

**Untersuchung von Protein-Ligand-Interaktionen
mit Affinitätskapillarelektrophorese**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biochemie / Biotechnologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Steffen Kießig
geboren am 11. Januar 1971 in Leipzig

Halle (Saale) im November 2001
Öffentliche Verteidigung am 11. April 2002

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. G. Fischer
Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle (Saale)
2. Herr Prof. Dr. K. Neubert
Institut für Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Herr Prof. Dr. G. Werner
Institut für Analytische Chemie, Universität Leipzig

Inhalt

1	Einleitung	4
1.1	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen	4
1.1.1	Einteilung der PPIasen	5
1.1.2	Bedeutung der Cyclophiline	6
1.1.2.1	Immunsuppression	6
1.1.2.2	Physiologische Relevanz von Cyclophilin-Interaktionen	6
1.2	Kapillarelektrophorese in der Biochemie	7
1.2.1	Kapillarelektrophorese von Peptiden	7
1.2.2	Kapillarelektrophorese von Proteinen	9
1.2.3	Affinitätskapillarelektrophorese	11
1.2.3.1	Untersuchung der Komplexbildung nach Präequilibrierung	15
1.2.3.2	Untersuchung der Komplexbildung durch Mobilitätsverschiebung	16
1.2.3.3	Anwendungsbeispiele	18
2	Kapillarelektrophorese - Theoretischer Teil	24
2.1	Apparativer Aufbau	24
2.2	Theoretische Grundlagen	25
2.3	Kapillarelektrophoretische Methoden	28
2.4	Elektrophoretisch vermittelte Mikroanalyse	29
2.5	Detektion	30
3	Material und Methoden	33
3.1	Material	33
3.1.1	Antikörper	33
3.1.2	Arbeitsgeräte und Hilfsmittel	33
3.1.3	Chemikalien und Materialien	34
3.1.3.1	Chemikalien	34
3.1.3.2	Materialien	35
3.1.4	Medien, Puffer- und Färbelösungen, Polyacrylamidgele	36
3.1.5	Säulenmaterialien	38
3.2	Methoden	38
3.2.1	Expression und Reinigung von rDmCyp20-GFP, rDmCyp20 und rGFP	38
3.2.1.1	Kultivierung der Mikroorganismen	38
3.2.1.2	Homogenisation	39
3.2.1.3	Präparative Chromatographie	39
3.2.1.4	Endkontrolle und Lagerung	41
3.2.2	Proteinanalyse	41
3.2.2.1	EDMAN-Sequenzierung	41
3.2.2.2	Massenspektrometrie	42
3.2.2.3	Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD	42
3.2.2.4	Spektrometrische Konzentrationsbestimmung	42

3.2.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
3.2.2.6	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
3.2.2.7	<i>western-blot</i> -Analyse.....	43
3.2.3	Herstellung eines polyklonalen Anti-GFP-Antiserums.....	44
3.2.4	Aufschluß von <i>Drosophila melanogaster</i>	44
3.2.5	Kapillarelektrophorese.....	45
3.2.5.1	Geräte und Kapillaren.....	45
3.2.5.2	Kapillarelektrophorese mit UV-Detektion	45
3.2.5.3	Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion	46
3.2.5.4	Affinitätskapillarelektrophorese	46
3.2.5.5	EMMA.....	47
3.2.6	Analytische Größenausschlußchromatographie	48
3.2.7	PPIase-Aktivitätstest.....	49
3.2.8	Bindungsanalysen an ortsaufgelösten Cellulose-gebundenen Oligopeptid- bibliotheken	51
3.2.9	Titrationsskalorimetrie	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Reinigung und Charakterisierung verwendeter Proteine.....	54
4.1.1	rDmCyp20-GFP	54
4.1.2	rDmCyp20	56
4.1.3	rGFP	58
4.2	Kapillarelektrophoretische Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Cyclophilinen.....	60
4.2.1	Nachweis der Bindung zwischen rhCyp18 und CsA mittels ACE.....	60
4.2.2	Quantitative Auswertung durch EMMA-Messungen.....	64
4.2.3	Untersuchungen zur Bindung bekannter Peptidliganden	67
4.2.4	Unterschiedliche Bindungseigenschaften der Cyclophiline	70
4.2.5	Interaktionen von rDmCyp20-GFP mit unbekanntem Peptidliganden	72
4.3	Untersuchungen von Protein-Protein-Wechselwirkungen	76
4.3.1	Etablierung eines Referenzsystems für Protein-Protein-Wechselwirkungen..	76
4.3.1.1	Die HIV-1 p24 / Cyclophilin – Wechselwirkung und Einsatz des Fusionsproteins	76
4.3.1.2	Charakterisierung der Bindung zwischen rDmCyp20-GFP und p24	77
4.3.2	Cyclophilin-Interaktionen in Zell-Lysaten	81
5	Diskussion	85
6	Zusammenfassung	101
7	Literaturverzeichnis	104
8	Abkürzungen und Symbole	116

1 Einleitung

Bindungsereignisse zwischen Proteinen und Liganden sind wichtige biochemische Prozesse. Sie sind essentielle Bestandteile von Signaltransduktionskaskaden, die die Weiterleitung zellulärer Informationen sicherstellen. Kenntnisse auf diesem Gebiet ermöglichen genauere Informationen über physiologische Zellfunktionen, aber auch die Diagnose von Krankheiten und die Entwicklung effektiver Therapiemöglichkeiten. So vermittelt beispielsweise der Protein-Ligand-Komplex aus dem niedermolekularen Wirkstoff Cyclosporin A und dem intrazellulären Bindungspartner Cyclophilin über die Interaktion mit der Phosphatase Calcineurin eine immunsuppressive Wirkung. Cyclophiline gehören zu der ubiquitär verbreiteten und in hohen zellulären Konzentrationen vorliegenden Enzymfamilie der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen). PPIasen spielen eine wichtige Rolle bei Faltungsprozessen und der Erkennung prolinhaltiger Bindungsmotive. Über die zelluläre Regulation und endogene Bindungspartner der PPIasen ist bisher nur wenig bekannt, obwohl die Beteiligung der PPIasen an verschiedenen zellulären Interaktionen nachgewiesen werden konnte.

Während sich die qualitative und quantitative Analyse solcher Wechselwirkungen *in vivo* schwierig gestaltet, konnten *in vitro* Interaktionen von PPIasen mit einem heterogenen Ligandenspektrum, z.B. virale Proteine, Peptide, nachgewiesen werden. Der Analyse von Bindungsereignissen, in die PPIasen involviert sind, kommt daher eine besondere Bedeutung bei der weiteren Aufklärung der funktionellen Zusammenhänge der zellulären Funktion zu.

1.1 Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Als Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen, EC 5.2.1.8) bezeichnet man eine, erstmalig von FISCHER und Mitarbeitern [FISCHER *et al.*, 1984] nachgewiesene Klasse ubiquitär in Pro- und Eukaryoten verbreiteter Enzyme. PPIasen beschleunigen die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen, die auf Grund ihrer relativ hohen Aktivierungsenergie von ca. 80 kJ/mol oft limitierende Schritte bei der Faltung von Proteinen darstellen [SCHMID *et al.*, 1993; SCHERER *et al.*, 1998].

1.1.1 Einteilung der PPIasen

Die Enzymklasse der PPIasen wird in drei Familien unterteilt (Abbildung 1). Man unterscheidet anhand von Homologien der Aminosäuresequenz Cyclophiline, FK506-bindende Proteine (FKBP) und Parvuline [GALAT & RIVIERE, 1998], die ihrerseits als Isoenzyme unterschiedlicher molekularer Masse und zellulärer Lokalisierung existieren [FISCHER, 1994]. Die Vertreter der ersten beiden PPIase-Familien zeichnen sich durch die selektive Bindung von bestimmten mikrobiellen Naturstoffen aus, die eine immunsuppressive Wirkung aufweisen.

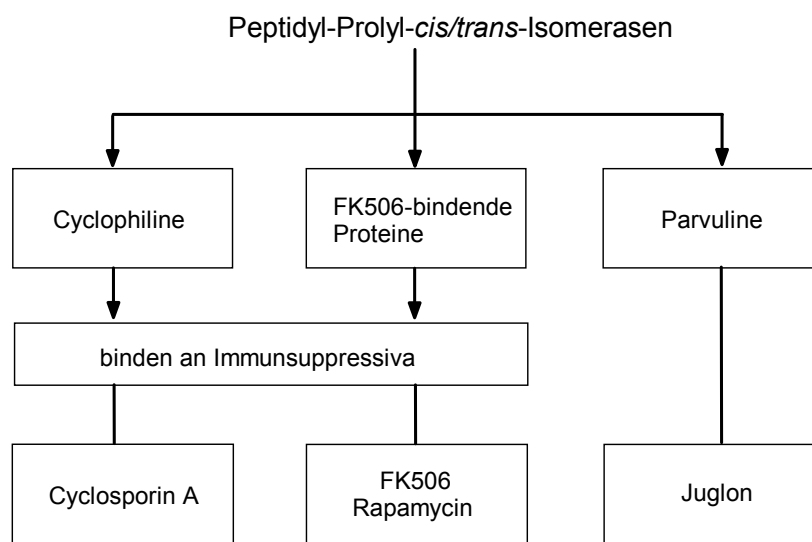


Abbildung 1: Überblick über die Klasse der PPIasen und die Inhibitoren der entsprechenden Enzymfamilien.

Die Cyclophiline binden an das cyclische Undekapeptid Cyclosporin A (CsA) [FISCHER *et al.*, 1989], während FKBP die makrolidischen Verbindungen FK506 und Rapamycin binden [BIERER *et al.*, 1990]. Die reversible Bindung der Naturstoffliganden geht mit der Inhibierung der PPIase-Aktivität einher. Die Parvuline, die keine Bindung der immunsuppressiven Cyclophilin- oder FKBP-Liganden CsA bzw. FK506 aufweisen, werden durch Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphto-chinon) irreversibel inhibiert [HENNIG *et al.*, 1998].

1.1.2 Bedeutung der Cyclophiline

1.1.2.1 Immunsuppression

Cyclophiline spielen durch die Bindung von CsA eine wichtige Rolle im Rahmen der Immunsuppression. CsA ist ein wichtiges Therapeutikum bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten und der Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen [BOREL *et al.*, 1976; ALLISON, 2000]. Die Wirkung von CsA bei der Unterdrückung des Immunsystems beruht nicht auf der Inhibierung der PPIase-Funktion. Vielmehr bindet der Komplex aus Cyclophilin und CsA an die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin, die dadurch in ihrer Funktion, die cytosolische Untereinheit von NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*) zu dephosphorylieren, inhibiert wird [LIU *et al.*, 1991]. Der Transport von NF-AT in den Zellkern bleibt somit aus, wodurch die Assoziation des cytosolischen NF-AT mit einer kernlokalisierten Untereinheit unterbleibt, die anderenfalls die Transkription von Genen zur Produktion von Interleukinen, Mediatorproteinen des Immunsystems, auslöst [SCHREIBER & CRABTREE, 1992].

1.1.2.2 Physiologische Relevanz von Cyclophilin-Interaktionen

Die Beteiligung von Cyclophilinen an Proteinfaltungs- und Transportprozessen konnte nachgewiesen werden. In Gegenwart des PPIase-Inhibitors CsA ist die Bildung der tripelhelikalen Collagenstruktur durch Faltung von Procollagen signifikant verlangsamt [STEINMANN *et al.*, 1991]. Ebenfalls durch CsA kann die Reifung des sekretorischen Proteins Transferrin inhibiert werden, wodurch auf eine Beteiligung von Cyclophilinen am Reifungsprozeß geschlußfolgert werden kann [LODISH & KONG, 1991]. Das Cyclophilin-homologe Protein NinaA in *D. melanogaster* ist für die Sekretion von Rhodopsin Rh1 essentiell [BAKER *et al.*, 1994]. Die Faltung von Ribonuclease T1 wird durch Cyclophiline katalysiert [SCHMID *et al.*, 1996]. Ein membranständiges Cyclophilin der Mitochondrienmatrix beschleunigt die Faltung beim Transport von Proteinen in isolierte Mitochondrien [MATOUSCHEK *et al.*, 1995].

Cyclophilin 40 ist Bestandteil des Glucocorticoidrezeptor-Heterokomplexes, einem Vertreter der Steroidrezeptoren [OWENS-GRILLO *et al.*, 1995]. Cyclophilin 20 ist über die Bindung an den Calciumsignal-modulierenden Liganden (CAML) in die Regulierung des Einstroms von Calcium in die Zelle involviert [BRAM & CRABTREE, 1994]. Im Gegensatz

zu der schon erwähnten Bindung von NinaA an Opsin aus *D. melanogaster* [BAKER *et al.*, 1994] bindet das Cyclophilin-verwandte Protein RanBP2 nicht direkt an Opsin, sondern moduliert dessen Bindung an RBD4 [FERREIRA *et al.*, 1996]. Die Interaktion zwischen Cyclophilin 40 und dem Transkriptionsfaktor c-Myb führt zu einer negativen Regulation der DNA-Bindung von c-Myb [LEVERSON & NESS, 1998; HUNTER, 1998].

Die Wechselwirkung zwischen Cyclophilin 18 der Wirtszelle und dem Capsidprotein p24 des HIV-1 Virus ist essentiell für die Infektiosität der Virionen [FRANKE *et al.*, 1994]. Die Aufnahme von Cyclophilin kann durch Zugabe von CsA verhindert werden [THALI *et al.*, 1994]. Die Interaktion verläuft unter Beteiligung des aktiven Zentrums von Cyclophilin [DORFMAN *et al.*, 1997]. Von besonderer Bedeutung für die Bindung sind die Aminosäuren G⁸⁹-P⁹⁰ im p24 [ZHAO *et al.*, 1997]. Durch Mutation einer dieser Aminosäuren wird die Cyclophilin-Bindung verhindert [COLGAN *et al.*, 1996; BRAATEN *et al.*, 1996].

Weitere Substrate für die Cyclophiline sind prolinhaltige Peptidhormone, wie am Beispiel von Bradykinin, einem Gewebshormon der Sequenz RPPGFSPFR, nachgewiesen werden konnte [MERKER & DAWSON, 1995; MERKER *et al.*, 1999].

1.2 Kapillarelektrophorese in der Biochemie

Geladene Biomoleküle werden heute routinemäßig mit elektrophoretischen Trennverfahren als Standardwerkzeuge der Biochemie charakterisiert [HAMES & RICKWOOD, 1990a, b]. Die Anwendung von Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Agarose-Gelelektrophorese ist aus der Analytik von Proteinen bzw. Nukleinsäuren nicht mehr wegzudenken. Neben diesen klassischen elektrophoretischen Methoden wurden analoge Verfahren für die Kapillarelektrophorese (CE) entwickelt (siehe 2.3, S. 28).

1.2.1 Kapillarelektrophorese von Peptiden

Peptide sind Biomoleküle, die beispielsweise als Hormone, Neuropeptide und Inhibitoren von Enzymen als wichtige Elemente des Steuerungssystems der zellulären Funktionen fungieren [ROQUES, 2000; TORRES-LUGO & PEPPAS, 2000; GILLIES, 1997; RENSHAW & HINSON, 2001; ECKART *et al.*, 1999]. In der Peptidchemie werden heutzutage neben den proteinogenen Aminosäuren natürlich auftretender Peptide auch Aminosäureanaloge und

-derivate eingesetzt, um so bestimmte Eigenschaften der synthetischen Peptide zu generieren [FRANK *et al.*, 2000].

Die elektrophoretische Mobilität von Peptiden kann für ihre Charakterisierung ausgenutzt werden und ist über empirische Formeln berechenbar [OFFORD, 1966; RICKARD *et al.*, 1991; COMPTON, 1991; GROSSMAN *et al.*, 1989; CIFUENTES & POPPE, 1994], die in folgender allgemeiner Form zusammengefaßt werden können:

$$\text{Gleichung 1} \quad \mu_{\text{ep}} \propto \frac{q_{\text{p}}^{\text{eff}}}{(M_{\text{p}})^k}$$

μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität
 $q_{\text{p}}^{\text{eff}}$: effektive Ladung des Peptids

M_{p} : molekulare Masse des Peptids
 k : empirische Konstante

Die Mobilität wird durch molekulare Masse und Ladung des Peptids bestimmt (Gleichung 1). Die chemische Formel definiert eindeutig die molekulare Masse, während die Ermittlung der effektiven Ladung bei dem pH-Wert der verwendeten Lösung schwierig ist. Die Effektivladung des Peptids kann aus den Einzelbeträgen der pK_a-Werte der beteiligten Aminosäuren errechnet werden. Die pK_a-Werte können aber durch "Nachbarschaftseffekte" der umgebenden Aminosäuren beeinflusst werden und so vom theoretischen Wert abweichen.

Für bestimmte Trennprobleme sind die in Gleichung 1 zusammengefaßten Modelle ungeeignet, weil sie nur die molekulare Masse des Peptids als Einflußgröße beinhalten und keine Einflüsse durch den hydrodynamischen Radius berücksichtigen. So ist die theoretische Berechnung der Mobilitätsunterschiede, die bei der Trennung von *cis/trans*-Konformeren prolinhaltiger Peptide beobachtet werden [MEYER *et al.*, 1994; MA *et al.*, 1995; THUNECKE & FISCHER, 1998], auf diese Weise nicht möglich.

Die Trennung von Peptiden in der CE ist mit allen in 2.3 dargestellten Methoden möglich (siehe Theoretischer Teil, S. 28), die Kapillarzonenelektrophorese wird aber auf Grund ihrer geringen experimentellen Anforderungen bevorzugt angewendet. Durch die Abhängigkeit der Mobilität von der Peptidladung können die Trennbedingungen durch Veränderungen des pH-Wertes des Trennpuffers auch für komplexe Gemische optimiert werden [MESSANA *et al.*, 1997]. Zur Überwachung und Kontrolle der Peptidsynthese werden CE-Analysen meist in sauren Trennpuffern durchgeführt. Dabei kann in Kombination mit der HPLC eine besonders effektive Reinheitskontrolle der

Syntheseprodukte erfolgen. Micellare Techniken werden für hydrophobe und schlecht lösliche Peptide eingesetzt.

Medizinisch interessant ist die Charakterisierung von Peptiden (Peptidhormone, Metaboliten von Proteinen, *tracer*-Verbindungen) in Körperflüssigkeiten. In diesem Fall wird meist eine Derivatisierung für den Einsatz selektiver Detektionsmethoden (Fluoreszenz, Radioaktivität) durchgeführt, um die erforderliche Nachweisgrenze zu erreichen.

Beim *peptide mapping* können Proteine nach tryptischem Verdau und nachfolgender Analyse in der CE auf Grund eines charakteristischen Peptidmusters analysiert werden. Die Technik wird sowohl zur Identifizierung (z.B. Proteomanalyse), als auch zur Beurteilung von Bindungseigenschaften (Peptidmuster ändert sich in Anwesenheit eines Liganden) genutzt. Die Kopplung der CE mit der Massenspektrometrie ist eine effektive Möglichkeit zur Identifizierung der proteolytischen Peptidfragmente bei gleichzeitiger Vereinfachung der Analyse [MANABE, 1999; CHALMERS & GASKELL, 2000].

1.2.2 Kapillarelektrophorese von Proteinen

Die elektrophoretischen Eigenschaften von Proteinen sind denen der Peptide vergleichbar. Allerdings läßt sich die elektrophoretische Mobilität von Proteinen nicht mehr mit relativ einfachen Modellen berechnen. Grundlage der Berechnung bildet die Basisbeziehung elektrisch geladener Teilchen nach DEBYE-HÜCKEL-HENRY (siehe Gleichung 6, S. 25). Aus der Analyse der Einflußgrößen der elektrophoretischen Mobilität (Ladung und Radius) erwachsen die Probleme bei der Vorausberechnung der Mobilität. Beide Größen sind durch die Einflußnahme der strukturellen Umgebung sowohl auf die Gesamteigenschaften als auch auf deren Einzelbausteine schwierig bestimmbar [PRITCHETT & ROBEY, 1997]. Im Minimum ist die elektrophoretische Mobilität von Proteinen eine Funktion der "molekularen Größe" und der Ladung, die wiederum Funktionen der dreidimensionalen Struktur des Proteins sind. Zusätzlich kann durch elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen der Proteine mit der Innenoberfläche der Kapillare eine weitere Veränderung der elektrophoretischen Mobilität in der CE auftreten. Experimentelle Methoden zur Ermittlung von Effektivladung und hydrodynamischem Radius nutzen die gezielte Beeinflussung dieser Größen durch Manipulationen am Molekül aus. Die elektrophoretische Mobilität wird durch Ladungsveränderungen nach Derivatisierungen

am Proteinmolekül verändert. Durch Verfolgung der Migrationszeit der einzelnen, modifizierten Spezies kann man die Effektivladung des unmodifizierten Proteins extrapolieren, da sich die einzelnen Verbindungen durch einen ganz bestimmten Ladungsunterschied von den anderen unterscheiden [GAO *et al.*, 1994]. Untersuchungen zum Einfluß des hydrodynamischen Radius auf die Mobilität des Proteins beschränken sich auf einige Modellproteine. Nuklease A und deren Mutanten konnten in der CZE getrennt werden, wenn die Effektivladung gleich ist, die molekulare Masse aber geringe Differenzen aufweist. KÁLMÁN und Mitarbeiter konnten damit die Bedeutung des hydrodynamischen Radius als Einflußgröße demonstrieren [KÁLMÁN *et al.*, 1995a].

Während sich die CE im Rahmen der DNA-Analyse, besonders der Sequenzierung, als Weiterentwicklung der Flachbettelektrophorese durchgesetzt hat [DOLNÍK, 1999a; HELLER, 2001], konnte sie klassische Verfahren der Proteinanalytik, wie SDS-PAGE, auf Grund des apparativen Aufwands und auftretender Probleme bei der absoluten Reproduzierbarkeit nicht ablösen. Die Möglichkeit der CE, bei hohem Probendurchsatz eine exzellente Auflösung zu erhalten, haben sie aber als wichtige Ergänzung des Methodenspektrums der Proteinanalytik etabliert [DENTON & TATE, 1997]. Schwierigkeiten bereiten die besonderen Eigenschaften von Proteinen, wie die Adsorptionstendenz an Gefäß- und Kapillaroberflächen. Zu deren Unterdrückung ist z.T. ein erheblicher Optimierungsaufwand erforderlich, der die Verwendung verschiedener Pufferadditive und/oder oberflächenmodifizierter Kapillaren erfordert [DOLNÍK, 1999b].

Erfolgreich wurde die CE zur Analyse von posttranslationalen Modifikationen [ODA & LANDERS, 1996; PANTAZAKI *et al.*, 1999] und Mikroheterogenitäten [DENTON & HARRIS, 1995] eingesetzt. Sechs verschiedene Glykoformen von rekombinantem Erythropoietin konnten mittels CZE getrennt werden [WATSON & YAO, 1993]. Die Charakterisierung intakter Glykoproteine gelang durch eine *offline*-Kopplung der CE zur MALDI-TOF-MS [CHAKEL *et al.*, 1997]. Die Leistungsfähigkeit der CZE konnte bei der Trennung von 12 Nuklease-Varianten aus *Staphylococcus aureus*, die durch Austausch lediglich einer Aminosäure generiert wurden, demonstriert werden [KÁLMÁN *et al.*, 1995b].

Die Adaption der Gelelektrophorese als CE-Verfahren ermöglicht eine schnelle und sichere Quantifizierung bei gleichzeitiger Erhöhung der Trennleistung. Optimierter Einsatz verschiedener Polymere und Pufferkomponenten ermöglicht es, mit hoher Trenneffizienz Proteine mit Mikroheterogenitäten aus Cerebrospinalflüssigkeit zu charakterisieren [HIRAOKA *et al.*, 1998].

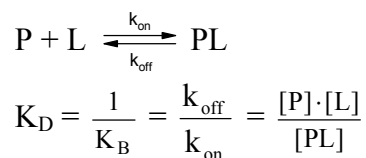
Die Kapillar-Isoelektrische Fokussierung (CIEF) kann auf Grund ihres Trennprinzips weitergehende Aussagen zu Eigenschaften der untersuchten Proteine liefern [PRITCHETT, 1996]. Häufig wird die CIEF zur Charakterisierung von Antikörpern eingesetzt [HUNT *et al.*, 1996]. Auf dem Gebiet der Proteomanalyse können die CE bzw. die CIEF Alternativen zur herkömmlichen 2D-Elektrophorese bieten [MANABE, 1999]. Durch CIEF und Fourier-Transform-Cyclotronresonanz-Techniken in Verbindung mit der Massenspektrometrie gelingt es, hunderte Proteine eines komplexen Gemisches (Zell-Lysat) durch simultane Ermittlung von pI und molekularer Masse zu charakterisieren [YANG *et al.*, 1998; JENSEN *et al.*, 1999]. Dieser methodische Ansatz ermöglicht somit eine bedeutende Beschleunigung der Proteom-Analyse, ist aber mit erheblichem materiell-technischen Aufwand verbunden.

1.2.3 Affinitätskapillarelektrophorese

Für Bindungsstudien stehen verschiedene physikalische, genetische oder chemische Methoden zur Verfügung, von denen besonders häufig spektrometrische Verfahren, chromatographische und elektrophoretische Trennverfahren, Zwei-Hybrid-Systeme, Phagenbibliotheken oder Quervernetzungsverfahren angewendet werden. Unter den Trennverfahren kommt den Affinitätstrennmethode eine besonders wichtige Rolle zu, da sie nur geringe apparative Anforderungen aufweisen und vielfältig einsetzbar sind. Die Affinitätskapillarelektrophorese (ACE) als spezielle Technik der CE hat sich als effektives Werkzeug zur Untersuchung von Analyt-Ligand-Interaktionen etabliert [SHIMURA & KASAI, 1997, HEEGAARD *et al.*, 1998]. Den Vorteil der getrennten Erfassung von freiem und gebundenem Liganden kombiniert die ACE zusätzlich mit hoher Trennleistung, geringem Materialverbrauch und einer kurzen Analysezeit. Ein weiterer Vorteil ist die Anwendbarkeit auf Interaktionen mit einer großen Variabilität bezüglich von Dissoziationskonstanten. So sind beispielsweise auch Untersuchungen schwacher Wechselwirkungen mit Dissoziationskonstanten $\geq 10^{-4}$ M möglich, die der Affinitätschromatographie kaum zugänglich sind. Durch Kopplung mit empfindlichen und selektiven Detektionsmethoden, wie der Laser-induzierten Fluoreszenzdetektion, wird die Möglichkeit geschaffen, den Analyten und dessen Interaktionen in komplexen Gemischen direkt zu erfassen, wodurch beispielsweise die Suche nach neuen Wechselwirkungspartnern in Zellextrakten ermöglicht wird.

Von besonderem Interesse sind Bindungsstudien an Biomolekülen (z.B. Peptide, Proteine, DNA, RNA), weil damit Aussagen über Art und Funktionsweise verschiedenster biologischer Wechselwirkungsprozesse erhalten werden können. Die ACE kombiniert adaptierte chromatographische Verfahren mit den Vorteilen der CE für die Untersuchung geladener Analyte [SHIMURA & KASAI, 1997]. Die Methode ist mit Gel-Retardations-Assays vergleichbar, bietet aber eine deutlich bessere Trenneffizienz. Hauptanwendungsgebiet ist die qualitative und quantitative Untersuchung nicht-kovalenter Wechselwirkungen [HEEGAARD *et al.*, 1998; CHU & CHENG, 1998], wodurch die ACE ein wertvolles Hilfsmittel für die pharmazeutische Industrie bei der Suche nach potentiellen Wirkstoffen und der Charakterisierung von identifizierten Zielsubstanzen darstellt [CHU *et al.*, 1995].

Gleichung 2



P : Analyt des Bindungssystems

L : Ligand des Bindungssystems

PL : Komplex aus P und L

[P] : Konzentration P im Gleichgewicht

[L] : Konzentration L im Gleichgewicht

[PL] : Konzentration PL im Gleichgewicht

K_D : Dissoziationskonstante des Komplexes

K_B : Bindungskonstante des Komplexes

k_{on} : Geschwindigkeitskonstante Komplexbildung

k_{off} : Geschwindigkeitskonstante Komplexzerfall

Der mit ACE untersuchbare Bereich der Dissoziationskonstanten K_D^* umfaßt sowohl schwache ($K_D \geq \text{mM}$) als auch starke Bindungen ($K_D \leq \text{nM}$) [SHIMURA & KASAI, 1997]. Neben der Charakterisierung sind Aussagen zur Komplexstöchiometrie möglich [CHU *et al.*, 1994; OKUN *et al.*, 2001]. Auf der Basis unterschiedlicher elektrophoretischer Eigenschaften von Analyt, Ligand und Komplex kann die Assoziationsreaktion mittels ACE untersucht werden.

Man unterscheidet zwei Grenzfälle von Wechselwirkungen entsprechend ihres K_D -Wertes:

- stabile Komplexe für starke Bindungen,
- labile Komplexe für schwache Bindungen.

* In der Literatur dienen zur Beschreibung von Wechselwirkungen die Begriffe Bindungs- und Dissoziationskonstante. In dieser Arbeit wird ausschließlich der Begriff Dissoziationskonstante im Sinne der Definition in Gleichung 2 zur Beschreibung von Bindungen genutzt. Vergleichsdaten, die als Bindungskonstanten in l/mol angegeben sind, werden gegebenenfalls umgerechnet als Dissoziationskonstante angegeben.

Im Übergangsbereich zwischen beiden Fällen ist es erforderlich, die Einzelwerte k_{on} und k_{off} mit in Betracht zu ziehen, weil sich niedrigaffine Komplexe, entsprechend ihres K_D -Wertes, auf Grund ihres kleinen Wertes für k_{off} doch wie stabile Komplexe untersuchen lassen [HEEGAARD, 1998].

Auf dieser Basis werden zwei methodische Ansätze durchgeführt:

(1) Stabile Komplexe werden durch Präinkubation gebildet. Der Inkubationsansatz wird in einem normalen CE-Lauf getrennt (Abbildung 2-I, siehe auch 1.2.3.1).

(2) Zur Analyse labiler Komplexe (schwache Bindung) wird dem Trennpuffer der zu untersuchende Ligand zugesetzt. Während der elektrophoretischen Wanderung des Analyten durch die Kapillare kommt es zur multiplen Wiedereinstellung des Gleichgewichts, da sich der Analyt durch eine Phase konstanter Ligandkonzentration bewegt (Abbildung 2-II, siehe auch 1.2.3.2). Ausgehend von diesem Grundprinzip des Zusatzes des Liganden zum Trennpuffer leiten sich verschiedene Verfahren ab (Tabelle 1).

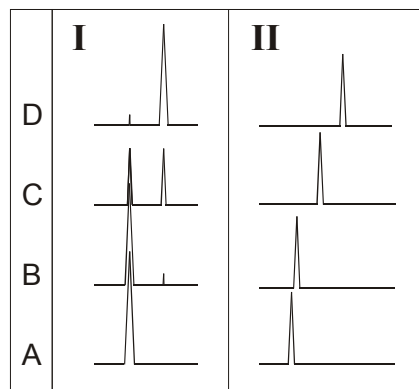


Abbildung 2: Schematische Darstellung von ACE-Messungen in Systemen mit stabilen (I) bzw. labilen (II) Komplexen. Im ersten Fall (I) werden Analyt und Ligand vorinkubiert, während im zweiten Fall (II) der Ligand dem Trennpuffer zugemischt wird.

A: 0 % Komplex (kein Ligand vorhanden)

B: 10 % Komplex

C: 50 % Komplex

D: 90 % Komplex

Mit ACE wurde eine große Anzahl von Wechselwirkungen verschiedenster Art untersucht, insbesondere wegen der einfachen experimentellen Durchführung und quantitativen Auswertung [HEEGAARD & KENNEDY, 1999; KAJIWARA, 1999]. Die HUMMEL-DREYER-Methode ist zwar der ACE vergleichbar, benötigt aber zeitaufwendige Kalibrationsmessungen. Ein weiterer Vorteil der ACE ist die Möglichkeit des Einsatzes ungereinigter Komponenten (meistens der Analyt), solange diese mittels CE unter ACE-Bedingungen

getrennt und identifiziert werden können. Für eine quantitative Auswertung genügt die exakte Kenntnis der im Puffer vorgelegten Konzentration an Ligand.

Tabelle 1: Methoden für die Ermittlung von Bindungsdaten mittels CE (nach [BUSCH *et al.*, 1997]).

Methode	experimentelle Voraussetzungen	Meßprinzip	Ergebnis
HUMMEL-DREYER	Ligand als Pufferzusatz, Analyt als Probe injiziert, variable Ligandenkonzentration	Intensität des Negativpeaks des Liganden in An- und Abwesenheit des Analyten zur Ermittlung des Anteils an gebundenem Liganden	Dissoziationskonstante, Bindungsstöchiometrie
<i>vacancy peak</i>	Ligand und Analyt als Pufferzusatz, variable Ligandenkonzentration, Injektion von Puffer ohne Zusätze	Intensität des Negativpeaks des Liganden, Vergleich der Intensität zu analytfreiem Puffer zur Ermittlung des Anteils an gebundenem Liganden	Dissoziationskonstante, Bindungsstöchiometrie
<i>frontal analysis</i>	Injektion eines großen Probepfropfens eines equilibrierten Gemisches aus Analyt und Ligand, variable Zusammensetzung der Probe	Intensität des Signalplateaus für den Liganden und Vergleich mit einer Kalibrationslösung zur Ermittlung des Anteils an gebundenem Liganden	Dissoziationskonstante, Bindungsstöchiometrie
<i>affinity capillary electrophoresis</i>	Ligand als Pufferzusatz, Analyt als Probe injiziert, variable Ligandenkonzentration	Veränderungen der elektrophoretischen Mobilität des Analyten unter dem Einfluß des Liganden im Puffer	Dissoziationskonstante
<i>vacancy affinity capillary electrophoresis</i>	Ligand und Analyt als Pufferzusatz, variable Ligandenkonzentration, Injektion von Puffer ohne Zusätze	Veränderungen der elektrophoretischen Mobilität des Analyten (Negativpeak) unter dem Einfluß des Liganden im Puffer	Dissoziationskonstante

Der Bereich der untersuchbaren Interaktionen wird von der Größe des Wertes für K_D bestimmt. Limitierend ist dabei die Nachweisgrenze des verwendeten Detektionsverfahrens. Die untersuchten Ligand- und Analytkonzentrationen sollten im Differenzbereich von einer Größenordnung um den Wert der erwarteten

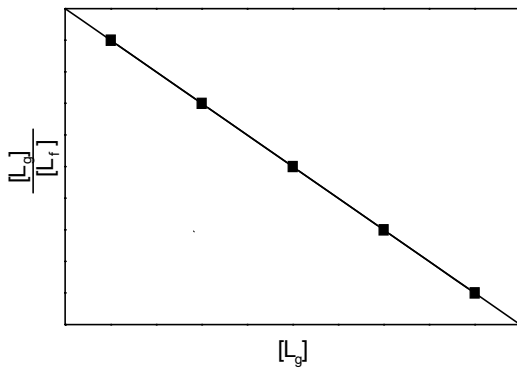
Dissoziationskonstante liegen [BOSE *et al.*, 1997]. Auf Grund der Nachweisgrenze der CE mittels UV-Detektion (siehe Tabelle 5, S. 31) können nur Affinitätssysteme mit einem K_D -Bereich von $\geq 10^{-6}$ M analysiert werden. Bei Verwendung der UV-Detektion liegt also eine Beschränkung auf mittlere bis schwache Wechselwirkungen vor. Für Systeme mit starker Bindung ($K_D \approx 10^{-9}$ M) werden empfindlichere Detektionsmethoden wie Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF) oder z.T. auch Massenspektrometrie (MS) eingesetzt, die durch die Notwendigkeit von Modifikationen am Analyten (LIF: Markierung mit Fluorophoren) oder Trennsystem (MS: Verwendung kompatibler Puffer) limitiert sind.

1.2.3.1 Untersuchung der Komplexbildung nach Präequilibrierung (*equilibrium-mixture analysis*)

Für die Untersuchung von Bindungssystemen mit langsamer Kinetik (Gleichung 2), wie sie für Dissoziationskonstanten $< 10^{-8}$ M vorliegen, wird der zu untersuchende Analyt mit dem Liganden titriert. Dazu werden beispielsweise die Proben mit einer konstanten Konzentration an Analyt und einer variablen Konzentration an Ligand hergestellt, equilibriert und mittels CE getrennt. Im Idealfall unterscheiden sich die elektrophoretischen Mobilitäten von Analyt, Ligand und Komplex. Die Bildung eines Komplexes wird durch das Auftreten eines zusätzlichen Signals im Elektropherogramm angezeigt (Abbildung 2-I).

Mit steigender Konzentration an Ligand im Ansatz nimmt die Signalintensität an freiem Analyt ab und das Signal des Komplexes zu. Aus dieser Titrationsreihe läßt sich, nach Kalibration der Signalintensitäten für Analyt und Ligand, eine Bindungskurve erstellen. Mit deren Hilfe oder unter Verwendung einer SCATCHARD-Auftragung [REHM, 1997] kann dann eine Dissoziationskonstante für das untersuchte System ermittelt werden (Abbildung 3).

Man erhält K_D durch Anpassung experimenteller Daten des $[PL]-[L]_0$ -Plots unter Verwendung des Massenwirkungsgesetzes und nichtlinearer Regression unter der Voraussetzung der direkten Detektierbarkeit des Komplexes. Die Kenntnis der absoluten Konzentration an $[PL]$ ist dabei nicht erforderlich, da in gleicher Weise auch die Intensität des Signals für $[PL]$, z.B. in Flächeneinheiten, aufgetragen werden kann.



$$\frac{[L_g]}{[L_f]} = \frac{[P]_0}{K_D} - \frac{[L_g]}{K_D}$$

[L_g] : Konzentration des Liganden,
 der gebunden im Komplex vorliegt
 [L_f] : Konzentration des freien Liganden

[P]₀ : Gesamtkonzentration Analyt (Bindeprotein)
 K_D : Dissoziationskonstante

Abbildung 3: Quantifizierung eines Bindungssystems mittels SCATCHARD-Analyse.

Im anderen Fall, wenn sich Analyt (Protein) und Komplex in ihrer elektrophoretischen Mobilität nicht unterscheiden, kann mit Hilfe der Signaldifferenz zwischen Kalibrationssignal und Signal im Gleichgewicht mit dem Analyten die Konzentration an Komplex errechnet und ausgewertet werden.

1.2.3.2 Untersuchung der Komplexbildung durch Mobilitätsverschiebung (mobility-shift analysis)

Die meisten Systeme mit schwachen Bindungseigenschaften sind durch schnelle Kinetiken für Bildung und Zerfall des Komplexes charakterisiert. Der Einsatz präequilibrierter Proben ist somit nicht möglich, da der gebildete Komplex unter den Nicht-Gleichgewichtsbedingungen während der Trennung wieder zerfallen würde.

Geladene Liganden vereinfachen meist die Untersuchung, da sich durch ihre Bindung der Ladungszustand des entstehenden Komplexes in jedem Fall von dem des freien Analyten unterscheidet, was eine geänderte Mobilität zu Folge hat.

Zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts wird die Elektrophorese nicht in einem einfachen Puffer durchgeführt, sondern mit dem Liganden als Hintergrundkomponente. Der Analyt wird als Probe injiziert und während der Trennung elektrophoretisch durch die Puffer- bzw. Ligandenphase bewegt. Die elektrophoretische Bewegung des Analyten stört das eingestellte Gleichgewicht. Dieser momentanen Störung folgt sofort die Neueinstellung, da die gesamte Pufferphase den Liganden in einer konstanten Konzentration enthält. Bei der Bewegung des Analyten durch die gepufferte "Ligandenlösung" herrscht somit ein quasistationärer Zustand. Je nach Konzentration des

Liganden liegt während der Elektrophorese ein bestimmter Anteil des Analyten als Komplex vor, der allerdings auf Grund seiner geringen kinetischen Stabilität nicht als getrenntes Signal detektiert werden kann. Unterscheiden sich Analyt und Komplex in ihrer elektrophoretischen Mobilität, dann erhält man eine, von der Konzentration des Liganden im Trennpuffer abhängige, veränderte Lage des Signals für den Analyten, verursacht durch die gemischte Population an freiem Analyten und Komplex. Der Anteil des Komplexes an der Gesamtpopulation des Proteins wird mit Hilfe des Molenbruches α_{PL} ausgedrückt (Gleichung 3).

Gleichung 3
$$\alpha_{PL} = \frac{[PL]}{[P] + [PL]}$$

α_{PL} : Molenbruch des Komplexes
[P] : Konzentration an freiem Protein
[PL] : Konzentration an Komplex

Die beobachtete Mobilität des Analyten in Gegenwart des Liganden wird als zusammengesetzte Größe aus Mobilität von freiem Analyt und Komplex definiert (Gleichung 4).

Gleichung 4
$$\mu_{obs} = (1 - \alpha_{PL}) \cdot \mu_P + \alpha_{PL} \cdot \mu_{PL}$$

α_{PL} : Molenbruch des Komplexes
 μ_{obs} : ermittelte (elektrophoretische) Mobilität für P
 μ_P : Mobilität für P ohne Wechselwirkung
 μ_{PL} : Mobilität des Komplexes

Trennpuffer mit verschiedenen Ligandenkonzentrationen liefern eine konzentrationsabhängige Veränderung der elektrophoretischen Mobilität μ_{obs} des Analyten (Abbildung 2-II). Aus der Auftragung von μ_{obs} gegen [L] kann die Dissoziationskonstante K_D ermittelt werden. Dazu wird Gleichung 4 umgeformt, indem man die Dissoziationskonstante K_D entsprechend Gleichung 2 sowie den Molenbruch entsprechend Gleichung 3 in Gleichung 4 einsetzt. Man erhält gemäß $\mu_{obs} = f(L)$ Gleichung 5, die zur Auswertung der erhaltenen Bindungskurve durch nichtlineare Regression verwendet werden kann. Aus Gleichung 5 wird weiterhin deutlich, daß K_D ohne Kenntnis der Analytkonzentration

bestimmbar ist. Die Verwendung von inhomogenen Proben ist daher möglich, solange das Signal des zu untersuchenden Proteins eindeutig zugeordnet werden kann.

Gleichung 5

$$\mu_{ep}^{obs} = \mu_{ep}^0 + (\mu_{ep}^{max} - \mu_{ep}^0) \frac{[L]}{K_D + [L]}$$

μ_{ep}^{obs} : ermittelte elektrophoretische Mobilität des Proteins = Mobilität in Gegenwart von Ligand
 μ_{ep}^0 : Ausgangswert der elektrophoretischen Mobilität des Proteins = Mobilität ohne Ligand
 μ_{ep}^{max} : Endwert der elektrophoretischen Mobilität des Proteins = Mobilität des Komplexes
 K_D : Dissoziationskonstante des Komplexes
 $[L]$: Konzentration des Liganden im Puffer

1.2.3.3 Anwendungsbeispiele

Wechselwirkungen mit Antikörpern

Die Wechselwirkung von Antikörpern mit Antigenen ist der Hauptteil der Immunreaktion des Körpers auf Fremdstoffe, die in das innere Milieu des Organismus gelangen [PORTER, 2001; SMYTH *et al.*, 2001]. Bereits kurz nach der Einführung der CE in die instrumentelle Analytik konnte gezeigt werden, daß sich vergleichbare Ergebnisse zu Größenausschlußchromatographie (SEC) und Isoelektrischer Fokussierung erhalten lassen [NIELSEN *et al.*, 1991]. Durch die Anwendung der LIF und der Markierung von Antikörper und/oder Antigen mit Fluorophoren konnte die Nachweisgrenze der Detektion in den Bereich von $\leq 10^{-9}M$ erweitert werden (siehe 2.5, Theoretischer Teil, S. 30). Der spezifische Nachweis von rekombinantem Wachstumshormon mit einer Nachweisgrenze von $10^{-12} M$ konnte so erreicht werden [SHIMURA & KARGER, 1994].

