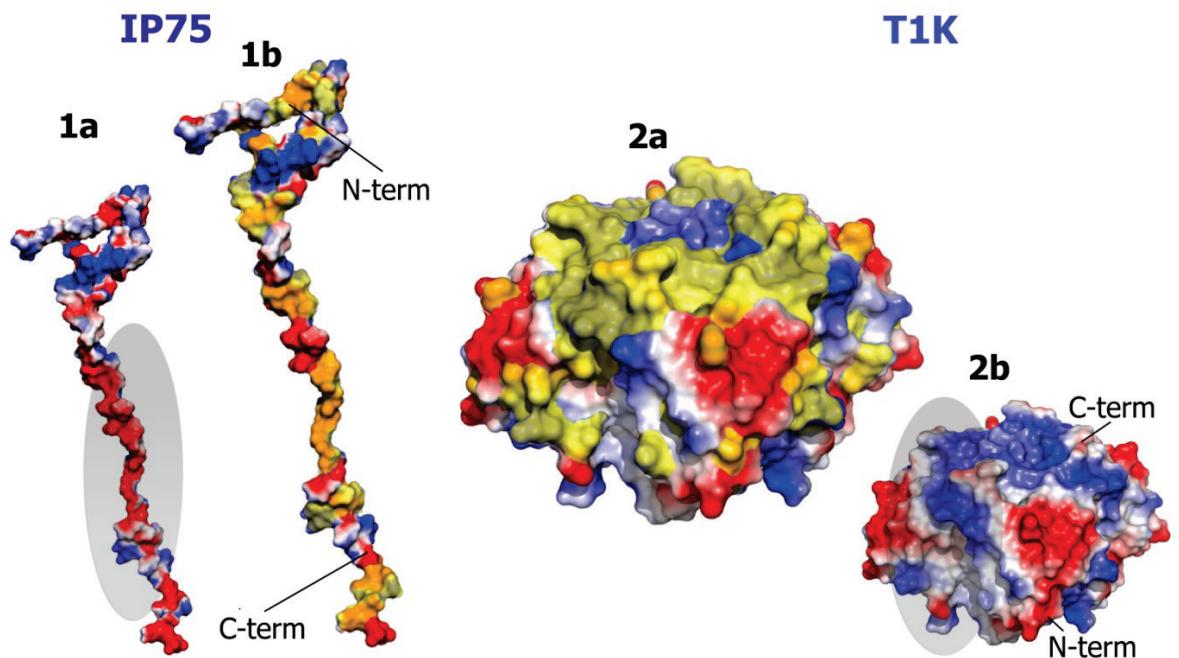


Abb. 6.2: Graphische Darstellung des T1K-Tetramers und des IP75-Peptides in der Elektronen- und Ladungsdichtevertteilung mit ihren gegenseitigen Protein-Protein Interaktionsflächen. Farbschema: (blau) Positiv geladene Bereiche. (rot) Negativ geladene Bereiche. (weiß) Neutral geladene Bereiche. (gelb) Protein-Protein Interaktionsflächen zwischen den beiden Proteinen. (graue Fläche) hebt die Ladungsverteilung auf der jeweiligen Proteinstruktur hervor (**1a**) IP75-Struktur: Ladungsverteilung. (**1b**) IP75-Struktur: Ladungsverteilung mit eingezeichneten Interaktionsbereichen zu dem T1K-Tetramer. (**2a**) T1K-Tetramer: Ladungsverteilung mit eingezeichneten Interaktionsflächen zu dem IP75-Peptid. (**2b**) T1K-Tetramer: Ladungsverteilung.

In Abschnitt 6.5 wurde das negativ kooperative Bindeverhalten und die Bindungsbereiche zwischen dem T1K-Tetramer und dem IP75-Peptid diskutiert. Bei diesem Bindemechanismus muss das IP75-Peptid großflächig überlappende Bereiche auf der Oberflächenstruktur von T1K einnehmen, um so die anderen IP75-Proteine an einer weiteren Bindung mit dem T1K-Tetramer zu hindern. Ein möglicher Interaktionsbereich des IP75-Peptides auf der T1K-Struktur wird in Abbildung 6.3 dargestellt.

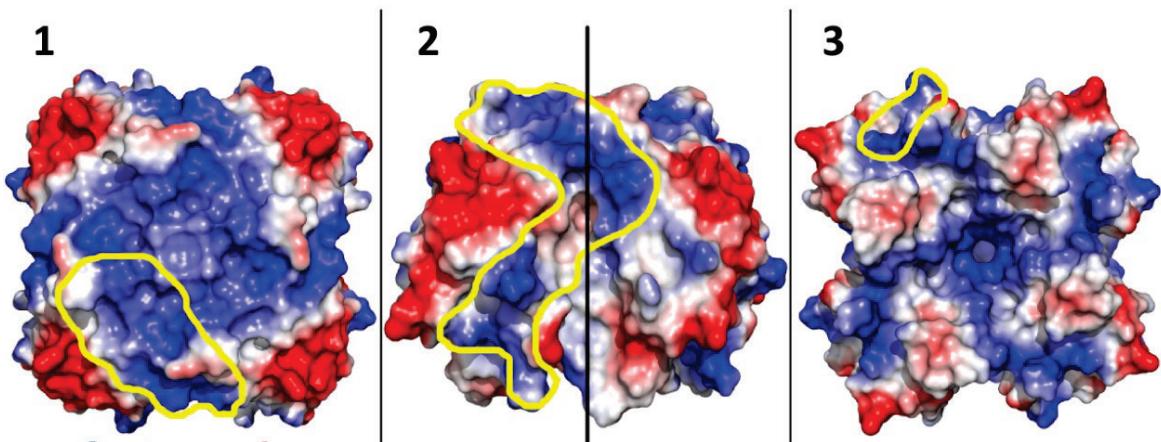


Abb. 6.3: Möglicher Interaktionsbereich des IP75-Peptides, dargestellt auf dem T1K-Tetramer in der Elektronen und Ladungsdichtevektorverteilungsdarstellung. Farbschema: (blau) Positiv geladene Bereiche. (rot) Negativ geladene Bereiche. (weiß) Neutral geladene Bereiche. (gelb) Möglicher Interaktionsbereich des IP75-Peptides mit dem T1K-Tetramer. Das IP75-Peptid, dessen Charakter eher durchwegs negativ geladen ist bindet an den positiven Ladungsbereich des T1K-Tetramers (vgl. Abb. 6.2). Der schwarze Strich in Bild 2 unterteilt die beiden T1-Monomere. Ansicht: T1K von (1) oben (2) der Seite und (3) innen.

6.13 Bindungsmodell des Kv1.4 Inaktivierungspeptides mit der Kv1.4 T1K-Domäne

Unter Verwendung des Programms PyMOL™ wurde ein Interaktionsmodell (Abb. 6.4) zwischen dem N-terminal gelegenen Kv1.4 Inaktivierungspeptid (IP75-Struktur, Wissmann et al., 2003) und der homotetrameren Kv1.4 T1K-Domäne (Kv1.4 T1K-Struktur, Abschn. 4.1.3) manuell erstellt. Zur Orientierung in dem Modell dient Abbildung 6.1. Die Größenverhältnisse der S1-T1 Linker sind nicht optimal, enthalten jedoch alle relevanten S1-T1 Aminosäuren. In diesem Modell wurden die Auswertungen aus Abschnitt 4.4.1 (Änderungen an dem T1K-Tetramer ausgelöst durch das IP75-Peptid), aus Abschnitt 4.6 (Änderungen an dem IP75 ausgelöst durch T1K und durch das C84-Peptid) und aus Abschnitt 6.12 (Elektrostatische Protein-Oberflächendarstellung) vereint. Ziel des Modells ist es, eine molekulare, strukturelle Vorstellung zu erhalten, wie das Ball-Peptid in den Kaliumkanal kommen könnte und dabei mit der cytosolischen T1K-Domäne interagiert. Zusätzlich wurde in dem Modell berücksichtigt, dass das IP75-Peptid mit dem T1-S1 Linker durch elektrostatische Wechselwirkungen interagiert (Abb. 6.1; Fan et al., 2012). Das Modell wird in Abbildung 6.4 dargestellt. Die Aminosäuren S60 bis H67 aus dem glycinreichen, flexiblen Bereich des Inaktivierungspeptides binden hier in einer 'Furche' an die T1K-Domäne zwischen zwei T1K-Monomeren (Abb. 6.4, Bild 1b und 2b, gelb). Abschnitt 4.4.1 behandelt die Protein-Protein Interaktion zwischen dem T1K-Tetramer und

dem IP75-Peptid. Hierbei konnten auf Seiten des T1K-Tetramers Signale einzelner Aminosäuren detektiert werden, die im Laufe der Titration aufspalten (Abb. 4.21). Diese Aufspaltungen sprechen für eine direkte Protein-Protein Wechselwirkung und werden in Abbildung 6.4 (Bild 1b und 2b) orange dargestellt. Rote Bereiche auf dem T1K-Tetramer (Abb. 6.4, Bild 1b und 2b) stellen signifikante Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen aus der Wechselwirkung mit dem IP75-Peptid (Abb. 4.20) dar. Die gegenseitige Interaktion des T1K-Tetramers und des IP75-Peptides passen mit der elektrostatischen Ladungsverteilung auf den Proteinen aus Abschnitt 6.12 überein. Eine weitere Interaktion findet zwischen positiv geladenen Resten auf dem IP75-Peptid und negativ geladenen Resten auf dem S1-T1 Linker statt (Abb. 6.4, Bild 1b und 2b, gold).

Zusammenfassend entstand so ein Modell, in dem das Inaktivierungspeptid an das T1K-Tetramer bindet, elektrostatische Wechselwirkungen mit dem T1-S1 Linker eingeht und in der Lage war den Ionenkanal per Ball-Peptid zu verschließen. Im physiologischen, in der Zellmembran vorkommenden Kv-Kanal liegt zwischen dem Inaktivierungspeptid (IP75) und der T1-Domäne ein unstrukturierter Peptidbereich (AS 76 bis 174, vgl. Abb. 6.1). Laut Fan et al. (2012) bildet dieser Bereich elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Aminosäurebereich 83-98 und dem Aminosäurenbereich 123-137 untereinander aus. Dies wäre mit dem Modell aus Abb. 6.4 vereinbar. Die Struktur des Kv1.4 Inaktivierungspeptides in Abbildung 6.4 wurde aus einem Strukturbündel von Wissmann et al. (2003) ausgewählt und manuell an das T1K-Tetramer gedockt. Bei Betrachtung von Abbildung 6.4 Bild 2b fällt auf, dass zwischen der T1K-Domäne und dem S1-T1 Linker das IP75-Peptid leicht nach außen klappt (roter Pfeil). Bei Sichtung aller IP75-Strukturen konnte dieser Bereich als flexibel und beweglich eingestuft werden. Er wäre also in der Lage sich an das T1K-Tetramer anzulagern, was auch den bindungsrelevanten Daten aus Abschnitt 4.4.1 gut entspricht. Bei der Vorstellung, dass in einem physiologisch vorkommenden Kv1.4 Kaliumkanal vier Inaktivierungspeptide und vier C-Termini nebeneinander existieren, kann man sich vorstellen, dass die Diffusion der Peptide untereinander stark eingeschränkt sein muss (Schreier, 2006). Bei dieser Vorstellung kann vermutet werden, dass eine Beteiligung des C-Terminus an der Inaktivierung und der Regeneration des Kanals, wie in Abschnitt 6.9 beschrieben, durchaus möglich erscheint (Sankaranarayanan et al., 2005).

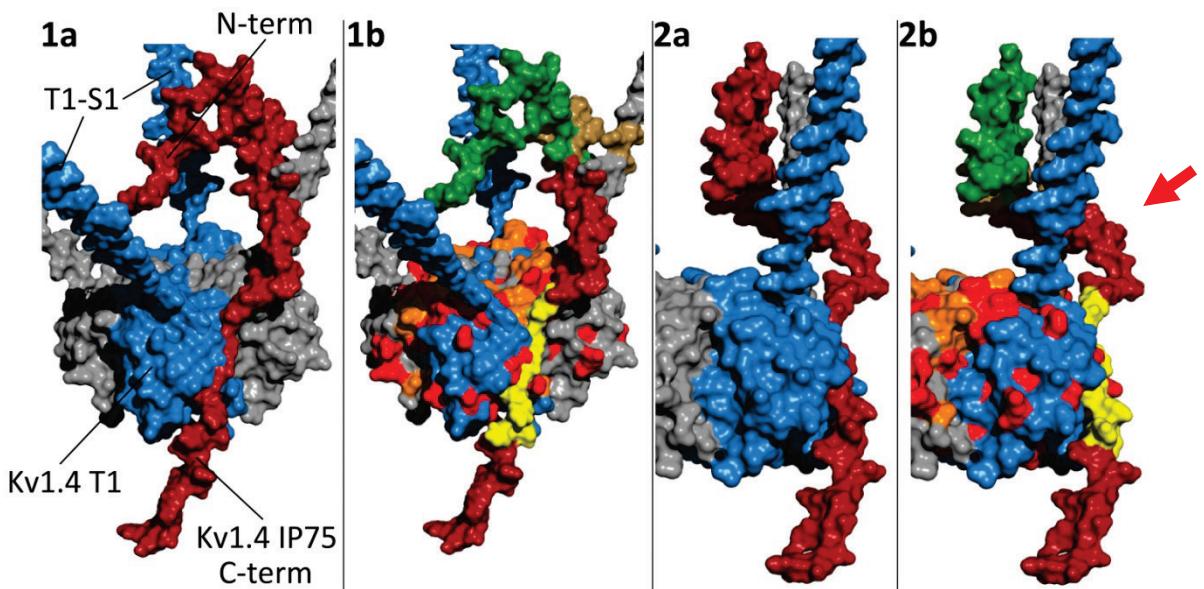


Abb. 6.4: Interaktionsmodell zwischen dem Kv1.4 T1K-Homotetramer und dem N-terminalen Inaktivierungspeptid. Farbschema: (blau, grau) T1K-Monomere mit S1-T1 Linker. (dunkelrot) IP75-Peptid. (grün) Ball-Peptid. (gold) Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen IP75 und dem T1-S1 Linker. (rot) Änderungen aus den kombinierten chemischen Verschiebungen und den Änderungen der Volumen oberhalb von σ , die durch IP75 an T1K ausgelöst werden (Abb. 4.19). (orange) Resonanzsignale, welche im Verlauf der IP75-Titration bei T1K aufspalten (Abb. 4.21). (gelb) Relevante Änderungen an dem Inaktivierungspeptid (AS S60-H67, Abb. 4.31). (roter Pfeil) flexibler IP75-Strukturbereich, welcher auch auf der T1K-Domäne anliegen kann (siehe Text). **(1a)** Ansicht schräg oben ohne Markierungen. **(1b)** Ansicht identisch 1a, jedoch mit Markierungen der Interaktionsbereiche. **(2a)** Ansicht Seite ohne Markierungen. **(2b)** Ansicht identisch 2a, jedoch mit Markierungen der Interaktionsbereiche.

6.14 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 C84-Peptid und der PDZ2-Domäne

Der äußerste C-Terminus des Kv1.4 Kaliumkanals besitzt ein EDTV PDZ-Bindemotiv (Abschn. 4.3). Dieses bindet an die PDZ-Domäne 1 oder 2 des PSD-95 Gerüstproteins, welches verantwortlich für ein erhöhtes, gebündeltes Auftreten von Kv1.4 Kanälen in einem Zellmembransegment ist (Abschn. 1.3.6). Für die Beteiligung dieser PDZ2-Domäne an der Kanal(in)aktivierung existiert kein Hinweis. Im Mittelpunkt stand die Charakterisierung der Bindung zwischen dem C-Terminus und der PDZ2-Domäne von PSD-95. Die Reste des PDZ-Bindemotivs zeigten bereits bei substöchiometrischen PDZ2-Konzentrationen eine starke Linienvverbreiterung, was für eine Bindung zwischen den beiden Proteinen spricht. Die dem PDZ-Bindemotiv naheliegenden Aminosäuren zeigten einen langsamen Austausch (Abschn. 4.9.1). Bei dieser Protein-Protein Titration kam es zu signifikanten kombinierten

chemischen Verschiebungen der Aminosäuren Y43 bis S55 bei dem C84-Peptid (Abb. 4.45). Bei der Untersuchung der Bindungsaffinität in diesem Bereich konnte vermutlich ein zweiter Interaktionsbereich zwischen dem C84-Peptid und dem PSD-95 Protein identifiziert werden (Abb. 4.46). Meyer (2005) untersuchte die Bindung zwischen dem Kv1.4 C-Terminus und der PDZ-2a Domäne von PTP-Bas, welche hoch homolog zur PDZ2-Domäne von PSD-95 ist. Er definierte den Bereich um die Aminosäuren Y44 bis S53 nicht als Interaktionsbereich zwischen den beiden Proteinen, sondern postulierte mehrere konformationelle strukturelle Gleichgewichte in der C84-Peptidstruktur. In Abschn. 4.3.2, der C84-Temperaturreihe und in Abschn. 4.5.2, der Bindung des T1K-Tetramers an das C84-Peptid konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden.

6.15 Protein-Protein Interaktion zwischen dem Kv1.4 C-Terminus, dem Kv1.4 T1K-Tetramer und der PDZ2-Domäne

In diesem Experiment wurde der Einfluss der PDZ2-Domäne von PSD-95 auf einen Proteinkomplex, bestehend aus der T1K-Domäne und dem C84-Peptid, untersucht (Abschn. 4.9.2). Dies entspricht einer Mischung der Protein-Protein Interaktionsversuche aus Abschnitt 4.5.2 (C84-Peptid mit T1K-Tetramer) und Abschnitt 4.9.1 (C84-Peptid mit PDZ2). Es stellte sich die Frage, ob die Funktion des PSD-95 Proteins rein regulatorischer Natur für die Zellfunktion ist (Abschn. 1.3.6), oder ob ein Einfluss auf die Bindung zwischen dem Kv1.4 T1-Tetramer und dem Kv1.4 C-Terminus besteht. Die Hauptaufgabe von PSD-95 ist die Lokalisation des spannungsgeladenen Kv1.4 Kaliumkanals über den C-Terminus in der Zellmembran. Laut Magidovich et al. (2007) entspringt der C-Terminus der S6-Helix und kann frei und flexibel im Cytosol vorliegen. Bindet nun in der Zelle ein PSD-95 Gerüstprotein über seine PDZ2-Domänen den C-Terminus eines Kv-Kaliumkanals zur Lokalisation des Kaliumkanals, so wäre vorstellbar, dass die Kv1.4 T1-Domäne dabei keine Relevanz hat. Durch die räumliche Dichte und Nähe der vier C-terminalen Reste an der Kanalstruktur wäre es jedoch auch denkbar, dass die Kv1.4 T1-Domäne involviert sein könnte. Es wurde eine Titration zwischen den drei Proteinen mit Sicht auf das C84-Peptid durchgeführt. Die kombinierten chemischen Verschiebungen in Abbildung 4.50 Bild A zeigen, dass das C84-Peptid an das T1K-Tetramer bindet. Vor allem der Bereich um die Aminosäuren Y46 bis S59 steht hierbei im Fokus. Im vorherigen Abschnitt 4.14 wurden sie als Bindungsbereich zwischen dem C84-Peptid und dem PSD-95 Protein definiert. Zugleich wurde bei der C84-Temperaturreihe in diesem Bereich ein erhöhtes Auftreten von unterschiedlichen lokalen

Konformationen definiert (Abschn. 6.2). Wird dem Komplex, bestehend aus dem C84-Peptid und dem T1K-Tetramer, nun das PDZ2-Protein zugegeben, kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen dem PDZ-Bindemotiv auf dem C-Terminus und der PDZ2-Domäne (Abb. 4.50, Bild B, Analog Abschn. 6.14). Hierbei kommt es zusätzlich in dem Aminosäurebereich Y43 bis S55 zu einer Abschwächung der Bindung zwischen dem C84-Peptid und dem T1K-Tetramer (Abb. 4.50, Bild C, AS-Bereich S54 bis S59). Außerdem kommt es in diesen Aminosäurebereich zu einer Reduzierung der Volumen. Dies spricht für eine bindungsinduzierte Strukturänderung des C84-Peptides durch das PDZ2-Protein. Das Experiment beschreibt zusammenfassend, dass das PDZ2-Protein die Bindung zwischen dem T1K-Tetramer und dem C84-Peptid schwächt und eine strukturelle Umorientierung auf dem C84-Peptid induziert. Ob die Bindung zwischen dem Kv1.4 C-Terminus, der Kv1.4 T1-Domäne und dem PDZ2-Protein nun physiologisch relevant ist, kann bei diesem Experiment nicht eindeutig gesagt werden. Es spricht jedoch dafür, dass der Kv1.4 C-Terminus und das PDZ2-Protein mehr eine rein organisatorische Zellfunktion unabhängig von der Kv1.4 T1-Domäne verbindet. Um ein räumliches Verständnis zwischen den drei Interaktionspartnern zu erhalten, wurde ein Modell in Abbildung 6.5 angefertigt, welches die drei Proteine in einem Komplex vereint. In Abschnitt 4.5.2 wurde gezeigt, dass der Kv1.4 C-Terminus und das Kv1.4 T1-Tetramer miteinander binden. Aufgrund der räumlichen, physiologischen Abstände im Kanal bindet die Kv1.4 T1-Domäne das Kv1.4 C84-Peptid wohl eher im mittleren Sequenzabschnitt und nicht direkt an seinem äußersten N- oder C-Terminus (Abb. 6.5). Gleichzeitig ist in dem Modell das PDZ-Bindemotiv mit der PDZ2-Domäne verbunden. Das Modell veranschaulicht, dass genug Platz zwischen den Protein-Protein Interaktionspartnern existiert, damit sie im trimeren Komplex vorliegen können. Zusätzlich kann man sich gut vorstellen, dass es für den mittleren Bereich des C84-Peptides mehr als eine lokale Konformation gibt.

