

Etablierung und Optimierung
von *in vivo*- und *in vitro*-Systemen
zur Erhöhung der Produktion sowie zur Stabilisierung
der humanen Dopaminrezeptoren D₂ und D₃

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT)
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Vanessa Frieda Boritzki

aus Weingarten

Bayreuth, 2020

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2016 bis Juli 2020 in Bayreuth am Lehrstuhl Biochemie IV unter Betreuung von Frau Professor Dr. Birgitta M. Wöhl angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Dissertation eingereicht am: 08.07.2020

Zulassung durch das Leitungsgremium: 16.07.2020

Wissenschaftliches Kolloquium: 19.10.2020

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Markus Lippitz

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Birgitta Wöhl (Gutachterin)

Prof. Dr. Andreas Möglich (Gutachter)

Prof. Dr. Matthias Ullmann (Vorsitz)

Prof. Dr. Gerrit Begemann

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	3
3. Einleitung	5
3.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren	5
3.2 Dopaminrezeptoren	9
3.2.1 Signalwege	11
3.2.2 Strukturen des D ₂ - und D ₃ -Rezeptors.....	12
3.3 <i>In vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Expressionssysteme zur Herstellung rekombinanter GPCRs ..	14
3.3.1 Insektenzellen als Expressionswirt.....	15
3.3.2 Zellfreie Expression	17
3.3.3 Nanodiscs	19
3.3.4 <i>E. coli</i> als Expressionswirt	21
3.4 Optimierungsstrategien zur Herstellung rekombinanter GPCRs	22
3.5 Zielsetzung.....	23
4. Material und Methoden	25
4.1 Material	25
4.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte.....	25
4.1.2 Enzyme und Antikörper	27
4.1.3 DNA-Längen- und Molekulargewichtsstandards	27
4.1.4 Nährmedien und Puffer.....	28
4.1.5 Bakterienstämme.....	32
4.1.6 Plasmide	32
4.1.7 Oligodesoxyribonukleotide.....	35
4.2 Methoden.....	35
4.2.1 Klonierung der Expressionsplasmide	35
4.2.2 Klonierung der Plasmidbibliotheken	39
4.2.3 Expression des humanen Dopaminrezeptorgens in Insektenzellen.....	42
4.2.4 Reinigung des humanen Dopaminrezeptors aus Insektenzellen	44

4.2.5	Elektroporation.....	45
4.2.6	Anzucht und Induktion der Genexpression in <i>E. coli</i>	45
4.2.7	Reinigung der zytosolischen Proteine	47
4.2.8	Herstellung von Membranhomogenat aus <i>E. coli</i>	48
4.2.9	Herstellung von Nanodiscs.....	49
4.2.10	Zellfreie Expression	51
4.2.11	Expression des humanen Dopaminrezeptorgens in HEK-Zellen	52
4.2.12	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	53
4.2.13	Proteinfällung.....	53
4.2.14	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
4.2.15	Western Blot	57
4.2.16	Größenausschlusschromatographie.....	58
4.2.17	In-Lösung Proteinverdau	59
4.2.18	Radioligandenbindungstest	60
4.2.19	Durchflusszytometrie	62
5.	Ergebnisse	65
5.1	Heterologe Expression in Insektenzellen.....	65
5.1.1	Klonierung des D _{3wt} -Rezeptorgens	65
5.1.2	Synthese und Reinigung des D _{3wt} -Rezeptors	66
5.2	Herstellung von Nanodiscs	68
5.2.1	Klonierung des cMSP1E3D1-Gens	68
5.2.2	Synthese und Reinigung von cMSP1E3D1	68
5.2.3	Kovalente Verknüpfung von cMSP1E3D1	70
5.2.4	Assemblierung der Nanodiscs.....	75
5.3	Zellfreie Expression	82
5.3.1	Klonierung der Varianten.....	82
5.3.2	Nanodiscs bringen den humanen D ₃ -Rezeptor in Lösung.....	84
5.3.3	Testen der Varianten in HEK-Zellen	85
5.4	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	86
5.4.1	Expression des D _{2S} -Rezeptorgens in <i>E. coli</i>	87

5.4.2	Optimierung der Expressionsdauer des D _{2S} -Rezeptorgens	97
5.4.3	Expression des D ₃ -Rezeptorgens in <i>E. coli</i>	100
5.4.4	Optimierung der Expressionsdauer des D ₃ -Rezeptorgens	102
5.4.5	Etablierung eines Systems zur Optimierung der Proteinsynthese	105
6.	Diskussion	116
6.1	Herstellung des wildtypischen D ₃ -Rezeptors in Insektenzellen	116
6.2	Herstellung von Nanodiscs	119
6.3	Zellfreie Expression	120
6.4	<i>E. coli</i> als Expressionswirt	123
6.4.1	Synthese der wildtypischen Dopaminrezeptoren D _{2S} und D ₃	124
6.4.2	Austausch des C-terminalen Fusionsproteins	126
6.4.3	Ein stärkerer Promotor verschlechtert die Herstellung des D ₂ -Rezeptors	127
6.4.4	Aminosäuresubstitutionen steigern die Synthese der Dopaminrezeptoren	127
6.4.5	Optimierung der Expressionsdauer	128
6.4.6	Etablierung einer Strategie zur Optimierung der Proteinsynthese	130
6.5	Ausblick	135
7.	Literaturverzeichnis	138
8.	Abkürzungsverzeichnis	149
9.	Anhang	152
9.1	Verwendete Plasmide	152
9.2	Sequenzen	156
9.3	Der <i>Codon Adaption Index</i> (CAI)	163
9.4	Oligodesoxynukleotide	164
9.5	Herstellung von Nanodiscs	166
9.6	Zellfreie Expression	167
9.7	Expression in <i>E. coli</i> und Implementierung der Optimierungsstrategie	168
10.	Danksagung	185
11.	(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen	186

1. Zusammenfassung

Die humanen Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ sind integrale Membranproteine und gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Beide Rezeptoren sind im zentralen Nervensystem lokalisiert und werden durch den endogenen Liganden Dopamin stimuliert. Veränderungen im dopaminergen System, wie beispielsweise ausbleibende Bildung des endogenen Liganden oder Mutationen in den Genen der Rezeptoren, können zu schwerwiegenden neurologischen Erkrankungen führen.

Um die genauen molekularen Zusammenhänge zu verstehen und um Fehlregulationen ausgleichen zu können, ist es zwingend erforderlich, den Aktivierungsmechanismus der Rezeptoren aufzuklären und neue Medikamente zu entwickeln, die mit hoher Spezifität an die jeweiligen Rezeptor-Subtypen binden, um Nebenwirkungen auf ein Minimum zu reduzieren (Subtyp-Selektivität). Dafür werden strukturelle und biochemische Untersuchungen der beiden Dopaminrezeptoren in der aktiven Konformation benötigt. Die größte Herausforderung für die erforderlichen strukturbioologischen Analysen besteht darin, rekombinante Rezeptoren in ausreichenden Mengen (mg-Maßstab) herzustellen. Hierfür stehen verschiedene *in vivo*- und *in vitro*- Expressionssysteme zur Verfügung, welche im Rahmen dieser Arbeit für die beiden Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ geprüft wurden. Der Fokus lag darauf, die Rezeptoren ohne Fusionsproteine, wie dem T4-Lysozym, in der dritten intrazellulären Schleife (*third intracellular loop*, ICL3) zu synthetisieren, da diese Fusionen die Kopplung mit dem G-Protein beeinträchtigen und die Rezeptoren im Zuge dessen die aktive Konformation nicht einnehmen können.

Zu Beginn des Projekts war bereits bekannt, dass der wildtypische D₃-Rezeptor in hohen Mengen in Insektenzellen synthetisiert werden kann, jedoch war unklar, ob er auch funktionell daraus gereinigt werden kann. Daher wurde versucht, den D_{3wt}-Rezeptor aus Insektenzellen zu reinigen. Der Rezeptor wurde jedoch im Zuge der Reinigung proteolytisch abgebaut, wahrscheinlich durch einen Schnitt im ICL3, der ca. 25 % (~100 Aminosäuren) des Proteins ausmacht und vermutlich unstrukturiert ist.

Darüber hinaus wurde die zellfreie Expression für den D₃-Rezeptor getestet, da dieser im Gegensatz zum D₂-Rezeptor noch nicht zellfrei hergestellt wurde. Basierend auf den Erfahrungen bezüglich der Reinigung aus Insektenzellen wurde der D₃-Rezeptor modifiziert und unterschiedliche Rezeptorvarianten geprüft. Es wurden flexible Teile des D₃-Rezeptors gekürzt (N-Terminus und ICL3), um ihn für strukturbioologische Untersuchungen wie Röntgenstrukturanalyse und Kernspinresonanzspektroskopie besser zugänglich zu machen und vor proteolytischem Abbau zu schützen. Außerdem wurden Cysteine gegen Alanin bzw. Serin ausgetauscht, um Fehlfaltung aufgrund unerwünschter Disulfid-Brücken zu reduzieren.

Vor der zellfreien Expression wurden zunächst Nanodiscs hergestellt, um den Rezeptor in einer Lipidumgebung zu stabilisieren. Dafür wurde das *membrane scaffold protein* MSP1E3D1

in *Escherichia coli* (*E. coli*) produziert und gereinigt. Für die anschließende Assemblierung des MSP1E3D1 wurden unterschiedliche Phospholipide verwendet, wobei die Assemblierung mithilfe der Dialyse am erfolgreichsten war. Unter Zugabe der Nanodiscs gelang es, die hydrophoben D₃-Rezeptorvarianten während der zellfreien Expression in Lösung zu bringen. Der Hauptteil der Arbeit beschäftigte sich damit, die Synthese des D₂- und D₃-Rezeptors in *E. coli* zu optimieren, um daraus Rezeptor im mg-Maßstab für strukturelle Untersuchungen reinigen zu können, der durch Agonisten und die Kopplung mit dem G-Protein aktiviert werden kann. Beide Rezeptoren wurden erfolgreich mit N- und C-terminalem Fusionsprotein hergestellt und waren im Radioligandenbindungstest in der Lage, den Liganden [³H]Spiperon zu binden. Aminosäuresubstitutionen führten beim D₂-Rezeptor zu einer deutlich verbesserten Synthese, die es erlaubt, Rezeptor in hohen Mengen aus *E. coli* zu reinigen. Außerdem konnte für beide Rezeptoren gezeigt werden, dass eine Expression der Gene für 4h deutlich vielversprechender ist als die Expression über Nacht. Der erste Reinigungsschritt für die Rezeptoren, welcher die Isolation der Membranen aus *E. coli* beinhaltet, konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden.

Abschließend wurde für die Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ eine Strategie basierend auf gerichteter Evolution etabliert, mit welcher der Grundstein gelegt wurde, um die Synthese der rekombinanten Rezeptoren noch weiter zu steigern und um Rezeptorvarianten zu finden, die eine erhöhte Thermostabilität aufweisen.

2. Abstract

The human dopamine receptors D₂ and D₃ are integral membrane proteins and belong to the G protein-coupled receptors (GPCRs). Both receptors are located in the central nervous system and are stimulated by the endogenous ligand dopamine. Changes in the dopaminergic system, such as the lack of formation of the endogenous ligand or mutations in the genes of the receptors, can lead to serious neurological diseases.

In order to understand the exact molecular relations and to compensate for misregulation, it is absolutely necessary to elucidate the activation mechanism of the receptors and to develop new drugs that bind to the respective receptor subtypes with high specificity in order to reduce side effects to a minimum (subtype selectivity). This requires structural and biochemical investigations of the two dopamine receptors in the active conformation. The greatest challenge is to produce recombinant receptors in sufficient quantities (mg-scale) for structural biological analyses. For this purpose, different *in vivo* and *in vitro* expression systems are available, which have been tested in this work for the two dopamine receptors D₂ and D₃. One key aspect was the synthesis of the receptors without fusion proteins in the third intracellular loop (ICL3), such as T4 lysozyme, since these fusions interfere with G protein coupling and therefore the receptors cannot assume the active conformation.

At the beginning of the project it was already known that the D₃ wild-type receptor can be synthesized in high amounts in insect cells, but it was unclear whether it could also be functionally purified from them. Therefore, an attempt was made to purify the D_{3wt} receptor from insect cells. However, the receptor was degraded by proteases during purification. Probably, the receptor was cut in the ICL3, which accounts for about 25% (~100 amino acids) of the protein and is supposed to be unstructured.

In addition, cell-free expression was tested for the D₃ receptor, since in contrast to the D₂ receptor it has not yet been produced *in vitro*. Based on the experience with purification from insect cells, the D₃ receptor was modified and different receptor variants were tested. Flexible parts of the D₃ receptor were truncated (N-terminus and ICL3) to make the protein more accessible for structural studies such as X-ray and nuclear magnetic resonance spectroscopy and to protect it from proteolytic degradation. In addition, cysteines were exchanged for alanine and serine to reduce misfolding due to undesired disulfide bridges.

Before carrying out cell-free expression, nanodiscs were prepared to stabilize the receptor in a lipid environment. The membrane scaffold protein MSP1E3D1 was produced and purified from *Escherichia coli* (*E. coli*). Afterwards, different phospholipids were used for the assembly of MSP1E3D1. It was shown that the assembly was most successful using dialysis. The use of nanodiscs allowed cell-free production of the hydrophobic D₃ receptor variants in solution.

The main part of the work dealt with the optimization of the synthesis of the D₂ and D₃ receptor in *E. coli* in order to purify receptor on a mg-scale for structural studies, which can be activated

by agonists and coupling to G protein. Both receptors were produced successfully with N- and C-terminal fusion proteins and showed binding to the ligand [³H]spiperone in a radioligand binding assay. Substitution of amino acids led to a significantly improved synthesis of the D₂ receptor, which allows the purification of receptor in large quantities from *E. coli*. Furthermore, it was shown for both receptors that expression of the genes for 4h is much more promising than overnight expression. The first purification step for the receptors, which involves isolating the membranes from *E. coli*, was also performed successfully.

Finally, a strategy based on directed evolution was established for the two dopamine receptors in order to increase the synthesis of recombinant receptors further and to find receptor variants with increased thermostability.

3. Einleitung

3.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind integrale Membranproteine. Sie werden von spezifischen endogenen Liganden stimuliert und leiten Signale aus der extrazellulären Matrix durch die Kopplung mit zytosolischen G-Proteinen oder Arrestinen in die Zelle (Congreve *et al.*, 2020). Eine gestörte Signalweiterleitung von GPCRs wird mit vielen Krankheiten in Zusammenhang gebracht, so zum Beispiel Alzheimer (Zhao *et al.*, 2016), Parkinson (Huang *et al.*, 2017), Herzkrankheiten (Wang Jialu *et al.*, 2018) oder asthmatische und allergische Entzündungsreaktionen (Johnson & Druey, 2002). Ungefähr 34 % aller zurzeit erhältlichen niedermolekularen Arzneimittel (Liganden) binden an GPCRs (Santos *et al.*, 2017). Dies zeigt, wie wichtig ein genaues Verständnis dieser Proteine für die Behandlung von Krankheiten ist.

GPCRs besitzen eine Basalaktivität, bei der Signalweiterleitung auch ohne Anwesenheit eines Liganden stattfindet. Daher wird von einem dynamischen Gleichgewicht zwischen der inaktiven und der aktiven Form des Rezeptors ausgegangen, woraus sich auch das Verständnis über die Pharmakologie der GPCRs ableitet (Abb. 1). Volle Agonisten sind Liganden, die wie der endogene Ligand zur maximalen Aktivierung des Rezeptors führen. Partialagonisten hingegen sind weniger effektiv und erreichen nur eine teilweise Aktivierung des Rezeptors. Neutrale Antagonisten besetzen die orthosterische Bindetasche, die primäre Binde- und Bindungsstelle eines Liganden am Rezeptor, ohne die Basalaktivität des Rezeptors zu beeinflussen. Zuletzt gibt es inverse Agonisten, welche die Basalaktivität sogar hemmen, da sie die inaktive Form des Rezeptors bevorzugen (Wacker *et al.*, 2017; Weis & Kobilka, 2018).

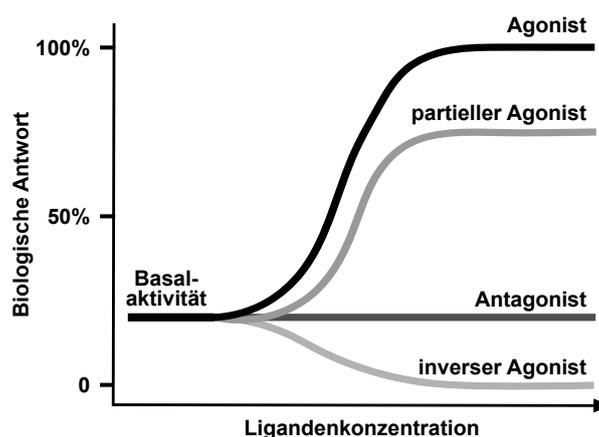


Abb. 1: Pharmakologie von GPCRs. Biologische Antwort (z.B. G-Protein-Kopplung) in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration (adaptiert nach (Wacker *et al.*, 2017)). Liganden werden in Agonisten, partielle Agonisten, Antagonisten und inverse Agonisten unterschieden.

Um neue Liganden zu synthetisieren, mit denen Fehlregulationen bei Krankheiten ausgeglichen werden können, dienen räumliche Strukturen von GPCRs in Verbindung mit ihren intrazellulären Signalproteinen als Designvorlage. Außerdem kann durch die

Strukturaufklärung auch das Wissen über die grundlegenden Mechanismen während der Aktivierung der GPCRs erweitert werden (Congreve *et al.*, 2020).

Die erste Kristallstruktur eines GPCRs (Rhodopsin) konnte im Jahr 2000 gelöst werden (PDB: 1F88), die zweite folgte sieben Jahre später mit der des humanen β_2 -adrenergen Rezeptors (PDB: 2R4R) (Palczewski *et al.*, 2000; Rasmussen *et al.*, 2007). Seitdem wurden über 370 Strukturen von 70 einzigartigen GPCRs mit unterschiedlichen Liganden und Fusionspartnern gelöst (Congreve *et al.*, 2020). GPCRs weisen sieben transmembrane Helices (TMs) als zentrales Strukturelement mit einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus auf (Abb. 2) (<https://gpcrdb.org>).

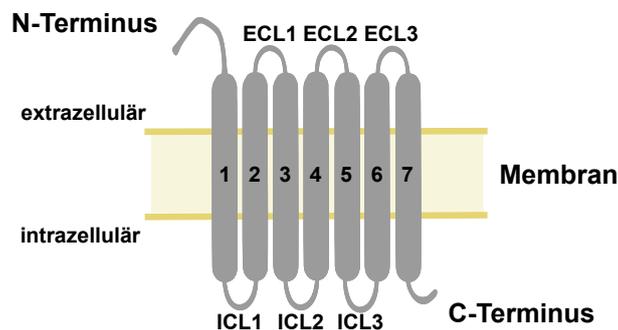


Abb. 2: Topologie der GPCRs. Die GPCRs sind aus sieben transmembranen Helices (TMs) aufgebaut, die in der Membran zu einem Bündel angeordnet sind. Die TMs sind nacheinander durch Schleifen miteinander verbunden. Die Schleifen ECL1-ECL3 befinden sich extrazellulär, die Schleifen ICL1-ICL3 intrazellulär (nach <https://gpcrdb.org> und Munk *et al.*, 2016).

Es sind zwei grundlegende Wege der Signalweiterleitung durch GPCRs bekannt, die Kopplung mit dem G-Protein und die Interaktion mit Arrestin. Das erste G-Protein (GTP-bindendes Protein) wurde in den 1970er Jahren entdeckt und charakterisiert (Ross & Gilman, 1977). Allgemein wird zwischen kleinen und heterotrimeren G-Proteinen unterschieden (Simon *et al.*, 1991). Kleine G-Proteine bestehen aus einem einzigen Peptid (~200 AS) und sind an der Regulation des Zellwachstums oder der Proteinsekretierung beteiligt. Die heterotrimeren G-Proteine bestehen hingegen aus den Untereinheiten α , β und γ (Abb. 3). Die Klassifizierung der heterotrimeren G-Proteine erfolgt jedoch nur anhand der G_α -Untereinheit in die vier Familien G_{α_s} , G_{α_i} , G_{α_q} und $G_{\alpha_{12}}$, welche wiederum weiter unterteilt werden können. Während Mitglieder der G_{α_s} -Familie den zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Signalweg stimulieren, wird dieser von Mitgliedern der G_{α_i} -Familie inhibiert. Mitglieder der G_{α_q} -Familie sind an der Regulierung der Phospholipase C (PLC) beteiligt, wohingegen Mitglieder der $G_{\alpha_{12}}$ -Familie mit dem GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) für Rho-GTPasen interagieren. Im Menschen codieren fünf Gene für die β -Untereinheit und zwölf Gene für die γ -Untereinheit, wobei ein Dimer aus einer G_β - und einer G_γ -Untereinheit immer eine funktionale Einheit bildet. Die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit ist nach der Aktivierung des G-Proteins durch den Rezeptor beispielsweise an der Regulation der PLC β und von Kalium- bzw. Calciumkanälen beteiligt. Da mehr G_{α_i} -Proteine in der Zelle vorliegen als G_{α_s} , wird vermutet, dass die Signalwege der

$G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit mit der Aktivierung des G_{α} -Proteins im Zusammenhang stehen (zusammengefasst in (Syrovatkina *et al.*, 2016)).

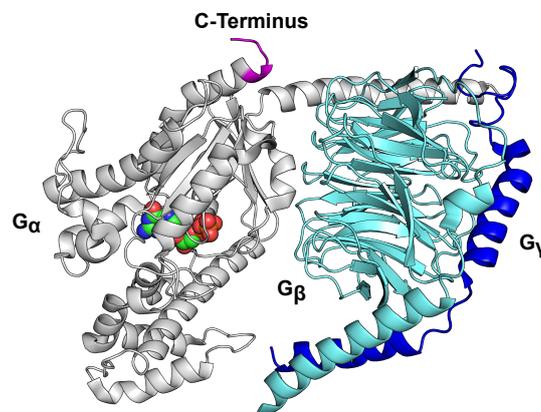


Abb. 3: Aufbau des heterotrimeren G-Proteins. Kristallstruktur des G-Proteins $G_{\alpha s}$ mit gebundenem GDP (PDB: 6EG8). G_{α} (grau), G_{β} (hellblau), G_{γ} (blau). C-Terminus der G_{α} -Untereinheit (pink) ist in der Kopplung mit dem GPCR involviert.

Das grundlegende Modell der Kopplung zwischen Rezeptor und dem heterotrimeren G-Protein (G_{α} , $G_{\beta\gamma}$) beschreibt die Bindung eines aktivierenden Liganden (Agonist) an den Rezeptor, wodurch eine Konformation des GPCRs stabilisiert wird, welche die Interaktion mit dem G-Protein ermöglicht. Dies sorgt in der G_{α} -Untereinheit für den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) mit Guanosintriphosphat (GTP) (Abb. 4). Die G_{α} -Untereinheit mit dem gebundenen GTP dissoziiert daraufhin von der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit, woraufhin diese beiden Untereinheiten separat voneinander nachgeschaltete Signalwege modulieren. Durch eine intrinsische Enzymaktivität kann die G_{α} -Untereinheit GTP zu GDP hydrolysieren, mit der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit reassoziieren und in den Ursprungszustand zurückkehren. Damit steht das G-Protein einem neuen Kopplungszyklus zur Verfügung (zusammengefasst in (Weis & Kobilka, 2018)).

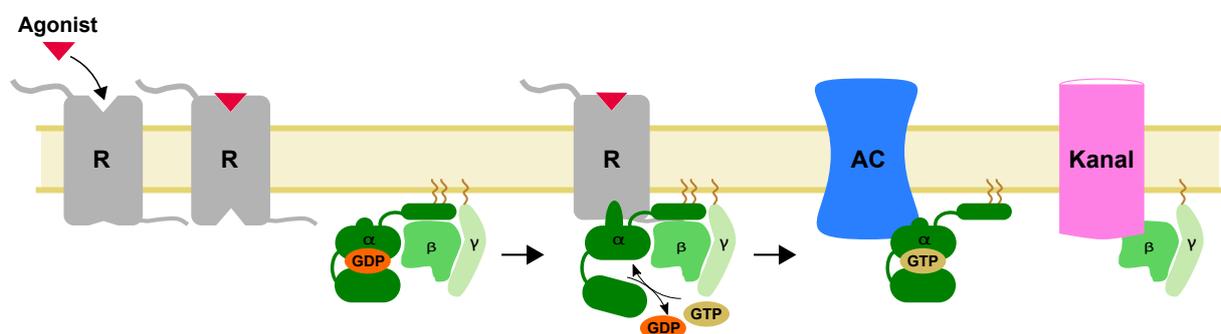


Abb. 4: Kopplung mit dem G-Protein. Ein Agonist bindet an den Rezeptor (R) und stimuliert durch eine Konformationsänderung des Rezeptors die Bindung an das G-Protein (grün, α -, β -, γ -Untereinheit). Anschließend erfolgt die Signalweiterleitung über das G-Protein. Die Untereinheiten des G-Proteins dissoziieren nach dem Austausch von GDP zu GTP und können weitere Signalproteine, wie die Adenylzyklase (AC) und Kanäle beeinflussen (adaptiert nach (Weis & Kobilka, 2018)).

Neben der Kopplung mit dem G-Protein wurde in den 1980er Jahren die Signalweiterleitung durch die Interaktion mit Arrestin entdeckt. Dieser Weg wurde in Zusammenhang mit der Desensibilisierung bzw. der Inaktivierung der Rezeptoren nachgewiesen (zusammengefasst in (Lefkowitz, 2004)). Nach dem heutigen Stand der Forschung werden die Rezeptoren durch G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs) am C-Terminus phosphoryliert, wodurch die Bindung von Arrestin an den C-Terminus ermöglicht wird (Abb. 5). Nach der anschließenden Internalisierung des Rezeptors mittels Endozytose, kann der Rezeptor entweder dephosphoryliert und recycelt oder abgebaut werden (Peterson & Luttrell, 2017; Bond *et al.*, 2019).

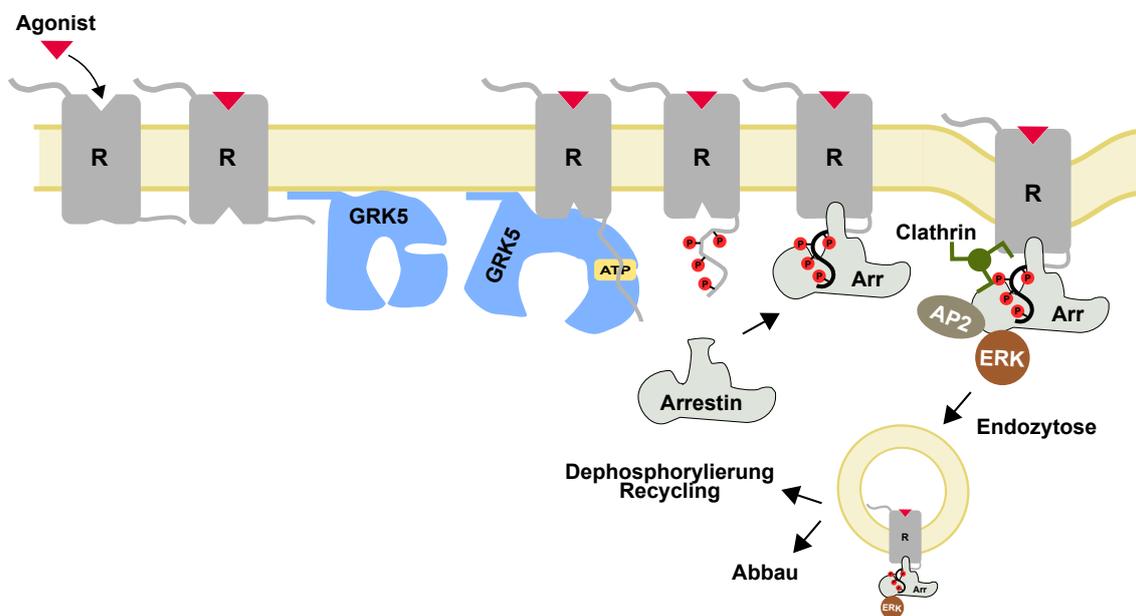


Abb. 5: Desensibilisierung bzw. Inaktivierung der GPCRs. Ein Agonist bindet an den Rezeptor (R) und stimuliert die Phosphorylierung durch die GPCR-Kinase 5 (GRK5) am C-Terminus, woraufhin die Bindung von Arrestin stattfinden kann. Anschließend sind Clathrin und das *vesicular transport adaptor protein* (AP-2) an der Bildung von Vesikeln beteiligt, welche im Rahmen der Endozytose gebildet werden. Außerdem gibt es Hinweise, dass durch diesen Signalweg auch die *extracellular-signal regulated kinases* (ERKs) reguliert werden (adaptiert nach (Weis & Kobilka, 2018)).

Was zur genauen Selektion zwischen den beiden Wegen der Signalweiterleitung führt, ist noch nicht geklärt. Es gibt für die Chemokinrezeptoren z.B. mehrere endogene Liganden, welche die Aktivierung über das G-Protein oder Arrestin unterschiedlich stark bevorzugen (Zweemer *et al.*, 2014; Amarandi *et al.*, 2016). Die Selektivität scheint demnach von der Struktur der Agonisten abhängig zu sein. Außerdem gibt es auch Hinweise, dass der Ort (Plasmamembran bzw. Golgi-Apparat) und die Kinetik (Dauer der Stimulation) Einfluss auf die Art der Signalweiterleitung nehmen (Gurevich & Gurevich, 2020; Fernandez *et al.*, 2020).

Im Menschen codieren ungefähr 800 Gene für GPCRs, wobei die Funktion vieler GPCRs bis heute ungeklärt ist. Solange der endogene Ligand eines GPCRs unbekannt ist, wird dieser als *orphan receptor* bezeichnet. Mit der Identifikation des endogenen Liganden wird der Rezeptor,

zu einer besseren Charakterisierung, einer bestimmten Klasse zugeordnet (Hill, 2006; Laschet *et al.*, 2018).

GPCRs werden in sechs Klassen (A-F) unterteilt, wobei im Menschen lediglich GPCRs aus vier Klassen (A,B,C,F) vorkommen (Hu *et al.*, 2017; Congreve *et al.*, 2020). Der Klassifizierung liegen die Sequenzen der Aminosäuren (AS) sowie funktionelle Ähnlichkeiten zu Grunde. Die größte Klasse an GPCRs (~80 %) bilden die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren (Klasse A). Sie beinhaltet GPCRs, die von Hormonen, Neurotransmittern oder Licht stimuliert werden und ist die Klasse, die bis dato am besten untersucht und verstanden ist. Auf struktureller Ebene weisen alle GPCRs dieser Klasse neben den sieben TMs, einen kurzen N-Terminus (~30 AS), eine kleine, achte Helix auf der intrazellulären Seite und ein palmitoyliertes Cystein im C-terminalen Bereich auf. Zu den GPCRs der Klasse A gehören auch die humanen Dopaminrezeptoren, welche eine tragende Rolle im zentralen Nervensystem spielen (Missale *et al.*, 1998).

3.2 Dopaminrezeptoren

Die genaue Funktionsweise der Dopaminrezeptoren sowie das dopaminerge System im Allgemeinen zu verstehen, ist überaus wichtig. Dopaminrezeptoren spielen eine wesentliche Rolle bei neurologischen Krankheiten, wie beispielsweise dem Tourette-Syndrom Schizophrenie und besonders bei der Parkinson-Krankheit (Vallone *et al.*, 2000). Die Auswirkungen auf den Organismus, wie die Beeinträchtigung der Motorik, sind auf die Degeneration von dopaminergen Neuronen und der damit verbundenen abfallenden Konzentration von Dopamin zurückzuführen (Lang & Lozano, 1998a, 1998b).

Die Existenz von Dopaminrezeptoren wurde bereits Ende der 1970er Jahre nachgewiesen (Spano *et al.*, 1978; Keabian & Calne, 1979). Biochemische und pharmakologische Untersuchungen wiesen zwei Populationen an Dopaminrezeptoren nach. Die eine Population, D₁ genannt, stimuliert die AC, während die andere Population, als D₂ bezeichnet, zur Inhibierung der AC führt. Heute sind fünf Subtypen an Dopaminrezeptoren bekannt, die aufgrund ihres Aufbaus und ihrer Funktion in die beiden Hauptgruppen D₁- bzw. D₂-ähnliche Rezeptoren eingeteilt werden (Abb. 6) (Missale *et al.*, 1998).

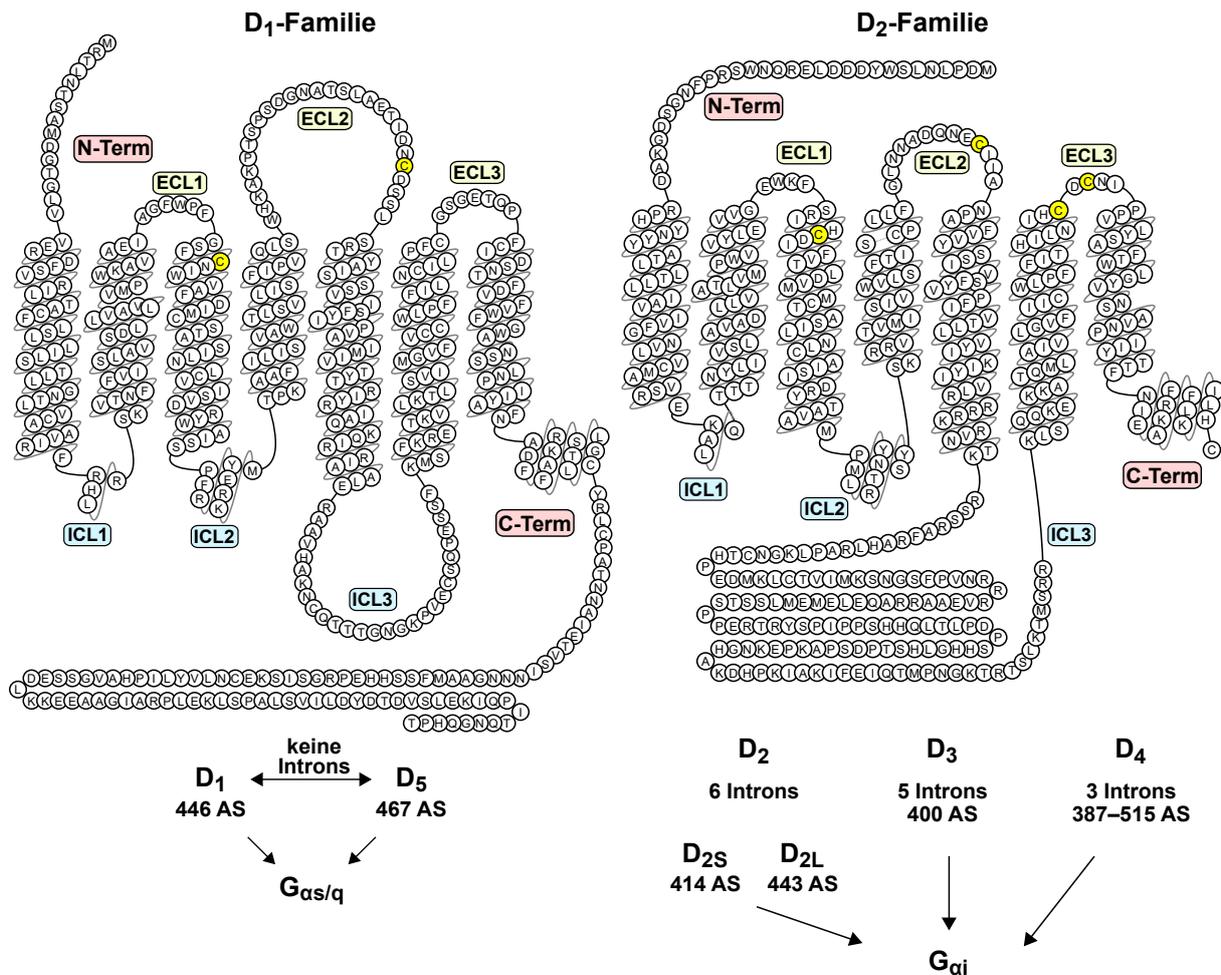


Abb. 6: Einteilung der humanen Dopaminrezeptoren. Die Dopaminrezeptoren werden in die zwei Familien D₁ und D₂ eingeteilt. Gezeigt sind beispielhaft die *Snake plots* des D₁- und des D₂-Rezeptors. Cysteine, die Disulfid-Brücken ausbilden, sind gelb unterlegt. Die Gene für die beiden Subtypen der D₁-Familie weisen keine Introns auf. Der D₁- und D₅-Rezeptor bestehen aus 446 bzw. 467 Aminosäuren (AS) und koppeln mit den G-Proteinen G_{αs} und G_{αq}. Dahingegen weisen die Gene für die Subtypen der D₂-Familie mehrere Introns auf. Die primäre Sequenz der Rezeptoren aus der D₂-Familie besteht aus 387-515 AS, abhängig von der jeweiligen Spleißvariante. Außerdem koppeln die Subtypen der D₂-Familie mit dem G-Protein G_{αi}.

Neben den sieben TMs weisen die beiden Rezeptorfamilien weitere Gemeinsamkeiten, aber auch einige Unterschiede auf. Der extrazelluläre N-Terminus ist bei beiden Familien ähnlich lang und kann, wie auch andere Abschnitte des Rezeptors, Glykosylierungen aufweisen. Die TMs des D₁- und D₅-Rezeptors weisen 80 % Sequenzidentität (Aminosäuren) auf, der D₂-Rezeptor und der D₃-Rezeptor 78 % Sequenzidentität bzw. der D₂-Rezeptor und der D₄-Rezeptor 53 % Sequenzidentität.

Der intrazelluläre C-Terminus der D₁-Rezeptorfamilie ist ca. siebenmal länger als der der D₂-Rezeptorfamilie, jedoch besitzen alle Dopaminrezeptoren ein Cystein in der C-terminalen Region, welches darüber hinaus in allen GPCRs konserviert ist. Dieses kann palmitoyliert sein, um den C-Terminus an der Membran zu verankern. Ein weiteres Charakteristikum ist die Ausbildung von Disulfid-Brücken, welche zur Stabilisierung beitragen.

Alle Dopaminrezeptoren weisen eine Disulfid-Brücke zwischen TM3 und ECL2 auf. Die Rezeptoren der D₂-Familie besitzen zusätzlich eine Disulfid-Brücke innerhalb des ECL3 (zusammengefasst in (Missale *et al.*, 1998; Vallone *et al.*, 2000; Pivonello *et al.*, 2007)).

3.2.1 Signalwege

Dopaminrezeptoren werden durch den endogenen Liganden Dopamin stimuliert (Carlsson *et al.*, 1958), wobei die Einteilung in cAMP-abhängige und cAMP-unabhängige Signalwege erfolgt (Beaulieu *et al.*, 2015; Butini *et al.*, 2016) (Abb. 7).

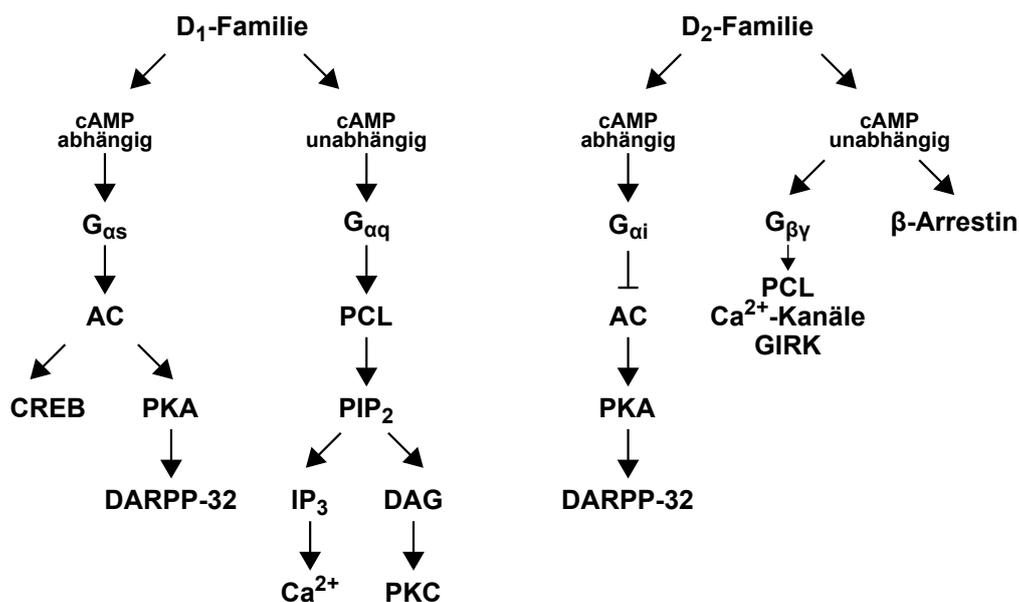


Abb. 7: Signalwege der Dopaminrezeptoren. Gezeigt sind die cAMP-abhängigen und die cAMP-unabhängigen Signalwege. Adenyllyclase (AC), Proteinkinase A (PKA), Dopamin- und cAMP-regulierte-Phosphoprotein (DARPP-32), *cAMP response element-binding protein* (CREB), Phospholipase C (PLC), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), Inositoltrisphosphat (IP₃), Diacylglycerol (DAG), Proteinkinase C (PKC), *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel* (GIRK).

Die Rezeptoren der D₁-Familie koppeln mit den G_{αs}-Proteinen, was in der Stimulierung der AC und somit in der Bildung von cAMP resultiert (cAMP-abhängiger Weg). Dies führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche das Dopamin- und cAMP-regulierte-Phosphoprotein (DARPP-32) phosphoryliert und das Hauptziel des Dopaminsignalwegs im Striatum ist (Svenningsson *et al.*, 2004). Für den D₅-Rezeptor wird außerdem ein cAMP-unabhängiger Weg vermutet, bei dem der Rezeptor mit dem G-Protein G_{αq} koppelt, was zur Aktivierung der PLC führt (Perreault *et al.*, 2014). Die PLC katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ sorgt wiederum für die intrazelluläre Freisetzung von Ca²⁺, während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert.

Die Rezeptoren der D₂-Familie koppeln im Gegensatz zur D₁-Familie an die G_{αi}-Proteine und inhibieren dadurch die AC und den daran anschließenden Signalweg. Unabhängig des cAMP-Signalweges soll die G_{βγ}-Untereinheit ebenfalls die PLC aktivieren können sowie an der

Regulation von Calcium- und Kaliumkanälen beteiligt sein (Yan *et al.*, 1997; Hernandez-Lopez *et al.*, 2000; Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Es gibt zudem Evidenz, dass der D₂-Rezeptor mit β -Arrestin 2 interagiert und somit die Regulation der Proteinkinase B (PKB) und der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) beeinflusst (Porter-Stransky & Weinshenker, 2017).

3.2.2 Strukturen des D₂- und D₃-Rezeptors

In dieser Arbeit liegt das besondere Augenmerk auf dem D₂- und dem D₃-Rezeptor (Abb. 8). Die beiden Rezeptoren sind zueinander sehr ähnlich, die Aminosäuresequenz der TMs ist zu 78 % identisch.

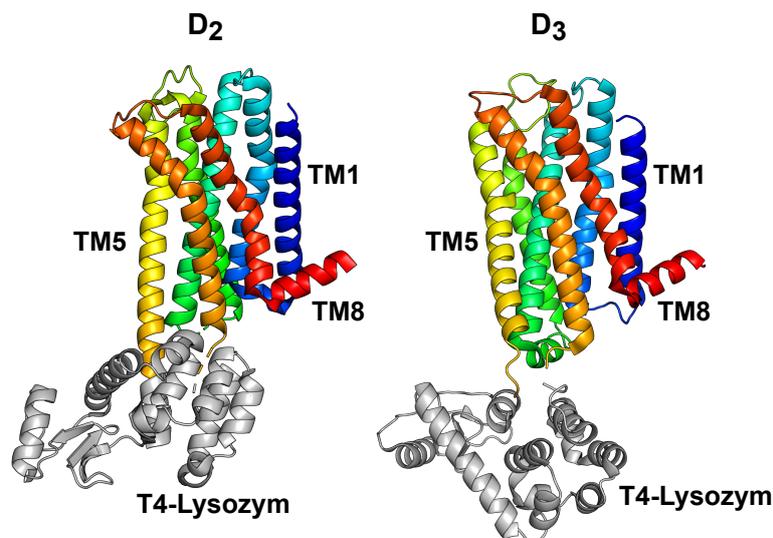


Abb. 8: Kristallstrukturen des D₂- und des D₃-Rezeptors. Gezeigt sind die Strukturen der beiden Rezeptoren in der inaktiven Konformation (PDB: 6LUQ, 3PBL) mit dem Fusionsprotein T4-Lysozym (grau), welches den ICL3 ersetzt. Das T4-Lysozym wird verwendet, um die Kristallisation von GPCRs zu ermöglichen (Chun *et al.*, 2012). Die beiden Strukturen sehen makroskopisch gleich aus, jedoch zeigten Computer-Simulationen, dass die beiden Rezeptoren mehrere unterschiedliche inaktive Konformationen einnehmen, abhängig vom verwendeten Liganden (Lane *et al.*, 2020).

In der Pharmakologie ist es dadurch schwierig, Liganden zu designen und zu synthetisieren, die zwischen den beiden Rezeptor-Subtypen diskriminieren können, damit Nebenwirkungen durch unerwünschte Wechselwirkungen reduziert werden können. Anhand von Proteinstrukturen können jedoch Unterschiede zwischen den Subtypen herausgearbeitet werden, um dieses Wissen in das Design neuer Liganden einfließen zu lassen.

Abgesehen von der erst kürzlich publizierten *Transmission electron cryomicroscopy* (Cryo-EM)-Struktur des D₂-Rezeptors in der aktiven Konformation (PDB: 6VMS), wurden bisher Kristallstrukturen der Dopaminrezeptoren D₂ (PDB: 6CM4, 6LUQ), D₃ (PDB: 3PBL) und D₄ (PDB: 5WIU, 5WIV, 6IQL) gelöst, jedoch immer in der inaktiven Form (Chien *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017, 2018; Fan *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2020).

Im Allgemeinen wird für die Kristallisation von GPCRs ein Fusionsprotein, z.B. das T4-Lysozym, benötigt, welches im Gegensatz zum Rezeptor einen hydrophilen Charakter besitzt und hilft, Kristallkontakte auszubilden. Dabei wird in den meisten Fällen der flexible

ICL3 durch das Fusionsprotein ersetzt, um den Rezeptor zusätzlich rigider zu machen, was eine Voraussetzung für die Kristallisation von GPCRs ist (Chun *et al.*, 2012). Anhand des β_2 -adrenergen Rezeptors zeigten Rosenbaum *et al.*, dass der Rezeptor durch die Fusion des T4-Lysozyms in den ICL3 jedoch nicht mehr mit dem G-Protein G_s interagieren kann (Rosenbaum *et al.*, 2007). Andererseits muss der Rezeptor aber durch das G-Protein stabilisiert werden, um die Struktur des β_2 -adrenergen Rezeptors in der aktiven Konformation zu lösen. Anstatt den ICL3 zu ersetzen, wurde das T4-Lysozym daher an den N-Terminus fusioniert (zusammengefasst in (Rasmussen *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2012)). Alternativ können Rezeptorvarianten ohne Fusionsproteine auch für Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)-Studien verwendet werden, um das Verständnis bezüglich der Dynamik der GPCRs und der Konformationsänderungen bei der Ligandenbindung und Signaltransduktion zu erweitern (Isogai *et al.*, 2016).

Der genaue Mechanismus während der Aktivierung der Dopaminrezeptoren konnte bisher noch nicht vollständig auf molekularer Ebene geklärt werden. Das liegt vor allem darin begründet, dass es lediglich eine Raumstruktur für die Dopaminrezeptoren in der aktiven Konformation gibt. Dahingegen ist die Aktivierung des β_2 -adrenergen Rezeptors durch das G-Protein inzwischen gut untersucht. Der β_2 -adrenerge Rezeptor gehört wie die Dopaminrezeptoren ebenfalls zu den GPCRs der Klasse A. Auf struktureller Ebene erfolgt die Stabilisierung des inaktiven Zustandes durch eine Salzbrücke (*ionic lock*) zwischen einem hochkonservierten Motiv (Aminosäuren: D/ERY) an der intrazellulären Spitze der TM3 und einem Glutamat in TM6 (Manglik & Kruse, 2017). In den Strukturen der inaktiven Form für den D_2 - und D_3 -Rezeptor wurde diese Salzbrücke ebenfalls beobachtet (Chien *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018).

Bei Aktivierung lösen Agonisten durch Bindung an die orthosterische Bindungstasche Konformationsänderungen auf der intrazellulären Seite des β_2 -adrenergen Rezeptors aus, die für die Bindung des G-Proteins notwendig sind. Dies beinhaltet eine Rotation der TM6 nach außen, wodurch ein Hohlraum freigelegt wird, in dem der C-Terminus der G_α -Untereinheit mit dem Rezeptor interagieren kann. Die Rotation der TM5 führt zu einer zusätzlichen Vergrößerung des Hohlraums. Die Stabilisierung der aktiven Konformation erfolgt auf struktureller Ebene durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken (*water lock*) zwischen einem Tyrosin in TM7 und einem Tyrosin in TM5 (Manglik & Kruse, 2017). In der Cryo-EM-Struktur des D_2 -Rezeptors in der aktiven Konformation wurde die Rotation der TM6 nach außen ebenfalls beobachtet (Yin *et al.*, 2020).

Anhand von NMR- und *Electron paramagnetic resonance* (EPR)-Experimenten am β_2 -adrenergen Rezeptor konnte bestätigt werden, dass die Bindung eines Agonisten jedoch nicht ausreicht, um die vollständige aktive Konformation des Rezeptors zu stabilisieren und

der Rezeptor dafür die Kopplung mit dem G-Protein oder bestimmten Fragmenten des G-Proteins benötigt. (zusammengefasst in (Manglik & Kruse, 2017; Wacker *et al.*, 2017)). Dies ist für die Dopaminrezeptoren vermutlich auch der Fall.

Alle bisher beschriebenen Methoden der Strukturanalysen, Röntgenkristallographie, NMR, EPR oder auch Cryo-EM (Maeda *et al.*, 2019), lassen sich nur durchführen, wenn die GPCRs im mg-Maßstab gereinigt werden können (Grisshammer, 2017). Das bedeutet in den meisten Fällen die Herstellung von rekombinanten GPCRs in heterologen Expressionssystemen, was ebenfalls Voraussetzung ist, um strukturelle Untersuchungen bezüglich der aktiven Konformationen der beiden humanen Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ durchführen zu können.

3.3 *In vivo*- und *in vitro*-Expressionssysteme zur Herstellung rekombinanter GPCRs

Wie viele Rezeptoren, können auch die humanen Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ aufgrund unserer ethischen Prinzipien nicht aus der natürlichen Quelle isoliert werden und müssen für biophysikalische Messungen in ausreichenden Mengen mithilfe heterologer Genexpression hergestellt werden. Die Herstellung von rekombinanten GPCRs ist jedoch schwierig und muss für jeden Rezeptor mit der Trial-and-Error-Methode etabliert werden. Das liegt vor allem daran, dass bisher erst wenig über die Schritte bekannt ist, die zur Insertion und korrekten Faltung der Rezeptoren in die Membran führen (McCusker *et al.*, 2007).

Nach der Herstellung muss überprüft werden, ob die synthetisierten Rezeptoren funktional sind. Die Funktionalität von GPCRs besteht zum einen darin, ihre spezifischen Liganden binden zu können und zum anderen, die Signalweiterleitung durch die Kopplung mit zytosolischen Interaktionspartnern, d.h. G-Proteine oder Arrestin, zu stimulieren (Zhang & Xie, 2012).

Die pharmakologische Charakterisierung des Rezeptors wird mit einem Radioligandenbindungstest vorgenommen (Bylund & Toews, 1993). Dabei werden die Affinitäten von Liganden zum Rezeptor durch Ermittlung der Dissoziationskonstante (K_D -Wert) bestimmt. Weisen rezeptorspezifische Liganden eine vergleichbare Affinität zu modifizierten Rezeptoren auf wie zum wildtypischen Rezeptor, wird davon ausgegangen, dass der Rezeptor gefaltet und die orthosterische Bindestelle demnach intakt ist. Außerdem kann so die Menge an Rezeptor bestimmt werden, die funktional gefaltet in der Membran eingebaut ist (B_{MAX} -Wert).

Die Signalweiterleitung des Rezeptors wird beispielsweise anhand des [³⁵S]GTPγS-Tests untersucht (Milligan, 2003). Der Test misst die G-Protein-Aktivierung nach Bindung eines Agonisten an den Rezeptor. Dabei wird die Bindung des radioaktiven GTP-Analogons [³⁵S]GTPγS, welches nicht hydrolysiert werden kann, an die Gα-Untereinheit bestimmt. Zeigt der Test, dass modifizierte Rezeptoren wie der wildtypische Rezeptor mit dem G-Protein koppeln, wird davon ausgegangen, dass eine Signalweiterleitung möglich ist.

Neben dem [³⁵S]GTPγS-Test können auch Messungen bezüglich der Akkumulation von cAMP, der GTPase Aktivität, der Mobilisierung von Calciumionen und der Bildung von IP₃ zeigen, ob der Rezeptor funktional ist (Schneider & Seifert, 2010; Zhang & Xie, 2012).

Für die heterologe Expression von GPCRs stehen Systeme in Eukaryoten (z.B. Insektenzellen, Hefen) und Prokaryoten (z.B. *Escherichia coli* (*E. coli*)) zur Verfügung. Eine weitere Möglichkeit der Herstellung ist die zellfreie Expression von GPCRs. Da in dieser Arbeit verschiedene Systeme zu Herstellung der Dopaminrezeptoren getestet wurden, werden diese im Folgenden genauer erläutert.

3.3.1 Insektenzellen als Expressionswirt

Insektenzellen gehören zu den Eukaryoten, weshalb sie gerne für die Herstellung von humanen GPCRs verwendet werden. Die Expression der Rezeptorgene erfolgt dabei mithilfe des Baculovirus-Insektenzell-Systems.

3.3.1.1 Das Baculovirus-Insektenzell-System

Die Insektenzelllinien, die am häufigsten für die Synthese rekombinanter Proteine verwendet werden, entstammen den Modellorganismen *Spodoptera frugiperda* (*S. frugiperda*) (z.B. Sf-21 und Sf-9) und *Trichoplusia ni* (*T. ni*) (z.B. High Five Zellen). Für die Expression von heterologen Genen in Insektenzellen werden virale Vektoren verwendet, die auf einem lytischen Virus (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV)) basieren. Die Expression der viralen Gene, die DNA-Replikation und die Synthese der strukturellen Proteine läuft in drei Phasen ab: frühe Phase (0-6h), späte Phase (6-24h) und sehr späte Phase (24-72h). In der sehr späten Phase der Infektion wird eine Proteinmatrix bestehend aus Polyhedrin gebildet, die jedoch nicht für die Infektiosität des Virus-Partikels benötigt wird. Daher können die entsprechenden Gene der sehr späten Phase, welche unter Kontrolle von sehr starken Promotoren (*polyhedrin*-Promotor, *p10*-Promotor) stehen, durch heterologe Gene ersetzt werden, um Fremdproteine zu synthetisieren (zusammengefasst in (Chambers *et al.*, 2018)). Expressionssysteme wie das MultiBac ermöglichen die Herstellung der Baculovirus DNA (Bacmid-DNA), welche die benötigten Gene für das Virus sowie das gewünschte Zielgen hinter dem *polyhedrin*-Promotor enthält (Abb. 9). Das Zielgen wird dazu zunächst in einen Transfervektor hinter den Promotor kloniert und erhält flankierende Transposon-Elemente (Tn7L und Tn7R). Im Anschluss wird der Transfervektor in den *E. coli* Stamm DH10MultiBac eingebracht, welcher das Ausgangsbacmid enthält. Die darin synthetisierte Tn7-Transposase integriert die Expressionskassette mithilfe der Transposon-Elemente in den entsprechenden DNA-Bereich des Bacmids. Dieser DNA-Bereich ist in das LacZα-Gen eingebettet, wodurch anhand der Blau-Weiß-Selektion Bakterienkolonien identifiziert werden können, in denen die Integration erfolgreich war. Anschließend wird die Bacmid-DNA aus *E. coli* isoliert und

Insektenzellen damit transfiziert, um die Viren für die Expression zu generieren (Sari *et al.*, 2016).

