

**Prokaryotische Expression, *in vitro*-Faltung
und Rekonstitution des Neuropeptid Y-
Rezeptors Typ 2 für
NMR-Strukturanalysen**

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
genehmigte

DISSERTATION

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

Diplom-Ingenieur Peter Schmidt

geboren am 09.08.1978 in Neubrandenburg

Gutachter:

25.11.2009, Halle (Saale)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	5
2.1.1	Struktur und Klassifizierung von GPCRs	5
2.1.2	Signaltransduktion von GPCRs	7
2.1.3	Der Y ₂ -Rezeptor	8
2.2	Rekombinante Expression von GPCRs	10
2.2.1	Eukaryotische Expressionssysteme	11
2.2.2	Prokaryotische Expressionssysteme	12
2.2.3	Zellfreie Expression	13
2.2.4	<i>fed-batch</i> -Fermentation	14
2.2.5	Isolierung und Reinigung von GPCRs aus IBs	15
2.3	Renaturierung von Proteinen	16
2.3.1	Hydrophobe Wechselwirkung	17
2.3.2	Detergenzien	18
2.3.3	Pulsrenaturierung	20
2.3.4	<i>redox-shuffling</i> System	22
2.4	Rekonstitution von Membranproteinen	22
2.5	Charakterisierung von GPCRs	24
2.5.1	Liganden-Bindung	24
2.5.2	NMR-Spektroskopie	26
3	Material und Methoden	28
3.1	Materialien	28
3.1.1	Chemikalien	28
3.1.2	Peptide und Enzyme	30
3.1.3	Plasmide	31
3.1.4	Mikroorganismen	31
3.1.5	Puffer, Medien und Lösungen	32
3.1.6	Standards und Kits	34
3.1.7	Geräte	34
3.1.8	Sonstige Materialien	35
3.2	Methoden	36
3.2.1	Allgemeine analytische Methoden	36
3.2.2	Klonierung	38
3.2.3	Zellkultivierung	40
3.2.4	Biochemische und Biophysikalische Methoden	42
3.2.5	Methoden zur Charakterisierung des Y ₂ -Rezeptors	44

4	Ergebnisse	47
4.1	Rekombinante Herstellung des Y ₂ -Rezeptors	48
4.1.1	Klonierung	48
4.1.2	Zellkultivierung	49
4.1.3	Aufarbeitung des Y ₂ -Rezeptors	51
4.1.4	Charakterisierung des Y ₂ -Rezeptors in SDS-Mizellen	54
4.2	<i>In vitro</i> Faltung des Y ₂ -Rezeptors	58
4.2.1	Stabilisierende Additive in der Faltung	60
4.2.2	Optimierung weiterer Faltungsparameter	61
4.2.3	Stabilisierung des Y ₂ -Rezeptors in DDM/CHAPS Mizellen	62
4.2.4	Charakterisierung des Y ₂ -Rezeptors in DDM/CHAPS Mizellen ..	67
4.3	Rekonstitution des Y ₂ -Rezeptors	71
4.3.1	Methoden zur Rekonstitution	71
4.3.2	Charakterisierung des Y ₂ -Rezeptors in Liposomen	74
5	Diskussion	77
5.1	Rekombinante Herstellung des Y ₂ -Rezeptors	78
5.1.1	Bewertung des Expressionssystems	78
5.1.2	Optimierung der Proteinausbeute	79
5.2	Der Y ₂ -Rezeptor in SDS-Mizellen	80
5.3	Der Y ₂ -Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen	85
5.3.1	Einfluss der Detergenzien auf die Strukturbildung	85
5.3.2	Einfluss der Additive auf die Strukturbildung	87
5.3.3	Funktionelle Charakterisierung	88
5.4	Der Y ₂ -Rezeptor in DMPC-Liposomen	89
5.5	Bewertung der Strategie	92
6	Literaturverzeichnis	94
	Danksagung	106
	Selbstständigkeitserklärung	107
	Wissenschaftlicher Werdegang	108
	Liste der Publikationen	109

Abkürzungsverzeichnis

A _{2A} R	humaner A _{2A} -Adenosinrezeptor
AN	Aggregationzahl (<i>aggregation number</i>)
β ₂ AR	humaner β ₂ -Adrenergenrezeptor
BFM	Biofeuchtmasse
BLT ₁ R	humaner Leukotrin B ₄ -Rezeptor Typ 1
bp	Basenpaare
CB ₂ R	humaner Canabinoidrezeptor Typ 2
CD	Circulardichroismus
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propanesulfonat
CHS	Cholesterol-Hemisuccinat
CMC	kritische Mizellkonzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
cps	Zählungen/Sekunde (<i>counts per second</i>)
cv	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
DDM	n-Dodecyl-β-D-Maltosid
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholine
DMPC- <i>d</i> ₆₇	1,2-Dimyristoyl- <i>d</i> _{5,4} - <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholine-1,1,2,2- <i>d</i> ₄ -N,N,N-tri-methyl- <i>d</i> ₉
DNA	Deoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dpm	Punkte/Minute (<i>dots per minute</i>)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GLPR ₁	humaner Glucagon-like Peptid 1 Rezeptor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
His-tag	Fusionspeptid aus mehreren Histidinen
³ H-NPY	Tritium markiertes Neuropeptid Y
HSQC	Heteronukleare Einquantenkohärenz (<i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
IBs	Einschlusskörper (<i>inclusion bodies</i>)
IMAC	Metalionenaffinitätschromatographie (<i>imobilized metal affinity chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LUV	große unilamellare Vesikel (<i>large unilamellar vesicle</i>)
MAS	makroskopische Rotation der Probe um die eigene Achse, die gegen das Magnetfeld um den magischen Winkel geneigt ist (<i>Magic Angle Spinning</i>)
MLV	Multischichtvesikel (<i>multilamellar vesicles</i>)
NMR	Kernmagnetische Resonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NPY	Neuropeptid Y
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OMP	<i>E. coli</i> Membranproteine (<i>outer membrane protein</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PTHR ₁	Parathyroid Hormon Rezeptor Typ 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
Y ₂ R	humaner Neuropeptid Y Rezeptor Typ 2

1 Einleitung

Membranproteine repräsentieren eine pharmazeutisch höchst relevante Klasse von Molekülen. Sie bilden etwa 30% des menschlichen Proteoms und besitzen eine Schlüsselfunktion für die physiologisch essentielle Signaltransduktion (Boyd et al. 1998; Stevens, Arkin 2000). Eine Reihe von schweren erblichen und somatischen Erkrankungen sind auf Fehlfunktionen von Membranproteinen zurückzuführen (Hanson, Stevens 2009). Aktuelle pharmakologische Untersuchungen gehen davon aus, dass mindestens zwei Drittel aller neu entwickelten Medikamente auf diese Proteine wirken (Watts 2005; Ulloa-Aguirre, Conn 2009). Unter den Membranproteinen bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) die größte (Venter et al. 2001) und therapeutisch interessanteste Unterfamilie (Jacoby et al. 2006). Etwa 30% der heutigen zugelassenen Medikamente wirken auf GPCRs, was diese Proteinklasse zu einem sehr Erfolg versprechenden Target für therapeutische Anwendungen macht (Hopkins, Groom 2002; Fredholm et al. 2007). Von den weltweit 20 umsatzstärksten Medikamenten zielen 12 auf GPCRs und erreichten 2007 einen Jahresumsatz von \$50 Mrd. (McCusker et al. 2007) mit steigender Tendenz für die Zukunft. Trotzdem gehören diese Rezeptoren zu einer der letzten unerforschten Klasse von Proteinen (Booth 2003). Aufgrund ihrer herausragenden Bedeutung unternimmt die internationale Forschungsgemeinde seit Mitte der 90er Jahre große Anstrengungen mehr Informationen über GPCRs zu erhalten. Kein anderes Gebiet in der Proteinforschung hat sich seitdem so rasant entwickelt (Abb. 1.1).

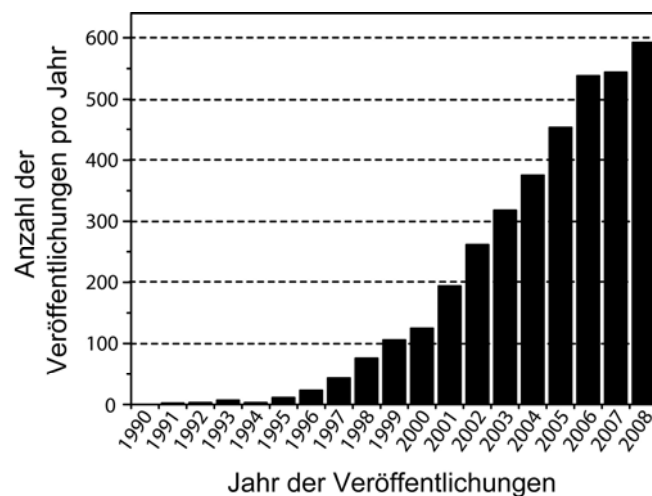


Abb. 1.1: Anzahl der jährlichen Veröffentlichungen von wissenschaftlichen Arbeiten zu GPCRs (Quelle: ISI Web of KnowledgeSM).

Aktiviert werden GPCRs durch die Bindung eines Liganden. Neben Informationen zu Funktionen und der Liganden-Bindung steht besonders die Ermittlung von Strukturdaten für gezielte Medikamentenentwicklung im Mittelpunkt. Erstmals gelang es Palczewski et al. Rhodopsin aus Rinderaugen im Grundzustand (Palczewski et al. 2000), später auch im aktivierten Zustand (Salom et al. 2006) zu kristallisieren (Abb. 1.2). Dieser Klasse A-GPCR liegt im Gegensatz zu allen anderen GPCRs in hohen Konzentrationen im Zellgewebe vor und sein natürlicher Ligand ist intramolekular kovalent gebunden, so dass Rhodopsin als einziger GPCR nicht durch Bindung, sondern durch Lichtimpulse aktiviert wird (Heck, Hofmann 2001). Erst in den letzten Jahren gelang es die Strukturen für drei weitere Klasse A-GPCRs aufzuklären, für den humanen β_2 -Adrenergerezeptor (Cherezov et al. 2007; Rosenbaum et al. 2007), für den β_1 -Adrenergerezeptor aus Truthahn (Warne et al. 2008) (Abb. 1.2) sowie für den humanen A_{2A} -Adenosinrezeptor (Jaakola et al. 2008).

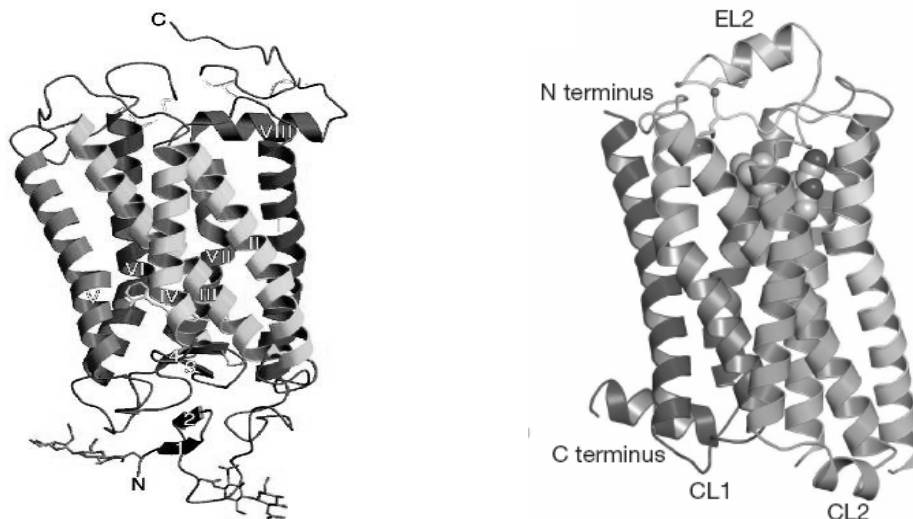


Abb. 1.2: Kristallstrukturen von Rhodopsin aus Rinderaugen (links) (Palczewski et al. 2000) und des β_1 -Adrenergerezeptors aus Truthahn (rechts) (Warne et al. 2008). Diese Klasse A-GPCRs besitzen eine hohe strukturelle Identität.

Alle bisher veröffentlichten Gesamtstrukturen von GPCRs wurden ausschließlich mittels Röntgenkristallographie gewonnen. Es ist jedoch ungewiss, ob statische Abbildungen in nicht-physiologischer Umgebung von diesen dynamischen Proteinen genug Informationen für die strukturbasierte Entwicklung neuer Medikamente liefern (McCusker et al. 2007).

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) ist im Gegensatz zur Röntgenkristallographie eine Methode, die Untersuchungen der Struktur und Dynamik von Proteinen in ihrer natürlichen Umgebung erlaubt. Für stabilere Membranproteine wie Ionenkanäle (Chill et al. 2007) und Proteine der äußeren bakteriellen Membran (OMPs) (Malia, Wagner 2007) konnte

dies bereits gezeigt werden. Auch die Strukturen einzelner Domänen von GPCRs wurden durch NMR-Strukturuntersuchungen aufgeklärt (Zou et al. 2008).

An vollständigen und nativen GPCR-Molekülen gelang eine Strukturaufklärung mittels NMR bisher noch nicht. Diese Methode benötigt Proteinmengen im Milligrammbereich und die Präparation von ausreichenden Mengen an funktionalem Rezeptor stellt bisher die entscheidende Limitierung für eine effiziente Strukturaufklärung und Charakterisierung der funktional wichtigen molekularen Dynamik des Rezeptors dar (McCusker et al. 2007).

Eine Vielzahl an Zellsystemen, von eukaryotischen über prokaryotische bis hin zu zellfreien Systemen, wurde für die Expression von GPCRs verwendet und optimiert. In allen Systemen ist die Ausbeute der Rezeptoren wesentlich geringer als die Ausbeuten, die gewöhnlich für lösliche Proteine erreicht werden. Außerdem gilt für die Expression der meisten GPCRs: je höher die Komplexität des Zellsystems und damit der Grad der posttranslationalen Modifikationen und die Funktionalität ist, desto geringer sind die Ausbeuten und desto höher sind die Kosten bei der Proteinherstellung.

Die einzige Methode, die bisher die Herstellung von für NMR-Methoden geeigneten Rezeptormengen mit einem günstigen Kosten-Ausbeuten-Verhältnis und zudem eine effiziente Markierung der Zielproteine ermöglicht, ist die Expression von GPCRs intrazellulär in dem prokaryotischen Zellsystem *Escherichia coli* (*E. coli*) (Sarramegn et al. 2006). Obwohl *E. coli* ein robustes und gut charakterisiertes Zellsystem ist, ist die Expression von großen Mengen an GPCRs auch mit dieser Methode problematisch (Bane et al. 2007). Daher musste in dieser Arbeit zunächst eine Strategie zur Expression und Reinigung etabliert und hinsichtlich der Proteinausbeute optimiert werden.

Der entscheidende Nachteil dieser Expressionsmethode ist, dass die Rezeptoren in inaktiver Form in Einschlusskörpern angereichert werden. Dies bedeutet, dass die Proteinaggregate isoliert, gelöst und anschließend unter geeigneten Bedingungen *in vitro* renaturiert werden müssen, um ihre ursprüngliche Funktion wieder herzustellen. Für lösliche Proteine ist dies eine oft verwendete, wenn auch nicht triviale, Prozedur (Lilie et al. 1998). Für Membranproteine allerdings stellt diese Methode immer noch eine enorme Herausforderung dar (Booth 2003). Bisher wurde nur für drei GPCRs (den OR5-Olfaktorrezeptor, den humanen Leukotrien-B₄-Rezeptor und den humanen Serotonin-5-HT_{4a}-Rezeptor) eine *in vitro* Renaturierung beschrieben (Baneres et al. 2003; Baneres et al. 2005; Kiefer et al. 1996). Die Schwierigkeit in der Ausbildung der nativen Struktur besteht darin, Renaturierungsbedingungen und -strategien zu finden, in denen die hydrophoben Domänen

vor Aggregation geschützt werden, aber die Ausbildung der nativen Tertiärstruktur ermöglicht wird.

In der vorliegenden Dissertation wurde mit einem typischen Klasse A-GPCR, dem Neuropeptid-Y Rezeptor Typ 2 (Y_2 -Rezeptor), gearbeitet. Er besitzt eine Reihe von Funktionen, wovon eine Schlüsselrolle bei der Nahrungsaufnahme die pharmazeutisch interessanteste ist (Batterham et al. 2002), denn die Behandlung von Bulemie, Magersucht, Fettleibigkeit und Diabetes bietet in der westlichen Wohlstandsgesellschaft ein enormes Marktpotential (Tschop et al. 2004).

Für die *in vitro*-Renaturierung der nativen Tertiärstruktur wurde der Y_2 -Rezeptor in drei verschiedenen Umgebungen präpariert (Abb. 1.3). In ionische Mizellen, die schon bei NMR-Strukturuntersuchungen des Ionenkanals KcsA verwendet wurden (Chill et al. 2006), in nicht-ionische Mizellen, mit denen GPCRs bereits nativ aus Zellmembranen gelöst wurden (Harding et al. 2007; Yeliseev et al. 2005; O'Malley et al. 2007) und in Liposomen, die der natürlichen Umgebung von GPCRs ähnlich sind (Gawrisch, Soubias 2008). Das Ziel war die Präparation von funktionalen, stabilen und hoch konzentrierten Proben des Y_2 -Rezeptors, die sich für NMR-Strukturanalysen eignen. Je nach Art der Präparation sollten Verfahren der Lösungs-NMR oder der Festkörper-NMR zur Strukturuntersuchung verwendet werden.

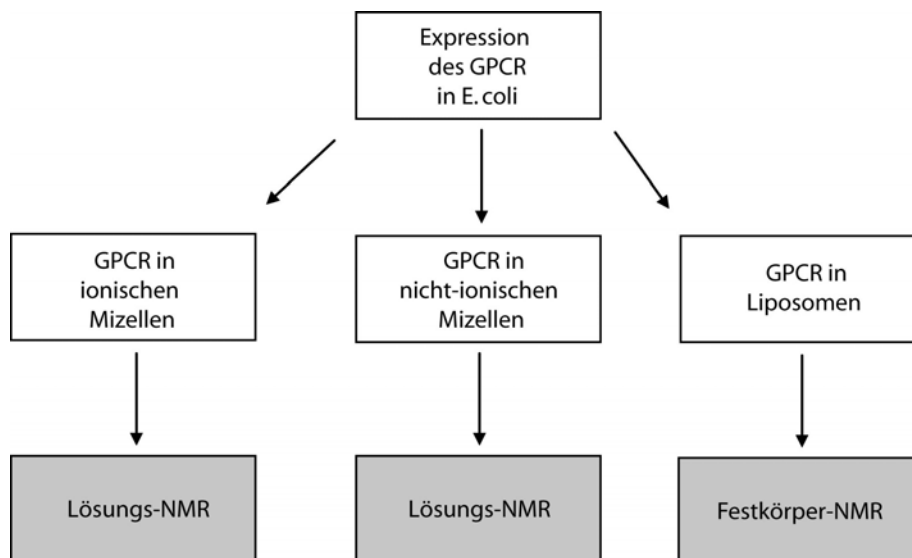


Abb. 1.3: In dieser Arbeit verwendete Strategien für die Präparation von funktionalen, stabilen und hoch konzentrierten Proben des Y_2 -Rezeptors für NMR-Strukturanalysen.

2 Grundlagen

2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Zellen bilden die kleinste Grundeinheit des Lebens. Ein komplexes Kommunikationssystem gewährleistet Wachstum, Differenzierung, Stoff- und Energiewechsel über ihre Membranen. Für die Stoff- und Signalübertragung zwischen dem intra- und dem extrazellulären Raum über die Membran werden spezielle Membranproteine benötigt. Neben den für den Stofftransport verantwortlichen Ionenkanälen und Transportern weist die Cytoplasmamembran eine Vielzahl weiterer Membranproteine wie Ankerproteine, Enzyme und Rezeptoren auf. Unter den Membranproteinen nehmen die GPCRs aufgrund ihrer Bedeutung für einen Großteil wichtiger physiologischer Prozesse eine herausragende Stellung ein.

2.1.1 Struktur und Klassifizierung von GPCRs

GPCRs besitzen keine Sequenzhomologien, die alle Rezeptoren dieser Art teilen (Probst et al. 1992). Doch es gibt typische Strukturelemente. Charakteristisch für alle GPCRs sind sieben die Membran durchspannende α -Helices (Transmembrandomänen), die alternierend durch intra- und extrazelluläre Loops miteinander verbunden sind. Der N-Terminus befindet sich im extrazellulären und der C-Terminus im intrazellulären Raum. Des Weiteren besitzen die meisten GPCRs eine hoch konservierte Disulfidbrücke zwischen dem extrazellulären Ende der dritten Helix (TM3) und dem zweiten extrazellulären Loop (ECL2) (Kolakowski, Jr. 1994). Signifikante Sequenzhomologien wurden in verschiedenen Unterfamilien gefunden, wovon die drei wichtigsten die Rhodopsin/ β_2 -Adrenergerezeptor ähnlichen Rezeptoren (Klasse A), die Glukagonrezeptor ähnlichen Rezeptoren (Klasse B) und die Neurotransmitter/Calziumrezeptor ähnlichen Rezeptoren (Klasse C) darstellen (Gether 2000) (Abb. 2.1).

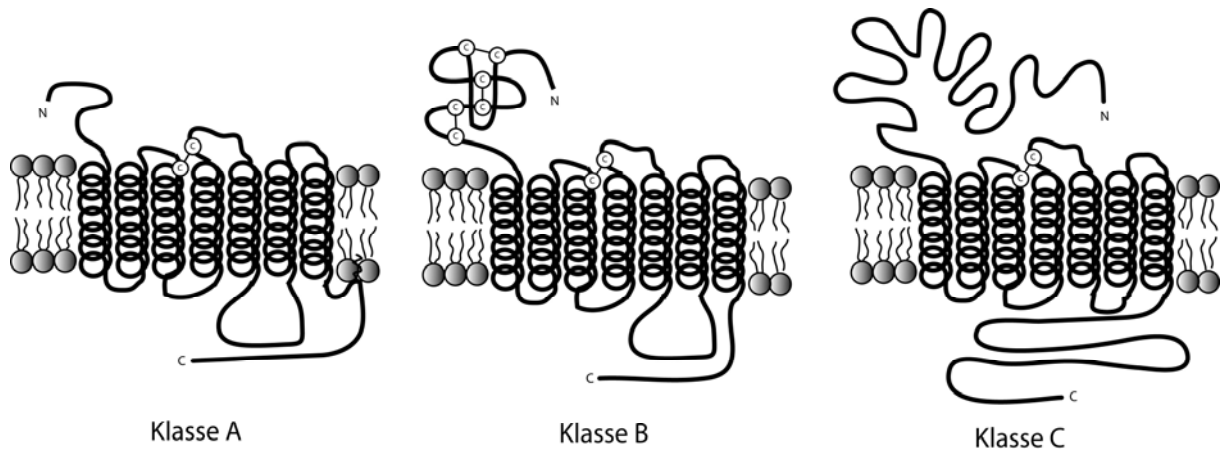


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der drei wichtigsten Unterfamilien von GPCRs. Charakteristisch für alle GPCRs sind die sieben membranständigen α -Helices, die durch drei intra- und drei extrazelluläre Loops miteinander verbunden sind, und die Disulfidbrücke zwischen der TM3 und dem ECL2. Unterschieden werden die Klassen anhand der unterschiedlichen N- und C-Termini (Gether 2000).

Die Klasse A-GPCRs bilden die mit Abstand größte und eine intensiv erforschte Unterfamilie. Zu ihr gehören unter anderem der am besten charakterisierte GPCR Rhodopsin (Palczewski 2006), alle weiteren Rezeptoren, von denen Kristallstrukturen existieren (Cherezov et al. 2007; Warne et al. 2008; Jaakola et al. 2008) und auch die Y-Rezeptoren (Larhammar, Salaneck 2004). Diese Familie ist charakterisiert durch eine Reihe von hoch konservierten Aminosäuren (Gether 2000), einem palmitoyliertem Cystein in der C-terminalen Region, das in der Membran verankert ist und durch relativ kurze N- und C-terminale *tail*-Regionen.

Klasse B-GPCRs hingegen enthalten einen langen N-Terminus mit mehreren Cysteinen, die ein Netzwerk aus Disulfidbrücken bilden. Sie besitzen ebenfalls die Disulfidbrücke, die den ECL2 und die TM3 verbindet, aber keine Palmitoylierung. Gut untersuchte Vertreter der Klasse B-Rezeptoren sind die Parathyroidhormon-Rezeptoren (PTHr) (McKinstry et al. 2009), Glucagon-like-Peptid-Rezeptoren (GLPR) (Runge et al. 2007) und die Calcitonin-Rezeptoren (Purdue et al. 2002).

Die Klasse C-GPCRs sind durch einen längeren C-Terminus und einen sehr langen (~600 Aminosäuren) N-Terminus, der mutmaßlich ein Liganden-Bindungsmotiv enthält (Chen et al. 1998), charakterisiert. Zu dieser Klasse gehören hauptsächlich Calcium- und Geschmacksrezeptoren (Brauner-Osborne et al. 2007).

2.1.2 Signaltransduktion von GPCRs

Die wichtigste Funktion von GPCRs besteht in der Weiterleitung von Signalen durch die Membran in das Zellinnere (Signaltransduktion). Aktiviert wird die Signaltransduktion durch die spezifische Bindung eines Liganden (Agonist) an den Rezeptor (Abb. 2.2). Eine Ausnahme stellt Rhodopsin dar. Der Ligand des Rhodopsins, das 11-*cis* Retinal, ist über eine Schiffssche Base kovalent in der Mitte der Transmembrandomänen an den Rezeptor gebunden. Die räumliche Nähe des Liganden zum Rezeptor ermöglicht eine schnelle Antwort auf Lichtreize, wodurch der Ligand-Rezeptor-Komplex aktiviert wird (Gether, Kobilka 1998).

Die an der Liganden-Bindung beteiligten Rezeptorbereiche sind je nach Art und Struktur des Liganden verschieden. Kleinere Liganden wie Amine, Nukleotide oder Lipide binden in der Transmembranregion der Rezeptoren. Peptide wie das NPY besetzen mehrere Bindungsstellen an den extrazellulären Loopregionen (Lindner et al. 2008a). Proteohormone wie Glucagon binden primär an den extrazellulären N-Terminus und es erfolgt nach einer Konformationsänderung des Rezeptors eine sekundäre Bindung an die extrazellulären Loopregionen. Kleine Moleküle wie Glutamat oder Calcium hingegen binden ausschließlich an den N-Terminus (Gether 2000).

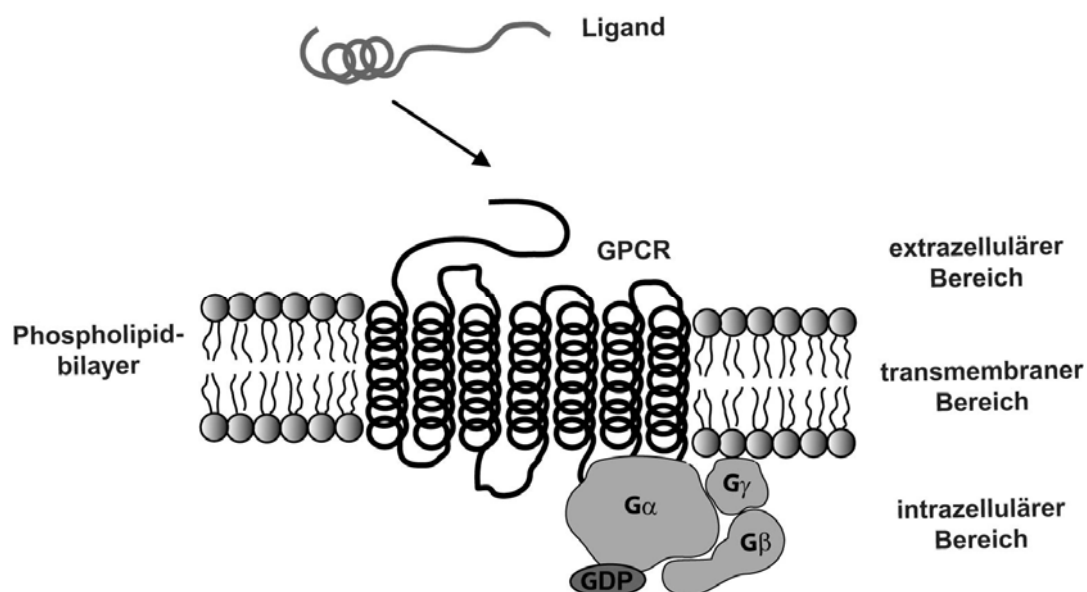


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion von Klasse A-GPCRs. Durch spezifische Bindung eines Liganden an die extrazellulären Loops wird der Rezeptor im Phospholipid-bilayer aktiviert. Durch eine Strukturänderung im aktivierten Zustand interagiert der GPCR mit dem intrazellulär gebundenen heterotrimeren G-Protein bestehend aus den Untereinheiten $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$. Nach Aktivierung des G-Proteins kommt es an $G\alpha$ zu einem Austausch von GDP zu GTP. Daraufhin löst sich der $G\alpha$ /GTP-Komplex aus dem Trimer und GTP wird zu GDP + P gespalten.

In aktuellen Modellen wird davon ausgegangen, dass ein Rezeptor in mindestens zwei unterschiedlichen Konformationen existiert, der aktiven und der inaktiven. Diese Rezeptorkonformationen befinden sich im Gleichgewicht, welches durch die Bindung eines Antagonisten zum inaktiven und durch die Bindung eines Agonisten zum aktiven Zustand verschoben wird (Yeagle, Albert 2003). Eine solche Strukturänderung ist für Rhodopsin bekannt. Durch eine Aktivierung des Rezeptors konnten Änderungen in der Ausrichtung der Helices zueinander nachgewiesen werden (Gether, Kobilka 1998). Allerdings sind Art und Ausmaß dieser spezifischen Konformationsänderungen noch weitgehend unbekannt.

Aktivierte GPCRs interagieren mit einem intrazellulär gebundenen heterotrimeren G-Protein, welches aus einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit besteht. Bisher konnten zahlreiche verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten beschrieben werden, die unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen GPCRs aufweisen. Eine wichtige Rolle für die Bindung des G-Proteins spielen der zweite und der dritte intrazelluläre Loop. Mutationen dieser Loops führten zu verminderten Bindungsaffinitäten des G-Proteins (Puett et al. 2007). Im inaktivierten Zustand bildet die $G\alpha$ -Untereinheit einen Komplex mit GDP sowie mit $G\beta$ und $G\gamma$. Durch die Bindung des Liganden kommt es zur Signalweiterleitung in Form eines Austausches von GDP gegen GTP an $G\alpha$. Daraufhin löst sich der $G\alpha$ /GTP-Komplex aus dem Heterotrimer. Aufgrund der intrinsischen GTPase-Aktivität von $G\alpha$ wird das gebundene GTP mit Hilfe von GTPase-aktivierenden Proteinen zu GDP gespalten und die α -Untereinheit reassoziert wieder mit $G\beta$ und $G\gamma$ und kann erneut an ein Rezeptormolekül binden (Kobilka, Deupi 2007).

2.1.3 Der Y_2 -Rezeptor

Der Y_2 -Rezeptor ist ein Vertreter der Familie der Neuropeptidrezeptoren, die noch mindestens vier weitere Mitglieder umfasst, den Y_1 -, Y_4 -, Y_5 - und Y_6 -Rezeptor. Sie alle sind typische Klasse A-GPCRs (Michel et al. 1998) und werden durch unterschiedliche Affinitäten von verschiedenen Neuropeptiden wie das NPY, das Peptid YY (PYY) oder das Pankreatische Polypeptid (PP) zu diesen Rezeptoren unterschieden (Michel et al. 1992; Cabrele et al. 2000; Lindner et al. 2008b).

Der Y_2 -Rezeptor ist im Gehirn, in Nervenfasern, im Darm und in wichtigen Blutgefäßen zu finden (Grundemar 1997) und zeichnet sich durch eine bedeutende pharmakologische Relevanz aus (Parker, Balasubramaniam 2008). Gefühlszustände wie Angst, Schmerz, Stress und Depression sind unter anderem auf eine Fehlfunktion des Y_2 -Rezeptors zurückzuführen

(Heilig 2004). Zudem spielen der Y_2 -Rezeptor und seine Liganden eine Schlüsselrolle bei der Nahrungsaufnahme (Batterham et al. 2002). Eine weitere wichtige Funktion ist die Weiterleitung von antisekretorischen Effekten durch hochselektive Peptide des Rezeptors bei der Wasser- und Salzaufnahme im Darm (Balasubramaniam et al. 2000), was bedeutsam bei Krankheiten wie Enterocolitis oder Cholera ist. Des Weiteren zeigt dieser Rezeptor Aktivität in der Neuroprotektion (Silva et al. 2003; Woldbye et al. 2005), die sich in ansteigenden Konzentrationen des Y_2 -Rezeptors im Hippocampus bei Krämpfen und epileptischen Anfällen äußert (Silva et al. 2007; Jinde et al. 2002; Morris et al. 2007). Auch zeigten Studien, dass eine Negativregulierung des Y_2 -Rezeptors zur Verengung von Blutgefäßen führt (Nilsson et al. 2000), wodurch eine Regulation mit effizienten Wirkstoffen für die Behandlung von arteriellen Krankheiten eine wichtige Rolle übernehmen kann (Cruze et al. 2007). Obwohl der Y_2 -Rezeptor als nicht entscheidend in der Krebsforschung erachtet wird (Korner, Reubi 2008), konnte eine Reduktion des Wachstums von humanen Krebszellen in der Bauchspeicheldrüse bei Mäusen durch Liganden-Bindung von Agonisten des Y_2 -Rezeptors gezeigt werden (Wesley et al. 2005).

In seiner natürlichen Form umfasst der Y_2 -Rezeptor 381 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 44,1 kDa (Abb. 2.3).

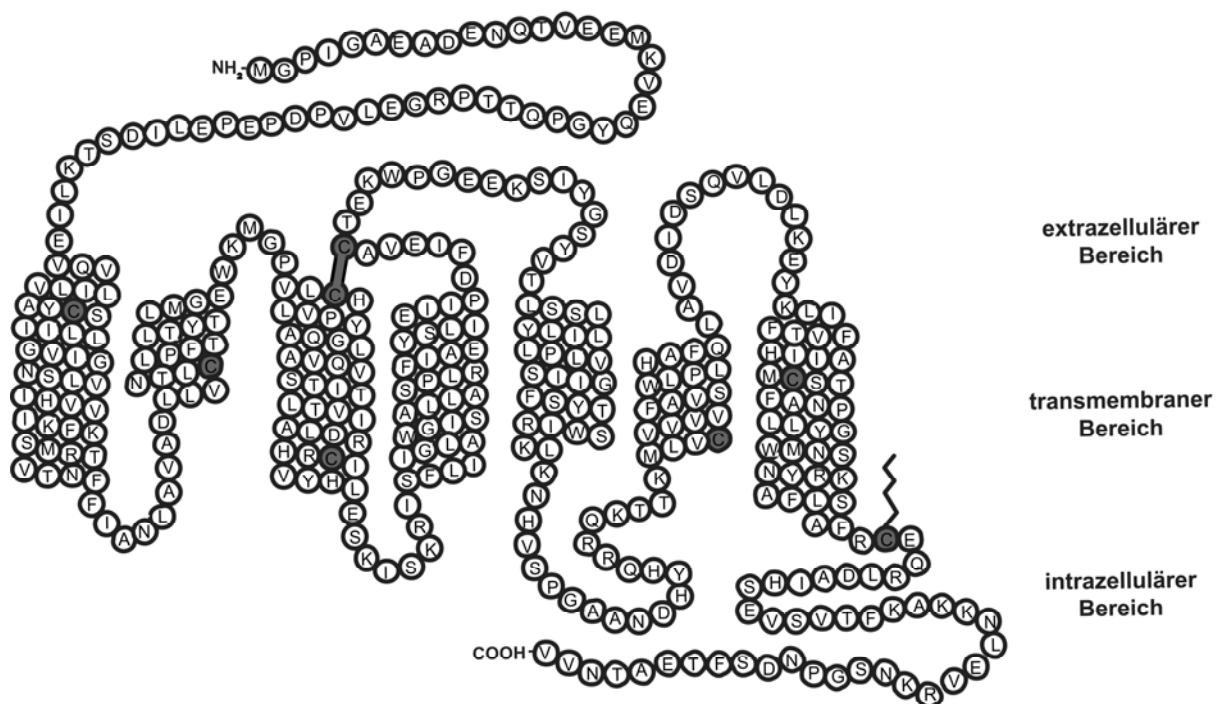


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des humanen Y_2 -Rezeptors. Die Einteilung der Aminosäuren in Loops und α -Helices basiert auf einem Hydrophobizitäts-plot (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpex>). Die Cysteine und die Disulfidbrücke zwischen Cys123 und Cys203 sind in grau markiert. Am Cys342 besitzt der Rezeptor eine für Klasse A-GPCRs typische Palmitoylierung, womit der C-Terminus in der Membran verankert ist.

Die Signaltransduktion des Y_2 -Rezeptors wird durch das NPY ausgelöst, welches den natürlichen Liganden des Rezeptors repräsentiert (Inui 1999). NPY besteht aus 36 Aminosäuren und besitzt C-terminal ein amidiertes Tyrosin (Beck-Sickinger et al. 1994). In seiner ungebundenen Form besitzt das NPY mittig eine α -Helix und zwei flexible Enden (Abb. 2.4).

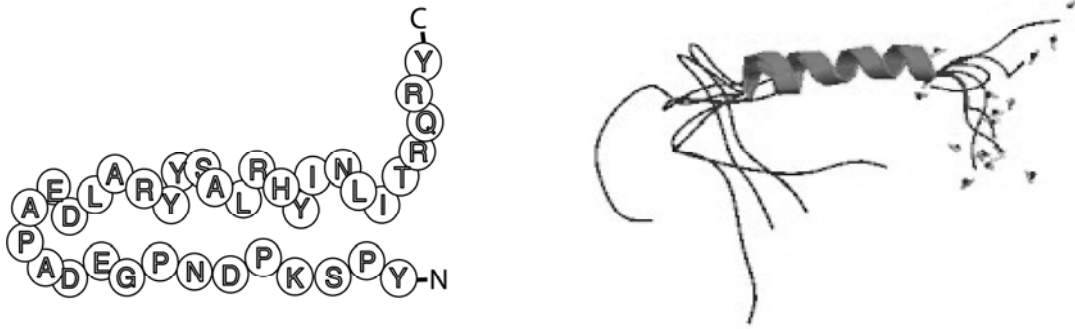


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz (links) und eine hoch aufgelöste NMR-Struktur (Bader et al. 2002) von NPY (rechts), dem natürlichen Liganden des Y_2 -Rezeptors.

Untersuchungen der Liganden-Bindung von NPY an den Y_2 -Rezeptor haben gezeigt, dass die Helix und der C-Terminus des Liganden für die Bindung an den Rezeptor und seine Aktivierung verantwortlich sind. Eine Verkürzung des N-Terminus hatte weder einen Einfluss auf die Affinität der Bindung, noch auf die Signaltransduktion (Cabrele, Beck-Sickinger 2000). Ein Austausch der Aminosäuren Arg35 und Tyr36 führte hingegen zu einer 1000fachen Verschlechterung der Affinität. Als ein wichtiger Bindungspartner wurde im Rezeptor die Aminosäure Asp292 im dritten extrazellulären Loop identifiziert (Merten et al. 2007).

2.2 Rekombinante Expression von GPCRs

GPCRs kommen in ihrer natürlichen Umgebung mit Ausnahme von Rhodopsin in sehr geringen Konzentrationen vor. Eine Isolierung großer Mengen dieser Proteine aus Zellorganen ist daher besonders für humane Proteine, aufgrund des limitierten Zellmaterials, nahezu unmöglich. Eine Alternative stellt die rekombinante Expression von heterologen Proteinen dar (Danilevskaia 1979). Dies bedeutet, dass zunächst mit einer Reihe von DNA-Rekombinationstechniken genetische Information (DNA) von einem Organismus isoliert und in einen anderen Organismus übertragen werden muss, um einen leistungsfähigen Expressionsklon herzustellen (Klonierung). Anschließend erfolgt eine Zellkultivierung des Expressionssystems in einem Bioreaktor, wobei das Zielprotein nach Induktion der

Expression entweder intra- oder extrazellulär angereichert wird (*upstream processing*). Danach muss das Zielprotein isoliert, gereinigt und konzentriert werden (*downstream processing*).