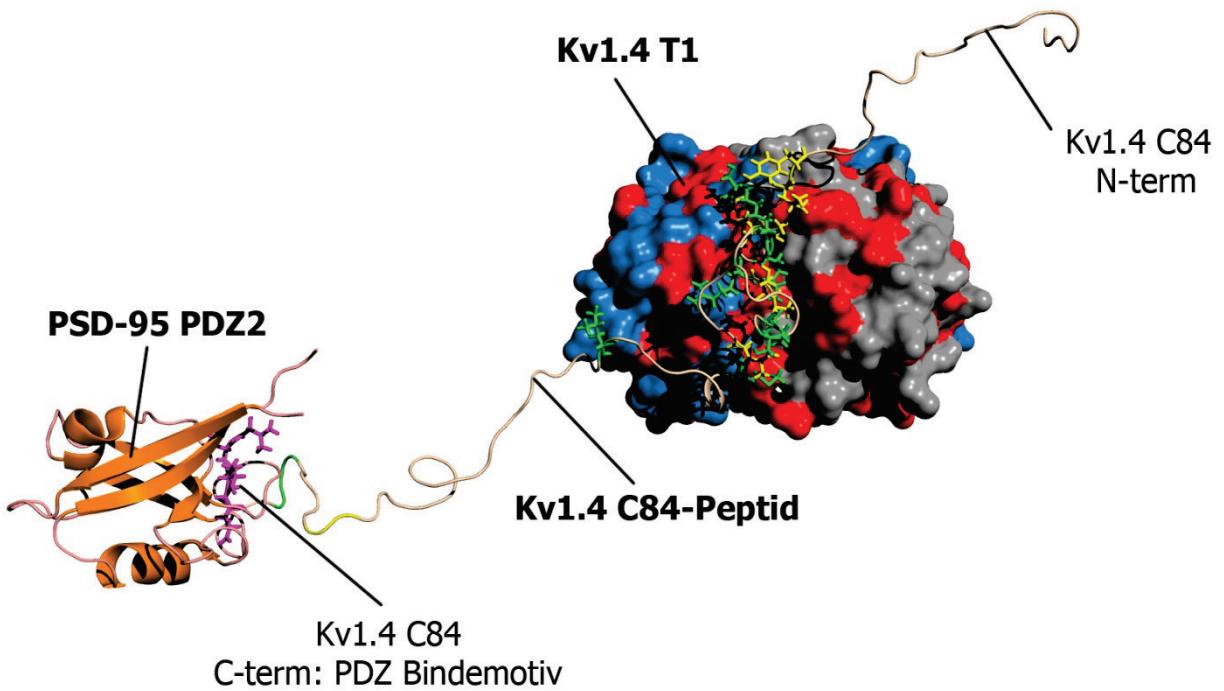


Abb. 6.5: Räumliche Darstellung der Bindung zwischen dem Kv1.4 C-Terminus (C84), der Kv1.4 T1-Domäne und dem PSD-95 PDZ2-Protein aus dem Experiment Abschn. 4.9.2. Farbschema: (grau, blau) Kv1.4 T1-Monomere, (orange) PSD-95 PDZ2-Protein. (gold) Kv1.4 C84-Peptid. (lila) PDZ-Bindemotiv auf dem C84-Peptid. (rot) Bindungsrelevante Aminosäuren mit dem C84-Peptid, lokalisiert auf dem T1-Tetramer. (grün, gelb) Bindungsrelevante Aminosäuren mit der T1-Domäne, lokalisiert auf dem C84-Peptid (AS-Bereich: Y43-S59; PyMOL™ 'Sticks'-Darstellung). Der N-Terminus des C84-Peptides ist im physiologischen Kanal nahe der Zellmembran lokalisiert und beginnt in der Darstellung oben rechts (vgl. Abb. 6.1). Durch seine gestreckte, relativ ungeordnete Struktur kann er mit dem Kv1.4 T1-Tetramer interagieren, oder sich frei im Cytosol bewegen (Abschn. 1.3.4.3). Der C-Terminus des C84-Peptides kann an die PDZ2-Domäne des PSD-95 Proteins binden.

6.16 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es vielseitige Interaktionsmöglichkeiten zwischen den cytosolischen Domänen des spannungsgesteuerten Kv1.4 Kanals gibt. Hierbei konnten lokale Strukturänderungen auf der Kv1.4 T1-Domäne, dem Kv1.4 Inaktivierungspeptid und bei dem Kv1.4 C-Terminus bestimmt werden, was für eine jeweilige Interaktion zwischen den Proteinen spricht. Teilweise konnten diese Interaktionen durch elektrophysiologische Versuche bereits deutlich beschrieben werden (Bett et al., 2010). Noch ist es aber nicht gelungen sich diese Interaktionen auf der gesamten Kaliumkanalstruktur treffend vorzustellen, da bis heute keine vollständiges Kv1.4 Strukturmodell mit allen cytosolischen Untereinheiten existiert. In dieser Arbeit konnten Kontaktbereiche zwischen den cytosolischen Domänen, jedoch nicht die Orientierung der Domänen untereinander bestimmt werden. Ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen ist hierbei die Verwendung eines Spin-Labels (MTSL, Abschn. 4.10). Dazu müssten die N- und C-terminalen Kv1.4 Peptide durch Mutationsversuche optimiert werden. Diese sollten je nur ein Cystein in ihrer Aminosäuresequenz, welches mit einem Spin-Label beladen ist besitzen. Dieses Cystein sollte im Idealfall an der wahrscheinlichsten Protein-Protein Interaktionsstelle zwischen den beiden Bindungspartnern liegen. Bei einem Protein-Protein Titrationsversuch unter Verwendung der NMR-Spektroskopie könnte so die Orientierung und die Lage der Domänen zueinander bestimmt werden.

7. Diskussion der Ergebnisse um das CFPS-System

7.1 Rekonstruktion der Translationsmaschinerie in *E. coli* S30 CFPS-Systemen

Basierend auf der Forschungsarbeit von Freischmidt (2011) wurde die Rekonstruktion der Translationsmaschinerie in *E. coli* S30 Extrakten weiter verfolgt. Den Ursprung fand die Arbeit durch die Veröffentlichung von Underwood et al. (2005), welche belegte, dass alle Vorgänge der Translation (Initiation, Elongation und Termination) in einer CFPS-Reaktion ('cell-free protein synthesis') deutlich langsamer als im lebenden *in vivo* System ablaufen. Dies resultiert in praktischen Problemen bei der Effizienz der zellfreien Proteinsynthese, die trotz verschiedener Forschungsansätze bisher nicht gelöst werden konnte. Freischmidt (2011) klonierte zehn unterschiedliche, translationsrelevante Faktoren (Abb. 5.1) und testete ihren jeweiligen Einfluss auf die Produktivität des CFPS-Systems. Jedes der zehn Proteine war aktiv und bedingt durch die Aufreinigungsmethode (Abschn. 3.3.4) mit einem His₆-tag verbunden, welcher keinen negativen Einfluss auf die Reaktion hatte. Freischmidt (2011) testete nur die Zugabe einzelner Translationsfaktoren (TL-Faktoren) zu dem CFPS-System. Underwood et al. (2005) sowie Freischmidt (2011) zeigten, dass nur die Zugabe der TL-Faktoren EF-Tu und EF-Ts die Syntheseleistung des Systems sichtlich verbessern konnten. Es konnten Synthesesteigerungen zwischen 12 % und 20 % erzielt werden. Die zugegebenen Konzentrationen der TL-Faktoren bewegten sich im Rahmen der von Freischmidt (2011) optimal gewählten Bedingungen. Zusammenfassend nahm Freischmidt (2011) an, dass die TL-Maschinerie in den S30-Extrakten bereits in einem optimalen Protein-Konzentrationsgleichgewicht vorlag und keine Verbesserung erzielt werden konnte. Er ging davon aus, dass das CFPS-System ein komplexes System aus vielen Komponenten darstellt, deren Zusammenspiel bei der Optimierung berücksichtigt werden muss.

Im Folgenden wurde getestet, wie das CFPS-System auf die Zugabe von vollständigen TL-Proteinensembles und nicht nur auf einzeln zugegebene TL-Faktoren reagiert. Die Initiationsfaktoren (IF-1, IF-2, IF-3), Elongationsfaktoren (EF-Tu, EF-Ts, EF-G) und Terminationsfaktoren (RF-1, RF-2, RF-3, RRF) wurden je in einem Bündel zusammengefasst und ihre gemeinsame Auswirkung auf die Syntheseleistung in der CFPS-Reaktion untersucht. Bevor die TL-Bündel getestet werden konnten, wurden wie bei Freischmidt (2011) vorgegeben die einzelnen TL-Faktoren aufgereinigt (Abb. 5.1) und deren Einfluss auf die CFPS-Reaktion hin einzeln untersucht. Analog zu Freischmidt (2011) und Underwood et

al. (2005) konnte die CFPS-Syntheseleistung nur bei den TL-Faktoren EF-Tu und EF-Ts um ca. 12 % und 8 % gesteigert werden.

Durch das Reproduzieren der Ergebnisse von Freischmidt (2011) konnten die TL-Faktoren nun in ihren Ensembles in der CFPS-Reaktion getestet werden (Abb. 5.3, Bild 4). Hierbei wurde gezeigt, dass der Zusammenschluss aus den Elongationsfaktoren die CFPS-Syntheseleitung um ca. 15 % steigern konnte. Die CFPS-Reaktion hatte ihr Syntheseoptimum bei einer Zugabe von 1 μ M - 1,5 μ M der Elongationsfaktoren. Wird die Konzentration der Elongationsfaktoren weiter erhöht, fällt die Produktivität des Systems wieder ab. Der jeweilige Zusammenschluss aus den Initiations- und Terminationsfaktoren führte bei jeder CFPS-Reaktion zu einem Einbruch der CFPS-Produktivität. Somit wäre die Theorie von Freischmidt (2011) bestätigt, dass das S30 CFPS-System von *E. coli* schon optimal in Bezug auf die TL-Faktoren zusammengesetzt ist.

7.2 CFPS unter Niedrigtemperatur

Dieses Experiment stellt die Weiterführung der Arbeit von Freischmidt (2011) dar. Dieser Bereich galt der Entwicklung eines CFPS-Systems, welches es ermöglichte, CFPS-Reaktionen bei einer niedrigeren Reaktionstemperatur als bei der optimalen CFPS-Reaktionstemperatur von 37° C durchzuführen (Abschn. 3.4). Vorteilhaft bei einer niedriger Expressionstemperatur ist, dass weniger ATP unspezifisch hydrolysiert (Kim und Swartz, 2001) und zufällig ablaufende proteolytische Prozesse während der CFPS-Reaktion reduziert sind (Schindler et al., 1999). Freischmidt (2011) testete die Expression unterschiedlichster Proteine bei unterschiedlichen Temperaturen im CFPS-System. Das Resultat war stets, dass eine Temperatursenkung unter 37° C eine verminderte Proteinausbeute zur Folge hatte. Die Proteinsynthesesteigerung konnte bei niedriger Temperatur jedoch durch einen Austausch der 5`UTR-Region vor dem Testprotein CAT (Chloramphenicol-Acyl-Transferase, Abschn. 3.4.5) ermöglicht werden. Hierbei wurde stattdessen die 5`UTR Region des Kälteschockproteins CspA (Abschn. 5.2) verwendet. Giuliodori et al., (2010) beschrieb, dass die 5`UTR-Region von CspA unterschiedliche Sekundärstrukturen bei unterschiedlichen Temperaturen einnimmt und somit besser oder schlechter der Transkription zugänglich ist (Abb. 5.4). Sie kann nur bei Temperaturen deutlich kleiner als 37° C gut abgelesen werden (Abb. 5.4, Optimum um 10° C). Freischmidt (2011) entdeckte bei dem CFPS-System unter Verwendung der 5`UTR von CspA ein Proteinsyntheseoptimum zwischen 20° C und 25° C

mit dem 5`UTR CspA-CAT (csCAT) Konstrukt. Es kam zu einer Synthesesteigerung in der CFPS-Reaktion zum normalen CAT-Testprotein in diesem Temperaturbereich (Abb. 5.5). Die Verbesserung bei einer mittleren Expressionstemperatur wurde damit begründet, dass die 5`UTR-Sekundärstruktur in einem Bereich von 10° C und 37° C zusätzliche Übergangszustände besäße. Nicht bei jedem Testprotein konnte die 5`UTR von CspA eine verbesserte Expression erzielen. Dies wurde mit der Aussage von Voges et al. (2004) begründet, dass eine optimierte 5`UTR, aufgrund von Basenpaarung und RNA-Sekundärstrukturbildung mit der codierenden Region niemals die Expression aller proteincodierenden Sequenzen steigern könnte (Freischmidt, 2011). Zusätzlich resultierte die Senkung der CFPS-Reaktionstemperatur auch in einer Verminderung der Aktivität reaktionsrelevanter Enzyme. Bei dem Testprotein CAT, wo eine Steigerung der Expression unter Verwendung der 5`UTR bei tiefer Temperatur ermöglicht werden konnte (Abb. 5.5), ist nun der Fall, dass die Translatierbarkeit durch die Verwendung der 5`UTR zunimmt, jedoch die Menge an translatierbarer mRNA mit sinkender Temperatur abnimmt. Bei 25° C bis 30° C scheint ein Optimum der translatierbaren mRNA vorzuliegen (Freischmidt, 2011). So liegt nun der Fall vor, dass bei hohen Temperaturen die mRNA in ausreichender Menge vorhanden, jedoch aufgrund der mRNA Sekundärstruktur nicht ausreichend gut translatierbar ist. Zusätzlich sinkt bei fallender Temperatur die Aktivität der mRNA synthetisierenden T7-RNA Polymerase (T7-RNA Pol.; Aktivität: 37° C - 100 %; 30° C - 70 %; 25° C - 40 %; 20° C - 20 %; 15° C - 7 %; Chamberlin und Ring, 1973). Ziel war jetzt die sinkende T7-RNA Pol. Aktivität bei tiefer Temperatur durch Zugabe zusätzlicher T7-RNA Pol. auszugleichen und so die CFPS-Produktivität wieder zu steigern. Hierbei wurde eine T7-RNA Pol. mit definierter, wahrscheinlicher Aktivität (Abschn. 5.2.2, T7-Pol. Fermentas 200 U/μl) dem System zugefügt, um die prozentual fehlende T7-RNA Pol. Aktivität durch Zugabe so zu erhöhen, dass stets die 100 %ige Aktivität wie beim Normalansatz bei 37° C erreicht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Anwesenheit von mehr T7-RNA Pol. wieder mehr mRNA produziert und sich gleichzeitig die Produktivität des CFPS-Systems erhöhte. Zusammenfassend sei gesagt, dass allein die einfache Verwendung der 5`UTR vor dem CAT-Testprotein die CFPS-Syntheseleistung bei 25° C um ca. 20 % steigerte. Unter erhöhter Zugabe der T7-RNA Polymerase konnte die CFPS-Produktivität um zusätzliche 10 % erhöht werden (Abb. 5.6).

7.3 CFPS und der pH-Wert

Im diesem Experiment wurde die Änderung des pH-Wertes bei einer CFPS-Reaktion NMR-spektroskopisch verfolgt. CFPS-Reaktionssysteme brauchen für eine erfolgreiche Reaktion ATP. Verbrauchtes oder unspezifisch gespaltenes ATP wird in dem CFPS-System unter Verwendung eines Energie-Regenerationssystems wieder zu ATP aufgebaut (Abschn. 3.4). Wichtig für eine funktionierende, erfolgreiche CFPS-Reaktion ist ein stabiles Puffersystem mit einem stabilen pH-Wert. Die Proteinproduktion findet im Idealfall bei pH 6,8 im CFPS-System statt (Jewett und Swartz, 2004). Unser *E. coli* S30 System verwendete ein HEPES-Puffer mit einem pka von 7,5. Dies ermöglichte einen stabilen pH-Wert von pH 6,8 bis pH 8,2. Bei der Proteinproduktion werden *in vivo*, wie *in vitro* saure, anaerobe Abbauprodukte, wie Acetat und Lactat gebildet. In der lebenden Zelle werden diese über die Zellmembran abtransportiert (Kessler und Knappe, 1996). In der CFPS-Reaktion führt dies zu einem Abfall des pH-Wertes in den ersten paar Minuten um ca. 0,2 pH-Einheiten beim HEPES-Puffersystem. Je nach Energiequelle (Phophoenolpyruvat (PEP), Glucose-6-Phosphat) werden im CFPS-System unterschiedliche Puffersysteme (HEPES, Bis-Tris) verwendet (Calhoun et al., 2004). Der pH-Abfall wurde NMR-spektroskopisch untersucht, indem HEPES spezifische Signale verfolgt wurden (Abschn. 5.3). Die pH-Untersuchung wurde bei 310 K und 277 K durchgeführt. Bei 310 K konnte ein wie von Calhoun et al. (2004) beschriebener pH-Abfall um ca. 0,23 Einheiten in den ersten paar Minuten der CFPS-Reaktion detektiert werden (Abb. 5.8, Bild 1). Die Proteinsynthese bei 310 K war im Gegensatz zu der Synthese bei 277 K produktiv. Das pH-Plateau blieb bei der CFPS-Reaktion über einen Reaktionszeitraum von ca. 2 Stunden stabil. Bei 277 K konnte keine Proteinsynthese festgestellt werden. Jedoch kam es zu einem pH-Abfall um ca. 0,31 pH-Einheiten über einen Zeitraum von ca. 6 Stunden (Abb. 5.8, Bild 2). Dies wurde auf die unspezifische Hydrolyse von ATP zurückgeführt, welche bei 277 K deutlich langsamer abläuft als bei 310 K.

7.4 CFPS unter hydrostatischem Druck

Bei diesem Experiment wurde der Einfluss von hydrostatischem Druck auf die Syntheseleistung eines S30 CFPS-Systems von *E. coli* untersucht. Ein ähnliches Experiment wurde von Lu et al. (1997) durchgeführt, wo die zellfreie Synthese von PolyU-Peptiden an einem rekonstruierten CFPS-System und an isolierten Ribosomen (Ratten, Leberzellen) getestet wurde. Hierbei konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivität der CFPS-Reaktion und der Aktivität der Ribosomen detektiert werden. Weitgehend sind die Ergebnisse des S30 *E. coli* Extraktes aus Abschnitt 5.4 auf die Ergebnisse von Lu et al. (1997) übertragbar.

Der erste Versuch konnte zeigen, dass je höher der hydrostatische Druck bei einer CFPS-Reaktion ist, desto niedriger wird die Ausbeute an synthetisiertem CAT-Testprotein (Abb. 5.9). Ab 60 MPa konnte kein synthetisiertes Protein mehr detektiert werden, wenn davon ausgegangen wird, dass alleine der Aufbau des Experimentes die Expression einer geringen Menge Protein vor dem Druckexperiment zuließ (Abschn. 5.4.1). Im zweiten Versuch konnte gezeigt werden, dass die CFPS-Reaktion durch Druck inhibiert werden kann, diese Inhibierung jedoch reversibel ist. Es wurde bei Drücken von 20 MPa und 60 MPa zu einem Normalansatz ohne Druckeinfluss untersucht. Hierbei wurde der Druck 10 min an den Reaktionsansatz angelegt. Die Versuchsdauer war begrenzt, da die CFPS-Reaktionen im Batch-Verfahren nicht länger als 30 min produktiv laufen (Abb. 5.10, vgl. Normalansatz). Beide Druckexperimente erzielten nach Druckabnahme im Vergleich zu dem Normalansatz fast identische Expressionsraten in der Zeit von 10 min bis 30 min. Der Normalansatz synthetisierte in dieser Zeit 35 % seiner Gesamtproteinausbeute. Der Ansatz bei 20 MPa synthetisiert 27 % und der Reaktionsansatz bei 60 MPa 21 % im Vergleich zu dem Normalansatz ohne Druckeinfluss. Dies würde bedeuten, dass der Druck die CFPS-Reaktion zeitweise inhibieren oder reduzieren kann, dies aber keinen Einfluss auf die Gesamtausbeute hat, wenn die grundlegend limitierenden CFPS- Faktoren (z.B. Energieverbrauch) in der CFPS-Reaktion keine Rolle spielen. Für eine bessere Aussage müssten mehrere CFPS-Versuche bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden, da bislang bei jedem Messpunkt nur ein Versuchsansatz durchgeführt wurde. Zudem spielt der Betrag des hydrostatischen Druckes eine entscheidende Rolle, da er bei Überschreitung eines gewissen Grenzwertes die Proteine nicht mehr rückgefaltet werden können. Dazu wurde im dritten Versuch das isolierte S30-Extrakt dem hydrostatischen Druck bei unterschiedlichen Druckpunkten ausgesetzt und es anschließend in einem CFPS-

Ansatz bei Standardbedingungen eingesetzt (Abb. 5.11). Hierbei wurde überprüft, bis zu welchem Druck eine eventuelle Denaturierung des Systems noch reversibel ist. Bei einem Druckpunkt von 80 MPa konnte das S30-Extrakt noch eine Leistung von ca. 55 % zum Normalansatz erreichen. Bei 100 MPa konnten nur noch ca. 18 % an Gesamtproteinausbeute detektiert werden. Bei Druckpunkten von 150 MPa und 200 MPa war die Synthese nicht mehr aktiv. Hierbei scheint der hydrostatische Druck irreversible Prozesse in dem S30-Extrakt induziert zu haben. Ab einem Druck größer 100 MPa ist keine Reaktivierung des Systems mehr möglich. Diese Ergebnisse entsprechen in etwa dem Datensatz von Lu et al. (1997), welcher eine Reaktivierung von eukaryotischen Rattenribosomen max. bis 120 MPa voraussagte. Drücke jenseits von 120 MPa ließen keine aktiven Ribosomen mehr zu.