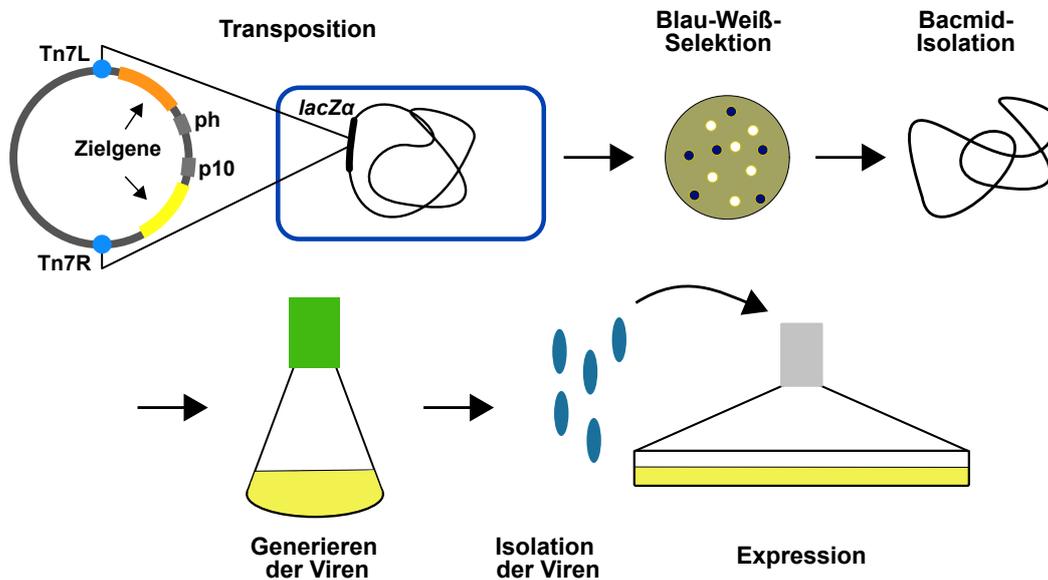


Abb. 9: Expression heterologer Gene in Insektenzellen mithilfe des MultiBac-Systems. Zunächst wird das Zielgen in einen Transposon-Vektor hinter den *polyhedrin*-Promotor (ph) oder den *p10*-Promotor (p10) kloniert, welche von Transposon-Elementen (Tn7L und Tn7R) flankiert werden. Dieser wird dann in *E. coli* DH10MultiBac eingebracht, wo die Tn7-Transposase die Expressionskassette in das Gen *lacZα* im Bacmid integriert. Durch die Blau-Weißselektion können Kolonien identifiziert werden, in denen die Transposition erfolgreich war. Im Anschluss wird die Bacmid-DNA aus *E. coli* isoliert, um damit Insektenzellen zu transfizieren und die Viren zu generieren und zu vermehren, mit denen die Expression anschließend in größerem Maßstab durchgeführt werden kann.

3.3.1.2 Vor- und Nachteile

Vorteilig ist, dass Insektenzellen leichter und günstiger in Kultur zu halten sind als Säugerzellen und hohe Ausbeuten an GPCRs erreicht werden. Des Weiteren erzeugen Insektenzellen posttranslationale Modifikationen (PTMs), die sehr ähnlich zu denen in Säugerzellen sind. Jedoch muss beachtet werden, dass die Glykosylierungsmuster nicht immer homogen sind, was nachteilig für strukturelle Analysen sein kann. Ein weiterer sehr großer Nachteil ist die sehr zeitaufwendige Generierung der Viren (ca. 14 Tage), was ein schnelles Screening von Konstrukten für die Expression erschwert (Sarramegna *et al.*, 2003; Schneider & Seifert, 2010; Chien *et al.*, 2010; Milić & Veprintsev, 2015).

Es gibt Markierungsstrategien, um isotoopenmarkierte Rezeptoren für NMR-Studien herzustellen. Dafür können Kulturmedien hergestellt werden, welche die gewünschten Aminosäuren isotoopenmarkiert enthalten, was jedoch sehr teuer ist. Deuterierungen von Proteinen in Insektenzellen sind hingegen nur schwer zu erreichen, da die Vitalität der Zellen in deuteriertem Medium oder bei Zugabe von deuterierter Glukose stark zurückgeht (Franke *et al.*, 2018).

3.3.1.3 Synthese von GPCRs

Mittlerweile wurden viele GPCRs für strukturelle Experimente in Insektenzellen hergestellt (Milić & Veprintsev, 2015), darunter auch die Dopaminrezeptoren. Die Veröffentlichungen der Kristallstrukturen für die humanen Dopaminrezeptoren D₂, D₃ und D₄ beinhalten Protokolle für die Expression der Rezeptorgene und die anschließende Reinigung aus Insektenzellen. Für die Expression beinhalten alle Konstrukte unter anderem am N-Terminus eine Haemagglutinin (HA)-Signalsequenz, welche die Insertion des Rezeptors in die Membran fördert. Außerdem enthalten alle Konstrukte einen His₁₀-Anhang für die Reinigung. Neben dem eingefügten Fusionsprotein in den ICL3, wurden am D₂- und D₃-Rezeptor noch weitere Modifikationen vorgenommen. Der N-Terminus des D_{2L}-Rezeptors wurde gekürzt (Δ M1-Y34) sowie die Thermostabilität durch drei ausgetauschte Aminosäuren verbessert (I122A, L375A, L379A). Beim D₃-Rezeptor wurde ebenfalls eine Aminosäure ausgetauscht (L119W), mit dem Ziel die Thermostabilität zu verbessern. Alle Rezeptoren wurden im Zuge der Reinigung mit den Detergenzien *n*-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid (DDM) und Cholesteryl-Hemisuccinat (CHS) solubilisiert. Zwar wurde für die so hergestellten Rezeptoren die Bindung des Liganden untersucht, Untersuchungen bezüglich der Signalweiterleitung wurden jedoch nicht durchgeführt. Aufgrund der Fusionsproteine im ICL3 sind diese Rezeptorvarianten, wie der β_2 -adrenerge Rezeptor, vermutlich nicht mehr dazu in der Lage, die Signalweiterleitung zu stimulieren (Zou *et al.*, 2012).

3.3.2 Zellfreie Expression

Die zellfreie Expression wurde bereits 1961 von Nirenberg und Matthaei für die Dechiffrierung des genetischen Codes verwendet (Nirenberg & Matthaei, 1961) und wurde seitdem kontinuierlich für die *in vitro*-Herstellung von Proteinen weiterentwickelt. Hierfür wird ein Lysat aus Zellen hergestellt, welches die Bestandteile enthält, die für die Translation (z.B. Ribosomen, Aminoacyl-tRNA Synthetase), die Proteinfaltung und die Generierung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) benötigt werden.

Die Lysate können aus unterschiedlichsten Zellen hergestellt werden, bekannt sind beispielsweise Extrakte aus *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), Insektenzellen oder Weizenkeimen (Perez *et al.*, 2016). Für die GPCRs, die mittels zellfreier Expression hergestellt wurden, wurde meistens Lysat aus *E. coli*-Zellen verwendet (Kögler *et al.*, 2019). Dieses wird mit der DNA des gewünschten Zielproteins, meist in Form eines Plasmids, sowie mit der RNA-Polymerase (z.B. T7 RNA-Polymerase) für die Transkription, deren Substrat (NTPs) und Dithiothreitol (DTT) supplementiert, welches die T7 RNA-Polymerase stabilisiert. DTT schafft zudem eine reduzierende Umgebung, was vor der Ausbildung von Disulfidbrücken schützt und somit Fehlfaltungen verhindern kann. Da die Ausbildung von Disulfidbrücken jedoch auch wichtig für die Stabilität des zu synthetisierenden Proteins sein kann,

muss ein Kompromiss zwischen DTT-Zugabe und Aktivität der T7 RNA-Polymerase gefunden werden.

Neben RNase-Inhibitoren werden tRNAs hinzugeben, deren Zusammensetzung auf die jeweilige Codonverwendung (z.B. *E. coli*) angepasst sein kann. Für die Regeneration von Energie (ATP) wird der Reaktionsansatz mit dem Substrat Acetylphosphat für die Acetatkinase und dem Phosphoenolpyruvat/Pyruvatkinase-System supplementiert. Zuletzt werden neben Salzen, weiteren Puffern und Stabilisatoren, die einzelnen Aminosäuren hinzugegeben. Die Zugabe der einzelnen Aminosäuren ermöglicht Markierungsstrategien mit isotopenmarkierten Aminosäuren, die dann als Sonden in NMR-Experimenten dienen können.

Zur Synthese eines Membranproteins muss der Ansatz Detergenzien oder Lipide in Form von Bizellen oder Nanodiscs (3.3.3) enthalten, um die Faltung des hydrophoben Proteins zu ermöglichen und es stabil in Lösung zu halten. Andernfalls präzipitiert das Membranprotein.

Wird die zellfreie Expression im Batch-Verfahren durchgeführt, kommt die Synthese nach 0,5-2h zum Erliegen, sobald die eingesetzten Edukte wie NTPs oder Aminosäuren verbraucht sind. Um die Syntheszeit zu verlängern und somit die Ausbeute zu erhöhen, wird gerne ein System für die kontinuierliche Zufuhr von Edukten verwendet. Der Reaktionsaufbau weist zwei Kompartimente auf, die über eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind (Abb. 10).

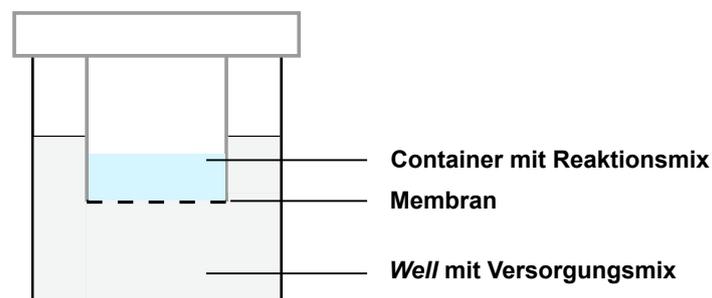


Abb. 10: Reaktionsaufbau für die zellfreie Expression. Der Container mit dem Reaktionsmix (RM) taucht in das Well mit dem Versorgungsmix (VM) ein. Die Membran, mit der der Container bespannt ist, erlaubt den Austausch von Stoffen zwischen RM und VM.

In dem einen Kompartiment befindet sich der Reaktionsmix, in dem die höhermolekularen Komponenten, wie Ribosomen und Nukleinsäuren, enthalten sind. Der umgebende Versorgungsmix im anderen Kompartiment enthält die niedermolekularen Komponenten, wie Nukleotide und Aminosäuren, welche der Reaktion so kontinuierlich zur Verfügung stehen. Dadurch können Reaktionszeiten von 12-24h erreicht werden (zusammengefasst in (Schwarz *et al.*, 2007; Bernhard & Tozawa, 2013; Rues, Henrich, *et al.*, 2016)).

3.3.2.1 Vor- und Nachteile

Der Vorteil der zellfreien Expression liegt in dem offenen System, wodurch die Transkription und die Translation leicht kontrolliert werden können. Weitere Vorteile sind der einfache Versuchsaufbau, die hohe Produktausbeute (~ 1mg/mL Ansatz) und die vereinfachte

Reinigung, da der Ansatz beispielsweise direkt für eine Affinitätschromatographie verwendet werden kann, ohne eine Zellernte oder einen Zellaufschluss durchführen zu müssen. Im Gegensatz zur *in vivo*-Proteinsynthese ist es in zellfreien Systemen jedoch schwieriger, PTMs zu erhalten, die für die Funktionalität des Rezeptors wichtig sein können. Es ist ebenfalls schwieriger, die korrekte Faltung durch die Ausbildung von Disulfid-Brücken zu erreichen. Daher ist es umso wichtiger, die korrekte Faltung und die Funktionalität des Rezeptors mit den entsprechenden Untersuchungsmethoden (3.3) zu zeigen. Zudem ist die Bereitstellung der benötigten Reaktionsbestandteile, wie Enzyme, Aminosäuren, etc. relativ kostenintensiv (zusammengefasst in (Junge *et al.*, 2008, 2011; Lu, 2017)).

3.3.2.2 Synthese von GPCRs

Mittlerweile konnten einige wenige GPCRs mit zellfreier Expression hergestellt werden. Dazu zählen beispielsweise der Endothelin-Rezeptor (Proverbio *et al.*, 2013), der β_1 - sowie der β_2 -adrenerge Rezeptor (J.-P. Yang *et al.*, 2011; Rues, Dötsch, *et al.*, 2016). Diese Rezeptoren wurden in Lipiden rekonstituiert und auf Ligandenbindung hin überprüft. Bisher wurde von den Dopaminrezeptoren ausschließlich der humane D_{2L} -Rezeptor zellfrei hergestellt (Basu *et al.*, 2013).

3.3.3 Nanodiscs

Um die Struktur und die Funktion von Membranproteinen besser verstehen zu können, werden diese gerne in ihrer natürlichen Lipidumgebung untersucht und nicht in Detergenzmizellen, worin sie nach der Reinigung häufig solubilisiert sind. Inzwischen gibt es eine Reihe an Technologien, die die Rekonstitution in Lipiden ermöglichen, wie Bizellen, *styrene maleic acid lipid particles* (SMALPs) oder Nanodiscs (zusammengefasst in (Yokogawa *et al.*, 2019)). Nanodiscs sind kleine Scheibchen, die aus einer Doppelschicht von Phospholipiden bestehen, umgeben von zwei Kopien des amphiphatischen *membrane scaffold protein* (MSP) (Abb. 11). Das MSP wurde aus dem Apolipoprotein A1 (ApoA1) abgeleitet, welches ein wesentlicher Bestandteil der *High-Density* Lipoprotein-Partikel (HDL) ist, und 2002 zum ersten Mal mit Phospholipiden assembliert (Bayburt *et al.*, 2002).

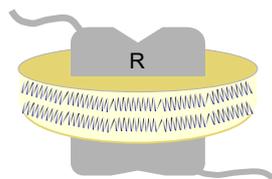


Abb. 11: Schematischer Aufbau einer Nanodisc mit eingebettetem Rezeptor. Zwei Kopien des α -helikalen MSPs umgeben eine Doppelschicht aus Phospholipiden und formen dadurch eine Scheibe. Darin können Membranproteine wie GPCRs (R) eingebettet sein (adaptiert nach (Leitz *et al.*, 2006)).

Das MSP ist aus kleinen repetitiven α -Helices aufgebaut, die durch Proline und Glyzine voneinander getrennt sind. Die Länge des MSPs bestimmt den Durchmesser der Nanodisc (Denisov *et al.*, 2004; Bayburt & Sligar, 2010).

Für die Assemblierung werden zu den MSPs Phospholipide gegeben, die in Detergenzien solubilisiert sind. Die Zusammensetzung der Phospholipide kann je nach gewünschter Anwendung variieren. Anschließend wird die Selbstassoziation der Nanodiscs durch Entfernen des Detergens mithilfe von Dialyse oder Detergens-absorbierenden Partikeln (*Bio-Beads* SM-2, Bio-Rad Laboratories) initiiert (Yokogawa *et al.*, 2019). Membranproteine, die bereits während der Reinigung mit Detergenzien solubilisiert wurden, können dem Ansatz hinzugegeben werden, wenn sie in Lipiddoppelschichten rekonstituiert werden sollen. Hingegen können sogenannte „leere“ Nanodiscs beispielsweise für die *in vitro*-Synthese (3.3.2) von Membranproteinen verwendet werden.

Nanodiscs einer sehr homogenen Größe und Form sowie mit höherer Stabilität als konventionelle Nanodiscs, können hergestellt werden, indem der N-Terminus und der C-Terminus des MSPs kovalent verknüpft werden (Nasr *et al.*, 2017). Die Transpeptidase Sortase A erkennt das C-terminale Leu-Pro-X-Thr-Gly (LPXTG)-Motiv und spaltet zwischen Threonin und Glyzin. Anschließend kann sie das freie Threonin kovalent mit dem freien Glyzin am N-Terminus verknüpfen, welches durch die Spaltung mit der *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease zur Verfügung steht (Abb. 12).

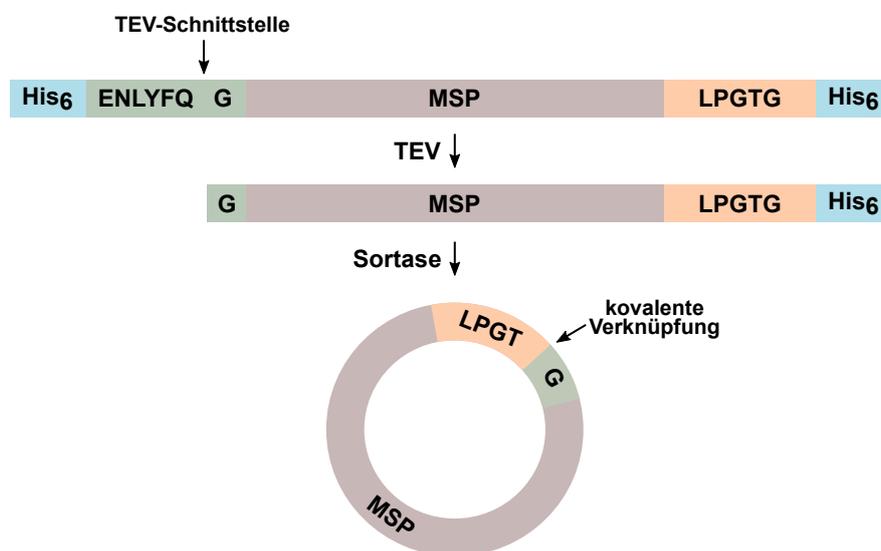


Abb. 12: Kovalente Verknüpfung des MSP. Das Konstrukt beinhaltet am N-Terminus einen His₆-Anhang und eine TEV-Schnittstelle, am C-Terminus die Erkennungssequenz für die Sortase und einen weiteren His₆-Anhang. Nach der Verknüpfung durch die Sortase wird eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie durchgeführt, um das verknüpfte MSP aus dem Reaktionsansatz zu reinigen. MSP-Moleküle, bei denen die Verknüpfung nicht erfolgreich war, beinhalten weiterhin den His₆-Anhang am C-Terminus und werden während dieses Reinigungsschrittes aus dem Ansatz entfernt (adaptiert nach (Nasr *et al.*, 2017)).

3.3.4 *E. coli* als Expressionswirt

Die Synthese von Membranproteinen in gramnegativen Bakterien, wie *E. coli*, findet im Vergleich zu Eukaryoten direkt an der Plasmamembran statt. Der Translokase-Komplex SecYEG, das Homolog zu Sec61 in Eukaryoten, transloziert lösliche Proteine über die innere Membran ins Periplasma bzw. ermöglicht die Faltung von α -helikalen Membranproteinen in die innere Membran (Serdiuk *et al.*, 2019).

Die Synthese von Fremdproteinen (z.B. GPCRs) in *E. coli* ist oftmals toxisch für die Zelle, weshalb häufig keine Synthese von GPCRs zu beobachten ist oder die Synthese in Einschlusskörperchen stattfindet. Es gibt Verfahren, mit denen GPCRs aus Einschlusskörperchen zurückgefaltet werden können, jedoch ist die Rückfaltung von GPCRs in eine funktionale Form schwierig und wurde nur für sehr wenige GPCRs erreicht, beispielsweise für den humanen Leukotrien B₄ (LTB₄) Rezeptor BLT1 (Baneres *et al.*, 2003).

Die Synthese von funktionalen GPCRs in *E. coli* ist jedoch möglich. Dafür hat es sich bewährt, an den N-Terminus des Rezeptors das periplasmatische Maltosebindeprotein (MBP) zu fusionieren. Das MBP dient als Signalprotein und ermöglicht die Expression von GPCRs in der inneren Membran. Die alleinige Fusion des MBP führte zur Synthese des humanen Adenosinrezeptors A_{2A} (Weiss & Grisshammer, 2002). Durch die Fusion von einem zusätzlichen Protein an den C-Terminus kann die Synthese, beispielsweise wie die des Neurotensinrezeptors aus Ratte (NTR1), noch gesteigert werden (Tucker & Grisshammer, 1996). Vermutlich hilft das C-terminale Fusionsprotein, den Abbau des Rezeptors zu verhindern, bevor der Rezeptor in der Membran eingebettet ist. Erfolgreiche Synthesen konnten auch für weitere GPCRs gezeigt werden, wie dem Cannabinoid-Rezeptor CB2 (Yeliseev *et al.*, 2005) oder dem Cannabinoid-Rezeptor CB1 (Skretas & Georgiou, 2009).

Die Synthese der humanen Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ in *E. coli* wurde ebenfalls bereits durchgeführt. Die Rezeptoren wurden funktional in *E. coli* hergestellt, um Ligandenbindung in An- und Abwesenheit von G-Proteinen untersuchen zu können (Vanhauwe *et al.*, 2000). Die Herstellung von funktional in der Membran gefalteten Rezeptoren war jedoch zu gering, um ausreichend Rezeptor für strukturelle Untersuchungen reinigen zu können und muss aus diesem Grund deutlich optimiert werden.

3.3.4.1 Vor- und Nachteile

Die Vorteile der Expression in *E. coli* liegen in den niedrigen Kosten, der einfachen Handhabung und der Vielzahl an unterschiedlichen Stämmen. Dies sorgt neben der kurzen Generationszeit dafür, dass schnell optimiert und die Ansatzgröße einfach hochskaliert werden kann. Außerdem gibt es viele Strategien für die Markierung mit Isotopen, was für NMR-Studien Voraussetzung ist. Nachteilig ist, dass *E. coli* die PTMs, die für GPCRs wichtig sein können, nicht erzeugt, was jedoch im Sinne einer homogenen Probe für strukturelle Untersuchungen

sogar von Vorteil sein kann. Ein weiterer Nachteil ist die unterschiedliche Lipidzusammensetzung von *E. coli* im Vergleich zu Eukaryoten (zusammengefasst in (McCusker *et al.*, 2007)).

3.4 Optimierungsstrategien zur Herstellung rekombinanter GPCRs

Die Herstellung und Charakterisierung von wildtypischen Rezeptoren ist aufgrund von Stabilitätsproblemen oft nicht möglich. Um strukturelle Untersuchungen an den GPCRs überhaupt erst zu ermöglichen, werden die GPCRs daher meistens modifiziert. Dabei werden Verkürzungen am N- bzw. C-Terminus und den Schleifen vorgenommen und sehr häufig Aminosäuren substituiert, welche die Expression und die Stabilität im gereinigten Zustand verbessern. Die Erfahrung hat gezeigt, dass der Austausch von Aminosäuren, die beispielsweise in einem GPCR zu mehr Stabilität geführt haben, auf andere Rezeptoren nicht 1:1 übertragbar sind, auch wenn alle Rezeptoren eine sehr ähnliche Struktur haben (Heydenreich *et al.*, 2015). Für jeden neuen Rezeptor, der untersucht werden soll, muss der Austausch entsprechender Aminosäuren daher individuell beleuchtet werden.

Hilfe kann da das Alanin-Scanning bieten. Bei dieser Strategie wird jede Aminosäure einzeln oder in Kombination mit mehreren gegen Alanin ausgetauscht, was die Stabilität des Proteins aufgrund der kleinen und chemisch inerten Seitengruppe verbessern kann (Horovitz *et al.*, 1992; Blaber *et al.*, 1993; Magnani *et al.*, 2008).

Eine andere Strategie zur Optimierung liegt in einem Ansatz mithilfe gerichteter Evolution (Sarkar *et al.*, 2008; Schlinkmann & Plückthun, 2013). Dafür werden in das Gen des GPCRs mit *error-prone* PCR zufällige Mutationen eingefügt und so eine Bibliothek aus mutierten Rezeptorgen generiert. Im Gegensatz zum Alanin-Scanning ergeben sich dadurch die vielfältigsten Rezeptorvarianten, die nicht nur auf einen einfachen Austausch zu einem Alanin beschränkt sind. Im nächsten Schritt wird die Bibliothek in den Expressionsvektor kloniert, in *E. coli* exprimiert und die synthetisierten Rezeptorvarianten in den Zellen mit einem spezifischen fluoreszenzmarkierten Liganden markiert. Je höher die Synthese der GPCR-Varianten ist, umso mehr Fluoreszenzligand bindet. In jeder Runde werden die Zellen mit *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) selektiert, welche die höchste Fluoreszenz aufweisen (Abb. 13)

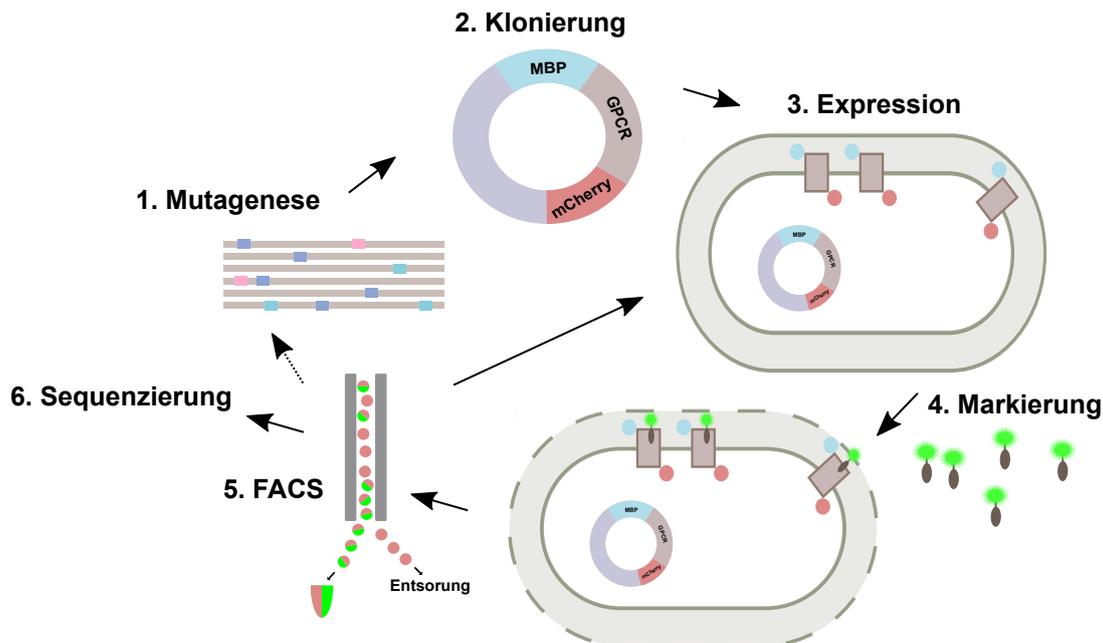


Abb. 13: Verbesserte Expression und Stabilität mithilfe von gerichteter Evolution. Gezeigt ist der Ablauf: Herstellen der Bibliothek aus Mutanten (1), die anschließend in den Expressionsvektor kloniert wird (2). Nach der Expression (3) werden Rezeptoren in der inneren Membran mit einem Fluoreszenzliganden markiert (4). Zellen, die die höchste Fluoreszenz aufweisen, werden im FACS selektiert (5). Es können anschließend weitere Selektionsrunden folgen, Einzelklone analysiert (6) oder eine weitere Mutagenese durchgeführt werden (1) (adaptiert nach (Klenk *et al.*, 2016)).

Im letzten Schritt werden die Plasmide aus den angereicherten Zellen isoliert und die enthaltenen Rezeptorvarianten analysiert. Dadurch können Aminosäuresubstitutionen aufgespürt werden, die zu einer besseren Synthese der Rezeptoren führen.

Die Selektion anhand der Markierung mit dem Fluoreszenzliganden bietet den Vorteil, dass ausschließlich Rezeptorvarianten angereichert werden, die eine Faltung aufweisen, bei der die orthosterische Bindetasche intakt ist und der Rezeptor Ligand binden kann. Abschließend muss noch geprüft werden, ob die erhaltenen Rezeptorvarianten die Signalweiterleitung zu den zytosolischen Interaktionspartnern stimulieren können.

Die Voraussetzungen für diese Methode sind demnach die Synthese des wildtypischen Rezeptors in *E. coli* und die Verfügbarkeit eines fluoreszenzmarkierten Liganden mit möglichst hoher Affinität (< 10 nM). Neben dem NTR1 wurde mit dieser Methode die Synthese des Neurokinin 1 Rezeptors von ~ 100 -300 auf ~ 3000 Rezeptoren/Zelle erhöht. Für den α_{1a} -adrenergen Rezeptor konnte die Synthese ebenfalls von ~ 350 auf ~ 3500 Rezeptoren/Zelle verzehnfacht werden (Sarkar *et al.*, 2008; Dodevski & Plückthun, 2011).

3.5 Zielsetzung

Ein Großteil der Medikamente, die wir heutzutage nutzen, um Krankheiten zu behandeln, wirken an GPCRs, wie den adrenergen Rezeptoren oder den Dopaminrezeptoren. Für die Entwicklung neuartiger selektiver Medikamente ist ein grundlegendes Verständnis über die genaue Funktionsweise der GPCRs eine essenzielle Voraussetzung.

Dazu können die strukturellen Methoden wie Kristallographie, Cryo-EM oder NMR einen Beitrag leisten. Für diese Methoden müssen rekombinante GPCRs hergestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die humanen Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ für strukturelle Methoden in ausreichenden Mengen synthetisiert werden können. Da die Signalweiterleitung mit zytosolischen Interaktionspartnern nicht möglich ist, wenn im ICL3 Fusionsproteine integriert werden, können mit diesen Konstrukten Untersuchungen an den Rezeptoren in der aktiven Konformation nicht durchgeführt werden. Deswegen sollte geprüft werden, inwieweit die Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ ohne Fusionsprotein hergestellt werden können. Dafür stehen unterschiedliche Expressionssysteme zur Verfügung.

Zunächst sollte der wildtypische D₃-Rezeptor in Insektenzellen synthetisiert und anschließend daraus gereinigt werden. Darüber hinaus sollte die zellfreie Expression für die Herstellung des D₃-Rezeptors unter Verwendung von Nanodiscs geprüft werden. Dafür sollten zunächst unverknüpfte und kovalent verknüpfte Nanodiscs mit der MSP-Variante MSP1E3D1 hergestellt werden.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt darauf, die Synthese des D_{2S}- und D₃-Rezeptors in *E. coli* zu optimieren, um daraus Rezeptor in ausreichenden Mengen für biophysikalische Messungen reinigen zu können. Es sollten dafür Konstrukte des D₂- und D₃-Rezeptors mit N- und C-terminalen Fusionsproteinen generiert und getestet werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob Substitutionen einzelner Aminosäuren die Synthese der beiden Rezeptoren in *E. coli* erhöhen können. Abschließend sollte die Optimierungsstrategie, welche sich die gerichtete Evolution zunutze macht, als Methode für die Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ erarbeitet werden, um den Grundstein zu legen, mithilfe dessen die Synthese der beiden Rezeptoren gesteigert werden kann.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien, die für diese Arbeit verwendet wurden, bei den folgenden Herstellern bezogen: Fluka Chemie (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roche (Basel, Schweiz), Roth (Karlsruhe), Thermo Fisher Scientific (Dreieich) oder VWR Chemicals (Langenfeld). Verbrauchsmaterialien und Geräte sind in Tab. 1 und Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller.

Chromatographie-Material/Säulen	Superdex 200 Increase 10/300 GL, HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), Strep-Tactin® Sepharose® 50% suspension (IBA Lifesciences, Göttingen), Ni-NTA Superflow 5 mL (Qiagen, Hilden)
Filter, Membranen und Konzentratoren	Spectra/Por® 7 Dialysis Membrane MWCO 5 bzw. 10 kDa (Thermo Fisher Scientific, Dreieich); Filtropur S 0.2, S 0.44 (Sarstedt, Nümbrecht); Vivaspin-20 MWCO 5 bzw. 10 kDa, Minisart® Syringe Filter 5 µm (Sartorius, Göttingen)
Küvetten	<i>E. coli Pulser</i> TM (Elektroporationsküvette, Bio-Rad Laboratories, München); 1 mL Plastikküvetten (Sarstedt, Nümbrecht)
Transfektionsreagenz	X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Zellkulturmedium	SF-4 BaculoExpress ICM (Bioconcept, Allschwil, Schweiz)

Tab. 2: Verwendete Geräte.

Gerät	Typenbezeichnung (Hersteller)
Analysenwaage	TE1245 (Sartorius, Göttingen)
Autoklav	Laboklav (SHP Steriltechnik, Haldensleben), Systec DB-23 (Systec, Linden)
Blotting-Apparatur	SemiPhor TE 70 (Amersham Biosciences, Freiburg)
Brutschrank	IN30 (Mettler, Schwabach)
Chromatographiesystem	ÄKTA purifier, ÄKTA pure (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)
Elektroporationssystem	Micropulser (Bio-Rad Laboratories, München)
Geldokumentationssystem	Bio-Rad GelDoc XR+ (Bio-Rad Laboratories, München)
Gelelektrophoresekammern	Biometra Maxigel (Jena Analytics, Jena), <i>Mighty Small II SE</i> (Hoefer, Holliston, MA, USA), <i>Mini-Sub-DNA-Cell</i> (Bio-Rad Laboratories, München)

Horizontalschüttler	ST 5 Schüttler (CAT, Ballrechten-Dottingen)
<i>Microplate reader</i>	Synergy 2 Multi-Detektions-Reader (BioTek, Winooski, VT, USA)
Mikrofluidizer	Fluidizer (Microfluids, Newton, MA, USA)
Mikroskop	B1 Series System Microscopes (Motic, Barcelona, Spanien)
Mikrowelle	Mikrowelle Modell 9023 (Privileg, Stuttgart)
Netzteil	PowerPac™ HV, PowerPac™ Basic (Bio-Rad Laboratories, München), Multidrive XL (Amersham Biosciences, Freiburg)
Peristaltische Pumpe	Pump P-1 (Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden)
pH-Elektrode	PB-11 (Sartorius, Göttingen)
Pipetten	Rainin Pipet-Lite XLS+ 2 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
Präzisionswaage	NewClassic (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
Pufferfiltrationsapparatur	Nalgene (Rochester, NY, USA)
Reinstwasseranlage	Advantage A10 mit Q-Pod (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)
Rühr- und Heizplatten	RCT, REO (Janke & Kunkel, Staufen)
Schüttelinkubator	Certomat R, Certomat HK (Sartorius, Göttingen), Mulitron Standard (Infors HAT, Bottmingen, Schweiz) Excella E25, C25KC CLASSIC SERIES (New Brunswick Scientific, Hamburg)
Ultraschall-Homogenisator	LABSONIC P (Sartorius, Göttingen)
Sicherheitswerkbank	HERAsafe HS12 (Kendro, Hanau)
Thermoblock	91-D1100 (Peqlab, Erlangen), ThermoMixer RC (Eppendorf, Hamburg)
Thermocycler	Biometra TProfessional Thermocycler (Analytik Jena, Jena), Primus 25 advanced Thermocycler (Peqlab, Erlangen)
UV-Vis-Spektrometer	Ultrospec 2100 pro Spektralphotometer (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich), Nanodrop ND-1000 (Peqlab, Erlangen)
Vortex-Mixer	VF2 (Janke & Kunkel, Staufen)
Zählkammer	Zählkammer, Neubauer Improved (Brand, Wertheim)
Zentrifugen	1-14 K (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), Allegra X-15R, Avanti J-26 XP, Optima XE (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), Rotina 420R, Mikro 200R und Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen), Speed Vac RVC 2-25 CD plus (Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz)

4.1.2 Enzyme und Antikörper

Die verwendeten Enzyme und Antikörper sind in Tab. 3 und Tab. 4 aufgelistet.

Tab. 3: Verwendete Enzyme.

Enzyme	
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T5 Exonuklease	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Taq DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
DpnI	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
DNaseI	Roche, Mannheim
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>tobacco etch virus</i> (TEV)-Protease	LS Biochemie IV, Ramona Heißmann

Tab. 4: Verwendete Antikörper.

Antikörper	
Anti-MBP Monoclonal Antibody	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Anti-mCherry Polyclonal Antibody	BioVision, Milpitas, CA, USA
StrepMAB-Classic	IBA Lifesciences, Göttingen
Anti-Mouse IgG (Fc specific)-Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Rabbit IgG (Fc specific)-Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4.1.3 DNA-Längen- und Molekulargewichtsstandards

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde der DNA-Längen-Standard 1 kb DNA *Ladder* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) verwendet. Für die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, 4.2.14) wurde der Molekulargewichtsstandard Bio-Rad *Low Range* (Bio-Rad Laboratories, München) und der *Precision Plus Protein™ Standard* (Bio-Rad Laboratories, München) eingesetzt. Für den Western Blot wurde der *All Blue Prestained Protein Standard* (Bio-Rad Laboratories, München) und der *BlueRay Prestained Protein Marker* (Jena Bioscience, Jena) verwendet. Die Fragmentlängen sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Verwendete DNA-Längen- und Molekulargewichtsstandards.

1 kb DNA Ladder (Basenpaare)	Bio-Rad Low Range (kDa)	Precision Plus Protein™ Standard (kDa)	All Blue Prestained Protein Standard (kDa)	BlueRay Prestained Protein Marker (kDa)
10 000	97,4	250	250	170
8000	66,2	150	150	130
6000	45	100	100	93
5000	31	75	75	70
4000	21,5	50	50	53
3000	14,4	37	37	41
2000		25	25	30
1500		20	20	22
1000		15	15	14
500		10	10	9

Für die Eichgerade der analytischen Größenausschlusschromatographie wurden die Gel Filtration Calibration Kits (LMW, HMW) (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) verwendet: Thyroglobulin 669 kDa, Ferritin 440 kDa, Aldolase 158 kDa, Albumin 67 kDa, Ribonuklease A 13,7 kDa.

4.1.4 Nährmedien und Puffer

Die verwendeten Medien, Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser (18,2 MΩ cm bei 25 °C - Merck Millipore) hergestellt - wenn nicht anders angegeben. Alle Puffer für die Proteinreinigung wurden sterilfiltriert (0,45 µm).

4.1.4.1 Nährmedien

Das *Hogness Freezing Medium* und das SOC-Medium wurden mit H₂O hergestellt und anschließend steril filtriert (0,2 µm). LB-Medium und 2 x TY-Medium wurden autoklaviert. Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurde der Agar zuvor in das LB-Medium hinzugegeben. Die Zugabe der Glukose erfolgte nach dem Autoklavieren. Dazu wurde eine 20 %ige (w/v) Glukose-Stammlösung mit H₂O hergestellt und steril filtriert (0,2 µm). Die Antibiotika (4.1.4.2) wurden ebenfalls nach dem Autoklavieren hinzugegeben, nachdem das Medium auf 50 °C abgekühlt war.

- **Hogness Freezing Medium:**

36 mM	K ₂ HPO ₄
13,2 mM	KH ₂ PO ₄
0,4 mM	MgSO ₄
1,7 mM	Na ₃ -citrat
6,8 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
4,4 % (v/v)	Glyzerin

- **Luria-Bertani-Medium (LB-Medium):**

10 g/L	Pepton
5 g/L	Hefeextrakt
10 g/L	NaCl

- **LB-Medium, 3% Glukose**

1 x	LB-Medium
3 % (v/v)	Glukose-Stammlösung (20 %)

- **LB-Agarplatten:**

1 x	LB-Medium
15 g/L	Agar

- **LB-Agarplatten, 3% Glukose**

1 x	LB-Medium
15 g/L	Agar
3 % (v/v)	Glukose-Stammlösung (20 %)

- **MultiBac-Platten:**

1 x LB-Medium
 15 g/L Agar
 50 mg/L Kanamycin
 10 mg/L Tetracyclin
 10 mg/L Gentamycin
 100 mg/L Bluo-Gal
 40 mg/L IPTG

- ***Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC-Medium):***

2 % (w/v) Pepton
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 3 % (v/v) Glukose-Stammlösung (20 %)

- **2 x TY-Medium**

16 g/L Pepton
 10 g/L Hefeextrakt
 5 g/L NaCl

- **2 x TY-Medium, 1% Glukose**

1 x 2 x TY-Medium
 1 % (v/v) Glukose-Stammlösung (20 %)

- **2 x TY-Medium, 3% Glukose**

1 x 2 x TY-Medium
 3 % (v/v) Glukose-Stammlösung (20 %)

4.1.4.2 Antibiotika, Induktor, Bluo-Gal

Für die Herstellung von selektiven Nährmedien wurden Antibiotika, Induktor Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) bzw. 5-Bromo-3-indolyl β -D-galactopyranosid (Bluo-Gal) zu dem Ausgangsmedium (4.1.4.1) hinzugegeben. Dazu wurden 1000x-Stammlösungen in H₂O bzw. Ethanol hergestellt und sterilfiltriert (0,2 μ m). Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

- **Ampicillin-Stammlösung**

100 mg/mL Ampicillin in H₂O

- **Kanamycin-Stammlösung**

50 mg/mL Kanamycin in H₂O

- **Gentamycin-Stammlösung**

20 mg/mL Gentamycin in H₂O

- **Tetracyclin-Stammlösung**

10 mg/mL Tetracyclin in Ethanol

- **IPTG-Stammlösung**

1 M IPTG in H₂O

- **Bluo-Gal-Stammlösung**

100 mg/mL Bluo-Gal in DMF

4.1.4.3 Puffer

Bis auf die im Folgenden angegebenen Puffer, sind alle Zusammensetzungen in den entsprechenden Durchführungen (Kapiteln) zu finden, bei denen sie verwendet wurden.

- **10 x PBS pH 7,3:**

101 mM Na₂HPO₄

18 mM KH₂PO₄

1,4 M NaCl

27 mM KCl

- **10 x TBS pH 7,4:**

200 mM Tris/HCl
1,5 M NaCl

4.1.5 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme gehören zu der Spezies *E. coli*.

Tab. 6: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp
TOP10	<i>F</i> - <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
DH10MultiBac	<i>F</i> - <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD</i> 139 Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ - <i>rpsL</i> <i>nupG</i> /pMON14272/pMON7124
BL21 (DE3)	<i>F</i> - <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (<i>rB</i> ⁻ , <i>mB</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)
BL21 Star (DE3)	<i>F</i> - <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> <i>rne</i> 131 (DE3)

4.1.6 Plasmide

Die Ausgangsvektoren, welche für diese Arbeit verwendet wurden, sind in diesem Kapitel dargestellt. Die vollständige Liste der verwendeten Plasmide sowie die DNA- und Aminosäuresequenz der einzelnen Proteine befindet sich zum Nachschlagen im Anhang (Tab. 26, 9.1). Der Vektor pACEBac1 wurde für die Expression in Insektenzellen verwendet (Abb. 14). Dafür wurde das Gen für den D_{3wt}-Rezeptor hinter den *polyhedrin*-Promotor kloniert. Mit Hilfe der flankierenden Transposon-Elemente Tn7L und Tn7R kann die Expressionskassette in das Bacmid integriert werden, mit welchem die Generierung der Viren initiiert wird. Für die Manipulation in *E. coli* enthält der Vektor das Resistenzgen für Gentamycin.

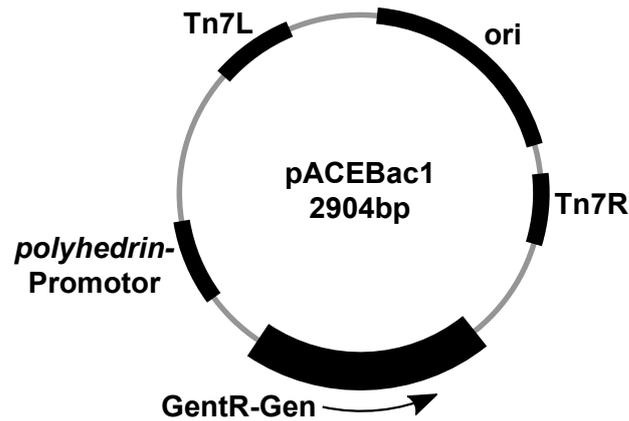


Abb. 14: Vektorkarte von pACEBac1. Der Vektor pACEBac1 enthält das Resistenzgen für Gentamycin (GentR-Gen) für die Selektion in *E. coli*, einen Replikationsursprung für *E. coli* (ori), die Transposon-Elemente Tn7L und Tn7R und den *polyhedrin*-Promotor für die Transkription des Zielgens.

Für die Überexpression des cMSP1E3D1-Gens und des Sortase-Gens in *E. coli* wurden die Vektoren pET-28a(+) bzw. pET-29a(+) verwendet (Abb. 15). Dabei stehen die Gene unter Kontrolle des T7-Promotors und können in Bakterienstämmen, die den DE3-Prophagen enthalten, durch die Zugabe von IPTG induziert werden. Steht den Bakterien weder Laktose noch das Analogon IPTG zur Verfügung, sorgt der Lac-Repressor für eine negative Regulation der Basalexpression, indem er an den Operator bindet.

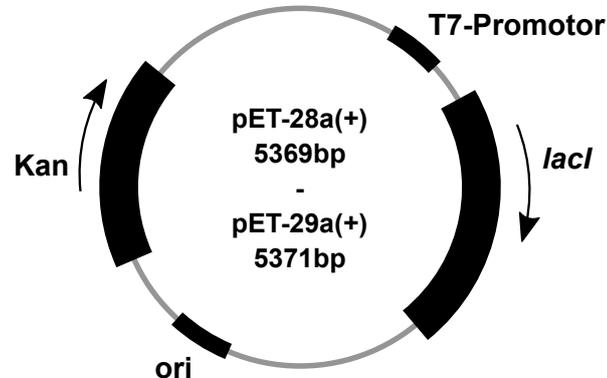


Abb. 15: Vektorkarte von pET-28a und pET-29a. Die Vektoren pET-28a und pET-29a enthalten das Resistenzgen für Kanamycin (Kan) für die Selektion in *E. coli*, einen Replikationsursprung für *E. coli* (ori), das Gen für den Lac-Repressor *lacI* und den T7-Promotor für die Transkription des Zielgens.

Der Vektor pET-21a(+) wurde für die zellfreie Expression des D₃-Rezeptors verwendet (Abb. 16). Dabei steht das Rezeptorgen unter Kontrolle des T7-Promotors, welcher von der T7-Polymerase im Reaktionsansatz erkannt wird und für die Transkription des Gens sorgt.

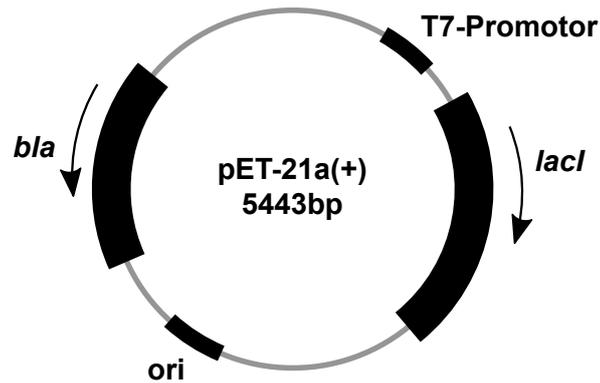


Abb. 16: Vektorkarte von pET-21a. Der Vektor pET-21a enthält das Resistenzgen für Ampicillin *bla* (β -Lactamase) für die Selektion in *E. coli*, einen Replikationsursprung für *E. coli* (*ori*), das Gen für den Lac-Repressor *lacI* und den T7-Promotor für die Transkription des Zielgens.

Für die Expression des D₃-Rezeptorgens in HEK-Zellen wurde der Vektor pcDNA3.1 verwendet (Abb. 17). Dabei steht das Rezeptorgen unter Kontrolle des CMV Promotors und des entsprechenden Enhancers. Für die Manipulation des Vektors in *E. coli* enthält der Vektor das Resistenzgen für Ampicillin.

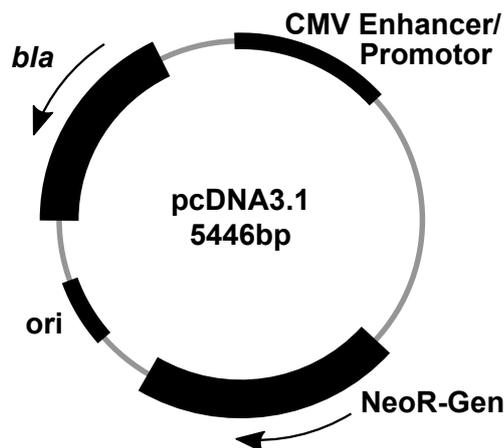


Abb. 17: Vektorkarte von pcDNA3.1. Der Vektor pcDNA3.1 enthält das Resistenzgen für Ampicillin *bla* (β -Lactamase) für die Selektion in *E. coli*, einen Replikationsursprung für *E. coli* (*ori*), das Resistenzgen für Neomycin (NeoR-Gen) für die Selektion in HEK-Zellen und den CMV-Promotor für die Transkription des Zielgens

Allen Konstrukten, die für die Expression der Gene für die Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ kloniert wurden, liegt der Vektor pMAL-p5X zugrunde (Abb. 18). Dieser enthält den *tac*-Promotor, der jedoch zu Beginn dieser Arbeit gegen den *lac*-Promotor ausgetauscht wurde. Der *lac*-Promotor kann von der endogenen RNA-Polymerase in *E. coli* erkannt werden. Wie bei den pET-Vektoren bindet der Lac-Repressor an den Operator, um die Basalexpression zu hemmen. Die Bindung an den Operator kann durch die Zugabe von Laktose bzw. dem Analogon IPTG aufgehoben und die Expression somit induziert werden. Die Basalexpression kann weiterhin durch das Zusetzen von Glukose gehemmt werden (Görke & Stülke, 2008). Zusätzlich enthält der Vektor bereits das Gen *malE*, welches für das Fusionsprotein MBP kodiert.

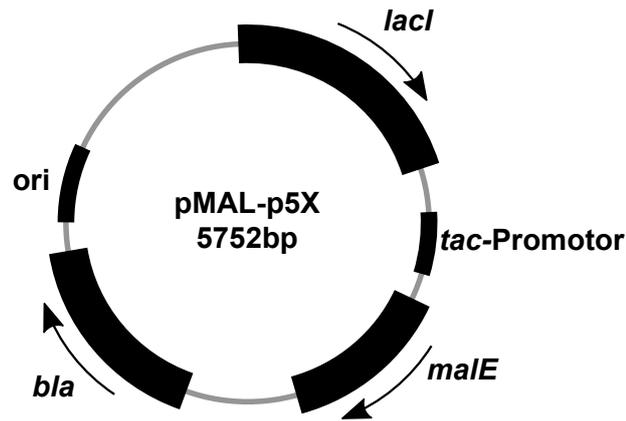


Abb.18: Vektorkarte von pMAL-p5X. Der Vektor pMAL-p5X enthält das Resistenzgen für Ampicillin *bla* (β -Lactamase) für die Selektion in *E. coli*, einen Replikationsursprung für *E. coli* (*ori*), das Gen für den Lac-Repressor *lacI* und den *tac*-Promotor für die Transkription des Zielgens. Zusätzlich beinhaltet der Vektor bereits das Gen für das Fusionsprotein MBP (*malE*).

4.1.7 Oligodesoxyribonukleotide

Die Liste der verwendeten Oligodesoxyribonukleotide befindet sich im Anhang (Tab. 28 und Tab. 29, 9.4).

4.2 Methoden

4.2.1 Klonierung der Expressionsplasmide

4.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde für die Auftrennung von DNA-Molekülen nach deren spezifischer Größe verwendet. Hierfür wurde eine 0,8 %ige (w/v) Agaroselösung in Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Puffer (89 mM Tris/HCl, pH 8,3, 89 mM Borsäure, 25 mM EDTA) unter Aufkochen hergestellt. Nach Abkühlen auf maximal 60 °C wurde die Agaroselösung mit 5 μ L Roti® GelStain/100 mL Agaroselösung versetzt und anschließend in eine *Mini-Sub-DNA-Cell*-Gelkammer mit aufgesetztem Probenkamm eingefüllt und abgekühlt. Die Gelproben wurden mit DNA-Auftragspuffer (10x Puffer: 1x TBE, 50 % (v/v) Glycerin, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau, 0,02 % (w/v) Xylencyanol) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer bei einer Spannung von 100 V für etwa 40 min durchgeführt. Die Färbung durch Roti® GelStain basiert auf der Anlagerung von Benzimidazolen an die kleine Furche von helikalen Nukleinsäuren und kann mittels UV-Licht angeregt werden. Dazu wurde die Einstellung „GelRed“ im Geldokumentationssystem Gel Doc™ XR verwendet. Das Gel wurde anschließend fotografiert und mit der *Image Lab*™-Software (Version 5.2.1.1) verarbeitet.

4.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolation der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Hierfür wurde zu 10 mL LB-Medium, 3% Glukose (4.1.4.1) das benötigte Antibiotikum hinzugefügt und mit dem entsprechendem *E. coli*-Stamm angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht (ÜN) bei 37 °C unter Schütteln bei 160 *rotations per minute* (rpm) im

Schüttler inkubiert und anschließend mit 5000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde nach dem Protokoll des Herstellers weiterbearbeitet. Das gereinigte Plasmid wurde mit 50 µL H₂O von der Säule eluiert und mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.2.1.1) analysiert.

4.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die enzymatische Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die *Touchdown*-PCR verwendet (Korbie & Mattick, 2008). Der Vorteil gegenüber anderen PCR-Methoden ist eine schrittweise Annäherung der Hybridisierungstemperatur, was die Amplifikation von unerwünschten Nebenprodukten minimiert. Dabei wird die Hybridisierungstemperatur in den ersten 15 Zyklen in jedem Zyklus um 1 °C gesenkt, angefangen bei 70 °C. In den darauffolgenden 20 Zyklen wird immer die gleiche Hybridisierungstemperatur verwendet, welche 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Oligodesoxynukleotide liegt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7: Reaktionsansatz der *Touchdown*-PCR.

PCR-Ansatz	
< 1 µg	Matrizen-DNA
0,5 µM	Vorwärtsprimer
0,5 µM	Rückwärtsprimer
200 µM	dNTP-Mix
1 x	5 x Phusion GC-Puffer
1 U/50 µL PCR	Phusion DNA-Polymerase

Die *Touchdown*-PCR wurde entsprechend Tab. 8 durchgeführt.

Tab. 8: Programm für die *Touchdown*-PCR.

PCR-Programm			
	DNA-Denaturierung	98 °C	1:30 min
1.Phase 15 Zyklen	DNA-Denaturierung	98 °C	30 s
	Hybridisierung	70 °C - Δ 1 °C	30 s
	Elongation	72 °C	15-30 s/kb
2. Phase 20 Zyklen	DNA-Denaturierung	98 °C	30 s
	Hybridisierung	$T_M - 5$ °C	30 s
	Elongation	72 °C	15-30 s/kb
Ende	Elongation	72 °C	10 min
	Lagerung	15 °C	bis Entnahme

4.2.1.4 DNA-Reinigung

Die Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.2.1.1). Dabei wurden die DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt, das gewünschte Produkt ausgeschnitten und nach Protokoll des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die Elution des Fragmentes erfolgte mit 30 μ L H₂O.

4.2.1.5 Gibson Assemblierung

Für das Einfügen und Ausschneiden von DNA-Sequenzen in/aus einem Vektor wurde die Gibson Assemblierung verwendet (Gibson *et al.*, 2009). Dazu wurden mit *Touchdown*-PCR (4.2.1.3) überlappende Basensequenzen an die zu assemblierenden DNA-Fragmente angefügt und die DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.2.1.1) gereinigt. Für die Gibson Reaktion wurden 15 μ L Gibson Mastermix mit 0,1 pmol DNA versetzt, wobei die hinzugebende DNA-Menge ein Gesamtvolumen von 5 μ L haben muss. Der Reaktionsansatz (gesamt 20 μ L) wurde für 1h bei 50 °C inkubiert. Die Zusammensetzung des Gibson Mastermix ist in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Zusammensetzung des Gibson Mastermix.

1 x Gibson Mastermix	
100 mM	Tris/HCl pH 7,5
10 mM	MgCl ₂
10 mM	DTT
je 0,2 mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
1 mM	NAD ⁺
5 %	PEG 8000
0,004 U/μL	T5 Exonuklease
0,025 U/μL	Phusion DNA-Polymerase
4 U/μL	Taq DNA-Ligase
ad 15 μL	H ₂ O

Für eine erfolgreiche Assemblierungsreaktion ist das Verhältnis der DNA-Fragmente zueinander von entscheidender Bedeutung. Dabei zeigte sich ein Verhältnis von 2:1 von kürzerem zu längerem DNA-Fragment (0,066 pmol kurzes Fragment und 0,033 pmol langes Fragment) am effektivsten.

4.2.1.6 Zielgerichtete Mutagenese

Das Einbringen von Punktmutationen in ein Gen erfolgte mittels zielgerichteter Mutagenese. Dafür wurden Oligodesoxynukleotide designt, welche den gewünschten Basenaustausch aufweisen und eine Schmelztemperatur von ~60 °C haben. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10: PCR-Ansatz für die zielgerichtete Mutagenese.