Eine strukturelle Charakterisierung von GPCRs ist hauptsächlich durch die Schwierigkeit der Entwicklung eines leistungsfähigen heterologen Expressionssystems limitiert (Sarramegna et al. 2003). Sogar in ihren nativen Zellen werden GPCRs nur in sehr geringen Mengen produziert, mit Rhodopsin als einzige Ausnahme (Palczewski 2006). Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften (vgl. Kapitel 2.1) kann die Expression von GPCRs nur intrazellulär als inaktive Aggregate oder aktiv in die Zellmembran erfolgen, wo sie bei hohen Expressionsraten toxisch auf die Wirtszellen wirken und die Membran lysieren (Wagner et al. 2008).

2.2.1 Eukaryotische Expressionssysteme

Erwartungsgemäß sind eukaryotische Zellen besser für die rekombinante Produktion von GPCRs geeignet, da sie in der Lage sind das Zielprotein *in vivo* zu falten und in ihre Plasmamembran einzubauen. Ca. 90% der für *in vitro*-Studien genutzten GPCRs wurden mittels Eukaryoten exprimiert (McCusker et al. 2007).

Tierzellen besitzen alle nötigen Co-Rezeptoren, eine native Membranzusammensetzung und sind in der Lage alle post-translationalen Modifikationen am Protein durchzuführen. Die meisten Studien, die Tierzellen als Expressionssystem nutzen, beschreiben die produzierten GPCRs als homogen und voll funktionsfähig (Sambi et al. 2006; Shukla et al. 2006). Der Y₂-Rezeptor konnte bereits nativ in Tierzellmembranen hergestellt werden (Merten et al. 2007). Allerdings sind die Rezeptorausbeuten bei Tierzellexpressionssystemen gewöhnlich mit einigen Mikrogramm pro Liter Kulturmedium sehr gering und daher ungeeignet für Strukturuntersuchungen. Hinzu kommen Schwierigkeiten verlässliche Zelllinien über einen längeren Zeitraum stabil zu halten und die Kultivierung in einem größeren Maßstab durchzuführen. Tierzellexpressionssysteme sind kostenintensiv, zeitaufwendig und eignen sich daher eher für biophysikalische Untersuchungen, die nur geringe Rezeptormengen benötigen wie Liganden-Bindungs-Studien (Berger et al. 2005).

Das derzeit erfolgreichste Expressionssystem für die Herstellung von GPCRs sind mit dem Baculovirus infizierte Insektenzellen. In diesem System wird ein DNA-Virus als Expressionsvektor ausgenutzt. Durch einen Einbau der GPCR-kodierenden Gene und eines Transfervektors in eine nicht essentielle Region des viralen Genoms kommt es zur homologen

Rekombination. Die Produktion des Fremdproteins wird erreicht, indem die Insektenzellen mit dem rekombinanten Virus infiziert werden (Fraser 1992). Mit diesem System können rekombinante Proteine *in vivo* sowohl korrekt gefaltet als auch disulfidbrückt exprimiert werden und bis auf die Glykosylierungen sind alle post-translationalen Modifikationen identisch zu denen in Tierzellen (Kuhn, Gudermann 1999). Durch Fortschritte in der Zellkulturtechnologie sind Virus-basierte Expressionssysteme inzwischen einfacher zu handhaben und im Gegensatz zu Tierzellen geeignet für große Expressionsvolumina (Kost et al. 2005). Doch auch dieses System ist zeit- und arbeitsaufwendig und die Rezeptorausbeuten sind nur geringfügig höher als in Tierzellen, was es zu einer sehr kostenintensiven Methode macht. Allerdings wurden alle Kristallstrukturen von GPCRs neben Rhodopsin mit Rezeptoren erhalten, die in Insektenzellen exprimiert wurden.

Ein weniger komplexes eukaryotisches Expressionssystem stellen Hefen dar. Diese natürlichen Einzeller kombinieren schnelles mikrobielles Wachstum und die Möglichkeit Proteine *in vivo* zu falten. Sie sind in der Lage die meisten Arten von post-translationalen Modifikationen durchzuführen und Disulfidbrücken können ausgebildet werden. Studien, in denen Rezeptoren mit Ausbeuten von einigen Milligramm pro Liter Kulturmedium funktional exprimiert wurden, haben gezeigt, dass Hefen und insbesondere *P. pastoris* eine echte alternative für die Expression von GPCRs darstellen (Andre et al. 2006; Kim et al. 2005; Niebauer, Robinson 2006). Unkorrekte *in vivo* Faltung und inhomogene Modifikationen machen es jedoch schwierig den Anteil an nativen Rezeptoren in den Membranen vorherzusagen oder zu beeinflussen. Für den hA_{2A}R wurde ein nativer Anteil in den Membranen von ~19% erreicht (O'Malley et al. 2007).

2.2.2 Prokaryotische Expressionssysteme

Der Vorteil von prokaryotischen Expressionssystemen, insbesondere von *E. coli*, sind die niedrigen Kosten, die einfache Handhabung, die Vielzahl von optimierten Expressionsstämmen, die einfache Isotopenmarkierung der Zielproteine und die hohen Wachstumsraten (Grisshammer, Tate 1995). Daher kann die Proteinexpression einfach optimiert und im großen Maßstab durchgeführt werden. Doch es gibt entscheidende Nachteile. *E. coli* besitzt keine nativen G-Proteine oder andere Proteine, die mit GPCRs interagieren, was für die Produktion funktionaler Rezeptoren notwendig sein kann. Außerdem hat *E. coli* keine Möglichkeit post-translationalen Modifikationen durchzuführen. Für einige

GPCRs ist gezeigt worden, dass eine Glykosylierung für die hoch affine Liganden-Bindung oder die G-Protein-Aktivierung nötig ist (Kaushal et al. 1994), während andere GPCRs keinen Effekt durch eine Glykosylierung zeigten (Kusui et al. 1994; Butz et al. 2003). Trotz dieser Limitierungen wurden GPCRs bereits aktiv in *E. coli* exprimiert. Eine erfolgreiche Strategie stellt die Fusion eines *E. coli*-Signalpeptids wie das Maltose-Bindeprotein (MBP) an den N-Terminus des GPCRs dar, wodurch das Zielprotein in die Periplasmamembran transportiert wird. Allerdings betragen die Proteinausbeuten aufgrund eines schwachen Promotors und des zelllysierenden Effekts durch den Einbau der GPCRs in die Membran bisher maximal 1 mg/l (Yeliseev et al. 2005; Weiss, Grishammer 2002; White et al. 2004).

Eine weitere Strategie stellt die Expression der Fremdproteine durch *E. coli* in intrazellulären Aggregaten so genannte *inclusion bodies* (IBs) dar. Diese Methode reduziert die Toxizität auf die Zellen während der Expression, was zu höheren Ausbeuten führen kann. Zusätzlich sind IBs relativ einfach zu reinigen und die Proteine darin sind vor proteolytischem Abbau geschützt. Allerdings ist eine anschließende Faltung und Ausbildung der Disulfidverbrückung *in vitro* notwendig. Dieser Schritt gelang bisher nur für drei GPCRs (Baneres et al. 2003; Baneres et al. 2005; Kiefer et al. 1996). Obwohl die Expression von GPCRs in IBs trivial sein sollte, gibt es keine generelle Strategie und einige Rezeptoren ließen sich auf diese Weise nicht exprimieren (Bane et al. 2007).

2.2.3 Zellfreie Expression

Die zellfreie Proteinsynthese bietet eine Methode zur Nutzung biologischer Prozesse ohne intakte Zellen. Dies ermöglicht die Produktion von Proteinen, die normalerweise störend in die Zellphysiologie eingreifen. So können Probleme in der *in vivo* Expression wie Toxizität, zellinduzierte Proteinaggregation oder Plasmidverlust vermieden werden (Shimizu et al. 2006). Zudem können die Rezeptoren direkt in Detergenzmizellen aufgenommen werden (vgl. Kapitel 2.3.2). Aber diese Methode ist aufgrund komplexer Medien sehr kostenintensiv und es können keine post-translationalen Modifikationen durchgeführt werden, wodurch Falschfaltungen problematisch werden können. Der mit Abstand größte Nachteil dieses Systems ist das bisher ungelöste Problem der Maßstabsvergrößerung. Typischerweise betragen die Reaktionsvolumina weniger als ein Milliliter, allerdings mit relativ hohen Ausbeuten von einem Milligramm Rezeptor pro Milliliter Reaktionsvolumen (Ishihara et al. 2005). Diese Proteinausbeuten sinken jedoch drastisch mit zunehmendem Volumen. Bis jetzt

gibt es nur wenige Arbeiten, die zellfreie Expression für die Produktion von GPCRs nutzen (Klammt et al. 2007). So ist noch unklar, ob mit dieser Methode robust Milligrammmengen aktive Rezeptoren produziert werden können.

2.2.4 *fed-batch*-Fermentation

Die *fed-batch*-Fermentation ist eine weit verbreitete Methode für die Kultivierung hoher Zelldichten als Grundlage hoher Proteinausbeuten. In dieser Methode werden die Zellen zunächst in einem *batch*-Medium vermehrt (*batch*-Phase), bis die vorgelegte C-Quelle (Substrat) verbraucht ist. Anschließend wird eine definierte Substratkonzentration kontinuierlich in das Kulturmedium gegeben (*feed*-Phase). Diese Vorgehensweise hat als Vorteile, dass zum einen höhere Zelldichten erreicht werden, da diese nicht mehr vom vorgelegten Substrat abhängig sind. Zum anderen kann auf diese Weise die Wachstumsrate geregelt werden, wodurch die Proteinproduktion nach der Induktion optimiert werden kann, da diese von der Wachstumsrate abhängig ist (Gnoth et al. 2008a). Ziel der rekombinanten Expression von heterologen Proteinen für Strukturanalysen ist eine möglichst hohe Proteinausbeute pro Liter Medium. Der Proteinbildungsprozess kann durch ein System gekoppelter Differentialgleichungen beschrieben werden (Glg. 2.1-2.4). Die Menge an exprimiertem Protein (P) ist eine Funktion aus Biomasse (X) und Produktbildungsrate (π) nach der Induktion (Glg. 2.1). Der bestimmende Parameter für die Kultivierung von Biomasse ist die Wachstumsrate (μ) (Glg. 2.2). Während der *batch*-Phase wächst die Biomasse zunächst mit maximaler Wachstumsrate (μ_{\max}). Sobald das vorgelegte Substrat (S) aufgebraucht ist, wird in der *feed*-Phase Substrat steril „zugefüttert“. Aufgrund der Substratlimitierung wird die Wachstumsrate während der *feed*-Phase mit der Monod-Gleichung beschrieben (Glg. 2.3). Die Regelung der Wachstumsrate während der *feed*-Phase ist wichtig für das Erreichen von hohen Biomassekonzentrationen und sollte durch die Regelung der *feed*-Rate auf einen Wert von 50-80% der maximalen Wachstumsrate eingestellt werden (Jenzsch et al. 2006b). Liegt der Wert weit darunter, kann es zu einer Mangelversorgung durch die C-Quelle kommen. Die Zellen setzen in diesem Fall die Energie nur noch für ihren Erhaltungsstoffwechsel und nicht mehr für die Biomasseproduktion ein. Längere Phasen der Mangelversorgung können zum Verlust des Expressionsplasmides führen. Ist die *feed*-Rate zu hoch eingestellt, kommt es zu einer Verdünnung, d.h. die Biomassekonzentration wird durch Zugabe des *feed*-Mediums stärker verdünnt als durch Zellwachstum ausgeglichen werden kann (Glg. 2.4). Während der Proteinproduktion nach der Induktion wird die Wachstumsrate auf einen niedrigen Wert

geregelt. Zum einen zwingt dies die Zellen ihre Ressourcen stärker für die Proteinbiosynthese des Zielproteins als für die Biomasseproduktion einzusetzen, zum anderen können hohe Wachstumsraten nach der Induktion zu hohen Plasmidverlusten führen. Die Zellen teilen sich schneller als die DNA-Replikation der Expressionsplasmide nachkommt.

$$dP/dt = \pi * X \quad (\text{Glg. 2.1})$$

$$dX/dt = \mu * X \quad (\text{Glg. 2.2})$$

$$\mu = \mu_{\max} * S / (S + K_s) \quad (\text{Glg. 2.3})$$

$$dX/dt = \mu * X - X * dV/dt \quad (\text{Glg. 2.4})$$

Die konstanten Parameter aus Glg 2.3 μ_{\max} und K_s (Monod-Konstante) können aus dem Wachstumsverlauf der Biomasse in der *batch*-Phase bestimmt werden (Jenzsch et al. 2006a). Eine Bestimmung der Substratkonzentration bei der Kultivierung von Biomasse in komplexen Medien ist dagegen nahezu unmöglich, da die Zellen verschiedene Substrate, wie Glukose, Glycerol und Hefeextrakt als C-Quelle nutzen. Deshalb werden die Produktionsstämme auf definierte Mineralsalzmedien mit nur einer C-Quelle adaptiert, wodurch nicht nur eine effiziente Markierung der Aminosäuren im Zielprotein erleichtert wird, sondern auch gezielt die Produktausbeute optimiert werden kann.

2.2.5 Isolierung und Reinigung von GPCRs aus IBs

Nachdem der erste Schritt, die Expression, erfolgreich absolviert wurde, muss das rekombinante Protein aus den Zellen extrahiert und gereinigt werden. Der Rezeptor liegt nach der Expression in *E. coli* aggregiert und biologisch inaktiv intrazellulär in IBs vor. IBs sind Partikel mit hoher Dichte und generell unlöslich in nicht denaturierenden Pufferlösungen. Daher können sie relativ einfach mit einem Zellaufschlussverfahren und einer anschließenden Fest-Flüssig-Trennung in reiner Form gewonnen werden (De Bernardez et al. 1999).

Zur Solubilisierung von Membranproteinen aus IBs werden chaotrope Substanzen oder ionische Detergenzien verwendet (Baneres et al. 2003; Bane et al. 2007; Kiefer et al. 1996). Guanidin-HCl und Harnstoff sind kleine chaotrope Substanzen, die die Löslichkeit von Proteinen erhöhen und die Aggregation minimieren, indem sie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen behindern (Sarramegn et al. 2006). Ionische Detergenzien wirken stark denaturierend und können daher Membranproteine in Mizellen in Lösung halten (vgl. 2.3.2).

Die Reinigung von GPCRs ist bedeutend schwieriger als die Reinigung wasserlöslicher Proteine, obwohl die Methoden im Wesentlichen dieselben sind (Sarramegn et al. 2006). Am meisten wird die Reinigung mittels Metalionenaffinitätschromatographie über einen His-tag (IMAC) beschrieben (Grisshammer, Tucker 1997). Allerdings sind die erreichten Ausbeuten und Reinheiten sehr unterschiedlich. Jedes Membranprotein zeigt ein spezifisches Verhalten bei der Reinigung und es muss für jeden Rezeptor neu optimiert werden (Ratnala et al. 2004; Sarramegna et al. 2005; Pawate et al. 1998).

2.3 Renaturierung von Proteinen

Alle Systeme streben einen Zustand minimaler freier Enthalpie (Gibbssche freie Energie) an. Aus diesem Grund resultiert die Struktur eines Proteins aus den Wechselwirkungen zwischen einzelnen oder mehreren Aminosäuren, ganzen Domänen und der Umgebung. Die Änderung der freien Energie (ΔG) ist über die Änderung der Temperatur (T), der Enthalpie (ΔH) und der Entropie (ΔS) des Systems definiert (Glg. 2.5).

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (\text{Glg. 2.5})$$

Es existiert eine Vielzahl von biophysikalischen Wechselwirkungen, welche die Struktur von Proteinen beeinflussen. Neben spezifischen Bindungsmotiven sind es vor allem Wasserstoffbrückenbindungen, wie sie innerhalb von α -Helices und zwischen β -Faltblättern gebildet werden, und Disulfidbrücken zwischen Cysteinen, die die Struktur definieren. Besonders bei GPCRs sind aber auch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Domänen und der Umgebung von besonderer Bedeutung. Die Ausbildung dieser nicht-kovalenten Interaktionen wird stark von Zusätzen in der umgebenden Pufferlösung beeinflusst.

Obwohl die Renaturierung von löslichen Proteinen *in vitro* heute ein etablierter Prozess ist und auch für die industrielle Herstellung von *high value*-Wirkstoffen eingesetzt wird (Brange, Volund 1999), bleibt die Wiederherstellung der aktiven Struktur von Membranproteinen eine Herausforderung (Booth 2003). Proteine befinden sich bei der *in vitro* Renaturierung in einer Gleichgewichtsreaktion zwischen der vollständig denaturierten Form, einer Vielzahl von Intermediaten und der nativen Struktur (Abb. 2.5).

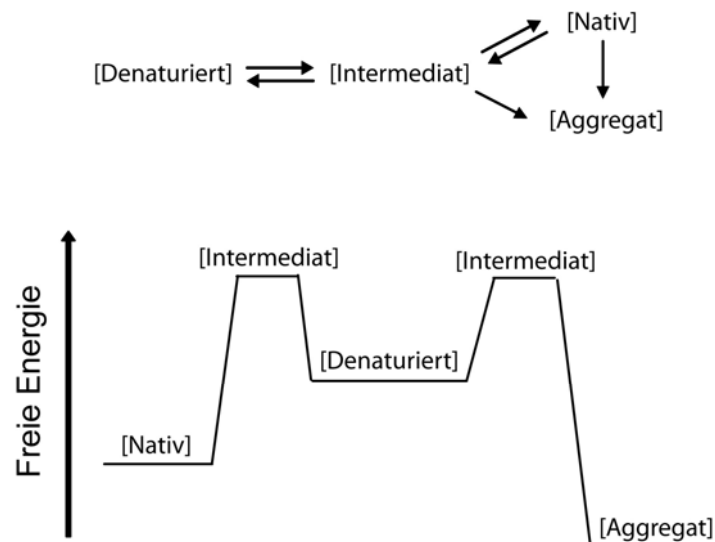


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Gleichgewichtsreaktion zwischen verschiedenen Proteinzuständen

Gewöhnlich stellt die native Form die energetisch stabilste dar, sodass lösliche Proteine oft spontan ihre biologisch aktive Struktur ausbilden, wenn sie von denaturierenden in renaturierende Pufferbedingungen überführt werden. Membranproteine hingegen enthalten stark hydrophobe Aminosäuresequenzen und es ist schwierig, das Reaktionsgleichgewicht hin zur nativen Tertiärstruktur zu verschieben, ohne dass große Mengen des Proteins unlösliche Aggregate bilden.

Erstmalig gelang es Kiefer et al. (Kiefer et al. 1999; Kiefer et al. 1996), später Baneres et al. (Baneres et al. 2003; Baneres, Parello 2003; Baneres et al. 2005), GPCRs aus IBs funktional zurückzufalten und Liganden-Bindung an GPCRs aus prokaryotischer Expression zu charakterisieren. Weitere Arbeiten demonstrierten, dass mit dieser Methode Membranproteinmengen produziert werden konnten, die sogar für Strukturuntersuchungen ausreichen (Park et al. 2006; Hiller et al. 2008). Doch es zeigte sich, jeder Rezeptor verhält sich anders und die Faltungsbedingungen müssen immer wieder neu optimiert werden.

2.3.1 Hydrophobe Wechselwirkung

Wasser formt ein hoch strukturiertes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen. Die kombinierte Stärke dieser Wasserstoffbrückenbindungen verleiht dem Wasser seine Lösungsmittleigenschaften. Polare und hydrophile Substanzen werden in Wasser gelöst, da sie Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen mit den Wassermolekülen bilden. Unpolare und hydrophobe Substanzen hingegen sind nicht in der Lage diese Wechselwirkungen zu bilden und sind daher mit Wasser nicht mischbar. Unpolare

Substanzen brechen die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der Wassermoleküle auf und erschaffen einen wasserfreien Hohlraum. An der Oberfläche des Hohlraums ordnen sich die Wassermoleküle um, was eine Abnahme der Entropie zur Folge hat. Um diesen Entropieverlust auszugleichen werden die hydrophoben Moleküle in Cluster gezwungen, in denen sie minimalen Platz einnehmen. Dieser Effekt wird als hydrophobe Wechselwirkung bezeichnet. Hydrophobe Wechselwirkungen spielen eine wichtige Rolle in der Ausbildung der nativen Tertiärstruktur von Proteinen. Lösliche Proteine falten ihre hydrophoben Domänen zusammen, sodass sie von der wässrigen Umgebung abgeschirmt werden. Membranproteine besitzen hingegen auch im nativen Zustand nach außen gelagerte hydrophobe Bereiche. In biologischen Membranen werden die hydrophoben Domänen von Rezeptoren durch die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der Lipide von der wässrigen Umgebung abgeschirmt.

2.3.2 Detergenzien

Detergenzien besitzen wie Lipide eine polare Kopfgruppe, aber nur eine hydrophobe Kohlenwasserstoffkette. Der polare Kopf bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit den Wassermolekülen, während die Kohlenwasserstoffkette aufgrund hydrophober Wechselwirkungen aggregiert. Deshalb bilden Detergenzien in wässriger Umgebung kugelförmige Strukturen, so genannte Mizellen, aus. Durch ihre amphipatische Natur sind Detergenzien in der Lage hydrophobe Verbindungen in Wasser zu lösen. Im Fall von Membranproteinen gehen die Ketten der Detergenzien hydrophobe Wechselwirkungen mit den hydrophoben Domänen der Proteinmoleküle ein und bilden einen Ring um die transmembranen Domänen (Abb. 2.6).

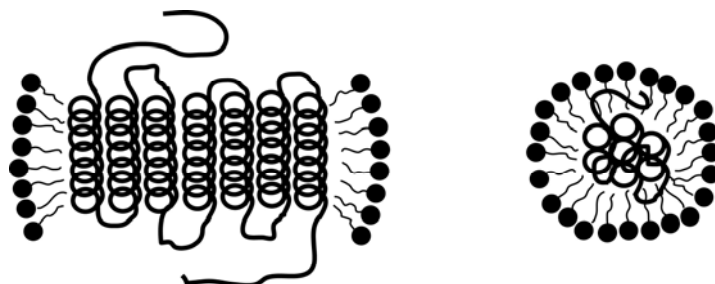


Abb. 2.6: Schematische Darstellung von GPCRs in Mizellen. Die Detergenzmoleküle lagern sich in einem Ring um die hydrophoben Domänen des Rezeptors.

Auf Grundlage der physikalischen Eigenschaften der hydrophilen Kopfgruppe werden Detergenzien in ionische, nicht-ionische und zwitterionische Detergenzien eingeteilt (Bhairi 2001). Ionische Detergenzien besitzen eine geladene Kopfgruppe. Diese kann sowohl negativ (anionisch) als auch positiv (kationisch) geladen sein. Natriumdodecylsulfat (SDS) zum Beispiel besitzt eine negativ geladene Sulfatgruppe und ist das in der Proteinchemie meist genutzte anionische Detergenz für die Solubilisierung von Membranproteinen in Mizellen (Chill et al. 2006). Ionische Detergenzien sind aufgrund ihrer polaren und amphipatischen Eigenschaften in der Lage Protein-Protein-Interaktionen, wie elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen aufzubrechen und zu unterdrücken, wirken daher jedoch auch stark denaturierend auf Proteinmoleküle.

Nicht-ionische Detergenzien besitzen eine ungeladene, hydrophile Kopfgruppe, die entweder aus polyoxyethylen Resten wie bei BRIJ[®] und TRITON[®] oder aus Glykosidgruppen wie bei n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM) bestehen. Generell sind nicht-ionische Detergenzien besser geeignet um Lipid-Lipid- und Lipid-Protein- als Protein-Protein-Wechselwirkungen aufzubrechen (Moller, le Maire 1993), da sie zwar stabile Mizellen bilden, jedoch keine Ladung besitzen. Deshalb gelten sie als nicht-denaturierend und werden oftmals für die Isolierung von Membranproteinen in ihrer biologisch aktiven Form verwendet (Ratnala et al. 2004;Warne et al. 2003).

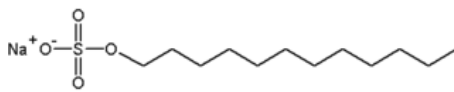
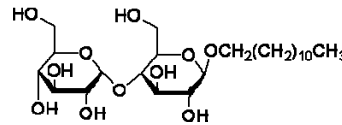
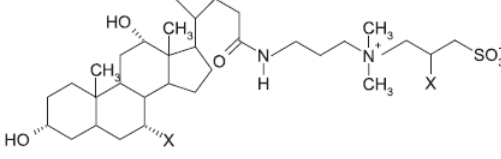
Zwitterionische Detergenzien wie 3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propanesulfonat (CHAPS) vereinen die Eigenschaften von ionischen und nicht-ionischen Detergenzien. Sie besitzen wie nicht-ionische Detergenzien keine Nettoladung, sind aber wie ionische Detergenzien sehr effizient beim Aufbrechen von Protein-Protein-Wechselwirkungen (Stark et al. 1984). CHAPS wirkt möglicherweise aufgrund seiner rigiden steroiden Ringstruktur erst bei hohen Konzentrationen denaturierend auf Proteine (Bhairi 2001).

Detergenzmoleküle befinden sich im ständigen Austausch zwischen ihrer monomeren und mizellären Form. Die kritische Mizellkonzentration (CMC) definiert die geringste Konzentration, ab der sich Monomere zu Mizellen formieren. Allerdings beginnt die Mizellbildung in der Realität eher in einem weiten Konzentrationsbereich als bei einer definierten Konzentration. Die CMC eines Detergenz ist stark von der Pufferumgebung abhängig (Beck et al. 2008). So erhöhen Additive die die Wasserstruktur verändern, wie Glycerol oder Harnstoff, die CMC. Ansteigende Konzentrationen von Gegenionen in der Lösung hingegen erniedrigen die CMC von ionischen Detergenzien. Generell bilden Detergenzien mit niedrigen CMCs stabilere Mizellen aus, da weniger monomere Moleküle in

der Lösung vorliegen und damit die Austauschraten geringer sind. Dafür lassen sich Detergenzien mit hohen CMCs leichter aus der Lösung entfernen.

Eine weitere wichtige Größe für die Eigenschaft von Detergenzien ist die Aggregationszahl (AN). Diese Größe gibt die Zahl der Detergenzmoleküle in einer einzelnen Mizelle an und errechnet sich aus dem Molekulargewicht einer Mizelle geteilt durch das Molekulargewicht eines Monomers. Wie bei der CMC ist die Mizellgröße und damit die AN von der umgebenen Ladung abhängig. Auch die Fläche der exponierten hydrophoben Oberflächen des Membranproteins hat einen Einfluss auf die AN.

Tabelle 2.1: Charakteristische Größen der wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Detergenzien (Bhairi 2001).

Detergenz	MW* [g/mol]	CMC** [mM]	AN*** [mol/Mizelle]	Struktur
SDS	288,5	7-10	62	
DDM	348,5	0,13	200	
CHAPS	614,9	6-10	4-14	

* Molekulargewicht, ** Kritische Mizellkonzentration, *** Aggregationszahl

2.3.3 Pulsrenaturierung

Die Pulsrenaturierung ist eine Methode der Faltung, die besonders für Proteine geeignet ist, die zur intermolekularen Aggregation neigen. Bei dieser Methode wird das in denaturierenden Substanzen gelöste Protein schrittweise in nicht denaturierende Pufferlösungen verdünnt. Wie oben beschrieben ist die Aggregation von ungefalteten Protein und falsch gefalteten Intermediaten das größte Problem während der Proteinfaltung. Ein schnelles Entfernen der denaturierenden Substanzen wie SDS mittels Verdünnung in nicht denaturierende Konzentrationen vermindert den Proteinverlust durch Aggregatausbildung, besonders in Anwesenheit von stabilisierenden Additiven (Lange, Rudolph 2005).

Der Anteil des Aggregationsprozesses in der Faltungsreaktion steigt dramatisch mit ansteigender Startkonzentration des ungefalteten Proteins. Da korrekt gefaltetes Protein gewöhnlich nicht aggregiert, kann dieses Problem zumindest zum Teil behoben werden, indem das solubilisierte denaturierte Protein schrittweise zu dem Faltungspuffer gegeben wird (Winter et al. 2002). Durch die schrittweise Zugabe des Proteins in Zeitabständen, die für die Ausbildung der ersten stabileren Strukturen lang genug sind, ist die Konzentration von ungefalteten Protein über den gesamten Faltungsprozess ausreichend gering.

Des Weiteren kann die Pulsrenaturierung gut mit der Zwei-Schritt-Prozess für die *in vitro* Faltung von Proteinen in Detergenzien kombiniert werden, der von Rozema und Gellman mit dem Namen „artifizielles Chaperonen-System“ diskutiert wurde (Rozema, Gellman 1996). Im ersten Schritt dieses Prozesses wird das nicht native Zielprotein in einem Detergensystem unter Bedingungen gelöst, die normalerweise zur irreversiblen Aggregation des Proteins führen würden (vgl. Kapitel 2.3.2). Das Protein ist in diesem Detergenkomplex nicht in der Lage die native Struktur auszubilden. Im zweiten Schritt wird des Detergens durch Zugabe von Cyclodextrin vom Protein entfernt und gibt diesem die Möglichkeit der nativen Strukturausbildung. Cyclodextrin ist ein cyclisches Oligosaccharid mit einer polaren Oberfläche und einem hydrophoben Hohlzylinder im Kern des Moleküls (Abb. 2.7). Aufgrund dieser Struktur ist Cyclodextrin in der Lage, hydrophobe Moleküle wie Detergenzien zu komplexieren und dem System damit effektiv zu entziehen.

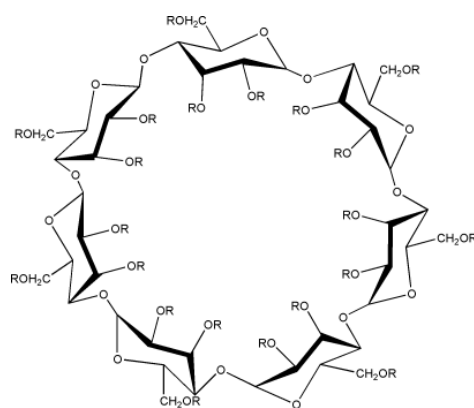


Abb 2.7: Schematische Darstellung der Struktur von Cyclodextrin. Detergenzmoleküle können von Cyclodextrin im hydrophoben Innenraum komplexiert werden. Die Affinitäten der Bindungen sind abhängig von der Größe und der Struktur der zu komplexierenden Moleküle.

2.3.4 *redox-shuffling* System

Disulfidbrücken sind kovalente Bindungen zwischen Cysteinen und sind entscheidend für die Strukturbildung von Proteinen. Der Y₂-Rezeptor besitzt, wie die meisten GPCRs, im nativen Zustand eine hoch konservierte Disulfidbrücke im extrazellulären Bereich (Abb. 2.3). Es ist postuliert, dass diese Bindung sowohl für die Funktion, als auch für die Struktur essentiell ist (Gether, Kobilka 1998). Aufgrund des reduzierenden Milieus im Cytoplasma von Prokaryonten können Disulfidbrücken im rekombinanten Protein nicht von *E. coli*-Zellen in der intrazellulären Expression geknüpft werden. Daher muss eine Ausbildung dieser Bindung während der *in vitro*-Strukturbildung erfolgen. Es gibt eine Vielzahl von möglichen Verknüpfungen der intra- und intermolekularen Disulfidbrücken, die mit der Anzahl der Cysteine exponentiell ansteigt. Gewöhnlich ist aber nur eine Verknüpfungsmöglichkeit die biologisch aktive. Ein geeignetes System für die Ausbildung dieser nativen Disulfidverbrückung stellt ein *redox-shuffling* System aus oxidiertem und reduziertem Glutathion dar (Rudolph, Lilie 1996). In diesem System werden ständig zufällige Disulfidbrücken ausgebildet und andere reduziert (Abb. 2.8). Da die native Disulfidverbrückung jedoch die thermodynamisch stabilste ist, werden bevorzugt nicht native Cysteinbindungen aufgebrochen. Auf diese Weise verschiebt sich das Gleichgewicht dieser Reaktion zur nativen und damit biologisch aktiven Disulfidverbrückung.

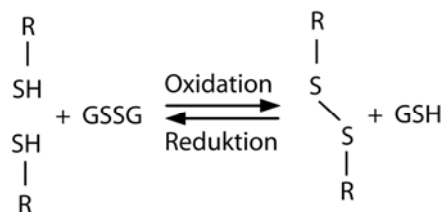


Abb 2.8: Gleichgewichtsreaktion der Disulfidverbrückung von Proteinen mit einem *redox-shuffling* System aus GSH/GSSG.

2.4 Rekonstitution von Membranproteinen

Biologische Membranen stellen die natürliche Umgebung von GPCRs dar. Sie bestehen aus Phospholipiden, Sterolen und Proteinen. Der Großteil der Phospholipide, die eine Membran bilden, besteht aus zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffketten, die mit einer polaren Kopfgruppe verbunden sind (Abb. 2.9). Durch diese Molekülarchitektur sind Lipide in der Lage Strukturen auszubilden, in denen sich die hydrophoben Ketten zueinander ausrichten, während sich die polaren Kopfgruppen der wässrigen Umgebung zuwenden. Sie bilden so

genannte Lipid-*bilayer* (Abb. 2.2). Proteine und Lipide wie Cholesterol sind in diesem *bilayer* eingebaut. Das-*bilayer* Modell wurde erstmals 1972 als Fluid Mosaik Modell vorgeschlagen (Singer, Nicolson 1972). Die eingebauten Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten der Lipide und den hydrophoben Domänen der Proteine in der Membran stabilisiert. Phospholipide besitzen eine sehr geringe CMC. Daher findet im Gegensatz zu Detergenzien kaum ein Austausch zwischen der gebundenen und monomeren Form statt und die Membranproteine sind in einer Phospholipidumgebung stärker vor Wechselwirkungen mit der wässrigen Umgebung geschützt.

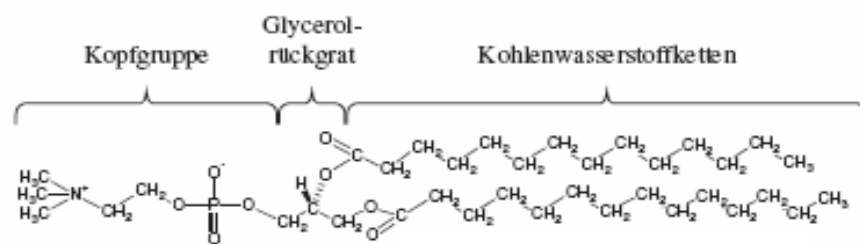


Abb. 2.9: Schematische Darstellung eines Phospholipides am Beispiel von DMPC.

Allerdings sind Biologische Membranen sehr komplexe Gebilde. Deshalb werden für die *in vitro*-Untersuchungen von Membranproteinen Modellmembranen aus definierter Phospholipidzusammensetzung verwendet, so genannte Liposomen (Abb. 2.10). Abhängig von der Lipidzusammensetzung besitzen sie oftmals eine kugelförmige Form aus einer Lipiddoppelschicht. Die Größe der Strukturen kann je nach Präparation zwischen wenigen Nanometern und einigen Mikrometern variieren. Durch einen Einbau der Rezeptoren in Liposomen (Rekonstitution) konnten bereits erste Strukturuntersuchungen an GPCRs durchgeführt werden (Soubias et al. 2006; Harding et al. 2009).

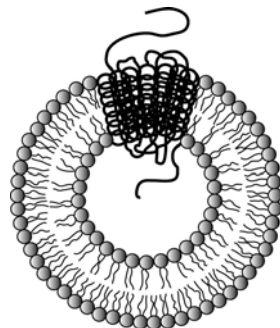


Abb. 2.10: Schematische Darstellung eines GPCRs in einem Liposom aus Phospholipiden.

Es gibt eine Vielzahl von Methoden Membranproteine in Liposomen einzubauen. Eine Rekonstitution mittels Detergenzien ist oft erfolgreich und sinnvoll, da Detergenzien meist schon in der Isolierung und Reinigung der Proteine eingesetzt werden (Rigaud et al. 1995). Eine Variante ist die Verdünnung des Protein/Detergens-Gemisches in eine Liposomenlösung, so dass die Konzentration des Detergens unter die CMC fällt. Dadurch wird die Detergenzmizelle instabil und das Protein wird in die Liposomen übertragen. Die zweite Möglichkeit besteht darin die Liposomen mit Detergenzien zu sättigen (Abb. 2.11). Detergenzien zerstören Lipid/Lipid-Wechselwirkungen, wodurch die Lipiddoppelschicht dynamischer und dadurch durchlässig wird. Wird die Detergenzkonzentration über eine Sättigungsgrenze erhöht, kommt es zu einer vollständigen Solubilisierung der Liposomen in gemischte Mizellen aus Detergens- und Lipidmolekülen. Dieser Prozess ist reversibel und die Liposomen können sich nach Entfernung der Detergenzien neu ausbilden (Seddon et al. 2004).

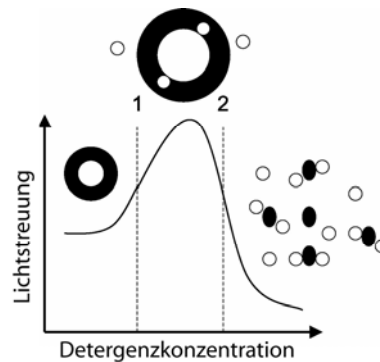


Abb. 2.11: *Drei-Stufen-Modell* zur Beschreibung der Wechselwirkung zwischen Liposomen und Detergenzmolekülen (Almog et al. 1986). Ab einer Detergenzkonzentration (1), die Annähernd der CMC des Detergens entspricht, werden Lipid/Lipid-Wechselwirkungen aufgebrochen und die *bilayer*-Schicht destabilisiert, was sich in einer Größenzunahme der Liposomen detektieren lässt. Sind die Liposomen mit Detergenzien gesättigt (2) bricht die Doppelschicht auf und bildet mizellare oder bizellare Strukturen aus.

2.5 Charakterisierung von GPCRs

2.5.1 Liganden-Bindung

Eine Charakterisierung der Funktionalität von rekombinant hergestellten GPCRs kann über Liganden-Bindung erfolgen, denn die Bindung eines Liganden zu seinem natürlichen Rezeptor ist in der Regel hoch affin mit Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich. Wichtige Parameter sind die Dissoziationskonstante, die eine Aussage über die Funktionalität des Bindungsmotivs zulässt, und die Konzentration an nativem Rezeptor, was entscheidend für die Bewertung von Herstellungsstrategien ist.

Verdrängungsassay

Eine einfache Methode für eine erste Abschätzung der Ligandenaffinität ist ein Verdrängungsassay (IC₅₀-Bestimmung). In diesem Assay konkurrieren zwei verschiedene Liganden um die Bindungsstellen eines Rezeptors. Diese Methode wird häufig verwendet um die Spezifität von Liganden miteinander zu vergleichen (Lindner et al. 2008a).

Es können jedoch auch gleiche Liganden verwendet werden. In diesem Fall konkurriert eine markierte mit einer unmarkierten Spezies. Die aus einer Modellanpassung an die experimentellen Daten erhaltenen Parameter der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) und der relativen Signaldifferenz (ΔS) lassen Aussagen über das Bindungsmotiv des Rezeptors zu (Glg. 2.6). Eine hohe relative Signaldifferenz deutet auf eine spezifische Bindung des Liganden an den Rezeptor und der IC₅₀-Wert ist in der Größenordnung vergleichbar mit der Dissoziationskonstante.

$$S = S_{\min} + \frac{(S_{\max} - S_{\min})}{1 + 10^{([L] - IC_{50})}} \quad \text{und} \quad \Delta S = \frac{(S_{\max} - S_{\min})}{S_{\max}} \quad (\text{Glg. 2.6})$$

In diesen Gleichungen ist S die Signalintensität des markierten Liganden und [L] die Konzentration des unmarkierten Liganden.

Sättigungsassay

In Sättigungsexperimenten werden markierte Liganden zu Rezeptorproben titriert. Aus einer geeigneten Modellanpassung lässt sich die Dissoziationskonstante genauer bestimmen. Ein für die Bindung eines Liganden an die N-terminale Domäne des Klasse B-GPCRs PTHR1 erfolgreich verwendetes Modell (Grauschopf et al. 2000) basiert auf einer 1/1 Stöchiometrie der Liganden-Bindung und dem Massenwirkungsgesetz.

