

Strukturelle und biochemische Charakterisierung des
cytosolischen C-Terminus von Polycystin-2 und seine
Interaktion mit dem Zytoskelett-assoziierten Protein
mammalian diaphanous homolog 1



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

vorgelegt von

Maren Eberhardt, geb. Schmidt

aus Berlin-Kreuzberg

November 2011

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 21.11.2011

Das Promotionskolloquium fand statt am: 17.02.2012

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

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. Karl Kunzelmann

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer
2. Gutachter: apl. Prof. Dr. Wolfram Gronwald
3. Prüfer: Prof. Ralph Witzgall

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	ADPKD – “Autosomal dominant polycystic kidney disease”	1
1.2	Die Proteinfamilie der Polycystine	2
1.3	Die Lokalisation von Polycystinen	3
1.4	Unterschiedliche Funktionen von Polycystin-2	4
1.4.1	Funktion an der Plasmamembran	4
1.4.2	Funktion im Endoplasmatischen Retikulum	5
1.4.3	Funktion in den primären Cilien	6
1.4.4	Funktion am mitotischen Spindelapparat und am Zentrosom	7
1.5	Interaktionspartner von Polycystin-2 in der Zelle	8
1.5.1	Polycystin-1	8
1.5.2	Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR)	9
1.5.3	Transient-Receptor-Potential-Channel 1 (TRPC1)	9
1.5.4	Transient-Receptor-Potential-Cation-Channel-Subfamily-V-member-4 (TRPV4)	10
1.5.5	Polycystin-2 interactor, Golgi- and endoplasmic reticulum-associated protein (PIGEA-14)	10
1.5.6	Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1 und 2 (PACS-1 und-2)	10
1.5.7	CD2-associated protein (CD2AP)	11
1.5.8	HCLS1-associated protein X-1 (Hax-1)	11
1.5.9	α -Actinin	12
1.5.10	Tropomyosin-1 (TM-1)	12
1.5.11	Troponin-I	12
1.5.12	Pericentrin	12
1.5.13	Casein Kinase 2(CK2)	12
1.5.14	ATPase p97 und Homocysteine-induced ER protein (HERP)	12
1.5.15	Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3)	13
1.5.16	Phospholipase C- γ 2 (PLC- γ 2)	13
1.5.17	DNA-binding protein inhibitor (Id2)	14
1.5.18	Eukaryotic translation initiation factor (Elf2 α) und pancreatic ER-resistant eukaryotic translation initiation factor kinase (PERK)	14
1.5.19	FYVE Domain-Containing Protein (FPC)	14
1.5.20	Exocyst Protein Sec10	15

1.6	Der Interaktionspartner mammalian diaphanous homolog 1 (mDia1).....	16
1.7	Übersicht der Binderegionen in Polycystin-2.....	17
1.8	Strukturelle Aspekte des cytosolischen C-Terminus von Polycystin-2.....	18
1.9	Fragmente des C-Terminus von Polycystin-2	20
1.10	Zielsetzung	22
2	Materialien und Geräte	23
2.1	Bakterienstämme und Plasmide.....	23
2.2	Nährmedien und Antibiotika	23
2.2.1	Nährmedien	23
2.2.2	Antibiotika	24
2.3	Chemikalien.....	24
2.4	Häufig verwendete Pufferlösungen und Gele.....	24
2.5	Enzyme	26
2.6	Proteinstandard	26
2.7	Säulenmaterialien	27
2.8	Verbrauchsmaterialien	27
2.9	Geräte	27
2.10	Verwendete Software.....	28
3	Methoden.....	29
3.1	Expression und Reinigung.....	29
3.1.1	Expression der ungelabelten PKD2C-Fragmente	29
3.1.2	Expression der ¹⁵ N, ¹³ C, ² H markierten PKD2C-Fragmente	29
3.1.3	Reinigung der PKD2C-Fragmente mit His-Tag.....	30
3.1.4	Reinigung der PKD2C-Fragmente mit MBP-Tag ohne Ca ²⁺	31
3.1.5	Reinigung der PKD2C-Fragmente mit MBP-Tag mit Ca ²⁺	32
3.1.6	Expression und Reinigung der TEV-Protease	32
3.1.7	Expression und Reinigung von mDia1(69-457).....	33
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	33
3.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels UV-Spektroskopie.....	33
3.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli	34
3.3	Kernspinresonanzspektroskopie	35
3.3.1	Probenbereitung	35

3.3.1.1	pH-Titrationsen und Zuordnung der Ringprotonen	35
3.3.1.2	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -Titrationsen.....	35
3.3.1.3	Titration mit mDia1(69-457)	36
3.3.2	Pulsprogramme, Auswertung und Abbildung der Spektren	36
3.3.2.1	1D-Spektren.....	36
3.3.2.2	2D-Spektren.....	38
3.3.2.3	3D-Spektren.....	39
3.4	CD-Spektroskopie.....	40
3.4.1	Probenbereitung	40
3.4.2	Auswertung und Abbildung der Daten	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C680-796.....	41
4.1.1	Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ¹ H- und 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-NMR-Spektroskopie	41
4.1.1.1	Interaktion mit den bivalenten Kationen Ca ²⁺ und Mg ²⁺	42
4.1.1.2	Bestimmung des Aggregationszustandes in Lösung mittels 1D- ¹ H- NMR-Diffusionsmessungen	44
4.1.1.3	NMR-spektroskopische Charakterisierung mittels 2D-(¹ H- ¹⁵ N)- HSQC-Spektren.....	46
4.1.2	Zuordnung der Resonanzen der Ringprotonen von Tyr684, Tyr762, Phe738, Phe759, His750, His773, His775 und His793.....	47
4.1.3	Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste mittels 1D- ¹ H- und (¹ H- ¹⁵ N)-HSQC-Spektren	49
4.1.3.1	Bestimmung der Säurekonstanten mittels 1D- ¹ H-Spektren	49
4.1.3.2	Bestimmung der Säurekonstanten mittels (¹ H- ¹⁵ N)-HSQC- Spektren	51
4.1.4	Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺ mittels CD-Spektroskopie	52
4.2	Hochdruck-NMR-spektroskopische Untersuchungen an PKD2C680-796.....	53
4.2.1	Druckabhängigkeit in Anwesenheit von Ca ²⁺	54
4.2.2	Druckabhängigkeit in Abwesenheit von Ca ²⁺	57
4.2.3	Bestimmung des Aggregationszustandes in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺ bei 40 und 2000 bar	59

4.3	Spektroskopische und biochemische Charakterisierung der EF-Hand-Mutanten PKD2C680-796(T771A, E774A) und PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A)	60
4.3.1	Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ¹ H- und 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-NMR-Spektroskopie	61
4.3.1.1	Interaktion mit Ca ²⁺	62
4.3.1.2	Bestimmung des Aggregationszustandes in Lösung mittels 1D- ¹ H-NMR-Diffusionsmessungen	68
4.3.1.3	NMR-spektroskopische Charakterisierung mittels 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-HSQC-Spektren.....	70
4.3.2	Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺ mittels CD-Spektroskopie	72
4.4	Interaktion des Fragments PKD2C680-796 mit dem Protein <i>mammalian diaphanous homolog 1</i> (mDia1)	75
4.4.1	Interne Referenzierung über die Aminosäure Gln743.....	76
4.4.2	Bindungsstudien von mDia1(69-457) an PKD2C680-796.....	77
4.5	Struktureller Vergleich und Vergleich der Zuordnungen des Fragments PKD2C680-796 (pdb: 2KLE) mit PKD2C720-797 (pdb: 2KQ6) und PKD2C725-880	81
4.5.1	Verbesserte Zuordnung und Vergleich des Fragments PKD2C680-796 mit den Zuordnungen von PKD2C720-797 und PKD2C725-880	81
4.5.1.1	Verbesserung der Zuordnung von PKD2C680-796	81
4.5.1.2	Vergleich der Zuordnungen der Fragmente PKD2C680-796 (pdb-Struktur 2KLE), PKD2C720-797 (pdb-Struktur 2KQ6) und der Zuordnung des Fragments PKD2C725-880.....	85
4.5.2	Vergleich der Strukturen 2KLE und 2KQ6	88
4.6	Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C725-880	90
4.6.1	Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ¹ H- und 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-NMR-Spektroskopie	91
4.6.1.1	Interaktion mit Ca ²⁺	91
4.6.1.2	Bestimmung des Aggregationszustandes in Lösung mittels 1D- ¹ H-NMR-Diffusionsmessungen	97
4.6.1.3	NMR-spektroskopische Charakterisierung mittels 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-HSQC-Spektren.....	103
4.6.2	Zuordnung des (¹ H- ¹⁵ N)-HSQC-Spektrums	104
4.6.3	Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺ mittels CD-Spektroskopie	105

4.7	Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C680-968.....	106
4.7.1	Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ¹ H- und 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-NMR-Spektroskopie	106
4.7.1.1	Interaktion mit Ca ²⁺	107
4.7.1.2	Bestimmung des Aggregationszustandes in Lösung mittels 1D- ¹ H-NMR-Diffusionsmessungen	109
4.7.1.3	NMR-spektroskopische Charakterisierung mittels 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-HSQC-Spektren.....	111
4.7.2	Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺ mittels CD-Spektroskopie	112
4.8	Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C797-968.....	113
4.8.1	Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ¹ H- und 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-NMR-Spektroskopie	113
4.8.1.1	Interaktion mit den bivalenten Kationen Ca ²⁺ und Mg ²⁺	114
4.8.1.2	Bestimmung des Aggregationszustandes in Lösung mittels 1D- ¹ H-NMR-Diffusionsmessungen	116
4.8.1.3	NMR-spektroskopische Charakterisierung mittels 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-HSQC-Spektren.....	118
4.8.2	Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie	119
4.9	Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C828-900.....	120
4.9.1	Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ¹ H- und 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-NMR-Spektroskopie	121
4.9.1.1	Interaktion mit Ca ²⁺	122
4.9.1.2	Bestimmung des Aggregationszustandes in Lösung mittels 1D- ¹ H-NMR-Diffusionsmessungen	122
4.9.1.3	NMR-spektroskopische Charakterisierung mittels 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-HSQC-Spektren.....	124
4.9.2	Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie	125
5	Diskussion.....	126
5.1	Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C680-796.....	126
5.1.1	Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ¹ H- und 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-NMR-Spektroskopie	126
5.1.2	Zuordnung der Resonanzen der Ringprotonen von Tyr684, Tyr762, Phe738, Phe759, His750, His773, His775 und His793.....	127

5.1.3	Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste mittels 1D- ¹ H- und (¹ H- ¹⁵ N)-HSQC-Spektren	128
5.1.4	Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺ mittels CD-Spektroskopie	129
5.2	Hochdruck-NMR-spektroskopische Untersuchungen an PKD2C680-796.....	130
5.2.1	Druckabhängigkeit in Anwesenheit von Ca ²⁺	130
5.2.2	Druckabhängigkeit in Abwesenheit von Ca ²⁺	131
5.2.3	Bestimmung des Aggregationszustandes in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺ bei 40 und 2000 bar	132
5.3	Spektroskopische und biochemische Charakterisierung der EF-Hand-Mutanten PKD2C680-796(T771A, E774A) und PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A)	133
5.3.1	Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ¹ H- und 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-NMR-Spektroskopie	133
5.3.2	Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺ mittels CD-Spektroskopie	135
5.4	Interaktion des Fragments PKD2C680-796 mit dem Protein <i>mammalian diaphanous homolog 1</i> (mDia1).....	136
5.5	Struktureller Vergleich und Vergleich der Zuordnungen des Fragments PKD2C680-796 (pdb: 2KLE) mit PKD2C720-797 (pdb: 2KQ6) und PKD2C725-880	137
5.5.1	Verbesserte Zuordnung und Vergleich des Fragments PKD2C680-796 mit den Zuordnungen von PKD2C720-797 und PKD2C725-880	137
5.5.1.1	Verbesserung der Zuordnung von PKD2C680-796	137
5.5.1.2	Vergleich der Zuordnungen der Fragmente PKD2C680-796 (pdb-Struktur 2KLE), PKD2C720-797 (pdb-Struktur 2KQ6) und der Zuordnung des Fragments PKD2C725-880.....	138
5.5.2	Vergleich der Strukturen 2KLE und 2KQ6	139
5.6	Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C725-880.....	140
5.6.1	Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ¹ H- und 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-NMR-Spektroskopie	140
5.6.2	Zuordnung des (¹ H- ¹⁵ N)-HSQC-Spektrum	143
5.6.3	Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺ mittels CD-Spektroskopie	144
5.7	Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C680-968.....	144

5.7.1	Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ¹ H- und 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-NMR-Spektroskopie	144
5.7.2	Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca ²⁺ mittels CD-Spektroskopie	146
5.8	Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C797-968.....	146
5.8.1	Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ¹ H- und 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-NMR-Spektroskopie	146
5.8.2	Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie	148
5.9	Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C828-900.....	148
5.9.1	Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ¹ H- und 2D-(¹ H- ¹⁵ N)-NMR-Spektroskopie	148
5.9.2	Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie	149
6	Zusammenfassung	150
7	Literaturverzeichnis	152
8	Abkürzungsverzeichnis	159
9	Danksagung	161
10	Anhang	162
11	Erklärung	172

1 Einleitung

1.1 ADPKD – “Autosomal dominant polycystic kidney disease”

Die Autosomal Dominante Polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) wird normalerweise im Erwachsenenalter diagnostiziert. Sie ist durch die beidseitige Ausbildung und Vergrößerung von flüssigkeitsgefüllten Zysten in der Niere charakterisiert. Die Krankheit zeigt eine Inzidenz von 1:400 bis 1:000 und ist damit eine der häufigsten monogenetischen Erbkrankheiten. In den allermeisten Fällen, führt die ADPKD zu terminaler Niereninsuffizienz [1]. ADPKD ist eine systemische Erkrankung. Die Ausbildung von Zysten ist nicht nur auf die Nieren beschränkt, sondern zeigt sich auch in der Leber, in der Bauchspeicheldrüse, in der Samenblase und in der Spinnwebhaut. Patienten haben ein fünffach erhöhtes Risiko ein intrakranielles Aneurysma zu entwickeln und dadurch bedingt eine erhöhte Sterblichkeitsrate aufgrund der Ruptur dieser Aneurysmen [1]. Weitere Symptome sind Flankenschmerzen, Mikro- oder Hämaturie, rezidivierende Zysteninfektionen, Bluthochdruck, Nephrolithiasis und mäßiggradige Polyurie [2].

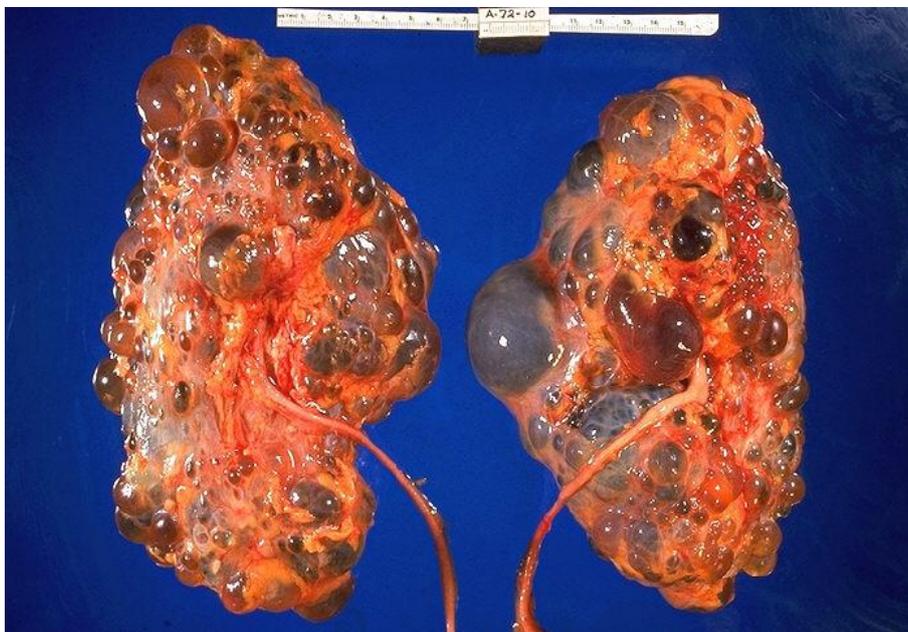


Abbildung 1.1 Foto einer Zystenniere: Das Foto stammt aus dem zentralen Medienarchiv Wikimedia Commons und zeigt zwei polyzystische Nieren nach Entfernung aus dem Körper.

ADPKD ist eine genetisch heterogene Erkrankung und wird hervorgerufen durch Mutationen in den Genen PKD1 (85 % [3-4]) und PKD2 [5-6]. Diese Gene kodieren für die Proteine Polycystin-1 (460 kDa) [7] und -2 (110 kDa) [8]. Durch die große

phänotypische Variation der Krankheit gibt es große Unterschiede im Krankheitsverlauf [9]. Die ersten Symptome der Krankheit treten zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr auf [2]. Der Beginn der terminalen Niereninsuffizienz liegt bei Menschen mit Mutationen im PKD1-Gen bei 53 Jahren und bei Patienten mit Mutationen im PKD2-Gen bei 69.1 Jahren, im Vergleich zu 78 Jahren in der Kontrollgruppe. Frauen (71 Jahre) mit Mutationen im PKD2-Gen haben eine signifikant höhere Lebenserwartung als Männer (67.3 Jahre), wohingegen kein geschlechtsspezifischer Unterschied bei Mutationen im PKD1-Gen festgestellt wurde. PKD2-Patienten haben durchschnittlich weniger Probleme mit Bluthochdruck, Infektionen des Urogenitaltrakts und Hämaturie [10].

Die Diagnose für ADPKD wird meistens klinisch zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr, bei positiver Familienanamnese (70 %), bei beidseitig deutlich vergrößerten Nieren mit mehreren Zysten und eingeschränkter Nierenfunktion, gestellt. Der Nachweis extrarenaler Manifestationen unterstützt den Nachweis bei negativer Familienanamnese (30 %). Bei Nachkommen von ADPKD-Patienten kann eine Diagnose ab dem 20. Lebensjahr mittels Ultraschall nachgewiesen werden. Fehlende Zysten im Alter über 30 Jahre schließen die Krankheit aus [2, 11]. Bei zweifelhafter Bilddiagnostik kann eine molekulare Diagnostik (bei ca. 90 % der Patienten können Mutationen nachgewiesen werden) eine weitere Möglichkeit sein [12].

Bis jetzt gibt es keine Therapie, die das Wachstum oder die Vergrößerung der flüssigkeitsgefüllten Zysten verhindern kann. Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich auf die Linderung der Komplikationen. Gen-Therapieansätze sind für die ADPKD nicht zu favorisieren, aufgrund der großen genetischen Heterogenität der Mutationen [9, 13-14]. Aktuell gibt es eine Vielzahl von Studien, die an der molekularen Pathogenese der Bildung und Vergrößerung von Zysten ansetzen [13].

1.2 Die Proteinfamilie der Polycystine

Der Name Polycystin kommt ursprünglich von dem Gen, das hauptsächlich für die ADPKD (PKD1) verantwortlich ist. Sieben weitere Polycystine wurden inzwischen identifiziert und bilden eine eigene Proteinfamilie. Polycystin-1 (PC1) hat eine lange N-terminale extrazelluläre Domäne, elf Transmembrandomänen und einer kurze intrazelluläre C-terminale Domäne und soll als G-Protein-gekoppelter Rezeptor funktionieren. Polycystin-2 (PC2) hat sechs Transmembrandomänen, kurze intrazelluläre N- und C-terminale Domänen und ist ein Ca^{2+} selektiver, intrazellulärer Kationenkanal (Abbildung 1.2). Die Polycystine werden in zwei Subfamilien (PC1-receptor like molecules und PC2 ion channel-like proteins), abhängig von ihrer Proteinstruktur und vermutlicher Funktion eingeteilt [15]. Zu den PC1 receptor-like Molekülen gehören PC1 [4, 7, 16-17], polycystin-REJ [18], polycystin-1L1 (PCL) [19], polycystin-1L2 [20-21] und polycystin-1L3 [21]. Zu den PC2 ion channel-like Proteinen gehören PC2 [5-6], polycystin-L [22-23] und polycystin-2L2 [24-25]. PC2 und PC2 ion channel-like Proteine haben bezüglich ihrer Sequenz und Topologie

Ähnlichkeit zur Superfamilie der TRP-Kanäle (transient receptor potential). Aus diesem Grund bilden sie die TRPP-Subfamilie. Alle Polycystine haben spezifische Sequenzhomologien in ihren letzten sechs Transmembrandomänen [15].

Das Protein Polycystin-2 besteht aus 968 Aminosäuren und ist aus sechs Transmembrandomänen und cytosolische N- und C-Termini aufgebaut. Für den C-Terminus wurden zwei EF-Hände (Aminosäuren 727-739 und 763-774) [5, 26], zwei Coiled-Coil Domänen (Aminosäuren 781-796 und 835-873) [5, 27-28] und ein ER Retentionssignal (Aminosäuren 787-820) [8] gefunden.

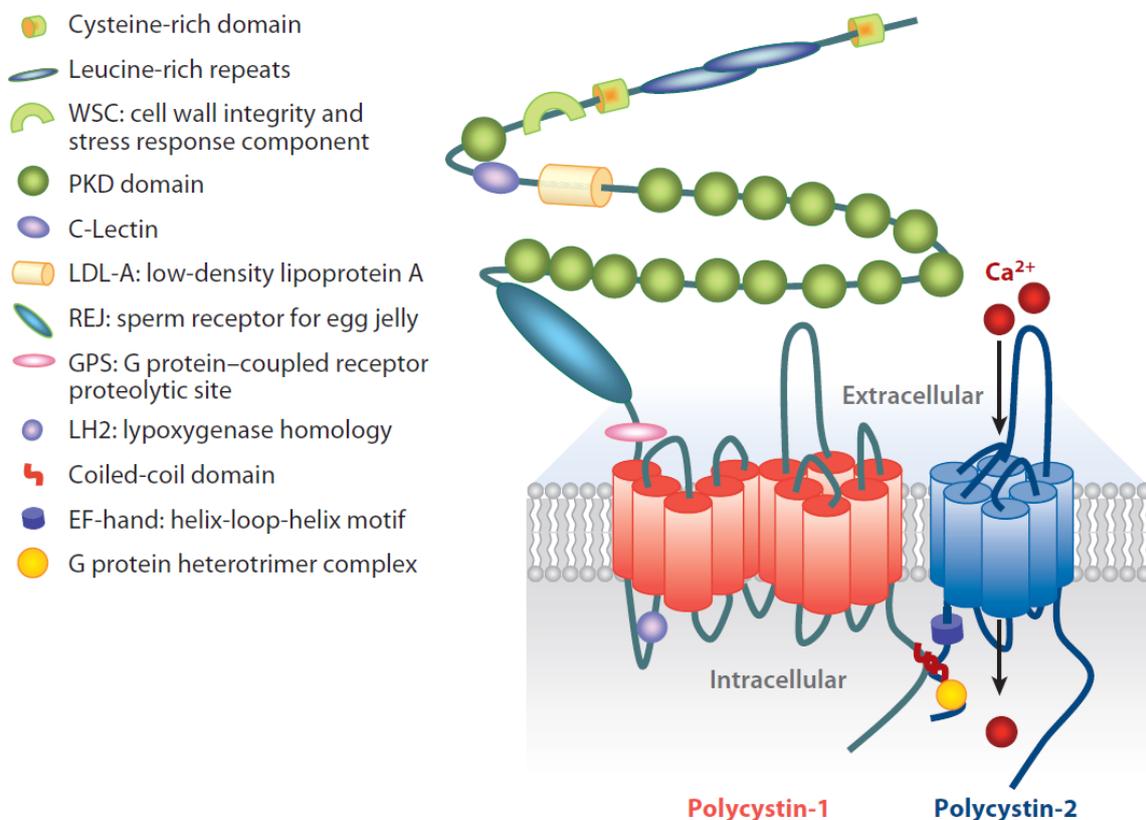


Abbildung 1.2 Topologie von Polycystin-1 und -2: Abgebildet sind Polycystin-1, das als G-Protein-gekoppelter Rezeptor funktionieren soll und Polycystin-2, das ein Ca²⁺-selektiver, intrazellulärer Kationenkanal ist. Polycystin-1 und -2 interagieren über ihre C-terminalen Coiled-Coil-Domänen miteinander [15].

1.3 Die Lokalisation von Polycystinen

Alle Polycystine werden in den Hoden exprimiert (Zitate zu den einzelnen Polycystinen in Kapitel 1.2). PC1 und PC2 werden in einer Vielzahl von Geweben und Organen exprimiert, z. B. in den Epithelzellen in der Niere, Leber, Bauspeicheldrüse, der Brust, im Muskel, in den Blutgefäßen und in Astrocyten im Gehirn [29-37]. Die subzelluläre Lokalisation wird von vielen Wissenschaftlern diskutiert. PC1 und PC2 wurden am Schaft und dem Basalkörper der primären Cilien

nachgewiesen [15, 38]. Neben den Cilien werden PC1 und PC2 auch in subzellulären Bereichen und Membrandomänen gefunden. PC1 wurde in apikalen Membranen, Adhärenz- und Desmosomalverbindungen gefunden [30-31, 39-40]. PC2 wurde im Zytoplasma [36] und in den apikalen und basolateralen Membranen in der Niere [8, 34, 41], im Endoplasmatischen Retikulum und der Plasmamembran gefunden [8, 42].

1.4 Unterschiedliche Funktionen von Polycystin-2

1.4.1 Funktion an der Plasmamembran

In der Studie von Hanaoka *et al* [43] konnte gezeigt werden, dass PC2 nur in Verbindung mit PC1 als Kanal funktionieren kann. PC1 unterstützt den Transport von PC2 an die Plasmamembran und ermöglicht so überhaupt erst die Funktionalität des Kanals. PC2 bildet einen funktionalen Kanal in der Plasmamembran mit einer konstitutiven Aktivität bei Überexpression [44]. Dieser Kanal ist durchlässig für Kationen mit einer leicht erhöhten Selektivität für Ca^{2+} im Vergleich zu Na^+ und K^+ . Allerdings ist die Leitfähigkeit bei K^+ höher [45]. PC2 kann also in der Plasmamembran aktiv sein. Diese Aktivität ist allerdings stark reguliert durch viele unterschiedliche Faktoren, wie z. B. den Transport zwischen ER und Plasmamembran, Protein-Protein-Interaktion und den Aktivierungsmodus [44]. Die Menge von PC2 an der Plasmamembran unterliegt einer dynamischen Regulation durch Interaktion mit Proteinen (PC1 [43, 46], PIGEA-14 [47]), posttranslationale Modifikationen (CK2 [48], GSK3 [49]) und Interaktion mit anderen Kanaluntereinheiten in der Plasmamembran (PC1 [27, 43, 46, 50-51], TRCP1 [52], TRPV4 [53]). Diese Regulation hat also Konsequenzen für die Funktion von PC2 und es könnte eine Ersatzaktivität von PC2 sein, wenn es als konstitutiver, aktiver Kanal unter physiologischen Bedingungen arbeitet [44].

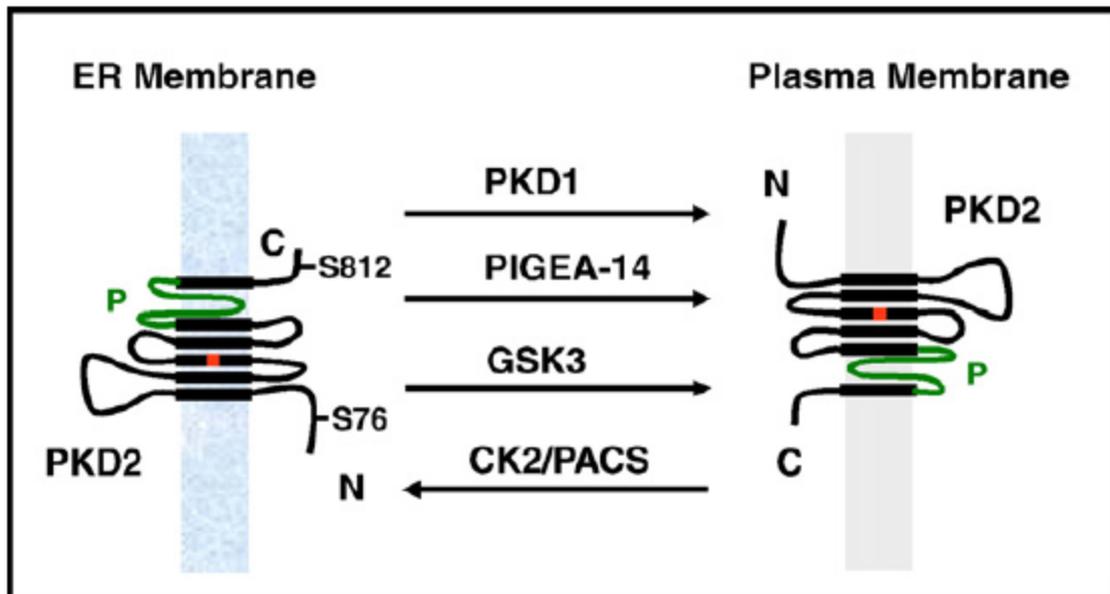


Abbildung 1.3 Dynamische Regulierung des Transports von PC2 vom ER zur Plasmamembran: Die Interaktion mit PC1 und PIGEA-14 oder Phosphorylierung an Position Ser76 durch GSK3 ermöglicht die Bewegung vom ER zur Plasmamembran. Phosphorylierung an Position Ser812 durch CK2 und die Bindung an PACS-Proteine PC2 im ER belässt [44].

1.4.2 Funktion im Endoplasmatischen Retikulum

Die größere Menge von PC2 wird im Endoplasmatischen Retikulum gefunden und eine Anhäufung von sauren Aminosäuren im cytosolischen C-Terminus von PC2 sind für das Verbleiben von PC2 im ER verantwortlich [8]. Die pathogene Mutante R742X, bei der das ER-Retentionssignal fehlt, wird in der Plasmamembran gefunden [46, 54] obwohl diese Mutante keine Kanalaktivität zeigt [43]. Es konnte gezeigt werden, dass PC2 als ein neuartiger intrazellulärer Ca^{2+} -Kanal funktioniert, der als Antwort auf steigende Ca^{2+} -Konzentrationen in der Zelle aktiviert wird [55]. Die Anwesenheit von PC2 im ER hat also eine regulierende Wirkung auf die intrazelluläre Abgabe von Ca^{2+} als Reaktion auf lokale Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [44].

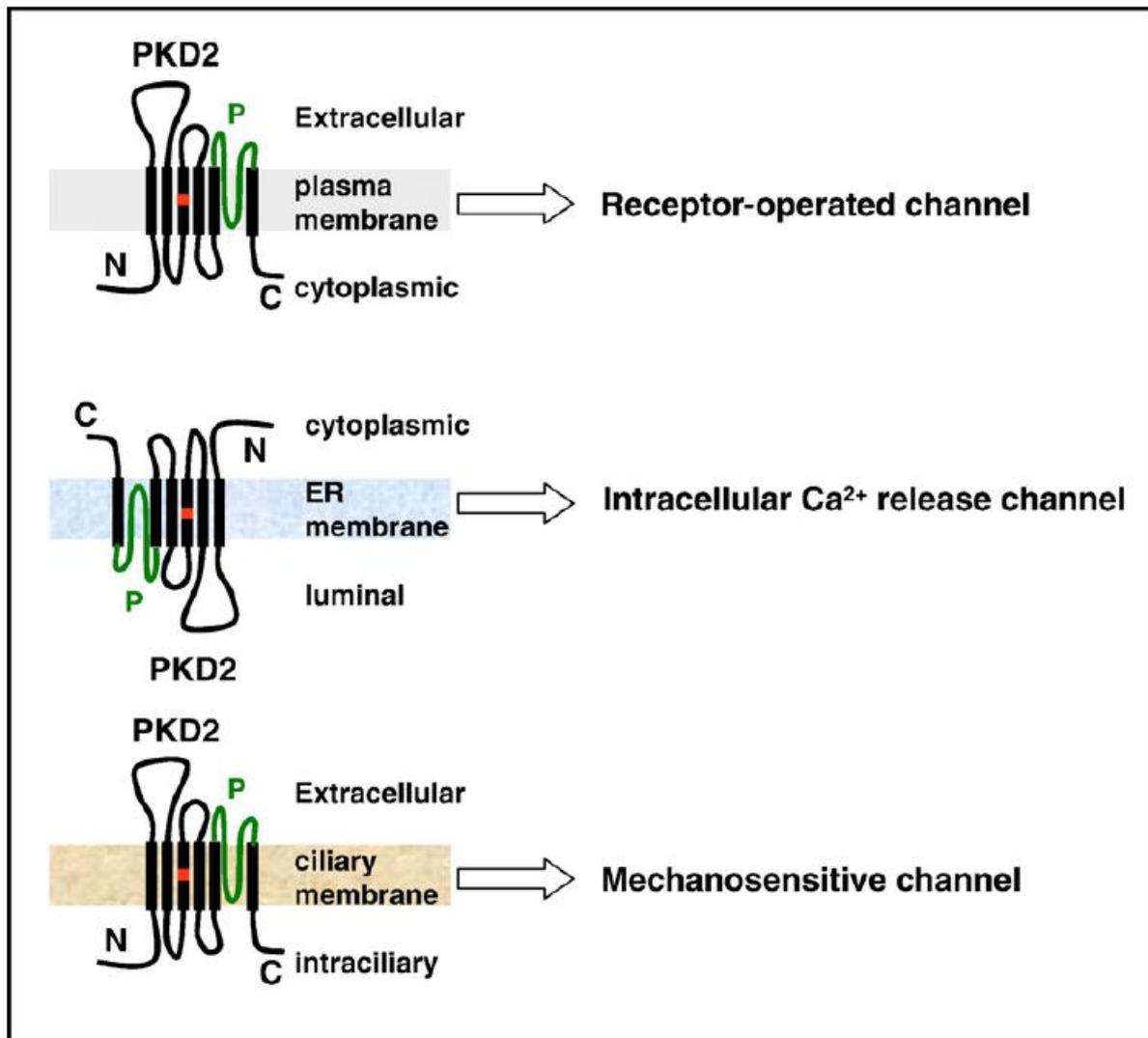


Abbildung 1.4 Funktionale Bereiche von PC2: Polycystin-2 funktioniert als rezeptoragierender, nichtselektiver Kationenkanal an der Plasmamembran, als intrazellulärer Ca²⁺-durchlässiger Kanal im Endoplasmatischen Retikulum und als mechanosensitiver Kanal in den Cilien. Rot markiert ist die D511V-Mutation, bei der die Ca²⁺-Abgabe von PC2 in die Zelle gestört ist [56] und die vermutlich Poren bildende Region ist grün dargestellt [44].

1.4.3 Funktion in den primären Cilien

Während die genaue Funktion der unbeweglichen, primären Cilien von Epithelzellen der Niere noch nicht wirklich geklärt ist, ist es eine akzeptierte Tatsache, dass der Verlust der Funktion oder Bildung dieser primären Cilien zu zystischen Erkrankungen führen. Dies zeigt die zentrale Rolle in der Pathologie von PKD für dieses Organell der Zelle [57-58]. Mehrere Gruppen konnten die Expression von PC1 und PC2 in den primären Cilien zeigen [38, 42, 59-60]. Es wurde ein R₆VxP-Motiv gefunden, dass für den Transport von PC2 zum Cilium verantwortlich ist. Weder hierfür noch für die Funktion von PC2 ist die Anwesenheit von PC1 erforderlich [60].

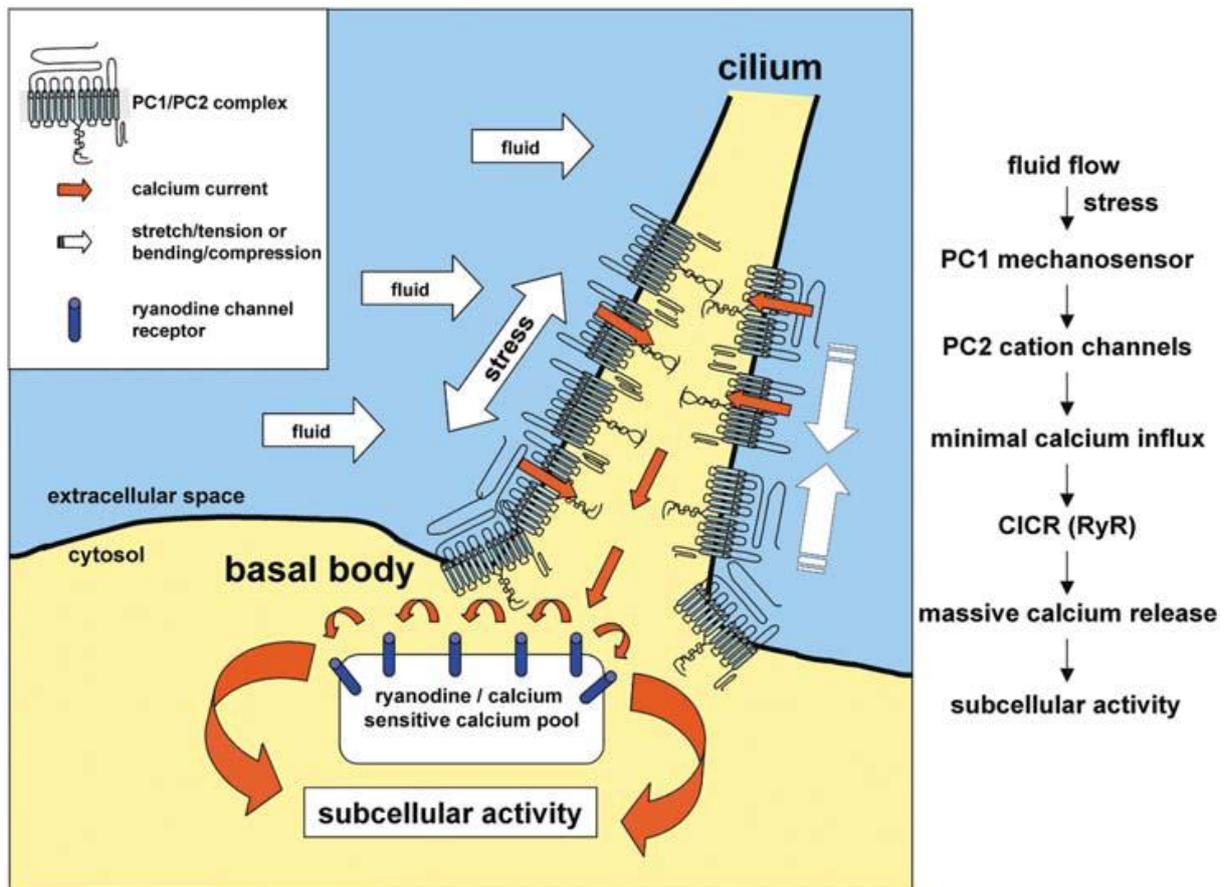


Abbildung 1.5 Schematische Abbildung des strömungsinduzierten Stress und der Ca²⁺-bedingten Signalweiterleitung in Nierenzellen von Mausembryonen: Die Cilie funktioniert als Antenne, um strömungsbedingte Bewegungen zu registrieren. PC1 agiert mit seiner großen extrazellulären Domäne als sensorisches Molekül und übermittelt das Signal zu PC2. PC2 gibt daraufhin Ca²⁺ in die Zelle frei und aktiviert damit die intrazelluläre Ca²⁺-Freigabe durch die Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Der resultierende lokale Anstieg der Ca²⁺-Konzentration in der Zelle reguliert eine Vielzahl an molekularen Aktivitäten, die wiederum zur Gewebeentstehung beitragen [61].

Nauli *et al* zeigten als erste, dass PC1, PC2 und das Cilium für die strömungsinduzierte Ca²⁺-Signalweiterleitung unbedingt benötigt werden [61]. Obwohl PC1 und PC2 eine ähnliche Rolle in der Mechanotransduktion in den Cilien haben, geht mit dem Verlust von PC1 auch der vollständige Verlust der strömungsinduzierten Ca²⁺-Signalweiterleitung einher. PC1 ist also die wichtigste sensorische Komponente, die neben PC2 [44, 61] auch TRPV4 [62] und TRPC1 [63] binden kann.

1.4.4 Funktion am mitotischen Spindelapparat und am Zentrosom

Neben der Plasmamembran, dem Endoplasmatischen Retikulum und den primären Zilien konnte die Expression von PC2 auch im mitotischen Spindelapparat [64] von sich teilenden Zellen und im Zentrosom [65] von ruhenden Zellen nachgewiesen werden.

Rundle *et al* konnten zeigen, dass mDia1 durch Bindung an PC2 für die Verankerung von PC2 während der Metaphase an den Spindelapparat verantwortlich ist. Die Gegenwart von PC2 im Spindelapparat könnte zwei Aufgaben haben: Zum einen die gleichmäßige Verteilung von PC2 auf Mutter- und Tochterzelle und die Regulierung der Ca^{2+} -Signalweiterleitung während der Zellteilung [64]. PC2 bindet im Bereich (Aminosäuren 143-260) der RhoA Bindedomäne von mDia1 (Aminosäuren 63-260) und überlappt mit der mDia1 FH3-Domäne (Aminosäuren 157-456) [66].

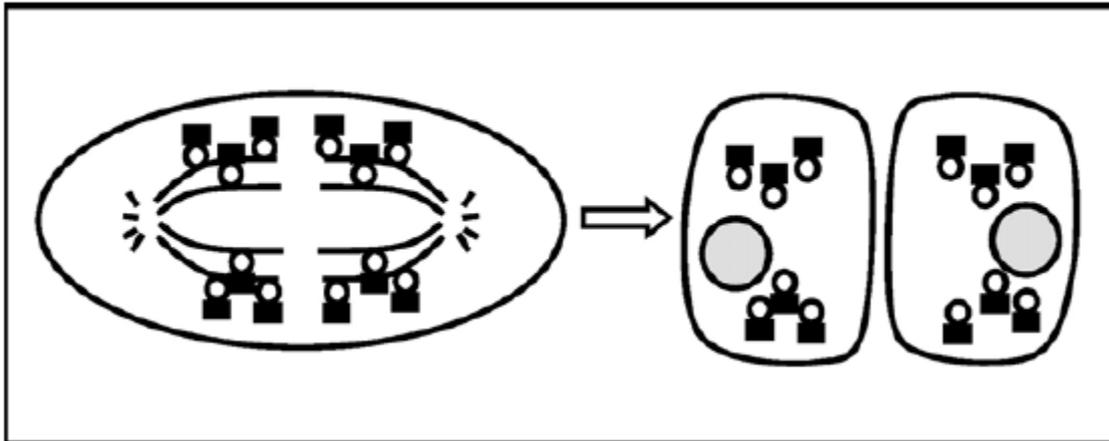


Abbildung 1.6 Symmetrische Aufteilung von PC2 zwischen Mutter- und Tochterzellen während der Zellteilung: PC2 (schwarzes Quadrat) ist während der Metaphase durch mDia1 (schwarze Kreise) mit dem mitotischen Spindelapparat verankert. Das Ergebnis zeigt eine gleiche Anzahl von PC2 in der Mutter- und der Tochterzelle [44].

Jurczyk *et al* konnten PC2-Expression im Zentrosom von ruhenden Zellen und am Spindelpol während der Metaphase nachweisen. Die Autoren vermuten, dass PC2 zusammen mit anderen Proteinen für die Funktion und den Aufbau von Cilien benötigt wird [65].

1.5 Interaktionspartner von Polycystin-2 in der Zelle

1.5.1 Polycystin-1

PC1 und PC2 interagieren über ihre Coiled-Coil-Domänen miteinander [27, 67-68]. PC2 wird durch die Interaktion mit PC1 aktiviert und gelenkt [16, 46]. Yu *et al* schlagen für die Coiled-Coil-Domäne von PC2 ein Trimer vor und für den PC2/PC1-Komplex eine Stöchiometrie von 3:1. Für die Kristallstruktur und die stöchiometrischen Untersuchungen mittels Light Scattering wurden allerdings die Coiled-Coil-Domänen isoliert betrachtet [69].

1.5.2 Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR)

PC2 kann auch durch Interaktion mit EGFR aktiviert werden. Da EGFR Knock-out keinen Phänotyp ähnlich zum PC2 Knock-out zur Folge hat, könnte PC2 einfach als Down-Streamfaktor für Transkriptionsfaktoren funktionieren [70].

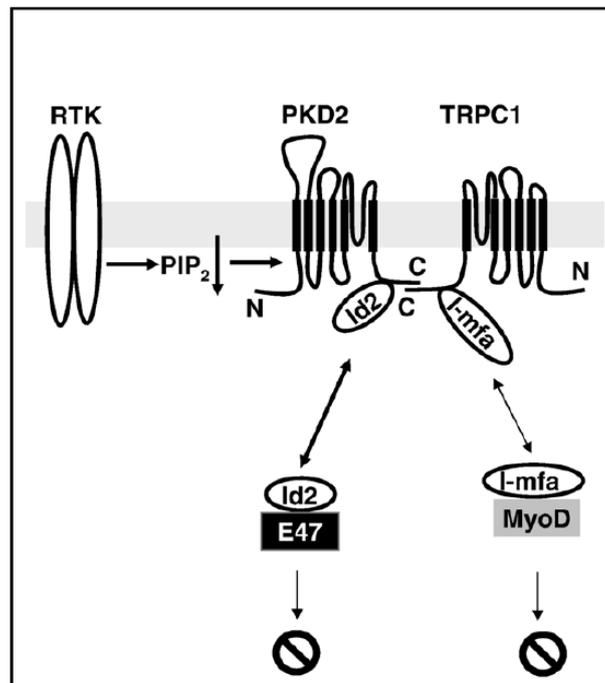


Abbildung 1.7 Hypothetisches Modell der von PC2 vermittelte Signalweiterleitung in der Zelle: PC2 interagiert mit TRPC1 und kann durch die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) aktiviert werden. Verantwortlich dafür ist die Verringerung von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) an der Plasmamembran. PC2 und TRPC1 interagieren erst mit dem DNA-binding protein inhibitor Id2 und anschließend mit I-mfa domain proteins. Diese können wiederum an bHLH-, E47- und MyoD-related proteins- Transkriptionsfaktoren binden und deren Aktivität für die Transkription, unterbinden [44, 70].

1.5.3 Transient-Receptor-Potential-Channel 1 (TRPC1)

PC2 und TRPC1 bilden einen neuen, als Rezeptor agierenden Kanal, über die Verbindung zu einem heteromultimeren Proteinkomplex, mit ganz eigenen Eigenschaften. Der Kanal wird als Antwort auf die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (z. B. PC1) aktiviert. Der TRPP2/TRPC1-Kanal hat Effekte auf die Ca²⁺-regulierte Mechanotransduktion in den Cilien, die sich von PC2 und TRPC1 allein, unterscheiden [52, 63, 71].

1.5.4 Transient-Receptor-Potential-Cation-Channel-Subfamily-V-member-4 (TRPV4)

PC2 benutzt TRPV4, um einen mechano- und thermosensitiven molekularen Sensor in den Cilien zu bilden. Der Abbau von TRPV4 in den Epithelzellen der Niere verhindert den strömungsinduzierte Ca^{2+} -Freisetzung. TRPV4 ist also eine essenzielle Komponente der mechanosensorischen Funktion in den Cilien [72].

1.5.5 Polycystin-2 interactor, Golgi- and endoplasmic reticulum-associated protein (PIGEA-14)

Co-Expression der cDNAs von PIGEA-14 und PKD2 in LLC-PK₁ und HeLa Zellen resultierten in einer Aufteilung von PIGEA-14 und PC2 im trans-Golgi-Netzwerk. Diese Beobachtung spricht für eine wichtige Rolle von PIGEA-14 bezüglich der Regulation der intrazellulären Lokalisierung von PC2 [47].

1.5.6 Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1 und 2 (PACS-1 und-2)

Die subzelluläre Lokalisation von PC2 wird durch die Adapterproteine PACS-1 und -2 gelenkt. Diese Proteine erkennen eine Anhäufung von sauren Aminosäuren im cytosolischen C-Terminus von PC2. Die Bindung an die Adapterproteine ist durch die Phosphorylierung von PC2 durch die Proteinkinase Casein Kinase 2 (CK2) reguliert. Die Phosphorylierung von PC2 wird für die Wegbestimmung von PC2 zwischen Endoplasmatischem Retikulum, trans-Golgi-Netzwerk und Plasmamembran benötigt [48].

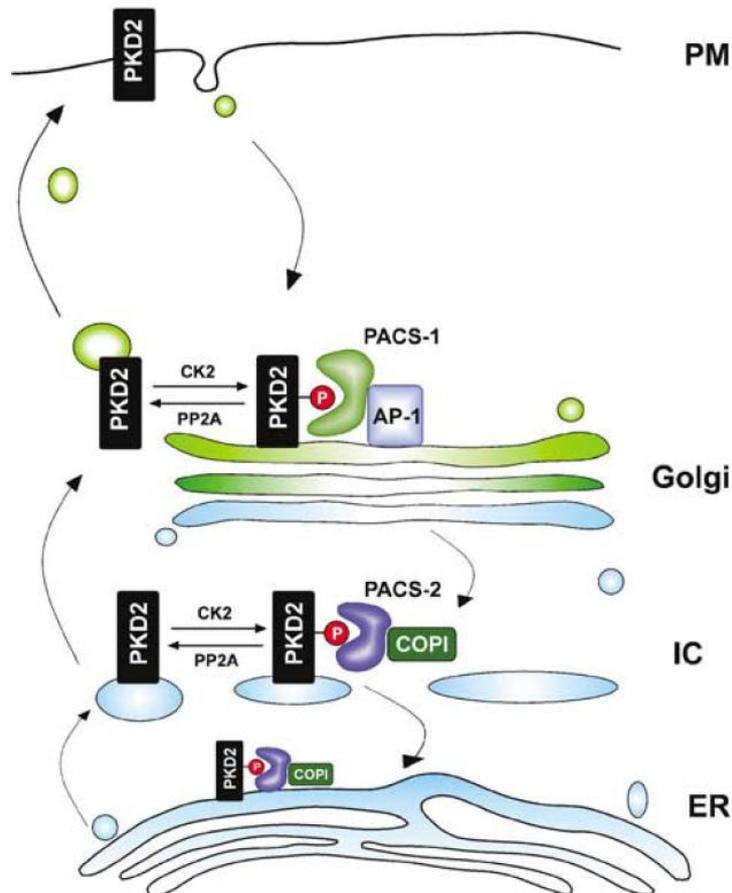


Abbildung 1.8 Modell des Transport von PC2: PC2 phosphoryliert an Position Ser812 durch CK2 bindet an PACS-2/COPI und wird vom IC zurück ins ER transportiert. Dephosphorylierung durch Protein Phosphatase 2 (PP2A) gibt PC2 von dieser Interaktion frei und ermöglicht die Translokation zur Plasmamembran. PACS-1/AP-1 vermittelt den Transport von PC2 zum trans-Golgi-Netzwerk [48].

1.5.7 CD2-associated protein (CD2AP)

The C-terminale Regionen von CD2AP und PC2 können interagieren. Die Funktion dieser Interaktion ist bisher unbekannt [73].

1.5.8 HCLS1-associated protein X-1 (Hax-1)

PC2 bindet spezifisch Hax-1 - im Gegensatz zu PC2L2. In den meisten Zellen sind beide Proteine im Zellkörper lokalisiert. In einigen Zellen sind PC2 und Hax-1 auch an zellulären Prozessen in den Lamellipodien beteiligt. Des Weiteren wurde eine Interaktion zwischen Hax-1 und dem F-Aktin bindenden Protein Cortactin nachgewiesen. Dies könnte eine Verbindung von PC2 zum Aktin Zytoskelett sein. PC2 könnte in die Bildung von Zell-Matrix-Kontakten involviert sein, die funktionsgestört bei PC2-Mutationen sind [74].

1.5.9 α -Actinin

Die intrazellulären N- and C-Termini von PC2 assoziieren mit den α -Actininen, Aktin-bindenden und Aktin-bündelnden Proteine, die für die Organisation des Zytoskeletts, Zelladhäsion, Proliferation und Migration eine wichtige Rolle spielen. α -Actinin stimuliert bei Bindung die Aktivität von PC2. Die Interaktion der beiden Proteine könnte eine wichtige Rolle bei der abnormalen Zelladhäsion, Proliferation und Migration, die bei ADPKD beobachtet werden, spielen [75].

1.5.10 Tropomyosin-1 (TM-1)

Eine TM-1 Isoform bindet an PC2. Die Bindung erfolgt im Bereich (G821-R878) der Coiled-Coil-Domäne von PC2. Der Bereich der bei TM-1 an der Bindung beteiligt ist, liegt zwischen Ala152-Glu196. Unter Einbeziehung der Beobachtungen, dass TM-1 das neoplastische Wachstum von transformierten Zellen unterdrückt, ist es möglich, dass TM-1 zur Zystenbildung und -vergrößerung beiträgt, wenn die Verankerung von PC2 an die Aktinfilamente mittels TM-1 verändert ist [76].

1.5.11 Troponin-I

Der cytosolische C-Terminus von PC2 interagiert mit Troponin-I, einem wichtigen regulatorischen Protein in Herzmuskelzellen. Die Interaktion folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik, also einer Stöchiometrie von 1:1. Die Interaktionsdomäne in PC2 geht von Arg872 bis His927, für Troponin-I von Met1 bis Val107 und Lys106 bis Leu158. Die Studie liefert neue Beweise für eine direkte Bindung von PC2 an die Aktinfilamente [77].

1.5.12 Pericentrin

Pericentrin bildet mit intraflagellären Transportproteinen und Polycystin-2 einen Komplex und wird für die Bindung an die primären Cilien benötigt [65].

1.5.13 Casein Kinase 2(CK2)

CK2 kann PC2 an verschiedenen Positionen phosphorylieren [78-79]. (Siehe dazu auch Abbildungen in den Kapiteln 1.4.1 und 1.5.6).

1.5.14 ATPase p97 und Homocysteine-induced ER protein (HERP)

Innerhalb des ERAD (Endoplasmic reticulum-associated degradation) werden schlecht gefaltete Proteine erkannt, am ER ubiquitiniert und vom ER zum 26S

Proteasom im Cytosol für die proteolytische Spaltung, transportiert. Der PC2-Abbau wird durch das ERAD-System reguliert. Hierfür interagiert PC2 mit ATPase p97 (Komponente des ERAD-Systems) und wird in der perinuklearen Region immobilisiert. PC2 interagiert auch mit HERP, das für den Abbau von PC2 benötigt wird. HERP erkennt auch PC2-Mutanten, nur nicht die, bei denen beide cytosolischen N- und C-Termini fehlen. Das ERAD-System könnte also wichtig für die ADPKD-Pathogenese sein, da die PC2-Expression innerhalb dieses Signalwegs durch Mutationen von PC2 beeinflusst ist [80].

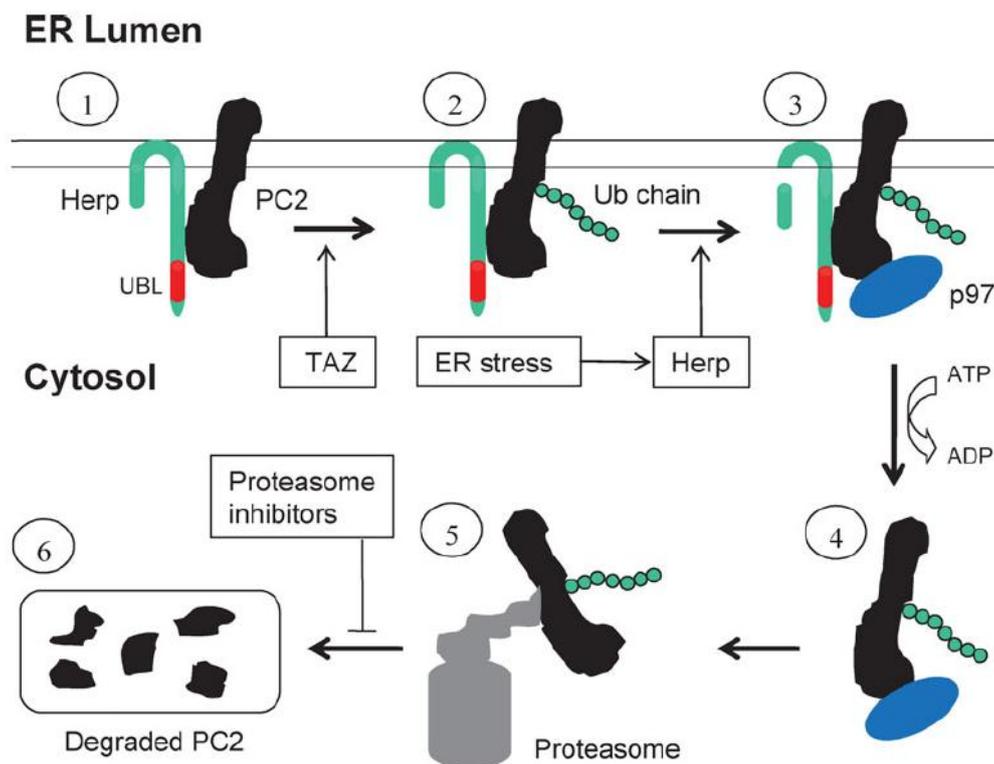


Abbildung 1.9 Modell des Abbaus von Polycystin-2 durch das ERAD-System: 1) PC2 im Komplex mit HERP 2) PC2 Ubiquitinierung 3) Bindung durch p97 4) PC2 gebunden an p97 im Cytosol 5) PC2 gebunden an das Proteasom 6) Abgebautes PC2 [80].

1.5.15 Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3)

Ser76 als neue Phosphorylierungsstelle in der N-terminalen Domäne wird von der Glykogen Synthase Kinase 3 phosphoryliert [49].

1.5.16 Phospholipase C-γ2 (PLC- γ 2)

EGF (Epidermal Growth Factor) aktiviert PC2 über die Freigabe der Inhibition durch PIP₂. Dies erfolgt durch die PLC- γ 2-induzierte Hydrolyse von PIP₂ und den PI3K-induzierten (Phosphoinositid-3-Kinase) Umbau von PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-

bisphosphat) zu PIP₃ (Phosphatidylinositol 4,5-triphosphat). Diese Regulation erfolgt über die Interaktion von PC2 mit PLC- γ 2 und EGFR. Die Daten weisen auf einen neuen Mechanismus der PC2-Regulation durch EGF hin [70].

1.5.17 DNA-binding protein inhibitor (Id2)

PC2 reguliert den Zellzyklus direkt durch die Interaktion mit Id2, einem Mitglied der Helix-Loop-Helix-Proteinfamilie, die für die Regulation von Zelldifferenzierung und -proliferation bekannt ist. Die PC2-Id2-Interaktion ist über die PC1-abhängige Phosphorylierung von PC2 reguliert. Id2 besitzt eine entscheidende Rolle in der Regulierung des Zellzyklus, die durch PC1 und PC2 vermittelt wird [81].

1.5.18 Eukaryotic translation initiation factor (Elf2 α) und pancreatic ER-resistant eukaryotic translation initiation factor kinase (PERK)

PC2, aber nicht die pathogenen Mutanten E837X und R872X, unterdrückt die Zellproliferation durch die Unterstützung der Phosphorylierung von Elf2 α durch PERK. ER-Stress erhöht die Phosphorylierung von Elf2 α durch die Hochregulierung der PERK-Kinase-Aktivität. Während ER-Stress reguliert PC2 die Phosphorylierung von Elf2 α runter und beeinflusst die Phosphorylierung von PERK. Vermutlich unterstützt PC2 die Phosphorylierung von Elf2 α durch PERK. PC2 wurde im Komplex mit Elf2 α und PERK gefunden. PC2 treibt also das Zellwachstum über die Unterstützung die PERK-gesteuerte Phosphorylierung von Elf2 α voran. Dies unterstützt die Bedeutung von PC2 für die Translationsmaschinerie [82].

1.5.19 FYVE Domain-Containing Protein (FPC)

FPC und PC2 kolokalisieren vollständig oder teilweise an der Plasmamembran und in den primären Cilien. FPC moduliert die strömungsinduzierte Ca²⁺-Antwort. Dies spricht für einen teilweise gemeinsamen Mechanotransduktionssignalweg von FPC und PC2 [83].

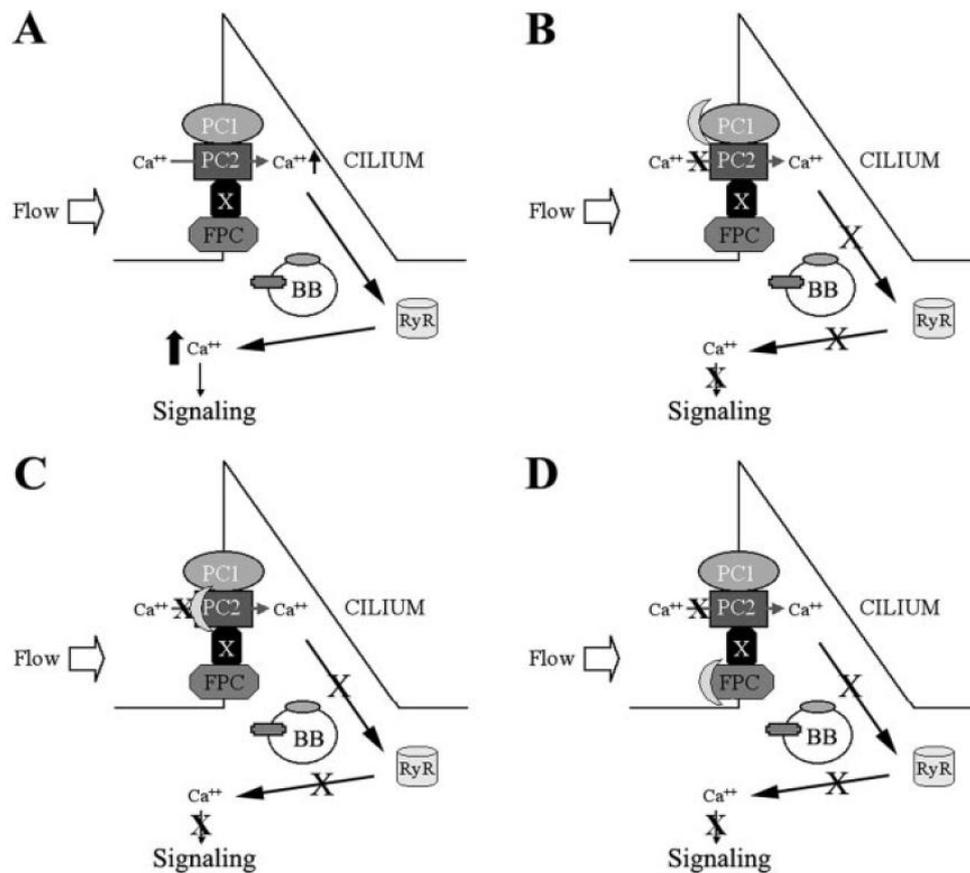


Abbildung 1.10 Modell des PC2-FPC-Komplex in den primären Cilien: A) Über strömungsinduzierte Stimulation wird der mechanische Stress über Proteine in der Membran (z. B. PC2) der Cilie in die Zelle geleitet. Dies führt zum Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und aktiviert so Ca^{2+} -induziert RyR zur intrazellulären Ca^{2+} -Abgabe, dies wiederum aktiviert andere Signalwege. B und C) Zerstörung des PC1/PC2-Komplexes verhindert das Ca^{2+} -Einstrom-Signal. D) Blockierung von FPC verringert das Ca^{2+} -Signal durch die Veränderung des Polycystin-Komplexes und reguliert damit Effektoren wie RyR herunter. BB, Basalkörper, X unbekanntes Molekül [83].

1.5.20 Exocyst Protein Sec10

Die Arbeit von Fogelgren *et al* zeigt die erste Verbindung zwischen dem Exocyst, einem hoch konservierten Proteinkomplex bestehend aus acht Proteinen der an der Proteinlokalisierung beteiligt ist und PC2. Der Knock-down von Sec10 führt zu einer Vielzahl an Phänotypen die denen von PKD2 gleichen. Es konnte eine genetische und biochemische Interaktion zwischen Sec10 und PC2 nachgewiesen werden und dass Sec10 mit anderen Proteinen, die in den Cilien vorkommen, interagiert. Es wird vermutet, dass Sec10 in den Transport verschiedener Proteine der Cilien zu den Cilien beteiligt ist [84].

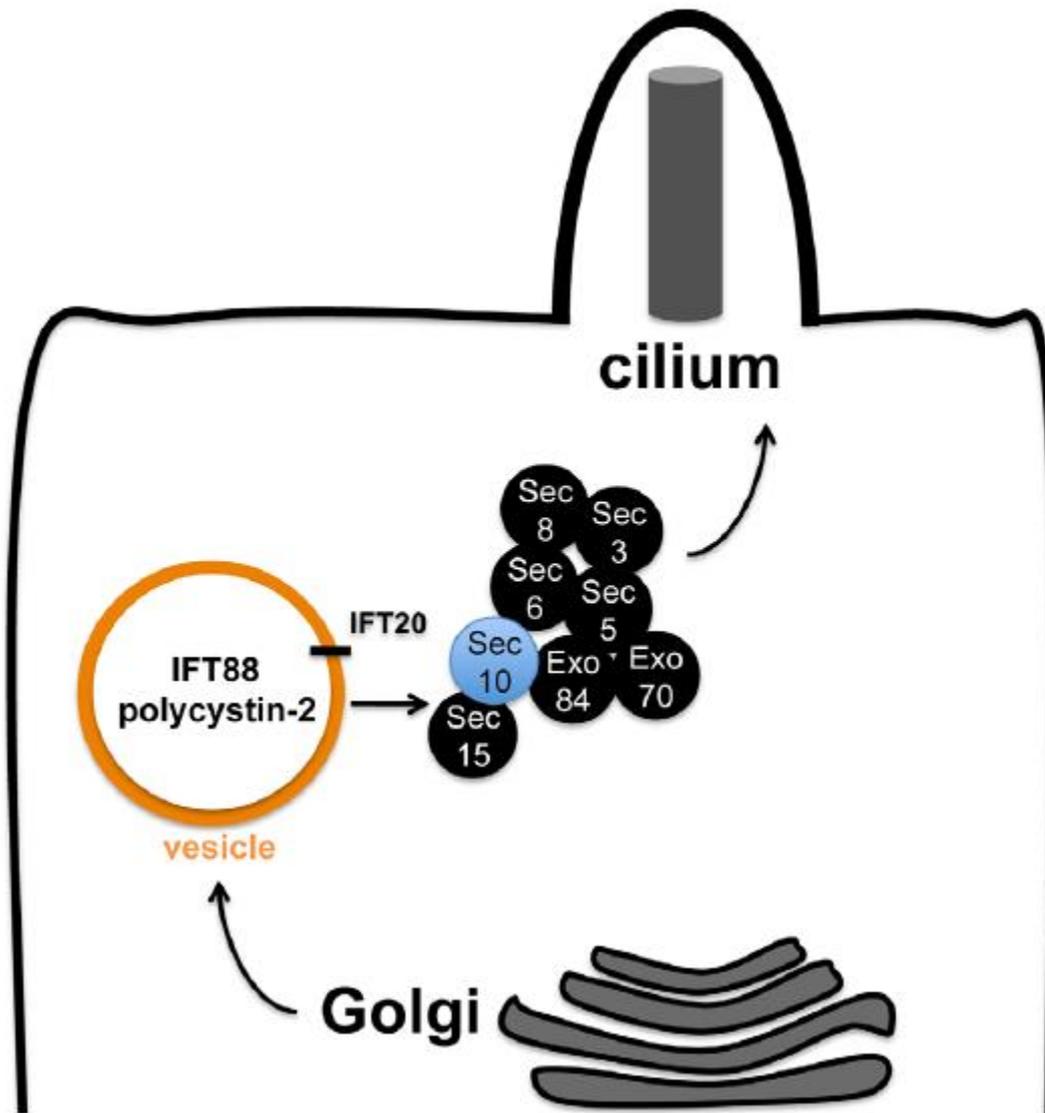


Abbildung 1.11 Modell der Rolle des Exocysts für den Transport von Proteinen der Cilien: Das Exocyst ist zuerst im primären Cilium lokalisiert und interagiert dann mit den sekretorischen Vesikeln des trans-Golgi-Netzwerks, die Proteine wie z. B. PC2 beinhalten [84].

1.6 Der Interaktionspartner mammalian diaphanous homolog 1 (mDia1)

Formine sind in eine Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, die die Veränderung des Cytoskeletts erfordern. Sie beinhalten die Aktin-bindenden FH1- und FH2-Domänen, die die Aktin-Bindung realisieren [85-86]. Die Diaphanous Formine bilden eine Untergruppe der Formine, die durch eine N-terminale Rho-GTPase-bindende Domäne (GBD) und eine FH3 Domäne (DID), die die C-terminale Diaphanous-autoregulations-Domäne (DAD) bindet, um das Protein in einer inaktiven Konformation zu halten, charakterisiert sind [87-88]. Über die Bindung von GTP-gebundenen Rho-Proteinen löst sich die DAD von der DID und kann mit der Bindung

und Verlängerung unverzweigter Aktinfilamente beginnen [89]. Für die Bindung an PC2 wurde eine Bindung nach Aminosäure Glu871 vorhergesagt [64].

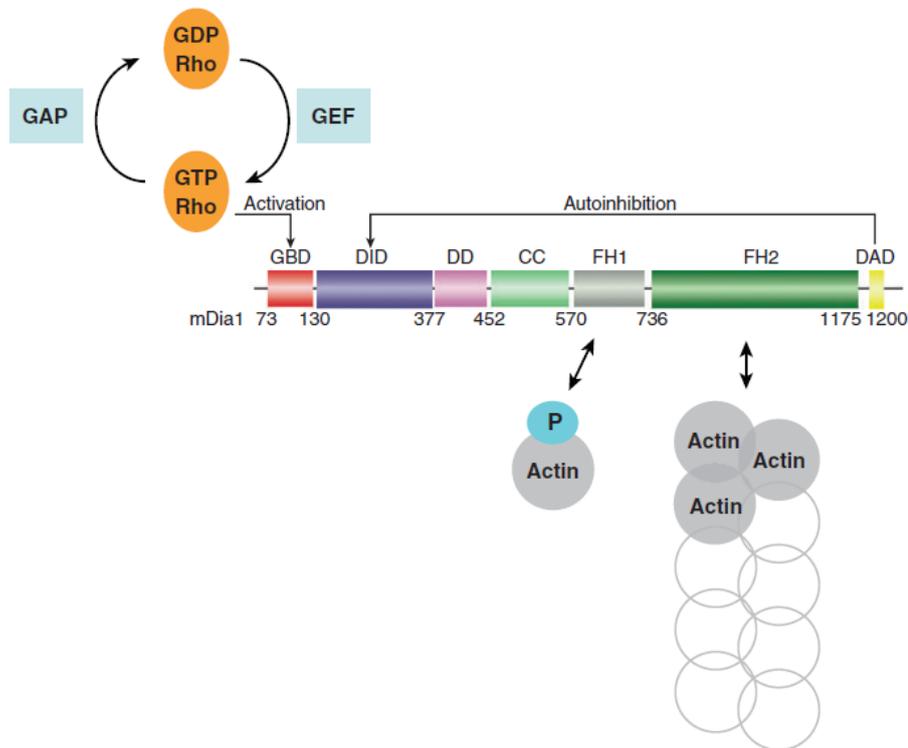


Abbildung 1.12 Domänenstruktur der Diaphanous Formine und Liganden, von denen bekannt ist dass sie die biochemischen Reaktionen mit Aktin regulieren: Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäureposition in mDia1. Abkürzungen: Bud6, ein Protein; CC, Coiled-Coil-Domäne; DAD, Diaphanous autoregulierende Domäne; DD, Dimerisierungsdomäne; DID, Diaphanous inhibierende Domäne; FH1 und FH2, Formin Homolog 1 und 2; GAP, G-Protein-aktivierendes Protein; GBD, GTPase-bindende Domäne; GEF, Guaninnukleotidaustauschfaktor. Autoinhibition wird über intramolekulare Interaktion zwischen der C-terminalen DAD (gelb) und der N-terminalen DID (blau) aufrechterhalten. Die Bindung von GTP-gebundenem Rho-Protein (GTP Rho) an die GBD-Domäne führt zum Beenden des autoinhibierten Zustands. Die FH2-Domäne initiiert die Anlagerung an Aktinfilament über die Bindung und Stabilisierung von Aktindimeren oder -trimeren und bleibt mit dem spitzen Ende des Filaments während der Elongation verbunden. Die Interaktion von FH1 mit Profilin-Aktin beschleunigt die Elongation [89].