PCR-Ansatz	
30 ng	Matrizen-DNA
0,5 μM	Vorwärtsprimer
0,5 μM	Rückwärtsprimer
200 μM	dNTP-Mix
1 x	5 x Phusion GC-Puffer
1 U/50 μL PCR	Phusion DNA-Polymerase

Die PCR wurde gemäß Tab. 11 durchgeführt.

Tab. 11: PCR-Programm für die zielgerichtete Mutagenese.

PCR-Programm			
	DNA-Denaturierung	98 °C	1:30 min
15 Zyklen	DNA-Denaturierung	98 °C	30 s
	Hybridisierung	T _M - 5 °C	30 s
	Elongation	72 °C	15-30 s/kb
Ende	Elongation	72 °C	10 min
	Lagerung	15 °C	bis Entnahme

Im Anschluss an die PCR wurde die Matrizen-DNA mittels Restriktionsverdau aus dem Ansatz entfernt. Der Ansatz wurde mit dem Enzym DpnI (20 U/50 µL Ansatz) versetzt und für 2h bei 37 °C inkubiert.

4.2.1.7 Transformation der Gibson- bzw. Mutageneseansätze

Zuerst wurden die Gibson-Ansätze (4.2.1.5) bzw. die Mutagenese-Ansätze (4.2.1.6) mittels Mikrodialyse (0,025 µm) 15 min gegen H₂O dialysiert. Anschließend wurden 40 µL elektrokompetente *E. coli* TOP10 mittels Elektroporation (4.2.5) mit 3 µL Gibson-Ansatz bzw. Mutagenese-Ansatz transformiert und mit 200 µL SOC-Medium (4.1.4.1) versetzt.

4.2.1.8 Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung

Einzelkolonien auf den selektiven LB-Agarplatten, 3 % Glukose (4.1.4.1) wurden in 10 mL LB-Medium, 3 % Glukose (4.1.4.1) mit dem benötigten Antibiotikum (4.1.4.2) angezogen und anschließend eine Präparation der Plasmid-DNA (4.2.1.2) durchgeführt. Die isolierten Plasmide wurden in einem Testverdau mit 1-2 Restriktionsenzymen linearisiert (Protokoll: siehe New England Biolabs (NEB), Ansatzvolumen: 10 µL), um anschließend die korrekte Größe des Plasmids anhand einer Agarose-Gelelektrophorese (4.2.1.1) zu bestimmen. Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden den entsprechenden Plasmidkarten entnommen. Ergab die Auswertung der Agarosegele die korrekte Größe der DNA, wurden Proben vorbereitet, um die Sequenz der DNA zu verifizieren (GATC, Konstanz sowie Eurofins, Luxemburg, Luxemburg).

4.2.2 Klonierung der Plasmidbibliotheken

4.2.2.1 Mutagenese der Dopaminrezeptorgene

Zunächst wurde das GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) verwendet, um eine Bibliothek aus Rezeptorgenen herzustellen, die Mutationen enthalten. Es

wurden 50 μ L Ansätze hergestellt. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tab. 12 aufgeführt.

Tab. 12: Ansatz für die *error-prone* PCR (EPCR).

EPCR-Ansatz	
10-100 ng	Matrizen-DNA
125 ng	Vorwärtsprimer
125 ng	Rückwärtsprimer
200 μ M	dNTP-Mix
1 x	10 x Mutazyme II Reaktionspuffer
2,5 U/50 μ L PCR	Mutazyme II DNA-Polymerase

Die PCR wurde entsprechend der Parameter in Tab. 13 durchgeführt. Für den Ansatz mit 10 ng Matrizen-DNA wurden 30 Zyklen durchgeführt, für den Ansatz mit 100 ng wurden 23 Zyklen eingestellt.

Tab. 13: Verwendetes Programm für die EPCR.

EPCR-Programm			
	DNA-Denaturierung	95 °C	2 min
23-30 Zyklen	DNA-Denaturierung	95 °C	30 s
	Hybridisierung	$T_M - 5$ °C	30 s
	Elongation der Primer	72 °C	2 min
Ende	Elongation der Primer	72 °C	10 min
	Lagerung	15 °C	bis Entnahme

Im Anschluss an die Mutagenese wurde der EPCR-Ansatz mit dem Restriktionsenzym DpnI (20 U/50 μ L EPCR-Ansatz) versetzt und für 2h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Verdau wurde die DNA mittels MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und anschließend erneut amplifiziert. Dazu wurde der PCR-Ansatz mit einer *high-fidelity* Polymerase (4.2.1.3) und das EPCR-Programm verwendet. Abschließend wurde die DNA erneut gereinigt (4.2.1.4) und bei -20 °C gelagert.

4.2.2.2 Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC)

Die Herstellung der Plasmidbibliothek erfolgte durch das Einfügen der Bibliotheken aus mutierten Rezeptorgen (4.2.2.1) in den Vektor *lac*-MBP-mCherry anhand von *Circular Polymerase Extension Cloning* (Quan & Tian, 2009, 2011). Dabei werden in einer ersten PCR überlappende Basensequenzen an die zu assemblierenden DNA-Fragmente angefügt. In einer zweiten PCR hybridisieren die überlappenden Bereiche und das Plasmid wird durch die DNA-Polymerase vervollständigt und zirkularisiert. Die überlappenden Basensequenzen an das DNA-Fragment für den Rezeptor wurden bereits während der Mutagenese mit den entsprechenden Oligodesoxynukleotiden (Nr. 70+71, Tab. 28) berücksichtigt. Die Herstellung des Vektorfragments erfolgte mit *Touchdown*-PCR (4.2.1.3) und anschließender Reinigung der DNA (4.2.1.4). Für das Vektorfragment wurden die Oligodesoxynukleotide Nr. 40+41 (Tab. 28) verwendet. Die Zusammensetzung des CPEC-Ansatzes ist in Tab. 14 dargestellt.

Tab. 14: Ansatz für die CPEC-Reaktion.

CPEC-Ansatz	
650 ng	Vektorfragment
260 ng	Rezeptorfragment
1 x	HF-Puffer
200 µM	dNTP-Mix
1 U/50 µL PCR	Phusion DNA-Polymerase
ad 130 µL	H ₂ O

Für die Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden 10 µL von dem CPEC-Ansatz abgenommen und der restliche Ansatz auf 6 PCR-Reaktionsgefäße á 20 µL aufgeteilt. Die PCR zur Assemblierung der DNA-Fragmente wurde entsprechend Tab. 15 durchgeführt und der Verlauf der Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.2.1.1) verfolgt. Je ein PCR-Reaktionsgefäß wurde für eine der sechs untersuchten Hybridisierungstemperaturen verwendet *(45, 50, 55, 60, 65, 70 °C).

Tab. 15: Verwendetes Programm für die CPEC-Reaktion.

CPEC-Programm			
	DNA-Denaturierung	95 °C	2 min
30 Zyklen	DNA-Denaturierung	95 °C	30 s
	Hybridisierung	45-70 °C*	30 s
	Elongation der Primer	72 °C	2 min
Ende	Elongation der Primer	72 °C	10 min
	Lagerung	15 °C	bis Entnahme

Nach der CPEC-Reaktion wurden ~20 µL CPEC-Reaktionsansatz in einer Mikrodialyse (0,025 µm) 15 min gegen H₂O dialysiert und anschließend transformiert (4.2.2.3).

4.2.2.3 Transformation der Plasmidbibliothek

Die Transformation der Plasmidbibliothek erfolgte verändert zu der Transformation in 4.2.1.7. Nach der Mikrodialyse wurden 80 µL elektrokompetenten *E. coli* TOP10 mit 10 µL CPEC-Ansatz anhand von Elektroporation (4.2.5) transformiert und anschließend 910 µL SOC-Medium dazugegeben. Der Ansatz wurde für 1h bei 37 °C und 600 rpm im Heizblock inkubiert und anschließend eine Verdünnungsreihe auf selektiven LB-Agarplatten, 3 % Glukose (4.1.4.1) ausplattiert und ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der restliche Transformationsansatz wurde in 50 mL selektivem 2 x TY-Medium, 3 % Glukose (4.1.4.1) inokuliert und für 2h bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Die Kultur wurde daraufhin filtriert (5 µm). Das Filtrat wurde für 10 min bei 8000 g zentrifugiert und das Pellet anschließend in 50 mL frischem, selektivem 2 x TY-Medium, 3 % Glukose (4.1.4.1) resuspendiert. Die Kultur wurde bei 30 °C und 160 rpm über Nacht geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die OD₆₀₀ bestimmt (4.2.6) und 2x10⁹ Zellen für 5 min bei 7000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 200 µL *Hognees Freezing Medium* (4.1.4.1) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und abschließend bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.3 Expression des humanen Dopaminrezeptorgens in Insektenzellen

Die Generierung der Baculoviren und die Expression der D_{3wt}-Rezeptorgens in Insektenzellen wurde mittels MultiBac™ (Geneva Biotech, Genf, Schweiz) durchgeführt.

4.2.3.1 Insektenzellkultur

Die Insektenzelllinien Sf21 (*S. frugiperda*) und High Five (*T. ni*) wurden in serumfreien Medium in 50 mL Suspensionskulturen bei einer Zelldichte von $0,5-0,8 \times 10^6$ Zellen/mL in 250 mL Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluss gehalten.

Die Kultivierung erfolgte bei 27 °C und 130 rpm. Der Schraubverschluss wurde dabei eine halbe Umdrehung geöffnet, um die Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen mittels Trypanblau-Färbung auf ihre Vitalität hin überprüft. Dafür wurde Zellsuspension 1:1 mit Trypanblaulösung (0,4 % (w/v) in H₂O) gemischt und in einem Hämozytometer nach Neubauer unter dem Mikroskop analysiert. Lebende Zellen erscheinen weiß, tote Zellen färben sich blau, da der Farbstoff durch die beschädigte Zellmembran gelangt. Die Zellen wurden anschließend mit vorgewärmten Medium auf eine Zelldichte von $0,5-0,8 \times 10^6$ Zellen/mL in einen neuen Erlenmeyerkolben gesplittet.

4.2.3.2 Herstellung des Bacmids

Chemisch kompetente *E. coli* DH10MultiBac wurden mit 50 ng Plasmid-DNA transformiert. Dafür wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, Plasmid-DNA dazugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s, gefolgt von 2 min Inkubation auf Eis. Anschließend wurde 1 mL LB-Medium zu den Zellen gegeben und bei 37 °C und 800 rpm im Heizblock über Nacht geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 1 min bei 7000 x g pelletiert, 850 µL Medium abgenommen, die Zellen in dem restlichen Medium resuspendiert und auf selektiven MultiBac-Platten (4.1.4.1) ausplattiert. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C inkubiert, bis deutlich zwischen blau und weiß gefärbten Kolonien unterschieden werden konnte. Mit einer weißen Kolonie wurde eine 10 mL Kultur mit selektivem LB-Medium (4.1.4.1, 50 µg/mL Kanamycin, 10 µg/mL Tetracylin, 10 µg/mL Gentamycin) angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm über Nacht geschüttelt. Für die Isolation der Bacmid-DNA wurde zunächst das QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Nach dem Abtrennen des Zellschrotts für 10 min bei 13000 rpm, 4 °C wurde der Überstand jedoch nicht auf die Reinigungssäule gegeben, sondern in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut für 5 min bei 13000 rpm, RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut abgenommen, 750 µL Isopropanol dazugegeben und vorsichtig geschüttelt. Die ausgefällte Bacmid-DNA wurde für 10 min bei 13000 rpm, RT zentrifugiert. Danach wurden 250 µL Ethanol (70 %) zu dem Pellet gegeben und für 5 min bei 13000 rpm, RT zentrifugiert. Zu dem Pellet wurden 100 µL Ethanol (70 %) gegeben und ab diesem Zeitpunkt an der Sterilbank weitergearbeitet. Der Ethanol wurde abgenommen und das Pellet an der Luft für ca. 10 min getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 100 µL sterilem H₂O gelöst und die Konzentration am Nanodrop bestimmt. Die Lagerung der Bacmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

4.2.3.3 Generierung der Viren

Für die Generierung des initialen Virus (V0) wurden Sf21 mit der Bacmid-DNA transfiziert. Dazu wurden in zwei Wells einer 6-Well-Platte 2 mL Sf21 ($0,5-0,8 \times 10^6$ Zellen/mL) ausgesät und für >15 min bei 27 °C inkubiert. Die Konfluenz betrug ca. 70 %. Währenddessen wurde der Transfektionsmix in Tab. 16 angesetzt und für 15-30 min bei RT inkubiert.

Anschließend wurde der Transfektionsmix gleichmäßig auf die zwei Wells aufgeteilt, die Platte mit Parafilm abgedichtet und bei 27 °C für ca. sieben Tage inkubiert.

Tab. 16: Ansatz für die Transfektion in Insektenzellen.

Transfektionsmix	
200 µL	Medium
~ 6µg	Bacmid-DNA
16 µL	X-tremeGENE™ HP Transfektionsreagenz

Nach ca. sieben Tagen wurde der Überstand in den zwei Wells abgenommen und V0 geerntet. Für die erste Virengeneration (V1) wurden 50 mL Sf21 ($0,8 \times 10^6$ Zellen/mL) mit V0 infiziert (~4mL) und bei 27 °C für 72h geschüttelt. Anschließend wurde für die Ernte von V1 die Zellsuspension für 10 min bei 900 x g zentrifugiert und der Überstand steril filtriert (0,2 µm). Für die zweite Virengeneration (V2) wurden 50 mL Sf21 ($0,8 \times 10^6$ Zellen/mL) 1:25 mit V1 infiziert (2 mL) und wieder bei 27 °C für 72h geschüttelt. Die Ernte wurde gleich zu V1 durchgeführt. Die Lagerung der Viren erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C.

4.2.3.4 Expression in High Five

Für die Synthese des Dopaminrezeptors wurden 100 mL High Five ($1,6 \times 10^6$ Zellen/mL) 1:40 mit V2 infiziert und bei 27 °C für 72h in einem 500 mL Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluss geschüttelt. Anschließend wurden Zellen mittels Zentrifugation für 10 min bei 900 x g geerntet und das Zellpellet bei -20 °C gelagert.

4.2.4 Reinigung des humanen Dopaminrezeptors aus Insektenzellen

Die Reinigung des humanen D₃-Rezeptors aus High Five Insektenzellen erfolgte in Anlehnung an Chien *et al.* (Chien *et al.*, 2010). Das Pellet (4.2.3.4) wurde in 30 mL Lysepuffer (10 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl, Proteaseinhibitor) aufgetaut, resuspendiert und mittels Mikrofluidizer unter Eiskühlung aufgeschlossen, bis die Lösung homogen war. Die Membranen wurden mittels Zentrifugation für 20 min bei 40000 x g und 4 °C abgetrennt. Das Membranpellet wurde mit dem 9fachen Volumen (w/v) Solubilisierungspuffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 500 mM NaCl, 10% Glycerol) in einem

Dounce-Homogenisator (Roth, Karlsruhe) homogenisiert. Das Pellet wurde dazu 10 x mit Pistill A vorzerkleinert und abschließend 10 x mit Pistill B homogenisiert. Anschließend wurde zu dem Homogenat 1/10 Volumen (v/v) Solubilisierungspuffer gegeben, in dem 5 % (w/v) DDM und 1% (w/v) CHS gelöst waren und für 1h bei 4 °C gerührt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 40000 x g und 4 °C wurde der Überstand 1:1 mit Solubilierungspuffer verdünnt, 4 mL Strep-Tactin® Säulenmaterial dazugegeben und über Nacht bei 4 °C langsam gerührt. Am nächsten Tag wurde das Säulenmaterial für 10 min bei 2700 x g und 4 °C abzentrifugiert (Durchfluss) und anschließend dreimal mit 5 SV Waschpuffer (Solubilierungspuffer + 0,05 % DDM, 0,01 % CHS) im Batchverfahren gewaschen. Die Elution erfolgte in 5 x 2 mL Schritten mit Elutionspuffer (Waschpuffer + 5 mM Desthiobiotin).

4.2.5 Elektroporation

Die Transformation elektrokompenter Bakterien mit Plasmid-DNA erfolgte mittels Elektroporation. Die Herstellung hauseigener elektrokompenter Zellen wurde von Ulrike Persau und Ramona Heißmann durchgeführt. Für die Transformation der Plasmidbibliothek wurden elektrokompente *E. coli* TOP10 von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA) verwendet. Für die Elektroporation wurden 0,5-10 µL Plasmid-DNA einer Plasmidpräparation (4.2.1.2) mit 40-80 µL elektrokompenten *E. coli*-Zellen vermischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Anschließend wurde mittels MicroPulser ein Spannungsimpuls (1,8 kV) ausgeführt. Zu den Zellen wurden 200-1000 µL SOC-Medium (4.1.4.1) gegeben und der Ansatz für 1h bei 37 °C, 600 rpm im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Probe entweder auf selektiven LB-Agarplatten (4.1.4.1) ausplattiert oder direkt selektives LB-Medium (4.1.4.1) angeimpft. Zellen, die Plasmid enthalten, welches für den humanen Dopaminrezeptor codiert, wurden auf selektiven LB-Agarplatten, 3 % Glukose (4.1.4.1) ausplattiert oder in 10-100 mL selektives 2 x TY-Medium, 3 % Glukose (4.1.4.1) überführt.

4.2.6 Anzucht und Induktion der Genexpression in *E. coli*

Während der Anzucht wurde die optische Dichte (OD) der Bakterienkultur mittels UV-Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 600 nm (optische Dichte - OD₆₀₀) bestimmt. Das verwendete Flüssigmedium wurde als Referenzwert verwendet. Die Proben wurden in Halbmikroküvetten mit 1 cm Schichtdicke mit einem Ultrospec 2100 pro Spektralphotometer gemessen. Proben, die einen OD₆₀₀-Wert von > 1,0 aufwiesen, wurden dementsprechend verdünnt. Es wurde angenommen, dass 1 mL Zellsuspension bei einem OD₆₀₀-Wert von 1x10⁹ Zellen enthält. Für die Überprüfung der Proteinproduktion wurden vor Induktion und nach Induktion bis zur Zellernte Proben mit 1/OD₆₀₀ mL Kultur abgenommen und bei 7000 x g für 4 min bei RT zentrifugiert. Die Pellets wurden bei -20 °C gelagert und anschließend mittels SDS-PAGE (4.2.14) analysiert.

4.2.6.1 Expression des cMSP1E3D1-Gens in *E. coli* BL21 Star (DE3)

Für die Expression des cMSP1E3D1-Gens wurden *E. coli* BL21 Star (DE3) mit dem entsprechenden Plasmid mittels Elektroporation (4.2.5) transformiert. Es wurde eine Vorkultur (VK) mit 500 mL selektivem LB-Medium (4.1.4.1) angeimpft und ÜN bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Für die Hauptkultur (HK) wurden am nächsten Tag je 3 x 2 L selektives LB-Medium mit je 170 mL VK angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von ~1 erreicht war. Anschließend wurden die Expression des rekombinanten Gens mit 1 mM IPTG (4.1.4.2) induziert und 1h bei 37 °C weitergeschüttelt. Die Temperatur wurde dann auf 28 °C reduziert und für weitere 3h bei 160 rpm geschüttelt. Die Ernte der Bakterienzellen erfolgte mittels Zentrifugation für 20 min bei 8000 x g und 4 °C. Die Pellets wurden vereinigt und bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

4.2.6.2 Expression des Sortase-Gens in *E. coli* BL21 (DE3)

Für die Expression des Sortase-Gens wurden *E. coli* BL21 (DE3) mit dem entsprechenden Plasmid mittels Elektroporation (4.2.5) transformiert. Es wurde eine 10 mL-Übertagkultur mit selektivem LB-Medium (4.1.4) angeimpft und über Tag (ÜT) bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Abends wurde eine Übertagkultur in eine VK mit 400 mL selektivem LB-Medium inokuliert und ÜN bei 37 °C geschüttelt. Für die HK wurden am nächsten Morgen je 2 x 2 L selektives LB-Medium mit je 100 mL VK angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von ~0,7 erreicht war. Anschließend wurde die Überexpression des rekombinanten Gens mit 0,4 mM IPTG (4.1.4.2) induziert und 4h bei 30 °C weitergeschüttelt. Die Bakterienzellen wurden mittels Zentrifugation für 20 min bei 8000 x g und 4 °C geerntet. Das Pellet wurde bis zur Reinigung bei -20 °C gelagert.

4.2.6.3 Expression des humanen Dopaminrezeptor-Gens in *E. coli* TOP10

Für die Expression des humanen Dopaminrezeptor-Gens wurden *E. coli* TOP10 mit dem entsprechenden Plasmid transformiert (4.2.5) und VKs mit 20 mL oder 100 mL selektivem 2 x TY-Medium, 3 % Glukose angeimpft (4.1.4.1) und ÜN bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Für die HKs wurden am nächsten Morgen 20 mL oder 2 L selektives 2 x TY-Medium, 1 % Glukose (4.1.4.1) mit der VK auf eine OD₆₀₀ von etwa ~0,1 angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa ~0,5, wurde die Expression des rekombinanten Gens durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG (4.1.4.2) induziert. Die Kultur wurde anschließend für 1-22h bei 20 °C geschüttelt. Die Bakterienzellen wurden mittels Zentrifugation der Kulturen für 20 min bei 8000 x g und 4 °C geerntet. Die Pellets wurden entweder sofort weiterbearbeitet oder bei -20 °C gelagert.

4.2.6.4 Expression Bibliotheken für die Rezeptorvarianten in *E. coli*

Die Expression der Bibliotheken erfolgte ähnlich zu Kapitel 4.2.6.3. Für die VK wurde jedoch 50 mL Medium verwendet und mit einem Zellpellet (4.2.2.3) inokuliert.

4.2.7 Reinigung der zytosolischen Proteine

Die Reinigung von cMSP1E3D1 (4.2.6.1) und der Sortase (4.2.6.2) erfolgte an einer P1-Pumpe bei RT bzw. an einer ÄKTA *pure*. Der Fortschritt der Reinigung wurde mit einer SDS-PAGE (4.2.14) untersucht. Bei beiden Reinigungen wurde eine Nickelaffinitätschromatographie durchgeführt. Dabei interagieren die Imidazol-Ringe der Seitenketten des His₆-Anhangs des jeweiligen Proteins mit den immobilisierten Ni²⁺-Ionen des Säulenmaterials (Gaberc-Porekar & Menart, 2001). Die Elution erfolgt mit freiem Imidazol.

4.2.7.1 Reinigung von cMSP1E3D1

Die Reinigung von cMSP1E3D1 erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit anschließender Rückfaltung in Anlehnung an das Protokoll von Nasr *et al.* (Nasr *et al.*, 2017). Das Bakterienpellet (4.2.6.1) wurde in 30 mL MSP-Denaturierungspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 6 M GdmCl, 500 mM NaCl) resuspendiert. Anschließend wurden nicht aufgeschlossene Zellen und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation für 30 min bei 19000 x g und 4 °C abgetrennt. Der Überstand (ÜS1) wurde abgenommen. Das Pellet (P1) wurde erneut in 30 mL MSP-Denaturierungspuffer resuspendiert und zusätzlich mit Ultraschall homogenisiert (Cycle: 0,6; Amplitude: 70 %, 3 x 1 min auf Eis), um die Zellen aufzuschließen, die im ersten Schritt noch nicht aufgeschlossen wurden. Die Abtrennung der unlöslichen Bestandteile erfolgte wiederum mittels Zentrifugation für 30 min bei 19000 x g und 4 °C. Der Überstand nach dem zweiten Aufschluss (ÜS2) wurde mit ÜS1 vereinigt, filtriert (0,45 µm) und an der P1-Pumpe bei RT drei Mal mit niedriger Flussgeschwindigkeit (~0,5-1 mL/min) auf zwei zusammenhängende 5 mL Ni²⁺-NTA Säulen aufgetragen. Das Säulenvolumen (SV) betrug demnach 10 mL. Die Säule wurde anschließend mehreren Waschschritten (W1-W6) unterzogen. Die Waschschriffe W1-4 wurden bei RT an der P1-Pumpe durchgeführt. W1: 10 SV MSP-Denaturierungspuffer, W2: 10 SV MSP-Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 500 mM NaCl), um das cMSP1E3D1 zurück zu falten. W3: 10SV MSP-Waschpuffer + 1 % TritonX-100, um *E. coli*-eigene Lipide, die an das cMSPE3D1 gebunden haben, wegzuwaschen. Die Waschschriffe W4-6 sowie die Elution des Proteins wurden an einer ÄKTA *pure* bei 4 °C durchgeführt. W4: 10 SV MSP-Waschpuffer + 50 mM Cholat, um das TritonX-100 aus dem vorherigen Waschschrift zu entfernen. W5: 10 SV MSP-Waschpuffer, W6: MSP-Waschpuffer + 20 mM Imidazol. Die Elution erfolgte in einem Schritt mit 10 SV MSP-Waschpuffer + 500 mM Imidazol. Die Eluatfraktionen, die nach Analyse mittels SDS-PAGE (4.2.14) die größten Mengen an Zielprotein aufwiesen, wurden vereinigt. Anschließend wurde der N-terminalen His₆-Anhang mit TEV-Protease Verdau abgeschnitten. Dazu wurden je 1 mL Eluat mit 20 µL TEV-Protease versetzt und das gesamte Eluat ÜN bei 4 °C gegen 2 x 5 L MSP-Dialysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl) dialysiert (MWCO 10 kDa).

Die Endkonzentration des Dialysats (60 μM) wurde über die Absorption bei 280 nm und dem Extinktionskoeffizienten des cMSP1E3D1 nach TEV-Verdau ($\epsilon_{280} = 26930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass die Werte nur annähernd korrekt sind, da der Dialyseansatz neben dem geschnittenen cMSP1E3D1 auch die TEV-Protease enthielt. Die TEV-Protease war im Verhältnis zu dem geschnittenen cMSP1E3D1 jedoch nur in geringen Mengen vorhanden. Nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff wurde das Protein bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

4.2.7.2 Reinigung der Sortase

Die Reinigung der Sortase erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2011) und unter zur Hilfenahme des ÄKTA *pure* bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Das Zellpellet (4.2.6.2) wurde in 30 mL Sortase-Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF) unter Zugabe einer Spatelspitze DNaseI und einer halben Tablette Proteaseinhibitor (Roche, Basel, Schweiz) resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Mikrofluidizer unter Eiskühlung aufgeschlossen, bis die Lösung erkennbar homogen war und unlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation für 30 min bei $19000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ abgetrennt. Der Überstand wurde filtriert ($0,45 \mu\text{m}$) und auf eine Ni^{2+} -NTA Säule mit einem Säulenvolumen von 5 mL aufgetragen. Die Flussgeschwindigkeit betrug hier sowie bei den Wasch- und Elutionsschritten, 1-1,5 mL/min. Die Säule wurde mit 20 SV Sortase-Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen und das Protein anschließend mit steigender Konzentration an Imidazol von der Säule eluiert. Dabei wurde ein Einstufengradient verwendet, bei dem der Anteil des Sortase-Elutionspuffers (50 mM Tris/HCl, pH 8, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol) kontinuierlich über 20 SV von 0 % auf 100 % erhöht wurde. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (4.2.14) auf das Zielprotein hingehend untersucht und die Waschfraktionen sowie die Eluatsfraktionen mit dem höchsten Anteil an Sortase vereinigt. Die vereinigte Fraktion wurde anschließend gegen $2 \times 5 \text{ L}$ Sortase-Dialysepuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) ÜN bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ dialysiert (MWCO 5 kDa). Das Dialysat wurde mittels Vivaspin 20-Konzentratoren (MWCO 5 kDa) bei $4500 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf eine Endkonzentration von $\sim 800 \mu\text{M}$ konzentriert und anschließend 1:1 mit Glycerin verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.8 Herstellung von Membranhomogenat aus *E. coli*

Das Bakterienpellet (4.2.6.3) wurde in vierfacher Menge (w/v) Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Der Aufschlusspuffer wurde zuvor mit Proteaseinhibitor (Roche, Basel, Schweiz) gemäß Anleitung (1 Tablette/50 mL Puffer), einer Spatelspitze Lysozym und DNase I versetzt. Der Zellaufschluss wurde mit dem Mikrofluidizer unter Eiskühlung durchgeführt, bis die Lösung homogen war. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile mittels Zentrifugation für 30 min, $6600 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ abgetrennt (Überstand1 (ÜS1) und Pellet1 (P1)). Die Membran-

bestandteile im Überstand nach der ersten Zentrifugation wurden mittels Ultrazentrifugation für 1h, 120 000 x g und 4 °C abgetrennt (Überstand Ultrazentrifuge (ÜSUZ) und Membranpellet).

Das Membranpellet wurde mit dem 10-12fachen Volumen (w/v) Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂) im Dounce-Homogenisator (Roth, Karlsruhe) zerkleinert. Dazu wurde das Pellet 10 x mit Pistill A vorzerkleinert und abschließend 10 x mit Pistill B homogenisiert. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde mittels BCA-Assay (4.2.12.2) bestimmt.

4.2.9 Herstellung von Nanodiscs

Es wurden Nanodiscs mit den Lipiden 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoglycerol (POPG), 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoglycerol (DOPG), und 1,2-Dimyris-toyl-sn-Glycero-3-Phosphoglycerol (DMPG) hergestellt. Dazu wurde das gereinigte cMSP1E3D1 (4.2.7.1) direkt verwendet (unverknüpftes cMSP1E3D1) oder vor der Assemblierung mit den Lipiden kovalent verknüpft (4.2.9.1). Die Durchführung der kovalenten Verknüpfung erfolgte in Anlehnung an Nasr *et al.* (Nasr *et al.*, 2017).

4.2.9.1 Kovalente Verknüpfung von cMSP1E3D1

Für die kovalente Verknüpfung des cMSP1E3D1 wurden unverknüpftes cMSP1E3D1 und die Sortase auf eine Endkonzentration von 5 µM bzw. 7,5 µM in Sortase-Reaktionspuffer (300 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂) verdünnt. Für den präparativen Maßstab wurden sechs Ansätze á 20 mL hergestellt. Die Ansätze wurden für 1-4h bei 37 °C inkubiert, anschließend vereinigt und filtriert (0,45 µm). Anschließend wurde die vereinigte Fraktion ÜN mehrfach auf zwei zusammenhängende 5 mL Ni²⁺-NTA Säulen (SV 10 mL) aufgetragen, die zuvor mit 3 SV Verknüpfungspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl) äquilibriert wurde. Am nächsten Morgen wurde mit 3 SV Waschpuffer (Verknüpfungspuffer + 10 mM Imidazol) gewaschen und mit 10 SV Elutionspuffer (Verknüpfungspuffer + 500 mM Imidazol) eluiert. Die Proteinkonzentration im Durchfluss, der das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 enthielt, wurde mittels NanoDrop-Spektrophotometer (4.2.12.1) bestimmt. Der Durchfluss wurde mittels Vivaspin 20-Konzentratoren (MWCO 5 kDa) bei 4500 x g und 4 °C konzentriert. Im Anschluss erfolgte eine präparative Größenausschlusschromatographie, die in Anlehnung zu der analytischen Größenausschlusschromatographie (4.2.16) durchgeführt wurde. Für die präparative Größenausschlusschromatographie wurde eine HiLoad 16/600 Superdex 75 pg Säule verwendet. Als Gelfiltrationspuffer diente der Verknüpfungspuffer. Es wurde ein 1 mL Probenschlauch für den Auftrag der Probe verwendet.

4.2.9.2 Assemblierung von Nanodiscs

Die Assemblierung der Nanodiscs erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von Rues *et al.* und Nasr *et al.* (Rues, Henrich, *et al.*, 2016; Nasr *et al.*, 2017). Dazu wurde das unverknüpfte

cMSP1E3D1 (4.2.7.1) und das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 (4.2.9.1) verwendet sowie die Lipide DOPG, POPG und DMPG. Von den Lipiden wurden 50 mM Stammlösungen in 100 mM Natriumcholat (in H₂O) unter starkem Schütteln bei 37 °C hergestellt. Es wurden 300 µL Assemblierungsansätze mit ND-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl) angesetzt.

Die Zusammensetzung kann Tab. 17 entnommen werden. Die Endkonzentration an cMSP1E3D1 beträgt 100 µM, die des Detergens Dodecylphosphocholin (DPC) 0,1%. Das cMSP1E3D1 wurde in den angegebenen Verhältnissen mit dem jeweiligen Lipid gemischt.

Aufgrund der angesetzten Lipid/Natriumcholat-Stammlösungen verändern sich Konzentrationen von Lipid zu Natriumcholat direkt proportional bei den jeweiligen Verhältnissen von cMSP1E3D1 zu Lipid (1:80-1:110). Bei den Ansätzen mit DOPG in den Verhältnissen 1:80 und 1:90 wurde weiteres Natriumcholat dazugegeben, um eine Endkonzentration an Natriumcholat von 20 mM einzustellen.

Tab. 17: Zusammensetzung der Assemblierungsansätze für die Nanodiscs.

	DOPG				DMPG		POPG
Verhältnis	1:80	1:90	1:100	1:110	1:90	1:110	1:90
Lipid [mM]	8	9	10	11	9	11	9
Cholat [mM]	20	20	20	22	18	22	18
cMSP1E3D1	100 µM						
DPC	0,1 %						

Die Ansätze aus Tab. 17 wurden für 1h bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert (DOPG: Raumtemperatur (RT), DMPG: RT, POPG: RT bzw. 4 °C) und anschließend die Assemblierung der Nanodiscs durch Entfernen des Detergens aus dem Ansatz initiiert. Die Entfernung des Detergens geschah entweder durch die Zugabe von *Bio-Beads* oder durch Dialyse. Für die Entfernung der Detergenzien mittels *Bio-Beads* wurden die *Bio-Beads* für mindestens 3h in ND-Puffer inkubiert und anschließend die an der Oberfläche schwimmenden *Bio-Beads* entfernt. Zu 300 µL Assemblierungsansatz wurden 150 mg nasse *Bio-Beads* gegeben und der Ansatz nahe der vorgegebenen Temperatur für 4h leicht geschüttelt. Für die Dialyse wurde 48h gegen 1 L ND-Puffer dialysiert (MWCO 10 kDa) und der Dialysepuffer alle 12h gewechselt. Nach Entfernung der Detergenzien wurden die Ansätze mit den *Bio-Beads* filtriert (0,2 µm) bzw. die Dialysate für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Filtrate bzw. Überstände wurden mittels analytischer Größenausschlusschromatographie (4.2.16) untersucht.

4.2.10 Zellfreie Expression

4.2.10.1 Herstellung von *E. coli* S30 Extrakt

Die Herstellung des *E. coli* S30 Extrakts erfolgte nach (Schwarz *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurden für den *E. coli* S30 Extrakt *E. coli* BL21 verwendet. Zunächst wurde die logarithmische Wachstumsphase der *E. coli* BL21 anhand einer Wachstumskurve bestimmt. Dazu wurden 2 L 2xYTPG Medium 1:100 mit einer *E. coli* BL21 VK ohne Antibiotikum inokuliert und bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Die Wachstumskurve zeigte, dass die Zellen sich etwa 150 min in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, bis sie in die stationäre Phase übergingen (Abb. 19). Dies entsprach einer OD₆₀₀ von etwa ~ 2.

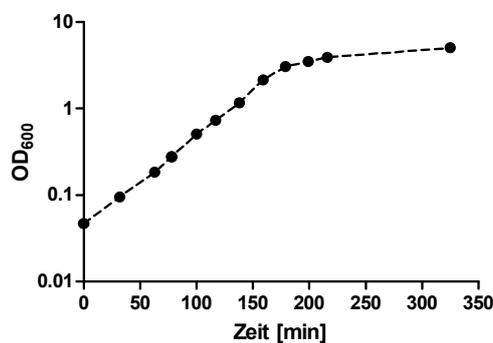


Abb. 19: Wachstumskurve von *E. coli* BL21. Aufgetragen ist die OD₆₀₀ in halblogarithmischer Darstellung gegen die Zeit.

Für die Herstellung des Extrakts wurden 6 x 2 L 2xYTPG Medium 1:100 mit einer *E. coli* BL21 VK angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt bis eine OD₆₀₀ von etwa ~1-1,2 erreicht war. Anschließend wurde mit den Zellen entsprechend der Vorgaben in (Schwarz *et al.*, 2007) weiter verfahren. Dies stellte sicher, dass die Zellen sich entsprechend dem Vorversuch in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Das Nasszellgewicht betrug 29 g. Der Zellaufschluss wurde statt mit der French-Press mit einem Mikrofluidizer durchgeführt.

4.2.10.2 Herstellung T7-Polymerase

Die T7-Polymerase wurde vom Lehrstuhl Biochemie IV (UBT) bereitgestellt. Die hauseigene Herstellung erfolgte durch Ramona Heißmann.

4.2.10.3 Allgemeiner Reaktionsansatz

Für einen Reaktionsansatz wurden 100 µL Reaktionsmix (RM) und 1,5 mL Versorgungsmix (VM) gemäß Tab. 18 auf Eis und unter RNase freiem Arbeiten vorbereitet. Die Plasmid-DNA wurde am selben Tag präpariert (4.2.1.2), um eine hohe Qualität der DNA zu gewährleisten. Die Herstellung der Stammlösungen erfolgte nach (Schwarz *et al.*, 2007; Rues, Heinrich *et al.*, 2016). Für die Aminosäuren wurde eine Stammlösung mit 25 mM hergestellt, indem alle zwanzig natürlich vorkommenden Aminosäuren im gleichen molaren Verhältnis eingewogen und anschließend in H₂O resuspendiert wurden (Lösung blieb trüb).

Tab. 18: Allgemeiner Reaktionsansatz für die zellfreie Expression.

Reagenz	Endkonzentration	Mix
S30-Extrakt	35%	RM
T7-Polymerase	6 U/ μ L	RM
Plasmid-DNA	1 μ g/ 100 μ L	RM
RNase Inhibitor	0,5 U/ μ L	RM
tRNA <i>E. coli</i>	0,5 mg/ mL	RM
Pyruvatkinase	0,04 mg/ mL	RM
Aminosäuren	1 mM	RM+VM
Acetylphosphat	20 mM	RM+VM
Phosphoenolpyruvat	20 mM	RM+VM
NaN ₃	0,05%	RM+VM
GTP, CTP, UTP	0,8 mM	RM+VM
ATP	1,2 mM	RM+VM
DTT	2 mM	RM+VM
Folinsäure	0,1 mg/ mL	RM+VM
Protease Inhibitor	1x	RM+VM
Mg(oAC) ₂	13 mM	RM+VM
KoAC	220 mM	RM+VM
PEG 8000	2%	RM+VM
HEPES/KOH pH 8,0	100 mM	RM+VM

Die zellfreie Expression wurde in 24 *Well*-Platten durchgeführt. Dabei wurden 1,5 mL VM in ein *Well* vorgelegt. Anschließend wurde der Expressionsbehälter mit einer Membran bespannt (MWCO 10 kDa), mit dem RM befüllt und in den VM eingetaucht (Abb. 10, 3.3.2). Die 24 *Well*-Platte wurde mit Parafilm dicht verschlossen und für die Expression bei 30 °C und 100 rpm über Nacht inkubiert. Nach Beendigung der Expression wurde der RM den Behältern entnommen und für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Harnstoffpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8, 6 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 0,2 % (w/v) SDS) resuspendiert.

4.2.11 Expression des humanen Dopaminrezeptorgens in HEK-Zellen

Die Expression des humanen Dopaminrezeptors in HEK-Zellen mithilfe der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide und die anschließende Herstellung von Membranhomogenat erfolgte

durch Dr. Dorothee Weikert und Dr. Harald Hübner (LS für Pharmazeutische Chemie, Prof. Dr. Peter Gmeiner, Universität Erlangen-Nürnberg (FAU)) (Hübner *et al.*, 2000).

4.2.12 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der gereinigten Proteine cMSP1E3D1 (4.2.7.1) und der Sortase (4.2.7.2) wurden mit Hilfe des NanoDrop-Spektrophotometers bestimmt. Die Gesamtproteinkonzentration der Membranhomogenate aus *E. coli* (4.2.8) wurde mittels BCA-Assay bestimmt.

4.2.12.1 NanoDrop-Spektrophotometer

Die Messung der Proteinkonzentration von reinen Proben wurde an einem NanoDrop-Spektrophotometer durchgeführt. Dabei wurde die Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm (A_{280}) Wellenlänge gemessen und mit dieser die Proteinkonzentration c nach Lambert-Beer berechnet (Gl.1).

$$A_{280} = \varepsilon_{280} \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl.1})$$

Der molekulare Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ε_{280}) wurde mit dem Programm ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) berechnet bzw. der Literatur entnommen.

$$\varepsilon_{280} (\text{cMSP1E3D1}) = 26930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}, \varepsilon_{280} (\text{Sortase}) = 17420 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

4.2.12.2 BCA-Assay

Die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay wurde mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) nach Protokoll durchgeführt.

4.2.13 Proteinfällung

Proteinproben mit einer geringen Proteinkonzentration, wie beispielsweise nach der analytischen Größenausschlusschromatographie (4.2.16), wurden konzentriert, um diese mittels SDS-PAGE (4.2.14) analysieren zu können. Dazu wurde entweder die Trichloressigsäure (TCA) Fällung (A) oder die Azeton-Fällung (B) verwendet.

A) Trichloressigsäure (TCA) Fällung

Für die Trichloressigsäure (TCA) Fällung wurde zu der zu fällenden Probe 1/10 Volumen 100 % TCA-Lösung hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Das gefällte Protein wurde anschließend mittels Zentrifugation für 20 min bei 13000 rpm und 4 °C abgetrennt. Das Pellet wurde mit 100 µL Ethanol (80 %) gewaschen und erneut für 20 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet entweder an der Luft oder für 2 min in der SpeedVac getrocknet. Das Pellet wurde abschließend in 10 µL 2x Roti-Load resuspendiert und für 5 min bei 95 °C inkubiert.

B) Azeton-Fällung

Für die Azeton-Fällung wurde zu einem Volumenteil Probe fünf Volumenteile eiskaltes Azeton (80 %) gegeben und die Mischung ÜN bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde die Probe für 1h bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und abschließend in 10 µL 2x Roti-Load resuspendiert und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

4.2.14 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Untersuchung von Proteinen bezüglich ihres Molekulargewichts wurde mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) im Probenpuffer bzw. in den Gelen und im Laufpuffer führt zur Denaturierung der Proteine. Dabei binden pro Gramm Protein etwa 1,4 g SDS, wodurch die Eigenladung der Proteine überdeckt wird und eine negative Ladungsverteilung entsteht. Die negative Ladung ermöglicht nun die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht mittels Elektrophorese. Polyacrylamid-Gele (PA-Gele) werden aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt, wobei die Konzentration der Acrylamide den Vernetzungsgrad und damit die Porengröße des Gels bestimmt.

Es wurde zum einen das Tris-Glyzin Gelsystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet, zum anderen das Bis-Tris Gelsystem basierend auf dem NuPAGE® Elektrophorese-System von Thermo Fisher Scientific. Bei dem klassischen Tris-Glyzin Gelsystem nach Laemmli wird ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet, wobei der pH-Wert und die Ionenstärke von Sammelgel (Tris, pH 6,8), Trenngel (Tris, pH 8,8) und SDS-Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) unterschiedlich sind. Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte somit effektiv im alkalischen pH-Bereich (pH 9,5), was zu Nebeneffekten wie schlechter Auflösung, Verbreiterung der Banden und Artefakten führen kann. In dieser Arbeit war die Auflösung des Tris-Glyzin Gelsystems jedoch ausreichend, um den Verlauf der Synthese und Reinigung des cMSP1E3D1 (4.2.7.1) und der Sortase (4.2.7.2) zu untersuchen. Die Zusammensetzung kann Tab. 19 entnommen werden.

Tab. 19: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für das Tris-Glyzin System.

Stamm-Lösungen	Endkonzentrationen	
	Sammelgel	Trenngel 17 %
30 % (w/v) Acrylamid-Lösung	7,5 % (w/v)	10 % (w/v)
2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung	0,21 % (w/v)	0,41 % (w/v)
3 M Tris, pH 8,8		375 mM
0,5 M Tris, pH 6,8	62 mM	
10 % (w/v) SDS-Lösung	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
H ₂ O	ad 20 mL	ad 30 mL
10 % (w/v) APS-Lösung	200 µL	300 µL
TEMED	20 µL	20 µL

Bei dem Bis-Tris Gelsystem haben Sammelgel und Trenngel den gleichen pH-Wert (Bis-Tris, pH 6,6). Als Laufpuffer wird MOPS-Laufpuffer (50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, pH 7,7) mit neutralem pH-Wert verwendet, was zu einem signifikant niedrigeren pH-Wert (pH 7,0) während der Elektrophorese führt. Für das Bis-Tris Gelsystem wird ein Probenpuffer mit hohem pH-Wert (pH 8,5) verwendet, was die Säurebildung während der Erwärmung vermindern soll (Laemmli-Probenpuffer, pH 6,8). Der neutrale pH-Wert, bei welcher die SDS-PAGE durchgeführt wird, erhöht die Proteinstabilität während der Elektrophorese, was in einer schärferen Auflösung der Banden und somit in genaueren Ergebnissen resultiert. In dieser Arbeit wurde die zu analysierenden Proben, die die Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ aus Expression mittels *E. coli* enthielten, mit dem Bis-Tris Gelsystem untersucht. Unter Verwendung des Tris-Glyzin Gelsystems aggregierten die Dopaminrezeptoren im Sammelgel und wanderten nicht in das Trenngel ein, weshalb die Durchführung der SDS-PAGE nach Laemmli für dieses Protein nicht möglich war. Für alle Proben, die aus der Expression in *E. coli* stammen, wurden 5×10^7 Zellen bzw. 4 µg Protein aufgetragen. Die Zusammensetzung der Bis-Tris Gele ist in Tab. 20 gezeigt.

Tab. 20: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für das Bis-Tris System.

Stamm-Lösungen	Endkonzentrationen	
	Sammelgel	Trenngel 10 %
30 % (w/v) Acrylamid-Lösung	7,5 % (w/v)	10 % (w/v)
2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung	0,21 % (w/v)	0,24 % (w/v)
1,6 M Bis-Tris, pH 6,6	357 mM	357 mM
H ₂ O	ad 20 mL	ad 30 mL
10 % (w/v) APS-Lösung	200 µL	300 µL
TEMED	20 µL	20 µL

Für die Herstellung der PA-Gele wurden in einem Gelgießstand Mighty Small SE 245 sechs Gele parallel gegossen. Dazu wurde zunächst die Trenngel-Lösung mit Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) versetzt und bis zu der gewünschten Höhe in die Gießkammer gegossen. Die frische Trenngel-Lösung wurde dann mit Ethanol überschichtet, um eine gerade Abschlusskante des Trenngels zu erhalten. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde mit dem Sammelgel ebenso verfahren, jedoch anschließend Käbme für die Ausbildung von Taschen für den Probenauftrag eingesetzt. Die fertigen Gele wurden in feuchten Zellstoff eingewickelt und bei 4 °C gelagert. Die PA-Gele setzten sich aus einem 2 cm langen Sammelgel und einem 6 cm langen Trenngel zusammen. Die Breite der PA-Gele betrug 10 cm. Die Proben, die mittels Tris-Glyzin Gelsystem untersucht wurden, wurden vor dem Auftragen mit 2 x Roti-Load versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Proben für das Bis-Tris Gelsystem wurden auf Eis mit 2 x Bis-Tris Auftragspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 20 % (v/v) Glyzerin, 2 % β-Mercaptoethanol, 4 % (w/v) SDS, 2 mM EDTA) vermischt und nicht aufgeköcht. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20° C. Die Elektrophorese wurde in vertikalen Mighty Small SE250/260-Gelkammern mit Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 100 V für das Sammelgel und 150 V für das Trenngel unter Wasserkühlung für insgesamt ca. 40-50 min durchgeführt. Um die Proteinbanden zu färben, wurde das Gel nach dem Lauf in Coomassie-Färbelösung (25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G 250, 10 % (v/v) Essigsäure) in der Mikrowelle erwärmt und anschließend für 15-20 min geschüttelt und abgekühlt. Zum Entfärben wurde das Gel in 10 % (v/v) Essigsäurelösung gelegt und erneut erwärmt, geschüttelt und abgekühlt. Der Schritt wurde so oft wiederholt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren und die unspezifische Hintergrundfärbung entfernt war.

Abschließend wurde das Gel mit dem Geldokumentationssystem Gel Doc™ XR fotografiert und mittels Image Lab™-Software (Version 5.2.1.1) verarbeitet. Zur Aufbewahrung wurden die Gele in H₂O gelagert.

4.2.15 Western Blot

Der Western Blot ist eine spezifische Nachweismethode für die Identifikation und Quantifizierung eines bestimmten Proteins in komplexen Proteingemischen (Renart *et al.*, 1979; Towbin *et al.*, 1979). Hierbei wird die Proteinprobe zunächst mittels SDS-PAGE (4.2.14) anhand der Größe aufgetrennt und anschließend auf eine Trägermembran (z.B. Nitrozellulose) übertragen und dadurch immobilisiert. Daraufhin kann das Protein auf der Trägermembran mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Für den Nachweis werden häufig zwei Antikörper verwendet. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an das Zielprotein. Der zweite Antikörper wird zur Detektion des ersten Antikörpers verwendet und ist dazu beispielsweise an ein Enzym (z.B. Alkalische Phosphatase) gekoppelt. Der sekundäre Antikörper dient der Signalverstärkung, da mehrere Zweitantikörper gleichzeitig an den ersten Antikörper binden können. Anstelle der SDS-PAGE kann die Proteinprobe auch direkt als Punkt auf die Trägermembran getropft werden, jedoch geht hier die Information bezüglich der Molekulargewichts verloren. Ein solcher Western Blot wird als *Dot Blot* bezeichnet.

In dieser Arbeit wurde der Western Blot zum Nachweis der Expression der Dopaminrezeptoren verwendet. Dabei wurden spezifische Antikörper gegen die Fusionsproteine MBP, das rot fluoreszierende Protein mCherry sowie gegen den Strep-Anhang benutzt. Um das Molekulargewicht abschätzen zu können, wurden der vorgefärbte *All Blue Prestained Protein Standard* (4.1.3) für die Western Blots gegen MBP und mCherry auf das Gel aufgetragen. Für den Western Blot gegen den Strep-Anhang wurde der *BlueRay Prestained Protein Marker* (4.1.3) verwendet. Für alle Proben, die aus der Expression in *E. coli* stammen, wurden $2,5 \times 10^7$ Zellen bzw. 2 µg Protein aufgetragen.

Proteintransfer

Der Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran wurde mittels *Semi-Dry* Blot ausgeführt. Dazu wurden die Nitrocellulosemembran und sechs Lagen Filterpapier auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Nitrocellulosemembran und das Filterpapier wurden in Transferpuffer (Tris-Glyzin System: 25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 192 mM Glyzin, 20 % (v/v) Methanol; Bis-Tris System: 50 mM Bis-Tris, pH 7,2, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Methanol) getaucht, bis diese vollständig mit Transferpuffer getränkt waren. Anschließend wurde die SDS-PAGE mit der Nitrocellulosemembran und den Filterpapieren in der Blotting-Apparatur luftblasenfrei nach dem Schema in Abb. 20 geschichtet. Die Blotting-Kammer wurde mit 5 kg Gewicht beschwert und der Proteintransfer für 1h bei konstanter Stromstärke in mA durchgeführt. Die Stromstärke berechnete sich anhand der Größe des Gels in $\text{cm}^2 \times 0,8$.

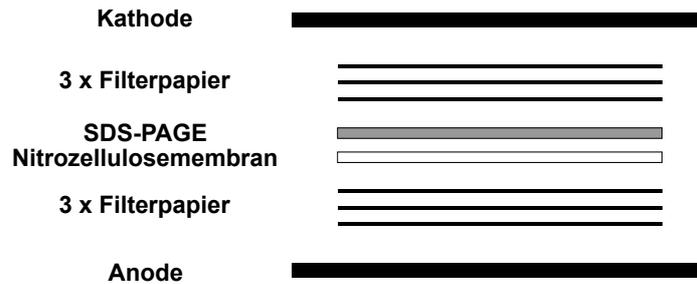


Abb. 20: Schema der Schichten für den Proteintransfer. Die Schichten für den Proteintransfer von unten nach oben: Anode, dreimal Filterpapier Nitrocellulosemembran, SDS-PAGE, dreimal Filterpapier, Kathode.

Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wurde das Gel mittels Coomassie (4.2.14) zur Kontrolle von verbliebenden Proteinen gefärbt. Die Nitrocellulosemembran wurde für 1h bei 100 rpm auf einem Horizontalschüttler in 10 mL Blocking-Puffer (1 (Anti-Step): 1x TBS, 10 % (w/v) Magermilchpulver, 0,1 % (v/v) Tween 20; 2 (Anti-MBP, Anti-mCherry): 1x TBS, 3 % (w/v) BSA, 0,1 % (v/v) Tween 20) geschüttelt und anschließend 3 x 5 min mit je 10 mL Waschpuffer (1x TBS, 0,1 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1h bei 100 rpm und RT in den entsprechenden Puffern (Anti-Strep 1:1000 in Blocking-Puffer 1, Anti-MBP und Anti-mCherry 1:10000 in Blocking-Puffer 3 (1x TBS, 0,2 % (w/v) BSA, 0,1 % (v/v) Tween 20). Nach 3 x 5 min Waschen mit je 10 mL Waschpuffer folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1h bei RT in dem gleichen Puffer wie für den primären Antikörper. Für den Anti-Strep und Anti-MBP Antikörper wurde Anti-Mouse IgG (Fc specific)-Alkaline Phosphatase als sekundärer Antikörper verwendet (1:20000), für die primären Antikörper Anti-mCherry Anti-Rabbit IgG (Fc specific)-Alkaline Phosphatase (1:20000). Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min mit 10 mL Waschpuffer und 3 x 5 min mit 10 mL AP-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) gewaschen. Für das Entwickeln wurde die Membran in 10 mL Detektionspuffer (20 mL AP-Puffer + 66 µL NBT (83 mg/mL in 70 % DMF) + 33 µL BCIP (42 mg/mL in 100 % DMF)) geschwenkt, bis ein deutliches Signal zu sehen war. Die Reaktion wurde durch Waschen mit AP-Puffer gestoppt und die Membran mit dem Geldokumentationssystem Gel Doc™ XR fotografiert und mittels Image Lab™-Software (Version 5.2.1.1) verarbeitet.

4.2.16 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (Lathé & Ruthven, 1955, 1956) wurde verwendet, um das cMSP1E3D1 (4.2.7.1) vor und nach der Assemblierung mit Lipiden (4.2.9.2) zu untersuchen. Hierbei werden Proteine bzw. deren Komplexe anhand ihrer Größe getrennt. Große Proteine bzw. Proteinkomplexe eluieren dabei schneller als kleine Proteine. Mit Hilfe einer Eichgeraden können Rückschlüsse auf das Molekulargewicht bzw. den Durchmesser gemacht werden.

Die analytische Größenausschlusschromatographie wurde an einer Superdex 200 Increase 10/300 GL mit Hilfe des ÄKTA *purifier* durchgeführt. Die Elution der Proteine wurde durch UV-Detektion bei 220 und 280 nm verfolgt. Zunächst wurden die Säulen mit 2 SV entgastem ND-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl) equilibriert. Für die analytische Chromatographie wurde ein 100 µL Probenschlauch verwendet und mit 300 µL Probe überspült. Die isokratische Elution erfolgte mit 1,2 SV ND-Puffer und einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min. Bei Bedarf wurden 0,5 mL Fraktionen gesammelt und nach Protein-Fällung (4.2.13) mittels SDS-PAGE (4.2.14) untersucht.

Zusätzlich zu den Assemblierungsreaktionen wurde gereinigtes unverknüpftes cMSP1E3D1 (100 µg/300 µL) und kovalent verknüpftes cMSP1E3D1 (1 mg/300 µL) hingehend ihres Elutionsprofils untersucht.