Der freie Rezeptor [R₀] reagiert mit dem freien Liganden [L₀] zu einem Rezeptor/Ligand-Komplex [RL] (Glg. 2.7). Die Dissoziationskonstante (K_D) ist definiert mit Glg. 2.8 und nach dem Prinzip der Massenerhaltung ergibt sich die Konzentration der freien Moleküle aus der Differenz der gesamten ([R] und [L]) und der im Komplex gebundenen Moleküle (Glg. 2.9). Werden die Glg'n aus 2.9 in die Glg. 2.8 eingesetzt ergibt sich für den K_D-Wert die Glg. 2.10.



$$K_D = [R_0] * [L_0] / [RL] \quad (\text{Glg. 2.8})$$

$$[R_0] = [R] - [RL] \quad \text{und} \quad [L_0] = [L] - [RL] \quad (\text{Glg. 2.9})$$

$$K_D = ([R] - [RL]) * ([L] - [RL]) / [RL] \quad (\text{Glg. 2.10})$$

Das Signal des gebundenen Liganden (S) ist über den Bindungsgrad ($[RL]/[R]$) und der maximalen Signaländerung definiert (Glg 2.11). Durch auflösen der Glg. 2.10 ergibt sich für $[RL]$ die Glg. 2.12.

$$S = S_{\max} * [RL]/[R] \quad (\text{Glg 2.11})$$

$$[RL] = \frac{([R] + [L] + K_D)}{2} - \sqrt{\left(\frac{[R] + [L] + K_D}{2}\right)^2 - [R] * [L]} \quad (\text{Glg 2.12})$$

Ein Vorteil dieses Modells ist, dass es neben der Bestimmung des K_D -Wertes auch eine Abschätzung der Konzentration an nativem Rezeptor über eine Parameteranpassung zulässt.

2.5.2 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung des Kernspins mit äußeren (Zeeman-Effekt) und lokalen Magnetfeldern, sowie auf Wechselwirkungen der Kernspins untereinander. Da Kerne mit einer ungeraden Zahl von Protonen oder Neutronen, wie z.B. ^1H , ^{15}N , ^{13}C , ein magnetisches Moment besitzen, nehmen sie in einem starken Magnetfeld Orientierungen ein, die auf quantenmechanischen Effekten beruhen. Dies führt zu einer makroskopischen Magnetisierung der Probe (Gleichgewichtsmagnetisierung). Durch definierte elektromagnetische Impulse, dessen magnetischer Vektor senkrecht zu dem statischen Magnetfeld steht, wird diese Magnetisierung ausgelenkt. Die zeitliche Entwicklung der Magnetisierung und die Rückkehr in den Gleichgewichtszustand (Relaxation) werden durch die Wechselwirkungen der Kernspins beeinflusst.

Neben der Zeeman-Wechselwirkung sind vor allem die chemische Verschiebung, die dipolaren Kopplungen und die J-Kopplungen von Interesse. Die chemische Verschiebung beschreibt die Abschirmung des äußeren Magnetfeldes am Ort des Kerns, hervorgerufen durch die den Kern umgebende Elektronenverteilung. Die dipolaren Kopplungen sind Dipol/Dipol-Wechselwirkungen zwischen den Kernspins und J-Kopplungen sind über die Bindung vermittelte Resonanz-Wechselwirkungen zwischen magnetischen Kernen. Alle diese Wechselwirkungen haben, bis auf die J-Kopplungen, anisotropen Charakter und enthalten prinzipiell Strukturinformationen. Diese Informationen ermöglichen eine Aufklärung der Struktur und Dynamik von Proteinmolekülen.

In Lösung werden die anisotropen Wechselwirkungen durch die schnellen Bewegungen der Moleküle ausgemittelt, sodass schmale Linienspektren entstehen und die Signale gut den Kernen zugeordnet werden können. Grundsätzlich gilt, je kleiner der Proteinkomplex, desto

schneller ist seine Bewegung und desto eindeutiger sind die Signale. Allerdings bedeutet diese Ausmittlung der Bewegung einen Verlust von Strukturinformationen über die Moleküldynamik. Die HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) ist eine zweidimensionale Methode in der Lösungs-NMR, bei der die chemischen Verschiebungen der Signale von kovalent gebundenen NMR-aktiven Kernen ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) korreliert werden. Strukturelemente von Proteinen, wie α -Helices oder β -Faltblätter, zeigen dabei typische chemische Verschiebungen.

Proteinmoleküle in Membranen oder Liposomen können mit der Lösungs-NMR nicht untersucht werden. Ihre langsame Bewegung führt zu breiten sich überlagernden Signalen und eine Zuordnung wird unmöglich. Einen Ausweg bietet die MAS-NMR (*magic angle spinning*). Bei dieser Festkörper-NMR-Methode wird die gesamte Probe um eine zentrale Achse, die in einem magischen Winkel von $54,7^\circ$ zum statischen Magnetfeld steht, rotiert. Dadurch werden die anisotropen Wechselwirkungen ausgemittelt und das NMR-Signal wird in einer einzigen schmalen Linie konzentriert (Huster 2005). Die Strukturinformationen der anisotropen Wechselwirkungen können durch Rückkopplungsverfahren zurückgewonnen werden. Dies macht die Vorteile von MAS und der Strukturinformationen anisotroper Wechselwirkungen gleichzeitig nutzbar (Ishii et al. 2001).

Eine Grundvoraussetzung für die NMR-Untersuchung von Proteinen besteht in der Detektierbarkeit der Signale der verschiedenen Aminosäuren. Aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit von ^{13}C - und ^{15}N -Isotopen in Proteinen werden die Aminosäuren während der Herstellung der Proteine mit Isotopen markiert (Wagner et al. 2004). Dies erfolgt bei der rekombinanten Expression von heterologen Proteinen durch ^{13}C - und ^{15}N -markierte Substrate im Kulturmedium. Hohe Konzentrationen der Proteine in den Proben sind ebenso entscheidend, da sich gleiche NMR-Signale aufaddieren und erst so detektierbar werden.

Eine strukturelle Homogenität der Proteine ist aus demselben Grund essentiell, denn nur gleiche Strukturen liefern homogene Signale. Aggregierte Moleküle zeigen eine Vielzahl sich überlagernder und damit schwer detektierbarer Signale, da ihre Struktur eher zufällig ausgebildet wird.

Eine hohe Strukturvielfalt und eine räumliche Nähe der Strukturelemente führen zu einer hohen Dispersion der Signale. Deshalb ist eine hohe Dispersion der Signale in NMR-Spektren ein Maß für eine hohe strukturelle Ordnung der Moleküle, wie es bei nativen Proteinen der Fall ist. Zum Teil oder vollständig denaturierte Proteine hingegen besitzen weniger Strukturelemente in einer weniger kompakten Anordnung, was zu einer geringeren Dispersion führt.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ager-Ager	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Amidoschwarz 6B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ammoniumchlorid ¹⁵ N-markiert	Cambridge Isotope Lab. Inc., Andover, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ammoniumsulfat ¹⁵ N-markiert	Cambridge Isotope Lab. Inc., Andover, USA
L-Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propanesulfonat (CHAPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Cobalt(II)-chlorid (CoCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Cholesterol	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Coomassie Brilliantblau G 250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholine (DMPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
1,2-Dimyristoyl- <i>d</i> ₆₇ - <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholine-1,1,2,2- <i>d</i> ₄ -N,N,N-tri-methyl- <i>d</i> ₉ (DMPC- <i>d</i> ₆₇)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
n-Dodecyl-β-D-Maltosid (DDM)	Glycon Bioch. GmbH, Luckenwalde

Eisen(III)-chlorid (FeCl_3)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethanol 99,8%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ficoll 400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
α -D-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Harnstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Imidazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Mangansulfat (MnSO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Methyl- β -Cyclodextrin	Wacker Biotech GmbH, Jena
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Nickelsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ni-NTA-Agarose	Qiagen GmbH, Hilden

Pepton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyethylenglykol (PEG 20.000)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
2-Propanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
SDS-Gelelektrophorese Marker	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Szintilationscocktail OptiPhase'HiSafe'3	Perkin Elmer, Van Nuys, USA
N,N,N',N',-Tetramethyl- Ethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Thiamin	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
O-[4-(1,1,3,3,-Tetramethylbutyl)phenoxy]- polyethoxyethanol (Triton-X-100)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Wasser, entdeutert (D ₂ O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Zinksulfat (ZnSO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

3.1.2 Peptide und Enzyme

Peptide

Neuropeptid Y (NPY)	AG Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger, Universität Leipzig
N-[propionyl- ³ H]- Neuropeptid Y (³ H-NPY)	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

Enzyme

NdeI, XhoI	Promega GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Promega GmbH, Mannheim
Lysozym (78643 U/mg)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Desoxyribonuclease (Dnase) (515 U/mg)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

3.1.3 Plasmide

- phY2_EYFP-N1 Plasmid für die Expression des Y₂-Rezeptors in SK-N-MC Zellen (zur Verfügung gestellt von AG Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger, Universität Leipzig).
- pET41b(+) *E. coli* Expressionsvektor von auf dem ein T7-Promotor (Golomb, Chamberlin 1974), eine Kanamycin-Resistenz (Portier 1980) und ein C-Terminaler His-tag kodiert ist (zur Verfügung gestellt von AG Prof. Dr. Rainer Rudolph, MLU Halle-Wittenberg).
- phY2_pET41b(+) Plasmid, welches in dieser Arbeit für die Expression des Y₂-Rezeptors in *E. coli* konstruiert wurde. Es besitzt Schnittstellen für NdeI und XhoI.

3.1.4 Mikroorganismen

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten Mikroorganismenstämme.

Stamm	Organismus	Genotyp	Hersteller	Referenz
XL1-Blue	<i>E. coli</i>	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac⁻, F['][proAB, lacIqZM15, Tn10, (Tet^r)]</i>	Stratagene Madison, USA	(Bullock et al. 1987)
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i>	<i>hsdS, gal (λcIst857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7 gene 1)</i>	Novagen, Madison, USA	(Studier, Moffatt 1986)
Rosetta (DE3) pLysS	<i>E. coli</i>	<i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cam^R)</i>	Novagen, Madison, USA	(Dabrowski, Kiaer 2003)

3.1.5 Puffer, Medien und Lösungen

Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl pH 8,5 2 mM EDTA
DNA-
Auftragspuffer: 5% (v/v) Ficoll 400; 30 mM EDTA; 1% (w/v) SDS;
0,06% (w/v) Bromphenolblau

SDS-PAGE

Trenngelpuffer: 4 g/l SDS; 182 g/l Tris/HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer: 4 g/l SDS; 60 g/l Tris/HCl pH 6,8
Laufpuffer: 10 g/l SDS; 144 g/l Glycin ; 30 g/l Tris/HCl pH 6,8
Probenpuffer: 30% (v/v) Glycerin; 5% (w/v) SDS; 10% (w/v) Saccharose ;
0,5% (w/v) Bromphenolblau; 3% (v/v) Mercaptoethanol
60 mM Tris/HCl pH 6,8;
Färbelösung: 45% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure;
0,1% (w/v) Coomassie R250
Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure;

Kultivierungsmedien

LB: 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
SOC: 20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl;
10 mM MgSO₄; 10 mM MgCl₂; 4 g/l Glucose

Komplexmedien

batch-Medium: 50 g/l Hefeextrakt; 5 g/l Glucose; 11 g/l K₂HPO₄;
0,5 g/l NH₄Cl; 0,68 g/l MgSO₄
feed-Medium: 300 g/l Hefeextrakt; 250 g/l Glycerin

Mineralsalzmedien

batch-Medium: 25 g/l Glukose; 1 g/l NH₄Cl; 4,92 g/l (NH₄)₂SO₄; 1,2 g/l MgSO₄;
9,29 g/l Na₂SO₄; 29,20 g/l K₂HPO₄; 8,14 g/l NaH₂PO₄ x 2H₂O;
100 mg/l Thiamin; 1 ml/l Spurenelemente

<i>feed</i> -Medium:	400 g/l Glukose; 1 g/l NH ₄ Cl; 4,92 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 9,29 g/l Na ₂ SO ₄ ; 29,20 g/l K ₂ HPO ₄ ; 8,14 g/l NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O; 100 mg/l Thiamin; 1 ml/l Spurenelemente
Spurenelemente:	2,08 g/l CaCl ₂ x 2 H ₂ O; 0,45 g/l ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 4,34 g/l EDTA; 0,25 g/l MnSO ₄ x H ₂ O; 2,51 g/l FeCl ₃ x 6H ₂ O; 0,25 g/l CuSO ₄ ; 0,53 g/l CoCl ₂ x 6 H ₂ O

Alle Medien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Für feste Nährböden wurde den entsprechenden Medien vor dem Autoklavieren 1,5% Agar-Agar zugesetzt. Zur Kultivierung der Mikroorganismen unter selektiven Bedingungen enthielten die Medien die Antibiotika 50 mg/l Kanamycin und 34 mg/l Chloramphenicol. Alle Medien wurden auf pH 7,0 eingestellt. Für die Expression von ¹⁵N-markiertem Rezeptor wurden sowohl NH₄Cl als auch (NH₄)₂SO₄ ¹⁵N-markiert eingesetzt. Alle Zellkultivierungen erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Zellaufschluss und Solubilisierung

Aufschlusspuffer:	0,1 M Tris/HCl pH 7,0; 10 mM EDTA; 0,375 mg/ml Lysozym ; 3 mM MgCl ₂ ; 10 U/ml DNase
Waschpuffer 1:	0,1 M Tris/HCl pH 7,0; 60 mM EDTA; 1,5 M NaCl; 6% (v/v) Triton-X-100
Waschpuffer 2:	0,1 M Tris pH 7,0; 10 mM EDTA
Solubilisierungspuffer:	15 mM SDS; 0,1 M Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 50 mM DTT

Reinigung und Faltung:

Gelfiltrationspuffer:	15 mM SDS; 50 mM NaP pH 5,7
IMAC vor der Faltung	
Äquilibrierungspuffer:	15 mM SDS; 50 mM NaP pH 8,0
Elutionpuffer:	15 mM SDS; 50 mM NaP pH 4,5
Faltungspuffer:	30% (v/v) Glycerin; 0,3% (w/v) DDM; 0,6% (w/v) CHAPS; 20 mM Cyclodextrin; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 50 mM NaP pH 8,5; 1 mM EDTA
IMAC nach der Faltung	
Äquilibrierungspuffer:	30% (v/v) Glycerin; 0,3% (w/v) DDM; 0,6% (w/v) CHAPS;

	2,5 mM GSH; 0,5 mM GSSG; 20 mM Imidazol;
	50 mM NaP pH 8,0
Elutionspuffer:	30% (v/v) Glycerin; 0,3% (w/v) DDM; 0,6% (w/v) CHAPS;
	2,5 mM GSH; 0,5 mM GSSG; 300 mM Imidazol;
	50 mM NaP pH 8,0

Wenn es im Text nicht anders vermerkt ist, wurden die Puffer für die Reinigung und die Faltung so verwendet, wie sie hier aufgeführt sind. Die Natriumphosphatpuffer (NaP) wurden durch entsprechende Mischungsverhältnisse von Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt. Alle Puffer wurden mindestens 30 Minuten lang entgast.

3.1.6 Standards und Kits

Standards:

1 kb Marker	NEB, Schwalbach
LMW Calibration Kit for SDS-PAGE	GE Healthcare, München

Kits:

PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick™ Gelextraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden

3.1.7 Geräte

Chromatographieanlage Äkta <i>purifier</i>	GE Healthcare, München
β-Counter TRICARB2900-TR	Packard Bioscience., Massachusetts, USA
Elektrophoresegerät Mighty Small II SE250	Hoefler, San Francisco, USA
Elektroporator Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Extruder Lipex	Lipex Biomem. Inc., Vancouver, Canada
Feinwaage ME/SE	Satorius AG, Göttingen
Fermenter Biostat C DCU	B. Braun Biotech GmbH, Melsungen
Fluoreszenz-Spektrometer Fluoromax 4	Horiba Jobin Yvon GmbH, Unterhachingen

Glukosemessgerät Accu-CHEK Aviva	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Hochdruckhomogenisator Gaulin LAB	APV-Schröder, Lübeck
Homogenisator Ultra-Turrax T 25	IKA Labortechnik, Staufen
pH-Meter pH/Ion 510	Eutech Instruments Ltd, Singapur
Reinstwasseranlage	USF, Ransbach Baumbach
Rotationsverdampfer Laborota 4010	Heidolph, Schwabach
Spektralpolrimeter J-810	Jasco, Gross-Umstadt
Tischzentrifuge 5702R	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Thermomixer comfort 1,5ml	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf
UV/VIS Spectrometer Ultraspec 4000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortexer Genie2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Waage Acculab ALC	Satorius AG, Göttingen
Wärmebad SW22	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zentrifuge Avanti J-20, J-25	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

3.1.8 Sonstige Materialien

Amicon Ultra Centrifugal Filter Device (MWCO 3000, 10000, 50000)	Millipore, Billerica, USA
BioBeads SM2 Absorband, 20-50 mesh	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Blotmembran Polyvinylidendifluorid (PVDF)	Millipore, Billerica, USA
Chromatographiesäulen	
HiPrep 26/10	GE Healthcare, München
HiPrep 16/10	GE Healthcare, München
HiPrep 1ml, 5ml	GE Healthcare, München
Dialysekammer D-Tube MWCO 6-8	Novagen, Madison, USA
Dialyseschlauch Spectra/Por MWCO 6-8	Spectrum Lab., Inc., Broadwick St., USA
Filtermembran Nitrozellulose	PALL Life Science, Pensacola, USA
Küvetten	
Einmal-Küvetten 1,5 ml	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Electroporations Küvette 2mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
QS-Küvette 0,2mm, 0,5mm, 10mm	Hellma GmbH & Co. KG, Mühlheim

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine analytische Methoden

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur analytischen oder präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Dafür wurden 1,5% (w/v) Agarosegele hergestellt, die in eine mit TAE-Laufpuffer befüllte Agarose-Gelelektrophoresekammer platziert wurden. Die Proben wurden mit 1/6 (v/v) 6x Ficoll-Probenpuffer versehen, in eine Geltasche pipettiert und mittels horizontaler Gelelektrophorese bei 200 V über einen Zeitraum von 45 min aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) angefärbt und die DNA-Banden mittels UV-Licht visualisiert.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde die Methode der SDS-PAGE angewendet (Laemmli 1970). Das anionische Detergens SDS verdeckt die Oberflächenladung der Proteine, wodurch die Moleküle nur aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte und Struktur durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Hierfür wurde das Mighty Small II SE250-Gelelektrophorese-System nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Maximal 15 µl der zu analysierenden Proteinproben wurden 1/1 (v/v) mit Probenpuffer vermischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf ein 12,5%iges Gel mit der in Tab.3.2 angegebenen Zusammensetzung aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200 V für 45 min im Laufpuffer. Danach wurden die Gele 30 min in Färbelösung unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend in Entfärbelösung gespült bis die eingefärbten Proteinbanden im SDS-Gel sichtbar wurden.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE. Für eine schärfere Trennung der Proteinbanden wird vor das Sammelgel ein Trenngel geschichtet.

	Sammelgel 6%	Trenngel 12,5%
Trenngelpuffer	-	2,5 ml
Sammelgelpuffer	1,5 ml	-
30% (v/v) Acrylamid	1,2 ml	4,2 ml
Wasser	3,3 ml	3,3 ml
TEMED	4 µl	5 µl
10% (w/v) APS	20 µl	35 µl

Proteinkonzentrationsbestimmung in Mizellen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Rezeptoren in Mizellen erfolgte mittels UV/VIS-Spektroskopie. Dafür wurden die Proteinproben in einer Quarzküvette in einem Wellenlängenbereich von 240-340 nm aufgenommen. Als Referenz diente jeweils der entsprechende Puffer ohne Protein. Die Konzentration wurde auf Grundlage des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnet. Die Absorption wurde als Differenz der Absorptionen bei 280 und 320 nm eingesetzt, um mögliche Pufferunterschiede zwischen der Referenz und der Probe zu berücksichtigen. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm und der Extinktionskoeffizient des Y₂-Rezeptors bei 280 nm im reduzierten Zustand der Cysteine beträgt 53860 M⁻¹*cm⁻¹ (www.expasy.ch).

Proteinkonzentrationsbestimmung in Liposomen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Rezeptoren in Liposomen erfolgte mittels der Schaffner/Weissmann-Methode (Schaffner, Weissmann 1973). Bei dieser Methode wird das Protein durch Zugabe der Säure TCA ausgefällt und das Präzipitat mit dem Farbstoff Amidoschwarz angefärbt. Durch die Säurefällung werden die meisten störenden Substanzen entfernt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass auch sehr geringe Proteinmengen nachgewiesen werden können und Detergenzien oder Lipide die Messungen nicht beeinflussen. Diese aufwendige Methode ist allerdings nur für große Proteinmoleküle geeignet.

Nach geeigneter Verdünnung wurden 10 µl der Proben mit 260 µl Wasser und 30 µl 60%iger TCA-Lösung gefällt und auf eine befeuchtete Blot-Membran pipettiert. Mittels einer Vakuumpumpe wurde der Überstand durch die Membran abgesaugt, so dass nur das Pellet auf der Membran verblieb. Durch mehrmaliges Waschen mit 6%iger TCA-Lösung wurden alle Substanzen vom Protein entfernt. Anschließend wurde der Filter für 2 min in eine Farbreagenz aus 0,1% Amidoschwarz; 45% Methanol; 10% Essigsäure getaucht. Eine Entfernung von überschüssigem Amidoschwarz erfolgte mit mehrmaligem Waschen in 90% Methanol; 2% Essigsäure. Die blau eingefärbten Proteine auf der Membran wurden großflächig aus der getrockneten Membran ausgeschnitten und mittels 25 mM NaOH; 50 µM EDTA; 50% Ethanol aus der Membran über einen Zeitraum von 1,5 h herausgelöst. Die Absorption der Blaufärbung wurde bei 630 nm Wellenlänge gemessen. Als Standard dienten verschiedene Konzentrationen des Rezeptors in SDS-Mizellen, die auf gleiche Weise präpariert und vermessen wurden.

3.2.2 Klonierung

Vervielfältigung der Plasmid-DNA

Für die Vervielfältigung der jeweiligen Vektor- und Expressionsplasmide wurde die Plasmid-DNA in *E.coli*-Zellen (XL1-Blue für Ligationsprodukte und BL21(DE3) für gereinigte Plasmide) transformiert. Die transformierten Zellen wurden anschließend über Nacht in 3 ml LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit hoher Reinheit unter Verwendung des QIAfilter™ Spinprep-Kits nach den Angaben des Herstellers. Eluiert wurde sie mit destilliertem sterilem Wasser.

Restriktion

Restriktion ist die Spaltung von DNA-Plasmiden mit Restriktionsendonukleasen an spezifischen Spaltstellen. Restriktionsendonukleasen wurden gemäß den Angaben der Hersteller unter Verwendung der entsprechenden Puffer eingesetzt. Eine präparative Restriktion für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus der PCR hatte ein Gesamtvolumen von 100 µl und eine analytische Restriktion für die Überprüfung von Ligationsprodukten ein Gesamtvolumen von 15 µl. Die Zusammensetzung für alle Restriktionsansätze war 45 vol.% Plasmid-DNA, 10 vol.% Puffer, 1 vol.% BSA, 40 vol.% steriles Wasser, 2 vol.% XhoI und 2 vol.% NdeI. Diese Restriktionsansätze wurden 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend nach Zugabe von nochmals je 1 vol.% der Restriktionsenzyme 30 min bei 37 °C inkubiert. An die Restriktion eines PCR-Produktes schloss sich eine Reinigung des Spaltproduktes mittels PCR-Purification an. Diese wurde mit dem QIAquick™ PCR-Purification Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich DNA-Fragmente in einer sich zyklisch wiederholenden Abfolge von Reaktionsschritten amplifizieren (Mullis, Faloona 1987). Dazu wurden zur DNA-Sequenz komplementäre Oligonukleotide (Primer) und *taq*-DNA-Polymerase verwendet. Die Reaktionsbedingungen, unter denen die DNA-Amplifikation durchgeführt wurde, variierten in Abhängigkeit des DNA-Templates und der eingesetzten Primern. Auf einen Denaturierungsschritt von 2 min bei 95 °C folgten 24 bis 30 sich wiederholende Zyklen der Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung. Die Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 30 s und die Primer-Anlagerung für 30 s bei einer Temperatur, die sich nach der Schmelztemperatur der Primer richtete. Diese variierte

zwischen 52 °C und 62 °C. Die Dauer der Primer-Verlängerung richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Produktes und betrug 30-90 s bei einer Temperatur von 68-72 °C. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelextraktion gereinigt.

Gelextraktion

Zur Isolierung der DNA-Fragmente wurden die PCR-Produkte in ein Agarose-Gel aufgetrennt, die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick™ Gelextraction Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Ligation

Ligation ist eine Verbindung von DNA-Fragmenten an ihren Enden zu einem Plasmid mit Hilfe von Ligase. Die Ligrationsreaktionen inkubierten in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 5 vol.% T4-DNA-Ligase und 10 vol.% Ligase-Puffer 16 h bei 4 °C. Das eingesetzte Volumen der DNA-Fragmente zueinander hing von ihren Konzentrationen ab.

Transformation

Transformation ist der Prozess, in dem rekombinante DNA in Zellen eingeschleust wird. Eine Methode ist die Elektroporation elektrokompenter *E. coli*-Zellen. Mit dieser Methode wird die Membran der Zellen mittels eines elektrischen Impulses kurzzeitig permeabilisiert, so dass die Plasmide in das Zytoplasma diffundieren können. In dieser Arbeit wurden 50 µl elektrokompenter Zellen mit 0,4 µl Plasmid-DNA bzw. 1 µl Ligrationsansatz versetzt. Diese Suspension wurde in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt und mit 1,8 V bei 200 Ω gepulst. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl SOC-Medium überführt, für 45 min bei 37 °C und 800 rpm inkubiert, auf Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Für die Plasmidpräparation wurden XL1-Blue- und BL21(DE3)-Zellen und für die Expression Rosetta (DE3) pLysS-Zellen transformiert.

Selektion

Während der Transformation wird nur ein Bruchteil der Zellen mit rekombinanter DNA transformiert. Um diese zu selektieren wurden die transformierten Zellsuspensionen auf Agar-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen. Nur Zellen, die den DNA-Vektor mit der jeweiligen Antibiotika-Resistenz enthielten, konnten auf dem Selektionsmedium kultiviert werden. Um aus den Transformanten, die mit Ligrationsansätzen transformiert wurden, die Klone zu selektieren, die neben der Vektor-DNA auch die Rezeptor-kodierende DNA enthielten,

wurden die Plasmide wie weiter oben beschrieben aus den Zellen isoliert. Anschließend erfolgte mit diesen Plasmiden eine analytische Restriktion.

3.2.3 Zellkultivierung

Ermittlung der Zelldichten

Die Zelldichten werden als optische Dichten bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) angegeben. Zur Ermittlung der Zelldichten wurden 1 ml der Proben 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, das erhaltene Zellpellet in H_2O resuspendiert und in einer geeigneten Verdünnung vermessen. Dies hat den Vorteil, dass für alle verwendeten Medien H_2O als Referenz genutzt werden kann.

Glycerinkulturen

Glycerinkulturen dienen zur Lagerung der Expressionsstämme und als Inokulum der Vorkulturen für die Fermentation. Zum Anlegen der Glycerinkulturen wurden die transformierten rekombinanten *E.coli*-Zellstämme mit vollständigen Expressionsplasmiden von den Agerplatten in Komplexmedium überführt, bei 37 °C und 200 rpm auf eine Zelldichte von $OD_{600} = 2-3$ kultiviert, dann mit 50% (v/v) Glycerin auf eine Glycerinkonzentration von 8% gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Glycerinkulturen hatten ein Volumen von 1 ml und wurden bei -80 °C gelagert.

Adaption

Für die Kultivierung in Mineralsalzmedium mussten die Zellen von Komplexmedium auf dieses Medium adaptiert werden, d.h. ihr Zellmetabolismus musste sich auf andere Nährstoffquellen umstellen. Dafür wurden Zellen aus den Glycerinkulturen 1/100 (v/v) in Mineralsalzmedium verdünnt und bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 2-3$ kultiviert. Von diesen Zellsuspensionen wurden erneut Glycerinkulturen angelegt. Dieser Schritt wurde wiederholt bis die Wachstumsrate und damit die Verdopplungszeiten der Zellen nahezu konstant waren.

Vorkulturen

Vorkulturen in Schüttelkolben dienten als Startbiomasse für den Fermentationsprozess (Inokulum). Diese Kultivierung erfolgte in zwei Schritten. Für die erste Vorkultur wurde

1 ml der Glycerinkultur in 20 ml des jeweiligen Mediums überführt und über Nacht kultiviert. In der zweiten Vorkultur wurden die 20 ml der ersten Vorkultur in 5 x 200 ml frisches Medium aufgeteilt und bis $OD_{600} = 4$ kultiviert. Diese wurden anschließend steril bei 8000 rpm für 5 min zentrifugiert. Eine Resuspension des Zellpellets erfolgte mit 50 ml sterilem H_2O . Dieser Schritt diente zum einen zur Reduktion des Inokulumvolumens und zum anderen zur Abtrennung von Nebenprodukten des Zellmetabolismus der Vorkulturen.

Fermentation

Die Fermentationen wurden in einem Biostat C DCU mit 10 l Arbeitsvolumen und einem digitalen Mess- und Regelsystem durchgeführt. Der Zusammenbau und die Sterilisation des Fermenters sowie die Kalibrierung der Messsonden (Antischaum-, pO_2 - und pH-Sonde) und das Anschließen der Pumpen erfolgten nach Angaben der Hersteller. Das *batch*-Medium wurde im Fermenter vorgelegt und auf 37°C vorgewärmt. Nachdem die Antibiotika mittels Sterilfiltration frisch dem Medium zugegeben wurden, erfolgte der Start des Fermentationsprozesses durch Zupumpen des Inokulums. Ein konstanter pH-Wert wurde durch automatisch geregeltes steriles Zupumpen von 10% (w/v) NaOH und 10% (v/v) H_3PO_4 sichergestellt. Die Steuerung der Sauerstoffsättigung (pO_2) des Mediums auf einem konstanten Wert von 30% der maximalen Sättigung erfolgte mittels einer automatisierten Kaskadenregelung der Rührerdrehzahl, des Luftstroms und der Zufuhr von reinem O_2 bei hohen Zelldichten. Eine teilweise stark auftretende Schaumbildung wurde durch manuelle Zugabe von Antischaummittel begrenzt. Eine Aufzeichnung der Onlinedaten (pO_2 , pH, T, Säure-, Baseverbrauch, Rührerdrehzahl und Luftstrom) erfolgte mittels des Programms MFCS. Die Offlinedaten (Zelldichte, Glukosekonzentration) wurden aus Proben, die in regelmäßigen Abständen steril aus dem Fermenter entnommen wurden (2-3 ml), ermittelt. Die Glukosekonzentration in Mineralsalzmedien wurde mittels eines Glukosemessgerätes durch Auftragen von wenigen Mikrolitern der Probe auf den Messstreifen ermittelt. In Fermentationen mit Komplexmedien ist die Konzentrationsbestimmung der C-Quelle nicht möglich, daher wurde der Startpunkt für das Zupumpen des *feed*-Mediums aus dem Verhalten der pO_2 - und der pH-Regelung abgeschätzt. Eine Herunterregulierung der pO_2 -Sättigung (die Zellen verbrauchen weniger Sauerstoff) bei gleichzeitiger Herunterregulierung des pH-Wertes (die Zellen verbrauchen die Acetate aus dem Medium) deuteten stark auf einen Substratmangel hin.

Zellernte

Nach Beendigung des Fermentationsprozesses wurde die Zellsuspension auf 4°C heruntergekühlt, aus dem Fermenter in Zentrifugenbecher überführt und bei 4°C, 8000 rpm für 40 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde bei -80°C für maximal sechs Monate gelagert.

3.2.4. Biochemische und Biophysikalische Methoden

Das rekombinant hergestellte Protein wurde in den *E.coli*-Zellen als IBs eingelagert. Um das Protein aus den IB's zu gewinnen, mussten die Zellen erst aufgeschlossen werden, anschließend wurden die IB's gereinigt und das Protein solubilisiert. Darauf folgten zwei chromatographische Reinigungsschritte. Anschließend wurde das Protein *in vitro* gefalten, konzentriert und rekonstituiert.

IB-Präparation

Zum Aufschluss der Zellen wurden diese in 5fachem Volumen (v/w) Aufschlusspuffer resuspendiert und mittels eines UltraTurrax homogenisiert. Nach Zugabe von 0,375 mg/ml Lysozym, 3 mM MgCl₂ und 10 U/ml DNase erfolgte eine Inkubation bei starkem Rühren und Raumtemperatur für 30 min. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Hochdruckhomogenisators über 3 Passagen bei 800 bar aufgeschlossen. Dabei wird die Zellsuspension mit hohem Druck durch ein Ventil gedrückt. Ein größerer Durchmesser nach dem Ventil führt zur plötzlichen Entspannung der Lösung, wodurch die Zellmembranen aufgerissen werden. Die Suspension wurde danach 1,5 h bei 4°C nach Zugabe von 1/4 (v/v) des Waschpuffers 1 gerührt, um *E. coli*-Zellbestandteile in der Suspension zu lösen. Es schloss sich ein 3 mal wiederholender Waschschrift an, bei dem die Suspension aus gelösten Zellbestandteilen und ungelösten IB's mit 25000 rpm bei 4 °C 30 min zentrifugiert wurde und das Pellet im Waschpuffer 2 wieder homogenisiert wurde. Das erhaltene Pellet aus gereinigten IB's wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

Solubilisierung

Solubilisiert wurden die IB's mit 10 (v/w) Solubilisierungspuffers für mindestens 12 h bei Raumtemperatur und starkem Rühren. Um eventuell entstandene Disulfidbrücken zu reduzieren und freie SH-Gruppen reduziert zu halten wurde vor der Solubilisierung frisch

DTT im Puffer gelöst. Nach der Solubilisierung wurden ungelöste Bestandteile mittels Zentrifugation bei 25000 rpm und Raumtemperatur über einen Zeitraum von 40 min abgetrennt.

Gelfiltration

Kleinere Protein oder Proteinfragmente und das DTT wurden mittels eines ersten chromatographischen Schrittes abgetrennt. Die Gelfiltration, in der Substanzen aufgrund ihrer Größe und Struktur unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten in der Säulenmatrix aufweisen und daher aufgetrennt werden können, erfolgte mit einer HiPrep 26/10, die ein Säulenvolumen (cv) von 53 ml besitzt. Das maximale Auftragsvolumen betrug 10 ml Probe bei einer Flussrate von 4 ml/min.

IMAC

In dieser Affinitätschromatographie wird das Zielprotein über seinen C-Terminalen His-*tag* an die Säulenmatrix gebunden. Auf der Säulenmatrix befinden sich mittels Nitrilotriessigsäure (NTA) immobilisierte Nickelionen. Diese zweiwertigen Metallionen können durch Histidine komplexiert werden. Nachdem alle Proteine ohne His-*tag* von der Säule gewaschen wurden, wird der Ni/His-Komplex durch ein Absenken des pH-Wertes aufgelöst und das Zielprotein kann hochrein eluiert werden (Grisshammer, Tucker 1997).

Die IMAC erfolgte mit einer HisPrep 16/10 (cv von 20 ml) Chromatographiesäule, die vor jeder Anwendung mit 50 ml 0,1 M Nickelsulfat beladen wurde. Das maximale Auftragsvolumen betrug 150 ml Probe bei einer Flussrate von 1 ml/min. Anschließend wurden ungebundene Proteine mit 5 cv von der Matrix gewaschen. Die Elution erfolgte mittels eines pH-Gradienten von 8 auf 4,5. Die Elutionsfraktion wurde mit dem Puffer der Gelfiltration auf eine Konzentration von 400 µg/ml verdünnt und bei -20°C für maximal 4 Wochen gelagert.

Präparation der Liposomen

Die Präparierten Liposomen bestanden zum Teil aus einem Lipidgemisch mit 95% DMPC und 5% Cholesterol, zum Teil aus reinem DMPC. Im Fall von Lipidgemischen wurde die benötigte Menge in Chloroform gelöst, um eine vollständige Durchmischung der Lipide zu erreichen. Anschließend wurde das Chloroform mittels eines Rotationsverdampfers unter starkem Unterdruck abgedampft und der entstandene Lipidfilm mit 50 mM NaP pH 8, 1 mM EDTA in eine Lipidkonzentration von 10 mg/ml gelöst. Homogene Lipide wurden direkt im

Puffer gelöst. Darauf folgten eine Inkubation der Proben im Wasserbad für 30 min bei 37°C, um eine vollständige Lösung der Lipide in mehrschichtige Vesikel (MLVs) im Puffer zu gewährleisten und 10 Gefrier-Tau-Zyklen, in denen die Lipidlösungen abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut wurden. Durch das Schockfrieren dehnt sich das Wasser zwischen den Schichten der MLVs aus, so dass große Strukturen aufgebrochen und homogenisiert werden. Um die Lipidvesikel auf eine definierte Größe von 100 nm zu reduzieren wurden sie mittels eines Extruders zehnmal mit 25 bar durch eine Membran mit 100 nm Porendurchmesser gepresst. Dabei entstanden unilamillare Liposomen mit einem Durchmesser von durchschnittlich 100 nm (LUVs).

Faltung, Konzentrierung und Rekonstitution

Faltung, Konzentrierung und Rekonstitution waren Gegenstand intensiver Untersuchungen und werden im Einzelnen im Ergebnisteil bei den jeweiligen Experimenten näher erläutert.

3.2.5. Methoden zur Charakterisierung des Y₂-Rezeptors

Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Spektroskopie wurde genutzt um die Aggregation und die unspezifische Oligomerisierung der Rezeptormoleküle in Mizellen zu messen. Der Y₂-Rezeptor besitzt fünf Tryptophanreste, welche eine intrinsische Fluoreszenz haben. Diese wurden bei einer Wellenlänge von 295 nm angeregt. Durch Strukturänderung des Rezeptors aufgrund von Aggregation oder Oligomerisierung wird der Abstand zwischen den Tryptophanen geringer und die Signalemissionen löschen sich gegenseitig aus, es kommt zum *quench*-Effekt. Die Messung der Emission erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm über einen definierten Zeitraum, mit Ein- und Ausgangsspaltbreiten von 1 nm, bei 25°C unter leichtem Rühren.

Circulardichroismus

Diese spektroskopische Methode nutzt die Wechselwirkung von circular polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen. Aufgrund der unterschiedlichen Absorption von rechts- und linksdrehenden Substanzen kommt es zu einer Differenz, die als Elliptizität angegeben wird. Aus typischen Kurvenverläufen der Elliptizitäten über einen Wellenlängenbereich lassen sich sekundäre Strukturelemente von Proteinmolekülen ableiten. Die Aufnahme der Fern-UV-CD-Spektren erfolgte an einem Spectropolarimeter in einem Wellenlängenbereich von 190-

260 nm mit einer Proteinkonzentration von 0,4 mg/ml in einer 0,2 mm Quarzküvette bei 20°C und 60 Akkumulationen. Nach Abzug des Puffersignals erfolgte die Berechnung der mittleren molaren Elliptizität (Θ_{MRW}) aus der gemessenen Elliptizität (Θ) in mdeg, des Molekulargewichts des Proteins (MW) in Da, der Schichtdicke der Küvette (d) in cm, der Anzahl der Aminosäuren im Protein (n_{AS}) und der Konzentration des Proteins (c) mit Glg. 3.1. Die Berechnung des Anteils der α -helikalen Strukturelemente aus dem Spektrum erfolgte mit dem Programm CDNN (Bohm et al. 1992)

$$\Theta_{MRW} = (\Theta * 100 * MW) / (d * c * n_{AS}) \quad (\text{Glg. 3.1})$$

Radioliganden-Bindungsassay

Radioliganden-Bindungsstudien wurden sowohl mit dem Y₂-Rezeptor in Mizellen als auch in seiner rekonstituierten Form durchgeführt. Die Liganden-Bindung erfolgte mit 1 nM ³H-NPY in einem Reaktionsvolumen von 250 μ l. Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden 200 μ l rekombinant hergestellter Y₂-Rezeptor (\sim 1 μ M), 25 μ l ³H-NPY (10 nM) und 25 μ l unmarkiertem NPY (10 μ M gelöst in 0,1 mg/ml BSA) in 1000fachen Überschuss zum markiertem verwendet. Aufgrund dieses hohen Überschusses werden die markierten Liganden durch die unmarkierten von den spezifischen Bindungsstellen an den Rezeptoren verdrängt, da diese nur in begrenzter Zahl vorhanden sind. Im Gegensatz dazu sind unspezifische Bindungsstellen in nahezu unbegrenzter Zahl vorhanden (Oberflächen des Reaktionsgefäßes, der Mizellen, der Liposomen und der Ni-NTA-Agarose). Das ³H-NPY wird daher nicht verdrängt und wird als unspezifische Bindung gemessen.