Die Interaktion von PC2 mit mDia1 ist ausführlich in Kapitel 1.4.4 beschrieben.

1.7 Übersicht der Binderegionen in Polycystin-2

In Tabelle 1.1 sind alle in der Literatur bekannten Bindungspartner von Polycystin-2 und die Regionen in denen die Bindung stattfindet, aufgeführt.

Interaktionspartner	Interaktionsbereich in PC2
PC1	Coiled-Coil-Domäne (AS835-873)
EGFR	AS379-871 schwache Interaktion
	AS871-968 starke Interaktion
TRPC1	Coiled-Coil-Domäne (AS835-873)
TRPV4	cytosolischer C-Terminus
PIGEA-14	AS833-923 aber nicht AS833-881
PACS-1	AS741-871, S812 phosphoryliert
PACS-2	AS741-871, S812 phosphoryliert
CD2AP	cytosolischer C-Terminus
Hax-1	Region zwischen fünfter und sechster Transmembrandomäne
α -Actinin	cytosolischer N- und C-Terminus
Tropomyosin-1	AS821-878
Troponin-I	AS872-927
Pericentrin	-
CK2	-
ATPase p97	-
HERP	cytosolischer N- oder C-Terminus
GSK3	N-Terminus
Phospholipase C- γ 2	N-Terminus
Id2	C-Terminus, S812 nicht phosphoryliert
Elf2 α	-
PERK	cytosolischer N- und C-Terminus
FPC	-
Exocyst Protein Sec10	-
mDia1	AS871-968
	AS680-796 diese Arbeit

Tabelle 1.1 Übersichtstabelle der Bindungspartner und Interaktionsbereiche in PC2: Die Interaktionsbereiche wurden aus den Veröffentlichungen in Kapitel 1.5 zu den jeweiligen Bindungspartnern zusammengefasst. Für die Markierung mit – wurden keine genauen Angaben über den Ort der Bindung gefunden. AS = Aminosäure.

1.8 Strukturelle Aspekte des cytosolischen C-Terminus von Polycystin-2

Für den C-Terminus wurden zwei EF-Hände (Aminosäuren 727-739 und 763-774) [5, 26], zwei Coiled-Coil-Domänen (Aminosäuren 781-796 und 835-873) [5, 27-28] und ein ER Retentionssignal (Aminosäuren 787-820) [8] vorausgesagt.

Für den Bereich der EF-Hände existieren zwei NMR-Strukturen (pdb-Eintrag: 2KLE [26] und 2KQ6 [90]).

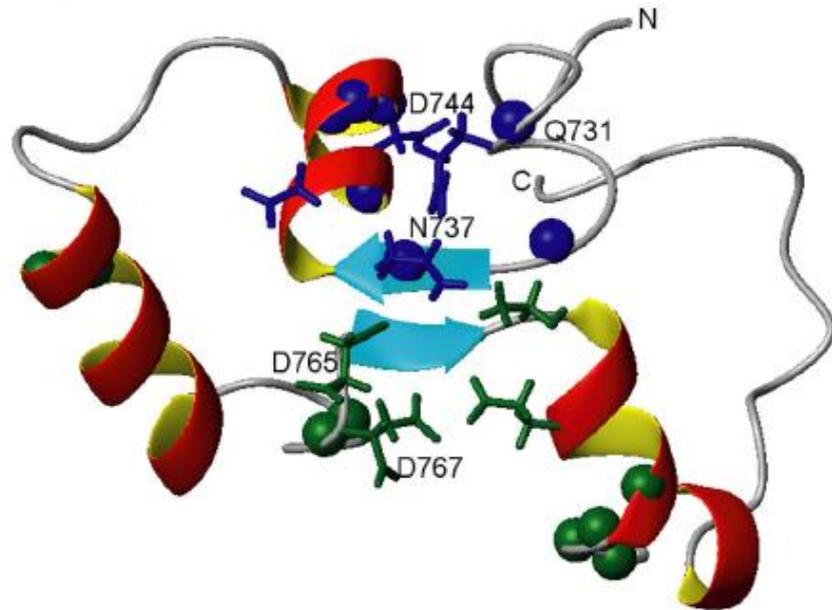


Abbildung 1.13 Darstellung der beiden Bindungsstellen für Calcium in PC2(680-796): Abgebildet ist die Ribbondarstellung der Konformation mit der niedrigsten Energie nach dem AUREMOL-ISIC refinement. Die Seitenkettengruppen, die an der Bindung von Ca^{2+} beteiligt sind, sind blau für die atypische EF-Hand 1 und grün für die kanonische EF-Hand 2 dargestellt [26].

Schumann *et al* untersuchten ein Fragment das von Ile680 bis Leu796 reichte und Hinweise für das Vorhandensein von zwei EF-Händen mit Bindungskonstanten für Ca^{2+} von 55 und 179 μM lieferte. Des Weiteren wurde ein Dimer-/Monomer-Gleichgewicht für die Ab- und Anwesenheit von Ca^{2+} gefunden. Diese Dissoziation könnte im Zusammenhang mit einer Inaktivierung von PC2 stehen [26].

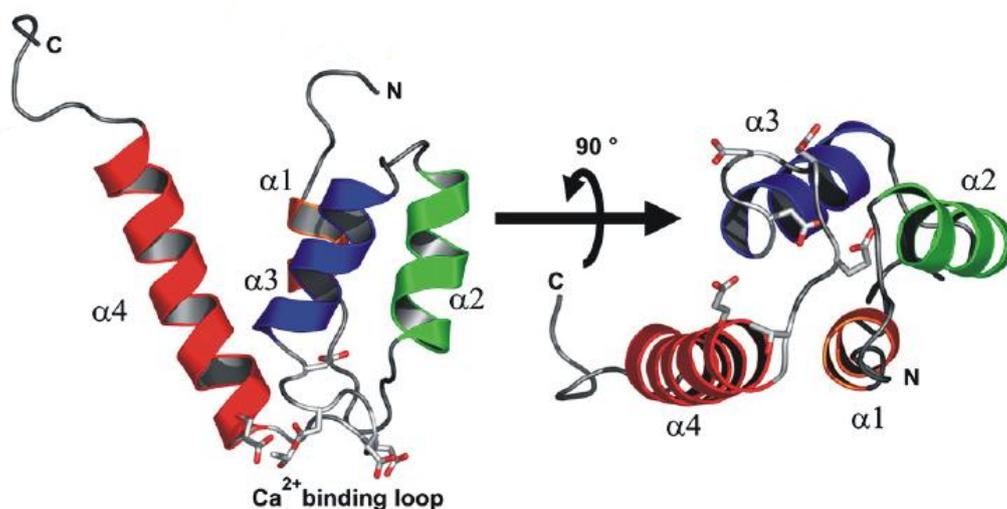


Abbildung 1.14 Struktur von Ca^{2+} -gebundenem PC2-EF: Helices $\alpha 1$ -4 (orange, grün, blau und rot) und die Ca^{2+} -koordinierenden Reste in Corey-Pauling-Koltun (CPK) Darstellung [90].

Petri *et al* fanden eine Ca^{2+} -Bindungsstelle mit einer Bindungskonstanten von $214 \mu\text{M}$ für ein Fragment von PC2, das von Asn720-Pro797 reichte. PC2-EF durchläuft eine Ca^{2+} -abhängigen konformationelle Änderung als ein essenzielles Element der Ca^{2+} -sensitiven Regulation der PC2 Aktivität [90].

Für den Bereich der Coiled-Coil-Domäne existiert eine Kristallstruktur. Yu *et al* fanden für die Kristallstruktur der Coiled-Coil-Domäne eine trimere Anordnung [69].

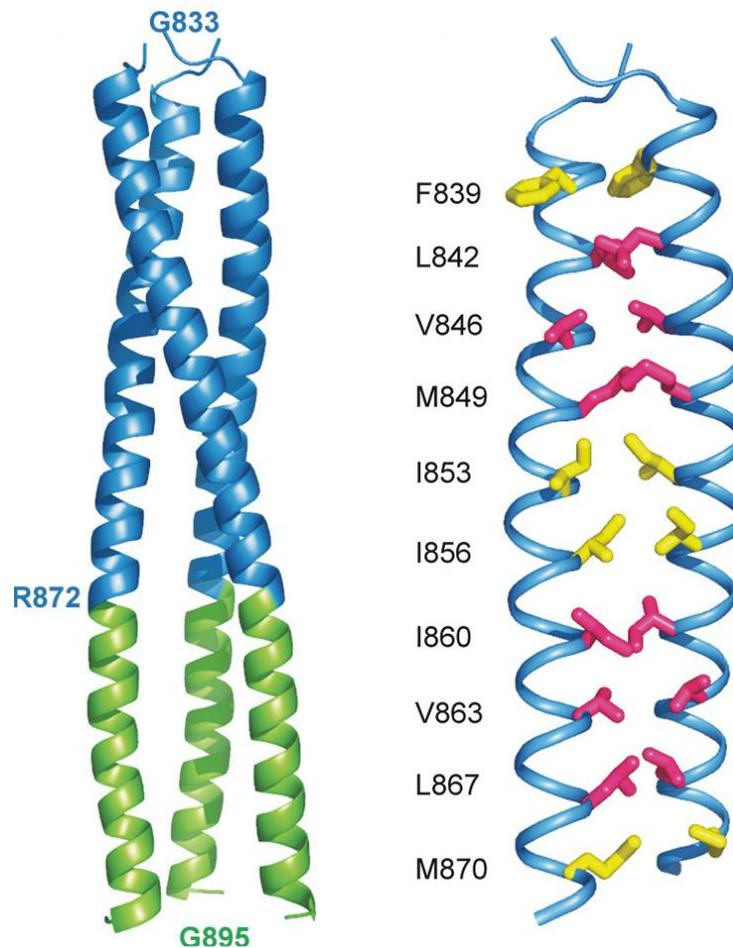


Abbildung 1.15 Kristallstruktur von PC2(833-895): links) Gly833-Arg872 in blau und Ala873-Gly895 in grün, rechts) Seitenketten der Aminosäuren die an der trimeren Coiled-Coil-Interaktion beteiligt sind. Für eine bessere Übersichtlichkeit würde eine Untereinheit weggelassen [69].

1.9 Fragmente des C-Terminus von Polycystin-2

Um den C-Terminus von Polycystin-2 strukturell und funktionell zu charakterisieren wurden verschiedene Fragmente des cytosolischen C-Terminus von Polycystin-2 exprimiert, gereinigt und spektroskopisch untersucht. In dieser sind die Aminosäuresequenzen aller, in dieser Doktorarbeit charakterisierten Fragmente des C-Terminus von Polycystin-2 gezeigt.

680 690 700 710 720 EF1
INDTYSEVKSDLAQQKAEMELSDLIRKGYHKALVKLKLKKNTVDD**I**SESL
 INDTYSEVKSDLAQQKAEMELSDLIRKGYHKALVKLKLKKNTVDDI**SESL**
 INDTYSEVKSDLAQQKAEMELSDLIRKGYHKALVKLKLKKNTVDDI**SESL**
 INDTYSEVKSDLAQQKAEMELSDLIRKGYHKALVKLKLKKNTVDDI**SESL**
 ISESL

730 740 750 760 EF2 770
RQGGGKLNFD**E**LRQDLKGGKHTDAEIEAIFTKY**DQDGDQELTEHE**HQQMR
 RQGGGKLNFD**E**LRQDLKGGKHTDAEIEAIFTKYDQDGDQELTEHEHQQMR
 RQGGGKLNFAALRQALKGGKHTDAEIEAIFTKYDQDGDQELTEHEHQQMR
 RQGGGKLNFD**E**LRQDLKGGKHTDAEIEAIFTKYDQDGDQELAEHAHQQMR
 RQGGGKLNFD**E**LRQDLKGGKHTDAEIEAIFTKYDQDGDQELTEHEHQQMR

CC
 780 ERR 790 800 810 820
DDLEKEREDLDLDHSSLPRPMSSRSFPRSLDDSEEDDED**SGHSSRRRGS**
 DDLEKEREDLDLDHSSL 680-796
 DDLEKEREDLDLDHSSL 680-796mutEF1
 DDLEKEREDLDLDHSSL 680-796mutEF2
 PRPMSSRSFPRSLDDSEEDDED**SGHSSRRRGS**
 DDLEKEREDLDLDHSSLPRPMSSRSFPRSLDDSEEDDED**SGHSSRRRGS**
 GS

830 CC 840 850 860 870
ISSGVS**Y**EEFQVLVRRVDRMEHSIGSIVSKIDAVIVKLE**IMERAKLKRRE**
 ISSGVS**Y**EEFQVLVRRVDRMEHSIGSIVSKIDAVIVKLE**IMERAKLKRRE**
 ISSGVS**Y**EEFQVLVRRVDRMEHSIGSIVSKIDAVIVKLE**IMERAKLKRRE**
 ISSGVS**Y**EEFQVLVRRVDRMEHSIGSIVSKIDAVIVKLE**IMERAKLKRRE**

880 890 900 910 920
VLGRLLDGVAEDERLGRDSEIHREQMERLVREELERWESDDAASQISHGL
 VLGRLLDGVAEDERLGRDSEIHREQMERLVREELERWESDDAASQISHGL
 V725-880
 VLGRLLDGVAEDERLGRDSEI 828-900

930 940 950 960
GTPVGLNGQPRPRSSRPSSSQSTEGMEGAGGNGSSNVHVC-Terminus
 GTPVGLNGQPRPRSSRPSSSQSTEGMEGAGGNGSSNVH**V**797-968

Abbildung 1.16 Übersicht der untersuchten Proteinfragmente des C-Terminus von Polycystin-2:
 Aminosäuresequenzen nach dem Einbuchstabencode der Fragmente PKD2C680-968 in schwarz, PKD2C680-796/mutEF1/EF2 in grün, PKD2C797-968 in blau, PKD2C725-880 in rot und PKD2C828-900 in lila. EF1 in gelb sind die Aminosäuren der EF-Hand 1 [26], EF2 in gelb sind die Aminosäuren der EF-Hand 2 [5], CC in gelb sind die Aminosäuren der Coiled-Coil-Domänen [5, 27-28], ERR in gelb sind die Aminosäuren des ER-Retentionssignal [8].

1.10 Zielsetzung

Das PKD2 Gen ist eines der beiden mutierten Gene in Patienten, die an Autosomal-dominanter polyzystischer Nierenerkrankung leiden [5]. Es kodiert für das Protein Polycystin-2, das aus 968 Aminosäuren besteht und aus sechs Transmembrandomänen und cytosolische N- und C-Termini aufgebaut ist. Für den C-Terminus wurden zwei EF-Hände (Aminosäuren 727-739 und 763-774) [5, 26], zwei Coiled-Coil Domänen (Aminosäuren 781-796 und 835-873) [5, 27-28] und ein ER Retentionssignal (Aminosäuren 787-820) [8] vorausgesagt. Wie in diesem Kapitel gezeigt gibt es eine Vielzahl Interaktionspartner, mit ganz unterschiedlichen Funktionen in der Zelle.

Ziel dieser Arbeit war es nun, mithilfe unterschiedlicher spektroskopischer Methoden detailliertere strukturelle und biochemische Informationen über den cytosolischen C-Terminus zu erhalten. Dafür sollen neben dem gesamten cytosolischen C-Terminus unterschiedliche Fragmente, die ein oder mehrere der oben erwähnten Strukturmerkmale des cytosolischen C-Terminus enthalten, einer strukturellen und biochemischen Analyse unterzogen. Weiterhin soll untersucht werden, ob der Zytoskelett-assoziierte Interaktionspartner mDia1 wie von Rundle et al [64] beschrieben im Bereich nach Aminosäure Glu871 den cytosolischen C-Terminus bindet und die Bindungskonstante bestimmt werden.

Glucose	2 g/L nach Bedarf ¹³ C markiert
NH ₄ Cl	1 g/L nach Bedarf ¹⁵ N markiert
Thiamin	1 mg

SL-Mix=Spurenelemente-Mix (1 mL)+EDTA-Eisensulfat (0.9 mL)

Spurenelementemix: lange haltbar

ZnSO₄ x 7 H₂O 100 mg/L, MnCl₂ 30 mg/L, H₃BO₃ 300 mg/L, CoCl₂ x 6 H₂O 200 mg/L, CuCl₂ x 2 H₂O 10 mg/L, NiCl x 6 H₂O 20 mg/L, Na₂MoO₄ 30 mg/L

EDTA-Eisensulfat: immer frisch ansetzen

EDTA 500 mg + FeSO₄ x 7 H₂O 200 mg, ad. Millipore H₂O 90 mL

Im Falle des dreifach markierten Proteins wurden Spurenelemente-Mix, EDTA-Eisensulfat und die Antibiotika in wässrigen Lösungen hergestellt und verwendet. Nach Einwaage und Zugabe aller Komponenten wird dann mit D₂O (Reinheit 99.9 %) auf 1 L aufgefüllt.

2.2.2 Antibiotika

Carbenicillin (GERBU):	Stammlösung: 50 mg/mL in H ₂ O
Kanamycin (GERBU):	Stammlösung: 30 mg/mL in H ₂ O
Chloramphenicol (Roche):	Stammlösung: 34 mg/mL in Ethanol

2.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden in der jeweils höchsten Reinheitsstufe (Analysequalität) von den Firmen Amersham Life Science, GERBU, Merck, Roche, Serva, Roth, VWR, MPBiomedicals, Euriso-Top und Sigma-Aldrich bezogen.

2.4 Häufig verwendete Pufferlösungen und Gele

Reinigung der MBP-Tag Fragmente

MBP-Puffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl
MBP-Elutionspuffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM Maltose
His-Waschpuffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 50 mM Imidazol pH 8.0
Messpuffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE

Reinigung der MBP-Tag Fragmente in Anwesenheit von Ca²⁺

MBP/Ca ²⁺ -Puffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM CaCl ₂
MBP/Ca ²⁺ -Elutionspuffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM CaCl ₂ , 10 mM Maltose
His/Ca ²⁺ -Waschpuffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM Imidazol pH 8.0
Messpuffer/Ca ²⁺	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM CaCl ₂ , 1 mM DTE

Reinigung der His-Tag Fragmente

His-Puffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl
His-Waschpuffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 50 mM Imidazol pH 8.0
His-Elutionspuffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 300 mM Imidazol pH 8.0
Messpuffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE

Reinigung der His-Tag Fragmente in Anwesenheit von Ca²⁺

His/Ca ²⁺ -Puffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM CaCl ₂
His/Ca ²⁺ -Waschpuffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM Imidazol pH 8.0
His/Ca ²⁺ -Elutionspuffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM CaCl ₂ , 300 mM Imidazol pH 8.0
Messpuffer/Ca ²⁺	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM CaCl ₂ , 1 mM DTE

CD-Messungen

CD-Messpuffer	10 mM Tris pH 7.5
---------------	-------------------

Reinigung der TEV-Protease

TEV-Lysepuffer	20 mM Tris pH 8.0, 10 mM Imidazol pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.2% NP-40, 2 mM Mercaptoethanol
TEV-Waschpuffer 1	20 mM Tris pH 8.0, 10 mM Imidazol pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM Mercaptoethanol
TEV-Waschpuffer 2	20 mM Tris pH 8.0, 10 mM Imidazol pH 8.0, 1 M NaCl, 2 mM Mercaptoethanol
TEV-Waschpuffer 3	20 mM Tris pH 8.0, 50 mM Imidazol pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM Mercaptoethanol

TEV-Elutionspuffer	20 mM Tris pH 8.0, 330 mM Imidazol pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM Mercaptoethanol
TEV-Puffer	20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTE, 10% Glycerin

Reinigung von mDia1(69-457)

mDia1-Lysepuffer	50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM Mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF, 2 mM EDTA
Messpuffer	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-Probenpuffer	230 mM Tris pH 6.8, 6.85 % SDS, 24 % Glycerin, 0.4 M DTE, 0.008 % Bromphenolblau
Sammelgel	0.13 M Tris pH 6.8, 0.04 % SDS, 4 % Acrylamid, 1 % Ammoniumpersulfat, 0.1 % N,N,N,N'-Tetramethylethylen-diamin
Trenngel	0.4 M Tris pH 8.8, 0.04 % SDS, 15 % Acrylamid, 1 % Ammoniumpersulfat, 0.1 % N,N,N,N'-Tetramethylethylen-diamin
Laufpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0.1 % SDS
Färbelösung	45 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, 45 % (v/v) Wasser, 0.1 % (w/v) Coomassie G Brillant Blue, 0.3 % (w/v) Coomassie B Brillant Blue
Entfärbelösung	20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, 70 % (v/v) Wasser

2.5 Enzyme

Thrombin	Merck
TEV Protease	Eigene Herstellung, siehe Kapitel 3.1.6
Lysozym	Sigma-Aldrich
DNase I	Roche

2.6 Proteinstandard

Dalton Mark VII – L	Sigma-Aldrich
---------------------	---------------

L7 (66 /45 /36 /29 /24 /20,1 /14,2 kDa)

2.7 Säulenmaterialien

Superdex G75 prep grade	GE Healthcare
MBPTrap HP	GE Healthcare
Dextrin Sepharose High Performance	GE Healthcare
HisTrap FF crude	GE Healthcare
Ni-NTA Superflow	Qiagen
Benzamidin Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
Glutathione Sepharose 4B Beads	GE Healthcare

2.8 Verbrauchsmaterialien

Einmalküvetten	Roth
Vivaspin 6, 20	VIVASCIENCE, Sartorius
Sterilfilter (Spritzenaufsätze)	Renner
Sterilfilter	Steritop, Millipore
5 mm NMR Tube 502-7	Standard Series NORELL
5 mm Shigemi Tube	SHIGEMI Inc.
Eppendorf Cups	Roth
Latexhandschuhe	Roth
Nitrilhandschuhe	VWR

2.9 Geräte

Gelelektrophoresekammern	GE Healthcare
Heizblock Type QBD1	Grant
Inkubator AJ 100	Infors
Magnetrührer MR3000K	Heidolph
Milliporeanlage	Millipore

Wasseraufbereitung	PURELAB Ultra Elga
Bruker Avance600, TXI CryoProbe	Bruker BioSpin
Bruker Avance800, TCI CryoProbe	Bruker BioSpin
ÄKTA™-System mit P920, UPC 900	Amersham Pharmacia
Pipetman P2,P20,P200,P1000	Gilson
Schüttelgerät Promax 1020	Heidolph
Schüttelgerät Polymax 2040	Heidolph
Tischzentrifuge Universal 320R	Hettich
Ultraschalldesintegrator	Sonifier 250/450, Branson
UV/VIS Spektrometer	Lambda Bio ⁺ , Perkin Elmer
Biofuge <i>pico</i>	Heraeus Instruments
Zentrifugen	J-6B, J-20, J-25, Beckman Coulter
CD-Spektrometer	J-810 Jasco, Lehrstuhl Prof. Sterner Universität Regensburg
pH-Elektrode	Spintrode P, Hamilton
pH-Meter	Φ340 ph/Temp Meter, Beckman

2.10 Verwendete Software

CorelDraw 12	Corel Corporation
Origin 6.0	Microcal Software Inc.
MS-Office	Microsoft
Topspin NMR	Bruker
Topspin Plot	Bruker
Auremol	www.auremol.de
Spectra Manager 2	JASCO
PyMOL	www.pymol.org

3 Methoden

3.1 Expression und Reinigung

3.1.1 Expression der ungelabelten PKD2C-Fragmente

Für die Vorkultur wurden 200 mL LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika versetzt, eine Pipettenspitze der zu vermehrenden Glycerin Zellkultur zugegeben und über Nacht bei 37 °C und 180 U/min im Schüttler inkubiert.

10 L LB-Medium wurden auf vier 5 L-Kolben verteilt. Danach wurden Antibiotika und 50 mL der Vorkultur zugegeben. Anschließend wurden die Kulturen bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer $OD_{600} > 0.5$ inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG gestartet. Nach der Inkubation wurden die Kulturen bei 4 °C und 4000 U/min für 30 min geerntet und die Zellpellets bei -20 °C gelagert. Eine Übersicht der exakten Expressionsbedingungen ist in Tabelle 3.1 beschrieben.

Fragment	Expression				Antibiotika		
	c (IPTG) [mM]	T [°C]	Dauer [h]	c (Glucose) [g/L]	Kana [mg/L]	Carb [mg/L]	Cam [mg/L]
PKD2C680-968	1	37	4	2	-	50	34
PKD2C680-796	0.4	30	16	-	30	-	-
PKD2C680-796mutEF1	1	37	4	2	-	50	34
PKD2C680-796mutEF2	1	37	4	2	-	50	34
PKD2C797-968	1	37	4	2	-	50	34
PKD2C725-880	1	37	4	2	-	50	34
PKD2C828-900	0.1	37	4	-	-	50	34

Tabelle 3.1 Übersicht der Expressionsbedingungen der PKD2C-Fragmente: Abgebildet sind die Bedingungen für nicht markiertes Protein in LB-Medium. Die Zugabe der Glucose erfolgt bei Zugabe von IPTG.

3.1.2 Expression der ^{15}N , ^{13}C , ^2H markierten PKD2C-Fragmente

Für die Vorkultur wurden 200 mL LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika versetzt, eine Pipettenspitze der zu vermehrenden Glycerin Zellkultur zugegeben und über Nacht bei 37 °C und 180 U/min im Schüttler inkubiert.

10 L LB-Medium wurden auf vier 5 L-Kolben verteilt. Danach wurden die Antibiotika und 50 mL der Vorkultur zugegeben. Anschließend wurden die Kulturen bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer $OD_{600} > 0.5$ inkubiert. Die Zellen wurden bei R. T. für 30 min bei 4000 U/min geerntet. Nacheinander zweimal in NMM resuspendiert und erneut bei R. T. für 30 min zentrifugiert. Zum Schluss wurde das gewaschene Pellet in 5 L NMM resuspendiert und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG gestartet. Nach der Inkubation wurden die Kulturen bei 4 °C

und 4000 U/min für 30 min geerntet und die Zellpellets bei -20 °C gelagert. Die genauen Expressionsbedingungen in NMM können Tabelle 3.2 entnommen werden. Je nach Bedarf wurde, um ein einfach markiertes Protein zu erhalten $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$, für ein zweifach markiertes Protein $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$, $^{13}\text{C-Glucose}$ und für ein dreifach markiertes Protein $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, $^{13}\text{C-Glucose}$ und D_2O (Reinheit 99.9 %) bei der Herstellung des NMM verwendet (siehe hierzu Kapitel 2.2).

Fragment	Expression				Antibiotika		
	c (IPTG) [mM]	T [°C]	Dauer [h]	c ($^{13}\text{C-Glucose}$) [g/L]	Kana [mg/L]	Carb [mg/L]	Cam [mg/L]
PKD2C680-968	1	37	14	2	-	50	34
PKD2C680-796	0.4	30	16	-	30	-	-
PKD2C680-796mutEF1	1	37	16	2	-	50	34
PKD2C680-796mutEF2	1	37	16	2	-	50	34
PKD2C797-968	1	37	16	2	-	50	34
PKD2C725-880	1	37	16	2	-	50	34
PKD2C828-900	0.1	37	20	-	-	50	34

Tabelle 3.2 Übersicht der Expressionsbedingungen für die markierte Variante der PKD2C-Fragmente: Abgebildet sind die Vorschriften um markiertes Protein in NMM zu erhalten. Die Zugabe der Glucose erfolgt bei Zugabe von IPTG und muss für den Fall, dass ein zweifach markiertes Protein exprimiert wird, auch ^{13}C markiert sein.

3.1.3 Reinigung der PKD2C-Fragmente mit His-Tag

Folgende Fragmente tragen einen 6xHis-Tag und werden nach diesem Protokoll gereinigt: PKD2C828-900, PKD2C680-796.

Für den Aufschluss wurde das Zellpellet zuerst in His-Puffer (1 mL/g Pellet) aufgetaut und gelöst. Der Zellaufschluss wurde durch Zugabe von Lysozym (1 Spatelspitze in 1 mL His-Puffer) und 1.5 mL DNase-I-Lösung (10 mg/mL) eingeleitet und durch 3x 10 s Ultraschallbehandlung abgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend zentrifugiert (45000 g, 4 °C, 45 min).

Der Überstand wurde zweimal auf eine mit His-Puffer equilibrierte HisTrap FF crude- oder eine Ni-NTA Superflow-Säule aufgetragen. Danach wurde nacheinander mit fünf Säulenvolumen His-Puffer und His-Waschpuffer gespült. Anschließend wurden mit His-Elutionspuffer vier Säulenvolumen eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereint.

Im Falle von PKD2C828-900 werden die proteinhaltigen Fraktionen im Massenverhältnis 1:100 mit TEV-Protease versetzt, um den 6xHis-Tag vom Protein zu trennen. Die Spaltung erfolgte bei R. T. für 18 h. Nach der Spaltung durch die TEV-Protease wurden die Fraktionen vereint und zur Auftrennung auf eine mit His-Puffer equilibrierte HisTrap FF crude- oder eine Ni-NTA Superflow-Säule aufgetragen, um die TEV-Protease und den abgespaltenen His-Tag abzutrennen. PKD2C828-900 bindet unspezifisch an die Säule und es wurden vier Säulenvolumen

mit His-Waschpuffer eluiert. Die TEV-Protease und der 6xHis-Tag hingegen verbleiben am Säulenmaterial. Die PKD2C haltigen Fraktionen wurden in Vivaspins bei 5 °C und 5000 U/min konzentriert. Um das Protein in Messpuffer oder His-Puffer (je nach Bedarf) zu erhalten wurde entweder im Vivaspin fünfmal mit dem gewünschten Puffer bei 5 °C und 5000 U/min umgepuffert oder über eine Superdex G75 prep grade -Säule in den gewünschten Puffer überführt. Anschließend wurde die Proteinlösung im Vivaspin konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Im Falle von PKD2C680-796 wurden zu den proteinhaltigen Fraktionen insgesamt 700 µL Thrombin (2U/µL) zugegeben, um den 6xHis-Tag vom Protein zu trennen. Die Spaltung erfolgte bei R. T. für 18 h. Nach der Spaltung durch Thrombin wurden die Fraktionen vereinigt und 2x über eine Benzamidin Sepharose 4 Fast Flow-Säule geleitet um das Thrombin abzutrennen. Die PKD2C680-796-haltigen Fraktionen wurden in Vivaspins bei 5 °C und 5000 U/min konzentriert. Der 6xHis-Tag diffundiert hierbei durch die Membran und wird so abgetrennt. Um das Protein in Messpuffer oder His-Puffer (je nach Bedarf) zu erhalten wurde entweder im Vivaspin fünfmal mit dem gewünschten Puffer bei 5 °C und 5000 U/min umgepuffert oder über eine Superdex G75 prep grade-Säule in den gewünschten Puffer überführt. Anschließend wurde die Proteinlösung im Vivaspin konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.4 Reinigung der PKD2C-Fragmente mit MBP-Tag ohne Ca²⁺

Folgende Fragmente tragen einen MBP-Tag und werden nach diesem Protokoll gereinigt: PKD2C680-968, PKD2C680-796mutEF1/EF2, PKD2C797-968, PKD2C725-880.

Für den Aufschluss wurde das Zellpellet zuerst in MBP-Puffer (1 mL/g Pellet) aufgetaut, gelöst und eine Proteaseinhibitortablette zugegeben (Complete EDTA-free, Roche). Der Zellaufschluss wurde durch Zugabe von Lysozym (1 Spatelspitze in 1 mL MBP-Puffer) und 1.5 mL DNase-I-Lösung (10 mg/mL) eingeleitet und durch 3x 10 s Ultraschallbehandlung abgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend zentrifugiert (45000 g, 4 °C, 45 min).

Der Überstand wurde zweimal auf eine, mit MBP-Puffer equilibrierte, Dextrin Sepharose High Performance- oder eine MBPTrap HP-Säule aufgetragen. Danach wurde mit zehn Säulenvolumen MBP-Puffer gespült. Anschließend wurden mit MBP-Elutionspuffer vier Säulenvolumen eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereint und im Massenverhältnis 1:100 mit TEV-Protease versetzt, um den MBP-Tag vom Protein zu spalten. Die Spaltung erfolgte bei R. T. für 18 h. Das Proteingemisch (MBP, PKD2C, TEV-Protease) wurde im 2. Reinigungsschritt auf eine mit MBP-Puffer equilibrierte Ni-NTA- oder HisTrap FF crude-Säule aufgetragen. Es wurden mit fünf Säulenvolumen MBP-Puffer gespült, um das MBP abzutrennen. Da PKD2C unspezifisch an das Säulenmaterial bindet, konnte es mit vier Säulenvolumen His-

Waschpuffer eluiert werden. Durch den 6x His-Tag der TEV-Protease, verblieb diese an der Säule und konnte so im 2. Reinigungsschritt entfernt werden. Die PKD2C-haltigen Fraktionen wurden in Vivaspins bei 5 °C und 5000 U/min konzentriert. Um das Protein in Messpuffer oder MBP-Puffer (je nach Bedarf) zu erhalten wurde entweder im Vivaspin fünfmal mit dem gewünschten Puffer bei 5 °C und 5000 U/min umgepuffert oder über eine Superdex G75 prep grade-Säule in den gewünschten Puffer überführt. Für alle Fragmente, die die Coiled-Coil Domäne (Aminosäuren 835-873) [28] enthalten, empfiehlt es sich unbedingt einen Reinigungsschritt über die Gelfiltrationssäule (Superdex G75 prep grade-Säule) durchzuführen, um große Aggregate abzutrennen. Anschließend wurde die Proteinlösung im Vivaspin konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.5 Reinigung der PKD2C-Fragmente mit MBP-Tag mit Ca^{2+}

Da mehrere untersuchte Fragmente zwei EF-Hände besitzen [26] wurden diese zum Teil auch in Anwesenheit von CaCl_2 gereinigt.

Die Reinigung erfolgte analog zu Kapitel 3.1.4. Allerdings wurde statt MBP-Puffer, MBP/ Ca^{2+} -Puffer statt MBP-Elutionspuffer, MBP/ Ca^{2+} -Elutionspuffer, statt His-Waschpuffer, His/ Ca^{2+} -Waschpuffer und statt Messpuffer, Messpuffer/ Ca^{2+} , verwendet.

3.1.6 Expression und Reinigung der TEV-Protease

Die Expression und Reinigung der TEV-Protease wurde analog zu Roland Hofweber (Dissertation, Universität Regensburg) durchgeführt.

Für die Vorkultur wurden 200 mL LB-Medium mit 200 μL Chloramphenicol (34 mg/mL), 200 μL Kanamycin (30 mg/mL) versetzt, eine Pipettenspitze der Glycerin Zellkultur zugegeben und über Nacht bei 37 °C und 180 U/min im Schüttler inkubiert. 10 L LB-Medium wurden auf vier 5 L-Kolben verteilt. Danach wurden jeweils 2.5 mL Chloramphenicol (34 mg/mL), 2.5 mL Kanamycin (30 mg/mL) und 50 mL der Vorkultur zugegeben. Anschließend wurden die Kulturen bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer $\text{OD}_{600} > 0.5$ inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von 0.5 mM IPTG gestartet. Nach der Inkubation für 4 h wurden die Kulturen bei 4 °C und 4000 U/min für 30 min geerntet und die Zellpellets bei -20 °C gelagert.

Zur Reinigung der TEV-Protease wurde das Zellpellet aufgetaut und in TEV-Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde durch Zugabe von Lysozym (1 Spatelspitze in 1 mL Lysepuffer) und 1.5 mL DNase-I-Lösung (10 mg/mL) eingeleitet und durch 2x30 s Ultraschallbehandlung abgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 17000 g und 4 °C für 45 min sedimentiert. Der Überstand wurde auf eine Ni-NTA-Superflow-Säule (25 mL, equilibriert mit TEV-Lysepuffer, Flussrate: 2 mL/min) aufgetragen. Anschließend

wurde mit jeweils vier Säulenvolumen TEV-Waschpuffer 1, TEV-Waschpuffer 2 und TEV-Waschpuffer 3, bei einer Flussrate von 4 mL/min gespült. Danach wurde mit TEV-Elutionspuffer eluiert (Flussrate: 2 mL/min). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereint, konzentriert und über eine Gelfiltrationssäule (Superdex 75 prep grade) in TEV-Puffer überführt. Die TEV-Protease wurde auf 1 mg/mL eingeeengt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.1.7 Expression und Reinigung von mDia1(69-457)

Für die Vorkultur wurden 200 mL LB-Medium mit 200 µL Carbenicillin (50 mg/mL), versetzt, eine Pipettenspitze der Glycerin Zellkultur zugegeben und über Nacht bei 37 °C und 180 U/min im Schüttler inkubiert. 10 L LB-Medium wurden auf vier 5 L-Kolben verteilt. Danach wurden jeweils 2.5 mL Carbenicillin (50 mg/mL) und 50 mL der Vorkultur zugegeben. Anschließend wurden die Kulturen bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer $OD_{600} > 0.5$ inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von 0.1 mM IPTG gestartet. Nach der Inkubation über Nacht bei 25 °C wurden die Kulturen bei 4 °C und 4000 U/min für 30 min geerntet und die Zellpellets bei -20 °C gelagert.

Zur Reinigung von mDia1(69-457) wurde das Zellpellet aufgetaut und in mDia1-Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde durch 2x30 s Ultraschallbehandlung abgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C für 30 min sedimentiert. Der Überstand wurde auf Glutathione Sepharose 4B Beads übertragen. Anschließend wurde mDia1-Lysepuffer zugegeben, bei 4000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Danach wurde mit 80U Thrombin pro mL Glutathion Beads, bei R. T. für 2 h der GST-Tag von mDia1 gespalten. Der Überstand wurde auf Benzamidin Speharose 4 Fast Flow Beads aufgetragen, um das Thrombin vom mDia1 abzutrennen. Der Überstand wurde dann im Vivaspin dreimal mit Messpuffer bei 5 °C und 5000 U/min umgepuffert. Anschließend wurde die Proteinlösung im Vivapspin konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels UV-Spektroskopie

Die Konzentration eines Proteins lässt sich aus dessen Absorption bei 280 nm bestimmen [93-94].

Dafür wird die zu untersuchende, konzentrierte, reine Proteinlösung 1:100 mit Wasser verdünnt und die Absorption bei 280 nm (gegen reines Wasser als Tara)

gemessen. Über das Lambert-Beersche-Gesetz kann dann die Konzentration berechnet werden:

$$A(280\text{nm})=\varepsilon(280\text{nm})\cdot c\cdot d$$

Formel 3.1 Lambert Beersches Gesetz: A Absorbanz, ε Extinktionskoeffizient, c Konzentration des Proteins und d Schichtdicke der Küvette

Der Extinktionskoeffizient eines Proteins kann über seine Aminosäuresequenz berechnet werden [94-95]. Die in Tabelle 3.3 abgebildeten Extinktionskoeffizienten wurden, wie oben beschrieben, zur Berechnung der Proteinkonzentration der unterschiedlichen Fragmente nach dem letzten Reinigungsschritt und Konzentration verwendet.

Fragment	ε (280 nm) [cm ⁻¹ ·M ⁻¹]
PKD2C680-968	11460
PKD2C680-796	4470
PKD2C680-796mutEF1	4470
PKD2C680-796mutEF2	4470
PKD2C797-968	6990
PKD2C725-880	2980
PKD2C828-900	1490

Tabelle 3.3 Berechnete Extinktionskoeffizienten nach Gill und von Hippel [94-95]

3.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli

Die Überprüfung von Proteingemischen in den Fraktionen nach Affinitäts- und Chromatographiesäulen wurde über SDS-PAGE nach Lämmli [96] durchgeführt.

Die Proteine werden dabei durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) in ihrer Ladung maskiert und erhalten so eine negative Gesamtladung, die direkt proportional zum Molekulargewicht ist. Dies ermöglicht eine Auftrennung nach der molekularen Masse.

Für die Denaturierung der Proteine werden zu 18 μL der Proteinprobe 6 μL 4x SDS-Probenpuffer gegeben, gut vermischt und für fünf Minuten bei 105 °C erhitzt. Anschließend wird für eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert. In zwölf Taschen des mit Laufpuffer befüllten Sammelgels können jeweils 15 μL des Überstandes der zu untersuchenden Fraktion gegeben werden, in eine Tasche kommen 10 μL des Proteinstandards. Die Trennung erfolgte in Anwesenheit von Laufpuffer im Trenngel bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA für 45 min. Die Gele werden in Färbelösung kurz in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend für 15 Minuten

geschwenkt. Entfärbt wurde mit Entfärbelösung durch mehrmaliges kurzes Aufkochen in der Mikrowelle und Schütteln - jeweils immer mit frischer Entfärbelösung. Die fertig entfärbten Gele wurden in kleine Plastiktüten verpackt, beschriftet, fotografiert und eingescannt.

3.3 Kernspinresonanzspektroskopie

3.3.1 Probenbereitung

Die zu untersuchenden Proben wurden wie in Kapitel 3.1 beschrieben gereinigt und die Proteinkonzentration wie in Kapitel 3.2.1 angegeben bestimmt. Die zu vermessenden Proben wurden auf ein Gesamtvolumen von 500 μL oder 600 μL durch folgende Zugaben gebracht:

448 μL Protein in Puffer + 50 μL D_2O + 2 μL DSS (0.1 M in D_2O)

538 μL Protein in Puffer + 60 μL D_2O + 2 μL DSS (0.1 M in D_2O).

Es wurde immer in Gegenwart von 10 % D_2O („lock“-Signal) und 400 μM bzw. 333 μM DSS als Referenz gemessen. Das CH_3 -Signal des DSS wird als 0 ppm festgelegt. So ist eine indirekte Referenzierung der 2D- (^{15}N , ^{13}C) und 3D- (^1H , ^{15}N , ^{13}C) Spektren möglich [97]. Im Falle von Langzeitmessungen (Messzeiten länger als drei Tage) wurde in Anwesenheit von 1 mM NaN_3 gemessen, um ein Keimwachstum zu verhindern. Die fertigen Lösungen wurden in 5 mm NMR Röhren (siehe Kapitel 2.8) gefüllt und in das Spektrometer gegeben. Die Probe wurde für 5 Minuten im Spektrometer auf die Messtemperatur equilibriert.

3.3.1.1 pH-Titrationen und Zuordnung der Ringprotonen

Um die Protonen der Aromaten sichtbar zu machen müssen die Protein-Proben in reinem D_2O (99.9 %) vorliegen. Hierfür wurde die Protein-Probe nach der Reinigung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für mindestens 2 Tage lyophilisiert. Anschließend wurde in 500 oder 600 μL D_2O gelöst und 2 μL DSS (0.1 M in D_2O) zugegeben.

Für jeden pH-Titrationsschritt wurde die Proteinlösung in ein Eppendorf Cup überführt, der pH-Wert gemessen (siehe Kapitel 2.9) und durch Zugabe von 0.1 und 0.01 molarer HCl- oder NaOH-Lösung der neue pH-Wert eingestellt.

3.3.1.2 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Titrationen

Die Ionenzugabe erfolgte direkt an die Wand des NMR-Probenröhren aus Ca^{2+} - bzw. Mg^{2+} -Stammlösungen mit den Konzentrationen 1, 0.1 und 0.01 mol/L. Das

Röhrchen wurde mit dem Deckel verschlossen, zweimal vorsichtig auf den Kopf gestellt (wobei darauf zu achten ist dass sich die Zugabe mit der Probenlösung mischt), anschließend zentrifugiert und wieder in das Spektrometer gebracht.

3.3.1.3 Titration mit mDia1(69-457)

PKD2C680-796 und mDia1(69-457) wurden in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE) überführt. Die mDia1(69-457) Probe enthielt zusätzlich 200 μM DSS und 10 % D_2O . Die PKD2C680-796 Probe enthielt 0.5 mM CaCl_2 , 500 μM DSS und 10 % D_2O . Der Ablauf der Titration ist Tabelle 3.4 zu entnehmen.

	c [μM]		V [μL]		Verhältnis
	PKD2C	mDia1	Gesamt	Zugabe	PKD2C:mDia1
Start	54	0	200	0	1:0
1. Titrationsschritt	48.33	24.16	223	23	1:0.5
2. Titrationsschritt	44.36	41.07	243	20	1:0.93
3. Titrationsschritt	38.10	67.73	283	40	1:1.78
4. Titrationsschritt	30.99	98.00	348	65	1:3.16
5. Titrationsschritt	22.81	132.85	473	125	1:5.82

Tabelle 3.4 Ablauf der Titration von PKD2C680-796 mit mDia1(69-457)

3.3.2 Pulsprogramme, Auswertung und Abbildung der Spektren

3.3.2.1 1D-Spektren

Für die eindimensionalen ^1H -Spektren wurde das Pulsprogramm *zgpgw5* und *zgpgw5.pr*, das eine Watergate W5-Pulssequenz [98] zur Wasserunterdrückung benutzt, verwendet. Die Anzahl der Scans (ns) wurde der Proteinkonzentration angepasst.

Für die Titration mit mDia1(69-457) wurde das Pulsprogramm *noesygprr1d.pr* verwendet. Hier wurde ein *relaxation delay* (D1) von 8 s verwendet um ein quantitatives Spektrum für die NMR-Konzentrationsbestimmung zu erhalten.

Mit *TopSpinNMR* wurden die aufgenommenen Spektren mit einer zusätzlichen Linienverbreiterung von 2 Hz exponentiell gefiltert.

Für Abbildungen wurden die Spektren nach der Prozessierung und Eichung in *TopSpinPlot* geöffnet, als *postscript (.ps)-file* exportiert und im Programm *CorelDraw12* importiert. Mithilfe von *CorelDraw12* wurde die Spektren in Form und Farbe nach Bedarf gestaltet.

Ca²⁺-Titration

Für die Auswertung der Ca²⁺-Titrationsexperimente zur Ermittlung der Bindungskonstanten wurden die Shifts oder die Zu-/Abnahme eines Signale verfolgt, anschließend wurde die Differenz zwischen den ppm-Werten oder des Integrals des jeweiligen Titrationsschritts und dem Wert ohne Ca²⁺-Zugabe gebildet. Diese Differenz wurde gegen die Konzentration von CaCl₂ aufgetragen und mit der Formel 3.2 im Programm *Origin6.0* gefittet. Die gefitteten und farblich gestalteten Kurven wurden als *Tagged Image File (.tif)* abgespeichert.

$$y = \frac{B \cdot x}{K + x}$$

Formel 3.2 Verwendete Formel zur Berechnung der Bindungskonstanten: Formel nach dem OneSiteBinding- oder dem Zwei Zustands-Modell. x ist die Konzentration des Liganden, y die Shift- oder Intensitätsänderung aufgrund der spezifischen Bindung. Gefittet werden die Parameter B (maximale Bindungskapazität) und K (Dissoziationskonstante).

pH-Titration

Für die Auswertung der pH-Titrationsexperimente wurde die chemische Verschiebung gegen den pH-Wert aufgetragen und der sigmoidale Verlauf mit der Formel 3.3 im Programm *Origin6.0* gefittet. Die gefitteten und farblich gestalteten Kurven wurden als *Tagged Image File (.tif)* abgespeichert.

$$y = \frac{A1 - A2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A2$$

Formel 3.3: Verwendete Formel zur Berechnung der Säurekonstante: Formel nach dem Boltzmann-Modell. x ist der pH-Wert, y die chemische Verschiebung in ppm. Gefittet werden die Parameter x₀ (Säurekonstante, pK Wert), A1 (linke horizontale Asymptote) und A2 (rechte horizontale Asymptote).

Diffusionsmessungen

Um Informationen über den hydrodynamischen Radius und die Größe von Proteinen in Lösung zu bestimmen, wurden eindimensionale ¹H-Diffusionsmessungen mit dem Pulsprogramm *diffuledcsd2o.wk* [10-12] durchgeführt. Für die korrekte Auswertung der Diffusionsmessungen wurden immer 99.9 % D₂O (zur Berechnung des hydrodynamischen Radius), 20 % Polyacrylamid (Stabilität des Gradientenfeldes) und Ethanol (Temperaturstandard) vermessen. Die Anzahl der Scans (ns) wurde der Proteinkonzentration angepasst. Der Gradientenpuls (1-2.5 ms) wurde so angepasst, dass der Signalabfall bei 100 % Gradient unter 20-10 % des Signals bei 5 % Gradient, lag. Die Messungen mit Protein und D₂O wurden in 5 %-Schritten und die Polyacrylamid Probe in 10 %-Schritten gemessen. Die Messungen wurden immer bei 298 K durchgeführt.

Mit *TopSpinNMR* wurden die aufgenommenen Spektren mit einer zusätzlichen Linienverbreiterung von 2 Hz exponentiell gefiltert.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Origin6.0*. Der Signalabfall des Proteins zwischen 0 und 3 ppm wurde gegen den angelegten Gradienten aufgetragen und

analog zu Munte et al gefitteten und ausgewertet [99], farblich gestaltet und als *Tagged Image File (.tif)* exportiert. Für die Berechnung der hydrodynamischen Radien der Fragmente wurde der Diffusionskoeffizient $D_{\text{HDO}}(\text{in D}_2\text{O}) = 1.902 \pm 0.190 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ bei 298 K [100] verwendet.

3.3.2.2 2D-Spektren

(¹H-¹⁵N)-HSQC-Spektren

Für die zweidimensionalen HSQC-Spektren wurde das Pulsprogramm *hsqcf3gpqh19.cem* [101-103] verwendet. Die Anzahl der Scans (ns) und der Experimente wurde der Proteinkonzentration angepasst.

Die aufgenommenen Spektren wurden mit einer GM (Lorentz-to-Gauss) Window function (GB = 0.12 für Protonen und 0.1 für Stickstoff) mit *TopSpinNMR* prozessiert.

Für Abbildungen wurden die Spektren nach der Prozessierung und Eichung im Programm *Auremol* geöffnet, mit dem Befehl *copy to clipboard* gespeichert und in das Programm *CorelDraw12* kopiert. Mit Hilfe von *CorelDraw12* wurde die Spektren in Form und Farbe nach Bedarf gestaltet.

Aromatenzuordnung

Die Zuordnung der Ringprotonen der Aromaten erfolgte mit dem Pulsprogramm *mlevgpqh5* [98, 104], *noesygpqh5* [98] und *hsqcetgpsi* [105-107].

Die aufgenommenen Spektren wurden mit einer GM (Lorentz-to-Gauss) Window function (GB = 0.12 für Protonen und 0.1 für Stickstoff) mit *TopSpinNMR* prozessiert.

pH-Titration

Für die Auswertung der pH-Titrationsexperimente wurde die chemische Verschiebung der Protonen gegen den pH-Wert aufgetragen und mit der Formel 3.3. im Programm *Origin6.0* gefittet. Die gefitteten und farblich gestalteten Kurven wurden als *Tagged Image File (.tif)* abgespeichert.

Titration mit mDia1(69-457)

Für die Titrationsexperimente mit mDia1(69-457) wurden aufgrund der zu erwartenden Größe des Komplexes das Pulsprogramm *trotyf3gpqhsi19pr.fs* [108-113] verwendet.

Der NC_proc wurde bei allen Titrationsschritten gleich gesetzt (NC_pro = -9). Die aufgenommenen FIDs wurden vor der Fouriertransformation mit einer quadratischen Cosinusfunktion multipliziert (*TopSpin*-Parameter QSINE und SSB = 2). Anschließend wurde noch eine automatische polynomiale baseline correction fünfter Ordnung in beiden Dimensionen durchgeführt.

Für die Auswertung wurden die prozessierten Spektren in *Auremol* geladen, die Signale automatisch gepickt (Auto Signal pick (threshold) und mit einem Segmentierungslevel von 0.1 integriert (2D/3D Signal integration by shape and volume error calculation). Um eine interne Korrektur vorzunehmen, wurde das Integral von Gln743 näher betrachtet. Durch die Zugabe von mDia1(69-457) wurde PKD2C680-796 verdünnt. Da sich die Integrale linear zur Konzentration verhalten, wurde das zu erwartende Integral für Gln743 bezüglich dem Integral ohne mDia1(69-457) berechnet. Durch Vergleich der realen Integrale mit den berechneten, wurde ein Korrekturfaktor für jeden Titrationsschritt ermittelt. Die Integrale der Aminosäuren wurden in Excel auf $n_s = 1$ normiert und mit dem Korrekturfaktor multipliziert. Abschließend wurde noch die Differenz der Integrale zum „Nullwert“ (Integral ohne mDia1(69-457)) berechnet.

Diese Differenz wurde in *Origin6.0* gegen die Konzentration von mDia1(69-457) aufgetragen und mit Formel 3.2 gefittet. Für die Abbildungen wurden die Graphen als *Tagged Image File (.tif)* exportiert.

Für Abbildungen der 2D-Spektren wurden diese nach der Prozessierung und Eichung im Programm *Auremol* geöffnet, mit dem Befehl *copy to clipboard* gespeichert und in das Programm *CorelDraw12* kopiert. Mithilfe von *CorelDraw12* wurde die Spektren in Form und Farbe nach Bedarf gestaltet.

3.3.2.3 3D-Spektren

HNCA, CBCACONH, CBCANH

Für die dreidimensionalen Messungen des dreifach markierten Proteins wurden die Pulsprogramme *hncagp2h3d* [114-115], *hncocacbgp2h3d* [116] und *hncacbgp2h3d* [116-117] verwendet.

Die aufgenommenen Spektren wurden mit einer QSINE Window function mit *TopSpinNMR* prozessiert und auf DSS geeicht. Mittels der 13 und 23 Projektionen wurden die Spektren gephasst.

Für die Auswertung wurden die Spektren in *Auremol* bearbeitet. Im HNCA sieht man die C_{α} s der Aminosäure n und ihres Vorgänger n^{-1} . Im CBCACONH sieht man das C_{α} und C_{β} des Vorgängers n^{-1} und im CBCANH die C_{α} s und C_{β} s der Aminosäure n und ihres Vorgängers n^{-1} . Anhand der chemischen Verschiebungen der C_{α} s und C_{β} s kann eine teilweise Zuordnung der Art der Aminosäure erfolgen und eventuell schon ein Ausgangspunkt für die sequenzielle Zuordnung gefunden werden. Anschließend wird über die Aminosäuresequenz, die Informationen über die Aminosäure und die chemischen Verschiebungen der C_{α} s und C_{β} s der Aminosäure n und der Vorgänger n^{-1} die sequentielle Zuordnung vervollständigt.

3.4 CD-Spektroskopie

3.4.1 Probenbereitung

Für die CD-Messungen wurden die Proteinproben fünfmal in CD-Messpuffer im Vivaspin bei 5 °C und 5000 U/min umgepuffert. Die Messungen wurden bei R. T. durchgeführt.

3.4.2 Auswertung und Abbildung der Daten

Die vom CD-Spektrometer aufgenommenen Datensätze wurden mit dem *Jasco Spectra Manager* im Programm *Spectra Analysis* mit dem Algorithmus nach Savitzky-Golay gefittet. Die so erhaltenen Daten wurden mit der Formel 3.4 in die molare Elliptizität, normiert auf einen Aminosäurerest, umgerechnet. Diese Daten wurden mithilfe des Online Servers DICHROWEB [118] mit dem *CDSSTR* [119-121] Analyseprogramm ausgewertet. Für PKD2C680-796 wurde das Referenzset SP175 [122], für die Fragmente PKD2C680-968, 797-968, 828-900, 725-880, 680-796mutEF1 das Referenzset Set3 [122] und für PKD2C680-796mutEF2 das Referenzset Set6 [122] verwendet. Anschließend wurden die Datensätze in das Programm *Origin6.0* geladen, grafisch dargestellt, farblich gestaltet und als *Tagged Image File (.tif)* exportiert.

$$\theta_{MRW} = \frac{\theta \cdot M}{10 \cdot c \cdot d \cdot n_{AS}} \text{ [deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}\text{]}$$

Formel 3.4 Formel zur Umrechnung in die molare Elliptizität: θ [mdeg] ist die Elliptizität, M [g/mol] ist die molekulare Masse des Proteins, c [mg/mL] ist die Konzentration des Proteins, d [cm] Schichtdicke der Küvette und n_{AS} Anzahl der Aminosäuren des Proteins. Die resultierende Einheit ist in eckigen Klammern angegeben.

4 Ergebnisse

Das PKD2 Gen ist eines der beiden mutierten Gene in Patienten, die an Autosomal-dominanter polyzystischer Nierenerkrankung leiden [5]. Es kodiert für das Protein Polycystin-2, das aus 968 Aminosäuren besteht und aus sechs Transmembrandomänen und cytosolische N- und C-Termini aufgebaut ist. Für den C-Terminus wurden zwei EF-Hände (Aminosäuren 727-739 und 763-774) [5, 26], zwei Coiled-Coil Domänen (Aminosäuren 781-796 und 835-873) [5, 27-28] und ein ER Retentionssignal (Aminosäuren 787-820) [8] vorausgesagt. Hinzu kommt, dass für den C-Terminus Interaktionen mit einer Vielzahl an Proteinen bekannt ist [123]. Um detailliertere strukturelle Informationen über den C-Terminus zu erhalten, wurden neben dem gesamten C-Terminus (PKD2C680-968), auch die Fragmente PKD2C680-796, 680-796(D739A, E740A, D744A), 680-796(T771A, E774A), 797-968, 725-880 und PKD2C828-900 einer strukturellen und biochemischen Analyse unterzogen. Die kleineren Fragmente machen den relativ großen C-Terminus für die NMR-Spektroskopie zugänglicher und geben so auch die Möglichkeit die einzelnen Strukturmerkmale isoliert zu betrachten.

4.1 Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C680-796

Das Fragment PKD2C680-796 besitzt zwei EF-Hände (Aminosäuren 727-739 und 763-774) [5, 26] und eine Coiled-Coil Domäne [27] (Aminosäuren 781-796).

4.1.1 Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ^1H - und 2D-(^1H - ^{15}N)-NMR-Spektroskopie

Um erste Informationen über die Faltung des Fragments zu erhalten wurde ein ^1H -Spektrum aufgenommen. Das Spektrum zeigt überwiegend schmale Linienbreiten, aber zu wenig Signale insgesamt, in Anbetracht der Größe von 13.5 kDa (Abbildung 4.1).

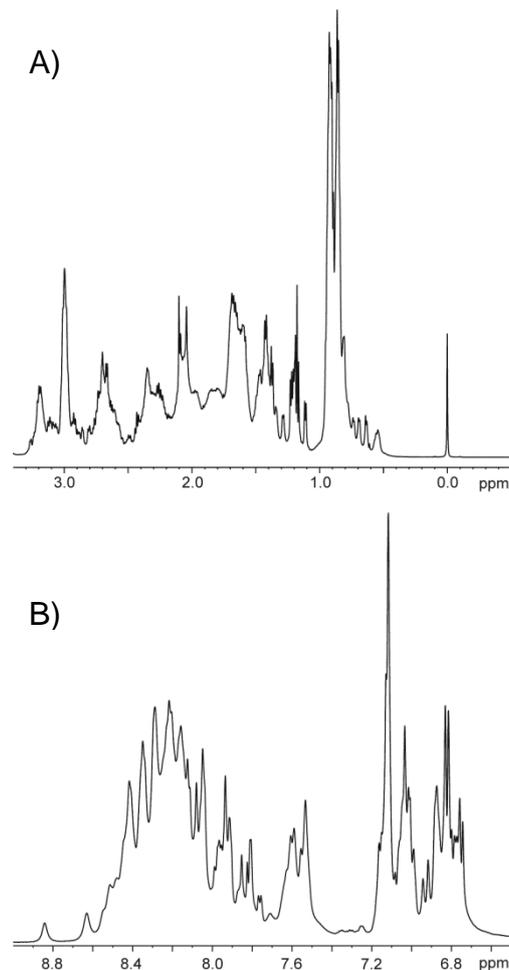


Abbildung 4.1 Ausschnitte aus dem 1D- ^1H -Spektrum von PKD2C680-796 in Abwesenheit von Ca^{2+} : $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 200 \mu\text{M}$ in 5 mM Tris pH 6.8, 500 mM NaCl, $T = 298 \text{ K}$. Das Spektrum wurde exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). A) Aliphatischer Bereich mit DSS bei 0 ppm. B) Amidbereich.

4.1.1.1 Interaktion mit den bivalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+}

Da in diesem Fragment zwei EF-Hände mit K_D -Werten von 55 und 179 μM gefunden wurden [26], ist die Interaktion mit Calcium von großem Interesse. Um zu überprüfen ob der Effekt nur auf Calcium beschränkt ist, wurde vergleichend noch die Interaktion mit Magnesium untersucht. In Abbildung 4.2 ist die Titration von PKD2C680-796 mit Ca^{2+} zu sehen. Wie schon von Schumann *et al* [26] gezeigt, sind Veränderungen im Spektrum bei Ca^{2+} Zugabe zu beobachten. Die Ca^{2+} -Zugabe führt zur Verschiebung des H^{N} Signals von Asp 752. Das Signal des H^{δ} von Phe738 taucht mit steigender Ca^{2+} -Konzentration auf, wohingegen das Signal des H^{N} von Leu729 mit steigender Ca^{2+} -Konzentration abnimmt und verschwindet. Im Gegensatz hierzu führt die Mg^{2+} -Zugabe zu keinen Veränderungen im ^1H Spektrum von PKD2C680-796 (Abbildung 4.3).

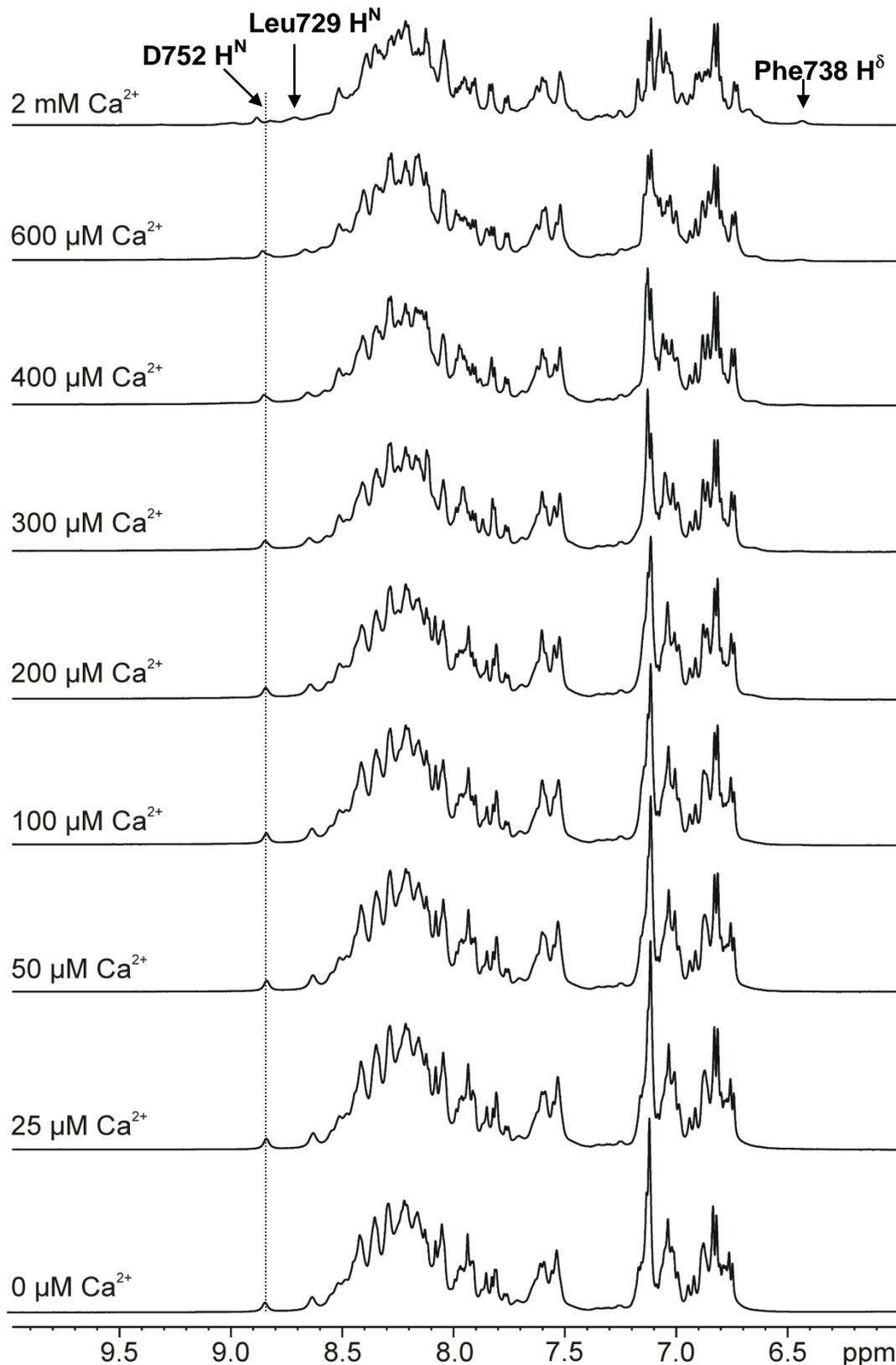


Abbildung 4.2 Calcium Titration von PKD2C680-796: $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 200 \mu\text{M}$ in 5 mM Tris pH 6.8, 500 mM NaCl, $T = 298 \text{ K}$. Calciumchlorid wurde entsprechend der Beschriftung zugegeben. Die gestrichelte Linie zeigt den Shift des H^{N} von Asp752, der Pfeil markiert einmal das Erscheinen des H^{δ} von Phe738, zum anderen das Verschwinden des H^{N} von Leu729 mit steigender Ca^{2+} -Konzentration. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

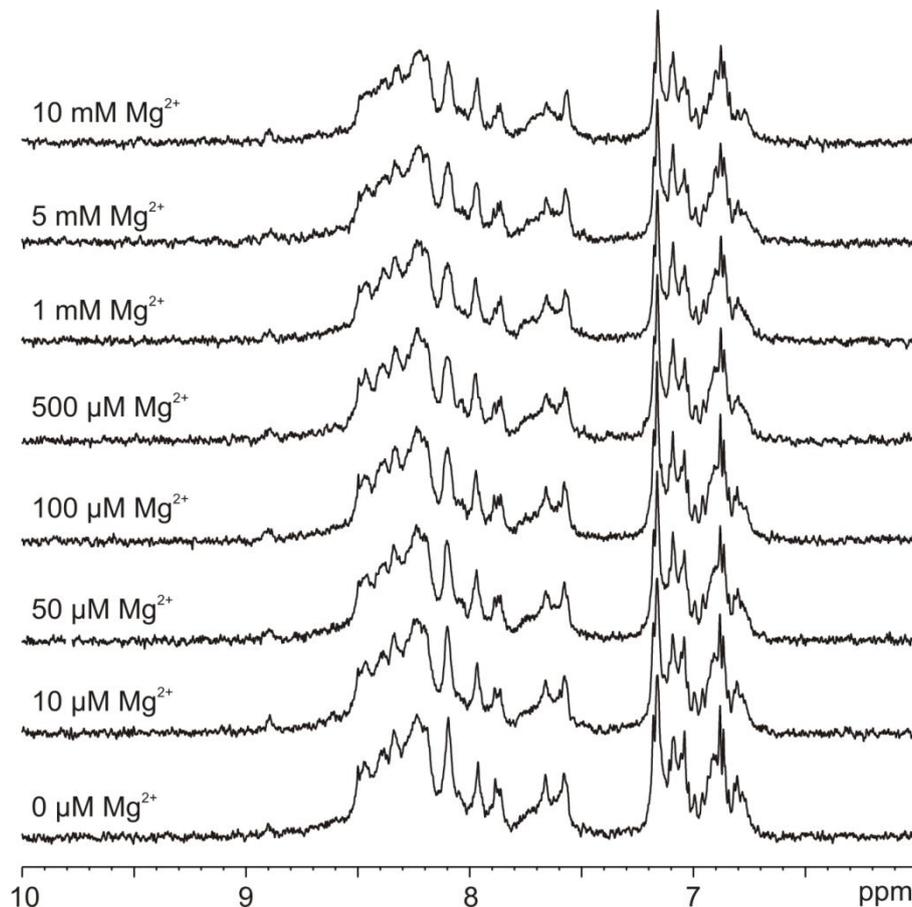


Abbildung 4.3 Magnesium Titration von PKD2C680-796: $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 50 \mu\text{M}$ in $5 \text{ mM Tris pH } 6.8$, 500 mM NaCl , $T = 298 \text{ K}$. Magnesiumchlorid wurde entsprechend der Beschriftung zugegeben. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

4.1.1.2 Bestimmung des Aggregationszustandes in Lösung mittels $1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ -Diffusionsmessungen

Da die Linienbreite auch vom Aggregationszustand des Proteins in Lösung abhängen kann, wurden $1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ -Diffusionsmessungen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} durchgeführt. Der Signalabfall der Proteinsignale zwischen 0 und 3 ppm wurde gegen den angelegten Gradienten aufgetragen. Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C680-796 in Lösung eine molekulare Masse von $24,297 \text{ g/mol}$ (Abbildung 4.4, rot). Dies spricht bei einer molekularen Masse von 13.5 kDa für das Vorliegen eines Dimers in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} reduziert sich die scheinbare molekulare Masse auf $9,194 \text{ g/mol}$ (Abbildung 4.4, grün). Auch der relative hydrodynamische Radius reduziert sich in Anwesenheit von Ca^{2+} um 27.7% (Tabelle 4.1) Die Zugabe von Calcium führt also zu einer Monomerisierung von PKD2C680-796 in Lösung.