Antikörper gegen Phosphoserin (pSer) und Phosphotyrosin (pTyr) sind wichtige Hilfsmittel bei der Identifizierung phosphorylierter Proteine [KAUFMANN *et al.*, 2001; SONTAG, 2001; RANE & REDDY, 2000]. Durch die quantitative Charakterisierung der Bindung zwischen Antikörper und verschiedenen Antigenen kann eine Bewertung hinsichtlich der Spezifität des Antikörpers vorgenommen werden. Für die Bindung zwischen pTyr und einem spezifischen Anti-pTyr-Antikörper wurde eine Dissoziationskonstante von $7,4 \mu M$ durch CE ermittelt. Unter gleichen Bedingungen konnte für pSer keine Bindung festgestellt werden [HEEGAARD, 1994]. Eine Quantifizierung durch ACE gelingt auch für Proteine oder Peptide als Antigene. Für Phosvitin, ein phosphoryliertes Protein aus Hühnereigelb, wurde ein K_D -Wert von $22,4 \mu M$

bestimmt. Die mit dem direkten Verfahren ACE ermittelten Dissoziationskonstanten sind vergleichbar mit den Ergebnissen indirekter Verfahren (z.B. ELISA: 17,4 μM) [LIN *et al.*, 1997]. Zur Beurteilung der Bindung von pTyr-Bausteinen in unterschiedlicher Umgebung (18mer-Peptide verschiedener Sequenz) an Fragmente eines pTyr-spezifischen Antikörpers konnte nur eine mittlere Dissoziationskonstante für beide Bindungsstellen erhalten werden ($K_D^{\text{mittel}} = 27,7 \mu\text{M}$) [LIN *et al.*, 1999]. In allen diesen Beispielen wurde die *mobility-shift*-Methode zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten verwendet. Durch die Konstanten im Bereich von 10^{-6} M war auch eine einfache Detektion mittels UV-Absorption möglich. Die Verwendung phosphorylierter Aminosäuren entspricht dem Fall einer Wechselwirkung mit einem Liganden, der kaum Änderungen am hydrodynamischen Radius verursacht, aber durch die Phosphatgruppe den Ladungszustand des Komplexes verändert. Daraus resultieren gut detektierbare Änderungen der elektrophoretischen Mobilität, der Hauptmeßgröße zur Bestimmung von K_D .

Der Einsatz von fluoreszenzmarkierten Analyten und/oder Liganden ermöglicht die Untersuchung von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen mit Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-9} M. So können hochaffine Systeme, wie Insulin und ein monoklonaler Antikörper, unter der Verwendung der *equilibrium-mixture*-Analyse quantifiziert werden. Der verwendete monoklonale Anti-Insulin-Antikörper zeigte gegenüber Insulin verschiedener Spezies vergleichbare Affinitäten im Bereich von 0,3 bis 0,7 nM [TAO & KENNEDY, 1997]. Besonders bemerkenswert ist hierbei die extrem kurze Analysezeit von 12 s pro Trennung, wodurch gesichert ist, daß die Bestimmung der Konstante nicht durch Dissoziation während der Trennung verfälscht wird.

Klinisch interessante niedermolekulare Verbindungen können auch in Körperflüssigkeiten durch Verwendung entsprechender Antikörper und markierter Antigene analysiert werden. Das Immunsuppressivum Cyclosporin A konnte in der CE mit UV-Detektion nur im Bereich von 10^{-6} M bestimmt werden. In einem indirekten CE-Assay mit markiertem CsA und Anti-CsA-Antikörpern wurde die Nachweisgrenze auf 0,9 nM abgesenkt, und es werden der klassischen klinischen Analytik (Fluoreszenzpolarisation) vergleichbare Ergebnisse in Vollblut erzielt [YE *et al.*, 1998]. Mit Hilfe der *mobility-shift*-Analyse waren polyklonale Anti-Dinitrophenol-Antikörper entsprechend ihrer Affinität zu Dinitrophenol charakterisierbar [LIN *et al.*, 2000]. Neben dem *epitope mapping* für Antikörper ist auch die Bindungsstöchiometrie und die Stabilität der Komplexe mit ACE bestimmbar [QUIAN & TOMER, 1998; OKUN *et al.*, 2000].

Wechselwirkungen mit niedermolekularen Verbindungen

Die Analytik von Biomolekül-Pharmaka-Interaktionen ist sowohl von hohem wissenschaftlichen Interesse [ORAVCOVÁ *et al.*, 1996; HAGE & TWEED, 1997; CHU & CHENG, 1998; HEEGAARD & KENNEDY, 1999] als auch von großem kommerziellen Wert. Den Hauptteil heute verwendeter Arzneimittel bilden organische Verbindungen mit vergleichsweise geringer molekularer Masse [KAROW & LANG, 1999], die keine peptid-, protein- oder nukleinsäureartigen Strukturen aufweisen [KUSCHINSKY & LÜLLMANN, 1989]. Die Bindungsstudien werden erschwert, da die Interaktion des Wirkstoffs mit dem Zielmolekül durch unspezifische Bindungen, z.B. an Serumalbumin, beeinflusst und Verteilung, Bioverfügbarkeit, Aktivität, Toxizität und Elimination verändert werden [SVENSSON *et al.*, 1986; HAGE & TWEED, 1997]. Die Einsatzfähigkeit der ACE wurde daher zuerst an bekannten Beispielen, wie dem Antibiotikum Vancomycin und Arylsulfonamiden, nachgewiesen und verifiziert. Die Arbeitsgruppe um WHITESIDES, dem Begründer der ACE, benutzte die Charakterisierung dieser Bindungen für die einführenden Publikationen [CHU & WHITESIDES 1992, CHU *et al.* 1992] und methodische Weiterentwicklungen, wie die Verwendung von Mobilitätsverhältnissen zur Bestimmung von Bindungsdaten [KAWAOKA & GOMEZ, 1998] und den Einsatz multipler Injektionen zur Beschleunigung der Meßprozedur [ZHANG & GOMEZ, 2000].

Das Interaktionsmodell Serumalbumin und Warfarin (4-Hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)cumarin) [BUSCH *et al.*, 1997] diente zur Einführung meßtechnischer Erweiterungen, wie die Messung kompetitiver Verdrängung von Warfarin durch andere Pharmaka [ERIM & KRAAK, 1998].

Neben diesen Modellsystemen, die vorwiegend zur Methodenentwicklung angewandt wurden, konnte eine Vielzahl weiterer biochemisch relevanter Interaktionen untersucht werden. Als Beispiel sollen die Bindung von entzündungshemmenden Wirkstoffen an Serumalbumin [SUN *et al.*, 1994] und Hitzeschockproteinen oder Immunophilinen an Immunsuppressiva [LIU *et al.*, 1994; NADEAU *et al.*, 1994; HSIEH *et al.*, 1995] genannt werden.

Derzeit wird versucht, in kürzester Zeit und unter minimalem Materialaufwand neue Wirkstoffe für einzelne Rezeptoren oder ganze Signalkaskaden aus komplexen Substanzbibliotheken zu identifizieren [VENTON & WOODBURY, 1999], was durch ACE an den Beispielen Vancomycin und Transthyretin demonstriert werden konnte [CHU *et al.*, 1993; DELORENZI *et al.*, 2000].

Tabelle 2: Übersicht ACE-charakterisierter Wechselwirkungen mit kleinen Molekülen.

Analyt	Ligand	Ergebnis	Referenz
N-Acyl-D-Ala-D-Ala	Vancomycin	Bestimmung K_D	CHU & WHITESIDES, 1992; BUSCH <i>et al.</i> , 1997b
Carboanhydrase B	Arylsulfonamide	Bestimmung K_D	CHU <i>et al.</i> , 1992; KAWAOKA & GOMEZ, 1998; ZHANG & GOMEZ, 2000
Peptidbibliothek	Vancomycin	Peptid mit besten Bindungseigenschaften	CHU <i>et al.</i> , 1993; CHU <i>et al.</i> , 1996
FKBP	FK506, Rapamycin	Nachweis der Bindung	HSIEH <i>et al.</i> , 1994
humanes Serumalbumin, Rinderserumalbumin	Flurbiprofen Ibuprofen	Bestimmung K_D	SUN <i>et al.</i> , 1994
Hsc70	Deoxyspergualin	Bestimmung K_D	LIU <i>et al.</i> , 1994
Hsc70 und Hsp90	Deoxyspergualin	Bestimmung K_D	NADEAU <i>et al.</i> , 1994
Rinderserumalbumin	Warfarin	Bestimmung K_D	BUSCH <i>et al.</i> , 1997a
Rinderserumalbumin	Verdrängung von Warfarin durch Furosemid bzw. Phenylbutazon	Beurteilung des Verdrängungseffekts	ERIM & KRAAK, 1998
Peptidbibliothek	Vancomycin	simultane Bestimmung der K_D von 19 Peptiden	DUNAYEVSKIY <i>et al.</i> , 1998
HIV-1 NCp	Zn^{2+}	Bestimmung K_D	GUSZCZYNSKI & COPELAND, 1998
Casein-Phosphopeptide	Ca^{2+}	Bestimmung K_D	MEISEL & OLIEMAN, 1998
Transthyretin	Bibliothek entzündungshemmender Stoffe	beste Bindesubstanz und Bestimmung K_D	DE LORENZI <i>et al.</i> , 2000

FKBP: FK506-Bindeprotein, Hsc70, Hsp90: Vertreter der Klasse der Hitzeschockproteine, HIV: *human immunodeficiency virus*, NCp: Nucleocapsidprotein

Durch Kopplung der ACE mit massenspektrometrischer Detektion werden Informationsgehalt der Meßdaten und Empfindlichkeit der Detektion erhöht, so daß die Anzahl der Verbindungen in der untersuchten Bibliothek vergrößert werden kann [CHU *et al.*, 1996]. Gleichzeitig erhält man die Möglichkeit, Teile der Bibliothek hinsichtlich ihrer Dissoziationskonstanten zum Zielmolekül simultan quantitativ zu charakterisieren [DUNAYEVSKIY *et al.*, 1998].

Die Bindung von Metallionen an Biomoleküle kann ebenfalls durch ACE untersucht werden. Beispiele dafür sind die Bindung von Calcium an Casein-Phosphopeptide [MEISEL & OLIEMAN, 1998] oder von Zink an das HIV-1 Nucleocapsidprotein [GUSZCZYNSKI & COPELAND, 1998].

Protein-Wechselwirkungen mit Polysacchariden bzw. Nukleinsäuren

Die Interaktion zwischen Heparin und den Bindeproteinen Amyloid P und Lactoferrin sowie daraus abgeleiteten Peptiden wurde hinsichtlich der Bestimmung von K_D und der Untersuchung von Heparin-Bindungsstellen im Molekül mittels ACE charakterisiert [HEEGAARD *et al.*, 1995; HEEGAARD & BRIMNES, 1996; HEEGAARD *et al.*, 1996].

Am Beispiel des CD44-Rezeptors konnte der Einsatz der ACE bei der Untersuchung von Glykosylierungen und deren Einfluß auf das Bindungsverhalten von Proteinen gezeigt werden [SKELTON *et al.*, 1998].

Für die Protein-DNA-Interaktionsanalyse mittels ACE wurden klassische gelelektrophoretische Verfahren adaptiert, die auch als CEMSA (*capillary electrophoretic mobility shift assay*) bezeichnet werden. Neben der Untersuchung von Transkriptions- und Reparaturmechanismen von Nukleinsäuren [FOULDS & ETZKORN, 1998, 1999] eignet sich dieses Verfahren auch zur Untersuchung einzelner Zellen, wie durch DNA-Bindungsassays an Seeigeleiern demonstriert werden konnte [XIAN *et al.*, 1996].

Protein-Wechselwirkungen mit Protein- oder Peptid-Liganden

Abgesehen vom Sonderfall der Protein-Antikörper-Interaktion sind nur wenige Arbeiten zum Einsatz der ACE für Wechselwirkungsstudien mit Peptid- bzw. Proteinliganden publiziert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Durch ACE untersuchte Protein-Wechselwirkungen mit Protein- oder Peptid-Liganden.

Analyt	Ligand	Ergebnis	Referenz
hMHC	abgeleitetes Peptid aus <i>Influenza-Hämagglutinin</i>	Nachweis der Bindung, Bindungskinetik	HEEGAARD <i>et al.</i> , 1997
Erythropoietin-Rezeptor	EPO <i>mimetic peptides</i>	Nachweis der Bindung	CALDWELL <i>et al.</i> , 1999
HIV-1 gp41	putatives Bindeprotein P45	Nachweis der Bindung	XIAO <i>et al.</i> , 1999
humanes Interferon β	putatives Bindeprotein P50 für HIV-1 gp41	Nachweis der Bindung	YU <i>et al.</i> , 2000
HIV-2 gp36	putative Bindeproteine P45 und P62 für gp36	Nachweis der Bindung	CHEN <i>et al.</i> , 2000

EPO: Erythropoietin, HIV: *human immunodeficiency virus*, hMHC: humaner Haupthistokompatibilitätskomplex

Durch *mobility-shift*-Experimente konnte die Bindung zwischen einem Fragment des Erythropoietin-Rezeptors und Peptiden nachgewiesen werden [CALDWELL *et al.*, 1999]. Die Charakterisierung der Interaktion zwischen einem Protein des humanen Haupthistokompatibilitätskomplexes und viralen Peptidliganden umfaßte neben dem Nachweis auch eine kinetische Verfolgung des Bindungsvorgangs [HEEGAARD *et al.*, 1997].

Im Rahmen der HIV-Forschung wurde die ACE für die Untersuchung der Bindung von Virusproteinen an potentielle Rezeptorproteine der Wirtszellen [XIAO *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2000] und der Inhibierung dieser Bindung durch Interferone genutzt [YU *et al.*, 2000].

Aufgabenstellung

Die vorgelegte Arbeit diene der Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Methode zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von Cyclophilin-Ligand-Interaktionen. Ausgehend von den Dissoziationskonstanten bekannter Vertreter dieser Wechselwirkungen galt es, eine Methode zu etablieren, die eine Bestimmung von K_D von Interaktionen unterschiedlicher Affinität ermöglicht. Unter Verwendung von Peptidliganden verschiedener Affinität sollte die ACE zur Charakterisierung von Cyclophilin-Interaktionen dienen. Die Möglichkeit, Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Hilfe der ACE zu analysieren, wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht. Mit Hilfe eines Referenzsystems für Cyclophilin-Protein-Interaktionen sollte die Einsatzfähigkeit der ACE für derartige, durch die Methode nur wenig untersuchte Wechselwirkungen demonstriert werden. In diesem Zusammenhang galt es, die Nutzbarkeit eines fluoreszierenden Cyclophilin-Fusionsproteins für die Interaktionsanalyse nachzuweisen, um nachfolgend dieses Fusionsprotein auf Grund der selektiven Fluoreszenzdetektion zum Nachweis von Cyclophilin-Interaktionen in Zell-Lysaten heranzuziehen.

2 Kapillarelektrophorese - Theoretischer Teil

Die CE ist eine Hochleistungstrenntechnik (*high performance capillary electrophoresis*, HPCE), die Anfang der 80er Jahre entwickelt wurde [JORGENSEN & LUKACS, 1981, 1983] und die im Vergleich zur Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) besondere Vorteile für die Untersuchung geladener Analyte aufweist. Für die Biochemie stellt die CE eine wertvolle Ergänzung der klassischen elektrophoretischen Methoden dar, die sich durch hohe Trenneffizienz, gute Automatisierbarkeit und breite Adaptierbarkeit der Trennbedingungen auszeichnet. Daher hat sich die CE in den letzten Jahren auch fest in der Analytik von Biochemie und Biotechnologie etabliert, wobei ein vielfältiges Problemspektrum bearbeitet wurde [XU, 1999; LAGU, 1999; SZÖKÖ, 1997; LEHMANN *et al.*, 1997; MANABE, 1999].

2.1 Apparativer Aufbau

Der schematische Aufbau eines CE-Gerätes ist in Abbildung 4 dargestellt. Eine mit Puffer gefüllte Kapillare, die mit ihren Enden in Puffergefäße eintaucht, bildet den Hauptbestandteil des Gerätes.

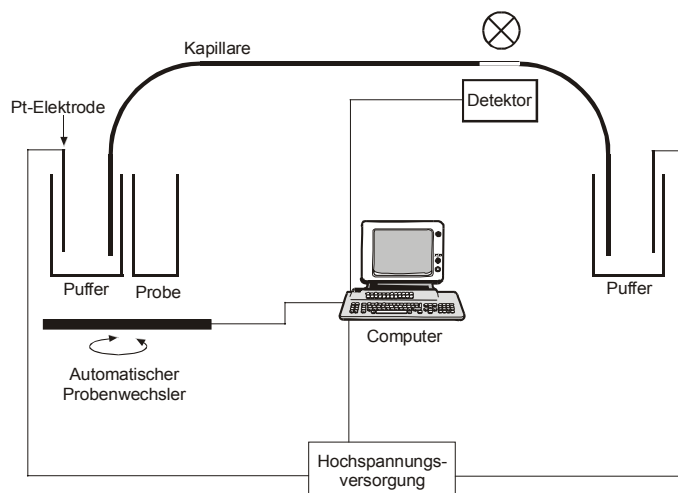


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Kapillarelektrophoresegerätes.

Häufige Verwendung finden Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 25 bis 100 μm und einer Länge von 15 bis 150 cm. Das Kapillarmaterial besteht aus Quarz (*fused silica*),

das zur besseren Handhabbarkeit außen mit einer Polyimid-Beschichtung versehen ist [NEIGER, 1992].

Die Detektion erfolgt *online*, d.h., unter Verwendung eines Abschnitts der Kapillare, von dem die äußere, UV/VIS-undurchlässige Polyimid-Beschichtung entfernt wurde. Auf die einzelnen Detektionsprinzipien wird später noch ausführlich eingegangen. Um die Probe in der Kapillare zu plazieren wird das Puffergefäß an einem Ende gegen ein entsprechendes Probengefäß ausgetauscht. Die Injektion kann folgendermaßen erfolgen:

- hydrodynamisch (durch Anlegen von Druck oder Vakuum),
- hydrostatisch (mittels Schwerkraft durch Höhenunterschied der Kapillarenden),
- elektrokinetisch (durch Anlegen einer Spannung).

In kommerziellen Geräten finden nur noch die hydrodynamische und die elektrokinetische Injektion Anwendung.

2.2 Theoretische Grundlagen

Die Probenbestandteile wandern nach Injektion im angelegten elektrischen Feld und passieren dabei den Detektor. Die Wanderungsgeschwindigkeit oder Migration geladener Probenbestandteile wird durch Gleichung 6 beschrieben (DEBYE-HÜCKEL-HENRY-Theorie).

Gleichung 6
$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot F = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_H} \cdot F$$

v_{ep} : elektrophoretische Geschwindigkeit
 μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität
 F : elektrische Feldstärke

q : Ladung des Ions
 η : dynamische Viskosität des Puffers
 r_H : Radius des hydratisierten Ions

Aus Gleichung 6 wird deutlich, daß neben der elektrischen Feldstärke auch die Parameter Ladung und Radius des hydratisierten Moleküls (Masse-Ladungs-Verhältnis) sowie die Viskosität des verwendeten Puffers Einflußfaktoren sind.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten in der Kapillare hängt zusätzlich zur elektrophoretischen Mobilität μ_{ep} auch vom elektroosmotischen Fluß (EOF) ab, der durch Oberflächeneigenschaften des Kapillarmaterials verursacht wird.

Wie in Abbildung 5 dargestellt, ist die Innenoberfläche des Quarzmaterials der Kapillare durch Dissoziation der Silanolgruppen ($pK_a = 2$ [BECKMAN, 1991]) in Abhängigkeit vom pH-Wert des verwendeten Puffers geladen. Diese negative Ladung wird durch Anlagerung von positiven Ionen des Puffers kompensiert. Es bildet sich eine elektrochemische Doppelschicht aus, die aus einer starren (HELMHOLTZ-Schicht) und einer diffusen Schicht (GOUY-CHAPMAN-Schicht) besteht. Zwischen der Doppelschicht und der Pufferlösung fällt das sogenannte Zeta-Potential ab, welches besonders durch die Ionenstärke des Puffers beeinflusst wird [SCHWER, 1998]. Unter dem Einfluß des während der Trennung angelegten elektrischen Feldes wandern die Kationen der Doppelschicht zur Kathode und führen somit zu einer Bewegung der gesamten Pufferphase.

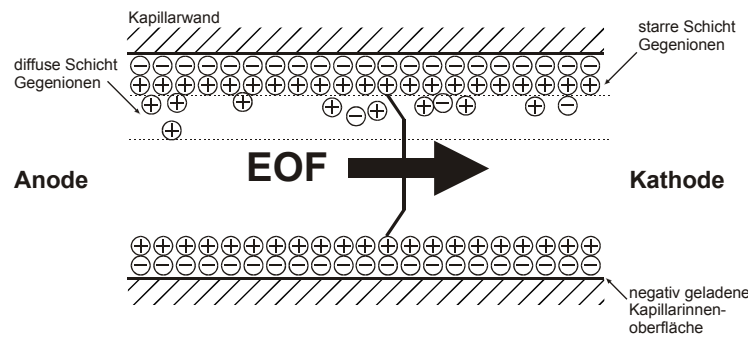


Abbildung 5: Der elektroosmotische Fluß an der Innenwand einer Quarzkapillare.

Gleichung 7

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot F = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \cdot F$$

F: elektrische Feldstärke
 v_{eo} : elektroosmotische Geschwindigkeit
 ϵ_0 : absolute Dielektrizitätskonstante
 ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante

η : dynamische Viskosität des Puffers
 μ_{eo} : elektroosmotische Mobilität
 ζ : Zeta-Potential

Aus Gleichung 7 geht hervor, daß der EOF wesentlich von der Art des eingesetzten Puffers, seiner Dielektrizitätskonstanten, der Viskosität und dem pH-Wert des verwendeten Puffersystems abhängt (Abbildung 6). Diese Abhängigkeit ist bedingt durch die Variabilität des Zeta-Potentials entsprechend des Dissoziationsgrades der Silanolgruppen der inneren Kapillaroberfläche. Die Ausbildung eines EOF ist auch für andere Kapillarmaterialien beschrieben worden [NEIGER, 1992]. Die Aufladung der inneren Oberfläche wird hierbei durch Adsorption von Ionen aus der Pufferphase verursacht.

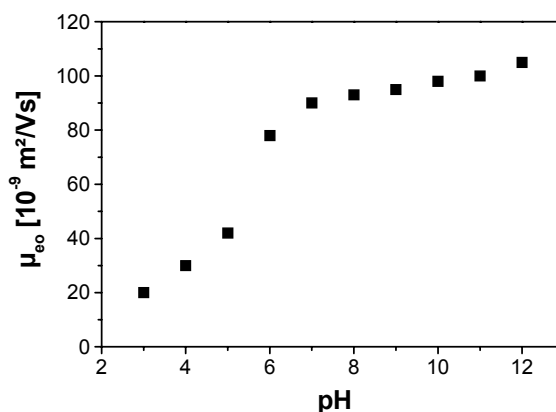


Abbildung 6: Die pH-Wert-Abhängigkeit des EOF in Quarzkapillaren (nach [SCHWER, 1998]).

Die pfropfenförmige Bewegung der gesamten Pufferphase durch den EOF transportiert somit auch die neutralen Probenbestandteile, die so ungetrennt als eine Zone den Detektor erreichen. Der EOF beeinflusst auch die effektiven Mobilitäten der geladenen Probenbestandteile, da sich die Geschwindigkeitsvektoren von Elektroosmose und Elektrophorese überlagern (Tabelle 4).

Tabelle 4: Die resultierende Mobilität von Probenbestandteilen.

Probenbestandteil	resultierende Mobilität μ_{res}	
Kationen	$\mu_{res} = \mu_{eo} + \mu_{ep}$	Gleichung 8
Anionen	$\mu_{res} = \mu_{eo} - \mu_{ep}$	Gleichung 9
Neutralmoleküle	$\mu_{res} = \mu_{eo}$	Gleichung 10

μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität

μ_{eo} : elektroosmotische Mobilität

Obwohl der EOF selbst nicht zur Trennung beiträgt, kann sein Einfluß gezielt genutzt werden. Einerseits ist es so möglich, alle in Tabelle 4 aufgeführten Probenbestandteile in einem Lauf zu analysieren. Andererseits kann man durch gezielte Veränderung der elektroosmotischen Mobilität (z.B. durch Änderung der Ionenstärke des Trennpuffers) eine Verbesserung der Trenneffizienz erreichen [NEIGER, 1992; SCHWER, 1998].

Für die Optimierung der Trennleistung ist eine Anzahl von Parametern variierbar:

- pH-Wert,
- Ionenstärke,
- Temperatur,

- Kapillarmodifizierung,
- Pufferzusätze (Detergenzien, organische Lösungsmittel, chirale Selektoren).

Die Variationsbreite ist allerdings bei biochemischen Fragestellungen oft eingeschränkt, da man hier beispielsweise für Untersuchungen von Interaktionen auf eine native Umgebung angewiesen ist.

2.3 Kapillarelektrophoretische Methoden

In der CE werden Trennungen in verschiedenen Operationsmodi durchgeführt [WÄTZIG *et al.*, 1998]. Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) trennt die Probenbestandteile entsprechend ihrer Mobilität in einem einheitlichen Elektrolytssystem (Trennpuffer) in Zonen auf. Durch die Entwicklung der micellarelektrokinetischen Chromatographie (MEKC) konnte die Limitation der CZE bei der Analyse elektrisch neutraler Verbindungen überwunden werden [TERABE *et al.*, 1984; QUIRINO & TERABE, 1999]. Der Zusatz von Detergenzien schafft unter Bildung geladener Micellen eine pseudostationäre Phase im Puffer, was zur Trennung der neutralen Probenbestandteile entsprechend ihrer Verteilungsgleichgewichte zwischen den Micellen und der wäßrigen Phase führt [TERABE, 1989]. Als Detergenzien können anionische, kationische und nichtionische Tenside sowie Gemische eingesetzt werden, wobei Natriumdodecylsulfat (SDS) am häufigsten Verwendung findet [TERABE, 1992].

Durch Adaption an Verfahren der herkömmlichen Flachbett-Elektrophorese wurden Kapillargelelektrophorese (CGE) und Kapillar-Isoelektrische Fokussierung (CIEF) als CE-Verfahren entwickelt, die sich durch eine bedeutende Erhöhung der Trennleistung auszeichnen. In der CGE kommen verschiedene Polymere zum Einsatz, die sowohl quervernetzt fest in der Kapillare fixiert, als auch als physikalisches Gel linearer löslicher Polymere verwendet werden. Ein klassischer Vertreter der ersten Gruppe ist Polyacrylamid. Als physikalische Gelbildner sind verschiedenste Polymere, wie Cellulosederivate, Agarose, Polyvinylalkohol usw., verwendbar. Die CGE eignet sich vor allem zur Analyse von Biomakromolekülen wie Proteinen und DNA. In der CIEF werden Ampholyte (z.B. Proteine) entlang eines pH-Gradienten getrennt. Hierbei wird die Kapillare mit einem Gemisch aus Ampholyten und der Probe gefüllt. Nach dem Anlegen des elektrischen Feldes kommt es zur Ausbildung des pH-Gradienten, da die Ampholyte des Puffers entsprechend ihres pI wandern. Die Probenbestandteile, selbst auch

Ampholyte, wandern dann entlang dieses pH-Gradienten durch die Kapillare und werden an der Stelle $pI^{\text{Probe}} = \text{pH}$ fokussiert. Die Bewegung der Probezonen zum Detektor erfolgt, zeitlich getrennt vom Fokussierschritt, durch Druck-/Spannungs- oder chemische Mobilisierung.

Weitere Spezialanwendungen sind Isotachophorese (ITP), chirale CE und Affinitätskapillarelektrophorese (ACE). Die ITP verwendet ein diskontinuierliches Puffersystem aus Leit- und Endelektrolyt, das die applizierte Probe umschließt. Da sich die Mobilitäten von Leitelektrolyt (höchste Mobilität), Probe und Endelektrolyt (niedrigste Mobilität) unterscheiden, bildet sich beim Anlegen eines konstanten Stroms unter Einhaltung des OHM'schen Gesetzes ein Feldstärkegradient aus.

Mit der zunehmenden Anwendung chiraler Verbindungen im Rahmen industrieller Wirkstoffforschung hat die Anwendung der chiralen CE an Bedeutung gewonnen. Durch eine chirale pseudostationäre Phase wird ein stereoselektives Umfeld geschaffen, so daß bei Wechselwirkung mit den enantiomeren Probenbestandteilen ein diastereomerer Komplex entsteht. Eine Trennung der chiralen Probenbestandteile ist dann möglich, wenn die diastereomeren Komplexe entweder unterschiedliche Mobilitäten oder unterschiedliche Stabilitätskonstanten aufweisen. Als pseudostationäre Phase kommen besonders häufig Cyclodextrine (cyclische Verbindungen aus 6 bis 8 D-Glukose-Bausteinen), chirale Micellbildner (z.B. Cholsäuren) und chirale Cellulosederivate zum Einsatz.

2.4 Elektrophoretisch vermittelte Mikroanalyse

Bei der elektrophoretisch vermittelten Mikroanalyse (*electrophoretically mediated microanalysis*, EMMA, [BAO & REGNIER, 1992]) handelt es sich um eine Spezialanwendung der CE, bei der die Kapillare als Mikroreaktor genutzt wird. Edukte einer Reaktion werden als getrennte Probezonen injiziert. Die Reaktion dieser Komponenten erfolgt dann während der Elektrophorese. Dabei werden die Zonen der Edukte durch ihre notwendigerweise vorhandenen Unterschiede in den elektrophoretischen Eigenschaften gemischt und somit die Reaktion ermöglicht [REGNIER *et al.*, 1995]. Die Verfolgung der Reaktion wird entweder durch die Detektion des entstandenen Produkts oder der Abnahme der Edukte realisiert (Abbildung 7).

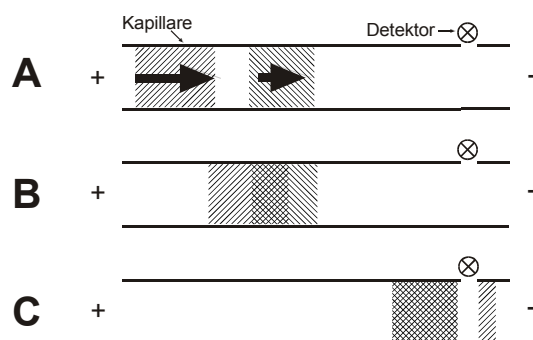


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Reaktion durch EMMA in der CE. Die Reaktanden P (▨) und L (▩) werden als getrennte Probezonen injiziert (A). Während der elektrophoretischen Trennung werden die Probezonen auf Grund der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität von P und L durchmischt und das Reaktionsprodukt PL (⊗) wird gebildet (B). Der Fortschritt der in der Kapillare abgelaufenen Reaktion wird durch Detektion des gebildeten Reaktionsprodukts oder die Abnahme des Signals der Reaktanden verfolgt (C).

Anwendung findet dieses Prinzip besonders bei der Analyse enzymatischer Reaktionssysteme [HARMON *et al.*, 1993a; SAEVELS *et al.*, 1996; KWAK *et al.*, 1999], wobei man die Effektivität der katalysierten Reaktion für die empfindliche Detektion und die Charakterisierung geringster Substanzmengen ausnutzt. Eine Steuerung der Reaktion ist durch die Variation der elektrophoretischen Bedingungen möglich, die die Kontaktzeit der Probezonen bestimmen [HARMON *et al.*, 1993b].

2.5 Detektion

Für die *online*-Detektion in der CE sind verschiedene Methoden etabliert worden (Tabelle 5). Der Hauptteil der Detektionssysteme beruht auf spektroskopischen Methoden, wobei die UV-Absorptions-Detektoren auf Grund ihres einfachen Aufbaus und der vielseitigen Anwendbarkeit am weitesten verbreitet sind. Besondere Bedeutung besitzt die LIF-Detektion, die eine drastische Verbesserung der Nachweisgrenze ermöglicht. Weitere Detektionsprinzipien (Elektrochemie, Circular dichroismus, Brechungsindex, Raman-spektroskopie, Radioisotope, Chemilumineszenz, Kernresonanzspektroskopie etc.) werden für Trennprobleme mit hohen Anforderungen an Selektivität und Sensitivität der Detektion eingesetzt [SWINNEY & BORNHOP, 2000; HUANG & FANG, 2000; PUSECKER *et al.*, 1998; BOBBIT & LINDER, 2001; GUZMAN *et al.*, 1997]. Allerdings sind derartige Systeme kommerziell kaum erhältlich und daher der Routineanwendung nur schwer zugänglich.

Wie aus Gleichungen 11 und 12 hervorgeht, ist neben stoffspezifischen Konstanten (Extinktionskoeffizient, Quantenausbeute) die Schichtdicke der Detektorzelle von entscheidender Bedeutung für die Empfindlichkeit des Detektionssystems. Durch den Verzicht auf eine externe Detektorzelle wird eine Zonenverbreiterung durch Diffusion in dem der Kapillare nachgeschalteten Volumen verhindert. Nachteilig ist bei der *online*-Detektion allerdings das geringe Detektionsvolumen, das durch den Kapillardurchmesser limitiert wird.

Tabelle 5: Nachweisgrenzen einiger Detektionsmethoden in der CE nach [NEIGER, 1992].

Methode	Nachweisgrenze	
	absolut [mol]	relativ ^{*)} [mol/l]
UV-Absorption	$10^{-13} - 10^{-16}$	$10^{-5} - 10^{-8}$
Fluoreszenz	$10^{-15} - 10^{-17}$	$10^{-7} - 10^{-9}$
Laser-induzierte Fluoreszenz	$10^{-18} - 10^{-20}$	$10^{-10} - 10^{-12}$
Amperometrie	$10^{-18} - 10^{-19}$	$10^{-10} - 10^{-11}$
Leitfähigkeit	$10^{-15} - 10^{-16}$	$10^{-7} - 10^{-8}$
Massenspektrometrie	$10^{-16} - 10^{-17}$	$10^{-8} - 10^{-9}$

^{*)}bezogen auf ein Injektionsvolumen von 10 nl

Gleichung 11
$$A = \lg \frac{I_0}{I_d} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Gleichung 12
$$I_F = 2,303 \cdot \Phi_F \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A : Absorption
 I_0 : Intensität des eingestrahnten Lichts
 I_d : Intensität des durchgehenden Lichts
 ε : Extinktionskoeffizient
 c : Konzentration
 d : Schichtdicke
 I_F : Intensität der Fluoreszenzemission
 Φ_F : Quantenausbeute der Fluoreszenz

Speziell im Bereich der Miniaturisierung und Fokussierung des Detektionssystems ist ein erheblicher apparativer Aufwand nötig. Durch Modifikationen der Detektionszone der Kapillare (*bubble*-Zelle, Z-Zelle) kann die Empfindlichkeit durch einen verlängerten Lichtweg [DJORDJEVIC *et al.*, 1997; CHERVET *et al.*, 1991] gesteigert werden.

Neben der Detektion in der Kapillare sind verschiedene Kopplungen zu Nachsäulen-Detektionsverfahren beschrieben [AL-DIRBASHI & NAKASHIMA, 2000].

Für Kopplungen zur Massenspektrometrie (MS) werden verschiedene Spray-Techniken verwendet (z.B. Elektrospray), um die Überführung in die Gasphase und die Ionisierung zu realisieren. Dazu ist allerdings die Verwendung eines Zusatzflusses an Puffer (*sheath flow*) erforderlich, da die während der Trennung aus der Kapillare austretenden Flüssigkeitsmengen nicht zum Betreiben der miniaturisierten Zerstäuber ausreichen [SEVERS & SMITH, 1997]. Alternativ wurden auch Zerstäuber mit einem Gaszusatzfluß angewandt [FIGEYS & AEBERSOLD, 1998].

Durch die Verwendung eines automatischen Probensammlers in Verbindung mit MALDI-TOF-MS ist es möglich, eine *offline*-Kopplung von CE und MS zu realisieren. Hierbei werden Fraktionen der CE-Trennung direkt auf MALDI-Trägern gesammelt und nachfolgend mittels MS analysiert [WALKER *et al.*, 1995].

Obwohl die Kopplung mit der Massenspektrometrie keine bedeutende Verbesserung der Nachweisgrenze im Vergleich zur UV-Detektion ermöglicht, ist der Informationsgehalt der erhaltenen Daten deutlich größer, da man molekulare Masse und Struktur der Analyten aufklären kann [FIGEYS & AEBERSOLD, 1997; ZHOU *et al.*, 1998].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

	bereitgestellt von:
Anti-rhCyp18	Dr. J. Rahfeld, MPG Halle
Anti-rDmCyp20	Dr. G. Küllertz, MPG Halle
Anti-Kaninchen-IgG, peroxidasegekoppelt	Serva, Heidelberg
Ein polyklonales Anti-GFP-Antiserum wurde gegen rekombinantes grün fluoreszierendes Protein (GFP) mittels Kaninchenimmunisierung hergestellt (pab productions, Herbertshausen).	

3.1.2 Arbeitsgeräte und Hilfsmittel

Chromatographie

FPLC-System:

Steuerungseinheit <i>LCC-501 Plus</i>	
2 Pumpen <i>P-500</i> mit Gradientenmischer	
Fraktionssammler <i>Frac-100</i>	
UV-Detektor <i>Control Unit UV-1</i>	
Schreiber <i>Rec 112</i>	Amersham Pharmacia, Freiburg

SMART Chromatographie-System:

Steuereinheit <i>μ Separation Unit</i>	
Pumpen <i>μ Precision Pump</i>	
Detektor <i>μ Peak Monitor</i>	
Fraktionssammler	
SMART Manager 1.5	Amersham Pharmacia

Elektrophorese und Westernblot

Elektrophoresekammer für Minigel	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer XCell II	Invitrogen, Groningen, NL
Blotkammer Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Netzgerät Power Pack P 25	Biometra

Fluoreszenzdetektion

CCD-Kamera Darkroom evo III	Raytest, Straubenhardt
Fluoreszenzscanner Fuji FLA-3000	Raytest

Photometer und Zubehör

Photometer HP 8452A	Agilent, Waldbronn
Kryostat Haake D8	Haake, Karlsruhe

Kapillarelektrophorese

P/ACE MDQ mit Dioden-Array-Detektor	Beckman Coulter, München
P/ACE 2100 mit Fluoreszenzdetektor und Ar ⁺ -Laser	Beckman Coulter
ABI-270HT mit UV-Detektor	Applied Biosystems, Weiterstadt

Zentrifugen und Rotoren

Sorvall RC 5B Plus Rotor SLA-300 Rotor SS-34	Kendro, Newton, CT, USA
Biofuge fresco	Heraeus, Karlsruhe

Sonstiges

Inkubator innova 4330	Brunswick Scientific, Nürtingen
Kippschüttler Duomax 1030	Heidolph, Kehlheim
<i>french press</i>	SLM Amico Instruments
Ultraschalldesintegrator	Novodirect, Kehl/Rhein

*3.1.3 Chemikalien und Materialien**3.1.3.1 Chemikalien*

Acrylamidlösung (30 % Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid)	
"Rothiphorese Gel 30"	Roth, Karlsruhe
Antibiotika	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
<i>Coomassie</i> Brilliant Blau R bzw. G 25	Serva

rekombinantes humanes Cyclophilin 18 (rhCyp18)	Dr. J. Rahfeld, J. Fanghänel (MPG Halle)
Hefeextrakt	Life Technologies, Karlsruhe
ECL Western Blot Detektionslösungen	Amersham Pharmacia
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	AppliChem, Darmstadt
Molekulargewicht-Marker für SDS-PAGE	
<i>Mark 12 wide range</i>	Invitrogen
<i>SeeBlue</i>	Invitrogen
10 kDa-Leiter	Life Technologies
Ponceau S	Sigma
Synthetische Peptide	D. Wildemann, Dr. F. Bordusa (MPG Halle)
	Calbiochem, Bad Soden
Trypton	Sigma
Trypsin	Merck

Alle übrigen gebräuchlichen Chemikalien wurden mit dem Reineitsgrad "*pro analysis*" bzw. "für die Molekularbiologie" verwendet und von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

3.1.3.2 Materialien

Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia
Nitrocellulose Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Blotting-Papier	Schleicher & Schuell
Dialyseschlauch	Serva
CE-Kapillarmaterial (<i>fused silica</i>)	Polymicro, Phoenix, AZ, USA

3.1.4 Medien, Puffer- und Färbelösungen, Polyacrylamidgele

Soweit nicht gesondert angegeben, wurde für alle Lösungen Wasser (entionisiert, in tridestillierter Qualität) als Lösungsmittel verwendet.

phosphatgepufferte Kochsalzlösung 136,9 mM NaCl
(PBS) 2,7 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
pH 7,0

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Trenngel "TBE"-Gele (6 %), Invitrogen

Laufpuffer 45 mM Tris
45 mM Borsäure
0,78 mM EDTA
pH 8,3

Probenpuffer "High-Density TBE Sample Buffer",
Invitrogen

Tris-gepufferte Kochsalzlösung 50 mM Tris pH 7,5 (HCl)
+ Tween 20 (TBT) 150 mM NaCl
0,2 % (v/v) Tween 20

SDS-PAGE

Sammelgel 0,4 ml Acrylamidlösung
0,25 ml 1,25 M Tris pH 6,8 (HCl)
1,8 ml Wasser
25 µl 10 % (w/w) SDS
2,5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
8,5 µl 10 % (w/w) Ammoniumpersulfat

Trenngel 3,125/3,75 ml Acrylamidlösung (12,5/15 %)
2,625/2 ml Wasser (12,5/15 %)
1,5 ml 1,8 M Tris pH 8,8 (HCl)
75 µl 10% (w/w) SDS
3,75 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
25 µl 10% (w/w) Ammoniumpersulfat

Alternativ wurden vorgefertigte Gradientengele 4 bis 12 % (Invitrogen) verwendet.

Laufpuffer 25 mM Tris
192 mM Glycin
3,5 mM SDS pH 8,3

Probenpuffer	156 mM Tris pH 6,8 (HCl) 80 mM SDS 4 % (v/v) Glycerin Bromphenolblau
<i>Coomassie</i> Brilliantblau-Färbelösung für Polyacrylamidgele	2 g/l <i>Coomassie</i> Brilliantblau R 250 0,5 g/l <i>Coomassie</i> Brilliantblau G 250 10 % (v/v) Essigsäure 30 % (v/v) Methanol 17,5 % (v/v) Ethanol
Entfärbelösung für <i>Coomassie</i> Brilliantblau gefärbte Polyacrylamidgele	45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Lösung zur Proteinbestimmung nach BRADFORD	0,1 g <i>Coomassie</i> Brilliantblau lösen in: 100 ml Phosphorsäure (85 %ig) 50 ml Ethanol (95 %ig) anschließend auffüllen auf 1 l
Lösungen für <i>western-blot</i>	
Transferpuffer	25 mM Tris 150 mM Glycin pH 8,3 10 % (v/v) Methanol
Blockierungslösung	3 % (w/v) Magermilchpulver in TBT
Ponceau S - Färbelösung	5 g/l Ponceau S 1 % (v/v) Essigsäure
Homogenisationspuffer A	50 mM Phosphat pH 7,5 0,2 % v/v Tween 20 1 mM Mercaptoethanol 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) 5 % (v/v) Glycerin
Homogenisationspuffer B	25 mM Hepes pH 7,5 50 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 10 mM NaF 0,01 % (v/v) Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glycerin 0,2 % (v/v) NP-40 0,5 mM PMSF

Puffer für Peptidbibliotheken (MP)	30 mM Tris pH 7.6 (HCl) 170 mM NaCl 6,4 mM KCl 0,05 % (v/v) Tween 20 5 % Saccharose (w/v)
<i>terrific broth</i> -Nährmedium (TB)	11,8 g/l Pepton 140 23,6 g/l Hefeextrakt 9,4 g/l K ₂ HPO ₄ 2,2 g/l KH ₂ PO ₄ 0,5 % Glycerin (v/v) pH 7,5 (NaOH)

3.1.5 Säulenmaterialien

Hydrophobe Interaktionschromatographie:

Fraktogel EMD Propyl	Merck
----------------------	-------

Ionenaustauschchromatographie:

Source 30 Q	Pharmacia
Source 30 S	Pharmacia

Größenausschlußchromatographie

Superdex 75	Pharmacia
-------------	-----------

3.2 Methoden

3.2.1 Expression und Reinigung von *rDmCyp20-GFP*, *rDmCyp20* und *rGFP*

3.2.1.1 Kultivierung der Mikroorganismen

Die *E. coli*-Stämme zur Überexpression von *rDmCyp20-GFP* und *rDmCyp20* wurden von Frau Dr. J. Reißmann (MPG Halle) kloniert [REIßMANN, 2001] und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Proteinexpression wurde in Gegenwart von Ampicillin in 3 ml TB-Vorkulturen bei 30 und 37 °C überprüft. Über-Nacht-Kulturen wurden mit 1 mM IPTG induziert. Nach 1 bis 2 h wurde 1 ml der Kultur abzentrifugiert (10 min, 6000 × g), der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit 50 µl SDS-Probenpuffer versetzt und mit Ultraschall homogenisiert (dreimal 30 s). Das Zellhomogenat wurde 10 min bei 95 °C denaturiert und abzentrifugiert (5 min, 13000 × g). Proben des Überstandes von 5 µl wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Für die Hauptkultur wurden die entsprechenden *E. coli*-Stämme bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,6$ bei 37 °C kultiviert. Die Überexpression der rekombinanten Proteine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG für 6 h bei 37 °C (rDmCyp20) bzw. 25 °C (rDmCyp20-GFP) induziert.

3.2.1.2 Homogenisation

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, $6000 \times g$) geerntet. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Das erhaltene Zellpellet wurde unter Zugabe von 300 ml Homogenisationspuffer A mittels Ultraschall resuspendiert. Der vollständige mechanische Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte unter Verwendung einer French-Druckzelle (*french press*, 1200 psi). Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation (20 min, $27000 \times g$) sedimentiert und abgetrennt. Der Überstand wurde den entsprechenden Reinigungsprozeduren für die jeweiligen Proteine zugeführt.