Die totale Bindung ist die gemessene Radioaktivität der unspezifisch und der spezifisch gebundenen markierten Liganden. Das Reaktionsvolumen für die totale Bindung enthielt ebenfalls 200 μ l rekombinant hergestellter Y₂-Rezeptor (\sim 1 μ M) und 25 μ l ³H-NPY (10 nM), allerdings 25 μ l 0,1 mg/ml BSA-Lösung statt des unmarkiertem NPY.

Nach einer Inkubationszeit von 90 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln wurden 50 μ l Ni-NTA-Agarose in die Reaktionsansätze gegeben, um den Y₂-Rezeptor/NPY-Komplex am C-terminalen His-tag des Rezeptors zu binden und so von ungebundenem Liganden zu trennen. Die Ansätze wurden für weitere 30 min inkubiert und anschließend 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet mit den Ni-NTA-Agarose/Y₂-Rezeptor/NPY-Komplex wurde zweimal mit PBS auf Eis gewaschen. Die Messung der Radioaktivität der Proben erfolgte mittels eines β -Counters, nach dem die Proben in 3 ml Szintillationscocktail überführt und gut durchmischt wurden.

In den Verdrängungsexperimenten zwischen markiertem und unmarkiertem NPY wurden 200 μl rekombinant hergestellter Y_2 -Rezeptor in Mizellen ($\sim 1 \mu\text{M}$) mit 1 nM ^3H -NPY und mit ansteigenden Konzentrationen in einem Bereich 0,01 nM und 10 μM inkubiert. Gebundener wurde von ungebundenem Liganden wie oben beschrieben getrennt. Jeder Bindungsassay wurde mindestens zweimal separat durchgeführt und jedes Experiment ist ein Mittelwert aus drei Ansätzen.

Des Weiteren wurden Sättigungsassays mit rekombinant hergestellter Y_2 -Rezeptor in Mizellen ($\sim 1 \mu\text{M}$) durchgeführt. Konstante Mengen des Rezeptors wurden mit ansteigenden ^3H -NPY-Konzentrationen von bis zu 7 nM inkubiert. Dieser Assay wurde sowohl für die spezifische als auch die unspezifische Bindung wie oben beschrieben durchgeführt. Die Radioaktivität des spezifisch gebundenen ^3H -NPY ist als Differenz der totalen und der unspezifischen Bindungen dargestellt. Gebundener wurde von ungebundenem Liganden ebenfalls wie oben beschrieben getrennt. Die Berechnung der charakteristischen Parameter erfolgte mit den in Kapitel 2.5.1 angegebenen Gleichungen.

NMR-Messungen

Die $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren des Y_2 -Rezeptors in SDS-Mizelle wurden an einem Bruker DRX 600 NMR-Spektrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten) mit einer Impulslänge der 90° Impulse von 11,1 μs für die ^1H -Kerne und einer spektralen Weite von 9 kHz aufgenommen. In der indirekten Dimension wurden 256 Inkremente mit 200 Akkumulationen pro Inkrement und einer Wartezeit von 2 s aufgenommen. Die spektrale Auflösung für die indirekte Dimension betrug 0,37 ppm, die für die direkte Dimension 0,005 ppm. Die Resonanzfrequenz für ^1H betrug an diesem Gerät 600,13 MHz. Alle Proben enthielten einen D_2O Anteil von 10% (v/v).

Die MAS-NMR-Messungen des Y_2 -Rezeptors in Liposomen wurden an einem Bruker Avance 750 NMR-Spektrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten) durchgeführt. Die Resonanzfrequenz für ^1H betrug an diesem Gerät 749,8 MHz.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die rekombinante Herstellung des Y_2 -Rezeptors in aktiver Form für NMR-Strukturuntersuchungen. Dafür wurde zunächst die den Y_2 -Rezeptor kodierende DNA in *E. coli*-Zellen transformiert. Die Produktion des Zielproteins erfolgte in *fed-batch*-Fermentationen, in welchen die Rezeptoren nach Induktion der Proteinexpression intrazellulär in IBs als Aggregate angereichert wurden. Diese Aggregate wurden aus den Zellen isoliert und mittels des stark denaturierenden Detergens SDS in Mizellen solubilisiert. Anschließend wurde der Y_2 -Rezeptor in zwei Schritten chromatographisch in hochreiner Form isoliert. Die aktive Tertiärstruktur des Rezeptors wurde mittels Faltung *in vitro* hergestellt. Als Methode der Wahl wurde die Pulsrenaturierung genutzt, bei der das denaturierende Detergens mit Hilfe eines artifiziellen Chaparonen-System durch nicht denaturierende Detergenzien ausgetauscht wurde. Eine Disulfidverbrückung wurde durch ein *redox-shuffling* System aus reduziertem und oxidiertem Glutathion sichergestellt. Nach der Faltung erfolgte eine weitere chromatographische Reinigung, in der entstandene Proteinaggregate sowie das SDS abgetrennt und die Rezeptoren aufkonzentriert wurden. Da der renaturierte Rezeptor in diesen nicht denaturierenden Mizellen in konzentrierter Form eine sehr niedrige Langzeitstabilität aufwies, wurde er abschließend in eine stabile Membranumgebung (Liposomen) rekonstituiert (Abb. 4.1).

Zur Charakterisierung des Y_2 -Rezeptors wurden von seinem denaturierten, renaturierten und rekonstituierten Zustand sowohl Liganden-Bindungs-Studien als auch NMR-Experimente durchgeführt.

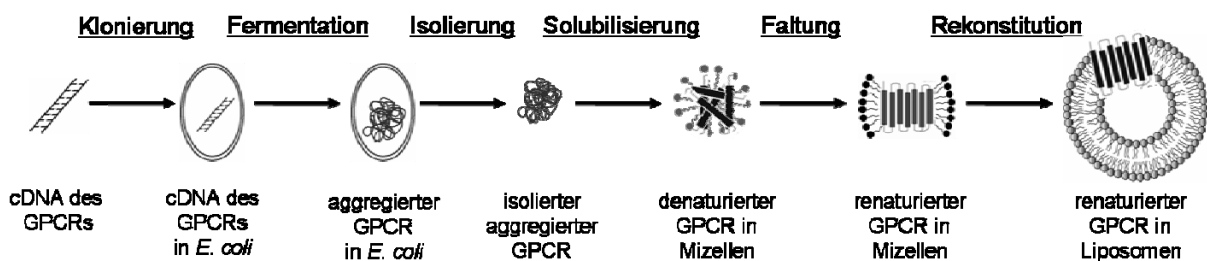


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der rekombinanten Herstellung des humanen Y_2 -Rezeptors. Die Expression erfolgte in *E. coli*. Das in *inclusions bodies* angereicherte Zielprotein wurde isoliert, solubilisiert und gereinigt. Anschließend wurde der Rezeptor in seine aktive Konformation *in vitro* gefaltet und abschließend in eine stabile Lipidumgebung rekonstituiert.

4.1 Rekombinante Herstellung des Y₂-Rezeptors

4.1.1 Klonierung

In der Klonierung wird mit einer Reihe von DNA-Rekombinationstechniken genetische Information von einem Organismus isoliert und in einen anderen Organismus übertragen, um einen leistungsfähigen Expressionsklon herzustellen. Für diese Arbeit wurde ein *E. coli*-Klon zur intrazellulären Expression des Zielproteins hergestellt. Die Klonierung erfolgte nach der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Methoden. Als Ausgangsplasmid diente das Expressionsplasmid für Tierzellensysteme phY2_EYFP-N1 (AG Prof. Annette Beck-Sickinger, Universität Leipzig). Aus diesem Plasmid wurde die den Y₂-Rezeptor kodierende DNA durch die Restriktionsenzyme NdeI und XhoI herausgeschnitten und mittels Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Die gereinigte DNA wurde anschließend mit dem *E. coli*-Expressionsvektor pET-41b(+) ligiert. Dieser Vektor kodiert, neben dem für die pET-Vektoren typischen T7-Promoter für die Induktion der Proteinexpression mittels IPTG, eine Kanamycinresistenz, welche wichtig für die Kultivierung der *E. coli* Zellen auf Selektionsmedium war, und einen 8fach His-tag, der C-terminal am Zielprotein exprimiert wird. Dieser His-tag spielte eine entscheidende Rolle sowohl für die Reinigung des Rezeptors als auch für die Konzentrierung und für die Liganden-Bindungs-Studien.

Größe und Reinheit des Expressionsplasmides wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (Abb. 4.2). Des Weiteren wurde die Korrektheit der DNA-Sequenz durch Sequenzanalyse sichergestellt (E. Merck KGaA, Darmstadt).

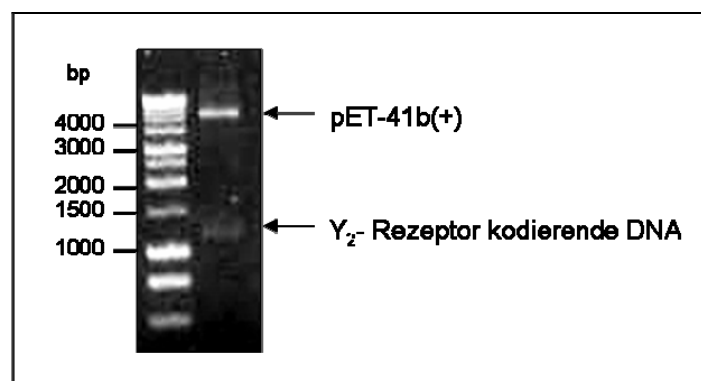


Abb. 4.2: Agarose-Gel mit Spaltprodukten des mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI verdauten Plasmids, welches für die prokaryotische Expression des Y₂-Rezeptors hergestellt wurde. Zu sehen sind der Vektor pET-41b(+) mit einer Größe von 5013 bp und das Y₂-Rezeptor kodierende DNA-Fragment mit einer Größe von 1144 bp.

4.1.2 Zellkultivierung

Als Zellkultivierung wird die Fermentation eines Expressionssystems in einem Bioreaktor bezeichnet, wobei das Zielprotein entweder intrazellulär oder extrazellulär exprimiert wird (*upstream processing*). Für diese Arbeit sollte der Y_2 -Rezeptor für NMR-Strukturuntersuchungen hergestellt werden. Diese Methode benötigt Proteinmengen im Milligramm-Bereich. Um ausreichende Mengen an homogenem Rezeptor zur Verfügung zu stellen, erfolgte die Biomasseproduktion von Y_2 -Rezeptor-Expressionsklonen mittels *fed-batch*-Fermentation. Fermentiert wurde der *E. coli*-Stamm RosettaTM(DE2)pLysS, welcher zuvor mit dem Expressionsplasmid mittels Elektroporation transformiert wurde.

Zunächst wurde eine Fermentation in Komplexmedium (vgl. Kapitel 3.1.5) bei einer Temperatur von 37°C und einer Startzelldichte von $OD_{600} = 1,1$ in 6 L *batch*-Medium durchgeführt. Nach 9 h *batch*-Phase war eine Zelldichte von $OD_{600} = 28$ erreicht und die *feed*-Phase wurde gestartet. Die *feed*-Rate wurde manuell stufenweise erhöht, um eine nahezu maximale Wachstumsrate der Zellen zu ermöglichen, ohne eine Anreicherung der C-Quelle im Fermentationsmedium zu riskieren. Dies wurde durch eine Kaskadenregelung des gelösten Sauerstoffs im Medium von konstant 30% über die Rührerdrehzahl und die zugeführte Luftmenge gewährleistet. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte nach 11 h bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 60$ durch Zugabe von 1 mM IPTG. Kurz vor Induktion wurde die *feed*-Rate auf 50% vermindert, um ein C-Quellen limitierendes Wachstum während der Expressionsphase zu erreichen. In Abb. 4.3 ist zu sehen, dass die Zelldichte nach der Induktion zunächst abnahm und nach weiteren 2h wieder anstieg. Nach 4 h Expressionszeit erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation der Zellsuspension bei 4°C. Es wurden ~900 g Zellpellet (BFM) aus 8 L Medium gewonnen.

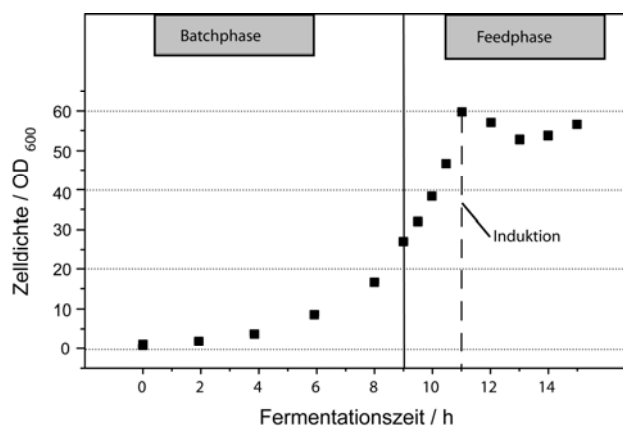


Abb. 4.3: Darstellung des Verlaufes einer *fed-batch*-Fermentation auf Komplexmedium bei 37°C. Fermentiert wurde der *E. coli*-Stamm RosettaTM(DE2)pLysS, welcher mit dem Plasmid für die heterologe prokaryotische Expression des Y_2 -Rezeptors transformiert war. Die Induktion erfolgte bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 60$ mit 1 mM IPTG.

NMR-Strukturuntersuchungen benötigen ^{15}N - und/oder ^{13}C -markierte Proteine. Diese Markierungen werden dem Fermentationsmedium in Form von markierten N- oder C-Quellen zugesetzt, von den Zellen verstoffwechselt und während der Biosynthese in die Proteine eingebaut. Dies kann nur in einem definierten Mineralsalzmedium geschehen, in dem nur eine markierte N- und/oder C-Quelle vorhanden ist.

Für diese Arbeit wurde ^{15}N -markierter Rezeptor für NMR-Untersuchungen hergestellt. In Abb. 4.4 ist ein typischer Verlauf einer *fed-batch*-Fermentation auf Mineralsalzmedium (vgl. Kapitel 3.1.5) dargestellt. Die einzige C-Quelle in diesem Medium ist Glukose. Als N-Quellen dienten markiertes NH_4Cl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Zunächst wurden die *E. coli*-Expressionsklone in mehreren Schritten von dem Komplexmedium auf das Mineralsalzmedium adaptiert, in Schüttelkolbenkulturen kultiviert und als Startbiomasse in das Fermentationsmedium gepumpt. In der Fermentation wurden 25 g/L Glukose im *batch*-Medium (5 L) vorgelegt. Diese war nach 17,5 h bei einer $\text{OD}_{600} = 15$ verbraucht und die *feed*-Phase wurde gestartet. Die *feed*-Rate wurde in diesem Fall exponentiell erhöht. Die Regelung des gelösten Sauerstoffes im Medium erfolgte analog zur Fermentation auf Komplexmedium. Erneut wurde die *feed*-Rate 30 min vor Induktion, die nach 23 h bei einer $\text{OD}_{600} = 44$ mit 1 mM IPTG erfolgte, auf ca. 20% reduziert.

Nach 3 h Expressionszeit erfolgte die Zellernte. Es wurden ~400 g Zellpellet (BFM) aus 6 L Medium gewonnen. Im Vergleich zur Fermentation auf Komplexmedium ist am auffälligsten, dass die Zelldichte nach Induktion der Proteinexpression stärker abnimmt.

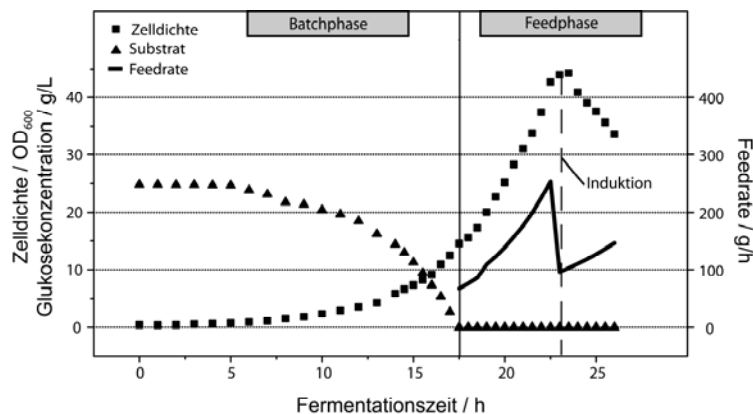


Abb. 4.4: Darstellung des Verlaufes einer *fed-batch*-Fermentation auf Mineralsalzmedium bei 37°C. Fermentiert wurde der auf dieses Medium adaptierte *E. coli*-Stamm Rosetta™(DE2)pLysS, welcher mit dem Plasmid für die heterologe prokaryotische Expression des Y_2 -Rezeptors transformiert war. Nach 17,5 h war das Substrat verbraucht, und es wurde *feed*-Medium mit einer exponentiell ansteigenden *feed*-Rate zu der Zellsuspension gepumpt. Die Induktion erfolgte bei einer Zelldichte von $\text{OD}_{600} = 44$ mit 1 mM IPTG, nachdem die *feed*-Rate auf 20% abgesenkt wurde. In dieser Fermentation wurden sowohl ^{15}N -markiertes NH_4Cl als auch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingesetzt, wodurch ^{15}N -markierter Y_2 -Rezeptor exprimiert wurde.

4.1.3 Aufarbeitung des Y₂-Rezeptors

Die Aufarbeitung, das so genannte *downstream processing*, beinhaltet die Abtrennung, die Reinigung und die Konzentrierung des Zielproteins aus dem Medium oder dem Zellpellet. Das Zielprotein dieser Arbeit, der Y₂-Rezeptor, wurde während der Fermentationen in *E. coli*-Zellen exprimiert und in IBs in aggregierter Form intrazellulär eingelagert. Die Isolierung, Solubilisierung und Reinigung dieser Aggregate erfolgte nach den in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Methoden.

In der IB-Präparation konnten die Ausbeuten durch das Detergens Triton-X-100 signifikant erhöht werden. Die Ausbeute aus den Fermentationen auf Komplexmedium (Abb. 4.3) betrug durchschnittlich 0,19 g IBs/g BFM, während die Ausbeute aus den Fermentationen auf Mineralsalzmedium (Abb. 4.4) mit 0,09 g IBs/g BFM geringer ausfiel.

Für die Solubilisierung der IBs wurde das ionische Detergens SDS mit einer Konzentration von 15 mM erfolgreich eingesetzt. Oft verwendete Chemikalien zur Solubilisierung, wie 6 M Guanidin/HCl oder 8 M Harnstoff, waren nicht in der Lage den Rezeptor aus den IBs zu lösen. Während mit Guanidin/HCl nur *E. coli*-Membranproteine (OMPs) solubilisiert und gereinigt werden konnten, konnten mit Harnstoff gar keine Proteine aus den IBs gelöst werden. An die Solubilisierung schlossen sich zwei chromatographische Reinigungsschritte an, eine Gelfiltration und eine IMAC (Abb. 4.5).

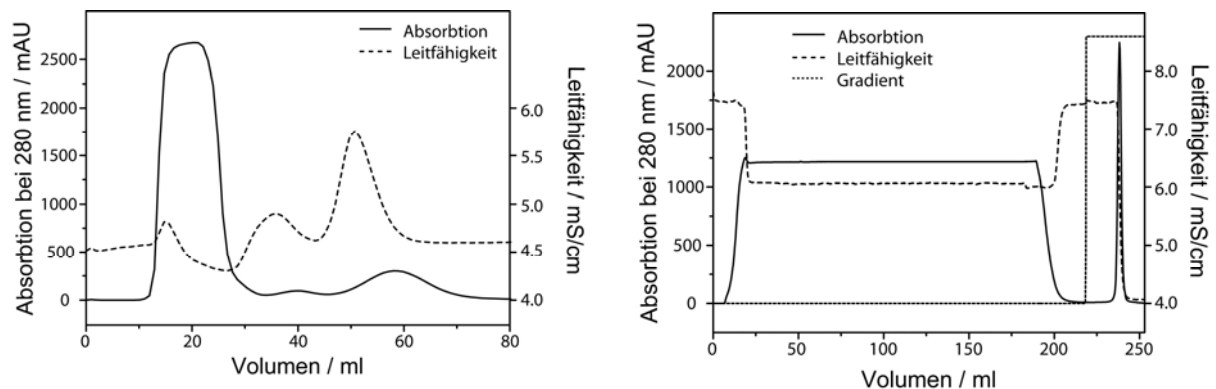


Abb. 4.5: Exemplarische Chromatogramme aus der Reinigung des Y₂-Rezeptors. Dargestellt sind die Gelfiltration (links) und die IMAC (rechts). In der Gelfiltration wurden von der Zielfraktion (Retentionsvolumen 12-27 ml) DTT und niedermolekulare Proteine abgetrennt. In der IMAC wurde der Y₂-Rezeptor an die Säulenmatrix mittels His-Tag gebunden (Retentionsvolumen 5-200 ml) und über einen pH-Shift von 8,0 auf 4,5 in hochreiner und konzentrierter Form eluiert (Retentionsvolumen 233-241 ml).

In der Solubilisierung wurden 50 mM DTT zur vollständigen Reduktion der Cysteine verwendet. Da das DTT Komplexe mit Metallionen bildet und dadurch eine Reinigung mittels IMAC verhindert, wurde es, neben niedermolekularen Proteinen, über eine Gelfiltration von der Zielfraktion abgetrennt (Abb. 4.5, links). Es wurden maximal 10 ml/Lauf aufgetragen, um

eine effektive Trennung zu gewährleisten. Die Gelfiltration wurde bei einem pH-Wert von 5,7 durchgeführt, um eine Oxidation der Cysteine zu verhindern. Für eine Reinigung mittels IMAC musste der pH-Wert erhöht werden, damit der Y₂-Rezeptor über den His-*tag* an die Säulenmatrix gebunden werden kann. Dafür wurde die gesammelte Zielfraktion 1/1 (v/v) mit dem Äquilibrierungspuffer der IMAC (vgl. Kapitel 3.1.5) verdünnt.

In Abb. 4.5, im rechten Chromatogramm, ist ein typischer Lauf einer Reinigung des Y₂-Rezeptors mittels IMAC dargestellt. Pro Lauf wurden bis zu 150 ml entsalztes Solubilisat auf die Säule aufgetragen. Die Rezeptoren wurden über ihren C-terminalen His-*tag* an die Matrix gebunden. Mit einem einstufigen Gradienten von 0 auf 100% Elutionspuffer (vgl. Kapitel 3.1.5) wurde der Y₂-Rezeptor mittels pH-Shift in hochreiner Form eluiert (Abb. 4.6). Nach der Elution wurde die Rezeptorfraktion mit dem Puffer aus der Gelfiltration auf 400 µg/ml verdünnt und bei -20°C gelagert. Die Ausbeuten nach der Reinigung aus den Fermentationen in verschiedenen Medien sind in Tab. 4.1 aufgelistet.

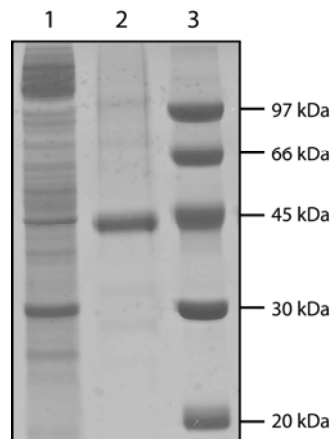


Abb. 4.6: SDS-Gel (Coomassie gefärbt) mit Proben aus der Aufarbeitung. Dargestellt sind solubilisierte IBs (Reihe 1), gereinigter Y₂-Rezeptor in SDS-Mizellen (Reihe 2) und Marker-Proteine (Reihe 3).

Tab. 4.1: Vergleich der Wachstumsraten und Proteinausbeuten aus *fed-batch*-Fermentationen in verschiedenen Medien.

	Komplexmedium	Mineralsalzmedium
Wachstumsrate [g/(g*h)]	0,45	0,23
BFM/Volumen [g/L]	112	67
Rezeptor/BFM [mg/g]	0,15	0,22
Rezeptor/IB [mg/g]	0,78	2,4
Rezeptor/Volumen [mg/L]	17	15

Zur Analyse der Identität der Elutionsfraktion wurden mehrere Milligramm Protein mittels MALDI-Massenspektroskopie untersucht (Jan Stichel, AG Prof. A. Beck-Sickinger, Universität Leipzig, durchgeführt bei AG Prof. A. Sinz, MLU Halle-Wittenberg). Dafür wurde der Rezeptor mit den Spaltenzymen Trypsin und Chymotrypsin verdaut und die erhaltenen Peptide analysiert. In Abb. 4.7 sind in grau die Abschnitte des Y_2 -Rezeptors dargestellt, die identifiziert werden konnten. Es wurde eine Sequenzabdeckung von 62,3% erreicht. Peptide von GPCRs sind dafür bekannt, dass ihre Ionisierung nicht immer möglich ist und daher GPCRs nicht komplett massenspektroskopisch identifiziert werden können (Ho et al. 2008). Der C-terminale His-tag, beide Termini und wesentliche Loopregionen konnten identifiziert werden, so dass eine vollständige Expression des Y_2 -Rezeptors als sicher anzusehen war.

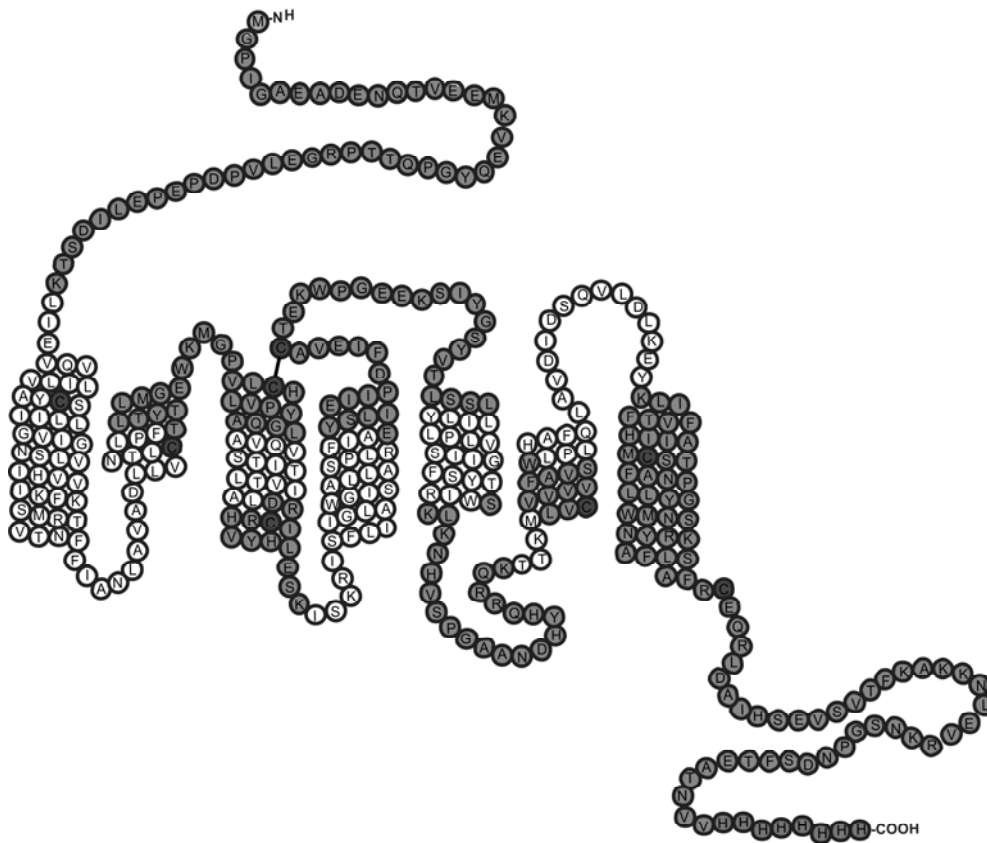


Abb. 4.7: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des Y_2 -Rezeptors in seiner postulierten Sekundärstruktur. Grau eingefärbt sind die Aminosäuren, die mittels MALDI-Massenspektroskopie identifiziert werden konnten. In dunkelgrau sind die 8 Cysteine abgebildet. Des Weiteren wurde der C-terminale 8x His-tag identifiziert. Die Einteilung der Helices und der Loops in dieser schematischen Darstellung wurde auf Grundlage eines Hydrophobizitäts-plot vorgenommen (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpex>).

4.1.4 Charakterisierung des Y_2 -Rezeptors in SDS-Mizellen

Der Y_2 -Rezeptor lag nach der Aufarbeitung in SDS-Mizellen vor. In dieser Form zeigte er eine hohe Stabilität. Er ließ sich ohne signifikante Verluste mittels AmiconTM-Zentrifugenröhrchen mit einer 10kDa-Membran auf über 200 μ M aufkonzentrieren und war außerdem unanfällig für pH-Wert-Änderungen zwischen pH 4 und pH 9. Dadurch wurden erste biophysikalische Charakterisierungen ermöglicht.

Zunächst wurde ein Radioliganden-Bindungs-Assay nach der in Kapitel 3.2.5 beschriebenen Methode durchgeführt (Abb. 4.8). Wie erwartet zeigte der Radioligand 3 H-NPY keine spezifische Bindung an den Y_2 -Rezeptor in SDS-Mizellen, da der Rezeptor in denaturierender Umgebung und ohne Disulfidverbrückung vorlag.

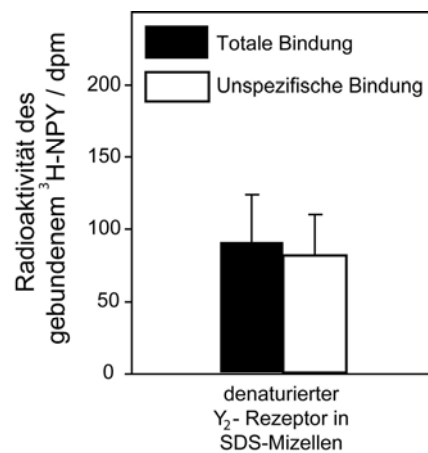


Abb. 4.8: Radioliganden-Bindungs-Assay mit Y_2 -Rezeptor in SDS-Mizellen. Dargestellt sind die totale und unspezifische Bindung des Radioliganden 3 H-NPY an den Rezeptor in SDS-Mizellen. Eine Differenz der Bindungen und somit eine spezifische Bindung ist wie erwartet nicht zu erkennen.

In Abb. 4.9 ist eine Fern-UV-CD-Messung mit dem Rezeptor in SDS-Mizellen dargestellt.

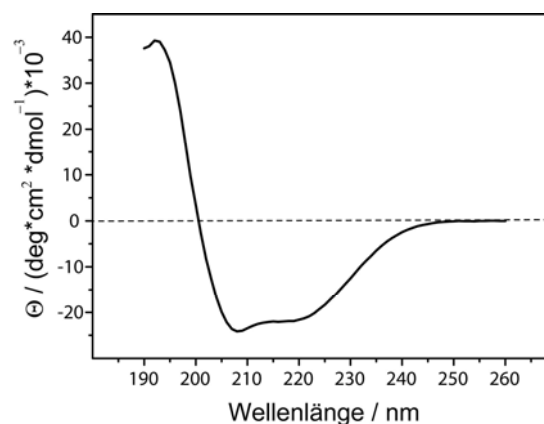


Abb. 4.9: CD-Spektrum des Y_2 -Rezeptors in SDS-Mizellen. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur in einer 0,5 mm Küvette und mit einer Rezeptorkonzentration von 0,4 mg/ml. Der Verlauf der Kurve wies Minima bei 206 und 222 nm auf, was typisch für einen hohen α -helikalen Anteil in der Sekundärstruktur des Proteins ist.

Der α -helikale Anteil des Y_2 -Rezeptors in SDS-Mizellen betrug nach diesen Messungen 40-50% (vgl. Kapitel 3.2.5). Dies ist in dem Bereich, der bereits für andere GPCRs mit CD-Messungen ermittelt wurde (McCusker, Robinson 2008; Baneres et al. 2003) und entspricht annähernd dem Wert (53 %), der für den nativen Rezeptor auf Grundlage des Hydrophobizitäts-*plot* erwartet wurde (vgl. Abb. 4.7).

Eine weitere Charakterisierung der Sekundär- und der Tertiärstruktur erfolgte in einem $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment mit ^{15}N -markiertem Y_2 -Rezeptor in SDS-Mizellen (Abb. 4.10).

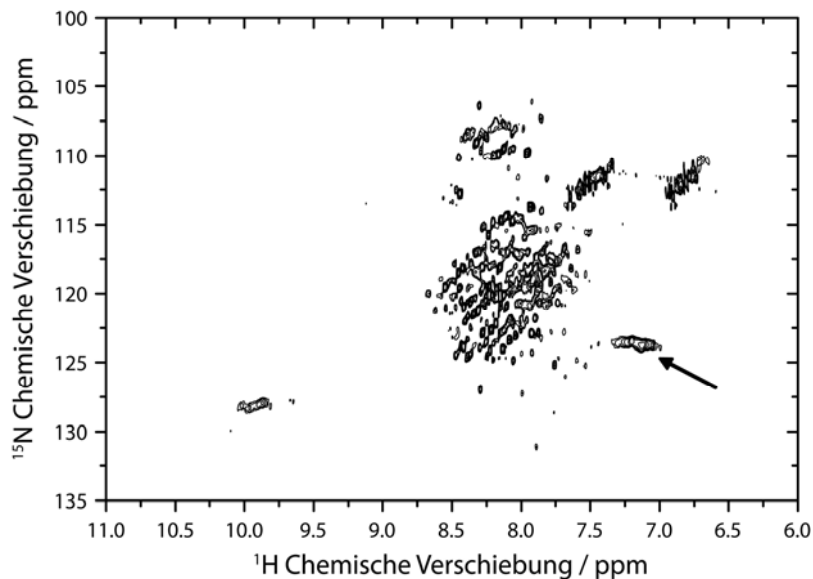


Abb. 4.10: HSQC-Spektrum von ^{15}N -markiertem Y_2 -Rezeptor in SDS-Mizellen. Die Messung erfolgte bei 293 K und einer Rezeptorkonzentration von 200 μM . Zu sehen ist eine gewisse Dispersion der Signale, sowohl in der ^1H - als auch der ^{15}N -Dimension, und zudem ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Das mit Pfeil markierte Signal wies eigentlich eine ^{15}N -Verschiebung von 84 ppm auf und wurde in den dargestellten Bereich gefaltet.

Eine relativ hohe Dispersion der Signale zwischen 6,5-8,7 ppm in der ^1H -Dimension und 108-125 ppm in der ^{15}N -Dimension war in dem HSQC-Spektrum des ^{15}N -markierten Rezeptors in SDS-Mizellen zu erkennen. Aufgrund der hohen Konzentration und einer offensichtlich hohen strukturellen Homogenität zwischen den Rezeptoren in der Probe wurde außerdem ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht.

Mit derselben Probe wurde ein weiteres $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment identischen Bedingungen, aber einer geringeren Auflösung in der indirekten Dimension durchgeführt. Dies führte zu einer Vergrößerung des Anzeigebereiches, wodurch das mit Pfeil markierte Signal in Abb. 4.10 bei seiner realen Verschiebung dargestellt werden konnte (Abb. 4.11). Dieses Signal eines Arginins wurde für die Referenzierung mit MAS-NMR-Spektren von rekonstituiertem Rezeptor genutzt. Aufgrund der Vergleichbarkeit erfolgten alle weiteren HSQC-Messungen

mit derselben Auflösung von 0,37 ppm in der indirekten Dimension wie die Messung in Abb. 4.10.

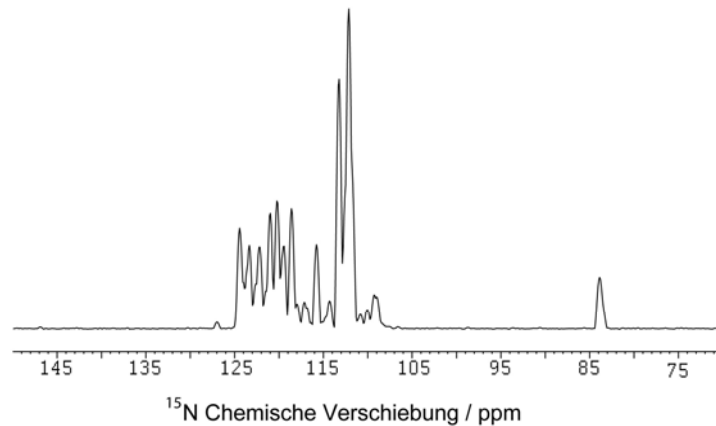


Abb. 4.11: Eindimensionale Projektion der Signale von ^{15}N -markiertem Y_2 -Rezeptor in SDS-Mizellen aus einem HSQC-Spektrum auf die ^{15}N -Achse. Zu sehen ist das Signal eines Arginins in seiner realen Verschiebung bei 84 ppm in der indirekten Dimension.

Aufgrund des HSQC- und des CD-Spektrums, die beide starke Indizien dafür lieferten, dass die α -Helices im Rezeptor bereits in SDS-Mizellen vollständig ausgebildet waren, wurde ein weiteres Lösungs-NMR Experiment durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob die Helices bereits in einer räumlichen Nähe zueinander vorlagen. Dafür wurde ein HSQC-Spektrum des Y_2 -Rezeptors in SDS-Mizellen mit nahezu identischen Parametern wie zuvor aufgenommen. Anschließend wurde 1 mM des Lanthanids DyCl_3 zu der Probe titriert und erneut ein Spektrum aufgenommen (Abb. 4.12).

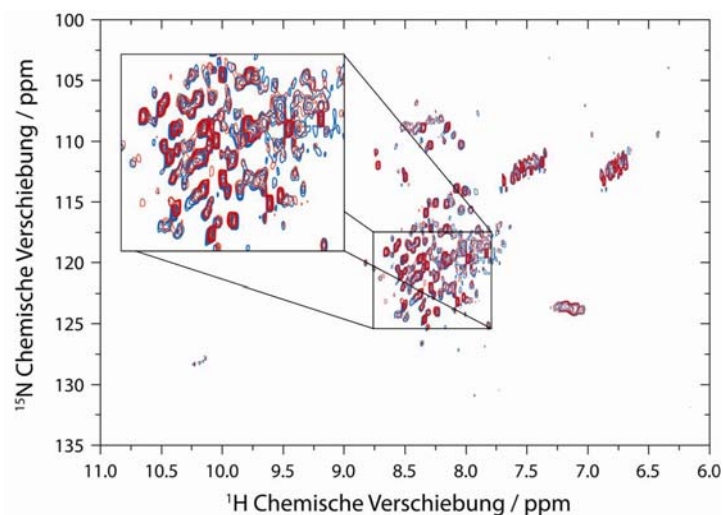


Abb. 4.12: HSQC-Spektren vom Y_2 -Rezeptor in SDS-Mizellen mit DyCl_3 (rot) und ohne DyCl_3 (blau). Zu sehen ist, dass einige Signale der beiden Spektren exakt überlagern, während andere Signale verschoben sind. Dies deutete auf eine räumliche Nähe von α -Helices des Rezeptors zueinander hin.

Paramagnetisches DyCl_3 hat die Eigenschaft NMR-Signale von Aminosäuren zu verschieben, wenn sie Kontakt zur wässrigen Umgebung haben (Gröbner et al. 1999). In den beiden Spektren waren Signale zu sehen, die sich sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von DyCl_3 exakt überlagerten. Andere Signale hingegen wurden durch Zugabe von DyCl_3 verschoben. Dies könnte bedeuten, dass einige Aminosäuren keinen Kontakt mit der wässrigen Umgebung hatten, also innerhalb des Rezeptors oder der Mizelle lagen, was wiederum bedeutete, dass der Rezeptor bereits in SDS-Mizellen eine partiell ausgeprägte Tertiärstruktur besaß.