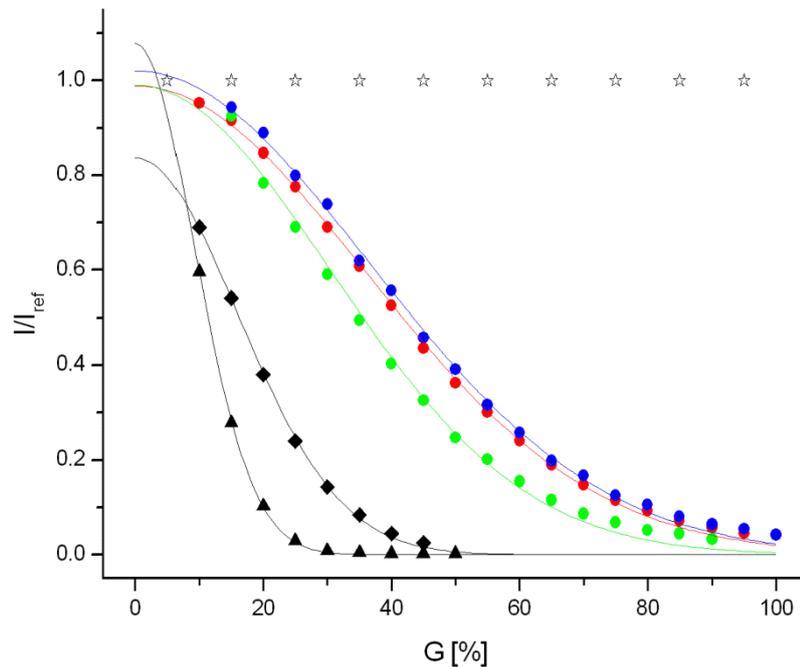


Abbildung 4.4 Aggregationszustand von PKD2C680-796 in An- und Abwesenheit bivalenter Ionen: Graph von I/I_{ref} als Funktion der relativen Gradientenstärke G . I repräsentiert die Signalintensität bei Gradientenstärke G und I_{ref} die Signalintensität der niedrigsten Gradientenstärke. Als Referenz wurde das DSS in der Probe verwendet. Die Stabilität des Gradientensystems wurde mit PAA überprüft. Das Signal von HDO in einer 99.9% D_2O und 0.1% H_2O Probe wurde verwendet um die Diffusionskonstante D [99] zu berechnen, siehe Kapitel 3.4.2. $V = 600 \mu L$, $c = 200 \mu M$ in 20 mM Tris pH 6.8, 500 mM NaCl, $T = 298 K$. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). *, PAA; \blacktriangle HDO, \blacklozenge DSS, \bullet PKD2C680-796 in Abwesenheit bivalenter Ionen, \bullet PKD2C680-796 in Anwesenheit von 2 mM $CaCl_2$, \bullet PKD2C680-796 in Anwesenheit von 2 mM $MgCl_2$.

Die Zugabe von Magnesium hingegen zeigt keine Veränderungen in der molekularen Masse und im hydrodynamischen Radius (Abbildung 4.4, blau). Die molekularen Massen und hydrodynamischen Radi sind Tabelle 4.1 zu entnehmen.

PKD2C	D^a	$R_h/R_{h,DSS}^b$	M_{exp}^c	M^d
	$10^{-10} m^2 \cdot s^{-1}$		$g \cdot mol^{-1}$	$g \cdot mol^{-1}$
680-796	1.54 ± 0.04	4.98 ± 0.27	$24,297 \pm 2,010$	13,514
680-796, $CaCl_2$	2.12 ± 0.10	3.60 ± 0.27	$9,194 \pm 1,330$	
680-796, $MgCl_2$	1.49 ± 0.05	5.15 ± 0.31	$26,742 \pm 2,702$	

Tabelle 4.1 Molekulare Massen und hydrodynamische Radien von PKD2C680-796 in An- und Abwesenheit bivalenter Ionen: a) Die Berechnung der Diffusionskonstante erfolgte über die Auswertung des Signalabfalls einer 99.9% D_2O und 0.1% H_2O Probe als Funktion der Gradientenstärke. Die Diffusionskonstante von HDO bei 298 K beträgt $D_{HDO}(in D_2O) = 1.902 \pm 0.190 \times 10^{-9} m^2/s$ [100]. b) Verhältnis der hydrodynamischen Radien von PKD2C und DSS. c) Experimentell festgestellte molekulare Masse von PKD2C in Lösung. DSS ($M = 196.34 g \cdot mol^{-1}$) wurde als Referenz verwendet. d) Molekulare Masse berechnet aus der Aminosäuresequenz.

4.1.1.3 NMR-spektroskopische Charakterisierung mittels 2D-(^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren

Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796 zeigt in Abwesenheit von Calcium eine schlechte Auflösung und deutlich weniger als die zu erwartenden 117 Signale für die Amidprotonen des Proteinrückgrats. Nach Zugabe von Calcium verbessert sich die spektrale Auflösung deutlich. Allerdings sind immer noch Signale im Random Coil Bereich zu beobachten [26, 124].

In Anbetracht dieser Erkenntnisse ist in Abbildung 4.5 das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796 in Anwesenheit von Calcium abgebildet. Die Pufferbedingungen (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE) wurden einem physiologischeren Bereich angepasst und wurden im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet.

Das Spektrum zeigt Signale die scharf und gut aufgelöst sind. Allerdings sind vor allem im Bereich zwischen 7.5-8.5 ppm und 118-123 ppm viele Signale schlecht aufgelöst. Weiterhin sind einige Signale auch im Bereich der chemischen Verschiebung von Random-Coil Positionen zu finden. Überträgt man die Zuordnung von Frank Schumann [125] auf dieses Spektrum erkennt man, dass die gut strukturierten Bereiche, die Bereiche der beiden EF-Hände und des Linkers dazwischen (Abbildung 4.5) sind.

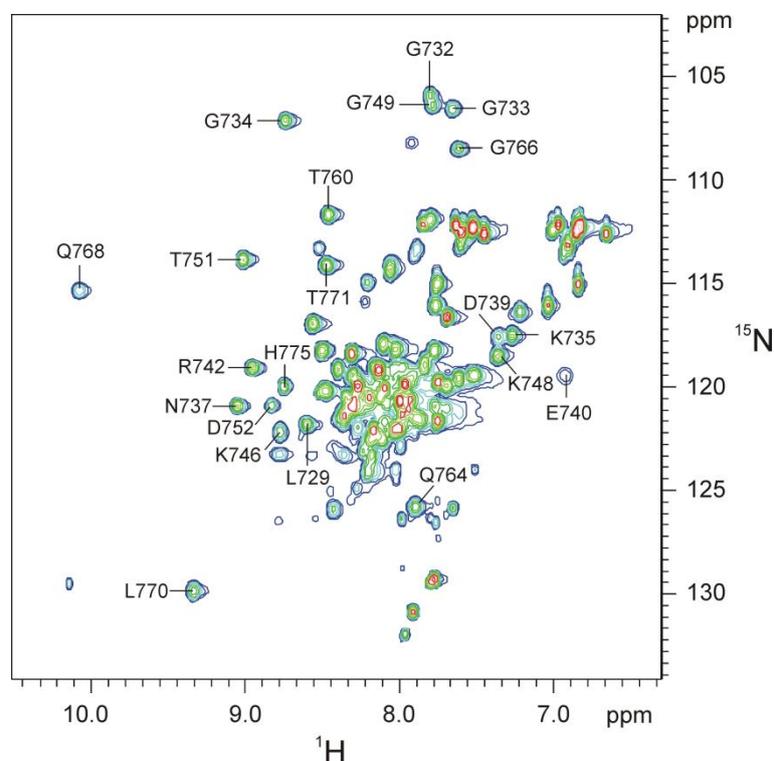


Abbildung 4.5 (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796: V = 600 μL , c = 0.5 mM in 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE, 0.7 mM CaCl_2 , pH = 7.7, T = 298 K. Beschriftet sind die Backbone Signale der Aminosäuren im Bereich der EF-Hände und des Linkers dazwischen. Das Spektrum wurde mit einer Lorentz zu Gauss Funktion (GB = 0.12 für ^1H und 0.1 für ^{15}N) prozessiert.

4.1.2 Zuordnung der Resonanzen der Ringprotonen von Tyr684, Tyr762, Phe738, Phe759, His750, His773, His775 und His793

Für die Zuordnung der Ringprotonen von PKD2C680-796 (BMRB: 16191 [125]) wurde das Protein wie in Kapitel 3.3.1.1 vorbereitet. Mithilfe der zugeordneten Resonanzen der Protonen der Seitenketten, wurde die Zuordnung mittels 2D-(^1H - ^1H)-TOCSY und -NOESY-Spektren (Abbildung 4.7) für die Ringprotonen der Aromaten vervollständigt. In Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7 ist die Zuordnung im 1D- und in den 2D-Spektren beschriftet. In Tabelle 4.2 sind die dazu gehörenden chemischen Verschiebungen zu finden.

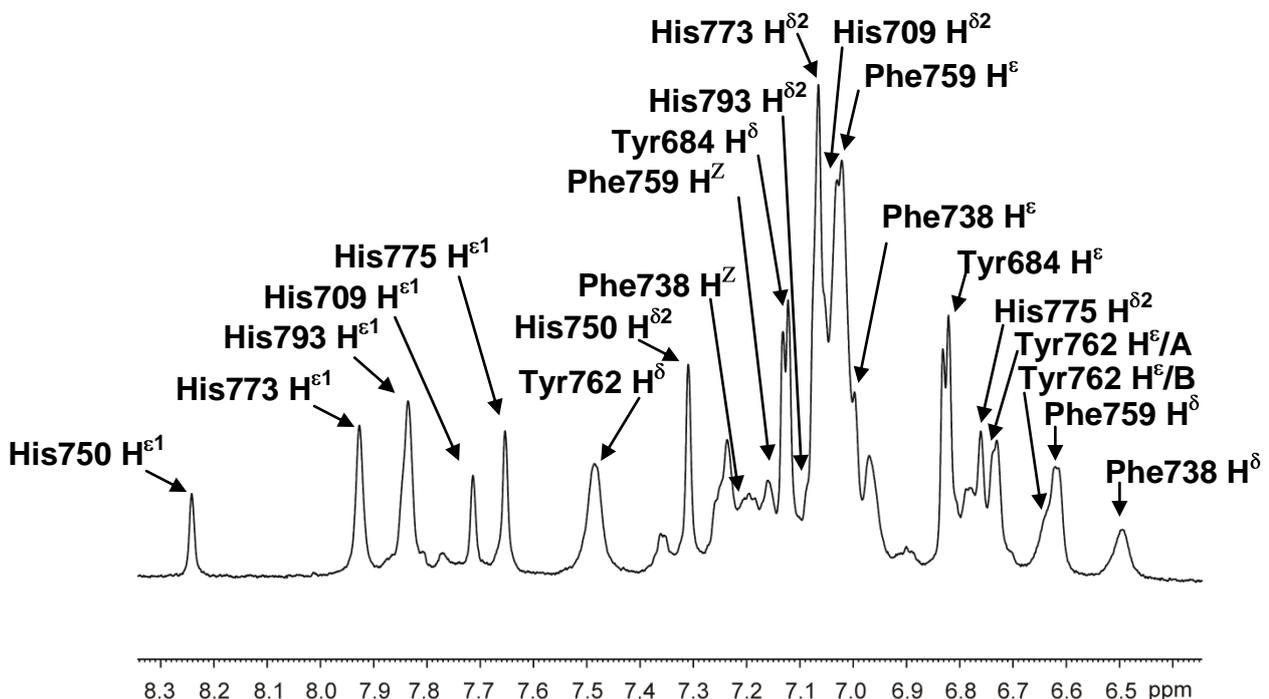


Abbildung 4.6 Zuordnung des Aromatenbereich von PKD2C680-796 in D_2O in Anwesenheit von Ca^{2+} : $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 1.92 \text{ mM}$ in $5 \text{ mM Tris pH } 6.8$, 500 mM NaCl , 2 mM CaCl_2 gefriergetrocknet und in D_2O gelöst, $T = 293 \text{ K}$. (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz)

Das nicht zugeordnete Singulett bei $\delta = 7.71 \text{ ppm}$ liegt im Bereich der chemischen Verschiebung der $\text{H}^{\epsilon 1}$ der Histidine. Es gibt im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum zwar keine Zuordnung für His709, nach dem Ausschlussverfahren kann es sich bei diesem Signal des $\text{H}^{\epsilon 1}$ aber nur um das $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His709 handeln. Über das Kreuzsignal im (^1H - ^1H)-TOCSY-Spektrum konnte daraufhin auch das $\text{H}^{\delta 2}$ von His709 zugeordnet werden.

Da für Tyr708 keine Zuordnung im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum gemacht werden konnte, folglich auch keine Seitenkettenuordnung vorhanden ist, wurde dieses nicht in Abbildung 4.7 und Abbildung 4.6 beschriftet.

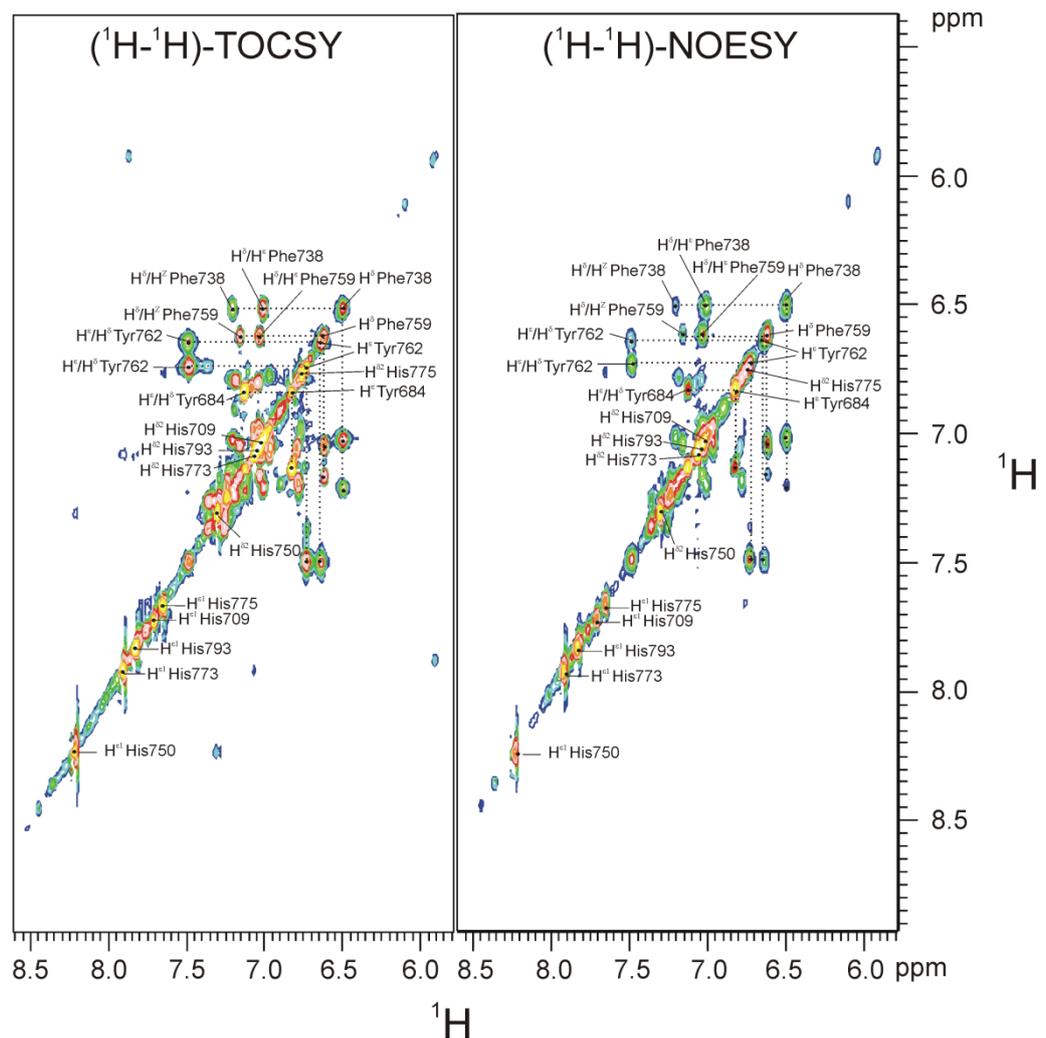


Abbildung 4.7 (^1H - ^1H)-TOCSY und -NOESY-Spektren PKD2C680-796 in D_2O in Anwesenheit von Ca^{2+}
Abgebildet ist der Ausschnitt des Aromatenbereichs. Das Spektrum wurde mit einer Lorentz-zu Gauss-Funktion (GB = 0.12 für ^1H) prozessiert.

Unabhängig davon gibt es im 1D - ^1H -Spektrum in Abbildung 4.6 und in den 2D -Spektren in Abbildung 4.7 noch weitere, nicht zugeordnete Signale bei $\delta = 7.77$, 7.36 , 7.26 , 7.19 , 6.97 , 6.90 und 6.78 ppm. Diese Signale erscheinen mit kleineren Integralen im Spektrum und zeigen Kreuzsignale in den 2D -Spektren in Abbildung 4.7.

Bei Betrachtung der Integrale, nach Referenzierung auf die H^δ von Tyr684, ergeben sich für den Bereich der H^ϵ der Histidine ($\delta = 7.6$ - 8.3 ppm) fünf Protonen. Das bedeutet, dass durch die partielle Beladung des Proteins mit Ca^{2+} für einige Histidine verschiedene Zustände zu beobachten sind, die in der Summe aber fünf Protonen ausmachen.

Für das Signal der H^δ von Tyr762, ergibt sich ein Integral von 1.75 Protonen, statt 2. Des Weiteren konnten eindeutig zwei Zustände für das H^ϵ des Tyr762 (A und B in Abbildung 4.6) zugeordnet werden. Beide Zustände haben gleiche chemische

Verschiebungen für das H^δ . Die Kreuzsignale der zwei Zustände für H^ϵ/H^δ zeigen ein Verhältnis von 31:69 %.

Für das H^δ von Phe738 ergibt sich ein Integral von einem Proton statt zwei. Dies würde bedeuten, dass EF-Hand 1 zu ca. 50 % besetzt ist.

	$H^{\delta 1}$ ppm	$H^{\delta 2}$ ppm	$H^{\epsilon 1}$ ppm	$H^{\epsilon 2}$ ppm	H^Z ppm
Phe738	6.49 ± 0.01	6.49 ± 0.01	7.00 ± 0.01	7.00 ± 0.01	7.21 ± 0.01
Phe759	6.61 ± 0.01	6.61 ± 0.01	7.03 ± 0.01	7.03 ± 0.01	7.16 ± 0.01
Tyr684	7.18 ± 0.01	7.18 ± 0.01	6.77 ± 0.01	6.77 ± 0.01	-
Tyr762 A	7.49 ± 0.01	7.49 ± 0.01	6.72 ± 0.01	6.72 ± 0.01	-
Tyr762 B	7.49 ± 0.01	7.49 ± 0.01	6.64 ± 0.01	6.64 ± 0.01	-
His709	-	6.99 ± 0.01	7.71 ± 0.01	-	-
His750	-	7.30 ± 0.01	8.23 ± 0.01	-	-
His773	-	7.08 ± 0.01	7.92 ± 0.01	-	-
His775	-	6.76 ± 0.01	7.65 ± 0.01	-	-
His793	-	7.06 ± 0.01	7.83 ± 0.01	-	-

Tabelle 4.2 Chemische Verschiebungen der Zuordnung der Ringprotonen der Aromaten in PKD2C680-796 in Anwesenheit von Ca^{2+} : Zugeordnete chemische Verschiebungen der $H^{\delta 1/2}$, $H^{\epsilon 1/2}$ und H^Z von Phe738, Phe759, Tyr984, Tyr762, His709, His750, His773, His775 und His793. Tyr708 wurde nicht zugeordnet.

4.1.3 Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste mittels $1D-^1H$ - und $(^1H-^{15}N)$ -HSQC-Spektren

Säurekonstanten (pK-Werte) von Histidinen in Proteinen lassen Rückschlüsse auf ihre chemische Umgebung und ihre biochemische Funktion zu ([126] und darin verwendete Referenzen). PKD2C680-796 besitzt fünf Histidine (His709, His750, His773, His775 und His793), wobei His750 im Linker zwischen den beiden EF-Händen liegt und His773 in EF-Hand 2 [26]. His775 ist die erste Aminosäure direkt nach EF-Hand 2.

4.1.3.1 Bestimmung der Säurekonstanten mittels $1D-^1H$ -Spektren

Für die Bestimmung der pK-Werte wurde das Protein, wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben, vorbereitet und der Shift der chemischen Verschiebung des $H^{\epsilon 1}$ im Histidin im 1H NMR-Spektrum verfolgt (Abbildung 4.8). Zu beachten ist, dass die Reinigung in Anwesenheit von Ca^{2+} erfolgte, das Protein im letzten Reinigungsschritt jedoch in einen Puffer ohne Ca^{2+} überführt wurde. Bei Betrachtung des, für die Ca^{2+} -Bindung typischen Integrals des H^δ von Phe738 (nicht gezeigt) kann zumindest von teilweise besetzten EF-Händen ausgegangen werden (vgl. Abbildung 4.2). Für

His709 konnte kein Signal für $H^{\epsilon 1}$ zugeordnet werden. In Abbildung 4.9 sind die vier pH-Titrationskurven gezeigt.

Tabelle 4.3 sind die berechneten pK-Werte der vier Histidine zu entnehmen. Die pK-Werte zweier Histidine, His773 und His775 stechen hervor, da sie deutlich unter dem Durchschnitt in Proteinen [127], bei 6.49 ± 0.03 und 6.31 ± 0.12 , liegen.

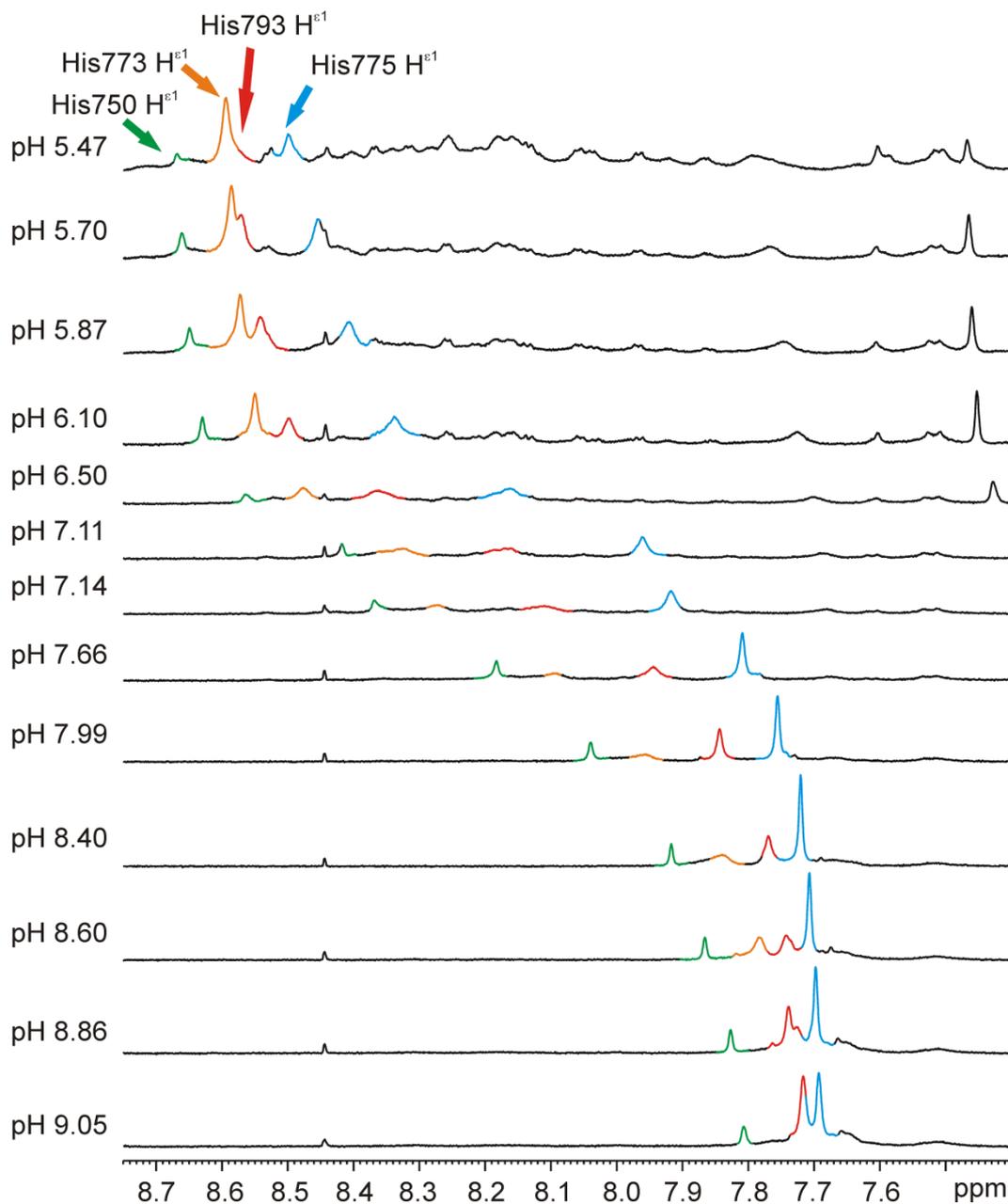


Abbildung 4.8 pH-Titrationskurven von PKD2C680-796 in Anwesenheit von Ca^{2+} : $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE) gefriergetrocknet und in D_2O gelöst, $T = 298 \text{ K}$. Im Puffer befindet sich zwar kein Ca^{2+} , allerdings wurde in Anwesenheit von 10 mM $CaCl_2$ gereinigt und es liegt zumindest eine partielle Beladung der EF-Hände mit Ca^{2+} vor. Die pH-Titrationskurve erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben. Das Resonanzsignal des $H^{\epsilon 1}$ für His750 ist grün, das von His773 orange, das von His793 rot und das von His775 blau.

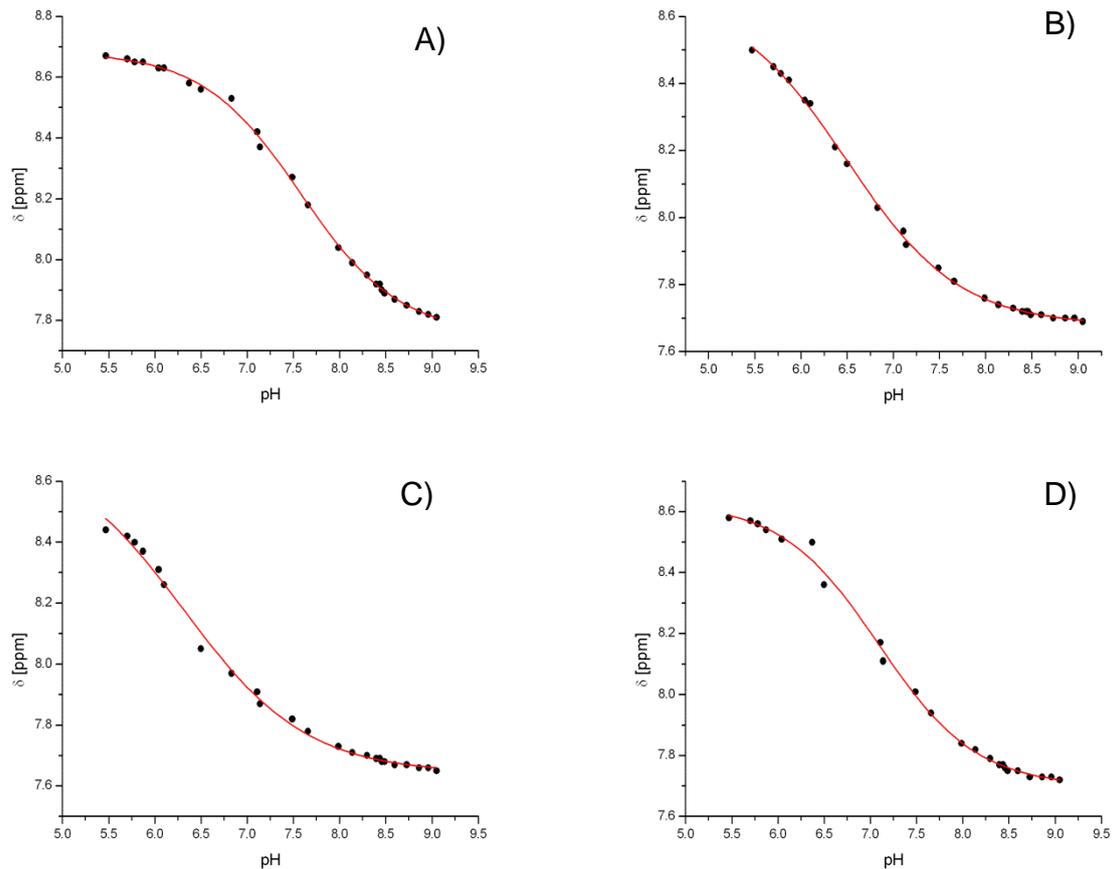


Abbildung 4.9 Titrationskurven der $H^{\epsilon 1}$ der fünf Histidine in PKD2C680-796: Graph der chemischen Verschiebung δ des $H^{\epsilon 1}$ als Funktion des pH-Wertes. Die pH-Titration erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben. $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE) gefriergetrocknet und in D_2O gelöst, $T = 298 \text{ K}$. A) $H^{\epsilon 1}$ von His750, B) $H^{\epsilon 1}$ von His773, C) $H^{\epsilon 1}$ von His775, D) $H^{\epsilon 1}$ von His793. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

4.1.3.2 Bestimmung der Säurekonstanten mittels (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren

Für die Bestimmung der Säurekonstanten aus den (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren wurde eine pH-Titration durchgeführt und der Shift der chemischen Verschiebung des H^{N} im Histidin verfolgt. Die pH-Titration erfolgte in Anwesenheit von Ca^{2+} . Die EF-Hände sind vollständig mit Ca^{2+} besetzt. Die Auswertung erfolgte für die drei Histidine His750, His773 und His775. In Abbildung 4.10 sind die pH-Titrationskurven zu sehen. Die pK-Werte sind Tabelle 4.3 zu entnehmen. Die pK-Werte zweier Histidine, His773 und His775 stechen erneut hervor, da sie deutlich unter dem Durchschnitt in Proteinen [127], bei 5.55 ± 0.33 und 5.81 ± 0.04 , liegen.

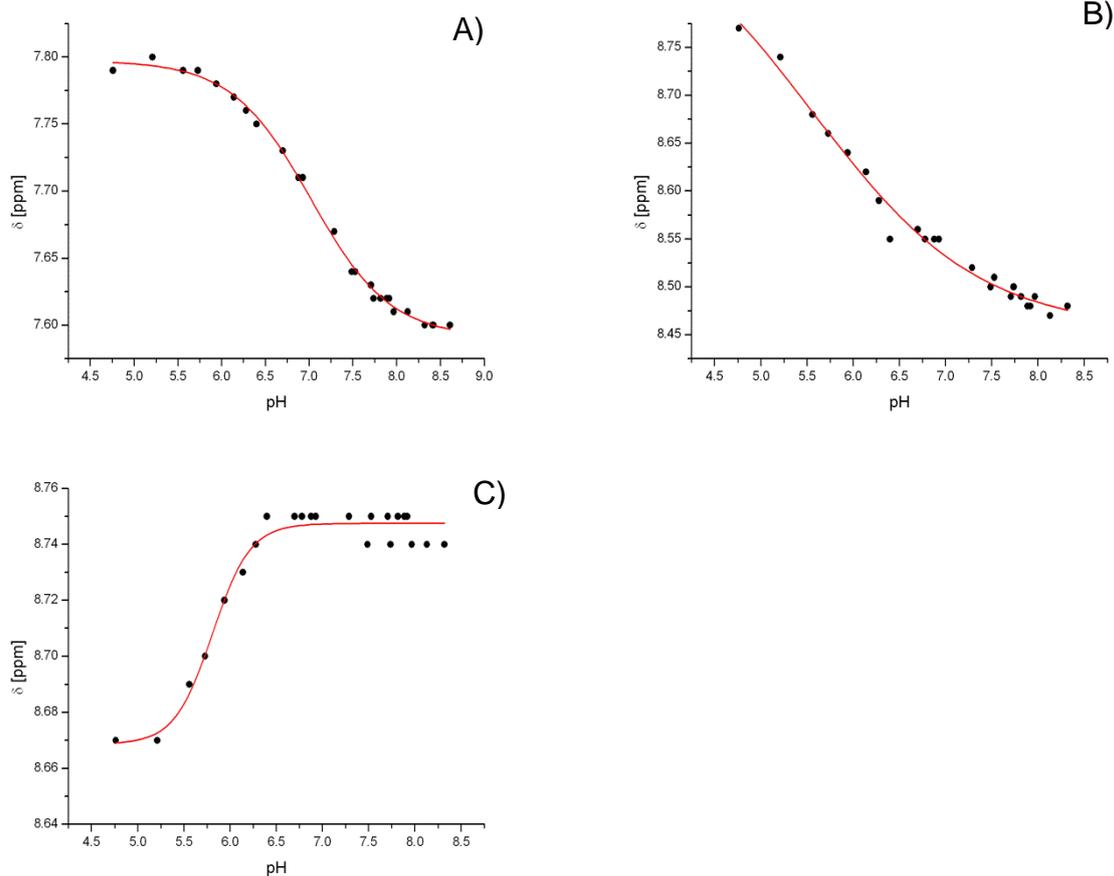


Abbildung 4.10 Titrationskurven der H^N von drei Histidinen in PKD2C680-796 in Anwesenheit von Ca^{2+} : Graph der chemischen Verschiebung δ des H^N als Funktion des pH-Wertes. Die pH-Titration erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben. $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in $20 \text{ mM Tris pH } 7.5$, 150 mM KCl , 1 mM DTE , 0.7 mM CaCl_2 , $T = 298 \text{ K}$. A) H^N von His750, B) H^N von His773, C) H^N von His775. Alle Spektren wurden mit einer Lorentz-zu-Gauss Funktion (Linienbreite -6 Hz für ^1H und -8 Hz für ^{15}N) prozessiert.

	HisA $H^{\epsilon 1}$	His750 $H^{\epsilon 1}$	His773 $H^{\epsilon 1}$	His775 $H^{\epsilon 1}$	His793 $H^{\epsilon 1}$	His750 H^N	His773 H^N	His775 H^N
pK-Wert	7.55 ± 0.03	7.58 ± 0.02	6.49 ± 0.03	6.31 ± 0.12	7.09 ± 0.04	7.02 ± 0.02	5.55 ± 0.33	5.81 ± 0.04
$\Delta\delta$	0.97 ± 0.03	0.93 ± 0.02	0.99 ± 0.02	1.08 ± 0.10	0.93 ± 0.03	0.21 ± 0.005	0.46 ± 0.11	0.08 ± 0.005
δ_{HA}	8.62 ± 0.01	8.68 ± 0.01	8.67 ± 0.01	8.72 ± 0.09	8.63 ± 0.02	7.80 ± 0.002	8.91 ± 0.09	8.67 ± 0.004
δ_{A^-}	7.65 ± 0.02	7.75 ± 0.01	7.68 ± 0.01	7.64 ± 0.01	7.70 ± 0.01	7.59 ± 0.003	8.45 ± 0.02	8.75 ± 0.001

Tabelle 4.3 Berechnete Säurekonstanten der fünf Histidine in PKD2C680-796: Die sigmoidalen Kurven aus Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10 wurden mit Formel 3.3 gefittet. pK-Wert ist die Säurekonstante, $H^{\epsilon 1}$ ist das $H^{\epsilon 1}$ des Histidinrings, $\Delta\delta$ ist die Differenz zwischen der sauren δ_{HA^-} und der basischen δ_{A^-} -Asymptote. Für die Auswertung der $H^{\epsilon 1}$ erfolgte die Zuordnung-soweit möglich-abgeleitet aus Kapitel 4.1.2. Für His709 wurde im HSQC kein H^N zugeordnet. Der Shift des H^N von His793 konnte aufgrund von Überlagerungen in den (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren nicht verfolgt werden.

4.1.4 Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} mittels CD-Spektroskopie

Um Informationen über die Sekundärstruktur und deren Änderung durch Ca^{2+} -Bindung zu erhalten, wurden CD-Spektren aufgenommen und analysiert. Die beobachteten CD-Spektren sind in Abbildung 4.11 gezeigt. Das rote Spektrum wurde ohne Ca^{2+} und das grüne Spektrum in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} aufgenommen.

Die Spektren sind typisch für ein partiell gefaltetes Protein und zeigen kleine Änderungen in der Sekundärstruktur in Anwesenheit von Ca^{2+} .

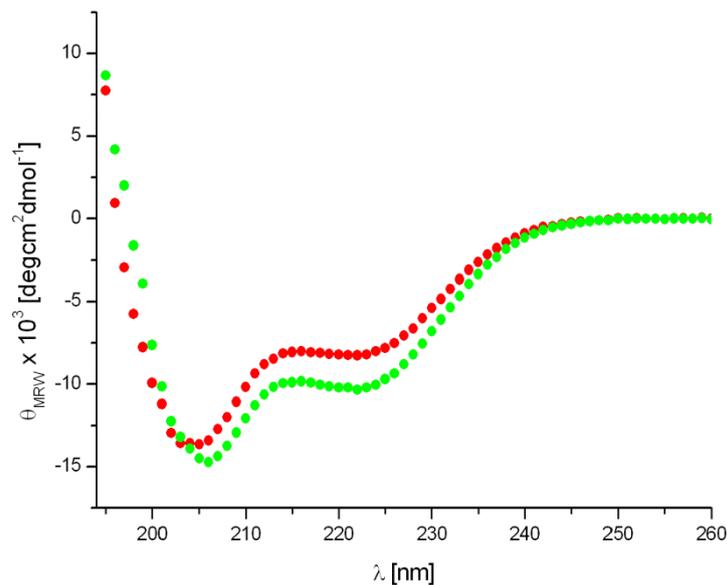


Abbildung 4.11 CD-Spektren von PKD2C680-796 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Die Probe enthält 50 μM Protein in CD-Messpuffer (10 mM Tris pH 7.5) vor (rot) und nach (grün) der Zugabe von 2 mM CaCl_2 . Die Messungen wurden bei R. T. durchgeführt.

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C680-796 eine Zusammensetzung aus 30 % α -Helix, 16 % β -Faltblatt, 14 % Schleifen und 40 % ungeordnet. Nach Bindung von Ca^{2+} ändert sich die Zusammensetzung der Sekundärstruktur in 47 % α -Helix, 12 % β -Faltblatt, 12 % Schleifen und 28 % ungeordnet.

PKD2C	α -Helix	β -Faltblatt	Schleife	ungeordnet
680-796	30%	16%	14%	40%
680-796, CaCl_2	47%	12%	12%	28%

Tabelle 4.4 Sekundärstrukturanalyse von PKD2C680-796 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Die Daten wurden mithilfe des Online Servers DICHROWEB [118] mit dem Referenzset SP175 [122] ausgewertet.

4.2 Hochdruck-NMR-spektroskopische Untersuchungen an PKD2C680-796

Die Anwendung von hohem Druck kann wichtige Informationen über Faltung, Dynamik und Struktur von Proteinen geben. Hierbei ist es von besonderem Interesse, Einblicke in lokale mechanische und dynamische Eigenschaften zu erhalten.

Im Fragment PKD2C680-796 ist die Bindung von Ca^{2+} durch die beiden EF-Hände ausschlaggebend für die Bildung einer teilweise wohldefinierten Struktur [26]. Es liegt nahe zu überprüfen, ob Druck einen Einfluss auf dieses Bindungsgleichgewicht hat, welchen Einfluss die Ausübung von Druck auf das gesamte Spektrum hat und ob es Hinweise für das Vorliegen unterschiedlicher Faltungsintermediate gibt.

Da die Probe in 99.9 % D_2O vorliegt, kann man keine Amidprotonen erkennen. Diese wurden fast vollständig durch Deuterium ersetzt. Gut zu erkennen sind H^{δ^2} , H^{ε^1} der Histidine, H^{δ} , H^{ε} , H^Z der Phenylalanine und H^{δ} , H^{ε} der Tyrosine.

4.2.1 Druckabhängigkeit in Anwesenheit von Ca^{2+}

In Abbildung 4.13 ist die Druckreihe in Anwesenheit von Ca^{2+} abgebildet. Auf den ersten Blick fällt auf, dass die Linien der Signale im Spektrum bei 2000 bar deutlich schmaler und wohl-definierter sind, als bei 40 bar. Einige sehr breite Signale verschwinden mit steigendem Druck vollständig ($\delta = 6.4\text{-}6.7$, $7.3\text{-}7.65$, 7.83 ppm). Außerdem shiften einige Signale und neue Signale werden sichtbar. Im Bereich zwischen $\delta = 6.6\text{-}7.2$ ppm treten Shifts einiger Signale auf und es erscheinen neue Signale.

Bekannt ist [26], dass das H^{δ} des Phe738 bei Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hand 1 ein Signal bei 6.45 ppm zeigt. Dieses Signal zeigt also an, ob Ca^{2+} an EF-Hand 1 gebunden ist.

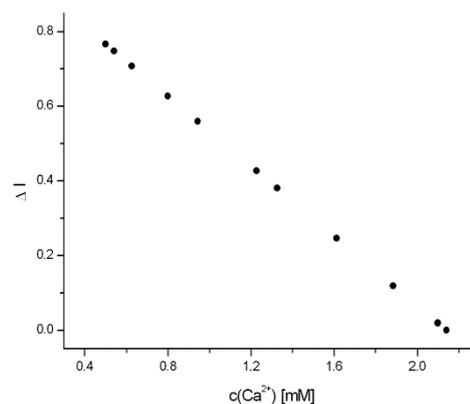


Abbildung 4.12 Druckabhängigkeit des Integrals des H^{δ} von Phe738: Graph der Differenz des Integrals zum Integral bei maximal besetzter EF-Hand 1 gegen die Konzentration des gebundenen Ca^{2+} .

Bei Betrachtung des Signals für H^{δ} von Phe738 ($\delta = 6.45$ ppm) sieht man, dass das Integral des Signals mit steigendem Druck deutlich abnimmt und das Signal bei 1800 bar fast vollständig verschwunden ist (Abbildung 4.13). Das Integral nimmt linear mit dem Druck ab (Abbildung 4.12). Derselbe Effekt ist für das Signal des H^{δ} von Phe759 ($\delta = 6.61$ ppm) und des H^{ε} von Tyr762 ($\delta = 6.64$ ppm) zu beobachten.

Das Proteinfragment PKD2C680-796 besitzt fünf Histidine (His709, His750, His773, His775 und His793), wobei His750 im Linker zwischen den beiden EF-Händen liegt und His773 in EF-Hand 2 [26]. His775 ist die erste Aminosäure direkt nach EF-Hand 2. Bei Übertragung der Zuordnung aus Kapitel 4.1.2 auf das 40 bar-Spektrum fällt auf, dass im Bereich der $H^{\epsilon 1}$ der Histidine ($\delta = 7.57-7.95$ ppm) sieben bis acht Signale mit unterschiedlichen Linienbreiten zu sehen sind. Bei Betrachtung der Integrale, nach Referenzierung auf das Duplett des H^{δ} von Tyr684, liegen unter diesen vier schmalen und vier stark verbreiterten Signalen genau fünf Protonen ($\delta = 7.57-7.95$ ppm). Das bedeutet, durch die partielle Beladung mit Ca^{2+} , liegt ein gewisser Prozentsatz Ca^{2+} -gebunden vor, der andere Teil nicht. Bei 2000 bar sieht man nur noch die vier schmalen Linien. Die Resonanzlinie des $H^{\epsilon 1}$ für His750 ($\delta = 7.88$ ppm) shiftet bei Druck, verändert sich ansonsten jedoch nicht. Das $H^{\epsilon 1}$ von His773 zeigt zwei Resonanzlinien ($\delta = 7.67$ und 7.77 ppm). Bei 2000 bar hingegen nur noch eine bei $\delta = 7.64$ ppm. Die Resonanzlinie des $H^{\epsilon 1}$ von His793 shiftet bei 2000 bar von $\delta = 7.73$ nach 7.72 ppm. Das Signal des $H^{\epsilon 1}$ von His775 verschwindet vollständig bei 2000 bar, shiftet aber in Richtung des Signals des $H^{\epsilon 1}$ von His709 ($\delta = 7.69$ ppm). Bei 2000 bar hat sich dieses Signal um 0.01 ppm verschoben ($\delta = 7.68$ ppm).

Bei Betrachtung des gesamten Spektrums fällt auf, dass die druckinduzierten Veränderungen einen vollständig reversiblen Prozess darstellen. Das Spektrum bei 40 bar nach der Druckreihe, hat sich im Vergleich zu vorher nicht verändert.

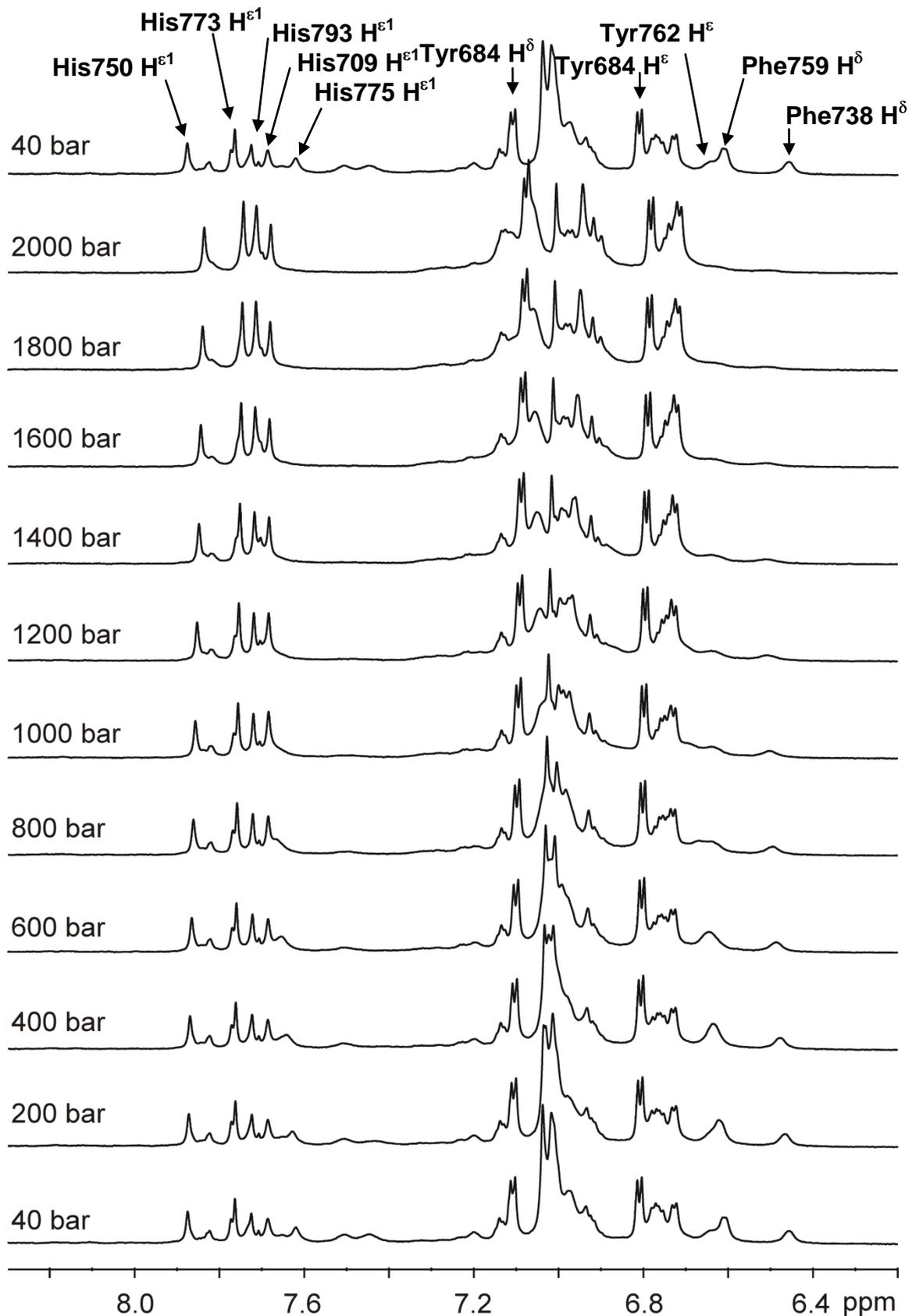


Abbildung 4.13 Druckabhängigkeit von PKD2C680-796 in Anwesenheit von Ca²⁺: V = 600 μL, c = 2.14 mM in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE) gefriergetrocknet und in D₂O gelöst, in Anwesenheit von 4.28 mM CaCl₂, T = 298 K. Der Druck wurde, von unten nach oben nacheinander angelegt. Das untere 40 bar-Spektrum wurde vor der Druckreihe, das obere 40 bar-Spektrum nach der Druckreihe gemessen. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

4.2.2 Druckabhängigkeit in Abwesenheit von Ca^{2+}

Durch Zugabe des sechszähligen Komplexbildners EDTA wird pro EDTA ein Ca^{2+} in einem Chelatkomplex gebunden. Die Affinität von EDTA an Ca^{2+} ist hierbei deutlich höher als die der EF-Hände.

In Abbildung 4.14 ist die Druckreihe in Abwesenheit von Ca^{2+} abgebildet. Auf den ersten Blick fällt auf, dass das Spektrum schon zu Beginn der Druckreihe bei 40 bar deutlich weniger Signale aufweist als das Spektrum in Anwesenheit von Ca^{2+} . Vor allem im Bereich zwischen $\delta = 6.3\text{-}7.2$ ppm fehlen viele Signale der H^δ , H^ϵ und H^Z der Phenylalanine und Tyrosine. Des Weiteren verschwinden die meisten breiten Linien der $\text{H}^{\epsilon 1}$ der Histidine zwischen $\delta = 7.57\text{-}7.95$ ppm in Abbildung 4.13 bei EDTA-Zugabe.

Mit steigendem Druck treten im Bereich zwischen $\delta = 6.6\text{-}7.2$ ppm Shifts einiger Signale auf und es erscheinen neue Signale.

Der Bereich, in dem die $\text{H}^{\epsilon 1}$ der Histidine liegen, hat sich tieffeldverschoben und liegt nach Zugabe von EDTA zwischen $\delta = 7.7\text{-}8.6$ ppm. Im Spektrum mit EDTA sind hier bei 40 bar vier Signale mit schmalen und zwei Signale mit breiten Linien zu sehen, bei 1800 bar sind fünf schmale Signale zu erkennen. Ab 1000 bar verschmälern sich die Linien der vorhandenen Signale der $\text{H}^{\epsilon 1}$ der Histidine deutlich, bei 1800 bar sind fünf schmale Signale zu erkennen. Bei Übertragung der Zuordnung aus Kapitel 4.1.2 fällt auf; dass die Resonanzlinie des $\text{H}^{\epsilon 1}$ für His750 ($\delta = 8.44$ ppm) bei Druck shiftet, sich ansonsten jedoch nicht verändert. Das $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His773 zeigt eine Resonanzlinie ($\delta = 8.09$ ppm) bei 40 bar und zeigt einen Shift bei 1800 bar zu $\delta = 8.07$ ppm. Die Resonanzlinie des $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His793 liegt bei 40 bar bei $\delta = 7.89$ ppm stark verbreitert vor und wird deutlich schmaler bei 1800 bar bei gleicher chemischer Verschiebung. Das Signal des $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His775 ($\delta = 7.76$ ppm) zeigt einen kleinen Shift bei 1800 bar im Vergleich zu 40 bar. Das Signal des $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His709 ($\delta = 7.69$ ppm), hat sich bei 1800 bar um 0.01 ppm verschoben ($\delta = 7.68$ ppm).

Das H^δ des Phe738 ($\delta = 6.45$ ppm) ist in Anwesenheit von EDTA noch leicht erkennbar. Auch hier nimmt das noch vorhandene Integral mit steigendem Druck ab. Die Signale des H^δ von Phe759 ($\delta = 6.61$ ppm) und des H^ϵ von Tyr762 ($\delta = 6.64$ ppm) sind nicht mehr zu beobachten.

Bei Betrachtung des gesamten Spektrums fällt auf, dass die druckinduzierten Veränderungen (wie auch schon in Anwesenheit von Ca^{2+}) einen vollständig reversiblen Prozess darstellen. Das Spektrum bei 40 bar nach der Druckreihe zeigt im Vergleich zu vorher keine Veränderungen.

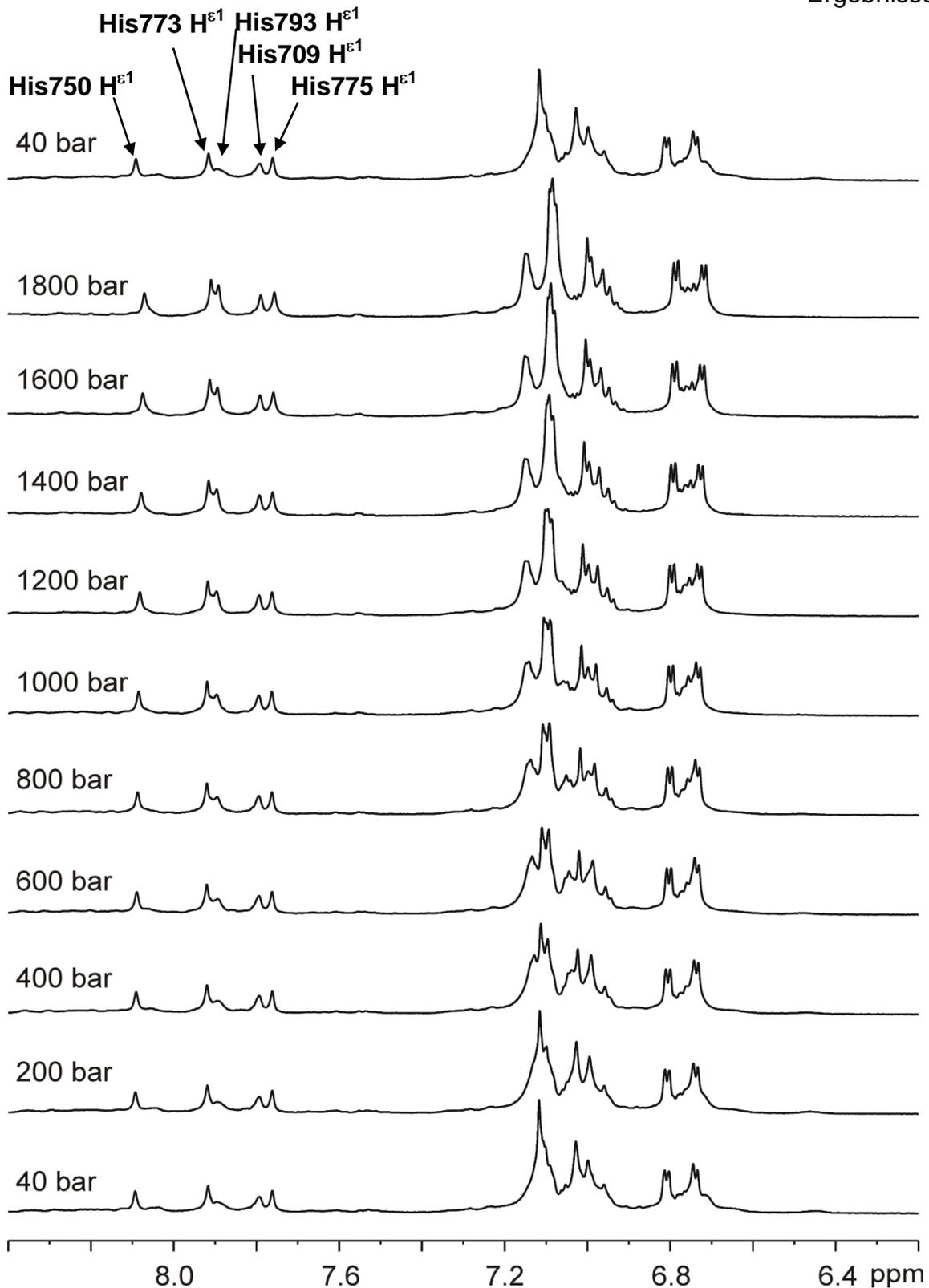


Abbildung 4.14 Druckabhängigkeit von PKD2C680-796 in Abwesenheit von Ca^{2+} : $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 2.14 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE) gefriergetrocknet und in D_2O gelöst, in Anwesenheit von 4.28 mM CaCl_2 und 5 mM EDTA, $T = 298 \text{ K}$. Der Druck wurde, wie beschrieben, von unten nach oben nacheinander angelegt. Das untere 40 bar-Spektrum wurde vor der Druckreihe, das obere 40 bar-Spektrum nach der Druckreihe gemessen. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

4.2.3 Bestimmung des Aggregationszustandes in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} bei 40 und 2000 bar

Um Informationen darüber zu erhalten, wie und ob sich der Aggregationszustand von PKD2C680-796 unter Druck anders verhält, wurden $1\text{D}^{-1}\text{H-NMR}$ -Diffusionsmessungen bei 40 und 2000 bar in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. Da sich kein DSS in der Probe befand, konnten nur die Diffusionskoeffizienten berechnet werden. Betrachtet wurde der Signalabfall der Proteinsignale zwischen 0 und 3 ppm. Im Speziellen ein sehr gut aufgelöstes Duplett eines Alanins bei $\delta = 1.1$ ppm. Die Diffusionskoeffizienten für Ca^{2+} -gebundenes PKD2C680-796 unterscheiden sich bei 40 und 2000 bar im Rahmen des Fehlers nicht und zeigen den gleichen Aggregationszustand (Tabelle 4.5). Bei 40 bar beträgt die Diffusionskonstante $2.19 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, bei 2000 bar $1.98 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Die Diffusionskoeffizienten in Anwesenheit von EDTA unterscheiden sich bei 40 und 2000 bar deutlich (Tabelle 4.5). Die Diffusionskonstante nimmt von $2.47 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ auf $4.52 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ zu, das bedeutet die Beweglichkeit des Proteins in Lösung bei 2000 bar nimmt fast um das Doppelte zu.

PKD2C	D^a
40 bar	$10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
680-796, EDTA	2.47 ± 0.65
680-796, CaCl_2	2.19 ± 0.49
2000 bar	
680-796, EDTA	4.52 ± 1.46
680-796, CaCl_2	1.98 ± 0.44

Tabelle 4.5 Diffusionskonstanten von PKD2C680-796 bei 40 und 2000 bar in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : a) Die Berechnung der Diffusionskonstante erfolgte über die Auswertung des Signalabfalls einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe als Funktion der Gradientenstärke. Die Diffusionskonstante von HDO bei 298 K beträgt $D_{\text{HDO}}(\text{in } \text{D}_2\text{O}) = 1.902 \pm 0.190 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ [100].

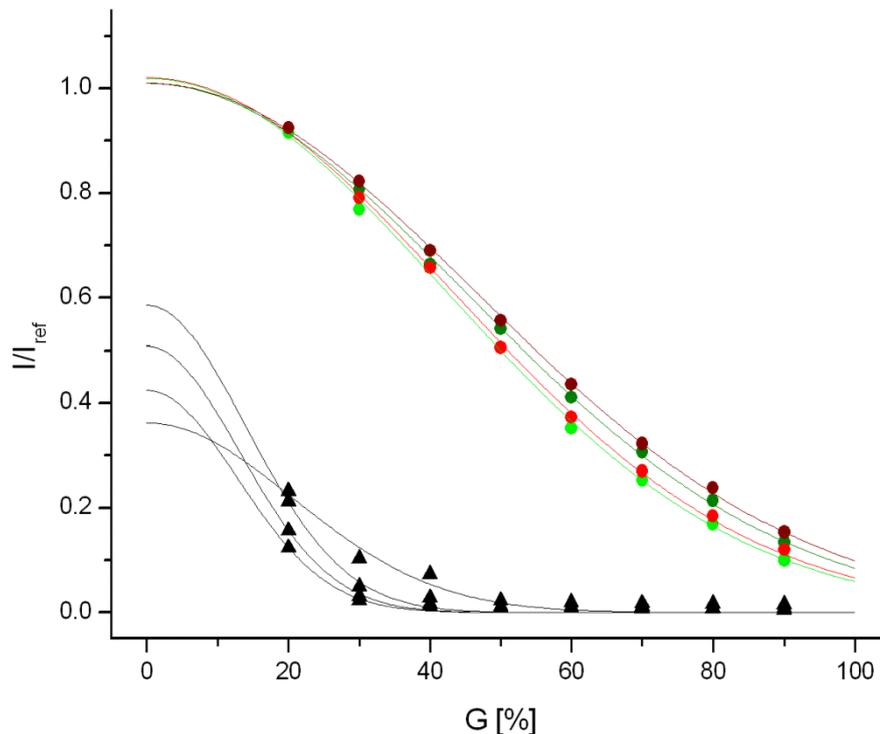


Abbildung 4.15 Aggregationszustand von PKD2C680-796 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Graph von I/I_{ref} als Funktion der relativen Gradientenstärke G . I repräsentiert die Signalintensität bei Gradientenstärke G und I_{ref} die Signalintensität der niedrigsten Gradientenstärke. Die Stabilität des Gradientensystems wurde mit PAA überprüft. Das Signal von HDO in einer 99.9% D_2O und 0.1% H_2O Probe wurde verwendet um die Diffusionskonstante D [99] zu berechnen, siehe Kapitel 3.4.2. $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 2.14 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE) gefriergetrocknet und in D_2O gelöst, $T = 298 \text{ K}$. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). \blacktriangle HDO, \bullet PKD2C680-796 in Anwesenheit von 5 mM EDTA bei 40 bar, \bullet PKD2C680-796 in Anwesenheit von 5 mM EDTA bei 2000 bar, \bullet PKD2C680-796 in Anwesenheit von 4.28 mM CaCl_2 bei 40 bar, \bullet PKD2C680-796 in Anwesenheit von 4.28 mM CaCl_2 bei 2000 bar.

4.3 Spektroskopische und biochemische Charakterisierung der EF-Hand-Mutanten PKD2C680-796(T771A, E774A) und PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A)

Das Fragment PKD2C680-796 besitzt zwei Calcium-bindende EF-Hände (Aminosäuren 727-739 und 763-774) [5, 26] und eine Coiled-Coil-Domäne [27] (Aminosäuren 781-796). Interessant war es nun herauszufinden, welchen strukturellen Einfluss Mutationen, die eine Bindung von Ca^{2+} verhindern, haben. Es wurden zwei Mutanten des Fragments PKD2C680-796 untersucht. PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) zeigt Mutationen in der EF-Hand 1, das Fragment PKD2C680-796(T771A, E774A) zeigt Mutationen in der EF-Hand 2.

4.3.1 Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ^1H - und 2D-(^1H - ^{15}N)-NMR-Spektroskopie

Um erste Informationen über die Faltung der Mutanten zu erhalten, wurden ^1H -Spektren aufgenommen (Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17). Die Spektren beider Mutanten zeigen schmale Linien. Z. B. ist bei $\delta = 7.9$ ppm in Abbildung 4.16 das H^ϵ -Signal eines Histidins und bei $\delta = 7.18$ ppm in Abbildung 4.17 das H^δ eines Histidins gut erkennbar. Im Bereich um 0 ppm sind keine hochfeldverschobenen Signale (Methylprotonen im hydrophoben Kern des Proteins) zu sehen. Allgemein fällt auf, dass die Linienbreiten im Amidbereich von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) (Abbildung 4.16) deutlich schmaler sind als die von PKD2C680-796(T771A, E774A) (Abbildung 4.17).

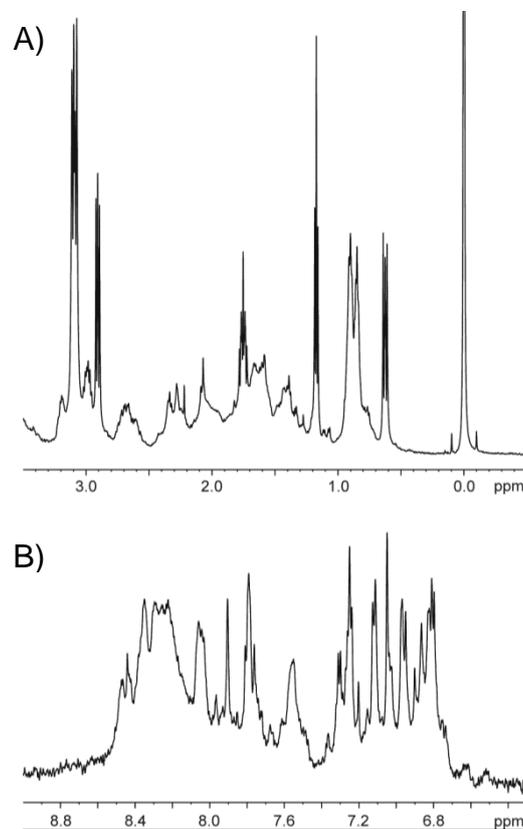


Abbildung 4.16 Ausschnitte aus dem 1D- ^1H -Spektrum von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) in Abwesenheit von Ca^{2+} : $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 50 \mu\text{M}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Das Spektrum wurde exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). A) Aliphatischer Bereich mit DSS (abgeschnitten) bei 0 ppm. B) Amidbereich.

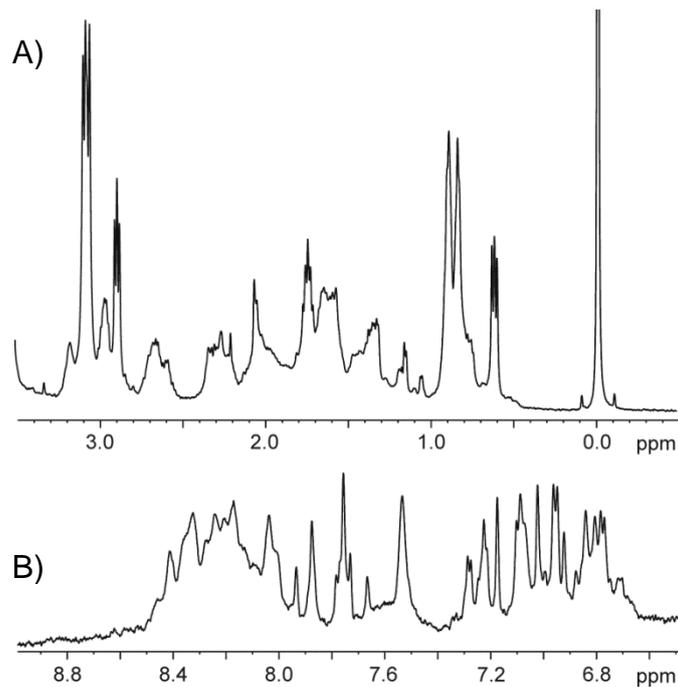


Abbildung 4.17 Ausschnitte aus dem $1\text{D-}^1\text{H}$ -Spektrum von PKD2C680-796(T771A, E774A) in Abwesenheit von Ca^{2+} : $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 50 \mu\text{M}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Das Spektrum wurde exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). A) Aliphatischer Bereich mit DSS (abgeschnitten) bei 0 ppm. B) Amidbereich.

4.3.1.1 Interaktion mit Ca^{2+}

Um zu überprüfen, welche Auswirkungen die Mutationen auf die Ca^{2+} -Bindung haben und ob bei Mutation der einen EF-Hand noch eine Ca^{2+} -Bindung in der anderen EF-Hand möglich ist, wurden Ca^{2+} -Titrations durchgeföhrt.

In Abbildung 4.18 ist die Ca^{2+} -Titration für PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A), dem Fragment, bei dem die EF-Hand 1 mutiert ist, abgebildet. Im Vergleich zu PKD2C680-796(wt) sind die Signale für das H^δ des Phe738 ($\delta = 6.45 \text{ ppm}$), Phe759 ($\delta = 6.61 \text{ ppm}$) und des H^ϵ von Tyr762 ($\delta = 6.64 \text{ ppm}$) in Anwesenheit von Ca^{2+} nicht mehr erkennbar.

Jedoch sind in den ^1H -Spektren Änderungen bei Ca^{2+} -Zugabe zu beobachten. Ein Beispiel hierfür ist das H^δ des Tyr762 ($\delta = 7.56 \text{ ppm}$). Um diese Veränderungen zu charakterisieren, wurde das Signal des H^ϵ von Phe759 bei $\delta = 6.97 \text{ ppm}$ genauer betrachtet. Das Integral des Signals nimmt mit steigender Ca^{2+} -Konzentration ab. Die Abnahme des Signals ergibt in der Auswertung (Abbildung 4.20) einen K_D -Wert von $86.39 \mu\text{M}$ (Tabelle 4.6).