3.2.1.3 Präparative Chromatographie

rDmCyp20-GFP

Die unter 3.2.1.2 beschriebene lösliche Proteinfraction wurde mit Ammoniumsulfat fraktioniert gefällt. Nach Abtrennung des Proteinpräzipitats durch Zugabe von 5 und 20 % (w/v) Ammoniumsulfat und Zentrifugation (20 min, $27000 \times g$) konnte das im Überstand enthaltene rDmCyp20-GFP auf eine hydrophobe Säule (5 × 10 cm, Fraktogel EMD Propyl) appliziert werden, die mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 + 20 % (w/v) Ammoniumsulfat equilibriert war. Die Elution erfolgte durch einen stufenweise absteigenden Ammoniumsulfat-Gradienten (5 ml/min; 20 bis 0 % in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5; 5 %-Schritte zu je 250 ml). Die rDmCyp20-GFP enthaltenden Fraktionen wurden mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 + 5 % (w/v) Ammoniumsulfat eluiert, gegen 10 mM Tris-Puffer pH 7,5 dialysiert und zentrifugiert (20 min, $27000 \times g$). Der Überstand wurde auf eine Anionenaustauschersäule (2,6 × 14 cm, Source 30 Q) aufgetragen, die mit 20 mM Tris-Puffer pH 7,5 equilibriert war. Die Elution erfolgte durch einen linearen NaCl-Gradienten (4 ml/min; 0 bis 150 mM NaCl in 20 mM Tris-Puffer pH 7,5; 800 ml). rDmCyp20-GFP wurde mit 50 mM NaCl vom Anionenaustauscher eluiert.

rDmCyp20

Kultivierung, Aufschluß und fraktionierte Fällung von rDmCyp20 erfolgte analog der oben beschriebenen Methode für rDmCyp20-GFP mit einer zusätzlichen 40%-Ammoniumsulfatfällung. Der Überstand des 40 %igen Fällungsschrittes wurde auf eine hydrophobe Säule (5 × 10 cm, Fraktoigel EMD Propyl) aufgetragen, die mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 + 40 % (w/v) Ammoniumsulfat equilibriert war. rDmCyp20 konnte durch einen stufenweise absteigenden Ammoniumsulfat-Gradienten (5 ml/min; 20 bis 0 % in 50 mM Tris-Puffer pH 8,0; 10 %-Schritte zu je 250 ml) eluiert werden. Die rDmCyp20 enthaltenden Fraktionen wurden gegen 10 mM Tris-Puffer pH 8,0 dialysiert.

Verunreinigungen im zentrifugierten Überstand (20 min, 27000 × g) konnten in 20 mM Tris-Puffer pH 8,0 auf eine Anionenaustauschersäule (2,6 × 14 cm, Source 30 Q) gebunden werden, während rDmCyp20 im Durchlauf der Säule detektiert wurde. Das dialysierte (10 mM Mes-Puffer pH 6,5) und zentrifugierte (20 min, 27000 × g) rDmCyp20 wurde auf einer Kationenaustauschersäule (1,6 × 14 cm, Source 30 S) feingereinigt. Die Elution erfolgte durch einen linearen NaCl-Gradienten (4 ml/min; 0 bis 250 mM NaCl in 20 mM Mes-Puffer pH 6,5; 650 ml). rDmCyp20 wurde mit 50 mM NaCl vom Kationenaustauscher eluiert.

rGFP

Das Protein rGFP wurde durch vollständigen proteolytischen Abbau des Fusionsproteins rDmCyp20-GFP erhalten. Zu einer Lösung von rDmCyp20-GFP (2 mg/ml) wurde Trypsin (5 µM) gegeben und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der proteolytische Abbau wurde durch Probenahme (20 min Intervalle) und anschließende Analyse in einer SDS-PAGE verfolgt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM PMSF gestoppt, der Ansatz dialysiert (10 mM Tris pH 8,0) und zentrifugiert (20 min, 27000 × g). Die Feinreinigung unter Abtrennung der Protease sowie proteolytischer Fragmente erfolgte an einer mit 20 mM Tris pH 8,0 equilibrierten Anionenaustauschersäule (2,6 × 14 cm, Source 30 Q). rGFP mit einer Reinheit ≥ 95 % (nach SDS-PAGE) wurde durch einen linearen NaCl-Gradienten (6 ml/min; 0 bis 500 mM NaCl in 20 mM Tris pH 8,0; 960 ml) erhalten. rGFP wurde mit 150 mM NaCl vom Anionenaustauscher eluiert.

3.2.1.4 Endkontrolle und Lagerung

Die Fraktionen des finalen chromatographischen Reinigungsschrittes wurden durch SDS-PAGE mit anschließender *Coomassie*-Färbung auf ihre Homogenität analysiert. Fraktionen gleicher Qualität wurden vereinigt und nach Zugabe von 5 % (v/v) Glycerin portioniert bei -80 °C gelagert. Nachfolgend erfolgte eine Charakterisierung wie unter 3.2.2.1 bis 3.2.2.4 beschrieben.

3.2.2 Proteinanalyse

3.2.2.1 EDMAN-Sequenzierung

Die Proteinproben mußten für Untersuchungen mittels N-terminaler Sequenzierung oder Massenspektrometrie nochmals gereinigt und entsalzt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Trennung mittels Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) durchgeführt. Die Trennung wurde an einem HPLC-System LC-10A (Shimadzu, Duisburg) mit Hilfe einer Säule ET125/2 Nucleosil 500-5 C₃-PPN (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Die Elution erfolgte mit Gradientenelution mittels Wasser (0,09 % Trifluoressigsäure v/v) und Acetonitril (0,08 % Trifluoressigsäure v/v) mit einer Flußrate von 0,2 ml/min. Folgender Gradient wurde verwendet:

0 bis 1,9 min 1 % Acetonitril (konstant)

1,9 bis 2 min 1 bis 30 % Acetonitril

2 bis 28 min 30 bis 60 % Acetonitril

Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Die Proteinfraction wurde aufgefangen und für Sequenzierung und Massenspektrometrie verwendet. Falls erforderlich, wurden die Proteine vor der Injektion durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) reduziert (30 min, 22 °C, pH 8,0).

Die N-terminale Sequenzierung erfolgte mittels EDMAN-Abbau am *pulsed-liquid-sequencer* 476A (Applied Biosystems, Weiterstadt).

Die Proteinanalyse durch RP-HPLC und EDMAN-Sequenzierung wurden freundlicherweise von Herrn Dr. P. Rücknagel (MPG Halle) durchgeführt.

3.2.2.2 Massenspektrometrie

In Vorbereitung der massenspektrometrischen Analyse wurden die Proteine mittels RP-HPLC entsalzt (siehe 3.2.2.1).

Die molekulare Masse der gereinigten rekombinanten Proteine wurde am Esquire-LC-ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen) bestimmt, wobei Acetonitril (0,05 % Ameisensäure v/v) als Eluent verwendet wurde.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (MPG Halle) durchgeführt.

3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD

Diese Variante der Konzentrationsbestimmung wurde sowohl für Lösungen bekannter Proteine (gereinigte rekombinante Proteine) als auch für die Ermittlung der Gesamtkonzentration in komplexen Gemischen (Aufschlüsse von Biomaterial) verwendet und erfolgte adaptiert nach der von BRADFORD publizierten Methode [BRADFORD, 1976].

Das System wurde mittels Rinderserumalbumin im Bereich von 0 bis 100 µg/ml kalibriert und die Kalibrationsfunktion durch lineare Regression ausgewertet. 50 µl der Kalibrations- bzw. Proteinlösungen wurden mit 200 µl BRADFORD-Lösung in einer Mikrotiterplatte gemischt. Nach einer Inkubation (22 °C, 5 min) wurde die Extinktion bei 590 nm gemessen.

3.2.2.4 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung

Für Proteine bekannter Sequenz können spektrometrische Eigenschaften (Extinktionskoeffizient) berechnet werden [GILL & VON HIPPEL, 1989]. Durch Messung der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge (z.B. 280 nm) kann die Proteinkonzentration unter Verwendung des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes (siehe 2.5, Gleichung 11) errechnet werden, wenn es sich um eine reine Substanz in Lösung handelt.

Spektren der Proteinlösungen im Bereich von 240 bis 320 nm wurden in entsprechender Verdünnung in einer 1 cm-Küvette im Photometer (HP 8452, Agilent) aufgenommen, wobei das Hintergrundspektrum des jeweiligen Puffers subtrahiert wurde.

3.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach LAEMMLI durchgeführt [LAEMMLI, 1970]. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (20 % v/v) versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und auf die Polyacrylamidgele aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstantem Strom von 30 mA und einer variablen Spannung von 100 bis 250 V durchgeführt.

Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteinbanden mittels *Coomassie* Brilliantblau-Färbelösung so gefärbt, daß die Proteinbanden vor einem farblosen Gelhintergrund sichtbar waren.

Die Abschätzung der molekularen Masse war durch Vergleich der Laufstrecke mit Markerproteinen möglich. Es wurden kommerziell erhältliche Markerproteinmischungen verwendet (siehe 3.1.3.1).

3.2.2.6 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) kamen 6 %ige Gele (Invitrogen) zum Einsatz, die mit einem Tris-Borat-EDTA-Laufpuffer verwendet wurden. Die Proben wurden mit TBE-Probenpuffer versetzt (20 % v/v) und auf die Gele aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 100 V für etwa 5 h durchgeführt. Die Elektrophoresezelle wurde dabei in einem Eisbad gekühlt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels Fluoreszenzdetektion an einer CCD-Kamera mit Filter "SYBR GREEN" (Raytest) bzw. durch Färbung mit *Coomassie* Brilliantblau.

3.2.2.7 *western-blot*-Analyse

Nach erfolgter elektrophoretischer Trennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine im "*semi-dry*"-Verfahren auf Nitrocellulose transferiert. In einer Blotkammer (Bio-Rad, München) wurden in Transferpuffer eingeweichtes Blottingpapier, Nitrocellulose und das Gel der vorangegangenen SDS-PAGE in folgender Reihenfolge luftblasenfrei eingelegt:

Anode Blottingpapier | Nitrocellulose | Gel | Blottingpapier **Kathode**

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei einer Stromdichte von 2 mA/cm² für 90 min. Zur Kontrolle des Transfererfolges wurden die an Nitrocellulose gebundenen Proteine

reversibel mit Ponceau S-Färbelösung sichtbar gemacht. Durch Schwenken in PBS für 20 min konnte die Färbung wieder vollständig entfernt werden.

Nach Blockierung freier Bindungsstellen der Nitrocellulose durch Inkubation in Blockierungslösung für 120 min erfolgte eine Hybridisierung der Proteine mit dem spezifischen Antikörper. Für diese Hybridisierung wurde der spezifische polyklonale Antikörper 1:2000 (v/v) in Blockierungslösung verdünnt und die Nitrocellulose damit inkubiert (15 h, 4 °C). Nach mehrfachem Waschen mit TBT wurde der spezifische Antikörper durch Inkubation mit dem Zweitantikörper Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (1:2000 v/v in Blockierungslösung, 2 h) hybridisiert. Der Nachweis der so mit spezifischem und Zweitantikörper hybridisierten Proteine erfolgt durch Detektion der Peroxidasefunktion des Zweitantikörperkonjugates. Diese konnte mittels Peroxidase-sensitiver Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers [AMERSHAM, 1998].

3.2.3 Herstellung eines polyklonalen Anti-GFP-Antiserums

Um ein polyklonales Anti-GFP-Antiserum herzustellen, wurde ein Kaninchen immunisiert (Firma pab productions, Herbertshausen). Als Antigen diente das unter 3.2.1.3 beschriebene gereinigte rekombinante GFP. Zur Verstärkung der Immunantwort im Tier erfolgte vor den Injektionen eine 1:1 Mischung des Antigens mit FREUDSchem Adjuvans. Dem Kaninchen wurden dann 500 µl der Antigenmischung subcutan im Nackenbereich gespritzt. Nach 4 Wochen konnte das erste Serum entnommen werden und im *western blot* auf immunreaktive Antikörper getestet werden. Ebenso nach 4 bis 6 Wochen erhielt das Kaninchen eine weitere Antigeninjektion, um einen möglichst hohen IgG-Titer im Serum zu erhalten.

3.2.4 Aufschluß von *Drosophila melanogaster*

Zur Homogenisation wurden ca. 50 mg Biomaterial von *D. melanogaster* der entsprechenden Entwicklungsstufe für ≥ 2 h bei -80 °C tiefgefroren. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Das gefrorene Pellet wurde mit 300 bis 500 µl vorgekühltem Homogenisationspuffer B versetzt und mit Hilfe eines Ultraschall-desintegrators solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (10 min,

13000 × g) sedimentiert und abgetrennt. Im erhaltenen Überstand wurde die Proteinkonzentration nach BRADFORD bestimmt. Die solubilisierten Proteine wurden entweder direkt verwendet oder portioniert bei –80 °C gelagert.

3.2.5 Kapillarelektrophorese

3.2.5.1 Geräte und Kapillaren

Für die Durchführung der Messungen mit UV-Detektion wurden die Kapillarelektrophoresegeräte ABI-270HT (ABI) von Applied Biosystems und P/ACE MDQ (MDQ) von Beckman Coulter verwendet. Die Experimente mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion wurden mit einem P/ACE 2100-Gerät (PACE) von Beckman Coulter durchgeführt.

Kapillaren aus Quarz (*fused silica*) wurden in den Innendurchmessern 50 und 75 µm bezogen (Polymicro). Vor der erstmaligen Benutzung wurde die Kapillare mit 1 M NaOH konditioniert, anschließend mit Wasser gespült und getrocknet.

3.2.5.2 Kapillarelektrophorese mit UV-Detektion

Für die Messungen mit UV-Detektion wurden je nach Kapillarelektrophoresegerät Kapillaren einer Länge von 60 cm (50 cm bis zum Detektionsfenster, MDQ) bzw. 80 cm (60 cm bis zum Detektionsfenster, ABI) mit einem Innendurchmesser von 50 µm verwendet.

Die Kapillare wurde auf 25 °C thermostatisiert. Abweichende Kapillartemperaturen werden im Elektropherogramm angegeben. Die Detektion mittels UV-Absorption erfolgte bei 200 nm (ABI) bzw. bei 200 und 280 nm (MDQ). Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, betrug die Trennungsspannung 30 kV. Die Injektion erfolgte hydrodynamisch mittels Vakuum (5" Hg-Säule = 2,45 psi = 16,9 kPa, ABI) oder Druck (0,5 psi = 3,44 kPa, MDQ). Standardmäßig wurde eine Injektionszeit von 3 s (ABI) bzw. 10 s (MDQ) gewählt. Wenn nicht anders ausgeführt, kam als Hintergrundelektrolyt (*background electrolyte*, BGE) ein alkalischer Phosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) zum Einsatz. Für das MDQ-Gerät wurden Steuerung und Datenaufnahme mittels P/ACE MDQ 2.3 Software (Beckman

Coulter) realisiert. Die Datenaufnahme am ABI-Gerät erfolgte mit Kontron PC Integrator 3.90 Software (Kontron Instruments, Mailand, Italien).

3.2.5.3 Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF)

Die Messungen mit LIF-Detektion wurden mit Kapillaren mit einer Länge von 77 cm (70 cm bis zum Detektionsfenster) und einem Innendurchmesser von 75 μm durchgeführt. Die Kapillare wurde auf 25 °C thermostatisiert. Die Detektion erfolgte durch Messung der Fluoreszenzemission bei 520 ± 10 nm, die nach Anregung durch einen Argon-Ionenlaser bei 488 nm ausgelöst wurde. Per Software wurde ein elektronischer Verstärkungsfaktor "Gain = 100" eingestellt. Die Trennungsspannung betrug 25 kV. Die Injektion erfolgte hydrodynamisch mittels Druck (0,5 psi = 3,44 Pa) für 10 s. Soweit nicht anders ausgeführt, kam als BGE ein alkalischer Boratpuffer (100 mM, pH 8,5) mit 30 mM SDS zum Einsatz. Gerätesteuerung und Datenaufnahme erfolgten mit P/ACE 3.0 Software (Beckman Coulter).

3.2.5.4 Affinitätskapillarelektrophorese

Die ACE-Analysen wurden nach zwei unterschiedlichen Verfahren durchgeführt. Bei Interaktionsanalysen, die durch Mobilitätsverschiebung (*mobility-shift*, siehe 1.2.3.2) charakterisiert wurden, erfolgte die Zuführung des Liganden durch Zugabe zum BGE. In diesem Fall wurde eine Stammlösung des Liganden in BGE hergestellt und nachfolgend entsprechend der erforderlichen Endkonzentration verdünnt. Der andere Interaktionspartner (Protein) wurde als Probe, verdünnt in BGE, injiziert. Die Änderung der Mobilität des Proteins unter dem Einfluß der unterschiedlichen Ligandenkonzentration im BGE wurde durch Berechnung der elektrophoretischen Mobilität μ_{ep} erfaßt.

Gleichung 13

$$\mu_{\text{ep}} = \frac{l_{\text{D}} \cdot l_{\text{E}}}{U} \cdot \frac{1}{t_{\text{M}} - t_{\text{EOF}}}$$

μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität des Analyten
 l_{D} : Kapillarlänge bis zum Detektor
 l_{E} : Gesamtkapillarlänge

U : Trennungsspannung
 t_{M} : Migrationszeit des Analyten
 t_{EOF} : Migrationszeit des EOF-Markers

Unspezifische Einflüsse durch Veränderung der Eigenschaften des BGE (Ligandenzusatz) wurden durch Verwendung interner Standards (Dimethylsulfoxid (DMSO) als Marker für den EOF, $_{AC-AA}$ als Peptid ohne Affinität zum Liganden) berücksichtigt und korrigiert.

Die so errechneten Mobilitäten wurden in einer $\mu_{ep-c}(\text{Ligand})$ -Darstellung aufgetragen und durch nichtlineare Regression unter Verwendung von Gleichung 5 (S. 18) ausgewertet.

Für Interaktionen, deren Analyse durch Präequilibrierung (siehe 1.2.3.1) erfolgte, wurden Proben mit konstanter Konzentration an Analyt und variabler Konzentration an Ligand hergestellt und entsprechend inkubiert. Die Untersuchung mittels CE erfolgte danach durch Injektion dieser Proben und Trennung in einem BGE ohne Ligandenzusatz. Auch in diesem Fall wurde zur Korrektur unspezifischer Änderungen durch Variation des BGE die Berechnung der Mobilität nach Gleichung 13 durchgeführt. Die Auswertung für K_D erfolgte durch nichtlineare Regression der $\mu_{ep-c}(\text{Ligand})$ -Auftragung unter Verwendung von Gleichung 14, die durch Kombination der unter Verwendung des Massenwirkungsgesetzes (Gleichung 2) hergeleiteten Gleichung mit einem Skalierungsfaktor für die Meßgröße G erhalten wurde, mit dessen Hilfe die Änderung der erfaßten Meßgröße infolge der Komplexbildung angepaßt wird.

$$\text{Gleichung 14} \quad G^{\text{obs}} = G^0 + \frac{(G^{\text{max}} - G^0)}{[P]_0} \cdot \left\{ \frac{([P]_0 + [L]_0 + K_D)}{2} - \sqrt{\frac{([P]_0 + [L]_0 + K_D)^2}{4} - ([P]_0 \cdot [L]_0)} \right\}$$

G^0 : Ausgangswert einer gemessenen Größe G (z.B. μ_{ep} oder V_R)
 G^{max} : Maximalwert einer gemessenen Größe G
 G^{obs} : aktueller Wert einer gemessenen Größe G
 $[P]_0$: Ausgangskonzentration des Analyten P
 $[L]_0$: Ausgangskonzentration des Liganden L
 K_D : Dissoziationskonstante des Komplexes PL

3.2.5.5 EMMA

Die elektrophoretisch vermittelte Mikroanalyse wurde zur Analyse der Komplexbildung zwischen Cyclophilin und Cyclosporin-Derivaten durch CE eingesetzt. Die Komplexbildung findet während der elektrophoretischen Trennung statt. Dazu wurden die den Komplex formenden Substanzen in entsprechender Verdünnung einzeln injiziert. Dabei ist die Reihenfolge der Injektion entsprechend der effektiven Mobilität der Moleküle zu beachten. Konkret muß die Substanz mit der geringsten Mobilität zuerst injiziert werden, damit sie von der Substanz mit der größeren Mobilität in der Kapillare überholt

wird, sich die Probezonen mischen und so die gewünschte Komplexbildungsreaktion abläuft.

Alle EMMA-Messungen wurden mit dem ABI-Kapillarelektrophoresegerät durchgeführt (siehe 3.2.5.1). Als BGE kam ein Phosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) zum Einsatz. Folgendes Mehrfachinjektionsregime wurde unter Verwendung von hydrodynamischer Injektion genutzt:

1. 1 s 0,5 mM Ac-AA (interner Migrationszeitstandard, gelöst in BGE),
2. 3 s 6,1 μ M rhCyp18 (verdünnt in BGE),
3. 0,5 s BGE,
4. 5 s CsA-Derivat (variable Konzentration, gelöst in DMSO, verdünnt in BGE).

Die Zwischeninjektion von BGE (3. Injektionsschritt) war erforderlich, um einen direkten Kontakt der Probezonen zu vermeiden.

Nach Injektion aller Komponenten wurde der elektrophoretische Lauf gestartet. Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der Mobilität von rhCyp18 bzw. der Mobilitätsdifferenz zum internen Standard (Gleichung 13). Die Dissoziationskonstante wurde durch nichtlineare Regression der erhaltenen $\mu_{ep-c}(\text{Ligand})$ -Daten unter Verwendung von Gleichung 14 ermittelt.

3.2.6 Analytische Größenausschlußchromatographie

Die analytische Größenausschlußchromatographie wurde am SMART-Chromatographiesystem (Pharmacia) durchgeführt. Die Säule (Superdex 75 PC 3.2/30) wurde mit dem Elutionspuffer PBS equilibriert. Säule und Fraktionssammler wurden auf 10 °C thermostatisiert. Die Probenapplikation erfolgte mit einer 50 μ l-Probenschleife. Die Säule wurde mit einer konstanten Flußrate von 40 μ l/min betrieben. Nach erfolgter Injektion wurde das Eluat in Fraktionen von 40 μ l aufgefangen. Während der gesamten Zeit erfolgte eine Detektion mittels UV-Absorption bei drei Wellenlängen (225, 280, 488 nm). Die Daten des UV-Monitors wurden mit Hilfe der Steuersoftware als Chromatogramm gespeichert. Die gesammelten Fraktionen wurden nachfolgend durch SDS-PAGE- bzw. *western-blot*-Analyse untersucht.

3.2.7 PPIase-Aktivitätstest

Der PPIase-Aktivitätstest wurde in einem proteasefreien System mit geringen Modifikationen nach [JANOWSKI *et al.*, 1997] durchgeführt und sowohl für die Bestimmung der spezifischen Aktivität (k_{cat}/K_m) als auch der Inhibierung (IC_{50}) der rekombinant hergestellten PPIasen verwendet.

Die Geschwindigkeit von enzymkatalysierten Reaktionen läßt sich durch die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung beschreiben (Gleichung 15).

$$\text{Gleichung 15} \quad v = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{[S]_0 + K_m}$$

$[E]_0$: Ausgangskonzentration an Enzym
 $[S]_0$: Ausgangskonzentration an Substrat
 k_{cat} : Katalysekonstante

K_m : MICHAELIS-MENTEN-Konstante
 v : Geschwindigkeit der Reaktion

Unter der Bedingung $[S]_0 \ll K_m$ läßt sich Gleichung 15 unter Verwendung von $v = k \cdot [S]$ umstellen, so daß man k_{cat}/K_m bei definierter Enzymkonzentration unter Einbeziehung der Geschwindigkeitskonstante berechnen kann (Gleichung 16).

$$\text{Gleichung 16} \quad k = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} \cdot [E]_0$$

$[E]_0$: Ausgangskonzentration an Enzym
 k : Geschwindigkeitskonstante der Reaktion

k_{cat} : Katalysekonstante
 K_m : MICHAELIS-MENTEN-Konstante

Im vorliegenden Test wird durch Lösungsmittelsprung das *cis/trans*-Gleichgewicht der Alanyl-Prolylbindung im Tetrapeptidderivat $AC\text{-AAPF-DFA}$ (DFA: 2,4-Difluoroanilid) gestört. Die Neueinstellung des *cis/trans*-Gleichgewichts kann unter Ausnutzung der unterschiedlichen Absorptionseigenschaften der *cis*- und *trans*-Konformere des verwendeten Substrates spektrophotometrisch verfolgt werden. Die erhaltene Progreßkurve wurde nach einer Reaktion erster Ordnung ausgewertet (Abbildung 8). Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} setzt sich aus den Geschwindigkeitskonstanten der enzymkatalysierten Reaktion k_{enz} und der unkatalysierten Reaktion k_u zusammen (Gleichung 17). Darüber hinaus setzt sich k_{obs} additiv aus den Gleichgewichtskonstanten für Hin- und Rückreaktion der Gleichgewichtseinstellung zusammen.

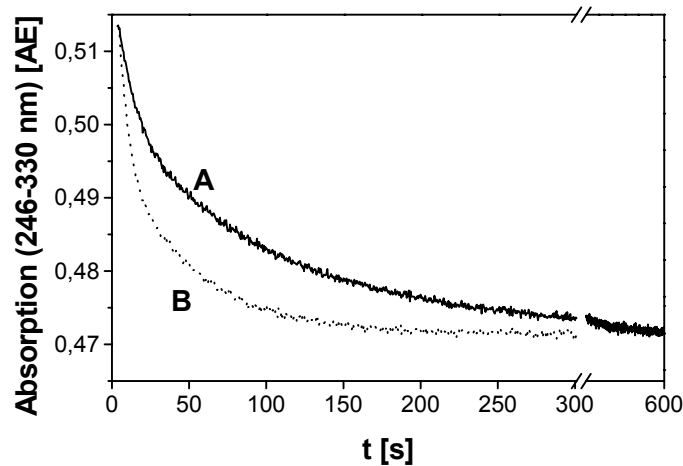


Abbildung 8: Absorptions-Zeit-Verlauf der *cis/trans*-Isomerisierung des Substrates AC-AAPF-DFA in Abwesenheit (A) bzw. in Gegenwart (B) einer PPIase (3,9 nM rDmCyp20).

Gleichung 17 $k_{\text{obs}} = k_u + k_{\text{enz}}$

k_{obs} : beobachtete Geschwindigkeitskonstante

k_u : Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Reaktion

k_{enz} : Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Reaktion

Die Messung der Absorption wurde an einem Diodenarray-Spektrophotometer (Typ 8452A, Agilent) durchgeführt, das mit einer temperierbaren Küvettenhalterung und Magnetrührwerk für den Meßansatz ausgestattet war.

Alle Messungen wurden durch Verfolgung der Absorption bei einer Wellenlänge von 246 nm (Referenz: 330 nm) und einer Temperatur von 10 °C durchgeführt. Die Datenaufnahme erfolgte über einen Zeitraum von 5 bis 10 min. Ein typischer Meßansatz enthielt folgende Komponenten:

1230 µl 35 mM Hepes pH 7,8 (Meßpuffer),

5 µl Rinderserumalbumin (5 mg/ml, gelöst in Wasser),

5 µl Enzym (in variabler Konzentration, gelöst in Meßpuffer).

Die Messung wurde nach Temperierung des Meßansatzes in der Küvette für 10 min durch Zugabe von 1 µl Substrat (40 mg/ml gelöst in Trifluorethanol mit 0,55 M Lithiumchlorid) gestartet, was einer Substratkonzentration von 50 µM im Meßansatz entspricht.

Für die Messung der Inhibierung wurden zusätzlich 10 µl CsA-Lösung (variable Konzentration) zugegeben. Da der Inhibitor CsA in DMSO gelöst vorlag, wurde der

Kontrollwert ohne Inhibitor in Gegenwart von 10 µl DMSO ermittelt. Ein entsprechender Meßansatz enthielt folgende Komponenten:

- 1230 µl 35 mM Hepes pH 7,8 (Meßpuffer),
- 5 µl Rinderserumalbumin (5 mg/ml, gelöst in Wasser),
- 5 µl Enzym (konstante Konzentration, gelöst in Meßpuffer),
- 10 µl CsA (variable Konzentration, gelöst in DMSO).

Der Start der Messung erfolgte ebenfalls durch Zugabe von 1 µl Substrat (40 mg/ml gelöst in Trifluorethanol mit 0,55 M Lithiumchlorid) nach vorangegangener 10minütiger Inkubation des Meßansatzes in der Küvette zur Temperierung und Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes.

Gleichung 18

$$k_{enz}^i = \frac{k_{enz}^0}{1 + \frac{[I]_0}{IC_{50}}}$$

- k_{enz}^i : Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Reaktion in Gegenwart von Inhibitor
- k_{enz}^0 : Ausgangswert der Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Reaktion
- $[I]_0$: Ausgangskonzentration an Inhibitor
- IC_{50} : Inhibitorkonzentration für 50 %ige Hemmung der Enzymaktivität

Die Ermittlung der Inhibitorkonzentration, die eine Hemmung der Enzymaktivität um 50 % verursacht (IC_{50}), wurde nach dem Modell einer reversiblen Inhibierung unter der Bedingung $[S]_0 \ll K_m$ ausgewertet und durch nichtlineare Regression ermittelt (Gleichung 18) [SCHELLENBERGER, 1989].

3.2.8 Bindungsanalysen an ortsaufgelösten Cellulose-gebundenen Oligopeptidbibliotheken

Ortsaufgelöste Cellulose-gebundene Oligopeptidbibliotheken (OPB) wurden wie beschrieben [VOLKMER-ENGERT & SCHNEIDER-MERGENER, 1998] mit Hilfe eines Pipettierroboters Auto-Spot Robot APS 222 (Abimed GmbH, Langenfeld) synthetisiert und freundlicherweise von Herrn Dr. F. Bordusa (MPG Halle) zur Verfügung gestellt.

Bei den verwendeten Bibliotheken handelt es sich um sogenannte "13,3-scans". Das bedeutet, daß die Sequenz des zu untersuchenden Proteins in Form von 13mer-Peptiden synthetisiert wurde, die, beginnend am N-Terminus, jeweils um 3 Aminosäuren versetzt schrittweise die Sequenz des Proteins beschreiben (Abbildung 9).

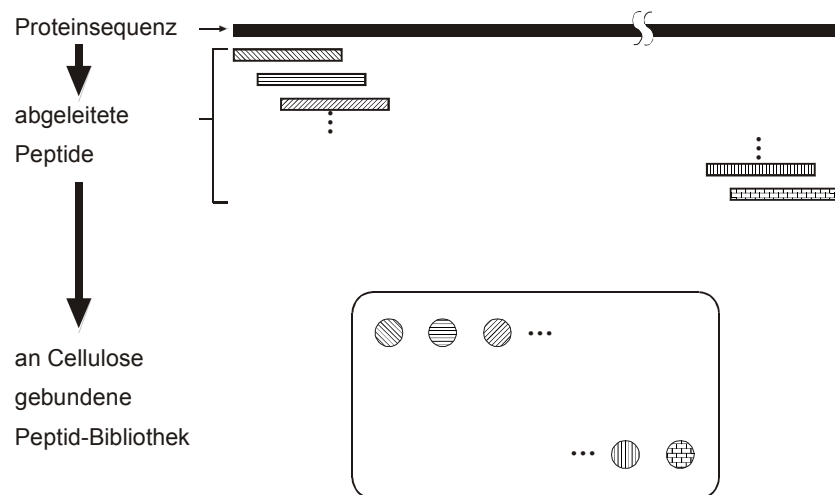


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Herstellung einer orts aufgelösten Cellulose-gebundenen Oligopeptidbibliothek zur Beschreibung einer Proteinsequenz.

Das Protein wird somit in Form sich um jeweils 10 Aminosäuren überlappender Peptidsequenzen, die in Spot-Form kovalent gebunden an einem Cellulose-träger vorliegen, synthetisiert. Die Peptide werden über β -Alanin mit dem Cellulose-träger verknüpft und liegen C-terminal amidiert vor.

Zur Vorbereitung der Bindungsstudien wurde die Cellulosemembran 30 min mit Methanol bei 22 °C gewaschen. Nachfolgend wurde die Membran mit 8 M Guanidiniumhydrochlorid (gelöst in 1 M Tris pH 7,5) für 1 h behandelt. Alle nachfolgenden Arbeiten wurden bei 4 °C auf einem Kippschüttler durchgeführt. Die Guanidiniumhydrochlorid-Lösung wurde mit MP-Puffer sukzessive verdünnt, so daß eine Endkonzentration an Guanidiniumhydrochlorid von 4; 2; 1; 0,5 bzw. 0,25 M vorlag. Die Membran wurde in jeder verdünnten Lösung für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 30 min mit MP-Puffer gewaschen.

Für die Bindungsstudien wurde die Membran mit dem potentiellen Liganden rDmCyp20-GFP (1,5 mg/ml, verdünnt in MP-Puffer) für 15 h bei 4 °C inkubiert (Kippschüttler).

Die Detektion des gebundenen Proteinliganden erfolgte durch direkte Messung der Fluoreszenz des GFP-Fusionsproteins auf der Membran mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners (Fuji FLA-3000, $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) nach Waschschritten mit MP-Puffer. Zur Beurteilung der Bindung anhand der Fluoreszenzintensität wurde das erhaltene Bild mit dem Zustand vor der Inkubation verglichen.

Zur Regeneration wurde die Membran mit 8 M Guanidiniumhydrochlorid (gelöst in 1 M Tris pH 7,5) 1 h gewaschen. Nach erfolgter fünfmaliger Verdünnung mit MP-Puffer wurde die Membran entweder nach dreimaligem Waschen mit MP-Puffer direkt für weitere Bindungsstudien eingesetzt oder nach dreimaligem Waschen mit PBS bei 4 °C gelagert. Die Membranen wurden bis zu viermal wiederverwendet.

3.2.9 Titrationskalorimetrie

Der Einsatz der isothermischen Titrationskalorimetrie (ITC) für die Interaktionsanalyse beruht auf der Titration des Proteins mit dem Liganden unter Erfassung der freiwerdenden Bindungswärme. Mit Hilfe der molaren Verhältnisse von Analyt und Ligand kann daraus eine Bindungskurve ermittelt und die thermodynamischen Konstanten der Bindungsreaktion berechnet werden [WISEMAN *et al.*, 1989].

Die Messungen wurden an einem Mikrokalorimeter VP-ITC (MicroCal, Northampton, MA, USA) durchgeführt.

Das Protein rDmCyp20 wurde mittels Centricon-Zentrifugenfiltern (Millipore, Eschborn) mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa auf die erforderliche Konzentration von > 300 µM aufkonzentriert (2 ml). Der Ligand $_{AC-NPPKPMRPLYWTR-NH_2}$ wurde nach Einwaage für eine > 5 mM Lösung in 50 mM Phosphat pH 8,0 gelöst (750 µl). Sowohl die Protein- als auch die Peptidlösung wurden gegen 50 mM Phosphat pH 8,0 dialysiert (dreimal je 2 l, > 6 h, 4 °C). Nach der Dialyse wurden die Konzentrationen der Lösungen spektroskopisch bestimmt (siehe 3.2.2.4). Die Lösung von rDmCyp20 (445 µM) wurde in der Kalorimeterzelle vorgelegt und bei 25 °C durch schrittweise Zugabe der Peptidlösung (je Injektionsschritt 5 µl 13,5 mM $_{AC-NPPKPMRPLYWTR-NH_2}$) titriert. Die erhaltene Titrationskurve wurde durch Anpassung eines Einseitenbindungsmodells unter Verwendung nichtlinearer Regression (Origin 5.0, MicroCal) ausgewertet.

Die Interaktionsanalyse mittels ITC wurde freundlicherweise von Herrn J. Fanghänel durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Reinigung und Charakterisierung verwendeter Proteine

4.1.1 *rDmCyp20-GFP*

Cyclophilin 20 (Cyp20) aus *D. melanogaster* wurde als ein Modellprotein für die CE-Untersuchungen auf Grund einiger Besonderheiten ausgewählt. Cyp20 ist das bisher einzige bekannte Cyclophilin, das entwicklungspezifisch exprimiert wird [REIBMANN, 2001]. Um eine selektive Detektion von rDmCyp20 auch in komplexen Proteingemischen zu gewährleisten, wurde ein Fusionsprotein mit GFP (rDmCyp20-GFP) eingesetzt, das auf Grund der möglichen Anwendung von CE-LIF zusätzlich eine Verringerung der Detektionsgrenze ermöglicht.

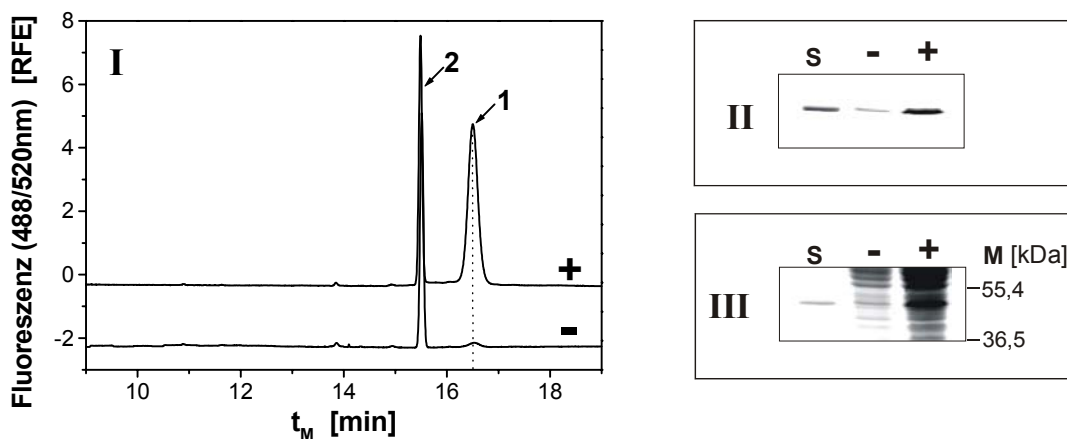


Abbildung 10: Nachweis der Expression von rDmCyp20-GFP (1) in *E. coli* vor (-) bzw. nach (+) der Induktion der Proteinüberexpression mit 1 mM IPTG durch CE-LIF (I) und SDS-PAGE mit Fluoreszenzdetektion (II) bzw. Coomassie-Färbung (III). Für die CE-LIF-Messungen wurde das *E. coli*-Zell-Lysat 1:40 mit PBS verdünnt eingesetzt. Fluorescein (2, 10 nM) diente als interner Standard. Mit Hilfe eines rDmCyp20-GFP-Standards (S) konnte das Fusionsprotein in der SDS-PAGE identifiziert werden. Der molekulare Massestandard (M) diente zur Abschätzung einer molekularen Masse von 47 kDa.

Die Kultivierung des rDmCyp20-GFP-überexprimierenden *E. coli*-Stammes war unter Standardbedingungen nicht möglich, da das Fusionsprotein nahezu vollständig proteolytisch abgebaut wurde. Durch Absenkung der Inkubationstemperatur auf 25 °C und die Verwendung von TB-Medium konnte eine starke Überexpression bei gleichzeitiger Unterdrückung der Proteolyse von rDmCyp20-GFP erreicht werden.

Die Expression des Fusionsproteins konnte durch Fluoreszenzdetektion der GFP-Fusion bereits im Zell-Lysat der zur Überexpression von rDmCyp20-GFP induzierten *E. coli* Zellen selektiv nachgewiesen werden (Abbildung 10).

Rekombinantes DmCyp20-GFP konnte standardmäßig aus 30 g *E. coli*-Zellen (Naßgewicht) durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung angereichert werden. Fremdproteine wurden vom löslichen rDmCyp20-GFP durch hydrophobe Interaktionschromatographie und Anionenaustauschchromatographie abgetrennt. Mit dieser Reinigungsstrategie wurde das Fusionsprotein in einer Reinheit $\geq 95\%$ (nach SDS-PAGE) erhalten. Die Homogenität des gereinigten Endprodukts wurde durch CE, HPLC und SDS-PAGE analysiert (Abbildung 11).

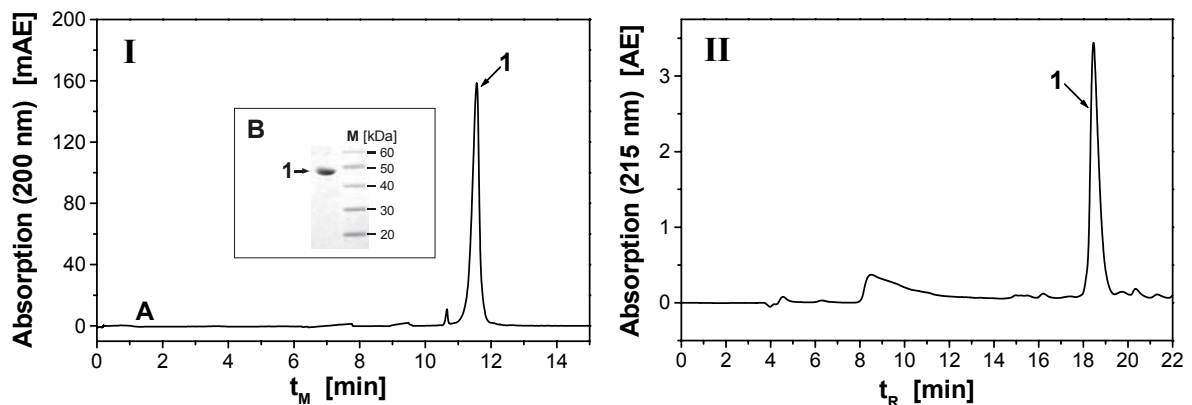


Abbildung 11: Prüfung der Homogenität des gereinigten Proteins rDmCyp20-GFP mittels CE (I-A), SDS-PAGE (I-B) und HPLC (II). rDmCyp20-GFP (1) wurde mit einer Reinheit von $\geq 95\%$ (nach SDS-PAGE) erhalten. Mit Hilfe des molekularen Massestandards (M) konnte durch SDS-PAGE (4 bis 12 %, Coomassie-Färbung) eine molekulare Masse von 47 kDa ermittelt werden. Für die CE-Messungen (ABI) wurde 100 mM Citrat pH 2,5 als BGE eingesetzt.

Die in der SDS-PAGE abgeschätzte molekulare Masse von ca. 47 kDa entspricht dem theoretischen Wert von 47478 Da, der mit Hilfe der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz errechnet wurde (Abbildung 10-III bzw. Abbildung 11-I B).

Eine weitere Charakterisierung erfolgte durch N-terminale Sequenzanalyse und ESI-Massenspektrometrie. Durch EDMAN-Sequenzierung wurde die Identität der ersten neun N-terminalen Aminosäuren $ASDDSLGPL$ des gereinigten rDmCyp20-GFP mit der erwarteten Aminosäuresequenz, die von der DNA-Sequenz abgeleitet wurde, nachgewiesen. Durch ESI-Massenspektrometrie wurde eine molekulare Masse von 47634 Da bestimmt, die mit der theoretisch berechneten molekularen Masse von 47478 Da korreliert. Eine mögliche Ursache der beobachteten Massendifferenz von 159 Da ist die teilweise N-terminale

Erweiterung durch Formylmethionin (156 Da) [SOLBIATI *et al.*, 1999], die nur durch Massenspektrometrie auf Grund der N-terminalen Blockierung, aber nicht durch EDMAN-Abbau erfaßt werden konnte.

Abschließend wurden die enzymatischen Eigenschaften von rDmCyp20-GFP als PPIase analysiert. Auf Grund der proteolytischen Instabilität von DmCyp20 als Fusionsprotein kam ein proteasefreier PPIase-Aktivitätstest (siehe 3.2.7) zur Bestimmung des charakteristischen Parameters k_{cat}/K_m und des IC_{50} -Wertes für den Inhibitor CsA zum Einsatz (Abbildung 12).