Ein weiteres HSQC-Experiment untersuchte den Einfluss der Disulfidverbrückung auf die Struktur des Rezeptors. Dafür wurde gereinigter ^{15}N -markierter Rezeptor ($\sim 10 \mu\text{M}$) in SDS-Mizellen auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Anschließend wurden 5 mM GSSG, 1 mM GSH und 1 mM EDTA zu der Rezeptorprobe gegeben. Diese wurde dann unter leichtem Rühren für 72 h inkubiert. Schließlich wurde der pH-Wert wieder auf 5,7 erniedrigt und der Rezeptor mittels AmiconTM-Zentrifugenröhrchen auf $\sim 200 \mu\text{M}$ aufkonzentriert. Von dieser Probe wurde ein HSQC-Spektrum unter den gleichen Bedingungen wie oben aufgenommen und mit dem Spektrum aus Abb. 4.9 überlagert (Abb. 4.13). Zu sehen sind teilweise starke Verschiebungen der Signale. Offenbar übte die Disulfidverbrückung eine strukturelle Restriktion auf den Rezeptor aus.

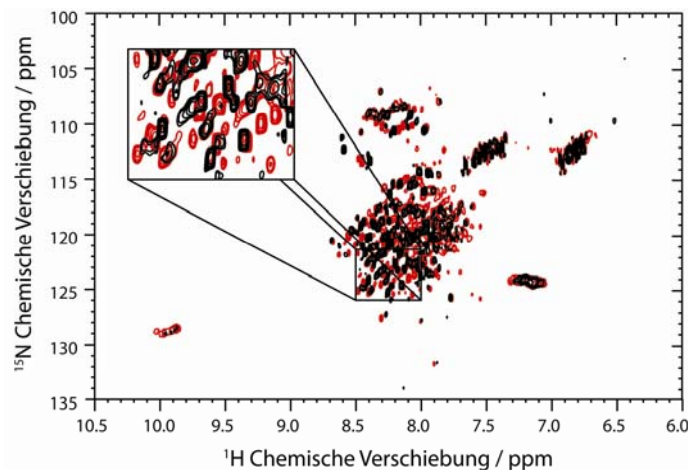


Abb. 4.13: HSQC-Spektren vom Y_2 -Rezeptor in SDS-Mizellen mit Disulfidverbrückung (rot) und ohne Disulfidverbrückung (schwarz). Zu sehen sind teilweise starke Verschiebungen der Signale, was auf einen starken Einfluss der Disulfidverbrückung auf die Tertiärstruktur des Rezeptors hindeutet.

Ähnliche Versuche wurden mit der Zugabe eines *brain-lipid*-Extraktes oder der Zugabe von verschiedenen Verhältnissen der Detergenzien DDM und CHAPS zum Rezeptor in SDS-Mizellen durchgeführt. Es sollte getestet werden, ob geringe Lipidanteile oder mildere Detergenzien in den SDS-Mizellen einen Einfluss auf die Struktur des Rezeptors haben. In keinem dieser Versuche konnte eine Veränderung in den HSQC-Spektren festgestellt werden.

4.2 *In vitro* Faltung des Y₂-Rezeptors

Der kritischste Punkt dieser Arbeit war die *in vitro*-Faltung des Y₂-Rezeptors in seine aktive Tertiärstruktur. Als Methode der Wahl wurde die Pulsrenaturierung verwendet (vgl. Kapitel 2.3.3). Dabei wurde der Rezeptor in denaturierenden SDS-Mizellen durch schnelle Verdünnung in ein Puffersystem mit nicht-denaturierenden Detergenzien in drei Pulsen im Abstand von mindestens 6 h langsam und bei starkem Rühren titriert. Ein Detergensgemisch aus dem nicht-ionischen DDM und dem zwitterionischen CHAPS stellte hierfür die Basis. Das SDS wurde durch Cyclodextrin komplexiert und mittels IMAC abgetrennt (Abb. 4.14).

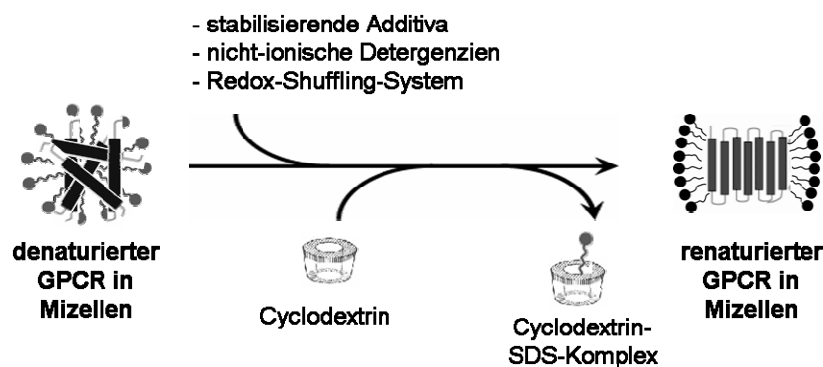


Abb. 4.14: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten *in vitro*-Faltung des Rezeptors. Das denaturierende Detergens SDS wird von Cyclodextrin komplexiert und durch nicht-denaturierende Detergenzien ersetzt. Ein *redox-shuffling*-System ermöglicht eine Disulfidverbrückung und stabilisierende Additive unterdrücken die ungewollte Aggregation des Rezeptors.

Konstante Größen im Faltungspuffer waren 50 mM Natriumphosphat als Puffer, 20 mM Cyclodextrin zur Komplexierung des SDS, 1 mM EDTA zur Unterdrückung der Oxidation des Proteins mittels Luftsauerstoff und ein *redox-shuffling*-System aus 5 mM GSSG und 1 mM GSH, welches eine korrekte Disulfidverbrückung der Cysteine ermöglichte.

Eine Reihe von weiteren Faltungsparametern wurde in dieser Arbeit untersucht und hinsichtlich Liganden-Bindung, Proteinausbeute und Proteinkonzentration nach der Faltung optimiert. Hierzu gehörten ein stabilisierendes Additiv, welches die Aggregation des Rezeptors unterdrücken sollte, der pH-Wert während der Faltung, Temperatur, Inkubationszeit, Detergenzkonzentration und Proteinkonzentration in der Faltung.

Die Faltungsansätze wurden nach der Inkubation erneut mittels IMAC gereinigt. Dies diente zum einen zur Abtrennung des Cyclodextrin/SDS-Komplexes und von Aggregaten, zum anderen zur Konzentrierung des Rezeptors nach der Faltung. Ein exemplarischer Chromatographielauf ist in Abb. 4.15 dargestellt.

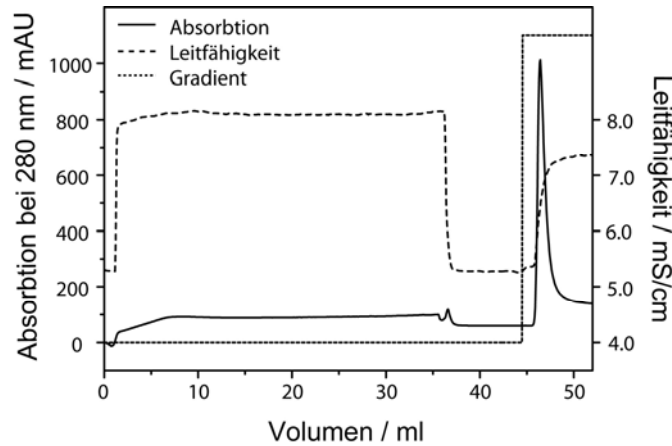


Abb. 4.15: Exemplarisches Chromatogramm einer Reinigung des renaturiertem Rezeptors nach der Faltung mittels IMAC. Jeweils 30 ml Faltungsansatz wurden mit einer Flussrate von 0,4 ml/min auf eine HisPrep™ 1 ml Chromatographiesäule aufgetragen. Die Elutionpuffer enthielten zusätzlich 300 mM Imidazol. Dieser Chromatographieschritt diente zur Abtrennung des SDS/Cyclodextrin-Komplexes und von Aggregaten, und zur Konzentrierung des Rezeptors.

Die Äquilibration der Säule erfolgte mit 5 cv des jeweiligen Faltungspuffers ohne EDTA und Cyclodextrin, aber mit 20 mM Imidazol. Aufgetragen wurden maximal 30 ml Faltungsansatz auf eine HisPrep™ 1 ml Chromatographiesäule. Größere Faltungsansätze wurden in mehreren Läufen gereinigt, wobei zwischen den Läufen die Säulen neu mit Nickelionen beladen wurden. Der Einsatz von größeren Säulen führte zu niedrigeren Proteinausbeuten und Proteinkonzentrationen. Die Elution erfolgte mit 300 mM Imidazol in einem Ein-Schritt-Gradienten von 0 auf 100% Elutionspuffer.

Der Erfolg der Faltungen wurde mittels Radioliganden-Bindungs-Assay bewertet. Dieser in Kapitel 3.2.5 beschriebene Assay wurde aus Bindungs-Studien für Rezeptoren in Tierzellen übernommen und für die hier verwendeten Rezeptoren in Mizellen und Liposomen adaptiert. Ausschlaggebend für eine positive Bewertung einer Faltungsoptimierung ist die Differenz der Radioaktivität von gebundenen Liganden zwischen totaler Bindung und unspezifischer Bindung. Dieser Wert wurde qualitativ als direkte Korrelation zu der Anzahl der korrekt gefalteten Rezeptoren bewertet, zumindest was die Liganden-Bindung betraf. In einigen Fällen ist dieser Wert als spezifisch gebundener Radioligand angegeben (Glg. 2.6.). Diese Angabe der Bindung wurde verwendet, wenn aufgrund unterschiedlicher Faltungspuffer die unspezifischen Bindungen der Liganden an die Rezeptoren zu verschieden waren, um sie eindeutig miteinander vergleichen zu können.

4.2.1 Stabilisierende Additive in der Faltung

Der erste Schritt war die Ermittlung eines stabilisierenden Additivs für die Faltung, welches möglichst große Mengen des Membranproteins während des Detergenzienaustausches in Lösung hielt. Da die Aggregation des Rezeptors während der Faltung ein Problem darstellte (vgl. Kapitel 2.3), war ein geeignetes stabilisierendes Additiv entscheidend für den Erfolg der Renaturierung. Eine Auswahl der in dieser Arbeit getesteten Additive ist in Abb. 4.16 dargestellt.

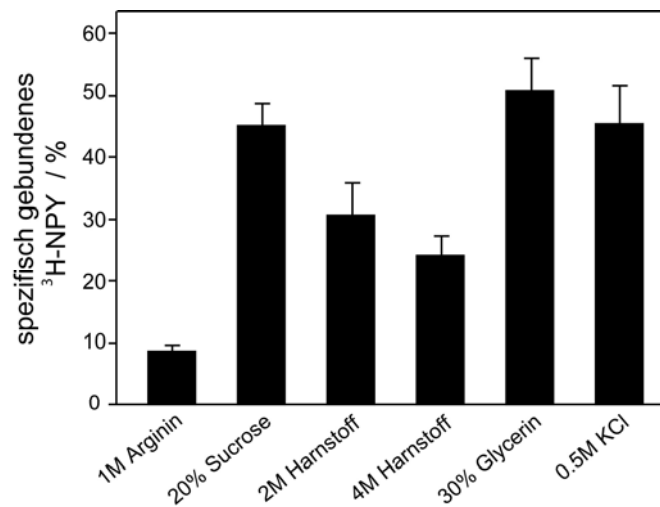


Abb. 4.16: Radioliganden-Bindungs-Assay von Faltungsansätzen mit verschiedenen Additiven. Dargestellt ist die spezifische Bindung von $^3\text{H-NPY}$ an Rezeptoren aus der Faltung *in vitro*. Während das Salz KCl, das Kohlenhydrat Sucrose und das Alkanol Glycerin die Faltung des Rezeptors unterstützen, zeigen das Kohlensäurederivat Harnstoff nur geringe und die Aminosäure Arginin keine positiven Effekte.

Neben den oben genannten konstanten Größen in der Faltung waren die weiteren Parameter bei diesen Versuchen: 0,1% DDM; 0,1% CHAPS; pH 8,5; Raumtemperatur; 64 h Inkubationszeit; 40 $\mu\text{g/ml}$ Rezeptor; kein *redox-shuffling*-System in den Chromatographiepuffern.

Die Rezeptoren aus dem Faltungsansatz mit 1 M Arginin zeigten nahezu keine spezifische Bindung. Mit verschiedenen Konzentrationen von Harnstoff als Additiv konnten nur spezifische Bindungen von 24-31% nachgewiesen werden. Höhere spezifische Bindungen wurden in den Faltungsansätzen mit 20% Sucrose (45%), 30% Glycerin (51%) und 0,5 M KCl (46%) erreicht. Da Sucrose und Glycerin sehr ähnliche biochemische Eigenschaften aufweisen, wurden in den folgenden Faltungsansätzen zur Parameteroptimierung nur 30% Glycerin und 0,5 M KCl als Additive weiterverfolgt.

4.2.2 Optimierung weiterer Faltungsparameter

Weitere Parameter in der Faltung, wie der pH-Wert, die Inkubationszeit und die Inkubationstemperatur, wurden in Gegenwart von 0,5 M KCl und von 30% Glycerol untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.17 dargestellt. Alle Faltungsansätze wurden, abgesehen von den hier variierten Parametern, unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 4.2.1 durchgeführt.

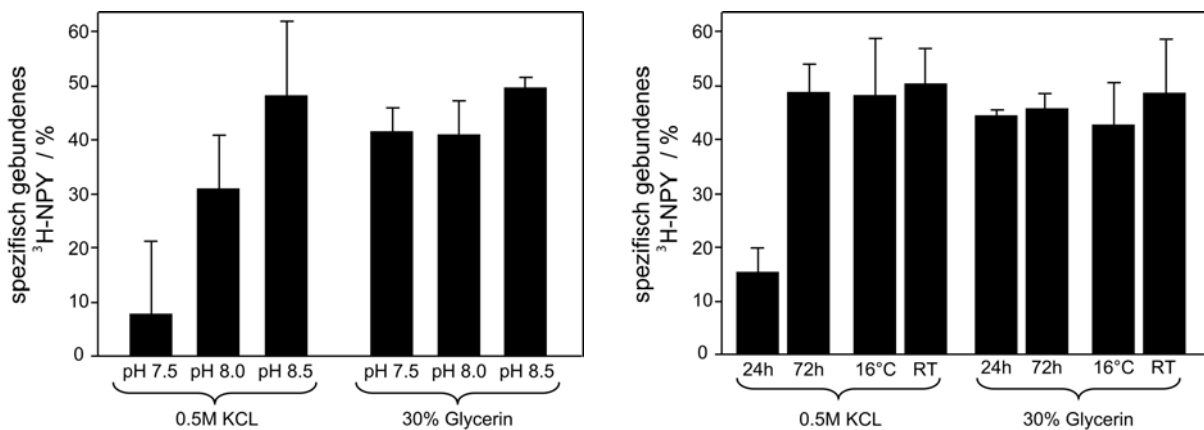


Abb. 4.17: Radioliganden-Bindungs-Assay von Faltungsansätzen mit verschiedenen Faltungsparametern. Dargestellt ist die spezifische Bindung von ³H-NPY an Rezeptoren aus Faltungen mit unterschiedlichen pH-Werten, Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen in Gegenwart von 0,5 M KCl und 30% Glycerin. Während die Parameter in Gegenwart von Glycerin, mit konstanten Bindungswerten von 43-52% kaum einen Einfluss auf die Faltung zeigten, führten niedrige pH-Werte und kürzere Inkubationszeiten in Gegenwart von KCl zu geringen spezifischen Bindungswerten.

Ein pH-Wert von 8,5 in der Faltung zeigte sowohl für 0,5 M KCl als auch 30% Glycerin das beste Ergebnis. Niedrigere pH-Werte wirkten sich in Gegenwart von KCl stark negativ auf die Faltung der Rezeptoren aus, während in Gegenwart von Glycerin nur ein schwacher Effekt zu beobachten war. Ein pH-Wert von 7,0 oder niedriger führte in allen Fällen zu starker Aggregation in den Faltungsansätzen.

Auch auf die Inkubationszeit nach dem letzten Puls reagierten die Rezeptoren in Gegenwart von KCl empfindlicher als in Gegenwart von Glycerin. Mit KCl als Additiv benötigten die Rezeptoren 3 Tage zur Strukturbildung, während mit Glycerin die Erhöhung der Inkubationszeit von 1 auf 3 Tage nur einen sehr geringen positiven Effekt hatte.

Raumtemperatur als Inkubationstemperatur ist in beiden Fällen besser als 16°C. Temperaturen unter 16°C waren für die Faltung ungeeignet, da SDS unterhalb dieser Temperatur ausfällt. Auch Temperaturen über der Raumtemperatur wurden nicht getestet, da dann eine proteolytische Spaltung zum Problem hätte werden können.

Im Ergebnis aus diesen Untersuchungen wurde 30% Glycerin als Faltungsadditiv besser bewertet als 0,5 M KCl. In Gegenwart von Glycerin konnten bei allen Parametern konstante Bindungswerte zwischen 43-51% ermittelt werden. In Gegenwart von KCl hingegen führten niedrige pH-Werte und kürzere Inkubationszeiten zu geringen spezifischen Bindungswerten. Außerdem waren die Fehler beim Radioliganden-Bindungsassay mit KCl tendenziell höher. Die Faltungsreaktion des Rezeptors in Gegenwart von Glycerin erschien robuster.

Weiterhin wurde der optimale Glycerinanteil im Faltungspuffer untersucht. Von diesen Versuchen wurden keine Radioliganden-Bindungsassays durchgeführt, sondern die Proteinausbeute in der IMAC nach der Faltung wurde als Maß für die Stabilität gewertet. Die Daten wiesen auf eine direkte Proportionalität von Stabilität und Glycerinanteil hin. Allerdings konnten Faltungsansätze mit einem Glycerinanteil von >30% nicht mehr chromatographisch gereinigt werden, da die hohe Viskosität zu starken Druckproblemen auf der Chromatographiesäule führte.

Zusammenfassend wurden folgende Parameter für alle weiteren Faltungsansätze konstant gehalten: 30% Glycerin; 50 mM Natriumphosphat pH 8,5; 20 mM Cyclodextrin; 1 mM EDTA; 5 mM GSSG; 1 mM GSH; Raumtemperatur; 48-72 h Inkubationszeit.

4.2.3 Stabilisierung des Y₂-Rezeptors in DDM/CHAPS Mizellen

Mit den bisher verwendeten Faltungs- und Konzentrierungsstrategien waren die Stabilität, die Ausbeuten und die Konzentration des Y₂-Rezeptors unzureichend für eine detaillierte Charakterisierung der Funktionalität oder der Struktur des Rezeptors. Die maximal erreichbare Konzentration lag bei nur ~1,6 µM mit Proteinausbeuten von unter 20% und der Rezeptor wies unter den jetzigen Bedingungen eine extrem geringe Langzeitstabilität auf, die abhängig von der Konzentration zwischen wenigen Stunden und einigen Tagen lag. Für eine effektive Strukturanalyse mittels Lösungs-NMR sind Konzentrationen von >100 µM erforderlich.

Es wurden eine Vielzahl von Experimenten durchgeführt, die eine Erhöhung Rezeptorendkonzentration zum Ziel hatten. So wurde verschiedene Proteinkonzentrationen in der Faltung getestet, allerdings führten Konzentrationen von über 40 µg/ml zu starker Aggregatbildung während der Faltung, zu extrem niedrigen Proteinausbeuten und nicht zur Erhöhung der Endkonzentration.

Das Auftragen von größeren Volumen der Faltungsansätze auf die HisprepTM 1 ml Chromatographiesäule nach der Faltung, um somit größere Rezeptormengen an die Säulenmatrix zu binden scheiterte daran, dass bei einem Auftragsvolumen von über 30 ml zu viele Ni-Ionen durch das EDTA aus dem Faltungspuffer von der Säule gewaschen wurden und somit die verminderte Bindungskapazität der Säule zu niedrigeren Proteinkonzentrationen und –ausbeuten führte.

Eine Aufkonzentrierung des Rezeptors nach Faltung und Reinigung mittels AmiconTM-Zentrifugenröhrchen führte zu sichtbarer Aggregatbildung auf der Filtermembran und damit zu schlechten Proteinausbeuten, da sich an der Membran zu hohe lokale Konzentrationen bildeten. Für eine Verdoppelung der Rezeptorkonzentration musste ein Rezeptorverlust von über 80% hingenommen werden. Ähnlich erfolglos blieb eine Aufkonzentrierung mittels Dialyse. Der Dialysepuffer enthielt neben den gleichen Bestandteilen wie der Puffer in dem sich der Rezeptor befand 20% (w/v) PEG 20,000. Nach einigen Stunden konnte Aggregatbildung beobachtet werden. Das Volumen der Rezeptorprobe verringerte sich, ohne dass die Konzentration zunahm.

Der Zusammenhang zwischen Rezeptorkonzentration und Aggregat- bzw. Oligomerbildung konnte mit Fluoreszenzmessungen gezeigt werden (Abb. 4.18). Verschiedene Konzentrationen von Y₂-Rezeptoren wurden bei 290 nm Wellenlänge angeregt und die Emission der Tryptophane bei 340 nm Wellenlänge über 6000 s aufgenommen.

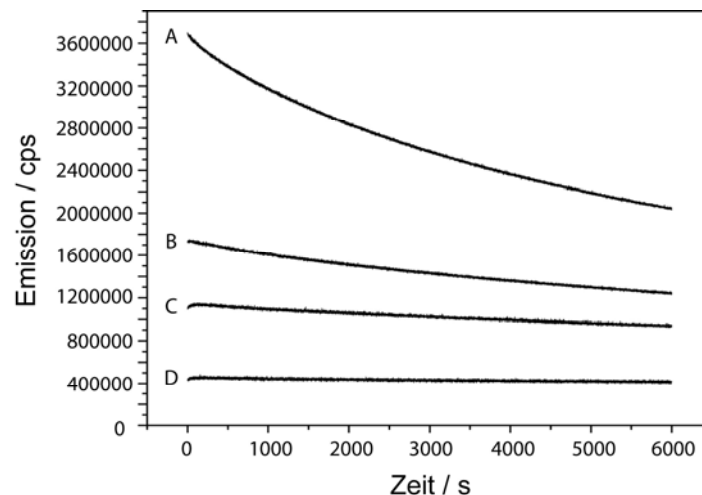


Abb. 4.18: Abnahme der intrinsischen Fluoreszenz der Tryptophane des Y₂-Rezeptors bei verschiedenen Rezeptorkonzentrationen. Aufgenommen wurden die Emissionen der Tryptophane bei 340 nm und einer Anregungswellenlänge von 290 nm über einen Zeitraum von 6000 s, bei einer Temperatur von konstant 20°C. Zu sehen ist, dass die Fluoreszenz abhängig von der Proteinkonzentration über die Zeit unterschiedlich stark abnimmt. Bei einer Konzentration von 1600 nM (A) verliert der Rezeptor 46% seiner Tryptophanfluoreszenz über 6000 s, bei 750 nM (B) 29%, bei 500 nM (C) 14% und bei 200 nM (D) nur noch 5%.

Eine Erhöhung der Rezeptorkonzentration konnte demnach nur über eine Optimierung des mizellbildenden Detergensystems erfolgen. Dazu wurden mehrere Faltungen mit variierenden Konzentrationen der nicht-denaturierenden Detergenzien DDM und CHAPS durchgeführt. Zusätzlich wurde ein weiterer Faltungsansatz mit erhöhten Detergenkonzentrationen angesetzt, bei dem sowohl der Äquilibrierungs- als auch der Elutionspuffer in der IMAC nach der Faltung 0,5 mM GSH und 2,5 mM GSSG enthielten. Die Faltungsansätze hatten ein Volumen von 30 ml und eine Rezeptorkonzentration von 40 µg/ml (~0,9 µM). Die Chromatographiepuffer enthielten die gleichen Detergenkonzentrationen wie die jeweiligen Faltungsansätze. Von den Elutionsfraktionen nach der IMAC wurden die Proteinkonzentration und die Proteinausbeuten bestimmt (Abb. 4.19). Die Ausbeute bezieht sich auf das Verhältnis des in die Faltung eingesetzten Rezeptors in SDS-Mizellen und der Menge an eluiertem Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen. Dabei konnte nicht unterschieden werden, ob die Proteinverluste in der Faltung oder der chromatographischen Konzentrierung auftraten.

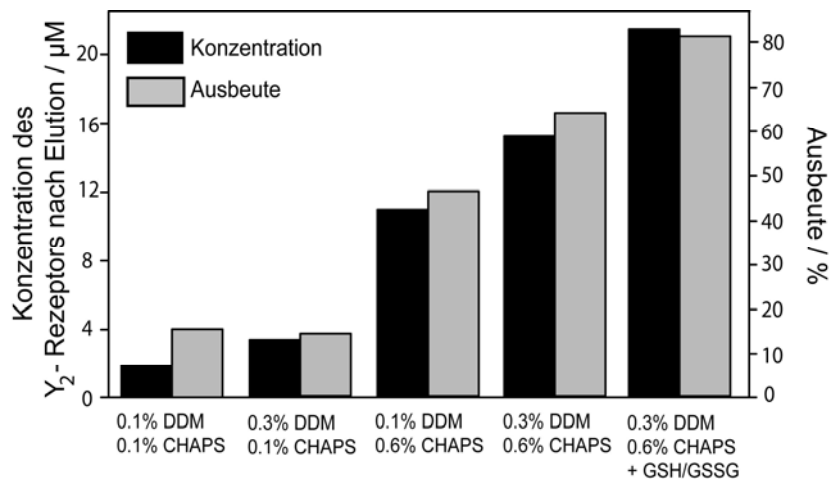


Abb. 4.19: Konzentrationen und Ausbeuten von Faltungsansätzen mit verschiedenen Detergenkonzentrationen nach der IMAC. Zu sehen ist, dass sich eine Erhöhung der Detergenkonzentrationen, insbesondere der von CHAPS, positiv sowohl auf die Proteinkonzentration als auch auf die Proteinausbeute auswirkt. Zudem bringt der Einsatz des *redox-shuffling*-Systems aus GSH/GSSG in den Chromatographiepuffern einen zusätzlichen Effekt.

Unter den bisher verwendeten Faltungsbedingungen wurde eine Rezeptorkonzentration von 1,6 µM bei einer Ausbeute von 16% erreicht. Durch die Erhöhung der DDM-Konzentration von 0,1% auf 0,3% konnte die Proteinkonzentration auf 3,7 µM mehr als verdoppelt werden, allerdings bei gleich bleibend schlechter Ausbeute. Deutlich positiv wirkte sich die Erhöhung der CHAPS-Konzentration von 0,1% auf 0,6% aus. Dadurch wurde eine Rezeptorkonzentration von 11 µM bei einer Ausbeute von 43% erreicht. Die Erhöhung beider

Detergengkonzentrationen führte zu einer Proteinkonzentration von 15 μM und einer Ausbeute von 65%.

Einen zweiten positiven Effekt in dieser Versuchsreihe hatte die Verwendung des *redox-shuffling*-Systems in den Chromatographiepuffern. Dadurch konnten sowohl die Rezeptorkonzentration auf 22 μM als auch die Rezeptorausbeute auf 81% nochmals gesteigert werden.

Von einigen dieser gereinigten Faltungsansätze wurden Radioliganden-Bindungsassays durchgeführt und diese mit der Bindung des Radioliganden an den Y_2 -Rezeptor in SDS-Mizellen verglichen (Abb. 4.20). Die Rezeptorkonzentrationen wurden für diese Messungen auf $\sim 1\mu\text{M}$ eingestellt.

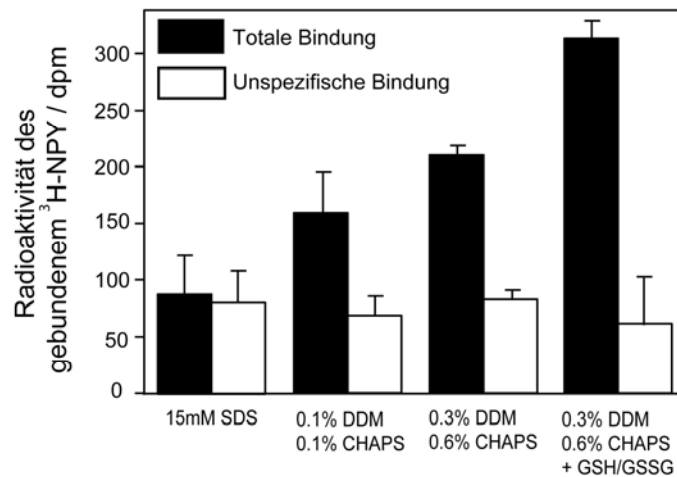


Abb. 4.20: Radioliganden-Bindungs-Assay von Faltungsansätzen mit verschiedenen Detergengkonzentrationen. Dargestellt sind totale und unspezifische Bindungen des Radioliganden $^3\text{H-NPY}$ an den Y_2 -Rezeptor vor der Faltung in 15 mM SDS, in der keine spezifische Bindung messbar war, und nach verschiedenen Faltungen. In der Faltung mit niedrigen Detergengkonzentrationen von 0,1% DDM und 0,1% CHAPS konnte eine spezifische Bindung von $\sim 50\%$ gezeigt werden. Diese wurde durch die Erhöhung der Detergengkonzentrationen auf $\sim 60\%$ verbessert. Eine entscheidende Verbesserung auf $\sim 80\%$ spezifische Bindung erzielte die Zugabe von GSH und GSSG in die Chromatographiepuffer der IMAC.

Mit diesen Radioliganden-Bindungs-Assays konnte, analog zu den Konzentrationen und Ausbeuten eine Verbesserung der Bindung von $^3\text{H-NPY}$ an den Y_2 -Rezeptor gezeigt werden. Durch die Erhöhung der Detergengkonzentrationen von DDM auf 0,3% und CHAPS auf 0,6% wurde die spezifische Bindung von $\sim 50\%$ auf $\sim 60\%$ gesteigert. Die entscheidende Verbesserung auf $\sim 80\%$ spezifische Bindung wurde durch die Zugabe von 0,5 mM GSH und GSSG 2,5 mM in die Chromatographiepuffer der IMAC erreicht. Diese Verbesserungen in der Rezeptorkonzentration, der Faltungsausbeute und der spezifischen Bindung waren offensichtlich auf eine Erhöhung des nativen Anteils und somit eine höhere Stabilität des Y_2 -Rezeptors zurückzuführen.

Eine weitere Erhöhung der DDM-Konzentration in allen Puffern auf 0,6% führte zu keiner Verbesserung der Konzentration, der Ausbeute oder der spezifischen Bindung des Rezeptors. Die Erhöhung der CHAPS-Konzentration auf 0,9% führte zwar zu einer Erhöhung der Rezeptorendkonzentration auf maximal 54 μM bei leicht geringerer Ausbeute. Allerdings zeigten diese Proben im Radioliganden-Bindungsassay eine spezifische Bindung von nur 30% und Konzentrationen von 1,1% CHAPS zeigten sowohl schlechtere Ausbeuten als auch Rezeptorendkonzentrationen als die Faltungsansätze mit 0,6% CHAPS.

Daraufhin wurde die Proteinkonzentration in der Faltung als wichtiger Parameter für hohe Rezeptorendkonzentrationen erneut untersucht. In eine Reihe von Faltungsansätzen mit einem Volumen von 30 ml wurden unterschiedliche Konzentrationen des Y_2 -Rezeptors in SDS-Mizellen in die Faltungspuffer titriert. Die Aufkonzentrierung dieser Faltungsansätze erfolgte mittels IMAC mit und ohne *redox-shuffling*-System aus 2,5 mM GSSG und 0,5 mM GSH in den Chromatographiepuffern. Verglichen wurden die Rezeptorkonzentrationen (Abb. 4.21, links) und die Ausbeuten nach der Elution (Abb. 4.21, rechts). Folgende Faltungsparameter waren konstant: 30% Glycerin; 0,3% DDM; 0,6% CHAPS; 50 mM Natriumphosphat pH 8,5; 20 mM Cyclodextrin; 1 mM EDTA; 5 mM GSSG; 1 mM GSH; Raumtemperatur; 60 h Inkubationszeit.

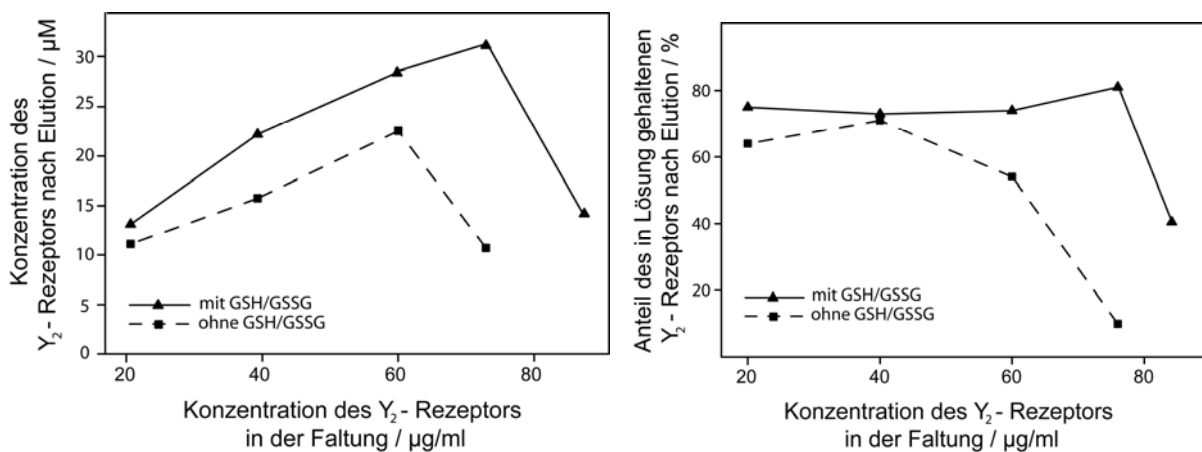


Abb. 4.21: Konzentrationen (links) und Ausbeuten (rechts) nach der IMAC von Faltungsansätzen mit verschiedenen Rezeptorkonzentrationen in der Faltung mit GSH/GSSG (▲) und ohne GSH/GSSG (■) in den Chromatographiepuffern der IMAC. Zu sehen ist, dass ohne GSH/GSSG die Rezeptorendkonzentration proportional mit der Rezeptorstartkonzentration zunahm, bis zu einem Maximum von 23 μM bei 60 $\mu\text{g/ml}$. Die Ausbeuten betragen zwischen 55 und 70%. Bei höheren Konzentrationen in der Faltung sanken die Endkonzentrationen und die Ausbeuten drastisch. Mit GSH/GSSG in den Chromatographiepuffern verhielten sich die Ergebnisse ähnlich, aber mit konstant höheren Endkonzentrationen und Ausbeuten zwischen 70 und 80%. Allerdings verschob sich das Maximum auf 32 μM bei einer Rezeptorkonzentration in der Faltung von 75 $\mu\text{g/ml}$.

Erneut bestätigten diese Messungen den stabilisierenden Effekt des *redox-shuffling*-Systems für den Y_2 -Rezeptor nach der Faltung. Während für die Faltung ohne GSH/GSSG nach der Faltung die Rezeptorkonzentration mit den besten Ergebnissen bei 60 $\mu\text{g/ml}$ lag, verschob sie sich mit GSH/GSSG auf 75 $\mu\text{g/ml}$. Die maximal erreichbare Rezeptorendkonzentration war dadurch mit 32 μM bedeutend höher, im Vergleich zu 23 μM , die ohne *redox-shuffling*-System maximal erreicht wurden. Auch die Ausbeuten waren mit GSH/GSSG konstant höher.

4.2.4 Charakterisierung des Y_2 -Rezeptors in DDM/CHAPS Mizellen

Zunächst wurde die Liganden-Bindung von NPY an den Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen charakterisiert. Dazu wurde ein 90 ml Faltungsansatz (30% Glycerin; 0,3% DDM; 0,6% CHAPS; 50 mM Natriumphosphat pH 8,5; 20 mM Cyclodextrin; 1 mM EDTA; 5 mM GSSG; 1 mM GSH) mit einer Y_2 -Rezeptorkonzentration von 60 $\mu\text{g/ml}$ über einen Zeitraum von 60 h bei Raumtemperatur und leichtem Rühren inkubiert. Die anschließende Reinigung und Konzentrierung erfolgte in drei Läufen mittels IMAC über eine HisPrepTM 1 ml chromatographisch. Die Chromatographiepuffer enthielten ein *redox-shuffling*-System aus 2,5 mM GSSG und 0,5 mM GSH. Nach der Elution wurde die Probe mit Äquilibrationpuffer auf $\sim 1 \mu\text{M}$ verdünnt und 1 mM EDTA hinzu gegeben.

In einem Verdrängungs-Assay wurde die Probe mit konstanten Mengen (1 nM) an ^3H -NPY und unterschiedlichen Konzentrationen an unmarkiertem NPY inkubiert (Kapitel 3.2.5). Die Radioaktivität des gebundenen ^3H -NPY wurde gemessen und über die Konzentration an unmarkiertem NPY aufgetragen (Abb. 4.22). Die Messung erfolgte 18 h nach der Probenpräparation. In diesem Experiment konkurrierten ^3H -markierter und unmarkierter NPY um die Bindung an den Y_2 -Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen. Durch ansteigende Konzentration des unmarkierten Liganden konnte der markierte Ligand vom Rezeptor verdrängt werden. Ein IC_{50} -Wert von $(8,5 \pm 2) \text{ nM}$ konnte durch eine Modellanpassung an die Datenpunkte ermittelt werden (vgl. Kapitel 2.5.1, Glg. 2.6). Die maximale gemessene Radioaktivität (totale Bindung) betrug $(482 \pm 21) \text{ dpm}$ und die minimale Radioaktivität $(81 \pm 17) \text{ dpm}$. Daraus resultierte eine spezifische Bindung von $(83 \pm 4)\%$, welche mit den vorhergehenden Ergebnissen übereinstimmte.

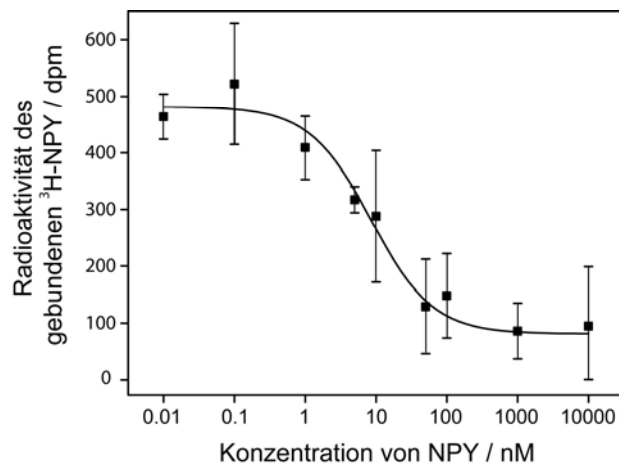


Abb. 4.22: Verdrängungs-Assay für die Bindung von NPY an dem Y₂-Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen. In diesem Experiment wurde ³H markierter NPY von nicht markiertem NPY verdrängt. Ein IC₅₀-Wert von (8,5 ± 2) nM bei einer spezifischen Bindung von (83 ± 4)% konnte durch Modellanpassung an die Datenpunkte ermittelt werden (vgl. Kapitel 2.5.1, Glg. 2.6).

Für ein Sättigungs-Experiment zur Ermittlung des K_D-Wertes erfolgten Präparationen mehrerer Y₂-Rezeptorproben analog zum vorherigen Experiment. Gemessen wurden sowohl die totale Bindung als auch die unspezifische Bindung an den Rezeptor. Die daraus resultierende spezifische Bindung wurde über ansteigende Konzentrationen an ³H-markiertem NPY aufgetragen (Abb. 4.23). Da dieses Experiment aufgrund hoher Konzentrationen des ³H-NPY sehr kostenintensiv war, erfolgten drei Messungen mit je nur sechs Datenpunkten für verschiedene Konzentrationsbereiche des ³H-NPY. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden über die unspezifische Bindung normalisiert und in einer Graphik aufgetragen. Je zwei Datenpunkte mit jeweils Dreifachbestimmungen wurden zusammengefasst.