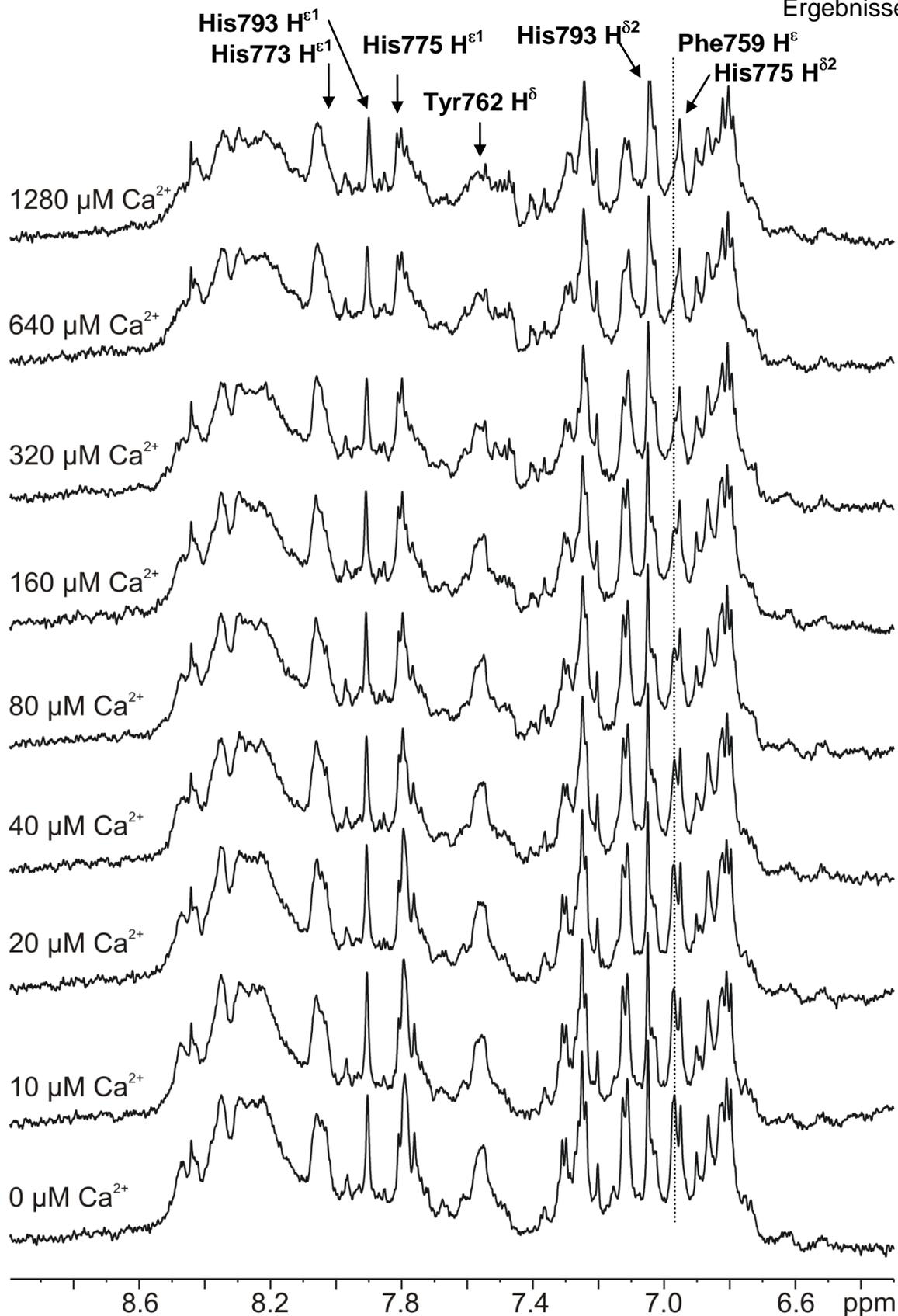


Abbildung 4.18 Calcium Titration von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A): $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 50 \mu\text{M}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Calciumchlorid wurde entsprechend der Beschriftung zugegeben. Die gestrichelte Linie markiert das Abnehmen des Signals des H^{ϵ} von Phe759 bei Ca^{2+} -Zugabe und wird in Abbildung 4.20 ausgewertet. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

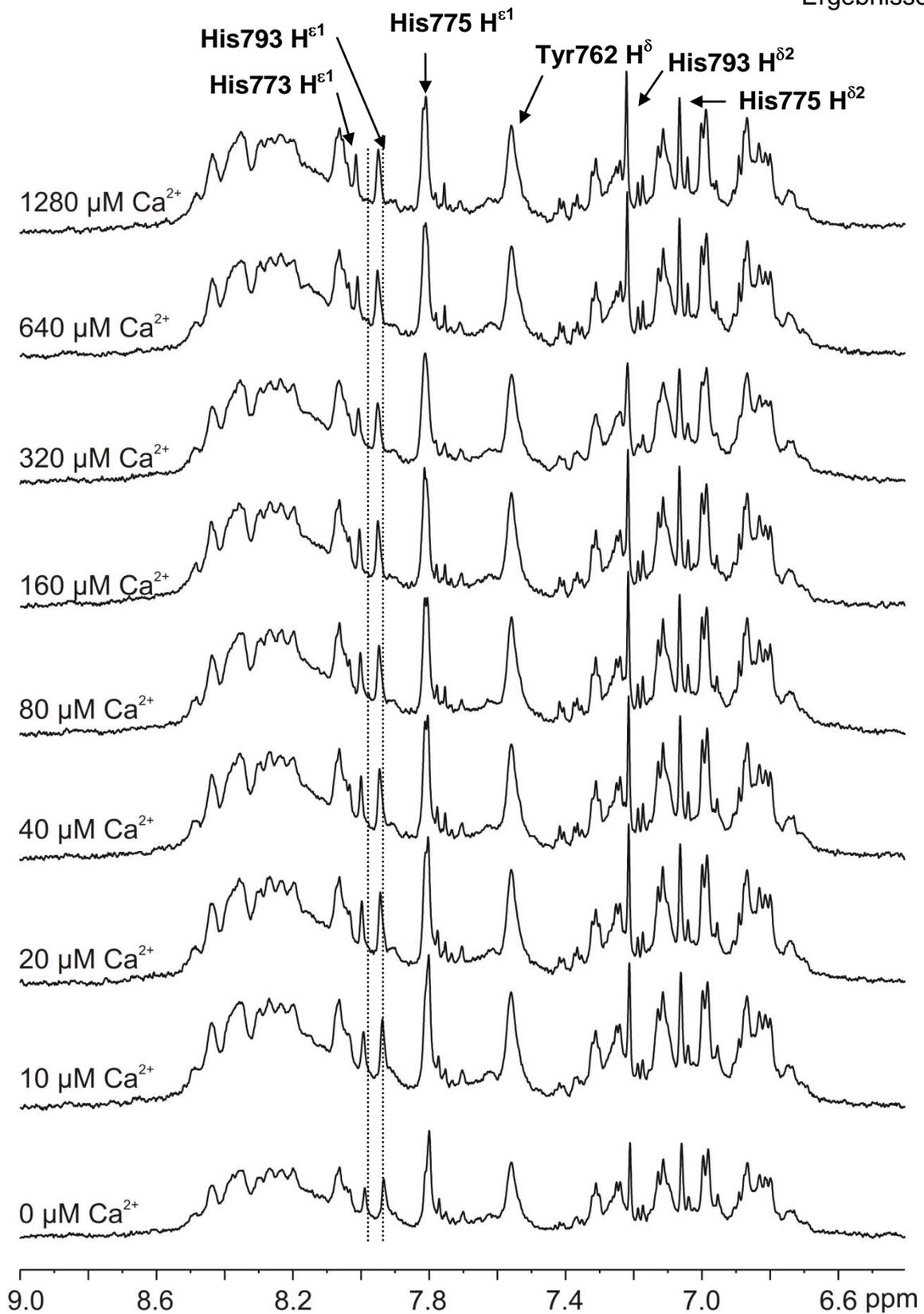


Abbildung 4.19 Calcium Titration von PKD2C680-796(T771A, E774A): $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 100 \mu\text{M}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Calciumchlorid wurde entsprechend der Beschriftung zugegeben. Die gestrichelten Linien markieren die Shifts der Signale der $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His773 und His793 bei Ca^{2+} -Zugabe und werden in Abbildung 4.21 ausgewertet. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

Für alle zugeordneten Histidine werden Verschiebungen der Signale bei Ca^{2+} -Zugabe festgestellt. Das His793 zeigt für sein Signal des $\text{H}^{\epsilon 1}$ einen kleinen Shift um 2.20 Hz bei Ca^{2+} -Zugabe. Die Signale des $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His775 ($\delta = 7.79$ ppm) und des $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His773 ($\delta = 8.03$ ppm) zeigen eine Abnahme der Signalintensität bei steigender Ca^{2+} -Konzentration. Das $\text{H}^{\delta 2}$ von His775 zeigt einen leichten Shift um 1.70 Hz bei Ca^{2+} -Zugabe. Zu beachten ist hier auch, dass das Signal der CH_3 -Gruppen des Tris-Puffers einen Shift von 1.10 Hz bei Ca^{2+} -Zugabe zeigt. Unter Zuhilfenahme der pH-Titration von Tris-Puffer von Andreas Huberth (2011, Diplomarbeit, Universität Regensburg) bei 299 K, spricht das für eine Veränderung des pH-Wertes von pH 7.72 ohne Ca^{2+} und pH 7.69 nach vollständiger Zugabe von 1280 μM CaCl_2 . Unter Verwendung der pH-Titrationskurven aus Kapitel 4.1.3.1 für die Histidine spricht die Verschiebung der Signale für einen kleinen pH-Shift der Histidine.

Für die mutierte EF-Hand 2 ist die Ca^{2+} -Titration in Abbildung 4.19 abgebildet. In den ^1H -Spektren sind Änderungen bei Ca^{2+} -Zugabe zu erkennen. Die Änderungen fallen allerdings im Vergleich zur mutierten EF-Hand 1 deutlich kleiner aus. Im Vergleich zu PKD2C680-796(wt) ist das Signal für das H^{δ} des Phe738 ($\delta = 6.45$ ppm) nicht mehr vorhanden. Die Signale für das H^{δ} des Phe759 ($\delta = 6.67$ ppm) und das H^{ϵ} von Tyr762 ($\delta = 6.74$ ppm) sind in Abwesenheit von Ca^{2+} zu sehen und zeigen keine Veränderung ihrer Integrale bei Ca^{2+} -Zugabe. Das Signal für H^{δ} von Tyr762 zeigt keine Änderungen mehr bei Ca^{2+} -Zugabe.

Für alle zugeordneten Histidine werden Verschiebungen der Signale bei Ca^{2+} -Zugabe festgestellt. Für His775 liegt dieser Shift bei 5.90 Hz für beide Ringprotonen, für das $\text{H}^{\delta 2}$ von His793 liegt der Shift bei 5.80 Hz. Um die Veränderungen zu charakterisieren, wurden die Shifts der Signale der $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His773, der Shift liegt hier bei 15.60 Hz und His793, mit einem Shift von 9.60 Hz, in Abbildung 4.21 näher betrachtet. Die Auswertung ergibt einen K_D -Wert von 53.98 ± 12.67 μM für His773 und 20.88 ± 4.49 μM . Allerdings ist hier zu beachten, dass das Signal der CH_3 -Gruppen des Tris-Puffers einen Shift von 2.90 Hz bei Ca^{2+} -Zugabe zeigt und einen K_D -Wert von 51.39 ± 10.70 μM (Abbildung 4.22). Es ist gut erkennbar, dass die Kurven für His773 und His793 (Abbildung 4.21) den gleichen Verlauf wie der pH-Shift der CH_3 -Gruppen des Tris-Puffers (Abbildung 4.22) zeigt. Hinzu kommen im Rahmen des Fehlers gleiche K_D -Werte. Unter Zuhilfenahme der pH-Titration von Tris-Puffer von Andreas Huberth (2011, Diplomarbeit, Universität Regensburg) bei 299 K spricht der Shift des Tris-Signals für eine Veränderung des pH-Wertes von pH 7.65 ohne Ca^{2+} nach pH 7.57 bei maximaler Zugabe von 1280 μM CaCl_2 . Unter Verwendung der pH-Titrationskurven aus Kapitel 4.1.3.1 für die Histidine entspricht die Verschiebung der Signale einem pH-Shift der Histidine und kann daher nicht zur Bestimmung einer Ca^{2+} -Bindung an EF-Hand 1 herangezogen werden.

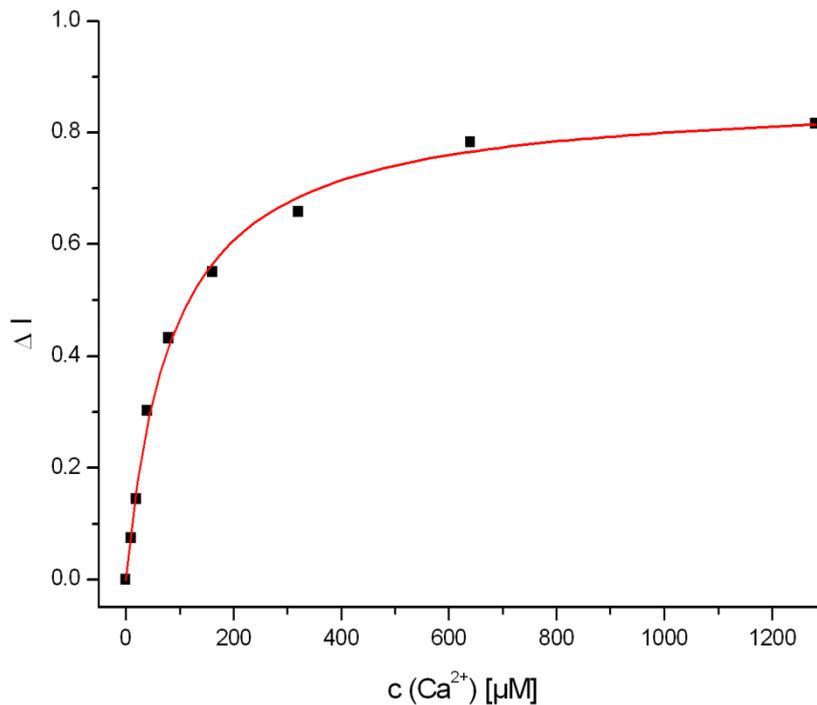


Abbildung 4.20 Bindungskurven des Integrals von H^δ von Phe759 in PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A): Graph der Differenz der Integrale als Funktion der Konzentration von Ca²⁺. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben.

	K _D -Werte [μM]		Methode
	EF-Hand1	EF-Hand2	
Schumann <i>et al</i>	179 ± 29	55 ± 12	NMR
Schumann <i>et al</i>	68 ± 2		Fluoreszenz
Hodsdon <i>et al</i>	-	~ 214	ITC
PKD2CmutEF1	-	86.39 ± 6.39	NMR
PKD2CmutEF2	-	-	NMR

Tabelle 4.6 Berechneter K_D-Werte für die Titration von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) und PKD2C680-796(T771A, E774A) mit Ca²⁺: Die Werte wurden aus dem Fit mit Formel 3.2 der Spektren in Abbildung 4.20 und Abbildung 4.21 erhalten. Zum Vergleich sind in der Tabelle die Dissoziationskonstanten der bereits vorher bestimmten K_D-Werte [26, 90] und die Bestimmungsmethoden eingetragen.

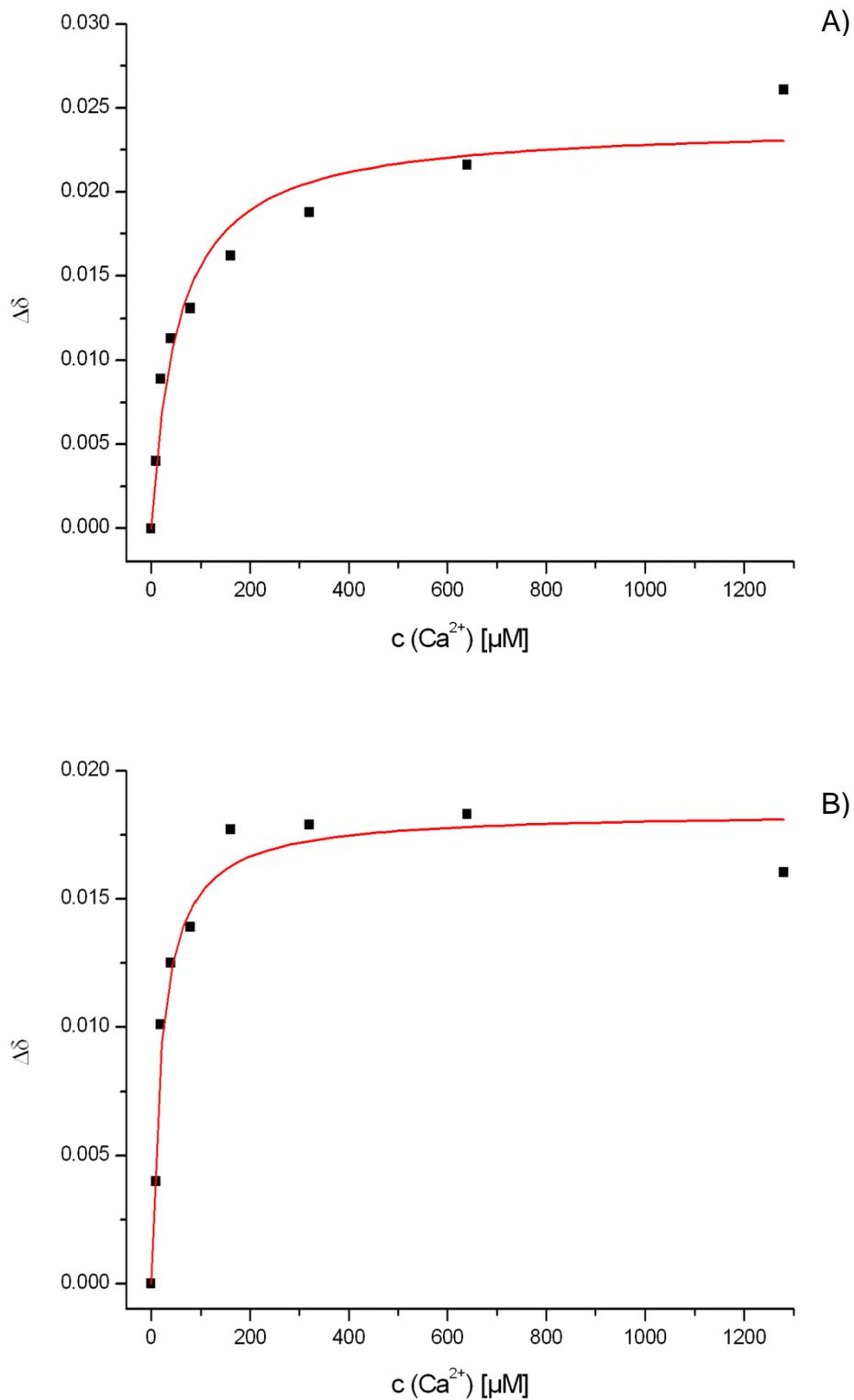


Abbildung 4.21 Bindungskurven der Shifts der Signale des $\text{H}^{\text{e}1}$ von His773 und His793 in PKD2C680-796(T771A, E774A): Graph der Differenz der Shifts als Funktion der Konzentration von Ca^{2+} . A) Differenz des Shifts des $\text{H}^{\text{e}1}$ von His773 Abbildung 4.19 B) Differenz des Shifts des $\text{H}^{\text{e}1}$ von His793 aus Abbildung 4.19. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben.

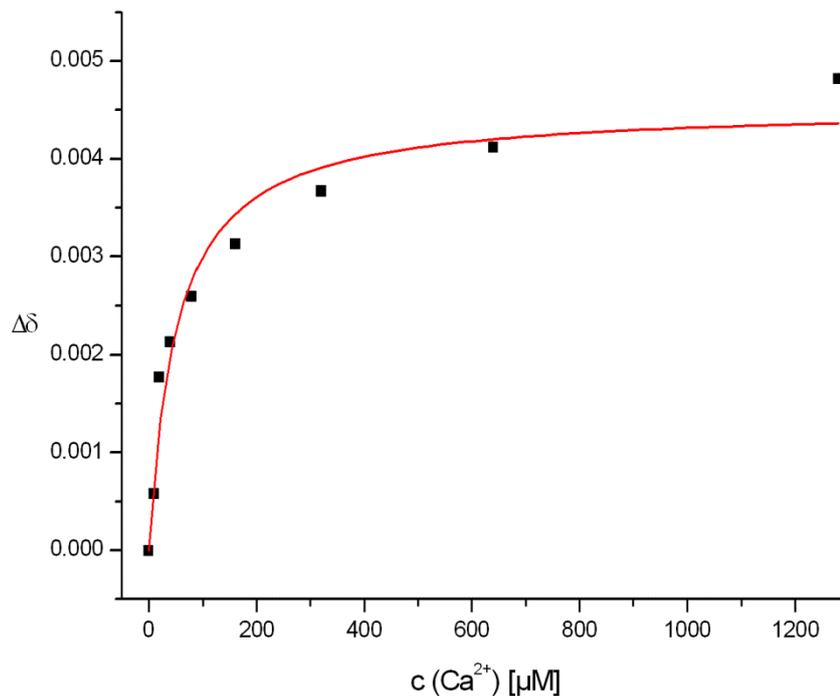


Abbildung 4.22 Bindungskurve des Shifts des CH₃-Signals von Tris innerhalb der Ca²⁺-Titration von PKD2C680-796(T771A, E774A): Graph der Differenz des Shifts des CH₃-Signals von Tris als Funktion der Konzentration von Ca²⁺. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben.

4.3.1.2 Bestimmung des Aggregationszustandes in Lösung mittels 1D-¹H-NMR-Diffusionsmessungen

Um zu klären ob der Aggregationszustand des Proteins in Lösung einen Einfluss auf die Linienbreiten hat, wurden 1D-¹H-NMR-Diffusionsmessungen in An- und Abwesenheit von Ca²⁺ durchgeführt. Der Signalabfall des Proteins zwischen 0 und 3 ppm wurde gegen den angelegten Gradienten aufgetragen. Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) in Lösung eine molekulare Masse von 74,306 g/mol (Abbildung 4.23rot). Dies spricht bei einer molekularen Masse von 13.4 kDa für das Vorliegen eines Oligomers in Lösung. In Anwesenheit von Ca²⁺ erhöht sich die scheinbare molekulare Masse auf 109,848 g/mol (Abbildung 4.23, grün). Der relative hydrodynamische Radius erhöht sich in Anwesenheit von Ca²⁺ um 12.2 %. Die Zugabe von Calcium führt also zu einer Änderung des Aggregationszustandes von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) in Lösung.

Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C680-796(T771A, E774A) in Lösung eine molekulare Masse von 67,345 g/mol (Abbildung 4.24, rot). Dies spricht bei einer molekularen Masse von 13.4 kDa für das Vorliegen eines Oligomers in Lösung. In Anwesenheit von Ca²⁺ reduziert sich die scheinbare molekulare Masse auf 54,257 g/mol (Abbildung 4.24, grün). Auch der relative hydrodynamische Radius reduziert sich in Anwesenheit von Ca²⁺ um 13.8 %. Die Zugabe von Calcium führt

also zu einer Änderung des Aggregationszustandes von PKD2C680-796(T771A, E774A) in Lösung.

Die molekularen Massen und hydrodynamischen Radien sind für PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) Tabelle 4.7 und für PKD2C680-796(T771A, E774A) Tabelle 4.8 zu entnehmen.

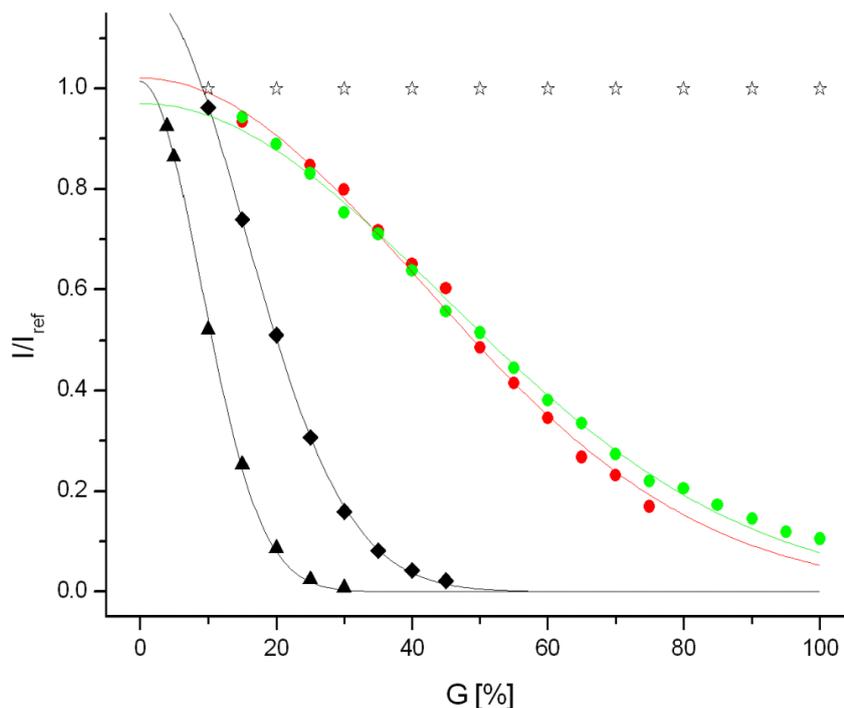


Abbildung 4.23 Aggregationszustand von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Graph von I/I_{ref} als Funktion der relativen Gradientenstärke G . I repräsentiert die Signalintensität bei Gradientenstärke G und I_{ref} die Signalintensität der niedrigsten Gradientenstärke. Als Referenz wurde das DSS in der Probe verwendet. Die Stabilität des Gradientensystems wurde mit PAA überprüft. Das Signal von HDO in einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe wurde verwendet um die Diffusionskonstante D [99] zu berechnen, siehe Kapitel 3.4.2. $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 20 \mu\text{M}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). *, PAA; \blacktriangle HDO, \blacklozenge DSS, \bullet PKD2C680-796mutEF1 in Abwesenheit bivalenter Ionen, \bullet PKD2C680-796mutEF1 in Anwesenheit von 2 mM CaCl_2 .

PKD2C	D^a	$R_h/R_{h,\text{DSS}}^b$	M_{exp}^c	M^d
	$10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$		$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
680-796mutEF1	1.10 ± 0.06	7.23 ± 0.67	$74,306 \pm 9,485$	13,369
680-796mutEF1, CaCl_2	0.92 ± 0.06	8.24 ± 0.96	$109,848 \pm 21,647$	

Tabelle 4.7 Molekulare Massen und hydrodynamische Radien von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : a) Die Berechnung der Diffusionskonstante erfolgte über die Auswertung des Signalabfalls einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe als Funktion der Gradientenstärke. Die Diffusionskonstante von HDO bei 298 K beträgt $D_{\text{HDO}}(\text{in } \text{D}_2\text{O}) = 1.902 \pm 0.190 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ [100]. b) Verhältnis der hydrodynamischen Radien von PKD2C und DSS. c) Experimentell festgestellte molekulare Masse von PKD2C in Lösung. DSS ($M = 196.34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) wurde als Referenz verwendet. d) Molekulare Masse berechnet aus der Aminosäuresequenz.

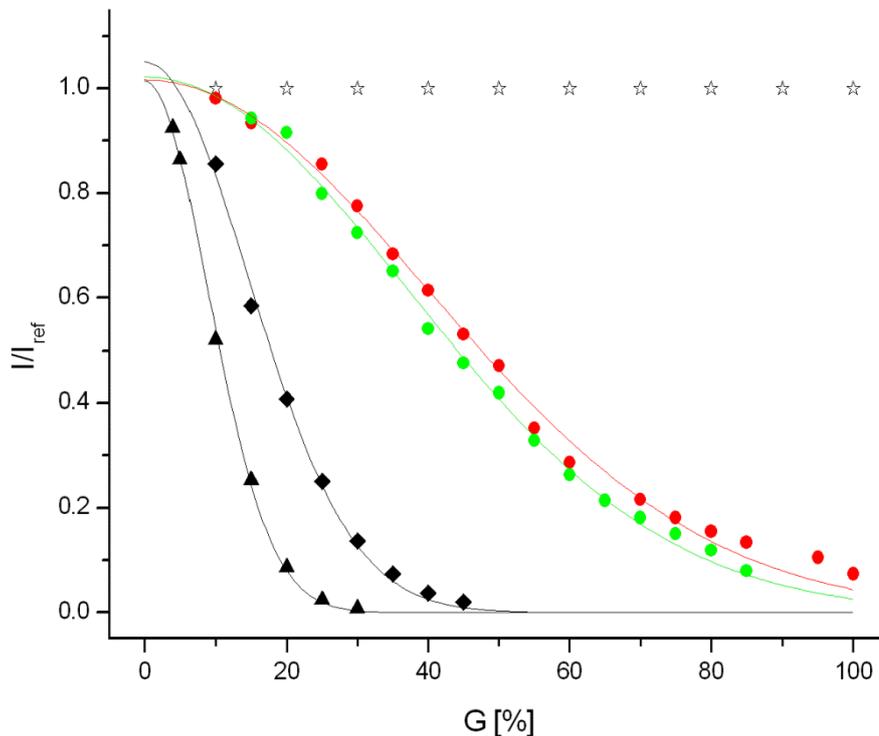


Abbildung 4.24 Aggregationszustand von PKD2C680-796(T771A, E774A) in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Graph von I/I_{ref} als Funktion der relativen Gradientenstärke G . I repräsentiert die Signalintensität bei Gradientenstärke G und I_{ref} die Signalintensität der niedrigsten Gradientenstärke. Als Referenz wurde das DSS in der Probe verwendet. Die Stabilität des Gradientensystems wurde mit PAA überprüft. Das Signal von HDO in einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe wurde verwendet um die Diffusionskonstante D [99] zu berechnen, siehe Kapitel 3.4.2. $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 80 \mu\text{M}$ in MBP-Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl), $T = 298 \text{ K}$. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). *, PAA; \blacktriangle HDO, \blacklozenge DSS, \bullet PKD2C680-796mutEF2 in Abwesenheit bivalenter Ionen, \bullet PKD2C680-796mutEF2 in Anwesenheit von 2 mM CaCl_2 .

PKD2C	D^a	$R_h/R_{h,\text{DSS}}^b$	M_{exp}^c	M^d
	$10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$		$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
680-796mutEF2	1.14 ± 0.06	7.55 ± 0.93	$67,345 \pm 14,765$	13,427
680-796mutEF2, CaCl_2	1.36 ± 0.06	6.51 ± 0.85	$54,257 \pm 12,990$	

Tabelle 4.8 Molekulare Massen und hydrodynamische Radien von PKD2C680-796(T771A, E774A) in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : a) Die Berechnung der Diffusionskonstante erfolgte über die Auswertung des Signalabfalls einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe als Funktion der Gradientenstärke. Die Diffusionskonstante von HDO bei 298 K beträgt $D_{\text{HDO}}(\text{in } \text{D}_2\text{O}) = 1.902 \pm 0.190 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ [100]. b) Verhältnis der hydrodynamischen Radien von PKD2C und DSS. c) Experimentell festgestellte molekulare Masse von PKD2C in Lösung. DSS ($M = 196.34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) wurde als Referenz verwendet. d) Molekulare Masse berechnet aus der Aminosäuresequenz.

4.3.1.3 NMR-spektroskopische Charakterisierung mittels 2D-(^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren

Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) (Abbildung 4.25) zeigt in Abwesenheit von Calcium eine schlechte Auflösung und

deutlich weniger als die zu erwartenden 117 Signale für die Amidprotonen des Proteinerückgrats. Nach Zugabe von Calcium verbessert sich die spektrale Auflösung nicht. Allerdings nimmt die Intensität einiger Signale bei gleichbleibendem Volumen der Probe und gleichen Aufnahmebedingungen ab (Abbildung 4.25, A und B). Auch bei niedrigerem pH-Wert und höheren Temperaturen (Abbildung 4.25, C und D) zeigen die Spektren nur wenig Signale, die scharf und gut aufgelöst sind. Vor allem im Bereich zwischen 8.0-8.5 ppm und 118-125 ppm sind viele Signale schlecht aufgelöst und viele Signale im Bereich der chemischen Verschiebung von Random Coil-Positionen zu finden. Im Vergleich zum (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum (Abbildung 4.5) von PKD2C680-796(wt) sind keine Signale aus den gut aufgelösten Bereichen der beiden EF-Hände und des Linkers dazwischen mehr zu sehen.

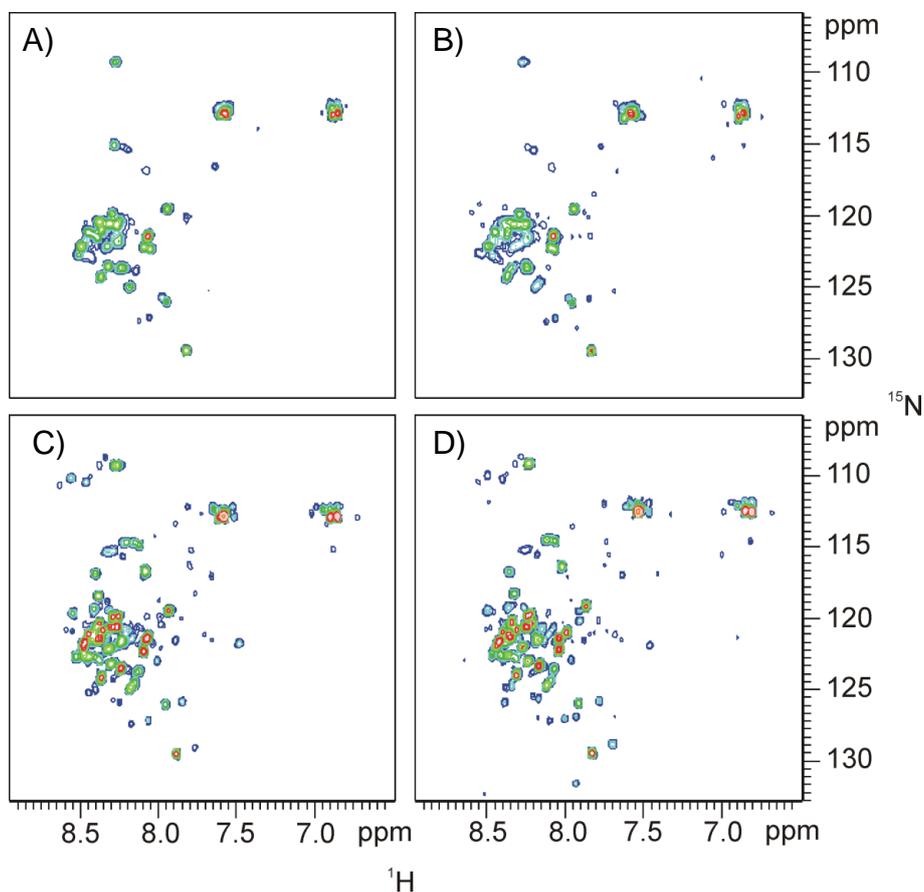


Abbildung 4.25 (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A): A) $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), pH 7.7, $T = 298 \text{ K}$. B) gleiche Probe und Bedingungen wie A aber Zugabe von 2 mM CaCl_2 . C) gleiche Probe und Bedingungen wie B aber pH 6.2. D) gleiche Probe wie C aber $T = 308 \text{ K}$. Alle Spektren wurden mit einer Lorentz-zu-Gauss Funktion (GB = 0.12 für ^1H und 0.1 für ^{15}N) prozessiert.

Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796(T771A, E774A) (Abbildung 4.26) zeigt in Abwesenheit von Calcium eine schlechte Auflösung und deutlich weniger als die zu erwartenden 117 Signale für die Amidprotonen des Proteinerückgrats. Nach Zugabe von Calcium verbessert sich die spektrale Auflösung nicht. Weder

Veränderung in den Integralen noch in der Position der Shifts sind zu beobachten (Abbildung 4.26 A und B). Bei niedrigerem pH-Wert und höheren Temperaturen (Abbildung 4.26, C und D) zeigen die Spektren keine Verbesserung in der Auflösung der Signale. Vor allem mehr Random Coil-Signale erscheinen. Im Bereich zwischen 8.0-8.5 ppm und 118-125 ppm sind viele Signale schlecht aufgelöst. Im Vergleich zum (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum (Abbildung 4.5) von PKD2C680-796(wt) sind aus den gut aufgelösten Bereichen der beiden EF-Hände und des Linkers dazwischen noch das Gly732, Asp752, Thr751 und L729 eindeutig zuzuordnen.

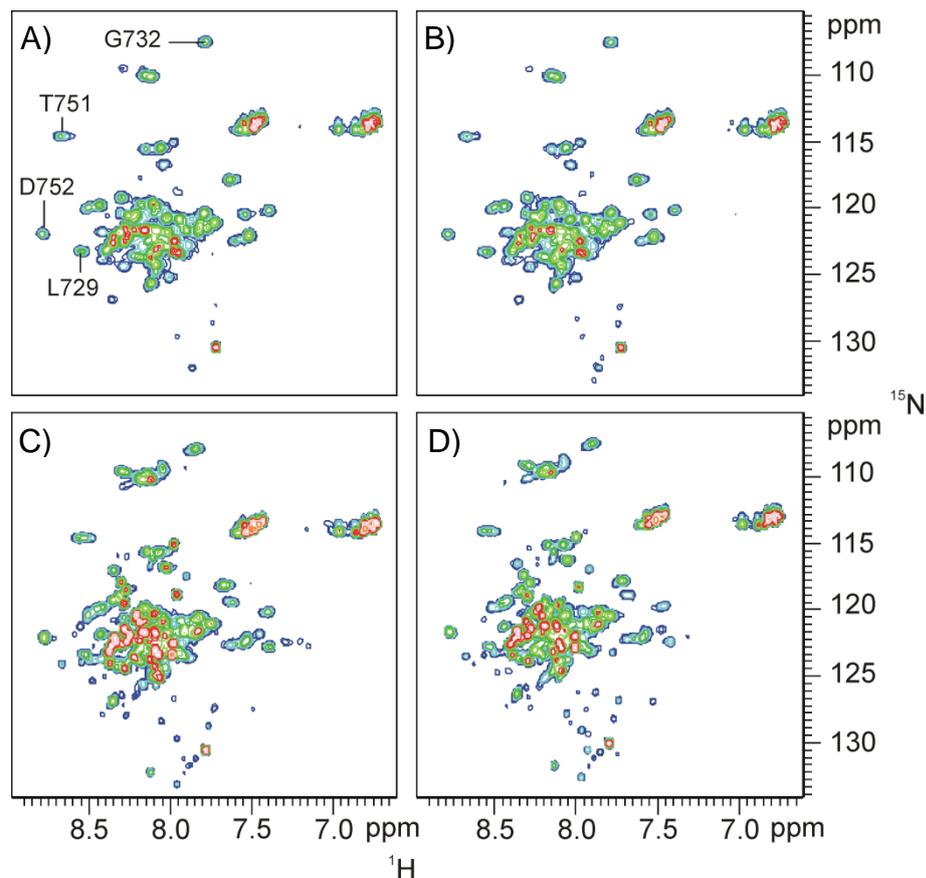


Abbildung 4.26 (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren von PKD2C680-796(T771A, E774A): A) $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), pH 7.7, $T = 298 \text{ K}$. B) gleiche Probe und Bedingungen wie A aber Zugabe von 2 mM CaCl_2 . C) gleiche Probe und Bedingungen wie B aber pH 6.2. D) gleiche Probe wie C aber $T = 303 \text{ K}$. Alle Spektren wurden mit einer Lorentz-zu Gauss-Funktion ($\text{GB} = 0.12$ für ^1H und 0.1 für ^{15}N) prozessiert.

4.3.2 Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} mittels CD-Spektroskopie

Um Informationen über die Sekundärstruktur und deren Änderung durch Ca^{2+} -Zugabe zu erhalten, wurden CD-Spektren aufgenommen und analysiert. Die beobachteten CD-Spektren sind in Abbildung 4.27 für PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) gezeigt. Das rote Spektrum wurde ohne Ca^{2+} und das grüne

Spektrum in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} aufgenommen. Die Spektren zeigen einen hohen ungeordneten Anteil und nur kleine Änderungen in der Sekundärstruktur in Anwesenheit von Ca^{2+} .

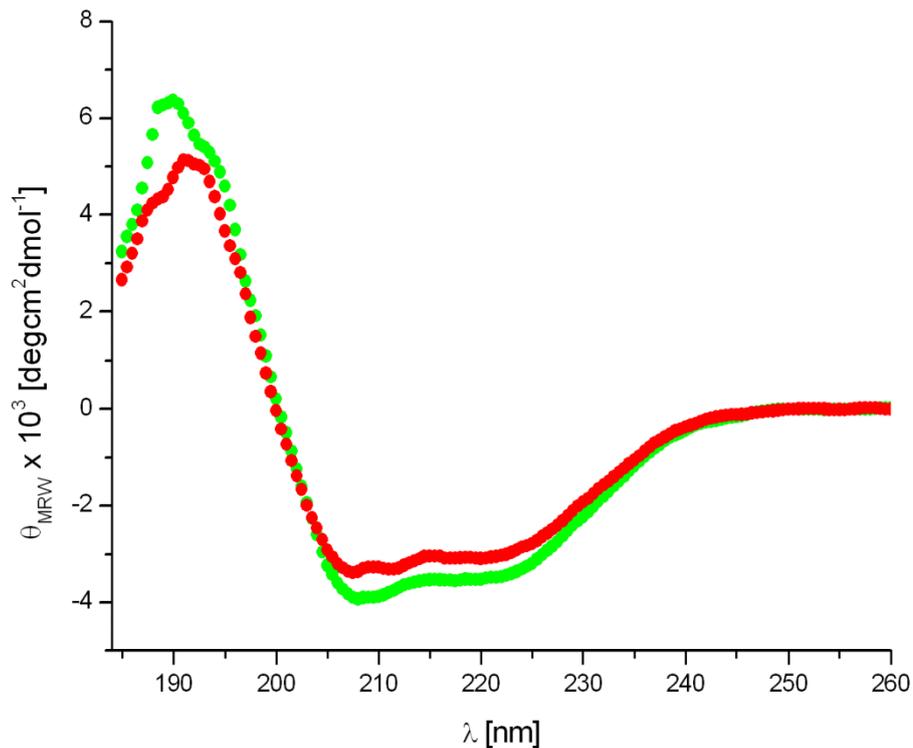


Abbildung 4.27 CD Spektren von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Die Probe enthielt 204 μM Protein in CD-Messpuffer (10 mM Tris pH 7.5) vor (rot) und nach (grün) der Zugabe von 2 mM CaCl_2 . Die Messungen wurden bei R. T. durchgeführt.

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) eine Zusammensetzung aus 6 % α -Helix, 36 % β -Faltblatt, 25 % Schleifen und 34 % ungeordnet. Nach Bindung von Ca^{2+} ändert sich die Zusammensetzung der Sekundärstruktur in 8 % α -Helix, 33 % β -Faltblatt, 21 % Schleifen und 36 % ungeordnet.

PKD2C	α -Helix	β -Faltblatt	Schleife	ungeordnet
680-796mutEF1	6%	36%	25%	34%
680-796mutEF1, CaCl_2	8%	33%	21%	36%

Tabelle 4.9 Sekundärstrukturanalyse von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Die Daten wurden mithilfe des Online Servers DICHROWEB [118] mit dem Referenzset Set6 [122] ausgewertet.

Die CD-Spektren für PKD2C680-796(T771A, E774A) sind in Abbildung 4.28 gezeigt. Das rote Spektrum wurde ohne Ca^{2+} und das grüne Spektrum in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} aufgenommen. Die Spektren zeigen einen hohen ungeordneten Anteil und nur kleine Änderungen in der Sekundärstruktur nach Zugabe von Ca^{2+} .

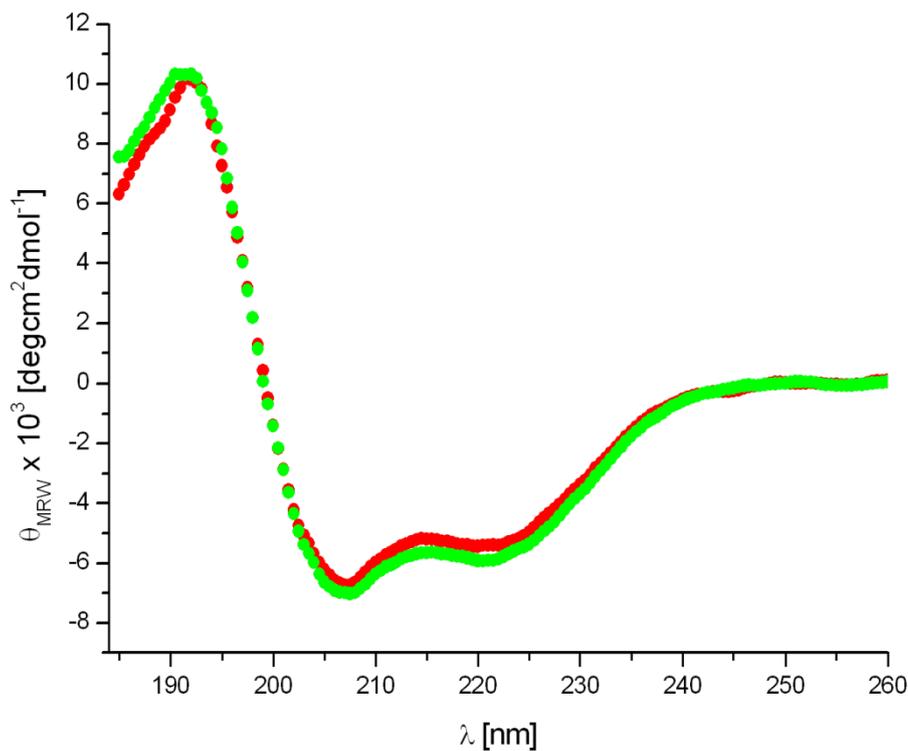


Abbildung 4.28 CD Spektren von PKD2C680-796(T771A, E774A) in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Die Probe enthielt 104 μM Protein in CD-Messpuffer (10 mM Tris pH 7.5) vor (rot) und nach (grün) der Zugabe von 2 mM CaCl_2 . Die Messungen wurden bei R. T. durchgeführt.

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C680-796(T771A, E774A) eine Zusammensetzung aus 18 % α -Helix, 26 % β -Faltblatt, 22 % Schleifen und 33 % ungeordnet. Nach Bindung von Ca^{2+} ändert sich die Zusammensetzung der Sekundärstruktur in 18 % α -Helix, 26 % β -Faltblatt, 24 % Schleifen und 31 % ungeordnet.

PKD2C	α -Helix	β -Faltblatt	Schleife	ungeordnet
680-796mutEF2	18%	26%	22%	33%
680-796mutEF2, CaCl_2	18%	26%	24%	31%

Tabelle 4.10 Sekundärstrukturanalyse von PKD2C680-796(T771A, E774A) in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Die Daten wurden mithilfe des Online Servers DICHROWEB [118] mit dem Referenzset Set3 [122] ausgewertet.

4.4 Interaktion des Fragments PKD2C680-796 mit dem Protein mammalian diaphanous homolog 1 (mDia1)

Der cytoplasmatische C-Terminus von PKD2C interagiert mit dem N-Terminus von mDia1 [64]. Die Bindung wurde mittels dem Hefe-Zwei-Hybrid-System und Co-Immunopräzipitationsexperimenten nachgewiesen. In vitro wurde die Interaktion von zwei Fragmenten, PKD2C679-968 und 743-871, untersucht. mDia1 hat nur das Fragment PKD2C679-968 gebunden.

Interessant ist es unter dem Aspekt der Ca^{2+} -Regulierung in der Zelle zu überprüfen, ob mDia1 auch den Bereich der beiden EF-Hände (AS727-774) [26] bindet. Hierfür wurde ^{15}N -markiertes PKD2C680-796 in Anwesenheit von Ca^{2+} mit mDia1(69-457) titriert. In Abbildung 4.29 sind die Spektren vor und nach 6-facher Zugabe von mDia1(69-457) zu sehen. Ein großer Teil der Signale zeigt eine deutliche Abnahme der Intensität. Einige Signale verschwinden vollständig. Dieser Effekt ist noch besser in Abbildung 4.30, einer Overlay-Darstellung der beiden Spektren, zu sehen. mDia1(69-457) bindet also Ca^{2+} -gebundenes PKD2C680-796.

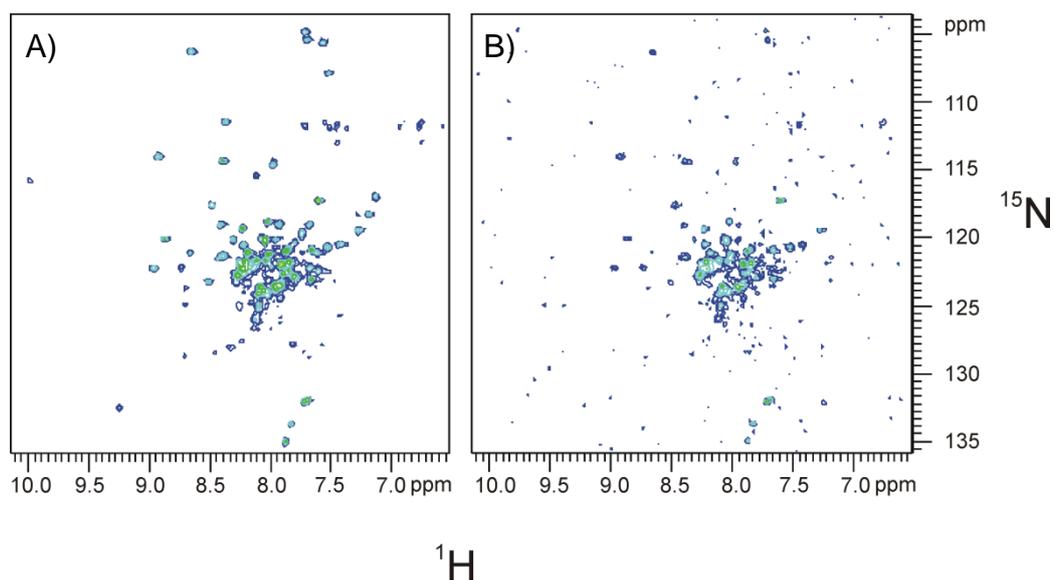


Abbildung 4.29 Interaktion von PKD2C680-796/ Ca^{2+} mit mDia1(69-457): A) PKD2C680-796, $V = 200 \mu\text{L}$, $c = 54 \mu\text{M}$ in 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE, 0.5 mM CaCl_2 , $T = 298 \text{ K}$. B) PKD2C680-796/6-fach mDia1(69-457) $V = 473 \mu\text{L}$ $c(\text{PKD2C680-796}) = 22.8 \mu\text{M}$, $c(\text{mDia1(69-457)}) = 132.7 \mu\text{M}$ in 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE, Pufferbedingungen in der gesamten Probe: 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE, 0.21 mM CaCl_2 , $T = 298 \text{ K}$. Die aufgenommenen FIDs wurden vor der Fouriertransformation mit einer quadratischen Cosinusfunktion multipliziert (*TopSpin*-Parameter QSINE und SSB = 2).

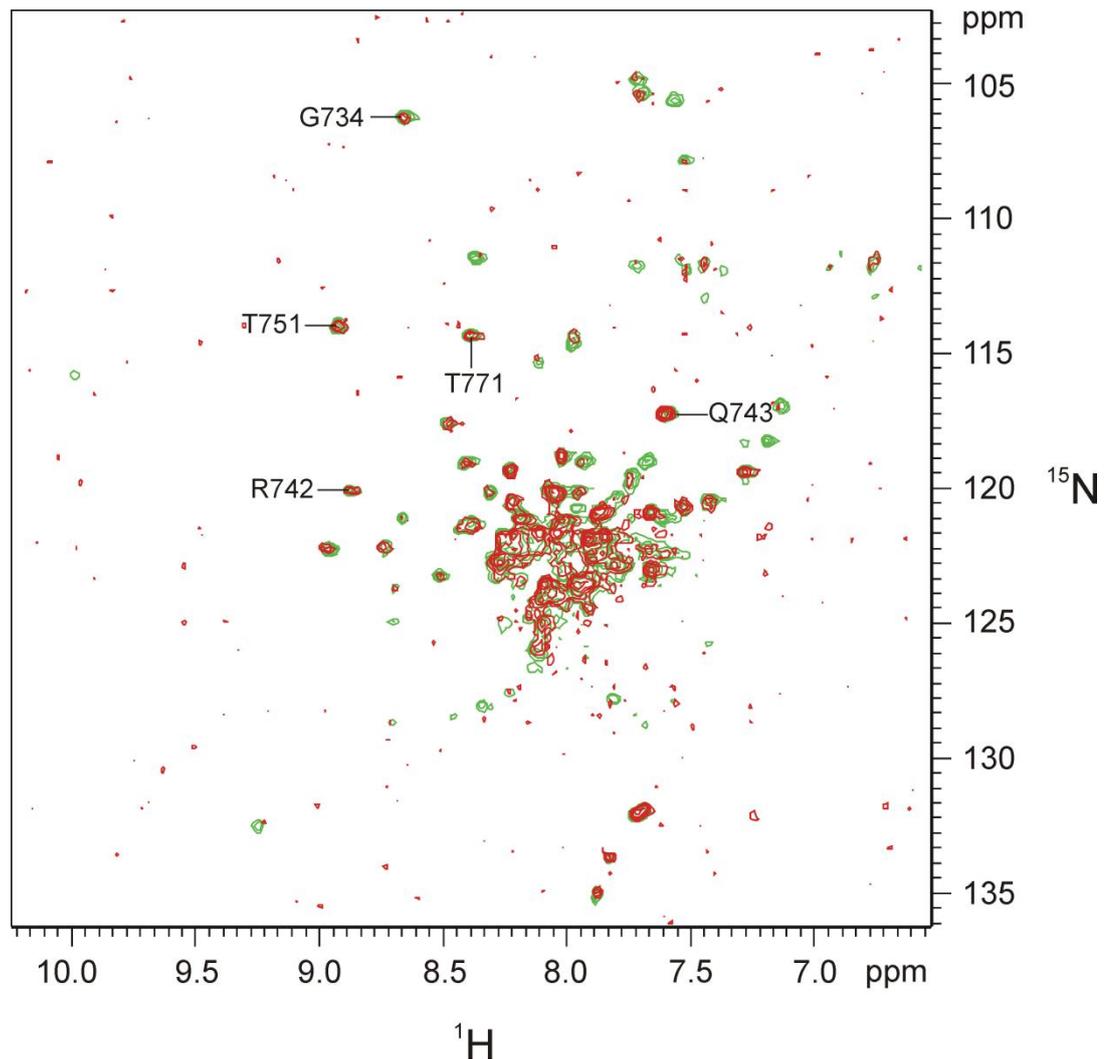


Abbildung 4.30 Overlay der (^1H - ^{15}N)-TROSY-HSQC Spektren der Interaktion von PKD2C680-796/ Ca^{2+} mit mDia1(69-457): grün) PKD2C680-796, $V = 200 \mu\text{L}$, $c = 54 \mu\text{M}$ in 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE, 0.5 mM CaCl_2 , $T = 298 \text{ K}$. rot) PKD2C680-796/6-fach mDia1(69-457) $V = 473 \mu\text{L}$ $c(\text{PKD2C680-796}) = 22.8 \mu\text{M}$, $c(\text{mDia1(69-457)}) = 132.7 \mu\text{M}$ in 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE, Pufferbedingungen in der gesamten Probe: 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE, 0.21 mM CaCl_2 , $T = 298 \text{ K}$. schwarz) Q743, das als Standard für die Referenzierung verwendet wurde. Die aufgenommenen FIDs wurden vor der Fouriertransformation mit einer quadratischen Cosinusfunktion multipliziert (*TopSpin*-Parameter QSINE und SSB = 2).

4.4.1 Interne Referenzierung über die Aminosäure Gln743

Um die Stärke der Bindung zu bestimmen, musste eine interne Referenzierung erfolgen, da die Spektren in verschiedenen NMR-Röhrchen und mit unterschiedlicher Anzahl an Scans aufgenommen wurden und sich durch die Zugabe von mDia1(69-457) das Volumen der Lösung vergrößert und sich somit die Konzentration im NMR-Röhrchen verringert.

Hierfür wurde das Gln743 (Abbildung 4.30) ausgewählt, da es auf den ersten Blick den Anschein hatte, dass die Signalintensität mit mDia1(69-457)-Zugabe nicht abnimmt. Um dies zu überprüfen, wurde die Signalintensität ohne mDia1(69-457) mit der bei maximaler mDia1(69-457) verglichen. Wenn Gln743 von der Bindung nicht

betroffen ist, nimmt das Volumen des Signals linear mit der Konzentration ab. Hierfür wurden zwei Spektren mit identischen Aufnahmebedingungen verwendet.

In Tabelle 4.11 ist gezeigt, dass sich das Volumen des Signals von Gln743 direkt proportional zur Abnahme der Konzentration verhält.

Gln743 eignet sich also als Referenz für die interne Eichung der Spektren.

	Gln743		c(PKD2C) [μM]	
	ohne mDia1	6fach mDia1	ohne mDia1	6fach mDia1
Integral	2.18E+09	9.16E+08	54	23
Abnahme	42%		43%	

Tabelle 4.11 Abnahme des Volumen von Gln743 im Vergleich zur Konzentration von PKD2C680-796.

4.4.2 Bindungsstudien von mDia1(69-457) an PKD2C680-796

Um die Stärke der Bindung, die Dissoziationskonstante, zu bestimmen, wurden vier Aminosäuren (Gly734, Arg742, Thr751 und Thr771), die über beide EF-Hände und den dazwischen liegenden Linker verteilt liegen, ausgewählt und die Abnahme der Signalintensität mit dem Anstieg der mDia1(69-457)-Konzentration verfolgt.

Die Kurvenverläufe für Gly734, Arg742, Thr751 und Thr771 sind in Abbildung 4.31 gezeigt. Die einzelnen K_D -Werte sind Tabelle 4.12 zu entnehmen. Der durchschnittliche K_D -Wert liegt bei $39.3 \pm 13.7 \mu\text{M}$.

	K_D-Werte [μM]
Gly734	69.70 ± 16.58
Arg742	38.81 ± 15.81
Thr751	21.33 ± 12.38
Thr771	27.47 ± 10.14

Tabelle 4.12 Berechnete K_D -Werte für die Titration von PKD2C680-796 mit mDia1(69-457): Auswertung der Bindungskurven aus Abbildung 4.31. Die Werte wurden nach dem Fit mit der Formel 3.2 erhalten.

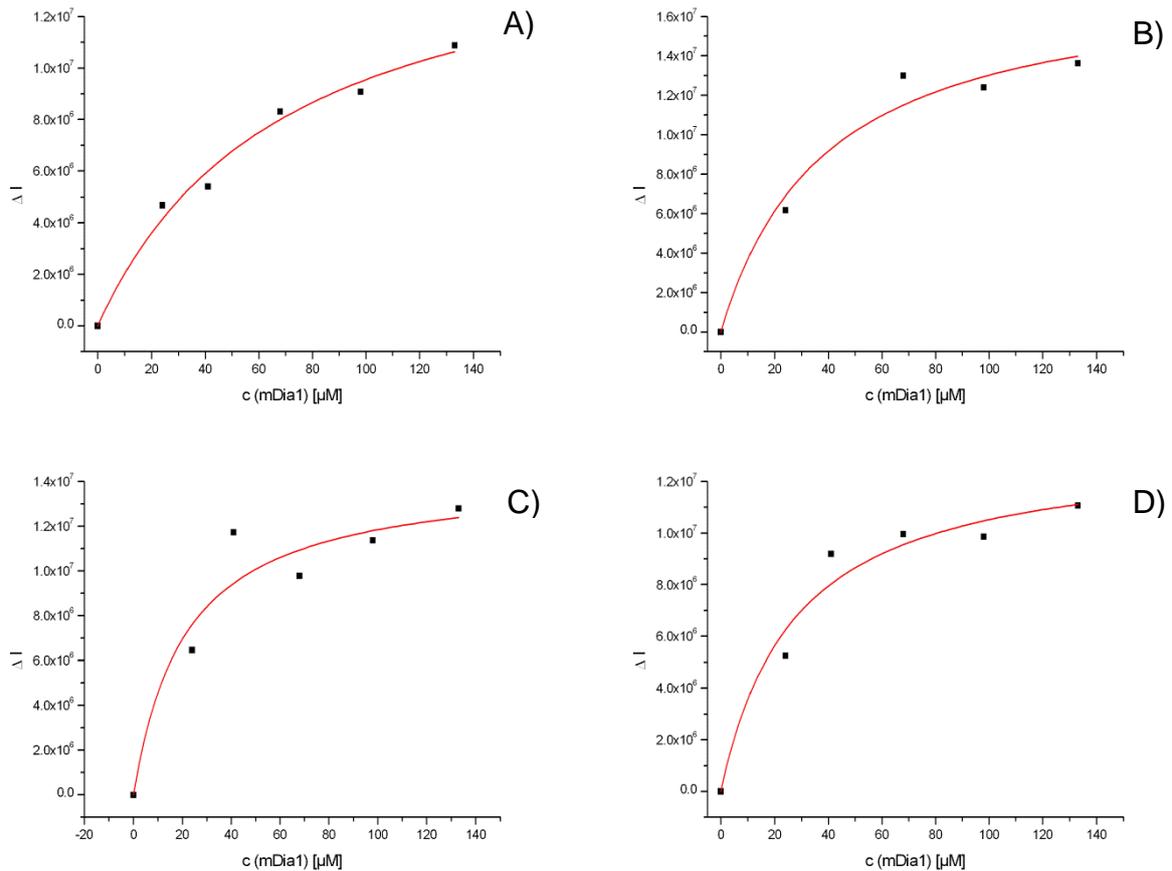


Abbildung 4.31 Bindungskurven der Integrale der H^N von Gly734, Arg742, Thr751, Thr771 in PKD2C680-796: Graph der Differenz der Integrale als Funktion der Konzentration von mDia1(69-457) nach interner Referenzierung über das Integral von Gln743. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.3.2.2 beschrieben. A) Gly734, B) Arg742, C) Thr751, D) Thr771.

Da die Titration bei pH 7.5 stattfand und die Struktur von PKD2C680-796 von Frank Schumann [26] bei pH 6.7 gelöst wurde, konnten nicht alle Signale einwandfrei übertragen werden.

Abnahme der Integrale		
0-50%	51-79%	80-100%
Asp752, Lys761	Ser685, Ser701, Asp744, Lys746, Thr751, Ala753, Ala757, Phe759, Glu783, Ser795, Leu796	Gly732, Gly733, Gly734, Lys735, Asn737, Arg742, Leu745, Lys748, Gly749, His750, Glu754, Glu756, Thr760, Gln764, Asp765, Gly766, Gln768, Glu769, Leu770, Thr771, His775, Gln777

Tabelle 4.13 Abnahme der relativen Integrale $(I-I_0)/I_0$ der $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -TROSY-HSQC Signale von PKD2C680-796/ Ca^{2+} in Anwesenheit von 6fach mDia1(69-457): Änderungen der Integrale der einzelnen Aminosäuren in Prozent, 0 % bedeuten keine Änderung der Integrale und 100% vollständiges Verschwinden des Signals (Integral=0) nach interner Referenzierung über das Integral von Gln743.

In Tabelle 4.13 sind alle übertragenen Aminosäuren und ihre prozentuale Abnahme der Intensität bei 6-fachem Überschuss von mDia1(69-457) in Gruppen von 0-50 %, 51-79 % und 80-100 % Abnahme, eingeteilt. Gut zu erkennen ist, dass Aminosäuren beider EF-Hände eine mittelstarke (Asp744) und starke (Lys735, Asn737, Asp765, Glu769, Thr771) Abnahme der Intensität zeigen. In Abbildung 4.32 ist die relative Abnahme aller übertragenen Signale graphisch dargestellt. Überwiegend Aminosäuren der EF-Hände oder in deren näheren Umgebung im Protein zeigen einen Signalabfall im Bereich von 80-100 %, im Bereich des Mittelwerts minus der Standardabweichung. Sie zeigen also eine signifikante Abnahme der Intensität aufgrund der Bindung von mDia1(69-457).

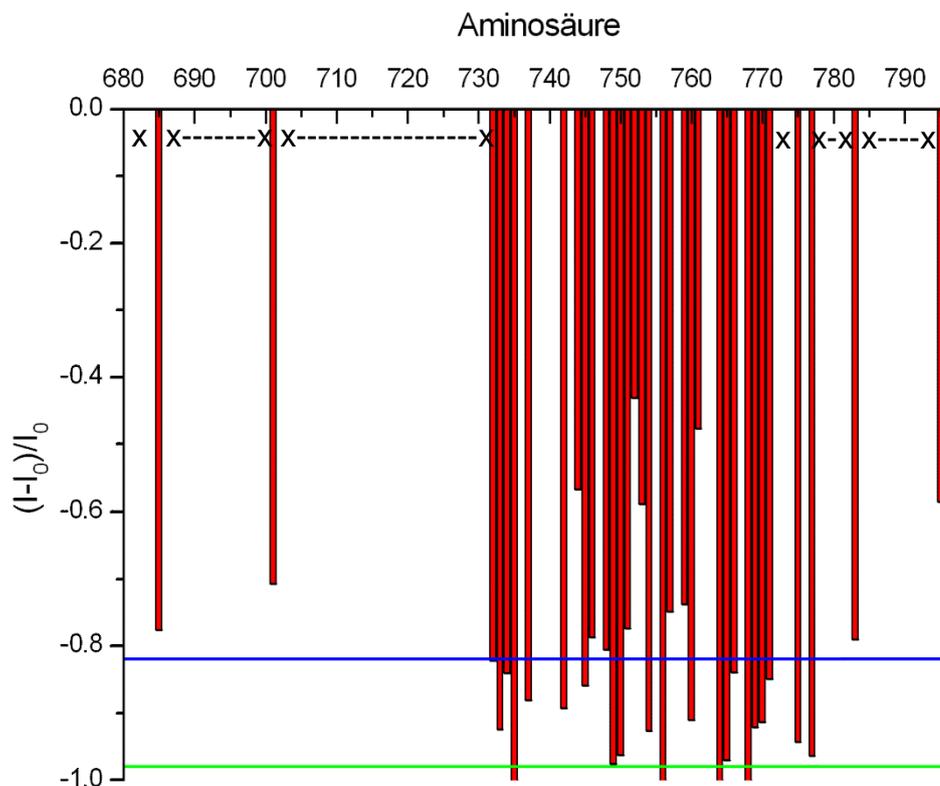


Abbildung 4.32 Relative Änderung der Integrale der $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -TROSY-HSQC Signale von PKD2C680-796/ Ca^{2+} in Anwesenheit von 6-fach mDia1(69-457): Aufgetragen sind nur die Integrale die einwandfrei zugeordnet werden konnten nach interner Referenzierung über das Integral von Gln743. Die übrigen Aminosäuren wurden mit x beschriftet. Der Mittelwert ist durch die blaue Linie, der Mittelwert abzüglich der Standardabweichung durch die grüne Linie gekennzeichnet.

Wenn man die relative Stärke der Abnahme der Integrale auf die Struktur von PKD2C680-796 (pdb: 2KLE) überträgt (Abbildung 4.33), kann man gut erkennen, dass mDia1(69-457) an beide EF-Hände bindet und diese wie eine Art Klammer umschließt.

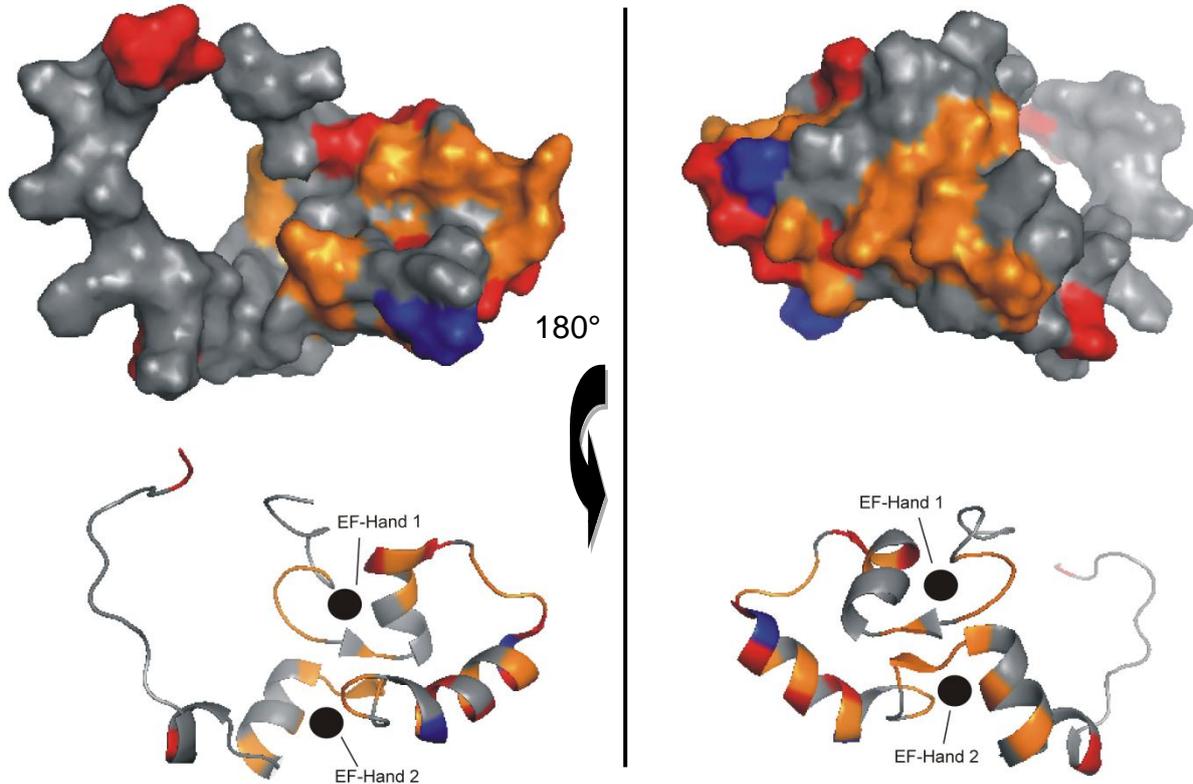


Abbildung 4.33 Beobachtete Änderung der Integrale in PKD2C680-796/Ca²⁺ durch Interaktion mit mDia1(69-457): oben) Oberflächendarstellung von PKD2C680-796/Ca²⁺. unten) Cartoon-Darstellung von PKD2C680-796/Ca²⁺. Abgebildet ist die NMR-Struktur (pdb: 2KLE, [26]). Abnahme der Integrale im (¹H-¹⁵N)-TROSY-HSQC zwischen 0-50 % in blau, 51-79 % in rot und 80-100 % in orange, grau steht für keine Information.

4.5 Struktureller Vergleich und Vergleich der Zuordnungen des Fragments PKD2C680-796 (pdb: 2KLE) mit PKD2C720-797 (pdb: 2KQ6) und PKD2C725-880

4.5.1 Verbesserte Zuordnung und Vergleich des Fragments PKD2C680-796 mit den Zuordnungen von PKD2C720-797 und PKD2C725-880

4.5.1.1 Verbesserung der Zuordnung von PKD2C680-796

Neben der pdb-Struktur 2KLE von 2009 [26] wurde 2010 auch die pdb-Struktur 2KQ6 [90] veröffentlicht. Da die beiden Strukturen deutliche Unterschiede (Kapitel 4.5.2) aufweisen, wurde die Zuordnung von PKD2C680-796 [125] überprüft. Kontrolliert wurde das HNCA, CBCACONH und das CBCANH in Bezug auf die sequenzielle Zuordnung. Hierfür wurden die Spektren, die von Frank Schumann aufgezeichnet und für die Zuordnung verwendeten wurden, benutzt. Für die vier Aminosäuren Ser728, Leu729, Glu754 und Ser795 konnte die Zuordnung verbessert werden.

In Abbildung 4.34 ist die verbesserte Zuordnung für Ser728 und Leu729 graphisch nachvollziehbar dargestellt. Für das Ser728 konnte Frank Schumann nur eine chemische Verschiebung für das Proton angeben. Für Leu729/2KLE ist im CBCACONH klar erkennbar, dass es sich beim Vorgänger nicht um ein Serin handeln kann, da dessen durchschnittliche chemische Verschiebungen für das C β (ca. 62-67 ppm [124]) vollkommen verschieden ist. Die im CBCACONH gefundene chemische Verschiebung des C β liegt bei ca. 33 ppm. Des Weiteren würde die chemische Verschiebung für das C β für Leu729/2KLE laut CBCANH bei ca. 30 ppm liegen. Die durchschnittliche chemische Verschiebung des C β für Leucine liegt zwischen 40 und 44 ppm [124]. Die chemischen Verschiebungen der Signale im HNCA und CBCANH von Ser728 passen zu den chemischen Verschiebungen im CBCACONH von Leu729.

Das Signal im HSQC für Ser728 bei 8.24 ppm für ^1H und 115.86 ppm für ^{15}N wurde von Frank Schumann nicht zugeordnet. Das bedeutet, die restliche Zuordnung der Struktur 2KLE ist von dieser Verbesserung nicht betroffen.