8. Zusammenfassung

Der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.4 ist an der neuronalen Signalgebung, der Herzrhythmusregulation und an informationsverarbeitenden, kognitiven Fähigkeiten des Menschen beteiligt. Er öffnet sich bei der Änderung des Membranpotentials und bedingt dadurch die Repolarisation bei einem Aktionspotential im Neuron. Physiologisch ist der Kv1.4 Kaliumkanal ein tetramerisches membranständiges Protein, welches aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist. Jede Untereinheit besteht aus einem transmembranständigen Bereich, dem N- und C-terminal cytosolisch liegende Domänen angegliedert sind. Stabilisiert wird die tetramere Kv1.4 Kanalstruktur über die ebenso tetramer vorliegende namensgebende Tetramerisierungsdomäne Kv1.4 T1. Diese befindet sich direkt zentral unterhalb der Kv1.4 Kanalpore. Die Aktivierung und Inaktivierung findet bei Kv1.4 Kaliumkanälen über cytosolische Domänen statt. So wurde mitunter die Kanal-Schnellinaktivierung dem N-terminal von der Kv1.4 T1-Domäne liegendem Ball-Peptid zugesprochen. Über den cytosolisch lokalisierten C-Terminus des Kv1.4 Kanals ist wenig bekannt. Sicher ist, dass er mit Gerüstproteinen, wie dem PSD-95-Protein Wechselwirkungen eingeht und so an der Entstehung von organisierten, multimeren Signalkomplexen in der postsynaptischen Membran exzitatorischer Synapsen beteiligt ist. Während die physiologischen Funktionen der zentralen Kanalpore durch elektrophysiologische Versuche weitgehend erforscht sind, ist wenig über die Wechselwirkungen der cytosolischen Domänen bei der Kanalregulation oder speziell bei der Inaktivierung auf molekularer, struktureller Ebene bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es die isolierten, cytosolischen Kv1.4 Domänen auf ihre gegenseitigen Interaktionsbereiche und ihre Bindungscharakteristik hin zu untersuchen und diese auf molekularer Ebene zu charakterisieren. Hierbei wurde die tetramere Kv1.4 T1-Domäne, das Inaktivierungspeptid und der C-Terminus NMR-spektroskopisch bei weitgehend physiologisch löslichen Bedingungen untersucht. Das Kv1.4 T1-Tetramer konnte im tetrameren Zustand NMR-spektroskopisch mit dem Kv1.4 Inaktivierungspeptid und dem Kv1.4 C-Terminus vermessen werden. Durch Markierung der Proteine mittels ^2H ^{15}N Isotope war es möglich die Proteine und deren einzelne Aminosäuren auf ihrer strukturelle Lage hin in der 2D-NMR Spektroskopie zu verfolgen. Die Interaktion zwischen der Kv1.4 T1-Domäne und dem Inaktivierungspeptid konnte näher charakterisiert werden. Hierbei bindet das Inaktivierungspeptid bevorzugt an der der Membran zugewandten Seite auf der Kv1.4 T1-

Oberfläche. Dies ist der Bereich, der nahe der Kanalpore lokalisiert ist. Die Bindung konnte als eine negativ kooperative Bindung mit starkem Bindungscharakter charakterisiert werden. Es wurde gezeigt, dass schon ein einzelnes Kv1.4 Inaktivierungspeptid für eine Kanalinaktivierung ausreicht. Aus Betrachtung des Kv1.4 Inaktivierungspeptides konnte ein Interaktionsbereich mit dem Kv1.4 T1-Tetramer über die gesamte Peptidstruktur detektiert werden. Durch die Bindungscharakteristik beider cytosolischer Domänen konnte ein Modell der Bindung zwischen dem Kv1.4 T1-Tetramer und dem Kv1.4 Inaktivierungspeptid erstellt werden. Dieses Modell konnte unter Verwendung einer elektrophysiologischen Oberflächendarstellung der Proteinstrukturen bekräftigt werden. Die Interaktion zwischen der Kv1.4 T1-Domäne und dem Kv1.4 C-Terminus war deutlich geringer als die des Inaktivierungspeptides und besaß keinen kooperativen Bindungscharakter. Der Kv1.4 C-Terminus interagierte mit der tetrameren Kv1.4 T1-Domäne bevorzugt im seitlichen, dem Cytosol zugewandten Bereich. Dieser Bereich war zu dem des Kv1.4 Inaktivierungspeptides unterschiedlich, jedoch gab es gemeinsame Überlappungsbereiche. Dem Kv1.4 C-Terminus, der weitgehend als unstrukturiert und ungefaltet galt, konnte ein Bereich von erhöhter struktureller Konformation/Dynamik zugesprochen werden. Dieser Bereich zeigte Bindungscharakter zu anderen Proteinen, sowie transient auftretende Konformationen. Es konnte gezeigt werden, dass das isolierte Kv1.4 Inaktivierungspeptid und der isolierte Kv1.4 C-Terminus nicht miteinander interagieren. Bei der Interaktion beider Peptide mit der Kv1.4 T1-Domäne konnte ein synergistischer Effekt an der T1-Domäne beobachtet werden. Hierbei erzielte der C-Terminus die partielle Verdrängung des Kv1.4 Inaktivierungspeptides von der Kv1.4 T1-Domäne. Im physiologischen Gesamtkanal könnte dies aufgrund des strukturellen Aufbaus zu einer kompletten Verdrängung führen. Ein weiteres Ziel stellte die Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Kv1.4 C-Terminus, dem PSD-95 Gerüstprotein und der T1-Domäne dar. Es konnte bestätigt werden, dass das C-terminale Kv1.4 Peptid über sein PDZ-Bindemotiv mit der PDZ2-Domäne von PSD95 interagiert. Beide Proteine in Kombination mit dem Kv1.4 T1-Tetramer zeigten, dass das PDZ2-Protein von PSD-95 höchstwahrscheinlich nur einen regulatorischen Charakter für die Zellorganisation besitzt und nicht an der physiologischen Kv1.4 Kanal(in)aktivierung beteiligt ist.

Die durchgeführten NMR-Experimente lieferten molekulare Informationen über die Kanalaktivitäten des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.4. Interaktionsareale konnten eingegrenzt und Aminosäuren den Bindungen charakteristisch zugeordnet werden. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der strukturellen Dynamik, den Protein-Protein

Wechselwirkungen und den physiologischen Funktionen der cytosolischen Domänen von Kv1.4 detektiert werden.

Die zellfreie *in vitro* Proteinexpression entwickelte sich in den letzten Jahrzehnten als wichtige Alternative zu der Proteinexpression im *in vivo* System. Dabei ermöglicht die Offenheit des Systems die Herstellung von z.B. zytotoxischen oder membranständigen Proteinen. Gerade in der klinischen Diagnostik sind Protein-Microarrays nicht mehr wegzudenken. Zwei Gründe/Belege sprechen dafür, dass die *in vitro* Proteinsynthese die *in vivo* Synthese noch nicht abgesetzt hat. Erstens ist die Herstellung der Reaktionskomponenten aufwendig und teuer und zweitens kann das System mit den *in vivo* Systemen in Bezug auf die Syntheseleistung nicht konkurrieren.

Um die Produktivität der *in vitro* Proteinsynthese zu steigern, wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Ansätze verfolgt. Diese wurden am Beispiel eines zellfreien Proteinsynthesesystems, basierend auf S30 Extrakt von *E. coli* durchgeführt. Es konnte eine Proteinsyntheseleistung von 500 µg/ml pro Stunde erreicht werden. Kommerziell erhältliche Systeme besitzen die gleiche Produktivität. Es konnte gezeigt werden, dass die Translationsmaschinerie in den S30-Extrakten bereits bei der Herstellung in optimalen Konzentrationen vorlag. Die Zugabe von einzelnen oder mehreren Translationsfaktoren führte zu keiner deutlichen Steigerung des zellfreien Proteinsynthese. Hierbei konnte die Syntheserate nur mit den Elongationsfaktoren Tu und Ts um 12 % bzw. 8 % gesteigert werden. Die Zugabe unterschiedlicher Translationsensembles brachte nicht den erwünschten Erfolg. Grundlegend konnte keine deutliche Steigerung der Syntheseleistung über die Optimierung der Translationsfaktoren erzielt werden kann. Basierend auf Daten von Freischmidt (2006) konnte bei einer Senkung der optimalen zellfreien Reaktionstemperatur unter gleichzeitiger Verwendung einer 5' UTR-Region eines Kälteschockproteins vor dem Testprotein CAT die Syntheseleistung im System um ca. 8 % gesteigert werden. Somit wurden unerwünschte Nebenreaktionen, wie die unspezifische ATP-Hydrolyse reduziert, jedoch auch die Aktivität reaktionsrelevanter Enzyme vermindert. Unter Zugabe einer RNA-Polymerase konnte die Produktivität des Systems auf deutliche 30 % gegenüber der Normalreaktion erhöht werden. Zusätzlich wurde der pH-Wert in der zellfreien Proteinsynthese NMR-spektroskopisch verfolgt. Hierbei kam es in den ersten paar Minuten zu einem pH-Abfall, welcher sich auf einem stabilen Plateau im weiteren Reaktionsverlauf einpendelte. Dieser pH-Abfall war Temperatur- jedoch nicht Zeitunabhängig und deutete auf eine unspezifische Hydrolyse hin. Des Weiteren behandelte diese Arbeit den Einfluss des hydrostatischen Druckes auf die zellfreie Proteinsynthese. Es

konnte gezeigt werden, dass je höher der Druck, desto weniger Protein kann synthetisiert werden. Hierbei gab es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Stabilität von Ribosomen und der Aktivität des zellfreien Systems. Es wurde herausgefunden, dass der hydrostatische Druck das System inhibierte, es jedoch bei Druckabnahme wieder in den aktiven Zustand überging. Erst ab einem Druck von über 100 MPa war das System vollständig inaktiv und nicht mehr reaktivierbar.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Ansätze diskutiert, welche die Produktivität des *in vitro* Systems steigern konnten und ein besseres Verständnis zur zellfreien Proteinsynthese lieferten.

9. Literaturverzeichnis

- Antz C, Geyer M, Fakler B, Schott MK, Guy HR, Frank R, Ruppersberg JP, Kalbitzer HR. (1997).** NMR structure of inactivation gates from mammalian voltage-dependent potassium channels. *Nature*. 385: 272-5.
- Armstrong CM, Bezanilla F & Rojas F. (1973).** Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J. Gen. Physiol.* 62: 375-391
- Armstrong CM, Bezanilla F. (1977).** Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol.* 70, 567-90.
- Ayer RK Jr, Sigworth FJ. (1997).** Enhanced closed-state inactivation in a mutant Shaker K⁺ channel. *J Membr Biol.* 157(3): 215-230.
- Baker KA, Hilty C, Peti W, Prince A, Pfaffinger PJ, Wider G, Wüthrich K, Choe S. (2006).** NMR-Derived Dynamic Aspects of N-Type Inactivation of a Kv Channel Suggest a Transient Interaction with the T1 Domain. *Biochemistry*. 45 (6), 1663-72.
- Barghaan J, Tozakidou M, Ehmke H, Bähring R. (2008).** Role of N-terminal domain and accessory subunits in controlling deactivation-inactivation coupling of Kv4.2 channels. *Biophys J.* 94(4):1276-94.
- Barghaan J, Bähring R. (2009).** Dynamic coupling of voltage sensor and gate involved in closed-state inactivation of Kv4.2 channels. *J Gen Physiol.* 133: 205-224.
- Barros F, Domínguez P, de la Peña P. (2012).** Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Front Pharmacol.* 3:49. doi: 10.3389/fphar.2012.00049. eCollection 2012.
- Baskaran K (2012).** Unveröffentlichtes Kv1.4 T1-Strukturmodell (Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie, Universität Regensburg).
- Beekwilder JP, O'Leary ME, van den Broek LP, van Kempen GT, Ypey DL, van den Berg RJ. (2003).** Kv1.1 channels of dorsal root ganglion neurons are inhibited by n-butyl-p-aminobenzoate, a promising anesthetic for the treatment of chronic pain. *J Pharmacol Exp* 304(2):531-8.
- Bett GC, Dinga-Madou I, Zhou Q, Bondarenko VE, Rasmusson RL. (2010).** A model of the interaction between N-type and C-type inactivation in Kv1.4 channels. *Biophys J.* 100(1):11-21.
- Bett GC, Lis A, Guo H, Liu M, Zhou Q, Rasmusson RL. (2012).** Interaction of the S6 proline hinge with N-type and C-type inactivation in Kv1.4 channels. *Biophys J.* 103 (7): 1440-50.
- Busch AE, Hurst RS, North RA, Adelman JP, Kavanaugh MP. (1991).** Current inactivation involves a histidine residue in the pore of the rat lymphocyte potassium channel RGK5. *Biochem Biophys Res Commun.* 179:1384-90.

- Calhoun KA, Swartz JR. (2005).** Energizing cell-free protein synthesis with glucose metabolism. *Biotechnol Bioeng.* 90(5):606-13.
- Calhoun KA and Swartz JR. (2007).** Energy systems for ATP regeneration in cell-free protein synthesis reactions. *Methods Mol Biol* 375: 3-17.
- Chamberlin M and Ring J. (1973)** Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase. 1. General properties of the enzymatic reaction and the template specificity of the enzyme. *J Biol Chem* 248, 2235-44.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH. (1989).** One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(7), 2172-5.
- Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. (2003).** A vision for the future of genomics research. *Nature* 422(6934): 835-47.
- Consiglio JF, Korn SJ (2004).** Influence of permeant ions on voltage sensor function in the Kv2.1 potassium channel. *J Gen Physiol.* 123:387–400.
- Cuello LG, Jogini V, Cortes DM, Pan AC, Gagnon DG, Dalmas O, Cordero-Morales JF, Chakrapani S, Roux B, Perozo E. (2010).** Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K(+) channels. *Nature*. 466:272–5.
- DeVries JK, Zubay G. (1967).** DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the alpha fragment of the enzyme beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 57(4) 1010-2.
- Ding S, Ingleby L, Ahern CA, Horn R. (2005).** Investigating the putative glycine hinge in Shaker potassium channel. *J Gen Physiol.* 126: 213–226.
- Fan Z, Ji X, Fu M, Zhang W, Zhang D, Xiao Z. (2012).** Electrostatic interaction between inactivation ball and T1-S1 linker region of Kv1.4 channel. *Biochim Biophys Acta.* 1818 (1):55-63.
- Farrokhi N, Hrmova M, Burton RA, Fincher GB. (2009).** Heterologous and Cell-Free Protein Expression Systems. *Methods Mol Biol.* 513, 175-98.
- Fedida D, Hesketh JC. (2001).** Gating of voltage-dependent potassium channels. *Prog Biophys Mol Biol.* 75(3) :165–199.
- Freischmidt A, Meysing M, Liss M, Wagner R, Kalbitzer HR, Horn G.J. (2010).** Limiting factors of the translation machinery. *J Biotechnol* 150(1): 44-50.
- Freischmidt A. (2011).** Untersuchung an einem zellfreien Proteinexpressionssystem basierend auf S30 Extrakt von Escherichia Coli. Doktorarbeit. Universität Regensburg.
- Freischmidt A, Hiltl J, Kalbitzer HR, Horn-Katting G. (2013).** Enhanced in vitro translation at reduced temperatures using a cold-shock RNA motif. *Biotechnol Lett.* 35(3): 389-95.
- Gale EF and Folkes JP. (1954).** Effect of nucleic acids on protein synthesis and amino-acid incorporation in disrupted staphylococcal cells. *Nature* 173(4417): 1223-7.

- Gebauer M, Isbrandt D, Sauter K, Callsen B, Nolting A. (2004).** N-type inactivation features of Kv2.4 channel gating. *Biophys J.* 86: 210–223.
- Geyer M, Herrmann C, Wohlgemuth S, Wittinghofer A and Kalbitzer HR. (1997).** Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signalling. *Nat Struct Biol.* 4(9): 694-699.
- Giuliodori AM, Di Pietro F, Marzi S, Masquida B, Wagner R, Romby P, Gualerzi CO, Pon CL. (2010).** The cspA mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA. *Mol Cell* 37, 21-33.
- Glauner KS, Mannuzzu LM, Gandhi CS, Isacoff EY. (1999).** Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature.* 402(6763):813-7.
- Graslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, Knapp S, Oppermann U, Arrowsmith C, Hui R, Ming J, dhe-Paganon S, Park HW, Savchenko A, Yee A, Edwards A, Vincentelli R, Cambillau C, Kim R, Kim SH, Rao Z, Shi Y, Terwilliger TC, Kim CY, Hung LW, Waldo GS, Peleg Y, Albeck S, Unger T, Dym O, Prilusky J, Sussman JL, Stevens RC, Lesley SA, Wilson IA, Joachimiak A, Collart F, Dementieva I, Donnelly MI, Eschenfeldt WH, Kim Y, Stols L, Wu R, Zhou M, Burley SK, Emtage JS, Sauder JM, Thompson D, Bain K, Luz J, Gheyi T, Zhang F, Atwell S, Almo SC, Bonanno JB, Fiser A, Swaminathan S, Studier FW, Chance MR, Sali A, Acton TB, Xiao R, Zhao L, Ma LC, Hunt JF, Tong L, Cunningham K, Inouye M, Anderson S, Janjua H, Shastry R, Ho CK, Wang D, Wang H, Jiang M, Montelione GT, Stuart DI, Owens RJ, Daenke S, Schutz A, Heinemann U, Yokoyama S, Bussow K, Gunsalus KC. (2008).** Protein production and purification. *Nat Methods* 5(2): 135-46.
- Grizel AV, Glukhov GS, Sokolova OS. (2014).** Mechanisms of activation of voltage-gated potassium channels. *Acta Naturae.* 6(4):10-26.
- Gross M, Lehle K, Jaenicke R, Nierhaus KH. (1993).** Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. Stabilizing conditions and identification of the most sensitive functional state. *Eur J Biochem.* 218(2):463-8.
- Gulbis JM, Mann S, MacKinnon R. (1999).** Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit. *Cell.* 97(7):943-52
- Gulbis JM, Zhou M, Mann S, MacKinnon R. (2000).** Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science.* 289(5476):123-7.
- Hatano N, Ohya S, Muraki K, Clark RB, Giles WR, Imaizumi Y. (2004).** Two arginines in the cytoplasmic C-terminal domain are essential for voltage-dependent regulation of A-type K⁺ current in the Kv4 channel subfamily. *J Biol Chem.* 279: 5450-9.
- Holmgren M, Jurman ME, Yellen G. (1996).** N-type inactivation and the S4-S5 region of the Shaker K⁺ channel. *J Gen Physiol.* 108(3):195-206.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. (1990).** Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science.* 250(4980): 533-8.
- Howard RJ, Clark K, Holton JM, Minor DL Jr.(2007).** Structural insight into KCNQ (Kv7) channel assembly and channelopathy. *Neuron* 53: 663-75.

- Imamura F, Maeda S, Doi T, Fujiyoshi Y. (2002).** Ligand Binding of the Second PDZ Domain Regulates Clustering of PSD-95 with the Kv1.4 Potassium Channel. *J Biol Chem.* 277 (5) 3640-3646.
- Imbrici P, Grottesi A, D'Adamo MC, Mannucci R, Tucker SJ, Pessia M. (2009).** Contribution of the central hydrophobic residue in the PXP motif of voltage-dependent K⁺ channels to S6 flexibility and gating properties. *Channels (Austin).* 3:39–45.
- Jackson AM, Boutell J, Cooley N, He M. (2004).** Cell-free protein synthesis for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2(4): 308-19.
- Jannasch HW, Taylor CD. (1984).** Deep-sea microbiology. *Annu Rev Microbiol.* 38, 487-514.
- Jensen MØ, Jogini V, Borhani DW, Leffler AE, Dror RO, Shaw DE. (2012).** Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science.* 336(6078):229-33.
- Jerng HH, Covarrubias M. (1997).** K⁺ channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains. *Biophys J.* 72: 163-74.
- Jewett MC, Swartz JR. (2004).** Mimicking the Escherichia coli cytoplasmic environment activates long-lived and efficient cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng.* 86(1):19-26.
- Jiang X, Bett GC, Li X, Bondarenko VE, Rasmusson RL. (2003).** C-type inactivation involves a significant decrease in the intracellular aqueous pore volume of Kv1.4 K⁺ channels expressed in Xenopus oocytes. *J Physiol.* 549(Pt 3): 683–695.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. (2003).** X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature.* 423(6935):33-41.
- Jiang QX, Wang DN, MacKinnon R. (2004).** Electron microscopic analysis of KvAP voltage-dependent K⁺ channels in an open conformation. *Nature.* 430(7001):806-10.
- Joseph BK, Thakali KM, Pathan AR, Kang E, Rusch NJ, Rhee SW. (2011).** Postsynaptic density-95 scaffolding of Shaker-type K⁺ channels in smooth muscle cells regulates the diameter of cerebral arteries. *J Physiol.* 589 (Pt 21): 5143-52.
- Jun SY, Kang SH, Lee KH. (2008).** Continuous-exchange cell-free protein synthesis using PCR generated DNA and an RNase E-deficient extract. *Biotechniques* 44(3): 387-91.
- Kaptein R, Wagner G. (2015).** NMR studies of membrane proteins. *J Biomol NMR.* 61(3-4): 181-4.
- Katzen F, Chang G, Kudlicki W. (2005).** The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol* 23(3): 150-6.
- Keller EB, Zamecnik PC. (1956).** The effect of guanosine diphosphate and triphosphate on the incorporation of labeled amino acids into proteins. *J Biol Chem* 221(1): 45-59.
- Kessler D, Knappe J. (1996).** Anaerobic dissimilation of pyruvate. In: Neidhardt FC, Curtiss RI, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M,

Umbarger H E, editors. (1996). Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology. Washington, DC: ASM Press. p 199–205.