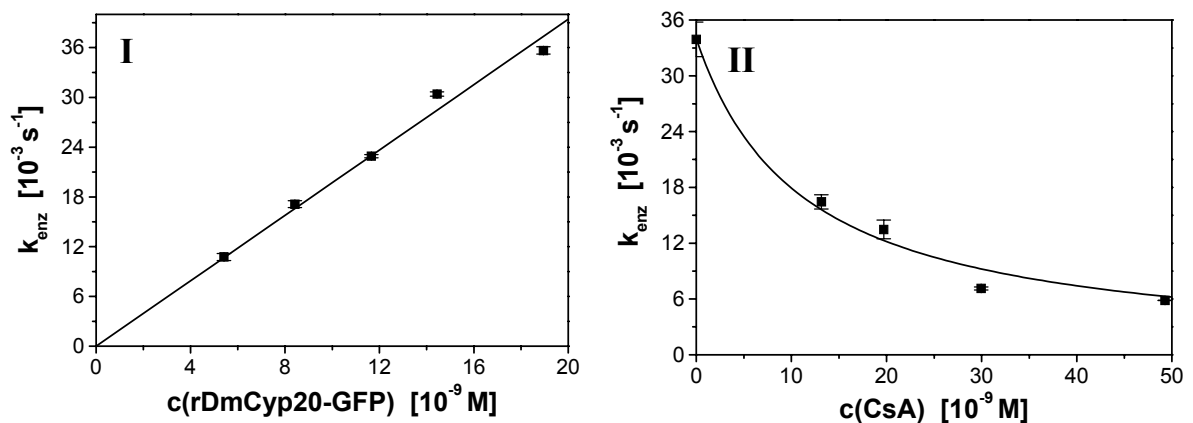


Abbildung 12: Bestimmung der enzymkinetischen Parameter k_{cat}/K_m (I) bzw. IC_{50}^{CsA} (II) der PPIase rDmCyp20-GFP mittels proteasefreiem PPIase-Aktivitätstest unter Verwendung von $_{\text{AC}}\text{-AAPF-DEFA}$ als Substrat. Für rDmCyp20-GFP konnte ein Wert für k_{cat}/K_m von $(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ unter Verwendung von linearer Regression (Gleichung 16) ermittelt werden. In Gegenwart von 18,5 nM rDmCyp20-GFP im Meßansatz wurde ein IC_{50} -Wert für den Inhibitor CsA von $(11,1 \pm 1) \cdot 10^{-9} \text{ M}$ durch nichtlineare Regression (Gleichung 18) erhalten. Die Datenpunkte stellen jeweils die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung dar.

Mit Hilfe des proteasefreien PPIase-Aktivitätstests (Substrat: $_{\text{AC}}\text{-AAPF-DEFA}$) konnte für rDmCyp20-GFP ein k_{cat}/K_m -Wert von $(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sowie ein IC_{50} -Wert von $(11,1 \pm 1) \cdot 10^{-9} \text{ M}$ für den Inhibitor CsA ermittelt werden.

4.1.2 rDmCyp20

Die molekularbiologisch generierten Fusionsproteine weisen oft ein verändertes enzymatisches Verhalten gegenüber den nicht fusionierten Proteinen auf (G. Fischer, persönliche Mitteilung, [ZARNT, 1997]). Als notwendiges Referenzprotein wurde daher rDmCyp20 kloniert [REIBMANN, 2001] und gereinigt.

Die Reinigungsstrategie für rDmCyp20 wurde in Anlehnung an das in 4.1.1 vorgestellte Verfahren entwickelt. Auch für dieses Protein wurde eine Kombination von fraktionierter Proteinfällung mit chromatographischen Trennmethode verwendet. Die hydrophobe Interaktionschromatographie, gefolgt von Anionenaustauschchromatographie, wurde durch eine finale Kationenaustauschchromatographie ergänzt (siehe 3.2.1). Diese Erweiterung war erforderlich, um rDmCyp20 im geforderten Reinheitsgrad, der benötigten Proteinkonzentration und der gewünschten Pufferzusammensetzung zu erhalten.

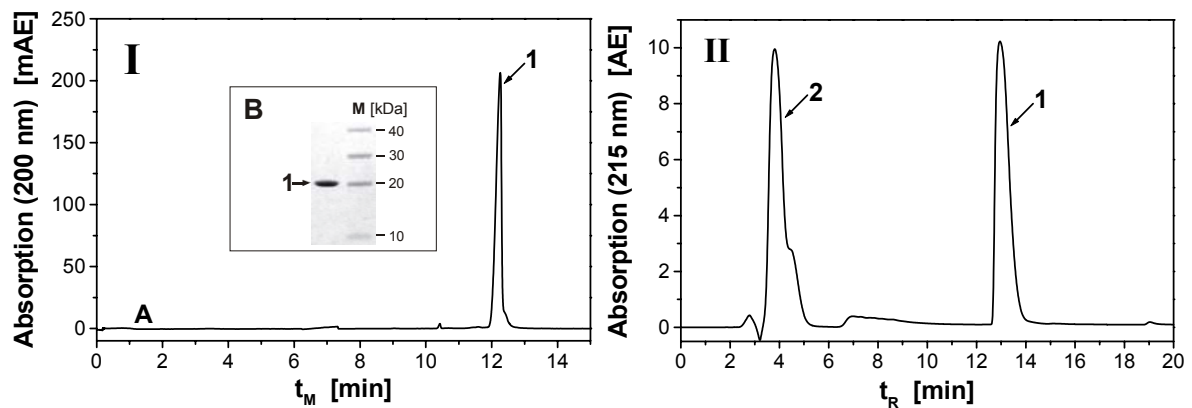


Abbildung 13: Prüfung der Homogenität des gereinigten Proteins rDmCyp20 mittels CE (I-A), SDS-PAGE (I-B) und HPLC (II). rDmCyp20 (1) wurde mit einer Reinheit von $\geq 95\%$ nach SDS-PAGE erhalten. Mit Hilfe des molekularen Massestandards (M) konnte durch SDS-PAGE (4 bis 12 %, *Coomassie*-Färbung) eine molekulare Masse von 20 kDa ermittelt werden. Für die CE-Messungen (ABI) wurde 100 mM Citrat pH 2,5 als BGE eingesetzt. Für die HPLC-Analyse wurde die Proteinprobe mit 1 mM DTT (2) bei 22 °C reduziert (20 min).

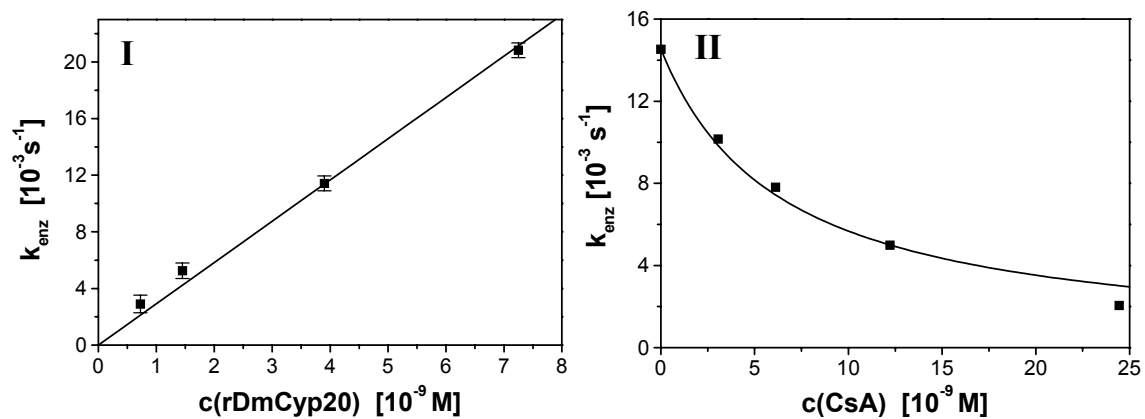


Abbildung 14: Bestimmung der enzymkinetischen Parameter k_{cat}/K_m (I) bzw. IC_{50}^{CsA} (II) der PPIase rDmCyp20 mittels proteasefreiem PPIase-Aktivitätstest unter Verwendung von $AC-AAPF-DEFA$ als Substrat. Für rDmCyp20 konnte ein Wert für k_{cat}/K_m von $(2,9 \pm 0,1) \cdot 10^6 M^{-1} s^{-1}$ unter Verwendung von linearer Regression (Gleichung 16) ermittelt werden. In Gegenwart von 3,9 nM rDmCyp20 im Meßansatz wurde ein IC_{50} -Wert für den Inhibitor CsA von $(6,4 \pm 0,6) \cdot 10^{-9} M$ durch nichtlineare Regression (Gleichung 18) erhalten. Die Datenpunkte (I) stellen jeweils die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung dar.

Im Rahmen der analytischen Charakterisierung des gereinigten Proteins durch CE, HPLC und SDS-PAGE (Abbildung 13) wurde eine molekulare Masse von 20 kDa ermittelt (Abbildung 13-I B).

Eine weitere Charakterisierung erfolgte durch N-terminale Sequenzanalyse und ESI-Massenspektrometrie. Durch EDMAN-Sequenzierung wurde die Identität der ersten fünf N-terminalen Aminosäuren $ASDDS$ des gereinigten rDmCyp20-GFP mit der erwarteten Aminosäuresequenz, die von der DNA-Sequenz abgeleitet wurde, nachgewiesen. Durch ESI-Massenspektrometrie wurde eine molekulare Masse von 20414 Da bestimmt, die mit der theoretisch berechneten molekularen Masse von 20412 Da im Rahmen der erwarteten Fehlergrenzen übereinstimmt.

Die Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der PPIase rDmCyp20 erfolgte wie schon für rDmCyp20-GFP in einem proteasefreien Testsystem. Dadurch wurde die proteolytische Spaltung des Enzyms im Test ausgeschlossen und ein direkter Vergleich der ermittelten Parameter gewährleistet. Für rDmCyp20 wurde ein k_{cat}/K_m -Wert von $(2,9 \pm 0,1) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und ein IC_{50} -Wert von $(6,4 \pm 0,6) \cdot 10^{-9} \text{ M}$ im proteasefreien PPIase-Aktivitätstest (Substrat: AC -AAPF-DFA) bestimmt.

4.1.3 rGFP

Um unspezifische, durch den GFP-Teil im Fusionsprotein rDmCyp20-GFP bedingte Effekte auszuschließen, wurde GFP für Kontrollexperimente benötigt.

Um sicherzustellen, daß für die Kontrollexperimente absolut vergleichbares GFP zur Anwendung kam, sollte das rGFP durch proteolytische Spaltung von rDmCyp20-GFP gewonnen werden. Aus ökonomischen Gründen wurden nur teilgereinigte Fraktionen der rDmCyp20-GFP-Präparation für die proteolytische Spaltung verwendet.

Die aus der Literatur bekannte extreme Stabilität von GFP gegenüber Proteasen [CHALFIE & KAIN, 1998] konnte in Vorexperimenten bestätigt werden. Unter Verwendung von 5 μM Trypsin bei 22 °C wurde von ca. 50 μM Fusionsprotein nach 20 min selektiv der Cyclophilin-Anteil abgebaut (Abbildung 15).

Die Fluoreszenzeigenschaften von GFP sind an die korrekt gefaltete Struktur des Proteins und eine unveränderte Primärsequenz gebunden [CHALFIE & KAIN, 1998]. Daher wurden die Proben nach dem proteolytischen Verdau unter nicht reduzierenden Bedingungen getrennt und mittels Fluoreszenzdetektion visualisiert.

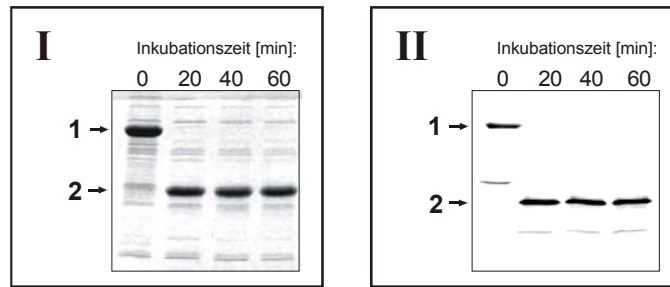


Abbildung 15: Zeitliche Verfolgung des proteolytischen Abbaus von rDmCyp20-GFP (1) zu rGFP (2) durch Trypsin bei 22 °C mittels SDS-PAGE (12,5 %) und Detektion durch *Coomassie*-Färbung (I) und Fluoreszenz (II).

Der Nachweis von fluoreszierenden Proteinen im Bereich einer molekularen Masse von 27 kDa ist ein erster Hinweis auf intaktes rGFP (Abbildung 15-II). Die proteolytische Spaltung wurde durch Zugabe von PMSF gestoppt. Mit Hilfe einer einstufigen Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie konnte rGFP in einer Reinheit $\geq 95\%$ (nach SDS-PAGE) erhalten werden.

Die abschließende Analyse mittels CE, HPLC und SDS-PAGE ergab eine geschätzte molekulare Masse von 27 kDa (Abbildung 16 I-B).

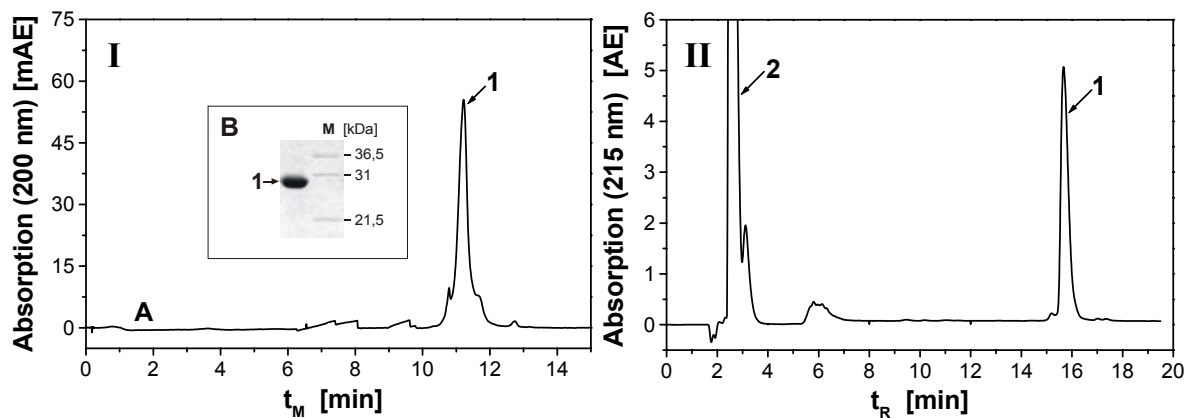


Abbildung 16: Prüfung der Homogenität des gereinigten Proteins rGFP mittels CE (I-A), SDS-PAGE (I-B) und HPLC (II). rGFP (1) wurde mit einer Reinheit von $\geq 95\%$ nach SDS-PAGE erhalten. Mit Hilfe des molekularen Massestandards (M) konnte durch SDS-PAGE (12,5 %, *Coomassie*-Färbung) eine molekulare Masse von 27 kDa ermittelt werden. Für die CE-Messungen (ABI) wurde 100 mM Citrat pH 2,5 als BGE eingesetzt. Für die HPLC-Analyse wurde die Proteinprobe mit 1 mM DTT (2) bei 22 °C reduziert (20 min).

Eine weitere Charakterisierung erfolgte durch N-terminale Sequenzanalyse und ESI-Massenspektrometrie. Durch EDMAN-Sequenzierung wurden die Identität der ersten fünf N-terminalen Aminosäuren MVSLG des gereinigten rDmCyp20-GFP mit der erwarteten Aminosäuresequenz, die von der DNA-Sequenz abgeleitet wurde, nachgewiesen. Durch

ESI-Massenspektrometrie wurde eine molekulare Masse von 26922 Da bestimmt, die mit der theoretisch berechneten molekularen Masse von 26813 Da korreliert.

4.2 Kapillarelektrophoretische Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Cyclophilinen

4.2.1 Nachweis der Bindung zwischen rhCyp18 und CsA mittels ACE

Zunächst war die prinzipielle Frage zu klären, ob man mit Hilfe der ACE Interaktionen zwischen Cyclophilinen und Liganden untersuchen kann. Als Modellsystem wurde daher die bekannte Wechselwirkung zwischen rhCyp18 und CsA für grundlegende Untersuchungen zur Eignung der ACE gewählt. Für die Bindung von CsA an verschiedene Cyclophiline wurden bisher Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-9} M bestimmt [FISCHER, 1994].

Voraussetzung für ACE-Bindungsstudien ist die Etablierung einer CE-Methode für den zu untersuchenden Analyten rhCyp18. Die Optimierung der Trennparameter muß einerseits hinsichtlich bester Trennergebnisse und andererseits ohne Beeinflussung der Analyt-Ligand-Interaktion erfolgen.

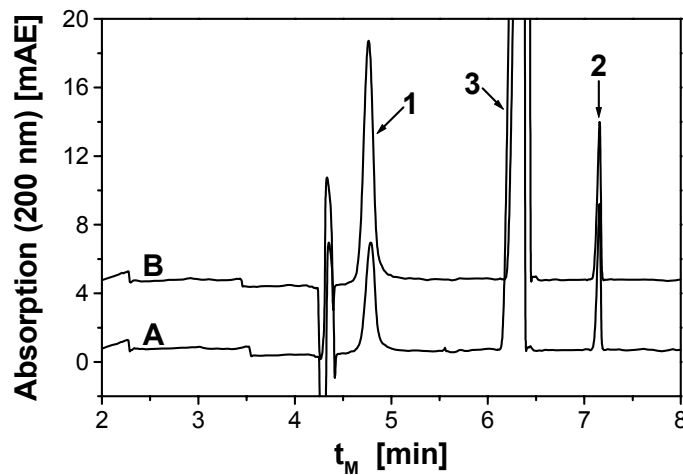


Abbildung 17: CE-Analyse von rhCyp18 in 50 mM Phosphat pH 8,0. Verschiedene Konzentrationen (3 μ M, A; 6,1 μ M, B) an rhCyp18 (1) wurden durch Verdünnung einer Stammlösung (10 mg/ml) mit 10 mM HEPES pH 7,5 (3) hergestellt und mittels CE (ABI) analysiert. Als interner Standard kam AC-AA (200 μ M, 2) zum Einsatz.

Nach Variation von Puffersubstanzen, pH-Wert und Salzkonzentrationen konnte ein Phosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) als geeignetes Trennsystem für die Detektion der

rhCyp18-Interaktion ausgewählt werden (Abbildung 17). Andere Puffer im Bereich von $\text{pH} = 7 \pm 1$ (Mes, Hepes, Tris) konnten auf Grund der breiten Peakform, schlechten Reproduzierbarkeit und schwierigen Identifizierung des Proteinsignals im Elektropherogramm nicht verwendet werden.

Zusätzlich störte die starke Absorption ($\lambda = 200 \text{ nm}$) der organischen Puffer die UV-Detektion, was zu einer Verringerung der Empfindlichkeit führte. Der Einsatz von Boratpuffern, vielfach verwendete Puffersysteme in der CE, war auf Grund von schlechter Reproduzierbarkeit der Signalintensität von rhCyp18 und potentieller komplexierender Eigenschaften nicht möglich [SCHWARTZ & PRITCHET, 1994].

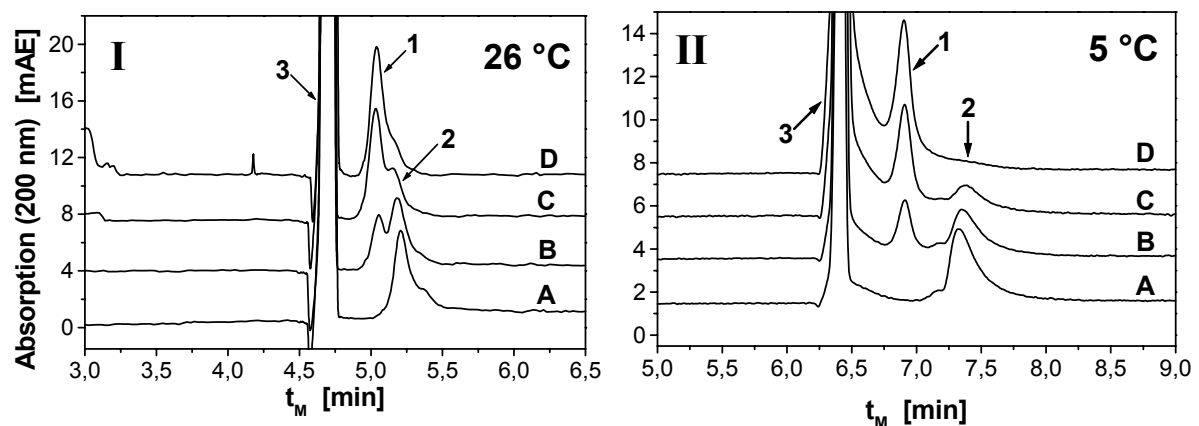


Abbildung 18: Analyse der Komplexbildung zwischen rhCyp18 und CsA mittels CE bei verschiedenen Kapillartemperaturen. Proben mit konstanter rhCyp18-Konzentration ($6,1 \mu\text{M}$) und ansteigender CsA-Konzentration ($0 \mu\text{M}$, A; $2 \mu\text{M}$, B; $4 \mu\text{M}$, C; $7 \mu\text{M}$, D) wurden inkubiert (30 min , $22 \text{ }^\circ\text{C}$) und anschließend mittels CE (ABI, I; MDQ, II) untersucht, um den Einfluß der Kapillartemperatur auf die Auflösung der Signale von rhCyp18 (2) und [rhCyp18-CsA] (1) zu untersuchen. CsA wurde in DMSO (3) gelöst und auf die entsprechende Konzentration mit 10 mM Hepes $\text{pH} 7,5$ verdünnt.

Die Dissoziationskonstante zwischen rhCyp18 und CsA liegt im Bereich von 10^{-9} M [FISCHER, 1994], d.h., der rhCyp18-CsA-Komplex sollte unter den Trennbedingungen stabil sein und konnte deshalb mittels *equilibrium-mixture*-Analyse untersucht werden. Erschwert wurde die *mobility-shift*-Analyse durch die schlechte Wasserlöslichkeit von CsA. Daher wurden Proben mit einer konstanten Konzentration an rhCyp18 und einer variablen Konzentration an CsA hergestellt und für 30 min bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, wofür eine CsA-Stammlösung in DMSO verwendet wurde. Danach erfolgte eine Untersuchung der Proben mittels CE.

Wie in Abbildung 18 dargestellt ist, verringerte sich nach Zusatz von CsA das Signal für rhCyp18 kontinuierlich, wobei gleichzeitig ein neues, ansteigendes Signal auftrat

(Abbildung 18 A bis D). Auf Grund des konzentrationsabhängigen Übergangs konnte das neue Signal als Signal des rhCyp18-CsA-Komplexes zugeordnet werden. Dies wurde zusätzlich von der Tatsache gestützt, daß die Position des Komplexes im Elektropherogramm zwischen denen von CsA und rhCyp18 angeordnet war. Als neutrales Molekül migriert CsA mit dem EOF und ist somit vom Lösungsmittel DMSO unter diesen Trennbedingungen nicht zu unterscheiden. Unter identischen Bedingungen konnte mit einem nichtbindenden Cyclosporin-Derivat CsH [HANDSCHUMACHER *et al.*, 1984] kein entsprechender Signalübergang beobachtet werden (Abbildung 19).

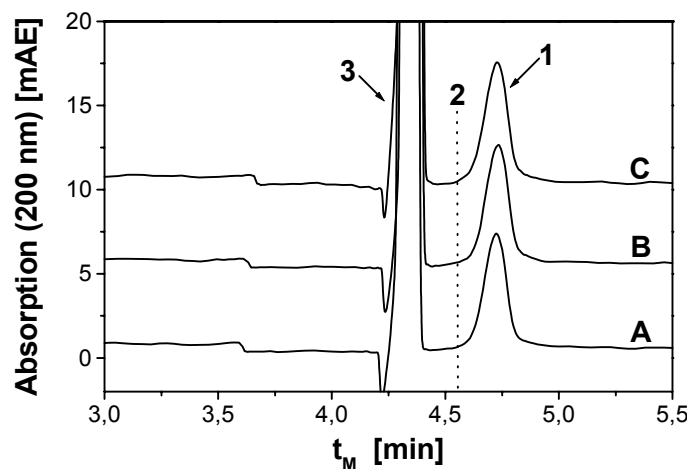


Abbildung 19: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen rhCyp18 (1) und CsH. Im Gegensatz zu CsA konnte nach Inkubation (30 min, 22 °C) von rhCyp18 (2,7 µM) mit ansteigenden Konzentrationen (0 µM, A; 1,5 µM, B; 3 µM C) des nichtbindenden Cyclosporin-Derivats CsH durch nachfolgende CE-Analyse (ABI) kein Komplexsignal detektiert werden. Die Position des im Fall einer Interaktion erwarteten Komplexes wurde mit (2) markiert. CsH wurde in DMSO (3) gelöst und auf die entsprechende Konzentration mit 10 mM Hepes pH 7,5 verdünnt.

In Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) dissoziieren die meisten Protein-Ligand-Komplexe auf Grund der denaturierenden Eigenschaften von SDS. Um die Detektion der rhCyp18-CsA-Komplexbildung durch weitere Experimente abzusichern, wurden daher MEKC-Bedingungen mit einer SDS-Konzentration von 30 mM SDS im BGE gewählt. Unter dieser Voraussetzung wurde keine Detektion eines Signals für den rhCyp18-CsA-Komplex erwartet. Wie man Abbildung 20 entnehmen kann, wurde neben dem ansteigenden Signal für CsA ein konstantes Signal für rhCyp18 beobachtet, d.h., der durch Inkubation von rhCyp18 und CsA gebildete Komplex war während der elektrophoretischen Bewegung im Puffersystem wieder zerfallen.

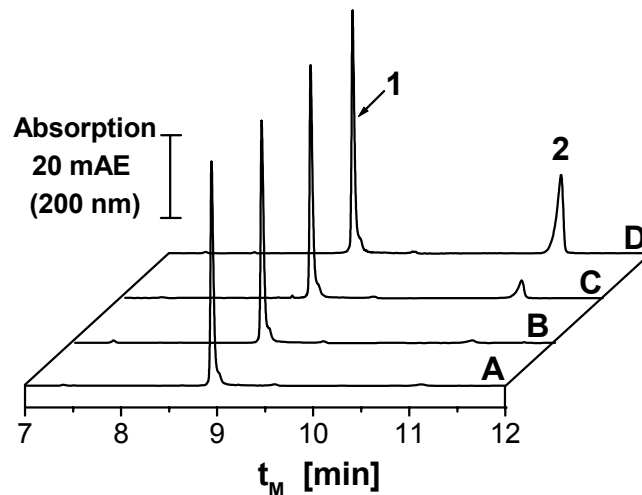


Abbildung 20: Analyse der Komplexbildung zwischen rhCyp18 und CsA mittels CE unter MEKC-Bedingungen. Proben konstanter Konzentration ($6,1 \mu\text{M}$) an rhCyp18 (**1**) wurden mit steigenden Konzentrationen ($0 \mu\text{M}$, **A**; $3 \mu\text{M}$, **B**; $7,5 \mu\text{M}$, **C**; $25 \mu\text{M}$, **D**) an CsA (**2**) inkubiert und danach mittels CE (ABI) in einem SDS-haltigen Puffer ($0,1 \text{ M}$ Borat pH $8,5$ + 30 mM SDS) getrennt. Anstelle eines Komplexsignals werden distinkte Signale für rhCyp18 und CsA detektiert.

Abbildung 18-I kann man entnehmen, daß für Komplex und freies Protein keine vollständige Trennung der Signale vorliegt. Durch Absenkung der Kapillartemperatur gelang es, die Auflösung erheblich zu verbessern (Abbildung 18-II), was für die quantitative Auswertung vorteilhaft ist. Außerdem läßt das Fehlen einer Übergangszone zwischen beiden Signalen den Schluß zu, daß der rhCyp18-CsA-Komplex während der Trennung nicht dissoziiert.

Um die Leistungsfähigkeit des etablierten Testsystems zu prüfen, wurde die Interaktion von rhCyp18 mit CsA-Derivaten analysiert, deren Affinität durch chemische Modifikation verändert war (biotinyliertes CsA, $[\text{O}-(\text{Biotin-NH}(\text{CH}_2)_5\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{-})\text{D-Serin}]^8\text{-CsA}$; phosphoryliertes CsA, $[\text{O-phosphoryl MeBmt}]^1\text{-CsA}$) [ZHANG, 2001].

Beim Vergleich der Abbildungen 18-I und 21-1 wird deutlich, daß die Komplexbildung zwischen rhCyp18 und $[\text{O}-(\text{Biotin-NH}(\text{CH}_2)_5\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{-})\text{D-Serin}]^8\text{-CsA}$ scheinbar eine größere Dissoziationskonstante als mit unmodifiziertem CsA hat. Während für CsA beim Einsatz equimolarer Mengen nur noch das rh-Cyp18-CsA-Signal detektierbar war (Abbildung 18-I D), war im identischen Fall für $[\text{O}-(\text{Biotin-NH}(\text{CH}_2)_5\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{-})\text{D-Serin}]^8\text{-CsA}$, auf Grund der unvollständigen Komplexbildung, noch etwa 50 % freies rhCyp18 detektierbar (Abbildung 21-I B).

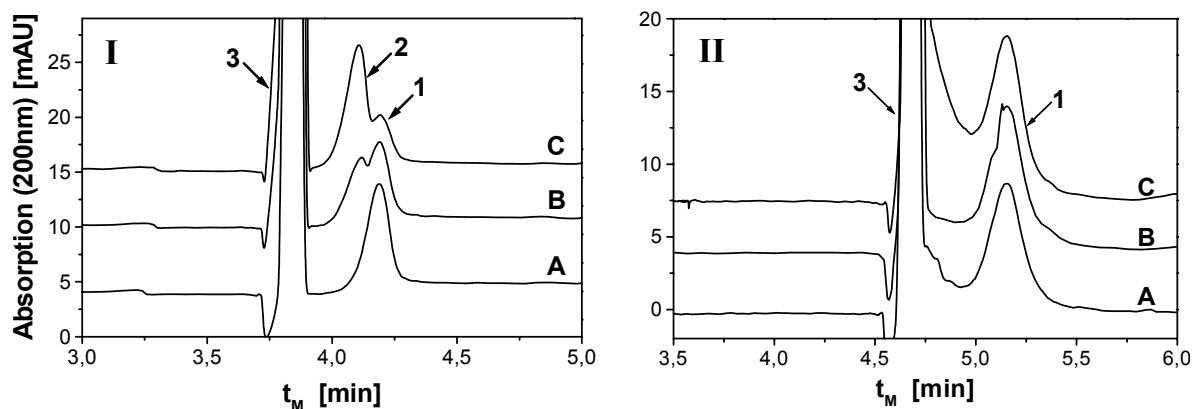


Abbildung 21: Analyse der Komplexbildung zwischen rhCyp18 und CsA-Derivaten mittels CE. Proben konstanter Konzentration (6,1 μM) an rhCyp18 (**1**) wurden mit steigenden Konzentrationen (0 μM , **A**; 6 μM , **B**; 10 μM , **C**) an biotinyliertem CsA (**I**, [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA) bzw. phosphoryliertem CsA (**II**, [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA) inkubiert und danach mittels CE (ABI) untersucht. Stammlösungen von [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA bzw. [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA in DMSO (**3**) wurden mit 10 mM Hepes pH 7,5 auf die erforderliche Konzentration verdünnt. Während für [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA eine Interaktion mit rhCyp18 in Form eines Signals für [rhCyp18-[O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA] (**2**) nachgewiesen werden konnte, wurde für [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA keine Wechselwirkung mit rhCyp18 detektiert.

Noch drastischer waren die Auswirkungen der Einführung der bei den verwendeten pH-Bedingungen geladenen Phosphatgruppe im [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA. Selbst bei einem Überschuss an [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA (Abbildung 21-II C) war nur das unveränderte Signal von rhCyp18 und kein Komplexsignal zu beobachten, d.h., unter diesen Bedingungen trat keine detektierbare Komplexbildung auf. Für [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA konnte kein eigenes Signal detektiert werden, obwohl [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA durch die Einführung der Phosphatgruppe bei pH 8,0 negativ geladen ist und ein vom EOF getrenntes Signal zu erwarten wäre. Das Ergebnis für den Liganden [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA war mit dem schon erwähnten nichtbindenden CsH vergleichbar (Abbildung 19). Möglich ist aber auch eine verschlechterte Dissoziationskonstante im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-5} M, wodurch der gebildete Komplex während des CE-Laufes in seine Komponenten zerfällt und nicht erfaßt werden konnte.

4.2.2 Quantitative Auswertung durch EMMA-Messungen

Die im Kapitel 4.2.1 dargestellten Inkubationsexperimente waren nicht zur Bestimmung einer Dissoziationskonstante für die rhCyp18-CsA-Interaktion geeignet. Die Schwierigkeiten bei der Basislinientrennung von Komplex- und Proteinpeak sowie der hohe

Verbrauch an rekombinantem Protein für die Herstellung der Titrationsproben erforderten die Entwicklung einer neuen Methode. Um den Verbrauch an Protein einzuschränken, wurde die elektrophoretisch vermittelte Mikroanalyse (EMMA, siehe 2.4) verwendet. In diesem Fall wurde nur eine Proteinprobe benötigt, die dann in der Kapillare mit verschiedenen Konzentrationen des Liganden (CsA-Derivate) gemischt wurde, wobei die Bildung des Komplexes ebenfalls während des CE-Laufes in der Kapillare stattfand. In Abbildung 22 ist exemplarisch die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen rhCyp18 und CsA dargestellt. Auf Grund der Bildung des rhCyp18-CsA-Komplexes kam es mit steigender CsA-Konzentration (Abbildung 22-I A bis D) zu einer Verschiebung der Mobilität des Proteinsignals hin zur Mobilität des Komplexes, die im Fall der Verwendung von nichtbindendem CsH ausblieb (Abbildung 22-II).

Die Mobilitätsverschiebung wurde durch die unterschiedlichen Populationen von freiem Protein und Komplex bei variabler CsA-Konzentration verursacht. Eine Trennung von rhCyp18 und rhCyp18-CsA-Komplex wie in den Experimenten mit Präinkubation (Abbildung 18-I) erfolgte nicht mehr, weil die Probezone während der Trennung der Komplexbildungsreaktion unterlag und somit die Front des sich bildenden Komplexes eine Zonenverbreiterung verursachte.

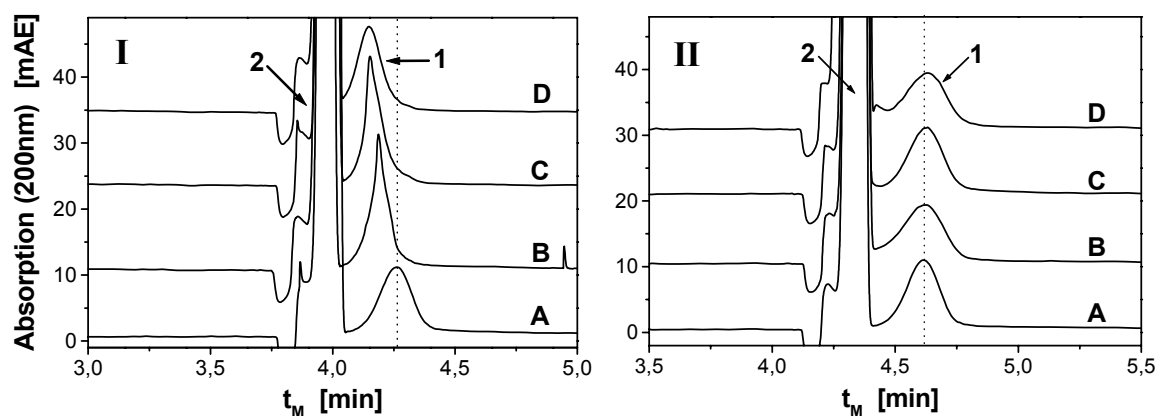


Abbildung 22: Analyse der Komplexbildung zwischen rhCyp18 und CsA (I) bzw. CsH (II) durch EMMA. Proben konstanter Konzentration ($6,1 \mu\text{M}$) an rhCyp18 (I) wurden ohne Inkubation mit Proben steigender Konzentrationen ($0 \mu\text{M}$, A; $3 \mu\text{M}$, B; $6 \mu\text{M}$, C; $25 \mu\text{M}$, D) an CsA (I) bzw. CsH (II) so injiziert und elektrophoretisch getrennt (ABI), daß sich die Probezonen während des Laufes in der Kapillare überholen und es zur Komplexbildung kam. CsA bzw. CsH wurden gelöst in DMSO (2) und nachfolgend verdünnt in BGE verwendet.

Die in Abhängigkeit von der vorgelegten Ligandkonzentration erhaltene Änderung der Mobilität konnte zur Ermittlung der Dissoziationskonstante genutzt werden. Dazu wurde

die Mobilität μ_{ep} bzw. die Mobilitätsdifferenz $\Delta\mu_{ep}$ zu einem internen Standard (Peptid oder Protein, das keine Wechselwirkung zum gegebenen Liganden zeigte) gegen die Konzentration des Liganden aufgetragen (Abbildung 23-I).

Für CsA und [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA ergab sich eine typische Bindungskurve. Im Gegensatz dazu konnte auch unter EMMA-Bedingungen keine Interaktion zwischen rhCyp18 und CsH bzw. [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA (Abbildung 23) beobachtet werden, was die Ergebnisse der Experimente der Präinkubationsversuche (siehe 4.2.1) bestätigte.

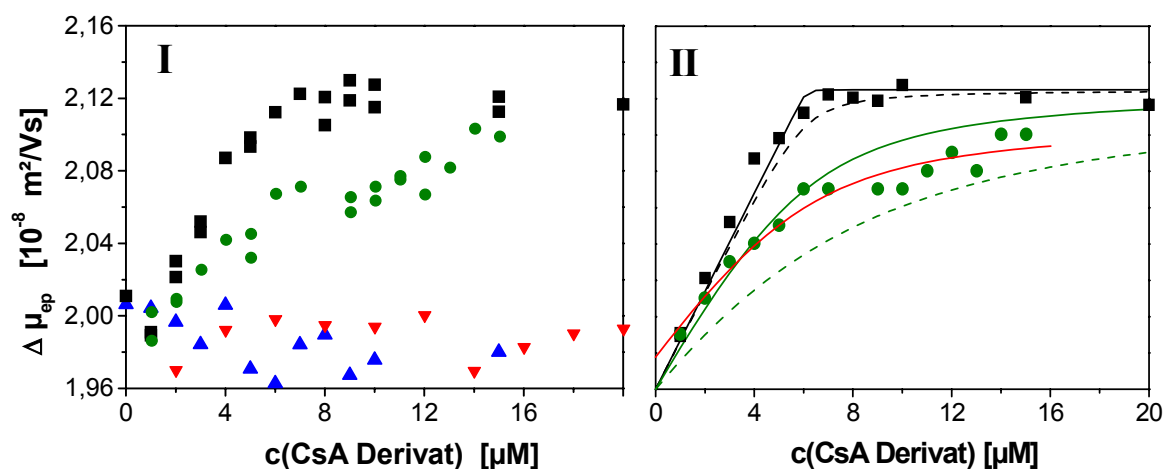


Abbildung 23: Quantitative Analyse von Cyclophilin-Wechselwirkungen mit Cyclosporin-Derivaten mittels EMMA. Die ermittelten Mobilitätsdifferenzen des rhCyp18-Signals zum internen Standard μ_{Ac-AA} in Gegenwart von CsA (■), CsH (▲), [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA (●) und [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA (▼) wurden gegen die eingesetzte Konzentration des entsprechenden Cyclosporinderivats aufgetragen (I). Durch simulierte Bindungskurven, die mit Hilfe von Gleichung 14 errechnet wurden, konnte eine Dissoziationskonstante für die rhCyp18-CsA-Interaktion im Bereich von 1 nM (—) bis 100 nM (---) bzw. für die rhCyp18-[O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA-Interaktion im Bereich von 1 μM (—) bis 4 μM (---) abgeschätzt werden (II). Durch nichtlineare Regression wurde für die rhCyp18-[O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA-Wechselwirkung eine Dissoziationskonstante von $1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (—) ermittelt. Für die rhCyp18-CsA-Interaktion konnte keine konvergierende Regressionsfunktion berechnet werden. Jeder Datenpunkt in II repräsentiert den Mittelwert einer Doppelbestimmung.

Die für CsA und [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA erhaltenen Bindungskurven wurden mittels Kurvensimulation oder nichtlinearer Regression (Gleichung 14, S. 47) ausgewertet (Abbildung 23-II). Dazu wurde in einer Auftragung der Mobilitätsdifferenz gegen die eingesetzte Ligandkonzentration eine Anpassung der experimentellen Daten unter Verwendung von Gleichung 14 durchgeführt.

Für CsA konnte mit Hilfe der Regressionsrechnung kein Wert für K_D bestimmt werden, da die Funktion für die ermittelten Daten nicht konvergiert. Die Simulation der Kurven für

$K_D = 1$ bzw. 100 nM zeigte nur geringe Unterschiede. Auf Grund der großen Diskrepanz zwischen eingesetzter Stoffmenge an rhCyp18 und CsA ($\sim 10^{-6}$ M) und der zu erwartenden Dissoziationskonstante (10^{-9} M, [FISCHER, 1994]) war nur eine sehr grobe Abschätzung der Dissoziationskonstante $K_D = 1$ bis 100 nM möglich.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante für [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA konnte mit Hilfe simulierter Kurven auf einen Bereich von $K_D = 1$ bis 4 μ M eingegrenzt werden. Mit Hilfe der Regressionsrechnung wurde ein Wert von $K_D = 1,3 \pm 0,2$ μ M bestimmt.

4.2.3 Untersuchungen zur Bindung bekannter Peptidliganden

In der Literatur wurde bisher die Interaktion von Peptidliganden mit hCyp18 teilweise nur qualitativ beschrieben bzw. wurden zur Quantifizierung proteolytisch gekoppelte Aktivitätstests verwendet. Sind im Peptidliganden Spaltstellen für die eingesetzte Protease vorhanden, kann es zur Verfälschung der Meßergebnisse durch Proteolyse des Liganden kommen.

Für das bioaktive Peptidhormon Bradykinin existieren nur ungenaue Aussagen zur Bindung an hCyp18, d.h., hierbei wurde eine Dissoziationskonstante im Bereich von 10^{-3} M postuliert [LONDON *et al.*, 1990; MERKER & DAWSON, 1995]. Protein-Ligand-Interaktionen mit solchen niederaffinen Dissoziationskonstanten können nicht nach Präinkubation mit CE analysiert werden, da der gebildete labile Komplex während der CE-Trennung zerfällt.

Entsprechend dem Prinzip der Mobilitätsverschiebung (*mobility-shift-Analyse*) wurde Bradykinin daher als Ligand dem CE-Puffersystem in variabler Konzentration zugesetzt. In einer $\mu_{ep}(\text{rhCyp18})\text{-c}(\text{Bradykinin})$ -Auftragung konnte eine konzentrationsabhängige Veränderung der elektrophoretischen Mobilität von rhCyp18 nachgewiesen werden (Abbildung 24 ■). Auf Grund des variablen Bradykiningehaltes im Puffer veränderte sich der EOF. Diese Änderung wurde durch Korrektur der elektrophoretischen Mobilität mit Hilfe des EOF-Markers berücksichtigt.

Die Interaktion von rhCyp18 und Bradykinin war durch CsA inhibierbar. Die elektrophoretische Mobilität der Komponente blieb unverändert, wenn anstelle des freien Proteins der rhCyp18-CsA-Komplex injiziert wurde (Abbildung 24 ○).

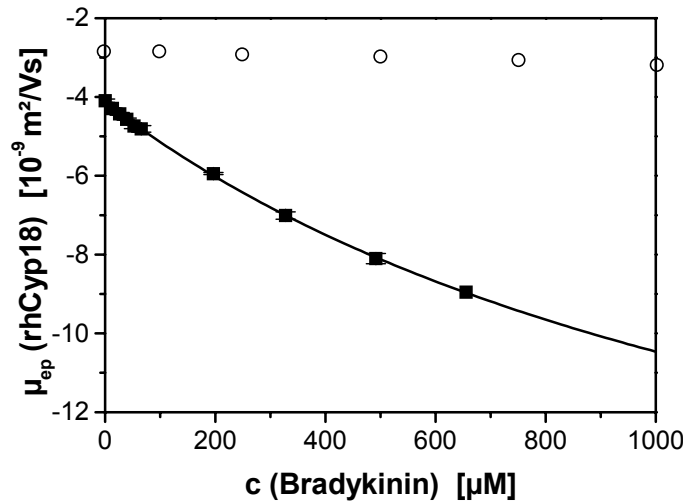


Abbildung 24: Auswertung der ACE-Messungen zur Bindungsanalyse von rhCyp18 (■) bzw. [rhCyp18-CsA] (○) und Bradykinin. Durch nichtlineare Regression (Gleichung 5) konnte eine Dissoziationskonstante $K_D = 1,4 \pm 0,1$ mM ermittelt werden. Die Datenpunkte (■) repräsentieren jeweils Mittelwerte einer Dreifachbestimmung für μ_{ep} .