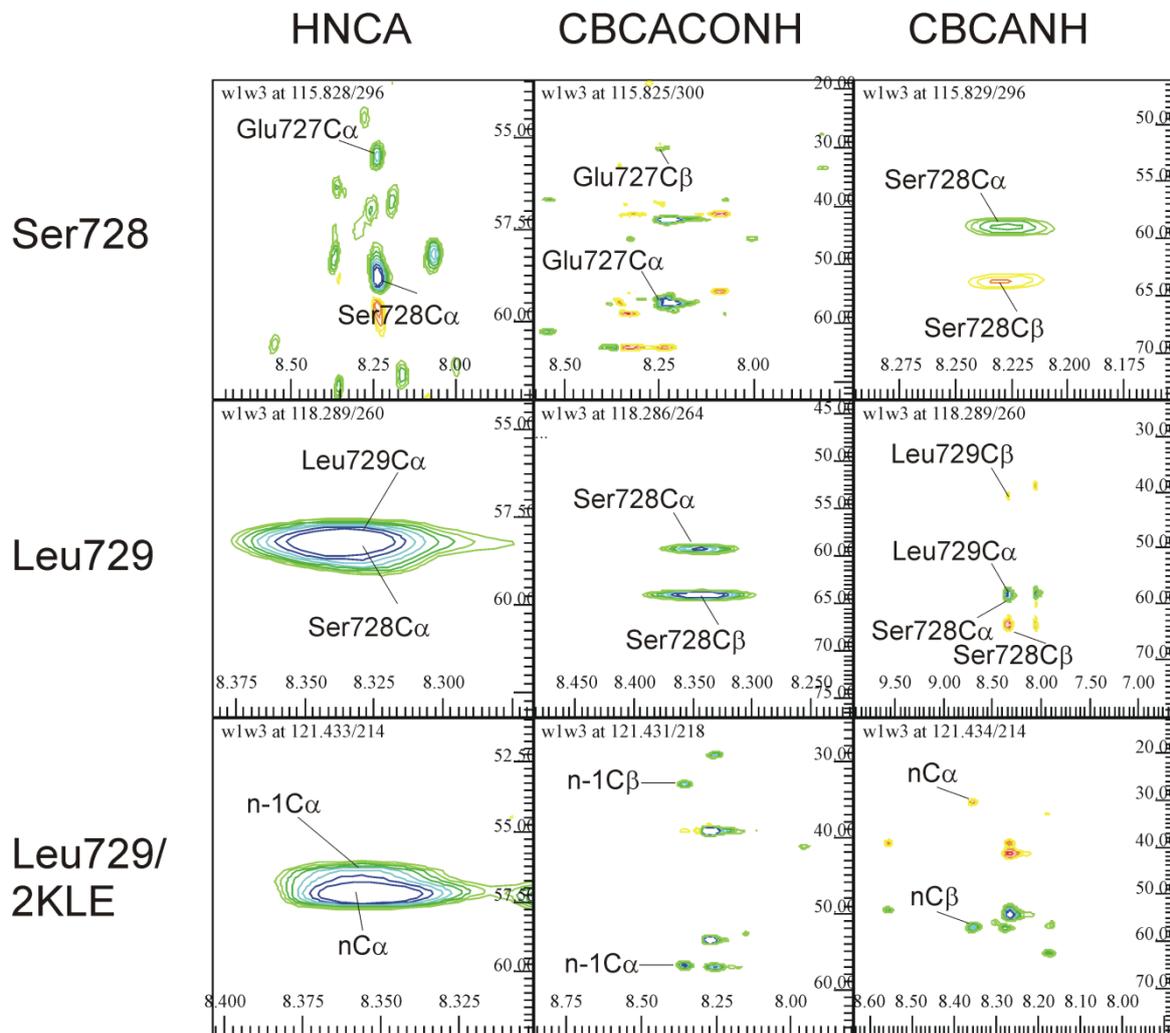


Abbildung 4.34: Verbesserung der Zuordnung für Ser728 und Leu729 in PKD2C680-796: Gezeigt ist die verbesserte Zuordnung von Ser728 und Leu729 nachvollziehbar anhand von Ausschnitten des HNCA, CBCACONH und CBCANH. Leu729/2KLE zeigt die Ausschnitte aus den Spektren von Frank Schumann [125] im Vergleich.

In Abbildung 4.35 ist die verbesserte Zuordnung für Glu754 grafisch nachvollziehbar dargestellt. Für Glu754/2KLE sind in den 3D-Spektren (HNCA, CBCACONH, CBCANH) für die zugeordnete chemische Verschiebung des ^1H im HSQC keine Signale erkennbar. Die chemischen Verschiebungen der Signale im HNCA und CBCANH von Glu754 passen zu den chemischen Verschiebungen im CBCACONH von Ile755.

Das Signal im HSQC für Glu754 bei 7.78 ppm für ^1H und 120.27 ppm für ^{15}N wurde von Frank Schumann als Asp744 zugeordnet. Bei genauerer Betrachtung der Signale im CBCANH des neu zugeordneten Glu754 fällt aber auf, dass auch die Signale des von Frank Schumann zugeordneten Asp744 zu finden sind. Die Signale der ^1H im HSQC überlagern sich bei $\delta = 7.78$ ppm für ^1H und 120.27 ppm für ^{15}N . Das bedeutet, die restliche Zuordnung der Struktur 2KLE ist von dieser Verbesserung nicht betroffen. Bei Betrachtung der Veröffentlichung zur Zuordnung

von 2KLE [125] fällt auf, dass das Signal im HSQC richtig beschriftet ist, also eine Überlagerung der Signale der H^N von Asp744 und Glu754 gezeigt wird.

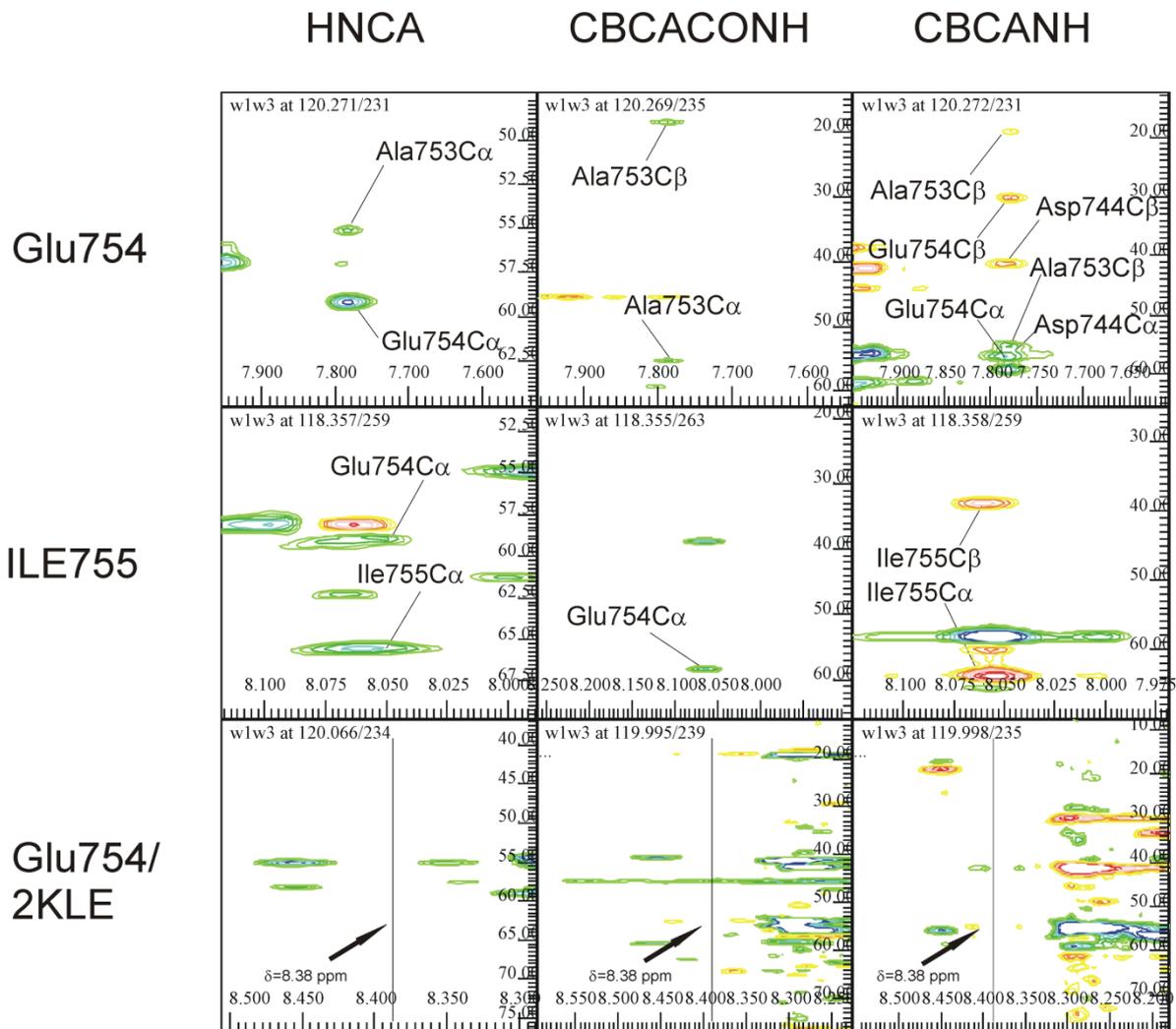


Abbildung 4.35 Verbesserung der Zuordnung für Glu754 in PKD2C680-796: Gezeigt ist die verbesserte Zuordnung von Glu754 nachvollziehbar anhand von Ausschnitten des HNCA, CBCACONH und CBCANH. Glu754/2KLE zeigt die Ausschnitte aus den Spektren der Zuordnung von Frank Schumann [125] im Vergleich.

In Abbildung 4.36 ist die verbesserte Zuordnung für Ser795 grafisch nachvollziehbar dargestellt. Die Zuordnungen für das Ser795 ($\delta = 8.37$ ppm für 1H und 118.59 ppm für ^{15}N) und für das Ser795/2KLE ($\delta = 8.34$ ppm für 1H und 118.26 ppm für ^{15}N) unterscheiden sich nur in der chemischen Verschiebung für das Proton. Bei Betrachtung des CBCANH erkennt man, dass hier zwei Serine gleich nebeneinander liegen und im HSQC überlagern, wobei eines der beiden noch ein Signal bei einer chemischen Verschiebung von ca 40 ppm besitzt. Das Serin795 darf im CBCACONH und im CBCANH keine anderen Signale als die durchschnittlichen für das $C\alpha$ und $C\beta$ von Serinen haben, da die Vorgänger-Aminosäure ein Serin, Ser794, ist. Nur die

Signale bei 8.37 ppm zeigen keine anderen Signale und passen zu den chemischen Verschiebungen im CBCACONH von Leu796.

Das Signal im HSQC für Ser795 bei 8.37 ppm für ^1H und 118.49 ppm für ^{15}N wurde von Frank Schumann nicht zugeordnet. Das bedeutet, die restliche Zuordnung der Struktur 2KLE ist von dieser Verbesserung nicht betroffen.

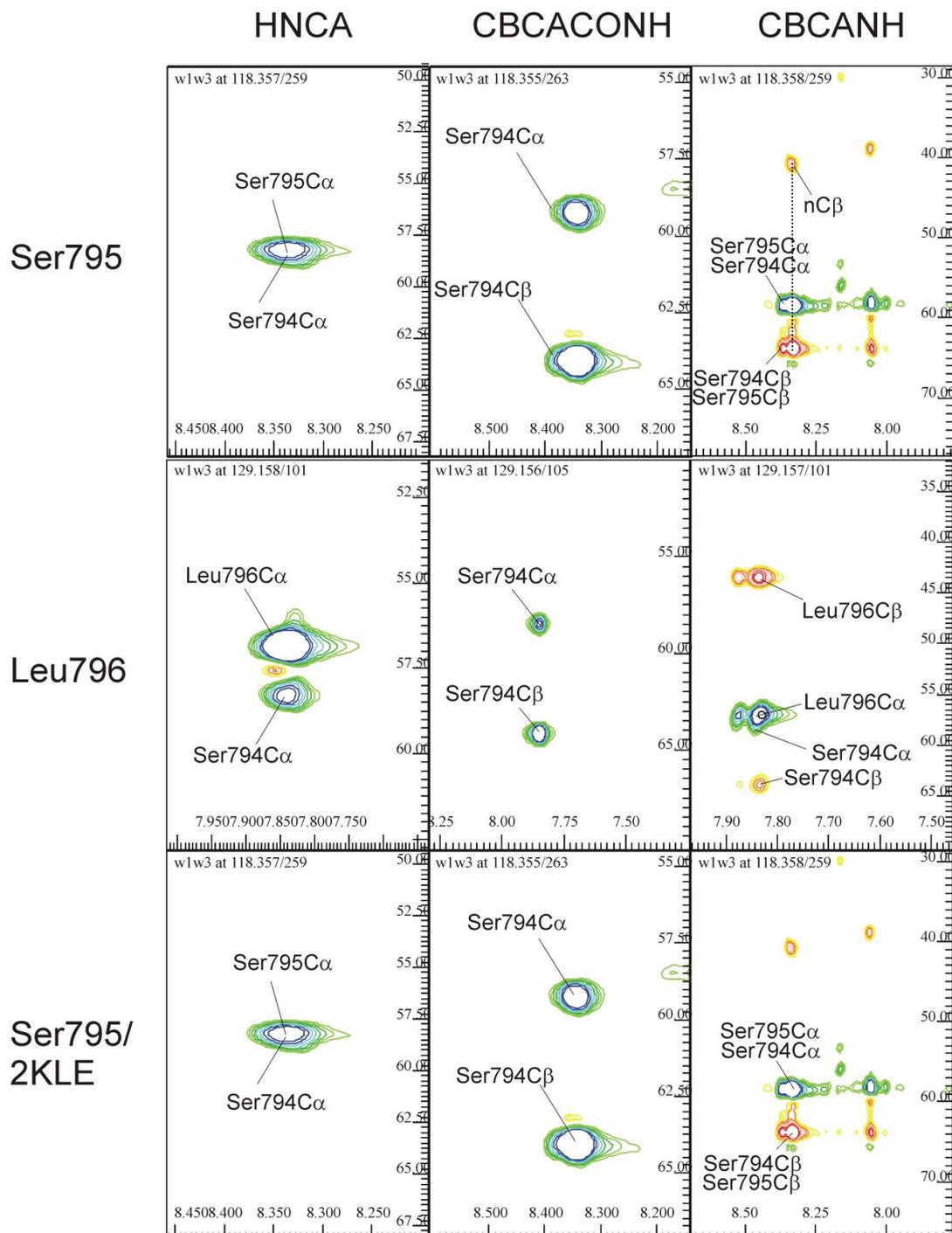


Abbildung 4.36 Verbesserung der Zuordnung für Ser795 in PKD2C680-796: Gezeigt ist die verbesserte Zuordnung von Ser795 nachvollziehbar anhand von Ausschnitten des HNCA, CBCACONH und CBCANH. Ser795/2KLE zeigt die Ausschnitte aus den Spektren der Zuordnung von Frank Schumann [125] im Vergleich.

Mithilfe der Tripelresonanzspektren (HNCA, CBCACONH, CBCANH) konnten fast 50 % der von Frank Schumann zugeordneten Signale für das (^1H - ^{15}N)-HSQC von PKD2C680-796 bestätigt werden. Da die Übereinstimmungen sehr groß waren, wurde auf eine weitere, zeitintensive Überprüfung der von Frank Schumann für die Zuordnung verwendeten, homonuklearen Spektren (TOCSY, NOESY) verzichtet.

4.5.1.2 Vergleich der Zuordnungen der Fragmente PKD2C680-796 (pdb-Struktur 2KLE), PKD2C720-797 (pdb-Struktur 2KQ6) und der Zuordnung des Fragments PKD2C725-880

In Abbildung 4.37 ist der Vergleich der Zuordnungen grafisch dargestellt. Bei Vergleich der Zuordnungen der Strukturen 2KLE und 2KQ6 fällt auf, dass sehr große Unterschiede vor allem im Bereich der ersten Hälfte der EF-Hand 1 (Glu727-Asp739) und nach EF-Hand 2 (Thr771-D790) bestehen. Die meisten Übereinstimmungen finden sich im Bereich des Linkers zwischen den beiden EF-Händen und EF-Hand 2 (Arg742-Asp767). Allerdings gibt es auch in diesem Bereich anders zugeordnete Signale, z. B. Gln768 in 2KLE entspricht Thr771 in 2KQ6. Bei Vergleich der Zuordnung von 2KQ6 mit dem (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796 (Abbildung 4.38) fällt auf, dass sich auch die Spektren sehr deutlich unterscheiden. Das Fragment PKD2C720-797, das von Hodsdon *et al* [90] verwendet wurde, zeigt keine Signale im Random Coil-Bereich. Besonders fällt auf, dass das Gln768 in EF-Hand 2, das aufgrund der Beteiligung an der Ca^{2+} -Bindung stark tieffeldverschoben ist, in PKD2C720-797 scheinbar nicht tieffeldverschoben vorliegt.

Die verbesserte Zuordnung von PKD2C680-796 zeigt im Vergleich mit der Zuordnung von 2KQ6 eine höhere Übereinstimmung für Ser728 und Glu754.

Bei Vergleich der Zuordnung von PKD2C725-880 mit der Zuordnung von 2KQ6 wird ersichtlich, dass die Übereinstimmungen deutlich höher sind. Im Bereich zwischen Lys735 – Asp792 stimmen die Zuordnungen vollständig überein. Einzige Ausnahme bildet Glu768, dessen Zuordnung dem des Fragments PKD2C680-796 entspricht. Die Zuordnungen der ersten Hälfte der EF-Hand 1 (Glu727-Gly734) unterscheiden sich.

	2KLE		2KQ6		PKD2C725-880		2KQ6	
	¹ H	¹⁵ N						
ASN720	-	-	-	-			-	-
THR721	-	-	-	-			-	-
VAL722	-	-	8.01	121.02			8.01	121.02
ASP723	-	-	8.19	122.64			8.19	122.64
ASP724	-	-	8.22	120.91			8.22	120.91
ILE725	7.99	121.91	8.18	120.87	-	-	8.18	120.87
SER726	8.00	117.27	8.38	119.43	8.46	118.94	8.38	119.43
GLU727	-	-	8.13	121.68	8.42	123.10	8.13	121.68
SER728	8.02	-	8.21	115.94	8.35	116.27	8.21	115.94
LEU729	8.36	121.43	7.88	119.15	-	-	7.88	119.15
ARG730	8.02	120.61	-	-	-	-	-	-
GLN731	8.08	118.84	-	-	-	-	-	-
GLY732	7.78	105.81	8.24	108.00	8.52	109.62	8.24	108.00
GLY733	7.62	106.53	8.56	108.98	8.39	108.68	8.56	108.98
GLY734	8.74	107.08	8.44	109.15	8.57	108.79	8.44	109.15
LYS735	7.26	117.40	8.07	120.13	8.15	119.66	8.07	120.13
LEU736	8.28	119.90	8.50	123.16	-	-	8.50	123.16
ASN737	9.04	120.68	8.69	121.06	8.81	120.60	8.69	121.06
PHE738	8.38	118.94	8.66	120.35	8.73	119.88	8.66	120.35
ASP739	7.37	117.76	8.23	118.66	8.33	118.85	8.23	118.66
GLU740	6.90	119.15	8.15	119.95	-	-	8.15	119.95
LEU741	8.38	120.99	8.08	121.80	-	-	8.08	121.80
ARG742	9.03	119.21	8.71	119.36	8.80	119.25	8.71	119.36
GLN743	7.71	116.65	7.68	116.48	7.72	116.05	7.68	116.48
ASP744	7.78	120.03	7.67	120.03	-	-	7.67	120.03
LEU745	8.61	116.34	8.49	117.12	-	-	8.49	117.12
LYS746	8.86	121.65	8.74	122.65	8.79	122.41	8.74	122.65
GLY747	7.94	108.21	8.02	108.37	8.12	108.51	8.02	108.37
LYS748	7.29	118.22	7.45	118.74	7.46	118.65	7.45	118.74
GLY749	7.82	106.56	7.85	106.43	7.88	106.33	7.85	106.43
HIS750	7.76	118.26	7.56	119.06	7.65	119.25	7.56	119.06
THR751	9.02	113.85	8.82	113.70	8.99	113.95	8.82	113.70
ASP752	8.84	120.75	8.89	120.92	9.03	120.62	8.89	120.92
ALA753	8.45	120.10	8.47	121.26	8.62	121.27	8.47	121.26
GLU754	8.38	120.03	7.80	119.87	7.92	119.97	7.80	119.87
ILE755	8.02	118.53	8.38	120.57	8.43	120.73	8.38	120.57
GLU756	8.62	117.98	8.21	119.15	8.24	118.67	8.21	119.15
ALA757	7.71	121.37	7.63	121.30	7.66	120.60	7.63	121.30
ILE758	7.95	119.78	8.26	121.42	-	-	8.26	121.42

	2KLE		2KQ6		PKD2C725-880		2KQE	
	¹ H	¹⁵ N						
PHE759	8.54	120.27	8.61	120.37	-	-	8.61	120.37
THR760	8.41	111.79	8.09	111.24	8.19	111.97	8.09	111.24
LYS761	7.46	119.31	7.65	121.07	7.75	120.15	7.65	121.07
TYR762	7.93	111.83	7.53	113.69	-	-	7.53	113.69
ASP763	7.92	120.72	7.79	120.91	-	-	7.79	120.91
GLN764	7.89	125.88	8.12	124.21	-	-	8.12	124.21
ASP765	8.05	114.26	8.19	114.73	-	-	8.19	114.73
GLY766	7.62	108.44	7.57	108.38	-	-	7.57	108.38
ASP767	8.08	119.76	8.10	120.00	-	-	8.10	120.00
GLN768	10.03	115.45	7.99	117.25	10.27	115.43	7.99	117.25
GLU769	7.98	118.12	9.06	120.73	-	-	9.06	120.73
LEU770	9.31	129.84	9.32	125.77	9.44	125.91	9.32	125.77
THR771	8.46	114.02	9.18	115.40	9.31	115.36	9.18	115.40
GLU772	8.29	119.78	7.72	120.76	7.68	120.60	7.72	120.76
HIS773	8.56	118.22	8.83	117.81	-	-	8.83	117.81
GLU774	7.86	120.72	7.65	118.31	-	-	7.65	118.31
HIS775	8.78	119.90	8.75	118.89	-	-	8.75	118.89
GLN776	8.06	119.35	8.28	119.26	-	-	8.28	119.26
GLN777	7.19	116.03	8.22	119.34	-	-	8.22	119.34
MET778	8.12	120.01	7.47	119.45	-	-	7.47	119.45
ARG779	-	-	8.20	118.05	-	-	8.20	118.05
ASP780	-	-	8.31	119.75	-	-	8.31	119.75
ASP781	8.48	121.54	7.99	120.24	-	-	7.99	120.24
LEU782	7.92	121.54	8.28	119.97	-	-	8.28	119.97
GLU783	7.80	118.26	7.99	119.03	-	-	7.99	119.03
LYS784	-	-	7.71	120.00	-	-	7.71	120.00
GLU785	-	-	8.11	120.01	-	-	8.11	120.01
ARG786	-	-	8.03	120.60	-	-	8.03	120.60
GLU787	-	-	8.36	121.57	-	-	8.36	121.57
ASP788	-	-	8.34	120.77	-	-	8.34	120.77
LEU789	-	-	8.02	122.08	-	-	8.02	122.08
ASP790	8.56	122.90	8.30	120.92	8.24	120.87	8.30	120.92
LEU791	8.06	121.54	8.06	122.33	8.12	121.89	8.06	122.33
ASP792	8.28	119.62	8.27	120.23	8.34	120.02	8.27	120.23
HIS793	8.29	119.25	7.75	123.50	7.93	120.86	7.75	123.50
SER794	-	116.61	-	-	8.59	118.04	-	-
SER795	8.34	118.26	-	-	8.41	117.78	-	-
LEU796	7.84	129.16	8.07	125.54	8.06	124.65	8.07	125.54
PRO797	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbildung 4.37 Vergleich der Zuordnungen von PKD2C680-796 (2KLE und verbessert), PKD2C720-797 (2KQ6) und PKD2C725-880: grün) gleiche Zuordnung, orange) vermutlich gleiche Zuordnung, rot) andere Zuordnung, grau) keine Information. Messbedingungen: 2KLE und verbessert: 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.8, 500 mM NaCl, 2 mM DTE; T = 293 K; PKD2C725-880: 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM CaCl₂, T = 278 K; 2KQ6: 2 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, T = 303 K. Bei der Definition von Übereinstimmung wurden die chemischen Verschiebungen ¹H und ¹⁵N betrachtet. Für ¹⁵N wurde ein Fehlerbereich ± 0.5 ppm als Übereinstimmung akzeptiert. Für die chemischen Verschiebungen der Protonen wurde ein deutlich größerer Fehlerbereich zugelassen, da diese stärker auf pH- und Temperaturschwankungen reagieren. Unterschiede wurden hier mit ± 0.4 ppm, bei guten Übereinstimmungen in den ¹⁵N chemischen Verschiebungen, akzeptiert.

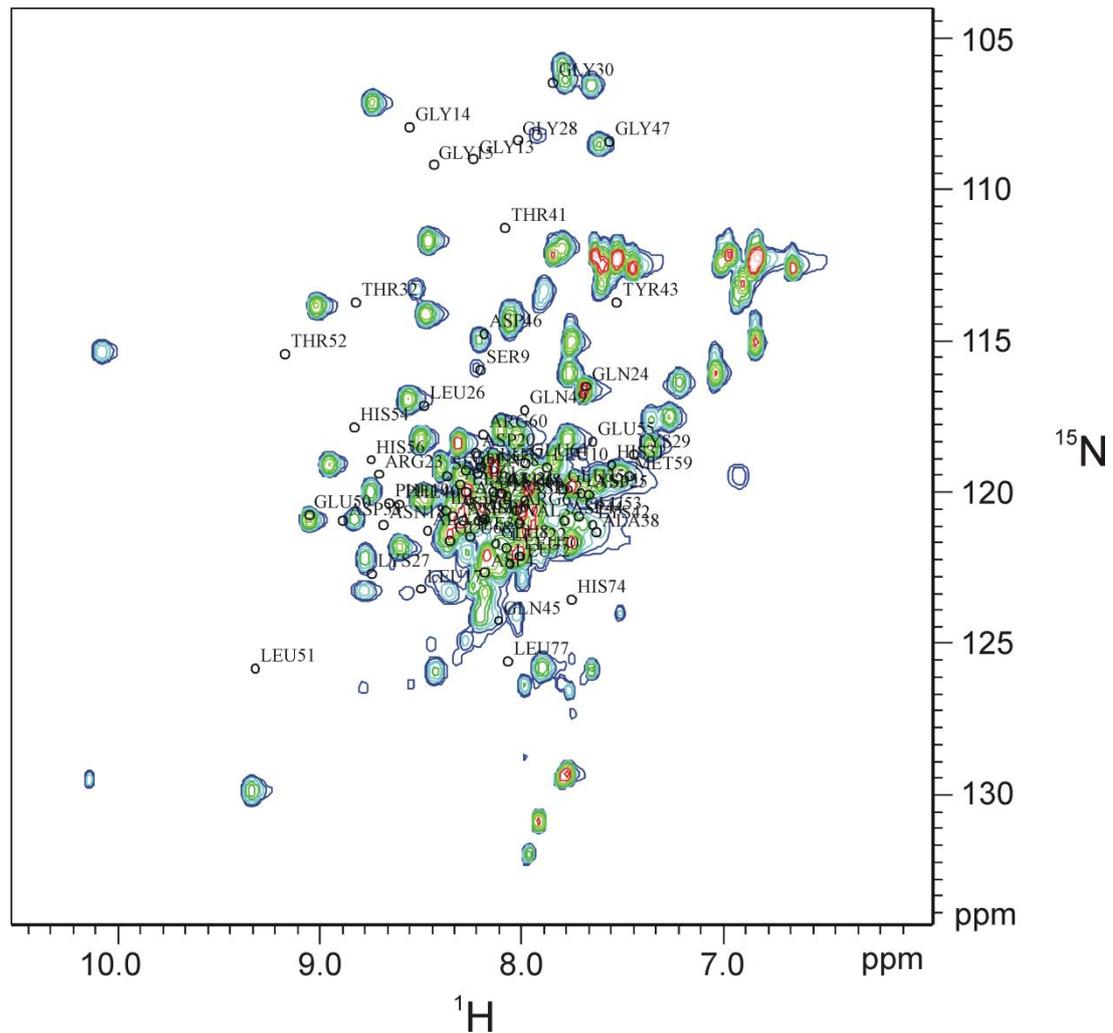


Abbildung 4.38 (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796 mit der Peakliste der Zuordnung der Struktur 2KQ6: V = 600 μL , c = 0.5 mM in 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE, 0.7 mM CaCl_2 , pH 7.7, T = 298 K. Beschriftet sind die Backbone-Signale der Aminosäuren der Zuordnung (Messbedingungen: 2 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 , T = 303 K) von PKD2C720-797 von Hodsdon *et al* [90]. Die Nummerierung addiert mit 719 entspricht der Nummerierung aus der Zuordnung von Frank Schumann für PKD2C680-796 [125]. Das Spektrum wurde mit einer Lorentz-zu-Gauss Funktion (GB = 0.12 für ^1H und 0.1 für ^{15}N) prozessiert.

4.5.2 Vergleich der Strukturen 2KLE und 2KQ6

In

Abbildung 4.39 sind die pdb-Strukturen 2KLE [26] und 2KQ6 [90] gezeigt.

Obwohl beide Strukturen nahezu gleiche Sequenzen haben, weisen die Strukturen deutliche Unterschiede auf. Die pdb-Struktur 2KLE wurde von Aminosäure Ile725 - Leu796, die pdb-Struktur 2KQ6 von Aminosäure Asn720 - Pro797, gerechnet.

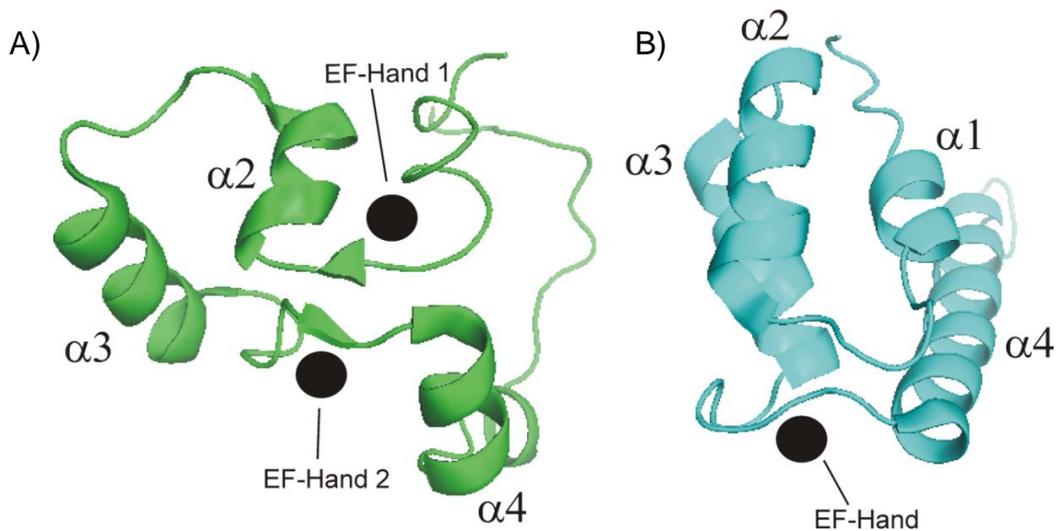


Abbildung 4.39 Vergleich der pdb-Strukturen 2KLE und 2KQ6: A) pdb-Struktur 2KLE in grün, B) pdb-Struktur 2KQ6 in blau. Die vier α -Helices in 2KQ6 sind mit $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$ bezeichnet ausgehend vom NH_2 -Ende. Analog zur 2KQ6-Beschriftung wurden die α -Helices in 2KLE bezeichnet. Überlagert wurden C_α der beiden Strukturen mithilfe des Befehls ‚align‘ in PyMOL von 2KLE und 2KQ6. Hierbei versucht PyMol den kleinsten RMSD (kleinste Standardabweichung) zwischen den gleichen C_α -Atomen in der Struktur zu finden. Der RMSD für die beiden Strukturen ist 7.57 Å.

Die Struktur 2KQ6 zeigt vier α -Helices ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$). Bei Vergleich der Helix $\alpha 1$ (Ile725 - Gln731) mit den gleichen Aminosäuren in 2KLE fällt auf, dass dort keine α -helikale-Struktur vorhanden ist (Abbildung 4.39 und Abbildung 4.40, A). Betrachtet man die Zuordnung von 2KLE (Kapitel 4.5.1.2, Abbildung 4.37) sieht man, dass in diesem Bereich deutlich weniger Resonanzen als in 2KQ6 zugeordnet werden konnten. Der Bereich der EF-Hand 1 (Abbildung 4.40, A) zeigt einen RMSD von 4.58 Å, der Bereich der EF-Hand 2 (Abbildung 4.40, B) einen RMSD von 7.28 Å.

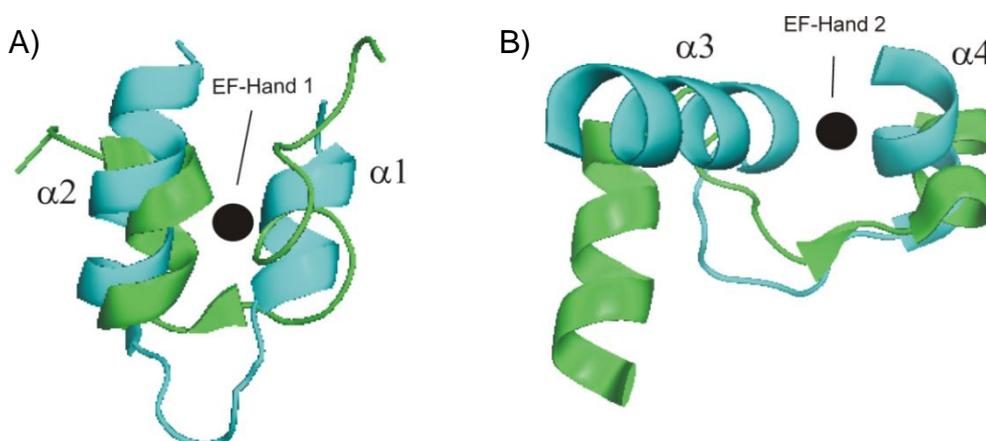


Abbildung 4.40 Vergleich der EF-Hände in 2KLE und 2KQ6: Ausschnitt aus den beiden überlagerten Strukturen 2KLE (grün) und 2KQ6 (blau). A) Bereich der EF-Hand 1 von Aminosäure Asp724-Gly749. B) Bereich der EF-Hand 2 von Aminosäure Asp752-Met778. Die vier α -Helices in 2KQ6 sind mit $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$ ausgehend vom NH_2 -Ende bezeichnet. Überlagert wurden die C_α der Aminosäurebereiche wie unter A) und B) abgebildet mithilfe des Befehls ‚align‘ in PyMOL. Hierbei versucht PyMol den kleinsten RMSD (kleinste Standardabweichung) zwischen den gleichen C_α -Atomen in der Struktur zu finden. Der RMSD ist für A) 4.58 Å und für B) 7.28 Å.

Helix α_2 (Phe738- Leu745) (Abbildung 4.39 und Abbildung 4.40, A) sieht im Vergleich zu 2KLE ähnlich aus. Helix α_3 (Ala753- Tyr762) ist im Vergleich zur Helix α_3 von 2KLE um 90° verschoben (Abbildung 4.40 und Abbildung 4.41). In Abbildung 4.41 ist der Bereich der beiden Helices α_2 und α_3 vergrößert dargestellt. Werden diese zwei Helices getrennt vom Rest der Struktur in den C_α überlagert, ergibt sich ein RMSD von 3.31 Å.

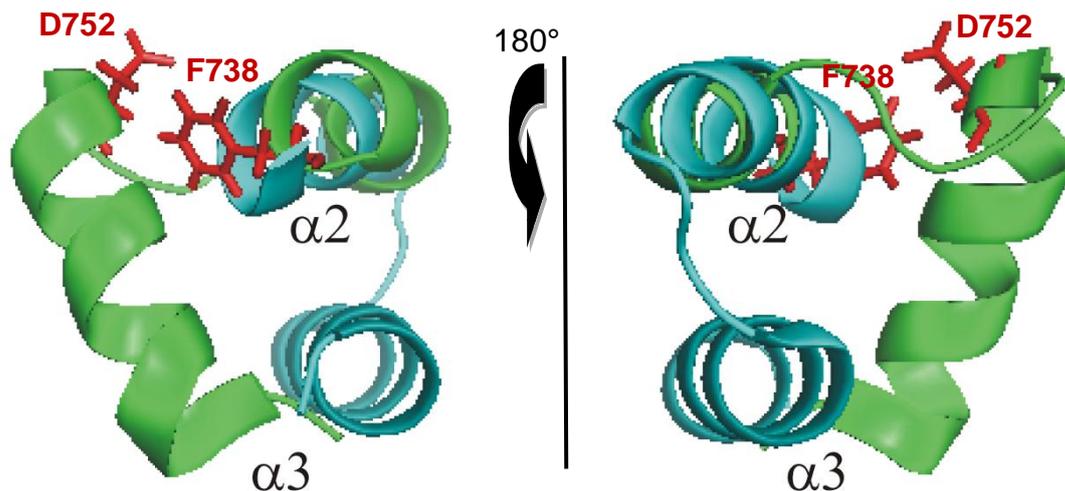


Abbildung 4.41 Vergrößerte Darstellung der Helices α_2 und α_3 : Ausschnitt aus den beiden überlagerten Strukturen 2KLE (grün) und 2KQ6 (blau). A) Bereich der α -Helices 1 und 2 von Aminosäure Asn737-Gln764. B) Gleiche Abbildung um 180° Grad gedreht. In rot die Aminosäuren Phe738 und Asp752 der Struktur 2KLE (grün). In blau die Struktur 2KQ6. Die vier α -Helices in 2KQ6 sind mit α_1 , α_2 , α_3 und α_4 bezeichnet ausgehend vom NH_2 -Ende. Überlagert wurden die C_α der Aminosäuren Asn737-Gln764 mithilfe des Befehls ‚align‘ in PyMOL. Hierbei versucht PyMol den kleinsten RMSD (kleinste Standardabweichung) zwischen den gleichen C_α -Atomen in der Struktur zu finden. Der RMSD ist in diesem Fall 3.31 Å.

Der NOE-Kontakt der beiden Aminosäuren Phe738 und Asp752 ist für die Ausrichtung der beiden Helices verantwortlich. Bei Betrachtung der Zuordnung beider Strukturen (Kapitel 4.5.1.2, Abbildung 4.37) fällt auf, dass das Asp752 gleich zugeordnet wurde, für Phe738 jedoch eine unterschiedliche Zuordnung erfolgte.

Helix α_4 ist in 2KLE nur ansatzweise vorhanden (Abbildung 4.39). Betrachtet man die Zuordnung von 2KLE (Kapitel 4.5.1.2, Abbildung 4.37) sieht man, dass in diesem Bereich deutlich weniger Resonanzen als in 2KQ6 zugeordnet werden konnten.

4.6 Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C725-880

Das Fragment PKD2C725-880 besitzt zwei EF-Hände (Aminosäuren 727-739 und 763-774) [5, 26], zwei Coiled-Coil-Domänen (Aminosäuren 781-796 und 835-873) [27-28] und ein ER-Retentionssignal (Aminosäuren 787-820) [8].

4.6.1 Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ^1H - und 2D-(^1H - ^{15}N)-NMR-Spektroskopie

Das Fragment zeigt bei einer Größe von 17.8 kDa im ^1H -Spektrum die zu erwartenden Linienbreiten. Einige Signale sind gut aufgelöst (z. B. alle vier Alanine des Proteins zwischen $\delta = 1.2$ -1.5 ppm) auch die CH_3 -Gruppen zweier der vier Methionine zeigen schmale Linien (Abbildung 4.42). Im Bereich um 0 ppm sind hochfeldverschobene Signale (Methylprotonen im hydrophoben Kern des Proteins) zu sehen.

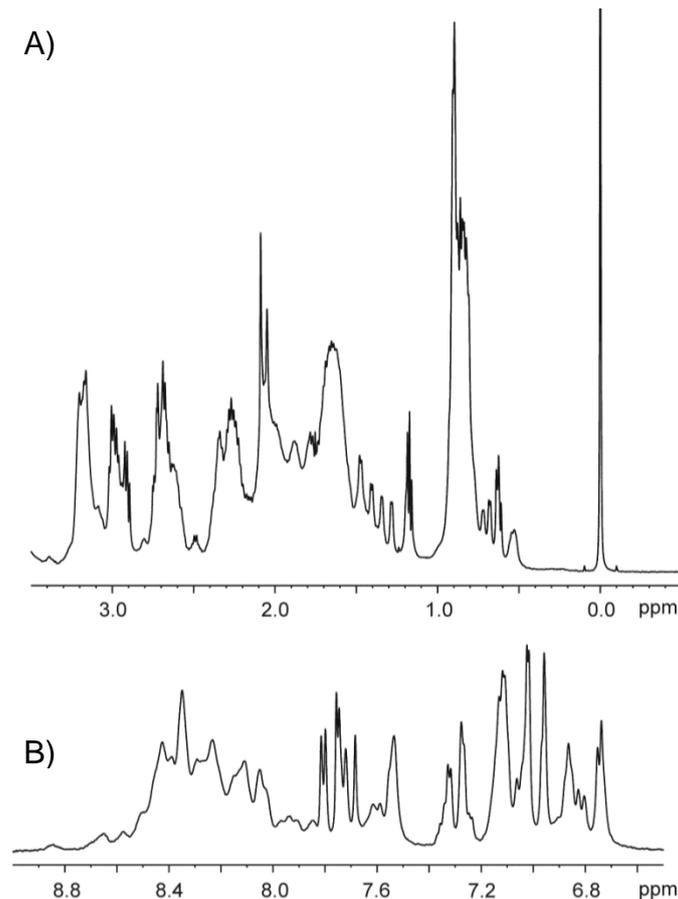


Abbildung 4.42 Ausschnitte aus dem 1D- ^1H -Spektrum von PKD2C725-880 in Abwesenheit von Ca^{2+} : $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Das Spektrum wurde exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). A) Aliphatischer Bereich mit DSS (abgeschnitten) bei 0 ppm. B) Amidbereich.

4.6.1.1 Interaktion mit Ca^{2+}

Für die beiden EF-Hände wurden K_D -Werte der Ca^{2+} -Bindung von 55 und 179 μM gefunden [26]. Interessant war es nun zu überprüfen, ob das Fragment 725-880 ähnliche Effekte bei der Interaktion mit Calcium aufweist und ob sich die Bindungskonstanten unterscheiden. In Abbildung 4.43 ist die Titration mit Ca^{2+} zu sehen. Die Ca^{2+} -Zugabe führt zu deutlichen Änderungen im 1D- ^1H -Spektrum von

PKD2C725-880. Auch in Anwesenheit von Ca^{2+} sind hochfeldverschobene Signale zu erkennen.

Bei Vergleich des $1\text{D-}^1\text{H}$ -Spektrums in Anwesenheit hoher CaCl_2 -Konzentrationen mit dem von PKD2C680-796 Abbildung 4.2 fällt auf, dass die Ca^{2+} -Zugabe erneut zur Verschiebung des H^{N} Signals von Asp 752 ($\delta = 9.05$ ppm) und zum Erscheinen des Signals des H^{δ} von Phe738 ($\delta = 6.68$ ppm) führt. Des Weiteren ist zu beobachten, dass ein Signal rechts des H^{δ} von Phe738 mit steigender Ca^{2+} -Konzentration shiftet und zu einem Duplett aufspaltet. In diesem Bereich können nur Protonen des Tyrosinrings zu Dupletts aufspalten. Für das H^{ϵ} von Tyr762 kann die Zuordnung des Dupletts aus der Zuordnung von PKD2C680-796 (Kapitel 4.1.2) übertragen werden.

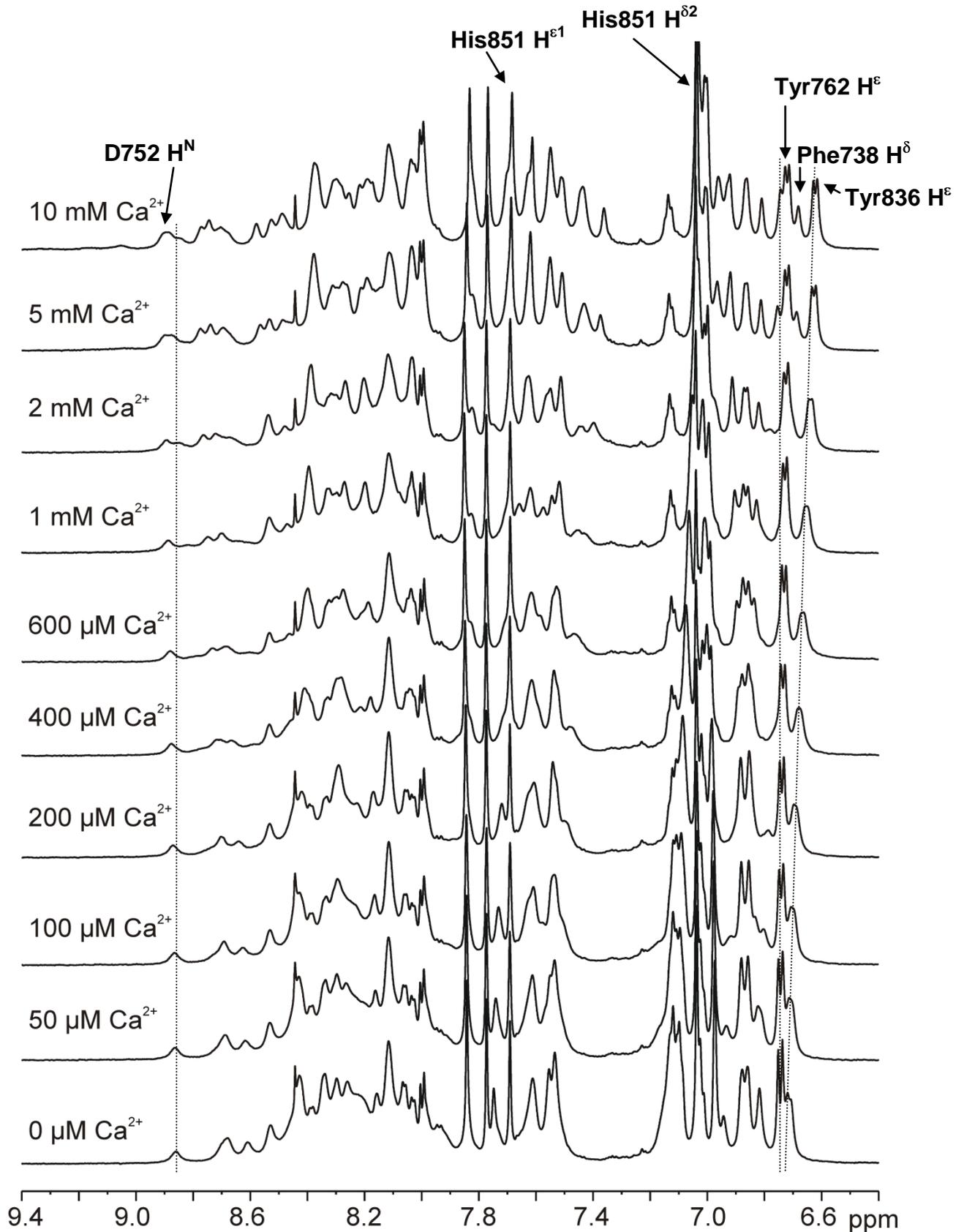


Abbildung 4.43 Calcium Titration von PKD2C725-880: $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 1 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Calciumchlorid wurde entsprechend der Beschriftung zugegeben. Die gestrichelten Linien markieren die Shifts der Signale des H^{N} von Asp752 und der H^{ϵ} von Tyr762/Tyr836 und werden in Abbildung 4.44 ausgewertet. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

Da in diesem Fragment nur zwei Tyrosine enthalten sind (Tyr762, Tyr836), muss es sich bei diesem Duplett um die H^ϵ von Tyr836 handeln. Das bedeutet, dass Teile in diesem Bereich des Proteins frei beweglich sein müssen. Tyr836 befindet sich am Anfang der Coiled-Coil-Domäne [28].

Das Fragment besitzt 6 Histidine (His750, His773, His775, His793, His822 und His851). Das bedeutet, die vier Histidine His750, His773, His775 und His793 überschneiden sich im Vergleich zu PKD2C680-796. Im Bereich der $H^{\epsilon 1}$ der Histidine, zwischen $\delta = 7.58-7.90$ ppm, sind in Abwesenheit von Ca^{2+} fünf Singulets mit unterschiedlicher Linienbreite zu sehen, in Anwesenheit von Ca^{2+} sieben Signale mit unterschiedlicher Linienbreite. Die zwei Signale der $H^{\epsilon 1}$ und $H^{\delta 2}$ von His851 können nach einem Vergleich mit den $1D-^1H$ -Spektren von PKD2C828-900 (Kapitel 4.9, Abbildung 4.67) zugeordnet werden. Damit ist auch bewiesen, dass die Entstehung der Schulter, die links des Signals des $H^{\epsilon 1}$ von His851 bei Ca^{2+} -Zugabe entsteht, auf Veränderungen in den Aminosäuren 828-880 zurückzuführen ist. Nur in diesem Bereich überschneiden sich beide Fragmente und beide Fragmente zeigen das Auftauchen der Schulter.

Die Shifts der Resonanzlinien in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration können verwendet werden, um die Bindung von Ca^{2+} an PKD2C725-880 zu charakterisieren. In Abbildung 4.44 sind die Bindungskurven der Shifts aus Abbildung 4.43 gezeigt. Das H^N von Asp752 zeigt einen K_D -Wert von $507 \mu M$. Das H^ϵ von Tyr836 weist einen K_D -Wert von $712 \mu M$. Die Auswertung des Shifts des H^ϵ von Tyr762 ergibt einen K_D -Wert von $652 \mu M$ auf. Die exakten Dissoziationskonstanten mit Fehler sind Tabelle 4.14 zu entnehmen.

Zusätzlich wurde noch der Shift der vier Alanine (Ala753, Ala757, Ala862, Ala873) in PKD2C725-880 (Abbildung 4.49, A) ausgewertet. Die Bindungskurven der Shifts sind in Abbildung 4.45 abgebildet und ergeben die K_D -Werte 674, 685, 660 und $672 \mu M$ für AlaA, AlaB, AlaC und AlaD. Die exakten Dissoziationskonstanten mit Fehlern sind Tabelle 4.15 zu entnehmen.

Es gibt also deutliche Hinweise dafür, dass die Bindung von Ca^{2+} an PKD2C725-880 strukturellen Einfluss auf den Bereich der Coiled-Coil-Domäne hat.

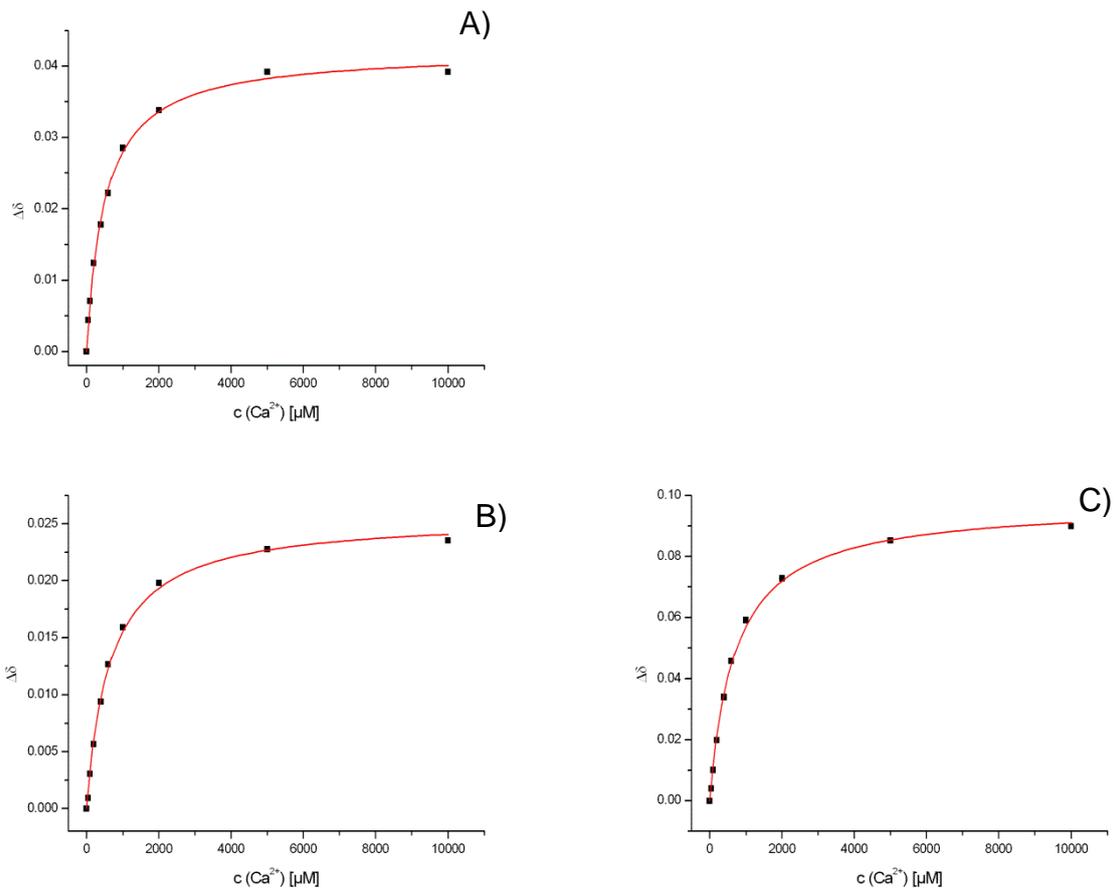


Abbildung 4.44 Bindungskurven der Interaktion von Ca^{2+} mit PKD2C725-880: Graph der Differenz der chemischen Verschiebung als Funktion der Konzentration von CaCl_2 . Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben. A) H^{N} von Asp752, B) H^{ϵ} von Tyr836 aus Abbildung 4.43 C) H^{ϵ} von Tyr762 Abbildung 4.43.

	K_{D}-Werte [μM]
H^{N} Asp752	507.01 ± 23.67
H^{ϵ} Tyr836	711.86 ± 35.05
H^{ϵ} Tyr762	652.32 ± 37.74

Tabelle 4.14 Berechnete K_{D} -Werte für die Titration von PKD2C725-880 mit Ca^{2+} : Die Werte wurden mit Formel 3.2 gefittet.

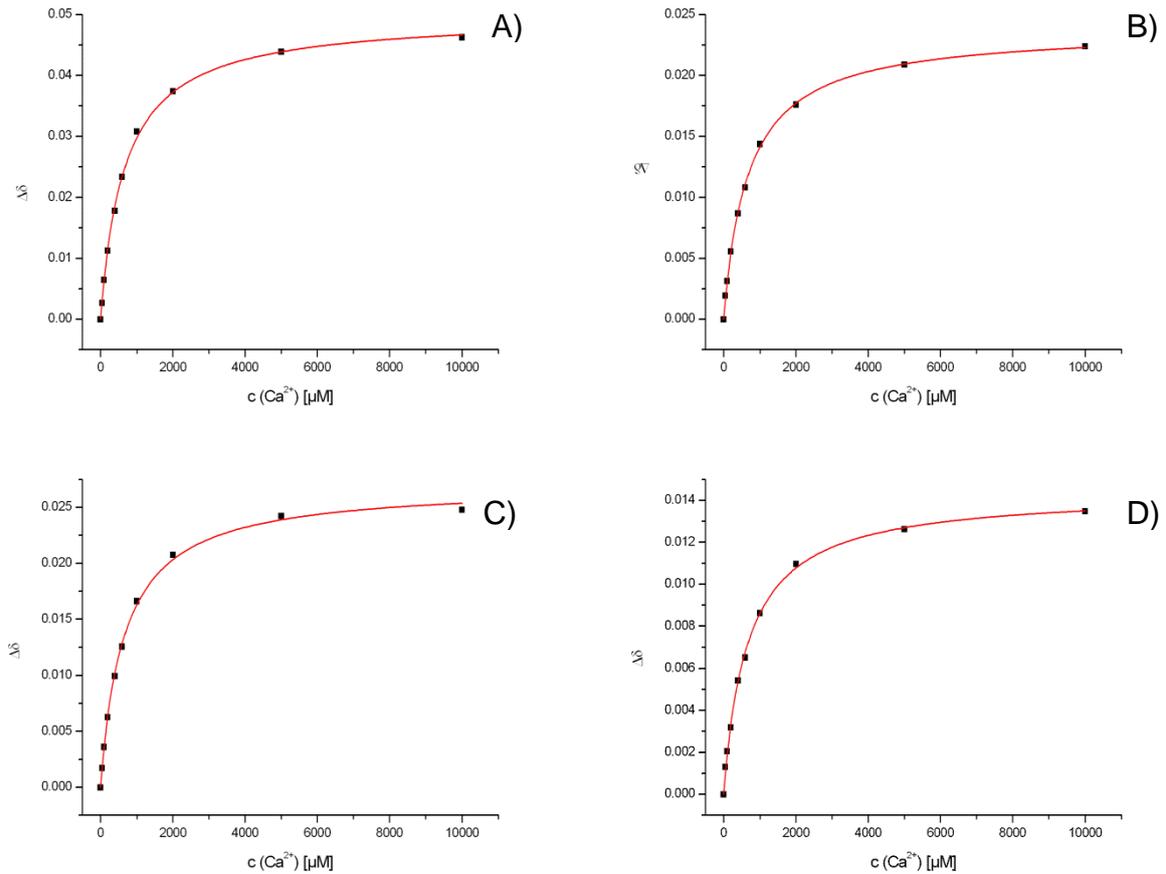


Abbildung 4.45 Bindungskurven der Interaktion von Ca^{2+} mit PKD2C725-880: Graph der Differenz der chemischen Verschiebung als Funktion der Konzentration von CaCl_2 . Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben. A) AlaA aus Abbildung 4.49, A; B) AlaB aus Abbildung 4.49, A; C) AlaC aus Abbildung 4.49, A; D) AlaD aus Abbildung 4.49, A.

	K_D-Werte [μM]
AlaA	673.75 ± 21.80
AlaB	684.88 ± 18.10
AlaC	659.55 ± 24.72
AlaD	672.45 ± 37.75

Tabelle 4.15 Berechnete K_D -Werte der Alanine für die Titration von PKD2C725-880 mit Ca^{2+} : Die Werte wurden mit Formel 3.2 gefittet.

4.6.1.2 Bestimmung des Aggregationszustandes in Lösung mittels $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Diffusionsmessungen

Um zu klären, ob der Aggregationszustand des Proteins in Lösung einen Einfluss auf die Linienbreiten hat, wurden $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Diffusionsmessungen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. Des Weiteren wurde untersucht, ob hohe Ca^{2+} -Konzentrationen während der Reinigung des Proteins einen Einfluss auf den Aggregationszustand haben. Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C725-880 in Lösung eine molekulare Masse von 35,881 g/mol (Abbildung 4.46, rot). Dies spricht bei einer molekularen Masse von 17,8 kDa für das Vorliegen eines Dimers in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} reduziert sich die scheinbare molekulare Masse auf 25,636 g/mol (Abbildung 4.46, grün) und entspricht damit eher einem Monomer. Auch der relative hydrodynamische Radius reduziert sich in Anwesenheit von Ca^{2+} um 9,8 % (Tabelle 4.16, weiß). Die Zugabe von Calcium führt also zu einer Änderung des Aggregationszustandes von PKD2C725-880 in Lösung.

Wurde das Protein während der Expression und Reinigung (Kapitel 3.1.5) hohen Ca^{2+} -Konzentrationen ausgesetzt, ergaben sich für die molekulare Masse in Lösung deutlich unterschiedliche Werte. Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C725-880 in Lösung eine molekulare Masse von 662,648 g/mol (Abbildung 4.47, rot). Dies spricht für das Vorliegen von hohen Aggregaten des Proteins in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} reduziert sich die scheinbare molekulare Masse auf 628,672 g/mol (Abbildung 4.47, grün). Die Zugabe von Calcium führt also zu keiner nennenswerten Änderung des Aggregationszustandes von PKD2C725-880 in Lösung (Tabelle 4.16, hellgrau).

Um die große Diskrepanz der zwei Diffusionsmessungen zu verifizieren, wurde PKD2C725-880 erneut in Abwesenheit von Ca^{2+} (Kapitel 3.1.4) gereinigt. Allerdings wurde innerhalb dieser Reinigung die Gelfiltrationssäule durch Umpuffern im Vivapsin ersetzt. Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C725-880 in Lösung eine molekulare Masse von 570,133 g/mol (Abbildung 4.48, rot). Dies spricht für das Vorliegen von hohen Aggregaten des Proteins in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} reduziert sich die scheinbare molekulare Masse auf 310,211 g/mol (Abbildung 4.48, grün). Die Zugabe von Calcium führt also zu einer deutlichen Änderung des Aggregationszustandes von PKD2C725-880 in Lösung (Tabelle 4.16, dunkelgrau).

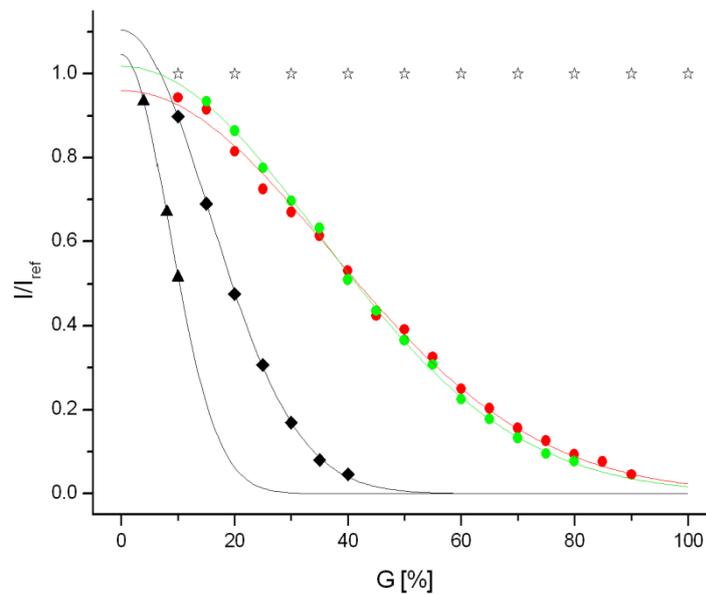


Abbildung 4.46 Aggregationszustand von PKD2C725-880 nach Reinigung in Abwesenheit von Ca^{2+} und Reinigung mittels Gelfiltrationssäule: Graph von I/I_{ref} als Funktion der relativen Gradientenstärke G . I repräsentiert die Signalintensität bei Gradientenstärke G und I_{ref} die Signalintensität der niedrigsten Gradientenstärke. Als Referenz wurde das DSS in der Probe verwendet. Die Stabilität des Gradientensystems wurde mit PAA überprüft. Das Signal von HDO in einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe wurde verwendet um die Diffusionskonstante D [99] zu berechnen, siehe Kapitel 3.4.2. $V=500 \mu\text{L}$, $c=1 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). *, PAA; \blacktriangle HDO, \blacklozenge DSS, \bullet PKD2C725-880 in Abwesenheit bivalenter Ionen, \bullet PKD2C725-880 in Anwesenheit von 10 mM CaCl_2 .

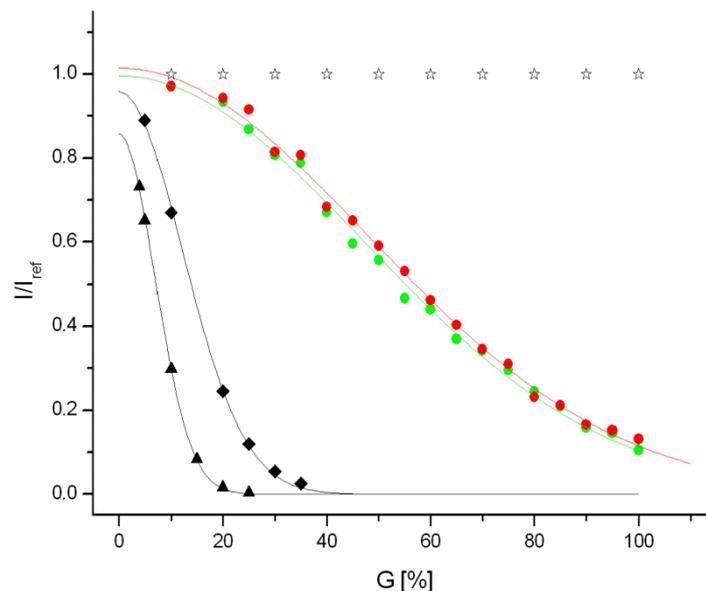


Abbildung 4.47 Aggregationszustand von PKD2C725-880 nach Reinigung in Anwesenheit von Ca^{2+} : Graph von I/I_{ref} als Funktion der relativen Gradientenstärke G . I repräsentiert die Signalintensität bei Gradientenstärke G und I_{ref} die Signalintensität der niedrigsten Gradientenstärke. Als Referenz wurde das DSS in der Probe verwendet. Die Stabilität des Gradientensystems wurde mit PAA überprüft. Das Signal von HDO in einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe wurde verwendet um die Diffusionskonstante D [99] zu berechnen, siehe Kapitel 3.4.2. $V=600 \mu\text{L}$, $c=1.33 \text{ mM}$ in MBP-Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl), $T = 298 \text{ K}$. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). *, PAA; \blacktriangle HDO, \blacklozenge DSS, \bullet PKD2C725-880 in Anwesenheit von 10 mM EDTA, \bullet PKD2C725-880 in Anwesenheit von 5 mM CaCl_2 .

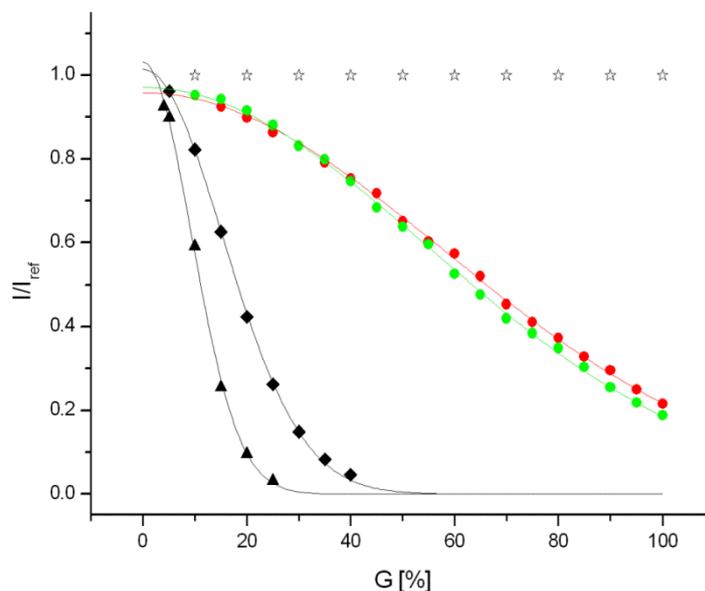


Abbildung 4.48 Aggregationszustand von PKD2C725-880 nach Reinigung in Abwesenheit von Ca^{2+} ohne Reinigung mittels Gelfiltrationssäule: Graph von I/I_{ref} als Funktion der relativen Gradientenstärke G . I repräsentiert die Signalintensität bei Gradientenstärke G und I_{ref} die Signalintensität der niedrigsten Gradientenstärke. Als Referenz wurde das DSS in der Probe verwendet. Die Stabilität des Gradientensystems wurde mit PAA überprüft. Das Signal von HDO in einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe wurde verwendet um die Diffusionskonstante D [99] zu berechnen, siehe Kapitel 3.4.2. $V=600 \mu\text{L}$, $c=1.33 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). *, PAA; \blacktriangle HDO, \blacklozenge DSS, \bullet PKD2C725-880 in Abwesenheit bivalenter Ionen, \bullet PKD2C725-880 in Anwesenheit von 10 mM CaCl_2 .

PKD2C	D^a	$R_h/R_{h,\text{DSS}}^b$	M_{exp}^c	M^d
	$10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$		$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
725-880	1.23 ± 0.05	5.62 ± 0.36	$34,881 \pm 3,341$	17,970
725-880, CaCl_2	1.36 ± 0.04	5.07 ± 0.27	$25,636 \pm 1,758$	
725-880	0.49 ± 0.02	15.00 ± 1.12	$662,648 \pm 69,316$	
725-880, CaCl_2	0.51 ± 0.02	14.74 ± 1.31	$628,672 \pm 91,932$	
725-880	0.59 ± 0.03	14.27 ± 1.38	$570,133 \pm 43,709$	
725-880, CaCl_2	0.67 ± 0.03	11.65 ± 1.10	$310,211 \pm 21,531$	

Tabelle 4.16 Molekulare Massen und hydrodynamische Radien von PKD2C725-880 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : a) Die Berechnung der Diffusionskonstante erfolgte über die Auswertung des Signalabfalls einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe als Funktion der Gradientenstärke. Die Diffusionskonstante von HDO bei 298 K beträgt $D_{\text{HDO}}(\text{in } \text{D}_2\text{O}) = 1.902 \pm 0.190 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ [100]. b) Verhältnis der hydrodynamischen Radien von PKD2C und DSS. c) Experimentell festgestellte molekulare Masse von PKD2C in Lösung. DSS ($M = 196.34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) wurde als Referenz verwendet. d) Molekulare Masse berechnet aus der Aminosäuresequenz.

Für die Auswertung der Diffusionsmessungen wurde der Signalabfall der gut aufgelösten Dupletts der Alanine zwischen $\delta = 1.2\text{-}1.5 \text{ ppm}$ (Abbildung 4.49) ausgewertet. Bei Betrachtung der Spektren in Abbildung 4.49 und Abbildung 4.50 ist gut zu erkennen, welchen Einfluss die Anwesenheit von hohen Ca^{2+} -

Konzentrationen während der Reinigung auf den Aggregationszustand von PKD2C725-880 hat (Abbildung 4.49, B und Abbildung 4.50, B). In Anbetracht der unterschiedlichen Ergebnisse für die Reinigung ohne Ca^{2+} muss es aber noch andere Faktoren geben die den Aggregationszustand und somit die Bildung von Oligomeren beeinflussen (Abbildung 4.49, A, C und Abbildung 4.50, A, C).

Bei Vergleich der Spektren für die Reinigung ohne Ca^{2+} (Abbildung 4.49, A, C und Abbildung 4.50, A, C) fallen auf den ersten Blick nur wenige Unterschiede auf. Die vier Alanine im Bereich zwischen $\delta = 1.2\text{-}1.5$ ppm sind in beiden Spektren alle gut zu sehen. Im Spektrum A ist die Aufspaltung der Dupletts der Alanine besser zu erkennen. Die Alanine befinden sich im Linker zwischen den beiden EF-Händen (Ala753) in EF-Hand 2 (Ala757) und in der Coiled-Coil-Domäne (Ala862 und Ala873). Ohne Ca^{2+} sind alle diese Bereiche also flexibel und frei beweglich im Protein. Nach Zugabe von Ca^{2+} shiften die Signale der vier Alanine für beide Spektren der Reinigung ohne Ca^{2+} (Kapitel 4.6.1.1 und Abbildung 4.49, A und C). Bei Betrachtung des Amidbereichs (Abbildung 4.50, A und C) fallen doch größere Unterschiede auf. Im Bereich zwischen $\delta = 6.50\text{-}7.20$ ppm gibt es, abgesehen von Intensitäten und Aufspaltung, z. B. der H^{ϵ} der Tyrosine, kaum Unterschiede. Zwischen $\delta = 7.20\text{-}7.36$ ppm sind im Spektrum C in Abbildung 4.50 breite Signale zu sehen, die im Spektrum A nicht vorhanden sind. Auch der Bereich der H^{ϵ} der Histidine weist deutliche Unterschiede auf. Die $1\text{D-}^1\text{H}$ -Spektren beider Reinigungen ohne Ca^{2+} zeigen die wie in Kapitel 4.6.1.1 beschriebenen Änderungen (Shift des H^{N} von Asp752, des H^{ϵ} von Tyr762 und 836, Erscheinen des Integrals des H^{δ} für Phe738), bei Ca^{2+} -Zugabe.