Die Erstellung der Eichgerade für die Säule Superdex 200 Increase 10/300 GL erfolgte mit den Standardproteinen Thyroglobulin (669 kDa, $R_{hyd} = 8,5$ nm), Ferritin (440 kDa, $R_{hyd} = 6,1$ nm), Aldolase (158 kDa, $R_{hyd} = 4,81$ nm), Albumin (67 kDa, $R_{hyd} = 3,55$ nm) und Ribonuklease A (13,7 kDa, $R_{hyd} = 1,64$ nm) (Erickson, 2009). Es wurden je 1 mg Standardprotein in 120 µL ND-Puffer gelöst. Das Retentionsvolumen der Proteine wurde in zwei Einzelläufen bestimmt. Für den ersten Lauf (Thyroglobulin, Aldolase, Ribonuklease A) wurden die entsprechenden Proteine vereinigt und vor dem Auftragen mithilfe eines 100 µL Probenschlauchs für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Für den zweiten Lauf (Ferritin, Albumin) wurden die Proteine ebenfalls vereinigt und das Volumen vor der Zentrifugation und dem Auftragen auf 300 µL mit ND-Puffer aufgefüllt. Für die Auswertung wurde das Retentionsvolumen der Standardproteine gegen den Logarithmus des Molekulargewichts bzw. des Durchmessers aufgetragen und mit einer linearen Regression gefittet. Mit den Gleichungen wurde das apparente Molekulargewicht bzw. der Durchmesser des Proteins bzw. Protein/Lipidkomplexes berechnet.

4.2.17 In-Lösung Proteinverdau

Für den In-Lösung Proteinverdau wurde 2,5 µg gereinigtes Protein mit 50 µL 50 mM Ammoniumcarbonat-Puffer (pH 8,5) versetzt. Anschließend wurden 10 mM DTT (Stammlösung 1 M) hinzugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Im dritten Schritt wurden 20 mM 2-Iodacetamid (IAA) (Stammlösung 1 M) hinzugefügt und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Der Proteinverdau wurde durch Zugabe von 0,2 µg Trypsin (Stammlösung 0,5 µg/µL) gestartet und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µL 10 % TFA-Lösung gestoppt und anschließend filtriert (MWCO 10 kDa). Die vorbereiteten Proben wurden an Dr. Andrea Di Fonzo (LS Biochemie I, Universität Bayreuth (UBT)) für den Peptidmassen-Fingerprint übergeben.

4.2.18 Radioligandenbindungstest

Radioligandenbindungstests sind der Goldstandard, um die Interaktion von Liganden mit GPCRs zu untersuchen (Bylund & Toews, 1993). Dabei werden zwei wichtige Bindungsparameter ermittelt. Zum einen wird die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D bestimmt, die die Affinität eines Liganden zu dem jeweiligen Rezeptor zeigt. Je kleiner der K_D -Wert, umso höher ist die Affinität. Sind die K_D -Werte der Liganden kleiner als 1 nM, werden diese als hochaffin bezeichnet. Zum anderen wird die maximale Rezeptordichte (B_{MAX}) bestimmt, welche quantitative Aussagen über die Expression des Rezeptors zulässt. Für die Bestimmung der beiden Parameter werden Sättigungsexperimente durchgeführt.

Die Bindung erfolgt dabei nach Gl.2.



Das Umstellen nach dem Massenwirkungsgesetz ergibt Gl.3.

$$K_D = \frac{K^{-1}}{K^{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} \quad (\text{Gl.3})$$

Die Gesamtrezeptorkonzentration $[R_G]$ ergibt sich aus der Summe der freien Rezeptoren $[R]$ und der Rezeptoren, die mit Ligand im Komplex gebunden sind $[RL]$.

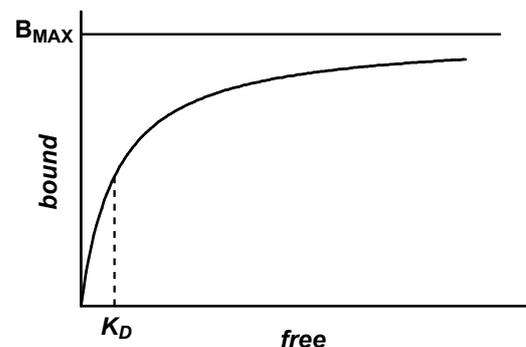
$$[R_G] = [R] + [RL] \quad (\text{Gl.4})$$

Werden Gl. 3 und Gl.4 kombiniert und nach $[RL]$ umgestellt, ergibt sich daraus Gl.5.

$$[RL] = \frac{[R_G] \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad (\text{Gl.5})$$

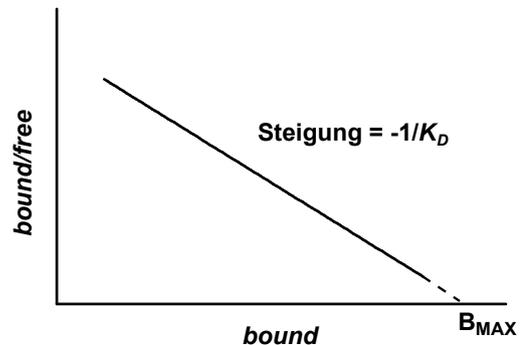
In der Literatur wird jedoch eine andere Nomenklatur verwendet. Dabei ist $[L] = F$ (*free*) $[RL] = B$ (*bound*), $[R_G] = B_{MAX}$ (*maximal number of binding sites*).

$$B = \frac{B_{MAX} \cdot F}{K_D + F}$$



Die Gleichung kann mittels linearer Regression gelöst werden. Dazu wird eine Linearisierung der Bindungsdaten nach Scatchard vorgenommen (Scatchard, 1949). Aus den vorangegangenen Gleichungen lässt sich die Scatchard-Gleichung ableiten.

$$\begin{aligned} \text{mit } [R] &= B_{MAX} - B \\ \rightarrow K_D &= \frac{(B_{MAX} - B) * F}{B} \\ \rightarrow K_D * B &= (B_{MAX} - B) * F \\ \rightarrow K_D * \frac{B}{F} &= (B_{MAX} - B) \\ \rightarrow \frac{B}{F} &= -\frac{1}{K_D} * B + \frac{1}{K_D} * B_{MAX} \end{aligned}$$



Der K_D -Wert lässt sich aus der negativen Steigung berechnen ($-1/K_D$). Für $B/F = 0$ wird der Schnittpunkt mit der Abszisse berechnet und gibt als Ergebnis den B_{MAX} -Wert. In dieser Arbeit wurden die Bindungsparameter der Sättigungskurve mit der Software GraphPad Prism (Version 5.01) ermittelt. Der K_D -Wert ist in [nM] angegeben, der B_{MAX} -Wert in [Rezeptoren/Zelle], wenn der Test mit Zellen durchgeführt wurde und in [pmol/mg] Membranprotein, wenn der Test mit Membranhomogenat durchgeführt wurde.

Radioligandenbindungstests werden mit Hilfe einer Filtrationseinheit durchgeführt. Dazu wird die zu untersuchende Probe (z.B. Zellen, Membranhomogenat) mit einem Radioliganden inkubiert, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Anschließend wird der Ansatz sehr schnell durch einen Glasfaserfilter filtriert, wodurch freier von gebundenem Radioligand getrennt wird. So wird zunächst die Gesamtbindung (GB) gemessen. Diese setzt sich aus der spezifischen Bindung (SpezB) an den Rezeptor und der unspezifischen Bindung (UB) an das Probenmaterial (z.B. Zellen, Membranhomogenat) sowie an das verwendete Material (z.B. Glasfaserfilter) zusammen. Um die unspezifische Bindung zu bestimmen und von der Gesamtbindung abziehen zu können, wird zusätzlich zu dem Ansatz von Probe + Radioligand ein zweiter Ansatz mit Probe + Radioligand + unmarkiertem Ligand vorbereitet. Der unmarkierte Ligand besitzt ebenfalls eine sehr hohe Affinität zu dem Rezeptor (< 10 nM) und besetzt aufgrund des 2000-5000fachen Überschuss hauptsächlich die spezifischen Bindungsstellen, während der Radioligand nun hauptsächlich die unspezifischen Bindungsstellen besetzt.

Die spezifische Bindung erreicht mit steigender Konzentration an Radioligand eine Sättigung, während die unspezifische Bindung dagegen nicht sättigbar ist. Bei einem guten Radioligandenbindungstest beträgt die unspezifische Bindung weniger als 20 % der Gesamtbindung (Abb. 21, A).

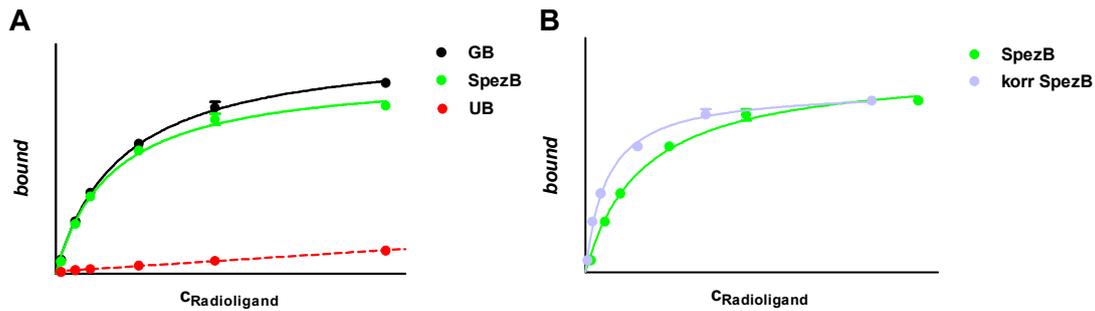


Abb. 21: Radioligandenbindungstest. Bound in Abhängigkeit der Konzentration an Radioligand. **(A)** Gesamtbindung (GB, schwarz), unspezifische Bindung (UB, rot), spezifische Bindung (SpezB, grün). **(B)** Spezifische Bindung (SpezB, grün), korrigierte spezifische Bindung (korr SpezB, lila).

Nachdem die spezifische Bindung (SpezB) berechnet wurde, wird die korrigierte spezifische Bindung (korr SpezB) ermittelt, um die Bindungsparameter schlussendlich bestimmen zu können. Dabei wird auf der Abszisse nicht die eingesetzte Konzentration des Radioliganden aufgetragen, sondern die freie Konzentration des Radioliganden nach Einstellen des Gleichgewichts. Dazu wird die Menge des Radioliganden, die durch die unspezifische Bindung der spezifischen Bindung an den Rezeptor nicht mehr zu Verfügung steht, von der eingesetzten Menge an Radioligand abgezogen (Abb. 21, B). Dies entspricht dem tatsächlichen Druck des Liganden im Gleichgewicht.

Die Radioligandenbindungstests wurden von Dr. Harald Hübner (LS für Pharmazeutische Chemie, Prof. Dr. Peter Gmeiner, FAU) durchgeführt (Hübner *et al.*, 2000). Die eingesetzten Probenkonzentrationen lagen bei 1×10^8 - 1×10^9 Zellen/mL bzw. 20-50 μ g Membranprotein/mL für die Membranhomogenate. Das Ansatzvolumen betrug 200 μ L. Eine Messung für eine Bindungskurve wurde in Vierfachbestimmung durchgeführt. Angezeigt sind jeweils der Mittelwert (MW) mit Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM). Messungen wurden ggf. öfters an unterschiedlichen Tagen wiederholt.

4.2.19 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Größe, Oberflächenbeschaffenheit und der Fluoreszenz analysiert werden (McKinnon, 2018). Dazu werden die Zellen hydrodynamisch fokussiert, passieren anschließend einzeln nacheinander die Messküvette und werden dabei einem Laserstrahl ausgesetzt. Das entstandene Streulicht bzw. das entsprechende Fluoreszenzsignal wird unter zur Hilfenahme von dichroitischen Spiegeln und Bandpassfiltern selektioniert und dann detektiert. Dazu werden i.d.R. Photomultiplier (PMTs) verwendet. Somit können über jede Zelle qualitative und quantitative Informationen gewonnen werden. Weiterhin gibt es Durchflusszytometer, die es erlauben, Zellen anhand ihrer optischen Signale aus einer Mischung von Zellen zu sortieren. Diese werden als *Cell Sorter* oder auch FACS (*Fluorescent activated cell sorting*) bezeichnet. Dabei wird der Tropfen mit der zu selektionierenden Zelle durch ein elektrisches Feld abgelenkt und in einem neuen Gefäß gesammelt.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um die Expression der Dopaminrezeptorgene anhand des Fusionsproteins mCherry zu analysieren.

Des Weiteren wurden die Bindung des Liganden NMP130 an die Rezeptoren untersucht. Der Ligand NMP130 wurde vom LS für Pharmazeutische Chemie, Prof. Peter Gmeiner (FAU), zur Verfügung gestellt und enthält ein agonistisches Pharmakophor, welches mit einem Alexa-Fluor-488 konjugiert ist (~1kDa). Die Affinitäten für die wildtypischen Dopaminrezeptoren, die in CHO-Zellen hergestellt wurden, betragen 15 nM für den D₂SWT-Rezeptor und 0,76 nM für den D₃WT-Rezeptor.

In Abb. 22 wurden die Absorptions- und Emissionsspektren von Alexa-Fluor-488 und mCherry und der jeweiligen verwendeten Filter anhand des *Spectrum Viewer* von BD Biosciences veranschaulicht. Das Emissionsspektrum des Alexa Fluor 488 nach Anregung mit dem Laser bei 488 nm überlappt mit dem Absorptionsspektrum von mCherry (*spillover*), was zu einer schwachen Anregung des mCherrys führt. Dieser spektrale Überlapp kann durch den Prozess der „Kompensation“ von dem anderen Detektor entfernt werden.

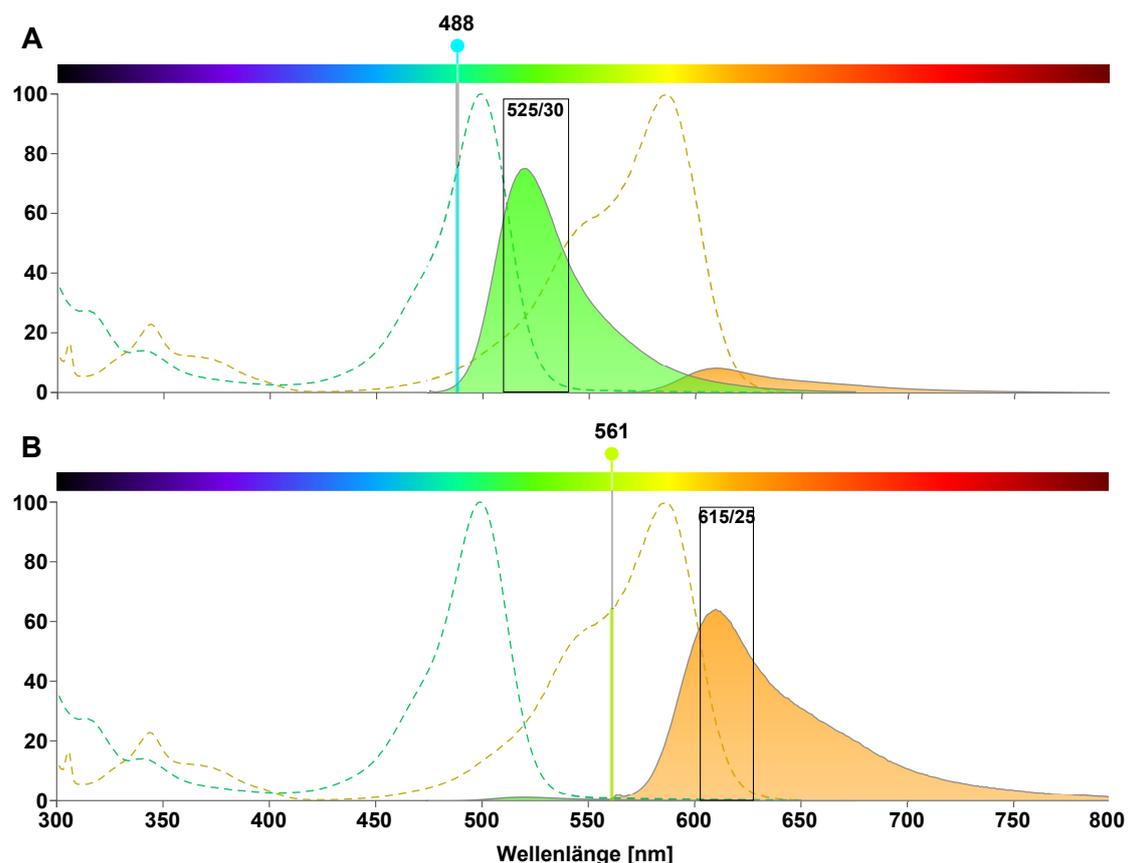


Abb. 22: Absorptions- und Emissionsspektren für Alexa-488 und mCherry. (A) Anregung mit dem Laser bei 488 nm und dem verwendeten Filter bei 525/30 nm. **(B)** Anregung mit dem Laser bei 561 nm und dem verwendeten Filter bei 615/25 nm. Gestrichelte Linien: Anregungsspektren für das jeweilige Fluorophor. Durchgezogene Linien: Emissionsspektren für das jeweilige Fluorophor.

Für die Analysen wurden die Rezeptorgene für D_{2Swt}, D_{3wt} und die Bibliotheken aus den Rezeptorvarianten in *E. coli* TOP10 exprimiert (4.2.6.3). Für einen Ansatz wurden anschließend 2×10^8 Zellen bei 7000 x g für 4 min bei RT zentrifugiert und anschließend in 500 µL eiskaltem 1x TBS+P (1x TBS + Proteaseinhibitor (P) (Roche, Basel, Schweiz)) resuspendiert. Zellen, die nicht mit Ligand inkubiert wurden, wurden zu 2 mL 1x TBS+P in ein Zytometrie-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Messung auf Eis gelagert (Gesamtvolumen: 2,5 mL).

Für die Analyse der Bindung des Liganden NMP130 an die Rezeptoren wurden 2×10^8 Zellen bei 7000 x g für 4 min bei RT zentrifugiert und anschließend in 500 µL eiskaltem 1x TBS+P mit NMP130 (Endkonzentration: 200 nM) resuspendiert. Die Endkonzentration an NMP130 im Ansatz betrug 200 nM. Die Zellen wurden mit dem Liganden für $\geq 1,5$ h auf Eis inkubiert. Für die Messung wurde die Probe bei 13000 rpm für 90 s und 4 °C zentrifugiert (erste Zentrifugation), das Zellpellet in 100 µL eiskaltem 1x TBS+P resuspendiert und anschließend zu 2,4 mL 1x TBS+P in ein Zytometrie-Reaktionsgefäß überführt und sofort gemessen.

Für die Verdrängungsexperimente mit Haloperidol wurden die Zellen mit NMP130 (Endkonzentration: 200 nM, 4 bzw. 8 % (v/v) Ethanol) oder mit NMP130 (Endkonzentration: 200 nM) und Haloperidol (Endkonzentrationen: 400 µM bzw. 800 µM) wie oben inkubiert und für die Messung vorbereitet. Die Konzentration der Haloperidol-Stammlösung in Ethanol betrug 10 mM.

Sollte ein zusätzlicher Waschschrift durchgeführt werden, wurde das Zellpellet nach der ersten Zentrifugation in 500 µL eiskaltem 1x TBS+P resuspendiert, erneut wie oben zentrifugiert, anschließend in 100 µL eiskaltem 1x TBS+P resuspendiert, zu 2,4 mL 1x TBS+P in ein Zytometrie-Reaktionsgefäß überführt und sofort gemessen.

Die Experimente in dieser Arbeit wurden mit dem S3e Cell Sorter (Bio-Rad, Watford, UK) am Lehrstuhl Biochemie II, Prof. Dr. Andreas Möglich (UBT) durchgeführt. Die Daten wurden mit Python geplottet. Das verwendete Skript wurde von Prof. Dr. Andreas Möglich (LS Biochemie II, UBT) zur Verfügung gestellt.

5. Ergebnisse

5.1 Heterologe Expression in Insektenzellen

Insektenzellen gehören zu den Eukaryoten und werden für die Herstellung von rekombinanten GPCRs häufig verwendet (3.3.1). Zu Beginn dieses Projektes (2016) war lediglich die Kristallstruktur des humanen D₃-Rezeptors gelöst, nachdem dieser aus Insektenzellen gereinigt werden konnte (Chien *et al.*, 2010, PDB: 3PBL). Es wurde angenommen, dass der D₃-Rezeptor für strukturelle Untersuchungen daher leichter zugänglich gemacht werden kann als der D₂-Rezeptor. Infolgedessen lag der Fokus bei der Herstellung aus Insektenzellen auf dem D₃-Rezeptor.

Die Kristallstruktur des D₃-Rezeptors wurde in der inaktiven Konformation gelöst (Chien *et al.*, 2010). Dafür wurde in den Rezeptor der thermostabilisierende Aminosäureaustausch L119W eingebracht sowie der ICL3 durch das T4-Lysozym ersetzt. Die Fusion des T4-Lysozym ist jedoch vermutlich der Grund, weshalb eine Kopplung mit dem trimeren G-Protein nicht möglich ist und der Rezeptor daher nicht in der aktiven Konformation untersucht werden kann. Um Studien in der aktiven Konformation zu erlauben, darf der ICL3 aus diesem Grund weder durch Fusionsproteine ersetzt noch vollständig deletiert werden (3.2.2). Im Hinblick darauf wären Studien am wildtypischen D₃-Rezeptor das Optimum.

Das Gen für den humanen wildtypischen D₃-Rezeptor wurde bereits in den 1990er Jahren von Pregenzer *et al.* ohne Fusionen in den ICL3 in Insektenzellen exprimiert, wobei die maximale Rezeptordichte bei $23 \pm 2,1$ pmol/mg lag (Pregenzer *et al.*, 1997). Wenn angenommen wird, dass die maximale Rezeptordichte bei ~ 26 pmol/mg liegen sollte, um 1 mg Rezeptor aus fünf Litern Kultur mit einer Zelldichte von 10^6 Zellen/mL reinigen zu können (Sarramegna *et al.*, 2003), ist die Synthese des D_{3wt}-Rezeptors in Insektenzellen überaus vielversprechend. Es wurde geprüft, ob der wildtypische D₃-Rezeptor aus Insektenzellen gereinigt werden kann. Dafür wurde der D_{3wt}-Rezeptor erneut in Insektenzellen hergestellt. Im Zuge dessen wurde zunächst die Insektenzellkultur am LS Biochemie IV (UBT) etabliert. Für die anschließende Expression wurde das MultiBac™-System verwendet (4.2.3).

5.1.1 Klonierung des D_{3wt}-Rezeptorgens

Die Klonierung des Gens *D3DR* für den humanen D_{3wt}-Rezeptor und der Gensequenzen für die Fusionsanhänge in den Vektor pACEBac1 erfolgte mit Gibson-Assemblierung (4.2.1.5). Das Konstrukt enthält am N-Terminus einen HA-Anhang und einen FLAG-Anhang, welche für die Immunodetektion bzw. Reinigung verwendet werden können. Am C-Terminus beinhaltet das Produkt einen weiteren Twin-Strep-Anhang, welcher für die Immunodetektion bzw. Reinigung verwendet und mittels TEV-Protease enzymatisch abgespalten werden kann (Abb. 23). Nach erfolgreicher Klonierung wurde mit dem Plasmid zunächst die Bacmid-DNA (4.2.3.2) hergestellt, um daraufhin die Viren für die Expression zu generieren (4.2.3.3).



Abb. 23: Konstrukt für die heterologe Expression in Insektenzellen. Das Konstrukt enthält vom N-Terminus zum C-Terminus einen Hämagglutinin (HA)-Anhang, einen FLAG-Anhang, den D_{3wt}-Rezeptor, eine TEV-Schnittstelle und einen Twin-Strep-Anhang. Die Gen- und Aminosäuresequenz befinden sich im Anhang (D₃ Gensequenz 2, 9.2)

5.1.2 Synthese und Reinigung des D_{3wt}-Rezeptors

Die Expression des D_{3wt}-Rezeptorgens in High Five Insektenzellen (4.2.3.4) wurde vor und nach Infektion der Zellen mit SDS-PAGE (4.2.14) und Western Blot (4.2.15) verfolgt (Abb. 24, A). Nach Infektion (NI) war im Western Blot gegen den C-terminalen Twin-Strep-Anhang eine Bande bei 48 kDa zu sehen, die dem Zielprotein zuzuordnen ist (theor. 50,6 kDa). Des Weiteren war Produkt am Übergang von Sammelgel zu Trenngel zu erkennen. Dies liegt vermutlich an Rezeptoraggregaten, die sich aufgrund des hohen pH-Wertes im Tris-Glyzin Gelsystem (pH 9,5) gebildet haben. Der theoretische pI-Wert des Fusionsproteins liegt bei 8,8 (ProtParam). Aus den exprimierenden Zellen wurde mithilfe von Dr. Harald Hübner (LS für Pharmazeutische Chemie, Prof. Dr. Peter Gmeiner, FAU) Membranhomogenat hergestellt. Die Herstellung erfolgte gleich zur Herstellung von Membranhomogenat aus HEK-Zellen (4.2.11). Im Anschluss wurde das Homogenat mit dem Radioligandenbindungstest (4.2.18) untersucht. Anhand der Bindung des Liganden [³H]Spiperon kann abgeschätzt werden, ob der Rezeptor korrekt gefaltet in der Membran vorliegt und in welchen Mengen. Als Vergleich diente Homogenat aus HEK-Zellen, in denen das D_{3wt}-Rezeptorgen exprimiert wurde (Abb. 24, B). Für beide Membranpräparationen konnte Ligandenbindung gemessen werden. Der K_D-Wert für den Rezeptor in High Five bzw. in HEK-Zellen lag bei 0,57 nM bzw. 0,21 nM. Der B_{MAX}-Wert betrug 7,9 pmol/mg bzw. 5,7 pmol/mg.

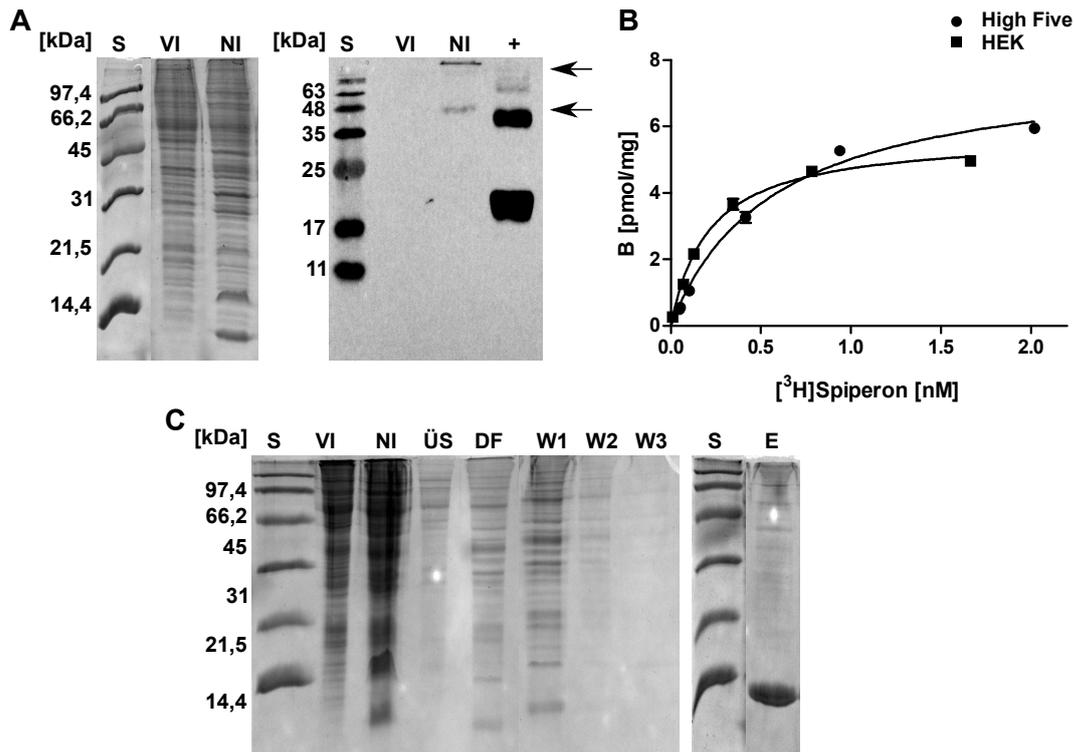


Abb. 24: Heterologe Expression des D_{3wt}-Rezeptorgens in Insektenzellen. (A) SDS-PAGE (17 %-Gel) und Western Blot gegen den C-terminalen Twin-Strep-Anhang vor und nach Infektion (VI, NI). Für die Positivkontrolle wurde gereinigtes Protein mit Strep-Anhang (NusG-Strep) vom LS Biochemie IV (UBT) bereitgestellt. **(B)** Radioligandenbindungstest mit Homogenat aus High Five (●) und HEK-Zellen und [³H]Spiperon als Ligand (■). **(C)** SDS-PAGE (17 %-Gel) zur Reinigung des D_{3wt}-Rezeptors über den Twin-Strep-Anhang. Analysiert wurden die Fraktionen VI, NI, Überstand (ÜS), Durchfluss (DF), Waschschrift 1 (W1), Waschschrift 2 (W2), Waschschrift 3 (W3), Elution (E); Molekulargewichtsstandard (S).

Im nächsten Schritt wurde eine Reinigung des D_{3wt}-Rezeptors aus High Five Zellen durchgeführt (4.2.4) und der Fortschritt der Reinigung mittels SDS-PAGE (4.2.14) verfolgt (Abb. 24, C). Es wurden viele verschieden große Membranproteine mittels Detergens solubilisiert (ÜS). Durch die Waschschriffe (W1-W3) konnte Fremdprotein erfolgreich entfernt werden. Dabei waren nach Zugabe des Waschpuffers weiße Aggregate zu sehen, die vermutlich auf denaturiertes Protein zurückzuführen sind. Nach Elution (E) war eine Bande bei 13 kDa zu sehen, die nicht dem erwarteten Molekulargewicht (theor. 50,6 kDa) entspricht. Entweder wurde der Rezeptor während der Reinigung abgebaut oder es wurde ein anderes Protein aus Insektenzellen gereinigt, welches eine sehr hohe Affinität an das verwendete Säulenmaterial aufweist. Im Falle eines Abbaus des Rezeptors könnte die Bande ein Rezeptorfragment aus TM6 und TM7 inklusive TEV-Schnittstelle und Twin-Strep-Anhang sein. Gründe hierfür könnten mangelnde Thermostabilität, mangelnde Stabilität des wildtypischen Rezeptors in den verwendeten Detergenzien oder Spaltung des Rezeptors am ICL3 durch Proteasen sein.

5.2 Herstellung von Nanodiscs

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Herstellung von Nanodiscs am LS Biochemie IV (UBT) für die zellfreie Expression (5.3) etabliert. Weiterhin können Nanodiscs für die Reinigung der Rezeptoren aus Membranen z.B. von *E. coli* Verwendung finden. Bei den Nanodiscs kann zwischen unverknüpften und kovalent verknüpften Nanodiscs unterschieden werden (3.3.3). Beide Arten sollten im Verlauf dieses Teilprojekts hergestellt werden.

Das MSP wurde dazu zunächst in *E. coli* Bakterienzellen synthetisiert, mit Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt und ggf. durch die Sortase-Reaktion kovalent verknüpft. Das MSP wurde anschließend mit Lipiden assembliert und der Erfolg der Assemblierung mit Größenausschlusschromatographie untersucht.

5.2.1 Klonierung des cMSP1E3D1-Gens

Das MSP-Gen ist für die Expression in den Vektor pET-28a kloniert. Das Ausgangsplasmid, welches von Ralf Rues und Frank Bernhard (Goethe-Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt wurde, beinhaltet die Gensequenz für die MSP-Variante MSP1E3D1 (Abb. 25, 1). Im Vergleich zum ursprünglichen MSP1 (200 AS, Ø ~10 nm) wurden bei dieser Variante drei zusätzliche Helices in das Protein eingefügt, um den Durchmesser für größere Membranproteine anzupassen (Ø ~ 12,1-12,9 nm). Außerdem wurden die ersten 22 Aminosäuren des ersten helikalen Elements deletiert (Denisov *et al.*, 2004).

Das Konstrukt enthält am N-Terminus einen His₆-Anhang für die Reinigung anhand einer Ni²⁺-Affinitätschromatographie und eine TEV-Schnittstelle, um den His₆-Anhang nach der Reinigung enzymatisch abzuspalten. Um neben unverknüpften Nanodiscs auch kovalent verknüpfte Nanodiscs herstellen zu können, wurde an den C-Terminus des MSP1E3D1 mit Gibson-Assemblierung (4.2.1.5) zusätzlich die Gensequenz für die Aminosäuren LPGTG und ein weiterer His₆-Anhang fusioniert (Abb. 25, 2, cMSP1E3D1).



Abb. 25: Konstrukte für die Expression des MSP1E3D1-Gens. Beide Konstrukte enthalten vom N-Terminus zum C-Terminus einen His₆-Anhang und eine TEV-Schnittstelle, gefolgt von der MSP-Variante MSP1E3D1. Konstrukt 2 (cMSP1E3D1) enthält zusätzlich die Aminosäuren LPGTG und einen His₆-Anhang für die Verknüpfungsreaktion mithilfe der Sortase. Die vollständige Gen- und Aminosäuresequenz für Konstrukt 2 befindet sich im Anhang (9.2).

5.2.2 Synthese und Reinigung von cMSP1E3D1

Für die Expression des cMSP1E3D1-Gens (Abb. 25, 2) wurde der Bakterienstamm *E. coli* BL21Star (DE3) verwendet (4.2.6.1). Nach Induktion der Genexpression mit IPTG wurde der Verlauf der Expression nach 1h, 2h und 4h mittels SDS-PAGE (4.2.14) untersucht (Abb. 26). Bereits nach einer Stunde war eine starke Bande bei 34 kDa zu erkennen, die dem Zielprotein cMSP1E3D1 (theor. 33,7 kDa) zuzuordnen ist.

Die Expression wurde nach vier Stunden beendet, indem die Zellen geerntet wurden. Das Nassgewicht des Zellpellets betrug 4,9 g/L Kultur.

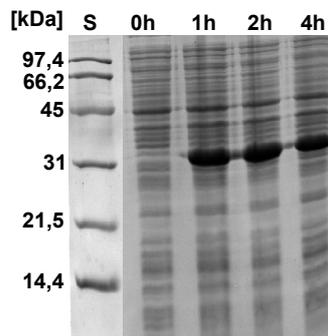


Abb. 26: Expression des cMSP1E3D1-Gens. Die Expression des cMSP1E3D1-Gens erfolgte in *E. coli* BL21Star (DE3) nach Induktion mit 1 mM IPTG für 4h und wurde mittels SDS-PAGE (17 %-Gel) vor Induktion (0h) und nach Induktion (1h, 2h, 4h) analysiert; Molekulargewichtsstandard (S).

Für die Reinigung von cMSP1E3D1 (4.2.7.1) wurde das geerntete Bakterienpellet aufgeschlossen. Dabei wurden alle Proteine mit Guanidin-Hydrochlorid denaturiert. Der Fortschritt der Reinigung wurde anhand der SDS-PAGE (4.2.14) verfolgt (Abb. 27, B). Die Analyse zeigte, dass sich ein Teil des Zielproteins im Überstand befand (ÜS1), jedoch auch Zielprotein im Pellet vorhanden war (P1). Um die Ausbeute an Zielprotein im Überstand zu erhöhen, wurde das Pellet erneut aufgeschlossen. Die Überstände nach dem ersten und zweiten Aufschluss (ÜS1+ÜS2) wurden vereinigt und eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie durchgeführt. Auffällig war, dass nach dreimaligem Auftragen immer noch Zielprotein im Durchfluss (DF) ist. Das Zielprotein ist zu diesem Zeitpunkt der Reinigung ungefaltet und kann durch die His₆-Anhänge an N- bzw. C-Terminus mit beiden Enden des Proteins an unterschiedlichen Punkten innerhalb der Säule binden. Somit wird ein Teil des Säulenmaterials mit cMSP1E3D1 bedeckt und ist für die Bindung weiteren Zielproteins unzugänglich. Dies könnte durch ein größeres Säulenvolumen kompensiert werden. Bei Waschschrift 3 (W3) wurde ein geringer Anteil an Zielprotein von der Säule gewaschen. Dies ist auf das Triton X-100 im Puffer zurückzuführen, welches benötigt wird, um aus *E. coli* stammende Lipide wegzuwaschen, die an das Zielprotein gebunden sind. Vorgegangene Testversuche zeigten, dass aufgrund dieses Waschschriftes eine Ni²⁺-NTA Säule für die Reinigung verwendet werden musste, da das Zielprotein bei Verwendung von *Ni Sepharose* (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) bzw. einer *HisTrap HP* Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) in diesem Schritt vollständig von der Säule gewaschen wurde.

Nach den Waschschriften wurde das cMSP1E3D1 mit einem Einstufengradienten (gestrichelte Linie, B2, Abb. 27, A) von der Säule eluiert und die hohe Reinheit des Proteins mit SDS-PAGE (E1+E2) gezeigt. Durch die anschließende TEV-Spaltung wurde der N-terminale His₆-Anhang abgespalten (vor TEV/nachTEV). Die Ausbeute an cMSP1E3D1 betrug 20,5 mg/L Kultur.

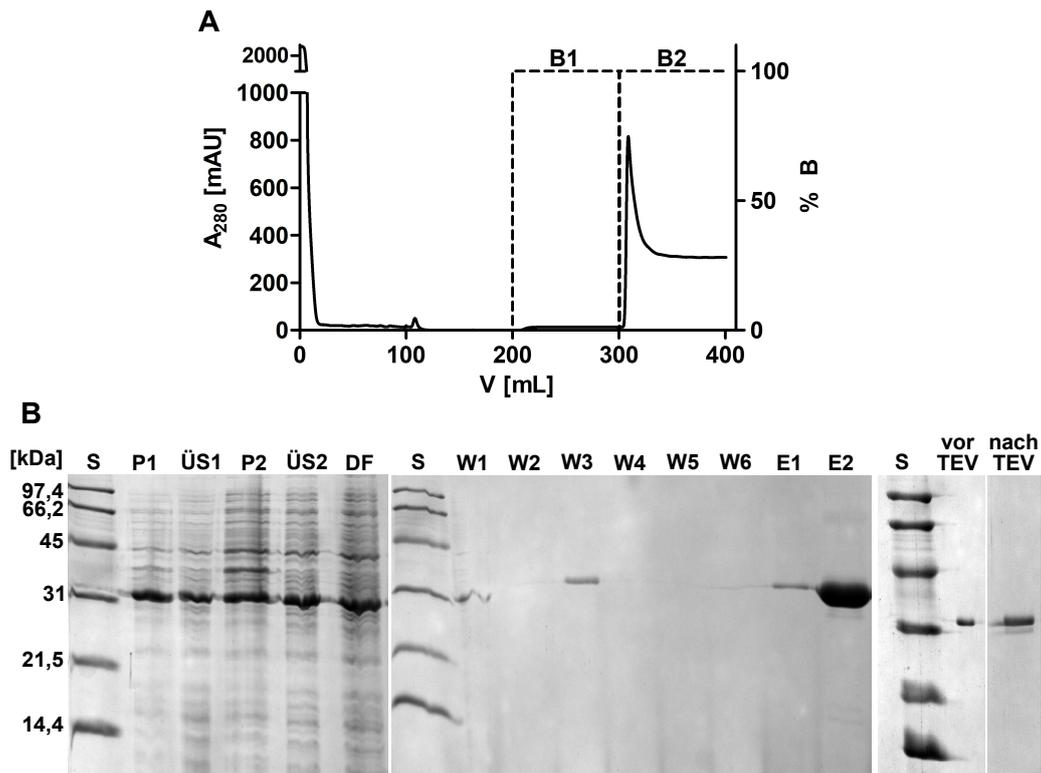


Abb. 27: Reinigung von cMSP1E3D1. (A) Chromatogramm der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Elutionsvolumens während den Reinigungsschritten W4, W5, W6 und Elution (durchgezogene Linie). Zusätzlich ist der Anteil der Puffer B1 und B2 (gestrichelte Linie) aufgetragen. Puffer B1 wurde für den Waschschrift 6 (W6) verwendet, Puffer B2 für die Elution. (B) SDS-PAGE (17 %-Gel) zur Untersuchung des Reinigungsfortschrittes anhand der Proben Pellet 1 (P1), Überstand 1 (ÜS1), Pellet 2 (P2), Überstand 2 (ÜS2), Durchfluss (DF), Waschschrift 1-6 (W1-6), Elution (E1-2), vor und nach TEV-Verdau; Molekulargewichtsstandard (S).

5.2.3 Kovalente Verknüpfung von cMSP1E3D1

Für die kovalente Verknüpfung von cMSP1E3D1 wurde zunächst die Sortase hergestellt. Daraufhin wurde die Verknüpfung durch die Sortase-Reaktion durchgeführt und anhand einer SDS-PAGE analysiert. Nach der Reaktion wurde das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 mithilfe einer Ni^{2+} -Affinitätschromatographie aus dem Reaktionsansatz gereinigt und abschließend die kovalente Verknüpfung mit einem Peptidmassen-Fingerprint (PMF) bestätigt.

5.2.3.1 Synthese und Reinigung der Sortase

Das Plasmid für die Expression des Sortase-Gens wurde über die Plasmid-Bank *addgene* bezogen, wo es durch die Arbeitsgruppe von Prof. David R. Liu (Harvard University, Cambridge, MA, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Das Gen für die Sortase ist in den Vektor pET-29a kloniert. Das Konstrukt enthält am C-Terminus einen His_6 -Anhang für die Reinigung des Enzyms über Ni^{2+} -Affinitätschromatographie (Abb. 28).



Abb. 28: Konstrukt für die Expression des Sortase-Gens. Das Konstrukt enthält vom N-Terminus zum C-Terminus die Sortase und einen His_6 -Anhang. Die vollständige Gen- und Aminosäuresequenz befindet sich im Anhang (9.2).

Die Expression des Sortase-Gens erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) (4.2.6.2). Dabei wurde die Genexpression mit IPTG induziert und der Verlauf der Expression nach 1h, 2h und 4h mit einer SDS-PAGE (4.2.14) verfolgt. Bereits nach einer Stunde war eine starke Bande bei 20 kDa zu sehen, die dem erwarteten Molekulargewicht der Sortase (theor. 17,9 kDa) entspricht (Abb. 29, 1h). Die Expression wurde noch für drei Stunden weitergeführt, wobei die Stärke der Bande über die Zeit zunahm. Die Zellen wurden nach vier Stunden geerntet und somit die Expression beendet. Das Nassgewicht des Zellpellets betrug 4,5 g/L Kultur.

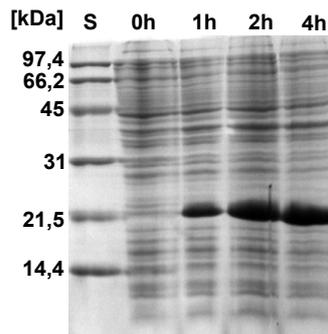


Abb. 29: Expression des Sortase-Gens. Die Expression des Sortase-Gens erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) nach Induktion mit 0,4 mM IPTG für 4h und wurde mittels SDS-PAGE (17 %-Gel) vor Induktion (0h) und nach Induktion (1h, 2h, 4h) analysiert; Molekulargewichtsstandard (S).

Die Sortase wurde nach der Proteinsynthese aus dem geernteten Bakterienpellet gereinigt (4.2.7.2). Der Fortschritt der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE (4.2.14) verfolgt (Abb. 30, B). Nach Zentrifugation befand sich noch ein geringer Anteil des Zielproteins im Pellet (P1), der größte Anteil des Zielproteins war im Überstand (ÜS1). Das Pellet wurde erneut aufgeschlossen, um den Anteil an Zielprotein im Überstand zu erhöhen (ÜS2). Die Überstände ÜS1 und ÜS2 wurden vereinigt und eine Ni^{2+} -Affinitätschromatographie durchgeführt. Dabei war nach dem Auftrag auf die Säule noch Zielprotein im Durchfluss (DF) vorhanden. Weiterhin kamen Teile der Sortase bereits in den Waschrufen sehr rein von der Säule (W1-W4), was auf eine Überladung der Säule mit Zielprotein hindeutet. Hier könnte das Säulenvolumen vergrößert werden, um die Ausbeute zu erhöhen.

Die Sortase wurde mit einem Einstufengradienten mit ansteigender Konzentration an Imidazol eluiert (gestrichelte Linie). Die hohe Reinheit der Sortase wurde anhand der SDS-PAGE bestätigt (E). Die Ausbeute betrug nach Vereinigen von Wasch- und Eluatfraktionen insgesamt 50,2 mg/L Kultur.

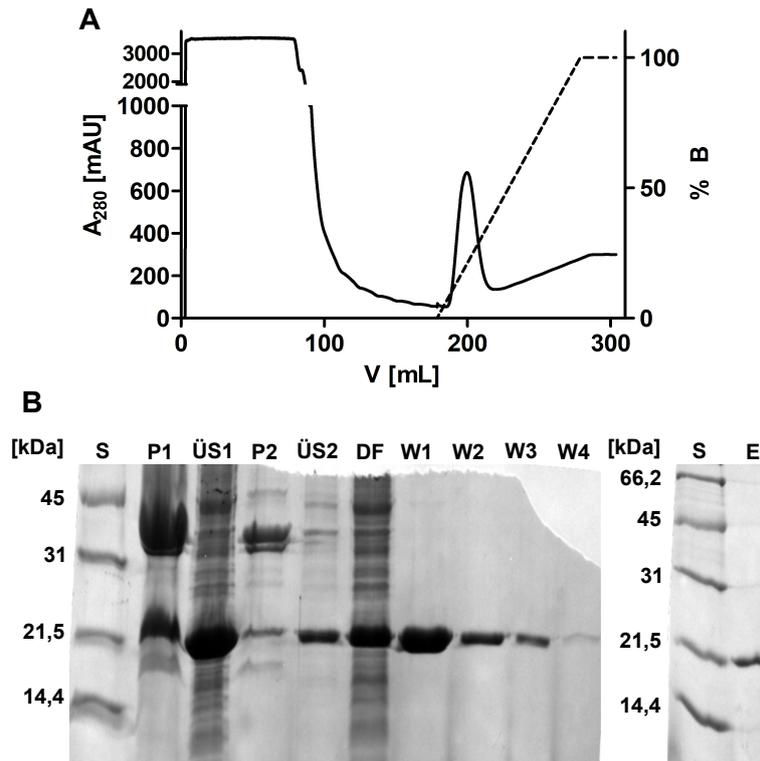


Abb. 30: Reinigung der Sortase. (A) Chromatogramm der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Elutionsvolumens (durchgezogene Linie). Zusätzlich ist der Anteil an Puffer B aufgetragen, welcher zur Elution verwendet wurde (gestrichelte Linie). (B) SDS-PAGE (17 %-Gel) zur Untersuchung des Reinigungsfortschrittes anhand der Proben Pellet 1 (P1), Überstand 1 (ÜS1), Pellet 2 (P2), Überstand 2 (ÜS2), Durchfluss (DF), Waschschrift 1-4 (W1-4), Elution (E); Molekulargewichtsstandard (S).

5.2.3.2 Sortase verknüpft die Termini des cMSP1E3D1

Für die kovalente Verknüpfung in der Sortase-Reaktion, wurde die Sortase (5.2.3.1) mit dem cMSP1E3D1 (5.2.2, Edukt) im Verhältnis 1,5:1 gemischt und für 4h bei 37 °C inkubiert (4.2.9.1). Bei der Reaktion verknüpft die Sortase das freie Glyzin am N-Terminus des cMSP1E3D1 mit der Sortase-Erkennungssequenz am C-Terminus kovalent und spaltet gleichzeitig einen Teil der Sortase-Erkennungssequenz und den C-Terminale His₆-Anhang ab (Abb. 12, 3.3.3). Somit hat das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 (Produkt) ein kleineres Molekulargewicht (30,4 kDa), was bereits nach einer Stunde Reaktionszeit sehr gut anhand der SDS-PAGE (4.2.14) zu sehen war (Abb. 31, A). Nach vier Stunden war die Reaktion beendet und 100 % des Eduktes umgesetzt. Im nächsten Schritt wurde das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 aus dem Reaktionsansatz gereinigt. Dazu wurde eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie durchgeführt, bei der die Sortase, die TEV-Protease aus der Reinigung des cMSP1E3D1 und unverknüpftes cMSP1E3D1 an die Säule binden. Das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 wurde im Durchfluss erwartet, da es nach der Reaktion keinen His₆-Anhang mehr besitzt.

Anhand der SDS-PAGE (Abb. 31, B) konnte die erfolgreiche Reinigung des kovalent verknüpften cMSP1E3D1 bestätigt werden (DF). Neben dem Hauptprodukt (Produkt 1) war eine weitere sehr schwache Bande bei ~97 kDa zu sehen (Produkt 2). Dabei könnte es sich

um ein Nebenprodukt handeln, bei dem drei cMSP1E3D1 Moleküle miteinander zu einem Trimer verknüpft wurden. Die übrigen Bestandteile des Sortase-Reaktionsansatzes befanden sich in der Eluatsfraktion (E).

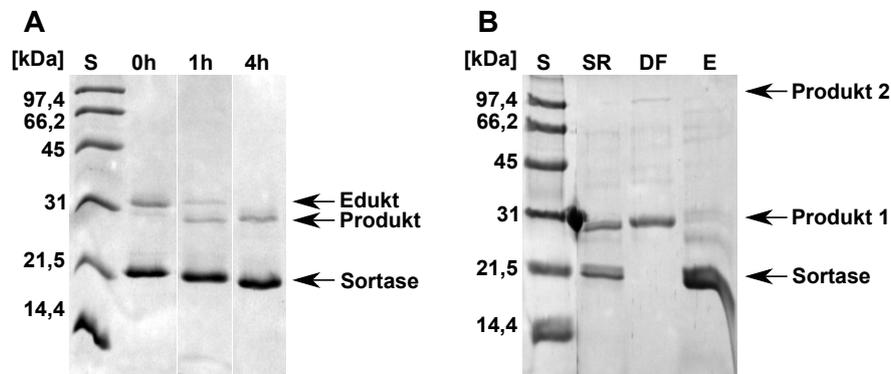


Abb. 31: Sortase-Reaktion. (A) Analyse des Verlaufs der Sortase-Reaktion mittels SDS-PAGE (17 %-Gele) für die Proben vor Sortase-Reaktion (0h) und nach einer bzw. vier Stunden (1h, 4h); Molekulargewichtsstandard (S). (B) Analyse der Reinigung des kovalent verknüpften cMSP1E3D nach der Sortase-Reaktion mittels SDS-PAGE (17 %-Gele) für die Proben nach Sortase-Reaktion (SR), Durchfluss (DF) und Elution (E); Molekulargewichtsstandard (S). Die entsprechenden Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die korrekte kovalente Verknüpfung des cMSP1E3D1 wurde mittels PMF bestätigt. Dazu wurden Proben für unverknüpftes und kovalent verknüpftes cMSP1E3D1 vorbereitet (4.2.17) und an Dr. Andrea Di Fonzo (LS Biochemie I, UBT) zur Analyse übergeben. Im Fall des unverknüpften cMSP1E3D1 wird nach dem Trypsinverdau ein Peptid erwartet, welches den C-terminalen His₆-Anhang enthält. Ist das cMSP1E3D1 kovalent verknüpft, wurde der C-terminale His₆-Anhang abgespalten und es wird kein Peptid erwartet, welches die sechs Histidine enthält. Die Ergebnisse der Analyse bestätigten die Erwartungen. Während für das unverknüpfte cMSP1E3D1 das Peptid mit dem His₆-Anhang detektiert worden ist (Abb. 32, A, pinkes Kästchen), war es für das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 nicht mehr vorhanden (Abb. 32, B).

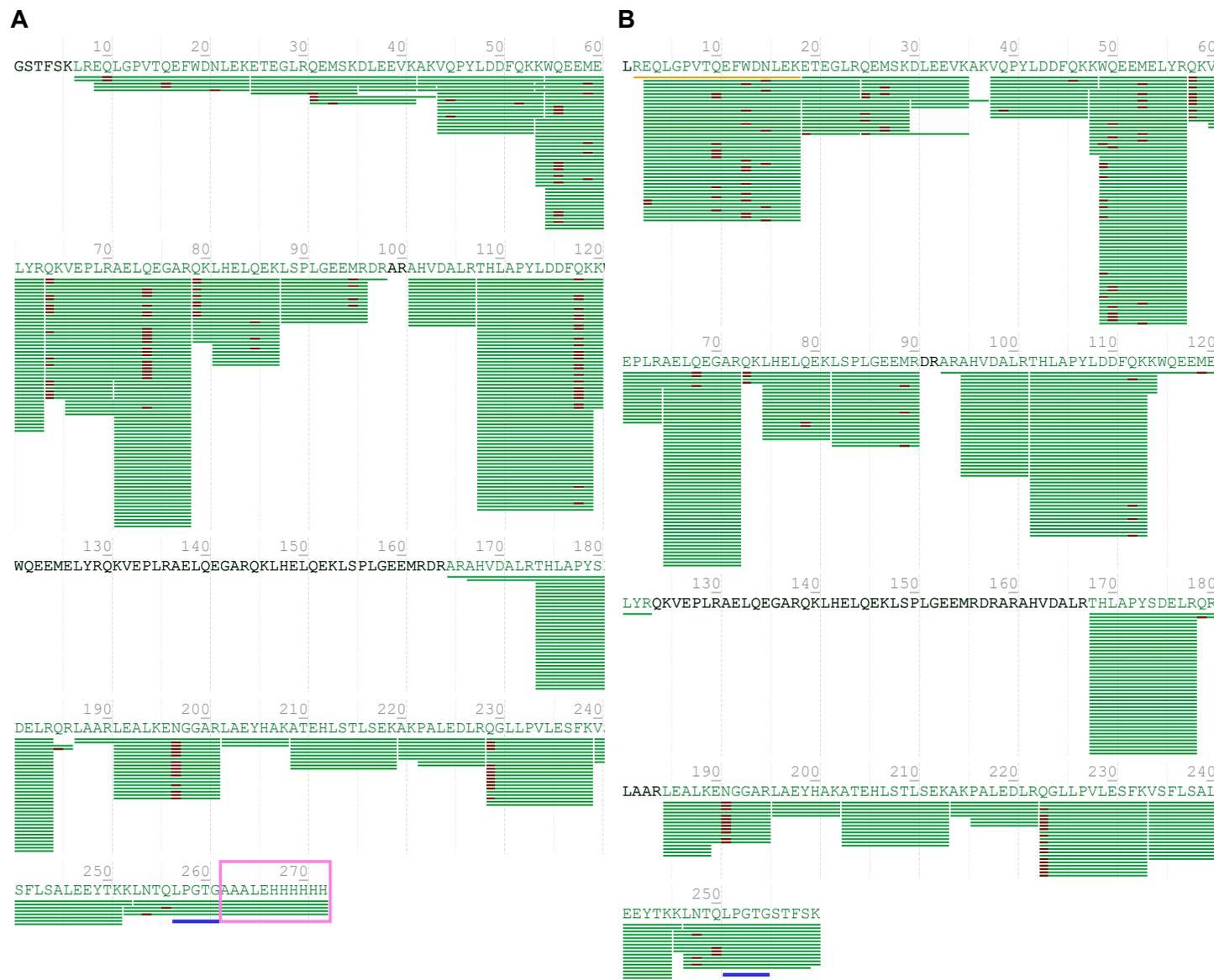


Abb. 32: Peptidmassen-Fingerprint. Detektierte Peptide nach Trypsinverdau für die Proben **(A)** unverknüpftes cMSP1E3D1 und **(B)** kovalent verknüpftes cMSP1E3D1. Die Verknüpfungssequenz für die Sortase (LPGTG) ist blau unterlegt. Der C-terminale His₆-Anhang des unverknüpften cMSP1E3D1 ist pink umrahmt.

5.2.4 Assemblierung der Nanodiscs

Für die Assemblierung der Nanodiscs wurden das unverknüpfte cMSP1E3D1 (5.2.2) und das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 nach der Sortase-Reaktion (5.2.3) verwendet. Die Proteine wurden mit Lipid/Detergens-Mischungen in den vorgegebenen Verhältnissen gemischt. Dabei wurden verschiedene Lipide getestet und es wurde untersucht, mit welchem Lipid die besten Ergebnisse erzielt werden können. Die Assemblierung der Nanodiscs wurde entweder durch Entfernen des Detergens aus dem Reaktionsansatz mit Hilfe von *Bio-Beads* oder Dialyse initiiert. Abschließend wurde die Assemblierung mittels Größenausschlusschromatographie analysiert. Dabei wurde ein einziger Gipfel bei entsprechendem Retentionsvolumen erwartet. Um den Erfolg der Assemblierung bewerten zu können, wurde eine Eichgerade mit Standardproteinen aufgenommen (4.2.16). Die Nanodiscs weisen im Gegensatz zu den globulären Standardproteinen eine scheiben-ähnliche Form auf, wodurch sie sich im apparenten Molekulargewicht stark von den Standardproteinen unterscheiden können. Jedoch kann der Erfolg der Assemblierung sehr gut anhand des Durchmessers der Nanodiscs bestimmt und mit der Literatur verglichen werden (Denisov *et al.*, 2004; Bayburt & Sligar, 2010).