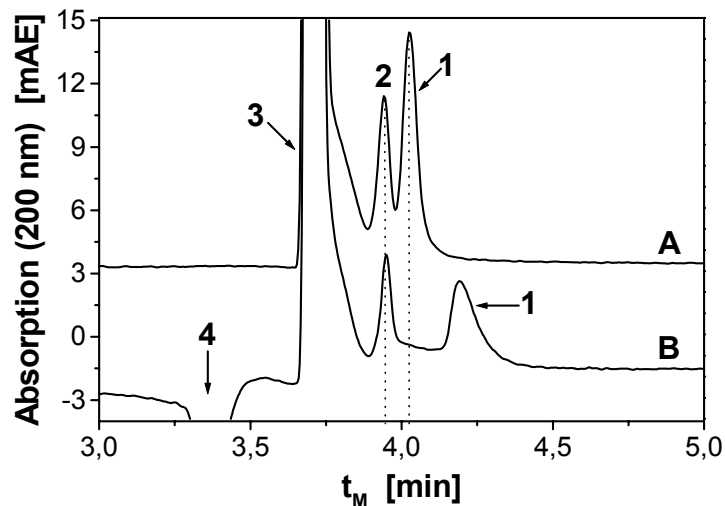


Abbildung 25: Simultane ACE-Analyse der Wechselwirkung zwischen rhCyp18 (1) bzw. [rhCyp18-CsA] (2) und Bradykinin durch Kombination von *equilibrium-mixture*- und *mobility-shift*-Analyse. Nach Inkubation von rhCyp18 (10 μ M) mit dem 0,5fachen Stoffmengenequivalent an CsA (5 μ M), verdünnt aus einer Stammlösung in DMSO (3), wurde die gemischte Population von freiem Protein und Inhibitor-Komplex gleichzeitig auf Wechselwirkung mit dem Liganden Bradykinin durch ACE (MDQ) getestet. In Abwesenheit (A) bzw. Gegenwart (B) von Bradykinin (100 μ M) im BGE trat eine Mobilitätsänderung des rhCyp18-Signals auf, während die Mobilität von [rhCyp18-CsA] nicht beeinflusst wurde. Infolge des Zusatzes von Bradykinin zum BGE (B) wurde nach der Injektion von Proben, die kein Bradykinin enthalten, ein negatives Signal für Bradykinin (4) beobachtet. Verschiebungen der Migrationszeiten durch veränderten EOF wurden auf die Signale der Standards DMSO und $AC-AA$ normiert, um einen besseren optischen Vergleich zu ermöglichen.

Kombiniert man die Ergebnisse der Untersuchungen zur Bindung zwischen rhCyp18 und CsA bzw. Bradykinin, kann man in einem CE-Lauf parallel die Bindung von Bradykinin an rhCyp18 und die Inhibierung der Bindung in Gegenwart von CsA nachweisen. Zu diesem Zweck wurde eine präinkubierte Probe aus rhCyp18 und CsA hergestellt, die equimolare Mengen sowohl an freiem rhCyp18 als auch an rhCyp18-CsA-Komplex enthielt (Abbildung 25 A). Diese Probe wurde nun in einem Puffer analysiert, der zusätzlich Bradykinin enthielt. Es konnte eine Veränderung der Migrationszeit (und damit der Mobilität) von rhCyp18 beobachtet werden, während die Migrationszeit des Komplexes unverändert blieb (Abbildung 25 B).

Unter Verwendung der nichtlinearen Regression konnte erstmals eine Dissoziationskonstante $K_D = 1,4 \pm 0,1$ mM für die Interaktion zwischen rhCyp18 und Bradykinin ermittelt werden (Abbildung 24).

Auf der Basis dieser Untersuchung der schwachen Wechselwirkung von rhCyp18 mit Bradykinin durch ACE wurden im weiteren andere Peptidsubstrate auf ihre Wechselwirkungen mit rhCyp18 untersucht.

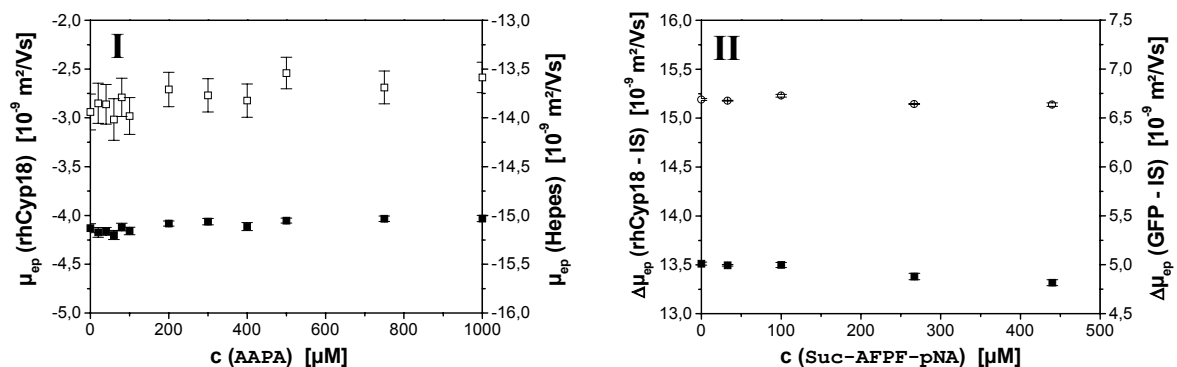


Abbildung 26: ACE-Analyse der Bindung zwischen rhCyp18 (■) und dem Tetrapeptid AAPA (I) bzw. dem Tetrapeptidderivat Suc-AFPF-pNA (II) durch ACE und *mobility-shift*-Analyse. Die Peptide wurden im BGE 50 mM Phosphat pH 8,0 in entsprechender Konzentration gelöst. Für AAPA (I) wurde μ_{ep} mit Hilfe von DMSO als EOF-Marker errechnet. Das Hepes-Signal (Puffer der rhCyp18-Lösung) wurde als Vergleichsstandard verwendet (□). Für Suc-AFPF-pNA (II) wurde die Mobilitätsdifferenz zwischen Protein und Migrationszeitstandard μ_{ac-AA} errechnet. rGFP diente als Protein-Vergleichsstandard (○). In beiden Fällen konnte keine Mobilitätsverschiebung als Folge der Bindung der Liganden an rhCyp18 beobachtet werden.

In Kernresonanzspektroskopie-Messungen bzw. einem proteasegekoppelten Test waren für die Peptide AAPA (U. Reimer, persönliche Mitteilung) und Suc-AFPF-pNA [HARRISON & STEIN, 1990b] Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-3} M bestimmt worden. Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe der ACE für rhCyp18 keine Mobilitätsänderung in

Gegenwart der Liganden registriert werden (Abbildung 26). Somit konnte trotz Variation der Trennbedingungen keine K_D -Bestimmung für diese Peptidliganden erfolgen.

4.2.4 Unterschiedliche Bindungseigenschaften der Cyclophiline

In den bisherigen Messungen wurden Eigenschaften der niedermolekularen Liganden variiert und der makromolekulare Rezeptor rhCyp18 unverändert eingesetzt. Inwieweit das ACE-Meßsystem auch universell für differente Cyclophiline aus verschiedenen Organismen eingesetzt werden kann, sollte mit Hilfe von Peptiden des HIV-Capsidproteins p24 analysiert werden (siehe 1.1.2.2). Die Anwendung der *mobility-shift*-Analyse fand gegenüber der Präinkubationsmethode den Vorzug, da für die Bindung zwischen rhCyp18 und Peptiden des HIV-Capsidproteins p24 Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-4} M publiziert sind [SCHUTKOWSKI *et al.*, 1999].

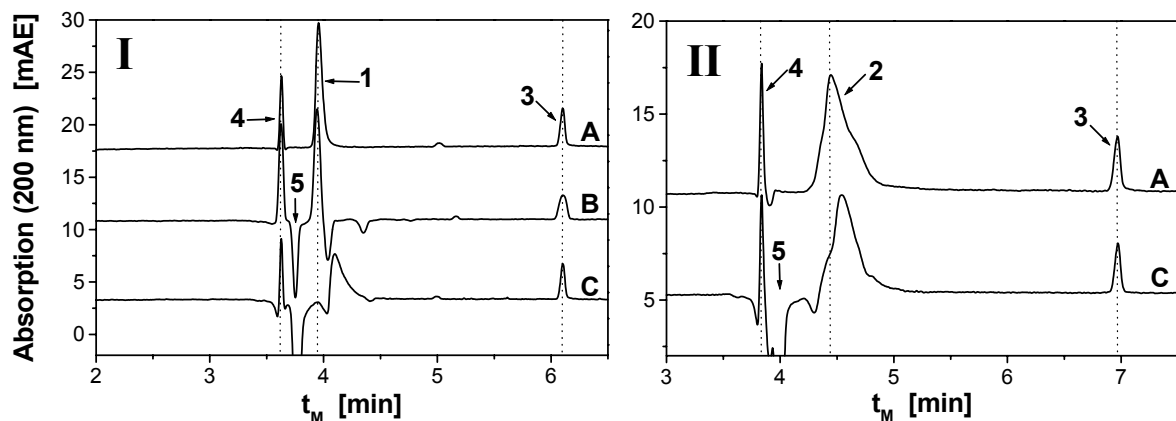


Abbildung 27: Interaktionsanalyse von rhCyp18 (I) und rDmCyp20 (II) mit einem aus dem HIV-1 Capsidprotein abgeleiteten 25mer-Peptid $\text{Ac-DRVHPVHAGP-Bpa-APGQ-Nle-REPRGSDIA-NH}_2$ (5) durch ACE (MDQ) und *mobility-shift*-Analyse. Die Proteine rhCyp18 (1) und rDmCyp20 (2) wurden als Proben ($10 \mu\text{M}$, in 50 mM Phosphat $\text{pH } 8,0$) in Trennpuffern mit dem 25mer-Peptid in verschiedenen Konzentrationen auf Veränderungen der elektrophoretischen Mobilität untersucht. Das Elektropherogramm A zeigt die Situation für einen BGE ohne Peptid, während der BGE in C $100 \mu\text{M}$ des 25mer-Peptids enthielt. Der Einsatz der P^{10}A -Variante des 25mer-Peptids ($100 \mu\text{M}$) ist in B dargestellt. Verschiebungen der Migrationszeiten durch veränderten EOF wurden auf die Signale der Standards DMSO (4) und Ac-AA (3) normiert, um einen besseren optischen Vergleich zu ermöglichen.

Der Effekt der Mobilitätsverschiebung war für die untersuchten Cyclophiline unterschiedlich. Für das humane rhCyp18 (Abbildung 27-I) trat eine deutliche Änderung der Migrationszeit des Proteins unter dem Einfluß des Peptidliganden im BGE auf. Im Gegensatz dazu wurde für das Cyclophilin aus *D. melanogaster* (rDmCyp20)

(Abbildung 27-II) nur eine geringe, aber signifikante Veränderung der Mobilität beobachtet. Für die quantitative Auswertung wurde deshalb neben der Korrektur des variablen EOF durch Berechnung der Mobilität auch noch eine Korrektur mit Hilfe der Mobilität des internen Standards nach Gleichung 19 durchgeführt.

Gleichung 19

$$\mu_{ep}^{korr} = \frac{\mu_{ep}^{Protein}}{\mu_{ep}^{Ac-AA}} \quad (\text{für jede Konzentration an Ligand})$$

μ_{ep}^{korr} : korrigierte elektrophoretische Mobilität

$\mu_{ep}^{Protein}$: elektrophoretische Mobilität des Proteins

μ_{ep}^{Ac-AA} : elektrophoretische Mobilität des internen Standards Ac-AA

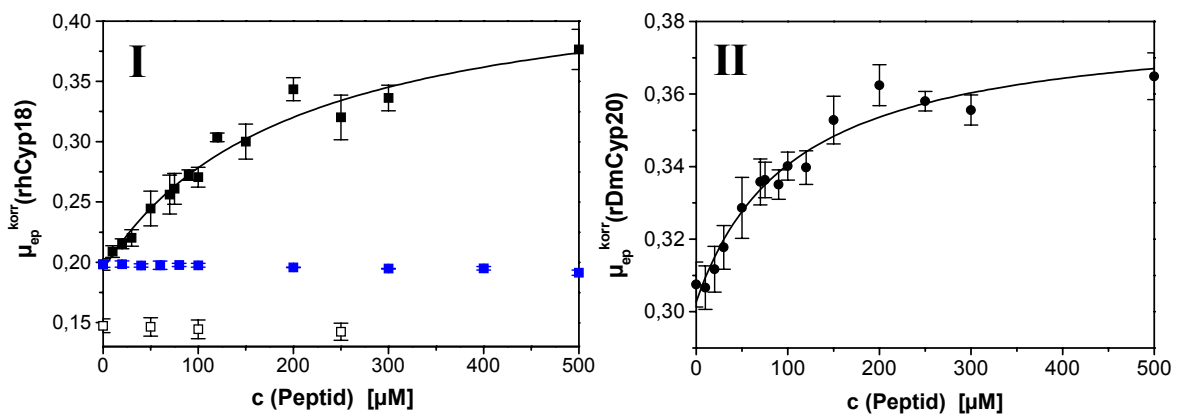


Abbildung 28: Ermittlung von Bindungskonstanten für die Interaktion von rhCyp18 (I) und rDmCyp20 (II) mit abgeleiteten 25mer-Peptiden des HIV-Capsidproteins durch *mobility-shift*-Analyse in der ACE. Die Peptide Ac-DRVHPVHAGP-Bpa-APGQ-N1e-REPRGSDIA-NH₂ bzw. Ac-DRVHPVHAGA-Bpa-APGQ-N1e-REPRGSDIA-NH₂ (P¹⁰A-Variante) wurden in entsprechender Konzentration gelöst in 50 mM Phosphat pH 8,0 als BGE verwendet. Die elektrophoretischen Mobilitäten für die Proteine und den internen Standard Ac-AA wurden mit Hilfe des EOF-Markers DMSO errechnet und mit Hilfe von Gleichung 19 korrigiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert einer Dreifachbestimmung. Die Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität von rhCyp18 (■), [rhCyp18-CsA] (□) und rDmCyp20 (●) von der Konzentration an Ac-DRVHPVHAGP-Bpa-APGQ-N1e-REPRGSDIA-NH₂ im BGE bzw. von rhCyp18 in Gegenwart von Ac-DRVHPVHAGA-Bpa-APGQ-N1e-REPRGSDIA-NH₂ wurde dargestellt. Für die Interaktion von rhCyp18 bzw. rDmCyp20 mit Ac-DRVHPVHAGP-Bpa-APGQ-N1e-REPRGSDIA-NH₂ konnten durch nichtlineare Regression unter Verwendung von Gleichung 5 Dissoziationskonstanten von $197 \pm 32 \mu\text{M}$ bzw. $106 \pm 18 \mu\text{M}$ ermittelt werden.

Die Auswertung der Beziehung zwischen korrigierter elektrophoretischer Mobilität und eingesetzter Peptidkonzentration erfolgte mit Hilfe nichtlinearer Regression (Gleichung 5, S. 18) und ergab eine Dissoziationskonstante von $197 \pm 32 \mu\text{M}$ für rhCyp18 bzw.

$106 \pm 18 \mu\text{M}$ für rDmCyp20 (Abbildung 28). Der K_D -Wert für rDmCyp20 weist auf eine festere Bindung zum HIV-Peptidliganden hin.

In nachfolgenden Kontrollexperimenten wurden Inhibierungsversuche durchgeführt, die zum Nachweis der Spezifität der gemessenen Mobilitätsverschiebung dienen sollten. Im ersten Versuch wurde anstelle der freien PPIase der Komplex mit dem Inhibitor CsA eingesetzt. In Gegenwart des HIV-Peptidliganden blieb die Mobilität des rhCyp18-CsA-Komplexes konstant (Abbildung 28-I □), da die Bindungsstelle bereits durch CsA blockiert war [YIN *et al.*, 1998].

In einem zweiten Versuch wurde eine Variante des obigen Peptids mit einem Aminosäureaustausch in der G-P-Bindung (P^{10A}) eingesetzt. Im proteasefreien PPIase-Test sowie durch Präzipitationsversuche wurde gezeigt, daß der Austausch P^{10A} sowohl im Peptid als auch im Capsidprotein p24 den K_D -Wert der Interaktion mit rhCyp18 drastisch verringert [FRANKE *et al.*, 1994; SCHUTKOWSKI *et al.*, 1999]. Die konstante Mobilität von rhCyp18 in Gegenwart des P^{10A} -variieren Peptids zeigte, daß unter den Meßbedingungen keine Bindung mehr nachweisbar bzw. die verringerte Affinität im verwendeten ACE-System nicht mehr erfaßbar war (Abbildung 28-I ■).

4.2.5 Interaktionen von rDmCyp20-GFP mit unbekanntem Peptidliganden

Für die vorangegangenen Interaktionsanalysen wurden immer nur Liganden eingesetzt, die an das aktive Zentrum der untersuchten Cyclophiline binden. Interessanterweise konnte in hCyp18 neben der Isomerasedomäne eine zusätzliche Domäne (ML -Domäne) mit Sequenzhomologien zu bekannten Proteinbindungsdomänen identifiziert werden [SCHUTKOWSKI *et al.*, 1999].

Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen von Cyp20 mit bekannten Proteindomänen konnte in diesem Enzym eine potentielle WW -Domäne postuliert werden (Abbildung 29).

Für Cyp20 aus *D. melanogaster* ist bekannt, daß es entwicklungspezifisch exprimiert wird [REIBMANN, 2001]. Für die Oogenese der Fruchtfliege sind Interaktionen zwischen WW -Domänen-Proteinen und dem prolinreichen CAPPUCINO-Protein essentiell [MAHONEY *et al.*, 1997; MANSEAU *et al.*, 1996].

WW-Domäne	W	20...22 Aminosäuren	WXXP
YAP:	¹⁷¹ VPLPAGW	EMAKTSSGQR	YFLNHIDQTTT--WQDPRKAMLS
Ned4:	²¹⁸ SPLPPGWE	ERQDILGR	TYVNHESRRT-Q-WKRPTPDNL
dodo:	⁵ EQLPDGWE	KRTSRSTGMS	YYLNMYTKESQ-WDQPTPAKK
hPin1:	¹ MADEEKLP	PPGWEKRMSR	SSGRVYYFNHITNASQ-WERP
hCyp18:	⁸⁵ ENFILKHTG	PGILSMANAG	PNTNGSQFFICTAKTEWLDGKHVVFGKVKEGMNI
hCyp20:	¹¹⁸ ENFKLKH	YGPVWSMANAG	KDTNGSQFFITTVKTAWLDGKHVVFGKVLEGMNV
DmCyp20:	⁹⁴ ENFKLKH	YGWLSMANAG	KDTNGSQFFITTKQTSWLDGRHVVF

Abbildung 29: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Cyclophilinen und bekannten WW-Domänen; Quellen nach [SUDOL, 1996]. YAP: Yes-assoziiertes Protein (human), dodo: Parvulin-PPIase (*D. melanogaster*), Ned4: humane Aminosäureligase

Inwieweit DmCyp20 über die postulierte WW-Domäne mit CAPPUCCINO, einem potentiellen Liganden, interagieren kann, sollte in einem ersten Ansatz unter Verwendung einer OPB überprüft werden. Dazu wurde das Protein in Form sich um drei Aminosäuren überlappender 13mer-Peptide an einem Celluloseträger synthetisiert, die in ihrer Abfolge die gesamte Proteinsequenz darstellen (siehe 3.2.8). Für die Interaktionsanalyse wurde die Membran mit der OPB mit Bindungspuffer equilibriert und nachfolgend für 15 h mit einer 30 µM rDmCyp20-GFP-Lösung bei 4 °C inkubiert. Unspezifisch gebundenes Fusionsprotein wurde durch mehrfaches Waschen mit Bindungspuffer entfernt. An Peptidsequenzen gebundenes rDmCyp20-GFP konnte mittels Fluoreszenzdetektion auf dem Celluloseträger nachgewiesen werden (Abbildung 30).

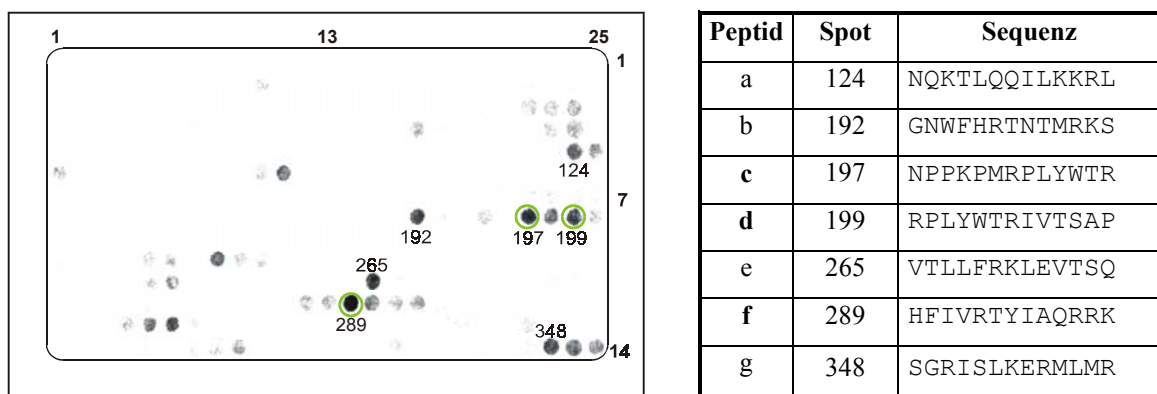


Abbildung 30: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen rDmCyp20-GFP und dem *D. melanogaster*-Protein CAPPUCCINO mit Hilfe einer OPB (siehe 3.2.8). Die Auswertung erfolgte nach Inkubation der Membran mit rDmCyp20-GFP durch direkte Detektion des an der Membran gebundenen Fusionsproteins mittels Fluoreszenzscanner. Die Tabelle enthält die Peptidsequenzen, die eine Bindung von rDmCyp20-GFP zeigen. Die Peptide der OPB lagen N-terminal über β-Alanin kovalent an die Cellulosemembran gebunden und C-terminal amidiert vor.

Die Peptidsequenzen, die eine Bindung von rDmCyp20-GFP zeigten, enthielten entweder besonders geladene Aminosäuren (Abbildung 30, Peptide **a**, **b**, **e** bis **g**) oder prolinhaltige

Abschnitte (Abbildung 30, Peptide **c**, **d**). Für die Überprüfung der am Celluloseträger interagierenden Peptide wurden einige ausgewählt und in Substanz synthetisiert, um durch Bindungsversuche in Lösung die Interaktion mit rDmCyp20-GFP bzw. rDmCyp20 zu verifizieren. Da die OPB eine Abfolge von sich jeweils um 10 Aminosäuren überlappender Peptide darstellt, wodurch ein potentiell Bindungsmotiv partiell auch in den umgebenden Peptidspots enthalten ist, wurde die Auswahl auf Spots beschränkt, die innerhalb einer Gruppe von Spots mit Affinität zu rDmCyp20-GFP lagen (Abbildung 30, Peptide **c**, **d**, **f**). Diesem Auswahlkriterium genügten zwei Gruppen der OPB, von denen die Peptide der Spots mit dem stärksten Fluoreszenzsignal nach Bindung von rDmCyp20-GFP synthetisiert wurden, so daß der Syntheseaufwand möglichst gering gehalten werden konnte.

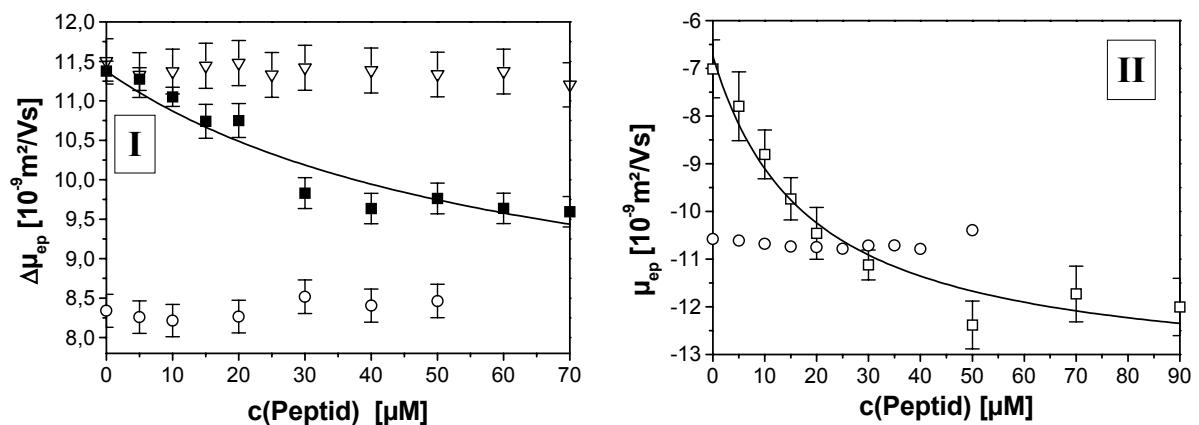


Abbildung 31: Quantifizierung der Bindung zwischen rDmCyp20-GFP (**I**) und rDmCyp20 (**II**) und Peptiden der CAPPUCINO-OPB mittels ACE und *mobility-shift*-Analyse. Die Peptide wurden in entsprechender Konzentration, gelöst in 50 mM Phosphat pH 8,0, als BGE eingesetzt. Für rDmCyp20-GFP (**I**) wurde die Mobilitätsdifferenz zum internen Standard AC-AA und für rDmCyp20 (**II**) die elektrophoretische Mobilität, berechnet mit Hilfe des EOF-Markers DMSO, gegen die eingesetzte Peptidkonzentration aufgetragen. Die Interaktion von rDmCyp20-GFP (10 μM) mit AC-NPPKPMRPLYWTR-NH₂ (■) und AC-RPLYWTRIVTSAP-NH₂ (▽) sowie von rDmCyp20 (10 μM) mit AC-NPPKPMRPLYWTR-NH₂ (□) wurde untersucht. Als Referenzprotein ohne Wechselwirkung mit den Peptiden wurde jeweils GFP (○) eingesetzt (10 μM). Durch Auswertung der Mobilitätsverschiebung konnten für die Interaktion von rDmCyp20-GFP bzw. rDmCyp20 mit AC-NPPKPMRPLYWTR-NH₂ unter Verwendung nichtlinearer Regression (Gleichung 5) Dissoziationskonstanten von 63 ± 6 μM bzw. 19 ± 2 μM bestimmt werden.

Die Verifizierung der Bindung der Cellulose-gebundenen Peptide an rDmCyp20 in Lösung erfolgte zunächst mittels ACE. Auf Grund fehlender Erfahrungen über die Größe der zu erwartenden Dissoziationskonstante wurde das Peptid dem BGE zugemischt, um die Bindung durch Mobilitätsverschiebung zu charakterisieren (siehe 1.2.3.2). Diese Strategie gewährleistete, Interaktionen sowohl niedriger als auch hoher Dissoziationskonstanten qualitativ zu erfassen.

Die Untersuchung von Peptid **f** (Abbildung 30) war auf Grund seiner geringen Löslichkeit im wässrigen System nicht möglich.

Die Peptide **c** und **d** (Abbildung 30) wurden zuerst auf ihre Bindung zu rDmCyp20-GFP untersucht. Während für das Peptid $_{AC-NPPKPMRPLYWTR-NH_2}$ (Abbildung 30, **c**) die im Rahmen der Bindungsanalyse mit einer OPB gefundene Affinität zu rDmCyp20-GFP bestätigt und durch eine Dissoziationskonstante $K_D = 63 \pm 6 \mu M$ charakterisiert werden konnte (Abbildung 31-I ■), war für das Peptid $_{AC-RPLYWTRIVTSAP-NH_2}$ (Abbildung 30, **d**) keine Interaktion unter ACE-Bedingungen durch Änderung der Mobilität des Bindeproteins rDmCyp20-GFP nachweisbar (Abbildung 31-II ▽).

In Kontrollexperimenten konnte eine unspezifische Bindung des Peptides an den GFP-Teil von rDmCyp20-GFP ausgeschlossen werden, da beim Einsatz von rGFP als Analyt unter identischen ACE-Bedingungen in Gegenwart von Peptid **c** (Abbildung 30) keine Veränderung der Mobilität des Signals zu beobachten war (Abbildung 31 ○).

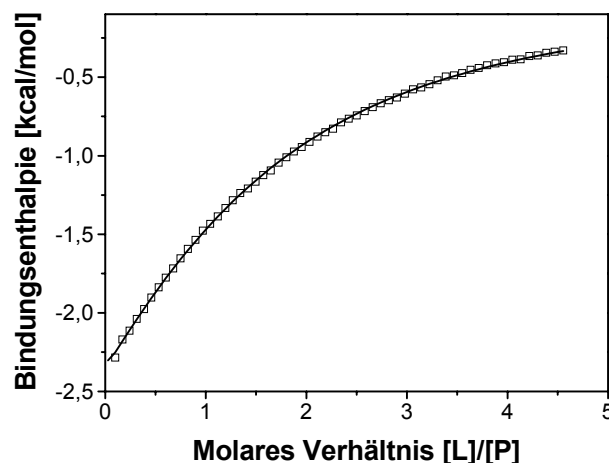


Abbildung 32: Analyse der Bindung zwischen rDmCyp20 und $_{AC-NPPKPMRPLYWTR-NH_2}$ mittels ITC. Protein und Peptid wurden gegen in 50 mM Phosphat pH 8,0 dialysiert. rDmCyp20 (445 μM) wurde in der Kalorimeterzelle vorgelegt und in 5 μl -Schritten mit $_{AC-NPPKPMRPLYWTR-NH_2}$ (13,5 mM) titriert. Die Bindungskurve wurde unter Verwendung von nichtlinearer Regression (Einseitenbindungsmodell) ausgewertet, wodurch folgende Parameter ermittelt werden konnten: $K_A = 1275 \pm 23 M^{-1}$; $\Delta H = -5585 \pm 122 \text{ kcal/mol}$; $\Delta S = -4,537 \text{ kcal/(mol}\cdot\text{K)}$. Zum besseren Vergleich mit den ACE-Daten wurde die Assoziationskonstante in die entsprechende Dissoziationskonstante $K_D = K_A^{-1} = 785 \pm 16 \mu M$ umgerechnet.

Um Bindungsartefakte, verursacht durch die Fusionierung von rDmCyp20 und GFP, auszuschließen, wurde die Bindung des Peptides **c** (Abbildung 30) mit rDmCyp20 untersucht. Die Interaktion von Peptid **c** (Abbildung 30) erfolgte unter identischen ACE-Bedingungen. Wie schon für rDmCyp20-GFP trat auch für rDmCyp20 eine Veränderung der Mobilität in Gegenwart von Peptid **c** auf. Durch Anpassung einer Bindungskurve an

eine Auftragung von Mobilität gegen Peptidkonzentration konnte unter Verwendung nichtlinearer Regression (Gleichung 5, S. 18) eine Dissoziationskonstante $K_D = 19 \pm 2 \mu\text{M}$ ermittelt werden (Abbildung 31-II □).

Die Dissoziationskonstante der Wechselwirkung von rDmCyp20 mit Peptid **c** wurde mit Hilfe der isothermischen Titrationskalorimetrie (ITC) als unabhängige Analysenmethode überprüft. Durch Auswertung der freiwerdenden Wärme, die durch die Bindung des Peptides an rDmCyp20 während jedes Titrationschrittes entsteht, konnte eine Dissoziationskonstante $K_D = 785 \pm 16 \mu\text{M}$ bestimmt werden (Abbildung 32).

4.3 Untersuchungen von Protein-Protein-Wechselwirkungen

4.3.1 Etablierung eines Referenzsystems für Protein-Protein-Wechselwirkungen

4.3.1.1 Die HIV-1 p24 / Cyclophilin – Wechselwirkung und Einsatz des Fusionsproteins

ACE-Bindungsstudien für Protein-Protein-Interaktionen sind nur für wenige Beispiele publiziert, die sich zudem oft auf den qualitativen Nachweis der Bindung und den Einsatz gereinigter Proteine beschränken. In zellulären Subfraktionen von Organismen wurden bisher mittels ACE weder qualitativ noch quantitativ Protein-Protein-Wechselwirkungen analysiert. Die selektive Detektion eines Bindungspartners ist dafür erforderlich. Molekularbiologisch generierte fluorogene Fusionsproteine, wie rDmCyp20-GFP, sind hierbei geeignete Hilfsmittel.

Als Referenzsystem für die methodische Entwicklung wurden rDmCyp20-GFP und p24 auf Grund der erfolgreichen Experimente zum Nachweis der Wechselwirkung von rhCyp18 und rDmCyp20 mit abgeleiteten Peptiden aus p24 gewählt. Für die Interaktion von rhCyp18 und p24 konnten mit Hilfe anderer Bindungsmessungen, wie Oberflächen-Plasmon-Resonanz, isothermische Titrationskalorimetrie oder isomerspezifischer PPIase-Test, Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-5} M bestimmt werden, die im erfaßbaren Bereich für die ACE liegen [SCHUTKOWSKI *et al.*, 1999; YOO *et al.*, 1997]. Darüber hinaus wurde der Einsatz eines GFP-Fusionsproteins anstelle eines unmarkierten Cyclophilins getestet, um nachfolgend die ACE zur Suche nach unbekanntem Liganden einzusetzen.

4.3.1.2 Charakterisierung der Bindung zwischen rDmCyp20-GFP und p24

Für die Bindung von rDmCyp20-GFP an p24 sind bisher keine Daten in der Literatur verfügbar. Deshalb wurde diese Interaktion zunächst mit den klassischen Methoden native PAGE und SEC untersucht. Dabei sollte geklärt werden, ob das Fusionsprotein vergleichbare Bindungseigenschaften zum unmarkierten Cyclophilin zeigt, die durch eine Dissoziationskonstante im Bereich von 10^{-5} M beschrieben wurden [Yoo *et al.*, 1997].

Die native PAGE wurde in Form eines "gel-shift-Assays" eingesetzt. Dazu wurden Proben hergestellt und unter nativen Bedingungen gelelektrophoretisch getrennt, die eine konstante Konzentration an rDmCyp20-GFP und eine ansteigende Konzentration an p24 enthielten. Für die Auswertung wurde ein Fluoreszenzbild durch Anregung der GFP-Fluoreszenz bei 280 nm verwendet.

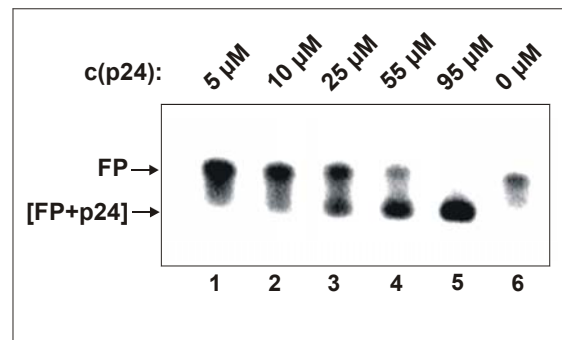


Abbildung 33: Analyse der Wechselwirkung zwischen rDmCyp20-GFP und p24 mittels nativer PAGE. Vorinkubierte Proben (15 h, 4 °C) von rDmCyp20-GFP (6 µM) und p24 (0 bis 95 µM) wurden in einem 6 %igen Gel getrennt und nachfolgend durch Detektion der GFP-Fluoreszenz sichtbar gemacht. Mit ansteigender Konzentration an p24 in den Proben (Spuren 1 bis 5) kommt es zum Übergang der Bande des Fusionsproteins rDmCyp20-GFP (FP) in eine Bande, die den Komplex aus p24 und rDmCyp20-GFP darstellt (FP+p24).

Mit steigender p24-Konzentration in der Probe zeigte die rDmCyp20-GFP-Bande eine veränderte Mobilität, die einen konzentrationsabhängigen Übergang aufwies (Abbildung 33, Spuren 1 bis 5). Das Signal des freien rDmCyp20-GFP (Abbildung 33, Spur 6) ging bei ca. 95 µM p24 komplett in das Signal des Komplexes (Abbildung 33, Spur 5) über, der eine höhere Mobilität aufwies. Eine grobe Schätzung der Dissoziationskonstante mit $K_D \approx 25$ µM war möglich, da für diese Konzentration an p24 freies Protein und putativer Komplex in gleicher Population vorlagen (Abbildung 33, Spur 3).

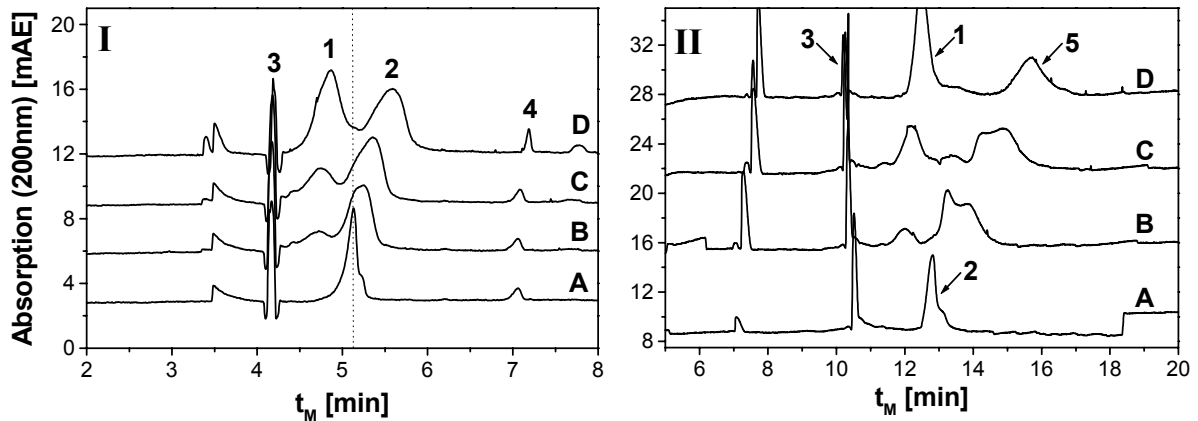


Abbildung 34: Untersuchung der Bindung zwischen p24 und rDmCyp20-GFP durch ACE. Proben konstanter Konzentration an rDmCyp20-GFP (5 μ M) und variabler Konzentration an p24 (0 μ M, **A**; 6 μ M, **B**; 12 μ M, **C**; 22 μ M, **D**) wurden inkubiert (15 h, 4 $^{\circ}$ C) und unter Verwendung von 50 mM Phosphat pH 8,0 (**I**, $U = 30$ kV) bzw. PBS (**II**, $U = 17,5$ kV) als BGE mittels CE (MDQ) analysiert. Mit ansteigender Konzentration an p24 (**1**) in den Proben kam es zu einer Veränderung der elektrophoretischen Mobilität des rDmCyp20-GFP-Signals (**2**). Bei der Verwendung von PBS als BGE (**II**) konnte zusätzlich die teilweise Auftrennung der Signals von rDmCyp20-GFP (**2**) und [p24 / rDmCyp20-GFP] (**5**) beobachtet werden. Als interner Standard wurde $AC-AA$ (**4**) und als EOF-Marker wurde DMSO (**3**) eingesetzt.

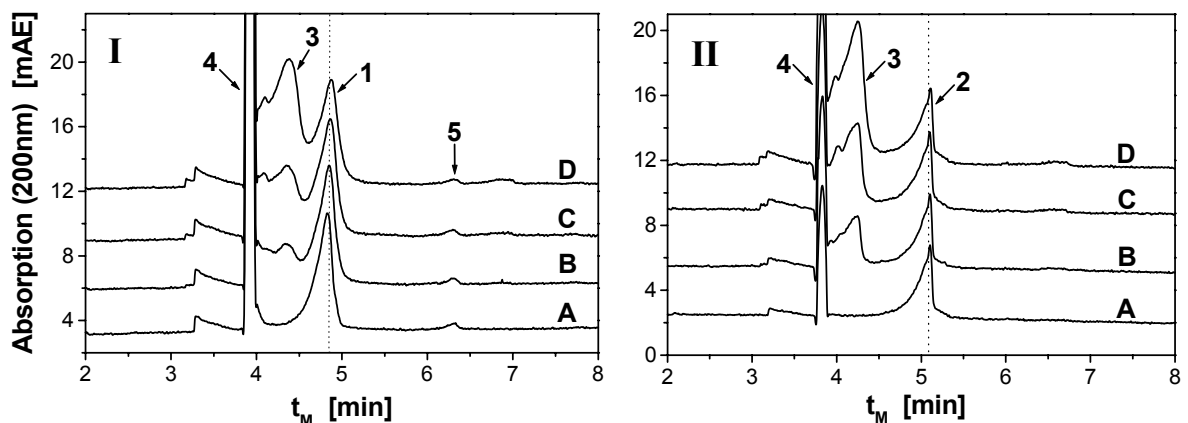


Abbildung 35: ACE-Experimente zum Nachweis der Spezifität der p24 / rDmCyp20-GFP-Interaktion. Die Inhibition des Cyclophilins durch Inkubation von rDmCyp20-GFP mit equimolaren Mengen CsA verhindert die Interaktion mit p24 (**I**). Dazu wurde rDmCyp20-GFP (10 μ M) mit CsA (10 μ M) zur Bildung von [CsA-rDmCyp20-GFP] (**1**) inkubiert (1 h, 4 $^{\circ}$ C). Anschließend wurde der so gebildete Komplex mit ansteigenden Konzentrationen (0 μ M, **A**; 6 μ M, **B**; 12 μ M, **C**; 22 μ M, **D**) an p24 (**3**) inkubiert (15 h, 4 $^{\circ}$ C) und schließlich mittels CE (MDQ) analysiert. rGFP allein zeigte keine Affinität zu p24 (**II**). Nach Inkubation (15 h, 4 $^{\circ}$ C) von rGFP (5 μ M) mit ansteigenden Konzentrationen an p24 (s. o.) konnte keine veränderte Mobilität des rGFP-Signals (**2**) beobachtet werden. Als EOF-Marker wurde DMSO (**4**) verwendet, das gleichzeitig Lösungsmittel der verwendeten CsA-Stammlösung war. $AC-AA$ wurde als interner Standard verwendet (**5**).

Die Komplexbildung konnte auch mittels CE unter Verwendung eines Phosphatpuffers als BGE durch eine Verschiebung des Signals für rDmCyp20-GFP verfolgt werden (Abbildung 34-I). Bei Verwendung von PBS als physiologischen BGE war es möglich, eine teilweise Auftrennung der Signale von rDmCyp20-GFP und -p24-Komplex zu erhalten, wobei das Signal des freien Proteins mit steigender p24-Konzentration ebenfalls

in das Komplexsignal übergang (Abbildung 34-II). Besonders vorteilhaft war die wesentlich kürzere Analysezeit im CE-Assay, verbunden mit einem geringeren Materialverbrauch, wobei die Proben final noch für nachfolgende Analysen, wie z.B. die Untersuchung der proteolytischen Stabilität, zur Verfügung standen.

Die Spezifität der Interaktion von p24 mit rDmCyp20-GFP konnte mit zwei Kontrollexperimenten gezeigt werden. Die Präinkubation von rDmCyp20-GFP mit equimolaren Mengen CsA verhinderte die Verschiebung des Signals des Fusionsproteins in Gegenwart von p24 (Abbildung 35-I). Die Migrationszeit von rGFP ohne DmCyp20-Fusion blieb nach Inkubation mit p24 unverändert (Abbildung 35-II), so daß eine unspezifische Bindung des Proteinliganden an das fluorogene rGFP ausgeschlossen werden konnte.

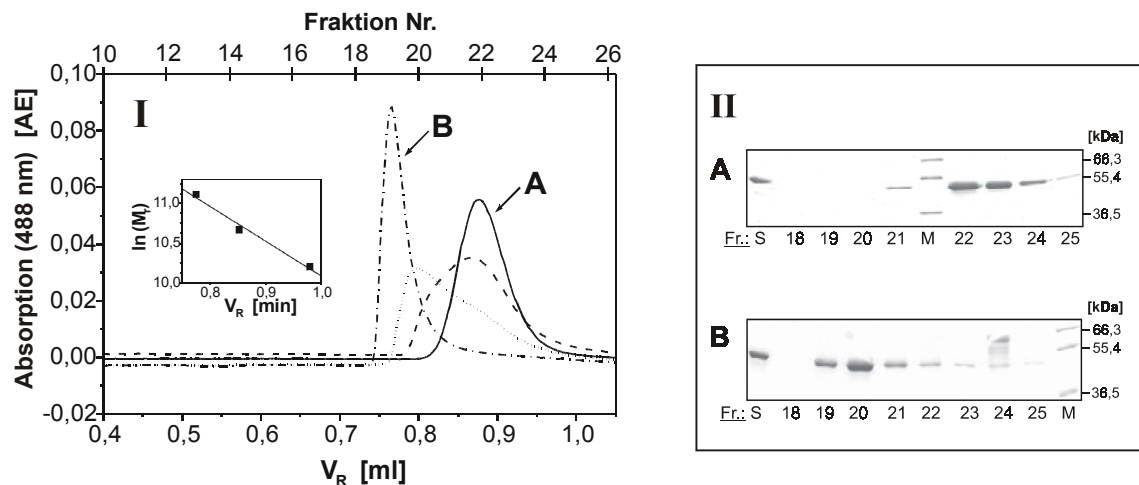


Abbildung 36: Analyse der Bindung zwischen p24 und rDmCyp20-GFP mittels SEC (I) und nachfolgender SDS-PAGE (II). Präinkubierte Proben (15 h, 4 °C) von rDmCyp20-GFP (5 μ M) mit ansteigenden Konzentrationen an p24 (0 μ M, — (A); 6 μ M, ---; 13 μ M,; 55 μ M, - - (B)) wurden mittels SEC (Superdex75) fraktioniert. Die UV-Detektion erfolgte bei $\lambda = 488$ nm, der Anregungswellenlänge der GFP-Fluoreszenz, so daß selektiv noch das Signal von rDmCyp20-GFP erfaßt wurde. Das Eluat der SEC-Säule wurde fraktioniert gesammelt und die Fraktionen anschließend durch SDS-PAGE (12,5%, Coomassie-Färbung) analysiert, um die intakte Form von rDmCyp20-GFP zu verifizieren. Die Numerierung der Gelspuren in II entspricht der Nummer der SEC-Fraktion aus I. Die Spuren S bzw. M enthalten Standards für rDmCyp20-GFP (1 μ g, ohne Inkubation) bzw. für die molekulare Masse. Die eingefügte Grafik (I) zeigt die Kalibration des Elutionsverhaltens der SEC-Säule, die mit Hilfe von rGFP (27 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Rinderserumalbumin (67 kDa) durchgeführt wurde.