Variierende Konzentrationen von ³H-markierten NPY wurden mit konstanten Konzentrationen des rekombinanten Rezeptors (~1 μM) inkubiert. Ein K_D-Wert von (1,9 ± 1,1) nM und eine Konzentration der nativen Rezeptoren von (2,3 ± 0,4) nM konnte durch eine Modellanpassung an die Datenpunkte ermittelt werden (vgl. Kapitel 2.5.1, Glg. 2.11 und 2.12).

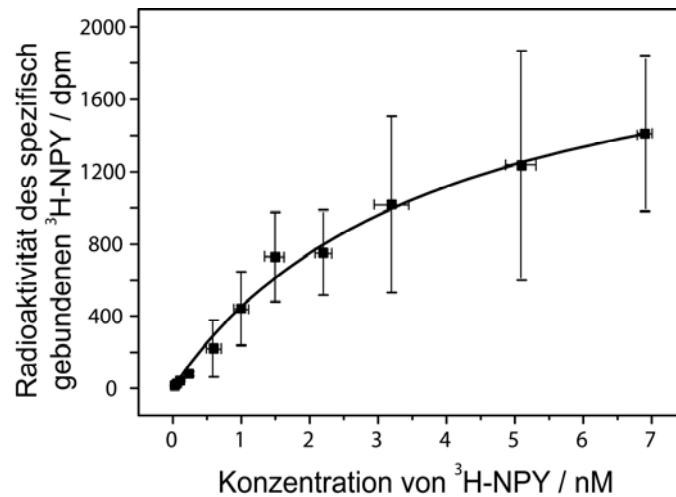


Abb. 4.23: Sättigungs-Experiment der Bindung von NPY an den Y_2 -Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen. Variierende Konzentrationen von ^3H -markiertem NPY wurden mit konstanten Konzentrationen des rekombinanten Rezeptors ($\sim 1 \mu\text{M}$) inkubiert. (vgl. Kapitel 2.5.1, Glg. 2.11 und 2.12)

Als nächstes sollte ein HSQC-Spektrum mit ^{15}N -markiertem Y_2 -Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen analog zur Messung mit dem Rezeptor in SDS-Mizellen (Abb. 4.9, Kapitel 4.1.4) durchgeführt werden. Dafür musste der pH-Wert des Rezeptors auf <6 erniedrigt werden, um den Protonenaustausch zwischen den Aminosäuren des Proteins und dem D_2O in dem Puffer zu vermeiden. Ein Versuch, den Rezeptor nach der Faltung von der IMAC mit einem Elutionspuffer mit pH 4,5 zu eluieren, führte zu einer starken Aggregatbildung auf der Säule. Es konnte kein Rezeptor eluiert werden. Auch in einer Dialyse des Rezeptors in DDM/CHAPS-Mizellen gegen den Äquilibriumspuffer der IMAC mit 50 mM NaP pH 4,5 statt pH 8,0 bildeten sich nach wenigen Stunden sichtbare Aggregate. Die Konzentration des Rezeptors in Lösung nach der Dialyse betrug $<1 \mu\text{M}$.

Ein Absenken des pH-Wertes durch direkte Titration mit verschiedenen Konzentrationen an Salzsäure führte zur sofortigen starken Aggregation des Rezeptors. Erst durch eine direkte Titration von 20 μl Essigsäure auf 1 ml Rezeptorprobe konnte ein pH-Wert von 5,5 erreicht werden. Trotzdem war nach wenigen Stunden eine Aggregation beobachtbar.

Mit der hier zuletzt genannten Methode, durch Titration mit Essigsäure, wurde der pH-Wert der Rezeptorprobe kurz vor der NMR-Messung erniedrigt. Die Faltung des ^{15}N -markierten Rezeptors erfolgte für diesen Versuch in Gegenwart von 0,9% CHAPS. Dadurch wurde, wie im vorhergehenden Kapitel erläutert, eine Rezeptorkonzentration von $\sim 50 \mu\text{M}$ erreicht. Aufgrund eines schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses in einem $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum konnten nur fünf Signale des Rezeptors in DDM/CHAPS-Mizellen eindeutig isoliert werden (Abb. 4.24).

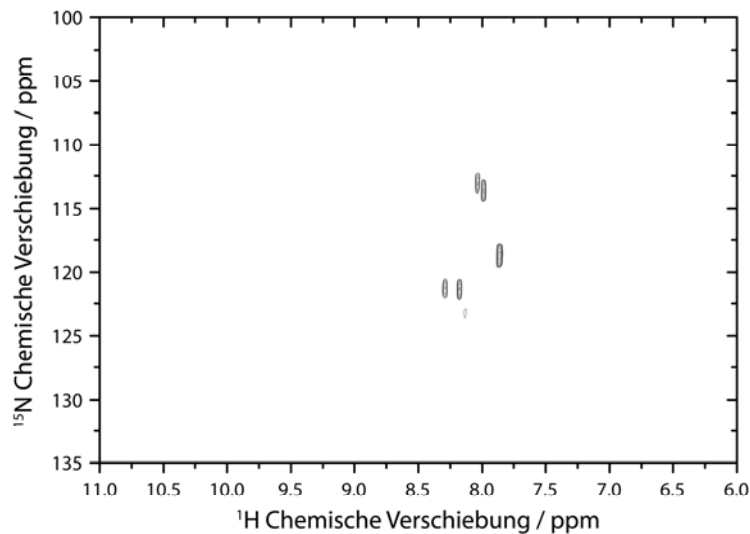


Abb. 4.24: HSQC-Spektrum von ¹⁵N-markiertem Y₂-Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen. Die Rezeptorkonzentration betrug ~50 μM vor der pH-Wert Erniedrigung auf 5,5. Aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses konnten nur fünf Signale in einem Bereich detektiert werden, der für das Proteinrückgrat typisch ist. Die Messung erfolgte bei 293 K an einem 700 MHz Spektrometer mit Kryo-Probenkopf.

4.3 Rekonstitution des Y₂-Rezeptors

Die geringe Stabilität des Y₂-Rezeptors in DDM/CHAPS-Mizellen war das dominierende Problem für die Charakterisierung des Rezeptors. Durch die Optimierung der Faltungsbedingungen, beschrieben in Kapitel 4.2.3, konnte die Langzeitstabilität der Rezeptoren in Konzentrationen von >2 μM von Stunden auf Tage erhöht werden, sodass die Bestimmung von Parametern wie IC₅₀-Wert und K_D-Wert (Kapitel 4.2.4) des Rezeptors in mizellärer Form möglich wurden. Allerdings konnte über die Zeit immer weniger NPY spezifisch an die Rezeptorpräparationen gebunden werden. Während 20 h nach der Faltung eine signifikante spezifische Bindung messbar war, konnte nach knapp drei Tagen fast keine spezifische Bindung mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.25). Ein Zeitraum von 20 h war bei größeren Rezeptormengen minimal für die Umpufferung, die Konzentrierung und die Durchführung des Radioliganden-Bindungassays erforderlich.

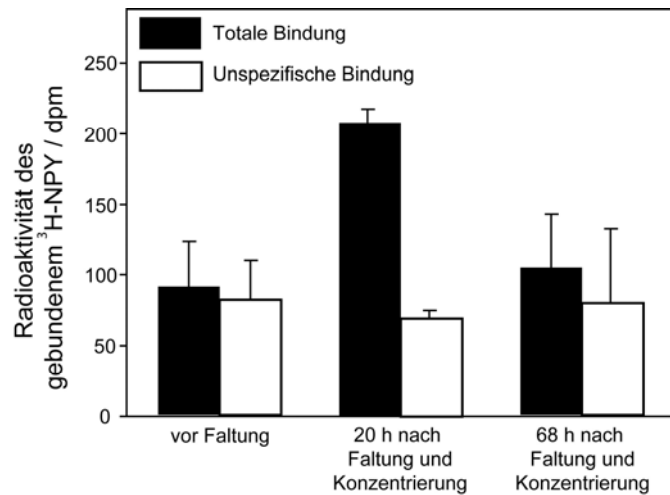


Abb. 4.25: Radioliganden-Bindungsassay von Rezeptorproben zu verschiedenen Zeitpunkten der Präparation. Dargestellt ist die Bindung von ^3H -NPY an Rezeptoren vor der Faltung und an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Faltung. Durch die Faltung *in vitro* wurde der Y_2 -Rezeptor in seine native Struktur renaturiert. Allerdings war diese Struktur nicht stabil, sodass nach 68 h kaum mehr spezifische Bindung messbar war.

Daher wurde der Y_2 -Rezeptor aus den instabilen DDM/CHAPS-Mizellen in eine stabilere Lipidumgebung überführt, die so genannte Rekonstitution. Ziele der Rekonstitution in dieser Arbeit waren den Rezeptor länger in seiner nativen Struktur in Lösung zu halten, hohe Proteinkonzentrationen in der Lipidumgebung zu erreichen und dies bei möglichst geringen Proteinverlusten zu realisieren.

4.3.1 Methoden der Rekonstitution

Einschichtige Liposomen mit einer Größe von ~ 100 nm (LUV) wurden aus mehrschichtigen MLVs nach der in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Methode hergestellt. Die Liposomen bestanden aus 95% DMPC und 5% Cholesterol.

Verschiedene Methoden für die Rekonstitution wurden in dieser Arbeit getestet (vgl. Kapitel 2.4.2). In einer Variante wurden die Liposomen mit dem Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen 2 h inkubiert und anschließend erfolgte eine Entfernung der Detergenzien aus der Probe mittels Dialyse über 3 Tage. Dieses Verfahren führte zu einer starken Aggregatbildung in der Probe. Rezeptoren in Lösung konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

In einer zweiten Variante wurden die Liposomen zunächst mit dem Detergens n-OG destabilisiert, ohne die Liposomen zu solubilisieren. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen für 2 h. Zur Entfernung der Detergenzien wurde die Probe über 20 h dialysiert. In Proben aus diesem Verfahren konnte ein Rezeptor/Lipid-

Verhältnis von $\sim 1/3000$ nachgewiesen werden. Außerdem wurde mittels Radioliaganden-Bindungsassay eine spezifische Bindung von NPY an diese Rezeptoren von 55% gemessen. Allerdings zeigten $^1\text{H-NMR}$ -Messungen dass sich noch erhebliche Mengen an DDM in der Probe befanden (Hirsch 2007). So kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich größere Mengen an Rezeptoren noch in Mizellen befanden, zumal eine Entfernung des Glycerins destabilisierend wirkte. Nach längeren Dialysezeiten wurde keine spezifische Bindung mehr gemessen.

Daraufhin wurden die Liposomen erneut mit dem Detergens n-OG destabilisiert und mit dem Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen für 2 h inkubiert. Diesmal erfolgte die Zerstörung der Mizellen durch eine 1/100 Verdünnung der Probe mit 50 mM Natriumphosphat pH 8,0; 1 mM EDTA; 2,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH, wodurch die Konzentration der Detergenzien unter ihre CMC erniedrigt wurde. Anschließend wurde die Probe mittels AmiconTM-Zentrifugenröhrchen mit einer 50 kDa Membran auf das Ursprungsvolumen aufkonzentriert. In Proben aus diesem Verfahren konnte ein Rezeptor/Lipid-Verhältnis von $\sim 1/8000$ nachgewiesen werden. Mittels Radioliaganden-Bindungsassay wurde jedoch keine spezifische Bindung gemessen.

In einem weiteren Versuch wurden die Liposomen mit CHAPS in einem 1/8 (M/M) Lipid/CHAPS-Verhältnis vollständig solubilisiert und mit dem Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen für 2 h inkubiert. Erneut erfolgte die Verdünnung der Detergenzien durch eine 1/100 Verdünnung der Probe mit 50 mM Natriumphosphat pH 8,0; 1 mM EDTA; 2,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH. Dadurch sollten die Mizellen zerstört und die Liposomen erneut gebildet werden. In Proben aus diesem Verfahren konnte ein Rezeptor/Lipid-Verhältnis von $\sim 1/5000$ nachgewiesen werden. Die spezifische NPY-Bindung betrug 35%.

Die besten Ergebnisse erzielte eine Rekonstitutionsmethode (Abb. 4.26), bei der die Liposomen zunächst mit CHAPS in einem 1/8 (M/M) Lipid/CHAPS-Verhältnis vollständig zu Mischmizellen solubilisiert wurden. Diese wurden wiederum mit dem Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen für 2 h inkubiert. Eine Entfernung der Detergenzien erfolgte diesmal durch die Zugabe von 200 mg/ml Bio-beads SM2 in die Probe (Rigaud et al. 1997). Nach einer Inkubation über Nacht bei leichtem Rühren wurden die *beads* über ein Sieb mit 0,5 mm Porenweite entfernt. Anschließend erfolgte eine Dialyse zur vollständigen Entfernung von Glycerin.

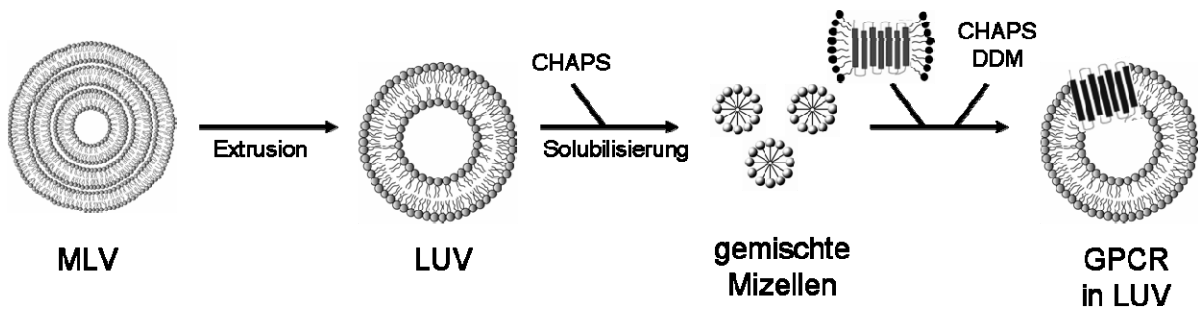


Abb. 4.26: Schematische Darstellung der Rekonstitution des Y_2 -Rezeptors aus Mizellen in Liposomen. Mehrschichtige MLVs werden zu einschichtigen LUVs verkleinert und anschließend mittels CHAPS zu Mischmizellen vollständig solubilisiert. Nach Inkubation mit dem Y_2 -Rezeptor in Mizellen werden die Detergenzien mittels Bio-beads entfernt. Daraufhin bilden sich die Liposomen mit integriertem Rezeptor neu aus.

Bei dieser Rekonstitution wurde ein Rezeptor/Lipid-Verhältnis von $\sim 1/200$ bestimmt. Die spezifische Bindung betrug knapp 50% und der Proteinverlust war $<20\%$. In Abb. 4.27 sind Lichtstreuungsmessungen von Lipidvesikeln zur Größenbestimmung der Liposomen in den verschiedenen Stadien dieser Rekonstitutionsmethode dargestellt.

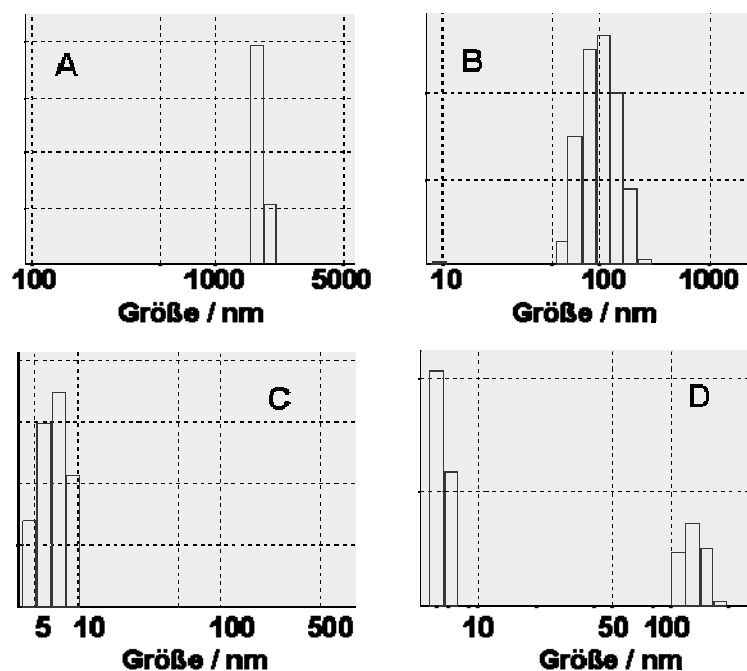


Abb. 4.27: Lichtstreuungsmessungen zur Größenverteilung von Liposomen in unterschiedlichen Stadien der Rekonstitution. Die Messungen erfolgten mit einer Lipidkonzentration von 3 mg/ml bei 37°C . MLVs (A) haben eine Größe ca. $2\ \mu\text{M}$. Diese werden durch Extrusion zu LUVs (B) mit einer Größe von 100 nm verkleinert. Durch die Zugabe von CHAPS entstehen 5-10 nm große Mischmizellen (C). Eine Entfernung der Detergenzien mit Bio-beads führt zur erneuten Bildung von leicht vergrößerten LUVs (D). In Bild D sind noch restliche Mizellen zu sehen. Daraufhin wurde die Inkubationszeit mit den Bio-beads verlängert.

4.3.2 Charakterisierung des Y_2 -Rezeptors in Liposomen

Dem Ziel dieser Arbeit, native, stabile und hochkonzentrierte Y_2 -Rezeptoren für NMR-Analysen herzustellen, folgend, wurden von dem rekonstituiertem Rezeptor Radioliganden-Bindungsassays durchgeführt. Mit diesen Messungen konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren hinsichtlich der Liganden-Bindung nicht nur aktiv in die Liposomen eingebaut wurden, sondern auch ihre native Struktur über mindestens 12 Tage nahezu vollständig beibehalten haben (Abb. 4.28). Die Messungen erfolgten in allen Punkten analog zu den Radioliganden-Bindungsassays von Rezeptoren in Mizellen mit einer Konzentration von $\sim 0,25 \mu\text{M}$.

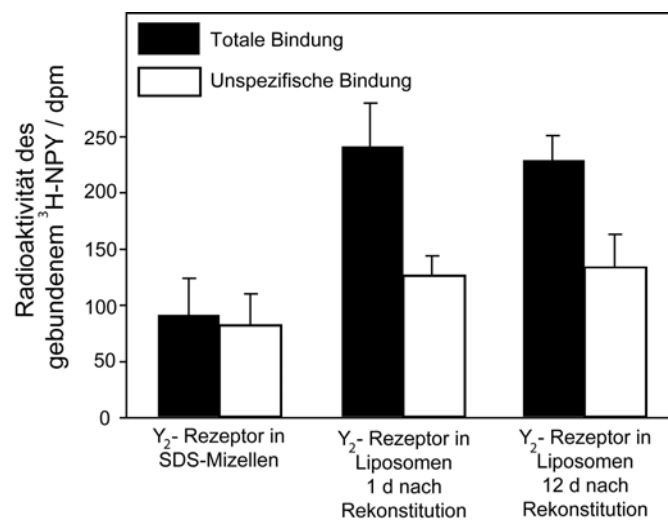


Abb. 4.28: Radioliganden-Bindungsassay von rekonstituierten Rezeptorproben im Vergleich zum Y_2 -Rezeptor in SDS-Mizellen. Dargestellt ist die Bindung von $^3\text{H-NPY}$ an Rezeptoren vor der Faltung und nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Rekonstitution. NPY bindet spezifisch an den rekonstituierten Rezeptor. Die Langzeitstabilität des Rezeptors von mindestens 12 Tage wurde durch die Rekonstitution in DMPC-LUVs drastisch erhöht.

Eine erste MAS-NMR-Messung mit dem Y_2 -Rezeptor in Liposomen wurde mit ^{15}N -markiertem Protein durchgeführt. Dafür wurde zunächst hochreiner, in SDS-Mizellen solubilisierter Rezeptor mit den in Kapitel 4.2.4 verwendeten Bedingungen *in vitro* gefaltet und mit einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ von der Säule eluiert. Anschließend erfolgte eine Rekonstitution des Rezeptors mit der in Abb. 4.26 dargestellten Methode in LUVs aus 95% DMPC und 5% Cholesterol. Nachdem das Glycerin mittels Dialyse entfernt wurde, erfolgte eine Aufkonzentrierung des Dialysates, indem frischer Dialysepuffer (50 mM Natriumphosphat pH 7, 1 mM EDTA, 2,5 mM GSSG; 0,5 mM GSH) mit 30% (w/v) PEG 20.000 zugesetzt wurde. Dieser Ansatz inkubierte, bis die Rezeptorprobe eine pastenähnliche Konsistenz aufwies. Die Abnahme des Volumens betrug $\sim 1 \text{ ml/h}$. Eine zusätzliche Stabilisierung des Rezeptors in der Dialyse erfolgte durch Zugabe von 1/1 (M/M) NPY.

Mit dieser Probe (^{15}N -markierter Y_2 -Rezeptor in DMPC-Liposomen) wurde mittels MAS-NMR ein $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -CP-Spektrum aufgenommen (Abb. 4.29). Das molare Rezeptor/Lipid-Verhältnis betrug $\sim 1/200$. Gemessen wurde bei 274 K und einer MAS-Frequenz von 5000 Hz.

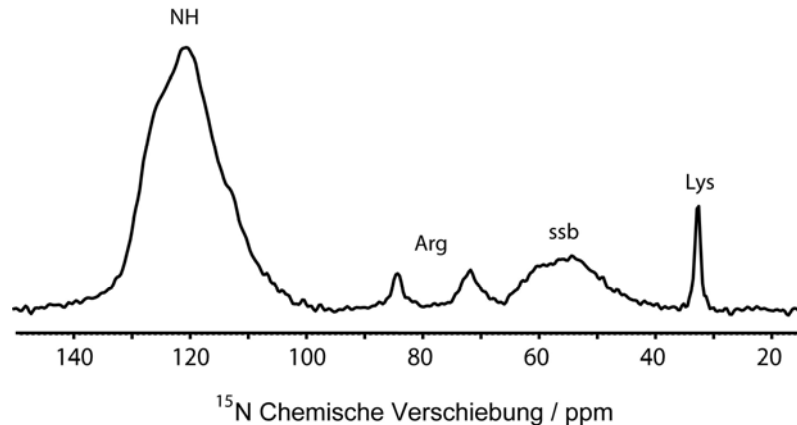


Abb. 4.29: MAS-NMR-CP-Spektrum von ^{15}N -markiertem Y_2 -Rezeptor in DMPC-Liposomen. Die Messung erfolgte bei 274K und einem Rezeptor/Lipid-Verhältnis von $\sim 1/200$ (M/M). Zugeordnet werden konnten Arginine, Lysine, die NH-Signale und Seitenbanden der NH-Signale (ssb) (www.bmrb.wisc.edu).

Da die ^{15}N -Signale in der Festkörper-NMR generell sehr breit sind, ist es natürlich nicht möglich einzelne Signale für eine Zuordnung zu isolieren. Allerdings war die Dispersion der NH-Signale dieser Messung mit ~ 30 ppm größer als die Dispersion der ^{15}N -Signale vom Y_2 -Rezeptor in SDS-Mizellen mit ~ 17 ppm (vgl. Abb. 4.10). Dies deutete auf eine stärkere Ausbildung der Tertiärstruktur und eine höhere strukturelle Homogenität zwischen den Rezeptoren in der Lipidmembran hin.

Eine Erfolg versprechende strukturelle Aufklärung des Gesamtrezeptors kann nur über eine ^{13}C -Markierung der Aminosäuren erfolgen. Dafür wurde ein erstes vorbereitendes Experiment durchgeführt. Eine Präparation von unmarkiertem Y_2 -Rezeptor in Liposomen erfolgte wie zuvor beschrieben. Als Lipid wurde diesmal reines deuteriertes DMPC- d_{67} verwendet. Auf Cholesterol wurde verzichtet, da es kommerziell nicht vollständig deuteriert erhältlich ist. Außerdem wurde nach Entfernung des Glycerins mittels Dialyse die Rezeptorprobe nicht mit PEG aufkonzentriert, sondern die Liposomen mit eingebautem Y_2 -Rezeptor wurden mit Ultrazentrifugation bei 96000 g über 3 h pelletiert. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht lyophilisiert. Anschließend wurden auf die Probe 150% (v/w) H_2O gegeben und in 20 Gefrier-Tau Zyklen (Kapitel 3.2.4) homogenisiert. Zusätzlich wurde eine zweite Probe aus Liposomen ohne Rezeptor auf die gleiche Weise präpariert.

Diese Proben wurden mittels MAS-NMR vermessen (Abb. 4.30). Im Gegensatz zu Abb. 4.29 wurden diesmal die ^{13}C -Kerne direkt angeregt. Das molare Rezeptor/Lipid-Verhältnis betrug ebenfalls $\sim 1/200$. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 274 K und einer MAS-Frequenz von 7000 Hz. Bereits mit unmarkiertem Rezeptor wurde ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht. CO-, $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Signale der Aminosäuren des Y_2 -Rezeptors ließen sich klar abgrenzen. Zudem deuteten die schmalen Linien der Signale auf eine hohe strukturelle Homogenität zwischen den Rezeptormolekülen der Probe hin.

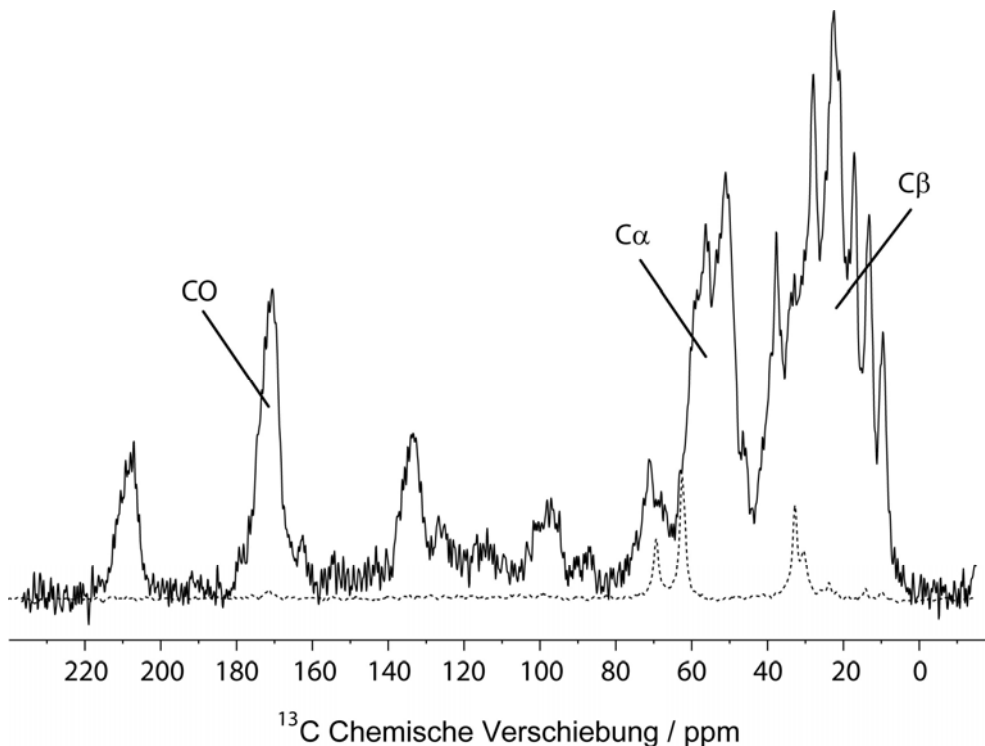


Abb. 4.30: MAS-NMR-Spektrum der ^{13}C -Kerne von unmarkiertem Y_2 -Rezeptor in $\text{DMPC-}d_{67}$ -Liposomen. Die Messung erfolgte bei 274K und einem Rezeptor/Lipid-Verhältnis von $\sim 1/200$ (M/M). Zum Vergleich wurden $\text{DMPC-}d_{67}$ -Liposomen ohne Rezeptor gemessen (gestrichelte Linie). Zu sehen sind eine Reihe isolierter Signale von den CO's, $\text{C}\alpha$'s und $\text{C}\beta$'s der Aminosäuren des Rezeptors.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Klasse A-GPCR Y_2 -Rezeptor für NMR-Strukturanalysen hergestellt. Dafür wurde zunächst ausgehend von der DNA eine Expressions- und Reinigungsstrategie entwickelt, in der eine Ausbeute von 15 mg ^{15}N -markiertem Y_2 -Rezeptor pro Liter Kulturmedium mit einer Reinheit von $>95\%$ erreicht wurde.

Für HSQC- und MAS-NMR-Methoden wurden Protokolle zur Probenpräparation des Y_2 -Rezeptors in verschiedenen Umgebungen erarbeitet und hinsichtlich ihrer Funktionalität und Stabilität in Konzentrationen, die für NMR-Messungen nötig sind, untersucht (Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Auflistung der in dieser Arbeit entwickelten Strategien zur Probenpräparation des Y_2 -Rezeptors in verschiedene Umgebungen und deren Eignung für NMR-Strukturanalysen.

Rezeptorumgebung	Funktionalität	Stabilität	NMR-Methode
SDS-Mizellen	nein	ja	HSQC
DDM/CHAPS-Mizellen	ja	nein	HSQC
DMPC-Liposomen	ja	ja	MAS

Die aus der Expression gewonnenen Rezeptoraggregate wurden zunächst in SDS-Mizellen solubilisiert. In diesen ionischen Mizellen konnte der Rezeptor ohne signifikante Verluste auf 200 μM aufkonzentriert werden und war über Wochen stabil, so dass mit diesen Proben HSQC-NMR-Messungen erfolgten. Allerdings war der Y_2 -Rezeptor in dieser Umgebung nicht funktional.

Daraufhin wurde der Rezeptor aus den SDS-Mizellen mittels Pulsrenaturierung in DDM/CHAPS-Mizellen mit einer Ausbeute von $>80\%$ überführt. In diesen nicht-denaturierenden Mizellen konnte mittels Radioliganden-Bindungsassay eine spezifische Bindung des natürlichen Liganden des Y_2 -Rezeptors NPY mit einem K_D -Wert von $(1,9 \pm 1,1)$ nM gezeigt werden. Die maximal erreichte Konzentration betrug 32 μM . Allerdings war der Y_2 -Rezeptor in dieser Umgebung sehr instabil, anfällig für Aggregation bei pH-Wert-Änderungen und zudem inhomogen.

Durch eine Rekonstitution des Rezeptors aus den DDM/CHAPS-Mizellen in DMPC-Liposomen wurde die Stabilität signifikant erhöht. Nach 12 Tagen war noch eine spezifische Bindung von NPY an den Y_2 -Rezeptor messbar. Das molare Rezeptor/Lipid-Verhältnis betrug 1/200 und war somit für MAS-NMR-Messungen geeignet.

5.1 Rekombinante Herstellung des Y₂-Rezeptors

5.1.1 Bewertung des Expressionssystems

NMR-Methoden benötigen relativ große Mengen an markiertem Zielprotein, doch die Expressionsraten von GPCRs sind im Vergleich zu denen von löslichen Proteinen in allen Zellsystemen sehr gering (vgl. Kapitel 2.2). Dies liegt vor allem darin begründet, dass durch hohe Expressionsraten des heterologen Membranproteins die Konzentration der Rezeptoren in der Zellmembran ansteigt, was zur funktionellen Einschränkung und zur Destabilisierung der Membran bis hin zur Lyse der Wirtszellen führt (Wagner et al. 2008). Allerdings ist der Prozess dieser toxischen Wirkung von hohen GPCR-Konzentrationen in der Zellmembran noch nicht vollständig aufgeklärt.

Eine intrazelluläre Expression von GPCRs in *E. coli* ist neben der zellfreien Expression die einzige Methode in der die Rezeptoren nicht in die Zellmembran eingebaut werden. Zusammen mit den weiteren Vorteilen von *E. coli*, den hohen Wachstumsraten, der einfachen Möglichkeit der genetischen Manipulation und die effektive Markierung des Zielproteins, ist dieses System am besten für die Herstellung von großen Mengen an markierten GPCRs geeignet. Zudem sind aufgrund einfacher Medienzusammensetzungen und hohen Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) die Kosten dieser Methode um ein Vielfaches geringer als bei allen anderen Expressionssystemen (Tab. 5.2).

Tab. 5.2: Vergleich der Proteinausbeuten von verschiedenen Expressionssystemen aus der Literatur und dieser Arbeit.

Expressionssystem	GPCR	Ausbeute absolut	RZA [$\mu\text{g}/(\text{l} \cdot \text{h})$]	Referenz
Tierzellen <i>HEK293</i>	hPTHR ₁	0.04 mg/l	0,3	(Gan et al. 2006)
Insektenzellen <i>Sf9</i>	h β_2 AR	0.25 mg/l	1,7	(Kobilka 1995)
Periplasmatisch in Bakterien <i>E. coli</i>	hCB ₂ R	1 mg/l	33	(Yeliseev et al. 2005)
Hefe <i>S.cerevisiae</i>	hA _{2a} R	4 mg/l	56	(O'Malley et al. 2007)
Intrazellular in Bakterien <i>E. coli</i>	hBLT ₁ R	8 mg/l	333	(Damian et al. 2007)
Intrazellular in Bakterien <i>E. coli</i>	hY ₂ R	17 mg/l	708	diese Arbeit

In der intrazellulären Expression von GPCRs in *E. coli* werden die Rezeptoren nicht in die Membran eingebaut, sondern als Aggregate in IBs angereichert, sodass die Wirtszellen vor der Lysierung geschützt sein sollten. Trotzdem wurde in den Fermentationen nach der Induktion der Proteinexpression ein toxischer Effekt auf die *E. coli*-Zellen beobachtet (vgl. Abb. 4.3 und 4.4). Offensichtlich bilden die GPCRs während der Überexpression keine IBs im eigentlichen Sinne, d.h. homogene intermolekular vernetzte Aggregate (Marston 1986; Allen et al. 1992), sondern sie lagern sich aufgrund hydrophober Wechselwirkungen mit ihren transmembranen Domänen an die Cytoplasmamembran. Diese Annahme wird dadurch untermauert, dass sich in den isolierten IB-Präparationen hauptsächlich *E. coli*-Membranproteine und nur geringe Anteile des rekombinanten Y₂-Rezeptors befanden (vgl. Abb. 4.6). Zudem erklärt es die Verbesserung der Ausbeuten in den IB-Präparationen durch die Verwendung von Triton-X-100, denn dieses nicht-ionische Detergens löst speziell Membranbestandteile von *E. coli*-Zellen (Seddon et al. 2004).

5.1.2 Optimierung der Proteinausbeute

Die Biomassen-spezifische Proteinausbeute ist die Zielgröße, die es in der Expression von GPCRs zu optimieren gilt. Sie erhält gegenüber der absoluten Proteinausbeute den Vorzug, da isotopen-markierte N- oder C-Quellen vorzugsweise in das Zielprodukt und nicht in die Biomasse umgesetzt werden sollen.

Die spezifische Proteinausbeute (P_{spez}) ist eine Funktion aus der Proteinbildungsrate (π), der Biomasse mit hohem Plasmidanteil (X_P) und der gesamten Biomasse (Glg. 5.1). Die Biomasse (X) ist über die optische Dichte der Zellsuspension messbar und ist die Summe aus Zellen mit Plasmid und Zellen ohne Plasmid (X_O) (Glg. 5.2).

$$dP_{\text{spez}}/dt = (\pi * X_P)/X \quad (\text{Glg. 5.1})$$

$$X = X_P + X_O \quad (\text{Glg. 5.2})$$

In der Fermentation in Komplexmedium war zu sehen, dass die Zelldichte nach Induktion zunächst absank und nach 3 h wieder anstieg (vgl. Abb. 4.3). Offensichtlich fanden zwei gegenläufige Prozesse statt. Zum einen verringerte sich der Anteil der Zellen mit hohem Plasmidanteil (Glg. 5.3), da hohe Produktbildungsraten, wie oben beschrieben, zur Lyse der Zellen führten. Zum anderen wurden die Zellen, die keine oder nur wenige Expressionsplasmide besitzen und somit kaum Produkt exprimieren, weiter kultiviert (Glg. 5.4).

$$dX_P/dt = -(\pi^* X_P) \quad (\text{Glg. 5.3})$$

$$dX_O/dt = \mu^* X_O \quad (\text{Glg. 5.4})$$

Durch einsetzen dieser Gleichungen in die Glg. 5.2 erhält man eine Modellgleichung für das Biomassewachstum von Zellen bei der Expression von toxischen GPCRs nach der Induktion (Glg. 5.5).

$$dX/dt = (\mu^* X_O) - (\pi^* X_P) \quad (\text{Glg. 2.2})$$

Werden die Gleichungen für die Entwicklung der Biomassen und der spezifischen Proteinausbeute mit exemplarischen Größen für die Wachstums- und Produktbildungsraten in ein Diagramm aufgetragen, wird ersichtlich, dass der Anteil an der Biomasse mit Expressionsplasmid mit zunehmender Induktionsdauer abnimmt (Abb. 5.1).

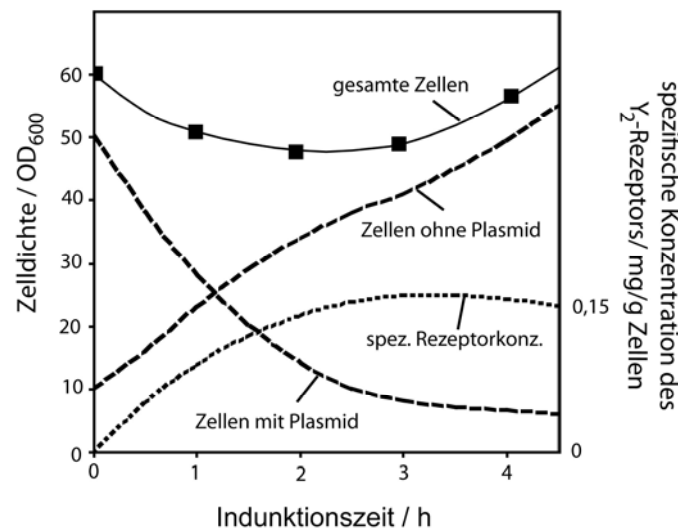


Abb. 5.1: Modellvorstellung der Zelldichten und der spezifischen Rezeptorkonzentration in der Fermentation nach der Induktion. Während der Anteil der Zellen mit Plasmid aufgrund von Plasmidverlust und Zellyse durch Proteinproduktion stetig abnimmt, steigt der Anteil der Zellen ohne Plasmid, die kein Produkt exprimieren. Dadurch ergibt sich ein Maximum für die spezifische Rezeptorkonzentration, welches den optimalen Zeitpunkt für die Zellernte darstellt.

Aus diesem Diagramm lassen sich verschiedene Schlussfolgerungen für hohe spezifische Proteinausbeuten in der Fermentation von GPCRs ableiten. Grundsätzlich ist die Stärke der Proteinexpression direkt proportional zu der Abnahme der Zelldichte. Dadurch wird die Bewertung eines Fermentationsprozesses vereinfacht, denn die Prozessparameter lassen sich ohne aufwendige Isolierung und Reinigung der Proteinaggregate qualitativ bewerten.

Des Weiteren sollte die Induktion der Proteinexpression bei der höchsten maximal möglichen Biomassekonzentration erfolgen, um den Startwert der Biomasse für die Proteinexpression

möglichst hoch zu setzen. Hohe Biomassekonzentration lassen sich am besten durch *fed-batch*-Verfahren realisieren (Jenzsch et al. 2006b).

Außerdem sollte die Wachstumsrate mittels Substratlimitierung während der Proteinexpression auf einen niedrigen Wert abgesenkt werden, um den Anteil an Biomasse mit hohem Plasmidanteil möglichst groß zu halten (Gnoth et al. 2008b) (vgl. Kapitel 2.2.4). Diese Maßnahme könnte ein Grund für die höhere spezifische Proteinausbeute in der Fermentation in Mineralsalzmedium sein, da hier die Wachstumsrate auf ca. 20% der maximalen Wachstumsrate abgesenkt wurde, während sie in Komplexmedium noch ca. 50% betrug.

Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass die Kultivierung nach der Induktion ca. 1-2 h über den Zeitpunkt, an dem die Zelldichte am geringsten ist, hinaus erfolgen sollte, da dann die spezifische Rezeptorkonzentration am höchsten ist. Hiermit hätte die Rezeptorausbeute in der Fermentation in Mineralsalzmedium verbessert werden können, denn eine Induktionsdauer von nur 3 h war offensichtlich zu kurz.