Neben der Regressionsgeraden, die anhand des Molekulargewichts erstellt wurde (Abb. 33, A), wurde daher auch die Regressionsgerade unter Berücksichtigung des Durchmessers ($\varnothing = 2 \times$ hydrodynamischer Radius) der Standardproteine erstellt (Abb. 33, B). Die Chromatogramme der Gelfiltrationsläufe für die Standardproteine befinden sich im Anhang (Abb. 80, 9.5).

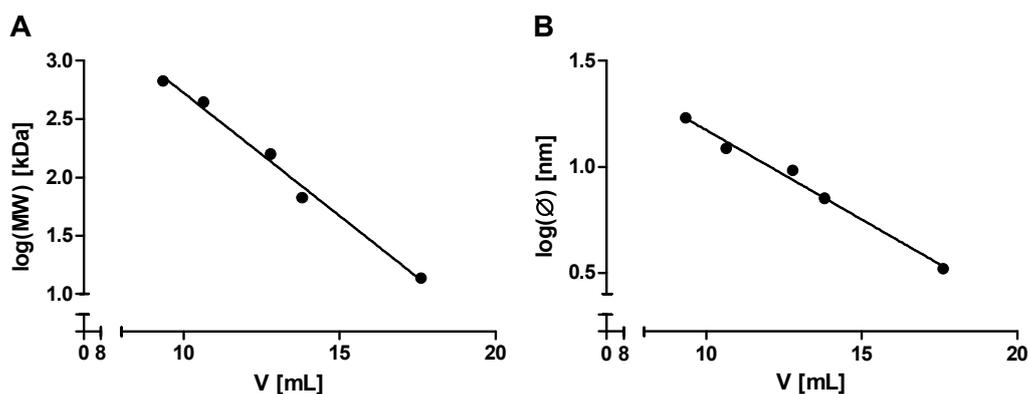


Abb. 33: Eichgeraden für die Größenausschlusschromatographie. Aufgetragen sind der Logarithmus des Molekulargewichts (A) und der Logarithmus des Durchmessers ($\varnothing = 2 \times$ hydrodynamischer Radius) (B) der Standardproteine Thyroglobulin 669 kDa, Ferritin 440 kDa, Aldolase 158 kDa, Albumin 67 kDa, Ribonuklease A 13,7 kDa gegen das Retentionsvolumen. Die Daten wurden mittels linearer Regression mit dem Programm GraphPad Prism (Version 5.01) gefittet. A: $y = -0,21x + 4,82$ $R^2 = 0,99$ B: $y = -0,084x + 2,014$ $R^2 = 0,99$.

5.2.4.1 Assemblierung von unverknüpften Nanodiscs

Um die Assemblierung beurteilen zu können, wurde zunächst das unverknüpfte cMSP1E3D1 (5.2.2) mit analytischer Größenausschlusschromatographie (4.2.16) analysiert und ein Absorptionsspektrum bei 220 nm aufgenommen (Abb. 34). Das Spektrum zeigte einen Hauptgipfel mit leichten Schultern bei einem Retentionsvolumen von 14,6 mL. Das apparente Molekulargewicht wurde anhand der Regressionsgeraden (Abb. 33, A) mit 56,9 kDa berechnet, was im Vergleich deutlich über dem erwarteten Molekulargewicht (theor. 33,7 kDa) lag. Da das cMSP1E3D1 nicht globulär ist, eluierte es früher von der Säule, was in einer größeren apparenten Molekulargewicht resultierte. Dies zeigt, dass die Bestimmung des Molekulargewichts anhand der Größenausschlusschromatographie nicht möglich ist.

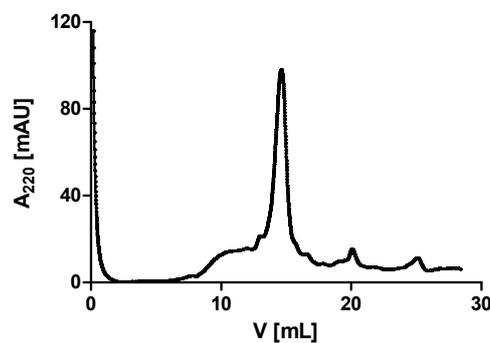


Abb. 34: Größenausschlusschromatographie von unverknüpftem cMSP1E3D1. Das Chromatogramm zeigt die Absorption bei 220 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens.

Zunächst wurden Nanodiscs mit dem Lipid POPG im Verhältnis 1:90 hergestellt und ermittelt, welche Temperatur für die Assemblierung besser geeignet ist. Die Initiation der Assemblierung wurde durch Zugabe von *Bio-Beads* erreicht (4.2.9.2).

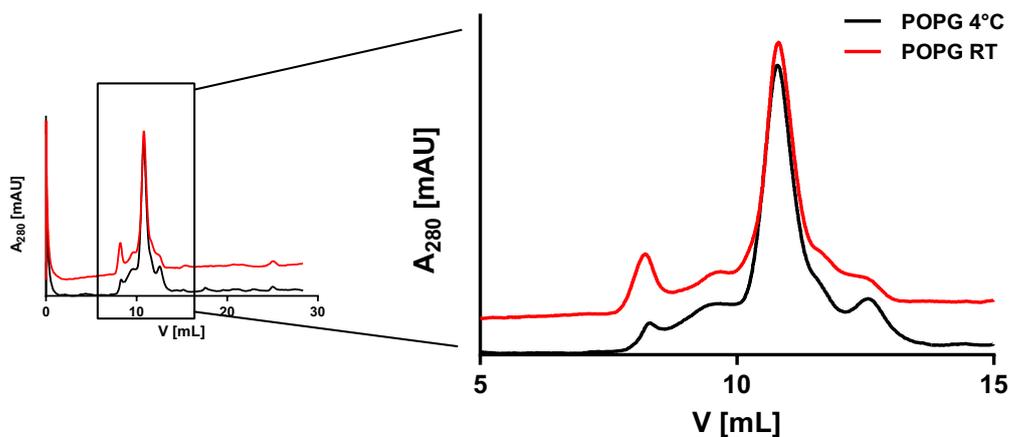


Abb. 35: Assemblierung von unverknüpftem cMSP1E3D1 mit POPG mithilfe von *Bio-Beads*. Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie anhand der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens für die Proben 4 °C (schwarz) und Raumtemperatur (rot).

Die Chromatogramme zeigten einen Hauptgipfel bei 10,8 mL ($\varnothing = 12,7$ nm), was dem erwarteten Durchmesser der Nanodiscs entspricht (Abb. 35). Bei beiden Temperaturen entstanden Spezies bei 8,3 mL, die sich im Ausschlussvolumen der Säule befanden und vermutlich auf Protein- bzw. Lipid-Aggregate zurückzuführen sind. Bei 4 °C ergab sich zusätzlich ein Nebengipfel bei 12,7 mL, der auf unvollständig assemblierte Nanodiscs hinweist.

Des Weiteren wurden Nanodiscs mit dem Lipid DOPG hergestellt und das geeignete cMSP1E3D1/Lipid-Verhältnis bestimmt. Dabei wurde unverknüpftes cMSP1E3D1 mit DOPG in den Verhältnissen 1:80, 1:90, 1:100 und 1:110 gemischt und die Assemblierung durch Inkubation mit *Bio-Beads* initiiert (4.2.9.2). Die Ergebnisse der anschließenden Größenausschlusschromatographie (4.2.16) zeigten einen Hauptgipfel bei 10,8 mL und Nebengipfel bei 8 mL, 9,7 mL und 12,5 mL (Abb. 36). Die Nanodiscs, die im Hauptgipfel eluierten, hatten demnach einen Durchmesser von 12,7 nm, was der Erwartung ($\varnothing = 12,9$ nm) entspricht. Die Spezies bei 8 mL waren, wie bei der Assemblierung mit POPG, vermutlich Aggregate, die daher im Ausschlussvolumen der Säule kamen. Die Spezies bei 9,7 mL hatten einen Durchmesser von 16 nm, während bei den Spezies, die nach dem Hauptgipfel eluierten, das cMSP1E3D1 nicht vollständig mit den Lipiden assembliert war. Im Vergleich sind die Verhältnisse 1:80 und 1:90 besser als die Verhältnisse 1:100 und 1:110, da das cMSP1E3D1 bereits mit niedrigeren Lipidkonzentrationen nahezu vollständig assembliert werden konnte und weniger Aggregate entstanden sind.

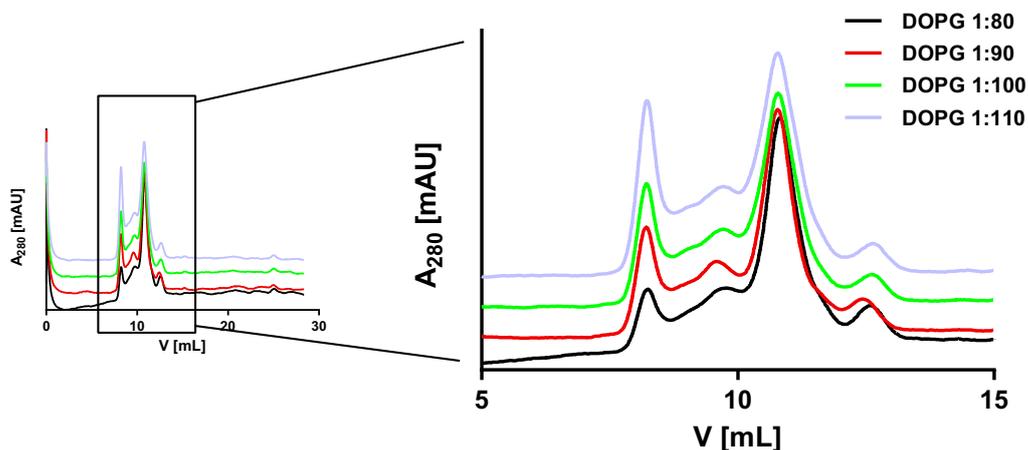


Abb. 36: Assemblierung von unverknüpftem cMSP1E3D1 mit DOPG mittels *Bio-Beads*. Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie anhand der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens für die Proben 1:80 (schwarz), 1:90 (rot), 1:100 (grün), 1:110 (blau).

Neben den *Bio-Beads* kann die Dialyse für die Assemblierung der Nanodiscs verwendet werden. Die Zugabe von *Bio-Beads* ist eine Möglichkeit, um das Detergens schnell und hart aus dem Reaktionsansatz zu binden und die Assemblierung einzuleiten (Goddard *et al.*, 2015).

Bei der Dialyse hingegen, wird das Detergens langsam und kontinuierlich aus dem Reaktionsansatz entfernt, wodurch die Assemblierung optimiert werden kann.

Um dies zu untersuchen, wurde das unverknüpfte cMSP1E3D1 mit dem Lipid DOPG in den Verhältnissen 1:80, 1:90, 1:100 und 1:110 gemischt und die Assemblierung der Nanodiscs mit Dialyse initiiert (4.2.9.2). Die Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie (4.2.16) zeigten einen Hauptgipfel bei 10,7-10,9 mL ($\varnothing = 12,5-13$ nm), was dem erwarteten Durchmesser entspricht (Abb. 37). Im Vergleich zu der Assemblierung mit *Bio-Beads* scheint die Assemblierung mit Dialyse erfolgreicher zu sein, da weniger Nebengipfel entstanden sind. Es war lediglich leichte Aggregatbildung im Ausschlussvolumen (8,3 mL) zu erkennen. Das beste Ergebnis lieferte die Assemblierung von cMSP1E3D1 mit DOPG im Verhältnis 1:80. Zwar war hier ebenfalls leichte Aggregatbildung zu erkennen, jedoch fiel diese im Vergleich zum Hauptgipfel, sehr gering aus.

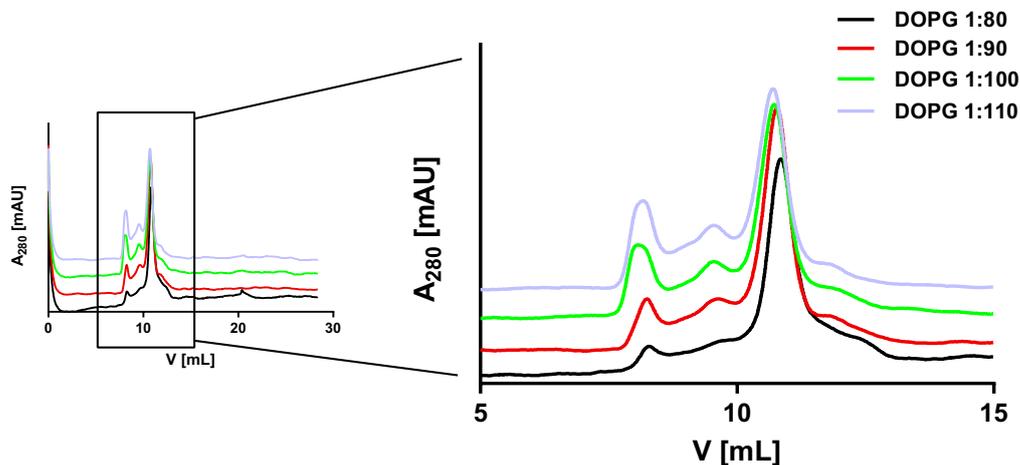


Abb. 37: Assemblierung von unverknüpftem cMSP1E3D1 mit DOPG mittels Dialyse. Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie anhand der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens für die Proben 1:80 (schwarz), 1:90 (rot), 1:100 (grün), 1:110 (blau).

Für die zellfreie Expression (5.3) wurden Nanodiscs im präparativen Maßstab hergestellt (4.2.9.2). Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurden hierfür die Bedingungen DOPG 1:80 und Dialyse gewählt. Für die präparative Herstellung wurde der Assemblierungsansatz von 300 μ L auf 8 mL hochskaliert. Die Herstellung der Nanodiscs lieferte im präparativen Maßstab das gleiche Ergebnis, wie die Herstellung im analytischen Maßstab (Abb. 38). Die Nanodiscs wurden auf 900 μ M konzentriert und bei 4 °C für zwei Tage gelagert. Daraufhin wurde beobachtet, dass ein Teil der Nanodiscs präzipitiert war.

Die präzipitierten Nanodiscs wurden durch Zentrifugation entfernt und die Konzentration neu bestimmt (464 μ M). Anschließend wurden die Nanodiscs am selben Tag für die zellfreie Expression verwendet.

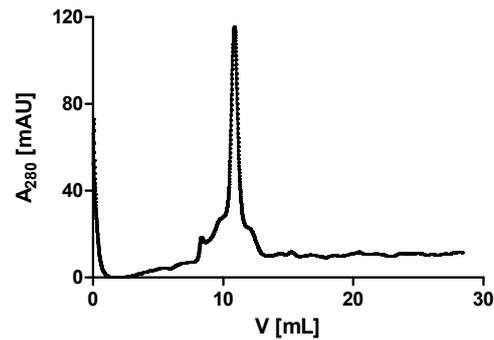


Abb. 38: Assemblierung von unverknüpftem cMSP1E3D1 im präparativen Maßstab. Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie anhand der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens.

5.2.4.2 Assemblierung von kovalent verknüpften Nanodiscs

Wie für das unverknüpfte cMSP1E3D1 (5.2.4.1) wurde das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 vor der Assemblierung durch analytische Größenausschlusschromatographie untersucht und die Absorption bei 280 nm gemessen (4.2.16). Im Vergleich zu dem unverknüpften cMSP1E3D1 (Abb., rot, 14,6 mL) zeigte das Chromatogramm des kovalent verknüpften cMSP1E3D1 zwei Gipfel bei 13 mL und 14,9 mL (Abb. 39, schwarz). Die Fraktionen der beiden Gipfel wurden nach Proteinfällung (4.2.13) anhand einer SDS-PAGE (4.2.14) untersucht (Abb. 39, B). Bei beiden Fraktionen war kovalent verknüpftes cMSP1E3D1 als Monomer zu sehen (31 kDa). Das kann darauf hindeuten, dass in dem ersten Gipfel entweder Oligomere des cMSP1E3D1 eluierten, die in der SDS-PAGE nicht zu detektieren sind, oder dass das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 zwei Konformationen annimmt. Dabei könnte das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 ähnlich zu Plasmid-DNA in einer offenen Ringstruktur (Gipfel 1) oder in einer „supercoiled-Struktur“ (Gipfel 2) vorliegen. In der ersten Fraktion (Gipfel 1) war eine Bande zu erkennen, welche einem Trimer aus verknüpftem cMSP1E3D1 entsprechen könnte.

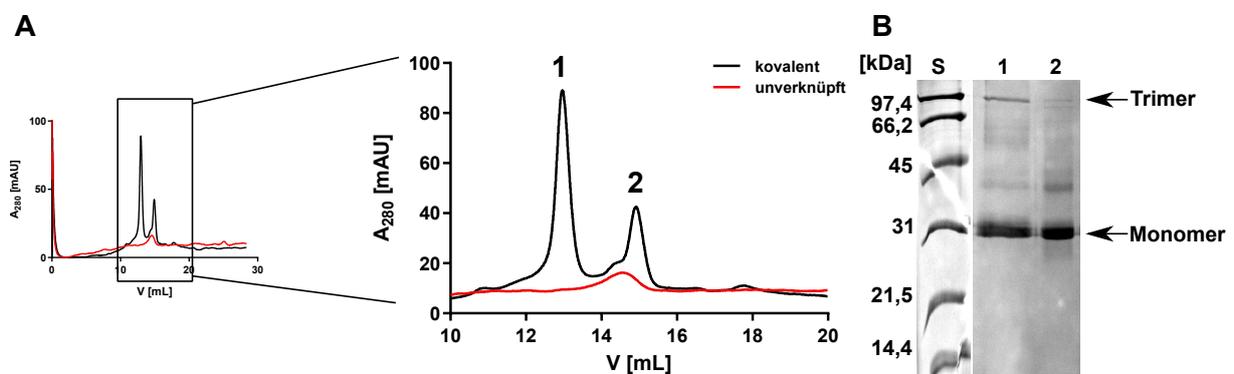


Abb. 39: Größenausschlusschromatographie und SDS-PAGE von kovalent verknüpftem cMSP1E3D1. (A) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie anhand der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens für die Proben mit unverknüpftem cMSP1E3D1 (rot) und kovalent verknüpftem cMSP1E3D1 (schwarz). (B) SDS-PAGE (17 %-Gel) von gefällten Proben der beiden Gipfel 1 und 2 des kovalent verknüpftem cMSP1E3D1; Molekulargewichtsstandard (S).

Im nächsten Schritt wurde eine präparative Größenausschlusschromatographie (4.2.16) durchgeführt, um das Trimer abzutrennen (Abb. 40, A). Das Chromatogramm zeigte einen Hauptgipfel (55,3 mL, **2**) mit zwei Nebengipfel (48,9 mL, **1**; 64 mL, **3**), die nicht klar voneinander separiert waren. Die Analyse der Fraktionen anhand der SDS-PAGE (4.2.14) ergab, dass ein Teil des Trimers abgetrennt werden konnte (Abb. 40, B). Jedoch war die Abtrennung des Trimers aufgrund des Überlapps der Gipfel unvollständig. Wie bei der analytischen Größenausschlusschromatographie war hier in der SDS-PAGE nur das Monomer zu erkennen (Abb. 40, B, Bahnen 2 und 3), auch wenn die analysierten Fraktionen von unterschiedlichen Retentionsvolumen stammten.

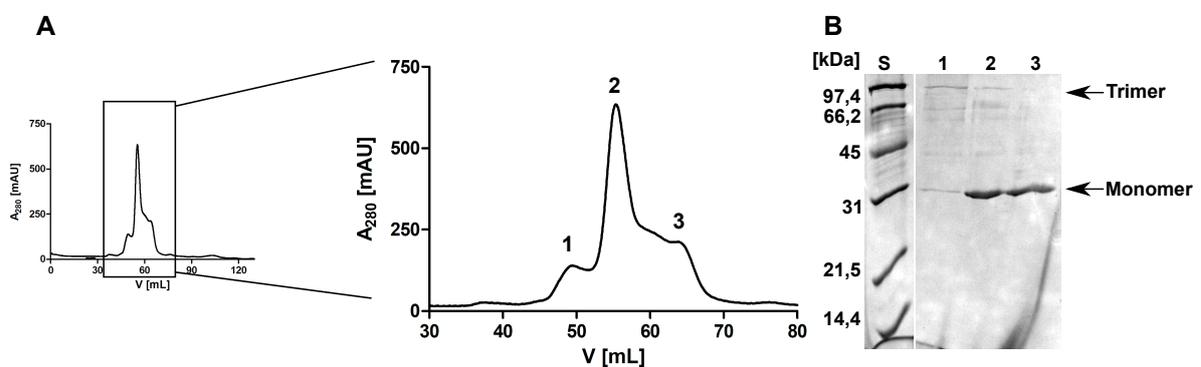


Abb. 40: Präparative Größenausschlusschromatographie und SDS-PAGE von kovalent verknüpftem cMSP1E3D1. (A) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie anhand der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens. (B) SDS-PAGE (17 %-Gel) von gefällten Proben der Gipfel **1**, **2** und **3** des kovalent verknüpften cMSP1E3D1; Molekulargewichtsstandard (S).

Die Fraktionen 2 und 3 aus der präparativen Größenausschlusschromatographie wurden vereinigt und für die Assemblierung mit Lipiden verwendet (4.2.9.2). Das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 wurde im Verhältnis 1:80 mit dem Lipid DOPG gemischt und die Assemblierung durch Zugabe von *Bio-Beads* initiiert.

Im Chromatogramm waren drei Gipfel zu sehen (Abb. 41, A). Gipfel 1 kam im Ausschlussvolumen der Säule bei 8,3 mL, was auf Aggregate hindeutet. Die Gipfel 2 und 3 kamen bei 11,7 mL und 12,7 mL, was einem Durchmesser von 10,7 nm bzw. 8,3 nm entspricht und die Nanodiscs demnach nicht vollständig mit Lipid assembliert wurden. Die Analyse nach Proteinfällung (4.2.13) anhand der SDS-PAGE (4.2.14) zeigte, dass sich in Fraktion 1 kein Protein befand, was für Lipidaggregate spricht (Abb. 41, B). In den Fraktionen 2 und 3 waren aufgrund der Proteinfällung ebenfalls kovalent verknüpftes Dimer und Trimer zu sehen. Die Banden fielen im Vergleich zum Monomer jedoch sehr schwach aus. In einem zweiten Ansatz wurde die Assemblierung von kovalent verknüpftem cMSP1E3D1 mit DOPG (1:80) durch Dialyse initiiert. Das Chromatogramm zeigte einen breiten Hauptgipfel bei 12 mL ($\varnothing = 10,1$ nm) mit mehreren kleinen Schultern, was wie bei der Durchführung mit *Bio-Beads* auf eine unvollständige Assemblierung hinweist (Abb. 41, C).

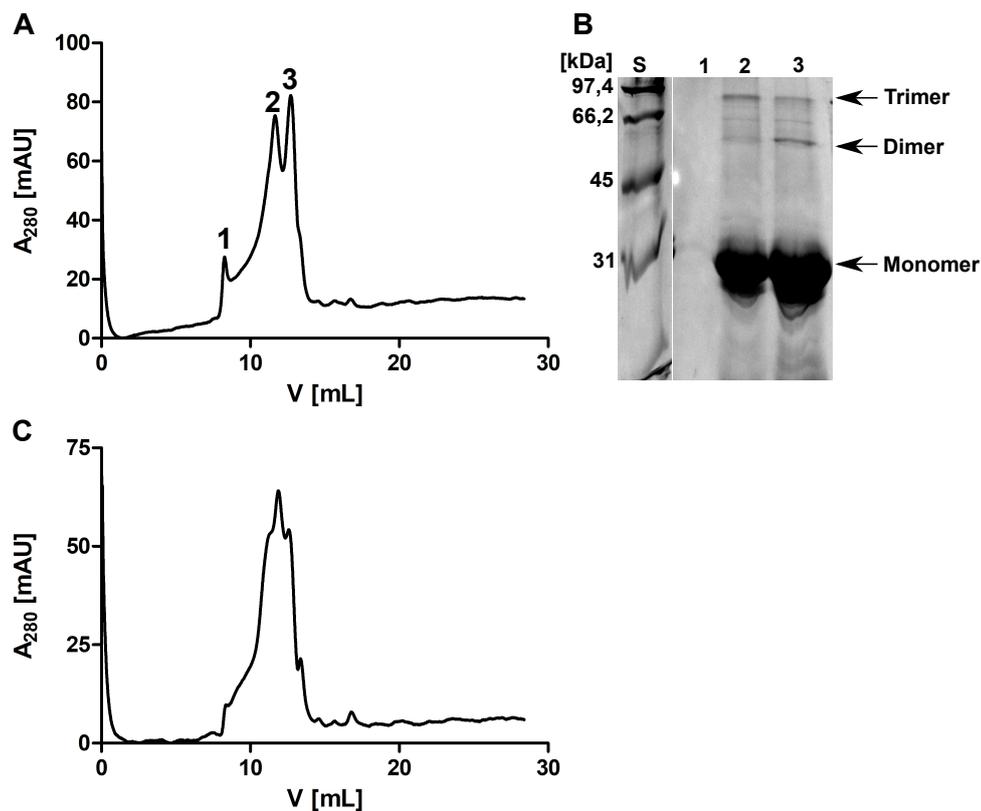


Abb. 41: Assemblierung von kovalent verknüpftem cMSP1E3D1. (A) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie anhand der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens für kovalent verknüpftes cMSP1E3D1/DOPG (1:80, *Bio-Beads*). (B) SDS-PAGE (17 %-Gel) von gefällten Proben der drei Gipfel 1, 2 und 3 nach Assemblierung des kovalent verknüpften cMSP1E3D1 mithilfe von *Bio-Beads*; Molekulargewichtsstandard (S). (C) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie anhand der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens für kovalent verknüpftes cMSP1E3D1/DOPG (1:80, Dialyse).

Da die Assemblierung mit DOPG im Verhältnis 1:80 unvollständig war, wurde die Assemblierung in den Verhältnissen 1:90 und 1:100 wiederholt. Dabei wurde die Assemblierung durch Zugabe von *Bio-Beads* initiiert. Jedoch führte die Erhöhung des Verhältnisses zu keiner deutlichen Verbesserung bei der Herstellung der Nanodiscs (Abb. 81, 9.5).

Neben DOPG wurde DMPG für die Assemblierung getestet. Hierfür wurde kovalent verknüpftes cMSP1E3D1 mit DMPG in den Verhältnissen 1:90 und 1:110 gemischt und die Assemblierung durch Zugabe von *Bio-Beads* initiiert. Für das Verhältnis 1:90 waren im Chromatogramm ein Hauptgipfel (13,4 mL) und kleine Nebengipfel (9-12 mL) zu sehen (Abb. 42, A). Im Nebengipfel könnten Nanodiscs eluiert sein, welche der erwarteten Größe ($\varnothing = 12,9 \text{ nm}$) entsprechen. Wurde das Verhältnis von Protein zu Lipid auf 1:110 erhöht, entstanden zwei Gipfel (10,7 mL und 13,4 mL) (Abb. 42, B). Der erste Gipfel bei 10,7 mL ($\varnothing = 13 \text{ nm}$) enthielt die Nanodiscs der erwarteten Größe. Jedoch war das cMSP1E3D1 bei den Spezies, die im zweiten Gipfel eluierten, nicht vollständig mit DMPG assembliert.

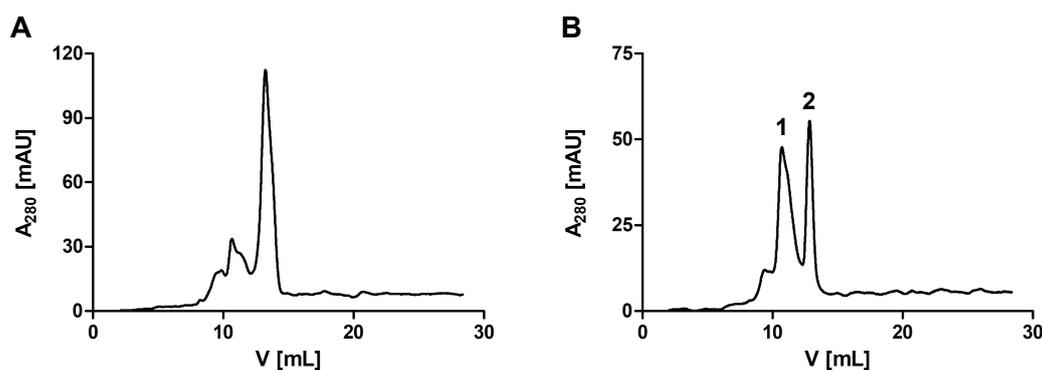


Abb. 42: Assemblierung von kovalent verknüpftem cMSP1E3D1 mit DMPG. Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie anhand der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens für kovalent verknüpftes cMSP1E3D1 mit DMGP in den Verhältnissen (A) 1:90 und (B) 1:110.

5.3 Zellfreie Expression

Neben der heterologen Expression in Insektenzellen, wurde die zellfreie Expression (3.3.2) als Möglichkeit für die Synthese des D₃-Rezeptors geprüft, um Rezeptor in ausreichenden Mengen für strukturelle Untersuchungen herstellen zu können. Bisher wurde von den Dopaminrezeptoren lediglich der D_{2L}-Rezeptor im Hinblick auf die zellfreie Expression untersucht (Basu *et al.*, 2013).

Dazu wurde die zellfreie Expression am Lehrstuhl Biochemie IV (UBT) etabliert. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Dr. Ralf Rues und Dr. Frank Bernhard (Goethe-Universität Frankfurt) (Schwarz *et al.*, 2007; Rues *et al.*, 2016). Im ersten Schritt wurden die benötigten Konstrukte kloniert und dabei mehrere D₃-Rezeptorvarianten generiert. Anschließend wurde die zellfreie Expression mit den generierten Varianten im analytischen Maßstab durchgeführt und anhand von *Dot Blots* analysiert. Um die hergestellten Varianten auf Ligandenbindung untersuchen zu können, wurden diese parallel in HEK-Zellen getestet.

5.3.1 Klonierung der Varianten

Für die zellfreie Expression wurde das Rezeptorgen *D3DR* und die Gensequenzen der Fusionsanhänge mittels Gibson-Assemblierung (4.2.1.5) in den Vektor pET21a kloniert (Abb. 43). Alle generierten Konstrukte beinhalten am N-Terminus die Aminosäuresequenz KPYDGP. Das entsprechende mRNA-Transkript sorgt für eine Optimierung der Initiation der Translation aufgrund der strukturellen Charakteristika der ersten ~10 Nukleotide (Roos *et al.*, 2014). Am C-Terminus beinhalten alle Varianten ein *superfolder* GFP (sfGFP) als Reporterprotein und einen Strep-Anhang, welcher für die Immunodetektion oder die Reinigung verwendet werden kann.

Die Reinigung des D_{3wt}-Rezeptors aus Insektenzellen zeigte bereits, dass der Rezeptor während der Reinigung abgebaut wurde (5.1.2). Für die zellfreie Expression und zur Etablierung eines anschließenden Reinigungsprotokolls wurden daher Modifikationen am D_{3wt}-Rezeptor vorgenommen (Varianten 1-7). Variante 1 enthält den Volllänge D₃-Rezeptor mit dem thermostabilisierenden Austausch L119W, wie er für die Kristallstruktur

(Chien *et al.*, 2010, PDB: 3PBL) verwendet wurde. An den Varianten 2-4 wurden Verkürzungen vorgenommen. Die flexiblen Bereiche des Proteins, der N-Terminus (M1-Y31) und Teile des ICL3 wurden deletiert. Dies sollte dafür sorgen, dass das Protein zum einen kleiner, aber auch rigider wird, um das Protein für Untersuchungen wie NMR oder Röntgenkristallographie besser zugänglich zu machen. Außerdem sollte die Verkürzung des ICL3 dafür sorgen, dass der Rezeptor während der Reinigung nicht so leicht durch Proteasen abgebaut werden kann. Dabei muss bedacht werden, dass Modifikationen am ICL3 strukturelle Veränderungen in der orthosterischen Bindetasche zur Folge haben können, welche dazu führen, dass Liganden schlechter an den D₃-Rezeptor binden. Für die Kristallstruktur des D₃-Rezeptors wurde der ICL3 mit dem T4-Lysozym ersetzt, wodurch beispielsweise die Bindung des Liganden Quinpirol ungefähr um den Faktor drei verschlechtert wurde (Chien *et al.*, 2010). Um zu testen, wie stark der ICL3 gekürzt werden kann, ohne die korrekte Faltung des Rezeptors zu stören, wurden für den ICL3 daher drei Längen eingeführt, kurz (Δ R222-R318), mittel (Δ T225-L315) und lang (Δ N228-L310). Dabei muss ebenfalls gewährleistet werden, dass die Verkürzungen des ICL3 nicht die Signalweiterleitung beeinträchtigen.

Die Varianten 5-7 bauen auf den Varianten 2-4 auf, enthalten jedoch zusätzliche Austausch mehrerer Cysteine. Da der Volllänge D₃-Rezeptor insgesamt 16 Cysteine (Verkürzt: 13 Cysteine) enthält, kann es bei der Proteinsynthese leicht zu Fehlfaltungen aufgrund unerwünschter Cysteinverbrückungen kommen. Um dem entgegen zu wirken, wurden Mutationen eingeführt, die bei acht Cysteinen entweder zur Substitution mit einer unpolaren Aminosäure (Alanin) führen, wenn das Cystein in den hydrophoben Helices vorkommt oder mit einer polaren Aminosäure (Serin), wenn das Cystein in den Termini oder den Schleifenregionen vorkommt. Cysteine, die für die Struktur und Funktion des Proteins wichtig sind, wie die Disulfidbrücken in den extrazellulären Schleifen wurden nicht ausgetauscht. Ähnliche Modifikationen haben beispielsweise zu einer verbesserten Synthese des Chemokin-Rezeptor 5 (CCR5) in *E. coli* beigetragen (Wiktor *et al.*, 2013).

1	KPYDGP		D ₃		sfGFP	Strep	L119W
2	KPYDGP	Δ M1-Y31	D ₃	Δ R222-R318	sfGFP	Strep	L119W
3	KPYDGP	Δ M1-Y31	D ₃	Δ T225-L315	sfGFP	Strep	
4	KPYDGP	Δ M1-Y31	D ₃	Δ N228-L310	sfGFP	Strep	
5	KPYDGP	Δ M1-Y31	D ₃	Δ R222-R318	sfGFP	Strep	L119W,C37A,C51A, C102A,C114A,C122A, C147A,C166A,C400S
6	KPYDGP	Δ M1-Y31	D ₃	Δ T225-L315	sfGFP	Strep	
7	KPYDGP	Δ M1-Y31	D ₃	Δ N228-L310	sfGFP	Strep	

Abb. 43: Konstrukte für die zellfreie Expression des D₃-Rezeptorgens. Alle Konstrukte enthalten vom N-Terminus zum C-Terminus die Sequenz KPYDGP, gefolgt von der jeweiligen D₃-Rezeptorvariante, einem sfGFP und einem Strep-Anhang. Die vollständige Gen- und Aminosäuresequenz für den wildtypischen D₃-Rezeptor befindet sich im Anhang (9.2). Die Gensequenz ist auf die Codonverwendung von *E. coli* optimiert; *Codon Adaption Index* (CAI): 0,86 (D₃ Sequenz 3) (Tab. 27).

5.3.2 Nanodiscs bringen den humanen D₃-Rezeptor in Lösung

Die Varianten 1-7 (5.3.1) wurden zellfrei hergestellt (4.2.10). Als Expressionskontrolle wurde ein Plasmid verwendet, welches das Reporterprotein sfGFP ohne Rezeptor enthält. Nach beendeter Expression wurden die Proben zentrifugiert und Pellet sowie Überstand analysiert. Im ersten Ansatz wurde die Synthese des Rezeptors im Präzipitat-Modus durchgeführt. Dabei sind keine Bestandteile, wie z.B. Nanodiscs, im Ansatz, die den Rezeptor in Lösung halten können. Der Rezeptor kann sich somit nicht falten und präzipitiert. Die *Dot Blots* (4.2.15) zeigten, dass alle sieben Varianten exprimiert wurden. Wie erwartet, war der Rezeptor nur im Pellet vorhanden (Abb. 44, A) und nicht im Überstand (Abb. 44, B).

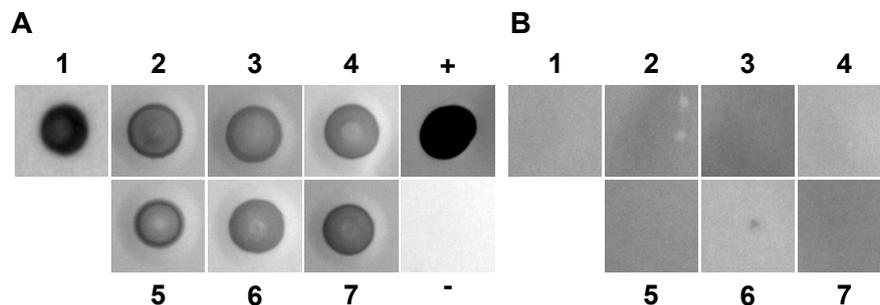


Abb. 44: Zellfreie Expression der D₃-Rezeptorvarianten im Präzipitat-Modus. (A) Analyse der Pellets: *Dot Blots* gegen den C-terminalen Strep-Anhang für die Varianten 1-7 sowie Positivkontrolle (gereinigtes Protein mit Strep-Anhang (NusG-Strep) vom LS Biochemie IV (UBT) bereitgestellt) und Negativkontrolle (zellfreie Expression ohne Zugabe von DNA). **(B)** Analyse der Überstände mittels *Dot Blot* gegen den C-terminalen Strep-Anhang für die Varianten 1-7.

Im zweiten Ansatz wurde die Synthese des Rezeptors im Nanodisc-Modus durchgeführt. Dazu wurden in den Ansatz Nanodiscs gegeben, die wie oben beschrieben, hergestellt wurden (5.2.4.1). Die Nanodiscs ermöglichen dem Rezeptor die Faltung in hydrophober Umgebung und können den Rezeptor somit in Lösung halten. Es wurden mit diesen Proben ebenfalls *Dot Blots* durchgeführt. Hier war zwar noch Rezeptor im Pellet zu sehen (Abb. 45, A), jedoch befand sich der Rezeptor auch löslich im Überstand (Abb. 45, B). Dies deutet darauf hin, dass der Rezeptor mit den Nanodiscs assoziiert bzw. in den Nanodiscs eingebettet ist.

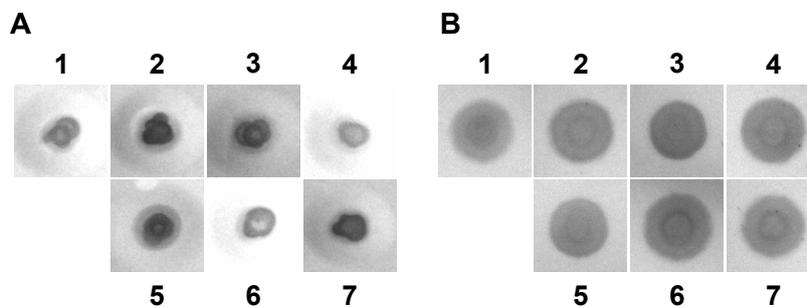


Abb. 45: Zellfreie Expression der D₃-Rezeptorvarianten im Nanodisc-Modus. (A) Analyse der Pellets: *Dot Blots* gegen den C-terminalen Strep-Anhang für die Varianten 1-7. **(B)** Analyse der Überstände mittels *Dot Blot* gegen den C-terminalen Strep-Anhang für die Varianten 1-7.

5.3.3 Testen der Varianten in HEK-Zellen

Um zu prüfen, ob die Rezeptorvarianten, die für die zellfreie Expression kloniert wurden, überhaupt Ligand binden können, wurden diese parallel in HEK-Zellen synthetisiert. Dazu wurden die Varianten in einen Expressionsvektor für HEK-Zellen kloniert (5.3.3.1) und diese anschließend durch Dr. Dorothee Weikert und Dr. Harald Hübner (LS für Pharmazeutische Chemie, Prof. Dr. Peter Gmeiner, FAU) exprimiert. Aus den jeweiligen Zellen wurde im Anschluss Membranhomogenat hergestellt und dieses mit dem Radioligandenbindungstest untersucht (5.3.3.2).

5.3.3.1 Klonierung der Varianten für die Expression in HEK-Zellen

Für die Expression in HEK-Zellen wurden die Gensequenzen für Rezeptorvarianten (5.3.1) mit Gibson-Assemblierung (4.2.1.5) in das Plasmid pcDNA3.1 kloniert (Abb. 46). Dieses beinhaltet vor dem Startcodon die Basensequenz GCCACC, auch Kozak-Sequenz genannt. Diese Sequenz verbessert die Initiation der Translation von mRNA-Transkripten in Eukaryoten (Kozak, 1984). Die Sequenz der Rezeptorvarianten 2-7 ist, wie bei den Varianten für die zellfreie Expression, auf die Codonverwendung von *E. coli* angepasst (CAI: 0,86; Tab. 27).

1	GCCACC		D ₃			
2	GCCACC	ΔA2-Y31	D ₃	ΔR222-R318		L119W
3	GCCACC	ΔA2-Y31	D ₃	ΔT225-L315		
4	GCCACC	ΔA2-Y31	D ₃	ΔN228-L310		
5	GCCACC	ΔA2-Y31	D ₃	ΔR222-R318		L119W, C37A, C51A, C102A, C114A, C122A, C147A, C166A, C400S
6	GCCACC	ΔA2-Y31	D ₃	ΔT225-L315		
7	GCCACC	ΔA2-Y31	D ₃	ΔN228-L310		

Abb. 46: Konstrukte für die Expression der D₃-Rezeptorvarianten in HEK-Zellen. Alle Konstrukte beinhalten vor dem Startcodon ATG die Kozak-Sequenz GCCACC. Die D₃-Rezeptorvarianten entsprechen den Varianten, die für die zellfreie Expression generiert wurden. Bei Variante 1 handelt es sich um die wildtypische Sequenz, welche auf Säugerzellen angepasst ist. Dafür wurde die D₃-Sequenz 1 (CAI: 0,8; Tab. 27, 9.3) verwendet.

5.3.3.2 Rezeptorvarianten binden keinen Liganden

Die Ergebnisse des Radioligandenbindungstests (4.2.18) zeigten keine bzw. eine sehr schwache Ligandenbindung der Varianten im Gegensatz zum wildtypischen D₃-Rezeptor (Variante 1) (Abb. 47). Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Rezeptorvarianten nicht in HEK-Zellen synthetisiert wurden. Der CAI ist mit 0,69 für die D₃-Genvarianten in Bezug auf die Säugerzellen jedoch recht hoch (Tab. 27, 9.3), weshalb es unwahrscheinlich ist, dass die HEK-Zellen die Rezeptorvarianten nicht hergestellt haben. Viel wahrscheinlicher ist es, dass die Rezeptorvarianten aufgrund der Verkürzungen und Mutationen nicht in der Zellmembran gefaltet waren und der Ligand [³H]Spiperon daher nicht gebunden wurde. Falls fehlgefaltete Rezeptorvarianten hergestellt wurden, könnten diese auch abgebaut worden sein.

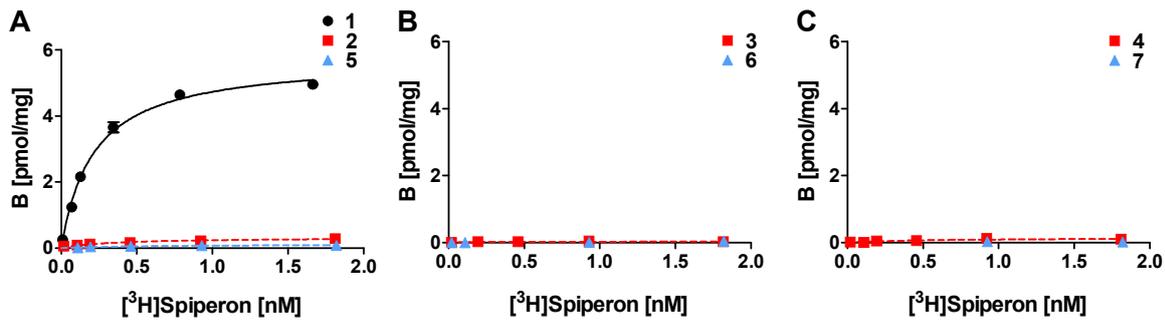


Abb. 47: Radioligandenbindungstest mit $[^3\text{H}]$ Spiperon nach Expression der D_3 -Rezeptorvarianten in HEK-Zellen. (A) Varianten 1, 2, 5. Der K_D -Wert und der B_{MAX} -Wert für den wildtypischen Rezeptor (Variante 1) lagen bei 0,21 nM und 5,5 pmol/mg. **(B)** Varianten 3 und 6. **(C)** Varianten 4 und 7. Für die Varianten 1-7 ist je eine Messung (4.2.18) beispielhaft gezeigt. Die Varianten 2-7 wurden zweimal gemessen; alle Messungen befinden sich nochmals zum Nachschlagen im Anhang (Abb. 82, 9.6). Für die Varianten 2-7 konnten keine K_D - und B_{MAX} -Werte bestimmt werden.

5.4 Heterologe Expression in *E. coli*

Die bisherigen Resultate der Expression in Insektenzellen und der zellfreien Expression zeigten, dass die Herstellung eines rekombinanten GPCRs nicht trivial ist. Die Expression des $\text{D}_{3\text{wt}}$ -Rezeptorgens in Insektenzellen war gut, jedoch wurde der wildtypische Rezeptor im Zuge der Reinigung abgebaut (5.1.2). Aller Voraussicht nach, müssen die Dopaminrezeptoren, ähnlich zu anderen GPCRs, modifiziert werden, um sie überhaupt in ausreichenden Mengen für die dringend benötigten strukturellen Untersuchungen herstellen zu können. Für die zellfreie Expression wurden am D_3 -Rezeptor daher Modifikationen in Form von Verkürzungen und Substitution einzelner Aminosäuren vorgenommen (5.3.1). Zwar war die zellfreie Expression sehr vielversprechend, jedoch führten die Modifikationen auch dazu, dass nur noch sehr schwache oder keine Bindung des Liganden $[^3\text{H}]$ Spiperon detektiert werden konnte.

Um geeignete Modifikationen zu finden, welche die Herstellung von rekombinanten Dopaminrezeptoren für strukturelle Untersuchungen verbessern, wäre das Screening einer Bibliothek an Rezeptorvarianten im Hochdurchsatz-Verfahren ideal. Die Expression in Insektenzellen und die zellfreie Expression eignen sich aufgrund der aufwendigen Generierung der Viren bzw. den hohen Kosten für so eine Strategie jedoch nur bedingt.

Im Gegensatz dazu ist die Expression in *E. coli* für ein Hochdurchsatz-Verfahren gut geeignet und bietet viele Vorteile, wie die einfache Handhabung und den geringen Kostenaufwand (3.3.4). Bisher wurden einige Optimierungsstrategien unter Verwendung von *E. coli* als Wirt entwickelt. Mit einem Ansatz, der gerichtete Evolution beinhaltet, können beispielsweise Substitutionen einzelner Aminosäuren aufgespürt werden, welche die Synthese steigern und zusätzlich auch die Thermostabilität des Rezeptors verbessern können (3.4, Sarkar *et al.*, 2008). Außerdem konnten GPCRs, wie der NTR1, schon in ausreichenden Mengen für Strukturuntersuchungen aus *E. coli* gereinigt werden (Egloff *et al.*, 2014).

Die Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ konnten zwar bereits in *E. coli* hergestellt werden, jedoch war die Synthese von funktional in der Membran gefalteten Rezeptoren sehr gering und reicht nicht aus, Rezeptor in ausreichenden Mengen für Strukturanalysen zu reinigen (Vanhauwe *et al.*, 2000). Die maximalen Rezeptordichten lagen bei $1 \pm 0,2$ pmol/mg für den D_{2S}, $0,25 \pm 0,04$ pmol/mg für den D_{2L} und $0,58 \pm 0,08$ pmol/10⁹ Bakterien für den D₃-Rezeptor. Daher wurde im ersten Schritt untersucht, ob die initiale Synthese des D_{2S}- und D₃-Rezeptors in *E. coli* noch gesteigert werden kann. Dafür wurden zunächst Konstrukte der beiden Rezeptoren mit N- und C-terminalen Fusionsproteinen sowie Substitutionen einzelner Aminosäuren generiert und getestet. Im Anschluss wurde die Strategie der gerichteten Evolution als Methode für die Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ implementiert. Mit dieser kann die Synthese der beiden Rezeptoren zusätzlich optimiert werden.

5.4.1 Expression des D_{2S}-Rezeptorgens in *E. coli*

Die Expression von Rezeptorgen mit den entsprechenden Fusionen für die Herstellung von rekombinanten GPCRs in *E. coli* erfolgt typischerweise unter Kontrolle eines schwachen Promotors, wie dem *lac*-Promotor. Des Weiteren wird die Expression eher bei niedrigeren Temperaturen (18-25 °C) für einen längeren Zeitraum in Protease-defizienten Stämmen, wie DH5 α , durchgeführt. Um außerdem die Expressionsstärke zu kontrollieren, haben sich unterschiedliche Konzentrationen an IPTG bewährt sowie die Zugabe von Glukose in das Medium (McCusker *et al.*, 2007). Dieser Mechanismus zur Regulation der Genexpression beruht auf der Katabolitrepression (Görke & Stülke, 2008).

Unter Berücksichtigung der oben genannten Anhaltspunkte wurden für den D_{2Swt}-Rezeptor drei initiale Konstrukte mit Gibson-Assemblierung (4.2.1.5) kloniert (Abb. 48) und anschließend für die Expression in *E. coli* getestet. Dabei diente der Vektor pMAL-p5X als Ausgangsplasmid, wobei der im Vektor enthaltene *tac*-Promotor gegen den schwächeren *lac*-Promotor ersetzt wurde. Weiterhin wurde eine Gensequenz für den D_{2Swt}-Rezeptor verwendet, die einen niedrigen CAI-Wert für *E. coli* aufweist (D₂ Sequenz 2; CAI: 0,57; Tab. 27). Dadurch sollte die Translation des mRNA-Transkripts zunächst gedrosselt werden, um zu vermeiden, dass sich die Synthese des Rezeptors auf den Expressionswirt toxisch auswirkt.

Alle drei Konstrukte beinhalten am C-Terminus eine TEV-Schnittstelle, um C-terminale Anhänge während einer Reinigung ggf. abspalten zu können. Der C-terminale Strep-Anhang kann für die Immunodetektion und die Reinigung verwendet werden. Die Konstrukte 2 und 3 enthalten zusätzlich am N-Terminus das MBP. Das MBP besitzt eine Signalsequenz, die dazu führt, dass das MBP ins Periplasma transferiert wird. Diese soll ermöglichen, dass das naszierende Polypeptid während der Translation zu inneren Membran transportiert wird und der Rezeptor mithilfe des Translokons in die Membran integriert wird. Konstrukt 3 enthält am C-Terminus als weiteres Fusionsprotein mCherry, um den Rezeptor am C-Terminus vor Abbau zu schützen.

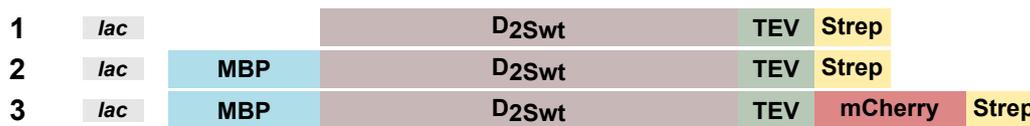


Abb. 48: Erste Konstrukte für die Expression des D_{2Swt}-Rezeptorgens in *E. coli*. Alle Zielgene stehen unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Die Konstrukte 1-3 beinhalten vom N-Terminus zum C-Terminus den D_{2Swt}-Rezeptor, eine TEV-Schnittstelle und einen Strep-Anhang. Zusätzlich beinhalten die Konstrukte 2 und 3 am N-Terminus das Fusionsprotein MBP. Konstrukt 3 enthält am C-Terminus mCherry als weiteres Fusionsprotein. Die Gen- und Aminosäuresequenzen für den Rezeptor und die beiden Fusionsproteine befinden sich im Anhang (9.2).

Die Plasmide für die drei initialen Konstrukte (Abb. 48) wurden in *E. coli* TOP 10 eingebracht und über Nacht exprimiert (4.2.6.3). Anschließend wurde die Expression mit SDS-PAGE (4.2.14) und Western Blot gegen (4.2.15) analysiert.

Das erwartete Molekulargewicht für das Konstrukt ohne Fusionsproteine (*lac*-D_{2Swt}) liegt bei 49,5 kDa. Da das Konstrukt keine Signalsequenz beinhaltet, die die Insertion des Rezeptors in die Membran ermöglicht, wurde die Produktion des Rezeptors in Einschlusskörperchen erwartet. Weder anhand der SDS-PAGE, noch anhand des Western Blots gegen den C-terminalen Strep-Anhang konnte jedoch eine Bande bei entsprechender Höhe festgestellt werden (Abb. 49). Auch nach einem Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation war keine entsprechende Bande in den Fraktionen der Pellets (P1, H) zu erkennen. Entweder wurde das Protein demnach nicht synthetisiert oder direkt abgebaut. Bei den anderen Banden handelt es vermutlich um unspezifische Bindung des Antikörpers an *E. coli* eigene Proteine (Skerra & Schmidt, 2000).

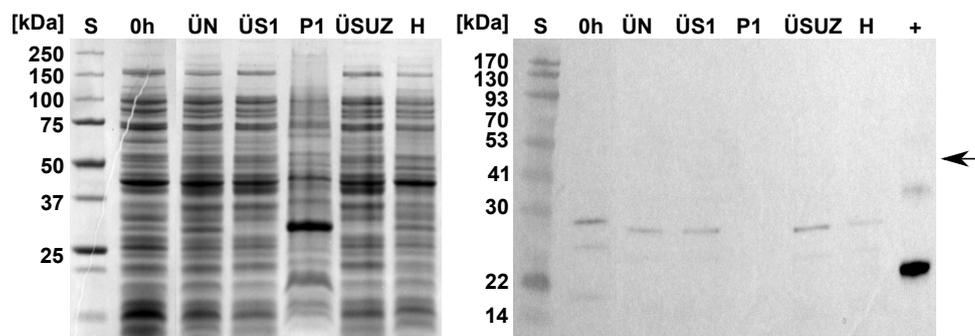


Abb. 49: Expression des D_{2Swt}-Rezeptorgens in *E. coli* mit dem Konstrukt *lac*-D_{2Swt}. Die Expression erfolgte in *E. coli* TOP10 nach Induktion mit 0,5 mM IPTG über Nacht und wurde mittels SDS-PAGE (10 %-Gel) und Western Blot gegen den C-terminalen Strep-Anhang analysiert. Proben: vor Induktion (0h), über Nacht (ÜN), Überstand 1 (ÜS1), Pellet 1 (P1), Überstand Ultrazentrifugation (ÜSUZ), Homogenat (H), Positivkontrolle (gereinigtes Protein mit Strep-Anhang (NusG-Strep) vom LS Biochemie IV (UBT) bereitgestellt); Molekulargewichtsstandard (S).

Für das Konstrukt *lac*-MBP-D_{2Swt} war im Western Blot gegen das N-terminale MBP nur leichter Abbau, aber keine Bande bei erwartetem Molekulargewicht zu sehen (theor. 92,5 kDa) (Abb. 50, A). Der Western Blot für das Konstrukt *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry zeigte eine Bande bei ca. 90 kDa, die deutlich unter der erwartetem Molekulargewicht (theor. 120,3 kDa) lag (Abb. 50, B). Es ist jedoch bekannt, dass Membranproteine in der SDS-PAGE ein anderes

Laufverhalten zeigen als erwartet (Rath *et al.*, 2009). Außerdem verringert das Abspalten der Signalsequenz des MBP das Molekulargewicht um 2,7 kDa (Fikes *et al.*, 1990). Für beide Konstrukte wurde ein Radioligandenbindungstest (4.2.18) mit den exprimierenden Zellen durchgeführt, um zu untersuchen, ob Rezeptor synthetisiert wurde, der Ligand binden kann und demnach gefaltet ist. Außerdem kann so die Insertion des Rezeptors in die innere Zellmembran quantifiziert werden (maximale Rezeptordichte). Es konnte Ligandenbindung für beide Konstrukte gemessen werden (Abb. 50, C, D). Die Parameter K_D und B_{MAX} wurden je drei bzw. vier Mal bestimmt und davon der Mittelwert gebildet (Abb. 50, E). Der K_D -Wert für das Konstrukt *lac*-MBP- D_{2Swt} -mCherry war mit $0,14 \pm 0,04$ nM etwas niedriger als der für das Konstrukt *lac*-MBP- D_{2Swt} mit $0,28 \pm 0,09$ nM. Die B_{MAX} -Werte für die beiden Konstrukte unterschieden sich mit 7 ± 2 Rezeptoren/Zelle und 258 ± 8 Rezeptoren/Zelle jedoch deutlich voneinander. Das C-terminale Fusionsprotein mCherry hat demnach zu einer starken Erhöhung der Produktion des Rezeptors geführt.