Zur Ermittlung einer Dissoziationskonstante für die p24 / rDmCyp20-GFP-Wechselwirkung wurde der Effekt der konzentrationsabhängigen Veränderung der Migrationszeit herangezogen (Abbildung 34-I). Um unspezifische Veränderungen der Trennbedingungen auf Grund der unterschiedlichen Proteingehalte der Proben zu eliminieren, wurde die elektrophoretische Mobilität des rDmCyp20-GFP-Signals

(Gleichung 13, S. 46) berechnet und gegen die eingesetzte Konzentration an p24 aufgetragen (Abbildung 37-I).

Die Auswertung erfolgte durch Anpassung einer Bindungskurve an die Daten mit Hilfe von nichtlinearer Regression unter Verwendung von Gleichung 14 (S. 47), wodurch eine Dissoziationskonstante von $20 \pm 1,5 \mu\text{M}$ bestimmt wurde.

Anschließend wurde die Cyclophilin-p24-Interaktion mit SEC untersucht, um mit Hilfe einer unabhängigen Methode Vergleichswerte hinsichtlich der qualitativen und quantitativen Auswertung zu erhalten. Für die SEC-Analyse wurden Proben wie für die ACE-Untersuchung hergestellt. Die Bildung eines p24 / rDmCyp20-GFP-Komplexes führte auf Grund der Veränderungen in Masse und Größe zu einer Verringerung des Retentionsvolumens des Analyten rDmCyp20-GFP. Mit steigender Konzentration an p24 in den Proben kam es zu einer kontinuierlichen Verschiebung des rDmCyp20-GFP-Signals zu einem geringeren Retentionsvolumen (Abbildung 36-I).

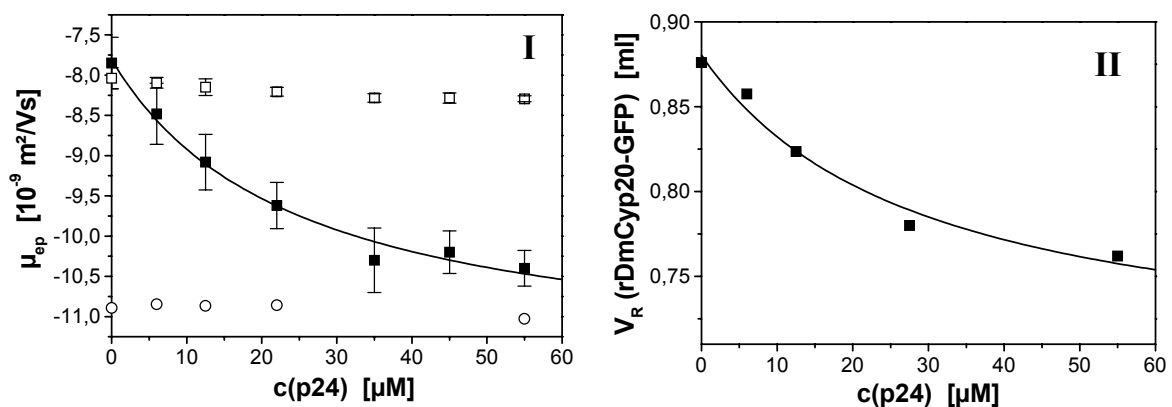


Abbildung 37: Auswertung der ACE- und SEC-Messungen zur Quantifizierung der rDmCyp20-GFP-p24-Interaktion. Die Auftragung der elektrophoretischen Mobilität der ACE- (I) bzw. des Retentionsvolumens der SEC-Analyse (II) von rDmCyp20-GFP (■) gegen die Konzentration an p24 wurde durch nichtlineare Regression (Gleichung 14) ausgewertet. Die ermittelten Dissoziationskonstanten für ACE bzw. SEC von $20 \pm 1,5 \mu\text{M}$ bzw. $23 \pm 3 \mu\text{M}$ zeigten untereinander eine gute Übereinstimmung. In Kontrollexperimenten wurde beim Einsatz von rGFP (○) bzw. [CsA-rDmCyp20-GFP] (□) anstelle von rDmCyp20-GFP eine konstante elektrophoretische Mobilität nach Inkubation mit p24 beobachtet. Jeder Datenpunkt der ACE-Messungen (I) stellt den Mittelwert einer Vierfachbestimmung dar.

Darüber hinaus deutete die Veränderung des gaußförmigen Signals in eine mit "tailing" behaftete Form auf die dynamische Einstellung eines Komplexgleichgewichts hin, das während der chromatographischen Trennung permanent gestört wurde. Durch Untersuchung der während der SEC-Trennungen gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE konnte ferner das veränderte Elutionsverhalten von rDmCyp20-GFP verifiziert und ein Abbau ausgeschlossen werden (Abbildung 36-II).

Durch Auftragung des ermittelten Retentionsvolumens für rDmCyp20-GFP gegen die eingesetzte Konzentration an p24 konnte eine Dissoziationskonstante von $23 \pm 3 \mu\text{M}$ ermittelt werden, indem unter Verwendung von Gleichung 14 (S. 47) und nichtlinearer Regression eine Bindungskurve angepaßt wurde (Abbildung 37-II).

Die ermittelten Werte für K_D der ACE- und SEC-Analyse von $20 \pm 1,5 \mu\text{M}$ bzw. $23 \pm 3 \mu\text{M}$ zeigten eine gute Übereinstimmung und entsprachen dem Bereich, der bereits durch native PAGE abgeschätzt wurde.

4.3.2 Cyclophilin-Interaktionen in Zell-Lysaten

In der Literatur wurden GFP-Fusionsproteine überwiegend benutzt, um deren intrazelluläre Verteilung (Fluoreszenzmikroskopie [KAM *et al.*, 2001]) oder Mobilität (Fluoreszenz-korrelationsspektroskopie [BROCK *et al.*, 1999]) zu analysieren. In der ACE wurde die Anwendung solcher Fusionsproteine zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Zellhomogenaten bisher noch nicht publiziert. Ziel der Experimente war es, eine Interaktion von DmCyp20 unter Verwendung von rDmCyp20-GFP in Zellhomogenaten nachzuweisen. Dazu war es notwendig, ein universelles Homogenisationsverfahren für *D. melanogaster* zu entwickeln und Trennbedingungen zu finden, unter denen die Protein-Protein-Komplexe spezifisch und reproduzierbar detektiert werden konnten.

Als Referenzmethode und zur Klärung methodischer Probleme, wie proteolytischem Abbau von rDmCyp20-GFP, diente die SEC. Präinkubierte Proben von rDmCyp20-GFP und zytosolischem Extrakt von *D. melanogaster*-Embryonen wurden an einer Superdex 75 analysiert.

Für die selektive Detektion von rDmCyp20-GFP kam die Messung der Absorption bei der Anregungswellenlänge der GFP-Fluoreszenz zum Einsatz, da am verwendeten SMART-Chromatographiesystem eine Beschränkung auf UV/VIS-Detektion vorlag (Abbildung 38-I). Die in Abbildung 38-I abgebildeten Chromatogramme zeigten, daß die gewählten Homogenisations- und Pufferbedingungen eine gute Trennung ermöglichten.

Eine selektive Absorptionsdetektion in der SEC war nicht möglich, da das Signal von rDmCyp20-GFP durch die Absorption unbekannter Proteine des Zell-Lysates ähnlicher Retentionsvolumina überlagert wurde (Abbildung 38-I, *). Putative Komplexe waren aus analogen Gründen unter diesen Bedingungen nicht detektierbar. Daher wurden die durch

SEC großenfraktionierten Proben nachfolgend durch SDS-PAGE- und *western-blot*-Analyse untersucht. Mit einem spezifischen Anti-GFP-Antikörper konnte die Verschiebung eines Teils des eingesetzten Fusionsproteins rDmCyp20-GFP zu geringerem Retentionsvolumen um zwei Fraktionen nachgewiesen werden (Abbildung 38-II).

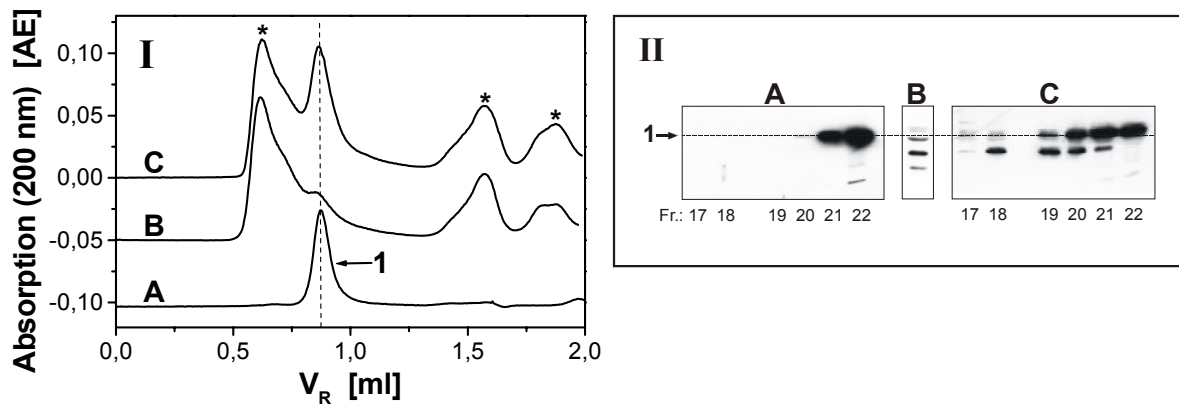


Abbildung 38: Nachweis der Komplexbildung von rDmCyp20-GFP mit zellulären Komponenten in *D. melanogaster* durch SEC (I) und nachfolgender SDS-PAGE- und *western-blot*-Analyse (II). Nach der Inkubation (15 h, 4°C) von rDmCyp20-GFP (5 µM; 1) mit Lysat embryonaler *D. melanogaster*-Zellen (C) bzw. mit Aufschlußpuffer (A) wurden die Proben mittels SEC (Superdex 75) analysiert. Da auf Grund von endogenen Signalen des Zellaufschlusses (*; B) bei der UV-Detektionswellenlänge $\lambda = 488$ nm keine selektive Detektion der GFP-Fusion möglich war, wurde das in Fraktionen gesammelte Eluat nach SDS-PAGE (15%) und Elektrottransfer mit einem Anti-GFP-Antikörper detektiert. Die in II dargestellten Fraktionen 17 bis 22 entsprechen dem Elutionsvolumen von 0,68 bis 0,88 ml. Die Kalibration des Elutionsvolumens entspricht der in Abbildung 36-I gezeigten.

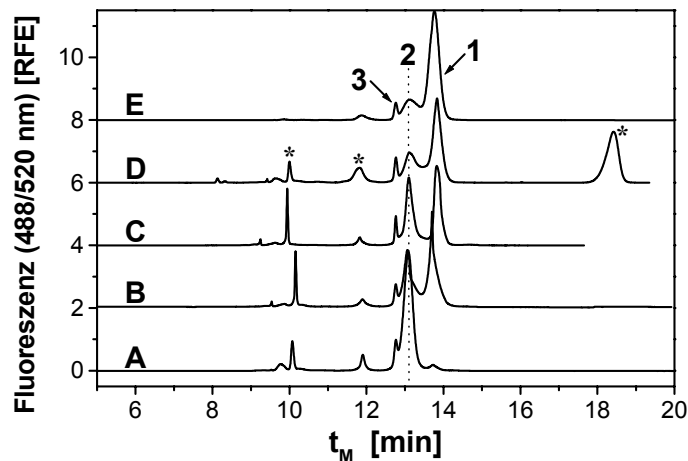


Abbildung 39: Nachweis einer entwicklungsabhängigen Interaktion in *D. melanogaster* durch ACE. rDmCyp20-GFP (1, 100 nM) und Zell-Lysate verschiedener Entwicklungsstadien von *D. melanogaster* (Embryonen, A; Larven, B; Puppen, C; Adulte, D) wurden inkubiert (15 h, 4°C) und mittels CE (PACE) analysiert. Die Detektion eines putativen Komplexes (2) in Form eines zusätzlichen Fluoreszenzsignals ließ auf die Bindung von rDmCyp20-GFP an einen endogenen Liganden, der einer entwicklungsabhängig abnehmenden Expression in *D. melanogaster* unterliegt, schließen. Die Migrationszeiten wurden zur besseren Anschaulichkeit auf den internen Standard Fluorescein (3) normiert. Die Zell-Lysate wiesen eine Gesamtproteinkonzentration von 6,5 mg/ml für Embryonal-, Larven- und Puppen- bzw. 2,5 mg/ml für das adulte Stadium auf (Bestimmung nach BRADFORD). Zusätzliche Fluoreszenzsignale, die durch unbekannte Komponenten des Zell-Lysats verursacht wurden, sind durch * gekennzeichnet.

Die zusätzlichen Proteinbanden im Bereich molekularer Masse von 25 bis 45 kDa waren nicht auf die Proteolyse von rDmCyp20-GFP, sondern auf Kreuzreaktivitäten des Anti-GFP-Antikörpers mit Proteinen des Zell-Lysates zurückzuführen (Abbildung 38-II B).

Der Einsatz von ACE-LIF konnte die Probleme der direkten Erfassung des Fusionsproteins in komplexen Gemischen durch UV/VIS-Detektion beseitigen. Darüber hinaus wurde der Verbrauch an Probenvolumen reduziert und der Zeitrahmen der Interaktionsanalyse erheblich verkürzt. Proben, in denen rDmCyp20-GFP und Zell-Lysat präinkubiert vorlagen, wurden kapillarelektrophoretisch analysiert.

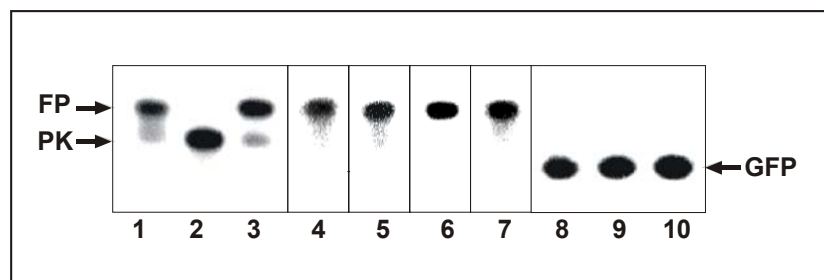


Abbildung 40: Nachweis einer entwicklungsabhängigen Interaktion in *D. melanogaster* durch native PAGE. rDmCyp20-GFP (6 μM) wurde in Aufschlußpuffer (1) bzw. mit Zell-Lysaten verschiedener Entwicklungsstadien von *D. melanogaster* (Embryonen, 2; Adulte, 3) inkubiert und durch native PAGE analysiert. Für rDmCyp20-GFP (FP) wurde nach Inkubation mit embryonalem Zell-Lysat eine komplette Verschiebung der Proteinbande in das Signal eines putativen Protein-Ligand-Komplexes (PK) beobachtet, die für adultes Zell-Lysat nur partiell detektiert werden konnte. In Kontrolleexperimenten wurde rDmCyp20-GFP (6 μM) mit Zell-Lysaten anderer Spezies mit gleicher Proteinkonzentration (Rinderserumalbumin, 4; *S. cerevisiae*-Cytosol, 5; T-Zell-Lysat, 6; *E. coli*-Lysat, 7) unter gleichen Bedingungen inkubiert und analysiert. Um eine Interaktion auf Grund der GFP-Fusion auszuschließen, wurde darüber hinaus rGFP (6 μM) in Aufschlußpuffer (8) bzw. mit Zell-Lysaten verschiedener Entwicklungsstadien von *D. melanogaster* (Embryonen, 9; Adulte, 10) inkubiert. In den Kontrolleexperimenten konnte keine Bandenverschiebung detektiert werden. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch direkte Fluoreszenzdetektion im Gel. Die Proteinkonzentrationen der Zell-Lysate entsprachen den in Abbildung 39 angegebenen.

Die Elektropherogramme in Abbildung 39 zeigten, daß durch Interaktion möglicher zellulärer Liganden mit rDmCyp20-GFP eine Veränderung im Signalmuster auftrat. Das Signal des Fusionsproteins (Abbildung 39 E) wurde nach Inkubation mit embryonalem Zell-Lysat bei einer veränderten Migrationszeit detektiert (Abbildung 39 A). Neben den Fluoreszenzsignalen für rDmCyp20-GFP und dem internen Standard Fluorescein traten noch Signale auf, die auf Inhaltsstoffe des Lysats zurückzuführen waren (Abbildung 39 *). Der oder die potentiellen Liganden für rDmCyp20-GFP scheinen entwicklungspezifisch exprimiert zu werden. Der Vergleich der Elektropherogramme für Proben verschiedener Entwicklungsstufen zeigten einen Übergang des Signals für das freie Fusionsprotein in das Signal des putativen Ligandkomplexes (Abbildung 39 D bis A). Die Ergebnisse der ACE-Untersuchungen konnten mit Hilfe von "gel-shift"-Experimenten in der nativen PAGE

verifiziert werden. Eine vollständige Verschiebung der rDmCyp20-GFP-Bande erfolgte nur nach Inkubation mit embryonalen Zell-Lysat (Abbildung 40-I, Spur 2), während im Fall des adulten Entwicklungsstadiums nur etwa 5 % des Proteins als Komplex vorlagen (Abbildung 40-I, Spur 3).

Durch Kontrollexperimente wurde die Spezifität der beobachteten Interaktionseffekte überprüft. Weder durch Inkubation von rDmCyp20-GFP mit Zell-Lysaten anderer Spezies (*S. cerevisiae*, T-Zellen, *E. coli*; Abbildung 40-I, Spuren 5 bis 7) noch durch die Verwendung von rGFP ohne DmCyp20-Fusion (Abbildung 40-II) konnte eine Veränderung der Migrationseigenschaften beobachtet werden.

5 Diskussion

ACE-Analyse der rhCyp18-CsA-Interaktion

Die am häufigsten angewandte Methode zur Charakterisierung von CsA-Cyclophilin-Interaktionen ist die Messung der Inhibierung der enzymatischen Aktivität von Cyclophilin, der *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen in Peptidderivaten [FISCHER *et al.*, 1984; JANOWSKI *et al.*, 1997]. Andere Verfahren, wie z.B. Oberflächen-Plasmon-Resonanzmessungen [ZEDER-LUTZ *et al.*, 1995], Enzym-Immunoassay [RYFFEL *et al.*, 1993] oder Affinitätschromatographie [SANTOS *et al.*, 2000] wurden ebenfalls eingesetzt, sind aber stets mit der Problematik der Fixierung eines Wechselwirkungspartners an einem festen Träger verbunden.

Die Bildung eines Protein-Ligand-Komplexes aus rhCyp18 und CsA kann durch ACE in Lösung verfolgt werden. Im Gegensatz zu anderen Trennverfahren, die auf Grund mangelnder Auflösung (SEC) oder destabilisierender Bedingungen für den gebildeten Komplex (HPLC) nicht einsetzbar sind, kann mittels CE-Analyse zwischen freiem rhCyp18 und rhCyp18-CsA-Komplex durch Detektion getrennter Signale differenziert werden. Durch die Komplexbildung zwischen rhCyp18 und CsA kommt es lediglich zu einer Zunahme der molekularen Masse des Komplexes um ca. 7 %, während der Ladungszustand unverändert bleibt. Obwohl der so verursachte Unterschied der elektrophoretischen Mobilität zwischen rhCyp18 und rhCyp18-CsA-Komplex nur gering ist, können die beiden Spezies separiert werden. Mit Hilfe der ACE-Methode läßt sich der Komplexbildungsgrad für rhCyp18 mit CsA unter verschiedenen Inkubationsbedingungen beobachten. Zusätzlich kann die Interaktion von rhCyp18 mit Cyclosporin-Derivaten untersucht und relativ zu den für die Komplexbildung mit CsA ermittelten Ergebnissen beurteilt werden. Damit ist die vollständige Inhibierung des eingesetzten rhCyp18 bei bestimmten Versuchsbedingungen bzw. der Einfluß des zu untersuchenden CsA-Derivats mit Hilfe einer vom enzymatischen Aktivitätstest für Cyclophilin unabhängigen Methode erfaßbar.

Durch Inkubation von CsA mit rhCyp18 unter den beschriebenen Bedingungen (30 min, 22 °C) findet eine vollständige Bindung von CsA statt. Im Fall der Inkubation equimolarer Mengen wird allein ein Signal für den gebildeten Komplex detektiert. Dieses Ergebnis stimmt mit dem erwarteten Komplexierungsgrad von 99 % überein, der sich unter

Verwendung der bekannten Dissoziationskonstante $K_D = 1,6 \text{ nM}$ [FISCHER, 1994] dieser Wechselwirkung und den eingesetzten Stoffmengen im Bereich von 10^{-6} M berechnen läßt (siehe Gleichung 2, S. 12).

In der Literatur wurden Ergebnisse der Interaktionsanalyse der PPIase FKBP12 mit dem Inhibitor FK506 veröffentlicht [HSIEH *et al.*, 1995], die durch CE-MS-Analyse von inkubierten Proben von FKBP12 und FK506 (jeweils $50 \text{ }\mu\text{M}$) trotz der bekannten Dissoziationskonstante von $K_D = 1,7 \text{ nM}$ [FISCHER, 1994] einen erheblichen Anteil von unkomplexiertem FKBP12 nachweisen konnten. Für die rhCyp18-CsA-Wechselwirkung wurde ein solches Verhalten nicht gefunden, obwohl für die rhCyp18-CsA- bzw. FKBP12-FK506-Interaktion ähnliche Dissoziationskonstanten vorliegen und die Untersuchungen unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden. Eine mögliche Erklärung für dieses abweichende Ergebnis der FKBP12-FK506-Interaktion ist, daß für die Inkubation mit FK506 teilweise inaktives FKBP12 verwendet wurde, das FK506 nicht mehr binden kann.

Auf Grund der Nachweisgrenze der UV-Detektion in der CE sind Konzentrationen von 10^{-6} M erforderlich. In der ACE sollten die eingesetzten Konzentrationen von Protein und Ligand im Bereich von $0,1 \cdot K_D$ bis $10 \cdot K_D$ liegen [BOSE *et al.*, 1997], um die erhaltene Bindungskurve quantitativ auswerten zu können (Abbildung 41).

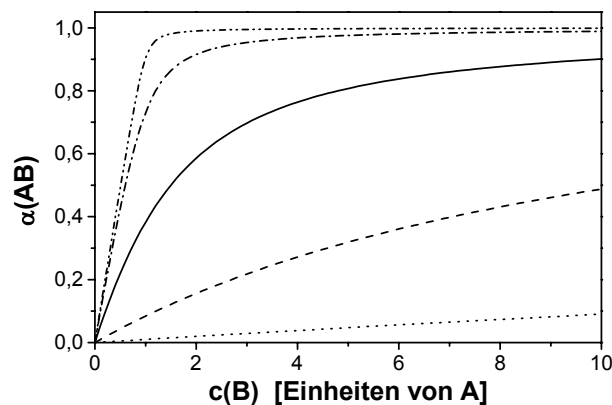


Abbildung 41: Simulierte Bindungskurven für die Reaktion $A + B \rightleftharpoons AB$ für unterschiedliche Verhältnisse von $[A]_0$ und K_D . Durch Anwendung von Gleichung 14 wurden unter der Annahme $K_D = 100 \cdot [A]_0$ (.....); $10 \cdot [A]_0$ (- -); $[A]_0$ (-); $0,1 \cdot [A]_0$ (- - -) bzw. $0,01 \cdot [A]_0$ (- - - -) Bindungskurven berechnet.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante der rhCyp18-CsA-Interaktion durch ACE ist damit nicht möglich, weil sich Bindungskonstante und eingesetzte Protein- bzw. Inhibitorkonzentration um den Faktor von ca. 10^4 unterscheiden. Dadurch liegt das

Gleichgewicht nahezu vollständig auf Seiten des Komplexes, so daß praktisch kein freies Protein vorhanden und so eine quantitative Auswertung, z.B. durch SCATCHARD-Auftragung, nicht möglich ist.

Die Cyclosporin-Derivate CsH, [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA und [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA zeigten im Vergleich zu CsA veränderte Affinitäten gegenüber rhCyp18, die durch die Intensität des Signals für das nicht komplexierte rhCyp18 charakterisiert wurden.

Im Fall des nichtbindenden Derivats CsH, das durch den Einbau von D- anstelle von L-Methyl-Valin im CsA-Molekül in Position 11 erzeugt wird [HANDSCHUMACHER *et al.*, 1984; KITAGAKI *et al.*, 1997], konnte kein Signal für den potentiellen rhCyp18-CsH-Komplex detektiert werden. Auf Grund der geringen strukturellen Änderung im Liganden sollte der Komplex die gleichen elektrophoretischen Eigenschaften wie [rhCyp18-CsA] haben. Das ausbleibende Komplexsignal diente damit zum Nachweis der Spezifität des beobachteten Effekts der rhCyp18-CsA-Interaktion.

Für die Interaktion von rhCyp18 mit [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA, das durch Phosphorylierung der Aminosäure in Position 1 synthetisiert wurde [ZHANG, 2001], konnte ebenfalls kein Komplexsignal detektiert werden. Die negative Ladung, die das Molekül nach der Modifikation unter den Versuchsbedingungen (pH = 8,0) trägt, verursachte veränderte elektrophoretische Eigenschaften für [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA und den putativen Komplex mit rhCyp18. Unter den verwendeten Trennbedingungen mit einem basischen BGE wurde beim Vergleich von CsA und [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA durch die Einbringung der negativen Ladung eine Detektion des [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA-Signals mit einer höheren Migrationszeit erwartet. In den durchgeführten Versuchen konnte jedoch weder ein Signal für [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA noch für einen rhCyp18-[O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA-Komplex detektiert werden. Das Fehlen des [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA-Signals wird durch die eingesetzten Konzentrationen, die unterhalb der Nachweisgrenze liegen, verursacht. Auf Grund des nicht detektierbaren Komplexsignals und der konstanten Signalintensität für rhCyp18 nach Inkubation mit ansteigender [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA-Konzentration wurde geschlußfolgert, daß [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA, wie auch CsH, nicht an Cyp18 bindet.

Durch die Modifikation von CsA mit Biotin in Position 8 wird der Ladungszustand des Moleküls nicht verändert. Die Migrationseigenschaften von [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA entsprechen unter den verwendeten Trennbe-

dingungen denen von CsA. Die Affinität gegenüber rhCyp18 wird herabgesetzt, wenngleich keine so drastische Beeinflussung wie im Fall der Phosphorylierung in Position 1 vorliegt. Bei der Untersuchung vorinkubierter Proben equimolarer Konzentrationen von [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA und rhCyp18 wurde im Gegensatz zu CsA keine vollständige Komplexbildung beobachtet. Statt dessen deutet ein Verhältnis von freiem rhCyp18 und rhCyp18-[O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA-Komplex von ca. 1:1 auf eine geringere Affinität mit einer Dissoziationskonstante im Bereich von 10⁻⁶ M hin. Eine genauere Bestimmung der Dissoziationskonstante durch Präinkubationsversuche war auf Grund der unvollständigen Trennung von freiem Protein und Komplex nicht möglich.

Einsatz von EMMA zur Quantifizierung von Protein-Ligand-Interaktionen

Durch Anwendung des EMMA-Konzepts auf Protein-Ligand-Interaktionen kann die Wechselwirkung von rhCyp18 und CsA-Derivaten quantifiziert werden. Hierbei wurde die Kapillare als Reaktionsgefäß, in der die Zonen der Reaktanden durchmischt werden, genutzt, ein Prinzip, das für Enzymreaktionen in der biochemischen Analyse Anwendung gefunden hat [REGNIER *et al.*, 1995]. Es konnte gezeigt werden, daß sich EMMA auch für die Analyse von Protein-Ligand-Wechselwirkungen eignet. Die Verfolgung der Reaktion zwischen rhCyp18 und CsA wird durch die Veränderung der elektrophoretischen Eigenschaften von rhCyp18 während der Bildung des rhCyp18-CsA-Komplexes ermöglicht. Verursacht wird die Veränderung der elektrophoretischen Eigenschaften durch die Bildung des rhCyp18-CsA-Komplexes während der Elektrophorese. Auf Grund der Reaktion in der Kapillare bildet sich eine, in der Zusammensetzung von der eingesetzten Stoffmenge an CsA abhängige, gemischte Population von freiem rhCyp18 und [rhCyp18-CsA]. Im Gegensatz zu den Präinkubationsexperimenten gibt es keine eng begrenzte Startfront, sondern mit der Passage der rhCyp18-Probezone durch die CsA-Probezone wird immer wieder Komplex gebildet, der eine geringfügig andere Startposition der elektrophoretischen Trennung hat. Die dadurch ausgelöste Zonenverbreiterung führt dazu, daß freies Protein und Protein-Ligand-Komplex in einem Signal am Detektor erscheinen. Die Mobilität dieses Signals liegt daher zwischen den Extremwerten, die durch die Mobilitäten von rhCyp18 bzw. [rhCyp18-CsA] bestimmt werden, und ist vom Anteil des in der Kapillare komplexierten rhCyp18 abhängig. Die dieser Reaktion zugrunde liegende

Dissoziationskonstante kann somit durch Anpassung einer vom Massenwirkungsgesetz abgeleiteten Gleichung (Gleichung 14, S. 47) an die experimentell ermittelten Daten in einer Auftragung der elektrophoretischen Mobilität gegen die eingesetzte Konzentration an CsA bestimmt werden.

Die Auswertung der Bindungskurven unterliegt ähnlichen Limitationen wie sie für die Präinkubationsversuche beschrieben wurden (Abbildung 41). Für die Interaktion zwischen rhCyp18 und CsA war daher nur eine Abschätzung der Dissoziationskonstante im Bereich von $K_D = 1$ bis 100 nM durch Kurvensimulation möglich, da die Kurvenanpassung durch nichtlineare Regression nicht konvergierte. Dies war durch den großen Unterschied zwischen der notwendigerweise einzusetzenden Minimalkonzentration an rhCyp18, die durch die Nachweisgrenze der UV-Detektion bestimmt wird, und der mehrere Größenordnungen niedriger liegenden Dissoziationskonstante begründet.

Im Fall des biotinylierten CsA verlief die Bindungskurve weniger steil, woraus eine Dissoziationskonstante im Bereich von 10^{-6} M durch Vergleich mit simulierten Bindungskurven abgeleitet werden konnte. Die nichtlineare Regression lieferte einen Wert von $K_D = 1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Der durch EMMA ermittelte Wert bestätigt die qualitativen Aussagen der Präinkubationsexperimente, die eine verringerte Affinität von [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA zu rhCyp18 erkennen ließen. Durch Einführung der Biotin-Modifikation in CsA wurde somit das Bindungsverhalten gegenüber dem Rezeptorprotein rhCyp18 stark reduziert. Die Cyclosporinderivate CsH und [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA zeigten, wie schon in den Inkubationsversuchen, auch unter EMMA-Bedingungen keine Affinität zu rhCyp18. Inhibitionsversuche im PPIase-Aktivitätstest ergaben für [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA eine Inhibitionskonstante $IC_{50} \geq 10 \mu\text{M}$ [ZHANG, 2001]. Auf Grund dieser Inhibitionsdaten ist zu erwarten, daß die gebildeten [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA-rhCyp18-Komplexe unter den elektrophoretischen Bedingungen nicht stabil sind, wodurch die Affinität von [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA von der des nichtbindenden CsH durch EMMA nicht mehr zu unterscheiden ist.

Interaktionsanalyse von Cyclophilinen und Peptidliganden durch ACE

Durch Anwendung der ACE ist eine quantitative Interaktionsanalyse von Cyclophilinen und Peptidliganden für einen weiten Affinitätsbereich möglich. Obwohl die ACE auch für die Untersuchung von Wechselwirkungen mit neutralen Liganden geeignet ist, zeigte sich,

daß besonders geladene Liganden gut zu charakterisieren sind [SHIMURA & KASAI, 1997]. Ein Grund dafür ist die Anwendung der *mobility-shift*- anstelle der *equilibrium-mixture*-Analyse, die sich für die Untersuchung von Wechselwirkungen geringerer Affinität eignet. Der labile Analyt-Ligand-Komplex wird während der elektrophoretischen Trennung nur auf Grund der multiplen Wiedereinstellung der Gleichgewichts während der Wanderung durch die Ligandenphase stabilisiert. Die nachfolgend zur Bestimmung der Dissoziationskonstante eingesetzte Änderung der elektrophoretischen Mobilität ist daher besonders groß, wenn beide Haupteinflußgrößen (molekulare Masse und Ladung) verändert werden, ohne daß sich die Effekte gegenseitig kompensieren.

Am Beispiel des Peptid-Gewebshormons Bradykinin konnte die Eignung der ACE zur quantitativen Auswertung von Cyclophilin-Interaktionen schwacher Affinität demonstriert werden. Während in der Literatur Bradykinin als Cyclophilin-Substrat beschrieben wurde, konnte für die Dissoziationskonstante der Interaktion nur eine Abschätzung durch Vergleich mit anderen Substraten von Cyclophilin erfolgen [LONDON *et al.*, 1990; MERKER & DAWSON, 1995]. Mit Hilfe der ACE wurde für die Interaktion zwischen rhCyp18 und Bradykinin eine Dissoziationskonstante von $1,4 \pm 0,1$ mM bestimmt. Limitierend bei der Quantifizierung solcher niederaffinen Wechselwirkungen ist die hohe Konzentration an Ligand, die auf Grund der resultierenden UV-Absorption der Lösung bei $\lambda < 300$ nm das Meßsignal des proteasefreien PPIase-Aktivitätstests stört. Obwohl auch bei den durchgeführten ACE-Messungen der Zusatz des Liganden Bradykinin zum BGE durch den Einfluß auf den EOF und die Qualität der Peakform auf einen Konzentrationsbereich von ≤ 1 mM limitiert ist, konnte auf Grund der guten Reproduzierbarkeit der Meßpunkte im unteren Drittel der Bindungskurve eine Kurvenanpassung zur Bestimmung von K_D durchgeführt werden. Die in Kontrollexperimenten durchgeführte Analyse der Wechselwirkung zwischen Bradykinin und dem rhCyp18-CsA-Komplex demonstrierte anschaulich die Inhibierung der Bradykinin-Cyclophilin-Interaktion durch CsA, wodurch die essentielle Beteiligung des aktiven Zentrums von rhCyp18 an der genannten Wechselwirkung deutlich wurde [LONDON *et al.*, 1990]. Durch Einbeziehung der Ergebnisse der rhCyp18-CsA-Interaktionsanalyse in die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Bradykinin und Cyclophilin gelang es, simultan die Interaktion mit rhCyp18 und die Inhibierung der Wechselwirkung durch CsA zu messen. Die gleichzeitige Nutzung von *equilibrium-mixture*- und *mobility-shift*-Analyse ermöglichte es, eine gemischte Population von rhCyp18 und [rhCyp18-CsA] nach kapillarelektrophoretischer

Trennung hinsichtlich ihrer Affinität gegenüber Bradykinin zu charakterisieren. Durch den Einfluß des im BGE gelösten Liganden kam es zu einer unterschiedlichen Beeinflussung der elektrophoretischen Mobilität von rhCyp18 bzw. [rhCyp18-CsA].

Die am Beispiel der Bradykinin-Cyclophilin-Interaktion vorgestellte ACE-Methode ist vielfältig einsetzbar. Trotzdem ergeben sich bei der Untersuchung von Protein-Peptid-Wechselwirkungen Limitationen, die auf das Prinzip des Meßsystems oder Eigenschaften des Peptidliganden zurückzuführen sind. Die Bindung des Tetrapeptidderivats Suc-AFPF-pNA , das als Substrat für spektroskopische PPIase-Aktivitätstests eingesetzt wird [HARRISON & STEIN, 1990b], und des Tetrapeptids AAPA an rhCyp18 konnte durch ACE-Analyse nicht untersucht werden. Obwohl für die genannten Peptidsubstrate vergleichbare Bindungskonstanten zu erwarten sind wie für Bradykinin [HARRISON & STEIN, 1990a], konnte keine Affinität in Form einer Mobilitätsverschiebung des rhCyp18-Signals detektiert werden. Wahrscheinlich bleibt die Veränderung der elektrophoretischen Mobilität von rhCyp18 in Gegenwart der genannten Peptidsubstrate aus, weil die Bindung des kleinen Peptidliganden weder den hydrodynamischen Radius noch die Ladung des Komplexes im Vergleich zum Protein entscheidend ändert und somit die elektrophoretischen Eigenschaften trotz erfolgter Interaktion unverändert bleiben. Eine andere Möglichkeit ist, daß sich die Änderungen des hydrodynamischen Radius und der Ladung gegenseitig aufheben.

Nachdem die Anwendung der ACE bei der Interaktionsanalyse von rhCyp18 mit verschiedenen Liganden gezeigt werden konnte, wurde die Eignung der ACE für die Untersuchung der Bindungseigenschaften differenter Cyclophiline getestet. Für die Wechselwirkung zwischen dem HIV-Capsidprotein p24 und Cyclophilinen wurden die Aminosäuren $\text{G}^{89}\text{-P}^{90}$ im p24 als essentiell für die Interaktion mit dem aktiven Zentrum des Cyclophilins charakterisiert [COLGAN *et al.*, 1996]. Von der Aminosäuresequenz dieser Cyclophilin-Bindungsstelle in p24 abgeleitete 25mer-Oligopeptide wurden verwendet, um die Eigenschaften dieser Wechselwirkung zu untersuchen [SCHUTKOWSKI *et al.*, 1999]. Durch ACE-Messungen konnten Dissoziationskonstanten für die Interaktion des Peptides $\text{Ac-}^{81}\text{DRVHPVHAGP-Bpa-APGQ-Nle-REPRGSDIA}^{105}\text{-NH}_2$ mit rhCyp18 und rDmCyp20 durch *mobility-shift*-Analyse bestimmt werden. Der ermittelte K_D -Wert für die Interaktion mit rhCyp18 von $197 \pm 32 \mu\text{M}$ weist eine gute Übereinstimmung mit der im PPIase-Aktivitätstest bestimmten Inhibitionskonstante von $159 \pm 3,1 \mu\text{M}$ [SCHUTKOWSKI *et al.*, 1999] auf. Die aus der Literatur bekannte Bedeutung der $\text{G}^{89}\text{-P}^{90}$ -Bindung als Cyclophilin-

Interaktionsstelle sowohl im p24-Protein [FRANKE *et al.*, 1994] als auch in den abgeleiteten Oligopeptiden [SCHUTKOWSKI *et al.*, 1999] konnte durch Bindungsanalyse einer entsprechenden P⁹⁰A-Variante des Peptides verifiziert werden. Nachdem durch Austausch des Prolins dieses entscheidende Bindungsmotiv für Cyclophilin geändert wurde, konnte in der ACE keine Interaktion mit rhCyp18 detektiert werden. Eine Blockierung des aktiven Zentrums in rhCyp18 durch die Bindung von CsA führt gleichfalls zur Inhibierung der Interaktion mit p24 [THALI *et al.*, 1994]. ACE-Kontrollexperimente, die zur Überprüfung der Spezifität der erhaltenen Bindungsdaten für die rhCyp18-Peptid-Interaktion durchgeführt wurden, zeigten ebenfalls eine komplette Inhibierung der Wechselwirkung, wenn [rhCyp18-CsA] anstelle von rhCyp18 eingesetzt wurde. Für rhCyp18 bzw. rDmCyp20 wurden unterschiedliche Dissoziationskonstanten von $197 \pm 32 \mu\text{M}$ bzw. $106 \pm 18 \mu\text{M}$ für die Wechselwirkung mit dem aus p24 abgeleiteten Oligopeptid bestimmt. Die höhere Affinität des Peptidliganden zu rDmCyp20 kann mit einer Stabilisierung der Bindung durch ein vom aktiven Zentrum distinktes Bindungsmodul in rDmCyp20 erklärt werden. Die in rDmCyp20 identifizierte potentielle WW-Domäne, die im nachfolgenden Abschnitt diskutiert wird, steuert, zusätzlich zur Interaktion im aktiven Zentrum der PPIase, einen Beitrag zur Bindung des Peptidliganden bei.

Die Kombination der Untersuchungen Cellulose-gebundener Peptidbibliotheken mit ACE-Messungen stellt eine alternative Methode zur schnellen Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen dar. Die Bindungsanalyse mit Hilfe der Cellulose-gebundenen Peptidbibliotheken liefert Informationen über mögliche Stellen der Ligandenbindung in der Aminosäuresequenz des Zielproteins. Nach Identifikation solcher Sequenzen können diese synthetisiert und durch ACE als unabhängige Methode hinsichtlich ihrer Affinität in Lösung überprüft sowie durch Dissoziationskonstanten charakterisiert werden. Durch Vergleich der Aminosäuresequenz von rDmCyp20 mit typischen Proteinbindungsmodulen konnten Sequenzmerkmale einer potentiellen Proteininteraktionsdomäne mit Ähnlichkeit zu bekannten WW-Domäne-Strukturen identifiziert werden. Entscheidendes Kriterium war dabei die Anordnung von W¹⁰⁵ und W¹²⁹ in der Aminosäuresequenz von rDmCyp20 im Abstand von 23 Aminosäuren [SUDOL, 1996]. Ein weiterer Hinweis war die typische Anordnung von zwei aromatischen Aminosäuren (F¹²⁰-F¹²¹) zwischen W¹⁰⁵ und W¹²⁹ [MACIAS *et al.*, 2000]. Die Aminosäuresequenz WXXP, ausgehend vom zweiten Tryptophan der WW-Domäne, als zusätzliches charakteristisches Merkmal ist in rDmCyp20 nicht vorhanden (siehe Abbildung 29, S. 73). Die Existenz von Proteinbindungsdomänen in

Multidomänen-PPIasen, die strukturell getrennt von der Isomerasedomäne vorliegen, ist bekannt [LU *et al.*, 1999; SCHIENE-FISCHER & YU, 2001]. Darüber hinaus wurden auch in Eindomänen-PPIasen, wie hCyp18, Proteinbindungsmodule identifiziert, die zwar eine vom aktiven Zentrum der PPIase distinkte Domänenstruktur besitzen, aber trotzdem überlappende Bereiche der Aminosäuresequenz aufweisen [SCHUTKOWSKI *et al.*, 1999]. Entsprechend ihrer Ligandenbindung unterscheidet man fünf Klassen von WW-Domänen, die alle verschiedenartige prolinhaltige Strukturen erkennen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Interaktionsmodule von WW-Domänen nach [KAY *et al.*, 2000; KASANOV *et al.*, 2001].

WW-Domäne	Beispiel	Bindungsmotiv
Klasse I	Yes assoziiertes Protein	(P) PXY
Klasse II	Formin-Bindeproteine	PPPPPL/R
Klasse III	Formin-Bindeproteine	PXXGMXPP
Klasse IV	hPin1	pS/pTP
Klasse V	Npw-Bindeprotein	RXPPGPPXR

Am Beispiel des *D. melanogaster*-Proteins CAPPUCINO, das auf Grund seiner Aminosäuresequenz einen potentiellen WW-Liganden darstellt [MAHONEY *et al.*, 1997], wurde die Interaktion mit Cyp20 als Fusionsprotein rDmCyp20-GFP untersucht. Die Verwendung der GFP-Fusion ermöglicht eine einfache Detektion des an die Peptidspots gebundenen Proteins direkt auf der Cellulosemembran, wodurch die sonst erforderliche Elektrotransferprozedur mit nachfolgender Antikörper-Detektion entfallen kann [RÜDIGER *et al.*, 1997], was eine erhebliche Verkürzung der Analysezeit zur Folge hat.

Von den Peptiden der OPB des CAPPUCINO-Proteins, die eine Bindung von rDmCyp20-GFP aufwiesen, wurden diejenigen für die Interaktionsanalyse in Lösung ausgewählt und in Substanz synthetisiert, die in einer Gruppe bindender Peptidspots lagen, womit die Auswahl auf zwei Bereiche der OPB eingeschränkt werden konnte. Die Untersuchung des Peptids $\text{Ac-HFIVRTYIAQRRK-NH}_2$ war auf Grund der geringen Löslichkeit in wässrigen Lösungen nicht möglich. Daher wurden weitere Interaktionsanalysen auf den zweiten Bereich bindender Peptide ($\text{Ac-NPPKPMRPLYWTR-NH}_2$, $\text{Ac-RPLYWTRIVTSAP-NH}_2$) reduziert, die durch eine prolinhaltige Sequenz und das charakteristische minimale Bindungsmotiv für Klasse I-WW-Domänen PXY gekennzeichnet waren [SUDOL, 1996; KAY *et al.*, 2000].