Abschließend lässt sich feststellen, dass trotz des erheblichen Optimierungspotentials die in dieser Arbeit erreichten Proteinausbeuten an gereinigten Y_2 -Rezeptoren höher sind, als die in der Literatur gezeigten Ausbeuten für alle anderen Expressionssysteme (McCusker et al. 2007). Zwar sind in verschiedenen Veröffentlichungen noch weitaus höhere Expressionsausbeuten für GPCRs erwähnt (Wedekind et al. 2006; Michalke et al. 2009), allerdings handelt es sich in diesen Fällen um ungereinigtes Protein.

5.2 Der Y_2 -Rezeptor in SDS-Mizellen

Nach der Expression liegen die Proteine in den IBs gewöhnlich in einer aggregierten, unstrukturierten *random coil*-Form vor (Lange, Rudolph 2005). SDS ist aufgrund seiner Ladung und seiner Struktur (vgl. Kapitel 2.3.2) in der Lage sowohl die inter- als auch die intramolekularen elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen dieser Proteinaggregate aufzubrechen (Alba et al. 1995), lässt aber die Ausbildung der α -Helices durch Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Helices zu. Mit den chaotropen Substanzen Guanidin/HCl und Harnstoff, die im Gegensatz zu SDS die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen verhindern (Sarramegn et al. 2006), konnte der Rezeptor nicht aus den Aggregaten gelöst werden, wodurch gezeigt werden konnte, dass erst durch die Ausbildung der sekundären Strukturelemente die hydrophobe Kraft zwischen den

Rezeptormolekülen und der wässrigen Umgebung soweit vermindert wurde, dass der Y_2 -Rezeptor in Lösung gehalten werden konnte.

In einem CD-Spektrum konnte ein Anteil der α -helikalen Sekundärstrukturen des Rezeptors in SDS-Mizellen vergleichbar mit dem von nativen GPCRs gezeigt werden (vgl. Abb. 4.9). Auch in einem HSQC-Spektrum zeigten die NH-Signale eine hohe Dispersion von einer Vielzahl isolierter Signale (vgl. Abb. 4.10), die eine bereits hohe definierte Strukturausbildung bestätigten. Vergleicht man dieses HSQC-Spektrum quantitativ mit dem Spektrum einer sieben integrale α -Helices umfassende Mutante (Trbovic et al. 2005) des Membranproteins TehA (Koglin et al. 2006) (Abb. 5.2), so wird klar, dass die Helices des Y_2 -Rezeptors bereits in SDS-Mizellen vollständig ausgebildet worden waren.

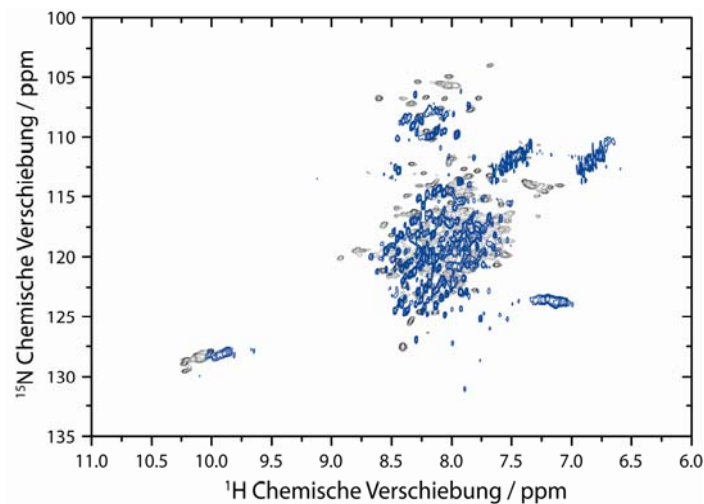


Abb. 5.2: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der sieben α -Helices umfassenden TehA Mutante (grau) und des Y_2 -Rezeptors in SDS-Mizellen (blau). Die Messung des TehA erfolgte bei pH 6 und einer Konzentration von 500 μM (Koglin et al. 2006), die Messung des Y_2 -Rezeptors bei pH 5,7 und 200 μM . Beide Spektren zeigen eine hohe Identität, was den Schluss zuließ, dass im Y_2 -Rezeptor ebenfalls alle sieben α -Helices bereits ausgebildet waren.

Wie erwähnt ist SDS effizient beim Aufbrechen von Protein-Protein-Interaktionen. Dies sorgt zum einen für die hohe Stabilität des Rezeptors in SDS-Mizellen, da unspezifische Oligomerisierung und Wechselwirkungen mit der Umgebung verhindert werden, zum anderen wirkt SDS dadurch denaturierend auf GPCRs. Die SDS-Moleküle gehen aufgrund ihrer geladenen Kopfgruppe elektrostatische Wechselwirkungen mit positiv geladenen Aminosäuren in der transmembranen Region ein und lagern sich mit ihren hydrophoben Kohlenwasserstoffketten zwischen die α -Helices, so dass diese auseinandergedrückt werden und ganze Mizellen um einzelne Domänen gebildet werden. Aus demselben Grund können sich die α -Helices während der Solubilisierung aus den IBs in die SDS-Mizellen nicht in ihre native Ausrichtung zueinander strukturieren.

Trotzdem liegen die Helices des Rezeptors in SDS-Mizellen nicht einzeln aufgereiht vor. In vergleichenden $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren von Proben des Y_2 -Rezeptors in SDS-Mizellen mit und ohne Zusatz des Lanthanides DyCl_3 (Grobner et al. 1999) waren verschobene und unveränderte Signale zu sehen (vgl. Abb. 4.12). Einige Aminosäuren befinden sich demnach innerhalb des Rezeptormoleküls oder der Mizelle, was bedeutet kann, dass Teile der transmembranen Helices des Rezeptors bereits zueinander ausgerichtet sind.

Untermauert wurde diese Annahme durch vergleichende HSQC-Spektren von Rezeptorproben in SDS-Mizellen mit und ohne Disulfidverbrückung (vgl. Abb. 4.13). Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass in SDS-Mizellen eine native Ausbildung der Disulfidverbrückung realisiert werden kann, denn das *redox-shuffling*-System basiert darauf vorzugsweise instabile Verbindungen aufzubrechen (vgl. Kapitel 2.3.4). Da die Rezeptoren in SDS-Mizellen jedoch sehr stabil sind, ist die intramolekulare Disulfidverbrückung eher zufällig. Trotzdem konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass zum einen die Cysteine räumlich nah genug zueinander liegen um Disulfidbrücken auszubilden, obwohl sie sich bis auf eine Ausnahme in verschiedenen Domänen befinden (vgl. Abb. 2.3), und zum anderen bewirken diese Disulfidbrücken eine strukturelle Veränderung des Rezeptors.

NPY ist nicht in der Lage an die Y_2 -Rezeptoren in SDS-Mizellen spezifisch zu binden. Diese Struktur ist nicht die biologisch aktive und es kann eher von einer partiell ausgebildeten nativen Struktur ausgegangen werden. Dies wird im Vergleich von HSQC-Spektren zwischen dieser Zwischenstruktur und voll funktionalem Rhodopsin (Werner et al. 2008) deutlich (Abb. 5.3).

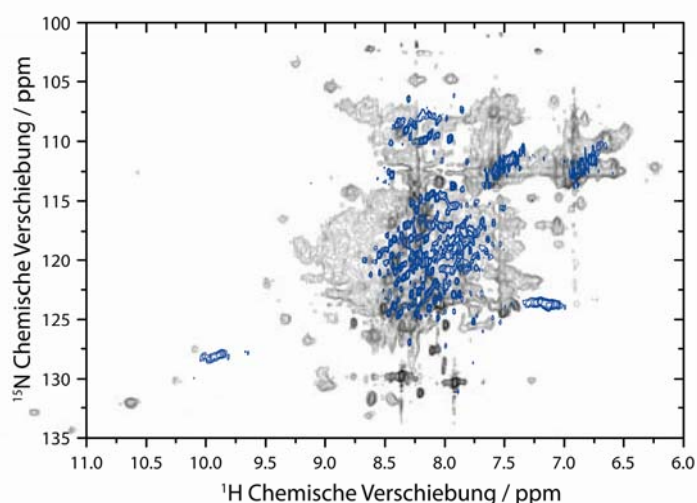


Abb. 5.3: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von funktionalem Rhodopsin (grau) und des Y_2 -Rezeptors in SDS-Mizellen (blau). Die Messung des Rhodopsin erfolgte bei 310 K mit einer Konzentration von 500 μM (Werner et al. 2008).

Rhodopsin zeigt eine deutlich bessere Dispersion der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Signale, insbesondere in den Bereichen der hohen Verschiebungen. Nachdem es in den letzten Jahren gelungen war neben Rhodopsin noch drei weitere Kristallstrukturen von Klasse A-GPCRs zu erhalten, wurde klar, dass in dieser Proteinfamilie eine hohe strukturelle Identität existiert und sich Rhodopsin trotz der unterschiedlichen Funktionsweise und evolutionären Entwicklung (Schulz, Schöneberg 2003) als grundlegendes Strukturmodell, zumindest in Bezug auf die Dispersion in NMR-Messungen, eignet (Hanson, Stevens 2009).

Die Helices liegen demnach weder einzeln noch alle zusammen in den SDS-Mizellen vor. In einer $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Messung mit zwei zueinander ausgerichteten Helices des Y_4 -Rezeptors in nicht-denaturierenden Mizellen (Neumoin et al. 2009) wurden zwar weniger Signale detektiert, aber die Dispersion dieser Signale ist nur wenig geringer als die des vollständigen Y_2 -Rezeptors in dieser Arbeit. Dies legt die Hypothese nahe, dass die transmembranen Regionen des Y_2 -Rezeptors in Bündeln von maximal drei α -Helices in den SDS-Mizellen vorlagen (Abb. 5.4).

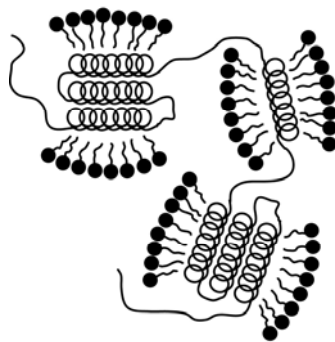


Abb. 5.4: Postulierte Modellvorstellung der α -Helices des Y_2 -Rezeptors in SDS-Mizellen.

Die Rezeptorproben in SDS-Mizellen zeigten in den HSQC-Messungen schmale Signale und die Spektren von verschiedenen Präparationen waren nahezu identisch, was auf eine hohe strukturelle Homogenität zwischen den Rezeptoren in den Proben schließen lässt. Dies war überraschend, denn es bedeutet, dass die Anordnung der Helices nicht zufällig zustande kommt, sondern es müssen zwischen einigen transmembranen Bereichen spezifische Bindungsmotive oder kovalente Bindungen existieren, die durch das SDS nicht aufgebrochen werden können. Der biologische Hintergrund dieser Bindungsmotive könnte in der Strukturänderung des Rezeptors während der Signaltransduktion begründet sein (vgl. Kapitel 2.1.2), in der sich nach der Liganden-Bindung einige Helices zueinander verschieben. Um dies schnell realisieren zu können, werden entweder Bindungen benötigt, die spezifisch aktiviert werden können oder schwache Wechselwirkungen zwischen den Domänen müssen

schnell und effektiv aufgebrochen werden können, ohne andere Molekülbereiche zu destabilisieren.

Grundsätzlich eignen sich Präparationen in SDS-Mizellen für NMR-Strukturuntersuchungen, wie mit der Strukturaufklärung des Kaliumkanals KcsA gezeigt werden konnte (Chill et al. 2006). Allerdings sind GPCRs in diesem Mizell-System nicht funktional, da die native Ausrichtung der Helices durch das SDS teilweise denaturiert wird und eine Ausbildung der korrekten Disulfidverbrückung nicht möglich ist. Ionenkanäle besitzen keine Disulfidbrücken und ihre Ringstruktur aus β -Faltblättern wird durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, welche nicht durch SDS aufgebrochen werden können.

5.3 Der Y₂-Rezeptor in DDM/CHAPS-Mizellen

Da ein SDS-Puffersystem für die Ausbildung der vollständig nativen Struktur des Y₂-Rezeptors ungeeignet ist, erfolgte eine Umpufferung des GPCRs aus SDS- in DDM/CHAPS-Mizellen mittels Pulsrenaturierung unter Verwendung eines artifiziellen Chaperonen-Systems in Form von Cyclodextrin (vgl. Kapitel 2.3.3). Cyclodextrin ist für die Komplexierung von SDS geeignet, denn die Bindungsaffinität von SDS zu diesem Oligosaccharid ist mit 22 μ M im Vergleich zu den Affinitäten von DDM und CHAPS, die jeweils nur im millimolaren Bereich liegen, sehr stark (Susann Schimmer, MLU Halle-Wittenberg, unveröffentlichte Daten).

5.3.1 Einfluss der Detergenzien auf die Strukturbildung

Die Anforderungen an das Detergens-System sind den Rezeptor in Lösung zu stabilisieren und die native Ausrichtung der Strukturdomänen zu begünstigen, gleichzeitig jedoch intermolekulare Wechselwirkungen zu verhindern. DDM hat dank seiner niedrigen CMC geringe Austauschraten und bildet daher relativ stabile Mizellen, die zudem durch die hohe Aggregationszahl von DDM-Mizellen groß genug sind um GPCRs aufzunehmen (Bhairi 2001).

Aufgrund vieler Einflüsse des Puffers auf das Mizell-System, ist es unmöglich vorherzusagen, wie viele Detergensmoleküle benötigt werden, um alle Rezeptoren in Lösung zu halten (Tsamaloukas et al. 2009). Am Anfang der Faltungsstudien betrug das molare

DDM/Rezeptor-Verhältnis 3000/1. Mit diesem Verhältnis konnten nur geringe Ausbeuten und Proteinkonzentrationen erreicht werden. Durch eine Verdreifachung der DDM-Konzentration in der Faltung war es möglich die Ausbeute auf ~80% zu steigern. Nach einer Optimierung verschiedener Faltungs- und Konzentrierungsparameter (vgl. Kapitel 4.2) betrug das molare Verhältnis des renaturierten Y_2 -Rezeptors und der DDM-Moleküle nur noch 300/1. Dass nach der Faltung nur noch $\sim 1/10$ der Detergenzien pro Rezeptormolekül während der Faltung benötigt wurden, ist ein starkes Indiz für eine enge Ausrichtung der Helices zueinander.

DDM ist aufgrund seiner fehlenden Ladung nicht in der Lage Protein-Protein-Wechselwirkungen und damit eine Oligomerisierung durch unspezifisches Domän-*swapping* (Gouldson et al. 2000) oder intermolekulare Aggregation von Helices verschiedener Moleküle zu verhindern (Abb. 5.5).

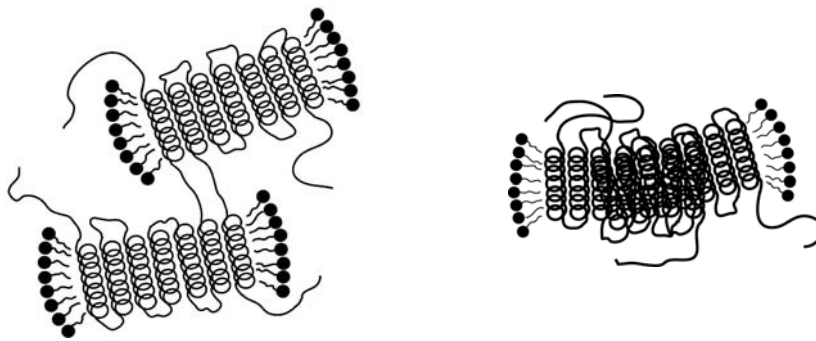


Abb. 5.5: Postulierte Modellvorstellung von unspezifischer Oligomerbildung des Y_2 -Rezeptors in nicht-denaturierenden Mizellen. Eine homologe Oligomerisierung kann durch Domän-*swapping* (links) oder intermolekulare Aggregation der Helices (rechts) verursacht werden.

Um solche intermolekularen Wechselwirkungen zu minimieren, wurde das zwitterionische Detergens CHAPS in das Mizell-System integriert (vgl. 2.3.2). Ein DDM/CHAPS-Mizellsystem wurde schon für die native Stabilisierung anderer GPCRs verwendet (Tucker, Grisshammer 1996; Krepiy et al. 2007; Harding et al. 2007). CHAPS besitzt im Gegensatz zu SDS nicht eine Ladung in der Kopfgruppe, sondern zwei entgegengesetzte Ladungen in der Kohlenwasserstoffkette. Warum CHAPS erst bei hohen Konzentrationen denaturierend auf Membranproteine wirkt, ist noch ungeklärt (Bhairi 2001). Eine Modellvorstellung ist, dass dieses Molekül mit seiner relativ großen, ungeladenen Kopfgruppe nicht in die ausgebildeten Transmembrandomänen vordringen kann und daher elektrostatische Wechselwirkungen nur an der Oberfläche des Rezeptormoleküls verhindert. Ab einer bestimmten Konzentration befinden sich allerdings genügend Gegenionen in der Lösung, sodass die intramolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen aufgehoben werden und die Bindung zwischen den Transmembrandomänen schwächer wird. Daraufhin lagern sich die hydrophoben Ketten des

CHAPS-Moleküls, ähnlich wie bei SDS, zwischen die Helices und drücken sie auseinander. Nach dieser Modellvorstellung ist die optimale Konzentration von CHAPS, bei der die elektrostatischen Wechselwirkungen an der Oberfläche des Rezeptormoleküls effektiv verhindert werden ohne den Rezeptor zu denaturieren, nicht wie bei DDM relativ zur Rezeptorkonzentration, sondern als eine absolute Konzentration zu sehen. Die optimale CHAPS-Konzentration für die Renaturierung des Y₂-Rezeptors betrug 0,6% (w/v) (~9,8 mM), was bei maximal erreichter Rezeptorkonzentration einem molaren Verhältnis von ~300/1 CHAPS/Rezeptor entsprach.

5.3.2 Einfluss der Additive auf die Strukturbildung

In nicht-denaturierenden Pufferbedingungen vermindern stabilisierende Additive die Oligomer- und Aggregatbildung. So wurde z.B. L-Arginin erfolgreich für die Renaturierung der N-terminalen Domäne des Klasse B-GPCRs GLPR₁ verwendet (Runge et al. 2007). Diese Aminosäure vermindert die freie Energie aller Proteinzustände, wodurch die Ausbildung der Struktur beschleunigt wird, und erhöht die kinetische Barriere zur Aggregatbildung (Baynes et al. 2005). Es gibt verschiedene Modelle über den Mechanismus dieses Effektes, wovon sich bis zum heutigen Zeitpunkt keines durchgesetzt hat (Arakawa et al. 2007).

Der Y₂-Rezeptor konnte mit L-Arginin als Faltungsadditive mit guten Ausbeuten renaturiert werden, jedoch war keine spezifische Bindung von NPY in diesem Puffer nachweisbar. Eine Bindung des NPY an den Y₂-Rezeptor erfolgt über ionische Wechselwirkungen des Arg33 des Liganden (Beck-Sickinger et al. 1994). Die Bindungsstellen für dieses Arg33 könnten bereits durch die Arginine aus dem Puffer besetzt sein, so dass Liganden-Bindungsstudien in Arginin-haltigen Puffern grundsätzlich nicht möglich sind.

Einwertige Salze wie KCl und NaCl wirken ebenfalls stabilisierend auf die native Struktur von GPCRs, wie in dieser Arbeit mit 0,5 M KCl (vgl. Kapitel 4.2.1) und für den β₂-Adrenergerezeptor mit 0,5 M NaCl gezeigt werden konnte (Rasmussen et al. 2007). Sie lagern sich an geladene Aminosäuren auf der Oberfläche der Rezeptormoleküle und verhindern elektrostatische intermolekulare Wechselwirkungen, ähnlich der Funktion von CHAPS (Tayyab et al. 2002).

Glycerol verändert das Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen des Wassers und macht es dadurch zu einem schlechteren Lösungsmittel für die hydrophoben Bereiche des Rezeptors, wodurch die Solvataion und damit die Aggregation vermindert werden (Sawano et al. 1992).

Zusätzlich führt dieser Effekt zur Viskositätserhöhung des Puffers, womit die laterale Diffusion der Mizellen verlangsamt und dadurch die Wahrscheinlichkeit für Protein/Protein-Wechselwirkungen, die mit der Zeit und der Konzentration zunimmt (vgl. Abb. 4.18), vermindert wird. Der stabilisierende Effekt von Glycerol auf GPCRs konnte nicht nur in dieser Arbeit, sondern auch für den β_2 -Adrenergenrezeptor gezeigt werden (Hampe et al. 2000).

Eine unspezifische Oligomerisierung des Y_2 -Rezeptors fand nicht nur über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen statt, sondern wurde auch durch die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken begünstigt. Dies konnte einfach aber effektiv durch die Zugabe des *redox-shuffling* Systems in alle Puffer nach der Faltung vermindert werden (vgl. Kapitel 2.3.4 und 4.2.3). In diesem Zusammenhang spielte auch die Zugabe von EDTA in alle Puffer nach der Chromatographie eine wichtige Rolle. EDTA komplexiert zweiwertige Metallionen, wodurch kein Luftsauerstoff mehr im Puffer gebunden werden kann. Dies ist nötig, da mittels Luftsauerstoff zufällig und irreversibel Disulfidbrücken ausgebildet werden.

5.3.3 Funktionelle Charakterisierung des Y_2 -Rezeptors in DDM/CHAPS-Mizellen

Erstmals konnte mit dieser Arbeit eine Sättigungskurve für einen *in vitro* renaturierten GPCR in Mizellen gezeigt werden (vgl. Abb. 4.23). Obwohl der ermittelte K_D -Wert von $(1,9 \pm 1,1)$ nM in einem niedrigen nanomolaren Bereich liegt, ist er etwa eine Größenordnung schwächer als der K_D -Wert von $(0,2 \pm 0,1)$ nM, der für Y_2 -Rezeptoren in Tierzellmembranen ermittelt wurde (Merten et al. 2007). Auch die Konzentration der aktiven Rezeptoren in den Mizellen, die aus der Kurvenanpassung an die Datenpunkte ermittelt wurde (vgl. Kapitel 2.5.1 und 4.2.4), erscheint relativ gering. Dafür kann es verschiedene Gründe geben. Grundsätzlich stellen die Mizellen im Vergleich zur Zellmembran ein wesentlich instabileres System dar, da sich die Detergenzien im Gegensatz zu den Lipiden im ständigen Austausch zwischen der gelösten und der aggregierten Form befinden (Seddon et al. 2004).

Es ist möglich, dass die Liganden-Bindung auf einem vorgeschlagenen Zwei-Schritt-Prozess basiert (Bader, Zerbe 2005). Nach diesem Model bindet das NPY zuerst an die Lipid-Membran (Thomas et al. 2005). Durch die Membranbindung wird die effektive Liganden-Konzentration stark erhöht, da die Diffusion auf zwei Dimensionen beschränkt ist (Murray et al. 1997). Im Gegensatz zu Mizellen erleichtert die größere Membranfläche von Zellen diesen ersten Bindungsschritt.

Weiterhin könnten die zellularen Rezeptoren an intrazelluläre G-Proteine gebunden sein, welche stabilisierend auf die Rezeptorstruktur wirken (Angel et al. 2006). Auch können posttranslationale Modifikationen zusätzlich die Y_2 -Rezeptoren in der Zellmembran stabilisieren oder eine wichtige Rolle bei der Liganden-Bindung spielen (Kamitani, Sakata 2001). Der in dieser Arbeit rekombinant exprimierte Y_2 -Rezeptor ist weder posttranslational modifiziert, noch befinden sich G-Proteine in den Puffern.

In den letzten Jahren wird auch verstärkt eine funktionelle Dimerisierung von GPCRs diskutiert (Milligan 2009; Vidi et al. 2008; Harding et al. 2009). Durch eine Dimerisierung erhalten die Rezeptoren eine höhere Variabilität, um ihre verschiedenen natürlichen Liganden zu binden und so zum Teil grundsätzlich verschiedene Funktionen zu erfüllen. Für den Y_2 -Rezeptor in dieser Arbeit wurden die Faltungs- und Konzentrierungsparameter jedoch so gewählt, dass die Ausbildung von Oligomeren verhindert wurde.

Es ist schwierig die erhaltenen Daten einzuschätzen, da es in der Literatur bisher keine vergleichbaren Arbeiten zu den Unterschieden in der Liganden-Bindung zwischen GPCRs in Mizellen und in Membranen gibt. Fest steht, der renaturierte Rezeptor besitzt ein hoch spezifisches Bindungsmotiv für seinen natürlichen Liganden, doch er ist in DDM/CHAPS-Mizellen sehr instabil. Aus diesem Grund waren aussagekräftige NMR-Messungen nicht möglich. Die maximal erreichte Konzentration war zum einen zu niedrig, zum anderen waren die Proben sehr wahrscheinlich inhomogen, bestehend aus nativen Rezeptoren und verschiedenen oligomeren Konformationen.

5.4 Der Y_2 -Rezeptor in DMPC-Liposomen

Mehrere Studien haben bereits den kinetisch und thermodynamisch stabilisierenden Effekt der Rekonstitution auf Membranproteine beschrieben (Booth, Paulsen 1996; Gorzelle et al. 1999; Surrey, Jahnig 1992). Allerdings gibt es keine generelle Methode, die für alle Membranproteine gleiche Ergebnisse liefert (Rigaud et al. 1995).

Entscheidend für die Rekonstitution von GPCRs für NMR-Messungen sind hohe Rezeptorkonzentrationen in der Lipid-Doppelschicht und eine effektive Entfernung der Detergenzien (vgl. Kapitel 2.4.2). Eine Dialyse war aufgrund der geringen Austauschrate von DDM sehr ineffektiv und eine Verdünnung war aufgrund der großen Puffervolumen unpraktikabel. Die Entfernung der Detergenzien mittels hydrophober Adsorption hingegen stellte eine geeignete Methode dar, denn je schneller und effektiver die Rezeptoren aus dem

instabilen Mizellsystem in eine stabile Membran überführt wurden, desto höher war die Ausbeute an funktionellen GPCR-Molekülen.

Der Einbau der Rezeptoren erfolgte nicht spontan, weder in unbehandelte noch in destabilisierte Liposomen, wie es für die Rekonstitution von Bakteriorhodopsin beschrieben wurde (Rigaud et al. 1988). Die thermodynamische Barriere an den Phasengrenzflächen der Lipid-*bilayer* war für die hydrophoben Helices des Y_2 -Rezeptors offensichtlich zu groß. Durch eine Solubilisierung und eine anschließende Wiederherstellung der Liposomen bauen sich die Membranfragmente, vermittelt durch Detergenzien, um die Rezeptoren, was ein thermodynamisch wesentlich günstigerer Prozess ist. Für den Acetylcholin-Rezeptor wurde diese Technik bereits angewendet (Schurholz 1996) und auch der Y_2 -Rezeptor konnte auf diese Weise funktional rekonstituiert werden (Abb. 5.6).

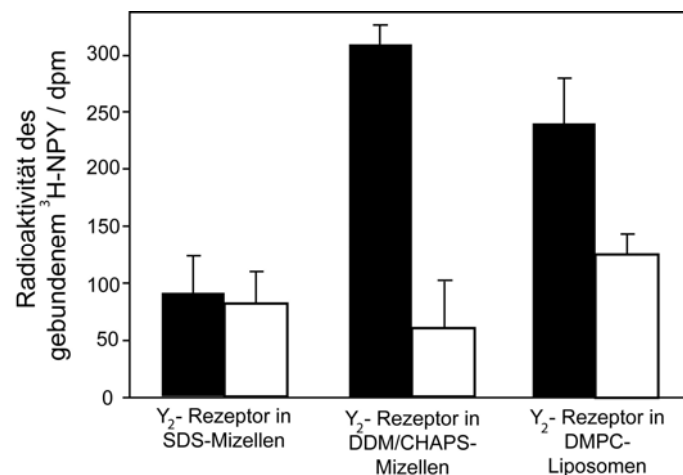


Abb. 5.6: Radioliganden-Bindungs-Assay von Y_2 -Rezeptorproben in unterschiedlichen Stadien der Präparation. Dargestellt sind die totale (schwarz) und die unspezifische (weiß) Bindung von 3H -NPY an Rezeptoren nach der in SDS-Mizellen, in DDM/CHAPS-Mizellen und nach der Rekonstitution in DMPC-Liposomen. Die Rezeptorkonzentrationen in Mizellen betragen $\sim 1 \mu M$ und in Liposomen $\sim 0,25 \mu M$.

Vergleicht man die Funktionalität des Y_2 -Rezeptors in Liposomen mit der in DDM/CHAPS-Mizellen, so ist neben einer höheren unspezifischen Bindung des NPY, die aufgrund einer größeren Oberfläche der Liposomen nicht ungewöhnlich ist, eine geringere spezifische Bindung zu sehen. Geht man jedoch von einer zufälligen Orientierung des Rezeptors in der Lipidmembran aus, wie es für andere Membranproteine beschrieben wurde (Reffay et al. 2009), würden nur 50% der aktiven Rezeptoren in der Lage sein, den Liganden zu binden. Zudem war die Rezeptorkonzentration in Liposomen bei dieser Messung 4-mal kleiner als in den Mizellen. Dies bedeutet, der Anteil der aktiven Rezeptoren ist nach der Rekonstitution größer als vor der Rekonstitution. Eine durch Rekonstitution induzierte Renaturierung wurde schon für das *E. coli*-Membranprotein OmpA beschrieben (Surrey et al. 1996). Trotz der

stabilen Struktur von Membranen besitzen die Einzelmoleküle durch laterale Diffusion und interne Bewegungen eine hohe Dynamik (Huster et al. 1998). Dadurch können sich die Strukturelemente der Proteine in ihre thermodynamisch stabile, native Position zueinander ausrichten (White et al. 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass der Y_2 -Rezeptor eine signifikant höhere strukturelle Ordnung in Liposomen als in SDS-Mizellen besitzt. Die Signale der Aminosäuren des Rezeptors waren in Liposomen im Vergleich zu Mizellen aufgrund der geringeren Beweglichkeit der Moleküle zwar breiter, aber die Dispersion der Signale nach der Faltung und der Rekonstitution des Rezeptors war deutlich höher (Abb. 5.7A). Um die Dispersion mit der von aktiven Rezeptoren vergleichen zu können, wurde ein $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -CP-Spektrum aus den Strukturdaten von Rhodopsin (Teller et al. 2001) simuliert. Die Dispersion der Signale des Y_2 -Rezeptors in Liposomen ist in der gleichen Größenordnung, wie die von aktivem Rhodopsin (Abb. 5.7B).

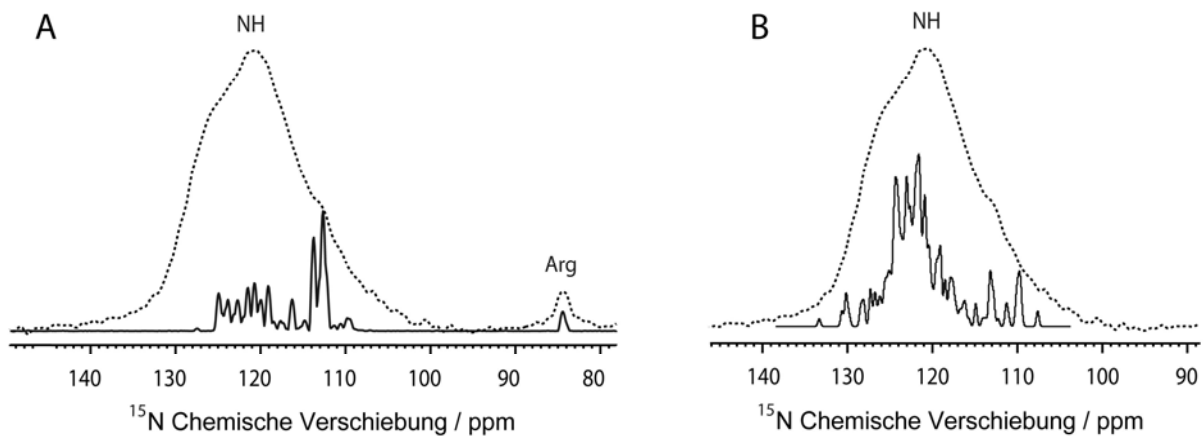


Abb. 5.7: Vergleichende $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -CP-Spektren (A) des Y_2 -Rezeptors in Liposomen (gestrichelte Linie) und in SDS-Mizellen (durchgezogene Linie) und (B) des Y_2 -Rezeptors in Liposomen (gestrichelte Linie) und von Rhodopsin (durchgezogene Linie). Die Referenzierung der Spektren in A erfolgte an dem NH_2 -Signal des Arginin bei 84 ppm (www.bmrb.wisc.edu). Das Spektrum von Rhodopsin ist eine Simulation aus den Strukturdaten (www.rcsb.org, PDB 1hzx).

Im Gegensatz zu den Rezeptorproben in DDM/CHAPS-Mizellen besitzen die rekonstituierten Proteinmoleküle eine hohe strukturelle Identität, was sich in schmalen Linien der $\text{C}\beta$ -Signale von unmarkiertem Y_2 -Rezeptor zeigte (vgl. Abb. 4.30). Detailliertere Aussagen über die Struktur des Y_2 -Rezeptors können über eine ^{13}C -Markierung der Aminosäuren erfolgen, denn MAS-NMR mit uniform ^{13}C -markiertem Protein ist eine exzellente Methode für die Strukturaufklärung von Membranproteinen (Torres et al. 2003). Der Kohlenstoffkern bietet aufgrund seiner größeren Anzahl an Atomen pro Aminosäure, der höheren Dispersion der Signale und der stärkeren Nachweisempfindlichkeit enorme Vorteile gegenüber dem Stickstoffkern (Jaroniec et al. 2001).

5.5 Bewertung der Strategie

Nur die Präparationen des Y_2 -Rezeptors in Liposomen waren für NMR-Strukturuntersuchungen funktional und stabil genug. Trotzdem werden alle Zwischenschritte in der Präparation für die Ausbildung der nativen Struktur benötigt (Abb. 5.8).

Es gibt eine Vielzahl von Wechselwirkungen, die die native Strukturausbildung des Y_2 -Rezeptors beeinflussen. Innerhalb der transmembranen Domänen werden die α -Helices durch Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet. Zwischen den Helices existieren hydrophobe, elektrostatische und in einigen Bereichen wahrscheinlich auch kovalente Wechselwirkungen. Im extrazellulären Bereich existiert eine Disulfidbrücke. Die Schwierigkeit in der Präparation von funktionalen, stabilen und hoch konzentrierten Rezeptorproben besteht darin, durch ionische, zwitterionische sowie nicht-ionische Detergenzien und Phospholipide die Ausbildung dieser Wechselwirkungen intramolekular zu ermöglichen, aber gleichzeitig intermolekular zu verhindern.

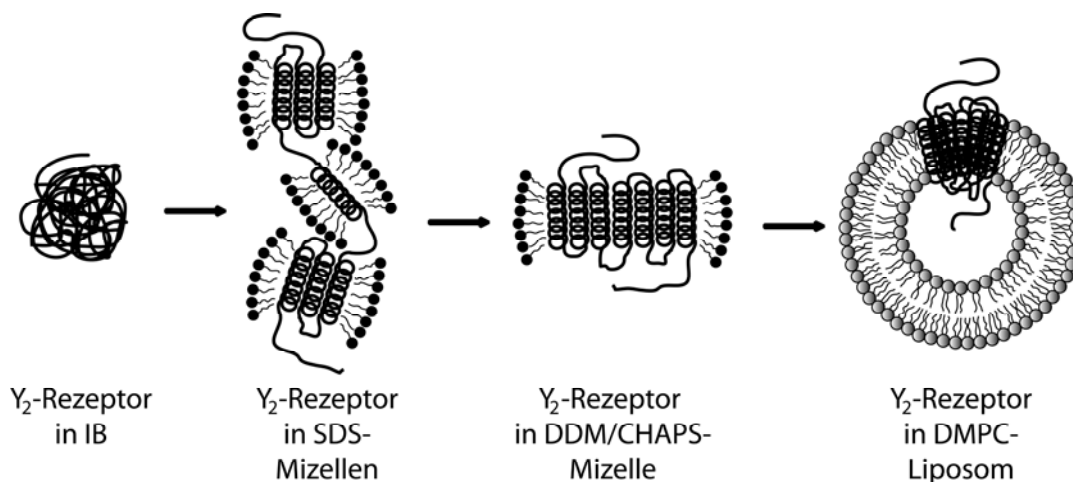


Abb. 5.8: Postulierte Ausbildung der Struktur während der hier erarbeiteten Strategie zur rekombinanten Herstellung des Y_2 -Rezeptors für NMR-Strukturanalysen.

Nur mit SDS war es möglich den Rezeptor aus den IBs durch effektives Aufbrechen der nicht-kovalenten Wechselwirkungen in den Aggregaten und durch Ausbildung der α -Helices in Mizellen zu solubilisieren. In diesen SDS-Mizellen war der GPCR zwar noch nicht funktional, aber es bestanden bereits strukturierte Domänen. Die Ausbildung der nativen Disulfidverbrückung und Anordnung der Helices erfolgte in nicht-denaturierenden DDM/CHAPS-Mizellen, in die der Rezeptor mittels *in vitro* Faltung umgepuffert wurde. Durch die Rekonstitution in Liposomen wurde der Y_2 -Rezeptor stabilisiert. Bei einer direkten Rekonstitution aus den SDS-Mizellen besteht die Gefahr einer nicht-nativen

Disulfidverbrückung und eines Einbaus von Domänen eines Rezeptormoleküls in verschiedene Liposomen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Klasse A-GPCR Y₂-Rezeptor in Milligrammmengen in *E. coli* exprimiert und anschließend in hoher Reinheit isoliert werden konnte. Die *in vitro* Renaturierung der nativen Struktur des Rezeptors erfolgte mittels Solubilisierung der Proteinaggregate in SDS-Mizellen, anschließender Umpufferung in nicht-denaturierende DDM/CHAPS-Mizellen und Rekonstitution in DMPC-Liposomen. Mittels Radio-Liganden-Bindung wurde eine hoch affine Bindung des natürlichen Liganden an diese Rezeptorproben ermittelt und die strukturelle Ordnung des renaturierten Rezeptors war in ¹H/¹⁵N-NMR-Messungen vergleichbar mit der von nativem Rhodopsin. Aufgrund hoher Stabilität und Konzentration der renaturierten und rekonstituierten Rezeptoren eignen sie sich für strukturelle Untersuchung, wobei die hier erarbeitete Probenpräparation besonders für die ¹³C-Festkörper-NMR ein hohes Potential bietet.

6 Literaturverzeichnis

- Alba,F., Arenas,J.C., and Lopez,M.A. 1995. Properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidases in the presence of detergents. *Peptides*. **16**:325-329.
- Allen,S.P., Polazzi,J.O., Gierse,J.K., and Easton,A.M. 1992. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **174**:6938-6947.
- Almog,S., Kushnir,T., Nir,S., and Lichtenberg,D. 1986. Kinetic and structural aspects of reconstitution of phosphatidylcholine vesicles by dilution of phosphatidylcholine-sodium cholate mixed micelles. *Biochemistry* **25**:2597-2605.
- Andre,N., Cherouati,N., Prual,C., Steffan,T., Zeder-Lutz,G., Magnin,T., Pattus,F., Michel,H., Wagner,R., and Reinhart,C. 2006. Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in Pichia pastoris to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Sci.* **15**:1115-1126.
- Angel,T.E., Kraft,P.C., and Dratz,E.A. 2006. Metarhodopsin-II stabilization by crosslinked G α C-terminal peptides and implications for the mechanism of GPCR-G protein coupling. *Vision Res.* **46**:4547-4555.
- Arakawa,T., Ejima,D., Tsumoto,K., Obeyama,N., Tanaka,Y., Kita,Y., and Timasheff,S.N. 2007. Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. *Biophys. Chem.* **127**:1-8.
- Bader,R., Rytz,G., Lerch,M., Beck-Sickinger,A.G., and Zerbe,O. 2002. Key motif to gain selectivity at the neuropeptide Y5-receptor: structure and dynamics of micelle-bound [Ala31, Pro32]-NPY. *Biochemistry* **41**:8031-8042.
- Bader,R. and Zerbe,O. 2005. Are hormones from the neuropeptide Y family recognized by their receptors from the membrane-bound state? *Chembiochem* **6**:1520-1534.
- Balasubramaniam,A., Tao,Z., Zhai,W., Stein,M., Sheriff,S., Chance,W.T., Fischer,J.E., Eden,P.E., Taylor,J.E., Liu,C.D., McFadden,D.W., Voisin,T., Roze,C., and Laburthe,M. 2000. Structure-activity studies including a Psi(CH(2)-NH) scan of peptide YY (PYY) active site, PYY(22-36), for interaction with rat intestinal PYY receptors: development of analogues with potent in vivo activity in the intestine. *J. Med. Chem.* **43**:3420-3427.
- Bane,S.E., Velasquez,J.E., and Robinson,A.S. 2007. Expression and purification of milligram levels of inactive G-protein coupled receptors in E. coli. *Protein Expr. Purif.* **52**:348-355.
- Baneres,J.L., Martin,A., Hullot,P., Girard,J.P., Rossi,J.C., and Parello,J. 2003. Structure-based analysis of GPCR function: conformational adaptation of both agonist and receptor upon leukotriene B4 binding to recombinant BLT1. *J. Mol. Biol.* **329**:801-814.
- Baneres,J.L., Mesnier,D., Martin,A., Joubert,L., Dumuis,A., and Bockaert,J. 2005. Molecular characterization of a purified 5-HT4 receptor: a structural basis for drug efficacy. *J. Biol. Chem.* **280**:20253-20260.