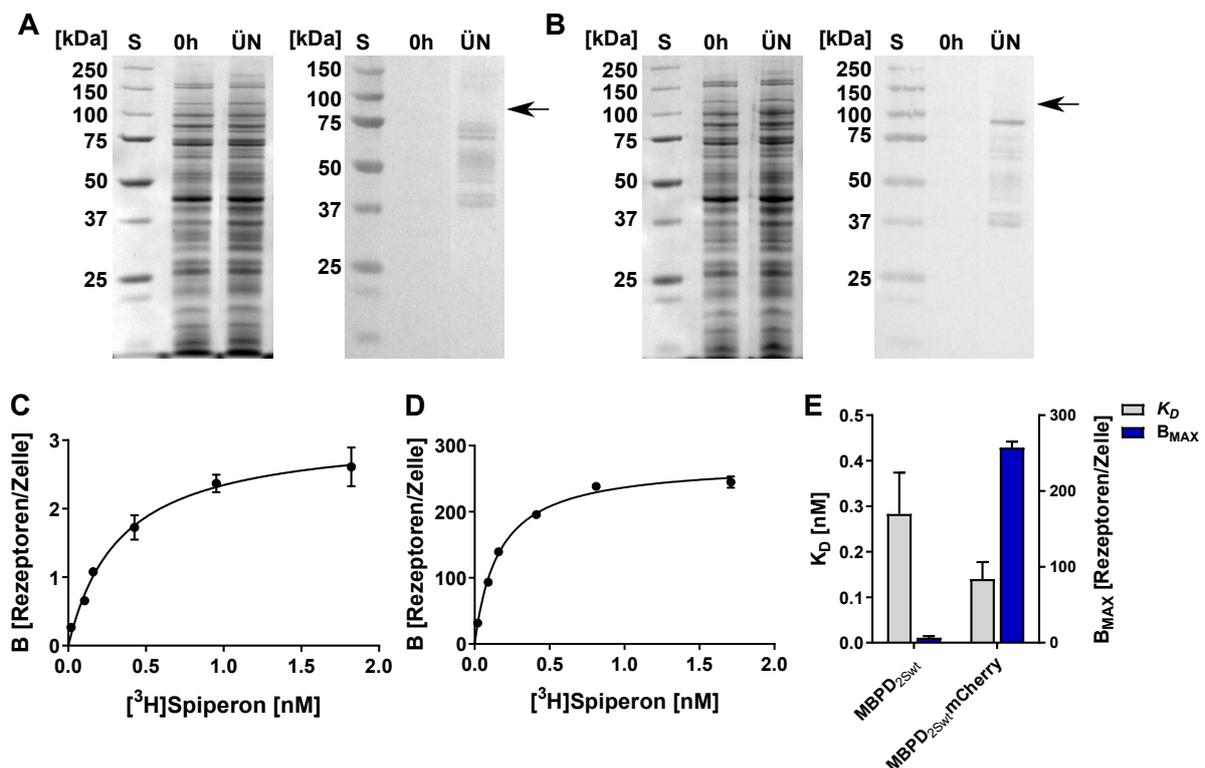


Abb. 50: Expression des D_{2Swt} -Rezeptorgens in *E. coli* mit den Konstrukten *lac*-MBP- D_{2Swt} und *lac*-MBP- D_{2Swt} -mCherry. Die Expression erfolgte in *E. coli* TOP10 nach Induktion mit 0,5 mM IPTG über Nacht und wurde mittels SDS-PAGE (10 %-Gel) und Western Blot gegen das N-terminale MBP analysiert (A) *lac*-MBP- D_{2Swt} , (B) *lac*-MBP- D_{2Swt} -mCherry. Proben: vor Induktion (0h), über Nacht (ÜN); Molekulargewichtsstandard (S). Die erwartete Laufhöhe der Bande ist mit einem Pfeil markiert. Die Positivkontrolle für den Western Blot befindet sich im Anhang (Abb. 83, 9.7). (C) (*lac*-MBP- D_{2Swt}) und (D) (*lac*-MBP- D_{2Swt} -mCherry): Bindung von [3 H]Spiperon an den Rezeptor. Die Bindungskurve einer Messung ist für die beiden Konstrukte beispielhaft gezeigt (E) $MW \pm SEM$ der K_D - und B_{MAX} -Werte aus vier zeitlich unabhängigen Messungen (4.2.18). Die Einzelwerte aller Messungen befinden sich im Anhang (Tab. 30, 9.7). Für alle Messungen wurde die gleiche Charge an exprimierenden Zellen verwendet.

5.4.1.1 Austausch des C-terminalen Fusionsproteins

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Synthese des wildtypischen D_{2S} -Rezeptors durch die Variation des C-terminalen Fusionsproteins optimiert werden kann. Dazu wurde das Gen

des C-terminalen mCherrys mittels Gibson-Assemblierung (4.2.1.5) durch die Gene für sfGFP, TrxA oder G_{α1} ersetzt (Abb. 51, 2-4). Das sfGFP weist, wie das mCherry, eine β-Faltblatt Faserstruktur (~28 kDa) auf (Pédelacq *et al.*, 2006). Das TrxA ist im Vergleich zu den fluoreszierenden Proteinen ein kleines globuläres Protein (~12 kDa), welches aus zentralen β-Faltblättern besteht, die von α-Helices umgeben sind (Gleason & Holmgren, 1988; Katti *et al.*, 1990). Die α-Untereinheit des trimeren G-Proteins ist deutlich größer (~40 kDa) und besteht aus mehreren α-Helices und β-Faltblättern (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Milligan & Kostenis, 2006). Es wurde im speziellen die α-Untereinheit des G-Proteins G₁ gewählt, da gezeigt wurde, dass der D_{2S}-Rezeptor die Interaktion mit diesem G-Protein bevorzugt (Grünewald *et al.*, 1996). Die Fusion aus GPCR mit der α-Untereinheit des G-Proteins kann außerdem dazu genutzt werden, die Interaktion zwischen den beiden Proteinen genauer zu beleuchten. Der Vorteil liegt darin, dass die Fusion eine Stöchiometrie von 1:1 vorgibt und die beiden Proteine in räumliche Nähe bringt, was ansonsten schwierig sein kann, wenn GPCRs und G-Proteine getrennt voneinander hergestellt werden (Seifert *et al.*, 1999).

1	<i>lac</i>	MBP	D _{2Swt}	TEV	mCherry	Strep
2	<i>lac</i>	MBP	D _{2Swt}	TEV	sfGFP	Strep
3	<i>lac</i>	MBP	D _{2Swt}	TEV	TrxA	Strep
4	<i>lac</i>	MBP	D _{2Swt}	TEV	G _{α1}	Strep

Abb. 51: Konstrukte mit verschiedenen C-terminalen Fusionsproteinen für die Expression in *E. coli*. Alle Zielgene stehen unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Alle Konstrukte beinhalten vom N- zum C-Terminus das Fusionsprotein MBP, den D_{2Swt}-Rezeptor, eine TEV-Schnittstelle und einen Strep-Anhang. Konstrukt 1 enthält am C-Terminus das Fusionsprotein mCherry, Konstrukt 2 das sfGFP, Konstrukt 3 das TrxA und Konstrukt 4 das G_{α1}. Die Gen- und Aminosäuresequenzen für Rezeptor und die Fusionsproteine befinden sich im Anhang (9.2).

Wie die initialen Konstrukte für den D_{2Swt}-Rezeptor wurden die drei neuen Konstrukte (Abb. 51, 2-4) exprimiert und analysiert (Abb. 52, A). Das erwartete Molekulargewicht für die hergestellten Proteine liegt bei 120,3 kDa für die Konstrukte 1 und 2, bei 105,2 kDa für Konstrukt 3 und 133,7 kDa für Konstrukt 4. Der Western Blot zeigte für alle vier exprimierten Konstrukte Banden, die wie zuvor unterhalb der erwarteten Laufhöhen lagen, wobei ebenfalls leichter Abbau zu erkennen war. Der Radioligandenbindungstest (4.2.18) zeigte, dass der hergestellte D_{2wt}-Rezeptor unabhängig vom verwendeten Konstrukt Ligand binden konnte (Abb. 52, B). Die K_D -Werte waren für alle vier Konstrukte vergleichbar (von 1-4: $0,14 \pm 0,04$ nM, $0,13 \pm 0,04$ nM, $0,1 \pm 0,04$ nM, $0,15 \pm 0,02$ nM), während die B_{MAX} -Werte nur leicht variierten. Das Konstrukt mit sfGFP als C-terminalem Fusionsprotein führte zur höchsten Produktion mit 325 ± 21 Rezeptoren/Zellen, gefolgt vom dem Konstrukt mit TrxA (284 ± 10 Rezeptoren/Zelle), mCherry (256 ± 7 Rezeptoren/Zelle) und G_{α1} (197 ± 23 Rezeptoren/Zelle). Im Vergleich zur Synthese ohne C-terminalem Fusionsprotein (Abb. 50), zeigen die Ergebnisse, dass das Vorhandensein eines Fusionsproteins wichtig ist. Allerdings hat die Art des Fusionsproteins für die Proteinbiosynthese keine große Bedeutung.

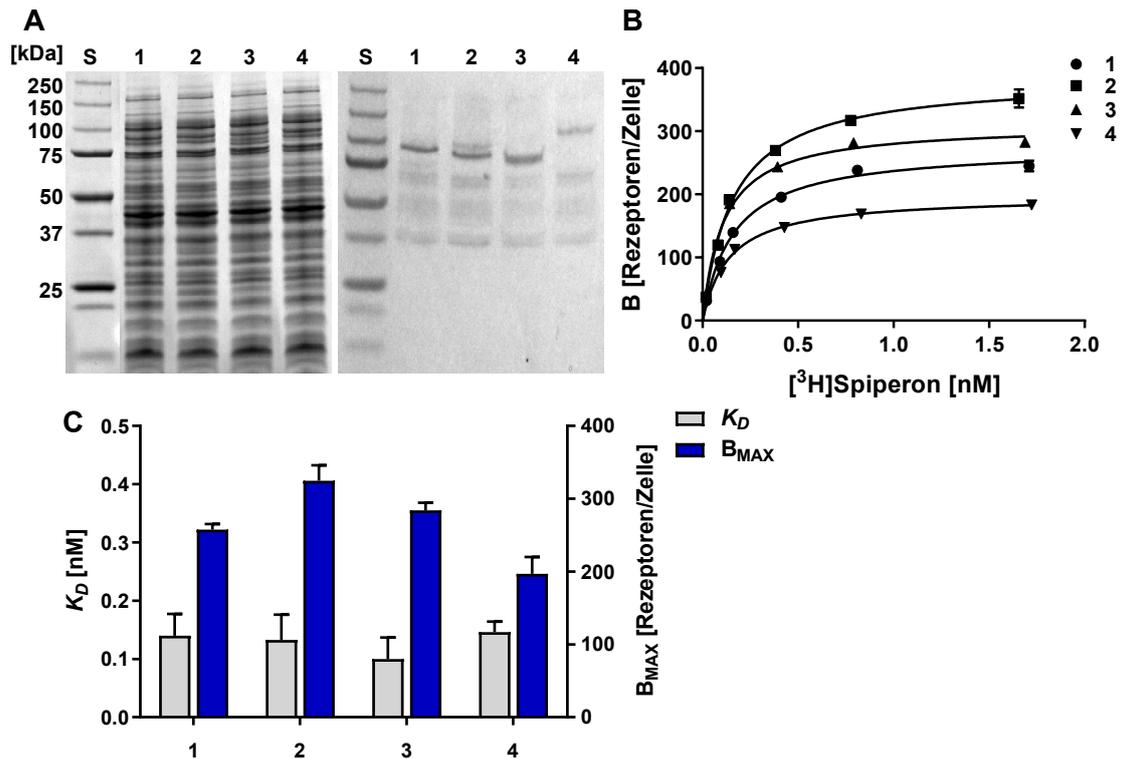


Abb. 52: Expression des D_{2Swt}-Rezeptorgens durch die Konstrukte mit verschiedenen C-terminalen Fusionsproteinen. Die Expression erfolgte in *E. coli* TOP10 nach Induktion mit 0,5 mM IPTG über Nacht und wurde mittels SDS-PAGE (10 %-Gel) und Western Blot gegen das N-terminale MBP analysiert **(A)** Bahn 1 *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry, 2 *lac*-MBP-D_{2Swt}-sfGFP, 3 *lac*-MBP-D_{2Swt}-TrxA, 4 *lac*-MBP-D_{2Swt}-G_{cit1}; Molekulargewichtsstandard (S). Die Positivkontrolle für den Western Blot befindet sich im Anhang (Abb. 83, 9.7). **(B)** Bindung von [³H]Spiperon an den Rezeptor für die Konstrukte 1, 2, 3 und 4. Die Bindungskurve einer Messung ist für die vier Konstrukte beispielhaft gezeigt **(C)** MW±SEM der K_D- und B_{MAX}-Werte aus vier zeitlich unabhängigen Messungen (4.2.18). Die Einzelwerte aller Messungen befinden sich im Anhang (Tab. 30, 9.7). Für alle Messungen wurde die gleiche Charge an exprimierenden Zellen verwendet.

5.4.1.2 Mutationen und Promotorstärke beeinflussen die Proteinsynthese

Nachdem die Art des C-terminalen Fusionsproteins keinen großen Auswirkungen auf die Synthese des D_{2Swt}-Rezeptors hatte, wurde im nächsten Schritt untersucht, inwiefern die Substitution einzelner Aminosäuren und die Stärke des Promotors die Herstellung des rekombinanten D_{2S}-Rezeptors beeinflussen können. Dazu wurden drei Mutationen schrittweise mit zielgerichteter Mutagenese (4.2.1.6) in das Rezeptorgen eingebracht, die zu den Aminosäureaustauschen I112A, L346A, und L350A führen (Abb. 53, 2-4). Von einer anderen Arbeitsgruppe wurden diese Austausche in das D_{2L}-Rezeptorgen eingeführt, um schließlich die Struktur des Rezeptors mittels Röntgenkristallographie (Wang *et al.*, 2018, PDB: 6CM4) lösen zu können. Ob diese Austausche zu einer gesteigerten Synthese in Insektenzellen beigetragen haben, geht aus dieser Arbeit jedoch nicht hervor und wurde daher für die Expression des D_{2S}-Rezeptorgens in *E. coli* untersucht.

Des Weiteren wurde der *tac*-Promotors wieder eingeführt und dessen Einfluss auf die Expression untersucht (Abb. 53, 5). Der *tac*-Promotor wurde mit Gibson-Assemblierung (4.2.1.5) kloniert, hierfür wurde die wildtypische Rezeptorvariante verwendet.

1	<i>lac</i>	MBP	D2Swt	TEV	mCherry	Strep
2	<i>lac</i>	MBP	D2S I122A	TEV	mCherry	Strep
3	<i>lac</i>	MBP	D2S L346A,L350A	TEV	mCherry	Strep
4	<i>lac</i>	MBP	D2S I122A, L346A, L350A	TEV	mCherry	Strep
5	<i>tac</i>	MBP	D2Swt	TEV	mCherry	Strep

Abb. 53: Konstrukte mit D_{2S}-Rezeptorvarianten mit Promotoren für die Expression in *E. coli*. Die Zielgene der Konstrukte 1-4 stehen unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Das Zielgen von Konstrukt 5 steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors. Alle Konstrukte beinhalten vom N- zum C-Terminus das Fusionsprotein MBP, den D_{2S}-Rezeptor der entsprechenden Variante, eine TEV-Schnittstelle, das Fusionsprotein mCherry und einen Strep-Anhang. Die Gen- und Aminosäuresequenzen für den wildtypischen Rezeptor und die beiden Fusionsproteine befinden sich im Anhang (9.2).

Wie zuvor, wurden die Konstrukte in *E. coli* TOP 10 über Nacht exprimiert (4.2.6.3) und anschließend anhand von SDS-PAGE (4.2.14) und Western Blot (4.2.15) analysiert (Abb. 54). Das erwartete Molekulargewicht liegt für alle Varianten bei ~120 kDa. Der Western Blot gegen das N-terminale MBP und das C-terminale mCherry zeigte Banden bei entsprechender Höhe, woraus geschlossen werden kann, dass alle Konstrukte exprimiert wurden (Abb. 54, B, C). Das Produkt für die Dreifachvariante (Abb. 54, 4) und den *tac*-Promoter (Abb. 54, 5) lief leicht höher als bei den anderen Konstrukten. In beiden Blots war Abbau für alle Konstrukte zu erkennen, wobei der Abbau bei der Expression unter Kontrolle des *tac*-Promotors am stärksten ausfiel. Dies deutet darauf hin, dass die Expression des Rezeptorgens unter Kontrolle des *tac*-Promotors für die Bakterienzellen zu stark ist. Die Zellen, die die Konstrukte 1, 4 und 5 exprimierten, wurden mit dem Radioligandenbindungstest (4.2.18) untersucht und die Parameter K_D und B_{MAX} bestimmt (Abb. 54, D+E). Die K_D -Werte lagen mit $0,14 \pm 0,04$ nM, $0,15 \pm 0,08$ nM und $0,21 \pm 0,02$ nM in der gleichen Größenordnung. Die B_{MAX} -Werte zeigten, dass die Einführung der Mutationen zu einer erhöhten Proteinproduktion von 258 ± 8 Rezeptoren/Zelle für den wildtypischen Rezeptor auf 754 ± 39 Rezeptoren/Zelle für die Dreifachvariante geführt hat. Dies darauf hindeutet, dass schon der Austausch von wenigen Aminosäuren die Synthese deutlich steigern kann. Die Expression unter Kontrolle des *tac*-Promotors hat mit 191 ± 32 Rezeptoren/Zelle eher zu einer geringeren Synthese des D_{2Swt}-Rezeptors geführt als unter der Kontrolle des *lac*-Promotors und bekräftigt so die Beobachtungen im Western Blot.

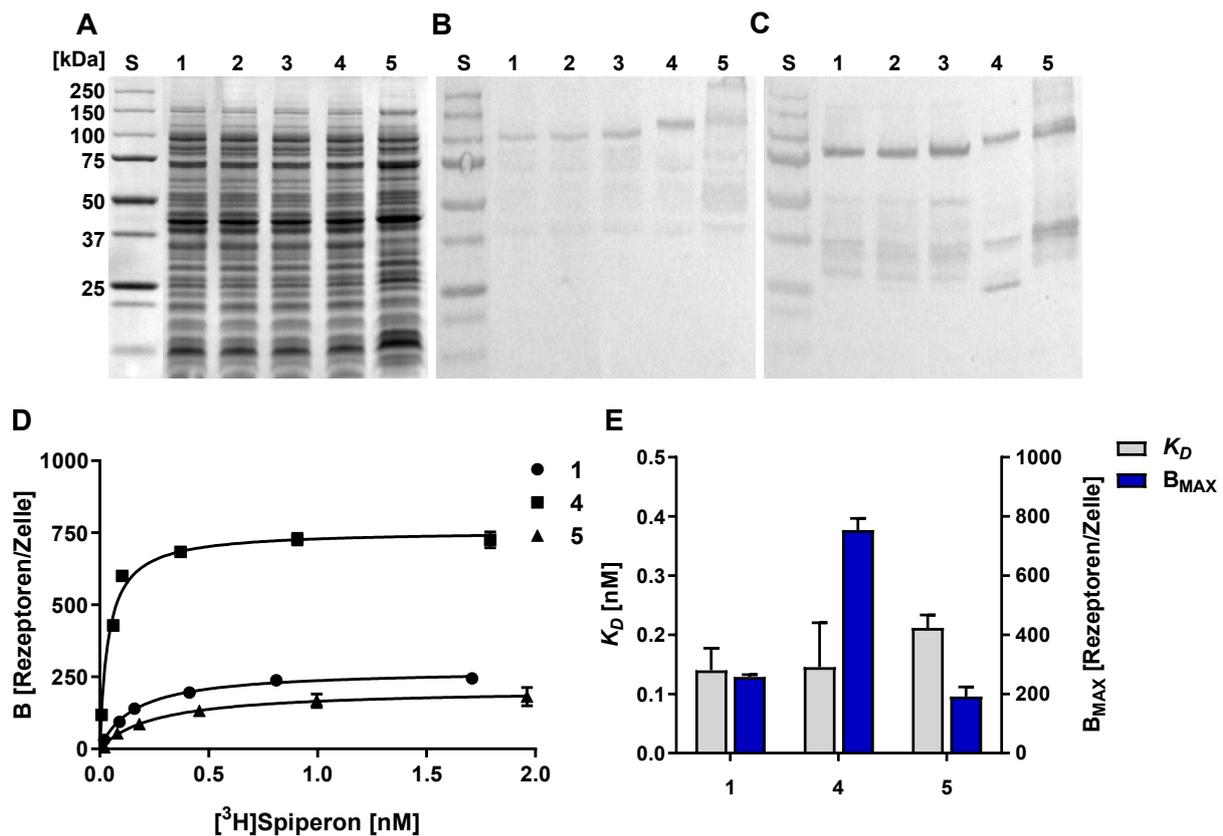


Abb. 54: Expression des D_{2S}-Rezeptorgens in *E. coli* mit verschiedenen D_{2S}-Konstrukten und *tac*-Promotor. Die Expression erfolgte in *E. coli* TOP10 nach Induktion mit 0,5 mM IPTG über Nacht und wurde mittels SDS-PAGE (10 %-Gel) (A) und Western Blot gegen das N-terminale MBP (B) und C-terminale mCherry (C) analysiert. Bahn 1 *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry, 2 *lac*-MBP-D_{2S I122A}-mCherry, 3 *lac*-MBP-D_{2S L346A,L350A}-mCherry, 4 *lac*-MBP-D_{2S I122A,L346A,L350A}-mCherry, 5 *tac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry; Molekulargewichtsstandard (S). Die Positivkontrollen für die Western Blots befinden sich im Anhang (Abb. 83, 9.7). (D) Bindungskurve einer Messung ist für die drei Konstrukte beispielhaft gezeigt (E) MW±SEM der K_D- und B_{MAX}-Werte aus vier zeitlich unabhängigen Messungen (4.2.18). Die Einzelwerte aller Messungen befinden sich im Anhang (Tab. 30, 9.7). Für alle Messungen wurde die gleiche Charge an exprimierenden Zellen verwendet.

Anhand des NTR1 sollte untersucht werden, wie hoch die Produktion eines GPCRs nach Einfügen von Mutationen und Verkürzungen sein kann. Für die Expression wurde das Konstrukt verwendet, welches das N-terminale MBP und das C-terminale mCherry beinhaltet. Das Gen für den NTR1 wurde mittels Gibson-Assemblierung (4.2.1.5) kloniert (Abb. 55). Dabei wurde eine Variante des NTR1 gewählt, die bereits durch Mutationen auf die Synthese hin optimiert wurde und 11 Aminosäureaustausche enthält (Egloff *et al.*, 2014).



Abb. 55: Konstrukt für die Expression des NTR1-Rezeptorgens in *E. coli*. Das Konstrukt 1 beinhaltet vom N- zum C-Terminus das Fusionsprotein MBP, den NTR1-Rezeptor, eine TEV-Schnittstelle, das Fusionsprotein mCherry und einen Strep-Anhang. Als Vergleich das Konstrukt 2 mit dem D_{2Swt}-Rezeptor. Beide Zielgene stehen unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Die Gen- und Aminosäuresequenzen für den Rezeptor und die beiden Fusionsproteine befinden sich im Anhang (9.2).

Die Expression in *E. coli* TOP10 (4.2.6.3) erfolgte wiederum über Nacht. Wie für den D_{2wt}-Rezeptor konnte für den NTR1 im Western Blot gegen das N-terminale Fusionsprotein MBP eine Bande (~ 90 kDa) unterhalb des erwarteten Molekulargewichts (theor. 109,2 kDa) beobachtet werden (Abb. 56, A).

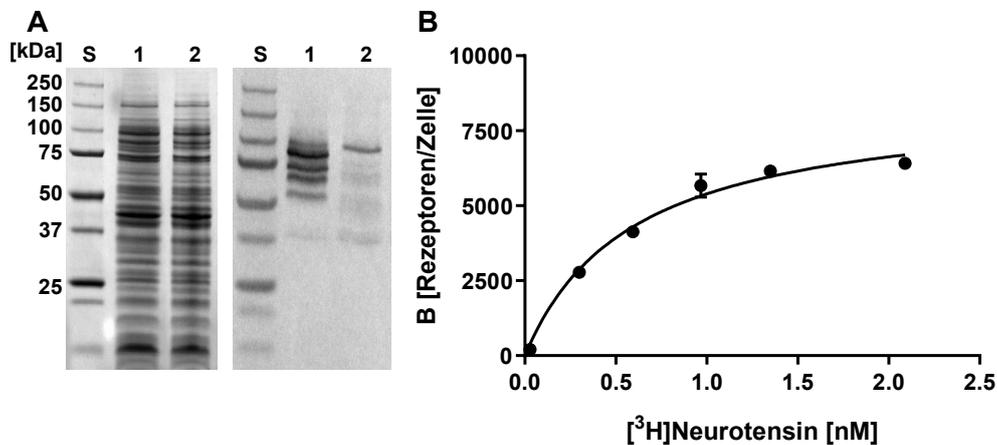


Abb. 56: Expression des NTR1-Rezeptorgens in *E. coli*. Die Expression erfolgte in *E. coli* TOP10 nach Induktion mit 0,5 mM IPTG über Nacht (4.2.6.3) und wurde mittels SDS-PAGE (10 %-Gel) und Western Blot gegen das N-terminale MBP analysiert (A) Bahn 1 *lac*-MBP-NTR1-mCherry, 2 *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry; Molekulargewichtsstandard (S). Die Positivkontrolle für den Western Blot befindet sich im Anhang (Abb. 83, 9.7). (B) Bindung von [³H]Neurotensin an den NTR1-Rezeptor. Gezeigt ist die Messung einer Bindungskurve in Vierfachbestimmung mit MW±SEM (4.2.18).

Im Vergleich zum D_{2wt}-Rezeptor war die Bande des NTR1 jedoch deutlich stärker, was auf eine erhöhte Proteinproduktion hindeutet. Der anschließende Radioligandenbindungstest (4.2.18) bestätigte, dass vom NTR1 mit 8600 Rezeptoren/Zelle ($K_D = 0,59$ nM) deutlich mehr synthetisiert worden ist als vom D_{2wt}-Rezeptor (258 ± 8 Rezeptoren/Zelle) (Abb. 56, B).

5.4.1.3 Erster Schritt zur Reinigung des D_{2S}-Rezeptors - Membranhomogenat

Nach erfolgreicher heterologer Expression stellt die Isolierung der Membranen aus den Bakterienzellen den ersten Schritt für die Reinigung des Rezeptors dar und ist hier anhand des Konstruktes *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry beispielhaft gezeigt (Abb. 57).

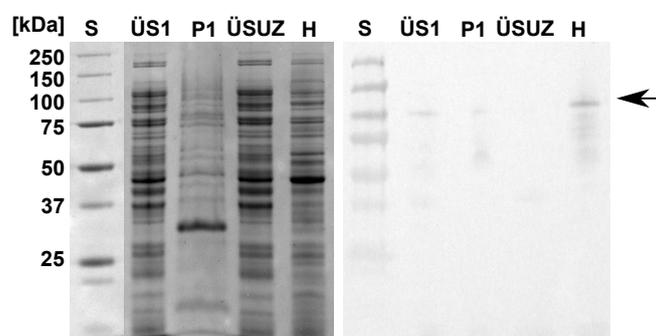


Abb. 57: Herstellung von Membranhomogenat aus *E. coli*. SDS-PAGE (10 %-Gel) und Western Blot gegen das N-terminale MBP nach Herstellung von Membranhomogenat aus *E. coli*, hier beispielhaft für die Verwendung des Konstruktes *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry gezeigt. Proben: Überstand 1 (ÜS1), Pellet 1 (P1), Überstand Ultrazentrifugation (ÜSUZ), Homogenat (H); Molekulargewichtsstandard (S). Die Positivkontrolle für den Western Blot befindet sich im Anhang (Abb. 83, 9.7). Der Pfeil zeigt die Bande auf entsprechender Laufhöhe an.

Die Zellen wurden nach der Expression geerntet und anschließend mit dem Mikrofluidizer aufgeschlossen (4.2.8). Nach der ersten Zentrifugation befand sich ein Großteil des Rezeptors im Überstand (ÜS1), während ein sehr geringer Anteil im Pellet zu finden war (P1). Mit der anschließenden Ultrazentrifugation konnten die Membranen, die den Rezeptor enthielten, sedimentiert und im entsprechenden Puffer resuspendiert werden (H). Die Analyse zeigte, dass die Membranen, die den exprimierten Rezeptor enthielten, deutlich angereichert werden konnten.

Für alle unter den Kapiteln 5.4.1.1 und 5.4.1.2 generierten Konstrukte wurde Membranhomogenat aus den exprimierenden Zellen hergestellt. Anschließend wurden die Homogenate mittels Radioligandenbindungstest untersucht und K_D - sowie B_{MAX} -Werte bestimmt. Dies zeigt, ob der Rezeptor nach dem ersten Reinigungsschritt noch gefaltet ist und Ligand binden kann. Außerdem kann der Rezeptoranteil an der Proteingesamtmenge in den Membranen abgeschätzt werden.

Die Analyse der Homogenate für den D_{2Swt} -Rezeptor mit den unterschiedlichen C-terminalen Fusionsproteinen (Konstrukte 1-4) anhand des Western Blots gegen das N-terminale MBP (4.2.15) zeigte, dass der erste Reinigungsschritt erfolgreich war und der Rezeptor nicht abgebaut wurde (Abb. 58, A).

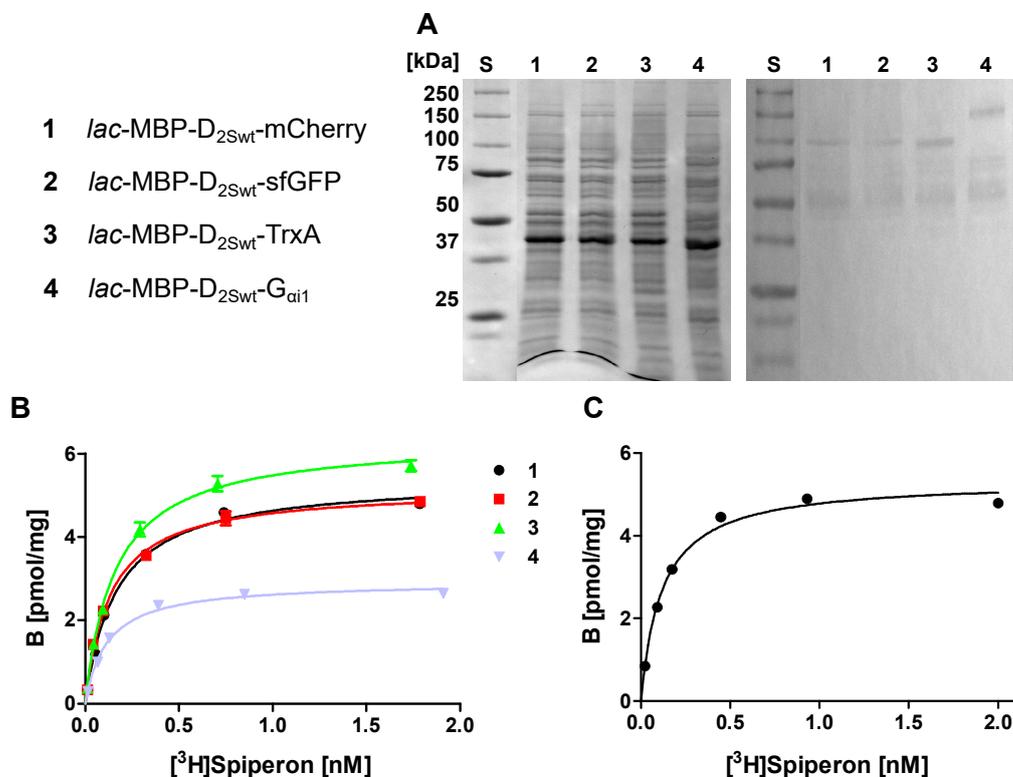


Abb. 58: Membranhomogenat der D_{2Swt} -Konstrukte mit verschiedenen C-terminalen Fusionsproteinen. Für die Herstellung des Membranhomogenats wurden die Zellen verwendet, mit denen zuvor die Ganzzellanalyse durchgeführt worden ist (5.4.1.1). **(A)** SDS-PAGE (10 %-Gel) und Western Blot gegen das N-terminale MBP; Molekulargewichtsstandard (S). Die Positivkontrolle für den Western Blot befindet sich im Anhang (Abb. 83, 9.7). **(B)** Bindung von [³H]Spiperon an den Rezeptor für die Konstrukte 1-4. **(C)** Bindung von [³H]Spiperon an den D_{2S} -Rezeptor, der in HEK-Zellen hergestellt wurde. Die Messungen wurden einmal in Vierfachbestimmung durchgeführt (MW±SEM) (4.2.18).

Der Radioligandenbindungstest (4.2.18) ergab für die Konstrukte 1-4 ähnliche K_D -Werte (1-4: 0,17 nM, 0,13 nM, 0,16 nM, 0,12 nM) (Abb. 58, B). Die B_{MAX} -Werte lagen bei 5,4 pmol/mg, 5,2 pmol/mg, 6,4 pmol/mg und 3 pmol/mg (je 1-4). Im Vergleich wurde die Bindung von [3 H]Spiperon an Rezeptor untersucht, der in HEK-Zellen hergestellt wurde (Abb. 58, C). Der K_D -Wert lag bei 0,12 nM, der B_{MAX} -Wert bei 5,3 pmol/mg.

Der Western Blot gegen das N-terminale MBP (4.2.15) zeigte für die Rezeptorvarianten mit den ausgetauschten Aminosäuren, dass der Rezeptor während des ersten Schrittes der Reinigung ebenfalls nicht abgebaut wurde (Abb. 59, A). Lediglich für das Konstrukt mit dem *tac*-Promotor konnte viel Abbau beobachtet werden, wie er bei der Analyse mit den ganzen Zellen auch zu sehen war.

Im Radioligandenbindungstest (4.2.18) ergaben sich für die Konstrukte 1 und 4 sehr niedrige K_D -Werte (0,17 nM bzw. 0,22 nM), die mit den Werten aus den Ganzzellexperimenten vergleichbar sind (Abb. 59, B). Lediglich für das Konstrukt mit dem *tac*-Promotor (5) wurde ein höherer K_D -Wert (0,82 nM) bestimmt. Die B_{MAX} -Werte für die Konstrukte 1, 4 und 5 lagen bei jeweils 5,4 pmol/mg, 22,6 pmol/mg und 0,6 pmol/mg. Dabei ist zu beachten, dass die Bindungskurve für Konstrukt 4 die Sättigung nicht ganz erreicht und der B_{MAX} -Wert daher vermutlich niedriger war. Wie für die vorgegangenen Experimente deuten die Ergebnisse darauf hin, dass ein stärkerer Promotor (*tac*) den gegenteiligen Effekt hat und die Synthese von korrekt gefalteten Rezeptoren verringert ist.

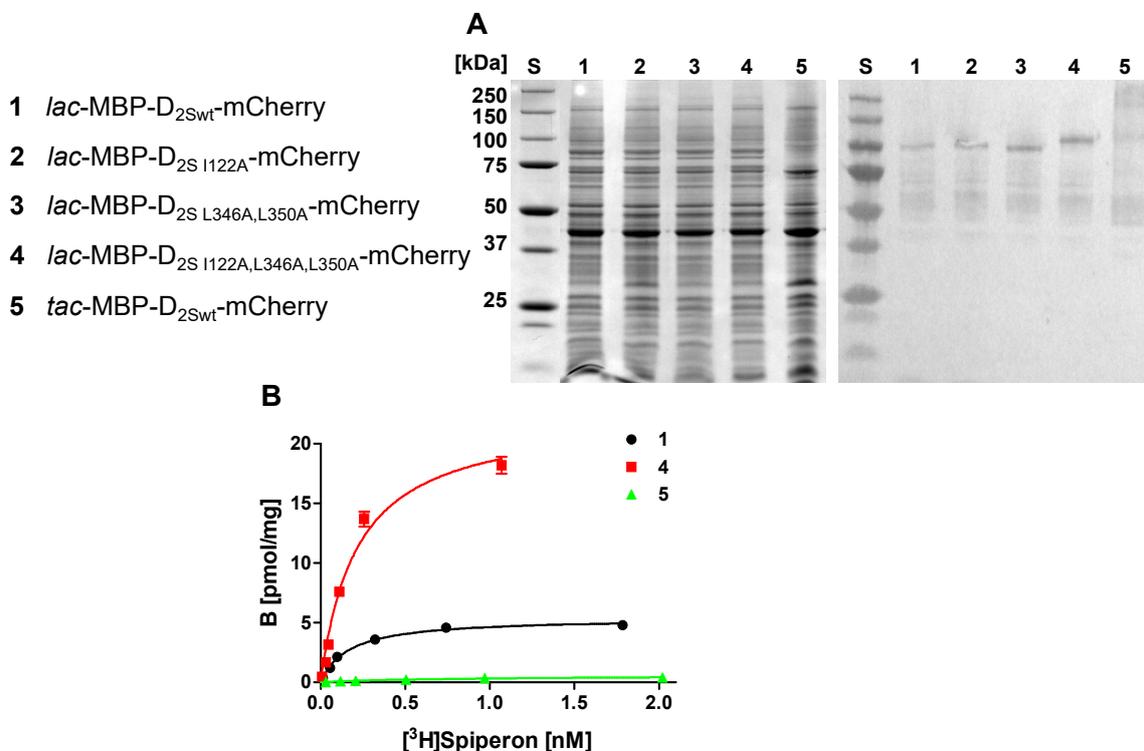


Abb. 59: Membranhomogenat der D_{2S}-Rezeptorkonstrukte mit *lac*- oder *tac*-Promotor. Für die Herstellung des Membranhomogenats wurden die Zellen verwendet, mit denen zuvor die Ganzzellanalyse durchgeführt worden ist (5.4.1.2). **(A)** SDS-PAGE (10 %-Gel) und Western Blot gegen das N-terminale MBP; Molekulargewichtsstandard (S). Die Positivkontrolle für den Western Blot befindet sich im Anhang (Abb. 83, 9.7). **(B)** Bindung von [3 H]Spiperon an den Rezeptor für die Konstrukte 1, 4 und 5. Die Messungen wurden einmal in Vierfachbestimmung durchgeführt (MW \pm SEM) (4.2.18).

5.4.2 Optimierung der Expressionsdauer des D_{2S}-Rezeptorgens

Nachdem die maximale Rezeptordichte des D_{2Swt}-Rezeptors in *E. coli* im Vergleich zur Arbeit von Vanhauwe *et al.* von $1 \pm 0,2$ pmol/mg auf 5,4 pmol/mg erfolgreich gesteigert werden konnte, wurde abschließend der Einfluss der Expressionsdauer untersucht. Vanhauwe *et al.* exprimierte die Gene vergleichsweise kurz (4h) (Vanhauwe *et al.*, 2000). Daher wurde getestet, ob die Expression über Nacht die optimale Expressionsdauer ist oder die Expression ggf. schon zu einem früheren Zeitpunkt beendet werden kann. Für die Untersuchung wurden Konstrukte mit mCherry als C-terminalem Fusionsprotein gewählt, da diese im späteren Verlauf der Arbeit für die Generierung und Expression neuer Rezeptorvarianten verwendet werden sollen (5.4.5).

Die Plasmide mit den Konstrukten *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry (A), *lac*-MBP-D_{2S} I122A,L346A,L350A-mCherry (B), *tac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry (C) wurden in *E. coli* TOP10 eingebracht und exprimiert (4.2.6.3). Dabei wurden zunächst die Auswirkungen vor und nach Induktion der Genexpression auf das Wachstum der Bakterien untersucht. Als Kontrolle wurde ein Konstrukt ohne D_{2Swt}-Rezeptorgen (*lac*-MBP-mCherry) verwendet. Für die Wachstumskurven wurden Kulturen auf eine OD₆₀₀ von ~0,1 angeimpft und bei 37 °C geschüttelt, bis nach ca. 1,5h eine OD₆₀₀ von ~0,5 erreicht war. Dann wurde die Genexpression für die Kulturen „+IPTG“ mit 0,5 mM IPTG induziert und anschließend alle Kulturen bei 20 °C weitergeschüttelt.

Die Wachstumskurven zeigten, dass die Induktion in Zellen mit dem Kontrollplasmid kaum Auswirkungen auf das Wachstum hatte (Abb. 60, A, rot). Das Wachstum der Zellen, die die Konstrukte A, B und C enthielten, war bereits vor Induktion niedriger als die Kontrolle ohne Induktion und wurde nach Induktion für die Konstrukte A und B nochmals leicht reduziert (Abb. 60, A schwarz, B). Dahingegen stellten die Zellen, die das Konstrukt C enthielten, das Wachstum nach der Induktion ein oder starben sogar ab (Abb. 60, C). Die Genexpression unter Kontrolle des *tac*-Promotors kostet die Zellen demnach sehr viel mehr Energie und Ressourcen im Vergleich zur Expression unter Kontrolle des *lac*-Promotors.

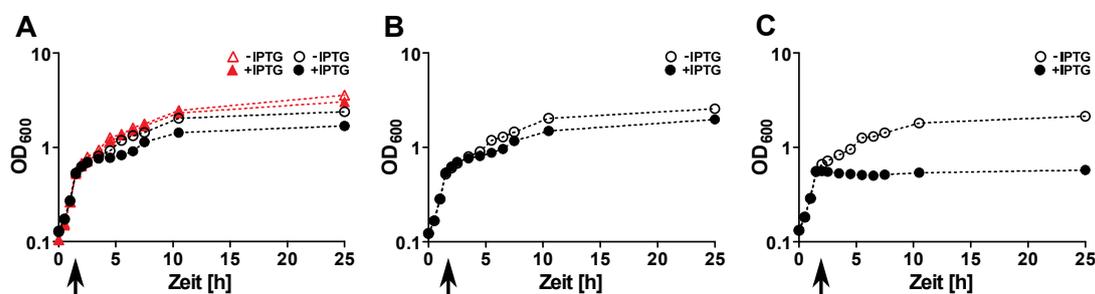


Abb. 60: Wachstumskurven für die Konstrukte mit den D₂-Rezeptorvarianten und dem *tac*-Promotor. In halblogarithmischer Auftragung sind die OD₆₀₀-Werte in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Für die Messreihe ohne Zugabe von IPTG wurden die nicht-ausgefüllten Symbole verwendet, für die Messreihe mit Zugabe von 0,5mM IPTG die ausgefüllten Symbole. (A) *lac*-MBP-mCherry (Kontrolle, rot), *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry (schwarz) (B) *lac*-MBP-D_{2S} I122A,L346A,L350A-mCherry (C) *tac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Induktion.

Die Expression wurde zu den Zeitpunkten 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h und über Nacht (ÜN) analysiert (Abb. 61), wobei die Ergebnisse für die SDS-PAGE im Anhang (Abb. 84, 9.7) zu finden sind.

Die Western Blots gegen das N-terminale MBP für die Konstrukte A und B zeigten bereits nach einer Stunde ein Genprodukt auf gewünschter Höhe (~120 kDa), welches im Verlauf der Expression weitergebildet, aber auch immer wieder abgebaut wurde. Dadurch entstand eine Bande bei ~100 kDa, die schon zuvor nach der Expression über Nacht beobachtet werden konnte (5.4.1.2). Die obere Bande könnte das Fusionsprotein vor und die untere Bande das Fusionsprotein nach Abspalten der Signalsequenz des MBPs sein. In den Western Blots gegen das C-terminale mCherry waren die zwei Banden für die Konstrukte A und B hingegen nicht aufgelöst, sondern vermutlich als eine dickere Bande bei ~100 kDa zu erkennen. Sie zeigte eine deutliche Produktzunahme zu Beginn der Expression, die 4-5h nach Induktion der Genexpression wieder weniger wurde.

Für das Konstrukt C konnte im Western Blot gegen das MBP eine Stunde nach Induktion der Genexpression noch eine seichte Bande bei ~100 kDa detektiert werden, jedoch war der Abbau im gesamten Verlauf sehr hoch. Im Western Blot gegen mCherry war für Konstrukt C neben einer dicken Bande bei ~100 kDa ebenfalls viel Abbau zu erkennen.

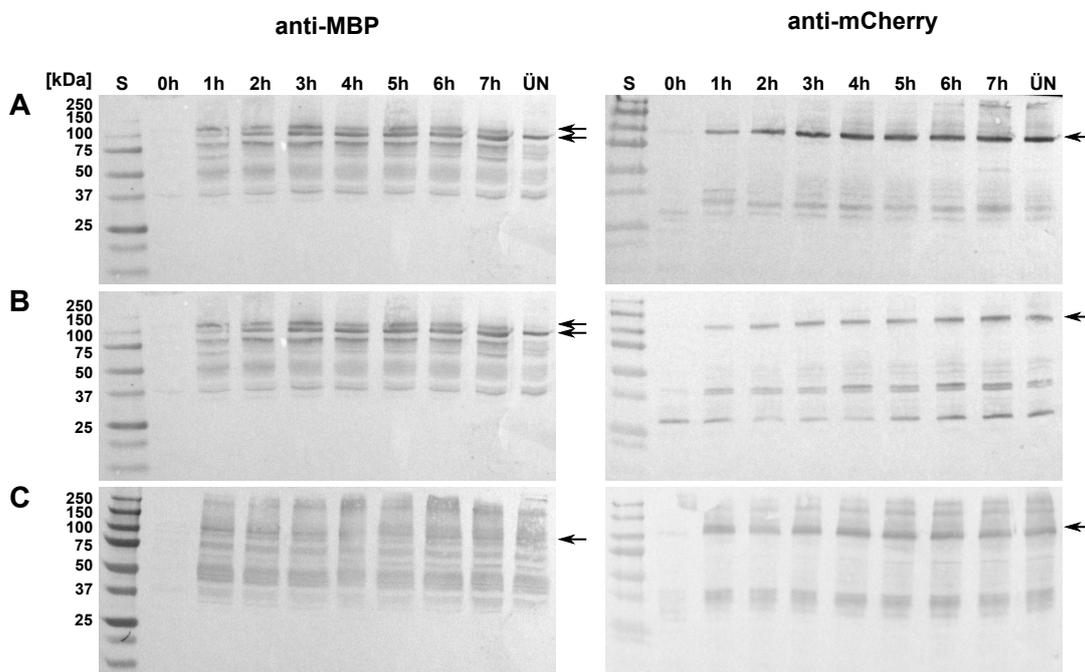


Abb. 61: Western Blot für die Konstrukte mit den D₂-Rezeptorvarianten und dem *tac*-Promotor. Für die Konstrukte *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry (A) *lac*-MBP-D_{2S} I122A,L346A,L350A-mCherry (B) und *tac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry (C) wurden Western Blots gegen die Fusionsproteine MBP und mCherry durchgeführt. Proben: vor Induktion (0h) und nach Induktion mit 0,5 mM IPTG (1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, ÜN); Molekulargewichtsstandard (S). Die Positivkontrollen für die Western Blots befinden sich im Anhang (Abb. 83, 9.7).

Abschließend wurden Radioligandenbindungstests (4.2.18) für ganze Zellen und Membranhomogenat 4h nach Induktion sowie ÜN durchgeführt und miteinander verglichen. Dafür wurden die K_D - und B_{MAX} -Werte für die Konstrukte *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry und

lac-MBPD_{2S}^{I122A,L346A,L350A}-mCherry bestimmt. Die vorgegangenen Experimente für das Konstrukt *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry zeigten, dass eine Expression unter Kontrolle des *lac*-Promotors nicht sinnvoll ist, weshalb dieses Konstrukt nicht weiter untersucht wurde.

Die Expression mit dem Konstrukt *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry nach Induktion für 4h bzw. ÜN resultierte für die Ganzzellmessungen in ähnlichen K_D -Werten (4h: 0,25 nM; ÜN: 0,28 nM) und einem höheren B_{MAX} -Wert für 4h als für die Expression über Nacht (4h: 423 Rezeptoren/Zelle; ÜN: 197 Rezeptoren/Zelle) (Abb. 62, A). Dieser Effekt war ebenso für das Homogenat zu beobachten. Die K_D -Werte waren mit 0,16 nM (4h) und 0,18 nM (ÜN) ähnlich. Dafür lag der B_{MAX} -Wert für 4h mit 8 pmol/mg über dem Wert für ÜN mit 4,8 pmol/mg (Abb. 62, C).

Die Ganzzellmessungen für das Konstrukt *lac*-MBP-D_{2S}^{I122A,L346A,L350A}-mCherry führten zu gleichen K_D -Werten (4h: 0,21 nM; ÜN: 0,21 nM) und wie für den wildtypischen Rezeptor zu einem höheren B_{MAX} -Wert für 4h (792 Rezeptoren/Zelle) als für die Probe ÜN (470 Rezeptoren/Zelle) (Abb. 62, B). Für das Homogenat wurden sowohl ähnliche K_D -Werte (4h: 0,22 nM; ÜN: 0,24 nM), als auch ähnliche B_{MAX} -Werte bestimmt (4h: 20,9 pmol/mg; ÜN: 20,6 pmol/mg) (Abb. 62, D). Insgesamt scheint eine kürzere Expressionsdauer von Vorteil zu sein.

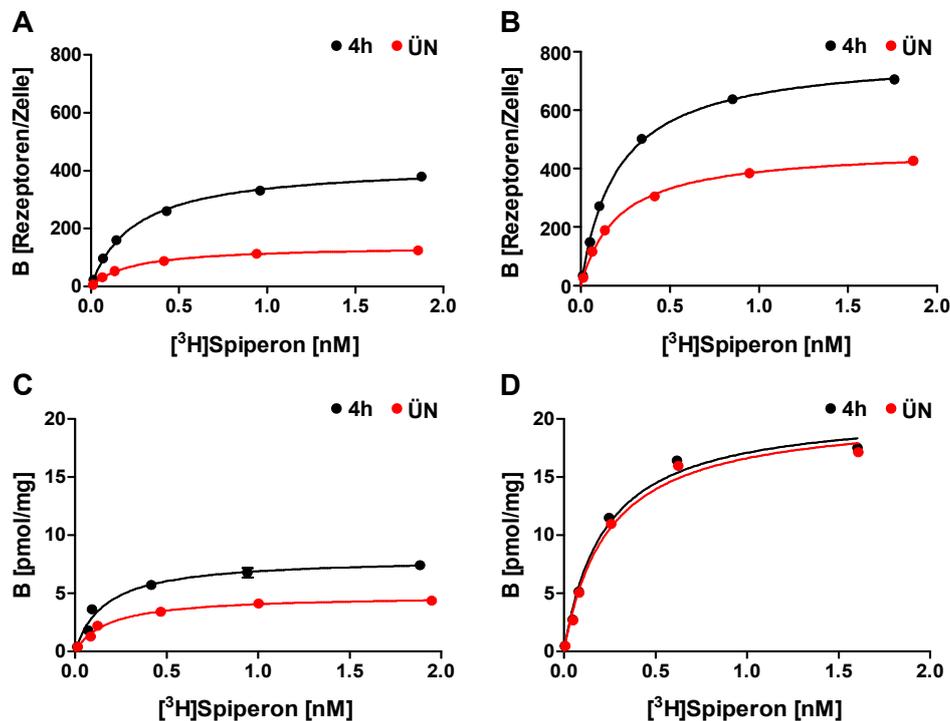


Abb. 62: Radioligandenbindung für die D₂-Rezeptorvarianten nach Expression für 4h und ÜN. Bindung von ³H]Spiperon an den Rezeptor nach Expression für 4h (schwarz) und ÜN (rot). (A) ganze Zellen: *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry (B) ganze Zellen: *lac*-MBP-D_{2S}^{I122A,L346A,L350A}-mCherry (C) Homogenat: *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry (D) Homogenat: *lac*-MBP-D_{2S}^{I122A,L346A,L350A}-mCherry. Die Messungen wurden einmal in Vierfachbestimmung durchgeführt (MW±SEM) (4.2.18).

5.4.3 Expression des D₃-Rezeptorgens in *E. coli*

Wie für den D_{2S}-Rezeptor (5.4.1) sollte auch die initiale Synthese des D₃-Rezeptors in *E. coli* verbessert werden, um im Anschluss die Strategie der gerichteten Evolution als Methode zur Optimierung der Synthese des D₃-Rezeptors etablieren zu können. Da für den D_{2S}-Rezeptor die Konstrukte mit N- und C-terminalem Fusionsprotein am erfolgreichsten waren, wurde das Gen für den wildtypischen D₃-Rezeptor direkt mit Gibson-Assemblierung (4.2.1.5) in die Konstrukte *lac*-MBP-mCherry und *lac*-MBP-sfGFP kloniert (Abb. 63, 1+3). Zusätzlich wurde der thermostabilisierende Aminosäureaustausch L119W, der im Rahmen der Kristallisation des Rezeptors (Chien *et al.*, 2010, PDB: 3PBL) eingeführt wurde (Abb. 63, 2+4), mit Gibson-Assemblierung (4.2.1.5) in den Rezeptor eingebracht. Die verwendeten Oligodesoxynukleotide enthielten die dazu benötigte Mutation.

1	<i>lac</i>	MBP	D ₃ wt	TEV	mCherry	Strep
2	<i>lac</i>	MBP	D ₃ L119W	TEV	mCherry	Strep
3	<i>lac</i>	MBP	D ₃ wt	TEV	sfGFP	Strep
4	<i>lac</i>	MBP	D ₃ L119W	TEV	sfGFP	Strep

Abb. 63: Konstrukte mit D₃-Rezeptorvarianten für die Expression in *E. coli*. Alle Zielgene stehen unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Alle Konstrukte beinhalten vom N- zum C-Terminus das Fusionsprotein MBP, den D₃-Rezeptor der entsprechenden Variante, eine TEV-Schnittstelle, das Fusionsprotein mCherry bzw. sfGFP und einen Strep-Anhang. Die Gen- und Aminosäuresequenzen für den wildtypischen Rezeptor und die Fusionsproteine befinden sich im Anhang (9.2).

E. coli TOP10 wurden mit den vier generierten Plasmiden transformiert und die Genexpression zunächst über Nacht induziert (4.2.6.3). Im Anschluss wurden die Zellen aufgeschlossen, um Membranhomogenat herzustellen (4.2.8). Das erwartete Molekulargewicht liegt für alle erwarteten Produkte bei ~117 kDa. Die Analyse der Zellen und des Membranhomogenats anhand von SDS-PAGE (4.2.14) und Western Blot gegen das N-terminale MBP (4.2.15) zeigte für alle untersuchten Proben eine Bande unterhalb von ~100 kDa, was nicht genau der erwarteten Höhe entspricht (Abb. 64, A+B). Dieses Laufverhalten war bereits für den D_{2S}-Rezeptor zu beobachten und ist auf das abnormale Laufverhalten von Membranproteinen in der SDS-PAGE und das Abspalten der Signalsequenz des MBP zurückzuführen (Fikes *et al.*, 1990; Rath *et al.*, 2009).

Für die Konstrukte, die das C-terminale mCherry beinhalten, wurde zunächst ein Radioligandenbindungstest (4.2.18) mit ganzen Zellen durchgeführt (Abb. 64, C+D). Der K_D -Wert für die Variante L119W war mit $1,02 \pm 0,14$ nM tendenziell größer als für den wildtypischen Rezeptor mit $0,51 \pm 0,24$ nM. Dafür war der B_{MAX} -Wert für die L119W-Variante mit 70 ± 8 Rezeptoren/Zelle tendenziell höher als der für den wildtypischen Rezeptor mit 45 ± 3 Rezeptoren/Zelle. Insgesamt war die Synthese des D₃-Rezeptors jedoch deutlich niedriger als die des D_{2S}-Rezeptors (256 ± 7 Rezeptoren/Zelle für den D_{2S}wt).