Mit Hilfe der ACE konnte für das Peptid $_{AC-NPPKPMRPLYWTR-NH_2}$ eine Quantifizierung der bei der Untersuchung der OPB gefundenen Interaktion durchgeführt werden. Für die Wechselwirkung des Peptids mit rDmCyp20-GFP bzw. rDmCyp20 wurden Dissoziationskonstanten von $63 \pm 6 \mu M$ bzw. $19 \pm 2 \mu M$ bestimmt. Die verringerte Affinität von rDmCyp20-GFP im Vergleich zu rDmCyp20 gegenüber $_{AC-NPPKPMRPLYWTR-NH_2}$ kann wahrscheinlich durch die mit der GFP-Fusion verbundene sterische Abschirmung der Bindungsregion und die somit verringerte Zugänglichkeit für das Peptid erklärt werden. Die für die OPB beobachtete Wechselwirkung zwischen $_{AC-RPLYWTRIVTSAP-NH_2}$ und rDmCyp20-GFP konnte durch die ACE-Analyse nicht bestätigt werden. Eine Ursache hierfür ist könnte die N-terminale Verlängerung der Peptidsequenz um eine Peptidbindung durch die Fixierung am Celluloseträger über β -Alanin. Die zusätzliche Peptidbindung und die Fixierung am Träger kann eine veränderte Struktur des Peptids bewirken, die eine höhere Affinität zu rDmCyp20-GFP aufweist und die im Fall der ACE-Analyse in Lösung nicht vorhanden ist.

Abschließend wurde die Interaktion zwischen $_{AC-NPPKPMRPLYWTR-NH_2}$ und rDmCyp20 durch eine Bindungsanalyse mittels ITC verifiziert. Für die bestimmten Dissoziationskonstanten der Interaktion zwischen rDmCyp20 und $_{AC-NPPKPMRPLYWTR-NH_2}$ von ACE ($19 \pm 2 \mu M$) und ITC ($785 \pm 16 \mu M$) wird ein Unterschied von mehr als einer Größenordnungen beobachtet. Trotz dieser großen Differenz konnte mit Hilfe der ITC die durch Interaktionsanalyse mit OPB und ACE gefundene Bindung zwischen rDmCyp20 und $_{AC-NPPKPMRPLYWTR-NH_2}$ bestätigt werden. Das Freiwerden von Bindungswärme kann als Beweis einer Interaktion zwischen dem Peptid und rDmCyp20 interpretiert werden. Eine mögliche Ursache für die erheblich voneinander abweichenden Dissoziationskonstanten ist die Messung bei stark unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen. Während für die ACE eine rDmCyp20-Konzentration von $10 \mu M$ eingesetzt wurde, kam in der ITC rDmCyp20 in einer Konzentration von $445 \mu M$ zum Einsatz. Die hohe Proteinkonzentration in der ITC war für die Messung der Dissoziationskonstante im Bereich von $10^{-5} M$ erforderlich, um eine auswertbare Bindungskurve zu erhalten. Andererseits führt sie aber möglicherweise auch zu einer Aggregation des Proteins rDmCyp20, wodurch die Interaktion mit dem Peptid gestört werden kann [O'BRIEN *et al.*, 2001].

ACE zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen

Die Nutzung der ACE zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurde am Beispiel der Interaktion zwischen rDmCyp20-GFP und p24 demonstriert. Interaktionen zwischen p24 und verschiedenen Cyclophilin-Isoformen sind bekannt [LUBAN *et al.*, 1993; BRAATEN & LUBAN, 2001]. Für die Wechselwirkung zwischen rhCyp18 und p24 wurden Dissoziationskonstanten von $15 \pm 0,7 \mu\text{M}$ bzw. $16 \pm 4 \mu\text{M}$ publiziert [SCHUTKOWSKI *et al.*, 1999; YOO *et al.*, 1997]. Es ist weiterhin bekannt, daß die Interaktion mit p24 durch das aktive Zentrum von Cyp18 vermittelt wird [DORFMAN *et al.*, 1997]. Diese Tatsache wird auch durch die Kompetition um die Bindung am aktiven Zentrum durch p24 und CsA bestätigt [BRAATEN *et al.*, 1997], die zur Inhibition der Wechselwirkung von Cyp18 und p24 durch das affiner bindende CsA führt [THALI *et al.*, 1994]. Auf Grund der starken Sequenzhomologie und strukturellen Ähnlichkeit zwischen Cyp18 und Cyp20 (U. Reimer, persönliche Mitteilung) kann ein p24-Bindungsverhalten mit vergleichbaren Dissoziationskonstanten angenommen werden.

Die durch ACE ermittelte Dissoziationskonstante von $20 \pm 1,5 \mu\text{M}$ liegt nicht nur in dem durch Vergleich mit der p24-Cyp18-Interaktion postulierten Bereich, sondern zeigt auch eine gute Übereinstimmung mit den durch die unabhängigen Methoden SEC und native PAGE bestimmten bzw. abgeschätzten Werten der Dissoziationskonstante $K_D = 23 \pm 3 \mu\text{M}$ bzw. $K_D \approx 25 \mu\text{M}$. Im Vergleich zur Bindung der abgeleiteten Oligopeptide weist das vollständige p24 eine um etwa eine Größenordnung geringere Dissoziationskonstante auf. Der seltene Einsatz der ACE auf dem Gebiet der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen geringer Affinität ist durch die starke Beeinflussung des elektrophoretischen Trennsystems begründet, die beim Einsatz des Proteinliganden als Pufferzusatz im Rahmen der *mobility-shift*-Analyse auftritt. Der größere Teil der zu diesem Thema publizierten Arbeiten befaßt sich daher mit der Charakterisierung von Protein-Antikörper-Wechselwirkungen [CHU & CHENG, 1998]. Diese Systeme meist hoher Affinität ($K_D \leq 10^{-7} \text{ M}$) wurden durch *equilibrium-mixture*-Analyse und LIF-Detektion untersucht [KORF *et al.*, 1997; TAO & KENNEDY, 1997]. Protein-Antikörper-Interaktionen geringerer Affinität sind auch der *mobility-shift*-Analyse zugänglich, sofern die Protein-Antigene das Trennsystem nicht beeinflussen [LIN *et al.*, 1997]. Auf Grund der limitierten Anzahl entsprechender Proteine und des hohen Substanzbedarfs ist der Einsatz dieses Verfahrens aber stark begrenzt. Andere ACE-Analysen von Protein-Protein-Interaktionen beschränken

sich auf den qualitativen Nachweis der Wechselwirkung [XIAO *et al.*, 1999; YU *et al.*, 2000].

Das in dieser Arbeit verwendete ACE-Verfahren kombiniert Elemente aus *equilibrium-mixture*- und *mobilty-shift*-Analyse [SHIMURA & KASAI, 1997]. Durch die Verwendung präinkubierter Proben wird der Einfluß eines proteinhaltigen Pufferzusatzes auf die Trennleistung des elektrophoretischen Systems vermieden. Der Präinkubationsansatz kann auf Grund der Bildung eines stabilen Protein-Protein-Komplexes aus rDmCyp20-GFP und p24 verwendet werden, was durch die SEC- und PAGE-Untersuchungen verifiziert wurde. Die Stabilität zeigte sich in der nativen PAGE auf Grund der Detektion einer vom Signal des freien Proteins distinkten Bande, wobei hier auch eine zusätzliche Stabilisierung durch den "*caging effect*" des gelelektrophoretischen Trennsystems erfolgt sein kann [FRIED & CROTHERS, 1981]. In der nativen PAGE kann darüber hinaus eine durch Abbau bedingte Bandenverschiebung *per se* nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der SEC hingegen zeigen, daß durch Inkubation von rDmCyp20-GFP mit p24 das Signal von rDmCyp20-GFP zu einem geringeren Elutionsvolumen und damit gleichbedeutend höherer molekularer Masse verschoben wird. Die nachfolgende SDS-PAGE konnte intaktes rDmCyp20-GFP sowohl beim Elutionsvolumen von rDmCyp20-GFP als auch nach Wechselwirkung mit p24 bei verringertem Elutionsvolumen nachweisen. Diese Ergebnisse lassen auf eine langsame Dissoziation des Komplexes im Zeitfenster der SEC-Trennung von ca. 25 min schließen. Für die ACE-Messungen kann auf Grund der noch verkürzten Trennzeit gleiches Verhalten angenommen werden. Die Detektion stabiler Komplexe bei der ACE-Analyse bestimmter schwacher Interaktionen ($K_D \approx 10^{-5}$ M) ist aus der Literatur bekannt [HEEGAARD, 1998].

Die Auswertung der Messungen erfolgte an Hand der Mobilitätsverschiebung, da unter den Trennbedingungen die gemischte Population an freiem rDmCyp20-GFP und dem entsprechenden Komplex mit p24 nicht in getrennte Signale aufgelöst werden konnte. Die veränderliche Mobilität des Signals mit steigender p24-Konzentration in der Probe kann, wie durch die SEC und PAGE gezeigt wurde, auf den steigenden Anteil an Komplex in der Probe zurückgeführt werden und eignet sich damit zur Bestimmung von K_D auch unter diesen "Nicht-Gleichgewichtsbedingungen". Die Auswertung durch eine SCATCHARD-Auftragung scheiterte an der ungenügenden Auflösung des Komplexsignals und des verbleibenden freien Anteiles an rDmCyp20-GFP bzw. p24 sowie der schlechten Quantifizierbarkeit des p24-Signals im Bereich geringer Konzentrationen. Darüber hinaus

wäre eine deutliche Erhöhung des Materialverbrauchs die Folge der Kalibrationsmessungen für p24 gewesen.

Beeinflussung der Eigenschaften von rDmCyp20 durch C-terminale GFP-Fusion

Die C-terminale Fusion von GFP an rDmCyp20 beeinflusst die enzymatischen Eigenschaften von rDmCyp20 nur in geringem Umfang. Die ermittelten Werte für k_{cat}/K_m für rDmCyp20 und rDmCyp20-GFP sind mit den Daten entsprechender Cyclophiline andere Eukaryoten vergleichbar (Tabelle 7, [FISCHER, 1994]). Die für CsA gemessenen Inhibitionsdaten im Bereich von 10^{-8} M stimmen mit den bekannten Werten eukaryotischer Cyclophiline überein.

Tabelle 7: Enzymatische Parameter einiger Cyclophiline

Cyclophilin	k_{cat}/K_m [$10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	IC_{50} (CsA) [10^{-9} M]	Referenz
rDmCyp20-GFP	$2,0 \pm 0,1$	$11,1 \pm 1$	diese Arbeit ^a
rDmCyp20	$2,9 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,6$	diese Arbeit ^a
rhCyp18	$5,1 \pm 0,2$	1,6 (K_i)	[JANOWSKI <i>et al.</i> , 1997] ^a , [FISCHER, 1994] ^b
rhCyp23	6,3	84 ± 13	[PRICE <i>et al.</i> , 1991] ^{b,c}
Cyp20 (Ratte)	$0,9 \pm 0,12$	$3,6 \pm 0,56$ (K_i)	[CONNERN & HALESTRAP, 1992] ^b
bCyp40	$1,92 \pm 0,07$	300	[KIEFFER <i>et al.</i> , 1992] ^{b,c}

K_i : Inhibitionskonstante, ^aSubstrat: Ac-AAPF-DFA, ^bproteasegekoppelter Test, ^cSubstrat Suc-AAPF-pNA, bCyp40: Rinder-Cyclophilin mit einer molekularen Masse von 40 kDa

Beim direkten Vergleich der enzymatischen Parameter von rDmCyp20 und rDmCyp20-GFP zeigte sich eine Verringerung der katalytischen Aktivität um etwa 30% für rDmCyp20-GFP. Für eine 50%ige Hemmung der PPIase-Aktivität von rDmCyp20-GFP wird im Vergleich zu rDmCyp20 etwa die doppelte Konzentration an CsA benötigt. Die höhere Konstante für die Inhibition von rDmCyp20-GFP durch CsA kann mit der Abschirmung des aktiven Zentrums durch den GFP-Teil des Fusionsproteins erklärt werden.

Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in Zell-Lysaten

Ein Ziel der Untersuchung von Protein-Ligand-Interaktionen ist es oft, endogene zelluläre Wechselwirkungspartner untersuchter Zielproteine zu finden. Häufig werden für solche Untersuchungen Zell-Lysate anstelle intakter Zellsysteme verwendet, da Lysate einfacher handhabbar und einer größeren Palette von Analysemethoden zugänglich sind. Das zu untersuchende Zielprotein wird, soweit nicht ohnehin eine entsprechende endogene Expression vorliegt, durch Co-Expression in den Zellen selbst oder extern durch Zugabe zum Lysat dem System zugeführt. Zur Untersuchung von Interaktionen des Zielproteins ist es erforderlich, das Protein und/oder seine Komplexe mit möglichen Liganden selektiv zu erfassen. Neben klassischen Methoden, wie Immunpräzipitation oder Quervernetzung, werden chromatographische und elektrophoretische Trennverfahren eingesetzt, um das Zielprotein im komplexen Gemisch des Zell-Lysats zu identifizieren [PHIZICKY & FIELDS, 1995]. Obwohl die modernen Hochleistungsmethoden eine hohe Trennleistung aufweisen, reicht diese trotzdem oft nicht aus, um das Multikomponentengemisch vollständig aufzutrennen. So wird der zusätzliche Einsatz einer selektiven Detektion, die nur das Zielprotein bzw. seine Protein-Ligand-Komplexe erfaßt, erforderlich. Biochemisch relevante selektive Detektionsverfahren sind Radioaktiv- und Fluoreszenzdetektion [PINGOUD & URBANKE, 1997]. Um diese Detektionsprinzipien anzuwenden, muß die Markierung des Analyten mit einem radioaktiven Isotop bzw. einer Fluoreszenzsonde erfolgen.

Die Einführung der Fluoreszenzmarkierung in das Proteinmolekül kann auf chemischem oder molekularbiologischem Weg erfolgen. Obwohl die chemische Modifizierung von Proteinen ein relativ einfaches Verfahren darstellt, ist ihr Einsatz durch die Bildung inhomogener Produkte und drastischer Beeinflussung der Proteineigenschaften, infolge der für das Protein nicht-nativen Reaktionsbedingungen, stark limitiert [CRAIG & DOVICH, 1998; LIU & SHAROM, 1996]. Durch Fusion mit fluoreszierenden Proteinen (z. B. GFP [TSIEN 1998]) wird ein homogen C- bzw. N-terminal markiertes Protein erzeugt. Trotz der Erhöhung der molekularen Masse auf Grund der Fusionierung mit dem fluorogenen Protein unterliegen die anderen Eigenschaften des Zielproteins meist nur einer geringen Beeinflussung [NEGRO *et al.*, 1997; JARRET & TAYLOR, 1998; WU *et al.*, 2000].

Durch Kombination der CE mit der selektiven Fluoreszenzdetektion unter Verwendung eines GFP-Fusionsproteins konnte ein Verfahren zur Interaktionsanalyse in Zell-Lysaten

etabliert werden. Entsprechende Untersuchungen wurden am Modellorganismus *D. melanogaster* unter Verwendung von Zell-Lysaten und externem Zusatz des Zielproteins rDmCyp20-GFP durchgeführt. Hinweise auf eine Wechselwirkung von rDmCyp20-GFP mit Bestandteilen des Zell-Lysates wurden durch SEC-Analysen präinkubierter Proben erhalten. Die Identifizierung des rDmCyp20-GFP-Signals im komplexen Gemisch des Zell-Lysats war mit Hilfe der UV-Detektion des verwendeten Chromatographiesystems nicht möglich. Diese gerätetechnische Limitation konnte nur durch nachgeschaltete SDS-PAGE- und *western-blot*-Analyse des fraktioniert gesammelten Eluats überwunden werden. Mit Hilfe der *western-blot*-Analyse konnte eine Veränderung des Retentionsverhaltens für rDmCyp20-GFP nach Inkubation mit embryonalem *D. melanogaster*-Zell-Lysat nachgewiesen werden. Das verringerte Retentionsvolumen kann auf Grund des Trennmechanismus der SEC mit einer erhöhten molekularen Masse von rDmCyp20-GFP gleichgesetzt werden, was auf eine Assoziation mit einem putativen Liganden aus dem Zell-Lysat schließen ließ. Die SDS-PAGE- und *western-blot*-Analyse der SEC-Fractionen zeigte neben der verbesserten Selektivität der Detektion auch, daß rDmCyp20-GFP nach Inkubation mit dem Zell-Lysat in intakter Form vorliegt.

Weitere Interaktionsanalysen in *D. melanogaster*-Lysaten wurden mittels ACE durchgeführt. In der ACE ist die Verwendung von Zell-Lysaten als Träger potentieller Liganden auf die *equilibrium-mixture*-Analyse und somit stabile Interaktionen beschränkt. Die Untersuchung möglicher schwacher Wechselwirkungen mittels *mobility-shift*-Analyse ist nur bedingt möglich, da sich Zell-Lysate auf Grund ihrer komplexen Zusammensetzung und der daraus resultierenden Beeinflussung des Trennsystems kaum als "Ligandenzusatz" zum BGE eignen.

Durch die ACE-Analyse der Proben, in denen rDmCyp20-GFP mit *D. melanogaster*-Zell-Lysaten inkubiert wurde, konnte eine Interaktion von putativen Liganden mit rDmCyp20-GFP nachgewiesen werden. Der Einsatz der LIF-Detektion ermöglichte die selektive Detektion von freiem und gebundenem rDmCyp20-GFP, welche sich durch unterschiedliche elektrophoretische Eigenschaften auszeichnen. Durch Kombination der LIF-Detektion mit der hohen Trennleistung der CE wird, im Gegensatz zur SEC-Analyse, die Identifizierung der Analytsignale nicht mehr durch überlagerte Signale des Zell-Lysats beeinträchtigt. Gleichzeitig wird im Vergleich zur SEC die Analysezeit durch die selektive *online*-Detektion erheblich verkürzt. Für die Inkubation mit rDmCyp20-GFP wurden Lysate verschiedener Entwicklungsstufen von *D. melanogaster* eingesetzt. Die in

Abhängigkeit von der Entwicklungsstufe unterschiedlichen Verhältnisse der Signalintensität von freiem und komplexiertem rDmCyp20-GFP lassen auf eine unterschiedliche Expression oder eine Veränderung der Affinität der oder des Liganden in *D. melanogaster* schließen, da die Gesamtproteingehalte der Lysate in der gleichen Größenordnung bestimmt wurden. Auffällig ist dabei die mit der Entwicklung von der embryonalen zur adulten Form einhergehende Abnahme der Interaktion, woraus eine besondere Rolle der Wechselwirkung in der frühen Entwicklungsphase abgeleitet werden kann. Ein möglicher Ligand entsprechender Eigenschaften ist das *Drosophila*-Protein CAPPUCCINO. Für eine Involvierung von CAPPUCCINO in die beobachtete rDmCyp20-GFP-Interaktion im *D. melanogaster*-Zell-Lysat sprechen die durch Bindungsanalyse an einer OPB nachgewiesene Wechselwirkung zwischen rDmCyp20-GFP und CAPPUCCINO *in vitro* und die in der Literatur beschriebene wichtige Rolle von CAPPUCCINO bei der Oogenese [MAHONEY *et al.*, 1997].

Die Ergebnisse der CE-Interaktionsanalyse von rDmCyp20-GFP in *D. melanogaster*-Zell-Lysaten konnten durch Einsatz der nativen PAGE verifiziert werden. Auch nach der gelelektrophoretischen Trennung zeigte sich eine veränderte Mobilität der rDmCyp20-GFP-Bande nach Inkubation mit embryonalem Zell-Lysat. Auf Grund der Beobachtung eines stabilen Komplexsignals trotz der im Vergleich zur CE auf etwa das 12fache erhöhte Analysezeit kann von der stabilisierenden Wirkung eines "caging effects" des gelelektrophoretischen Trennsystems [FRIED & CROTHERS, 1981], wie schon im Fall der p24 / rDmCyp20-GFP-Interaktion, ausgegangen werden. In Kontrollexperimenten zeigte sich eine hohe Spezifität der beobachteten Interaktion, da nach Inkubation mit Zell-Lysaten anderer Spezies keine Bildung eines putativen Komplexes beobachtet werden konnte.

6 Zusammenfassung

Der Analyse von Protein-Ligand-Interaktionen kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie an vielfältigen biochemischen Prozessen beteiligt sind. Die Anwendung der Kapillarelektrophorese als Hochleistungstrenntechnik hat in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen, wobei die Kapillarelektrophorese als effektives und schnelles Werkzeug zur Interaktionsanalyse bei minimalem Materialverbrauch etabliert werden konnte. Die vielfältige Einsetzbarkeit der Affinitätskapillarelektrophorese wurde am Beispiel der Wechselwirkung von biochemisch interessanten Liganden mit Cyclophilinen, Vertretern der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen, demonstriert. Bindungsstudien mit Peptid- bzw. Protein-Liganden eröffneten die Möglichkeit, die Affinitätskapillarelektrophorese zur Bestimmung von Bindungsdaten und zur Suche nach unbekanntem Interaktionspartnern einzusetzen.

- Die Bindung zwischen rhCyp18 und dem Inhibitor Cyclosporin A konnte durch Affinitätskapillarelektrophorese qualitativ charakterisiert werden. Trotz der geringen Differenz der elektrophoretischen Mobilität, verursacht durch einen marginalen Unterschied der molekularen Masse bei konstanter Ladung, gelang es, rhCyp18 und rhCyp18-Cyclosporin A-Komplex zu trennen.
- In ACE-Bindungsstudien von Cyclosporin A und den Cyclosporin-Derivaten [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA und [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA mit rhCyp18 zeigte sich eine Verringerung der Affinität für die Cyclosporin-Derivate im Vergleich zu unmodifiziertem Cyclosporin A. Für [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA wurde eine Dissoziationskonstante im Bereich von 10⁻⁶ M abgeschätzt, während für [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA keine Bindung an rhCyp18 detektiert werden konnte.
- Mit Hilfe der elektrophoretisch vermittelten Mikroanalyse konnte die Affinität von rhCyp18 zu Cyclosporin A bzw. [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA durch Dissoziationskonstanten von 1-100 nM bzw. 1,3 ± 0,2 µM quantifiziert werden.
- Die Wechselwirkung zwischen rhCyp18 und dem Peptidhormon Bradykinin konnte durch die Ermittlung einer Dissoziationskonstante von 1,4 ± 0,1 mM quantitativ belegt werden. Die Inhibierung der Interaktion durch subequimolare Mengen an

Cyclosporin A ermöglichte die parallele Untersuchung von rhCyp18 und dem rhCyp18-Cyclosporin A-Komplex auf ihre Affinität gegenüber Bradykinin.

- Für die Wechselwirkungen der Cyclophilin-Isoenzyme rhCyp18 und rDmCyp20 mit dem Oligopeptid $_{AC-DRVHPVHAGP-Bpa-APGQ-N1e-REPRGSDIA-NH_2}$, das vom HIV-Capsidprotein p24 abgeleitet wurde, konnten mit Hilfe der Affinitätskapillarelektrophorese unter Verwendung der *mobility-shift*-Analyse Dissoziationskonstanten von $197 \pm 32 \mu\text{M}$ bzw. $106 \pm 18 \mu\text{M}$ bestimmt werden.
- Durch Vergleich der Aminosäuresequenz von DmCyp20 und typischen Proteinbindungsmodulen wurde in DmCyp20 ein Interaktionsmodul mit Ähnlichkeit zu WW-Bindungsdomänen identifiziert.
- Durch Untersuchung der Interaktion zwischen dem Fusionsprotein rDmCyp20-GFP und dem *Drosophila*-Protein CAPPUCCINO, einem potentiellen Liganden für WW-Bindungsmodule, konnten unter Verwendung einer orts aufgelösten Cellulose-gebundenen Oligopeptidbibliothek Peptide der CAPPUCCINO-Sequenz mit Affinität zu DmCyp20 identifiziert werden.
- Zur Verifizierung der Bindung wurde eine Auswahl der identifizierten Peptide synthetisiert und in Lösung durch Affinitätskapillarelektrophorese untersucht. Dabei konnten für die Interaktionen des Peptids $_{AC-NPPKPMRPLYWTR-NH_2}$ mit rDmCyp20-GFP bzw. rDmCyp20 Dissoziationskonstanten von $63 \pm 6 \mu\text{M}$ bzw. $19 \pm 2 \mu\text{M}$ bestimmt werden.
- Die Affinitätskapillarelektrophorese wurde zur Untersuchung der Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem HIV-Capsidprotein p24 und rDmCyp20-GFP angewendet. Für dieses Interaktionssystem konnte eine Dissoziationskonstante von $20 \pm 1,5 \mu\text{M}$ bestimmt werden.
- Durch Einsatz der Größenausschlußchromatographie wurde für die p24 / rDmCyp20-GFP-Bindung mit Hilfe einer unabhängigen Methode eine vergleichbare Dissoziationskonstante von $23 \pm 3 \mu\text{M}$ ermittelt.
- Die Verwendung des Fusionsproteins rDmCyp20-GFP ermöglichte auf Grund der besonderen Fluoreszenzeigenschaften von GFP die selektive Detektion des Proteins in komplexen Gemischen. Mit Hilfe der Affinitätskapillarelektrophorese konnte in Zell-

Lysaten von *Drosophila melanogaster* die Wechselwirkung von rDmCyp20-GFP mit einem putativen Liganden nachgewiesen und mit Hilfe eines "band-shift"-Experiments in der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestätigt werden. Die Untersuchung von Zell-Lysaten unterschiedlicher Entwicklungsstufen von *Drosophila melanogaster* zeigte eine entwicklungsabhängige Wechselwirkung des putativen Liganden mit rDmCyp20-GFP.

7 Literaturverzeichnis

- AL-DIRBASHI O. Y. & NAKASHIMA K.** (2000)
Hyphenated chromatographic methods for biomaterials, *Biomed. Chromatogr.*, **14**, 406-421
- ALLISON A. C.** (2000)
Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward, *Immunopharmacology*, **47**, 63-83
- AMERSHAM** (1998)
ECL Western blotting detection reagents, Anwendungsprotokoll, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, GB
- BAKER et al.** (1994)
BAKER E. K., COLLEY N. J. & ZUKER C. S.
The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone forming a stable complex *in vivo* with its protein target rhodopsin, *EMBO J.*, **13**, 4886-4895
- BAO J. & REGNIER F. E.** (1992)
Ultramicro enzyme assays in a capillary electrophoretic system, *J. Chromatogr.*, **608**, 217-224
- BECKMAN** (1991)
Introduction to Capillary Electrophoresis, Publication No. 360643, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
- BIERER et al.** (1990)
BIERER B. E., MATTILA P. S., STANDAERT R. F., HERZENBERG L. A., BURAKOFF S. J., CRABTREE G. & SCHREIBER S. L.
Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **87**, 9231-9235
- BOBBIT D. R. & LINDER S. W.**, (2001)
Recent advances in chiral detection for high-performance liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.*, **20**, 111-123
- BOREL et al.** (1976)
BOREL J. F., FEURER C., GUBLER H. U. & STAHELIN H.
Biological effects of cyclosporin A, a new antilymphocytic agent, *Agents & Actions*, **6**, 468-475
- BOSE et al.** (1997)
BOSE S., YANG J. & HAGE D. S.,
Guidelines in selecting ligand concentration for the determination of binding constants by affinity capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, **697**, 77-88
- BRAATEN D. & LUBAN J.** (2001)
Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells, *EMBO J.*, **20**, 1300-1309
- BRAATEN et al.** (1997)
BRAATEN D., ANSARI H. & LUBAN J.
The hydrophobic pocket of cyclophilin is the binding site for the human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein, *J. Virol.*, **71**, 2107-2113
- BRADFORD M. M.** (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
- BRAM R. J. & CRABTREE G. R.** (1994)
Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein, *Nature*, **371**, 355-358
- BROCK et al.** (1999)
BROCK R., VAMOSI G., VEREB G. & JOVIN T. M.
Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **96**, 10123-10128
- BUSCH et al.** (1997a)
BUSCH M. H. A., CARELS L. B., BOELEN H. F. M., KRAAK J. C. & POPPE H.
Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **777**, 311-328
- BUSCH et al.** (1997b)
BUSCH M. H. A., BOELEN H. F. M., KRAAK, J. C. & POPPE H.
Vacancy affinity capillary electrophoresis, a new method for measuring association constants, *J. Chromatogr. A*, **775**, 313-326
- CALDWELL et al.** (1999)
CALDWELL G. W., McDONNELL P. A., MASCUCCI J. A., LOHNSON D. L. & JOLLIFE L. K.
Using affinity capillary electrophoresis to study the interaction of the extracellular binding domain of erythropoietin receptor with peptides, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **40**, 17-25

CHAKEL et al. (1997)

CHAKEL J. A., PUNGOR E., HANCOCK W. S. & SWEDBERG S. A.

Analysis of recombinant DNA-derived glycoproteins via high-performance capillary electrophoresis coupled with off-line matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **689**, 215-220

CHALFIE M. & KAIN S. (1998)

Green Fluorescent Protein – Properties, Applications and Protocols, 1st edition, John Wiley & Sons, New York

CHALMERS M. J. & GASKELL S. J. (2000)

Advances in mass spectrometry for proteome analysis, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 384-390

CHEN et al. (2000)

CHEN Y.-H., XIAO Y., WU W., WANG Q., LUO G. & DIERICH M. P.

HIV-2 Transmembrane Protein gp36 Binds to the Putative Cellular Receptor Proteins P45 and P62, *Immunobiology*, **201**, 317-322

CHERVET et al. (1991)

CHERVET J. P., VAN SOEST R. E. J. & URSEM M.

Z-Shaped flow cell for UV detection in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr.*, **543**, 439-449

CHU et al. (1992)

CHU Y.-H., AVILA L. Z., BIENBUYCK H. A. & WHITESIDES G. M.

Use of Affinity Capillary Electrophoresis To Measure Binding Constants of Ligands to Proteins, *J. Med. Chem.*, **35**, 2915-2917

CHU et al. (1993)

CHU Y.-H., AVILA L. Z., BIENBUYCK H. A. & WHITESIDES G. M.

Using Affinity Capillary Electrophoresis To Identify the Peptide in a Peptide Library that Binds Most Tightly to Vancomycin, *J. Org. Chem.*, **58**, 648-652

CHU et al. (1994)

CHU Y.-H., LEES W. J., STASSINOPOULOS A. & WALSH C. T.

Using Affinity Capillary Electrophoresis To Determine Binding Stoichiometries of Protein-Ligand Interactions, *Biochemistry*, **33**, 10616-10621

CHU et al. (1995)

CHU Y.-H., AVILA L. Z., GAO J. & WHITESIDES G. M.

Affinity Capillary Electrophoresis, *Acc. Chem. Res.*, **28**, 461-468

CHU et al. (1996)

CHU Y.-H., DUNAYEVSKIY Y. M., KIRBY D. P., VOUIROS P. & KARGER B. L.

Affinity Capillary Electrophoresis – Mass Spectrometry for Screening Combinatorial Libraries, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7827-7835

CHU Y.-H. & CHENG C. C. (1998)

Affinity Capillary Electrophoresis in biomolecular recognition, *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 663-683

CHU Y.-H. & WHITESIDES G. M. (1992)

Affinity Capillary Electrophoresis Can Simultaneously Measure Binding Constants of Peptides to Vancomycin, *J. Org. Chem.*, **57**, 3524-3525

CIFUENTES A. & POPPE H. (1994)

Simulation and optimization of peptide separation by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **680**, 321-340

COLGAN et al. (1996)

COLGAN J., YUAN H. E. H., FRANKE E. K. & LUBAN J.

Binding of human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein to cyclophilin A is mediated by the central region of capsid and requires gag dimerization, *J. Virol.*, **70**, 4299-4310

COMPTON B. J. (1991)

Electrophoretic mobility modeling of proteins in free zone capillary electrophoresis and its application to monoclonal antibody microheterogeneity analysis, *J. Chromatogr.*, **559**, 357-366

CONNERN C. P. & HALESTRAP A. P. (1992)

Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin, *Biochem. J.*, **284**, 381-385

CRAIG D. B. & DOVICHI N. J. (1998)

Multiple Labeling of Proteins, *Anal. Chem.*, **70**, 2493-2494

DE LORENZI et al. (2000)

DE LORENZI E., GALBUSERA C., BELLOTTI V., MANGIONE P., MASSOLINI G., TABALOTTI E., ANDREOLA A. & CACCIALANZA G.

Affinity capillary electrophoresis is a powerful tool to identify transthyretin binding drugs for potential therapeutic use in amyloidosis, *Electrophoresis*, **21**, 3280-3289

- DENTON K. A. & HARRIS R.**, (1995)
High-performance capillary electrophoretic separation of human serum albumin using a neutral coated capillary, *J. Chromatogr.*, **705**, 335-341
- DENTON K. A. & TATE S. A.** (1997)
Capillary electrophoresis of recombinant proteins, *J. Chromatogr. B*, **697**, 111-121
- DJORDJEVIC et al.** (1997)
DJORDJEVIC N. M., WIDDER M. & KUHN R.
Signal Enhancement in Capillary Electrophoresis by Using a Sleeve Cell Arrangement for Optical Detection, *J. High Resol. Chromatogr.*, **20**, 189-192
- DOLNÍK V.** (1999a)
DNA sequencing by capillary electrophoresis (review), *J. Biochem. Biophys. Methods*, **41**, 103-119
- DOLNÍK V.** (1999b)
Recent developments in capillary zone electrophoresis of proteins, *Electrophoresis*, **20**, 3105-3115
- DORFMAN et al.** (1997)
DORFMAN T., WEIMANN A., BORSETTI A., WALSH C. T. & GÖTTLINGER H. G.
Active-Site Residues of Cyclophilin A Are Crucial for Its Incorporation into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virions, *J. Virol.*, **71**, 7110-7113
- DUNAYEVSKIY et al.** (1998)
DUNAYEVSKIY Y. M., LYUBARSKAYA Y. V., CHU Y.-H., VOUROU P. & KARGER B. L.
Simultaneous Measurement of Nineteen Binding Constants of Peptides to Vancomycin Using Affinity Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry, *J. Med. Chem.*, **41**, 1201-1204
- ECKART et al.** (1999)
ECKART K., RADULOVIC J., RADULOVIC M., JAHN O., BLANK T., STIEDL O. & SPIESS J.
Actions of CRF and its analogs, *Curr. Med. Chem.*, **6**, 1035-1053
- ERIM F. B. & KRAAK J. C.** (1998)
Vacancy affinity capillary electrophoresis to study competitive protein-drug binding, *J. Chromatogr. B*, **710**, 205-210
- FERREIRA et al.** (1996)
FERREIRA P. A., NAKAYAMA T. A., PAK W. L. & TRAVIS G. H.
Cyclophilin-related protein RanBP2 acts as chaperone for red/green opsin, *Nature*, **383**, 637-640
- FIGEYS D. & AEBERSOLD R.** (1997)
High sensitivity identification of proteins by electrospray ionisation tandem mass spectrometry: Initial comparison between an ion trap mass spectrometer and a triple quadrupole mass spectrometer, *Electrophoresis*, **18**, 360-368
- FIGEYS D. & AEBERSOLD R.** (1998)
High-sensitivity analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry: Recent developments in technology and application, *Electrophoresis*, **19**, 885-892
- FISCHER et al.** (1984)
FISCHER G., BANG H. & MECH C.
Nachweis einer Enzymkatalyse für die *cis-trans* Isomerisierung einer Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden, *Biomed. Biochem. Acta*, **43**, 1101-1111
- FISCHER et al.** (1989)
FISCHER G., WITTMANN-LIEBOLD B., LANG K., KIEFHABER T. & SCHMID F. X. (1989)
Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins, *Nature*, **337**, 476-478
- FISCHER G.** (1994)
Über Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen und ihre Effektoren, *Angew. Chem.*, **106**, 1479-1501
- FOULDS G. J. & ETZKORN F. A.** (1998)
A capillary electrophoresis mobility shift assay for protein-DNA binding affinities free in solution, *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4304-4305
- FOULDS G. J. & ETZKORN F. A.** (1999)
DNA-binding affinities of MyoD and E47 homo- and hetero-dimers by capillary electrophoresis mobility shift assay, *J. Chromatogr. A*, **862**, 231-236
- FRANK et al.** (2000)
FRANK R., JAKOB M., THUNECKE F., FISCHER G. & SCHUTKOWSKI, M.
Thioxylation as One-Atom-Substitution Generates a Photoswitchable Element within the Peptide Backbone, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1120-1122
- FRANKE et al.** (1994)
FRANKE E. K., YUAN H. E. H. & LUBAN J.
Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions, *Nature*, **372**, 359-362

- FRIED M. & CROTHERS D. M.** (1981)
Equilibria and kinetics of *lac* repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6505-6525
- GAO et al.** (1994)
GAO J., GOMEZ F. A., HARTE R. & WHITESIDES G. M.
Determination of the effective charge of a protein in solution by capillary electrophoresis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **91**, 12027-12030
- GILL S. C. & VON HIPPEL P. H.** (1989)
Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data, *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326
- GILLIES G.** (1997)
Somatostatin: the neuroendocrine story, *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 87-95
- GROSSMAN et al.** (1989)
GROSSMAN P. D., COLBURN J. C. & LAUER H. H.
A semiempirical model for the electrophoretic mobilities of peptides in free-solution capillary electrophoresis, *Anal. Biochem.*, **179**, 28-33
- GUSZCZYNSKI T. & COPELAND T. D.** (1998)
A Binding Shift Assay for the Zinc-Bound and Zinc-Free HIV-1 Nucleocapsid Protein by Capillary Electrophoresis, *Anal. Biochem.*, **260**, 212-217
- GUZMAN et al.** (1997)
GUZMAN N. A., PARK S. S., SCHAUFELBERGER D., HERNANDEZ L., PAEZ X., RADA P., TOMLINSON A. J. & NAYLOR S.
New approaches in clinical chemistry: on-line analyte concentration and microreaction capillary electrophoresis for the determination of drugs, metabolic intermediates, and biopolymers in biological fluids, *J. Chromatogr. B*, **697**, 37-66
- HAGE D. S. & TWEED S. A.** (1997)
Recent advances in chromatographic and electrophoretic methods for the study of drug-protein interactions, *J. Chromatogr. B*, **699**, 499-525
- HAMES B. D. & RICKWOOD D.** (1990a)
Gel Electrophoresis of Proteins – A Practical Approach, 2nd edition, Oxford University Press, Oxford, GB
- HAMES B. D. & RICKWOOD D.** (1990b)
Gel Electrophoresis of Nucleic Acids – A Practical Approach, 2nd edition, Oxford University Press, Oxford, GB
- HANDSCHUMACHER et al.**, 1984
HANDSCHUMACHER R. E., HARDING M. W., RICE J., DRUGGE R. J. & SPEICHER D. W.
Cyclophilin A: A Specific Cytosolic Binding Protein for Cyclosporin A, *Science*, **226**, 544-547
- HARMON et al.** (1993a)
HARMON B. J., PATTERSON D.H. & REGNIER F. E.
Electrophoretically mediated microanalysis of ethanol, *J. Chromatogr. A*, **657**, 429-434
- HARMON et al.** (1993b)
HARMON B. J., PATTERSON D.H. & REGNIER F. E.
Mathematical Treatment of Electrophoretically Mediated Microanalysis, *Anal. Chem.*, **65**, 2655-2662
- HARRISON R. K. & STEIN R. L.** (1990a)
Mechanistic Studies of Peptidyl Prolyl Cis-Trans Isomerase: Evidence for Catalysis by Distortion, *Biochemistry*, **29**, 1684-1689
- HARRISON R. K. & STEIN R. L.** (1990b)
Substrate Specificities of the Peptidyl Prolyl Cis-Trans Isomerase Activities of Cyclophilin and FK506 Binding Protein: Evidence for the Existence of a Family of Distinct Enzymes, *Biochemistry*, **29**, 3813-3816
- HEEGAARD N. H. H.** (1994)
Determination of antigen-antibody affinity by immuno-capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **680**, 405-412
- HEEGAARD et al.** (1995)
HEEGAARD N. H. H., MORTENSEN H. D. & ROEPSDORF P.
Demonstration of a heparin-binding site in serum amyloid P component using affinity capillary electrophoresis as an adjunct technique, *J. Chromatogr. A*, **717**, 83-90
- HEEGAARD et al.** (1996)
HEEGAARD N. H. H., HEEGAARD P. M. H., ROEPSDORF P. & ROBEY F. A.
Ligand-binding sites in human serum amyloid P component, *Eur. J. Biochem.*, **239**, 580-586
- HEEGAARD et al.** (1997)
HEEGAARD N. H. H., HANSEN B. E., SVEKGAARD A. & FUGGER L. H.
Interactions of the human class II major histocompatibility complex protein HLA-DR4 with peptide ligand demonstrated by affinity capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **781**, 91-97

HEEGAARD et al. (1998)

HEEGAARD N. H. H., NILSSON S. & GUZMAN N. A. (1998)

Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments, *J. Chromatogr. B*, **715**, 29-54

HEEGAARD N. H. H. & BRIMNES J. (1996)

Comparison of heparin-binding to lactoferrin from human milk and from human granulocytes by means of affinity capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **17**, 1916-1920

HEEGAARD N. H. H. & KENNEDY R. T. (1999)

Identification, quantitation, and characterization of biomolecules by capillary electrophoretic analysis of binding interactions, *Electrophoresis*, **20**, 3122-3133

HEEGAARD N. H. H. (1998)

A heparin-binding peptide from human serum amyloid P component characterized by affinity capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **19**, 442-447

HELLER C. (2001)

Principles of DNA separation with capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **22**, 629-643

HENNIG et al. (1998)

HENNIG L., CHRISTNER C., KIPPING M., SCHELBERT B., RÜCKNAGEL K. P., GRABLEY S., KÜLLERTZ G. & FISCHER G.

Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases by juglon, *Biochemistry*, **37**, 5953-5960

HIRAOKA et al. (1998)

HIRAOKA A., ARATO T., TOMINAGA I., EGUCHI N., ODA H. & URADE Y.

Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoretic analysis of molecular mass microheterogeneity of β -trace protein in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases, *J. Chromatogr. A*, **802**, 143-148

HSIEH et al. (1995)

HSIEH Y.-L., CAI J., LI Y.-T., HENION J. D. & GANEM B.

Detection of Noncovalent FKBP-FK506 and FKBP-Rapamycin Complexes by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **6**, 85-90

HUANG X. - J. & FANG Z. - L. (2000)

Chemiluminescence detection in capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta*, **414**, 1-14

HUNT et al. (1996)

HUNT G., MOORHOUSE K. G. T. & CHEN A. B.

Capillary isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of recombinant humanized monoclonal antibody HER2, *J. Chromatogr. A*, **744**, 295-301

HUNTER T. (1998)

Prolyl Isomerases and Nuclear Function, *Cell*, **92**, 141-143

JANOWSKI et al. (1997)

JANOWSKI B., WÖLLNER S., SCHUTKOWSKI M. & FISCHER G.

A Protease-Free Assay for Peptidyl Prolyl *cis/trans* Isomerases Using Standard Peptide Substrates, *Anal. Biochem.*, **252**, 299-307

JARRET H. W. & TAYLOR W. L. (1998)

Transcription factor-green fluorescent protein chimeric fusion proteins and their use in studies of DNA affinity chromatography, *J. Chromatogr. B*, **803**, 131-139

JENSEN et al. (1999)

JENSEN P. K., PAŠA-TOLIĆ L., ANDERSON G. A., HORNER J. A., LIPTON M. S., BRUCE J. E. & SMITH R. D.

Probing proteomes using capillary isoelectric focusing-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **71**, 2076-2084

JORGENSON J. W. & LUKACS K. D. (1981)

Free-zone electrophoresis in glass capillaries, *Clin. Chem.*, **27**, 1551-1553

JORGENSON J. W. & LUKACS K. D. (1983)

Capillary Zone Electrophoresis, *Science*, **222**, 266-272

KAJIWARA H. (1999)

Affinity capillary electrophoresis of proteins and peptides, *Anal. Chim. Acta*, **383**, 61-66

KALMAN et al. (1995a)

KÁLMÁN F., MA S., HODEL A., FOX R. O. & HORVÁTH C.

Charge and size effects in the capillary zone electrophoresis of nuclease A and its variants, *Electrophoresis*, **16**, 595-603

KALMAN et al. (1995b)

KALMAN F., MA S., FOX R. O. & HORVÁTH C.