Kigawa T, Yabuki T, Matsuda N, Matsuda T, Nakajima R, Tanaka A, Yokoyama S. (2004). Preparation of Escherichia coli cell extract for highly productive cell-free protein expression. J Struct Funct Genomics 5(1-2): 63-8.

Kim DM, Choi CY. (1996). A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. Biotechnol Prog 12, 645-9.

Kim DM, Swartz JR. (2001). Regeneration of adenosine triphosphate from glycolytic intermediates for cell-free protein synthesis. Biotechnol Bioeng 74, 309-16

Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, Sheng M. (1995). Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. Nature. 378 85-8.

Kim E, Sheng M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. Nat Rev Neurosci. 5(10):771-81.

Kim TW, Kim DM, Choi CY. (2006) Rapid production of milligram quantities of proteins in a batch cell-free protein synthesis system. J Biotechnol 124(2) 373-80.

Kjaergaard M, Brander S, Poulsen FM. (2011). Random coil chemical shift for intrinsically disordered proteins: effects of temperature and pH. J Biomol NMR. 49(2):139-49.

Klammt C, Schwarz D, Dötsch V, Bernhard F. (2007). Cell-free production of integral membraneproteins on a preparative scale. Methods Mol Biol 375: 57-78.

Kremer C, Lützen A. (2013). Artificial allosteric receptors. Chemistry. 19(20):6162-96.

Kremer W, Weyand M, Winklmeier A, Schreier C, Kalbitzer HR. (2013). 1.2 Å X-ray structure of the renal potassium channel Kv1.3 T1 domain. Protein J. 32(7):533-42.

Kreusch A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S. (1998). Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. Nature. 392(6679):945-8.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-5.

Landau JV. (1967). Induction, transcription and translation in Escherichia coli: a hydrostatic pressure study. Biochim Biophys Acta. 149(2):506-12.

Li X, Bett GC, Jiang X, Bondarenko VE, Morales MJ, Rasmusson RL. (2003). Regulation of N- and C-type inactivation of Kv1.4 by pH and K⁺: evidence for transmembrane communication. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 284(1):H71-80.

Liu HL, Chen CW, Lin JC. (2005). Homology models of the tetramerization domain of six eukaryotic voltage-gated potassium channels Kv1.1-Kv1.6. J Biomol Struct Dyn. 22(4):387-98.

Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. (2005a). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309: 897–903.

Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. (2005b). Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309: 903-8.

López-Barneo J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW. (1993). Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors Channels*. 1:61–71.

Lu B, Li Q, Liu WY, Ruan KC. (1997). Effects of hydrostatic pressure on the activity of rat ribosome and cell-free translation system. *Biochem Mol Biol Int*. 43(3):499-506.

MacKinnon R. (2003). Potassium channels. *FEBS Lett*. 555(1): 62-5.

Magidovich E, Orr I, Fass D, Abdu U, Yifrach O. (2007). Intrinsic disorder in the C-terminal domain of the Shaker voltage-activated K⁺ channel modulates its interaction with scaffold proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(32):13022-7.

Majorek KA, Kuhn ML, Chruszcz M, Anderson WF, Minor W. (2014). Double trouble-Buffer selection and His-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. *Protein Sci*. 23(10):1359-68.

Meyer SM (2005). NMR-spektroskopische Charakterisierung der C-terminalen Domäne des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.4 und ihrer Interaktion mit der T1-Domäne und einer PDZ-Domäne. Diplomarbeit. Universität Regensburg.

Milescu M, Lee HC, Bae CH, Kim JI, Swartz KJ. (2013). Opening the shaker K⁺ channel with hanatoxin. *J Gen Physiol*. 141(2):203-16.

Minor DL, Lin YF, Mobley BC, Avelar A, Jan YN, Jan LY, Berger JM. (2000). The polar T1 interface is linked to conformational changes that open the voltage-gated potassium channel. *Cell*. 102(5): 657-70.

Monod J, Wyman J, Changeux JP (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible Model. *J Mol Biol*. 12: 88-118.

Moore CL, Nelson PL, Parekkar NK, Rusch NJ, Rhee SW. (2014). Protein kinase A-phosphorylated KV1 channels in PSD95 signaling complex contribute to the resting membrane potential and diameter of cerebral arteries. *Circ Res*. 2014. 114(8):1258-67.

Morales MJ, Wee JO, Wang S, Strauss HC, Rasmusson RL. (1996). The N-terminal domain of a K⁺ channel beta subunit increases the rate of C-type inactivation from the cytoplasmic side of the channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:15119–23.

Myasnikov AG, Simonetti A, Marzi S, Klaholz BP. (2009). Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. *Curr Opin Struct Biol* 19, 300-9.

Neidhardt FC. (1987) Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1654 p.

Nevin DE, Pratt JM. (1991). A coupled in vitro transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter. FEBS Lett 291(2): 259-63.

Nirenberg MW, Matthaei JH. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polynucleotides. Proc Natl Acad Sci U S A 47: 1588-602.

Pal SK, Takimoto K, Aizenman E, Levitan ES. (2006). Apoptotic surface delivery of K⁺ channels. Cell Death Differ. 13(4):661-7.

Pegan S, Tan J, Huang A, Slesinger PA, Riek R, Choe S. (2007). NMR Studies of Interactions between C-Terminal Tail of Kir2.1 Channel and PDZ1,2 Domains of PSD95. Biochemistry. 46: 5315-22.

Pervushin, K. (2000). Impact of transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY) on NMR as a technique in structural biology. Q. Rev Biophys. 33(2):161-97.

Pischalnikova AV, Sokolova OS. (2009). The domain and conformational organization in potassium voltage-gated ion channels. J Neuroimmune Pharmacol. 4(1):71-82.

Pratt, J.M. (1984). Coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free systems. In Transcription and Translation: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, UK.

Rasmusson RL, Morales MJ, Castellino RC, Zhang Y, Campbell DL, Strauss HC. (1995). C-type inactivation controls recovery in a fast inactivating cardiac K⁺ channel (Kv1.4) expressed in Xenopus oocytes. J Physiol. 489: 709-721.

Roberts EB. (1958). Microsomal Particles and Protein Synthesis. Pergamon Press, London, UK.

Rosnizeck IC, Filchtinski D, Lopes RP, Kieninger B, Herrmann C, Kalbitzer HR, Spoerner M. (2014). Elucidating the mode of action of a typical Ras state 1(T) inhibitor. Biochemistry 53(24):3867-78.

Sankaranarayanan K, Varshney A, Matheu MK. (2005). N type rapid inactivation in human Kv1.4 channels: functional role of a putative C-terminal helix. Mol Membr Biol. 22(5) 389-400.

Schindler PT, Macherhammer F, Arnold S, Reuss M, Siemann M. (1999) Investigation of translation dynamics under cell-free protein biosynthesis conditions using high-resolution two dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis 20, 806-12.

Schindler PT, Baumann S, Reuss M, Siemann M. (2000). In vitro coupled transcription translation: effects of modification in lysate preparation on protein composition and biosynthesis activity. Electrophoresis 21, 2606-9.

Schneider B, Junge F, Shirokov VA, Durst F, Schwarz D, Dötsch V, Bernhard F. (2010). Membrane protein expression in cell-free systems. Methods Mol Biol 601, 165-86.

Schönherr R, Mannuzzu LM, Isacoff EY, Heinemann SH. (2002). Conformational switch between slow and fast gating modes: allosteric regulation of voltage sensor mobility in the EAG K⁺ channel. *Neuron.* 35(5): 935-49.

Schreier C. (2006). NMR-spektroskopische und biochemische Charakterisierung der Tetramerisierungsdomäne des spannungsgesteuerten Kaliumkanals Kv1.4 und ihrer Interaktionen mit den N- und C-terminalen cytosolischen Domänen des Kanalproteins. Doktorarbeit. Universität Regensburg.

Schreier C, Auer A, Kalbitzer HR, Kremer W. (2009). NMR assignments of a 48 kDa tetramer of the T1 domain of the mammalian voltage gated potassium channel Kv1.4. *Biomol NMR Assign.* 3(2):167-70.

Schumann FH, Riepl H, Maurer T, Gronwald W, Neidig KP, Kalbitzer HR. (2007). Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions. *39(4): 275-89.*

Schwarz JR, Landau JV. (1972). Inhibition of cell-free protein synthesis by hydrostatic pressure. *J Bacteriol.* 112(3):1222-7.

Sette M, van Tilborg P, Spurio R, Kaptein R, Paci M, Gualerzi CO, Boelens R. (1997). The structure of the translational initiation factor IF1 from E.coli contains an oligomer-binding motif. *16(6):1436-43.*

Shaw WV. (1975). Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol* 43: 737-55.

Shi G, Nakahira K, Hammond S, Rhodes KJ, Schechter LE, Trimmer JS. (1996). Beta subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron.* 16(4):843-52.

Siekevitz P. (1952). Uptake of radioactive alanine in vitro into the proteins of rat liver fractions. *J Biol Chem* 195(2): 549-65.

Singer-Lahat D, Sheinin A, Chikvashvili D, Tsuk S, Greitzer D, Friedrich R, Feinshreiber L, Ashery U, Benveniste M, Levitan ES, Lotan I. (2007). K⁺ channel facilitation of exocytosis by dynamic interaction with syntaxin. *J Neurosci.* 27(7): 1651-8.

Sokolova O, Kolmakova-Partensky L, Grigorieff N.(2001). Three-dimensional structure of a voltage- gated potassium channel at 2.5nm resolution. *Structure* 9(3): 215–20.

Sokolova O, Accardi A, Gutierrez D, Lau A, Rigney M, Grigorieff N. (2003). Conformational changes in the C terminus of Shaker K⁺ channel bound to the rat Kvbeta2-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(22): 12607-12.

Spirin AS, Swartz JR. (2008). Cell-Free Protein Synthesis Systems: Historical Landmarks, Classification, and General Methods, in *Cell-Free Protein Synthesis: Methods and Protocols*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany.

- Stigers DJ, Watts ZI, Hennessy JE, Kim HK, Martini R, Taylor MC, Ozawa K, Keillor JW, Dixon NE, Easton CJ. (2010).** Incorporation of chlorinated analogues of aliphatic amino acids during cell-free protein synthesis. *Chem Commun (Camb)* 47(6), 1839-41.
- Tochio H, Hung F, Li M, Bredt DS, Zhang M. (2000).** Solution structure and backbone dynamics of the second PDZ domain of postsynaptic density-95. *J Mol Biol.* 295(2):225-37.
- Topinka JR, Bredt DS. (1998).** N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel Kv1.4. *Neuron.* 20(1):125-34.
- Tseng-Crank J, Yao JA, Berman MF, Tseng GN. (1993).** Functional role of the NH₂-terminal cytosolic domain of the mammalian A-type K channel. *J Gen Physiol.* 102(6):1057-83.
- Underwood KA, Swartz JR, Puglisi JD. (2005).** Quantitative polysome analysis identifies limitations in bacterial cell-free protein synthesis. *Biotechnol Bioeng.* 91, 425-35.
- Uysal S, Cuello LG, Cortes DM, Koide S, Kossiakoff AA, Perozo E. (2011).** Mechanism of activation gating in the full-length KcsA K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(29): 11896-9.
- Vacher H, Trimmer JS. (2011).** Diverse roles for auxiliary subunits in phosphorylation-dependent regulation of mammalian brain voltage-gated potassium channels. *Pflugers Arch.* 462(5): 631-43.
- Varhsney A, Chanda B, Mathew MK. (2004).** Arranging the elements of the potassium channel: the T1 domain occludes the cytoplasmic face of the channel. *Eur Biophys J.* 33: 370-6.
- Venkataraman G, Sri Kumar D, Holmgren M. (2014).** Quasi-specific access of the potassium channel inactivation gate. *Nat Commun.* 5:4050.
- Voges D, Watzele M, Nemetz C, Wizemann S, Buchberger B. (2004).** Analyzing and enhancing mRNA translational efficiency in an Escherichia coli in vitro expression system. *Biochem Biophys Res Commun.* 318, 601-14.
- Wang DT, Hill AP, Mann SA, Tan PS, Vandenberg JI. (2011).** Mapping the sequence of conformational changes underlying selectivity filter gating in the K(v)11.1 potassium channel. *Nat Struct Mol Biol.* 18: 35-41.
- Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT. (1996).** Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet.* 12(1):17-23.
- Wang S, Morales MJ, Qu YJ, Bett GC, Strauss HC, Rasmusson RL. (2003).** Kv1.4 channel block by quinidine: evidence for a drug-induced allosteric effect. *J Physiol.* 546(Pt 2): 387-401.
- Watanabe H, Nagata E, Kosakai A, Nakamura M, Yokoyama M, Tanaka K, Sasai H. (2000).** Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability. *J Neurochem.* 75(1):28-33.

Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Moghaddas Gholami A, Lieberenz M, Savitski MM, Ziegler E, Butzmann L, Gessulat S, Marx H, Mathieson T, Lemeer S, Schnatbaum K, Reimer U, Wenschuh H, Mollenhauer M, Slotta-Huspenina J, Boese JH, Bantscheff M, Gerstmair A, Faerber F, Kuster B. (2014). Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature.* 509(7502): 582-7.

Winnick T. (1950). Studies on the mechanism of protein synthesis in embryonic and tumor tissues. I. Evidence relating to the incorporation of labeled amino acids into protein structure in homogenates. *Arch Biochem* 27(1): 65-74.

Wishart, D. S., C. G. Bigam, et al. (1995). "1H, 13C and 15N chemical shift referencing in biomolecular NMR." *J Biomol NMR* 6(2): 135-140.

Wissmann R, Baukrowitz T, Kalbacher H, Kalbitzer HR, Ruppersberg JP, Pongs O, Antz C and Fakler B (1999). NMR structure and functional characteristics of the hydrophilic N terminus of the potassium channel β-subunit Kvbeta 1.1. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (50): 35521-5.

Wissmann R, Bildl W, Oliver D, Beyermann M, Kalbitzer HR, Bentrop D, Fakler B. (2003). Solution structure and function of the “tandem inactivation domain” of the neuronal A-type potassium channel Kv1.4. *J Biol Chem* 278: 16142-50.

Wüthrich K. (1986). NMR of Proteins and Nucleic Acids. John Wiley & Sons, New York.

Wüthrich K. (1990). Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *J Biol Chem.* 265 (36): 22059–62.

Yellen G. (1998). The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys.* 31: 239-95.

Yellen,G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature.* 419: 35-42.

Yusaf SP, Wray D, Sivaprasadarao A. (1996). Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel. *Pflugers Arch.* 433(1-2):91-7.

Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. (1994). Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature.* 372:97–100.

Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R. (2001). Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411: 657-661.

10. Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångstrom
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
beta-Me	β -Mercaptoethanol
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CFPS	cell-free protein synthesis
CoA	Coenzym A
cs	cold shock
Csp	Kälteschockprotein (cold shock protein)
CspA	cold shock protein A
CTP	Cytidintriphosphat
CV	Säulenvolumen (column volume)
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
DTNB	5,5'-Dithio-Bis (2-Nitrobenzoic Acid)
DTE	Dithioerythritol

DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylediamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung 1 g=9,81 ms ⁻²
GB	Gauss-Faktor
GdmHCl	Guanidiniumchlorid
GDP	Guanosindiphosphat
GM	Gauss-Multiplikation des FID
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	GTP hydrolysierendes Protein
H	Histidin
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
His ₆₋₁₀	6 bis 10 Histidine in Folge
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IF	Initiationsfaktor
inkl.	inklusive
IP	Inaktivierungspeptid (Inactivation Peptide)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
KPi	anorganisches Kaliumphosphat (Puffer)
K _V	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal
LB	Luria Bertani
LB	Linienverbreiterungs-Faktor für EM
M	Stoffmengenkonzentration (mol/l)
M _R	relative Molekülmasse
MDa	Mega Dalton
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Stoffmengenkonzentration (mmol/l)
mRNA	messenger RNA
MTSL	S-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonothioate
MW	molekulare Masse
MWCO	molecular weight cut-off
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Stoffmengenkonzentration (µmol/l)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMM	New Minimal Medium
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NOE	Nuclear Overhauser effect
ns	Number of scans
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	RCSB Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RF	Freisetzungsfaktor (release)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
rel.	relativen
RRF	Ribosomen Recycling Faktor
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Shine Dalgarno (Sequenz)
SDS	Natriumdodecylsulfat

SI	Size of real spectrum
s.u.	siehe unten
SV	Säulenvolumen
T1	Tetramerisierungsdomäne eines Kv Kanalproteins
Tab.	Tabelle
TD	Size of fid
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TL-Faktor	Translationsfaktor (TL)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TROSY	Transverse relaxation-optimized spectroscopy
TSS	Transformation & Storage Solution
üN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenanteil
w/v	'weight per volume'
z.B.	zum Beispiel

10.2 Abbildungen

Abb. 10.1: Vergleich von Kv 1.3 T1 (51-155, *Homo sapiens*) mit Kv1.4 T1 (175-262, *Rattus norvegicus*)

Kv1.3	1	MERVVINISGLRFETQLKTLQFPETLLGDPKRRMRYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYYY	60
		MERVVIN+SGLRFETQ+KIL QFPETLLGDP++R +YFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYYY	
Kv1.4	1	MERVVINVSGLRFETQMKTIAQFPETLLGDPEKRTQYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYYY	60
	61	YQSGGRIRRPNVPIDIFSEEIRFYQLG 88	
		YQSGGR++RPVNVP DIF+EE++FYQLG	
	61	YQSGGRLKRPVNVPFDIFTEEVKFYQLG 88	

Abb. 10.2: Verwendete Konstrukte von Kv1.4

Markierung: IP75 (grün), T1K (gelb), C84 (blau).

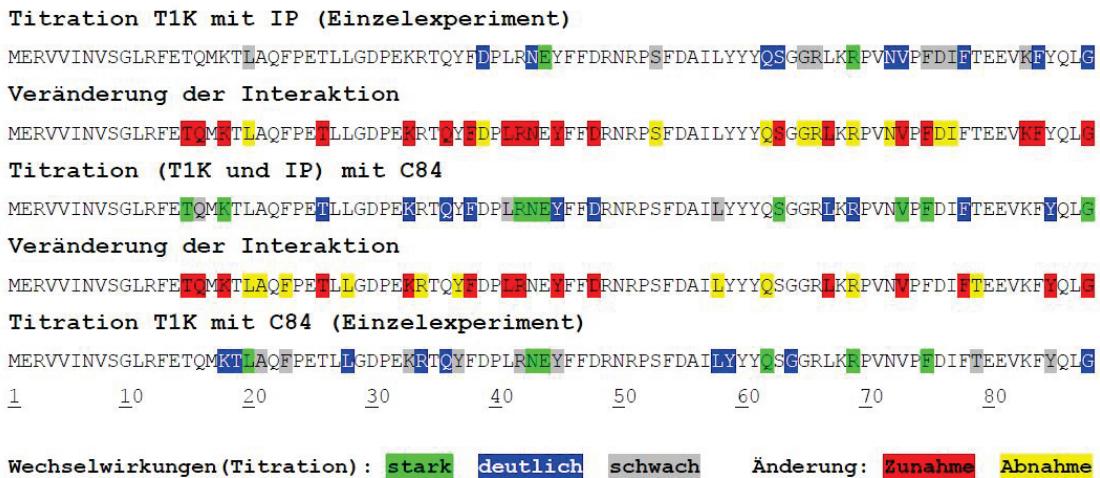
```

1 mevamvsaes sgcnshmpyg yaagararer erlahsraaa alavaaataa vegrsggg
61 phhhqtrga ysshdpqgsr gsrrrrqrq ekklhhrqs sfphcsdlmp sgseekilre
121 lseeee edee eeeeeegrf yyseedhgqg csytdllpqd dgggggyssv rysdcervv
181 invsglrfe qmktaqfpe tllgdpekrty qyfdplrnay ffdnmpsfd ailyyyqsgg
241 rlkrpvnvpf difteevkfy qlgeeallkf redegfvre edralpenef kkqiwlley
301 pesssparai aivsvlvi sivfcletl pefrddrdli malsagghsr llndtsaphl
361 ensghtifnd pffivetvci wfsfefvvr cfacpsqalf fknimniidi vsilpyfitl
421 gtdlaqqqgg gngqqqqams failriirlv rvfrifklsr hskglqilgh tlrasmrelg
481 llifflfigv ilfssavyfa eadeptthfq sipdafwwav vtmmtvgygd mkpitvgk
541 vgslciaiagv ltialpvivi vsnfnyfyhr eteneeqtql tqnavscpvl psnllkkfrs
601 stssslgdks eylemeegvk eslcgkeekc qgkgddsetd knncsnakav etdv

```

Abb. 10.3: Grundlage für Abschnitt 4.8.1

Schreier (2006): Seite 113;