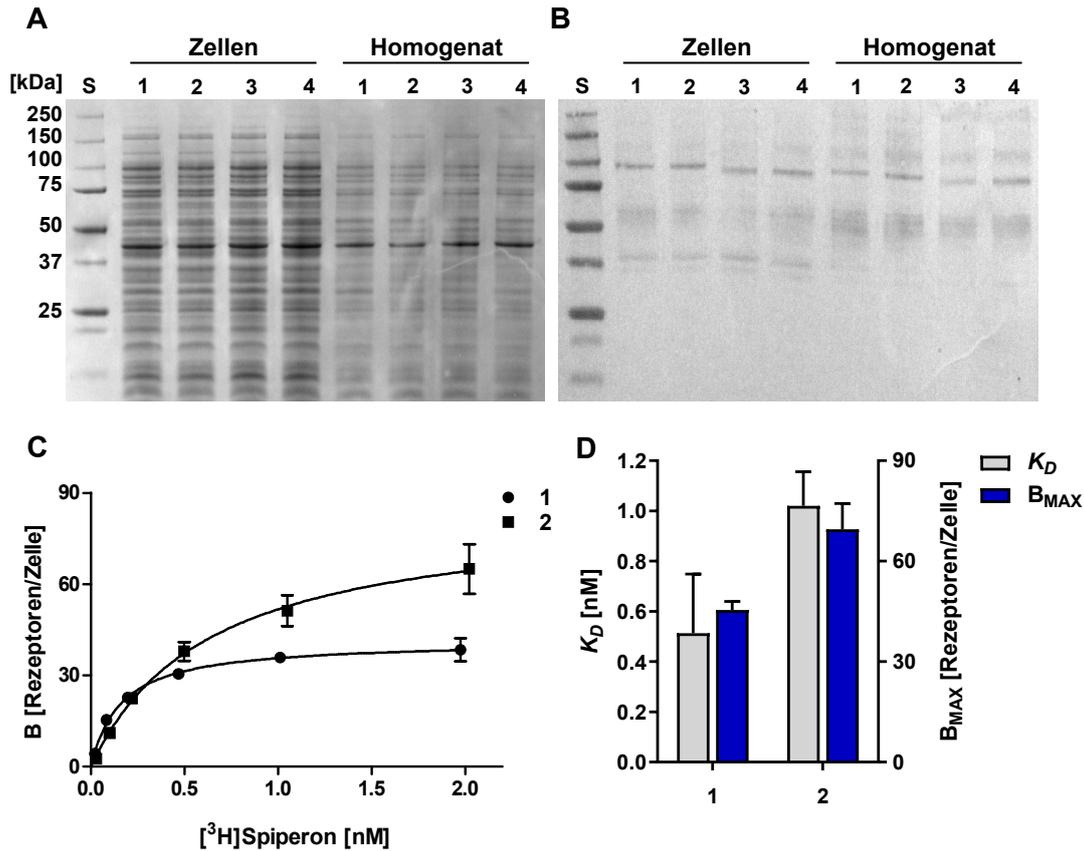


Abb. 64: Expression des D₃-Rezeptorgens in *E. coli*. Die Expression erfolgte in *E. coli* TOP10 nach Induktion mit 0,5 mM IPTG über Nacht und wurde mittels SDS-PAGE (10 %-Gel) (**A**) und Western Blot gegen das N-terminale MBP (**B**) für ganze Zellen und das entsprechende Homogenat analysiert. Bahn 1 *lac*-MBP-D₃wt-mCherry, 2 *lac*-MBP-D₃L119W-mCherry, 3 *lac*-MBP-D₃wt-sfGFP, 4 *lac*-MBP-D₃L119W-sfGFP; Molekulargewichtsstandard (S). Die Positivkontrolle für den Western Blot befindet sich im Anhang (Abb., 9.7). (**C**) Bindung von [³H]Spiperon an den Rezeptor für die Konstrukte 1 und 2. Die Bindungskurve einer Messung ist für die beiden Konstrukte beispielhaft gezeigt (**D**) MW±SEM der K_D- und B_{MAX}-Werte aus vier zeitlich unabhängigen Messungen (4.2.18). Die Einzelwerte aller Messungen befinden sich im Anhang (Tab. 30, 9.7). Für alle Messungen wurde die gleiche Charge an exprimierenden Zellen verwendet.

Der Radioligandenbindungstest (4.2.18) wurde ebenfalls für das Membranhomogenat aus Zellen mit den exprimierten mCherry-Konstrukten durchgeführt und die Bindungsparameter nach dem ersten Reinigungsschritt bestimmt (Abb. 65).

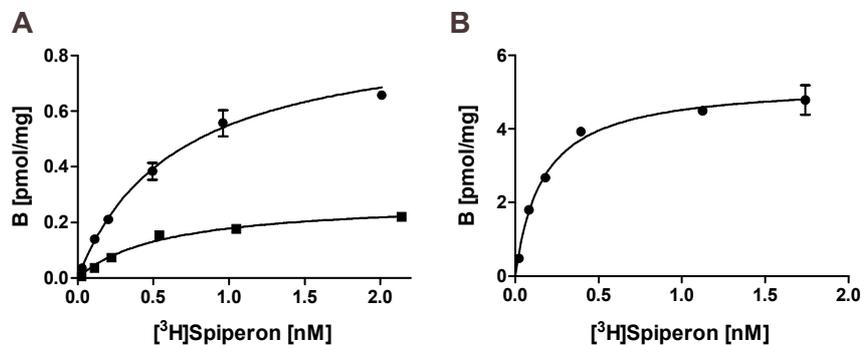


Abb. 65: Radioligandenbindung für die Homogenate der D₃-Rezeptorvarianten. Bindung von [³H]Spiperon an den Rezeptor für die Konstrukte (**A**) *lac*-MBP-D₃wt-mCherry (●) und *lac*-MBP-D₃L119W-mCherry (■). (**B**) Bindung von [³H]Spiperon an D₃wt-Rezeptor, der in HEK-Zellen hergestellt wurde. Die Messungen wurden einmal in Vierfachbestimmung durchgeführt (MW±SEM) (4.2.18).

Der K_D - und B_{MAX} -Wert für das Konstrukt *lac*-MBP- D_{3wt} -mCherry lagen bei 0,65 nM bzw. 0,9 pmol/mg. Für das Konstrukt *lac*-MBP- $D_{3 L119W}$ -mCherry lagen der K_D - und B_{MAX} -Wert bei 0,58 nM bzw. 0,3 pmol/mg. Damit scheint die Expression für den wildtypischen Rezeptor im Vergleich zur Variante mit dem Austausch L119W doch besser zu sein, als anhand der Ganzzellexperimente zunächst angenommen. Um jedoch eine statistische Aussage zu treffen, muss die Expression und die anschließende Analyse mit dem Radioligandenbindungstest öfter wiederholt werden. Zum Vergleich wurde der K_D - und B_{MAX} -Wert für den D_{3wt} -Rezeptor bestimmt, der in HEK-Zellen hergestellt wurde (0,17 nM bzw. 5,2 pmol/mg).

5.4.4 Optimierung der Expressionsdauer des D_3 -Rezeptorgens

Wie für den D_{2S} -Rezeptor (5.4.2), wurde auch für den D_3 -Rezeptor untersucht, ob die Expression über Nacht die optimale Expressionsdauer des Gens ist. Da die Synthese des D_3 -Rezeptors in *E. coli* trotz der großen Homologie in den TMs (78 % der Aminosäuresequenz) deutlich geringer war als die des D_{2S} -Rezeptors, wurde zusätzlich untersucht, ob für D_{3wt} -Rezeptor eine höhere Proteinsynthese bewirken werden kann, wenn das C-terminale Fusionsprotein ausgetauscht wird. Dazu wurde das Gen für das C-terminale Fusionsprotein mCherry gegen die Gene für TrxA und $G_{\alpha 1}$ mit Gibson-Assemblierung (4.2.1.5) ersetzt (Abb. 66, 2+3).

1	<i>lac</i>	MBP	D_{3wt}	TEV	mCherry	Strep
2	<i>lac</i>	MBP	D_{3wt}	TEV	TrxA	Strep
3	<i>lac</i>	MBP	D_{3wt}	TEV	$G_{\alpha 1}$	Strep

Abb. 66: Konstrukte für den D_{3wt} -Rezeptor mit verschiedenen C-terminalen Fusionsproteinen. Alle Zielgene stehen unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Alle Konstrukte beinhalten vom N- zum C-Terminus das Fusionsprotein MBP, den D_{3wt} -Rezeptor, eine TEV-Schnittstelle und einen Strep-Anhang. Konstrukt 1 enthält am C-Terminus das Fusionsprotein mCherry, Konstrukt 2 das TrxA und Konstrukt 3 das $G_{\alpha 1}$. Die Gen- und Aminosäuresequenzen für Rezeptor und die Fusionsproteine befinden sich im Anhang (9.2).

Die drei Plasmide wurden jeweils in *E. coli* TOP10 eingebracht und exprimiert (4.2.6.3). Zunächst wurden, wie für die Expression des D_2 -Rezeptorgens (5.4.2), die Auswirkungen auf das Wachstum der Bakterienzellen ohne und mit Induktion der Genexpression durch 0,5 mM IPTG untersucht. Als Kontrolle diente wieder ein Konstrukt ohne Rezeptorgen (*lac*-MBP-mCherry) (Abb. 67, A rot). Das Wachstum der Zellen war bereits vor Induktion für alle drei Konstrukte niedriger als für die Kontrolle, was auf eine geringe Baselexpression hindeuten könnte (Abb. 67, A schwarz, B, C). Nach Induktion der Genexpression stellten die Zellen das Wachstum ein, unabhängig vom verwendeten Konstrukt. Dies deutet darauf hin, dass die Expression des D_3 -Rezeptorgens für die Zellen eine größere Herausforderung darstellt als für das D_2 -Rezeptorgen.

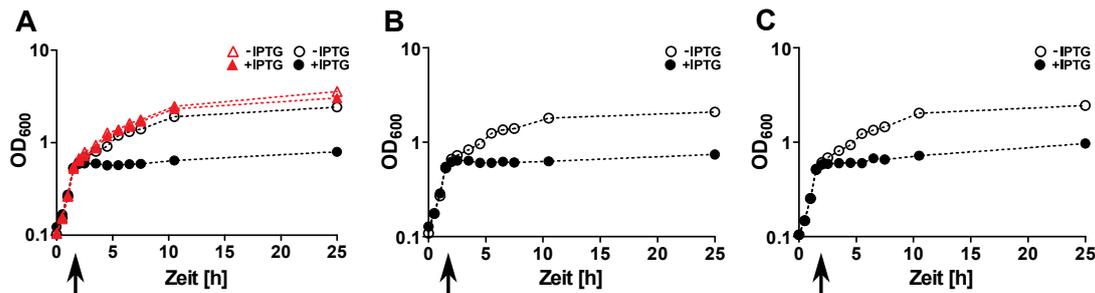


Abb. 67: Wachstumskurven für die Konstrukte mit dem D_{3wt}-Rezeptor. In halblogarithmischer Auftragung sind die OD₆₀₀-Werte in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Für die Messreihe ohne Zugabe von IPTG wurden die nicht-ausgefüllten Symbole verwendet, für die Messreihe mit Zugabe von 0,5 mM IPTG die ausgefüllten Symbole. **(A)** *lac*-MBP-mCherry (Kontrolle, rot), *lac*-MBP-D_{3wt}-mCherry (schwarz) **(B)** *lac*-MBP-D_{3wt}-TrxA **(C)** *lac*-MBP-D_{3wt}-G_{ai1}. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Induktion.

Mithilfe von Western Blots (4.2.15) wurde die Expression zu den Zeitpunkten 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h und über Nacht (ÜN) genauer untersucht (Abb. 68). Die Ergebnisse für die SDS-PAGE sind im Anhang (Abb. 84, 9.7) zu finden.

Das erwartete Molekulargewicht liegt für die drei Konstrukte (1-3) bei je 117 kDa, 102 kDa und 131 kDa, wobei die Banden in den Analysen voraussichtlich unterhalb der erwarteten Höhe liegen. Der Western Blot gegen MBP für das Konstrukt *lac*-MBP-D_{3wt}-mCherry zeigte bereits zum Zeitpunkt kurz vor der Induktion (Abb. 68, A, 0h) zwei sehr schwache Banden auf erwarteter Höhe (~ 100 kDa). Dies könnte auf eine geringe Basalexpression hindeuten. Die Bande knapp unterhalb von 100 kDa war dabei deutlich stärker. Die Bande knapp oberhalb von 100 kDa war nach Expression über Nacht (ÜN) nicht mehr vorhanden. Die obere Bande ist vermutlich das neu hergestellte Protein vor dem Abspalten der Signalsequenz des MBPs. Nach der Abspaltung läuft das Protein in der SDS-PAGE dementsprechend niedriger (untere Bande).

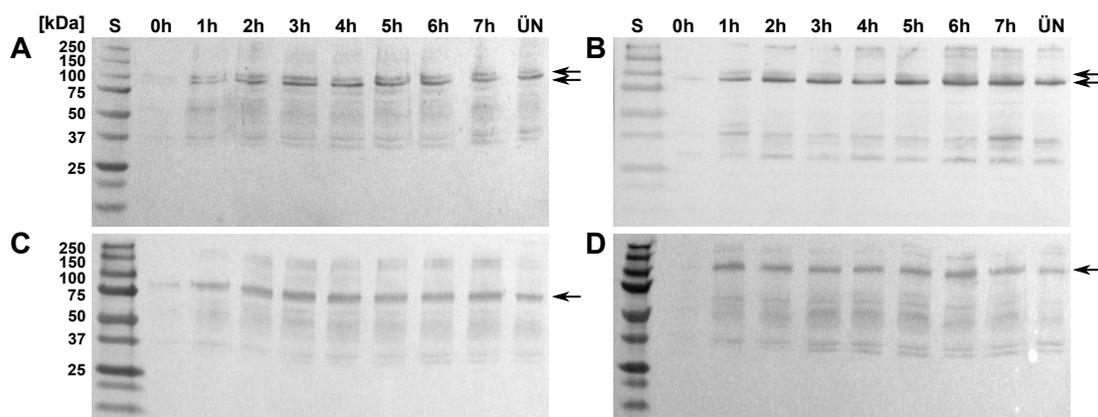


Abb. 68: Western Blot für die Konstrukte mit dem D_{3wt}-Rezeptor. Für das Konstrukt *lac*-MBP-D_{3wt}-mCherry wurde der Western Blot gegen die Fusionsproteine MBP **(A)** und mCherry **(B)** durchgeführt. Für die Konstrukte *lac*-MBP-D_{3wt}-TrxA **(C)** und *lac*-MBP-D_{3wt}-G_{ai1} **(D)** wurde der Western Blot gegen das Fusionsprotein MBP durchgeführt. Proben: vor Induktion (0h) und nach Induktion (1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, ÜN); Molekulargewichtsstandard (S). Die Positivkontrollen für die Western Blots befinden sich im Anhang (Abb. 83, 9.7).

Im Western Blot gegen mCherry war die Bande oberhalb von 100 kDa in den ersten Stunden nach Induktion der Genexpression ebenfalls zu sehen, jedoch schwächer ausgeprägt

(Abb. 68, B, 0h). Außerdem war im Western Blot gegen mCherry gut zu erkennen, dass die Stärke der Bande knapp unter 100 kDa für 5-6h nach Induktion immer mehr zunahm und nach Expression über Nacht wieder abgenommen hat.

Der Western Blot gegen das N-terminale MBP für das Konstrukt *lac*-MBP-D_{3wt}-TrxA zeigte vor Induktion (0h) ebenfalls eine schwache Bande bei erwarteter Höhe, was auf Basalexpression hindeutet (Abb. 68, C). Die Stärke der Bande nahm im Verlauf der Expression bis ca. 3h nach Induktion zu, blieb dann in etwa konstant (4-7h) und war nach Expression über Nacht (ÜN) wieder deutlich schwächer.

Ähnliches konnte für das Konstrukt *lac*-MBP-D_{3wt}-G_{ai1} im Western Blot gegen MBP festgestellt werden (Abb. 68, D). Zwar war vor Induktion der Genexpression (0h) noch keine Bande zu sehen, so war jedoch bereits eine Stunde nach Induktion (1h) eine starke Bande auf erwarteter Höhe zu erkennen, die für fünf weitere Stunden (1-6h) konstant stark blieb. Danach nahm die Stärke der Bande wieder ab (7h) und war nach Expression über Nacht deutlich schwächer.

Wie für die D₂-Rezeptorvarianten wurden die K_D - und B_{MAX} -Werte für die Konstrukte *lac*-MBP-D_{3wt}-mCherry, *lac*-MBP-D_{3wt}-TrxA und *lac*-MBP-D_{3wt}-G_{ai1} nach Induktion im Vergleich 4h zu ÜN bestimmt, indem Radioligandenbindungstests (4.2.18) mit ganzen Zellen und Membranhomogenat durchgeführt wurden (Abb. 69).

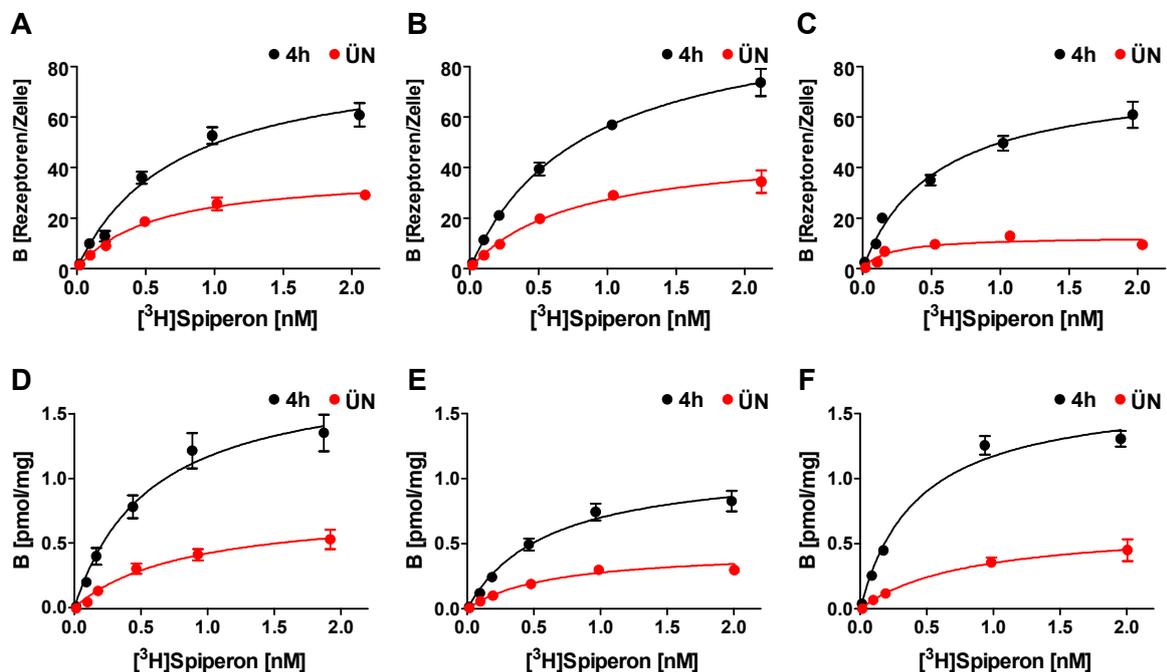


Abb. 69: Radioligandenbindung für den D_{3wt}-Rezeptor nach Induktion für 4h und ÜN. Bindung von [3H]Spiperon an den Rezeptor 4h nach Induktion (schwarz) und ÜN (rot). (A) ganze Zellen: *lac*-MBP-D_{3wt}-mCherry (B) ganze Zellen: *lac*-MBP-D_{3wt}-TrxA (C) ganze Zellen: *lac*-MBP-D_{3wt}-G_{ai1} (D) Homogenat: *lac*-MBP-D_{3wt}-mCherry (E) Homogenat: *lac*-MBP-D_{3wt}-TrxA (F) Homogenat: *lac*-MBP-D_{3wt}-G_{ai1}. Die Messungen wurden einmal in Vierfachbestimmung durchgeführt (MW±SEM) (4.2.18).

Die K_D - und B_{MAX} -Werte für die einzelnen Konstrukte sind in Tab. 21 zu sehen. Dabei waren die B_{MAX} -Werte für alle drei Konstrukte sowohl für ganze Zellen, als auch die Homogenate nach Expression für 4h höher als für die Expression über Nacht. Die Änderung des C-terminalen Fusionsproteins hatte auf die Expression der D_{3wt} -Rezeptorgens keinen aussagekräftigen Einfluss.

Tab. 21: K_D - und B_{MAX} -Werte für den D_{3wt} -Rezeptor nach Induktion für 4h und ÜN.

	Zellen				Homogenate			
	K_D [nM]		B_{MAX} [Rezeptoren/Zelle]		K_D [nM]		B_{MAX} [pmol/mg]	
	4h	ÜN	4h	ÜN	4h	ÜN	4h	ÜN
<i>lac</i> -MBP- D_{3wt} -mCherry	0,73	0,56	86	38	0,57	0,84	1,83	0,77
<i>lac</i> -MBP- D_{3wt} -TrxA	0,81	0,76	102	48	0,6	0,63	1,12	0,45
<i>lac</i> -MBP- D_{3wt} -G _{ai} 1	0,53	0,2	76	13	0,43	0,82	1,68	0,64

Zusammengefasst lag die Synthese des D_2 -Rezeptors in *E. coli* deutlich über der Synthese des D_3 -Rezeptors. Im Vergleich zur Arbeit von Vanhauwe *et al.* hat die Fusion eines Proteins an den C-Terminus des D_{3wt} -Rezeptors, die Synthese des Rezeptors sogar von ~350 auf ~100 Rezeptoren/Zelle erniedrigt (Vanhauwe *et al.*, 2000). Dennoch ist die Fusion eines C-terminalen Proteins, wie beispielsweise mCherry, sinnvoll, da dieses während der Etablierung der Strategie zur Optimierung der Proteinsynthese als Reporterprotein dienen kann.

5.4.5 Etablierung eines Systems zur Optimierung der Proteinsynthese

Insgesamt zeigten die vorangegangenen Ergebnisse der Expression in Insektenzellen, dass der wildtypische D_3 -Rezeptor nicht gereinigt werden kann (5.1.2). Daher müssen Modifikationen eingeführt werden, um die Thermostabilität und die Stabilität des Rezeptors in Detergens zu erhöhen sowie die Angriffsfläche für Proteasen am Rezeptor zu minimieren. Geringfügige Modifikationen führten jedoch bereits zum Verlust der Funktionalität des D_3 -Rezeptors, was im Rahmen der zellfreien Expression gezeigt wurde (5.3.3.2). Das Testen von einzelnen Konstrukten ist dabei nicht zielführend und außerdem sehr aufwendig, weshalb ein Expressionssystem in einem leicht handhabbaren Organismus wie *E. coli* und Methoden im Hochdurchsatz-Verfahren besser geeignet sind.

Im ersten Schritt auf der Suche nach geeigneten Modifikationen ist es sinnvoll, nach Rezeptorvarianten zu suchen, die mit einer höheren Rezeptordichte hergestellt werden

können, denn Aminosäuresubstitutionen, die zu einer gesteigerten Synthese führen, können auch zu einer höheren Thermostabilität des Rezeptors führen (Sarkar *et al.*, 2008).

Die heterologe Expression der Gene für die humanen Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ in *E. coli* konnte bereits erfolgreich gezeigt werden (5.4.1, 5.4.3). Die Substitution dreier Aminosäuren im D_{2S}-Rezeptor gab erste Hinweise, dass die Synthese des Rezeptors durch den Austausch von Aminosäuren gut gesteigert werden kann (Abb. 50; ~3fache Steigerung). Im Vergleich wurde eine Variante des NTR1 hergestellt (Abb. 56), auf welchen eine Optimierungsstrategie mithilfe von gerichteter Evolution angewendet wurde. Die Rezeptordichte lag im Vergleich zum D_{2Swt}-Rezeptor ~33fach höher, was zeigt, wie sinnvoll die Etablierung dieser Strategie für die beiden Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ ist. Im Folgenden wurde daher die Strategie mithilfe der gerichteten Evolution (3.4) zur Optimierung der Synthese in *E. coli* für die Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ implementiert.

5.4.5.1 Generierung einer Mutanten-Bibliothek

Im ersten Schritt wurde eine Bibliothek aus mutierten Rezeptorgen (Rezeptorvarianten) erstellt. Die Mutationen wurden mittels *error-prone* PCR unter Verwendung des GeneMorph II Random Mutagenesis Kit in das Rezeptorgen eingefügt (4.2.2.1). Dabei bestimmt die eingesetzte Menge an Matrizen-DNA und die Anzahl der Zyklen die Mutationsrate. Von Schlinkmann *et al.* (Schlinkmann & Plückthun, 2013) wurden 10 ng Matrizen-DNA und 30 Zyklen gewählt, um eine niedrige Rate von 1-5 substituierten Aminosäuren zu erhalten. Die Mutationsrate (Mutationen/kb) dürfte dementsprechend höher liegen, da nicht jede Mutation zu einem Austausch der Aminosäure führt. Das Kit hingegen gibt für eine Mutationsrate von 0-4,5 Mutationen/kb vor, 100 ng Matrizen-DNA und 20-25 Zyklen zu verwenden. Es wurden daher beide Ansätze für die Mutagenese der Rezeptorgene D₂ und D₃ parallel durchgeführt. Für die Mutagenese wurden die Oligodesoxynukleotide (Nr.70+71, Tab. 28) für die PCR-Amplifikation des Rezeptorgens verwendet. Diese enthielten bereits die überlappenden Sequenzen für die anschließende Klonierung in den Vektor. Nach Generieren der Bibliothek aus mutierten Rezeptorgenfragmenten (~1300 bp), wurden diese mit CPEC in den Vektor *lac*-MBP-mCherry (~6400 bp) kloniert (4.2.2.2). Dieses Konstrukt bietet den Vorteil, dass das C-terminale mCherry als Reporterprotein für die Expression des Rezeptors dienen kann.

Um die optimale Hybridisierungstemperatur für die CPEC-Reaktion zu bestimmen, wurden die Temperaturen 45, 50, 55, 60, 65 und 70 °C getestet. Das Verhältnis von Vektor- zu Rezeptorfragment betrug 1:2. Der Erfolg der CPEC-Reaktion wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.2.1.1) analysiert (Abb. 70). Die Analyse zeigte, dass das Vektor- und das Rezeptorfragment in der CPEC-Reaktion verbraucht wurden und das gewünschte Produkt bei (~7700 bp) durch Aneinanderlagern der beiden Ausgangsfragmente entstanden ist. Der Temperaturbereich von 50-60 °C erwies sich dabei als der Beste.

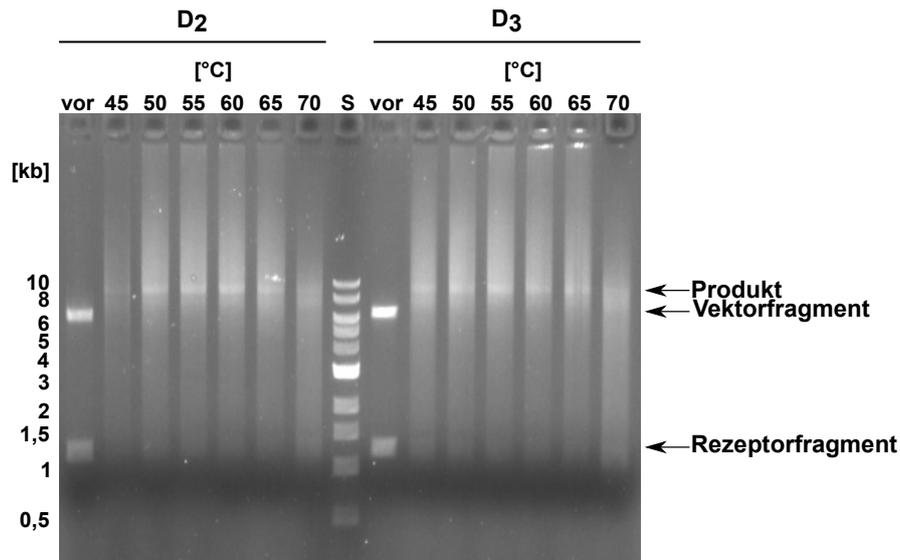


Abb. 70: Generierung der Plasmidbibliothek mittels CPEC. Analyse der CPEC-Reaktionen mittels Agarose-Gelelektrophorese für die Rezeptoren D₂ und D₃. Jeweilige Proben: vor CPEC und nach CPEC für die Hybridisierungstemperaturen von 45-70 °C; DNA-Längen-Standard (S). Die beiden Ausgangsfragmente und das entstandene Produkt sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Das Produkt der Proben 50-60 °C wurde vereinigt und *E. coli* TOP10 anschließend mit der Plasmidbibliothek transformiert (4.2.2.3). Die Anzahl der erhaltenen Klone wurde durch den Ausstrich einer Verdünnungsreihe bestimmt und ist in Tab. 22 zu sehen.

Tab. 22: Anzahl der erhaltenen Klone der Plasmidbibliotheken.

	D ₂ -Rezeptorvarianten	D ₃ -Rezeptorvarianten
10 ng Matrizen-DNA 30 Zyklen	~ 8 x 10 ⁵	~ 2 x 10 ⁵
100 ng Matrizen-DNA 23 Zyklen	~ 5 x 10 ⁵	~ 7,3 x 10 ⁵

Die Plasmidbibliotheken wurden in *E. coli* TOP10 vermehrt, anschließend die Gesamt-Plasmid-DNA isoliert und vom N-Terminus aus sequenziert (4.2.1.8). Dies diente dazu, einen Überblick zu erhalten, ob generell Mutationen in den Rezeptorgenen vorhanden sind (Abb. 71 D₂ + Abb. 72 D₃). Die Ausschnitte der Sequenzierung für die Bibliotheken des D₂-Rezeptorgens (D₂-10ng und D₂-100ng) zeigten unterhalb des Hauptsignals (wildtypische Sequenz) zusätzliche schwächere Signale, die von Genvarianten mit Mutationen kommen. Die Mutagenese war demnach erfolgreich. Weiterhin war der Trend zu erkennen, dass die Bedingungen 10 ng Matrizen-DNA und 30 Zyklen in der *error-prone* PCR zu mehr Mutationen geführt haben.

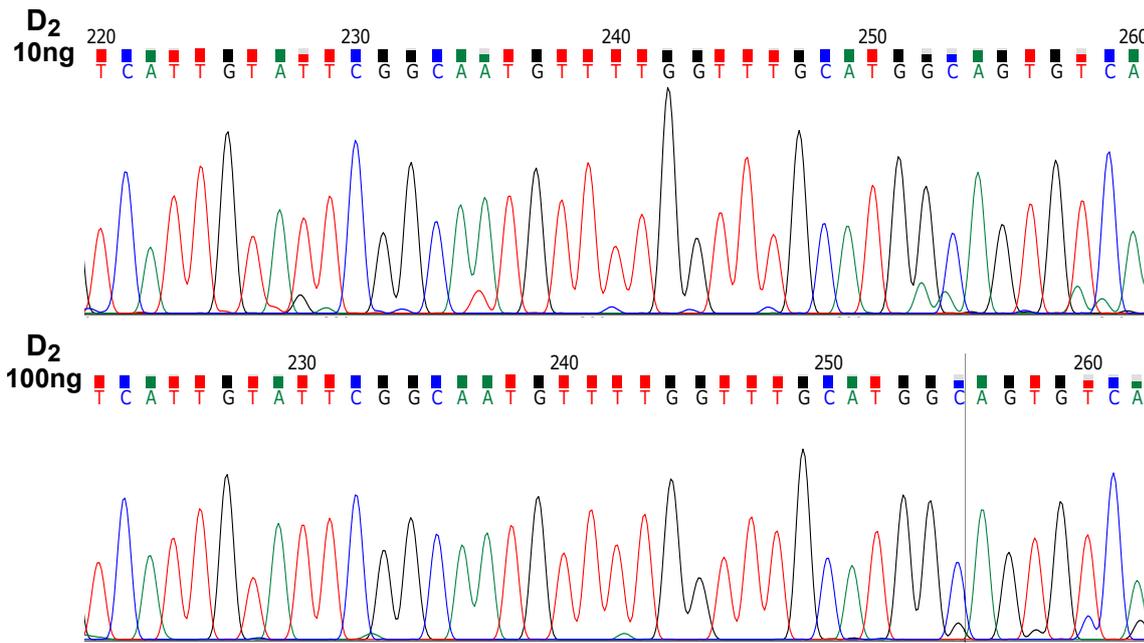


Abb. 71: Sequenzierungen der Plasmidbibliotheken für die D₂-Rezeptoren. Ausschnitte der Sequenzierungen für die Bibliotheken D₂-10ng und D₂-100ng. Die vollständige Sequenzierung befindet sich im Anhang (Abb. 85 + Abb. 86, 9.7).

Die Ausschnitte für die Sequenzierungen der Bibliotheken des D₃-Rezeptorgens (D₃-10ng und D₃-100ng) zeigten ein vergleichbares Bild zu denen des D₂-Rezeptorgens. Dabei wurden in das Gen des D₃-Rezeptors unter den Bedingungen 10 ng Matrizen-DNA und 30 Zyklen tendenziell noch mehr Mutationen eingebracht als in das Gen für den D₂-Rezeptor.

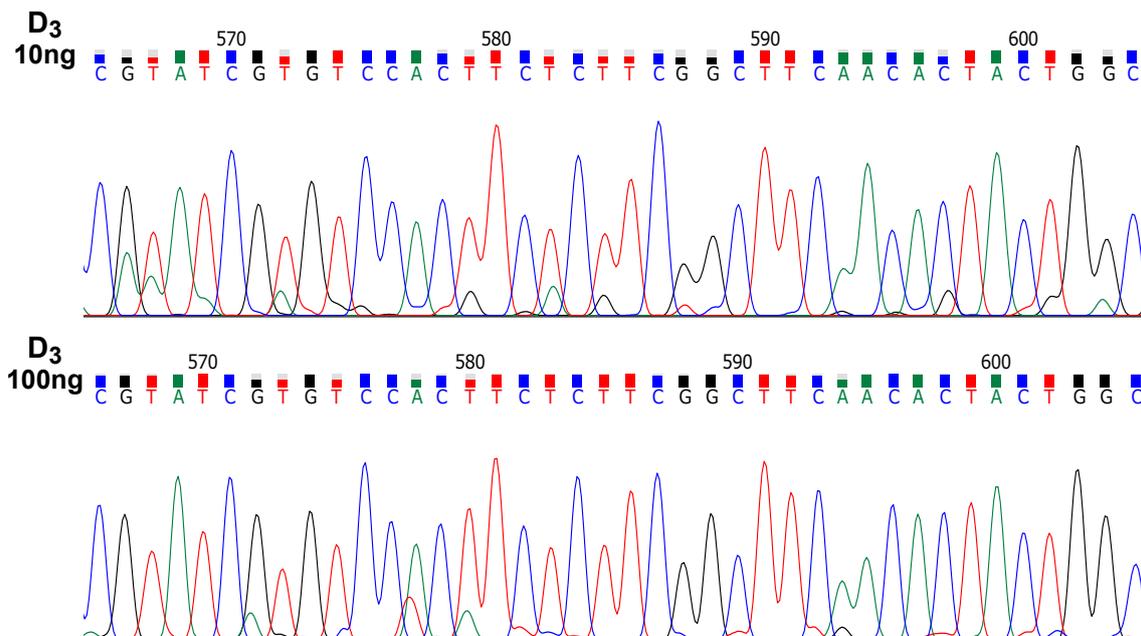


Abb. 72: Sequenzierungen der Plasmidbibliotheken für die D₃-Rezeptoren. Ausschnitte der Sequenzierungen für die Bibliotheken D₃-10ng und D₃-100ng. Die vollständige Sequenzierung befindet sich im Anhang (Abb. 87 + Abb. 88, 9.7).

Um einen genaueren Einblick in die Qualität der Bibliotheken zu erhalten, wurden von den Bibliotheken D₂-100ng und D₃-100ng Einzelklone auf deren Mutationsrate im Gen hin analysiert. Es wurde ebenfalls ermittelt, wie viele Mutationen zu einem Austausch der Aminosäure geführt haben. Beide Bibliotheken wiesen Mutationen in Codons über das ganze Gen verteilt auf, wobei in einigen Codons zweimal eine Mutation auftrat (Abb. 73, schwarz). Dabei waren die zwei Mutationen immer in unterschiedlichen Varianten zu finden und nicht in einem Codon derselben Variante. Es war zu erkennen, dass nicht alle Mutationen zu einem Austausch der Aminosäure geführt haben (Abb. 73, rot). Beispielsweise wurden in den Codons 3 und 5 für den D₂-Rezeptor (gelb) zwar Mutationen im Gen detektiert, jedoch führten diese nicht zum Austausch der Aminosäure. Für die Codons 127 bzw. 263 der D₂- bzw. D₃-Rezeptorgene (cyan) kam es für beide Mutationen zu einem Austausch der Aminosäure.

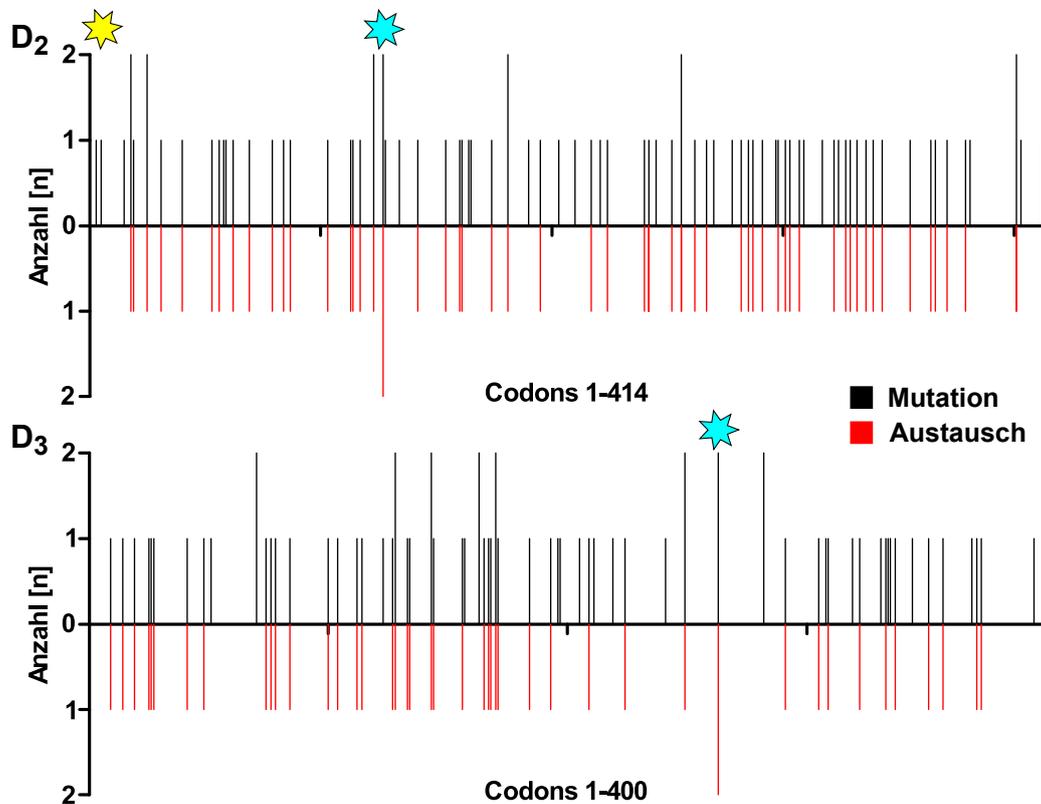


Abb. 73: Sequenzierungen der Einzelklone der D₂- und D₃-Rezeptorbibliotheken. Mutationen in den jeweiligen Codons (schwarz) bzw. Mutationen, die zu einem Austausch der Aminosäure geführt haben (rot). Gelb: Beispiel für eine Mutation, die zu keinem Austausch der Aminosäure geführt hat. Cyan: Mutationen in den beiden Klonen haben zu einem Austausch der Aminosäure geführt.

Insgesamt wurden bei 19 untersuchten Klonen für den D₂-Rezeptor im Mittel vier Mutationen pro Gen detektiert, die zu ca. drei substituierten Aminosäuren pro Rezeptorvariante geführt haben. 4,8 % der Mutationen trugen zur Bildung eines Stopcodons bei. Für den D₃-Rezeptor wurden 22 Klone untersucht, die im Mittel drei Mutationen pro Gen enthielten, welche im Schnitt zu ca. zwei substituierten Aminosäuren pro Rezeptorvariante führten. Die Rate an Mutationen, die Stopcodons verursacht hat, lag bei 5,6 %. Eine tabellarische Übersicht über

die einzelnen Klone und ein Sequenzalignment sind zum Nachschlagen im Anhang zu finden (Tab. 31, 9.7)

5.4.5.2 FACS ermöglicht die Selektion von Rezeptorvarianten

Um zu überprüfen, ob die Selektion neuer Rezeptorvarianten mit FACS generell möglich ist, wurde zunächst die Expression der wildtypischen Rezeptorgene anhand des Reporterproteins mCherry ($\lambda_{\text{Anregung}}/\lambda_{\text{Emission}} = 561/615 \text{ nm}$) untersucht. Ebenso wurde die Bindung des fluoreszenzmarkierten Liganden NMP130 ($\lambda_{\text{Anregung}}/\lambda_{\text{Emission}} = 488/525 \text{ nm}$) an die wildtypischen Rezeptoren analysiert.

E. coli TOP10 wurden dafür mit den Plasmiden *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry und *lac*-MBP-D_{3wt}-mCherry transformiert und die Genexpression für vier Stunden induziert (4.2.6.3). Die vorangegangenen Experimente hatten bereits darauf hingedeutet, dass eine Expression für wenige Stunden besser ist als die Expression über Nacht (5.4.2 + 5.4.4).

Anschließend wurde die Expression mittels Durchflusszytometrie untersucht (4.2.19). Als Vergleich wurden Zellen verwendet, in denen die Genexpression nicht induziert wurde. Die Induktion der Expression für den D_{2Swt}-Rezeptor führte zu einer Zunahme der Fluoreszenz bei 561/615 nm aufgrund des C-terminalen Fusionsproteins mCherry (Abb. 74, o.l.).

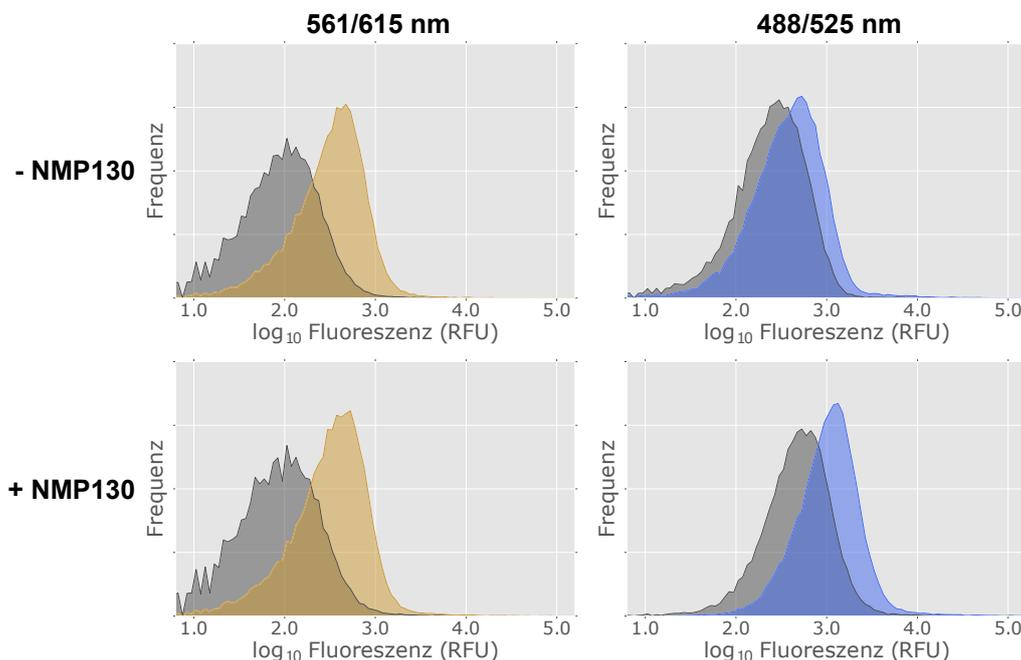


Abb.74: Durchflusszytometrie für den wildtypischen D₂-Rezeptor. Analyse der Fluoreszenz bei 561/615 nm und 488/525 nm vor (-NMP130) und nach (+NMP130) Markierung mit dem Fluoreszenzliganden. Aufgetragen ist die Frequenz in Abhängigkeit der Fluoreszenz (*relative fluorescence units* (RFU)) Grau: ohne Induktion; Farbig: mit Induktion.

Die Fluoreszenz bei 488/525 nm nahm ebenfalls zu, obwohl die Markierung mit dem Ligand NMP130 noch nicht durchgeführt wurde (Abb. 74, o.r.). Zellen, die nach der Expression mit NMP130 markiert wurden (4.2.19), wiesen, wie die unmarkierten Zellen, eine Zunahme der Fluoreszenz bei 561/615 nm auf (Abb. 74, u.l.). Sowohl bei Zellen ohne (grauer Gipfel) als

auch bei Zellen mit IPTG-Zugabe (blauer Gipfel), nahm die Fluoreszenz bei 488/525 nm nach der Markierung mit NMP130 zu (Abb. 74, u.r.). Dabei war die Zunahme der Fluoreszenz bei 488/525 nm für Zellen mit IPTG-Zugabe leicht höher als für Zellen ohne IPTG-Zugabe. Dies deutet darauf hin, dass es neben der unspezifischen Bindung des Liganden an die Zellen, auch Bindung des Liganden an den synthetisierten Rezeptor geben könnte.

Die Induktion der Expression für den D_{3wt} -Rezeptor führte zu einer Zunahme der Fluoreszenz bei 561/615 nm, die im Vergleich zu der Expression für D_{SwT} -Rezeptor sogar höher war (Abb. 75, o.l.). Ebenfalls war vor der Markierung mit NMP130 bereits eine Zunahme der Fluoreszenz bei 488/525 nm zu beobachten (Abb. 75, o.r.). Nach der Markierung mit NMP130 (4.2.19) blieb die Zunahme der Fluoreszenz bei 561/615 nm unverändert (Abb. 75, u.l.).

Die Fluoreszenz bei 488/525 nm nahm nach der Markierung mit NMP130 sowohl bei Zellen ohne (grauer Gipfel) als auch bei Zellen mit IPTG-Zugabe (blauer Gipfel) zu, wobei die Zunahme bei Zellen mit IPTG-Zugabe deutlich größer war (Abb. 75, u.r.). Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass neben der unspezifischen Bindung des Liganden an die Zellen, auch Bindung des Liganden an den synthetisierten Rezeptor stattgefunden haben könnte.

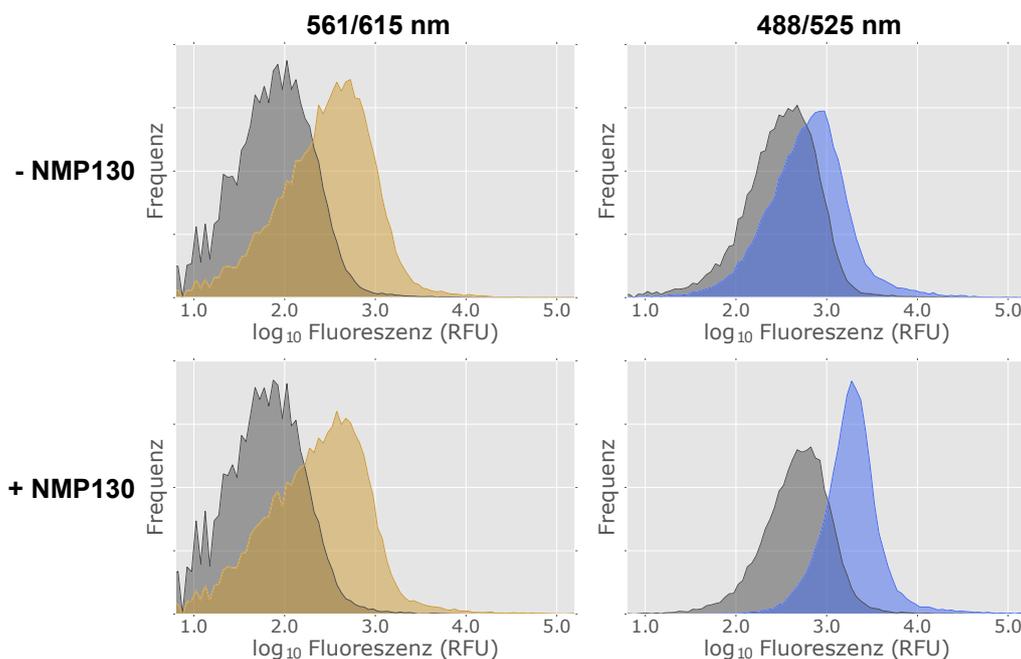


Abb. 75: Durchflusszytometrie für den wildtypischen D_3 -Rezeptor. Analyse der Fluoreszenz bei 561/615 nm und 488/525 nm vor (-NMP130) und nach (+NMP130) Markierung mit dem Fluoreszenzliganden. Aufgetragen ist die Frequenz in Abhängigkeit der Fluoreszenz (RFU). Grau: ohne Induktion; Farbig: mit Induktion.

Im nächsten Schritt wurde die spezifische Bindung des Liganden NMP130 an die Rezeptoren D_{2SwT} und D_{3wt} untersucht. Dabei sollte ähnlich zum Radioligandenbindungstest ermittelt werden, ob ein Überschuss an nicht-fluoreszierendem Ligand (Haloperidol) den Liganden NMP130 vom Rezeptor verdrängen kann. Dafür wurden exprimierende Zellen mit NMP130 oder mit NMP130+Haloperidol (2000facher bzw. 4000facher Überschuss) inkubiert (4.2.19).

Dabei ist zu beachten, dass alle Ansätze für die Markierungsreaktion mit Haloperidol 4 bzw. 8 % Ethanol enthielten, da Haloperidol max. bis 10 mM in Ethanol gelöst werden kann.

Die Kontrolle mit Ethanol zeigte, dass für den D_{2Swt}-Rezeptor im Vergleich zum Ansatz ohne Ethanol nur noch eine geringe Zunahme der Fluoreszenz nach der Markierung detektiert werden konnte. Dies spricht dafür, dass die Bindung von NMP130 an den D_{2Swt}-Rezeptor gestört ist, sobald der Ansatz Ethanol enthält (Abb. 76). Bei den Ansätzen mit Haloperidol konnte daher auch kein Rückgang der Fluoreszenz beobachtet werden. Die Verdrängung von NMP130 für den D_{2Swt}-Rezeptor kann somit nicht untersucht werden bzw. es müsste ein Ligand für die Verdrängung genutzt werden, der in wässrigen Lösungen in höheren Konzentrationen gelöst werden kann.

Für den D_{3wt}-Rezeptor führte der im Ansatz enthaltene Ethanol jedoch zum gegenteiligen Effekt, zu mehr Bindung des NMP130, was anhand der beobachteten Fluoreszenzzunahme zu erkennen war (Abb. 76). Die Zugabe von Haloperidol im 2000fachen Überschuss führte zu einem leichten Rückgang der Fluoreszenz. Die Erhöhung auf einen 4000fachen Überschuss an Haloperidol führte zu einem vollständigen Rückgang der Fluoreszenz, die der unspezifischen Bindung von NMP130 an Zellen ohne IPTG-Zugabe entsprach.

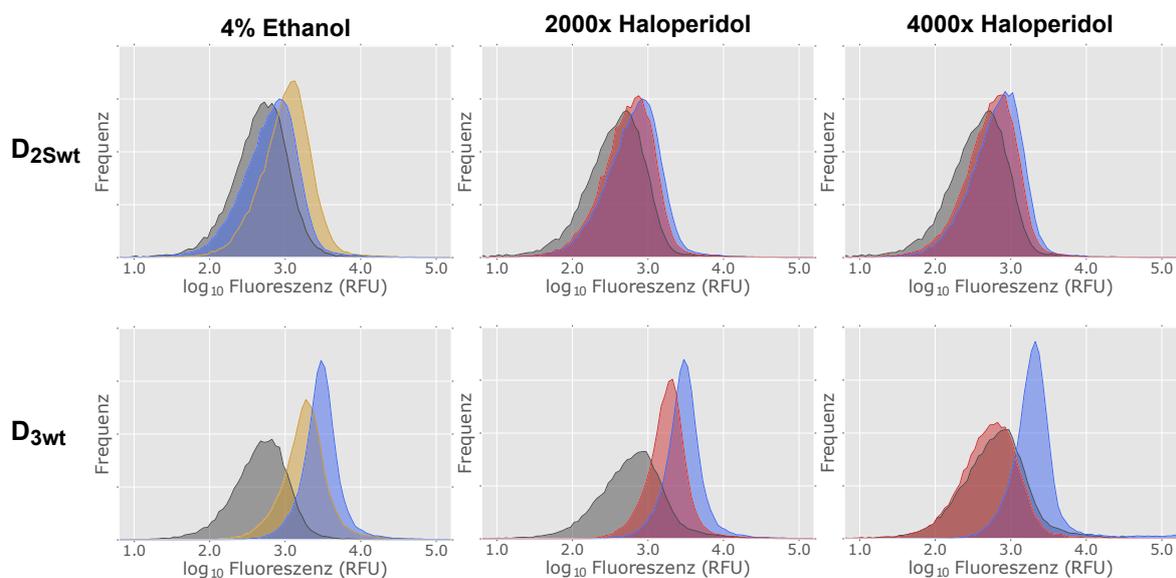


Abb. 76: Verdrängung des Fluoreszenzliganden mit Haloperidol. Dargestellt ist die Frequenz in Abhängigkeit der Fluoreszenz (RFU) bei 488/525 nm für D_{2Swt} und D_{3wt}. **4 % Ethanol:** Grau: ohne Induktion+NMP130; Gelb: mit Induktion+NMP130; Blau: mit Induktion+NMP130+4 % Ethanol im Markierungsansatz. **2000x Haloperidol** und **4000x Haloperidol:** Schwarz: ohne Induktion+NMP130; Blau: mit Induktion+NMP130+Ethanol; Rot: mit Induktion+NMP130+Haloperidol. Die Kontrolle mit 8 % Ethanol im Markierungsansatz ist im Anhang zu finden (Abb. 89, 9.7).

Im Weiteren wurde untersucht, ob unspezifisch gebundenes NMP130 durch einen zusätzlichen Waschschrift entfernt werden kann. Dabei besteht die Gefahr, dass durch den Waschschrift auch Ligand von Zellen mit Rezeptorvarianten entfernt wird, bei denen der Ligand mit niedrigerer Affinität bindet als für den wildtypischen Rezeptor. Das könnte darin

resultieren, dass Rezeptorvarianten, die zu einer besseren Expression führen, aber eine niedrigere Affinität aufweisen, für die Selektion verloren gehen.

Für das Experiment wurden Zellen ohne und mit IPTG-Zugabe nach der Markierung ein zusätzliches Mal vor der Durchflusszytometrie-Messung in Puffer resuspendiert und zentrifugiert (4.2.19). Für den $D_{2\text{Swt}}$ -Rezeptor zeigte der zusätzliche Waschschrift keine Auswirkungen auf die Fluoreszenz von Zellen ohne IPTG-Zugabe (Abb. 77, o.l.). Der unspezifisch gebundene Ligand scheint daher nicht entfernt worden zu sein. Zellen, in denen das $D_{2\text{Swt}}$ -Rezeptorgen exprimiert wurde, zeigten nach dem zusätzlichen Waschschrift eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz.

Für den $D_{3\text{Swt}}$ -Rezeptor konnte unspezifisch gebundenes NMP130 an Zellen ohne IPTG-Zugabe durch einen weiteren Waschschrift entfernt werden, was anhand der Abnahme der Fluoreszenz deutlich zu sehen ist (Abb. 77, u.l.). Jedoch wurde auch bei Zellen mit IPTG-Zugabe der Ligand nahezu vollständig gewegewaschen (Abb. 77, u.r.). Um aus dem oben genannten Grund während der Selektion der Bibliothek keine Rezeptorvarianten zu verlieren, wurde für alle weiteren Experimente kein zusätzlicher Waschschrift durchgeführt.