Capillary electrophoresis of S. nuclease mutants, *J. Chromatogr. A*, **705**, 135-154

- KAM et al.** (2001)
KAM Z., ZAMIR E. & GEIGER B.
Probing molecular processes in live cells by quantitative multidimensional microscopy, *Trends Cell Biol.*, **11**, 329-334
- KAROW T. & LANG R.** (1999)
Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Druckerei F. Hansen, Bergisch-Gladbach
- KASANOV et al.** (2001)
KASANOV J., PIROZZI G., UVEGES A. J. & KAY B. K.
Characterizing Class I WW domains defines key specific determinants and generates mutant domains with novel specificities, *Chem. Biol.*, **8**, 231-241
- KAUFMANN et al.** (2001)
KAUFMANN H., BAILEY J. E. & FUSSENEGGER M.
Use of antibodies for the detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis, *Proteomics*, **1**, 194-199
- KAWAOKA J. & GOMEZ F. A.** (1998)
Use of mobility ratios to estimate binding constants of ligands to proteins in affinity capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, **715**, 203-210
- KAY et al.** (2000)
KAY B. K., WILLIAMSON M. P. & SUDOL M.
The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains, *FASEB J.*, **14**, 231-241
- KIEFFER et al.** (1992)
KIEFFER L. J., THALHAMMER T. & HANDSCHUMACHER R. E.
Isolation and Characterization of a 40-kDa Cyclophilin-related Protein, *J. Biol. Chem.*, **267**, 5503-5507
- KITAGAKI et al.**, 1997
KITAGAKI K., NAGAI H., HAYASHI S. & TOTSUKA T.
Facilitation of apoptosis by cyclosporins A and H, but not FK506 in mouse bronchial eosinophils, *Eur. J. Pharmacol.*, **337**, 283-289
- KORF et al.** (1997)
KORF G. M., LANDERS J. P. & O'KANE D. J.
Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection for the Analysis of Free and Immune-complexed Green Fluorescent Protein, *Anal. Biochem.*, **251**, 210-218
- KUSCHINSKY G. & LÜLLMANN H.** (1989)
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 12. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- KWAK et al.** (1999)
KWAK E.-S., ESQUIVEL S. & GOMEZ F. A.
Optimization of capillary electrophoresis conditions for in-capillary enzyme-catalyzed microreactions, *Anal. Chim. Acta*, **397**, 183-190
- LAEMMLI U. K.**, (1970)
Cleavage of Structural Proteins during Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685
- LAGU A. L.** (1999)
Applications of capillary electrophoresis in biotechnology, *Electrophoresis*, **20**, 3145-3155
- LEHMANN et al.** (1997)
LEHMANN R., VOELTER W. & LIEBICH H. M.
Capillary electrophoresis in clinical chemistry, *J. Chromatogr. B*, **697**, 3-35
- LEVERSON J. D. & NESS S. A.** (1998)
Point Mutations in v-Myb Disrupt a Cyclophilin-Catalyzed Negative Regulatory Mechanism, *Mol. Cell*, **1**, 203-211
- LIN et al.** (1997)
LIN S., HSIAO I.-Y. & HSU S.-M. (1997)
Determination of the Dissociation Constant of Phosvitin-Anti-phosphoserine Interaction by Affinity Capillary Electrophoresis, *Anal. Biochem.*, **254**, 9-17
- LIN et al.** (1999)
LIN S., TANG P. & HSU S.-M.
Using affinity capillary electrophoresis to evaluate average binding constant of 18-mer diphosphotyrosine peptide to antiphosphotyrosine Fab, *Electrophoresis*, **20**, 3388-3395
- LIN et al.** (2000)
LIN S., TSAI J.-C. & HSU S.-M.
Characterization of a Polyclonal Antihapten Antibody by Affinity Capillary Electrophoresis, *Anal. Biochem.*, **284**, 422-426

LIU et al. (1991)

LIU J., FARMER JR. J. D., LANE S. W., FRIEDMAN J., WEISSMAN I. & SCHREIBER S. L.
Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes, *Cell*, **66**, 807-815

LIU et al. (1994)

LIU J., VOLK K. J., LEE M. S., KERNS E. H. & ROSENBERG I. E.
Affinity capillary electrophoresis applied to the studies of interactions of a member of heat shock protein family with an immunosuppressant, *J. Chromatogr. A*, **680**, 395-403

LIU R. H. & SHAROM F. J. (1996)

Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domain, *Biochemistry*, **35**, 11865-11873

LODISH H. F. & KONG N. (1991)

Cyclosporin A Inhibits an Initial Step in Folding of Transferrin within the Endoplasmic Reticulum, *J. Biol. Chem.*, **266**, 14835-14838

LONDON et al. (1990)

LONDON R. E., DAVIS D. G., VAVREK R. J., STEWART J. M. & HANDSCHUMACHER R. E.
Bradykinin and Its Gly⁶ Analogue Are Substrates of Cyclophilin: A Fluorine-19 Magnetization Transfer Study, *Biochemistry*, **29**, 10298-10302

LU et al. (1999)

LU P.-J., ZHOU X. Z., SHEN M. & LU K. P.
Function of WW-Domains as Phosphoserine- or Phosphothreonine-Binding Modules, *Science*, **283**, 1325-1328

LUBAN et al. (1993)

LUBAN J., BOSSOLT K. L., FRANKE E. K., KALPANA G. V. & GOFF S. P.
Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Binds Cyclophilins A and B, *Cell*, **73**, 1067-1078

MA et al. (1995)

MA S., KÁLMÁN F., KÁLMÁN A., THUNECKE F. & HORVATH C.
Capillary zone electrophoresis at subzero temperatures: I. Separation of the *cis* and *trans* conformers of small peptides, *J. Chromatogr. A*, **716**, 167-182

MACIAS et al. (2000)

MACIAS M. J., GERVAIS V., CIVERA C. & OSCHKINAT H.
Structural analysis of WW domains an design of a WW prototype, *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 375-379

MAHONEY et al. (1997)

MAHONEY N. M., JANMEY P. A. & ALMO S. C.
Structure of the profiling-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation, *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 953-960

MANABE T. (1999)

Capillary electrophoresis of proteins for proteomic analysis, *Electrophoresis*, **20**, 3116-3121

MANSEAU et al. (1996)

MANSEAU L., CALLEY J. & PHAN H.
Profilin is required for posterior patterning of the *Drosophila* oocyte, *Development*, **122**, 2109-2116

MATOUSCHEK et al. (1995)

MATOUSCHEK A., ROSPERT S., SCHMID K., GLICK B. S. & SCHATZ G.
Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **92**, 6319-6323

MEISEL H. & OLIEMAN C. (1998)

Estimation of calcium-binding constants of casein phosphopeptides by capillary zone electrophoresis, *Anal. Chim. Acta*, **372**, 291-297

MERKER et al. (1999)

MERKER M. P., AUDI S. H., BRANTMEIER B.M., NITHIPATIKOM K., GOLDMAN R. S., ROERIG D. L. & DAWSON C. A.
Proline in vasoactive peptides: consequences for peptide hydrolysis in the lung, *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Physiol.*, **276**, L341-L350

MERKER M. P. & DAWSON C. A. (1995)

Cyclophilin-facilitated bradykinin inactivation in the perfused rat lung, *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 2085-2091

MESSANA et al. (1997)

MESSANA I., ROSSETTI D. V., CASSIANO L., MISITI F., GIARDINI B. & CASTAGNOLA M.
Peptide analysis by capillary (zone) electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, **699**, 149-171

MEYER et al. (1994)

MEYER S., JABS A., SCHUTKOWSKI M. & FISCHER G.
Separation of *cis/trans* isomers of a prolyl peptide bond by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, **15**, 1151-1157

NADEAU et al. (1994)

NADEAU K., NADLER S. G., SAULNIER M., TEPPER M. A. & WALSH C. T.
Quantitation of the Interaction of the Immunosuppressant Deoxyspergualin and Analogs with Hsc70 and Hsp90,
Biochemistry, **33**, 2561-2567

NEGRO et al. (1997)

NEGRO A., GRASSATO L., DELAURENTO P. P. & SKAPER S. D.
Genetic construction, properties and application of a green fluorescent protein-tagged ciliary neurotrophic factor,
Protein Eng., **10**, 1077-1083

NEIGER D. N. (1992)

High Performance Capillary Electrophoresis, Agilent (ehemals Hewlett-Packard Company), Publication No. 12-5091-6199E

NIELSEN et al. (1991)

NIELSEN R. G., RICKARD E. C., SANTA P. F., SHARKNAS D. A. & SITTAMPALAN G. S.
Separation of antibody-antigen complexes by capillary zone electrophoresis, isoelectric focusing and high-performance size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr.*, **539**, 177-185

O'BRIEN et al. (2001)

O'BRIEN R., CHOWDHRY B. Z. & LADBURY J. E.
Isothermal titration calorimetry of biomolecules,
in HARDING S. E. & CHOWDHRY B. Z. (Ed.), *Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry*,
A Practical Approach Series, Oxford University Press, Oxford, GB, 263-286

ODA R. P. & LANDERS J. P. (1996)

High-Resolution Glycoprotein Analysis Using Capillary Electrophoresis, *Mol. Biotechnol.*, **5**, 165-170

OFFORD R. E. (1966)

Electrophoretic mobilities of peptides on paper and their use in the determination of amide groups,
Nature, **211**, 591-593

OKUN et al. (2000)

OKUN V. M., RONACHER B., BLAAS D. & KENNDLER E.
Affinity Capillary Electrophoresis for the Assessment of Complex Formation between Viruses and Monoclonal Antibodies,
Anal. Chem., **72**, 4634-4639

OKUN et al. (2001)

OKUN V. M., MOSER R., RONACHER B., KENNDLER E. & BLAAS D.
VLDL Receptor Fragments of Different Length Bind to Human Rhinovirus HRV2 with Different Stoichiometries,
J. Biol. Chem., **276**, 1057-1062

ORAVCOVÁ et al. (1996)

ORAVCOVÁ J., BÖHS B. & LINDNER W.
Drug-protein binding studies: New trends in analytical and experimental methodology, *J. Chromatogr. B*, **677**, 1-28

OWENS-GRILLO et al. (1995)

OWENS-GRILLO J. K., HOFMANN K., HUTCHISON K. A., YEM A. W., DEIBEL M. R. JR., HANDSCHUMACHER R. E. & PRATT W. B.
The cyclosporin A-binding immunophilin CyP-40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor, *J. Biol. Chem.*, **270**, 20479-20484

PANTAZAKI et al. (1999)

PANTAZAKI A., TAVERNA M. & VIDAL-MADJAR C.
Recent advances in the capillary electrophoresis of recombinant glycoproteins, *Anal. Chim. Acta*, **383**, 137-156

PHIZICKY E. M. & FIELDS S. (1995)

Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis, *Microbiol. Rev.*, **59**, 94-123

PINGOUD A. & URBANKE C. (1997)

Arbeitsmethoden der Biochemie, 1. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, 166-172

PORTER S. (2001)

Human Immune Response to Recombinant Human Proteins, *J. Pharm. Sci.*, **90**, 1-11

PRICE et al. (1991)

PRICE E. R., ZYDOWSKY L. D., JIN M., BAKER C. H., MCKEON F. D. & WALSH C. T.
Human cyclophilin B: A second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 1903-1907

PRITCHETT T. & ROBNEY F. A. (1997)

Capillary Electrophoresis of Proteins,
in LANDERS J. P. (Ed.), *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd edition, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 259-295

PRITCHETT T. J. (1996)

Capillary isoelectric focusing of proteins, *Electrophoresis*, **17**, 1195-1201

PUSECKER et al. (1998)

PUSECKER K., SCHEWITZ J., GFÖRER P., TSENG L.-J., ALBERT K. & BAYER E.
On-Line Coupling of Capillary Electrochromatography, Capillary Electrophoresis and Capillary HPLC with Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Anal. Chem.*, **70**, 3280-3285

QUIAN X.-H. & TOMER K. B. (1998)

Affinity capillary electrophoresis investigation of an epitope on human immunodeficiency virus recognized by a monoclonal antibody, *Electrophoresis*, **19**, 415-419

QUIRINO J. P. & TERABE S. (1999)

Electrokinetic Chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **856**, 465-482

RANE S. G. & REDDY E. P. (2000)

Janus kinases: components of multiple signaling pathways, *Oncogene*, **19**, 5662-5679

REGNIER et al. (1995)

REGNIER F. E., PATTERSON D.H. & HARMON B. J. (1995)
Electrophoretically-mediated microanalysis (EMMA), *Trends Anal. Chem.*, **14**, 177-181

REHM H. (1997)

Der Experimentator: Proteinbiochemie, 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 29-80

REIBMANN J. (2001)

Molekulare und genetische Charakterisierung eines Cyclophilin-Homologen aus *Drosophila melanogaster*,
Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

RENSHAW D. & HINSON J. P. (2001)

Neuropeptide Y and the adrenal gland: a review, *Peptides*, **22**, 429-438

RICKARD et al. (1991)

RICKARD E. C., STROHL M. M. & NIELSEN R. G.
Correlation of electrophoretic mobilities from capillary electrophoresis with physicochemical properties of proteins and peptides,
Anal. Biochem., **197**, 197-207

ROQUES B. P. (2000)

Novel approaches in targeting neuropeptide systems, *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 475-483

RÜDIGER et al. (1997)

RÜDIGER S., GERMERTH L., SCHNEIDER-MERGENEY J. & BUKAU B.
Substrate specificity of the Dnak chaperone determined by screening a cellulose-bound peptide library, *EMBO J.*, **16**, 1501-1507

RYFFEL et al. (1993)

RYFFEL, B., WOERLY G., MURRAY M., EUGSTER H. P. & CAR B.
Binding of Active Cyclosporins to Cyclophilin A and B, Complex Formation with Calcineurin A,
Biochem. Biophys. Res. Commun., **194**, 1074-1073

SAEVELS et al. (1996)

SAEVELS J., VAN SCHEPDAEL A. & HOOGMARTENS J.
Determination of the kinetic parameters of adenosine deaminase by electrophoretic mediated microanalysis,
Electrophoresis, **17**, 1222-1227

SANTOS et al. (2000)

SANTOS A. N., KORBER S., KÜLLERTZ G., FISCHER G. & FISCHER B.
Oxygen stress increases prolyl *cis/trans* isomerase activity and expression of cyclophilin 18 in rabbit blastocysts, *Biol. Reprod.*, **62**, 1-7

SHELLENBERGER A., Hrsg. (1989)

Enzymkatalyse – Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme, 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena

SCHERER et al. (1998)

SCHERER G., KRAMER M. L., SCHUTKOWSKI M., REIMER U. & FISCHER G.
Barriers to Rotation of Secondary Amide Peptide Bonds, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 5568-5574

SCHIENE-FISCHER C. & YU C. (2001)

Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases, *FEBS Lett.*, **495**, 1-6

SCHMID et al. (1993)

SCHMID F. X., MAYR L. M., MÜCKE M. & SCHÖNBRUNNER E. R.
Prolyl Isomerases: Role in Protein Folding, *Adv. Prot. Chem.*, **44**, 25-66

SCHMID et al. (1996)

SCHMID F. X., FRECH C., SCHOLZ C. & WALTER S.
Catalyzed and Assisted Protein Folding of Ribonuclease T1, *Biol. Chem.*, **377**, 417-424

- SCHREIBER S. L. & CRABTREE G. R.** (1992)
The mechanism of action of cyclosporin A and FK506, *Immunol. Today*, **13**, 136-142
- SCHUTKOWSKI et al.** (1999)
SCHUTKOWSKI M., JAKOB M., REIMER U., DREWELLO M. & FISCHER G.
Cyclophilin-binding motifs and the HIV p26 gag / Cyclophilin interaction, *Collection Symposium Series*, **1**, 126-133
- SCHWARTZ H. & PRITCHETT T.** (1994)
Separation of Proteins and Peptides by Capillary Electrophoresis: Application to Analytical Biotechnology,
Publication No. 727484, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
- SCHWER C.** (1998)
Kapillarelektrophorese
in LOTTSPREICH F., ZORBAS H. (Hrsg.), *Bioanalytik*, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 253-284
- SEVERS J. C. & SMITH R. D.** (1997)
Capillary Electrophoresis – Mass Spectrometry
in LANDERS J. P. (Ed.), *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd edition, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 791-826
- SHIMURA K. & KARGER B. L.** (1994)
Affinity Probe Capillary Electrophoresis: Analysis of recombinant Human Growth Hormone with a Fluorescent Labeled Antibody Fragment, *Anal. Chem.*, **66**, 9-15
- SHIMURA K. & KASAI K.** (1997)
Affinity Capillary Electrophoresis: A Sensitive Tool for the Study of Molecular Interactions and Its Use in Microscale Analysis, *Anal. Biochem.*, **251**, 1-16
- SKELTON et al.** (1998)
SKELTON T. P., ZENG C., NOCKS A. & STAMENKOVIC I.
Glycosylation Provides Both Stimulatory and Inhibitory Effects on Cell Surface und Soluble CD44 Binding to Hyaluronon, *J. Cell Biol.*, **140**, 431-446
- SMYTH et al.** (2001)
SMYTH M. J., GODFREY D. I. & TRAPANI J. A.
A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy, *Nat. Immunol.*, **2**, 293-299
- SOLBIATI et al.** (1999)
SOLBIATI J., CHAPMAN-SMITH A., MILLER J. L., MILLER C. G. & CRONAN J. E.
Processing of the N-termini of nascent polypeptide chains requires deformylation prior to methionine removal, *J. Mol. Biol.*, **290**, 607-614
- SONTAG E.** (2001)
Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signalling, *Cell. Signal.*, **13**, 7-16
- STEINMANN et al.** (1991)
STEINMANN B., BRUCKNER P. & SUPERTI-FURGA A.
Cyclosporin A Slows Collagen Triple-helix Formation *in vivo*: Indirect Evidence for Physiologic Role of Peptidyl-Prolyl *cis-trans*-Isomerase, *J. Biol. Chem.*, **266**, 1299-1303
- SUDOL M.** (1996)
Structure and function of the WW domain, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **65**, 113-132
- SUN et al.** (1994)
SUN P., HOOPS A. & HARTWICK R. A.
Enhanced albumin protein separations and protein-drug binding constant measurements using anti-inflammatory drugs as run buffer additives in affinity capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, **661**, 335-340
- SVENSSON et al.** (1984)
SVENSSON C. K., WOODRUFF M. N., BAXTER J. G. & LALKA D.
Free drug concentration monitoring in clinical practice. Rationale and current status, *Clin. Pharmacol.*, **11**, 450-469
- SWINNEY K. & BORNHOP D.** (2000)
A Review of CE Detection Methodologies, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **30**, 1-30
- SZŐKŐ E.** (1997)
Protein and peptide analysis by capillary electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography, *Electrophoresis*, **18**, 74-81
- TAO L. & KENNEDY R. T.** (1997)
Measurement of antibody-antigen dissociation constants using fast capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis*, **18**, 112-117

- TERABE et al.** (1994)
TERABE S., OTSUKA K., ICHIKAWA K., TSUCHIYA A. & ANDO T.
Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries, *Anal. Chem.*, **56**, 111-113
- TERABE S.** (1989)
Electrokinetic Chromatography: an interface between electrophoresis and chromatography, *Trends Anal. Chem.*, **8**, 129-133
- TERABE S.** (1992)
Micellar Electrokinetic Chromatography, Publication No. 266924, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
- THALI et al.** (1994)
THALI M., BUKOVSKY A., KONDO E., ROSENWIRTH B., WALSH C. T., SODROSKI J. & GÖTTLINGER H. G.
Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions, *Nature*, **372**, 363-365
- THUNECKE F. & FISCHER G.** (1998)
Separation of *cis/trans* conformers of human and salmon calcitonin by low temperature capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **19**, 288-294
- TORRES-LUGO M. & PEPPAS N. A.** (2000)
Transmucosal delivery systems for calcitonin: a review, *Biomaterials*, **21**, 1191-1196
- TSIEN R. Y.** (1998)
The Green Fluorescent Protein, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509-544
- VENTON D. L. & WOODBURY C. P.** (1999)
Screening combinatorial libraries, *Chemometrics Intell. Lab. Syst.*, **48**, 131-150
- VOLKMER-ENGERT R. & SCHNEIDER-MERGENER J.** (1998)
Synthese von Peptid-Bibliotheken zum Studium von Protein-Ligand-Wechselwirkungen, *Biospektrum*, **4**, 30-34
- WALKER et al.** (1995)
WALKER K. L., CHIU R. W., MONNIG C. A. & WILKINS C. L.
Off-Line Coupling of Capillary Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry
Anal. Chem., **67**, 4197-4204
- WATSON E. & YAO F.** (1993)
Capillary electrophoretic separation of human recombinant erythropoietin (r-HuEPO) glycoforms, *Anal. Biochem.*, **210**, 389-393
- WÄTZIG et al.** (1998)
WÄTZIG H., DEGENHARDT M. & KUNKEL A.
Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications,
Electrophoresis, **19**, 2695-2752
- WISEMAN et al.** (1989)
WISEMAN T., WILLISTON S., BRANDTS J. S. & LIN L.-N.
Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter, *Anal. Biochem.*, **179**, 131-137
- WU et al.** (2000)
WU C. F., CHA H. J., RAO G., VALDES J. J. & BENTLEY W. E.
A green fluorescent protein fusion strategy for monitoring the expression, cellular location, and separation of biologically active organophosphorous hydrolase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 78-83
- XIAN et al.** (1996)
XIAN J., HARRINGTON M. G. & DAVIDSON E. H.
DNA-protein bindings assays from a single sea urchin egg: A high-sensitivity capillary electrophoresis method,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 86-90
- XIAO et al.** (1999)
XIAO Y., WU W., DIERICH M. P. & CHEN Y.-H.
HIV-1 gp41 by N-Domain Binds the Potential Receptor Protein P45, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **121**, 253-257
- XU Y.** (1999)
Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.*, **71**, 309R-313R
- YANG et al.** (1998)
YANG L., LEE C. S., HOFSTADLER A., PAŠA-TOLIĆ L. & SMITH R. D.
Capillary Isoelectric Focusing-Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry for Protein Characterization, *Anal. Chem.*, **70**, 3235-3241
- YE et al.** (1998)
YE L., LE X. C., XING J. Z., MA M. & YATSCOFF R.
Competitive immunosassay for cyclosporine using capillary electrophoresis with laser induced fluorescence polarization detection,
J. Chromatogr. A, **714**, 59-67

YIN et al. (1998)

YIN L., BRAATEN D. & LUBAN J.

Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Modulated by Host Cyclophilin A Expression Levels, *J. Virol.*, **72**, 6430-6436

YOO et al. (1997)

YOO S., MYZKA D. G., YEH C., MCMURRAY M., HILL C. P. & SUNDQUIST W. I.

Molecular Recognition in the HIV-1 Capsid/Cyclophilin A Complex, *J. Mol. Biol.*, **269**, 780-795

YU et al. (2000)

YU T., XIAO Y., BAI Y., RU Q., LUO G., DIERICH M. P. & CHEN Y.-H.

Human interferon- β inhibits binding of HIV-1 gp41 to lymphocyte and monocyte cells and binds the potential receptor protein P50 for HIV-1 gp41, *Immunol. Lett.*, **73**, 19-22

ZARNT T. (1997)

Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase: Effektoren und Proteinfaltungskatalyse, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

ZEDER-LUTZ et al. (1995)

ZEDER-LUTZ G., RAUFFER N., ALTSCHUH D. & VAN REGENMORTEL M. H.

Analysis of cyclosporin interactions with antibodies and cyclophilin using the BIAcore, *J. Immunol. Methods*, **183**, 131-140

ZHANG Y. & GOMEZ F. A. (2000)

Multiple-step ligand injection affinity capillary electrophoresis for determining binding constants of ligands to receptors,

J. Chromatogr. A, **897**, 339-347

ZHANG Y. (2001)

Rational Design of Cyclosporin A Derivatives from Selective Enzyme Inhibition,

Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

ZHAO et al. (1997)

ZHAO Y., CHEN Y., SCHUTKOWSKI M., FISCHER G. & KE H.

Cyclophilin A complexed with a fragment of HIV-1 gag protein: insights into HIV-1 infectious activity, *Structure*, **5**, 139-146

ZHOU et al. (1998)

ZHOU G.-H., LUO G.-A., ZHOU Y., ZHOU K.-Y., ZHANG X.-D. & HUANG L.-Q.

Application of capillary electrophoresis, liquid chromatography, electrospray-mass spectrometry and matrix-assisted laser

desorption/ionisation-mass spectrometry to the characterization of recombinant human erythropoietin, *Electrophoresis*, **19**, 2348-2355

8 Abkürzungen und Symbole

Abkürzungen

Die Aminosäuren wurden im Einbuchstabencode dargestellt. Die N-terminale Aminogruppe und die C-terminale Carboxylgruppe wurden dabei, soweit unmodifiziert vorhanden, nicht mit angegeben.

ABI	Kapillarelektrophoresegerät ABI-270HT, Applied Biosystems
Ac-	Acetyl-
ACE	Affinitätskapillarelektrophorese
AE	Absorptionseinheit
BGE	Hintergrundelektrolyt (<i>background electrolyte</i>)
Bpa	4-Benzoyl-Phenylalanin
CE	Kapillarelektrophorese
CGE	Kapillargelelektrophorese
CIEF	Kapillar-Isoelektrische Fokussierung
CsA	Cyclosporin A
CsH	Cyclosporin H (D- ¹¹ MeVal-Cyclosporin)
Cyp	Cyclophilin
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
Da	Dalton (Einheit der molekularen Masse), g/mol
-DFA	2,4-Difluoroanilid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EMMA	elektrophoretisch vermittelte Mikroanalyse, <i>electrophoretically mediated microanalysis</i>
EOF	elektroosmotischer Fluß
ESI-MS	Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisierung
FKBP	FK506-Bindeprotein
FPLC	beschleunigte Protein-Flüssigchromatographie, <i>fast protein liquid chromatography</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>
Hepes	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPCE	Hochleistungskapillarelektrophorese, <i>high performance capillary electrophoresis</i>
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>
IC ₅₀	InhibitorKonzentration für 50% Restaktivität des Enzyms
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
ITC	isothermische Titrationskalorimetrie
ITP	Isotachophorese
kDa	Kilodalton (Einheit der molekularen Masse), 10 ³ g/mol

LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz(-Detektion)
MALDI-TOF-MS	Massenspektrometrie mit Matrix-unterstützter Laser-Desorptions-Ionisation und Trennung nach Flugzeit der Ionen
MDQ	Kapillarelektrophoresegerät P/ACE MDQ, Beckman Coulter
MeBmt	(4R)-4-[(E)-2-Butenyl]-4-methyl-L-Threonin
MEKC	Micellarelektrokinetische Chromatographie
Mes	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Mops	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
MP	Bindungspuffer für die Untersuchung Cellulose-gebundener Peptidbibliotheken
MS	Massenspektrometrie
Nle	Norleucin
OD _λ	optische Dichte bei einer Wellenlänge λ
OPB	ortsaufgelöste Cellulose-gebundene Oligopeptidbibliothek
PACE	Kapillarelektrophoresegerät P/ACE 2100 mit LIF, Beckman Coulter
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
-pNA	-4-Nitro-Anilid
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
pSer	phosphoryliertes Serin
pTyr	phosphoryliertes Thyrosin
p24	HIV-Capsidprotein
rDmCyp20	rekombinantes Cyclophilin 20 aus <i>Drosophila melanogaster</i>
rDmCyp20-GFP	Fusionsprotein aus rekombinatem Cyclophilin 20 (<i>Drosophila melanogaster</i>) und grün fluoreszierendem Protein (<i>Aequorea victoria</i>)
rhCyp18	rekombinantes humanes Cyclophilin 18
RFE	relative Fluoreszenzeinheit
RP-HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer Umkehrphase
SEC	Größenausschlußchromatographie, <i>size exclusion chromatography</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecylsulfat</i>
SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat
Suc-	Succinyl-
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TB	<i>terrific broth</i> -Nährmedium
TBT	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbar, <i>visible</i>

Symbole

A	Absorption
c	Konzentration
d	Schichtdicke
[E] ₀	Ausgangskonzentration eines Enzymes
F	elektrische Feldstärke
G ⁰	Ausgangswert einer gemessenen Größe G
G ^{max}	Maximalwert einer gemessenen Größe G
G ^{obs}	aktueller Wert einer gemessenen Größe G
I ₀	Intensität des eingestrahnten Lichts
I _d	Intensität des durchgelassenen Lichts
I _F	Intensität der Fluoreszenzemission
K _A	Assoziationskonstante
K _B	Bindungskonstante
K _D	Dissoziationskonstante
L	Ligand einer Komplexbildungsreaktion
l _D	Kapillarlänge bis zum Detektor
l _E	Gesamtkapillarlänge
k _{cat}	Katalysekonstante
k _{enz}	Geschwindigkeitskonstante einer enzymatisch katalysierten Reaktion
k _{enz} ⁰	Ausgangswert der Geschwindigkeitskonstante einer enzymatisch katalysierten Reaktion
k _{enz} ⁱ	Geschwindigkeitskonstante einer enzymatisch katalysierten und inhibierten Reaktion
K _m	MICHAELIS-MENTEN-Konstante
k _{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion
k _{on}	Geschwindigkeitskonstante der Komplexbildungsreaktion
k _{off}	Geschwindigkeitskonstante der Komplexzerfallsreaktion
k _u	Geschwindigkeitskonstante einer unkatalysierten Reaktion
M _p	molekulare Masse eines Peptids
P	Analyt einer Komplexbildungsreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
pK _a	Säurekonstante
q	Ladung
r _H	hydrodynamischer Radius, Radius eines hydratisierten Ions
[S] ₀	Ausgangskonzentration eines Substrates
t _{EOF}	Migrationszeit des elektroosmotischen Flusses
t _M	Migrationszeit eines Analyten
t _R	Retentionszeit eines Analyten

U	Trennspannung
v/v	Mischungsverhältnis Volumen-zu-Volumen
w/v	Mischungsverhältnis Masse-zu-Volumen
v_{eo}	elektroosmotische Geschwindigkeit
v_{ep}	elektrophoretische Geschwindigkeit
V_R	Retentionsvolumen einer Substanz
α	Molenbruch eines Stoffes
ε	Extinktionskoeffizient
ε_0	absolute Dielektrizitätskonstante
ε_r	relative Dielektrizitätskonstante
Φ_F	Quantenausbeute der Fluoreszenz
η	dynamische Viskosität
λ	Absorptionswellenlänge bei UV-Detektion
λ_{ex}	Anregungswellenlänge bei Fluoreszenzdetektion
λ_{em}	Emissionswellenlänge bei Fluoreszenzdetektion
μ_{eo}	elektroosmotische Mobilität
μ_{ep}	elektrophoretische Mobilität
μ_{ep}^{korr}	korrigierte elektrophoretische Mobilität
μ_{ep}^{max}	Maximalwert der elektrophoretischen Mobilität
μ_{ep}^{obs}	beobachtete elektrophoretische Mobilität
μ_{ep}^0	Ausgangswert der elektrophoretischen Mobilität
ζ	Zeta-Potential

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Fischer möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit der Bearbeitung in seinem Institut sowie das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit ganz besonders danken.

Herrn PD Dr. G. Küllertz danke ich für wertvolle Ratschläge und konstruktive Kritik, die die Entstehung dieser Arbeit maßgeblich begleitet haben.

Herrn Dr. F. Thuncke, Herrn Dr. H. Bang und Frau Dr. C. Rascher-Bang danke ich für die Betreuung der Arbeit, die Einführung in die Welt der Proteinchemie, die permanente Diskussionsbereitschaft und die Hilfe bei der Lösung der Probleme des Laboralltags.

Frau Dr. A. Schierhorn danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen. Herrn Dr. P. Rücknagel danke ich für die Anfertigung der HPLC- und Sequenzanalysen.

Bei Herrn Dr. M. Jakob bedanke ich mich für die Hilfestellung bei der Durchführung des PPIase-Aktivitätstests und die Durchsicht des Manuskripts.

Bei Herrn Dr. J. Rahfeld und Herrn J. Fanghänel bedanke ich mich für die Bereitstellung von rhCyp18. Herrn J. Fanghänel danke ich darüber hinaus für die Durchführung der isothermischen Titrationskalorimetrie.

Frau Dr. J. Reißmann gilt mein Dank für die Bereitstellung der *E. coli*-Stämme zur Überexpression von rDmCyp20 und rDmCyp20-GFP sowie der verschiedenen Entwicklungsstufen von *Drosophila melanogaster*.

Herrn Dr. F. Bordusa, Herrn D. Wildemann, Herrn Dr. Y. Zhang, Herrn Dr. G. Jahreis und Herrn Dr. M. Schutkowski möchte ich für die Bereitstellung synthetischer Peptide und Peptidderivate sowie Cellulose-gebundener Peptidbibliotheken danken.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts danke ich Frau Dr. B. König und Frau Dr. B. Hernandez Alvarez.

Frau B. Rappsilber und Frau K. Walther danke ich für die hervorragende technische Unterstützung.

Herrn Dr. F. M. Matysik und Frau P. Gläser (Universität Leipzig, Institut für Analytische Chemie) gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit zur Durchführung der CE-LIF-Messungen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. G. Fischer danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen unerwähnt gebliebenen Hilfeleistungen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Frau und meinen Eltern, die mich während der universitären Ausbildung sowie der Promotion geduldig und beharrlich unterstützt und damit entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Name: Steffen Kießig

geboren am: 11. Januar 1971 in Leipzig

Ausbildung:

09/77 bis 08/87 Polytechnische Oberschule in Leipzig
Abschluß: "Mit Auszeichnung"

09/87 bis 07/90 Berufsausbildung mit Abitur als Galvaniseur in Leipzig
Abschluß: "Mit Auszeichnung"

09/90 bis 08/91 Zivildienst

Studium:

10/91 bis 07/96 Studium an der Universität Leipzig, Fachrichtung: Chemie
Diplomarbeit zum Thema: "Trennung von Carnitin und Acylcarnitinen mit HPLC und Kapillarelektrophorese"
Abschluß "Sehr gut"

09/96 bis 12/96 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität Leipzig
Fakultät für Chemie und Mineralogie, Institut für Analytische Chemie
Projekt: "Messungen der Immissionsbelastung kulturhistorisch bedeutsamer Bauwerke"

09/96 bis 01/01 Postgradualstudium an der Universität Leipzig
Abschluß als Fachchemiker für Toxikologie

01/97 bis 06/97 Industriepraktikum, Novartis AG, Zentrale Analytik, Basel, Schweiz
Thema: "Untersuchungen zur Stabilität von Antisenseoligonukleotiden in Humanplasma mittels Kapillargelelektrophorese"

07/97 bis 10/97 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität Leipzig,
Fakultät für Chemie und Mineralogie, Institut für Analytische Chemie
Projekt: "Umweltmonitoring an geologischen und biologischen Materialien"

seit 11/97 Doktorand an der Max-Planck-Forschungsstelle für
Enzymologie der Proteinfaltung, Halle (Saale)

Publikationen

VOGT C. & KIESSIG S. (1996)

Separation of D/L-carnitine enantiomers by capillary electrophoresis

J. Chromatogr. A, **745**, 53-60

KIESSIG S., VOGT C. & WERNER G. (1997)

Separation of ADAM derivatives of carnitine and acyl-carnitines by capillary electrophoresis

Fresenius' J. Anal. Chem., **357**, 539-542

KIESSIG S. & VOGT C. (1997)

Separation of carnitine and acylcarnitines by capillary electrophoresis

J. Chromatogr. A, **781**, 475-479

KIESSIG S., BANG H. & THUNECKE F. (1999)

Interaction of cyclophilin and cyclosporins monitored by affinity capillary electrophoresis

J. Chromatogr. A, **853**, 469-477

KIESSIG S., REISSMANN J., RASCHER C., KÜLLERTZ G., FISCHER A. & THUNECKE F. (2001)

Application of a green fluorescent fusion protein to study protein-protein interactions by electrophoretic methods

Electrophoresis, **22**, 1428-1435

KIPPING M., ZARNT T., KIESSIG S., REIMER U., FISCHER G. & BAYER P. (2001)

Increased Backbone Flexibility in Threonine⁴⁵-Phosphorylated Hirudin upon pH change

Biochemistry, **40**, 7957-7963

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß diese Arbeit selbständig und nur unter der Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Ich versichere weiterhin, daß alle anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Diese Arbeit wurde bisher noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, 10. November 2001

Steffen Kießig

Thesen zur Dissertation

"Untersuchung von Protein-Ligand-Interaktionen mit Kapillarelektrophorese"

vorgelegt von Steffen Kießig

Der Analyse von Protein-Ligand-Interaktionen kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie an vielfältigen biochemischen Prozessen beteiligt sind. Für die Untersuchung derartiger Wechselwirkungen steht ein breites Methodenspektrum zur Verfügung. Die Anwendung der Kapillarelektrophorese (CE) als Hochleistungstrenntechnik hat in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen, seitdem die CE als effektives und schnelles Werkzeug zur Interaktionsanalyse bei minimalem Materialverbrauch etabliert wurde.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Anwendung der CE als Affinitätskapillarelektrophorese (ACE) zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Die vielfältige Einsetzbarkeit der Methode wurde am Beispiel der Interaktion von biochemisch-pharmakologisch interessanten Liganden mit Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) demonstriert.

Die Interaktionsanalyse von Cyclophilinen, einer Familie der PPIasen, mit Peptid- bzw. Protein-Liganden eröffnete die Möglichkeit, die ACE zur Bestimmung von Bindungsdaten und zur Suche nach unbekanntem Interaktionspartnern einzusetzen.

Zielstellung:

Die Arbeit diente der Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Methode zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von Cyclophilin-Ligand-Interaktionen.

Ausgehend von den Dissoziationskonstanten (K_D) bekannter Vertreter dieser Wechselwirkungen galt es, eine Methode zu etablieren, die eine Bestimmung von K_D von Cyclophilin-Interaktionen mit Peptid-Liganden unterschiedlicher Affinität ermöglichte.

Die Möglichkeit, Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Hilfe der ACE zu analysieren, wurde in einem anderen Teil der Arbeit untersucht. Mit Hilfe eines Referenzsystems für Cyclophilin-Protein-Interaktionen sollte die Einsatzfähigkeit der ACE für derartige, durch die Methode nur wenig untersuchte Wechselwirkungen demonstriert werden. ACE in Kombination mit einem fluoreszierenden Cyclophilin-Fusionsprotein wurde zur selektiven Detektion von Cyclophilin-Interaktionen in Zell-Lysaten herangezogen.

Ergebnisse:

1. Die zur Untersuchung der Protein-Ligand-Wechselwirkungen verwendeten Proteine wurden rekombinant hergestellt. Das Cyclophilin rDmCyp20 bzw. das entsprechende GFP-Fusionsprotein rDmCyp20-GFP wurden in einer drei- bzw. zweistufigen chromatographischen Reinigungsprozedur aus *E. coli*-Zellhomogenat mit einem Reinheitsgrad $\geq 95\%$ (nach SDS-PAGE) erhalten. Die Identität der gereinigten Proteine konnte durch EDMAN-Sequenzierung und Massenspektrometrie bestätigt werden.
2. Der GFP-Teil von rDmCyp20-GFP, der für Kontrollzwecke benötigt wurde, konnte nach tryptischem Abbau der Isomerasedomäne von rDmCyp20-GFP und nachfolgender einstufiger chromatographischer Reinigung erhalten werden.
3. Die enzymatischen Eigenschaften von rDmCyp20 und rDmCyp20-GFP wurden in einem proteasefreien PPIase-Aktivitätstest unter Verwendung des Tetrapeptidderivats $_{AC-AA PF- DFA}$ ermittelt. Die Werte für k_{cat}/K_m bzw. IC_{50}^{CsA} von $(2,9 \pm 0,1) \cdot 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$ bzw. $(6,4 \pm 0,6) \cdot 10^{-9} M$ für rDmCyp20 und $(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$ bzw. $(11,1 \pm 1) \cdot 10^{-9} M$ für rDmCyp20-GFP zeigten keine drastischen Veränderungen auf Grund der GFP-Fusion.
4. Die Bindung zwischen rhCyp18 und dem Inhibitor Cyclosporin A (CsA) konnte durch ACE qualitativ charakterisiert werden. Trotz der geringen Differenz der elektrophoretischen Mobilität zwischen rhCyp18 und dem rhCyp18-CsA-Komplex, verursacht durch einen marginalen Unterschied der molekularen Masse bei konstanter Ladung, gelang es, freies Protein und Komplex zu trennen.
5. In ACE-Bindungsstudien von CsA und den Cyclosporin-Derivaten [O-(Biotin-NH(CH₂)₅NHC(O)CH₂-)D-Serin]⁸-CsA (biotinyliertes CsA) und [O-phosphoryl MeBmt]¹-CsA (phosphoryliertes CsA) mit rhCyp18 zeigte sich eine Verringerung der Affinität für die Cyclosporin-Derivate im Vergleich zu unmodifiziertem CsA. Für biotinyliertes CsA wurde eine Dissoziationskonstante im Bereich von $10^{-6} M$ abgeschätzt, während für phosphoryliertes CsA keine Bindung an rhCyp18 detektiert werden konnte.

6. Mit Hilfe der elektrophoretisch vermittelten Mikroanalyse konnte eine Dissoziationskonstante der rhCyp18-CsA-Wechselwirkung im Bereich von 1 bis 100 nM abgeschätzt werden. Für biotinyliertes CsA wurde ein K_D -Wert von $1,3 \pm 0,09 \mu\text{M}$ ermittelt, während für phosphoryliertes CsA keine Dissoziationskonstante ermittelt werden konnte.
7. Die Wechselwirkung zwischen rhCyp18 und Bradykinin, einem Peptidhormon mit geringer Cyclophilin-Affinität, konnte erstmals durch die Ermittlung einer Dissoziationskonstante von $1,4 \pm 0,1 \text{ mM}$ quantitativ belegt werden.
8. Die Integration der ACE-Methode zur Untersuchung der rhCyp18-CsA-Bindung in die ACE-Analyse der Cyclophilin-Bradykinin-Interaktion eröffnete zusätzlich die Möglichkeit, rhCyp18 und rhCyp18-CsA-Komplex parallel auf ihre Affinität gegenüber Bradykinin zu untersuchen.
9. Für die Cyclophilin-Isoenzyme rhCyp18 und rDmCyp20 wurden Dissoziationskonstanten von $197 \pm 32 \mu\text{M}$ bzw. $106 \pm 18 \mu\text{M}$ für die Bindung des Oligopeptids $\text{Ac-DRVHPVHAGP-Bpa-APGQ-Nle-REPRGSDIA-NH}_2$, das vom HIV-Capsidprotein p24 abgeleitet wurde, ermittelt.
10. Durch Vergleich der Aminosäuresequenz von DmCyp20 und typischen Proteinbindungsmodulen wurde in DmCyp20 ein Interaktionsmodul mit Ähnlichkeit zu WW-Bindungsdomänen identifiziert.
11. Durch Verwendung einer orts aufgelösten Cellulose-gebundenen Oligopeptidbibliothek, die die Aminosäuresequenz von CAPPUCCINO, einem potentiellen WW-Liganden, umfaßte, und dem fluoreszierenden DmCyp20-Fusionsprotein rDmCyp20-GFP wurden Peptide der CAPPUCCINO-Sequenz mit Affinität zu DmCyp20 identifiziert.
12. Zur Verifizierung der Bindung wurde eine Auswahl der identifizierten Peptide in Lösung durch ACE untersucht. Dabei konnten für die Interaktionen des Peptids $\text{Ac-NPPKPMRPLYWTR-NH}_2$ mit rDmCyp20-GFP bzw. rDmCyp20 Dissoziationskonstanten von $63 \pm 6 \mu\text{M}$ bzw. $19 \pm 2 \mu\text{M}$ bestimmt werden.

13. Die Etablierung einer ACE-Methode zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgte am Beispiel der Interaktion zwischen Cyp20 und dem HIV-Capsidprotein p24 unter Verwendung des Fusionsproteins rDmCyp20-GFP. Nachfolgend konnte eine Dissoziationskonstante von $20 \pm 1,5 \mu\text{M}$ bestimmt werden.
14. Durch den Einsatz der Größenausschlußchromatographie (SEC, $K_D = 23 \pm 3 \mu\text{M}$) bzw. der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (NPAGE, $K_D \approx 25 \mu\text{M}$) konnte die mittels ACE bestimmte Dissoziationskonstante der p24-rDmCyp20-GFP-Wechselwirkung durch unabhängige Analysenverfahren verifiziert werden.
15. In Zell-Lysaten von *Drosophila melanogaster* wurde die Interaktion von rDmCyp20-GFP mit einem putativen Liganden durch ACE detektiert. Die Ergebnisse dieser ACE-Untersuchungen konnten durch NPAGE in Form von "band-shift"-Experimenten bestätigt werden.
16. Die Untersuchung von Zell-Lysaten unterschiedlicher Entwicklungsstufen von *Drosophila melanogaster* zeigte eine entwicklungsabhängige Wechselwirkung des putativen Liganden mit rDmCyp20-GFP.