Vergleicht man nun die Spektren der Reinigung in Abwesenheit von Ca^{2+} (Abbildung 4.49, Abbildung 4.50 jeweils A und C) mit denen in Anwesenheit von Ca^{2+} (Abbildung 4.49, Abbildung 4.50 jeweils B) fällt auf den ersten Blick auf, dass die Spektren vollkommen verschieden sind. Die Linien der Spektren B sind deutlich breiter. Die Alanine sind praktisch nicht mehr zu sehen, liegen also nicht mehr so flexibel und frei beweglich vor. Die Linien der sechs Histidine sind, wenn überhaupt noch sichtbar, stark verbreitert. Die Zugabe von EDTA hat keine Auswirkungen auf die Linienbreiten. Allerdings zeigen sich die entgegengesetzten Reaktionen der für die Ca^{2+} -Bindung in den EF-Händen typischen Veränderungen. Das H^{N} von Asp752 und die H^{ϵ} von Tyr762 und 836 shiften genau in die andere Richtung und das Integral des H^{δ} für Phe738 verschwindet. Das Entfernen von Ca^{2+} aus den EF-Händen kann also die gebildeten hohen Aggregate nicht auflösen.

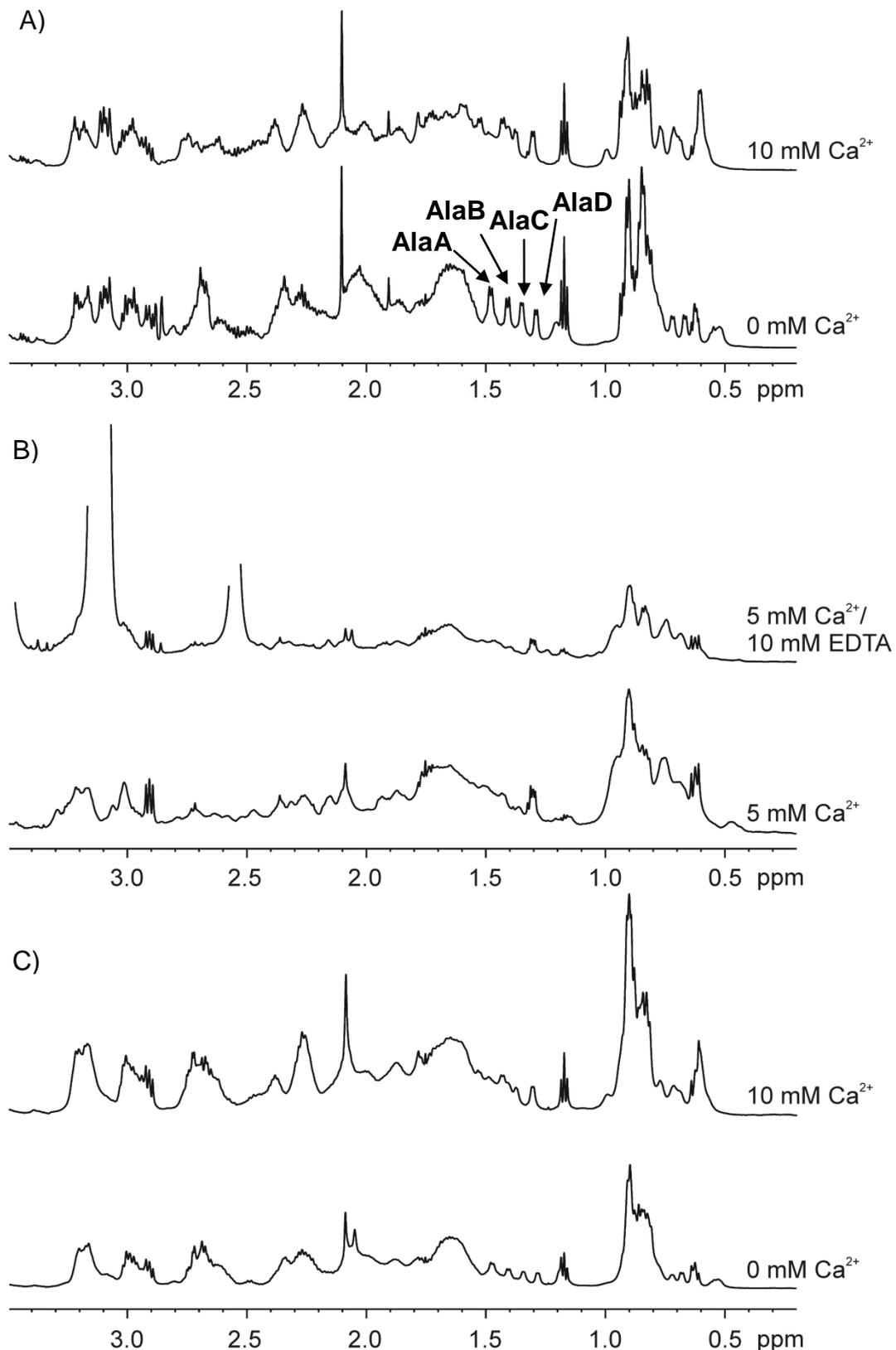


Abbildung 4.49 Vergleich des aliphatischen Bereichs der $1D-^1H$ -Spektren von PKD2C725-880 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} während der Reinigung: A) Spektrum nach Reinigung in Abwesenheit von Ca^{2+} , die Spektren gehören zur Auswertung in Abbildung 4.46. B) Spektrum nach Reinigung in Anwesenheit hoher Ca^{2+} -Konzentrationen, die Spektren gehören zur Auswertung in Abbildung 4.47. C) Spektrum nach Reinigung in Abwesenheit von Ca^{2+} , die Spektren gehören zur Auswertung in Abbildung 4.48. Für die Auswertung der Diffusionsmessungen wurde der Signalabfall der gut aufgelösten Dupletts der Alanine zwischen $\delta = 1.2-1.5$ ppm ausgewertet. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

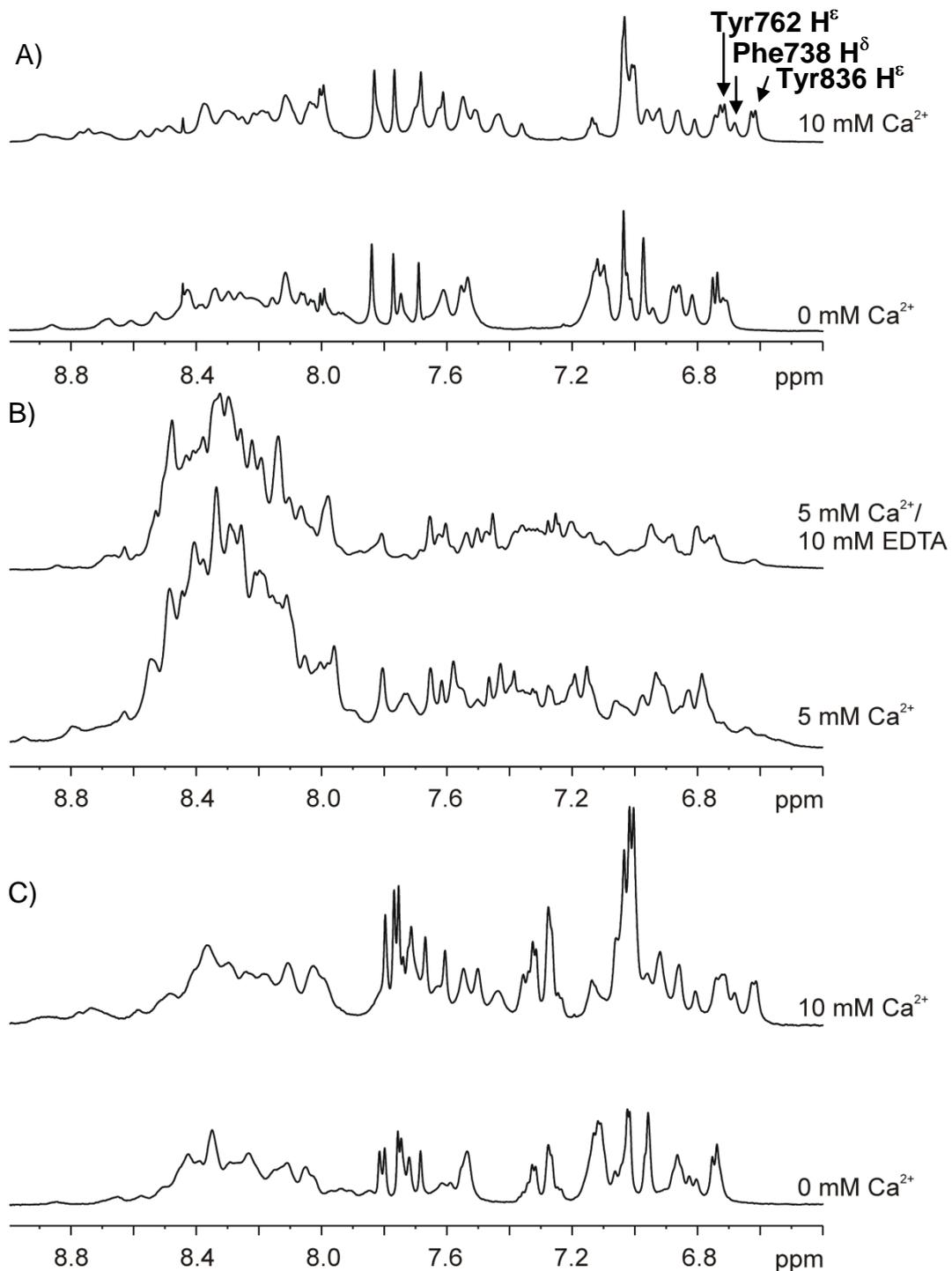


Abbildung 4.50 Vergleich des Amid-Bereichs der 1D- ^1H -Spektren von PKD2C725-880 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} während der Reinigung: A) Spektrum nach Reinigung in Abwesenheit von Ca^{2+} , die Spektren gehören zur Auswertung in Abbildung 4.46. B) Spektrum nach Reinigung in Anwesenheit hoher Ca^{2+} -Konzentrationen, die Spektren gehören zur Auswertung in Abbildung 4.47. C) Spektrum nach Reinigung in Abwesenheit von Ca^{2+} , die Spektren gehören zur Auswertung in Abbildung 4.48. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

4.6.1.3 NMR-spektroskopische Charakterisierung mittels 2D-(^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren

Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C725-880 zeigt in Abwesenheit von Calcium eine schlechte Auflösung und deutlich weniger als die zu erwartenden 156 Signale für die Amidprotonen des Proteinrückgrats (Abbildung 4.51, A). Nach Zugabe von Calcium zeigen sich mehr Signale (Abbildung 4.51, C). Allerdings sind immer noch nur ca 50 % der zu erwartenden Signale zu beobachten. Das Spektrum zeigt Signale, die scharf und gut aufgelöst sind. Allerdings sind vor allem im Bereich zwischen 7.5-8.5 ppm und 118-123 ppm viele Signale schlecht aufgelöst. Das Spektrum bei pH 6.5 zeigt etwas mehr Signale als das bei pH 7.0 (Abbildung 4.51, A, B). Die Erhöhung der Temperatur hingegen verschlechtert die Auflösung einiger Signale.

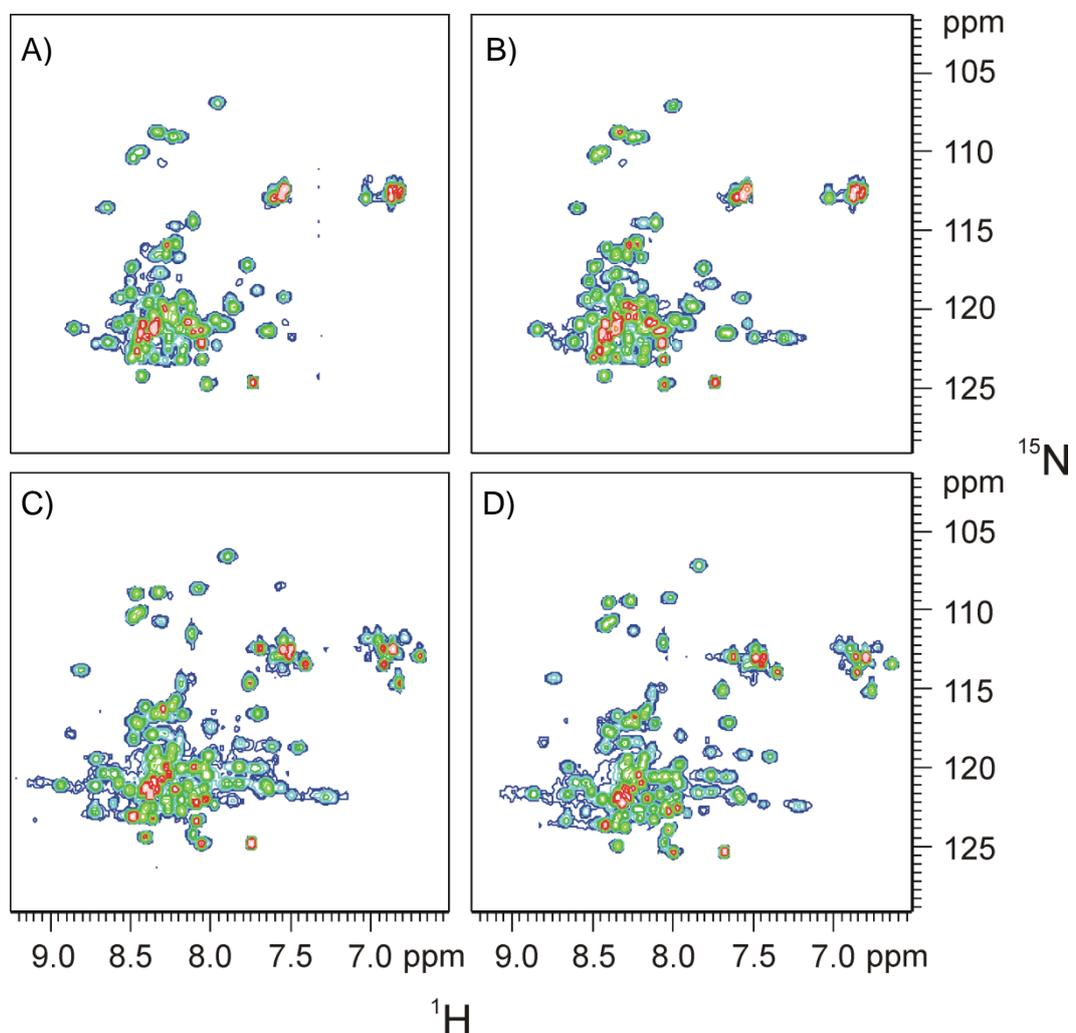


Abbildung 4.51 (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren von PKD2C725-880: A) $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 0.5 mM DTE, 25 mM Imidazol, pH 7.0, $T = 298 \text{ K}$. B) gleiche Probe und Bedingungen wie A aber pH 6.5. C) gleiche Probe und Bedingungen wie B aber Zugabe von 4 mM CaCl_2 . D) gleiche Probe wie C aber $T = 303 \text{ K}$. Alle Spektren wurden mit einer Lorentz-zu-Gauss Funktion ($GB = 0.12$ für ^1H und 0.1 für ^{15}N) prozessiert.

4.6.2 Zuordnung des (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrums

Mithilfe von 3D-(^1H - ^{15}N - ^{13}C)-NMR-Spektroskopie (Kapitel 3.3.2.3) konnte eine teilweise Zuordnung des Fragments PKD2C725-880 bei 278 K erfolgen. In Abbildung 4.52 sind die zugeordneten Aminosäuren benannt.

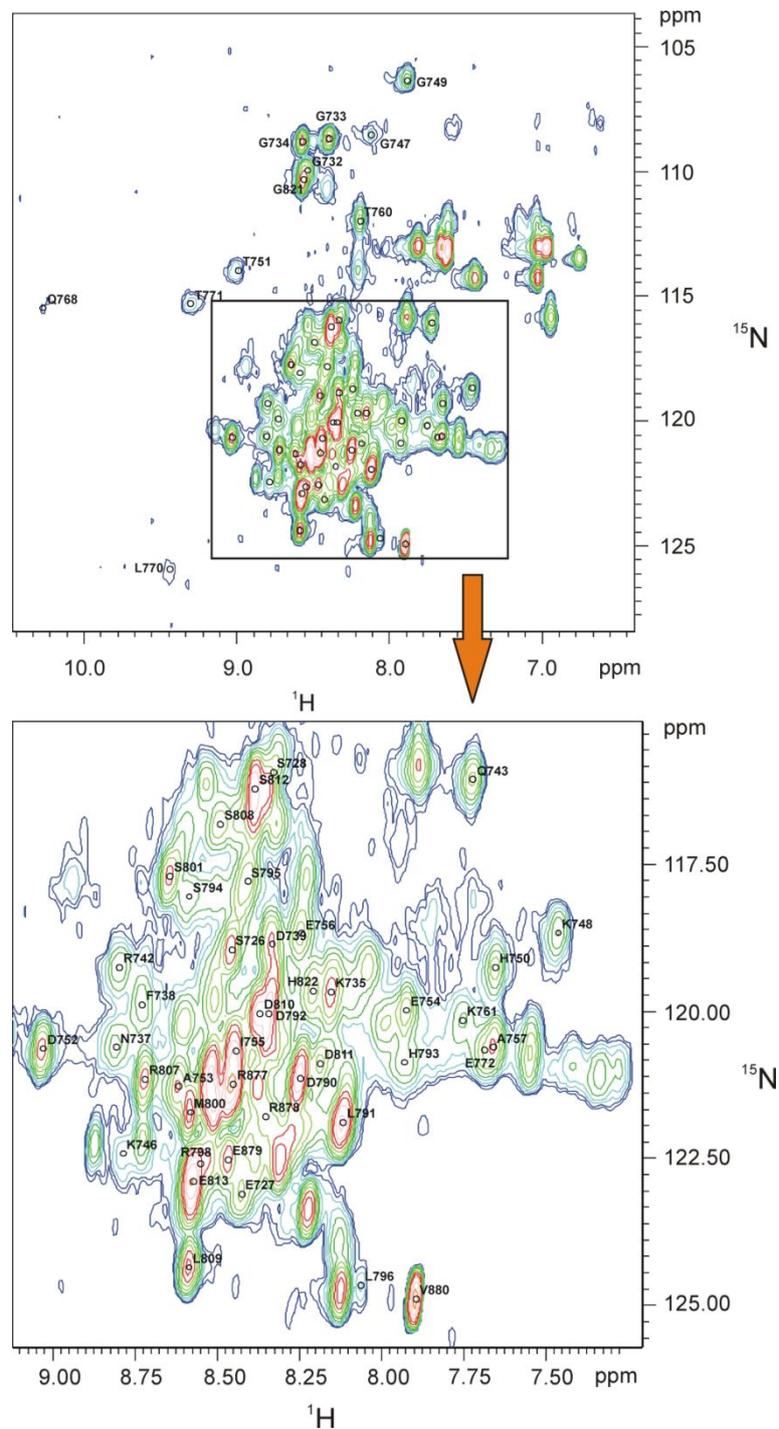


Abbildung 4.52 Zuordnung des (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrums von PKD2C725-880: $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 1.33 \text{ mM}$ in $20 \text{ mM Tris pH } 7.5$, 150 mM KCl , 5 mM CaCl_2 , $\text{pH } 7.50$, $T = 278 \text{ K}$. Das Spektrum wurden mit einer Lorentz-zu Gauss-Funktion ($GB = 0.12$ für ^1H und 0.1 für ^{15}N) prozessiert.

Die Aminosäuren der beiden EF-Hände, des Linkers zwischen den beiden EF-Händen und die Aminosäuren im Bereich zwischen der EF-Hand 2 und der Coiled-Coil-Domäne konnten zum großen Teil zugeordnet werden. Insgesamt wurden 53 der 156 Aminosäuren des Proteins und 53 der 83 sichtbaren Amidprotonen im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum zugeordnet.

4.6.3 Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} mittels CD-Spektroskopie

Um Informationen über die Sekundärstruktur und deren Änderung durch Ca^{2+} -Bindung zu erhalten, wurden CD-Spektren aufgenommen und analysiert. Die beobachteten CD-Spektren sind in Abbildung 4.53 gezeigt. Das rote Spektrum wurde ohne Ca^{2+} und das grüne Spektrum in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} aufgenommen. Die Spektren sind typisch für ein partiell gefaltetes Protein und zeigen kleine Änderungen in der Sekundärstruktur in Anwesenheit von Ca^{2+} .

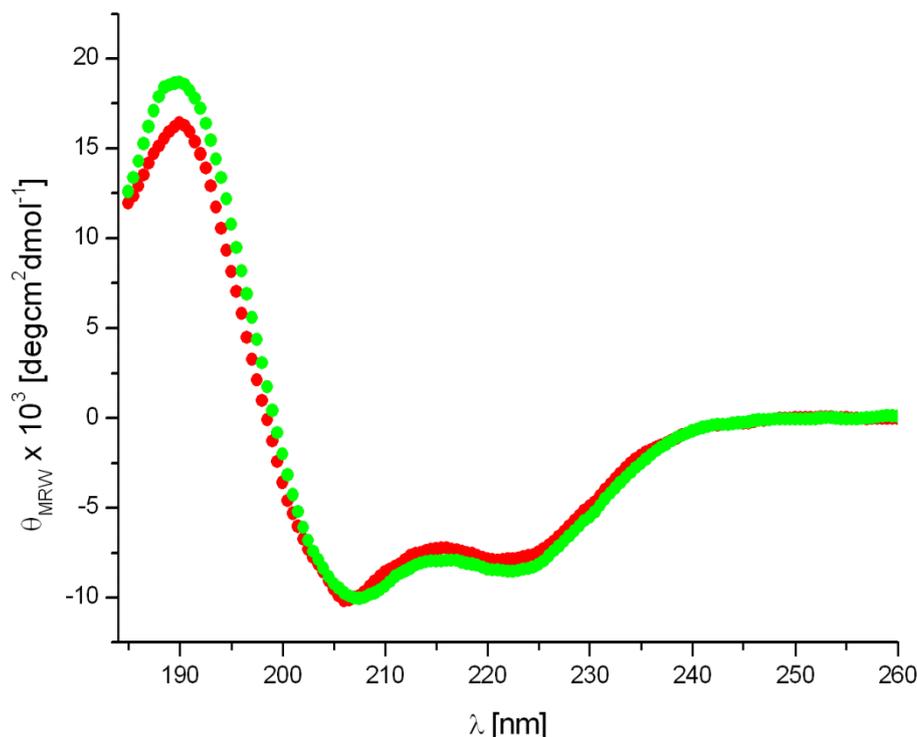


Abbildung 4.53 CD-Spektren von PKD2C725-880 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Die Probe enthielt 50 μM Protein in CD-Messpuffer (10 mM Tris pH 7.5) vor (rot) und nach (grün) der Zugabe von 2 mM CaCl_2 . Die Messungen wurden bei R. T. durchgeführt.

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C725-880 eine Zusammensetzung aus 25 % α -Helix, 22 % β -Faltblatt, 21 % Schleifen und 32 % ungeordnet. Nach Bindung von Ca^{2+} ändert sich die Zusammensetzung der Sekundärstruktur in 31 % α -Helix, 20 % β -Faltblatt, 20 % Schleifen und 29 % ungeordnet.

PKD2C	α -Helix	β -Faltblatt	Schleife	ungeordnet
725-880	25%	22%	21%	32%
725-880, CaCl_2	31%	20%	20%	29%

Tabelle 4.17 Sekundärstrukturanalyse von PKD2C725-880 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Die Daten wurden mithilfe des Online Servers DICHROWEB [118] mit dem Referenzset Set3 [122] ausgewertet.

4.7 Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C680-968

Das Fragment PKD2C680-968 besitzt zwei EF-Hände (Aminosäuren 727-739 und 763-774) [5, 26], zwei Coiled-Coil-Domänen (Aminosäuren 781-796 und 835-873) [27-28] und ein ER-Retentionssignal (Aminosäuren 787-820) [8].

4.7.1 Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ^1H - und 2D-(^1H - ^{15}N)-NMR-Spektroskopie

Das Fragment zeigt in Anbetracht seiner Größe von 32.6 kDa im ^1H -Spektrum (Abbildung 4.54) überwiegend sehr schmale Linienbreiten aber zu wenig Signale insgesamt. Im Bereich um 0 ppm sind hochfeldverschobene Signale (Methylprotonen im hydrophoben Kern des Proteins) zu sehen. Das ^1H -Spektrum ist typisch für ein partiell gefaltetes Protein.

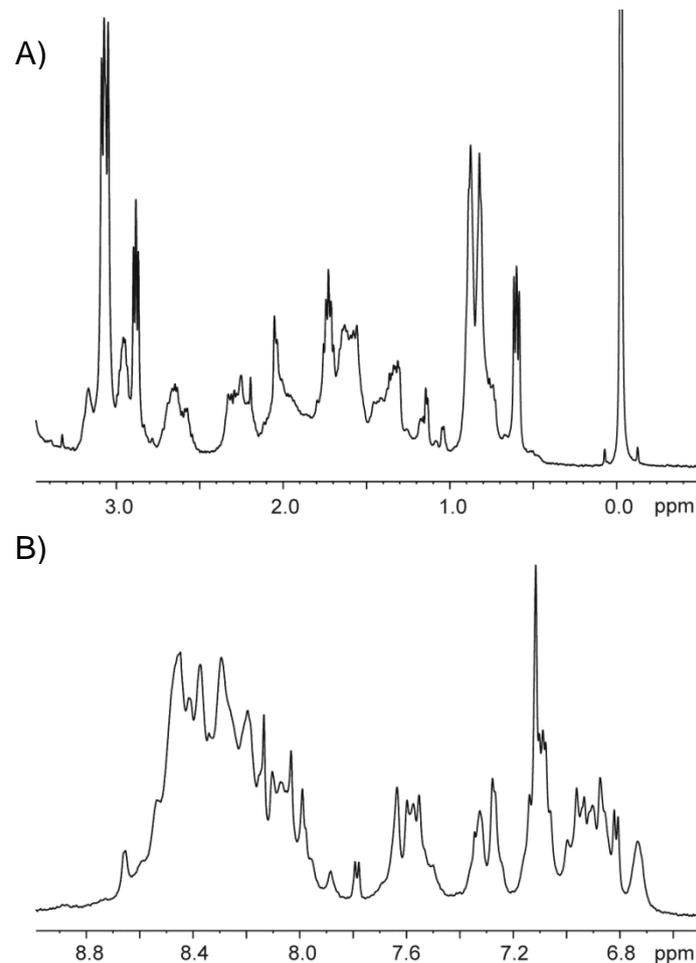


Abbildung 4.54 Ausschnitte aus dem $1D$ - 1H -Spektrum von PKD2C680-968 in Abwesenheit von Ca^{2+} : $V = 720 \mu L$, $c = 0.34 \text{ mM}$ in $20 \text{ mM Tris pH } 7.5$, 150 mM KCl , 20 mM EDTA , $T = 298 \text{ K}$. Das Spektrum wurde exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). A) Aliphatischer Bereich mit DSS (abgeschnitten) bei 0 ppm . B) Amidbereich.

4.7.1.1 Interaktion mit Ca^{2+}

Das Fragment PKD2C680-968 besitzt zwei EF-Hände [26]. Nun war es interessant herauszufinden, ob dieses Fragment ähnliche Veränderungen in Anwesenheit von Ca^{2+} zeigt, wie es bereits die untersuchten Fragmente PKD2C680-796 (Kapitel 4.1.1.1) und PKD2C725-880 (Kapitel 4.6.1.1) getan haben. Um die Interaktion mit Ca^{2+} zu untersuchen, wurden zwei Ansätze betrachtet.

In Abbildung 4.55 A wurde das Fragment in Anwesenheit von 20 mM EDTA im ersten Schritt mit $10 \text{ mM } CaCl_2$ versetzt. Daraufhin war eine starke weißliche Trübung im NMR-Röhrchen zu sehen. Nach Zentrifugation des Niederschlags kann man im 1H -Spektrum deutliche Änderungen sehen. Die Bindung von Ca^{2+} an PKD2C680-968 kann aber erst bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 23 mM , also einem Überschuss im Vergleich zum EDTA, nachgewiesen werden. Wie auch schon für die Fragmente PKD2C680-796 (Kapitel 4.1.1.1) und PKD2C725-880 (Kapitel 4.6.1.1) zeigt sich die Ca^{2+} -Bindung auch für PKD2C680-968 durch den Shift des H^N von Asp752 und das

Erscheinen des Signals des H^δ von Phe738. Des Weiteren ändert sich das Spektrum im Vergleich zum ersten $CaCl_2$ -Titrationsschritt kaum.

In Abbildung 4.55 B wurde das Fragment in Abwesenheit von 20 mM EDTA mit 5 mM $CaCl_2$ versetzt. Im Vergleich zu obigem Vorgehen, ist keine Trübung im NMR-Röhrchen zu beobachten. Im 1H -Spektrum zeigt sich die Ca^{2+} Bindung erneut durch den Shift des H^N von Asp752 und das Erscheinen des Signals des H^δ von Phe738. Im Übrigen ändert sich das Spektrum kaum.

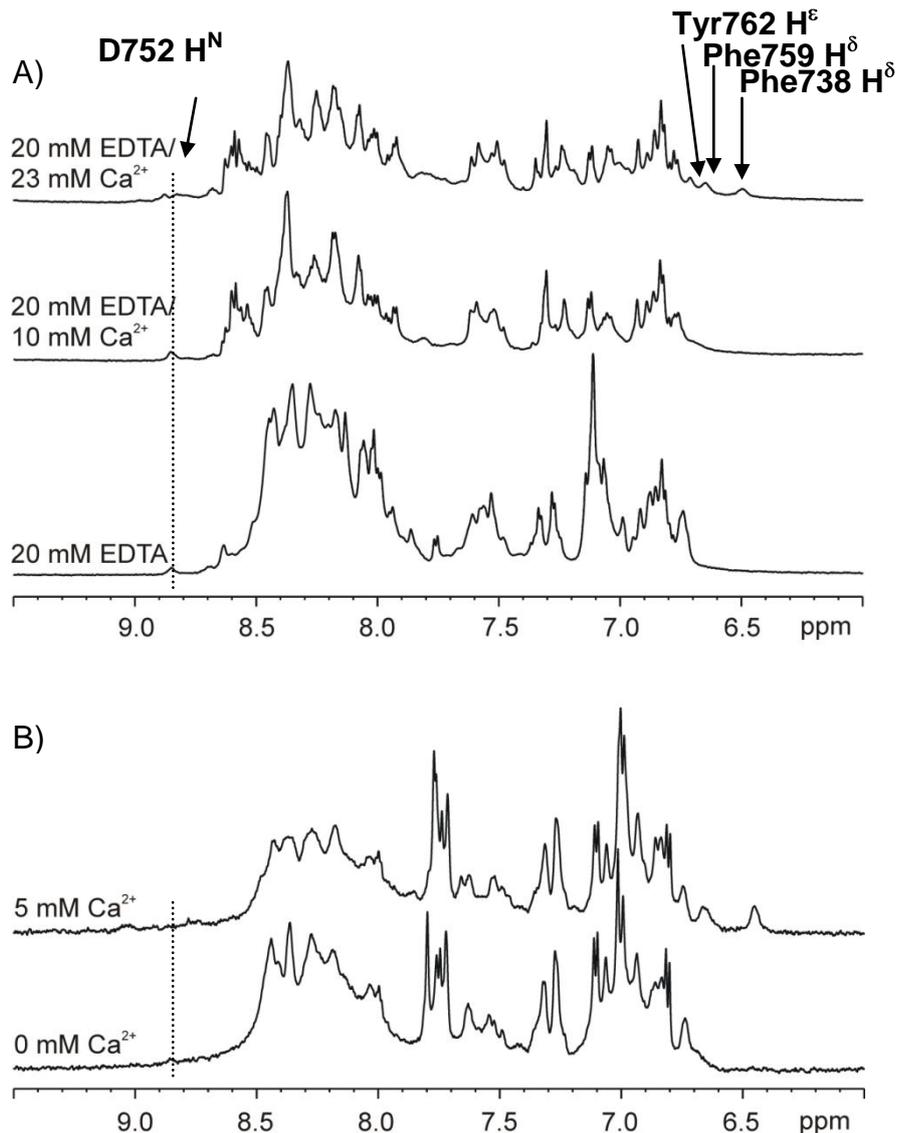


Abbildung 4.55 Calcium Titration von PKD2C680-968 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : A) $V = 720 \mu L$, $c = 0.34 \text{ mM}$ in 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 20 mM EDTA, $T = 298 \text{ K}$. Calciumchlorid wurde entsprechend der Beschriftung zugegeben. Im Rahmen dieser Ca^{2+} -Titration wurden die Diffusionsmessungen durchgeführt. B) $V = 500 \mu L$, $c = 200 \mu M$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Calciumchlorid wurde entsprechend der Beschriftung zugegeben. Die gestrichelte Linie zeigt den Shift des H^N von Asp752, angeschrieben ist außerdem das Erscheinen des H^δ von Phe738, bei Bindung der EF-Hände an Ca^{2+} . Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

Die Spektren mit Ca^{2+} -Überschuss unterscheiden sich in An- und Abwesenheit von EDTA deutlich. Gut zu erkennen ist, dass im $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Bereich der Histidine zwischen $\delta = 7.39\text{--}7.89$ ppm im Falle der Abwesenheit von EDTA, sechs schmale Linien zu sehen sind. Diese fehlen vollständig in Anwesenheit von EDTA.

Vergleicht man die Spektren mit denen von PKD2C680-796 (Kapitel 4.1) fällt auf, dass die H^{ϵ} von Tyr762 und die H^{δ} von Phe759 und Phe738 gut zu erkennen sind und daher die Zuordnung aus Kapitel 4.1.2 übertragen werden kann. Die zugeordneten H^{ϵ} von Tyr836 im Fragment PKD2C725-880 (Kapitel 4.6) sind in PKD2C680-968 nicht mehr zu sehen.

4.7.1.2 Bestimmung des Aggregationszustandes in Lösung mittels $1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ -Diffusionsmessungen

Um zu klären, ob der Aggregationszustand des Proteins in Lösung einen Einfluss auf die Linienbreiten hat, wurden $1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ -Diffusionsmessungen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. Der Signalabfall der Proteinsignale im Amidbereich und zwischen 0 und 2 ppm wurde gegen den angelegten Gradienten aufgetragen. Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C680-968 in Lösung eine molekulare Masse von 55,717 g/mol (Abbildung 4.56, rot). Dies spricht bei einer molekularen Masse von 32.6 kDa für das Vorliegen eines Dimers in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} reduziert sich die scheinbare molekulare Masse deutlich auf 25,609 g/mol (Abbildung 4.56, grün). Auch der relative hydrodynamische Radius reduziert sich in Anwesenheit von Ca^{2+} um 22.8 % (Tabelle 4.18). Die Zugabe von Calcium führt also zu einer Änderung des Aggregationszustandes von PKD2C680-968 in Lösung von einem Dimer zu einem Monomer. Die Diffusionsmessungen wurden im Rahmen der Ca^{2+} -Titration in Abbildung 4.55, A durchgeführt.

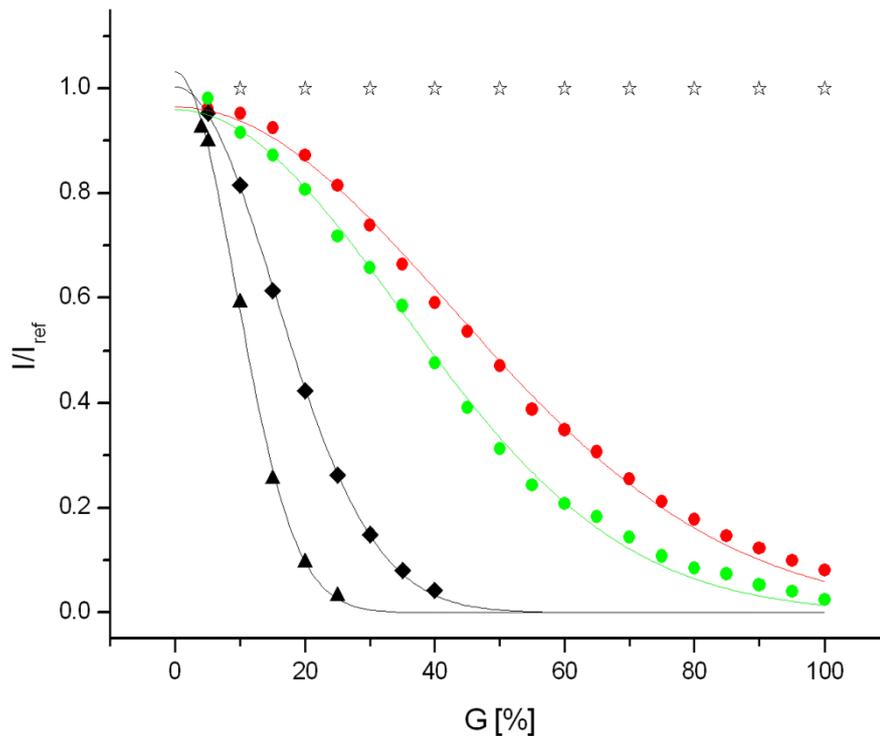


Abbildung 4.56 Aggregationszustand von PKD2C680-968 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Graph von I/I_{ref} als Funktion der relativen Gradientenstärke G . I repräsentiert die Signalintensität bei Gradientenstärke G und I_{ref} die Signalintensität der niedrigsten Gradientenstärke. Als Referenz wurde das DSS in der Probe verwendet. Die Stabilität des Gradientensystems wurde mit PAA überprüft. Das Signal von HDO in einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe wurde verwendet um die Diffusionskonstante D [99] zu berechnen, siehe Kapitel 3.4.2. $V = 720 \mu\text{L}$, $c = 0.34 \text{ mM}$ in 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 20 mM EDTA, $T = 298 \text{ K}$. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). *, PAA; \blacktriangle HDO, \blacklozenge DSS, \bullet PKD2C680-968 in Anwesenheit 20 mM EDTA, \bullet PKD2C680-968 in Anwesenheit von 10 mM CaCl_2 .

PKD2C	D^a	$R_h/R_{h,\text{DSS}}^b$	M_{exp}^c	M^d
	$10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$		$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
680-968	1.11 ± 0.06	6.57 ± 0.74	$55,717 \pm 6,824$	32,635
680-968, CaCl_2	1.66 ± 0.10	5.07 ± 0.53	$25,609 \pm 2,517$	

Tabelle 4.18 Molekulare Massen und hydrodynamische Radien von PKD2C680-968 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : a) Die Berechnung der Diffusionskonstante erfolgte über die Auswertung des Signalabfalls einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe als Funktion der Gradientenstärke. Die Diffusionskonstante von HDO bei 298 K beträgt $D_{\text{HDO}}(\text{in } \text{D}_2\text{O}) = 1.902 \pm 0.190 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ [100]. b) Verhältnis der hydrodynamischen Radien von PKD2C und DSS. c) Experimentell festgestellte molekulare Masse von PKD2C in Lösung. DSS ($M = 196.34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) wurde als Referenz verwendet. d) Molekulare Masse berechnet aus der Aminosäuresequenz.

4.7.1.3 NMR-spektroskopische Charakterisierung mittels 2D-(^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren

Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-968 zeigt in Anwesenheit von Calcium eine schlechte Auflösung und deutlich weniger als die zu erwartenden 288 Signale für die Amidprotonen des Proteinerückgrats (Abbildung 4.57). Das Spektrum zeigt Signale die scharf und gut aufgelöst sind. Allerdings sind vor allem im Bereich zwischen 7.5-8.5 ppm und 115-125 ppm viele Signale schlecht aufgelöst. Des Weiteren liegen einige Signale im Random-Coil-Bereich.

Bei Vergleich des (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrums von PKD2C680-968 (Abbildung 4.57) mit dem (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796 (Abbildung 4.5) fällt auf, dass die gut aufgelösten Signale den EF-Händen und des Linkers dazwischen zugeordnet werden können.

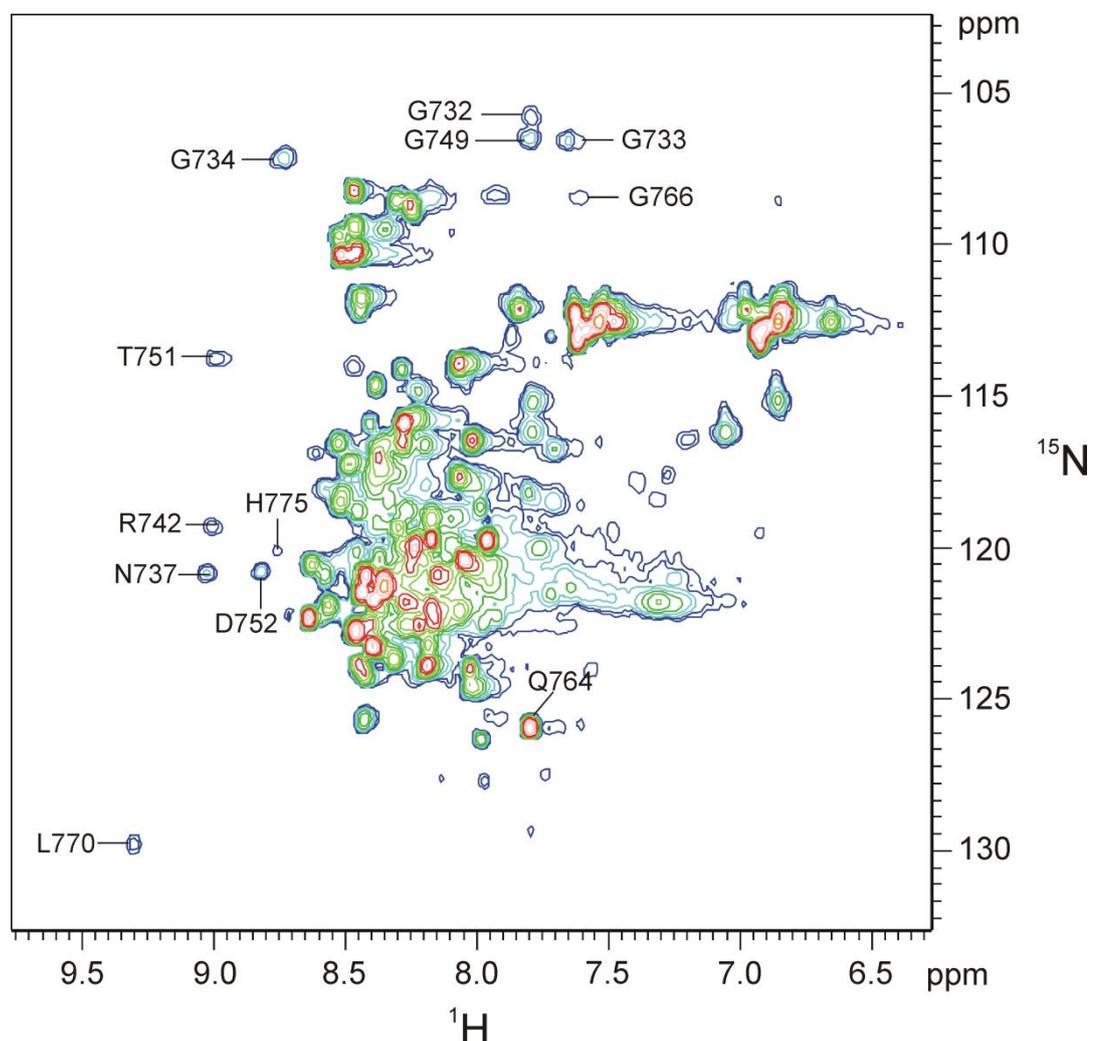


Abbildung 4.57 (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren von PKD2C680-968: A) $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in $20 \text{ mM Tris pH } 7.5$, 150 mM KCl , 1 mM DTE , 0.56 mM CaCl_2 , $T = 298 \text{ K}$, $\text{pH } 6.8$. Das Spektrum wurden mit einer Lorentz-zu-Gauss Funktion ($\text{GB} = 0.12$ für ^1H und 0.1 für ^{15}N) prozessiert.

4.7.2 Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} mittels CD-Spektroskopie

Um Informationen über die Sekundärstruktur und deren Änderung durch Ca^{2+} zu erhalten, wurden CD-Spektren aufgenommen und analysiert. Die beobachteten CD-Spektren sind in Abbildung 4.58 für PKD2C680-968 gezeigt. Das rote Spektrum wurde ohne Ca^{2+} und das grüne Spektrum in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} aufgenommen. Die Spektren sprechen für eine überwiegend α -helikale Struktur in Lösung. Des Weiteren findet man einen deutlichen ungeordneten Anteil und es ergeben sich kleine Änderungen in der Sekundärstruktur in Anwesenheit von Ca^{2+} .

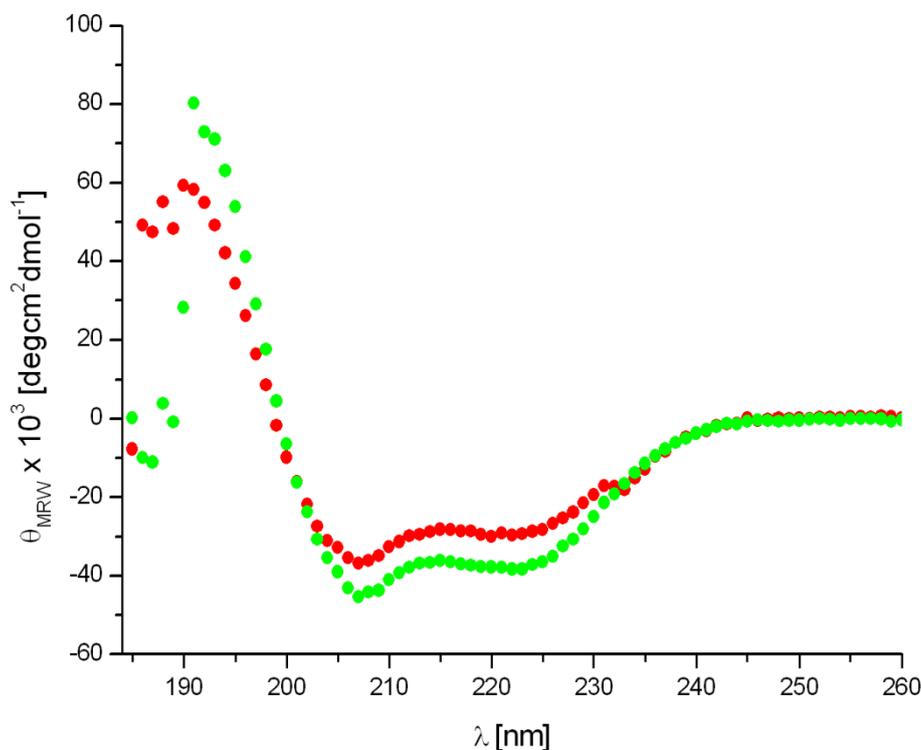


Abbildung 4.58 CD-Spektren von PKD2C680-968 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Die Probe enthielt 10 μM Protein in CD-Messpuffer (10 mM Tris pH 7.5) vor (rot) und nach (grün) der Zugabe von 5 mM CaCl_2 . Die Messungen wurden bei R. T. durchgeführt.

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C680-968 eine Zusammensetzung aus 52 % α -Helix, 24 % β -Faltblatt, 7 % Schleifen und 18 % ungeordnet. Nach Bindung von Ca^{2+} ändert sich die Zusammensetzung der Sekundärstruktur in 55 % α -Helix, 19 % β -Faltblatt, 7 % Schleifen und 19 % ungeordnet (Tabelle 4.19).

PKD2C	α -Helix	β -Faltblatt	Schleife	ungeordnet
680-968	52%	24%	7%	18%
680-968, CaCl ₂	55%	19%	7%	19%

Tabelle 4.19 Sekundärstrukturanalyse von PKD2C680-968 in An- und Abwesenheit von Ca²⁺: Die Daten wurden mithilfe des Online Servers DICHROWEB [118] mit dem Referenzset Set3 [122] ausgewertet.

4.8 Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C797-968

Das Fragment PKD2C797-968 besitzt eine Coiled-Coil Domäne (Aminosäuren 835-873) [28] und Teile des ER-Retentionssignals (Aminosäuren 787-820) [8].

4.8.1 Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D-¹H- und 2D-(¹H-¹⁵N)-NMR-Spektroskopie

Das Fragment zeigt bei einer Größe von 19.1 kDa im ¹H-Spektrum normale Linienbreiten aber zu wenig Signale insgesamt (Abbildung 4.59). Einige Signale sind gut aufgelöst (z. B. drei Alanine von sechs zwischen 1.2 und 1.5 ppm) und zeigen schmale Linien. Im Bereich um 0 ppm sind keine hochfeldverschobenen Signale (Methylprotonen im hydrophoben Kern des Proteins) zu sehen. Das ¹H Spektrum ist typisch für ein partiell gefaltetes Protein.

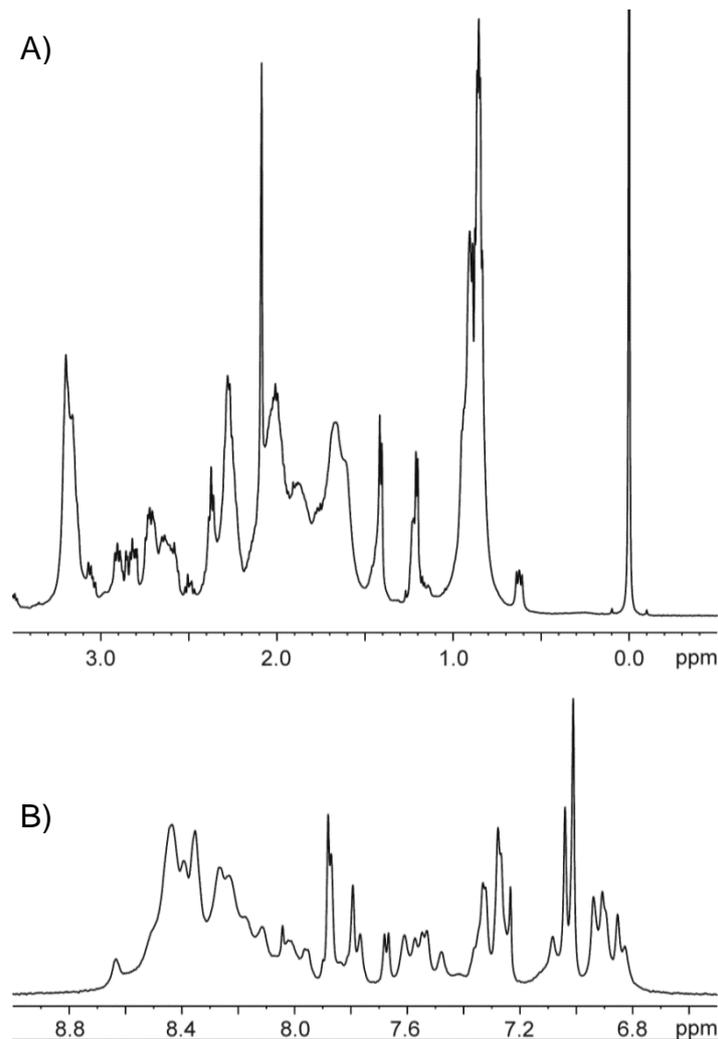


Abbildung 4.59 Ausschnitte aus dem $1D\text{-}^1\text{H}$ -Spektrum von PKD2C797-968 in Abwesenheit von Ca^{2+} : $V = 500\ \mu\text{L}$, $c = 1\ \text{mM}$ in $20\ \text{mM}$ Tris pH 7.5, $150\ \text{mM}$ KCl, $20\ \text{mM}$ EDTA, $T = 298\ \text{K}$. Das Spektrum wurde exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung $2\ \text{Hz}$). A) Aliphatischer Bereich mit DSS (abgeschnitten) bei $0\ \text{ppm}$. B) Amidbereich.

4.8.1.1 Interaktion mit den bivalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+}

Um die Interaktion mit Ca^{2+} zu untersuchen, wurden zwei Ansätze betrachtet.

In Abbildung 4.60 wurde das Fragment mit $10\ \text{mM}$ CaCl_2 versetzt. Daraufhin war eine starke weißliche Trübung im NMR-Röhrchen zu sehen. Nach Zentrifugation des Niederschlags kann man im ^1H -Spektrum - bis auf den Shift der Resonanzen der fünf Histidine (His822, His851, His901, His927 und His967) - nur eine Verbreiterung der Linien sehen. Für das Signal der CH_3 -Gruppen des Tris-Puffers wird ein Shift von $0.30\ \text{Hz}$ bei Ca^{2+} -Zugabe beobachtet. Das bedeutet, die Veränderungen in den Signalen der fünf Histidine lassen sich also durch eine Änderung des pH-Wertes erklären.

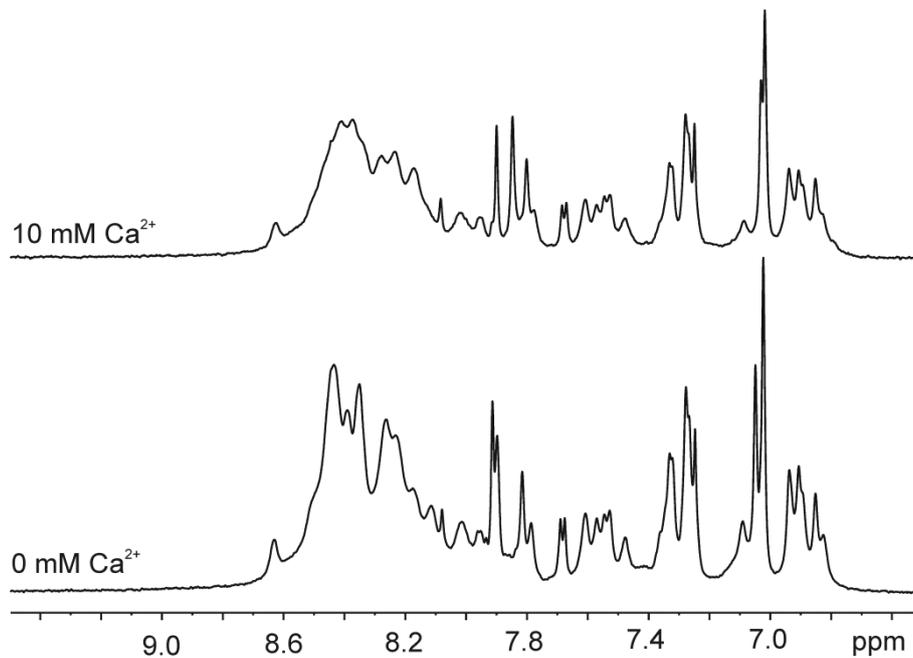


Abbildung 4.60 Titration von PKD2C797-968 mit Ca^{2+} : $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in MBP-Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl), $T = 298 \text{ K}$. Im Rahmen dieser Ca^{2+} -Titration wurde die Diffusionsmessung aus Abbildung 4.62 durchgeführt. Calciumchlorid wurde entsprechend der Beschriftung zugegeben. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt Ca^{2+} spezifisch ist, wurde, wie in Abbildung 4.61 gezeigt, PKD2C797-968 zuerst mit 10 mM MgCl_2 titriert. Hierbei wurde keine weißliche Trübung beobachtet. Im ^1H -Spektrum sind wieder nur Änderungen in den Resonanzen der $\text{H}^{\epsilon 1}$ der Histidine ($\delta = 7.70\text{--}8.10 \text{ ppm}$) zu sehen. Im nächsten Schritt wurden noch 10 mM CaCl_2 zugegeben. Daraufhin war eine starke weißliche Trübung im NMR-Röhrchen zu erkennen. Nach Zentrifugation des Niederschlags kann man im ^1H -Spektrum nach Zugabe von Ca^{2+} keine weiteren Änderungen erkennen. Für das Signal der CH_3 -Gruppen des Tris-Puffers wird ein Shift von 1.00 Hz bei Ca^{2+} -Zugabe beobachtet. Das bedeutet, die Veränderungen in den Signalen der fünf Histidine lassen sich also durch eine Änderung des pH-Wertes erklären. Dabei spielt es keine Rolle ob es sich um Mg^{2+} oder Ca^{2+} handelt.

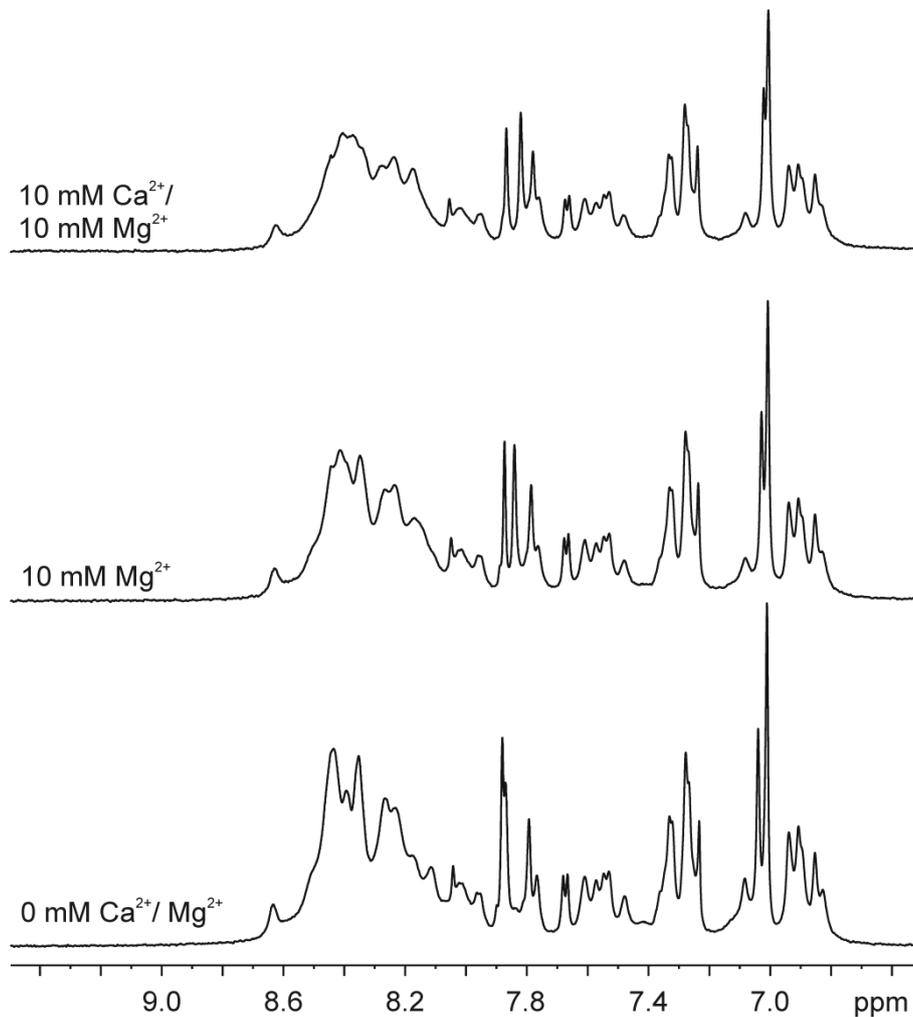


Abbildung 4.61 Titration von PKD2C797-968 mit Mg^{2+} und Ca^{2+} : $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in MBP-Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl), $T = 298 \text{ K}$. Im Rahmen dieser Ca^{2+}/Mg^{2+} -Titration wurde die Diffusionsmessung aus Abbildung 4.63 durchgeführt. Calcium- und Magnesiumchlorid wurden entsprechend der Beschriftung zugegeben. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

4.8.1.2 Bestimmung des Aggregationszustandes in Lösung mittels $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Diffusionsmessungen

Um den Aggregationszustand des Proteins in Lösung zu erhalten, wurden $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Diffusionsmessungen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} durchgeführt. Der Signalabfall der Proteinsignale zwischen 0 und 3 ppm wurde gegen den angelegten Gradienten aufgetragen. Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C797-968 im Rahmen der Titration aus Abbildung 4.60 in Lösung eine molekulare Masse von 616,434 g/mol (Abbildung 4.62, rot). Dies spricht bei einer molekularen Masse von 19.1 kDa für das Vorliegen hoher Aggregate in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} erhöht sich die scheinbare molekulare Masse auf 683,246 g/mol (Abbildung 4.62, grün). Auch der relative hydrodynamische Radius erhöht sich in Anwesenheit von Ca^{2+} um 3.4 %. Die Zugabe von Calcium führt im Rahmen des Fehlers (Tabelle 4.20, weiß) zu keiner Änderung des Aggregationszustandes von PKD2C797-968 in Lösung.

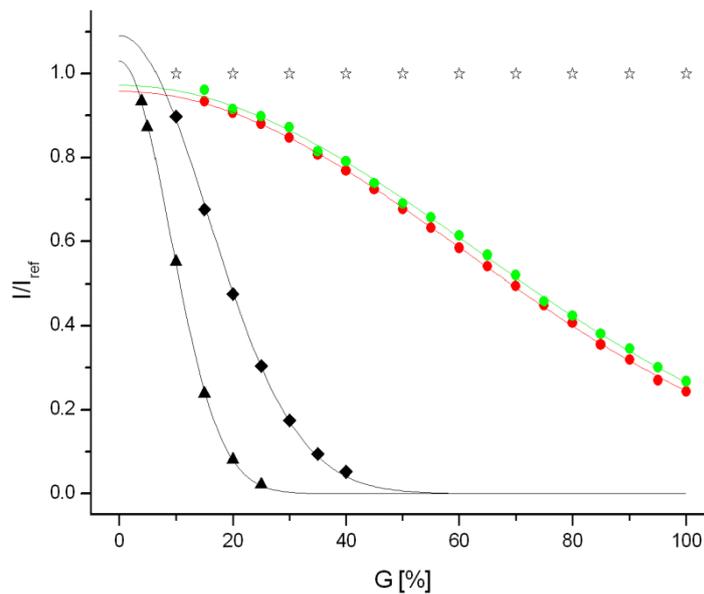


Abbildung 4.62 Aggregationszustand von PKD2C797-968 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Graph von I/I_{ref} als Funktion der relativen Gradientenstärke G . I repräsentiert die Signalintensität bei Gradientenstärke G und I_{ref} die Signalintensität der niedrigsten Gradientenstärke. Als Referenz wurde das DSS in der Probe verwendet. Die Stabilität des Gradientensystems wurde mit PAA überprüft. Das Signal von HDO in einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe wurde verwendet um die Diffusionskonstante D [99] zu berechnen, siehe Kapitel 3.4.2. $V = 500 \mu L$, $c = 1 \text{ mM}$ in MBP-Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl), $T = 298 \text{ K}$. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). *, PAA; \blacktriangle HDO, \blacklozenge DSS, \bullet PKD2C797-968 in Abwesenheit bivalenter Ionen, \bullet PKD2C797-968 in Anwesenheit von 10 mM $CaCl_2$.

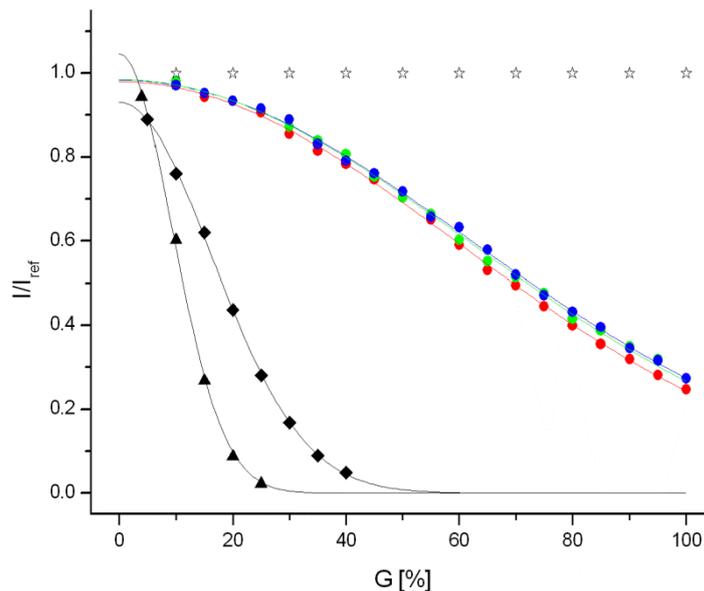


Abbildung 4.63 Aggregationszustand von PKD2C797-968 in An- und Abwesenheit bivalenter Ionen: Graph von I/I_{ref} als Funktion der relativen Gradientenstärke G . I repräsentiert die Signalintensität bei Gradientenstärke G und I_{ref} die Signalintensität der niedrigsten Gradientenstärke. Als Referenz wurde das DSS in der Probe verwendet. Die Stabilität des Gradientensystems wurde mit PAA überprüft. Das Signal von HDO in einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe wurde verwendet um die Diffusionskonstante D [99] zu berechnen, siehe Kapitel 3.4.2. $V = 500 \mu L$, $c = 1 \text{ mM}$ in MBP-Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl), $T = 298 \text{ K}$. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). *, PAA; \blacktriangle HDO, \blacklozenge DSS, \bullet PKD2C797-968 in Abwesenheit bivalenter Ionen, \bullet PKD2C797-968 in Anwesenheit von 10 mM $MgCl_2$.

Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben zu gewährleisten, wurde wieder der Signalabfall der Proteinsignale zwischen 0 und 3 ppm gegen den angelegten Gradienten aufgetragen. Mit DSS als Referenz zeigt die Probe aus Abbildung 4.61 in Lösung eine molekulare Masse von 483,070 g/mol (Abbildung 4.63, rot). Dies spricht bei einer molekularen Masse von 19.1 kDa erneut für das Vorliegen hoher Aggregate in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} erhöht sich die scheinbare molekulare Masse auf 504,010 g/mol (Abbildung 4.63, grün). In Anwesenheit von Mg^{2+} erhöht sich die scheinbare molekulare Masse auf 683,246 g/mol (Abbildung 4.63, blau). Der relative hydrodynamische Radius erhöht sich im Rahmen des Fehlers nur in Anwesenheit von Mg^{2+} um 8.3 %. Die Zugabe von Calcium und Magnesium führt im Rahmen des Fehlers (Tabelle 4.20, grau) nur bei Mg^{2+} zu Änderungen des Aggregationszustandes von PKD2C797-968 in Lösung.

PKD2C	D^a	$R_h/R_{h,DSS}^b$	M_{exp}^c	M^d
	$10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$		$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
797-968	0.51 ± 0.01	14.64 ± 0.77	$616,434 \pm 45,523$	19,138
797-968, CaCl_2	0.48 ± 0.01	15.15 ± 0.89	$683,246 \pm 63,157$	
797-968	1.54 ± 0.05	13.50 ± 1.27	$483,070 \pm 28,718$	
797-968, CaCl_2	2.12 ± 0.11	13.69 ± 1.32	$504,010 \pm 32,607$	
797-968, MgCl_2	1.49 ± 0.05	15.15 ± 1.49	$683,246 \pm 49,115$	

Tabelle 4.20 Molekulare Massen und hydrodynamische Radien von PKD2C797-968 in An- und Abwesenheit bivalenter Ionen: a) Die Berechnung der Diffusionskonstante erfolgte über die Auswertung des Signalabfalls einer 99.9 % D_2O - und 0.1 % H_2O -Probe als Funktion der Gradientenstärke. Die Diffusionskonstante von HDO bei 298 K beträgt $D_{\text{HDO}}(\text{in } \text{D}_2\text{O}) = 1.902 \pm 0.190 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ [100]. b) Verhältnis der hydrodynamischen Radien von PKD2C und DSS. c) Experimentell festgestellte molekulare Masse von PKD2C in Lösung. DSS ($M = 196.34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) wurde als Referenz verwendet. d) Molekulare Masse berechnet aus der Aminosäuresequenz.

4.8.1.3 NMR-spektroskopische Charakterisierung mittels 2D-(^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren

Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C797-968 zeigt in Anwesenheit von Calcium eine schlechte Auflösung und deutlich weniger als die zu erwartenden 172 Signale für die Amidprotonen des Proteinrückgrats (Abbildung 4.64). Das Spektrum zeigt nur ganz wenig Signale, die scharf und gut aufgelöst sind. Vor allem im Bereich zwischen 8.0-8.5 ppm und 115-125 ppm sind viele Signale schlecht aufgelöst. Im Übrigen liegen einige Signale im Random-Coil-Bereich.

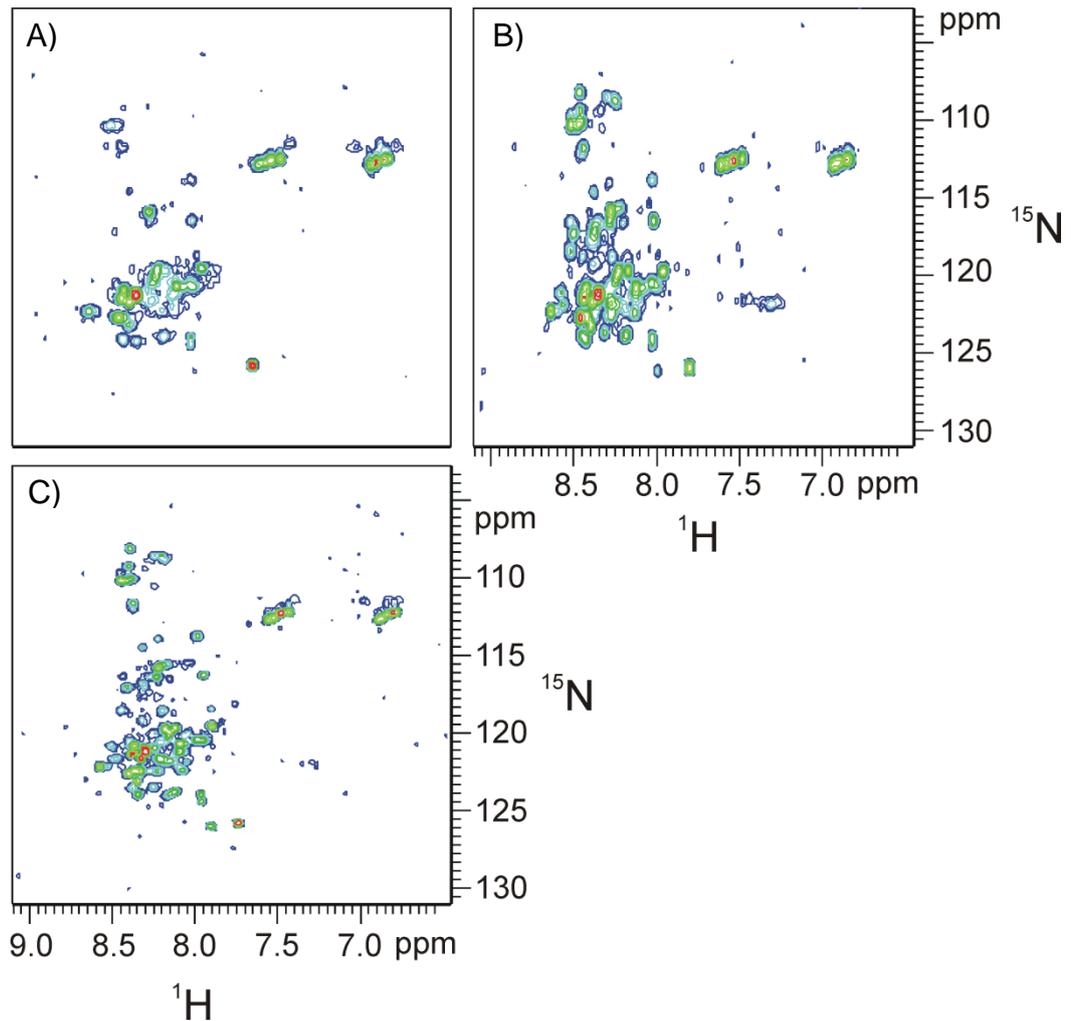


Abbildung 4.64 (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren von PKD2C797-968: A) $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$, pH-Wert 7.8. B) gleiche Probe wie A aber pH 6.8. C) gleiche Probe wie B aber $T = 308 \text{ K}$. Alle Spektren wurden mit einer Lorentz-zu-Gauss-Funktion (GB = 0.12 für ^1H und 0.1 für ^{15}N) prozessiert.