- Baneres, J.L. and Parello, J. 2003. Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J. Mol. Biol.* **329**:815-829.
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., Cone, R.D., and Bloom, S.R. 2002. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* **418**:650-654.
- Baynes, B.M., Wang, D.I., and Trout, B.L. 2005. Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry* **44**:4919-4925.
- Beck, A., Tsamaloukas, A.D., Jurcevic, P., and Heerklotz, H. 2008. Additive action of two or more solutes on lipid membranes. *Langmuir* **24**:8833-8840.
- Beck-Sickinger, A.G., Wieland, H.A., Wittneben, H., Willim, K.D., Rudolf, K., and Jung, G. 1994. Complete L-alanine scan of neuropeptide Y reveals ligands binding to Y1 and Y2 receptors with distinguished conformations. *Eur. J. Biochem.* **225**:947-958.
- Berger, B.W., Garcia, R.Y., Lenhoff, A.M., Kaler, E.W., and Robinson, C.R. 2005. Relating surfactant properties to activity and solubilization of the human adenosine a3 receptor. *Biophys. J.* **89**:452-464.
- Bhairi, S.M. 2001. Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, CA. Bohm, G., Muhr, R., and Jaenicke, R. 1992. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* **5**:191-195.
- Booth, P.J. 2003. The trials and tribulations of membrane protein folding in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**:51-56.
- Booth, P.J. and Paulsen, H. 1996. Assembly of light-harvesting chlorophyll a/b complex in vitro. Time-resolved fluorescence measurements. *Biochemistry* **35**:5103-5108.
- Boyd, D., Schierle, C., and Beckwith, J. 1998. How many membrane proteins are there? *Protein Sci.* **7**:201-205.
- Brange, J. and Volund, A. 1999. Insulin analogs with improved pharmacokinetic profiles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **35**:307-335.
- Brauner-Osborne, H., Wellendorph, P., and Jensen, A.A. 2007. Structure, pharmacology and therapeutic prospects of family C G-protein coupled receptors. *Curr. Drug Targets.* **8**:169-184.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, J.M. 1987. X11-Blue - A High-Efficiency Plasmid Transforming Reca Escherichia-Coli Strain with Beta-Galactosidase Selection. *Biotechniques* **5**:376-&.
- Butz, J.A., Niebauer, R.T., and Robinson, A.S. 2003. Co-expression of molecular chaperones does not improve the heterologous expression of mammalian G-protein coupled receptor expression in yeast. *Biotechnol. Bioeng.* **84**:292-304.
- Cabrele, C. and Beck-Sickinger, A.G. 2000. Molecular characterization of the ligand-receptor interaction of the neuropeptide Y family. *J. Pept. Sci.* **6**:97-122.
- Cabrele, C., Langer, M., Bader, R., Wieland, H.A., Doods, H.N., Zerbe, O., and Beck-Sickinger, A.G. 2000. The first selective agonist for the neuropeptide YY5 receptor increases food intake in rats. *J. Biol. Chem.* **275**:36043-36048.

- Chen,G.Q., Sun,Y., Jin,R., and Gouaux,E. 1998. Probing the ligand binding domain of the GluR2 receptor by proteolysis and deletion mutagenesis defines domain boundaries and yields a crystallizable construct. *Protein Sci.* **7**:2623-2630.
- Cherezov,V., Rosenbaum,D.M., Hanson,M.A., Rasmussen,S.G., Thian,F.S., Kobilka,T.S., Choi,H.J., Kuhn,P., Weis,W.I., Kobilka,B.K., and Stevens,R.C. 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**:1258-1265.
- Chill,J.H., Louis,J.M., Delaglio,F., and Bax,A. 2007. Local and global structure of the monomeric subunit of the potassium channel KcsA probed by NMR. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**:3260-3270.
- Chill,J.H., Louis,J.M., Miller,C., and Bax,A. 2006. NMR study of the tetrameric KcsA potassium channel in detergent micelles. *Protein Sci.* **15**:684-698.
- Cruze,C.A., Su,F., Limberg,B.J., Deutsch,A.J., Stoffolano,P.J., Dai,H.J., Buchanan,D.D., Yang,H.T., Terjung,R.L., Spruell,R.D., Mittelstadt,S.W., and Rosenbaum,J.S. 2007. The Y2 receptor mediates increases in collateral-dependent blood flow in a model of peripheral arterial insufficiency. *Peptides* **28**:269-280.
- Dabrowski,S. and Kiaer,A.B. 2003. Cloning, expression, and purification of the His6-tagged hyperthermostable dUTPase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli*: application in PCR. *Protein Expr. Purif.* **31**:72-78.
- Damian,M., Perino,S., Polidori,A., Martin,A., Serre,L., Pucci,B., and Baneres,J.L. 2007. New tensioactive molecules stabilize a human G protein-coupled receptor in solution. *FEBS Lett.* **581**:1944-1950.
- Danilevskaia,O.N. 1979. [Expression of eukaryotic genes in *Escherichia coli* cells]. *Genetika.* **15**:2087-2107.
- De Bernardez,C.E., Schwarz,E., and Rudolph,R. 1999. Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol.* **309**:217-36.:217-236.
- Fraser,M.J. 1992. The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic gene expression system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158**:131-172.
- Fredholm,B.B., Hokfelt,T., and Milligan,G. 2007. G-protein-coupled receptors: an update. *Acta Physiol (Oxf)* **190**:3-7.
- Gan,L., Alexander,J.M., Wittelsberger,A., Thomas,B., and Rosenblatt,M. 2006. Large-scale purification and characterization of human parathyroid hormone-1 receptor stably expressed in HEK293S GnTI- cells. *Protein Expr. Purif.* **47**:296-302.
- Gawrisch,K. and Soubias,O. 2008. Structure and dynamics of polyunsaturated hydrocarbon chains in lipid bilayers-significance for GPCR function. *Chem. Phys. Lipids* **153**:64-75.
- Gether,U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **21**:90-113.
- Gether,U. and Kobilka,B.K. 1998. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J. Biol. Chem.* **273**:17979-17982.
- Gnoth,S., Jenzsch,M., Simutis,R., and Lubbert,A. 2008a. Control of cultivation processes for recombinant protein production: a review. *Bioprocess. Biosyst. Eng* **31**:21-39.
- Gnoth,S., Jenzsch,M., Simutis,R., and Lubbert,A. 2008b. Product formation kinetics in genetically modified *E. coli* bacteria: inclusion body formation. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **31**:41-46.

- Golomb, M. and Chamberlin, M. 1974. A preliminary map of the major transcription units read by T7 RNA polymerase on the T7 and T3 bacteriophage chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **71**:760-764.
- Goetz, B.M., Nagy, J.K., Oxenoid, K., Lonzer, W.L., Cafiso, D.S., and Sanders, C.R. 1999. Reconstitutive refolding of diacylglycerol kinase, an integral membrane protein. *Biochemistry* **38**:16373-16382.
- Gouldson, P.R., Higgs, C., Smith, R.E., Dean, M.K., Gkoutos, G.V., and Reynolds, C.A. 2000. Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study. *Neuropsychopharmacology*. **23**:S60-S77.
- Grauschopf, U., Lilie, H., Honold, K., Wozny, M., Reusch, D., Esswein, A., Schafer, W., Rucknagel, K.P., and Rudolph, R. 2000. The N-terminal fragment of human parathyroid hormone receptor 1 constitutes a hormone binding domain and reveals a distinct disulfide pattern. *Biochemistry* **39**:8878-8887.
- Grisshammer, R. and Tate, C.G. 1995. Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q. Rev. Biophys.* **28**:315-422.
- Grisshammer, R. and Tucker, J. 1997. Quantitative evaluation of neurotensin receptor purification by immobilized metal affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* **11**:53-60.
- Grobner, G., Glaubitz, C., and Watts, A. 1999. Probing membrane surfaces and the location of membrane-embedded peptides by ¹³C MAS NMR using lanthanide ions. *J. Magn Reson.* **141**:335-339.
- Grundemar, L. 1997. Characterization of the receptor response for the neuropeptide Y-evoked suppression of parasympathetically-mediated contractions in the guinea pig trachea. *Regul. Pept.* **71**:97-101.
- Hampe, W., Voss, R.H., Haase, W., Boege, F., Michel, H., and Reilander, H. 2000. Engineering of a proteolytically stable human beta 2-adrenergic receptor/maltose-binding protein fusion and production of the chimeric protein in Escherichia coli and baculovirus-infected insect cells. *J. Biotechnol.* **77**:219-234.
- Hanson, M.A. and Stevens, R.C. 2009. Discovery of new GPCR biology: one receptor structure at a time. *Structure.* **17**:8-14.
- Harding, P.J., Attrill, H., Boehringer, J., Ross, S., Wadhams, G.H., Smith, E., Armitage, J.P., and Watts, A. 2009. Constitutive dimerization of the G-protein coupled receptor, neurotensin receptor 1, reconstituted into phospholipid bilayers. *Biophys. J.* **96**:964-973.
- Harding, P.J., Attrill, H., Ross, S., Koeppe, J.R., Kapanidis, A.N., and Watts, A. 2007. Neurotensin receptor type 1: Escherichia coli expression, purification, characterization and biophysical study. *Biochem. Soc. Trans.* **35**:760-763.
- Heck, M. and Hofmann, K.P. 2001. Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin-catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism. *J. Biol. Chem.* **276**:10000-10009.
- Heilig, M. 2004. The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropeptides* **38**:213-224.
- Hiller, S., Garces, R.G., Malia, T.J., Orekhov, V.Y., Colombini, M., and Wagner, G. 2008. Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles. *Science* **321**:1206-1210.

- Hirsch, I. 2007. Rekonstitution von humanen Neuropeptid Y-Rezeptoren (Typ II) in Liposomen. *Diplomarbeit im Institut für Biochemie/Biotechnologie der MLU-Halle-Wittenberg*.
- Ho, J.T., White, J.F., Grisshammer, R., and Hess, S. 2008. Analysis of a G protein-coupled receptor for neurotensin by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **376**:13-24.
- Hopkins, A.L. and Groom, C.R. 2002. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**:727-730.
- Huster, D. 2005. Investigations of the structure and dynamics of membrane-associated peptides by magic angle spinning NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **46**:79-107.
- Huster, D., Arnold, K., and Gawrisch, K. 1998. Influence of docosahexaenoic acid and cholesterol on lateral lipid organization in phospholipid mixtures. *Biochemistry* **37**:17299-17308.
- Inui, A. 1999. Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved? *Trends Pharmacol. Sci.* **20**:43-46.
- Ishihara, G., Goto, M., Saeki, M., Ito, K., Hori, T., Kigawa, T., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. 2005. Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors. *Protein Expr. Purif.* **41**:27-37.
- Ishii, Y., Balbach, J.J., and Tycko, R. 2001. Measurement of dipole-coupled lineshapes in a many-spin system by constant-time two-dimensional solid state NMR with high-speed magic-angle spinning. *Chemical Physics* **266**:231-236.
- Jaakola, V.P., Griffith, M.T., Hanson, M.A., Cherezov, V., Chien, E.Y., Lane, J.R., Ijzerman, A.P., and Stevens, R.C. 2008. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **322**:1211-1217.
- Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., and Seuwen, K. 2006. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem.* **1**:761-782.
- Jaroniec, C.P., Tounge, B.A., Herzfeld, J., and Griffin, R.G. 2001. Frequency selective heteronuclear dipolar recoupling in rotating solids: accurate (^{13}C) - (^{15}N) distance measurements in uniformly (^{13}C) , (^{15}N) -labeled peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **123**:3507-3519.
- Jenzsch, M., Simutis, R., Eisbrenner, G., Stuckrath, I., and Lubbert, A. 2006a. Estimation of biomass concentrations in fermentation processes for recombinant protein production. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **29**:19-27.
- Jenzsch, M., Simutis, R., and Lubbert, A. 2006b. Generic model control of the specific growth rate in recombinant *Escherichia coli* cultivations. *J. Biotechnol.* **122**:483-493.
- Jinde, S., Masui, A., Morinobu, S., Noda, A., and Kato, N. 2002. Differential changes in messenger RNA expressions and binding sites of neuropeptide Y Y1, Y2 and Y5 receptors in the hippocampus of an epileptic mutant rat: Noda epileptic rat. *Neuroscience* **115**:1035-1045.
- Kamitani, S. and Sakata, T. 2001. Glycosylation of human CRLR at Asn123 is required for ligand binding and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1539**:131-139.
- Kaushal, S., Ridge, K.D., and Khorana, H.G. 1994. Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**:4024-4028.

- Kiefer,H., Krieger,J., Olszewski,J.D., Von,H.G., Prestwich,G.D., and Breer,H. 1996. Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli*: purification, reconstitution, and ligand binding. *Biochemistry* **35**:16077-16084.
- Kiefer,H., Maier,K., and Vogel,R. 1999. Refolding of G-protein-coupled receptors from inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* **27**:908-912.
- Kim,T.K., Zhang,R., Feng,W., Cai,J., Pierce,W., and Song,Z.H. 2005. Expression and characterization of human CB1 cannabinoid receptor in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **40**:60-70.
- Klammt,C., Srivastava,A., Eifler,N., Junge,F., Beyermann,M., Schwarz,D., Michel,H., Doetsch,V., and Bernhard,F. 2007. Functional analysis of cell-free-produced human endothelin B receptor reveals transmembrane segment 1 as an essential area for ET-1 binding and homodimer formation. *FEBS J.* **274**:3257-3269.
- Kobilka,B.K. 1995. Amino and carboxyl terminal modifications to facilitate the production and purification of a G protein-coupled receptor. *Anal. Biochem.* **231**:269-271.
- Kobilka,B.K. and Deupi,X. 2007. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**:397-406.
- Koglin,A., Klammt,C., Trbovic,N., Schwarz,D., Schneider,B., Schafer,B., Lohr,F., Bernhard,F., and Dotsch,V. 2006. Combination of cell-free expression and NMR spectroscopy as a new approach for structural investigation of membrane proteins. *Magn Reson. Chem.* **44 Spec No**:S17-S23.
- Kolakowski,L.F., Jr. 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors. Channels* **2**:1-7.
- Korner,M. and Reubi,J.C. 2008. Neuropeptide Y receptors in primary human brain tumors: overexpression in high-grade tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **67**:741-749.
- Kost,T.A., Condreay,J.P., and Jarvis,D.L. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **23**:567-575.
- Krepkiy,D., Gawrisch,K., and Yeliseev,A. 2007. Expression and purification of CB2 for NMR studies in micellar solution. *Protein Pept. Lett.* **14**:1031-1037.
- Kuhn,B. and Gudermann,T. 1999. The luteinizing hormone receptor activates phospholipase C via preferential coupling to Gi2. *Biochemistry* **38**:12490-12498.
- Kusui,T., Benya,R.V., Battey,J.F., and Jensen,R.T. 1994. Glycosylation of bombesin receptors: characterization, effect on binding, and G-protein coupling. *Biochemistry* **33**:12968-12980.
- Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Lange,C. and Rudolph,R. 2005. Production of Recombinant Proteins for Therapy, Diagnostics and Industrial Research by in Vitro Folding. *Protein Folding Handbook Vol. 5*. Edited by Buchner J. & Kiefhaber T., WILEY-VCH GmbH&Co. KGaA
- Larhammar,D. and Salaneck,E. 2004. Molecular evolution of NPY receptor subtypes. *Neuropeptides* **38**:141-151.
- Lilie,H., Schwarz,E., and Rudolph,R. 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**:497-501.

- Lindner,D., Stichel,J., and Beck-Sickinger,A.G. 2008a. Molecular recognition of the NPY hormone family by their receptors. *Nutrition* **24**:907-917.
- Lindner,D., van,D.J., Merten,N., Morl,K., Gunther,R., Hofmann,H.J., and Beck-Sickinger,A.G. 2008b. GPC receptors and not ligands decide the binding mode in neuropeptide Y multireceptor/multiligand system. *Biochemistry* **47**:5905-5914.
- Malia,T.J. and Wagner,G. 2007. NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-xL. *Biochemistry* **46**:514-525.
- Marston,F.A. 1986. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli. *Biochem. J.* **240**:1-12.
- McCusker,E. and Robinson,A.S. 2008. Refolding of G protein alpha subunits from inclusion bodies expressed in Escherichia coli. *Protein Expr. Purif.* **58**:342-355.
- McCusker,E.C., Bane,S.E., O'Malley,M.A., and Robinson,A.S. 2007. Heterologous GPCR expression: a bottleneck to obtaining crystal structures. *Biotechnol. Prog.* **23**:540-547.
- McKinstry,W.J., Polekhina,G., efenbach-Jagger,H., Sato,K., Onuma,E., Gillespie,M.T., Martin,T.J., and Parker,M.W. 2009. Crystallization of the receptor-binding domain of parathyroid hormone-related protein in complex with a neutralizing monoclonal antibody Fab fragment. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **65**:336-338.
- Merten,N., Lindner,D., Rabe,N., Rompler,H., Morl,K., Schoneberg,T., and Beck-Sickinger,A.G. 2007. Receptor subtype-specific docking of Asp6.59 with C-terminal arginine residues in Y receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **282**:7543-7551.
- Michalke,K., Graviere,M.E., Huyghe,C., Vincentelli,R., Wagner,R., Pattus,F., Schroeder,K., Oschmann,J., Rudolph,R., Cambillau,C., and Desmyter,A. 2009. Mammalian G-protein-coupled receptor expression in Escherichia coli: I. High-throughput large-scale production as inclusion bodies. *Anal. Biochem.* **386**:147-155.
- Michel,M.C., Beck-Sickinger,A., Cox,H., Doods,H.N., Herzog,H., Larhammar,D., Quirion,R., Schwartz,T., and Westfall,T. 1998. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol. Rev.* **50**:143-150.
- Michel,M.C., Gaida,W., Beck-Sickinger,A.G., Wieland,H.A., Doods,H., Durr,H., Jung,G., and Schnorrenberg,G. 1992. Further characterization of neuropeptide Y receptor subtypes using centrally truncated analogs of neuropeptide Y: evidence for subtype-differentiating effects on affinity and intrinsic efficacy. *Mol. Pharmacol.* **42**:642-648.
- Milligan,G. 2009. G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. *Br. J. Pharmacol.* **157**:20-30.
- Moller,J.V. and le Maire,M. 1993. Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **268**:18659-18672.
- Morris,M.J., Gannan,E., Stroud,L.M., Beck-Sickinger,A.G., and O'Brien,T.J. 2007. Neuropeptide Y suppresses absence seizures in a genetic rat model primarily through effects on Y receptors. *Eur. J. Neurosci.* **25**:1136-1143.
- Mullis,K.B. and Faloona,F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.

- Murray,D., Ben-Tal,N., Honig,B., and McLaughlin,S. 1997. Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure* **5**:985-989.
- Neumoin,A., Cohen,L.S., Arshava,B., Tantry,S., Becker,J.M., Zerbe,O., and Naider,F. 2009. Structure of a double transmembrane fragment of a G-protein-coupled receptor in micelles. *Biophys. J.* **96**:3187-3196.
- Niebauer,R.T. and Robinson,A.S. 2006. Exceptional total and functional yields of the human adenosine (A2a) receptor expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr. Purif.* **46**:204-211.
- Nilsson,T., Lind,H., Brunkvall,J., and Edvinsson,L. 2000. Vasodilation in human subcutaneous arteries induced by neuropeptide Y is mediated by neuropeptide Y Y1 receptors and is nitric oxide dependent. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **78**:251-255.
- O'Malley,M.A., Lazarova,T., Britton,Z.T., and Robinson,A.S. 2007. High-level expression in *Saccharomyces cerevisiae* enables isolation and spectroscopic characterization of functional human adenosine A2a receptor. *J. Struct. Biol.* **159**:166-178.
- Palczewski,K. 2006. G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu. Rev. Biochem.* **75**:743-767.
- Palczewski,K., Kumasaka,T., Hori,T., Behnke,C.A., Motoshima,H., Fox,B.A., Le,T., I, Teller,D.C., Okada,T., Stenkamp,R.E., Yamamoto,M., and Miyano,M. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**:739-745.
- Park,S.H., Prytulla,S., De Angelis,A.A., Brown,J.M., Kiefer,H., and Opella,S.J. 2006. High-resolution NMR spectroscopy of a GPCR in aligned bicelles. *J. Am. Chem. Soc.* **128**:7402-7403.
- Parker,S.L. and Balasubramaniam,A. 2008. Neuropeptide Y Y2 receptor in health and disease. *Br. J. Pharmacol.* **153**:420-431.
- Pawate,S., Schey,K.L., Meier,G.P., Ullian,M.E., Mais,D.E., and Halushka,P.V. 1998. Expression, characterization, and purification of C-terminally hexahistidine-tagged thromboxane A2 receptors. *J. Biol. Chem.* **273**:22753-22760.
- Portier,C. 1980. Isolation of a polynucleotide phosphorylase mutant using a kanamycin resistant determinant. *Mol. Gen. Genet.* **178**:343-349.
- Probst,W.C., Snyder,L.A., Schuster,D.I., Brosius,J., and Sealfon,S.C. 1992. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* **11**:1-20.
- Puett,D., Li,Y., DeMars,G., Angelova,K., and Fanelli,F. 2007. A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. *Mol. Cell Endocrinol.* **260-262**:126-136.
- Purdue,B.W., Tilakaratne,N., and Sexton,P.M. 2002. Molecular pharmacology of the calcitonin receptor. *Receptors. Channels* **8**:243-255.
- Rasmussen,S.G., Choi,H.J., Rosenbaum,D.M., Kobilka,T.S., Thian,F.S., Edwards,P.C., Burghammer,M., Ratnala,V.R., Sanishvili,R., Fischetti,R.F., Schertler,G.F., Weis,W.I., and Kobilka,B.K. 2007. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* **450**:383-387.
- Ratnala,V.R., Swarts,H.G., VanOostrum,J., Leurs,R., DeGroot,H.J., Bakker,R.A., and DeGrip,W.J. 2004. Large-scale overproduction, functional purification and ligand affinities of the His-tagged human histamine H1 receptor. *Eur. J. Biochem.* **271**:2636-2646.

- Reffay, M., Gambin, Y., Benabdelhak, H., Phan, G., Taulier, N., Ducruix, A., Hodges, R.S., and Urbach, W. 2009. Tracking membrane protein association in model membranes. *PLoS ONE*. **4**:e5035.
- Rigaud, J.L., Mosser, G., Lacapere, J.J., Olofsson, A., Levy, D., and Ranck, J.L. 1997. Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. *J. Struct. Biol.* **118**:226-235.
- Rigaud, J.L., Paternostre, M.T., and Bluzat, A. 1988. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **27**:2677-2688.
- Rigaud, J.L., Pitard, B., and Levy, D. 1995. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1231**:223-246.
- Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Yao, X.J., Weis, W.I., Stevens, R.C., and Kobilka, B.K. 2007. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* **318**:1266-1273.
- Rozema, D. and Gellman, S.H. 1996. Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme: modulation of the competition between renaturation and aggregation. *Biochemistry* **35**:15760-15771.
- Rudolph, R. and Lilie, H. 1996. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**:49-56.
- Runge, S., Schimmer, S., Oschmann, J., Schiodt, C.B., Knudsen, S.M., Jeppesen, C.B., Madsen, K., Lau, J., Thogersen, H., and Rudolph, R. 2007. Differential structural properties of GLP-1 and exendin-4 determine their relative affinity for the GLP-1 receptor N-terminal extracellular domain. *Biochemistry* **46**:5830-5840.
- Salom, D., Lodowski, D.T., Stenkamp, R.E., Le, T., I, Golczak, M., Jastrzebska, B., Harris, T., Ballesteros, J.A., and Palczewski, K. 2006. Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:16123-16128.
- Sambi, B.S., Hains, M.D., Waters, C.M., Connell, M.C., Willard, F.S., Kimple, A.J., Pyne, S., Siderovski, D.P., and Pyne, N.J. 2006. The effect of RGS12 on PDGFbeta receptor signalling to p42/p44 mitogen activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Signal.* **18**:971-981.
- Sarramegn, V., Muller, I., Milon, A., and Talmont, F. 2006. Recombinant G protein-coupled receptors from expression to renaturation: a challenge towards structure. *Cell Mol. Life Sci.* **63**:1149-1164.
- Sarramegna, V., Muller, I., Mousseau, G., Froment, C., Monsarrat, B., Milon, A., and Talmont, F. 2005. Solubilization, purification, and mass spectrometry analysis of the human mu-opioid receptor expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **43**:85-93.
- Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P., and Milon, A. 2003. Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. *Cell Mol. Life Sci.* **60**:1529-1546.
- Sawano, H., Koumoto, Y., Ohta, K., Sasaki, Y., Segawa, S., and Tachibana, H. 1992. Efficient in vitro folding of the three-disulfide derivatives of hen lysozyme in the presence of glycerol. *FEBS Lett.* **303**:11-14.
- Schaffner, W. and Weissmann, C. 1973. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* **56**:502-514.
- Schulz, A. and Schoneberg, T. 2003. The structural evolution of a P2Y-like G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **278**:35531-35541.

- Schurholz, T. 1996. Critical dependence of the solubilization of lipid vesicles by the detergent CHAPS on the lipid composition. Functional reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor into preformed vesicles above the critical micellization concentration. *Biophys. Chem.* **58**:87-96.
- Seddon, A.M., Curnow, P., and Booth, P.J. 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**:105-117.
- Shimizu, Y., Kuruma, Y., Ying, B.W., Umekage, S., and Ueda, T. 2006. Cell-free translation systems for protein engineering. *FEBS J.* **273**:4133-4140.
- Shukla, A.K., Haase, W., Reinhart, C., and Michel, H. 2006. Biochemical and pharmacological characterization of the human bradykinin subtype 2 receptor produced in mammalian cells using the Semliki Forest virus system. *Biol. Chem.* **387**:569-576.
- Silva, A.P., Lourenco, J., Xapelli, S., Ferreira, R., Kristiansen, H., Woldbye, D.P., Oliveira, C.R., and Malva, J.O. 2007. Protein kinase C activity blocks neuropeptide Y-mediated inhibition of glutamate release and contributes to excitability of the hippocampus in status epilepticus. *FASEB J.* **21**:671-681.
- Silva, A.P., Pinheiro, P.S., Carvalho, A.P., Carvalho, C.M., Jakobsen, B., Zimmer, J., and Malva, J.O. 2003. Activation of neuropeptide Y receptors is neuroprotective against excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *FASEB J.* **17**:1118-1120.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**:720-731.
- Soubias, O., Polozov, I.V., Teague, W.E., Yeliseev, A.A., and Gawrisch, K. 2006. Functional reconstitution of rhodopsin into tubular lipid bilayers supported by nanoporous media. *Biochemistry*. **45**:15583-15590.
- Stark, R.E., Leff, P.D., Milheim, S.G., and Kropf, A. 1984. Physical Studies of Chaps, A New Detergent for the Study of Visual Pigments. *Journal of Physical Chemistry* **88**:6063-6067.
- Stevens, T.J. and Arkin, I.T. 2000. Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins* **39**:417-420.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. 1986. Use of Bacteriophage-T7 Rna-Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *Journal of Molecular Biology* **189**:113-130.
- Surrey, T. and Jahnig, F. 1992. Refolding and oriented insertion of a membrane protein into a lipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:7457-7461.
- Surrey, T., Schmid, A., and Jahnig, F. 1996. Folding and membrane insertion of the trimeric beta-barrel protein OmpF. *Biochemistry* **35**:2283-2288.
- Tayyab, S., Ahmad, B., Kumar, Y., and Khan, M.M. 2002. Salt-induced refolding in different domains of partially folded bovine serum albumin. *Int. J. Biol. Macromol.* **30**:17-22.
- Teller, D.C., Okada, T., Behnke, C.A., Palczewski, K., and Stenkamp, R.E. 2001. Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Biochemistry* **40**:7761-7772.
- Thomas, L., Scheidt, H.A., Bettio, A., Huster, D., Beck-Sickinger, A.G., Arnold, K., and Zschornig, O. 2005. Membrane interaction of neuropeptide Y detected by EPR and NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1714**:103-113.
- Torres, J., Stevens, T.J., and Samso, M. 2003. Membrane proteins: the 'Wild West' of structural biology. *Trends Biochem. Sci.* **28**:137-144.

- Trbovic,N., Klammt,C., Koglin,A., Lohr,F., Bernhard,F., and Dotsch,V. 2005. Efficient strategy for the rapid backbone assignment of membrane proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **127**:13504-13505.
- Tsamaloukas,A.D., Beck,A., and Heerklotz,H. 2009. Modeling the micellization behavior of mixed and pure n-alkyl-maltosides. *Langmuir*. **25**:4393-4401.
- Tschop,M. et al. 2004. Physiology: does gut hormone PYY3-36 decrease food intake in rodents? *Nature* **430**:1.
- Tucker,J. and Grisshammer,R. 1996. Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **317 (Pt 3)**:891-899.
- Ulloa-Aguirre,A. and Conn,P.M. 2009. Targeting of G protein-coupled receptors to the plasma membrane in health and disease. *Front Biosci.* **14**:973-994.
- Venter,J.C. et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* **291**:1304-1351.
- Vidi,P.A., Chen,J., Irudayaraj,J.M., and Watts,V.J. 2008. Adenosine A(2A) receptors assemble into higher-order oligomers at the plasma membrane. *FEBS Lett.* **582**:3985-3990.
- Wagner,K., Beck-Sickinger,A.G., and Huster,D. 2004. Structural investigations of a human calcitonin-derived carrier peptide in a membrane environment by solid-state NMR. *Biochemistry*. **43**:12459-12468.
- Wagner,S., Klepsch,M.M., Schlegel,S., Appel,A., Draheim,R., Tarry,M., Hogbom,M., van Wijk,K.J., Slotboom,D.J., Persson,J.O., and de Gier,J.W. 2008. Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:14371-14376.
- Warne,T., Chirnside,J., and Schertler,G.F. 2003. Expression and purification of truncated, non-glycosylated turkey beta-adrenergic receptors for crystallization. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**:133-140.
- Warne,T., Serrano-Vega,M.J., Baker,J.G., Moukhametzianov,R., Edwards,P.C., Henderson,R., Leslie,A.G., Tate,C.G., and Schertler,G.F. 2008. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**:486-491.
- Watts,A. 2005. Solid-state NMR in drug design and discovery for membrane-embedded targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**:555-568.
- Wedekind,A., O'Malley,M.A., Niebauer,R.T., and Robinson,A.S. 2006. Optimization of the human adenosine A2a receptor yields in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* **22**:1249-1255.
- Weiss,H.M. and Grisshammer,R. 2002. Purification and characterization of the human adenosine A(2a) receptor functionally expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **269**:82-92.
- Werner,K., Richter,C., Klein-Seetharaman,J., and Schwalbe,H. 2008. Isotope labeling of mammalian GPCRs in HEK293 cells and characterization of the C-terminus of bovine rhodopsin by high resolution liquid NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **40**:49-53.
- Wesley,U.V., McGroarty,M., and Homoyouni,A. 2005. Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway. *Cancer Res.* **65**:1325-1334.
- White,J.F., Trinh,L.B., Shiloach,J., and Grisshammer,R. 2004. Automated large-scale purification of a G protein-coupled receptor for neurotensin. *FEBS Lett.* **564**:289-293.

-
- White,S.H., Ladokhin,A.S., Jayasinghe,S., and Hristova,K. 2001. How membranes shape protein structure. *J. Biol. Chem.* **276**:32395-32398.
- Winter,J., Lilie,H., and Rudolph,R. 2002. Renaturation of human proinsulin--a study on refolding and conversion to insulin. *Anal. Biochem.* **310**:148-155.
- Woldbye,D.P., Nanobashvili,A., Sorensen,A.T., Husum,H., Bolwig,T.G., Sorensen,G., Ernfors,P., and Kokaia,M. 2005. Differential suppression of seizures via Y2 and Y5 neuropeptide Y receptors. *Neurobiol. Dis.* **20**:760-772.
- Yeagle,P.L. and Albert,A.D. 2003. A conformational trigger for activation of a G protein by a G protein-coupled receptor. *Biochemistry* **42**:1365-1368.
- Yeliseev,A.A., Wong,K.K., Soubias,O., and Gawrisch,K. 2005. Expression of human peripheral cannabinoid receptor for structural studies. *Protein Sci.* **14**:2638-2653.
- Zou,C., Naider,F., and Zerbe,O. 2008. Biosynthesis and NMR-studies of a double transmembrane domain from the Y4 receptor, a human GPCR. *J. Biomol. NMR* **42**:257-269.

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Huster. Durch sein fortwährendes Vertrauen in meine Fähigkeiten, absolute Freiheiten bei der Bearbeitung der Aufgabenstellung, gezielte Motivation und Anregungen in frustrierenden Phasen der Arbeit, sowie stetige Förderung wissenschaftlicher und nicht-wissenschaftlicher Kompetenzen schaffte er ein optimales Umfeld.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Rainer Rudolph und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Susann Schimmer, für das stetige Interesse an meiner Arbeit und die nötige Unterstützung bei der Einarbeitung in biochemische Methoden bedanken.

Im Rahmen des SFB-610 gab es über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit eine sehr angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger und Dr. Diana Lindner in allen Fragen zum Y2-Rezeptor und NPY, dafür meinen herzlichen Dank.

Die gute Seele dieses Projektes war Cindy Montag, sie verstand es in schwierigen Phasen zu motivieren und in guten Phasen zu hinterfragen. Dafür und für die absolute Vertrauenswürdigkeit bei der Lösung von Problemen innerhalb und außerhalb des Projektes gilt mein ganz besonderer Dank ihr.

Großer Dank gebührt allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit, insbesondere Dr. Andreas Bunge für die Hilfe bei den HSQC-NMR-Messungen und der Vorbildfunktion in Sachen wissenschaftliches Arbeiten, Dr. Holger Scheidt für die Durchführung der MAS-NMR-Messungen und die Simulation der Spektren anderer GPCRs, sowie Christian Berger für die Adaption und Kultivierung der Zellen in Mineralsalzmedium.

Ein ganz lieber Dank an meine ehemaligen Diplomanten und Praktikanten Dipl.-Biochem. Sandra Berndt, Dipl.-Biochem. Irina Hirsch, Katja Schulze und Sarah Herzog, deren Ergebnisse maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Des Weiteren möchte ich Dr. Jan Stichel und der AG Prof. Andrea Sinz für die Identifizierung des Rezeptors mittels MALDI danken.

Dem Exzellenznetzwerk-Biowissenschaften Sachsen-Anhalt und dem SFB-610 danke für die finanzielle Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Partnerin Diane für die notwendige Rechtschreibkorrektur der Arbeit und die uneingeschränkte Unterstützung, und an meine Kinder Oliver und Marten.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Dissertation oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen oder von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Halle, 16. Juni 2009

Peter Schmidt

Wissenschaftlicher Werdegang

Name: Peter Schmidt
Geburtsdatum: 09. August 1978
Geburtsort: Neubrandenburg
Familienstand: ledig

2001-2006 Studium der Bioverfahrenstechnik, Fakultät Ingenieurwissenschaften,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2005-2006 Diplomarbeit bei der ScilProteins GmbH, Halle

2006 Abschluss des Studiums als Diplom Ingenieur

2006-2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Nachwuchsgruppe
„Strukturbiologie von Membranproteinen“, Institut für Biochemie/
Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

seit 2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für medizinische Physik
und Biophysik, Universität Leipzig

Liste der Publikationen

Zeitschriftenartikel

Vieler, A., Scheidt, H.A., Schmidt, P., Montag, C., Nowoisky, JF., Lohr, M., Wilhelm, C., Huster, D., and Goss, R. 2008. The influence of phase transitions in phosphatidylethanolamine models on the activity of violaxanthin de-epoxidase. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1027-34.

Schmidt, P., Lindner, D., Montag, C., Berndt, S., Beck-Sickinger, A.G., Rudolph, R., and Huster, D. 2009. Prokaryotic Expression, in vitro Folding, and Molecular Pharmacological Characterization of the Neuropeptide Y Receptor Type 2. *Biotech Progr.*: im Druck.

Schimmer, S.,* Lindner, D.,* Schmidt, P.,* Beck-Sickinger, A.G., Huster, D., and Rudolph, R. 2009. Functional Characterization of in vitro Folded Human Y1 Receptor in Lipid Environment. *Protein and Peptide Letters*: eingereicht

*Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Veröffentlichung beigetragen.

Ausgewählte Vorträge

Schmidt, P., Lindner, D., Schimmer, S., Montag, C., Rudolph, R., Beck-Sickinger, A.G., and Huster, D. 2007. Functional characterization of human neuropeptide Y receptors expressed in *e. coli*. 6th EBSA & British Biophysical Society Congress, London, U.K.

Schmidt, P., Lindner, D., Montag, C., Beck-Sickinger, A.G., and Huster, D. 2007. Expression, Purification and Functional Characterization of Class A GPCRs. *Klausurtagung ZIK haloMEM, Freyburg*

Schmidt, P., Berger, C., Lindner, D., Thor, D., Schöneberg, T., Beck-Sickinger, A.G., and Huster, D. 2008. Recombinant Expression of G-Protein Coupled Receptors (GPCRs) for Structural Studies. *Exzellenznetzwerk-Biowissenschaften Gesamtarbeitsbesprechung, Halle*

Schmidt, P., Bunge, A., Lindner, D., Berndt, S., Berger, C., Beck-Sickinger, A.G., and Huster, D. 2009. NMR Measurements of Recombinant Expressed Human Neuropeptide Y2-Receptor. *SFB-610 Workshop, Oppurg*

Poster

Schmidt, P., Montag, C., Schimmer, S., Magg, C., Beck-Sickinger, A.G., Rudolph, R., and Huster, D. 2006. Recombinant production of Neuropeptide Y receptors in E. coli for structural studies with solid state NMR. 5. *Biotechnologietag der Universität Leipzig, Leipzig*

Schmidt, P., Lindner, D., Schimmer, S., Montag, C., Rudolph, R., Beck-Sickinger, A.G., and Huster, D. 2007. Functional characterization of human neuropeptide Y receptors expressed in e. coli. 6th *EBSA & British Biophysical Society Congress, London, U.K.*

Schmidt, P., Schimmer, S., Lindner, D., Hirsch, I., Beck-Sickinger, A.G., Rudolph, R., and Huster, D. 2008. Membrane Reconstitution of Functionally Refolded Human Y Receptor Type 2. *Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysics Congress (IUPAB), Long Beach, USA*

Schmidt, P., Bunge, A., Montag, C., Berger, C., Beck-Sickinger, A.G., and Huster, D. 2008. Bestimmung der Struktur und Dynamik von rezeptorgebundenem Neuropeptid Y mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie I. *SFB-610 Evaluierung, Leipzig*

Schmidt, P., Scheidt, H.A., Montag, C., Berger, C., and Vogel, A. 2008. Solid-State-NMR Studies of the Structure and Dynamics of Receptor-Bound Neuropeptide Y. *Exzellenznetzwerk-Biowissenschaften Zwischenevaluierung, Halle*

Schmidt, P., Berndt, S., Montag, C. and Huster, D. 2009. Reconstitution of an in vitro folded GPCR for structural studies via MAS-NMR. 2. *Sächsischer Biotechnologietag, Leipzig* (1. Posterpreis)