10.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Bakterienstämme	S. 26
Tab. 2.2: Plasmidvektoren	S. 26
Tab. 2.3: Proteine (Enzyme)	S. 26
Tab. 2.4: Oligonukleotide	S. 27
Tab. 2.5: Kits und Kitbestandteile	S. 27
Tab. 2.6: Chromatographie-Säulen (ÄKTA System)	S. 27
Tab. 2.7: Ausgangsplasmide	S. 28
Tab. 2.8: Wichtige Verbrauchsmaterialien	S. 28
Tab. 2.9: Verwendete Geräte	S. 28
Tab. 2.10: Computerprogramme	S. 29
Tab. 3.1: Flüssigmedien von Bakterien	S. 31
Tab. 3.2: Antibiotika Stammlösungen	S. 32
Tab. 3.3: LB-Agar	S. 32
Tab. 3.4: TSS-Medium	S. 33
Tab. 3.5: Pipettierschema einer PCR-Reaktion (Phusion-Polymerase)	S. 35
Tab. 3.6: PCR-Programm (Phusion Polymerase)	S. 35
Tab. 3.7: Pipettierschema einer Kolonie-PCR	S. 35
Tab. 3.8: PCR-Programm einer Kolonie-PCR	S. 36
Tab. 3.9: Pipettierschema Restriktionsverdau	S. 36
Tab. 3.10: Lösungen für die Agarose Gelelektrophorese	S. 37
Tab. 3.11: Pipettierschema Ligationsansatz	S. 38
Tab. 3.12: SDS-PAGE Lösungen	S. 39
Tab. 3.13: Pipettierschema Trenngel und Sammelgel	S. 40
Tab. 3.14: Färbe- und Entfärbe Lösungen	S. 40
Tab. 3.15: Pufferbedingungen der Nickel-Affinitätschromatographie	S. 41
Tab. 3.16: Medien für die CFPS	S. 46
Tab. 3.17: Lösungen für die CFPS	S. 48
Tab. 2.18: Herstellung LMY (90,7 ml)	S. 48
Tab. 3.19: Pipettierschema einer CFPS-Reaktion (30µl-Ansatz)	S. 48
Tab. 3.20: Benötigte Lösungen für die CAT-Testlösung	S. 49
Tab. 3.21: CAT-Testlösung (20 ml)	S. 49

10.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Phylogenetischer Baum der spannungsabhängigen Kaliumkanäle.	S. 6
Abb. 1.2: Tetramere Grundstruktur eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals (K_v).	S. 7
Abb. 1.3: Struktur eines K_v -Kanals.	S. 8
Abb. 1.4: Elektronendichtekarte und strukturelle Orientierung auf dem $K_v1.2$ Ionenkanal.	S. 10
Abb. 1.5: Konformationszustände des spannungsabhängigen K_v -Kanals.	S. 11
Abb. 1.6: Paddle-Modell: Aktivierung eines K_v -Kanals.	S. 12
Abb. 1.7: Grundaufbau der K_v1-K_v4 Kanäle.	S. 14
Abb. 1.8: Einteilung cytosolischer Strukturen und funktioneller Domänen von K_v1 bis K_v4 Kanälen.	S. 15
Abb. 1.9: Kristallstruktur einer K_v T1-Domäne.	S. 16
Abb. 1.10: Struktur und Orientierung des N-terminalen Inaktivierungspeptides im K_v -Kanal.	S. 18
Abb. 1.11: 3D-Struktur und EM-Bilder eines spannungsgesteuerten K_v WT und $K_v \Delta C$ Kanals.	S. 20
Abb. 1.12: Mögliche Lokalisation des K_v C-terminus an der T1-Domäne.	S. 21
Abb. 1.13: Schematische Darstellung von PSD-95 und der PDZ2-Domäne von PSD-95.	S. 23
Abb. 3.1: Eichung einer 26/600 Gelfiltrationssäule.	S. 44
Abb. 4.1: Aminosäuresequenzen (AS) der $K_v1.4$ T1-Konstrukte.	S. 53
Abb. 4.2: Verdau des T1K ($K_v1.4$ T1 - 92AS) Konstruktes mit Thrombin.	S. 55
Abb. 4.3: Analytische Gelfiltrationsläufe der $K_v1.4$ T1-Konstrukte.	S. 56
Abb. 4.4: Räumliche Darstellung des T1Ktag ($K_v1.4$ T1 - 101AS) und des T1K ($K_v1.4$ T1 - 91AS) Homotetramers.	S. 56
Abb. 4.5: Zugeordnete 2D-[^{15}N , ^1H]-TROSY-HSQC Spektren der $K_v1.4$ T1-Konstrukte.	S. 57

Abb. 4.6: Vergleich von T1Ktag (K_v 1.4 T1 - 101 AS) mit dem T1K (K_v 1.4 T1 - 91 AS) Konstrukt.	S. 58
Abb. 4.7: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.6 auf das K_v 1.4 T1-Strukturmodell (Abschn. 4.1.3).	S. 58
Abb. 4.8: K_v 1.3 T1-Modell des <i>shaker</i> Kaliumkanals (<i>Homo sapiens</i>).	S. 59
Abb. 4.9: Aminosäuresequenz (AS) des K_v 1.4 IP75-Konstruktes.	S. 60
Abb. 4.10: Verdau des GST-IP75 Konstruktes mit Thrombin.	S. 61
Abb. 4.11: Zugeordnetes 2D-[^{15}N , ^1H]-TROSY-HSQC Spektrum des K_v 1.4 IP75-Peptides.	S. 62
Abb. 4.12: Aminosäuresequenz (AS) des K_v 1.4 C84-Konstruktes.	S. 63
Abb. 4.13: Reinheitskontrolle von K_v 1.4 C84.	S. 63
Abb. 4.14: Zugeordnetes 2D-[^{15}N , ^1H]-TROSY-HSQC Spektren des K_v 1.4 C84-Peptides.	S. 64
Abb. 4.15: MD-Simulation von K_v 1.4 C84 ("Abalone" Biomolecular Modelling, Agile Molecule).	S. 65
Abb. 4.16: Ergebnis der K_v 1.4 C84-Temperaturreihe von 278 K auf 293 K.	S. 66
Abb. 4.17: Darstellung der Ergebnisse aus Abb. 4.16 auf dem C84 MD-Modell.	S. 67
Abb. 4.18: Ergebnis der ^{15}N IP75 Protein-Protein Interaktion mit dem unmarkiertem C84-Peptid.	S. 68
Abb. 4.19: Ergebnisse der ^2H ^{15}N T1K Protein-Protein Titration mit einem unmarkiertem IP75-Peptid.	S. 69
Abb. 4.20: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.19 und Abb. 4.21 auf die T1K-Struktur.	S. 70
Abb. 4.21: Darstellung der Resonanzsignale, welche im Verlauf der Titration aufspalteten.	S. 71
Abb. 4.22: Darstellung der Aminosäuren Y59 und K68, deren Signale im Verlauf der Protein-Protein Titration aufspalten.	S. 71
Abb. 4.23: Beträge der Verschiebungen von sechs ausgewählten deutlich, verschobenen Signalen des T1K-Konstrukts aufgetragen gegen die Konzentration des IP75-Peptides.	S. 72

Abb. 4.24: Ergebnisse der ^{15}N IP75 Protein-Protein Interaktion mit dem T1K-Homotetramer.	S. 73
Abb. 4.25: Darstellung der Ergebnisse aus Abb. 4.24 auf der IP75-Struktur.	S. 73
Abb. 4.26: Ergebnisse der $^2\text{H}^{15}\text{N}$ T1K Protein-Protein Titration mit einem unmarkierten C84-Peptid.	S. 75
Abb. 4.27: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.26 auf die T1K-Struktur.	S. 75
Abb. 4.28: Beträge der Verschiebungen von vier ausgewählten, deutlich verschobenen Signalen des T1K-Konstrukts aufgetragen gegen die Konzentration des C84-Peptides.	S. 76
Abb. 4.29: Ergebnisse der ^{15}N C84 Protein-Protein Interaktion mit dem T1K-Homotetramer.	S. 78
Abb. 4.30: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.29 auf die Struktur des C84-Peptides.	S. 79
Abb. 4.31: Darstellung der chemischen Verschiebungen aus der Protein-Protein Interaktion von ^{15}N IP75 mit der T1K-Domäne und dem C84-Peptid.	S. 80
Abb. 4.32: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Abb. 4.31.	S. 81
Abb. 4.33: Volumenänderungen bei der Protein-Protein Titration von ^{15}N IP75 mit der T1K-Domäne und dem C84-Peptid.	S. 82
Abb. 4.34: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus und Abb. 4.31 und Abb. 4.33 auf der räumlichen Struktur des IP75-Inaktivierungspeptides.	S. 84
Abb. 4.35: Graphische Darstellung des T1K-Homotetramers mit seiner Elektronen- und LadungsdichteVerteilung (oben) und mit seinen Protein-Protein Kontaktstellen mit dem N-terminalen Inaktivierungspeptid IP75 (unten).	S. 85
Abb. 4.36: Darstellung des IP75-Inaktivierungspeptides in der Elektronen- und LadungsdichteVerteilung und die Protein-Protein Interaktionsdaten des IP75-Peptides mit der T1K-Domäne und dem C84-Peptid aus Abschnitt 4.6.	S. 86
Abb. 4.37: Graphische Darstellung der Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen den beiden Peptiden IP75 und C84 mit der T1Ktag-Domäne auf der T1Ktag-Struktur (Datensatz: Schreier 2006).	S. 88
Abb. 4.38: Darstellung der chemischen Verschiebungen aus der Protein-Protein Titration von $^2\text{H}^{15}\text{N}$ T1K mit den beiden Peptiden IP75 und C84.	S. 90

Abb. 4.39: Graphische Darstellung der Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen den beiden Peptiden IP75 und C84 mit der T1K-Domäne auf der T1K-Struktur.	S. 91
Abb. 4.40: Volumenänderungen bei der Protein-Protein Interaktion von ^2H ^{15}N T1K mit den beiden Peptiden IP75 und C84.	S. 92
Abb. 4.41: Graphische Darstellung der Wechselwirkung beider Peptide mit der T1K-Domäne auf der T1K-Proteinstruktur.	S. 93
Abb. 4.42: Aminosäuresequenz und Struktur der PDZ2-Domäne von PSD-95.	S. 94
Abb. 4.43: Aufreinigung und Reinheitskontrolle der PDZ2-Domäne von PSD-95.	S. 94
Abb. 4.44: 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Spektrum der PDZ2-Domäne von PSD-95.	S. 95
Abb. 4.45: Ergebnis der Protein-Protein Interaktion von ^{15}N C84 mit PDZ2.	S. 96
Abb. 4.46: Bindungscharakterisierung zwischen dem C84-Peptid und dem PDZ2-Protein.	S. 97
Abb. 4.47: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.45 auf das C84 MD-Strukturmodell.	S. 97
Abb. 4.48: 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Spektren des C84-Peptides mit dem PDZ2-Protein.	S. 98
Abb. 4.49: 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Spektren des ^{15}N PDZ2-Proteins mit dem C84-Peptid.	S. 99
Abb. 4.50: Darstellung der chemischen Verschiebungen aus der Protein-Protein Titration von ^{15}N C84 mit der T1K-Domäne und dem PDZ2-Protein.	S. 101
Abb. 4.51: Volumenänderungen bei der Protein-Protein Titration von ^{15}N C84 mit der T1K Domäne und dem PDZ2-Protein.	S. 102
Abb. 4.52: Graphische Darstellung der Protein-Protein Interaktionsergebnisse aus Abb. 4.50 und 4.51 auf dem C84 MD-Modell.	S. 103
Abb. 4.53: 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC NMR-Spektren des ^{15}N C84-Konstruktes mit der T1K-Domäne und seinem Bindepartner, der PDZ2-Domäne.	S. 104
Abb. 4.54: Aminosäuresequenz der K _V 1.4 C84-Mutante (C84M) und Darstellung der Lage der Cysteine auf der C84-Peptidstruktur zur besseren Orientierung.	S. 105
Abb. 4.55: 2D-[$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-TROSY-HSQC Spektren des C84- und C84M-Peptides.	S. 106

Abb. 4.56: Vergleich des C84- und C84M-Peptides bei der Interaktion mit dem T1K-Tetramer.	S. 107
Abb. 4.57: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.56 auf die T1K-Struktur.	S. 108
Abb. 4.58: Volumenänderungen bei der Protein-Protein Interaktion von ^2H ^{15}N T1K mit dem C84M-Peptid.	S. 108
Abb. 4.59: Übertragung der Ergebnisse aus Abb. 4.56 und Abb. 4.58 auf die T1K-Struktur.	S. 109
Abb. 5.1: Aufgereinigte TL- Faktoren (Initiationsfaktoren (IF), Elongationsfaktoren (EF) und Terminationsfaktoren (TF)).	S. 111
Abb. 5.2: Zugeordnetes 2D-[^{15}N , ^1H] HSQC Spektrum des Initiationsfaktors IF-1.	S. 112
Abb. 5.3: Einfluss der TL-Faktoren auf die CFPS-Syntheseleistung.	S. 114
Abb. 5.4: Graphische Darstellung der 5`UTR mRNA Sekundärstruktur von CspA bei 37° C und 10° C.	S. 115
Abb. 5.5: CFPS-Reaktionen von CAT und csCAT (5`UTR CspA Sequenz) bei unterschiedlichen Temperaturen.	S. 116
Abb. 5.6: Einfluss von Glycerol und zusätzlicher T7-RNA Polymerase bei niedriger Temperatur auf die CFPS-Reaktion.	S. 118
Abb. 5.7: HEPES-KOH NMR pH-Reihe.	S. 119
Abb. 5.8: pH-Änderungen einer CFPS-Reaktion über einen definierten Zeitrahmen bei 277 K und 310 K.	S. 120
Abb. 5.9: Dargestellt wird der Effekt von hydrostatischem Druck auf die CFPS-Aktivität.	S. 123
Abb. 5.10: Wiederherstellung des CFPS-Reaktion nach einem Druckabbau.	S. 124
Abb. 5.11: Dargestellt wird der Effekt von hydrostatischem Druck auf isolierte S30-Zelllysate.	S. 125
Abb. 6.1: Schematischer Aufbau eines spannungsabhängigen $\text{K}_v1.4$ Kaliumkanals.	S. 126
Abb. 6.2: Graphische Darstellung des T1K-Tetramers und des IP75-Peptids in der Elektronen- und Ladungs-dichteVerteilung mit ihren gegenseitigen Protein-Protein Interaktionsflächen.	S. 140

- Abb. 6.3: Möglicher Interaktionsbereich des IP75-Peptides, dargestellt auf dem T1K-Tetramer in der Elektronen und Ladungsdichteverteilungs-darstellung. S. 141
- Abb. 6.4: Interaktionsmodell zwischen dem Kv1.4 T1K-Homotetramer und dem N-terminalen Inaktivierungspeptid. S. 143
- Abb. 6.5: Räumliche Darstellung der Bindung zwischen dem Kv1.4 C-Terminus (C84), der Kv1.4 T1-Domäne und dem PSD-95 PDZ2-Protein. S. 146
- Abb. 10.1: Vergleich von Kv1.3 T1 (51-155, *Homo sapiens*) mit Kv1.4 T1 (175-262, *Rattus norvegicus*) S. 171
- Abb. 10.2: Verwendete Konstrukte von Kv1.4 S. 172
- Abb. 10.3: Grundlage für Abschnitt 4.8.1 S. 172

10.5 Sequenzielle Zuordnungen der cytosolischen Kv1.4 Konstrukte

Sequentielle Zuordnung von Kv1.4 T1 (mit His₆-tag): 293 K - 300 mM KPi; pH 6,8

Ursprüngliche Zuordnung: Schreier (2006)

Residue	N ^H	H ^N
R3	113,8	7,22
V4	123,9	8,83
V5	127,0	8,77
I6	129,0	9,43
N7	128,8	9,65
V8	126,3	8,88
S9	119,3	8,60
G10	112,1	8,93
L11	128,2	8,36
R12	126,7	8,17
F13	126,2	9,87
E14	120,8	7,52
T15	114,7	8,34
Q16	121,6	8,80
M17	125,6	8,96
K18	116,5	8,19

T19	116,3	7,35
L20	120,8	7,04
A21	118,0	7,25
Q22	121,1	7,05
F23	117,8	7,66
P24		
E25	115,8	8,32
T26	119,3	7,36
L27	119,7	6,77
L28	116,3	6,72
G29	104,2	7,25
D30	121,8	7,11
P31		
E32		
K33	119,5	7,83
R34	120,1	7,70
T35	116,3	7,35
Q36	120,1	7,64
Y37	117,9	7,90
F38	123,0	7,75
D39	129,3	8,39
P40		
L41	120,2	9,33
R42	130,2	8,79
N43	128,2	8,68
E44	127,4	8,30
Y45	121,0	8,66
F46	124,3	8,55
F47	125,1	8,31
D48	130,0	8,96
R49	116,6	6,86
N50	119,4	7,89
R51	113,9	6,88
P52		
S53	120,6	7,81
F54	124,6	9,23
D55	118,7	9,08
A56	116,9	7,82
I57	114,0	6,91
L58	117,9	8,00
Y59	123,7	7,54
Y60		
Y61	115,5	7,24
Q62	118,3	7,70
S63	111,5	8,01
G64	110,0	7,63

G65	108,1	8,35
R66	121,5	7,52
L67	114,4	7,04
K68	117,4	8,74
R69	125,8	9,28
P70		
V71	119,7	8,33
N72	113,8	8,28
V73	123,4	7,65
P74		
F75	110,9	7,70
D76	119,5	7,71
I77	122,3	7,23
F78	119,9	8,30
T79	113,1	8,36
E80	121,1	7,03
E81	116,5	8,75
V82	120,4	8,09
K83	117,9	7,49
F84	124,1	7,90
Y85	113,8	8,17
Q86	118,9	7,78
L87	125,3	8,49
G88	107,4	8,10
K89	111,2	8,58
L90	124,1	8,25
A91	124,9	8,18
A92	122,3	8,09
A93	122,6	8,04
L94	120,9	7,95
E95	121,2	8,12
H96	120,5	8,30
H97	121,7	8,71
H98	121,5	8,54

Sequentielle Zuordnung von Kv1.4 T1 (ohne His₆-tag): 293 K - 150 mM KPi; pH 6,5

Residue	N ^H	H ^N
R3	113,7	7,18
V4	123,8	8,82
V5	126,9	8,77
I6	128,9	9,43

N7	128,7	9,65
V8	126,2	8,88
S9	119,1	8,59
G10	112,0	8,93
L11	128,2	8,40
R12	126,6	8,16
F13	126,1	9,87
E14	120,6	7,52
T15	114,5	8,35
Q16	121,3	8,80
M17	125,4	8,96
K18	115,7	8,18
T19	116,3	7,35
L20	120,2	7,04
A21	118,8	7,28
Q22	121,1	7,08
F23	117,8	7,67
P24		
E25	115,6	8,31
T26	119,1	7,35
L27	119,5	6,75
L28	116,2	6,72
G29	104,0	7,24
D30	121,6	7,11
P31		
E32		
K33	119,3	7,83
R34	119,8	7,71
T35	116,1	7,34
Q36	119,8	7,64
Y37	117,8	7,89
F38	122,8	7,75
D39	129,1	8,38
P40		
L41	120,1	9,38
R42	130,2	8,82
N43	127,0	8,74
E44	128,1	8,35
Y45	120,8	8,67
F46	124,1	8,54
F47	124,8	8,30
D48	129,8	8,96
R49	116,3	6,85
N50	119,2	7,89
R51	113,8	6,82
P52		

S53	120,2	7,79
F54	124,5	9,18
D55	118,8	9,08
A56	116,8	7,79
I57	114,8	6,90
L58	117,6	8,04
Y59	123,6	7,52
Y60		
Y61	115,3	7,22
Q62	118,2	7,72
S63	111,3	8,02
G64	110,9	7,61
G65	107,6	8,29
R66	121,4	7,62
L67	113,8	7,04
K68	117,2	8,75
R69	125,6	9,24
P70		
V71		
N72	113,6	8,26
V73	123,3	7,66
P74		
F75	110,7	7,68
D76	119,3	7,70
I77	122,3	7,25
F78	119,7	8,30
T79	113,1	8,35
E80	121,2	7,04
E81	116,3	8,74
V82	120,1	8,11
K83	117,9	7,51
F84	124,0	7,89
K83		
Q86	118,9	7,81
L87	124,0	8,48
G88	106,5	8,36

Sequentielle Zuordnung von Kv 1.4 IP75: 293 K - 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTE

Ursprüngliche Zuordnung: Wissmann (2003)

Residue	N ^H	H ^N
T3	117,4	8,38
M4	123,5	8,39
E5	123,6	8,35
V6	122,4	8,12
A7	128,2	8,33
M8	120,9	8,29
V9	122,5	8,06
S10	120,4	8,38
A11	127,2	8,45
E12	120,2	8,36
S13	117,2	8,24
S14	118,6	8,35
G15	111,4	8,42
Q16	119,5	8,19
N17	121,9	8,54
S18	116,8	8,22
H19	121,2	8,47
M20	122,3	8,13
Y22	122,5	8,34
Y22	121,4	8,30
G23	111,9	8,32
Y24	121,6	8,03
A25	124,8	8,35
A26	122,7	8,15
Q27	119,7	8,08
A28	124,4	8,11
R29	119,6	8,07
A30	123,9	7,97
R31	119,6	8,13
E32	121,4	7,99
R33	121,7	8,10
E34	121,1	8,03
R35	120,4	8,10
L36	121,8	8,11
A37	122,9	8,01
H38	118,2	8,26
S39	117,4	8,31
R40	123,9	8,44
A41	124,3	8,10
A42	122,5	8,08
A43	123,3	8,15
A44	123,4	8,07
A45	123,2	7,98

A46	123,0	7,91
V47	119,9	7,81
A48	126,2	8,06
A49	122,4	7,98
A50	123,2	8,02
T51	113,8	7,98
A52	126,4	8,04
A53	122,7	8,04
V54	119,6	7,95
E55	124,9	8,42
G56	110,6	8,40
T57	113,4	8,14
G58	112,1	8,55
G59	109,5	8,29
S60	116,7	8,41
G61	111,9	8,56
G62	109,8	8,21
G63	109,7	8,32
P65		
H65	119,5	8,53
H66	121,6	8,72
H67	120,9	8,41
H68	121,8	8,79
Q69	123,0	8,66
T70	117,3	8,35
R71	124,8	8,49
G72	111,1	8,45
A73	124,4	8,14
Y74	119,9	8,16
S75	118,4	8,09
S76	118,9	8,34
H77	120,9	8,28
D78	127,6	8,14