4.8.2 Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie

Um Informationen über die Sekundärstruktur zu erhalten, wurde ein CD-Spektrum aufgenommen und analysiert. Das beobachtete CD-Spektrum ist in Abbildung 4.65 für PKD2C797-968 gezeigt. Das Spektrum zeigt eine überwiegend α -helikale Struktur in Lösung. Des Weiteren findet man einen kleinen ungeordneten Anteil.

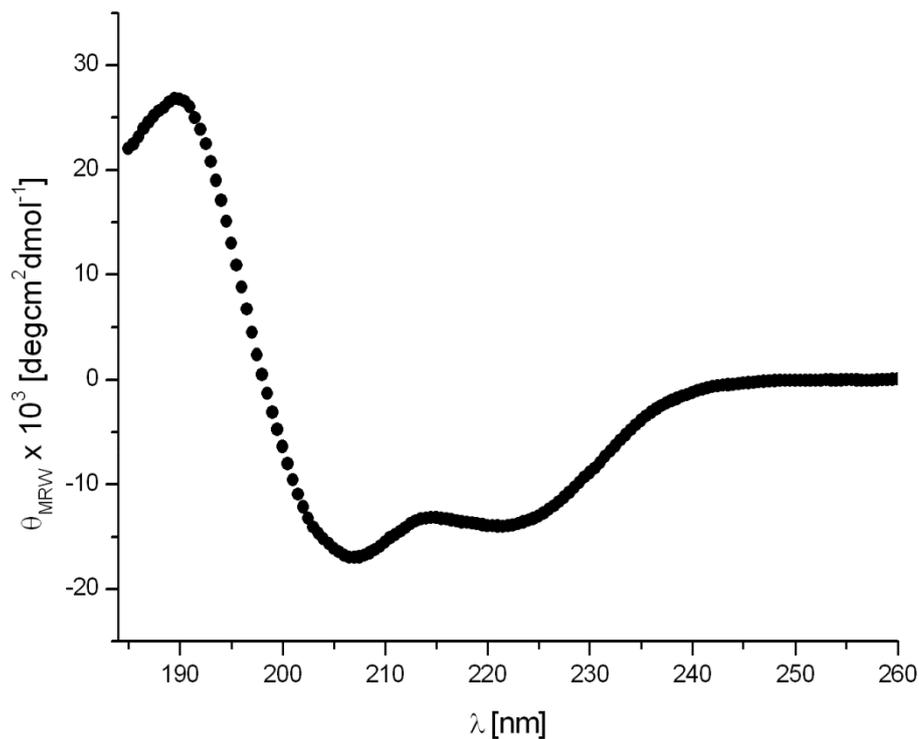


Abbildung 4.65 CD-Spektrum von PKD2C797-968: Die Probe enthielt 50 μM Protein in CD-Messpuffer (10 mM Tris pH 7.5). Die Messung wurden bei R. T. durchgeführt.

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C797-968 eine Zusammensetzung aus 74 % α -Helix, 9 % β -Faltblatt, 2 % Schleifen und 13 % ungeordnet (Tabelle 4.21).

PKD2C	α -Helix	β -Faltblatt	Schleife	ungeordnet
797-968	74%	9%	2%	13%

Tabelle 4.21 Sekundärstrukturanalyse von PKD2C797-968: Die Daten wurden mithilfe des Online Servers DICHROWEB [118] mit dem Referenzset Set3 [122] ausgewertet.

4.9 Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C828-900

Das Fragment PKD2C828-900 besitzt eine Coiled-Coil-Domäne (Aminosäuren 835-873) [28]. Dieses Fragment wurde nach einem Trypsinverdau am Lehrstuhl erhalten.

4.9.1 Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ^1H - und 2D-(^1H - ^{15}N)-NMR-Spektroskopie

Das Fragment zeigt bei einer Größe von 8.2 kDa im ^1H -Spektrum normale Linienbreiten (Abbildung 4.66). Einige Signale sind gut aufgelöst (z. B. Alanine zwischen 1.2 und 1.5 ppm) und zeigen schmale Linien. Im Bereich um 0 ppm sind keine hochfeldverschobenen Signale (Methylprotonen im hydrophoben Kern des Proteins) zu sehen.

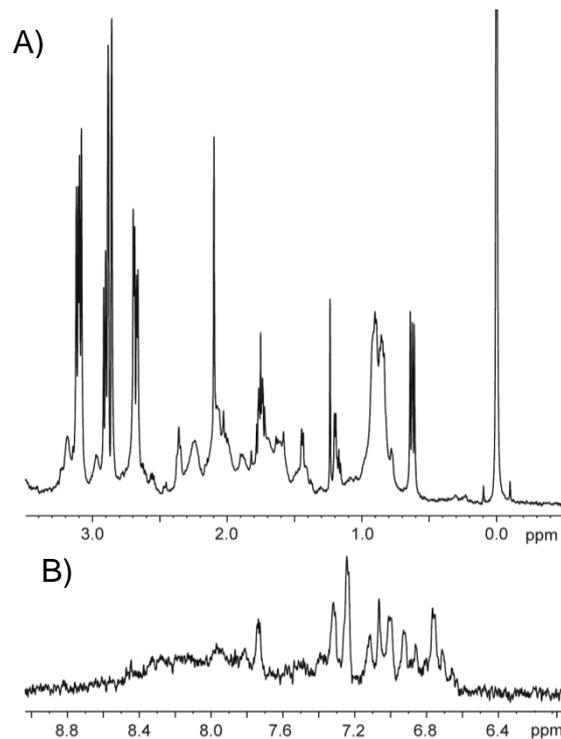


Abbildung 4.66 Ausschnitte aus dem 1D- ^1H -Spektrum von PKD2C828-900: $V = 500 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Das Spektrum wurde exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). A) Aliphatischer Bereich mit DSS (abgeschnitten) bei 0 ppm. B) Amidbereich.

Bei Betrachtung der drei Dupletts der Alanine (Ala862, Ala873 und Ala889) sieht man, dass diese flexibel und frei beweglich sein müssen. Die Alanine befinden sich am Ende der Coiled-Coil-Domäne und am Ende des Fragments.

Das Duplett der CH_3 -Gruppe des Alanins bei $\delta = 1.20 \text{ ppm}$ zeigt bei Eichung auf DSS eine Konzentration von 0.1 mM. Die zuvor bestimmte Konzentration mittels UV (Kapitel 3.2.1) ergab eine Konzentration von 0.5 mM. Bei Annahme der Richtigkeit beider Methoden würde das bedeuten, dass nur 20 % des Proteins in einer für die NMR zugänglichen Größe vorliegen.

4.9.1.1 Interaktion mit Ca^{2+}

Die Zugabe einer hohen Ca^{2+} -Konzentration zeigt wenig Änderungen im ^1H -Spektrum von PKD2C828-900 (Abbildung 4.67). Lediglich das breite Signal bei $\delta = 7.00$ ppm verschwindet und zwei schmale Signale bei $\delta = 7.95$ und 7.20 ppm shiften in Anwesenheit von Ca^{2+} .

PKD2C828-900 besitzt jeweils ein Tyrosin (Tyr836), Phenylalanin (Phe839) und Histidin (His851). Das Histidin851 in PKD2C828-900 (Abbildung 4.67) lässt sich nach Vergleich mit den Spektren von PKD2C725-880 (Kapitel 4.6, Abbildung 4.43) eindeutig zuordnen. Auch die Ausbildung der Schulter links des $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His851 beobachtet man in beiden Spektren, ist also auf Veränderungen zwischen Aminosäure 828-900 zurückzuführen. Die Zuordnung von Tyr836 kann nicht übertragen werden, da das Signal dafür im 1D- ^1H -Spektrum von PKD2C828-900 nicht an der gleichen Stelle ist und so die Signale für Tyr836 und Phe839 nicht unterschieden werden können.

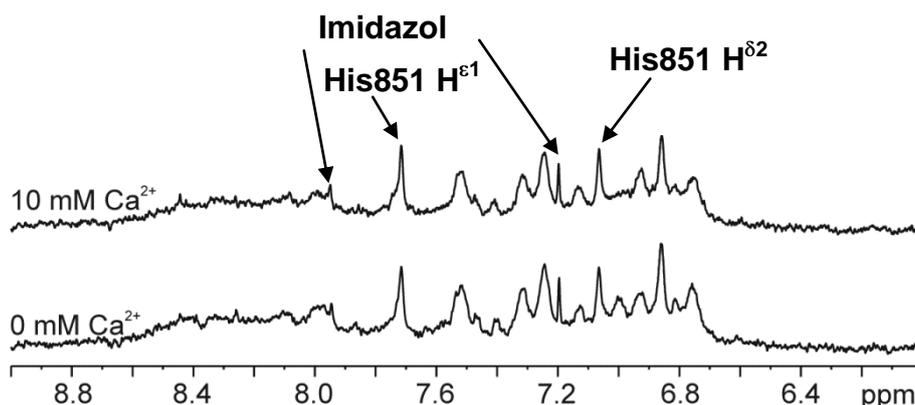


Abbildung 4.67 Calcium Titration von PKD2C828-900: $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Calciumchlorid wurde entsprechend der Beschriftung zugegeben. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz).

4.9.1.2 Bestimmung des Aggregationszustandes in Lösung mittels 1D- ^1H -NMR-Diffusionsmessungen

Da die Linienbreite auch vom Aggregationszustand des Proteins in Lösung abhängen kann, wurden 1D- ^1H -NMR-Diffusionsmessungen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. Der Signalabfall der Proteinsignale zwischen 0 und 3 ppm wurde gegen den angelegten Gradienten aufgetragen. Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C828-900 in Lösung eine molekulare Masse von 453,860 g/mol (Abbildung 4.68, rot). Dies spricht bei einer molekularen Masse von 8.1 kDa für das Vorliegen hoher Aggregate in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} reduziert sich die scheinbare molekulare Masse auf 347,828 g/mol (Abbildung 4.68, grün). Auch der relative

hydrodynamische Radius reduziert sich in Anwesenheit von Ca^{2+} um 8.5 % (Tabelle 4.22).

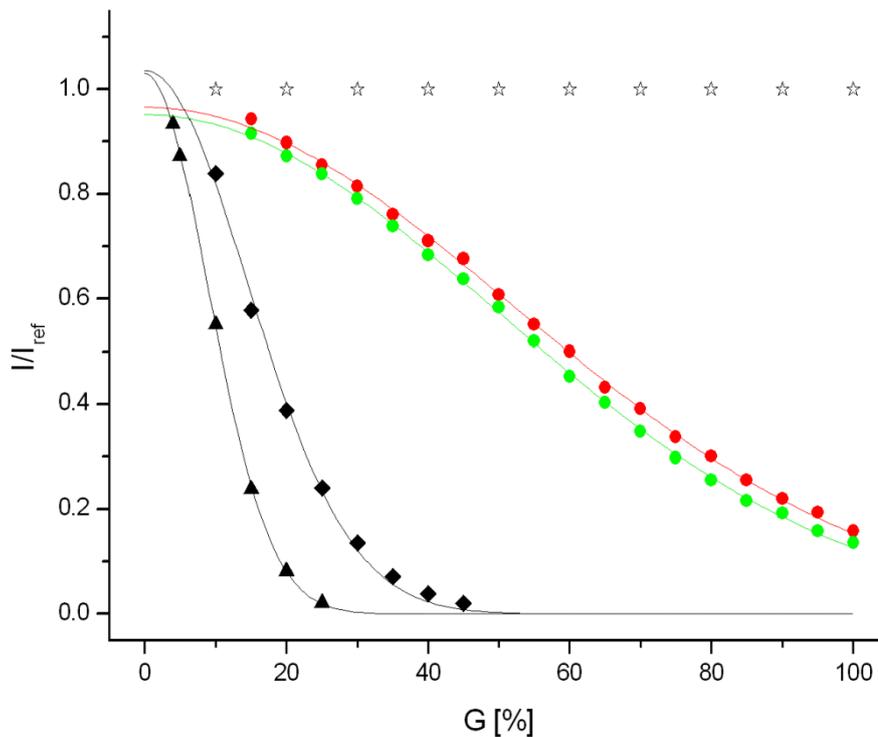


Abbildung 4.68 Aggregationszustand von PKD2C828-900 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : Graph von I/I_{ref} als Funktion der relativen Gradientenstärke G . I repräsentiert die Signalintensität bei Gradientenstärke G und I_{ref} die Signalintensität der niedrigsten Gradientenstärke. Als Referenz wurde das DSS in der Probe verwendet. Die Stabilität des Gradientensystems wurde mit PAA überprüft. Das Signal von H₂O in einer 99.9 % D₂O- und 0.1 % H₂O-Probe wurde verwendet um die Diffusionskonstante D [99] zu berechnen, siehe Kapitel 3.4.2. $V = 600 \mu\text{L}$, $c = 0.5 \text{ mM}$ in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), $T = 298 \text{ K}$. Die Spektren wurden exponentiell gefiltert (zusätzliche Linienverbreiterung 2 Hz). *, PAA; ▲ HDO, ◆ DSS, ● PKD2C828-900 in Abwesenheit bivalenter Ionen, ● PKD2C828-900 in Anwesenheit von 10 mM CaCl_2 .

PKD2C	D^a	$R_{\text{H}}/R_{\text{h,DSS}}^b$	M_{exp}^c	M^d
	$10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$		$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
828-900	0.66 ± 0.02	13.22 ± 1.05	$453,860 \pm 70,192$	8,240
828-900, CaCl_2	0.73 ± 0.02	12.10 ± 1.09	$347,828 \pm 64,205$	

Tabelle 4.22 Molekulare Massen und hydrodynamische Radien von PKD2C828-900 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} : a) Die Berechnung der Diffusionskonstante erfolgte über die Auswertung des Signalabfalls einer 99.9 % D₂O- und 0.1 % H₂O-Probe als Funktion der Gradientenstärke. Die Diffusionskonstante von HDO bei 298 K beträgt $D_{\text{HDO}}(\text{in D}_2\text{O}) = 1.902 \pm 0.190 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ [100]. b) Verhältnis der hydrodynamischen Radien von PKD2C und DSS. c) Experimentell festgestellte molekulare Masse von PKD2C in Lösung. DSS ($M = 196.34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) wurde als Referenz verwendet. d) Molekulare Masse berechnet aus der Aminosäuresequenz.

4.9.1.3 NMR-spektroskopische Charakterisierung mittels 2D-(^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren

Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C828-900 zeigt deutlich weniger als die zu erwartenden 73 Signale für die Amidprotonen des Proteinrückgrats (Abbildung 4.69, A). Bei Erhöhung der Temperatur zeigen sich deutlich mehr Signale (Abbildung 4.69, B). Allerdings sind immer noch nur ca. 30 % der zu erwartenden Signale zu beobachten. Die Signale, die sichtbar sind, sind gut aufgelöst. Die meistens Signale werden bei pH = 6.5 und T = 308 K sichtbar (Abbildung 4.69, B). In Anbetracht der Ergebnisse aus Kapitel 4.9.1.1 lässt sich aber die Aussage treffen, dass der flexible, frei bewegliche Teil wohl im Bereich um Phe839 bis His851 liegt, da für die Ringprotonen genug Signale im 1D- ^1H -Spektrum (Abbildung 4.67) gefunden werden. Der frei bewegliche Teil liegt also in der ersten Hälfte der Coiled-Coil-Domäne (Aminosäuren 835-873) [28].

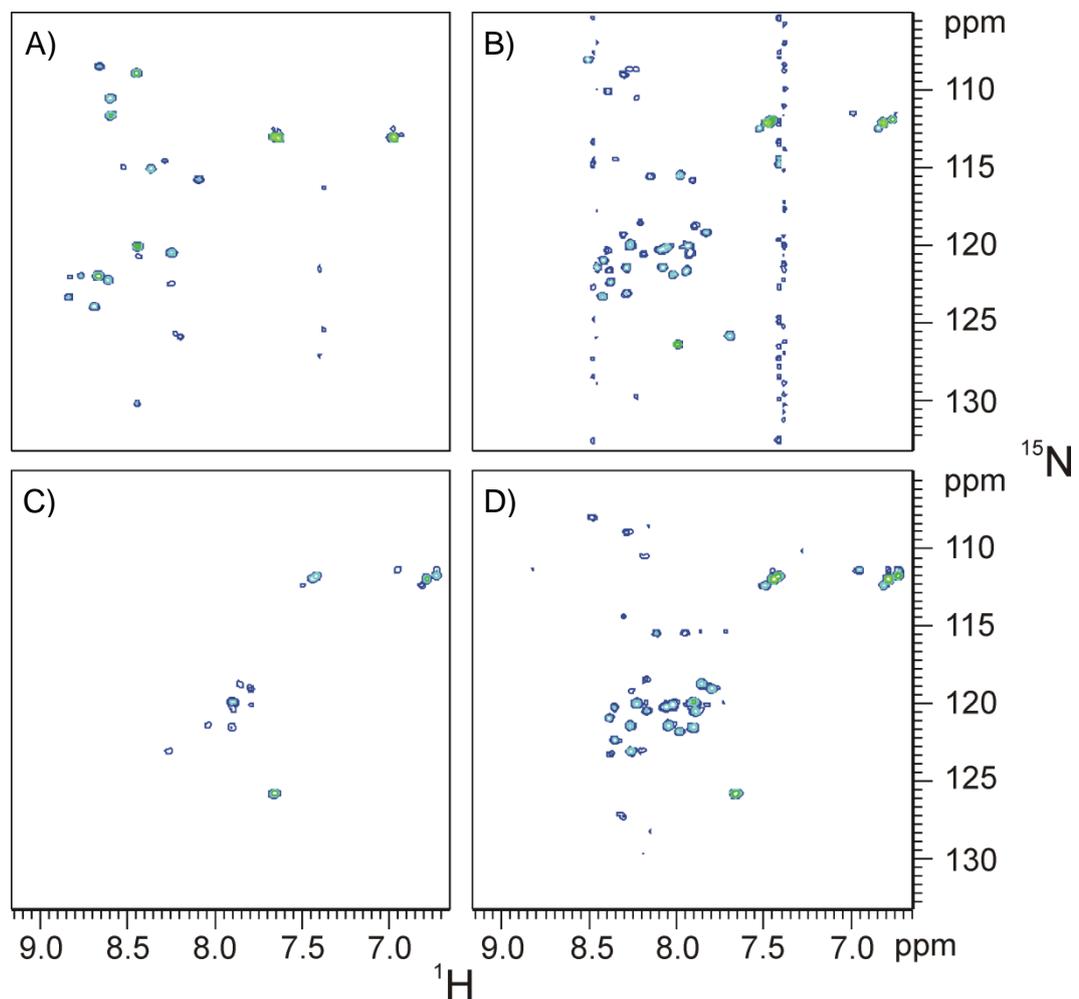


Abbildung 4.69 (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren von PKD2C828-900: A) V = 500 μL , c = 0.84 mM in His-Waschpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 50 mM Imidazol pH 8.0), T = 278 K, pH 6.5. B) gleiche Probe wie A aber T = 308 K. C) V = 500 μL , c = 0.5 mM in Messpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), T = 313 K, pH 7.8. D) gleiche Probe wie C aber pH 7.2. Alle Spektren wurden mit einer Lorentz-zu-Gauss-Funktion (GB = 0.12 für ^1H und 0.1 für ^{15}N) prozessiert.

4.9.2 Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie

Um Informationen über die Sekundärstruktur zu erhalten, wurde ein CD-Spektrum aufgenommen und analysiert. Das beobachtete CD-Spektrum ist in Abbildung 4.65 für PKD2C828-900 gezeigt. Das Spektrum zeigt eine überwiegend α -helikale Struktur in Lösung. Des Weiteren findet man einen kleinen ungeordneten Anteil.

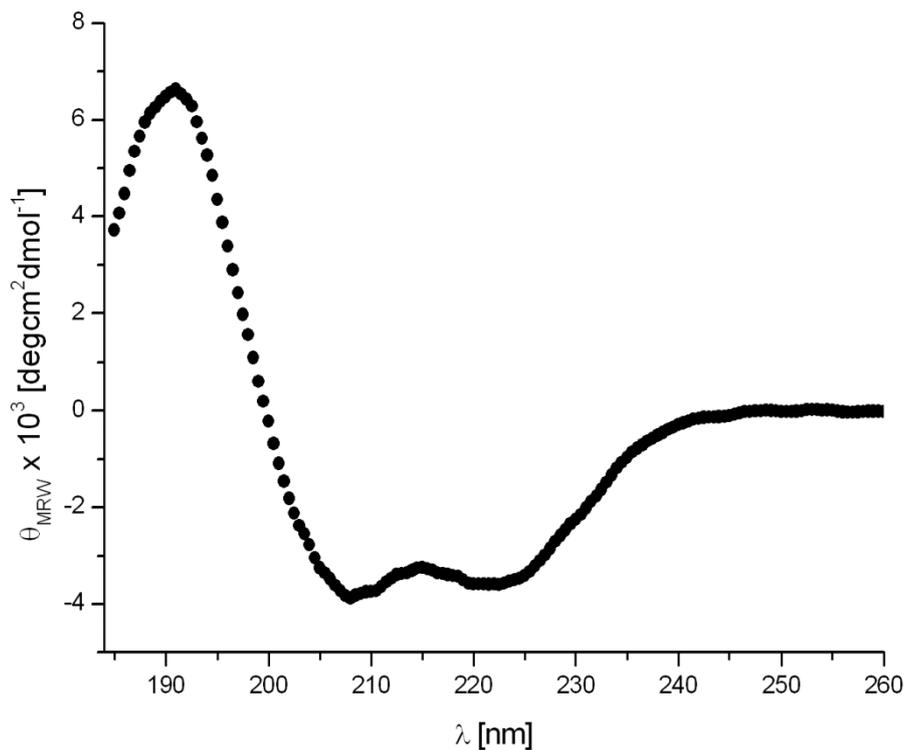


Abbildung 4.70 CD-Spektrum von PKD2C828-900: Die Probe enthielt 200 μ M Protein in CD-Messpuffer (10 mM Tris pH 7.5). Die Messung wurden bei R. T. durchgeführt.

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C828-900 eine Zusammensetzung aus 72 % α -Helix, 10 % β -Faltblatt, 5 % Schleifen und 14 % ungeordnet (Tabelle 4.23).

PKD2C	α -Helix	β -Faltblatt	Schleife	ungeordnet
828-900	72%	10%	5%	14%

Tabelle 4.23 Sekundärstrukturanalyse von PKD2C828-900: Die Daten wurden mithilfe des Online Servers DICHROWEB [118] mit dem Referenzset Set3 [122] ausgewertet.

5 Diskussion

Die Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung ist eine der häufigsten monogenetischen Erkrankungen und zeigt eine Inzidenz von 1:400-1:1000. Die Erkrankung wird normalerweise im erwachsenen Alter diagnostiziert und manifestiert sich durch die Bildung und Vergrößerung von flüssigkeitsgefüllten Zysten in der Niere [1]. Mutationen im PKD2-Gen, das für das Protein Polycystin-2 kodiert, führen zur Autosomal-dominanten polyzystischen Nierenerkrankung [5]. Für den cytosolischen C-Terminus von Polycystin-2 sind viele Interaktionspartner bekannt [123]. Informationen über die Struktur des C-Terminus sind daher von entscheidender Bedeutung, um die Ursachen der Krankheit besser zu verstehen.

5.1 Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C680-796

Das Fragment PKD2C680-796 besitzt zwei EF-Hände (Aminosäuren 727-739 und 763-774) [5, 26] und eine Coiled-Coil-Domäne [27] (Aminosäuren 781-796).

5.1.1 Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D-¹H- und 2D-(¹H-¹⁵N)-NMR-Spektroskopie

Die spektroskopische Untersuchung des Fragments 680-796 zeigte im ¹H-Spektrum schmale Linien, aber insgesamt zu wenig Signale in Anbetracht der Größe von 13,5 kDa. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass es sich um ein nur partiell gefaltetes Protein handelt.

Da in diesem Fragment zwei EF-Hände mit K_D -Werten von 55 und 179 μM gefunden wurden [26], wurde die Interaktion mit Calcium untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass wie schon in Schumann *et al* [26] gezeigt, Ca^{2+} -Zugabe zu Veränderungen im Spektrum führt. Die Ca^{2+} -Zugabe führt zur Verschiebung des H^{N} Signals von Asp752. Das Signal des H^{δ} von Phe738 taucht mit steigender Ca^{2+} -Konzentration auf, wohingegen das Signal des H^{N} von Leu729 mit steigender Ca^{2+} -Konzentration abnimmt und verschwindet. Dieser Effekt ist spezifisch für Calcium da im Gegensatz hierzu die Mg^{2+} -Zugabe zu keinen Veränderungen im ¹H-Spektrum von PKD2C680-796 führt.

Die gleichen Beobachtungen wurden bei Untersuchungen zum Aggregationszustand von PKD2C680-796 gemacht. PKD2C680-796 liegt in Abwesenheit von Ca^{2+} , mit einer molekularen Masse von 24,297 g/mol in Lösung vor. In Anwesenheit von Ca^{2+} reduziert sich die molekulare Masse auf 9,194 g/mol. Die Zugabe von Magnesium hingegen führt zu keiner Veränderungen in der molekularen Masse. Ein Grund für die Reduzierung der molekularen Masse und des hydrodynamischen Radius könnte eine kompaktere Struktur, die mit einem reduzierten Formfaktor einhergeht, sein. Diese

These wird allerdings weder durch die NMR- noch durch die CD-Daten unterstützt. Eine bessere Erklärung könnte die Bildung von Monomeren in Anwesenheit von Ca^{2+} sein. Bei Betrachtung des Signalabfalls in Anwesenheit von Ca^{2+} bei hohen Gradienten fällt auf, dass die Signalintensität höher liegt als der zu erwartende Kurvenverlauf. Dies ist ein weiterer Hinweis für das Vorliegen von Dimeren in Lösung.

Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796 in Anwesenheit von Ca^{2+} in den neuen Pufferbedingungen (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE), die einem physiologischeren Bereich angepasst wurden, zeigt Signale die scharf und gut aufgelöst sind. Allerdings sind vor allem im Bereich zwischen 7.5-8.5 ppm und 118-123 ppm viele Signale schlecht aufgelöst. Weiterhin sind einige Signale auch im Bereich der chemischen Verschiebung von Random-Coil-Positionen zu finden. Bei Übertragung der Zuordnung von Frank Schumann [125] erkennt man, dass die gut strukturierten Bereiche, die Bereiche der beiden EF-Hände und des Linkers dazwischen sind (Ile725-Met778). Dies spricht erneut, wie auch schon die 1D-Daten, für das Vorhandensein eines nur partiell gefalteten Proteins in Lösung.

In Anbetracht dieser Ergebnisse ist gut ersichtlich, dass die Anwesenheit von Ca^{2+} zu großen Änderungen im Fragment 680-796 führt. Diese betreffen sowohl die Struktur als auch den Aggregationszustand in Lösung. Gerade die Veränderung des Aggregationszustandes, die Monomerisierung in Anwesenheit von Ca^{2+} , legt die Vermutungen nahe, dass Ca^{2+} , neben dem Einfluss auf die Bildung einer wohldefinierten Struktur im Bereich der beiden EF-Hände, auch einen regulatorischen Effekt in Bezug auf die Funktion des Proteins Polycystin-2 als Ca^{2+} -selektiver, intrazellulärer Kationenkanal, hat [26, 55, 90].

5.1.2 Zuordnung der Resonanzen der Ringprotonen von Tyr684, Tyr762, Phe738, Phe759, His750, His773, His775 und His793

Für die Zuordnung der Ringprotonen von PKD2C680-796 wurde, ausgehend von den zugeordneten Amidprotonen im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum, mithilfe der 2D-(^1H - ^1H)-TOCSY und -NOESY-Spektren, die Zuordnung für den Aminosäurerest getroffen. Für die Aminosäuren Tyr684, Tyr762, Phe738, Phe759, His709, His750, His773, His775 und His793 konnte eine Zuordnung erfolgen.

Nach dem Ausschlussverfahren konnte eine Zuordnung für das $\text{H}^{\beta 1}$ von His709 getroffen werden und danach über das Kreuzsignal im (^1H - ^1H)-TOCSY-Spektrum eine Zuordnung für das $\text{H}^{\delta 2}$. Da für das H^{N} von His709 im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum kein Signal zuzuordnen ist, müssen die Ringprotonen eine deutlich höhere Beweglichkeit im Vergleich zum H^{N} im Protein haben.

Unabhängig davon gibt es in den 1D- ^1H -Spektrum und den 2D-(^1H - ^1H)-Spektren noch weitere nicht zugeordnete Signale. Diese Signale erscheinen mit kleineren Integralen in den Spektren und zeigen Kreuzsignale in den 2D-Spektren. Da für Tyr708 keine

Zuordnung im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum gemacht werden konnte, folglich auch keine Seitenkettenzuordnung vorhanden ist, konnte auch nach dem Ausschlussverfahren keine sichere Zuordnung erfolgen, da die Anzahl der nicht zugeordneten Signale, die für ein H^δ oder H^ϵ von Tyrosin infrage kommen, zu groß ist.

Für die Referenzierung der Integrale wurde das Integral der H^δ von Tyr684 verwendet. Da sich das Tyr684 am Anfang des Proteinfragments befindet, sollte es den Einfluss der Ca^{2+} -Bindung am wenigsten spüren. Dies ist besonders wichtig da nur eine partielle Beladung mit Ca^{2+} vorliegt. Des Weiteren sprechen die schmale Linienbreite und die gut sichtbare Dupletttaufspaltung für eine hohe Beweglichkeit im Protein. Für den Bereich der $\text{H}^{\epsilon 1}$ der Histidine ergeben sich nach der Referenzierung fünf Protonen. Durch die partielle Beladung des Proteins mit Ca^{2+} sind also für einige Histidine verschiedene Zustände zu beobachten, die in der Summe aber fünf Protonen ausmachen müssen. Diese Beobachtung erklärt auch die vielen nicht zugeordneten Signale in den 2D-TOCSY und -NOESY-Spektren. Durch die teilweise Beladung der EF-Hände mit Ca^{2+} ergeben sich unterschiedliche chemische Umgebungen für die Ringprotonen der Aromaten. Die Ringprotonen der Aromaten mit vollständiger Ca^{2+} -Beladung konnten zugeordnet werden, da für diese Bedingungen auch die Zuordnung der Signale im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum erfolgte und die Zuordnung der Seitenkettenprotonen vorhanden war.

Für das Signal der H^δ von Tyr762, ergibt sich ein Integral von 1.75 Protonen. Dies würde bedeuten, dass EF-Hand 2 zu ungefähr 85 % besetzt wäre. Des Weiteren konnten eindeutig zwei Zustände für die H^ϵ des Tyr762 zugeordnet werden, wobei die Integrale der Kreuzsignale ein Verhältnis von 31:69 % zeigen. Beide Zustände haben gleiche chemische Verschiebungen für die H^ϵ aber unterschiedliche chemische Umgebungen für die H^δ . Für das H^δ von Phe738 ergibt sich ein Integral von einem Proton statt zwei. Dies würde bedeuten, dass EF-Hand 1 zu ca. 50 % besetzt ist. Rein rechnerisch ergibt das eine höhere Ca^{2+} -Konzentration als zugesetzt. Wenn man aber noch in Betracht zieht, dass die 1.75 Protonen des Tyr762 sich aufgrund unterschiedlicher Zustände in den 2D-Spektren unterscheiden, muss davon ausgegangen werden dass die 85 % auch von strukturellen Effekten der Ca^{2+} -Bindung an EF-Hand 1 herrühren. Umgekehrt gilt genauso: Die Ca^{2+} -Bindung an EF-Hand 2 hat sicherlich auch strukturellen Einfluss auf die EF-Hand 1.

5.1.3 Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste mittels 1D- ^1H - und (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren

Säurekonstanten (pK-Werte) von Histidinen in Proteinen lassen Rückschlüsse auf ihre chemische Umgebung und ihre biochemische Funktion zu ([126] und darin verwendete Referenzen). PKD2C680-796 besitzt fünf Histidine (His709, His750, His773, His775 und His793), wobei His750 im Linker zwischen den beiden EF-Händen liegt und His773 in EF-Hand 2 [26]. His775 ist die erste Aminosäure direkt nach EF-Hand 2.

Bei Betrachtung der Säurekonstanten, die aus den 1D-¹H-Spektren der teilweise besetzten EF-Hände erhalten wurden, zeigen sich für Histidine durchschnittliche pK-Werte von 7.58 für das H^{ε1} von His750 und 7.09 für das H^{ε1} von His793. Die pK-Werte zweier Histidine, His773 und His775, stechen hervor, da sie deutlich unter dem Durchschnitt in Proteinen [127], bei 6.49 ± 0.03 und 6.31 ± 0.12 , liegen. Bei Betrachtung der Position im Protein der beiden Histidine (His773 liegt direkt in der EF-Hand 2, His775 ist die erste Aminosäure direkt nach EF-Hand 2) erkennt man, dass diese sich in direkter Nähe zur zweifach positiven Ladung des Ca²⁺ befinden. Dies erklärt den kleineren pK-Wert im Vergleich zu den anderen Histidinen. Für das Histidin 709 konnte keine Auswertung erfolgen, da nur vier Signale in den 1D-¹H-Spektren zu sehen waren. Es wäre gut möglich, dass das Signal der H^{ε1} unter den gegebenen Messbedingungen (Anwesenheit von Ca²⁺ nur während der Reinigung) mit einem der anderen Histidine überlagert.

Für die Bestimmung der Säurekonstanten aus den (¹H-¹⁵N)-HSQC-Spektren in Anwesenheit von Ca²⁺ wurden drei pK-Werte ausgewertet. Für His709 liegt keine Zuordnung im (¹H-¹⁵N)-HSQC-Spektrum vor und das Signal für das H^N von His793 überlagert zu stark mit anderen für eine gute Auswertung. Für His750 zeigt sich ein pK-Wert von 7.09. Die pK-Werte für His773 und His775 stechen erneut hervor, da sie deutlich unter dem Durchschnitt in Proteinen [127], bei 5.55 ± 0.33 und 5.81 ± 0.04 , liegen. Die EF-Hände sind in diesem Fall höher mit Ca²⁺ besetzt als im Falle der Auswertung der 1D-¹H-Spektren. Alle Histidine liegen im Bereich der EF-Hände und des Linkers dazwischen. Durch die höhere Ca²⁺-Besetzung der EF-Hände im Vergleich zur Auswertung der 1D-¹H-Spektren, lassen sich die Unterschiede in den pK-Werten für die Histidine gut erklären. Durch die räumlich größere Nähe lässt sich auch erklären, dass der Effekt für His773 und His775 größer ist als für His750.

5.1.4 Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca²⁺ mittels CD-Spektroskopie

Um Informationen über die Sekundärstruktur und deren Änderung durch Ca²⁺-Bindung zu erhalten, wurden CD-Spektren aufgenommen und analysiert. Die beobachteten CD-Spektren sind typisch für ein partiell gefaltetes Protein und zeigen kleine Änderungen in der Sekundärstruktur in Anwesenheit von Ca²⁺.

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C680-796 eine Zusammensetzung aus 30 % α-Helix, 16 % β-Faltblatt, 14 % Schleifen und 40 % ungeordnet. Nach Bindung von Ca²⁺ ändert sich die Zusammensetzung der Sekundärstruktur in 47 % α-Helix, 12 % β-Faltblatt, 12 % Schleifen und 28 % ungeordnet. Das bedeutet, selbst nach Bindung von Ca²⁺ an die EF-Hände zeigt sich noch ein hoher ungeordneter Anteil. Dies erklärt die zu wenigen Signale im 1D-1H-Spektrum und die große Anzahl an Random-Coil-Signalen im (¹H-¹⁵N)-HSQC-Spektrum. Das Fragment PKD2C680-796 zeigt überwiegend eine α-helikale Struktur nach Bindung von Ca²⁺. Dies zeigt eine

gute Übereinstimmung mit dem strukturellen Merkmal des Helix-Loop-Helix-Motivs der EF-Hände.

5.2 Hochdruck-NMR-spektroskopische Untersuchungen an PKD2C680-796

Das Fragment PKD2C680-796 besitzt zwei EF-Hände (Aminosäuren 727-739 und 763-774) [5, 26] und eine Coiled-Coil-Domäne [27] (Aminosäuren 781-796). Die Bindung von Ca^{2+} durch die beiden EF-Hände ist ausschlaggebend für die Bildung einer teilweise wohldefinierten Struktur [26]. Daher war es von besonderem Interesse zu überprüfen, ob Druck einen Einfluss auf dieses Bindungsgleichgewicht hat, welchen Einfluss die Ausübung von Druck auf das gesamte Spektrum hat und ob es Hinweise für das Vorliegen unterschiedlicher Faltungsintermediate gibt.

5.2.1 Druckabhängigkeit in Anwesenheit von Ca^{2+}

Bei Vergleich der Spektren bei 40 bar und 2000 bar fällt auf, dass die Linien der Signale im Spektrum bei 2000 bar deutlich schmaler und wohl definierter sind, als bei 40 bar. Einige sehr breite Signale verschwinden mit steigendem Druck vollständig. Außerdem shiften einige Signale und neue Signale werden sichtbar.

Bei Betrachtung des Signals für die H^δ von Phe738 sieht man, dass das Integral des Signals mit steigendem Druck linear abnimmt und das Signal bei 1800 bar fast vollständig verschwunden ist. Derselbe Effekt ist für das Signal der H^δ von Phe759 und der H^ϵ von Tyr762 zu beobachten. Bekannt ist [26], dass diese Signale bei Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hände ein Signal zeigen. Diese Signale zeigen also an, ob Ca^{2+} an die EF-Hände gebunden ist. Wenn jetzt bei hohem Druck das Integral dieser Signale vollständig verschwunden ist, kann es dafür drei mögliche Erklärungen geben. Es könnte sein, dass das Ca^{2+} bei hohem Druck freigesetzt wird, aufgrund der kleineren Dichte bei Ausbildung einer Hydratationshülle um das Ca^{2+} und des oberflächenvergrößerten Proteins. Der andere Grund könnte eine vollständige oder partielle Entfaltung des Proteins unter Druck sein. In diesem Fall würde man Signale im Random-Coil-Bereich erwarten. Eine dritte Möglichkeit ist die Mischung aus beiden Szenarien.

Im Bereich der $\text{H}^{\epsilon 1}$ der fünf Histidine in PKD2C680-796 sieht man bei 40 bar vier relativ schmale und vier stark verbreiterte Signale, die nach Referenzierung auf das Duplett des H^δ von Tyr684 gerade fünf Protonen ergibt. Das bedeutet, durch die partielle Beladung mit Ca^{2+} liegt ein gewisser Prozentsatz Ca^{2+} -gebunden vor, der andere Teil nicht. Bei 2000 bar sieht man nur noch die vier schmalen Linien. Die Resonanzlinien des $\text{H}^{\epsilon 1}$ für His750 und His793 shiften bei Druck, verändern sich ansonsten jedoch nicht. Das $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His773 zeigt zwei Resonanzlinien. Bei 2000 bar hingegen nur noch eine. Das Signal des $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His775 verschwindet vollständig bei

2000 bar, shiftet aber in Richtung des Signals des $H^{\epsilon 1}$ von His709 und überlagert scheinbar mit diesem. Bei 2000 bar hat sich dieses Signal um 0.01 ppm verschoben.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Histidine, die nicht direkt an der Ca^{2+} -Bindung beteiligt sind (His709, His750, His793), einen kleinen, druckbedingten Shift zeigen. Die Histidine H773 und H775, die sich räumlich nah zum gebundenen Ca^{2+} befinden, zeigen bei hohem Druck deutlich stärkere Änderungen. Wenn man an dieser Stelle die gleiche Argumentation wie für die H^{δ} und H^{ϵ} von Phe738, Phe759 und Tyr762 anwendet, sprechen alle diese Beobachtungen eher für das Verdrängen von Ca^{2+} aus den Helix-Loop-Helix-Motiven der EF-Hände bei hohem Druck als für das Entfalten von PKD2C680-796. Im Falle des vollständigen Entfaltens des Proteins würde man auch für die Histidine die nicht an der Ca^{2+} -Bindung beteiligt sind, stärkere Shifts bei 2000 bar im Vergleich zu 40 bar, erwarten.

Wenn man also davon ausgeht, dass man bei 2000 bar das $1D\text{-}^1H$ -Spektrum ohne Ca^{2+} sieht, muss man davon ausgehen, dass die breiten Signale, die bei hohem Druck verschwinden, den Ca^{2+} -bindenden Zustand des Proteins darstellen. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen aus der Aromatenzuordnung in Kapitel 4.1.2 überein. Ein weiterer zu beachtender Faktor ist das Ca^{2+} -abhängige in Kapitel 5.1.1 beschriebene Monomer/Dimer-Gleichgewicht. Hier würde man erwarten, dass die Linien im Ca^{2+} -gebundenen Zustand (Halbierung der molekularen Masse im Vergleich zur Abwesenheit von Ca^{2+}) eher schmaler sind. Allerdings darf man dabei nicht vergessen, dass die Diffusionsmessungen Hinweise über den Aggregationszustand gemittelt über das ganze Protein geben. Dies schließt Prozesse des langsamen Austauschs der direkt an der Ca^{2+} -Bindung beteiligten Aminosäuren, nicht aus.

Die Tatsache, dass bei Wegnahme des Drucks die druckinduzierten Änderungen einen reversiblen Prozess darstellen, lässt sich leicht durch die erneute Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hände erklären.

5.2.2 Druckabhängigkeit in Abwesenheit von Ca^{2+}

Die Druckreihe in Abwesenheit von Ca^{2+} zeigt auf den ersten Blick, dass das Spektrum schon zu Beginn der Druckreihe bei 40 bar deutlich weniger Signale aufweist als das Spektrum in Anwesenheit von Ca^{2+} . Vor allem im Bereich zwischen $\delta = 6.3\text{-}7.2$ ppm fehlen viele Signale der H^{δ} , H^{ϵ} und H^Z der Phenylalanine und Tyrosine. Des Weiteren verschwinden die breiten Linien zwischen $\delta = 7.4\text{-}7.7$ ppm bei EDTA-Zugabe. Wie schon in Kapitel 5.2.1 diskutiert, spricht auch diese Beobachtung dafür, dass der Ca^{2+} -gebundene Zustand von PKD2C680-796 durch deutlich breitere Linien charakterisiert werden kann, da diese nach EDTA-Zugabe nicht mehr zu sehen sind. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Diffusionsmessungen für PKD2C680-796 (Kapitel 5.1.1) sprechen auch diese Ergebnisse für langsame Austauschprozesse der an der Ca^{2+} -Bindung beteiligten Aminosäuren.

Mit steigendem Druck treten Shifts einiger Signale auf und es erscheinen neue Signale. Aus Kapitel 4.1.4 ist bekannt, dass PKD2C680-796 in Abwesenheit von Ca^{2+} zu einem Anteil von 40 % ungeordnet vorliegt. Durch die Anwendung von hohem Druck auf das Protein in Abwesenheit von Ca^{2+} können Gleichgewichte unterschiedlicher Faltungsintermediate hin zu einem energetisch bevorzugten verschoben werden. Dieser Zustand ist dann höher populierte und wird im $1\text{D-}^1\text{H}$ -Spektrum sichtbar.

Der Bereich, in dem die $\text{H}^{\epsilon 1}$ der Histidine liegen, hat sich tieffeldverschoben nach Zugabe von EDTA. Da Histidine pH-bedingt shiften, lassen sich die tieffeldverschobenen Signale durch eine pH-Erniedrigung durch die EDTA-Zugabe, erklären.

Im Spektrum mit EDTA sind im Bereich der $\text{H}^{\epsilon 1}$ der Histidine bei 40 bar vier Signale mit schmalen und zwei Signale mit breiten Linien zu sehen, bei 1800 bar sind fünf schmale Signale zu erkennen. Die Resonanzlinie des $\text{H}^{\epsilon 1}$ für His750 und His773 shiften bei Druck. Die Resonanzlinie des $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His793 liegt bei 40 bar stark verbreitert vor und wird deutlich schmaler bei 1800 bar bei gleicher chemischer Verschiebung. Das Signal des $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His775 shiftet leicht bei 1800 bar. Das Signal des $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His709 hat sich bei 1800 bar um 0.01 ppm verschoben. Zusammenfassend zeigen sich also in Abwesenheit von Ca^{2+} kleine, druckbedingte Shifts für His750, His773 und His775. Für His793 und His709 verschmälern sich die Signale bei 1800 bar deutlich. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Anwesenheit von Ca^{2+} zeigen sich deutlich weniger Effekte, gerade für die Histidine, die an der Ca^{2+} -Bindung beteiligt sind.

Wie auch schon in Anwesenheit von Ca^{2+} sind die Veränderungen unter Druck reversibel, da sich die 40 bar-Spektren vor und nach der Druckreihe nicht unterscheiden.

5.2.3 Bestimmung des Aggregationszustandes in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} bei 40 und 2000 bar

Um Informationen darüber zu erhalten, wie und ob sich der Aggregationszustand von PKD2C680-796 unter Druck anders verhält, wurden $1\text{D-}^1\text{H}$ -NMR-Diffusionsmessungen bei 40 und 2000 bar, in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. Die Diffusionskoeffizienten für Ca^{2+} -gebundenes PKD2C680-796 unterscheiden sich bei 40 und 2000 bar im Rahmen des Fehlers nicht und zeigen den gleichen Aggregationszustand. Bei 40 bar beträgt die Diffusionskonstante $2.19 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, bei 2000 bar $1.98 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Im Rahmen des Fehlers sind die Diffusionskonstanten für PKD2C680-796 in Kapitel 4.1.1.2 und 4.2.3 in Anwesenheit von Ca^{2+} gleich. Das bedeutet, unter Einbeziehung der molekularen Massen für diese Diffusionskonstanten aus Kapitel 4.1.1.2, dass PKD2C680-796 in Anwesenheit von Ca^{2+} bei 40 und 2000 bar als Monomer vorliegt.

Die Diffusionskoeffizienten in Anwesenheit von EDTA unterscheiden sich bei 40 und 2000 bar deutlich. Die Diffusionskonstante nimmt von $2.47 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ auf $4.52 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ zu, das bedeutet die Beweglichkeit des Proteins in Lösung bei 2000 bar nimmt fast um das Doppelte zu. In Kapitel 4.1.1.2 wurde gezeigt, dass PKD2C680-796 in Abwesenheit von Ca^{2+} als Dimer vorliegt und Ca^{2+} -Zugabe zu einer Monomerisierung führt. Der umgekehrte Prozess, also Monomer (Anwesenheit von Ca^{2+}) zu Dimer (EDTA-Zugabe), ist also nicht möglich.

5.3 Spektroskopische und biochemische Charakterisierung der EF-Hand-Mutanten PKD2C680-796(T771A, E774A) und PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A)

Wie bereits in Kapitel 5.1 diskutiert, hat die Bindung von Ca^{2+} einen Einfluss auf die Bildung einer wohldefinierten Struktur in den EF-Händen. Interessant war es nun herauszufinden, welchen strukturellen Einfluss Mutationen, die eine Bindung von Ca^{2+} verhindern, haben. Es wurden zwei Mutanten des Fragments PKD2C680-796 untersucht. PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) zeigt Mutationen in der EF-Hand 1, das Fragment PKD2C680-796(T771A, E774A) zeigt Mutationen in der EF-Hand 2.

5.3.1 Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ^1H - und 2D-(^1H - ^{15}N)-NMR-Spektroskopie

Die 1D- ^1H -Spektren beider Mutanten zeigen schmale Linien. Im Bereich um 0 ppm sind keine hochfeldverschobenen Signale (Methylprotonen im hydrophoben Kern des Proteins) zu sehen. Die Linienbreiten im Amidbereich von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) sind deutlich schmaler, als die von PKD2C680-796(T771A, E774A). Die Verbreiterung von Linien kann zwei Ursachen haben. Es können Aggregate in Lösung vorliegen, dadurch erhöht sich die molekulare Masse in Lösung. Dies führt zur Zunahme der Korrelationszeit τ_c und zu breiteren Linien. Ein weiterer Grund könnte das Vorliegen eines langsamen Austauschs sein, dies würde ebenfalls zu breiteren Linien führen.

Für die mutierte EF-Hand 1 sind bei Ca^{2+} -Zugabe im Gegensatz zum Wildtyp die Signale für das H^δ des Phe738, Phe759 und des H^ϵ von Tyr762 nicht mehr erkennbar. Allerdings gibt es Änderungen im Spektrum bei Ca^{2+} -Zugabe, z. B. für die H^δ des Tyr762 und die H^ϵ von Phe759. Die Abnahme des Signals der H^ϵ von Phe759 mit steigender Ca^{2+} -Zugabe ergibt einen K_D -Wert von $86.39 \mu\text{M}$. Für alle $\text{H}^{\epsilon 1}$ der Histidine, außer für His773, zeigen sich pH-Shifts, ansonsten aber keine Änderungen. Das Signal des $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His773 nimmt mit steigender Ca^{2+} -Konzentration ab. Diese Beobachtungen würden bedeuten, dass die Mutation der EF-Hand 1 einen strukturellen Einfluss auf die Faltung des Proteins hat, die Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hand 2 dadurch jedoch nicht oder kaum verändert wird. Es gibt

eine Mutation im Bereich der EF-Hand 1, Deletion der Aminosäuren Leu736 und Asn737 [128], die pathogen für ADPKD ist. Sollte auch hier die Bindung von Ca^{2+} an EF-Hand 2 funktionieren, würde das bedeuten, dass der strukturelle Einfluss der Mutation im Bereich der EF-Hand 1 der Grund für die Pathogenität ist.

Für die mutierte EF-Hand 2 sind im Vergleich zum Wildtyp nur noch pH-Shifts der Histidine aufgrund der Ca^{2+} -Zugabe zu beobachten. Das Signal der H^δ von Phe738 ist in Anwesenheit von Ca^{2+} nicht mehr zu erkennen. Die Signale der H^δ des Phe759 und der H^ϵ und H^δ von Tyr762 sind in Abwesenheit von Ca^{2+} zu sehen und zeigen keine Veränderung ihrer Integrale bei Ca^{2+} -Zugabe. Dies würde bedeuten, dass die Beobachtungen zur Bindung von Ca^{2+} an EF-Hand 1 und die Existenz von zwei verschiedenen K_D -Werten anders zu interpretieren wäre oder die Bindung von Ca^{2+} an EF-Hand 1 nur möglich bei Bindung von Ca^{2+} an EF-Hand 2 ist.

Untersuchungen zum Aggregationszustand der Mutanten zeigen für PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) in Lösung eine molekulare Masse von 74,306 g/mol. Dies spricht bei einer molekularen Masse von 13.4 kDa für das Vorliegen eines Oligomers in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} erhöht sich die scheinbare molekulare Masse auf 109,848 g/mol. Der relative hydrodynamische Radius erhöht sich in Anwesenheit von Ca^{2+} um 12.2 %. Die Zugabe von Calcium führt also zu einer Änderung des Aggregationszustandes von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) in Lösung. Das bedeutet, es gibt eine Veränderung nach Ca^{2+} -Zugabe, die Ergebnisse unterscheiden sich aber deutlich von PKD2C680-796(wt). Die Veränderungen der Mutation von EF-Hand 1 im Vergleich zum Wildtyp scheinen also einen direkten Einfluss auf den Aggregationszustand zu haben.

PKD2C680-796(T771A, E774A) zeigt in Lösung eine molekulare Masse von 67,345 g/mol. Dies spricht bei einer molekularen Masse von 13.4 kDa für das Vorliegen eines Oligomers in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} reduziert sich die scheinbare molekulare Masse auf 54,257 g/mol. Auch der relative hydrodynamische Radius reduziert sich in Anwesenheit von Ca^{2+} um 13.8 %. Die Zugabe von Calcium führt also zu einer Änderung des Aggregationszustandes von PKD2C680-796(T771A, E774A) in Lösung. Mutationen der EF-Hand 2 haben scheinbar einen ähnlichen Einfluss auf den Aggregationszustand wie auch Mutationen der EF-Hand 1. Allerdings ähnelt das Verhalten bei Ca^{2+} -Zugabe, also eine Verringerung der molekularen Masse, eher dem des Wildtyps.

Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) zeigt in Abwesenheit von Calcium eine schlechte Auflösung und deutlich weniger als die zu erwartenden 117 Signale für die Amidprotonen des Proteinrückgrats. Nach Zugabe von Calcium verbessert sich die spektrale Auflösung nicht. Allerdings nimmt die Intensität einiger Signale bei gleichbleibendem Volumen der Probe und gleichen Aufnahmebedingungen ab. Auch pH- und Temperaturveränderungen verbessern die spektrale Auflösung nicht. Besonders im Bereich zwischen 8.0-8.5 ppm und 118-125 ppm sind viele Signale schlecht aufgelöst und viele Signale im Bereich der chemischen Verschiebung von Random-Coil-Positionen zu finden. Im Vergleich zum

(^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796(wt) sind keine Signale aus den gut aufgelösten Bereichen der beiden EF-Hände und des Linkers dazwischen zu sehen. Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796(T771A, E774A) zeigt in Abwesenheit von Calcium ebenfalls eine schlechte Auflösung und deutlich weniger als die zu erwartenden 117 Signale für die Amidprotonen des Proteinerückgrats. Weder Ca^{2+} -Zugabe noch Veränderungen im pH-Wert oder der Temperatur verbessern die spektrale Auflösung. Im Bereich zwischen 8.0-8.5 ppm und 118-125 ppm sind viele Signale schlecht aufgelöst. Im Vergleich zum (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796(wt) sind aus den gut aufgelösten Bereichen der beiden EF-Hände und des Linkers dazwischen noch das Gly732, Asp752, Thr751 und L729 eindeutig zuzuordnen.

Die (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren bestätigen den Eindruck, dass die Mutationen im Bereich der EF-Hand 1 einen stärkeren strukturellen Einfluss haben als die in EF-Hand 2. Es fällt auch auf, dass im Falle der Mutation in EF-Hand 2 keine Signale in Anwesenheit von Ca^{2+} erscheinen, obwohl eine Bindung von Ca^{2+} an EF-Hand 2 eindeutig nachgewiesen werden konnte. Dies wiederum ist ein weiteres Argument dafür, dass eine intakte EF-Hand 1 für die richtige Faltung und die korrekte Funktionalität in der Zelle verantwortlich ist. Die Bindung von Ca^{2+} an EF-Hand 2 genügt scheinbar nicht für eine korrekte Faltung.

5.3.2 Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} mittels CD-Spektroskopie

Um Informationen über die Sekundärstruktur und deren Änderung durch Ca^{2+} -Zugabe zu erhalten, wurden CD-Spektren aufgenommen und analysiert. Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) eine Zusammensetzung aus 6 % α -Helix, 36 % β -Faltblatt, 25 % Schleifen und 34 % ungeordnet. Nach Bindung von Ca^{2+} ändert sich die Zusammensetzung der Sekundärstruktur in 8 % α -Helix, 33 % β -Faltblatt, 21 % Schleifen und 36 % ungeordnet. Für PKD2C680-796(T771A, E774A) zeigt sich eine Zusammensetzung aus 18 % α -Helix, 26 % β -Faltblatt, 22 % Schleifen und 33 % ungeordnet. Nach Bindung von Ca^{2+} ändert sich die Zusammensetzung der Sekundärstruktur in 18 % α -Helix, 26 % β -Faltblatt, 24 % Schleifen und 31 % ungeordnet.

Der α -helikale-Anteil von PKC2C680-796(wt) in Anwesenheit von Ca^{2+} liegt bei 47 %. Dieser Anteil reduziert sich im Falle der mutierten EF-Hand 1 um ca. 83 % und für die mutierten EF-Hand 2 um 62 %.

Die CD-Auswertung bestätigt die Beobachtung aus den NMR-Spektren. Im Vergleich zu PKD2C680-796(wt) ist der α -helikale-Anteil im Falle der mutierten EF-Hand 2 noch deutlich größer als bei der mutierten EF-Hand 1. Das bedeutet, der Bereich der mutierten EF-Hand 1 ist für die Bildung der beiden Helix-Loop-Helix-Motive der EF-Hände von großer Bedeutung. Der hohe ungeordnete Anteil für beide Mutanten passt zu den Ergebnissen der (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren. Für PKD2C680-796(T771A,

E774A) sind noch wenige Peaks von der Zuordnung des Wildtyps übertragbar für PKD2C680-796(D739A, E740A, D744A) keine.

5.4 Interaktion des Fragments PKD2C680-796 mit dem Protein mammalian diaphanous homolog 1 (mDia1)

Der cytoplasmatische C-Terminus von PKD2C interagiert mit dem N-Terminus von mDia1 [64]. In vitro wurde die Interaktion von zwei Fragmenten, PKD2C679-968 und 743-871, untersucht. mDia1 hat nur das Fragment PKD2C679-968 gebunden.

Unter dem Aspekt der Ca^{2+} -Regulierung in der Zelle wurde überprüft, ob mDia1 den Bereich der beiden EF-Hände (AS727-774) [26] bindet. Hierfür wurde ^{15}N markiertes PKD2C680-796 in Anwesenheit von Ca^{2+} mit mDia1(69-457) titriert. Ein großer Teil der Signale zeigt eine deutliche Abnahme der Intensität bei mDia1(69-457)-Zugabe. Einige Signale verschwinden vollständig. mDia1(69-457) bindet also Ca^{2+} -gebundenes PKD2C680-796. Für die Titration wurden (^1H - ^{15}N)-TROSY-HSQC-Spektren verwendet, da der Komplex PKD2C680-796/mDia1(69-457) eine Größe von 63 kDa hat. Dadurch erhöht sich die Korrelationszeit τ_c , was mit einer Verbreiterung der Linien einhergeht. Durch die Verwendung einer TROSY-HSQC-Pulsfolge können die Verbreiterungseffekte zum Teil verkleinert werden.

Für die Bestimmung der Bindungskonstante erfolgte eine interne Referenzierung der (^1H - ^{15}N)-TROSY-HSQC-Spektren über das Signal des H^{N} von Gln743. Das Signal nimmt proportional mit der Konzentration ab und eignet sich daher für die interne Referenzierung. Wäre Gln743 an der Bindung beteiligt, wäre dies nicht der Fall.

Um die Dissoziationskonstante zu bestimmen, wurden die vier Aminosäuren Gly734, Arg742, Thr751 und Thr771 ausgewählt und die Abnahme der Signalintensität mit dem Anstieg der mDia1(69-457)-Konzentration verfolgt. Die Auswahl der Aminosäuren erfolgte aufgrund ihrer Lage im Protein. Die vier Aminosäuren liegen über beide EF-Hände und den dazwischen-liegenden Linker verteilt. So kann eine Beteiligung beider EF-Hände an der Bindung gezeigt werden. Die Auswertung ergab einen durchschnittlichen K_D -Wert von 39.3 μM .

Bei Betrachtung aller aus der Zuordnung von Frank Schumann [26] übertragenen Aminosäuren und ihre prozentuale Abnahme der Intensität bei 6-fachem Überschuss von mDia1(69-457) ist gut zu erkennen, dass Aminosäuren beider EF-Hände eine mittelstarke (Asp744) und starke (Lys735, Asn737, Asp765, Glu769, Thr771) Abnahme der Intensität zeigen. Überwiegend Aminosäuren der EF-Hände oder in deren näheren Umgebung im Protein zeigen einen Signalabfall im Bereich von 80-100 %, im Bereich des Mittelwerts minus der Standardabweichung. Sie zeigen also eine signifikante Abnahme der Intensität aufgrund der Bindung von mDia1(69-457).

Wenn man die relative Stärke der Abnahme der Integrale auf die Struktur von PKD2C680-796 (pdb: 2KLE) überträgt, kann man gut erkennen, dass mDia1(69-457) an beide EF-Hände bindet und diese wie eine Art Klammer umschließt.

Diese Ergebnisse widersprechen auf den ersten Blick den Ergebnissen aus der Veröffentlichung von Rundle *et al* [64], wonach mDia1 Polycystin-2 in einem Bereich nach Aminosäure Glu871 bindet. Bei näherer Betrachtung der *in vitro* untersuchten Fragmente auf Bindung durch mDia1 fällt auf, dass nur das Fragment PKD2C679-968 die beiden vollständigen Bereiche der EF-Hände beinhaltet. Das Fragment PKD2C743-871, das nicht von mDia1 gebunden wird, enthält nur den Bereich der EF-Hand 2. Aus den Kapiteln 4.1, 5.1 und 4.3, 5.3 konnte klar gezeigt werden, dass gerade der Bereich der EF-Hand 1 für eine wohldefinierte Struktur beider EF-Hände und der damit verbundenen Ausbildung beide Helix-Loop-Helix-Motive von entscheidender Bedeutung ist. Fehlt nun das erste Helix-Loop-Helix-Motiv erklärt das, warum eine Bindung von mDia1 an das Fragment PKD2C743-871 nicht mehr möglich und daher auch nicht nachweisbar war.

5.5 Struktureller Vergleich und Vergleich der Zuordnungen des Fragments PKD2C680-796 (pdb: 2KLE) mit PKD2C720-797 (pdb: 2KQ6) und PKD2C725-880

5.5.1 Verbesserte Zuordnung und Vergleich des Fragments PKD2C680-796 mit den Zuordnungen von PKD2C720-797 und PKD2C725-880

Neben der pdb-Struktur 2KLE von 2009 [26] wurde 2010 auch die pdb-Struktur 2KQ6 [90] veröffentlicht. Beide Strukturen weisen mit einem RMSD von 7.57 Å deutliche Unterschiede auf. Daraufhin wurden die Tripelresonanzspektren, die für die Zuordnung von PKD2C680-796 [125] benutzt wurden, überprüft. Für die vier Aminosäuren Ser728, Leu729, Glu754 und Ser795 konnte die Zuordnung verbessert werden.

5.5.1.1 Verbesserung der Zuordnung von PKD2C680-796

Es wurde grafisch nachvollziehbar gezeigt, dass für Leu729/2KLE im CBCACONH kein Serin, mit einer chemischen Verschiebung für das C β von ca. 62-67 ppm [124]) als Vorgänger zu sehen ist. Die im CBCACONH gefundene chemische Verschiebung des C β liegt bei ca. 33 ppm. Des Weiteren würde die chemische Verschiebung des C β für Leu729/2KLE laut CBCANH bei ca 30 ppm liegen. Die durchschnittliche chemische Verschiebung des C β für Leucine liegt aber zwischen 40 und 44 ppm [124]. Die chemischen Verschiebungen der Signale im HNCA und CBCANH von

Ser728 in der verbesserten Zuordnung zeigen also eine bessere Übereinstimmung zu den chemischen Verschiebungen im CBCACONH von Leu729.

Für Glu754 konnte ebenfalls grafisch gezeigt werden, dass eine Überlagerung der Signale von Asp744 und Glu754 viel wahrscheinlicher ist als die eingetragene Zuordnung für Glu754/2KLE, da in den 3D-Spektren (HNCA, CBCACONH, CBCANH) für die zugeordnete chemische Verschiebung des H^N im HSQC keine Signale erkennbar sind. Die neu zugeordneten chemischen Verschiebungen der Signale im HNCA und CBCANH von Glu754 passen viel besser zu den chemischen Verschiebungen im CBCACONH von Ile755. Bei Betrachtung der Veröffentlichung zur Zuordnung von 2KLE [125] fällt auf, dass die Signale im HSQC richtig beschriftet sind, also eine Überlagerung der Signale der H^N von Asp744 und Glu754 gezeigt wird. Man kann also davon ausgehen, dass es sich hier gar nicht um einen Zuordnungsfehler handelt, sondern nur um einen Fehler im Übertrag der Daten.

Die verbesserte Zuordnung für Ser795 im Vergleich zu Ser795/2KLE zeigt, dass im CBCANH zwei Serine gleich nebeneinander liegen, wobei beide Aminosäuren ein Serin als Vorgänger haben. Allerdings ist die Aminosäure, die im CBCACONH ein Serin also Vorgänger sieht, nur im Falle der verbesserten Zuordnung ein Serin. Das Ser795 in der Zuordnung von Frank Schumann [125] ist kein Serin, da im CBCANH eine chemische Verschiebung für das C β von ca. 40 ppm zu sehen ist.

Die Signale im HSQC für Ser728, Leu729, Glu754 und Ser795 wurden von Frank Schumann nicht zugeordnet. Das bedeutet, die restliche Zuordnung der Struktur 2KLE ist von dieser Verbesserung nicht betroffen und somit in erster Linie auch nicht die Struktur von 2KLE.

Mithilfe der Tripelresonanzspektren (HNCA, CBCACONH, CBCANH) konnten fast 50 % der von Frank Schumann zugeordneten Signale für das (¹H-¹⁵N)-HSQC von PKD2C680-796 bestätigt werden. Da die Übereinstimmungen sehr groß waren, wurde auf eine weitere, zeitintensive Überprüfung der von Frank Schumann für die Zuordnung verwendeten, homonuklearen Spektren (TOCSY, NOESY), verzichtet.

5.5.1.2 Vergleich der Zuordnungen der Fragmente PKD2C680-796 (pdb-Struktur 2KLE), PKD2C720-797 (pdb-Struktur 2KQ6) und der Zuordnung des Fragments PKD2C725-880

Bei Vergleich der Zuordnungen der Strukturen 2KLE und 2KQ6 fällt auf, dass sehr große Unterschiede vor allem im Bereich der ersten Hälfte der EF-Hand 1 (Glu727-Asp739) und nach EF-Hand 2 (Thr771-D790) bestehen. Die meisten Übereinstimmungen finden sich im Bereich des Linkers zwischen den beiden EF-Händen und EF-Hand 2 (Arg742-Asp767). Allerdings gibt es auch in diesem Bereich anders zugeordnete Signale, z. B. Gln768 in 2KLE entspricht Thr771 in 2KQ6. Bei Vergleich der Zuordnung von 2KQ6 mit dem (¹H-¹⁵N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796 fällt auf, dass sich auch die Spektren sehr deutlich unterscheiden.

Das Fragment PKD2C720-797, das von Hodsdon *et al* [90] verwendet wurde, zeigt keine Signale im Random-Coil-Bereich. Besonders fällt auf, dass das Gln768 in EF-Hand 2, das aufgrund der Beteiligung an der Ca^{2+} -Bindung stark tieffeldverschoben ist, in PKD2C720-797 scheinbar nicht tieffeldverschoben vorliegt. Die verbesserte Zuordnung von PKD2C680-796 zeigt im Vergleich zur Zuordnung von 2KQ6 eine höhere Übereinstimmung für Ser728 und Glu754. Es stellt sich hier natürlich die Frage, ob bei so großen Unterschieden in den (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren überhaupt von einer ähnlichen Faltung der Proteinfragmente des cytosolischen C-Terminus ausgegangen werden kann. Das von Schumann *et al* [26] verwendete Fragment ist um die Aminosäuren 680-719 in Polycystin-2 länger als das von Hodsdon *et al* [90] verwendete Fragment. Es ist nicht bekannt, welchen Einfluss diese N-terminalen Aminosäuren besitzen und welche Bedeutung diese für die Faltung der EF-Hände haben.

Bei Vergleich der Zuordnung von PKD2C725-880 mit der Zuordnung von 2KQ6 sind die Übereinstimmungen deutlich größer. Im Bereich zwischen Lys735-Asp792 stimmen die Zuordnungen vollständig überein. Einzige Ausnahme bildet Glu768, dessen Zuordnung dem des Fragments PKD2C680-796 entspricht. Die Zuordnungen der ersten Hälfte der EF-Hand 1 (Glu727-Gly734) unterscheiden sich. Das Fragment PKD2C725-880 besitzt N-terminal fünf Aminosäuren weniger als das von Hodsdon *et al* [90] verwendete Fragment PKD2C720-797. Allerdings ist es C-terminal um 83 Aminosäuren länger. Bei diesem Vergleich fällt auf, dass für die beiden längeren Fragmente das Glu768 stark tieffeldverschoben erscheint. Im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796 ist das Signal des H^{N} für Glu768 gut sichtbar. Für das Fragment PKD2C725-880 ist das Integral des Signals deutlich abgeschwächt. Die Fragmente PKD2C725-880 und PKD2C720-797 wurden in Anwesenheit hoher Ca^{2+} -Konzentrationen gereinigt und die Zuordnungen bei einem deutlich höheren pH-Wert (pH 7.5) gemacht. Eventuell haben diese Faktoren Einfluss auf die Sichtbarkeit des Signals des H^{N} für Glu768 im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum und wurde folglich von Hodsdon *et al* [90] falsch zugeordnet.

5.5.2 Vergleich der Strukturen 2KLE und 2KQ6

Obwohl beide Strukturen nahezu gleiche Sequenzen haben, weisen die Strukturen deutliche Unterschiede auf (RMSD = 7.57 Å). Die pdb-Struktur 2KLE wurde von Aminosäure Ile725-Leu796, die pdb-Struktur 2KQ6 von Aminosäure Asn720-Pro797, gerechnet.

Die Struktur 2KQ6 zeigt vier α -Helices (α_1 , α_2 , α_3 und α_4). Bei Vergleich der Helix α_1 (Ile725-Gln731) mit den gleichen Aminosäuren in 2KLE fällt auf, dass dort keine α -helikale-Struktur vorhanden ist. Betrachtet man die Zuordnung von 2KLE sieht man, dass in diesem Bereich deutlich weniger Resonanzen als in 2KQ6 zugeordnet werden konnten. Um eine α -Helix bei der Strukturrechnung zu erhalten, müssen natürlich genügend NOE-Kontakte für diesen Bereich vorhanden sein. Eventuell

können durch die Verbesserung der Zuordnung mit Ser728 und Leu729 für die Struktur bessere Ergebnisse erzielt werden.

Helix α_2 (Phe738–Leu745) sieht im Vergleich zu 2KLE ähnlich aus. Helix α_3 (Ala753–Tyr762) ist im Vergleich zur Helix α_3 von 2KLE um 90° verschoben. Der von PyMOL berechnete RMSD von 3.31 \AA für die EF-Hand 1 im Vergleich zum RMSD der ganzen Struktur (7.5 \AA) bestätigt diese Annahme. Der NOE-Kontakt der beiden Aminosäuren Phe738 und Asp752 ist für die Ausrichtung der beiden Helices verantwortlich. Bei Betrachtung der Zuordnung beider Strukturen fällt auf, dass das Asp752 gleich zugeordnet wurde, für Phe738 jedoch eine unterschiedliche Zuordnung erfolgte. Die Zuordnung für Phe738 in PKD2C680-796 erfolgte unabhängig voneinander zweimal gleich und die Zuordnung von Asp752 ist für alle zugeordneten Fragmente gleich. Daher gibt es nur zwei Erklärungen für diese Beobachtungen. Entweder die Fragmente unterscheiden sich strukturell durch die unterschiedliche Aminosäuresequenz und die Zuordnungen für PKD2C680-796 und PKD2C720-797 sind beide korrekt oder es handelt sich um einen Zuordnungsfehler im Fragment PKD2C720-797 von Hodsdon *et al* [90].

Helix α_4 ist in 2KLE nur ansatzweise vorhanden. Betrachtet man die Zuordnung von 2KLE, sieht man, dass auch in diesem Bereich zu wenig Resonanzen vorhanden sind um eine α -helikale Anordnung bei der Strukturrechnung zu erhalten.

5.6 Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C725-880

Das Fragment PKD2C725-880 besitzt zwei EF-Hände (Aminosäuren 727-739 und 763-774) [5, 26], zwei Coiled-Coil-Domänen (Aminosäuren 781-796 und 835-873) [27-28] und ein ER-Retentionssignal (Aminosäuren 787-820) [8].