Sequentielle Zuordnung von K_v 1.4 C84: 287K - 150 mM KPi; pH 6,5; 20 mM DTE

Ursprüngliche Zuordnung: Meyer (2005)

Residue		N ^H	H ^N
H12	H12		
S13	S13	119,4	8,86
S14	S14	119,4	8,72
G15	G15	111,5	8,54

H16	H16	119,8	8,36
I17	I17	124,6	8,32
D18	D18	125,4	8,57
D19	D19	122,1	8,34
D20	D20	121,2	8,39
D21	D21	121,2	8,27
K22	K22	121,7	8,16
H23	H23	120,1	8,49
M24	M24	122,4	8,45
E572	E25	123,2	8,63
T573	T26	116,0	8,27
E574	E27	123,9	8,52
N575	N28	120,5	8,54
E576	E29	122,6	8,52
E577	E30	122,6	8,52
Q578	Q31	121,9	8,48
T579	T32	116,8	8,28
Q580	Q33	123,3	8,47
L581	L34	123,6	8,30
T582	T35	115,6	8,14
Q583	Q36	123,1	8,44
N584	N37	120,6	8,47
A585	A38	125,0	8,26
V586	V39	119,9	8,17
S587	S40	120,1	8,42
C588	C41	123,7	8,44
P589	P42		
Y590	Y43	121,1	8,16
L591	L44	127,6	8,02
P592	P45		
S593	S46	116,3	8,47
N594	N47	121,2	8,49
L595	L48	122,2	8,04
L596	L49	122,2	8,01
K597	K50	122,3	8,10
K598	K51	122,5	8,18
F599	F52	122,2	8,29
R600	R53	124,0	8,27
S601	S54	118,5	8,50
S602	S55	119,1	8,59
T603	T56	116,3	8,33
S604	S57	118,9	8,36
S605	S58	119,1	8,51
S606	S59	119,1	8,47
L607	L60	124,5	8,32
G608	G61	109,9	8,37

D609	D62	121,3	8,25
K610	K63	122,6	8,42
S611	S64	117,8	8,42
E612	E65	123,4	8,48
Y613	Y66	121,4	8,15
L614	L67	124,8	8,04
E615	E68	122,4	8,33
M616	M69	122,1	8,35
E617	E70	123,2	8,49
E618	E71	123,2	8,58
G619	G72	110,7	8,52
V620	V73	121,1	7,97
K621	K74	125,7	8,45
E622	E75	122,9	8,54
S623	S76	117,6	8,37
L624	L77	124,7	8,27
R625	R78	122,1	8,20
G626	G79	110,9	8,53
K627	K80	121,7	8,22
E628	E81	122,6	8,57
E629	E82		
K630	K83	123,5	8,47
C631	C84	121,6	8,51
Q632	Q85	124,1	8,64
G633	G86	111,6	8,60
K634	K87	121,7	8,38
G635	G88	111,2	8,60
D636	D89	121,3	8,33
D637	D90	121,9	8,48
S638	S91	116,9	8,38
E639	E92	123,4	8,48
T640	T93	115,6	8,12
D641	D94	123,6	8,39
K642	K95	122,7	8,31
N643	N96	119,2	8,46
N644	N97	119,8	8,30
C645	C98	120,2	8,37
S646	S99	118,9	8,53
N647	N100	121,7	8,47
A648	A101	125,1	8,23
K649	K102	121,5	8,30
A650	A103	126,8	8,37
V651	V104	120,6	8,22
E652	E105	125,9	8,62
T653	T106	115,5	8,22
D654	D107	124,4	8,49

V655	V108	124,2	7,69
------	------	-------	------

Sequentielle Zuordnung von Kv 1.4 C84: 293 K - 150 mM KPi pH 6,5; 20 mM DTE

Ursprüngliche Zuordnung: Meyer (2005)

Residue		N ^H	H ^N
H12	H12		
S13	S13	118,9	8,67
S14	S14	119,0	8,56
G15	G15	111,2	8,43
H16	H16	119,8	8,26
I17	I17	124,0	8,18
D18	D18	125,1	8,45
D19	D19	121,7	8,22
D20	D20	121,1	8,29
D21	D21	121,1	8,21
K22	K22	121,4	8,06
H23	H23	120,0	8,38
M24	M24	122,2	8,33
E572	E25	122,9	8,52
T573	T26	115,6	8,14
E574	E27	123,7	8,42
N575	N28	120,3	8,42
E576	E29	122,4	8,43
E577	E30	122,4	8,43
Q578	Q31	121,8	8,39
T579	T32	116,3	8,16
Q580	Q33	122,9	8,37
L581	L34	123,5	8,20
T582	T35	115,1	8,03
Q583	Q36	122,9	8,33
N584	N37	120,3	8,37
A585	A38	124,8	8,17
V586	V39	119,4	8,04
S587	S40	119,7	8,29
C588	C41	123,4	8,31
P589	P42		
Y590	Y43	120,5	7,97
L591	L44	126,8	7,89
P592	P45		
S593	S46	116,1	8,37

N594	N47	120,6	8,40
L595	L48	121,9	7,92
L596	L49	121,8	7,89
K597	K50	121,6	7,98
K598	K51	121,8	8,02
F599	F52		
R600	R53	123,4	8,17
S601	S54	117,9	8,36
S602	S55	118,7	8,46
T603	T56	116,0	8,23
S604	S57	118,6	8,27
S605	S58	118,8	8,39
S606	S59	118,7	8,37
L607	L60	124,3	8,21
G608	G61	109,7	8,27
D609	D62	121,3	8,17
K610	K63	122,2	8,29
S611	S64	117,5	8,33
E612	E65	123,1	8,40
Y613	Y66	121,0	8,04
L614	L67	124,4	7,95
E615	E68	122,1	8,24
M616	M69	121,8	8,24
E617	E70	123,1	8,41
E618	E71	122,8	8,47
G619	G72	110,4	8,42
V620	V73	120,6	7,87
K621	K74	125,4	8,34
E622	E75	122,5	8,43
S623	S76	117,2	8,27
L624	L77	124,5	8,18
R625	R78	121,8	8,12
G626	G79	110,8	8,43
K627	K80	121,5	8,13
E628	E81	122,4	8,48
E629	E82		
K630	K83	123,0	8,37
C631	C84	121,2	8,40
Q632	Q85	123,8	8,52
G633	G86	111,3	8,49
K634	K87	121,6	8,27
G635	G88	110,9	8,49
D636	D89	121,3	8,24
D637	D90	121,8	8,39
S638	S91	116,7	8,29
E639	E92	123,1	8,40

T640	T93	115,2	8,04
D641	D94	123,4	8,31
K642	K95	122,4	8,20
N643	N96	119,1	8,38
N644	N97	119,7	8,24
C645	C98	120,0	8,28
S646	S99	118,8	8,42
N647	N100	121,6	8,37
A648	A101	124,9	8,14
K649	K102	121,1	8,18
A650	A103	126,4	8,23
V651	V104	120,0	8,07
E652	E105	125,4	8,50
T653	T106	115,1	8,10
D654	D107	124,2	8,39
V655	V108	124,0	7,60

10.6 NMR-Experimente: Protein-Protein Titrationen

Der K_v1.4 C84-Terminus (N15) mit PDZ2 (PSD-95):

C84 (N15) + PDZ2:		ohne PDZ2		mit PDZ2	
		δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]	δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]
H12	tH12				
S13	tS13	118,938	8,6869	118,916	8,6921
S14	tS14	119,048	8,5746	119,051	8,5766
G15	tG15	111,2706	8,4382	111,2629	8,4406
H16	tH16	119,7678	8,2678	119,7222	8,2683
I17	tI17	124,0653	8,1862	124,0575	8,1885
D18	tD18	125,1101	8,4588	125,1125	8,4601
D19	tD19	121,7823	8,2714	121,7806	8,2295
D20	tD20	121,1355	8,3054	121,1393	8,3078
D21	tD21	121,1083	8,2168	121,1093	8,2158
K22	tK22	121,4471	8,0697	121,4486	8,0693
H23	tH23	120,0407	8,3905	120,0372	8,3974
M24	tM24	122,22	8,3359	122,222	8,3348
E572	E25	123,0168	8,5331	123,0147	8,5326
T573	T26	115,5885	8,1522	115,5948	8,15438
E574	E27	123,7244	8,4311	123,7253	8,4304
N575	N28	120,3627	8,4348	120,3648	8,4369
E576	E29	122,483	8,4102	122,457	8,423

E577	E30	122,483	8,4102	122,457	8,423
Q578	Q31	121,79	8,39	121,79	8,39
T579	T32	116,3292	8,1692	116,3316	8,1716
Q580	Q33	122,913	8,3839	122,909	8,3861
L581	L34	123,4801	8,2102	123,4823	8,2125
T582	T35	115,179	8,0399	115,17	8,0422
Q583	Q36	122,896	8,3395	122,898	8,3418
N584	N37	120,3351	8,3768	120,3304	8,3786
A585	A38	124,8394	8,1725	124,8372	8,1749
V586	V39	119,4298	8,0466	119,4193	8,0458
S587	S40	119,7091	8,2984	119,7091	8,2996
C588	C41	123,364	8,291	123,362	8,298
P589	P42				
Y590	Y43	120,5106	7,98158	120,4927	7,9774
L591	L44	126,8617	7,8937	126,821	7,8924
P592	P45				
S593	S46	116,105	8,3751	116,131	8,3811
N594	N47	120,6957	8,4109	120,678	8,4132
L595	L48	121,946	7,9274	121,935	7,9265
L596	L49	121,861	7,8966	121,833	7,8964
K597	K50	121,6994	7,9886	121,6643	7,9876
K598	K51	121,9165	8,0329	121,8896	8,0316
F599	F52	121,623	8,1521	121,597	8,1467
R600	R53	123,4578	8,1762	123,431	8,1781
S601	S54	118,0072	8,3701	117,9882	8,37242
S602	S55	118,7759	8,4714	118,7889	8,4703
T603	T56	116,0302	8,2357	116,0293	8,2363
S604	S57	118,6781	8,28	118,681	8,2804
S605	S58	118,8388	8,3996	118,8471	8,4022
S606	S59	118,7801	8,376	118,7886	8,3791
L607	L60	124,3708	8,2202	124,3696	8,2226
G608	G61	109,7478	8,2748	109,7445	8,2771
D609	D62	121,2924	8,1761	121,3024	8,1783
K610	K63	122,2991	8,3046	122,3005	8,3005
S611	S64	117,5693	8,3295	117,5631	8,3317
E612	E65	123,1802	8,4075	123,1785	8,4096
Y613	Y66	121,1191	8,0466	121,1057	8,0463
L614	L67	124,5228	7,9547	124,4924	7,969
E615	E68	122,1316	8,2475	122,1236	8,2498
M616	M69	121,8289	8,2474	121,8306	8,2467
E617	E70	123,1016	8,4143	123,1088	8,4133
E618	E71	122,8622	8,4791	122,8556	8,4814
G619	G72	110,4288	8,42472	110,4352	8,4269
V620	V73	120,6973	7,8831	120,6967	7,8845

K621	K74	125,4225	8,3496	125,414	8,3486
E622	E75	122,416	8,4383	122,416	8,4405
S623	S76	117,2644	8,2747	117,2597	8,2771
L624	L77	124,5079	8,1795	124,5067	8,18186
R625	R78	121,868	8,1279	121,856	8,12753
G626	G79	110,7651	8,4414	110,758	8,4408
K627	K80	121,545	8,1354	121,545	8,1376
E628	E81	122,4154	8,4892	122,416	8,4916
E629	E82				
K630	K83	123,059	8,3735	123,057	8,3756
C631	C84	121,2237	8,4111	121,2141	8,4134
Q632	Q85	123,7906	8,5302	123,784	8,5292
G633	G86	111,3646	8,4974	111,3606	8,4985
K634	K87	121,6441	8,2748	121,6448	8,277
G635	G88	110,9969	8,4995	110,9896	8,5018
D636	D89	121,2587	8,2482	121,2634	8,25
D637	D90	121,8	8,39	121,8	8,39
S638	S91	116,7338	8,2984	116,7316	8,2977
E639	E92	123,1802	8,4075	123,1785	8,4096
T640	T93	115,282	8,0432	115,292	8,0454
D641	D94	123,364	8,291	123,362	8,298
K642	K95	122,4922	8,2065	122,4747	8,2022
N643	N96	119,1529	8,3872	119,1818	8,3863
N644	N97	119,7439	8,243	119,7633	8,2465
C645	C98	120,0437	8,285	120,0437	8,2804
S646	S99	118,815	8,429	118,792	8,4126
N647	N100	121,668	8,3804	121,674	8,3792
A648	A101	124,989	8,145	125,277	8,1848
K649	K102	121,173	8,1829	121,456	8,1577
A650	A103	126,488	8,2439	126,997	8,2237
V651	V104	120,03	8,07	x	x
E652	E105	125,45	8,5	x	x
T653	T106	115,15	8,1	x	x
D654	D107	124,23	8,39	x	x
V655	V108	124,04	7,6	x	x

Die Kv1.4 T1K-Domäne (N15) mit Kv1.4 IP75:

T1K (N15) + IP75:		ohne IP75		mit IP75	
		δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]	δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]
1	M				
	E				
	R	113,684	7,2041	113,71	7,2073
	V	121,81	8,8439	121,802	8,8418
5	V	126,947	8,7996	126,9299	8,7973
	I	128,926	9,4503	128,9226	9,4513
	N	128,704	9,6717	128,694	9,6726
	V	126,191	8,9025	126,184	8,8984
	S	119,125	8,6145	119,12	8,6199
10	G	112,0919	8,9602	112,0451	8,9574
	L	128,116	8,38109	128,092	8,3817
	R	126,612	8,1872	126,597	8,1951
	F	126,095	9,8898	126,093	9,8937
	E	120,6429	7,5402	120,6453	7,5409
15	T	114,511	8,3676	114,499	8,3651
	Q	121,3604	8,8274	121,3282	8,8313
	M	125,432	8,9904	125,434	8,9879
	K	115,7044	8,2009	115,7124	8,205
	T	116,354	7,3761	116,339	7,3765
20	L	120,209	7,0668	120,226	7,0796
	A	118,964	7,3021	118,835	7,2984
	Q	121,085	7,1044	121,6354	7,1053
	F	117,829	7,6926	117,793	7,6876
	P				
25	E	115,6608	8,3334	115,6541	8,3334
	T	119,126	7,3725	119,13	7,3718
	L	119,529	6,7742	119,521	6,775
	L	116,183	6,7666	116,219	6,7443
	G	104,033	7,26787	104,042	7,2684
30	D	121,636	7,1295	121,6353	7,1298
	P				
	E				
	K	119,3347	7,8595	119,3347	7,8544
	R	119,8821	7,7337	119,8536	7,7248
35	T	116,193	7,3657	116,167	7,365
	Q	119,8816	7,7337	119,8839	7,7667
	Y	117,796	7,9181	117,76	7,919
	F	122,8829	7,782	122,8662	7,7794
	D	129,1	8,4119	129,0872	8,4128
40	P				

	L	120,1266	9,406	120,1159	9,407
	R	130,1765	8,8413	130,1022	8,8345
	N	127,992	8,759	127,886	8,743
	E	128,186	8,419	128,312	8,4659
45	Y	120,871	8,6887	120,848	8,6856
	F	124,1169	8,5583	124,1134	8,5623
	F	124,834	8,3266	124,81	8,3277
	D	129,8752	8,9842	129,8652	8,9814
	R	116,3381	6,8794	116,3262	6,8821
50	N	119,2593	7,9152	119,2651	7,9192
	R	113,8141	6,8488	113,8265	6,8499
	P				
	S	120,244	7,8135	120,264	7,8202
	F	124,475	9,2086	124,43	9,2125
55	D	118,799	9,1127	118,82	9,1112
	A	116,781	7,8149	116,793	7,8238
	I	114,8707	6,9272	114,8457	6,9261
	L	117,628	8,0545	117,628	8,0589
	Y	123,5955	7,547	123,5745	7,548
60	Y				
	Y	115,3	7,2436	115,2646	7,23445
	Q	118,21	7,7415	118,261	7,7526
	S	111,347	8,0481	111,3005	8,0585
	G	110,9138	7,6389	110,903	7,6361
65	G	107,6621	8,3167	107,6778	8,321
	R	121,4296	7,6493	121,421	7,6467
	L	113,832	7,0603	113,835	7,0638
	K	117,258	8,7827	117,2896	8,7806
	R	125,604	9,2796	125,525	9,3147
70	P				
	V				
	N	113,629	8,2789	113,641	8,2936
	V	123,37	7,68	123,272	7,6703
	P				
75	F	110,732	7,7036	110,613	7,694
	D	119,33	7,7193	119,321	7,723
	I	122,294	7,2785	122,386	7,2754
	F	119,7349	8,3252	119,7736	8,3343
	T	113,126	8,3809	113,2125	8,3887
80	E	121,2403	7,0692	121,1815	7,06
	E	116,3326	8,7661	116,3368	8,7702
	V	120,1153	8,1361	120,1465	8,1301
	K	117,939	7,5365	117,94	7,5442
	F	124,0346	7,9146	124,021	7,9186
85	Y				

	Q	118,928	7,8298	118,9252	7,827
	L	125,017	8,507	125,049	8,508
	G	106,553	8,3845	106,55	8,3648

Das Kv1.4 IP75-Inaktivierungspeptid (N15) mit Kv1.4 T1K:

IP75 (N15) + T1K:		ohne T1K		mit T1K	
		δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]	δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]
1	G				
	S				
	T	117,33	8,3755	117,356	8,3871
	M	123,478	8,3993	123,4852	8,402
5	E	123,589	8,3552	123,592	8,3572
	V	122,3646	8,1227	122,3653	8,123
	A	128,246	8,32772	128,2412	8,3275
	M				
	V	122,572	8,0626	122,551	8,0626
10	S	120,444	8,3857	120,446	8,3885
	A	127,2034	8,4504	127,2028	8,4505
	E	120,191	8,3664	120,19	8,3677
	S	117,2154	8,2496	117,2213	8,2529
	S	118,541	8,3485	118,554	8,3549
15	G	111,4288	8,4198	111,4397	8,4234
	C	119,466	8,195	119,4686	8,198
	N	121,988	8,5428	121,997	8,5458
	S	116,8419	8,2189	116,8531	8,222
	H	121,196	8,4622	121,197	8,464
20	M	122	8,137	122,2963	8,1373
	P				
	Y	121,432	8,3	121,429	8,3037
	G	111,962	8,3204	111,962	8,3212
	Y	121,5581	8,0314	121,56	8,0313
25	A	124,7895	8,3518	124,7918	8,355
	A	122,973	8,1982	122,978	8,1982
	Q	119,7472	8,083	119,7541	8,0848
	A				
	R	119,6736	8,0725	119,679	8,0752
30	A	123,9597	7,9669	123,9621	7,9701
	R	119,6401	8,1337	119,64665	8,1338
	E	121,4645	7,9906	121,4654	7,9939
	R	121,7588	8,1	121,7585	8,1029
	E	121,114	8,0383	121,127	8,0385

35	R	120,4427	8,1064	120,4427	8,1068
	L	121,7905	8,1169	121,7941	8,1193
	A	122,9768	8,01475	122,9628	8,0144
	H	118,2664	8,2599	228,2974	8,2629
	S	117,4	8,311	117,408	8,3139
40	R	123,9888	8,4368	124,0091	8,4436
	A				
	A	122,509	8,0853	122,509	8,0868
	A	123,3357	8,1473	123,3363	8,1476
	A	123,4813	8,0759	123,4666	8,07565
45	A	123,2328	7,9805	123,2386	7,9804
	A	123,047	7,916	123,04	7,9159
	V	119,9583	7,8236	119,9583	7,8236
	A	126,2276	8,0656	126,2018	8,0654
	A	122,3762	7,9805	122,3651	7,9804
50	A	123,158	8,0214	123,1583	8,0215
	T	113,8114	7,9772	113,8085	7,9801
	A	126,4564	8,0452	126,4479	8,0448
	A	122,778	8,0381	122,767	8,0381
	V	119,632	7,953	119,623	7,9529
55	E	124,994	8,4266	124,9845	8,4264
	G	111,4277	8,4198	111,4379	8,423
	T	113,462	8,1407	113,466	8,1437
	G	112,057	8,5489	112,065	8,5521
	G	109,4693	8,2938	109,479	8,2968
60	S	116,653	8,4058	116,667	8,4095
	G	111,869	8,5595	111,879	8,5629
	G	109,749	8,206	109,7556	8,2968
	G	109,6996	8,3178	109,7083	8,3209
	P				
65	H	119,5413	8,5319	119,5557	8,5321
	H	121,627	8,7229	121,632	8,7195
	H	120,952	8,4133	120,97	8,4162
	H	121,7973	8,7809	121,8258	8,777
	Q	121,016	8,6616	121,035	8,6642
70	T	117,3024	8,3559	117,2985	8,3582
	R				
	G	111,067	8,4505	111,071	8,4535
	A	124,4536	8,14	124,4536	8,1402
	Y	120	8,1608	120,0031	8,1609
75	S	118,366	8,08924	118,379	8,0923
	S	118,854	8,33418	118,878	8,3412
	H	120,911	8,2857	120,908	8,288
	D	127,61	8,145	127,609	8,1437

Die Kv1.4 T1K-Domäne (N15) plus Kv1.4 C84:

T1K (N15) + C84:		ohne C84		mit C84	
		δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]	δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]
1	M				
	E				
	R	113,6675	7,1897	113,7104	7,1935
	V	123,7994	8,8278	123,8145	8,8263
5	V	126,9427	8,7837	126,9384	8,782
	I	128,921	9,4356	128,895	9,4374
	N	128,718	9,6575	128,716	9,6536
	V	126,1894	8,8892	126,205	8,8911
	S	119,125	8,5998	119,135	8,6057
10	G	112,098	8,9456	112,113	8,9525
	L	128,111	8,3663	128,108	8,3647
	R	126,61	8,1704	126,603	8,1717
	F	126,1371	9,8784	126,129	9,8836
	E	120,6244	7,5274	120,6504	7,5236
15	T	114,504	8,354	114	8,3576
	Q	121,3517	8,81425	121,3968	8,8141
	M	125,4334	8,9762	125,4287	8,9761
	K	115,707	8,1894	115,695	8,1843
	T	116,294	7,3569	116,307	7,3519
20	L	120,223	7,0579	120,27	7,07
	A	119,117	7,3595	119,145	7,3562
	Q	121,0765	7,0894	121,0726	7,0859
	F	117,836	7,6756	117,809	7,6734
	P				
25	E	115,665	8,3187	115,69	8,3188
	T	118,876	7,2877	118,847	7,2843
	L	119,5194	6,7588	119,4895	6,7644
	L	116,211	6,7331	116,177	6,7233
	G	104,035	7,253	104,045	7,2514
30	D	121,6394	7,1144	121,6447	7,1139
	P				
	E				
	K	119,2626	7,90246	119,252	7,9013
	R	119,8826	7,7201	119,8961	7,7127
35	T	116,166	7,35	116,179	7,3553
	Q	119,8723	7,6601	119,8794	7,6601
	Y	118,22	7,7232	118,243	7,731
	F	122,8849	7,7682	122,8616	7,7652
	D	129,1	8,397	129,0997	8,3972
40	P				

	L	120,114	9,3932	120,085	9,3857
	R	130,151	8,8236	130,068	8,814
	N	127,972	8,7412	127,8981	8,729
	E	128,1933	8,4062	128,236	8,421
45	Y	120,878	8,6763	120,856	8,6691
	F	124,1223	8,5426	124,1062	8,5461
	F	124,815	8,3126	124,836	8,3104
	D	129,8767	8,9693	129,89	8,9663
	R	116,332	6,8639	116,348	6,8663
50	N	119,3244	7,8427	119,3446	7,8417
	R	113,802	6,8333	113,816	6,8332
	P				
	S	120,2359	7,798	120,26	7,8022
	F	124,4509	9,1903	124,4338	9,1888
55	D	118,766	9,0918	118,788	9,0919
	A	117,836	7,67554	117,811	7,6726
	I	114,86	6,914	114,859	6,9061
	L	120,1197	8,1212	120,1236	8,1147
	Y	123,5838	7,131	123,5917	7,5389
60	Y				
	Y	115,308	7,226	115,287	7,2306
	Q	118,2165	7,723	118,24	7,7307
	S	111,336	8,0385	111,333	8,0416
	G	110,9094	7,6242	110,8879	7,6275
65	G	107,648	8,3011	107,6933	8,3034
	R	121,409	7,6325	121,4121	7,6279
	L	113,8424	7,0445	113,8387	7,0483
	K	117,2582	8,77	117,2817	8,7684
	R	125,596	9,2674	125,57	9,2723
70	P				
	V				
	N	113,621	8,2643	113,63	8,2643
	V	123,366	7,666	123,302	7,6598
	P				
75	F	110,6937	7,6879	110,709	7,6812
	D	119,3289	7,7063	119,3253	7,7034
	I	122,2918	7,2642	122,3526	7,2634
	F	119,727	8,3054	119,753	8,3186
	T	113,118	8,3681	113,174	8,368
80	E	121,2311	7,0508	121,2326	7,0473
	E	116,318	8,746	116,326	8,7446
	V	120,1195	8,1211	120,1212	8,1141
	K	117,937	7,5216	117,937	7,5213
	F	124,0244	7,8999	124,0091	7,902
85	Y				

	Q	118,9184	7,8137	118,9339	7,811
	L	124,992	8,4875	124,979	8,4872
	G	106,554	8,3663	106,595	8,3443

Das Kv1.4 C84-Peptid (N15) mit Kv1.4 T1K (293 K):

C84 (N15) + T1K (293 K)	ohne T1K		mit T1K	
		δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]	δ (NH) [ppm]
H12	tH12			
S13	tS13	118,9596	8,6931	119,0186
S14	tS14	119,0402	8,5741	119,102
G15	tG15	111,2656	8,4393	111,3015
H16	tH16	119,769	8,2651	119,836
I17	tI17	124,0697	8,1876	124,0646
D18	tD18	125,112	8,4603	125,1367
D19	tD19	121,785	8,2278	121,763
D20	tD20	121,143	8,3043	121,162
D21	tD21	121,111	8,2151	121,126
K22	tK22	121,4499	8,0682	121,4622
H23	tH23	120,045	8,3906	120,053
M24	tM24	122,226	8,3342	122,2293
E572	E25	123,0179	8,5332	123,0295
T573	T26	115,5939	8,152	115,6443
E574	E27	123,7251	8,4296	123,734
N575	N28	120,364	8,4341	120,378
E576	E29	122,4114	8,438	122,3939
E577	E30	122,4114	8,438	122,3939
Q578	Q31	121,8091	8,3971	121,8108
T579	T32	116,3334	8,1695	116,3424
Q580	Q33	122,9179	8,3844	122,9144
L581	L34	123,4836	8,2101	123,4864
T582	T35	115,177	8,0398	115,183
Q583	Q36	122,905	8,339	122,905
N584	N37	120,333	8,3758	120,327
A585	A38	124,8413	8,17227	124,8314
V586	V39	119,4327	8,0452	119,409
S587	S40	119,714	8,2966	119,712
C588	C41	123,4149	8,3123	123,4595
P589	P42			
Y590	Y43	120,5156	7,98	120,4966
L591	L44	126,867	7,8932	126,8384

P592	P45				
S593	S46	116,115	8,3753	116,199	8,399
N594	N47	120,7061	8,4087	120,6239	8,4182
L595	L48	121,9509	7,9273	121,9254	7,9211
L596	L49	121,8664	7,8965	121,835	7,8965
K597	K50	121,6985	7,9882	121,6242	7,985
K598	K51	121,9172	8,0321	121,8366	8,0269
F599	F52	121,6174	8,14911	121,5833	8,14655
R600	R53	123,4606	8,1762	123,4047	8,1733
S601	S54	118,006	8,3699	117,9885	8,3775
S602	S55	118,782	8,4723	118,795	8,4767
T603	T56	116,0339	8,2339	116,0966	8,2459
S604	S57	118,6841	8,2891	118,7173	8,2891
S605	S58	118,844	8,3993	118,903	8,4145
S606	S59	118,782	8,3766	118,804	8,3831
L607	L60	124,3792	8,2198	124,3687	8,2194
G608	G61	109,75	8,276	109,737	8,279
D609	D62	121,292	8,1771	121,307	8,1814
K610	K63	122,3034	8,3033	122,3027	8,3093
S611	S64	117,5666	8,3304	117,5485	8,2743
E612	E65	123,1826	8,4075	123,1713	8,4083
Y613	Y66	121,1211	8,0461	121,0868	8,0426
L614	L67	124,5218	7,9546	124,4598	7,9553
E615	E68	122,134	8,248	122,095	8,2465
M616	M69	121,824	8,2459	121,882	8,2511
E617	E70	123,1194	8,4109	123,1194	8,4152
E618	E71	122,863	8,4791	122,843	8,4787
G619	G72	110,4284	8,4256	110,4518	8,4304
V620	V73	120,7	7,8827	120,6825	7,8827
K621	K74	125,4232	8,3494	125,4295	8,354
E622	E75	122,568	8,4417	122,568	8,4462
S623	S76	117,2692	8,2743	117,2761	8,2743
L624	L77	124,5091	8,1798	124,5367	8,1893
R625	R78	121,872	8,1262	121,867	8,1332
G626	G79	110,7686	8,4408	110,7725	8,4483
K627	K80	121,545	8,1357	121,563	8,1426
E628	E81	122,42	8,4891	122,404	8,4919
E629	E82				
K630	K83	123,057	8,3733	123,039	8,3754
C631	C84	121,2243	8,4126	121,2098	8,4133
Q632	Q85	123,7968	8,53	123,7895	8,5311
G633	G86	111,3631	8,4979	111,3846	8,5076
K634	K87	121,649	8,2748	121,661	8,2823
G635	G88	110,9994	8,4998	110,9787	8,5062

D636	D89	121,254	8,2485	121,272	8,2498
D637	D90	121,8091	8,3971	121,8108	8,3982
S638	S91	116,7341	8,2983	116,7424	8,2995
E639	E92	123,1826	8,4075	123,1713	8,4083
T640	T93	115,283	8,043	115,301	8,051
D641	D94	123,4149	8,3123	123,4595	8,3177
K642	K95	122,496	8,20488	122,499	8,212
N643	N96	119,149	8,3883	119,182	8,395
N644	N97	119,747	8,2425	119,764	8,2506
C645	C98	120,048	8,2856	120,059	8,2874
S646	S99	118,82	8,4286	118,861	8,44
N647	N100	121,6703	8,3796	121,6759	8,3809
A648	A101	124,994	8,1451	124,9936	8,1502
K649	K102	121,177	8,1826	121,125	8,1842
A650	A103	126,491	8,2435	126,4271	8,2381
V651	V104	120,0652	8,0818	120,0515	8,0804
E652	E105	125,482	8,5096	125,47	8,5075
T653	T106	115,1749	8,1076	115,1978	8,1117
D654	D107	124,2495	8,3971	124,2533	8,4016
V655	V108	124,052	7,6014	124,0536	7,6014

Der K_v1.4 C84-Terminus (N15) mit K_v1.4 T1K (278 K):

C84 (N15) + T1K (278 K)		ohne T1K		mit T1K	
		δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]	δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]
H12	tH12				
S13	tS13	119,407	8,8656	119,468	8,884
S14	tS14	119,398	8,7181	119,477	8,7356
G15	tG15	111,4723	8,5397	111,5045	8,5499
H16	tH16	119,777	8,3571	119,827	8,3645
I17	tI17	124,5765	8,319	124,5855	8,3211
D18	tD18	125,3778	8,5716	125,4366	8,5797
D19	tD19	121,2505	8,3912	121,2671	8,3969
D20	tD20	121,2035	8,2728	121,2148	8,2777
D21	tD21				
K22	tK22	121,6867	8,1564	121,7013	8,1584
H23	tH23	120,1236	8,4949	120,1278	8,4953
M24	tM24	122,428	8,4489	122,441	8,441
E572	E25	123,1995	8,6265	123,2154	8,6279
T573	T26	116,003	8,2652	116,0545	8,2745
E574	E27	123,936	8,5182	123,95	8,5247

N575	N28	120,5574	8,5391	120,5754	8,5439
E576	E29	122,6321	8,5201	122,6329	8,5259
E577	E30	122,6321	8,5201	122,6329	8,5259
Q578	Q31				
T579	T32	116,8249	8,2828	116,8416	8,2894
Q580	Q33	123,269	8,4653	123,266	8,4684
L581	L34	123,6296	8,3027	123,6448	8,308
T582	T35	225,5885	8,1442	115,6039	8,1502
Q583	Q36	123,1438	8,436	123,1496	8,4439
N584	N37	120,5622	8,4731	120,5594	8,4782
A585	A38	125,016	8,2602	125,0121	8,2639
V586	V39	119,9581	8,1699	119,9529	8,1718
S587	S40	120,205	8,4192	120,221	8,4275
C588	C41	123,6953	8,4383	123,7039	8,4412
P589	P42				
Y590	Y43	121,1492	8,1627	121,1497	8,1687
L591	L44	127,633	8,0221	127,616	8,0221
P592	P45				
S593	S46	116,28	8,4677	116,349	8,4888
N594	N47	121,1777	8,48657	121,1353	8,4954
L595	L48	122,2229	8,04455	122,2104	8,0426
L596	L49	122,1921	8,00642	122,1779	8,006
K597	K50	122,3136	8,0986	122,2698	8,1
K598	K51	122,4691	8,177	122,4161	8,1753
F599	F52	122,1852	8,2924	122,1508	8,2901
R600	R53	124,042	8,2662	124,004	8,2672
S601	S54	118,4662	8,4957	118,4641	8,5057
S602	S55	119,0716	8,594	119,0983	8,6034
T603	T56	116,2643	8,3298	116,3271	8,3465
S604	S57	118,917	8,3573	118,953	8,3691
S605	S58	119,1383	8,5103	119,2028	8,5262
S606	S59	119,0564	8,4729	119,0771	8,482
L607	L60	124,5765	8,319	124,5855	8,3211
G608	G61	109,9656	8,3675	109,9638	8,3727
D609	D62	121,393	8,2485	121,4025	8,2557
K610	K63	122,616	8,4383	122,626	8,4236
S611	S64	117,8098	8,42	117,8044	8,4262
E612	E65				
Y613	Y66	121,4671	8,1457	121,4467	8,1447
L614	L67	124,8701	8,0406	124,8287	8,0453
E615	E68	122,4041	8,3335	122,3858	8,3354
M616	M69				
E617	E70	123,184	8,49	123,207	8,4987
E618	E71	123,1687	8,5816	123,1601	8,5833

G619	G72	110,7113	8,5192	110,7371	8,5258
V620	V73	121,137	7,9755	121,1203	7,9776
K621	K74	125,7438	8,4512	125,7611	8,4584
E622	E75	122,8639	8,5445	122,9025	8,5501
S623	S76	117,6189	8,3744	117,6298	8,383
L624	L77	124,6686	8,2694	124,7015	8,2808
R625	R78	122,1238	8,2025	122,1259	8,2108
G626	G79	110,9279	8,532	110,9345	8,5386
K627	K80	121,689	8,2205	121,7	8,2236
E628	E81	122,5866	8,5682	122,5811	8,574
E629	E82				
K630	K83	123,454	8,4694	123,456	8,4174
C631	C84	121,5567	8,5187	121,5447	8,5227
Q632	Q85	124,0561	8,6414	124,0544	8,645
G633	G86	111,6046	8,5952	111,6183	8,6034
K634	K87	121,7864	8,3842	121,7992	8,3929
G635	G88	111,199	8,6024	111,1916	8,6093
D636	D89	121,3498	8,3334	121,3644	8,3386
D637	D90				
S638	S91	116,9365	8,3777	116,9468	8,3827
E639	E92	123,417	8,484	123,417	8,4851
T640	T93	115,5896	8,1186	115,6105	8,1285
D641	D94	123,5992	8,3976	123,633	8,4036
K642	K95	122,7725	8,3094	122,7788	8,3176
N643	N96	119,2022	8,4626	119,2267	8,4693
N644	N97	119,843	8,2945	119,855	8,3045
C645	C98	120,246	8,3673	120,254	8,371
S646	S99	119,007	8,523	119,0443	8,5351
N647	N100	121,746	8,4662	121,776	8,4814
A648	A101	125,138	8,2276	125,1432	8,2335
K649	K102	121,5466	8,2971	121,5121	8,3015
A650	A103	126,8531	8,3638	126,8037	8,3623
V651	V104	120,6175	8,2231	120,6103	8,2246
E652	E105	125,9404	8,6195	125,9346	8,6215
T653	T106	115,5446	8,2244	115,5693	8,2301
D654	D107	124,429	8,4866	124,435	8,4932
V655	V108	124,241	7,6981	124,242	7,6987

Das Kv1.4 IP75-Inaktivierungspeptid (N15) mit Kv1.4 T1K und Kv1.4 C84:

IP75 (N15) + T1K + C84:	IP75 (N15)		IP75 (N15) mit T1K		IP75 (N15) mit T1K und C84	
			δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]	δ (NH) [ppm]]	δ (HN) [ppm]
1-G						
S						
T	117,345	8,3641	117,380	8,3886	117,341	8,3814
M	123,459	8,3999	123,494	8,4057	123,464	8,4018
5-E	123,595	8,3573	123,592	8,3614	123,581	8,3576
V	122,394	8,1257	122,361	8,1230	122,331	8,1226
A	128,264	8,3283	128,231	8,3308	128,221	8,3286
M	120,949	8,2909	120,915	8,2916	120,905	8,2895
V	122,599	8,0679	122,527	8,0635	122,507	8,0613
10-S	120,451	8,3879	120,447	8,3904	120,427	8,3865
A	127,209	8,4526	127,196	8,4533	127,195	8,4529
E	120,197	8,3692	120,183	8,3682	120,183	8,3695
S	117,218	8,2534	117,224	8,2558	117,214	8,2520
S	118,517	8,3454	118,571	8,3631	118,542	8,3542
15-G	111,416	8,4186	111,442	8,4295	111,432	8,4240
C	119,454	8,1972	119,470	8,2014	119,470	8,2009
N	121,974	8,5412	122,000	8,5538	121,990	8,5483
S	116,827	8,2143	116,862	8,2303	116,833	8,2231
H	121,144	8,4935	121,238	8,4738	121,159	8,4495
20-M	122,316	8,1428	122,293	8,1418	122,273	8,1380
P						
Y	121,466	8,3079	121,423	8,3086	121,413	8,3031
G	111,983	8,3249	111,969	8,3274	111,930	8,3235
Y	121,564	8,0287	121,550	8,0345	121,550	8,0290
25-A	124,777	8,3556	124,793	8,3614	124,763	8,3644
A						
Q	119,728	8,0815	119,763	8,0890	119,743	8,0869
A						
R	119,728	8,0815	119,665	8,0754	119,665	8,0716
30-A	123,947	7,9657	123,953	7,9732	123,933	7,9677
R	119,630	8,1343	119,646	8,1367	119,636	8,1362
E	121,466	7,9912	121,462	7,9988	121,462	7,9983
R	121,769	8,1189	121,755	8,1060	121,755	8,1056
E	121,095	8,0372	121,130	8,0413	121,120	8,0375
35-R	120,441	8,1053	120,437	8,1094	120,427	8,1073
L	121,779	8,1019	121,785	8,1196	121,784	8,1243
A	123,000	8,0219	122,937	8,0141	122,927	8,0103
H	118,165	8,2654	118,317	8,2678	118,298	8,2639

S	117,403	8,3113	117,409	8,3188	117,399	8,3133
40-R	123,976	8,4339	124,021	8,4516	123,992	8,4427
A						
A	122,492	8,0866	122,507	8,0924	122,478	8,0920
A	123,341	8,1479	123,328	8,1503	123,318	8,1516
A	123,508	8,0815	123,445	8,0754	123,435	8,0733
45-A	123,205	7,9793	123,240	7,9834	123,220	7,9830
A	123,068	7,9214	123,025	7,9153	123,025	7,9149
V	119,972	7,8278	119,958	7,8234	119,948	7,8230
A	126,272	8,0713	126,160	8,0635	126,150	8,0630
A	122,394	7,9827	122,341	7,9817	122,331	7,9796
50-A	123,175	8,0236	123,162	8,0243	123,152	8,0222
T	113,819	7,9810	113,805	7,9817	113,795	7,9796
A	126,477	8,0491	126,434	8,0447	126,414	8,0409
A	122,795	8,0406	122,752	8,0413	122,751	8,0392
V	119,659	7,9572	119,607	7,9511	119,587	7,9490
55-E	125,012	8,4305	124,969	8,4278	124,959	8,4257
G	110,694	8,4033	110,690	8,4023	110,670	8,4001
T	113,448	8,1411	113,473	8,1503	113,453	8,1448
G	112,051	8,5480	112,077	8,5555	112,066	8,5517
G	109,453	8,2926	109,488	8,3018	109,468	8,2980
60-S	116,632	8,3999	116,686	8,4176	116,657	8,4121
G	111,856	8,5582	111,881	8,5708	111,855	8,5620
G	109,736	8,2058	109,762	8,2167	109,752	8,2112
G	109,688	8,3164	109,723	8,3274	109,703	8,3218
P						
65-H	119,493	8,5429	119,577	8,5368	119,548	8,5312
H	121,574	8,7608	121,668	8,7189	121,716	8,7117
H	120,870	8,4220	120,984	8,4227	120,954	8,4104
H	121,759	8,8136	121,824	8,7920	121,804	8,7713
Q	123,058	8,6740	123,006	8,6696	122,995	8,6606
70-T	117,345	8,3641	117,292	8,3614	117,272	8,3559
R						
G	111,074	8,4492	111,071	8,4602	111,060	8,4546
A						
Y	120,001	8,1649	119,997	8,1639	119,987	8,1635
75-S	118,360	8,0900	118,386	8,0975	118,356	8,0937
S	118,829	8,3300	118,904	8,3495	118,854	8,3406
H	120,949	8,2909	120,915	8,2916	120,905	8,2895
D	127,610	8,1581	127,606	8,1435	127,605	8,1448

Die KV1.4 T1K-Domäne (N15) mit KV1.4 C84M:

T1K (N15) + C84M:		ohne C84		mit C84M	
		δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]	δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]
1	M				
	E				
	R	113,692	7,2072	113,670	7,2054
	V	123,829	8,8451	123,789	8,8433
5	V	126,955	8,8025	126,924	8,7956
	I	128,928	9,4546	128,897	9,4494
	N	128,723	9,6725	128,692	9,6707
	V	126,203	8,9064	126,182	8,9029
	S	119,122	8,6169	119,111	8,6169
10	G	112,090	8,9608	112,000	8,9625
	L	128,127	8,3837	128,076	8,3802
	R	126,613	8,1896	126,582	8,1861
	F	126,125	9,8939	126,084	9,8904
	E	120,655	7,5460	120,624	7,5408
15	T	114,551	8,3718	114,530	8,3717
	Q	121,349	8,8315	121,347	8,8297
	M	125,451	8,9915	125,410	8,9880
	K	115,723	8,2049	115,712	8,2048
	T	115,342	7,2481	115,282	7,2378
20	L	120,196	7,0574	120,214	7,0811
	A	118,887	7,3025	118,876	7,3042
	Q	121,095	7,1068	121,035	7,1033
	F	117,852	7,6975	117,812	7,6975
	P				
25	E	115,664	8,3377	115,634	8,3359
	T	119,171	7,3758	119,111	7,3740
	L	119,542	6,7765	119,491	6,7747
	L	116,211	6,7509	116,141	6,7440
	G	104,042	7,2685	104,031	7,2667
30	D	121,642	7,1323	121,621	7,1305
	P				
	E				
	K	119,356	7,8610	119,325	7,8558
	R	119,903	7,7384	119,863	7,7281
35	T	115,342	7,2481	115,282	7,2378
	Q	119,893	7,6737	119,853	7,6736
	Y	117,803	7,9172	117,763	7,9171
	F	122,892	7,7844	122,832	7,7809
	D	129,104	8,4160	129,082	8,4160

40	P				
	L	120,147	9,4086	120,087	9,4017
	R	130,236	8,8519	130,157	8,8399
	N	128,029	8,7668	127,969	8,7582
	E	128,185	8,4160	128,155	8,4126
45	Y	120,899	8,6935	120,869	8,6901
	F	124,132	8,5590	124,101	8,5607
	F	124,855	8,3292	124,805	8,3291
	D	129,885	8,9915	129,854	8,9778
	R	116,348	6,8786	116,337	6,8802
50	N	119,278	7,9172	119,237	7,9171
	R	113,828	6,8514	113,807	6,8479
	P				
	S	120,235	7,8150	120,224	7,8098
	F	124,494	9,2145	124,424	9,2111
55	D	118,800	9,1158	118,788	9,1140
	A	116,778	7,8184	116,766	7,8184
	I	114,893	6,9314	114,842	6,9279
	L	117,667	8,0653	117,646	8,0618
	Y	123,615	7,5494	123,564	7,5442
60	Y				
	Y	115,342	7,2481	115,282	7,2378
	Q	118,272	7,7384	118,075	7,7451
	S	111,308	8,0500	111,287	8,0482
	G	110,937	7,6414	110,906	7,6396
65	G	107,656	8,3173	107,644	8,3206
	R	121,466	7,6584	121,406	7,6515
	L	113,819	7,0625	113,817	7,0607
	K	117,256	8,7855	117,245	8,7803
	R	125,607	9,2741	125,586	9,2826
70	P				
	V				
	N	113,652	8,2798	113,573	8,2866
	V	123,400	7,6873	123,349	7,6804
	P				
75	F	110,752	7,7095	110,701	7,6975
	D	119,347	7,7248	119,306	7,7213
	I	122,306	7,2787	122,285	7,2838
	F	119,757	8,3258	119,736	8,3240
	T	113,125	8,3837	113,114	8,3819
80	E	121,241	7,0710	121,191	7,0726
	E	116,358	8,7736	116,327	8,7701
	V	120,118	8,1402	120,116	8,1333
	K	117,950	7,5392	117,929	7,5408

	F	124,064	7,9206	124,004	7,9154
85	Y				
	Q	118,936	7,8320	118,905	7,8303
	L	125,050	8,5114	125,010	8,5062
	G	106,542	8,3990	106,541	8,3768

Der Kv1.4 C84-Terminus (N15) mit Kv1.4 T1K und PDZ2 (PSD-95):

C84 (N15) + T1K + PDZ2	C84 (N15)		C84 N15) mit T1K		C84 (N15) mit T1K und PDZ2	
	δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]	δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]	δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]
tH12						
tS13						
tS14	119,040	8,5742	119,097	8,5872	119,097	8,5873
tG15	111,265	8,4397	111,293	8,4459	111,293	8,4460
tH16	119,763	8,2660	119,829	8,2722	119,810	8,2707
tI17	124,060	8,1877	124,058	8,1820	124,058	8,1838
tD18	125,105	8,4601	125,171	8,4663	125,162	8,4664
tD19	121,784	8,2269	121,763	8,2246	121,763	8,2264
tD20	121,140	8,3052	121,148	8,3080	121,148	8,3098
tD21	121,110	8,2150	121,118	8,2177	121,118	8,2179
tK22	121,442	8,0685	121,460	8,0696	121,460	8,0698
tH23	120,036	8,3903	120,054	8,3863	120,044	8,3881
tM24	122,224	8,3341	122,232	8,3200	122,212	8,3234
E25	123,015	8,5316	123,023	8,5276	123,023	8,5294
T26	115,592	8,1520	115,639	8,1599	115,629	8,1600
E27	123,718	8,4295	123,726	8,4340	123,726	8,4358
N28	120,358	8,4346	120,376	8,4374	120,366	8,4375
E29	122,409	8,4380	122,388	8,4391	122,398	8,4409
E30	122,409	8,4380	122,388	8,4391	122,398	8,4409
Q31	121,804	8,3954	121,802	8,3982	121,812	8,3983
T32	116,325	8,1707	116,342	8,1752	116,333	8,1753
Q33	122,907	8,3852	122,906	8,3846	122,906	8,3864
L34	123,484	8,2099	123,482	8,2126	123,482	8,2145
T35	115,182	8,0413	115,180	8,0458	115,170	8,0459
Q36	122,898	8,3410	122,896	8,3454	122,896	8,3456
N37	120,329	8,3750	120,327	8,3795	120,327	8,3796
A38	124,841	8,1724	124,830	8,1735	124,820	8,1753
V39	119,430	8,0447	119,409	8,0458	119,399	8,0459
S40	119,714	8,2967	119,712	8,3029	119,702	8,3030
C41						

P42						
Y43	120,515	7,9800	120,493	7,9845	120,474	7,9812
L44	126,863	7,8932	126,832	7,8891	126,803	7,8893
P45						
S46	116,110	8,3750	116,196	8,3982	116,196	8,3983
N47	120,700	8,4091	120,620	8,4169	120,650	8,4171
L48	121,950	7,9272	121,919	7,9198	121,919	7,9216
L49	121,862	7,8966	121,831	7,8960	121,802	7,8961
K50	121,696	7,9885	121,616	7,9845	121,597	7,9863
K51	121,911	8,0311	121,831	8,0271	121,812	8,0238
F52						
R53	123,454	8,1758	123,404	8,1735	123,374	8,1736
S54	118,005	8,3699	117,983	8,3778	117,983	8,3762
S55	118,776	8,4720	118,794	8,4765	118,784	8,4767
T56	116,032	8,2354	116,088	8,2467	116,069	8,2468
S57	118,678	8,2797	118,716	8,2893	118,696	8,2877
S58	118,844	8,3988	118,901	8,4135	118,833	8,4188
S59	118,776	8,3767	118,794	8,3829	118,784	8,3847
L60	124,372	8,2201	124,361	8,2194	124,361	8,2213
G61	109,742	8,2746	109,730	8,2773	109,730	8,2792
D62	121,296	8,1775	121,304	8,1820	121,304	8,1821
K63	122,302	8,3035	122,300	8,3080	122,300	8,3098
S64	117,565	8,3307	117,544	8,3335	117,553	8,3354
E65						
Y66	121,120	8,0464	121,079	8,0424	121,079	8,0442
L67	124,519	7,9545	124,459	7,9555	124,439	7,9557
E68	122,126	8,2473	122,095	8,2467	122,095	8,2468
M69	121,823	8,2456	121,870	8,2518	121,870	8,2519
E70	123,103	8,4125	123,111	8,4152	123,121	8,4154
E71	122,859	8,4806	122,837	8,4782	122,837	8,4801
G72	110,426	8,4244	110,443	8,4289	110,434	8,4307
V73	120,700	7,8830	120,679	7,8823	120,679	7,8842
K74	125,418	8,3495	125,425	8,3539	125,406	8,3541
E75	122,546	8,4414	122,564	8,4459	122,554	8,4460
S76	117,262	8,2746	117,270	8,2807	117,260	8,2809
L77	124,509	8,1809	124,527	8,1888	124,527	8,1889
R78	121,862	8,1264	121,861	8,1326	121,851	8,1327
G79	110,767	8,4397	110,765	8,4459	110,756	8,4460
K80						
E81	122,419	8,4891	122,398	8,4919	122,398	8,4937
E82						
K83	123,054	8,3733	123,033	8,3761	123,033	8,3762
C84	121,218	8,4125	121,206	8,4135	121,197	8,4137
Q85	123,786	8,5316	123,785	8,5310	123,775	8,5311

G86	111,363	8,4976	111,371	8,5055	111,361	8,5056
K87	121,648	8,2746	121,655	8,2824	121,646	8,2809
G88	110,992	8,4993	110,980	8,5038	110,971	8,5039
D89	121,257	8,2490	121,265	8,2501	121,265	8,2519
D90	121,804	8,3954	121,802	8,3982	121,812	8,3983
S91	116,735	8,2984	116,743	8,2995	116,733	8,2996
E92						
T93	115,280	8,0430	115,297	8,0509	115,307	8,0510
D94						
K95	122,487	8,2047	122,495	8,2109	122,476	8,2077
N96	119,147	8,3886	119,175	8,3948	119,194	8,3915
N97	119,743	8,2422	119,761	8,2501	119,761	8,2502
C98	120,046	8,2865	120,054	8,2876	120,044	8,2826
S99	118,815	8,4278	118,852	8,4391	118,833	8,4188
N100	121,667	8,3784	121,675	8,3795	121,665	8,3813
A101	124,988	8,1452	124,986	8,1513	125,279	8,1872
K102	121,169	8,1826	121,118	8,1854	121,441	8,1583
A103	126,482	8,2422	126,422	8,2382	126,978	8,2247
V104	120,056	8,0822	120,044	8,0798	x	x
E105	125,476	8,5095	125,464	8,5089	x	x
T106	115,172	8,1077	115,190	8,1122	x	x
D107	124,245	8,3971	124,253	8,4016	x	x
V108	124,050	7,6020	124,048	7,6014	x	x

Die Kv1.4 T1K-Domäne (N15) mit Kv1.4 IP75 und Kv14 C84:

T1K (N15) + IP75: 1-M	T1K (N15)		T1K (N15) mit IP75		T1K (N15) mit IP75 und C84	
					δ (NH) [ppm]	
E						
R	113,704	7,2044	113,719	7,2061	113,743	7,2059
V	123,821	8,8439	123,815	8,8408	123,824	8,8432
5-V	126,953	8,7997	126,951	8,7986	126,957	8,7951
I	128,928	9,4514	128,930	9,4508	128,911	9,4528
N	128,725	9,6690	128,730	9,6705	128,714	9,6660
V	126,198	8,9037	126,199	8,9042	126,209	8,9029
S	119,120	8,6176	119,126	8,6182	119,130	8,6150
10-G	112,068	8,9589	112,076	8,9554	112,059	8,9516

L	128,139	8,3823	128,119	8,3830	128,124	8,3795
R	126,619	8,1867	126,620	8,1892	126,622	8,1865
F	126,114	9,8910	126,115	9,8917	126,082	9,8921
E	120,633	7,5411	120,644	7,5392	120,670	7,5402
15-T	114,521	8,3695	114,510	8,3680	114,568	8,3652
Q	121,344	8,8321	121,386	8,8294	121,342	8,8224
M	125,441	8,9923	125,463	8,9929	125,427	8,9900
K	115,708	8,2020	115,737	8,2028	115,727	8,1989
T	116,370	7,3763	116,352	7,3748	116,386	7,3717
20-L	120,238	7,0737	120,258	7,0826	120,269	7,0896
A	118,894	7,3031	118,908	7,3014	118,844	7,3065
Q	121,088	7,1046	121,096	7,1051	121,071	7,1046
F	117,832	7,6903	117,816	7,6920	117,829	7,6846
P						
25-E	115,670	8,3334	115,683	8,3338	115,670	8,3314
T	119,141	7,3745	119,143	7,3728	119,177	7,3723
L	119,527	6,7716	119,513	6,7729	119,514	6,7763
L	116,217	6,7478	116,201	6,7520	116,229	6,7411
G	104,102	7,2714	104,083	7,2714	104,101	7,2685
30-D	121,635	7,1290	121,635	7,1298	121,638	7,1293
P						
E						
K	119,338	7,8610	119,363	7,8589	119,398	7,8593
R	119,906	7,7363	119,908	7,7297	119,884	7,7263
35-T	116,229	7,3678	116,209	7,3655	116,249	7,3638
Q	119,869	7,6779	119,887	7,6754	119,877	7,6778
Y	117,827	7,6903	117,829	7,6920	117,879	7,6846
F	122,898	7,7842	122,893	7,7831	122,901	7,7803
D	129,109	8,4146	129,097	8,4117	129,096	8,4120
40-P						
L	120,125	9,4075	120,121	9,4048	120,117	9,3979
R	130,162	8,8390	130,132	8,8333	130,127	8,8321
N	127,966	8,7538	127,952	8,7477	127,924	8,7439
E	128,200	8,4218	128,260	8,4321	128,254	8,4382
45-Y	120,905	8,6923	120,884	8,6864	120,891	8,6857
F	124,114	8,5564	124,124	8,5587	124,127	8,5565
F	124,854	8,3277	124,839	8,3258	124,829	8,3292
D	129,878	8,9852	129,898	8,9830	129,885	8,9820
R	116,335	6,8793	116,319	6,8767	116,388	6,8786
50-N	119,270	7,9162	119,266	7,9169	119,292	7,9170
R	113,827	6,8478	113,815	6,8501	113,816	6,8464
P						
S	120,264	7,8137	120,290	7,8143	120,301	7,8154
F	124,448	9,2032	124,457	9,2040	124,428	9,2042

55-D	118,801	9,1079	118,813	9,1087	118,821	9,1090
A	116,806	7,8155	116,776	7,8153	116,772	7,8118
I	114,866	6,9280	114,865	6,9261	114,882	6,9223
L	117,682	8,0624	117,678	8,0581	117,664	8,0560
Y	123,590	7,5450	123,610	7,5458	123,599	7,5419
60-Y						
Y						
Q	118,258	7,7391	118,290	7,7483	118,278	7,7416
S	111,358	8,0454	111,328	8,0464	111,339	8,0558
G						
65-G	107,643	8,3168	107,675	8,3184	107,696	8,3153
R	121,420	7,6455	121,419	7,6427	121,434	7,6454
L	113,842	7,0617	113,856	7,0618	113,881	7,0623
K	117,261	8,7826	117,280	8,7802	117,305	8,7810
R	125,597	9,2796	125,635	9,2860	125,706	9,2896
70-P						
V						
N	113,658	8,2815	113,652	8,2869	113,640	8,2814
V	7,681	7,6809	7,677	7,6770	7,675	7,6746
P						
75-F	110,822	7,7089	110,718	7,7063	110,715	7,7036
D	119,329	7,7185	119,329	7,7193	119,336	7,7163
I	122,326	7,2791	122,341	7,2718	122,371	7,2813
F	119,760	8,3247	119,729	8,3266	119,773	8,3307
T	113,147	8,3823	113,228	8,3832	113,240	8,3795
80-E	120,238	7,0747	120,204	7,0684	120,248	7,0789
E	116,350	8,7643	116,340	8,7652	116,348	8,7652
V	120,130	8,1373	120,130	8,1350	120,140	8,1300
K	117,926	7,5344	117,934	7,5381	117,924	7,5365
F	124,036	7,9159	124,041	7,9167	124,029	7,9137
85-Y						
Q	118,933	7,8277	118,934	7,8253	118,943	7,8247
L	124,996	8,5051	125,007	8,5059	125,019	8,5061
G	106,594	8,3895	106,572	8,3758	106,572	8,3689

Das Kv1.4 IP75-Inaktivierungspeptid (N15) mit Kv1.4 C84:

IP75(N15) + C84		ohne C84		mit C84	
		δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]	δ (NH) [ppm]	δ (HN) [ppm]
1	G				
	S				
	T	117,398	8,3791	117,390	8,3815

	M	123,522	8,4132	123,514	8,4155
5	E	123,639	8,3689	123,641	8,3713
	V	122,487	8,1407	122,479	8,1431
	A	128,327	8,3451	128,329	8,3474
	M	120,992	8,3076	120,984	8,3100
	V	122,487	8,0692	122,479	8,0716
10	S	120,523	8,4063	120,525	8,4053
	A	127,243	8,4710	127,245	8,4734
	E	120,221	8,3791	120,223	8,3815
	S	117,261	8,2667	117,263	8,2691
	S	118,570	8,3621	118,572	8,3645
15	G	111,450	8,4302	111,452	8,4326
	C	119,478	8,2089	119,480	8,2078
	N	122,008	8,5562	122,010	8,5586
	S	116,871	8,2293	116,873	8,2317
	H				
20	M	122,408	8,1612	122,410	8,1602
	P				
	Y	121,539	8,3348	121,541	8,3338
	G	112,065	8,3417	112,058	8,3440
	Y	121,529	8,0114	121,531	8,0137
25	A	124,723	8,3825	124,725	8,3883
	A				
	Q	119,742	8,0795	119,734	8,0818
	A	124,342	8,1033	124,334	8,1057
	R	119,664	7,9603	119,656	7,9593
30	A	123,903	7,9603	123,905	7,9627
	R	119,644	8,1373	119,637	8,1363
	E	121,529	8,0114	121,531	8,0137
	R	121,822	8,1101	121,824	8,1125
	E	121,119	8,0318	121,111	8,0342
35	R	120,436	8,1067	120,437	8,1091
	L	121,744	8,1339	121,746	8,1363
	A	122,936	8,0079	122,938	8,0103
	H	118,316	8,2804	118,308	8,2827
	S	117,457	8,3280	117,459	8,3304
40	R	124,020	8,4472	124,012	8,4496
	A				
	A	122,487	8,1033	122,479	8,1057
	A	123,356	8,1578	123,348	8,1602
	A	123,444	8,0795	123,436	8,0784
45	A	123,160	7,9807	123,153	7,9831
	A	123,053	7,9160	123,055	7,9150
	V	120,074	7,8275	120,076	7,8299
	A	126,081	8,0624	126,073	8,0648
	A	122,321	7,9807	122,313	7,9831

50	A	123,180	8,0250	123,172	8,0274
	T	113,911	7,9909	113,913	7,9933
	A	126,432	8,0454	126,424	8,0478
	A	122,780	8,0488	122,781	8,0512
	V	119,664	7,9603	119,656	7,9593
55	E	125,006	8,4370	124,999	8,4360
	G	110,698	8,4098	110,700	8,4121
	T	113,462	8,1544	113,464	8,1567
	G	112,075	8,5630	112,077	8,5620
	G	109,477	8,3042	109,479	8,3066
60	S	116,666	8,4200	116,658	8,4223
	G	111,899	8,5732	111,892	8,5756
	G	109,760	8,2191	109,753	8,2214
	G	109,712	8,3314	109,714	8,3304
	P				
65	H	119,557	8,5528	119,558	8,5551
	H	121,666	8,7571	121,649	8,7526
	H	120,934	8,4302	120,926	8,4326
	H	121,842	8,8184	121,863	8,8139
	Q	123,092	8,6856	123,084	8,6879
70	T	117,398	8,3791	117,390	8,3815
	R				
	G	124,840	8,5119	124,833	8,5143
	A	124,469	8,1544	124,461	8,1567
	Y	120,045	8,1782	120,047	8,1806
75	S	118,424	8,0999	118,416	8,0989
	S	118,902	8,3519	118,894	8,3508
	H	120,992	8,3076	120,984	8,3100
	D	127,614	8,1612	127,616	8,1636

11. Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, Mai 2015

Johannes Hiltl

12. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer** für die Entwicklung des Themas und die Betreuung der Doktorarbeit bedanken. Dabei denke ich insbesondere an die Hilfestellung bei der Beschreibung der wissenschaftlichen Daten, die zahllosen Fachdiskussionen und die vielen Ratschläge zu theoretischen, aber auch praktischen Fragen. Zusätzlich möchte ich mich für die Bereitstellung seiner Labors, Geräte und Materialien bedanken.

Bei Herrn Prof. **Dr. Werner Kremer** möchte ich mich herzlichst für seine Geduld und Hilfe bei der Aufnahme und Auswertung von NMR-spektroskopischen Messungen bedanken. Stets fand ich tatkräftige Unterstützung bei Fragen der Probenaufbereitung, Analytik und Auswertung, sowie beim Verfassen dieser Arbeit.

Gleichfalls möchte ich mich bei Frau **Dr. Gudrun Horn** für die biochemische Betreuung, die Unterstützung bei Problemen jeglicher Art und das angenehme Laborarbeitsklima bedanken.

Dr. Michael Spörner und **Dr. Paul Sander** danke ich für die Auskünfte ihrer Methodik und die stets angenehme und fröhliche Zusammenarbeit.

Dank gilt meinem Laborkollegen **Dr. Axel Freischmidt**, welcher mich in die zellfreie Proteinsynthese einführte und dessen Forschungsergebnisse ich weiter entwickeln durfte.

Großer Dank gilt meinem Laborkollegen **Malte Andrasch**, welcher stets ein offenes Ohr im beruflichen, sowie auch im privaten für mich hatte.

Sabine Laberer und **Sabine Ruppel** möchte ich für ihr organisatorisches Geschick danken, welches eine reibungslose Laborarbeit erst ermöglichte. Zudem bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für eine tolle Atmosphäre und die stets gemeinsamen Unternehmungen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meiner Freundin Beke ganz besonders bedanken, die mich die komplette Doktorarbeit begleitet und immer unterstützt hat.