5.6.1 Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ^1H - und 2D-(^1H - ^{15}N)-NMR-Spektroskopie

Das Fragment zeigt bei einer Größe von 17.8 kDa im ^1H -Spektrum die zu erwartenden Linienbreiten. Viele Signale sind gut aufgelöst und im Bereich um 0 ppm sind hochfeldverschobene Signale zu sehen.

Das Fragment PKD2C725-880 enthält die beiden EF-Hände, für die K_D -Werte der Ca^{2+} -Bindung von 55 und 179 \mu M gefunden wurden [26]. Die Ca^{2+} -Zugabe führt, wie schon im Fragment PKD2C680-796 im 1D- ^1H -Spektrum zur Verschiebung des H^{N} Signals von Asp752 und zum Erscheinen des Signals der H^{δ} von Phe738. Des Weiteren kann das Signal rechts der H^{δ} von Phe738, das mit steigender Ca^{2+} -Konzentration shiftet und zu einem Duplett aufspaltet, als das Signal der H^{ϵ} von Tyr836, das sich am Anfang der Coiled-Coil-Domäne [28] befindet, zugeordnet

werden. Für die H^ϵ von Tyr762 kann die Zuordnung des Dupletts aus der Zuordnung von PKD2C680-796 übertragen werden. Es fällt auf, dass die Signale für die H^δ von Phe738 und die H^ϵ von Tyr762 im Vergleich zum Fragment PKD2C680-796 tieffeldverschoben vorliegen. Dies kann nicht an den unterschiedlichen pH-Werten liegen, da das Signal der H^δ von Phe738 im Fragment PKD2C680-796 unabhängig vom pH-Wert bei $\delta = 6.4-6.5$ ppm liegt. Die Fragmente PKD2C725-880 und PKD2C680-796 überschneiden sich lediglich in den Bereichen der EF-Hände. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Grund für die Tieffeldverschiebung strukturelle Effekte durch die unterschiedlichen Aminosäuren der Fragmente ist. Das bedeutet also, das Vorhandensein der N-terminalen Aminosäuren hat einen anderen Einfluss auf die Struktur der beiden EF-Hände als die Anwesenheit der Coiled-Coil-Domäne [28]. Durch den Shift des Signals der H^ϵ von Tyr836 ist auch bewiesen, dass die Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hände strukturellen Einfluss auf die Coiled-Coil-Domäne [28] hat. Dies gibt einen weiteren Hinweis; dass die EF-Hände Einfluss auf die Funktion von Polycystin-2 als Ca^{2+} selektiver, intrazellulärer Kationenkanal [26, 55, 90] und die Regulation der Interaktion mit Polycystin-1 [27, 68] haben.

Das Fragment PKD2C725-880 besitzt 6 Histidine (His750, His773, His775, His793, His822 und His851). Aufgrund der großen Unterschiede in den $1D-^1H$ -Spektren konnte nur die Zuordnung der zwei Signale des $H^{\epsilon 1}$ und $H^{\delta 2}$ von His851 übertragen werden. Damit ist auch bewiesen, dass die Entstehung der Schulter, die links des Signals des $H^{\epsilon 1}$ von His851 bei Ca^{2+} -Zugabe entsteht, auf Veränderungen in den Aminosäuren 828-880 zurückzuführen ist. Nur in diesem Bereich überschneiden sich beide Fragmente und beide Fragmente zeigen das Auftauchen der Schulter. Dies könnte zwei Ursachen haben. Die Ca^{2+} -Bindung an die EF-Hände hat strukturellen Einfluss auf den Bereich der Coiled-Coil-Domäne [28] oder es ist eine weitere Bindungsstelle für Ca^{2+} im Bereich dieser Aminosäuren vorhanden.

Bei Charakterisierung der Shifts der Resonanzlinien in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration, ergibt der Shift des H^N von Asp752 einen K_D -Wert von $507 \mu M$. Der Shift der H^ϵ von Tyr836 ergibt einen K_D -Wert von $712 \mu M$. Die Auswertung des Shifts der H^ϵ von Tyr762 ergibt einen K_D -Wert von $652 \mu M$. Zusätzlich wurde noch der Shift der vier Alanine (Ala753, Ala757, Ala862, Ala873) in PKD2C725-880 ausgewertet. Die Bindungskurven der Shifts der vier Alanine ergeben einen Durchschnitts- K_D -Werte von $673 \mu M$. Auf den ersten Blick erscheinen die K_D -Werte im Vergleich zu PKD2C680-796 zu hoch. Bei Betrachtung der Titrationsbedingungen fällt jedoch auf, dass die Konzentration des Proteins (im mM-Bereich) zu hoch ist, um vernünftige Werte für μM -Bindungskonstanten zu erhalten. Was man aber deutlich sehen kann ist das es scheinbar drei Bindungskonstanten gibt. Es kann natürlich sein, dass im Bereich der Coiled-Coil-Domäne [28] oder im Bereich zwischen den EF-Händen und der Coiled-Coil-Domäne zusätzlich noch eine unspezifischere Bindung von Ca^{2+} erfolgt.

Die $1D-^1H$ -NMR-Diffusionsmessungen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} zeigen abhängig von den Reinigungsbedingungen unterschiedliche Ergebnisse. Es wurden

drei verschiedene Proteinexpressionen und -reinigungen mithilfe von $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Diffusionsmessungen untersucht.

Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C725-880 in Lösung, nach Reinigung in Abwesenheit von Ca^{2+} und über eine Gelfiltrationssäule, eine molekulare Masse von 35,881 g/mol. Dies spricht bei einer molekularen Masse von 17.8 kDa für das Vorliegen eines Dimers in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} reduziert sich die scheinbare molekulare Masse auf 25,636 g/mol und entspricht damit eher einem Monomer. Auch der relative hydrodynamische Radius reduziert sich in Anwesenheit von Ca^{2+} um 9.8 %. Die Zugabe von Calcium führt also zu einer Änderung des Aggregationszustandes von PKD2C725-880 in Lösung. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Diffusionsmessungen von PKD2C725-880.

Wurde das Protein während der Expression und Reinigung hohen Ca^{2+} -Konzentrationen ausgesetzt und nicht über eine Gelfiltrationssäule gereinigt, ergaben sich für die molekulare Masse in Lösung deutlich unterschiedliche Werte. Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C725-880 in Lösung eine molekulare Masse von 662,648 g/mol. Dies spricht für das Vorliegen von hohen Aggregaten des Proteins in Lösung, die sich auch in Anwesenheit von Ca^{2+} nicht auflösen.

Bei einer Reinigung in Abwesenheit von Ca^{2+} und ohne Einsatz der Gelfiltrationssäule wurden ähnlich hohe Aggregate erhalten. Lediglich eine größere Änderung nach Ca^{2+} -Zugabe war zu beobachten, allerdings waren immer noch hohe Aggregate in Lösung detektierbar.

Bei Vergleich der Spektren für die Reinigung ohne Ca^{2+} fallen auf den ersten Blick nur wenige Unterschiede auf. Die vier Alanine im Bereich zwischen $\delta = 1.2\text{-}1.5$ ppm sind in beiden Spektren alle gut zu sehen. Im Spektrum nach Verwendung der Gelfiltrationssäule ist die Aufspaltung der Dupletts der Alanine etwas besser zu erkennen. Die Alanine befinden sich im Linker zwischen den beiden EF-Händen (Ala753) in EF-Hand 2 (Ala757) und in der Coiled-Coil-Domäne (Ala862 und Ala873). Ohne Ca^{2+} sind alle diese Bereiche also flexibel und frei beweglich im Protein. Nach Zugabe von Ca^{2+} shiften die Signale der vier Alanine für beide Spektren der Reinigung ohne Ca^{2+} . Bei Betrachtung des Amidbereichs fallen doch größere Unterschiede auf. Vor allem bei Betrachtung der Signale der $\text{H}^{\epsilon 1}$ der Histidine sieht man für den Fall der Verwendung der Vivaspins statt der Gelfiltrationssäule deutlich mehr als die vorhandenen sechs $\text{H}^{\epsilon 1}$ der Histidine. Dies spricht für eine Heterogenität des Proteins in Lösung, die im Falle der Verwendung der Gelfiltrationssäule nicht auftritt. Die $1D\text{-}^1\text{H}$ -Spektren beider Reinigungen ohne Ca^{2+} zeigen die beschriebenen Änderungen (Shift des H^{N} von Asp752, des H^{ϵ} von Tyr762 und 836, Erscheinen des Integrals des H^{δ} für Phe738), bei Ca^{2+} -Zugabe. Wenn man alle diese Fakten betrachtet, bleibt nur eine Erklärung für diese Beobachtungen. Nach Expression und dem ersten Reinigungsschritt, der Affinitätssäule, liegt PKD2C725-880 in Abwesenheit von Ca^{2+} als heterogenes Gemisch aus hohen Aggregaten und Dimer vor. Durch Verwendung der Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie) werden die hohen Aggregate von den Dimeren abgetrennt. Die Spektren zeigen

dann bei Ca^{2+} -Zugabe die Monomerisierung, hohe Diffusionskonstanten und eine kleine molekulare Masse.

Wird nun der Reinigungsschritt über die Gelfiltrationsäule weggelassen, werden die Aggregate nicht abgetrennt. Da sich die Spektren im Vergleich zur Verwendung der Größenausschlusschromatographie und Reinigung in Abwesenheit von Ca^{2+} doch sehr ähnlich sind, muss also die Austauschrate zwischen Mono-/Dimer und Aggregat schneller sein als die Diffusionskonstante des Aggregats. Sichtbar im Spektrum kann nur das Mono- oder Dimer sein. Die Aggregate weisen eine zu hohe molekulare Masse und damit eine zu lange Korrelationszeit τ_c auf, um im Spektrum noch sichtbar zu sein. Das bedeutet, durch den chemischen Austausch zwischen Mono-/Dimer und Aggregat, sieht man den Signalabfall des Aggregats am Spektrum des Mono-/Dimers.

Bei Betrachtung der Spektren mit Reinigung in Anwesenheit von Ca^{2+} fällt auf, dass das Spektrum im Vergleich zu den Spektren mit Reinigung in Abwesenheit von Ca^{2+} vollkommen verschieden sind. Die Linien des Spektrums sind deutlich breiter. Die Alanine sind praktisch nicht mehr zu sehen, liegen also nicht mehr so flexibel und frei beweglich vor. Die Linien der sechs Histidine sind, wenn überhaupt noch sichtbar, stark verbreitert. Die Zugabe von EDTA hat keine Auswirkungen auf die Linienbreiten. Allerdings zeigen sich die entgegengesetzten Reaktionen der für die Ca^{2+} -Bindung in den EF-Händen typischen Veränderung. Das H^{N} von Asp752 und die H^{ϵ} von Tyr762 und 836 shiften genau in die andere Richtung und das Integral des H^{δ} für Phe738 verschwindet. Das Entfernen von Ca^{2+} aus den EF-Händen kann also die gebildeten hohen Aggregate nicht auflösen. Anhand dieser Beobachtungen kann man also festhalten, dass bei Expression und Reinigung in Anwesenheit von hohen Ca^{2+} -Konzentrationen überwiegend hohe Aggregate vorliegen und wenn überhaupt nur wenig Mono-/Dimer.

Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C725-880 zeigt in Abwesenheit von Calcium eine schlechte Auflösung und deutlich weniger als die zu erwartenden 156 Signale für die Amidprotonen des Proteinrückgrats. Nach Zugabe von Calcium zeigen sich mehr Signale. Allerdings sind immer noch nur ca. 50 % der zu erwartenden Signale zu beobachten. Das Spektrum zeigt Signale die scharf und gut aufgelöst sind. Allerdings sind vor allem im Bereich zwischen 7.5-8.5 ppm und 118-123 ppm viele Signale schlecht aufgelöst. Das Spektrum bei pH 6.5 zeigt etwas mehr Signale als das bei pH 7. Die Erhöhung der Temperatur hingegen verschlechtert die Auflösung einiger Signale. Die Beobachtungen aus den 1D-Spektren finden sich also auch in den 2D-Spektren wieder. Durch den Austausch zwischen Mono-/Dimer und Aggregat sind nicht alle Signale für die H^{N} des Proteinrückgrats sichtbar.

5.6.2 Zuordnung des (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum

Mithilfe der Tripelresonanzspektren HNCA, CBCACONH und CBCANH konnte eine teilweise Zuordnung des Fragments PKD2C725-880 bei 278 K erfolgen. Die

Aminosäuren der beiden EF-Hände, des Linkers zwischen den beiden EF- Händen und die Aminosäuren im Bereich zwischen der EF-Hand 2 und der Coiled-Coil-Domäne konnten zum großen Teil zugeordnet werden. Insgesamt wurden 53 der 156 Aminosäuren des Proteins und 53 der 83 sichtbaren Amidprotonen im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum zugeordnet.

5.6.3 Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} mittels CD-Spektroskopie

Die beobachteten CD-Spektren sind typisch für ein partiell gefaltetes Protein und zeigen kleine Änderungen in der Sekundärstruktur in Anwesenheit von Ca^{2+} .

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C725-880 eine Zusammensetzung aus 25 % α -Helix, 22 % β -Faltblatt, 21 % Schleifen und 32 % ungeordnet. Nach Bindung von Ca^{2+} ändert sich die Zusammensetzung der Sekundärstruktur in 31 % α -Helix, 20 % β -Faltblatt, 20 % Schleifen und 29 % ungeordnet. Es fällt also auf, dass auch nach Ca^{2+} -Zugabe ein hoher ungeordneter Anteil vorliegt.

5.7 Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C680-968

Das Fragment PKD2C680-968 besitzt zwei EF-Hände (Aminosäuren 727-739 und 763-774) [5, 26], zwei Coiled-Coil-Domänen (Aminosäuren 781-796 und 835-873) [27-28] und ein ER-Retentionssignal (Aminosäuren 787-820) [8].

5.7.1 Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ^1H - und 2D-(^1H - ^{15}N)-NMR-Spektroskopie

Das Fragment zeigt in Anbetracht seiner Größe von 32.6 kDa im ^1H -Spektrum überwiegend sehr schmale Linienbreiten, aber zu wenig Signale insgesamt. Im Bereich um 0 ppm sind hochfeldverschobene Signale (Methylprotonen im hydrophoben Kern des Proteins) zu sehen. Das ^1H Spektrum ist typisch für ein partiell gefaltetes Protein.

Bei der Untersuchung des gesamten cytosolischen C-Terminus von Polycystin-2 zeigen sich, wie auch schon für die Fragmente PKD2C680-796 und PKD2C725-880, die typischen Veränderungen bei Ca^{2+} -Zugabe. Das Signal der H^δ von Phe738 erscheint und das Signal des H^N von Asp752 shiftet. Die chemischen Verschiebungen dieser Signale liegen näher an denen von PKD2C680-796. Auch das Duplett der H^ϵ von Tyr836 ist nicht zu sehen. Dies würde bedeuten, dass der strukturelle Einfluss der N-terminalen Aminosäuren größer ist, als der der Coiled-Coil-Domäne.

Für die Ca^{2+} -Interaktion wurde die Ca^{2+} -Zugabe in An- und Abwesenheit von EDTA untersucht.

Wird PKD2C680-968 in Anwesenheit von EDTA mit einem Unterschuss CaCl_2 , im Vergleich zur EDTA-Konzentration versetzt, tritt eine starke weißliche Trübung im NMR-Röhrchen auf. Nach Zentrifugation des Niederschlags kann man im ^1H -Spektrum deutliche Änderungen sehen. Die Bindung von Ca^{2+} an PKD2C680-968 kann aber erst bei einem Ca^{2+} -Überschuss (im Vergleich zur EDTA-Konzentration) nachgewiesen werden. Wird PKD2C680-968 in Abwesenheit von EDTA mit CaCl_2 versetzt, ist keine Trübung im NMR-Röhrchen zu beobachten. Die Spektren mit Ca^{2+} -Überschuss unterscheiden sich in An- und Abwesenheit von EDTA deutlich. Im Falle der Abwesenheit von EDTA sind im $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Bereich der Histidine sechs schmale Linien zu sehen. Diese fehlen vollständig in Anwesenheit von EDTA. Durch die Zugabe von EDTA wird eventuell der pH-Wert so erniedrigt, dass die Zugabe von hohen CaCl_2 -Konzentrationen zu einer weiteren Erniedrigung des pH-Werts und damit zu einem Ausfällen des Proteins führt.

Um zu klären, ob der Aggregationszustand des Proteins in Lösung einen Einfluss auf die Linienbreiten hat, wurden 1D- ^1H -NMR-Diffusionsmessungen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C680-968 in Lösung eine molekulare Masse von 55,717 g/mol. Dies spricht bei einer molekularen Masse von 32.6 kDa für das Vorliegen eines Dimers in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} reduziert sich die scheinbare molekulare Masse deutlich auf 25,609 g/mol. Die Zugabe von Calcium führt also zu einer Änderung des Aggregationszustandes von PKD2C680-968 in Lösung von einem Dimer zu einem Monomer. Die Diffusionsmessungen wurden im Rahmen der Ca^{2+} -Titration in Abwesenheit von EDTA durchgeführt. Es fällt auf, dass der Aggregationszustand aller, die EF-Hände beinhaltenden Fragmente (PKD2C680-968, PKD2C680-796 und PKD2C725-880, enorm durch die Ca^{2+} -Bindung beeinflusst wird und es sich dabei immer um eine Monomerisierung handelt.

Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-968 zeigt in Anwesenheit von Calcium eine schlechte Auflösung und deutlich weniger als die zu erwartenden 288 Signale für die Amidprotonen des Proteinrückgrats. Das Spektrum zeigt Signale die scharf und gut aufgelöst sind. Allerdings sind vor allem im Bereich zwischen 7.5-8.5 ppm und 115-125 ppm viele Signale schlecht aufgelöst. Des Weiteren liegen einige Signale im Random-Coil-Bereich.

Bei Vergleich des (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrums von PKD2C680-968 mit dem (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C680-796 fällt auf, dass die gut aufgelösten Signale den EF-Händen und dem Linker dazwischen zugeordnet werden können. Dies bedeutet, dass die gut strukturierten Bereiche überwiegend in diesem Bereich zu finden sind.

5.7.2 Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} mittels CD-Spektroskopie

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C680-968 eine Zusammensetzung aus 52 % α -Helix, 24 % β -Faltblatt, 7 % Schleifen und 18 % ungeordnet. Nach Bindung von Ca^{2+} ändert sich die Zusammensetzung der Sekundärstruktur in 55 % α -Helix, 19 % β -Faltblatt, 7 % Schleifen und 19 % ungeordnet.

Die Spektren sprechen für eine überwiegend α -helikale-Struktur in Lösung. Des Weiteren findet man einen deutlichen ungeordneten Anteil und es ergeben sich kleine Änderungen in der Sekundärstruktur in Anwesenheit von Ca^{2+} . Auch hier fällt auf, dass wohl der ungeordnete Anteil und die Aggregatbildung für die schlecht aufgelösten 1D- ^1H - und 2D-(^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren sind.

5.8 Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C797-968

Das Fragment PKD2C797-968 besitzt eine Coiled-Coil-Domäne (Aminosäuren 835-873) [28] und Teile des ER-Retentionssignals (Aminosäuren 787-820) [8].

5.8.1 Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ^1H - und 2D-(^1H - ^{15}N)-NMR-Spektroskopie

Das Fragment zeigt bei einer Größe von 19.1 kDa im ^1H -Spektrum normale Linienbreiten, aber zu wenig Signale insgesamt. Einige Signale sind gut aufgelöst und zeigen schmale Linien. Im Bereich um 0 ppm sind keine hochfeldverschobene Signale (Methylprotonen im hydrophoben Kern des Proteins) zu sehen. Das ^1H Spektrum ist typisch für ein partiell gefaltetes Protein.

Nachdem für das Fragment PKD2C725-880 (Kapitel 4.6.1.1 und 5.6.1) eine dritte Bindungskonstante für Ca^{2+} gefunden wurde, wurde auch für dieses Fragment die Interaktion mit Ca^{2+} untersucht. Die Fragmente überschneiden sich im Bereich 797-880, teilen also den Bereich zwischen EF-Händen und Coiled-Coil-Domäne und die Coiled-Coil-Domäne.

Bei Ca^{2+} -Zugabe war eine starke weißliche Trübung im NMR-Röhrchen zu sehen. Nach Zentrifugation des Niederschlags kann man im ^1H -Spektrum bis auf den Shift Resonanzen der fünf Histidine (His822, His851, His901, His927 und His967) nur eine Verbreiterung der Linien sehen. Für das Signal der CH_3 -Gruppen des Tris-Puffers wird ein Shift von 0.30 Hz bei Ca^{2+} -Zugabe beobachtet. Das bedeutet, die Veränderungen in den Signalen der fünf Histidine lassen sich also durch eine Änderung des pH-Wertes erklären. Um zu überprüfen ob dieser Effekt Ca^{2+} -spezifisch ist, wurde PKD2C797-968 zuerst mit MgCl_2 titriert. Hierbei wurde keine weißliche Trübung beobachtet. Im ^1H -Spektrum sind aber die gleichen Änderungen

in den Resonanzen der $H^{\epsilon 1}$ der Histidine ($\delta = 7.70-8.10$ ppm) zu sehen. Im nächsten Schritt wurden noch 10 mM $CaCl_2$ zugegeben. Daraufhin war eine starke weißliche Trübung im NMR-Röhrchen zu erkennen. Nach Zentrifugation des Niederschlags kann man im 1H -Spektrum keine weiteren Änderungen im Vergleich zur Mg^{2+} -Zugabe erkennen. Für das Signal der CH_3 -Gruppen des Tris-Puffers wird ein Shift von 1.00 Hz bei Ca^{2+} -Zugabe beobachtet. Das bedeutet, die Veränderungen in den Signalen der fünf Histidine lassen sich also erneut durch eine Änderung des pH-Wertes erklären. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um Mg^{2+} -oder Ca^{2+} -Zugabe handelt. Wie schon bei PKD2C680-968 kann die Zugabe bivalenter Kationen zum Ausfällen des Proteins führen. Im Falle von PKD2C680-968 passiert das nur in Anwesenheit von EDTA. PKD2C797-968 zeigt dieses Verhalten auch ohne EDTA. Den einzigen Unterschied, den diese beiden Fragmente haben, sind die EF-Hände. Scheinbar verhindern mit Ca^{2+} -besetzte EF-Hände und die dadurch erfolgte Änderung in der Struktur, das Ausfallen des Proteins bei Ca^{2+} -Zugabe.

Um den Aggregationszustand des Proteins in Lösung zu erhalten, wurden 1D- 1H -NMR-Diffusionsmessungen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} durchgeführt.

Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C797-968 im Rahmen der Titration nur mit Ca^{2+} in Lösung eine molekulare Masse von 616,434 g/mol. Dies spricht bei einer molekularen Masse von 19.1 kDa für das Vorliegen hoher Aggregate in Lösung. In Anwesenheit von Ca^{2+} verändert sich der Aggregationszustand im Rahmen des Fehlers nicht.

Mit DSS als Referenz zeigt PKD2C797-968 im Rahmen der Titration mit Ca^{2+} und Mg^{2+} in Lösung eine molekulare Masse von 483,070 g/mol. Dies spricht bei einer molekularen Masse von 19.1 kDa erneut für das Vorliegen hoher Aggregate in Lösung. Nur in Anwesenheit von Mg^{2+} treten Veränderungen im Aggregationszustand auf. Es liegen aber immer noch hohe Aggregate vor. Die Diffusionsmessungen zeigen, dass dieses Fragment, genauso wie PKD2C725-880, als heterogenes Gemisch vorliegt. Würden zu 100 % so große Aggregate vorliegen, dürfte man nicht so schmale und gut aufgelöste Signale im 1D- 1H -Spektrum sehen.

Das (1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C797-968 zeigt in Anwesenheit von Calcium eine schlechte Auflösung und deutlich weniger als die zu erwartenden 172 Signale für die Amidprotonen des Proteinrückgrats. Das Spektrum zeigt nur ganz wenig Signale die scharf und gut aufgelöst sind. Vor allem im Bereich zwischen 8.0-8.5 ppm und 115-125 ppm sind viele Signale schlecht aufgelöst. Im Übrigen liegen einige Signale im Random-Coil-Bereich. Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass nur ein Teil des Proteins als Mono- oder Dimer in Lösung vorliegt und somit für die NMR sichtbare Signale zeigt.

5.8.2 Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C797-968 eine Zusammensetzung aus 74 % α -Helix, 9 % β -Faltblatt, 2 % Schleifen und 13 % ungeordnet.

Das Spektrum zeigt eine überwiegend α -helikale-Struktur in Lösung. Des Weiteren findet man einen im Vergleich zu den anderen Fragmenten kleinen ungeordneten Anteil. Dieser kleine Anteil erklärt also nicht die wenigen Signale im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum. Bei so einem hohen α -helikalen-Anteil würde man viel höher aufgelöste Spektren erwarten. Durch die starke Aggregation wird das Fragment allerdings zu groß, um gute Signale zu erhalten.

5.9 Spektroskopische und biochemische Charakterisierung von PKD2C828-900

Das Fragment PKD2C828-900 besitzt eine Coiled-Coil-Domäne (Aminosäuren 835-873) [28].

5.9.1 Spektroskopische und strukturelle Charakterisierung mittels 1D- ^1H - und 2D-(^1H - ^{15}N)-NMR-Spektroskopie

Das Fragment zeigt bei einer Größe von 8.2 kDa im ^1H -Spektrum normale Linienbreiten. Einige Signale sind gut aufgelöst und zeigen schmale Linien. Im Bereich um 0 ppm sind keine hochfeldverschobene Signale (Methylprotonen im hydrophoben Kern des Proteins) zu sehen.

Bei Betrachtung der drei Dupletts der Alanine (Ala862, Ala873 und Ala889) sieht man, dass diese flexibel und frei beweglich sein müssen. Die Alanine befinden sich am Ende der Coiled-Coil Domäne und am Ende des Fragments. Diese Beobachtung steht im Einklang zur Kristallstruktur von Yu *et al*, die für diesen Bereich eine etwas offenere Struktur als weiter vorne, fanden [69].

Bei Überprüfung der tatsächlich sichtbaren Konzentration im NMR-Spektrum fällt auf, dass nur etwa 20 % des Proteins in Lösung sichtbar sind und in einer für NMR zugänglichen Größe vorliegen. Dies würde erneut für eine Heterogenität der Protein-Probe sprechen. Die Diffusionsmessungen, die im Falle der An- und Abwesenheit von Ca^{2+} hohe Aggregate zeigten, beweisen diese Beobachtung. In den Diffusionsmessungen ist aber trotzdem eine deutliche Reduzierung der molekularen Masse und des hydrodynamischen Radius zu beobachten. Die Zugabe hoher Ca^{2+} -Konzentration zeigt wenig Änderungen im ^1H -Spektrum von PKD2C828-900. Lediglich das Verschwinden eines breiten Signals, der Shift der zwei schmalen Imidazol-Signale und das Entstehen einer Schulter am $\text{H}^{\epsilon 1}$ von His851 sind zu beobachten. Dies ist ein weiterer Hinweis für das Vorhandensein einer dritten

Bindungsstelle oder zumindest eines sensitiven Bereichs für Ca^{2+} oder bivalente Kationen.

Die Untersuchung dieses Fragments mit Ca^{2+} liefert auch noch Hinweise für das Verhalten der Fragmente PKD2C680-968 in Anwesenheit von EDTA und PK2C797-968 für deren Interaktion mit Ca^{2+} . Da PKD2C828-900 kein Ausfällen bei Ca^{2+} -Zugabe zeigt, liegt die Vermutung nahe, dass der Bereich zwischen 797-827 für diesen Effekt verantwortlich ist. Bei Betrachtung der Aminosäuren in diesem Bereich fällt auf, dass es sich um eine sehr Asparaginsäure- und Glutaminsäure-reiche Region im Protein handelt. Es wäre nicht verwunderlich, wenn pH-Effekte oder die Zugabe bivalenter Kationen hier deutliche Änderungen zur Folge hätten.

Das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von PKD2C828-900 zeigt deutlich weniger als die zu erwartenden 73 Signale für die Amidprotonen des Proteinrückgrats. Bei Erhöhung der Temperatur zeigen sich deutlich mehr Signale, allerdings sind immer noch nur ca. 30 % der zu erwartenden Signale zu beobachten. Die Signale, die sichtbar sind, sind gut aufgelöst. Die meisten Signale werden bei $\text{pH} = 6.5$ und $T = 308 \text{ K}$ sichtbar. In Anbetracht der Ergebnisse aus Kapitel 4.9.1.1 lässt sich aber die Aussage treffen, dass der flexible, frei bewegliche Teil wohl im Bereich um Phe839 bis His851 liegt, da für die Ringprotonen genug Signale im 1D - ^1H -Spektrum gefunden werden. Der frei bewegliche Teil liegt also in der ersten Hälfte der Coiled-Coil-Domäne (Aminosäuren 835-873) [28]. Die niedrige Anzahl an Signalen bestätigt die Annahme, dass durch hohe Aggregation in Lösung nur wenige Signale gut sichtbar sind.

5.9.2 Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt für PKD2C828-900 eine Zusammensetzung aus 72 % α -Helix, 10 % β -Faltblatt, 5 % Schleifen und 14 % ungeordnet.

Das Spektrum zeigt eine überwiegend α -helikale-Struktur in Lösung. Des Weiteren findet man einen kleinen ungeordneten Anteil. Erneut ist mit diesen Ergebnissen gut erkennbar, dass die hohe Aggregation in Lösung der Grund für die wenigen Signale im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum ist und es nicht etwa daran liegt, dass das Protein schlecht gefaltet ist.

6 Zusammenfassung

Das PKD2 Gen ist eines der beiden mutierten Gene in Patienten, die an Autosomal-dominanter polyzystischer Nierenerkrankung leiden. Es kodiert für das Protein Polycystin-2, das aus 968 Aminosäuren besteht und aus sechs Transmembrandomänen und cytosolische N- und C-Termini aufgebaut ist. Für den cytosolischen C-Terminus wurden verschiedene Strukturmerkmale vorhergesagt und es ist eine Vielzahl an Interaktionspartnern, mit unterschiedlichsten Funktionen in der Zelle, bekannt. Ziel dieser Arbeit war es nun, mithilfe unterschiedlicher spektroskopischer Methoden detailliertere strukturelle und biochemische Informationen über den cytosolischen C-Terminus zu erhalten. Dafür wurden neben dem gesamten cytosolischen C-Terminus unterschiedliche Fragmente, die ein oder mehrere der Strukturmerkmale besitzen, einer strukturellen und biochemischen Analyse unterzogen. Weiterhin wurde die Interaktion mit dem Zytoskelett-assoziierte Protein mDia1 untersucht.

Für das Fragment PKD2C680-796 wurde bereits die NMR-Struktur am Lehrstuhl gelöst und die Existenz von zwei EF-Händen bewiesen. Innerhalb dieser Arbeit erfolgte die Zuordnung der Ringprotonen der Aromaten über 2D-(^1H - ^1H)-TOCSY und –NOESY-Spektren für Tyr684, Tyr762, Phe738, Phe759, His709, His750, His773, His775 und His793. Weiterhin konnte über die Spektren die Existenz verschiedener Zustände aufgrund partieller Ca^{2+} -Beladung gezeigt werden. Daraus konnte abgeleitet werden, dass die Sättigung beider EF-Hände mit Ca^{2+} für das Vorhandensein einer wohldefinierten Struktur von großer Bedeutung ist. Diffusionsmessungen zeigen bei Bindung von Ca^{2+} eine Monomerisierung.

Für die vier Histidine His750, His773, His775 und His793 wurden mittels pH-Titrationen die pK-Werte bestimmt. Die pK-Werte von His773 und His775 sind durch die direkte Nähe zum Ca^{2+} in den EF-Händen, stark von der Beladung mit Ca^{2+} der EF-Hände beeinflusst und zeigen deutlich erniedrigte pK-Werte im Vergleich zum Durchschnitt für Histidine in Proteinen.

Die CD-spektroskopische Analyse zeigt bei vollständiger Beladung mit Ca^{2+} eine überwiegend α -helikale-Struktur aber auch einen hohen ungeordneten Anteil.

Bei der Hochdruck-NMR-spektroskopischen Untersuchung fanden sich für das partiell mit Ca^{2+} -beladene PKD2C680-796 erneut Hinweise für das Vorliegen verschiedener Zustände. Bei Anwendung von Druck zeigte sich für die an der Ca^{2+} -Bindung beteiligten Aminosäure starke Änderungen. In Abwesenheit von Ca^{2+} zeigten sich nur noch kleine druckbedingte Shifts. Die Vermutung liegt nahe, dass das Ca^{2+} durch Anwendung von Druck freigesetzt wird. Bei Betrachtung der EF-Hand-Mutanten konnte gezeigt werden, dass bei Mutation der EF-Hand 1 immer noch die Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hand 2 möglich ist (K_D -Wert = 86 μM). Umgekehrt ist dies nicht der Fall. Der strukturelle Einfluss durch Mutationen an EF-Hand 1 im Vergleich zur EF-Hand 2 hingegen ist deutlich größer. Es konnte gezeigt werden,

dass für die wohldefinierte Faltung des Proteinfragments beide (funktionierende) EF-Hände und deren Beladung mit Ca^{2+} wichtig sind.

Für das Fragment PKD2C680-796 konnte gezeigt werden, dass es anders als vermutet, von dem Zytoskelett-assoziierten mDia1(69-457) im Bereich der Ca^{2+} -beladenen EF-Hände mit einem K_D -Wert = 39 μM gebunden wird und von diesem wie eine Klammer umschlossen wird. Auch hier ist das Vorhandensein beider EF-Hände für die Bindung erforderlich.

Für das Fragment PKD2C725-880 wurden bei Ca^{2+} -Zugabe die gleichen Veränderungen in den 1D- ^1H -Spektren und CD-Spektren wie auch im Fragment PKD2C680-796 gefunden. Im Bereich der EF-Hände und des Linkers dazwischen, sowie im Bereich des ER-Retentionssignals erfolgte eine Zuordnung der Resonanzen im 2D-(^1H - ^{15}N)-HSQC. Mittels Diffusionsmessungen konnte gezeigt werden, dass PKD2C725-880 in Lösung als heterogenes Gemisch aus hohen Aggregaten und Dimer/Monomer (abhängig von der Ca^{2+} -Beladung) vorliegt. Nach Abtrennung der Aggregate über eine Gelfiltrationssäule, kann das gleiche Monomer-/Dimer-Gleichgewicht, wie auch schon für PKD2C680-796, gezeigt werden

Für den gesamten cytosolischen C-Terminus PKD2C680-968 traten die identischen Veränderungen bei Ca^{2+} -Zugabe auf, wie schon für PKD2C680-796 und 725-880. Auch in den Diffusionsmessungen zeigte sich erneut das Monomer-/Dimer-Gleichgewicht. Im Bereich des ER-Retentionssignals wurde in Abwesenheit von Ca^{2+} eine starke Reaktion auf pH-Änderungen oder die Anwesenheit von bivalenten Kationen gefunden. Die CD-Spektren zeigen einen überwiegend α -helikalen-Anteil.

Für das Fragment PKD2C797-968 wurde gezeigt, dass es in Lösung als heterogenes Gemisch vorliegt und im Bereich des ER-Retentionssignals wurde auch hier eine Sensitivität auf pH-Veränderungen oder die Anwesenheit von bivalenten Kationen gefunden. Die CD-Spektren zeigen einen überwiegend α -helikalen-Anteil.

Das nach Trypsinverdau erhaltene Fragment PKD2C828-900 liegt in Lösung als heterogenes Gemisch vor. Es zeigt keine Reaktionen auf Ca^{2+} und eine hohe Beweglichkeit am Ende der Coiled-Coil-Domäne. Die CD-Spektren zeigen einen überwiegend α -helikalen-Anteil.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Fragmente, die die EF-Hände beinhalten, gleiche Veränderungen in den Spektren und ein Dimer-/Monomer-Gleichgewicht bei Ca^{2+} -Zugabe zeigen. Alle Fragmente, die die Coiled-Coil-Domäne der Kristallstruktur beinhalten, zeigen in Lösung ein heterogenes Verhalten und zeigen Aggregation. Der Bereich des ER-Retentionssignals zeigt eine Sensitivität für pH-Änderungen oder die Anwesenheit von bivalenten Kationen.

7 Literaturverzeichnis

1. Torres, V.E., P.C. Harris, and Y. Pirson, *Autosomal dominant polycystic kidney disease*. *Lancet*, 2007. **369**(9569): p. 1287-301.
2. Kühn, W. and G. Walz, *Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung*. *Dtsch Arztebl*, 2007. **104**(44): p. A 3022-8.
3. Peters, D.J. and L.A. Sandkuijl, *Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Europe*. *Contrib Nephrol*, 1992. **97**: p. 128-39.
4. *Polycystic kidney disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein*. *The International Polycystic Kidney Disease Consortium*. *Cell*, 1995. **81**(2): p. 289-98.
5. Mochizuki, T., et al., *PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein*. *Science*, 1996. **272**(5266): p. 1339-42.
6. Schneider, M.C., et al., *A gene similar to PKD1 maps to chromosome 4q22: a candidate gene for PKD2*. *Genomics*, 1996. **38**(1): p. 1-4.
7. Hughes, J., et al., *The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains*. *Nat Genet*, 1995. **10**(2): p. 151-60.
8. Cai, Y., et al., *Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(40): p. 28557-65.
9. Rossetti, S. and P.C. Harris, *Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant and autosomal recessive polycystic kidney disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(5): p. 1374-80.
10. Hateboer, N., et al., *Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2*. *European PKD1-PKD2 Study Group*. *Lancet*, 1999. **353**(9147): p. 103-7.
11. Elles, R.G., et al., *Diagnosis of adult polycystic kidney disease by genetic markers and ultrasonographic imaging in a voluntary family register*. *J Med Genet*, 1994. **31**(2): p. 115-20.
12. Rossetti, S., et al., *Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(7): p. 2143-60.
13. Belibi, F.A. and C.L. Edelstein, *Novel targets for the treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010. **19**(3): p. 315-28.
14. Harris, P.C. and V.E. Torres, *Polycystic kidney disease*. *Annu Rev Med*, 2009. **60**: p. 321-37.
15. Zhou, J., *Polycystins and primary cilia: primers for cell cycle progression*. *Annu Rev Physiol*, 2009. **71**: p. 83-113.
16. Delmas, P., et al., *Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(13): p. 11276-83.
17. Parnell, S.C., et al., *Polycystin-1 activation of c-Jun N-terminal kinase and AP-1 is mediated by heterotrimeric G proteins*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(22): p. 19566-72.
18. Hughes, J., et al., *Identification of a human homologue of the sea urchin receptor for egg jelly: a polycystic kidney disease-like protein*. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(3): p. 543-9.

19. Yuasa, T., et al., *The sequence, expression, and chromosomal localization of a novel polycystic kidney disease 1-like gene, PKD1L1, in human.* Genomics, 2002. **79**(3): p. 376-86.
20. Yuasa, T., et al., *Polycystin-1L2 is a novel G-protein-binding protein.* Genomics, 2004. **84**(1): p. 126-38.
21. Li, A., et al., *Identification of two novel polycystic kidney disease-1-like genes in human and mouse genomes.* Genomics, 2003. **81**(6): p. 596-608.
22. Nomura, H., et al., *Identification of PKDL, a novel polycystic kidney disease 2-like gene whose murine homologue is deleted in mice with kidney and retinal defects.* J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25967-73.
23. Wu, G., et al., *Identification of PKD2L, a human PKD2-related gene: tissue-specific expression and mapping to chromosome 10q25.* Genomics, 1998. **54**(3): p. 564-8.
24. Guo, L., et al., *The human polycystic kidney disease 2-like (PKDL) gene: exon/intron structure and evidence for a novel splicing mechanism.* Mamm Genome, 2000. **11**(1): p. 46-50.
25. Veldhuisen, B., et al., *Genes homologous to the autosomal dominant polycystic kidney disease genes (PKD1 and PKD2).* Eur J Hum Genet, 1999. **7**(8): p. 860-72.
26. Schumann, F., et al., *Ca²⁺-dependent conformational changes in a C-terminal cytosolic domain of polycystin-2.* J Biol Chem, 2009. **284**(36): p. 24372-83.
27. Qian, F., et al., *PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain.* Nat Genet, 1997. **16**(2): p. 179-83.
28. Giamarchi, A., et al., *A polycystin-2 (TRPP2) dimerization domain essential for the function of heteromeric polycystin complexes.* Embo Journal, 2010. **29**(7): p. 1176-91.
29. Griffin, M.D., et al., *Vascular expression of polycystin.* J Am Soc Nephrol, 1997. **8**(4): p. 616-26.
30. Geng, L., et al., *Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product.* J Clin Invest, 1996. **98**(12): p. 2674-82.
31. Geng, L., et al., *Distribution and developmentally regulated expression of murine polycystin.* Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 2): p. F451-9.
32. Ward, C.J., et al., *Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(4): p. 1524-8.
33. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., et al., *Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6397-402.
34. Foggensteiner, L., et al., *Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the PKD2 gene.* J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(5): p. 814-27.
35. Torres, V.E., et al., *Vascular expression of polycystin-2.* J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(1): p. 1-9.
36. Ong, A.C., et al., *Polycystin-1 expression in PKD1, early-onset PKD1, and TSC2/PKD1 cystic tissue.* Kidney Int, 1999. **56**(4): p. 1324-33.
37. Markowitz, G.S., et al., *Polycystin-2 expression is developmentally regulated.* Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 2): p. F17-25.
38. Yoder, B.K., X. Hou, and L.M. Guay-Woodford, *The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia.* J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(10): p. 2508-16.

39. Huan, Y. and J. van Adelsberg, *Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins*. J Clin Invest, 1999. **104**(10): p. 1459-68.
40. Scheffers, M.S., et al., *Polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease 1 gene, co-localizes with desmosomes in MDCK cells*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(18): p. 2743-50.
41. Obermuller, N., et al., *The rat pkd2 protein assumes distinct subcellular distributions in different organs*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 2): p. F914-25.
42. Luo, Y., et al., *Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca²⁺-permeable cation channel in renal epithelia*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(7): p. 2600-7.
43. Hanaoka, K., et al., *Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 990-4.
44. Tsiokas, L., S. Kim, and E.C. Ong, *Cell biology of polycystin-2*. Cell Signal, 2007. **19**(3): p. 444-53.
45. Cantiello, H.F., *Regulation of calcium signaling by polycystin-2*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(6): p. F1012-29.
46. Delmas, P., et al., *Gating of the polycystin ion channel signaling complex in neurons and kidney cells*. Faseb Journal, 2004. **18**(6): p. 740-2.
47. Hidaka, S., et al., *PIGEA-14, a novel coiled-coil protein affecting the intracellular distribution of polycystin-2*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 35009-16.
48. Kottgen, M., et al., *Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation*. Embo Journal, 2005. **24**(4): p. 705-16.
49. Streets, A.J., et al., *Identification of an N-terminal glycogen synthase kinase 3 phosphorylation site which regulates the functional localization of polycystin-2 in vivo and in vitro*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(9): p. 1465-73.
50. Tsiokas, L., et al., *Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(13): p. 6965-70.
51. Newby, L.J., et al., *Identification, characterization, and localization of a novel kidney polycystin-1-polycystin-2 complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20763-73.
52. Tsiokas, L., et al., *Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3934-9.
53. Kottgen, M. and G. Walz, *Subcellular localization and trafficking of polycystins*. Pflugers Arch, 2005. **451**(1): p. 286-93.
54. Chen, X.Z., et al., *Transport function of the naturally occurring pathogenic polycystin-2 mutant, R742X*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **282**(5): p. 1251-6.
55. Koulen, P., et al., *Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(3): p. 191-7.
56. Li, Y., et al., *Polycystin 2 interacts with type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca²⁺ signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41298-306.
57. Zhang, Q., P.D. Taulman, and B.K. Yoder, *Cystic kidney diseases: all roads lead to the cilium*. Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 225-30.
58. Davenport, J.R. and B.K. Yoder, *An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(6): p. F1159-69.

59. Pazour, G.J., et al., *Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease*. *Current Biology*, 2002. **12**(11): p. R378-80.
60. Geng, L., et al., *Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 7): p. 1383-95.
61. Nauli, S.M., et al., *Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells*. *Nat Genet*, 2003. **33**(2): p. 129-37.
62. Qin, H., et al., *Intraflagellar transport is required for the vectorial movement of TRPV channels in the ciliary membrane*. *Current Biology*, 2005. **15**(18): p. 1695-9.
63. Raychowdhury, M.K., et al., *Characterization of single channel currents from primary cilia of renal epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(41): p. 34718-22.
64. Rundle, D.R., G. Gorbisky, and L. Tsiokas, *PKD2 interacts and co-localizes with mDia1 to mitotic spindles of dividing cells: role of mDia1 IN PKD2 localization to mitotic spindles*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(28): p. 29728-39.
65. Jurczyk, A., et al., *Pericentrin forms a complex with intraflagellar transport proteins and polycystin-2 and is required for primary cilia assembly*. *J Cell Biol*, 2004. **166**(5): p. 637-43.
66. Kato, T., et al., *Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 4): p. 775-84.
67. Xu, G.M., et al., *Polycystin-1 activates and stabilizes the polycystin-2 channel*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(3): p. 1457-62.
68. Casuscelli, J., et al., *Analysis of the cytoplasmic interaction between polycystin-1 and polycystin-2*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. **297**(5): p. F1310-5.
69. Yu, Y., et al., *Structural and molecular basis of the assembly of the TRPP2/PKD1 complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(28): p. 11558-63.
70. Ma, R., et al., *PKD2 functions as an epidermal growth factor-activated plasma membrane channel*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(18): p. 8285-98.
71. Bai, C.X., et al., *Formation of a new receptor-operated channel by heteromeric assembly of TRPP2 and TRPC1 subunits*. *EMBO Rep*, 2008. **9**(5): p. 472-9.
72. Kottgen, M., et al., *TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex*. *J Cell Biol*, 2008. **182**(3): p. 437-47.
73. Lehtonen, S., et al., *In vivo interaction of the adapter protein CD2-associated protein with the type 2 polycystic kidney disease protein, polycystin-2*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(42): p. 32888-93.
74. Gallagher, A.R., et al., *The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(8): p. 4017-22.
75. Li, Q., et al., *Alpha-actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(12): p. 1587-603.
76. Li, Q., et al., *Polycystin-2 associates with tropomyosin-1, an actin microfilament component*. *Journal of Molecular Biology*, 2003. **325**(5): p. 949-62.
77. Li, Q., et al., *Polycystin-2 interacts with troponin I, an angiogenesis inhibitor*. *Biochemistry*, 2003. **42**(2): p. 450-7.
78. Cai, Y., et al., *Calcium dependence of polycystin-2 channel activity is modulated by phosphorylation at Ser812*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(19): p. 19987-95.

79. Hu, J., et al., *Casein kinase II and calcineurin modulate TRPP function and ciliary localization*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(5): p. 2200-11.
80. Liang, G., et al., *Polycystin-2 is regulated by endoplasmic reticulum-associated degradation*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(8): p. 1109-19.
81. Li, X., et al., *Polycystin-1 and polycystin-2 regulate the cell cycle through the helix-loop-helix inhibitor Id2*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(12): p. 1202-12.
82. Liang, G., et al., *Polycystin-2 down-regulates cell proliferation via promoting PERK-dependent phosphorylation of eIF2alpha*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(20): p. 3254-62.
83. Wang, S., et al., *Fibrocystin/polyductin, found in the same protein complex with polycystin-2, regulates calcium responses in kidney epithelia*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(8): p. 3241-52.
84. Fogelgren, B., et al., *The exocyst protein Sec10 interacts with Polycystin-2 and knockdown causes PKD-phenotypes*. Plos Genetics, 2011. **7**(4): p. e1001361.
85. Wallar, B.J. and A.S. Alberts, *The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(8): p. 435-46.
86. Zigmond, S.H., *Formin-induced nucleation of actin filaments*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(1): p. 99-105.
87. Alberts, A.S., *Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2824-30.
88. Watanabe, N., et al., *Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(3): p. 136-43.
89. Goode, B.L. and M.J. Eck, *Mechanism and function of formins in the control of actin assembly*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 593-627.
90. Petri, E.T., et al., *Structure of the EF-hand domain of polycystin-2 suggests a mechanism for Ca²⁺-dependent regulation of polycystin-2 channel activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(20): p. 9176-81.
91. Bertani, G., *Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 1951. **62**(3): p. 293-300.
92. Budisa, N., et al., *High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in Escherichia coli*. Eur J Biochem, 1995. **230**(2): p. 788-96.
93. Stoscheck, C.M., *Quantitation of protein*. Methods Enzymol, 1990. **182**: p. 50-68.
94. Pace, C.N., et al., *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. Protein Sci, 1995. **4**(11): p. 2411-23.
95. Gill, S.C. and P.H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal Biochem, 1989. **182**(2): p. 319-26.
96. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
97. Wishart, D.S., et al., *1H, 13C and 15N chemical shift referencing in biomolecular NMR*. J Biomol NMR, 1995. **6**(2): p. 135-40.
98. Liu, M., et al., *Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy*. Journal of Magnetic Resonance, 1998. **132**(1): p. 125-129.
99. Munte, C.E., et al., *C-mannosylation in the hypertrehalosaemic hormone from the stick insect Carausius morosus*. FEBS J, 2008. **275**(6): p. 1163-73.
100. Mills, R., *Self-Diffusion in Normal and Heavy-Water in Range 1-45 Degrees*. Journal of Physical Chemistry, 1973. **77**(5): p. 685-688.

101. Sklenar, V., et al., *Gradient-Tailored Water Suppression for H-1-N-15 Hsqc Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity*. Journal of Magnetic Resonance Series A, 1993. **102**(2): p. 241-245.
102. Bodenhausen, G. and D.J. Ruben, *NATURAL ABUNDANCE NITROGEN-15 NMR BY ENHANCED HETERONUCLEAR SPECTROSCOPY*. Chemical Physics Letters, 1980. **69**(1): p. 185-189.
103. Piotto, M., V. Saudek, and V. Sklenar, *Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions*. J Biomol NMR, 1992. **2**(6): p. 661-5.
104. Bax, A. and D.G. Davis, *Mlev-17-Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy*. Journal of Magnetic Resonance, 1985. **65**(2): p. 355-360.
105. Palmer, A.G., et al., *Sensitivity Improvement in Proton-Detected 2-Dimensional Heteronuclear Correlation Nmr-Spectroscopy*. Journal of Magnetic Resonance, 1991. **93**(1): p. 151-170.
106. Kay, L.E., P. Keifer, and T. Saarinen, *Pure Absorption Gradient Enhanced Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy with Improved Sensitivity*. Journal of the American Chemical Society, 1992. **114**(26): p. 10663-10665.
107. Schwendinger, M.G., et al., *Broad-Band Heteronuclear Hartmann-Hahn Sequences*. Journal of Magnetic Resonance Series A, 1994. **111**(1): p. 115-120.
108. Rance, M., J.P. Loria, and A.G.r. Palmer, *Sensitivity improvement of transverse relaxation-optimized spectroscopy*. J Magn Reson, 1999. **136**(1): p. 92-101.
109. Czisch, M. and R. Boelens, *Sensitivity enhancement in the TROSY experiment*. J Magn Reson, 1998. **134**(1): p. 158-60.
110. Pervushin, K.V., G. Wider, and K. Wuthrich, *Single Transition-to-single Transition Polarization Transfer (ST2-PT) in [15N, 1H]-TROSY*. J Biomol NMR, 1998. **12**(2): p. 345-8.
111. Meissner, A., et al., *Double spin-state-selective coherence transfer. Application for two-dimensional selection of multiplet components with long transverse relaxation times*. Molecular Physics, 1998. **95**(6): p. 1137-1142.
112. Weigelt, J., *Single scan, sensitivity- and gradient-enhanced TROSY for multidimensional NMR experiments (vol 120, pg 10778, 1998)*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(48): p. 12706-12706.
113. Zhu, G., X.M. Kong, and K.H. Sze, *Gradient and sensitivity enhancement of 2D TROSY with water flip-back, 3D NOESY-TROSY and TOCSY-TROSY experiments*. J Biomol NMR, 1999. **13**(1): p. 77-81.
114. Yamazaki, T., et al., *An HNCA Pulse Scheme for the Backbone Assignment of ¹⁵N, ¹³C, ²H-Labeled Proteins: Application to a 37-kDa Trp Repressor-DNA Complex*. J. Am. Chem. Soc., 1994. **116**(14): p. 6464-6465.
115. Grzesiek, S. and A. Bax, *Improved 3d Triple-Resonance Nmr Techniques Applied to a 31-kDa Protein*. Journal of Magnetic Resonance, 1992. **96**(2): p. 432-440.
116. Shan, X., et al., *Assignment of N-15, C-13(alpha), C-13(beta), and HN resonances in an N-15, C-13, H-2 labeled 64 kDa trp repressor-operator complex using triple-resonance NMR spectroscopy and H-2-decoupling*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(28): p. 6570-6579.
117. Wittekind, M. and L. Mueller, *Hncacb, a High-Sensitivity 3d Nmr Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha-Carbon and*

- Beta-Carbon Resonances in Proteins*. Journal of Magnetic Resonance Series B, 1993. **101**(2): p. 201-205.
118. Wallace, B.A. and L. Whitmore, *DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**: p. W668-W673.
 119. Sreerama, N. and R.W. Woody, *Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set*. Anal Biochem, 2000. **287**(2): p. 252-60.
 120. Compton, L.A. and W.C. Johnson, Jr., *Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication*. Anal Biochem, 1986. **155**(1): p. 155-67.
 121. Manavalan, P. and W.C. Johnson, Jr., *Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra*. Anal Biochem, 1987. **167**(1): p. 76-85.
 122. Lees, J.G., et al., *A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space*. Bioinformatics, 2006. **22**(16): p. 1955-62.
 123. Witzgall, R., *TRPP2 channel regulation*. Handb Exp Pharmacol, 2007(179): p. 363-75.
 124. Wang, Y. and O. Jardetzky, *Probability-based protein secondary structure identification using combined NMR chemical-shift data*. Protein Sci, 2002. **11**(4): p. 852-61.
 125. Schumann, F.H., et al., *NMR-assignments of a cytosolic domain of the C-terminus of polycystin-2*. Biomolecular Nmr Assignments, 2009. **3**(1): p. 141-4.
 126. Tanokura, M., *¹H-NMR study on the tautomerism of the imidazole ring of histidine residues. I. Microscopic pK values and molar ratios of tautomers in histidine-containing peptides*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1983. **742**(3): p. 576-85.
 127. Markley, J.L., *Correlation proton magnetic resonance studies at 250 MHz of bovine pancreatic ribonuclease. I. Reinvestigation of the histidine peak assignments*. Biochemistry, 1975. **14**(16): p. 3546-54.
 128. Stekrova, J., et al., *PKD2 mutations in a Czech population with autosomal dominant polycystic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(5): p. 1116-22.

8 Abkürzungsverzeichnis

Å Ångstrom

ADPKD Autosomal dominante polycystische Nierenerkrankung

AS Aminosäure

CD Circular dichroismus

DSS 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure

DTE Dithioerythritol

EDTA Ethylenediamintetraessigsäure

ER Endoplasmatisches Retikulum

HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence

IPTG Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

K Kelvin

kDa Kilodalton

mDia1(69-457) Fragment des Proteins mammalian diaphanous homolog 1 das von AS69-457 reicht

NMM New Minimal Medium

NMR Kernmagnetresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)

NOESY Nuclear Overhauser Effekt Spectroscopy

OD₆₀₀ Optische Dichte bei 600 nm

PC Polycystin

PC1 Polycystin-1

PC2 Polycystin-2

PKD Gen, das hauptsächlich für die ADPKD verantwortlich ist

PKD1 Gen, das für Polycystin-1 kodiert

PKD2 Gen, das für Polycystin-2 kodiert

PKD2C Bereich des cytosolischen C-Terminus der von Aminosäure 680-968 reicht

PKD2C680-796 Fragment des cytosolischen C-Terminus das von AS 680-796 reicht

PKD2C680-796mutEF1 das Fragment PKD2C680-796 mit mutierter EF-Hand 1

PKD2C680-796mutEF2 das Fragment PKD2C680-796 mit mutierter EF-Hand 2

R.T. Raumtemperatur

SDS Natriumdodecylsulfat

TEV Protease Cystein Protease aus dem Tobacco Etch Virus

TOCSY Total Correlation Spectroscopy

Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TROSY Transverse-relaxation optimized spectroscopy

U/min Umdrehungen pro Minute

wt Wildtyp, Fragment ohne Mutation

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für das spannende und interessante Thema, die vielen Diskussionen und die Möglichkeit, meine Arbeit in gut ausgerüsteten Laboren und an modernen Geräten durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Gronwald danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung meiner Arbeit. PD Dr. Michael Spörner danke ich für die freundliche Übernahme der Aufgabe des Drittprüfers.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Witzgall und seinen Mitarbeiterinnen Larissa Osten und Tina Stumpp für die stets freundliche und gute Zusammenarbeit.

Bei Prof. Dr. Sterner und seinem Mitarbeiter Klaus-Jürgen Tiefenbach möchte ich mich für die Benutzung des CD-Spektrometers und die freundliche Unterstützung bei den CD-Messungen bedanken.

Mein weiterer Dank gilt den vielen Mitgliedern des Lehrstuhls Kalbitzer für ihre stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre: Harald, Tobias, Bärbel, Konrad aus der Auremolgruppe; Malte, Hannes, Raphi, Sabine, Gudrun aus dem Ostlabor; Sabine, Dörte, Tanja, Sandra, Daniela, Michael, Werner aus dem Westlabor und Christoph, Robert, Groggy, Jörg und Markus aus dem ersten Stock.

Ein besonderer Dank geht an Sabine Laberer für die engagierte und zuverlässige Expression und Reinigung von mDia1.

Bei meinem Bürokollegen Paul möchte ich mich für die kompetente Hilfe und große Geduld bei allen NMR-Fragen und die gute Stimmung im Büro bedanken. Du hast einer Chemikerin zumindest ein Auge für die Physik geöffnet.

Ein besonderer Dank geht an meine beste Freundin Sandra. Es ist keine Selbstverständlichkeit eine so gute Freundin zu haben. Du hast stets ein offenes Ohr für mich, danke dafür.

Bei meinen Schwiegereltern Richard und Monika, meiner Schwester Annika, meiner Tante Martina, meinen Freunden Astrid, Florian und Raphi möchte ich mich für die vielen aufmunternden Worte, fürs Zuhören und die Unterstützung bedanken.

Ich danke meinen Eltern für ihre immerwährende und großzügige Unterstützung. Ihr steht mir mit Rat und Tat zur Seite und seid für mich da. Ihr habt es mir ermöglicht, meinen Weg unbeschwert zu gehen und ich verdanke euch viel.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Mann Peter. Du warst die letzten sieben Jahre geduldig an meiner Seite, bist für mich da, hörst mir zu und hast mich immer unterstützt. Es ist einfach schön mit dir – danke, dass du bist wie du bist!

10 Anhang

Vergleich der Zuordnungen von PKD2C680-796 (2KLE und verbessert), PKD2C720-797 (2KQ6) und PKD2C725-880: grün) gleiche Zuordnung, orange) vermutlich gleiche Zuordnung, rot) andere Zuordnung, grau) keine Information:

	2KLE		2KQE		verbessert		2KQE		PKD2C725-880		2KQE	
	¹ H	¹⁵ N										
ASN720	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
THR721	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VAL722	-	-	8.01	121.02	-	-	8.01	121.02	-	-	8.01	121.02
ASP723	-	-	8.19	122.64	-	-	8.19	122.64	-	-	8.19	122.64
ASP724	-	-	8.22	120.91	-	-	8.22	120.91	-	-	8.22	120.91
ILE725	7.99	121.91	8.18	120.87	-	-	8.18	120.87	-	-	8.18	120.87
SER726	8.00	117.27	8.38	119.43	-	-	8.38	119.43	8.46	118.94	8.38	119.43
GLU727	-	-	8.13	121.68	-	-	8.13	121.68	8.42	123.10	8.13	121.68
SER728	8.02	-	8.21	115.94	8.24	115.86	8.21	115.94	8.35	116.27	8.21	115.94
LEU729	8.36	121.43	7.88	119.15	8.33	118.26	7.88	119.15	-	-	7.88	119.15
ARG730	8.02	120.61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLN731	8.08	118.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLY732	7.78	105.81	8.24	108.00	7.78	105.81	8.24	108.00	8.52	109.62	8.24	108.00
GLY733	7.62	106.53	8.56	108.98	7.64	106.53	8.56	108.98	8.39	108.68	8.56	108.98
GLY734	8.74	107.08	8.44	109.15	8.75	107.08	8.44	109.15	8.57	108.79	8.44	109.15
LYS735	7.26	117.40	8.07	120.13	7.25	117.40	8.07	120.13	8.15	119.66	8.07	120.13
LEU736	8.28	119.90	8.50	123.16	-	-	8.50	123.16	-	-	8.50	123.16
ASN737	9.04	120.68	8.69	121.06	9.05	120.68	8.69	121.06	8.81	120.60	8.69	121.06
PHE738	8.38	118.94	8.66	120.35	8.38	118.94	8.66	120.35	8.73	119.88	8.66	120.35
ASP739	7.37	117.76	8.23	118.66	-	-	8.23	118.66	8.33	118.85	8.23	118.66
GLU740	6.90	119.15	8.15	119.95	-	-	8.15	119.95	-	-	8.15	119.95
LEU741	8.38	120.99	8.08	121.80	-	-	8.08	121.80	-	-	8.08	121.80
ARG742	9.03	119.21	8.71	119.36	-	-	8.71	119.36	8.80	119.25	8.71	119.36
GLN743	7.71	116.65	7.68	116.48	-	-	7.68	116.48	7.72	116.05	7.68	116.48
ASP744	7.78	120.03	7.67	120.03	-	-	7.67	120.03	-	-	7.67	120.03
LEU745	8.61	116.34	8.49	117.12	-	-	8.49	117.12	-	-	8.49	117.12
LYS746	8.86	121.65	8.74	122.65	-	-	8.74	122.65	8.79	122.41	8.74	122.65
GLY747	7.94	108.21	8.02	108.37	7.95	108.50	8.02	108.37	8.12	108.51	8.02	108.37
LYS748	7.29	118.22	7.45	118.74	7.31	118.22	7.45	118.74	7.46	118.65	7.45	118.74
GLY749	7.82	106.56	7.85	106.43	7.81	106.56	7.85	106.43	7.88	106.33	7.85	106.43
HIS750	7.76	118.26	7.56	119.06	7.73	118.26	7.56	119.06	7.65	119.25	7.56	119.06
THR751	9.02	113.85	8.82	113.70	9.01	113.85	8.82	113.70	8.99	113.95	8.82	113.70
ASP752	8.84	120.75	8.89	120.92	8.85	120.75	8.89	120.92	9.03	120.62	8.89	120.92
ALA753	8.45	120.10	8.47	121.26	8.46	120.10	8.47	121.26	8.62	121.27	8.47	121.26
GLU754	8.38	120.03	7.80	119.87	7.78	120.27	7.80	119.87	7.92	119.97	7.80	119.87
ILE755	8.02	118.53	8.38	120.57	8.06	118.36	8.38	120.57	8.43	120.73	8.38	120.57
GLU756	8.62	117.98	8.21	119.15	8.60	117.98	8.21	119.15	8.24	118.67	8.21	119.15
ALA757	7.71	121.37	7.63	121.30	7.71	121.37	7.63	121.30	7.66	120.60	7.63	121.30
ILE758	7.95	119.78	8.26	121.42	-	-	8.26	121.42	-	-	8.26	121.42

Zuordnung von PKD2C725-880 bei 278 K:

GLY"724"	¹ H	¹⁵ N	C α	C β	C α -1	C β -1
ILE725						
SER726	8.46	118.94	58.73	62.39	61.37	37.49
GLU727	8.42	123.10	56.93	29.14	58.81	
SER728	8.35	116.27	58.73	62.68	56.98	29.14
LEU729						
ARG730						
GLN731						
GLY732	8.52	109.62	44.87	-	55.80	28.40
GLY733	8.39	108.68	44.86	-	44.81	-
GLY734	8.57	108.79	44.65	-	44.81	-
LYS735	8.15	119.66	55.24	-	44.52	-
LEU736						
ASN737	8.81	120.60	abgeleitet von 298 K			
PHE738	8.73	119.88				
ASP739	8.33	118.85	57.43	40.42	-	-
GLU740						
LEU741						
ARG742	8.80	119.25	59.62	28.48?	56.92	40.63?
GLN743	7.72	116.05	58.24	27.38	59.61	28.61?
ASP744						
LEU745						
LYS746	8.79	122.41	abgeleitet durch T- Verschiebung, bei 298K Peak 12: 58.65 30.38 57.05 40.35			
GLY747	8.12	108.51	abgeleitet durch T- Verschiebung, bei 298K Peak 128: 45.91 -			
LYS748	7.46	118.65	55.51	32.36	45.99	-
GLY749	7.88	106.33	44.96	-	55.66	32.84
HIS750	7.65	119.25	55.86	-	44.81	-
THR751	8.99	113.95	60.19?		60.19?	
ASP752	9.03	120.62	57.93	39.10	60.19	70.30
ALA753	8.62	121.27	54.61	17.27	57.85	39.10
GLU754	7.92	119.97	58.43	28.99	54.48	17.27
ILE755	8.43	120.73	65.26	37.05	58.45	29.14
GLU756	8.24	118.67	59.12	28.41	65.03	37.20
ALA757	7.66	120.60	54.55	17.13	59.08	28.26
ILE758						
PHE759						
THR760	8.19	111.97				
LYS761	7.75	120.15				
TYR762						
ASP763						
GLN764						
ASP765						
GLY766						
ASP767						

GLN768	10.27	115.43	Hergeleitet aus Zuordnung Fragment 680-796				
GLU769							
LEU770	9.44	125.91	hergeleitet von Konkurrenz, Frank				
THR771	9.31	115.36	hergeleitet von Konkurrenz				
GLU772	7.68	120.60	58.54	28.39	65.46	68.29	Signale sehr schwach, Herleitung auch mit 298K
HIS773							
GLU774							
HIS775							
GLN776							
GLN777							
MET778							
ARG779							
ASP780							
ASP781							
LEU782							
GLU783							
LYS784							
GLU785							
ARG786							
GLU787							
ASP788							
LEU789							
ASP790	8.24	120.87	53.98	40.27	53.90	40.47	
LEU791	8.12	121.89	55.05	41.15	54.04	40.12	
ASP792	8.34	120.02	53.92	41.00	55.11	40.27	
HIS793	7.93	120.86	56.12		53.93		
SER794	8.59	118.04	58.62	62.64	56.06		
SER795	8.41	117.78	58.05/58.73	62.98	58.05/58.73	62.98	
LEU796	8.06	124.65	52.73	40.42	58.00	62.77	
PRO797							
ARG798	8.58	122.70	53.42	29.28	62.40	31.04	??
PRO799							
MET800	8.58	121.70	55.55	30.02	62.68	31.19	
SER801	8.64	117.69	57.74	62.98	55.51	30.02	
SER802							
ARG803							
SER804							
PHE805							
PRO806							
ARG807	8.72	121.14	55.36	31.77	62.54	31.17	
SER808	8.49	116.81	58.00	62.98	55.36	31.92	
LEU809	8.59	124.34	55.17	40.86	57.74	62.98	
ASP810	8.37	120.02	53.86	40.12	55.07	41.00	
ASP811	8.19	120.87	53.98	40.27	53.89	40.27	
SER812	8.38	116.21	58.44	62.98	53.89	40.27	

GLU813	8.56	122.88	56.05	29.28	58.44	63.12
GLU814						
ASP815						
ASP816						
ASP817						
GLU818						
ASP819						
SER820						
GLY821	8.56	110.29	45.03	-	58.73	62.83
HIS822	8.21	119.64	56.53	30.02	44.96	-
SER823						
SER824						
ARG825						
ARG826						
ARG827						
GLY828						
SER829						
ILE830						
SER831						
SER832						
GLY833						
VAL834						
SER835						
TYR836						
GLU837						
GLU838						
PHE839						
GLN840						
VAL841						
LEU842						
VAL843						
ARG844						
ARG845						
VAL846						
ASP847						
ARG848						
MET849						
GLU850						
HIS851						
SER852						
ILE853						
GLY854						
SER855						
ILE856						
VAL857						

SER858						
LYS859						
ILE860						
ASP861						
ALA862						
VAL863						
ILE864						
VAL865						
LYS866						
LEU867						
GLU868						
ILE869						
MET870						
GLU871						
ARG872						
ALA873						
LYS874						
LEU875						
LYS876						
ARG877	8.45	121.23	55.99	29.43	55.95	29.28
ARG878	8.35	121.78	55.86		55.95	29.43
GLU879	8.47	122.52	55.74	29.58	55.80	29.72
VAL880	7.90	124.88	63.19	32.21	55.95	29.43

ILE704									
ARG705									
LYS706									
GLY707		111	108.62	8.22	45.68	-	57.18	33.11	
TYR708	k.P.	43	119.66	7.96	61.10	38.99	45.58	-	
HIS709									
LYS710	k.P.	33	120.41	8.20	56.65	33.14	57.72	30.11	
ALA711	k.P.	131	124.48	8.25	52.98	19.71	57.26	33.10	
LEU712									
VAL713	k.P.	39/2	119.93	7.99	62.75		57.04	42.41	
LYS714	k.P.	139	130.72	8.00	57.71	33.99?	62.63	33.17	
LEU715									
LYS716									
LEU717									
LYS718									
LYS719									
ASN720									
THR721									
VAL722									
ASP723									
ASP724									
ILE725									
SER726									
GLU727									
SER728		124	115.86	8.24	58.74	63.79	55.46	30.16	
LEU729		54	118.26	8.33	58.14	40.75	59.30	64.08	
ARG730									
GLN731									
GLY732		116	105.81	7.78	45.01	-	58.20	28.53	
GLY733		115	106.53	7.64	46.03	-	45.21	-	

GLN764									
ASP765		73/2	114.11	8.06	52.44	39.24	58.80	29.49	
GLY766		112	108.44	7.62	47.20	-	52.39	39.47	
ASP767		42	119.76	8.08	53.29	40.60	47.54	-	
GLN768		118	115.38	10.08	57.04	-	53.42	40.43	
GLU769		57	118.12	8.00	54.93	32.99	56.83	25.66	
LEU770		2	129.84	9.32	53.41		55.13	32.84	
THR771									
GLU772									
HIS773									
GLU774									
HIS775									
GLN776									
GLN777									
MET778									
ARG779									
ASP780									
ASP781									
LEU782									
GLU783									
LYS784									
GLU785									
ARG786									
GLU787									
ASP788									
LEU789									
ASP790									
LEU791		19	121.81	8.05	55.60	42.07	55.06	41.04	
ASP792		40	119.90	8.28	54.46	41.25	55.74	42.48	
HIS793		47/2	119.45	8.27	55.87	29.90	54.54	41.22	
SER794		122	116.51	8.36	58.84	63.74	56.01	29.22	
SER795		54/2	118.49	8.37	??	??	58.47	63.88	
LEU796		3	129.16	7.82	56.85	43.53	58.47	64.22	

11 Erklärung

Diese Dissertation wurde am Lehrstuhl für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg am Lehrstuhl von Herrn Professor Dr. Dr. Kalbitzer durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Regensburg, November 2011



Maren Eberhardt