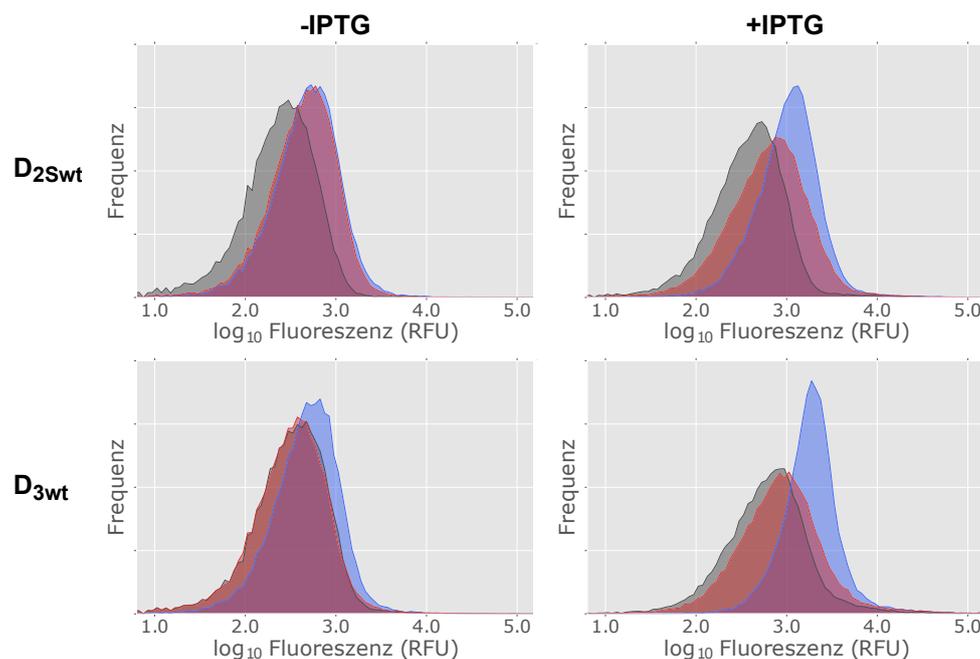


Abb. 77: Zusätzlicher Waschschrift nach Markierung mit NMP130. Dargestellt ist die Frequenz in Abhängigkeit der Fluoreszenz (RFU) bei 488/525 nm für $D_{2\text{Swt}}$ und $D_{3\text{Swt}}$ vor und nach Induktion mit IPTG (-/+IPTG). Grau: Zellen ohne Markierung mit NMP130; Blau: Zellen+NMP130; Rot: Zellen+NMP130+zusätzlicher Waschschrift.

Im letzten Schritt wurde untersucht, ob die Rezeptorvarianten, die durch die Mutagenese generiert wurden, noch dazu in der Lage sind, den Liganden NMP130 zu binden, was die generelle Voraussetzung ist, um gewünschte Rezeptorvarianten selektieren zu können. Dafür wurden die Bibliotheken aus mutierten Rezeptorgenen (D_2 -10ng, D_2 -100ng, D_3 -10ng und

D₃-100ng, 5.4.5.1) in *E. coli* TOP10 für vier Stunden exprimiert (4.2.6.4), anschließend mit NMP130 markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (4.2.19).

Für die D₂-Bibliotheken konnte eine Zunahme der Fluoreszenz bei 561/615 nm beobachtet werden, wobei die Zunahme für die Bibliothek D₂-10ng größer war als für die Bibliothek D₂-100ng (Abb. 78). Das deutet auf eine bessere Expression für die Bibliothek D₂-10ng hin. Die Fluoreszenzzunahme bei 488/525 nm nach der Markierung mit NMP130 (roter Gipfel) war im Vergleich zur Zunahme für den wildtypischen D_{2S}-Rezeptor (blauer Gipfel) bei beiden Bibliotheken eher gering. Trotz der vermeintlich besseren Expression der Bibliothek D₂-10ng, schien die Bindung von NMP130 für die Bibliothek D₂-100ng jedoch höher auszufallen. Das könnte auf eine geringere Mutationsrate zurückzuführen sein.

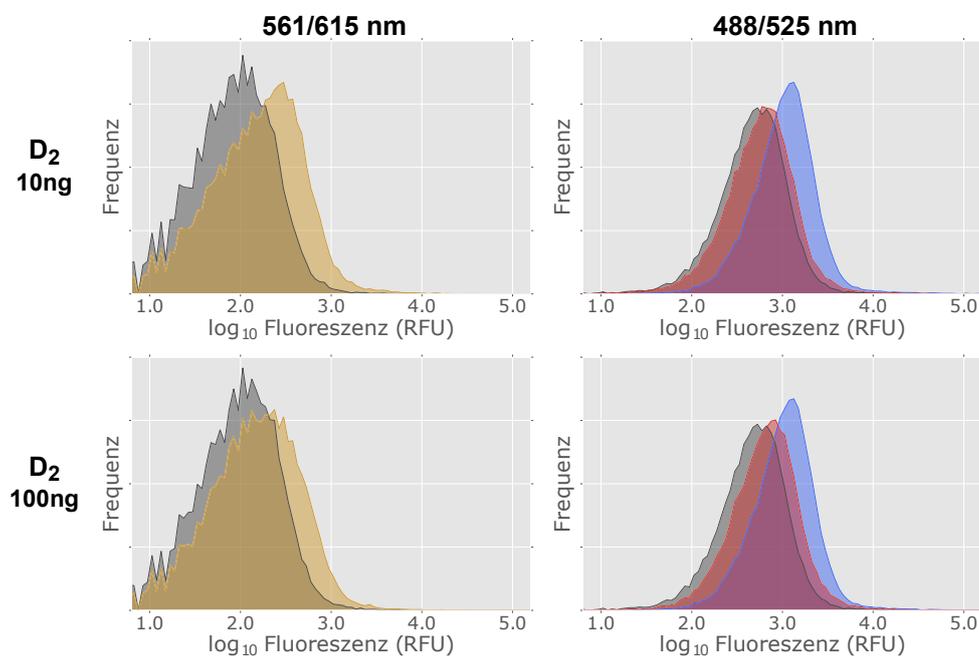


Abb. 78: Durchflusszytometrie der Plasmidbibliotheken für den D₂-Rezeptor. Analyse der Fluoreszenz bei 561/615 nm und 488/525 nm nach Markierung mit dem Fluoreszenzliganden für die Bibliotheken D₂-10ng und D₂-100ng. Aufgetragen ist die Frequenz in Abhängigkeit der Fluoreszenz (RFU). Grau: ohne Induktion; Gelb: mit Induktion; Rot: mit Induktion+NMP130; Blau: mit Induktion+NMP130 für den wildtypischen Rezeptor als Vergleich.

Für die D₃-Bibliotheken war die Zunahme der Fluoreszenz bei 561/615 nm ähnlich wie für die D₂-Bibliotheken (Abb. 79). Dabei konnte für die Bibliothek D₃-10ng ebenfalls eine stärkere Zunahme der Fluoreszenz bei 561/615 nm beobachtet werden als für die Bibliothek D₃-100ng, was zunächst für eine bessere Expression der D₃-10ng-Bibliothek spricht.

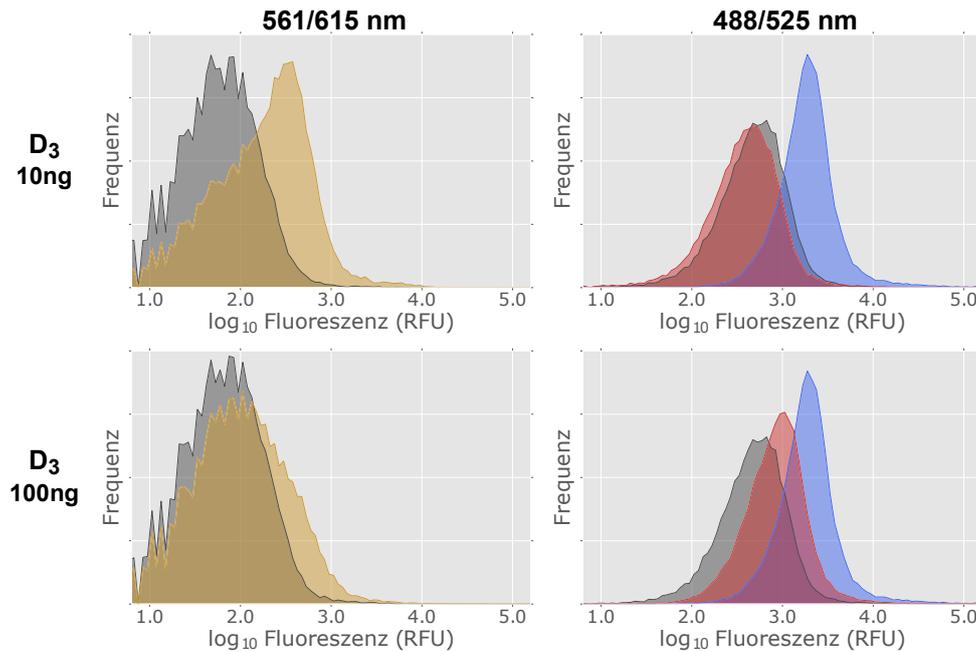


Abb. 79: Durchflusszytometrie der Plasmidbibliotheken für den D₃-Rezeptor. Analyse der Fluoreszenz bei 561/615 nm und 488/525 nm nach Markierung mit dem Fluoreszenzliganden für die Bibliotheken D₃-10ng und D₃-100ng. Aufgetragen ist die Frequenz in Abhängigkeit der Fluoreszenz (RFU). Grau: ohne Induktion; Gelb: mit Induktion; Rot: mit Induktion+NMP130; Blau: mit Induktion+NMP130 für den wildtypischen Rezeptor als Vergleich.

Jedoch konnte für die Bibliothek D₃-10ng nach der Markierungsreaktion mit NMP130 keine Zunahme der Fluoreszenz bei 488/525 nm (roter Gipfel) und somit auch keine Bindung des Liganden beobachtet werden. Vermutlich war die Mutationsrate in Bibliothek D₃-10ng zu hoch und die entstandenen Varianten können den Liganden nicht mehr binden. Bekräftigt wird dies dadurch, dass für die Bibliothek D₃-100ng eine Zunahme der Fluoreszenz bei 488/525 nm festgestellt werden konnte (roter Gipfel), auch wenn diese nicht so hoch ausfiel, wie für den wildtypischen D₃-Rezeptor (blauer Gipfel). Die geringere Mutationsrate kann demnach dazu beigetragen haben, dass die Bindung des Liganden NMP130 noch möglich ist.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Optimierungsstrategie der gerichteten Evolution für die beiden Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ erfolgreich implementiert werden konnte. Damit ist der Grundstein für ein Screening nach Rezeptorvarianten gelegt, welches erlaubt, Rezeptorvarianten zu identifizieren, die zu einer höheren Synthese in *E. coli* führen und ggf. sogar eine höhere Thermostabilität aufweisen.

6. Diskussion

Die humanen Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ sind Bestandteil der Signalweiterleitung im zentralen Nervensystem. Fehlregulationen des dopaminergen Systems können zu Krankheiten, wie Parkinson oder Schizophrenie führen (3.2). Um die Fehlregulation durch Medikamente ausgleichen zu können, müssen Liganden designt und synthetisiert werden. Die Liganden müssen dabei sehr spezifisch an den jeweiligen Subtyp (D₂ oder D₃) binden (Subtyp-Selektivität), um Nebenwirkungen zu vermeiden (Moritz *et al.*, 2018).

Dafür ist die Charakterisierung der beiden Rezeptoren auf molekularer bzw. struktureller Ebene anhand von Kristallographie, Cryo-EM oder NMR zwingend erforderlich. Ein weiteres großes Ziel ist die Aufklärung des Mechanismus während der Aktivierung der Dopaminrezeptoren mithilfe dieser Methoden. Bisher wurden neben der erst kürzlich veröffentlichten Cryo-EM-Struktur des D₂-Rezeptors die dreidimensionalen Strukturen der Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ ausschließlich in der inaktiven Konformation gelöst (3.2.2). Um unser Wissen über den D₂- und D₃-Rezeptor zu erweitern, sind strukturelle Untersuchungen an den beiden Rezeptoren in der aktiven Konformation jedoch unabdingbar. Strukturelle Untersuchungen bezüglich der aktiven Konformation werden jedoch erst möglich, wenn die humanen Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ ohne Fusionen in den ICL3 in ausreichenden Mengen hergestellt werden können. Diesbezüglich wurden in dieser Arbeit verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Expressionssysteme für die Rezeptoren geprüft und eine Strategie implementiert, mit welcher die Synthese der rekombinanten Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ optimiert werden kann.

6.1 Herstellung des wildtypischen D₃-Rezeptors in Insektenzellen

Insektenzellen gehören zu den Eukaryoten und werden häufig für die rekombinante Herstellung von GPCRs verwendet (3.3.1). Um 1 mg Rezeptor aus fünf Litern Kultur mit einer Zelldichte von 10⁶ Zellen/mL reinigen zu können, muss die Rezeptordichte bei ~26 pmol/mg liegen (Sarramegna *et al.*, 2003).

Der wildtypische humane D₃-Rezeptor wurde bereits 1997 in Insektenzellen hergestellt, um die Kopplung des Rezeptors mit endogenen G-Proteinen aus Insektenzellen zu untersuchen (Pregenzner *et al.*, 1997). Die maximale Rezeptordichte lag bei 23 ± 2,1 pmol/mg, was sehr vielversprechend ist, um ausreichende Mengen für strukturbiochemische Analysen zu reinigen. Daher wurde in dieser Arbeit der wildtypische D₃-Rezeptor ebenfalls in Insektenzellen synthetisiert und untersucht, ob dessen Reinigung generell möglich ist. Die Synthese von funktionalem Rezeptor wurde mit einem Western Blot und dem Radioligandenbindungstest bestätigt (5.1.2). Der *K_D*-Wert des Liganden [³H]Spiperon (*K_D* = 0,57 nM) lag in der Größenordnung des von Pregenzner *et al.* (Pregenzner *et al.*, 1997) ermittelten Wertes (*K_D* = 0,42 ± 0,09 nM). Die Rezeptordichte lag mit 7,9 pmol/mg jedoch niedriger. Eine Ursache könnte in den unterschiedlichen verwendeten Zelllinien liegen. In der vorliegenden Arbeit

wurde die Zelllinie High Five (*T. ni*) anstelle der Zelllinie Sf9 (*S. frugiperda*) genutzt. Dennoch, beide Insektenzelllinien werden für die Herstellung von rekombinanten GPCRs erfolgreich eingesetzt (Saarenpää *et al.*, 2015). Außerdem zeigten Wilde *et al.*, dass die Anfälligkeit der Zelllinie High Five gegenüber einer Infektion mit dem Baculovirus im Vergleich zur Zelllinie Sf9 sogar höher ist, was die Voraussetzungen für eine gute Expression sogar verbessert (Wilde *et al.*, 2014). Um die Rezeptordichte letztendlich zu erhöhen und auf eine ähnlich hohe Dichte an Rezeptoren wie die Publierte zu gelangen, ist eine Optimierung der Multiplizität der Infektion (MOI) am vielversprechendsten. Dazu sollte zunächst der Virentiter z.B. mit quantitativer *real-time* PCR bestimmt werden (Hitchman *et al.*, 2007). Anschließend kann das optimale Verhältnis von Viren zu Insektenzellen während der Infektion besser angepasst werden (Wiseman *et al.*, 2020).

Ungeachtet dessen lag die Synthese in Insektenzellen höher als die Synthese in HEK-Zellen (5,7 pmol/mg), dafür war die Affinität von [³H]Spiperon an den D₃-Rezeptor aus Insektenzellen tendenziell niedriger ($K_D = 0,57$ nM) als für den Rezeptor aus HEK-Zellen ($K_D = 0,21$ nM) (Abb. 24).

Dafür könnte eine andere Lipidzusammensetzung der Membranen sowie das Muster an PTMs in Insektenzellen verantwortlich sein, welches sich von dem in Säugerzellen deutlich unterscheidet. Ein wesentlicher Unterschied ist z.B. das geringere Cholesterol/Phospholipid-Verhältnis in Insektenzellmembranen (Marheineke *et al.*, 1998). Für den Serotonin_{1A}-Rezeptor wurde beispielsweise gezeigt, dass die Ligandenbindung stark zurückgeht, wenn der Anteil an Cholesterol niedrig ist (Pucadyil & Chattopadhyay, 2004). Das könnte für den D₃-Rezeptor ebenfalls denkbar sein. Außerdem finden Glykosylierungen in Insektenzellen nicht im gleichen Umfang statt, wie in Säugerzellen (Fraser, 1992), was für den D₃-Rezeptor, der vier potentielle Glykosylierungsstellen aufweist (Min *et al.*, 2015), problematisch sein könnte. Für andere GPCRs wurde bereits gezeigt, dass Glykosylierungen für eine hochaffine Ligandenbindung und/oder die Kopplung mit dem G-Protein wichtig sind (McCusker *et al.*, 2007).

Die anschließende Reinigung des rekombinanten wildtypischen D₃-Rezeptors aus Insektenzellen war nicht möglich. Während der Reinigung konnte Proteinaggregation beobachtet werden und anstelle des vollständigen Rezeptors (50,6 kDa), wurde lediglich ein Fragment (~13 kDa) gereinigt (Abb. 24). Dies kann verschiedene Ursachen haben. Ein Grund könnte die mangelnde Thermostabilität des Rezeptors gewesen sein. Eine höhere Thermostabilität des D₃-Rezeptors kann durch den Austausch der Aminosäure L119W gefördert werden. Der Austausch L119W ist einer der sehr wenigen Austausche, der bereits an entsprechender Position in mehreren anderen GPCRs zu höherer Thermostabilität geführt hat. Jedoch führt dieser Austausch bei den resultierenden Rezeptorvarianten auch zu einem Rückgang der Affinität der Liganden (Heydenreich *et al.*, 2015). Ursprünglich beruht dieser Austausch auf einem Tryptophan, welches in der TM3 von Rhodopsin entdeckt wurde und

Kontakt zur TM4 und TM5 hat. Auf diese Weise wird vermutlich die sehr flexible TM5 stabilisiert (Roth *et al.*, 2008). Zusätzlich kann die Thermostabilität erhöht werden, indem hochaffine Liganden in die zur Reinigung verwendeten Puffer gegeben werden. Die Thermostabilität des Fusionsproteins aus D₃-Rezeptor mit T4-Lysozym im ICL3 und Aminosäureaustausch L119W ist beispielsweise umso höher, je affiner die Liganden zu dieser Rezeptorvariante sind (Chien *et al.*, 2010). Daher wurde neben dem wildtypischen Rezeptor auch die D₃-Rezeptor mit dem Austausch L119W, aber ohne Fusion mit dem T4-Lysozym, in Insektenzellen synthetisiert und anschließend unter Zugabe des Liganden Haloperidol gereinigt (Daten nicht gezeigt), da dieser eine sehr hohe Affinität zum D₃-Rezeptor aufweist ($K_D = 1,2 \text{ nM}$) (McAllister *et al.*, 1995). Jedoch konnte das Problem dadurch nicht gelöst werden, denn die Reinigung resultierte ebenfalls im Abbau des Rezeptors.

Wahrscheinlich wurde der Rezeptor im ICL3 proteolytisch geschnitten, da das erhaltene Fragment ungefähr dem Molekulargewicht vom C-Terminus des Konstruktes bis zum ICL3 entspricht. Der ICL3 des D₃-Rezeptors macht ca. 25 % des Gesamtproteins aus und ist wie bei anderen bisher untersuchten GPCRs vermutlich unstrukturiert (Katritch *et al.*, 2012). Daher bietet er eine optimale Angriffsfläche für Proteasen jeglicher Art, von denen trotz Zugabe von Protease-Inhibitoren-Cocktails vermutlich nicht alle vollständig gehemmt werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde schon für den β_2 -adrenergen Rezeptor gemacht (Zou *et al.*, 2012). Hier konnte das Problem behoben werden, indem der ICL3 verkürzt wurde, um die Angriffsfläche für die Proteasen zu minimieren. Ein vielversprechender Ansatz für eine erfolgreiche Reinigung könnte daher sein, den ICL3 des D₃-Rezeptors ebenfalls zu kürzen. Dabei muss jedoch darauf geachtet werden, dass die Bindung von hochaffinen Liganden an die Rezeptorvarianten bestehen bleibt und die Varianten noch dazu in der Lage sind, mit den zytosolischen Signalproteinen zu interagieren. Da bis dato unklar ist, wie der ICL3 des D₃-Rezeptors genau mit dem G-Protein interagiert, ist die Kürzung des ICL3 eine Herausforderung.

Neben der Verkürzung des ICL3 ist es sinnvoll, nach weiteren Aminosäuren zu suchen, deren Austausch zu einer verbesserten Expression, zu einer höheren Thermostabilität oder zu einer höheren Stabilität in Detergenzien führt, mit denen die Rezeptoren während der Reinigung solubilisiert werden. Dafür könnte entweder ein Alanin-Scanning für den D₃-Rezeptor, ähnlich zum D₂-Rezeptor (Wang *et al.*, 2018), durchgeführt werden oder der in dieser Arbeit für die Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ etablierte Ansatz mittels gerichteter Evolution weiterverfolgt werden (5.4.5).

Ob rekombinanter D₂-Rezeptor ohne T4-Lysozymfusion in Insektenzellen synthetisiert und anschließend gereinigt werden kann, muss individuell getestet werden. Eine Reinigung des wildtypischen D₂-Rezeptors aus Insektenzellen ist jedoch aus den gleichen Gründen wie beim D_{3wt}-Rezeptor unwahrscheinlich, weshalb dieser ebenfalls modifiziert werden sollte. Dies

wurde mit der kürzlich erschienenen Publikation zur Cryo-EM-Struktur des D₂-Rezeptors bestätigt (Yin *et al.*, 2020). Um die Struktur des Rezeptors in der aktiven Konformation zu lösen, stellten Yin *et al.* das Protein in Insektenzellen her. Der Rezeptor wurde jedoch zunächst modifiziert; basierend auf rationalem Proteindesign mit computergestützten Methoden wurden fünf Aminosäuren ausgetauscht, welche zur Stabilisierung der aktiven Konformation beitrugen. Außerdem wurde der ICL3 (~120 AS) durch eine sieben Aminosäuren langes Peptid ersetzt, welches dem Rezeptor trotz Kürzung ermöglichte, mit dem G-Protein zu koppeln. Zusammengefasst bekräftigen Yin *et al.* die Annahmen und die Vorgehensweisen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit für die Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ getroffen und durchgeführt wurden.

6.2 Herstellung von Nanodiscs

Nanodiscs wurden hergestellt, um sie für die zellfreie Expression zu verwenden und um perspektivisch Rezeptor in Lipiden rekonstituieren zu können, welcher zuvor mit Detergenzien solubilisiert wurde. Außerdem können verschiedene Lipide und Lipidmischungen für die Herstellung verwendet werden, um dadurch den Einfluss der jeweiligen Lipide auf die Rezeptoren zu untersuchen.

Im Rahmen dieses Projekts wurde mit der MSP-Variante MSP1E3D1 gearbeitet, welche zur Bildung von Nanodiscs mit einem Durchmesser von ~12,9 nm führt (5.2). Zunächst wurde die Sortase-Erkennungssequenz an das 3'-Ende des Konstruktes kloniert, um neben den unverknüpften Nanodiscs auch kovalent verknüpfte Nanodiscs herstellen zu können (5.2.1). Die kovalent verknüpften Nanodiscs bieten den Vorteil, dass sie eine homogenere Form und eine höhere Stabilität gegen Proteasen aufweisen (3.3.3). Die Expression, gefolgt von der Reinigung des cMSP1E3D1 unter denaturierenden Bedingungen mit anschließender Rückfaltung, war erfolgreich. Die hohe Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-PAGE bestätigt. Die Ausbeute betrug 20,5 mg/L Kultur (5.2.2). Das Enzym Sortase konnte ebenfalls in ausreichenden Mengen (50,2 mg/L Kultur) hergestellt werden (5.2.3.1) und katalysierte die korrekte kovalente Verknüpfung von N- und den C-Terminus des cMSP1E3D1 (5.2.3.2). Die Vorgehensweise und die daraus resultierenden Ergebnisse sind im Einklang der Arbeit von Rues *et al.* und Nasr *et al.* (Rues, Heinrich *et al.*, 2016; Nasr *et al.*, 2017).

Im nächsten Schritt wurde die Assemblierung von Nanodiscs mit dem unverknüpften cMSP1E3D1 und den Lipiden POPG und DOPG durchgeführt. Die Selbstassemblierung mit POPG wurde mithilfe von *Bio-Beads* initiiert und führte zur Bildung von Nanodiscs des gewünschten Durchmessers ($\varnothing = 12,7$ nm) bei RT und auch bei 4 °C. Die Assemblierung mit DOPG wurde ebenfalls mit *Bio-Beads* initiiert und resultierte in Nanodiscs der gewünschten Größe ($\varnothing = 12,9$ nm). Es wurden jedoch auch Spezies gebildet, die nicht vollständig mit Lipiden assembliert waren. Um dies zu optimieren, wurde für die Initiation der Assemblierung die Dialyse verwendet, welche zur Bildung von Nanodiscs eines einheitlichen Durchmessers

fürhte. Das Verhältnis MSP1E3D1:DOPG von 1:80 erwies sich dabei am besten. Dieser Erfolg ist vermutlich auf das langsame und gleichmäßige Entfernen des Detergens aus dem Ansatz über einen längeren Zeitraum zurückzuführen, während die *Bio-Beads* das Detergens schnell und harsch aus dem Reaktionsansatz entfernen. Ein weiterer Nachteil, den die hydrophoben Polystyrol-Kügelchen mit sich bringen, ist, dass das Entfernen der Detergenzien unvollständig sein kann. Außerdem binden auch Lipide an die Kügelchen, wodurch sie für die Assemblierung der Nanodisc nicht mehr zur Verfügung stehen (Rigaud *et al.*, 1998). Unter Verwendung der Dialyse konnten unverknüpfte Nanodiscs auch im präparativen Maßstab erfolgreich für die zellfreie Expression hergestellt werden (Abb. 38).

Das kovalent verknüpfte cMSP1E3D1 sollte ebenfalls mit Lipiden assembliert werden. Jedoch wies das Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie bereits vor der Assemblierung zwei Gipfel auf. Die Analyse mit SDS-PAGE zeigte jedoch monomeres Protein in beiden Gipfeln (Abb. 39). Das cMSP1E3D1 formt demnach entweder nicht-kovalent verknüpfte Oligomere, wahrscheinlich Dimere, die mittels SDS-PAGE nicht zu detektieren sind, oder es liegt in Lösung in unterschiedlichen Konformationen vor. Denkbar wäre eine offene Ringstruktur, ähnlich zur *open-circle* Form von Plasmiden, oder eine *super-coiled* Form, bei der sich die hydrophoben Reste des amphipatischen Proteins zusammenlagern. Ähnliches beobachtete Nasr *et al.* für deren MSP-Variante cNW30 (Nasr *et al.*, 2017). Anstelle des erwarteten Durchmessers ($\varnothing = 30$ nm) betrug der Durchmesser der Nanodiscs lediglich die Hälfte ($\varnothing = 15$ nm), weshalb davon ausgegangen wurde, dass es bei dieser Variante zu einer Verzwirbelung kam.

Trotz der vermuteten zwei Konformationen wurde die Assemblierung des kovalent verknüpften cMSP1E3D1 mit DOPG zunächst im Verhältnis 1:80 durch *Bio-Beads* und Dialyse initiiert. Jedoch führte diese Vorgehensweise im Gegensatz zu den Ansätzen mit unverknüpftem cMSP1E3D1 nicht zu einer vollständigen Assemblierung mit Lipiden (Abb. 41). Auch ein höheres Verhältnis von cMSP1E3D1 zu Lipid (1:90; 1:100) führte nicht zu dem gewünschten Ergebnis (Abb. 81). Lediglich für die Assemblierung mit DMPG im Verhältnis 1:100 konnten Nanodiscs mit erwartetem Durchmesser ($\varnothing = 13$ nm) hergestellt werden (Abb. 42). Dennoch waren auch in diesem Ansatz nicht alle cMSP1E3D1-Moleküle vollständig mit Lipid assembliert. Um kovalent verknüpften Nanodiscs besser herstellen zu können, könnte die Verwendung einer anderen MSP-Variante hilfreich sein. Außerdem sollten die hergestellten Nanodiscs mithilfe von Elektronenmikroskopie kontrolliert werden, um die korrekte Form des Nanodiscs zu evaluieren (Nasr *et al.*, 2017).

6.3 Zellfreie Expression

Neben der Herstellung des wildtypischen D₃-Rezeptors in Insektenzellen, wurde untersucht, ob der Rezeptor zellfrei hergestellt werden kann. Der große Vorteil der zellfreien Expression liegt in einem offenen, modifizierbaren System. Dieses erlaubt beispielsweise das einfache

Einführen von isotoopenmarkierten Aminosäuren, welche für NMR-Studien benötigt werden (3.3.2.1). Ein Protokoll für die *in vitro*-Herstellung des D₂-Rezeptors wurde bereits von Basu *et al.* veröffentlicht (Basu *et al.*, 2013), für den D₃-Rezeptor wurde die zellfreie Expression jedoch noch nicht geprüft.

Zu Beginn dieses Teilprojektes wurden mehrere Konstrukte mit unterschiedlichen Varianten des Rezeptors kloniert (5.3.1). Der thermostabilisierende Austausch L119W wurde eingeführt. Außerdem wurden Varianten erstellt, bei denen flexible Teile des Proteins (z.B. der N-Terminus) deletiert wurden, um das Protein zu verkleinern, was für NMR-Experimente beispielsweise vorteilhaft ist. Außerdem sollte so die Stabilität zu erhöht werden. Während der Reinigung aus Insektenzellen wurde der wildtypische D₃-Rezeptor aller Voraussicht nach durch Proteasen abgebaut. Daher wurden Teile des ICL3 deletiert. Es wurden drei unterschiedliche Längen des ICL3 generiert, um zu untersuchen, wie lange der ICL3 sein muss, dass sich der Rezeptor noch funktional in die Membran faltet. Des Weiteren wurden Varianten erstellt, bei denen die Cysteine gegen Alanin bzw. Serin ausgetauscht wurden, um Fehlfaltungen aufgrund unerwünschter Disulfid-Brücken entgegenzuwirken.

Die Expression aller Konstrukte im Präzipitat-Modus war erfolgreich. Die Zugabe der zuvor hergestellten Nanodiscs (5.2.4.1) führte anschließend dazu, dass der Rezeptor nicht nur im Pellet, sondern auch löslich im Überstand detektiert werden konnte (5.3.2). Demnach ist der Rezeptor mit der Nanodisc assoziiert oder sogar in die Nanodisc eingebettet, was zeigt, dass das zellfreie Expression für den D₃-Rezeptor grundsätzlich sehr vielversprechend ist.

Ob die Rezeptorvarianten trotz der eingeführten Modifikationen überhaupt funktional sind, wurde parallel in HEK-Zellen getestet. Dafür wurden alle deletierten Varianten in HEK-Zellen synthetisiert und auf Ligandenbindung geprüft (5.3.3). Es konnte jedoch keine oder nur sehr schwache Bindung von [³H]Spiperon an die modifizierten D₃-Rezeptoren gemessen werden. Dies kann drauf zurückzuführen sein, dass die Rezeptorgene schlechter exprimiert werden konnten. Der CAI-Wert liegt für die verwendete Gensequenz in Bezug auf Säugerzellen jedoch bei 0,69, weshalb eine Expression der Rezeptorgene sehr wahrscheinlich ist.

Es ist eher anzunehmen, dass die Deletionen am N-Terminus oder dem ICL3 dazu geführt haben könnten, dass der Rezeptor nicht in großen Mengen funktional hergestellt wurde. Min *et al.* zeigten, dass die Dichte des D₂- und D₃-Rezeptors an der Zelloberfläche von HEK-Zellen (Zellmembran) vom N-Terminus und dessen Glykosylierungszustand abhängig ist (Min *et al.*, 2015). Sind keine Glykosylierungen am N-Terminus vorhanden, sinkt die Rezeptordichte in der Zellmembran drastisch ab. Wird der N-Terminus deletiert, könnte dies die gleichen Auswirkungen haben. Zwar könnte der Rezeptor im Endoplasmatischen Retikulum (ER) in die Membran gefaltet werden, aber er würde nicht mehr zur Zellmembran transportiert werden und dann ggf. eher abgebaut werden. Ob der N-Terminus des D₃-Rezeptors für die generelle Faltung des Rezeptors in die Membran im ER wichtig ist, ist unklar.

Weiterhin weisen Veränderungen am ICL3, wie die Fusion des T4-Lysozyms, bereits darauf hin, dass Modifikationen zu einer schlechteren Bindung des Liganden [³H]Spiperons führen (Chien *et al.*, 2010). Die Verkürzungen des ICL3 könnten demnach auch zu strukturellen Veränderungen in der orthosterischen Bindetasche geführt haben, weshalb die Bindung des [³H]Spiperons nicht mehr beobachtet werden konnte.

Um die zellfrei hergestellten Rezeptoren direkt und damit auch den Volllänge-Rezeptor generell auf Ligandenbindung testen und dadurch Rückschlüsse auf die Faltung ziehen zu können, muss der Radioligandenbindungstest für den D₃-Rezeptor in Lösung künftig etabliert werden. Ähnliches wurde für den D_{2L}-Rezeptor bereits gemacht (Basu *et al.*, 2013). Die Herausforderung liegt im Abtrennen von freiem und gebundenem Radioligand, was bei einem Test mit isolierten Membranen klassischer Weise mithilfe eines Filtrationsaufbaus durchgeführt wird. Dies ist für isolierte Rezeptoren aufgrund der zu großen Poren der verwendbaren Filter jedoch problematisch. Stattdessen könnte, wie für den D_{2L}-Rezeptor, die Polyethylenglycol (PEG)-Fällung verwendet werden. Hierbei wird der Rezeptor mit dem gebundenen Radioliganden durch Zugabe von γ -Globulinen und PEG ausgefällt und anschließend mit Zentrifugation abgetrennt. Der ungebundene Radioligand fällt hingegen nicht aus und verbleibt im Überstand. Das Pellet kann anschließend resuspendiert und im Szintillationszähler analysiert werden (Desbuquois & Aurbach, 1971; Plourde *et al.*, 1991). Als Alternative könnte auch die Größenausschlusschromatographie für die Trennung von freiem und gebundenem Liganden verwendet werden (Liu *et al.*, 2002).

Im Vergleich zur Verwendung von *in vivo*-Expressionssystemen wird die zellfreie Herstellung für GPCRs bisher eher wenig verwendet. Dies liegt voraussichtlich daran, dass die Faltung des Polypeptides in einen funktionalen GPCR während der zellfreien Herstellung oftmals schwierig ist. Diese Vermutungen spiegeln sich auch in der Beobachtung wider, dass die Rückfaltung von GPCRs aus Einschlusskörperchen von *E. coli* komplex ist (Milić & Veprintsev, 2015). Die Ausbeute von GPCRs, die mithilfe von zellfreier Expression hergestellt werden konnten, ist bisher eher gering und erreicht oftmals nicht den Wert von 1mg/mL, welcher in der Literatur häufig propagiert wird (Junge *et al.*, 2011). Beispielsweise betrug die Ausbeute von funktionalem β_2 -adrenergen Rezeptor lediglich 51 ng/mL (J.-P. Yang *et al.*, 2011).

Interessant ist auch, dass mit den GPCRs, die zellfrei hergestellt wurden, erst sehr wenige strukturelle Untersuchungen veröffentlicht sind (Kögler *et al.*, 2019). Die beiden Publikationen, in denen zellfrei hergestellte GPCRs anhand von NMR untersucht wurden, betreffen den *Corticotropin-releasing hormone receptor* (Klammt *et al.*, 2011) und eine thermostabilisierte Variante des Neurotensinrezeptors (en2NTS₁) (Shilling *et al.*, 2017). Shilling *et al.* konnte sogar eine sehr hohe Ausbeute an zellfrei hergestelltem en2NTS₁ erreichen (bis zu 2 mg/mL), jedoch zeigten sie in NMR-Experimenten anhand von ¹³C-Methionin markiertem en2NTS₁, dass für den zellfrei hergestellten Rezeptor im Gegensatz

zu dem in *E. coli* hergestellten Rezeptor keine dispergierten Signale mehr detektiert werden konnten. Dies gab Hinweise darauf, dass der zellfrei hergestellte Rezeptor nicht die erwartete Tertiärstruktur aufweist.

Um Konstrukte für die Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ zu finden, die zellfrei hergestellt werden können, sollten Varianten der Rezeptoren in einem Hochdurchsatz-Verfahren getestet werden. Dabei scheint es sinnvoll, zunächst nach Rezeptorvarianten zu screenen, die sich in *in vivo*-Expressionssystemen gut herstellen lassen. Es ist zumindest anzunehmen, dass Rezeptorvarianten zellfrei funktional hergestellt werden können, wenn diese auch funktional in *in vivo*-Systemen hergestellt werden können.

Die Herausforderung bei der zellfreien Expression besteht anschließend im Wesentlichen darin, die richtigen Detergenzien oder Lipidkompositionen zu finden, die zur korrekten Faltung des Rezeptors führen. Über die Faltung von α -helikalen Membranproteinen ist zwar bekannt, dass diese von der primären Aminosäuresequenz abhängig ist und spontan passiert, jedoch ist die Ausbeute auch stark von der Lipidkomposition abhängig (Focke *et al.*, 2016; Harris *et al.*, 2017). Des Weiteren muss die Bildung von Disulfid-Brücken soweit unterbunden werden, dass das Risiko unerwünschter Fehlfaltung minimiert wird. Dafür könnte beispielsweise ein Red/Ox-System in den Reaktionsansatz integriert werden oder die periplasmatische Disulfid-Isomerase DsbC aus *E. coli* sowie Chaperone als Faltungshelfer supplementiert werden (Goerke & Swartz, 2008; Rues *et al.*, 2018). Trotz der Möglichkeiten zur Optimierung wird sich ein gewisser Prozentsatz an fehlgefalteten Rezeptoren vermutlich nicht vermeiden lassen. Um funktionalen Rezeptor aus dem Reaktionsansatz zu isolieren und fehlgefaltetes Protein zu entfernen, sollte daher zukünftig ein Affinitätschromatographieverfahren für die humanen Dopaminrezeptoren entwickelt werden, das auf der Bindung von Rezeptor zu Ligand basiert. Für den β -adrenergen Rezeptor wurde beispielsweise bereits Ende der 1970er Jahre eine Affinitätschromatographiemethode entwickelt, bei welcher der Ligand Alprenolol an Agarose gekoppelt wurde (Vauquelin *et al.*, 1977, 1979). Außerdem wurde in den 1980er Jahren bereits der Ligand Haloperidol für die Reinigung des bovinen D₂-Rezeptors an Sepharose gekoppelt (Ramwani & Mishra, 1986). Dies könnte als Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Affinitätschromatographie für die humanen Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ dienen.

6.4 *E. coli* als Expressionswirt

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Herstellung von rekombinanten humanen Dopaminrezeptoren (D₂ und D₃) in *E. coli*. Die Vorteile der Expression in *E. coli* liegen im Vergleich zu den anderen Systemen eindeutig in der einfachen Handhabung, den geringen Kosten und der schnellen Generationszeit, was Optimierungen beschleunigt (3.3.4.1).

Zwar wurden die Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ bereits in *E. coli* synthetisiert (Vanhauwe *et al.*, 2000), jedoch reichen die Rezeptordichten nicht aus, um ausreichend

Protein für strukturbiochemische Untersuchungen wie Kristallographie und NMR reinigen zu können. Um 1 mg Rezeptor (~45 kDa) aus fünf Litern *E. coli*-Kultur mit einer Zelldichte von 10^9 Zellen/mL reinigen zu können, muss die Rezeptordichte bei mindestens 13 pmol/mg liegen (Sarramegna *et al.*, 2003). Daher wurde die Expression der Gene für die Dopaminrezeptoren in *E. coli* optimiert (5.4).

Die Synthese in *E. coli* erlaubt außerdem die Anwendung von Optimierungsstrategien zur Herstellung rekombinanter GPCRs im Hochdurchsatz-Verfahren (5.4.5), die mit Insektenzellen oder der zellfreien Expression nicht möglich sind.

6.4.1 Synthese der wildtypischen Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃

Im ersten Schritt wurden für den wildtypischen D_{2S}-Rezeptor drei initiale Konstrukte kloniert und die Expression in *E. coli* TOP10 geprüft (5.4.1). Die Expression erfolgte unter dem schwachen *lac*-Promotor. Des Weiteren wurde dem Medium Glukose zugesetzt, um die Basalexpression zu reduzieren. Der Regulationsmechanismus beruht auf der Katabolitrepression (Görke & Stülke, 2008). Außerdem wurde Gensequenz für den Rezeptor verwendet, die für *E. coli* seltenere Codons aufweist, was die Translation des mRNA-Transkripts erschwert. Dadurch kann die Synthese des Rezeptors verringert werden, um die Toxizität für den Expressionswirt zu minimieren.

Der D_{2Swt}-Rezeptor sollte zunächst ohne Fusionsproteine an den beiden Termini hergestellt werden, jedoch konnte keine Synthese des Proteins mithilfe des Western Blots detektiert werden (Abb. 49). Vermutlich ist der Rezeptor nach der Translation direkt wieder abgebaut worden. Dies kann an der fehlenden Signalsequenz liegen, welche benötigt wird, das naszierende Polypeptid während der Translation zur inneren Membran zu transportieren. Die TM1 des D_{2Swt}-Rezeptors kann demnach in *E. coli* vermutlich nicht als Signalanker dienen, wie es in Eukaryoten der Fall ist (Nanoff & Freissmuth, 2012).

Alternativ hätte die Synthese unter Bildung von Einschlusskörperchen stattfinden können. Für die Herstellung von GPCRs in Einschlusskörperchen wird jedoch meist ein Fusionspartner benötigt, wie beispielsweise die Glutathion-S-Transferase (GST) oder das α_5 Integrin-Fragment (α_5) (Banères *et al.*, 2011). Die eigentliche Herausforderung an der Herstellung von GPCRs in Einschlusskörperchen ist die anschließende Rückfaltung im Zuge der Reinigung. Diese ist äußerst schwierig und wurde bisher nur für wenige Rezeptoren erfolgreich durchgeführt, wie dem humanen Chemokinrezeptor 1 (CXCR1) (Park *et al.*, 2012), dem humanen Leukotrien B4 (LTB4) Rezeptor BLT1 (Baneres *et al.*, 2003) oder dem olfaktorischen Rezeptor OR₅ (Kiefer *et al.*, 1996).

Um die Insertion der Dopaminrezeptoren in die innere Membran zu ermöglichen, wurde das MBP an den N-Terminus des D₂-Rezeptors fusioniert. Die Fusion des MBP führte bereits für den humanen Adenosinrezeptors A_{2A} zu einer erfolgreichen Herstellung (Weiss & Grisshammer, 2002). Im Western Blot gegen das MBP war leichter Abbau zu sehen, dennoch

konnte Bindung von [³H]Spiperon gemessen werden (Abb. 50). Der K_D -Wert lag bei $0,28 \pm 0,09$ nM, die maximale Rezeptordichte bei 7 ± 2 Rezeptoren/Zelle, was sehr niedrig ist. Nachdem an den C-Terminus ein weiteres Protein fusioniert wurde (mCherry), konnte die Synthese auf 258 ± 8 Rezeptoren/Zelle erhöht werden. Dies entspricht einer Synthesesteigerung um einen Faktor von ~ 37 . Damit ist die Steigerung der Synthese sogar höher als die für den NTR1, an welchen ein Thioredoxin fusioniert wurde (~ 17 fach) (Tucker & Grisshammer, 1996). Der K_D -Wert von [³H]Spiperon lag für das Konstrukt *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry bei $0,14 \pm 0,04$ nM. Vermutlich schützt das C-terminale Fusionsprotein den Rezeptor vor dem Abbau. Alle darauf aufbauenden Konstrukte für den D_{2S}- und den D₃-Rezeptor wurden daher mit einem C-terminalen Fusionsprotein versehen.

Neben den ganzen Zellen wurde das Membranhomogenat auf Ligandenbindung untersucht. Die Herstellung von Membranhomogenat ist der erste Schritt zur Reinigung von Membranproteinen aus *E. coli*, bei dem die Zellen aufgeschlossen und die Membranen durch Zentrifugation angereichert werden (5.4.1.3). Dies konnte für das Konstrukt *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry und alle nachfolgenden Konstrukte erfolgreich durchgeführt werden. Der K_D -Wert für das Konstrukt *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry lag bei $0,17$ nM, die Rezeptordichte bei $5,4$ pmol/mg. Parallel wurden unter den gleichen Messbedingungen der K_D -Wert ($K_D = 0,12$ nM) und die Rezeptordichte ($5,3$ pmol/mg) für den D_{2Swt}-Rezeptor gemessen, der in HEK-Zellen hergestellt wurde. Sowohl der K_D -Wert als auch die Rezeptordichte sind miteinander vergleichbar.

Insgesamt konnte die Synthese des wildtypischen D_{2S}-Rezeptors unter Verwendung des *lac*-Promotors und der C-terminalen Fusion im Vergleich zur Arbeit von Vanhauwe *et al.* ($1 \pm 0,2$ pmol/mg) im ersten Schritt deutlich gesteigert werden (Vanhauwe *et al.*, 2000). Da die Affinität von [³H]Spiperon an den D_{2Swt}-Rezeptor, der in HEK-Zellen hergestellt wurde, ähnlich zu der in *E. coli* hergestellten Rezeptoren ist, kann daraus geschlossen werden, dass weder die unterschiedliche Lipidkomposition der beiden Organismen, noch die Unterschiede in den PTMs, die Bindeeigenschaften von [³H]Spiperon an den D_{2Swt}-Rezeptor bedeutend beeinflussen.

Neben dem D_{2Swt}-Rezeptor wurde der wildtypische D₃-Rezeptor mit den Fusionsproteinen MBP und mCherry in *E. coli* synthetisiert (5.4.3). Jedoch lag die Rezeptordichte für das Konstrukt *lac*-MBP-D_{3wt}-mCherry mit 45 ± 3 Rezeptoren/Zelle bzw. $0,9$ pmol/mg für das Homogenat deutlich niedriger als für den D_{2Swt}-Rezeptor. Auffällig ist auch, dass die gemessenen K_D -Werte mit $0,51 \pm 0,24$ nM (ganze Zellen) und $0,65$ nM (Homogenat) im Vergleich zur Bindung von [³H]Spiperon an den D_{3wt}-Rezeptor, der in HEK-Zellen hergestellt wurde, ($K_D = 0,17$ nM) schlechter sind (Abb. 65). Gleiches wurde bereits für Synthese des D_{3wt}-Rezeptors in Insektenzellen beobachtet (5.1.2). Anders als beim D_{2Swt}-Rezeptor scheinen die Unterschiede in der Lipidzusammensetzung oder in den PTMs von Säugierzellen zu *E. coli*,

die Affinität von [³H]Spiperon an den D_{3wt}-Rezeptor zu schmälern. Beispielsweise enthalten die Membranen in *E. coli* im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen kein Cholesterin, was die Bindungseigenschaften von Liganden zum Rezeptor, wie z.B. beim humanen μ -Opioid Rezeptor, massiv beeinflussen kann (McCusker *et al.*, 2007). Außerdem könnten fehlende Glykosylierungen eine Rolle spielen.

Insgesamt lassen diese Ergebnisse erkennen, dass die beiden Rezeptoren, obgleich sie zu einer Familie gehören, mit den gleichen G-Proteinen koppeln und eine sehr hohe Sequenzidentität aufweisen, unterschiedlich gut von *E. coli* hergestellt werden können. Es ist anzunehmen, dass die Unterschiede in der primären Aminosäuresequenz und den benötigten PTMs dazu führen, dass der D_{2Swt}-Rezeptor von *E. coli* leichter funktional in die innere Membran gefaltet werden kann. Die genauen Mechanismen in Bezug auf die Faltung von Membranproteinen sind bis dato zu unzureichend verstanden, um den genauen Grund zu kennen sowie Prognosen abzugeben zu können, ob und wie erfolgreich die Herstellung von rekombinanten GPCRs in *E. coli* sein kann (McCusker *et al.*, 2007). Daher muss die Herstellung für jeden Rezeptor individuell getestet und optimiert werden.

6.4.2 Austausch des C-terminalen Fusionsproteins

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Art des C-terminalen Fusionsproteins einen Einfluss auf die Synthese des D_{2Swt}- und D_{3wt}-Rezeptors hat. Dazu wurde an den C-Terminus statt mCherry, eines der Proteine sfGFP, TrxA, oder G_{ai1} fusioniert (5.4.1.1, 5.4.4). Jedoch fiel die Synthese der einzelnen Konstrukte ähnlich aus und es konnten keine eindeutigen Tendenzen beobachtet werden (Tab. 23).

Tab. 23: Austausch des C-terminalen Fusionsproteins - Affinitäten und Rezeptordichten

	Zellen		Homogenat	
	K _D [nM]	B _{MAX} [Rezeptoren/Zelle]	K _D [nM]	B _{MAX} [pmol/mg]
<i>lac</i> -MBP-D _{2Swt} -mCherry	0,14 ± 0,04	256 ± 7	0,17	5,4
<i>lac</i> -MBP-D _{2Swt} -sfGFP	0,13 ± 0,04	325 ± 21	0,13	5,17
<i>lac</i> -MBP-D _{2Swt} -TrxA	0,1 ± 0,04	284 ± 10	0,16	6,35
<i>lac</i> -MBP-D _{2Swt} -G _{ai1}	0,15 ± 0,02	197 ± 23	0,12	2,98
<i>lac</i> -MBP-D _{3wt} -mCherry	0,51 ± 0,24	45 ± 3	0,65	0,91
<i>lac</i> -MBP-D _{3wt} -TrxA	0,76	48	0,63	0,45
<i>lac</i> -MBP-D _{3wt} -G _{ai1}	0,2	13	0,82	0,64

Interessanterweise ist die Synthese des D_{2SWT}-Rezeptors mit G_{αi1} am schlechtesten. Dies könnte daran liegen, dass die Rezeptorfusionen mit G_{αi1} im Vergleich zu den anderen Fusionsproteinen das höchste Molekulargewicht haben (~134 kDa), was die Synthese in *E. coli* erschweren könnte. Insgesamt scheint wichtig zu sein, dass ein Fusionsprotein an den C-Terminus fusioniert wird, aber nicht welches.

6.4.3 Ein stärkerer Promotor verschlechtert die Herstellung des D₂-Rezeptors

Die Synthese des Rezeptors könnte gesteigert werden, indem ein stärkerer Promotor für die Expression verwendet wird. Um dies zu überprüfen, wurde der *lac*-Promotor des Konstrukts *lac*-MBP-D_{2SWT}-mCherry gegen den stärkeren *tac*-Promotor ausgetauscht (*tac*-MBP-D_{2SWT}-mCherry). Die Western Blots zeigten mehr Abbau bei Verwendung des Konstrukts mit dem *tac*-Promotor (5.4.1.2). Im Radioligandenbindungstest wurde für ganze Zellen zunächst ein K_D -Wert von $0,21 \pm 0,02$ nM zu [³H]Spiperon gemessen sowie eine Rezeptordichte von 191 ± 32 Rezeptoren/Zelle. Damit sind die Affinität und die Rezeptordichte tendenziell niedriger als für das Konstrukt mit dem *lac*-Promotor. Wurden die Membranen aus den Zellen isoliert, sank die Affinität ($K_D = 0,82$ nM) und die Rezeptordichte (0,6 pmol/mg) durch den ersten Reinigungsschritt im Vergleich zur Verwendung des *lac*-Promotors nochmals deutlich (Abb. 59). Dies bekräftigt die eingangs angenommene Vermutung, dass *E. coli* aufgrund der höheren Ableserate des Gens die korrekte Faltung des Rezeptors in die Membran nicht mehr gewährleisten kann. Generell wird Toxizität infolge der Überexpression von Genen für Membranproteine häufig beobachtet und auf Schwierigkeiten bei der Unterbringung zusätzlicher Membranproteine in die Zellmembran zurückgeführt. Dies liegt vor allem daran, dass die Kapazität der Enzyme und Proteinkomplexe, welche die Biosynthese von Phospholipiden und die Insertion der Membranproteine in die Membran vermitteln, eingeschränkt ist (Drew *et al.*, 2003; Gubellini *et al.*, 2011). Daher sollte auf die Verwendung von zu starken Promotoren für die Expression der Rezeptorgene besser verzichtet werden.

6.4.4 Aminosäuresubstitutionen steigern die Synthese der Dopaminrezeptoren

Neben dem Einfluss des Promotors und des C-terminalen Fusionsproteins wurde untersucht, ob die Rezeptorproduktion durch den Austausch einzelner Aminosäuren optimiert werden kann (5.4.1.2).

Zum Vergleich wurde eine stabilisierte Variante des NTR1 unter den gleichen Bedingungen synthetisiert wie die Dopaminrezeptoren (Abb. 56). Der K_D -Wert von [³H]Neurotensin an den Rezeptor betrug 0,59 nM und war damit höher als in der Literatur angegeben ($2,3 \pm 0,4$ nM) (Egloff *et al.*, 2014). Die Rezeptordichte lag mit 8600 Rezeptoren/Zelle lag deutlich über dem, was für die Dopaminrezeptoren erreicht wurde. Dies zeigt, wie stark die Herstellung von GPCRs in *E. coli* durch Substituieren von Aminosäuren gesteigert werden kann.

Für die Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ wurden die Aminosäuren substituiert, die auch für die jeweilige Kristallstruktur ausgetauscht wurden. In den D_{2S}-Rezeptor wurden basierend auf dem Konstrukt *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry die Austausche I122A, L346A und L350A nacheinander vorgenommen. Alle Konstrukte konnten erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden (Abb. 54). Der Radioligandenbindungstest zeigte, dass die Rezeptordichte von der Dreifachvariante im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor von 256 ± 7 auf 754 ± 39 Rezeptoren/Zelle gesteigert werden konnte. Der K_D -Wert von [³H]Spiperon lag bei $0,15 \pm 0,08$ nM. Die Steigerung spiegelt sich auch in der Messung für das Homogenat wider (Abb. 59). Hier lag der K_D -Wert bei $0,22$ nM und die Rezeptordichte bei $22,6$ pmol/mg. Im Vergleich zu Vanhauwe *et al.* ist das eine ~22fache Steigerung (Vanhauwe *et al.*, 2000).

In den D₃-Rezeptor wurde der thermostabilisierende Austausch L119W eingeführt (*lac*-MBP-D_{3L119W}-mCherry) (Chien *et al.*, 2010). Die Synthese nahm zwar von 45 ± 3 auf 70 ± 8 Rezeptoren/Zelle leicht zu, jedoch verschlechterte sich die Affinität von [³H]Spiperon ($K_D = 1,02 \pm 0,14$ nM) (Abb. 64). Für das Membranhomogenat lag der K_D -Wert bei $0,58$ nM und die Rezeptordichte bei $0,28$ pmol/mg Protein (Abb. 65), was wiederum für eine bessere Synthese des wildtypischen Rezeptors ($0,91$ pmol/mg) spricht. Um einen eindeutigen Trend festzustellen, müsste die Expression öfter wiederholt und analysiert werden. Nichtsdestotrotz scheint die Substitution L119W keinen bedeutsamen Einfluss auf die Herstellung des D₃-Rezeptors in *E. coli* zu nehmen, weshalb es besonders für den D₃-Rezeptor zwingend erforderlich ist, Aminosäuresubstitutionen zu finden, welche die Synthese steigern. Dabei kann die Optimierungsstrategie mithilfe der gerichteten Evolution helfen, welche genau aus diesem Grund für die Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ etabliert wurde (5.4.5).

6.4.5 Optimierung der Expressionsdauer

Die Expressionsdauer ist ein weiterer Parameter, welcher die Rezeptordichte der Dopaminrezeptoren in der Membran von *E. coli* beeinflussen kann. Alle bisherigen Untersuchungen in *E. coli* basieren auf der Expression der Rezeptorgene über Nacht (20-22h), wie es für den NTR1 ebenfalls durchgeführt wurde (Tucker & Grisshammer, 1996). Interessanterweise exprimierte Vanhauwe *et al.* die Gene der Dopaminrezeptoren lediglich für vier Stunden (Vanhauwe *et al.*, 2000). Daher wurde die Synthese der Dopaminrezeptoren nach kürzeren Expressionsdauern erneut untersucht.

Zu Beginn wurden Wachstumskurven erhoben (Abb. 60). Die Expression durch die Konstrukte *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry und *lac*-MBP-D_{2S I122A,L346A,L350A}-mCherry hatte im Vergleich zu der Kontrolle ohne Rezeptor (*lac*-MBP-mCherry) einen sehr geringen Einfluss auf das Wachstum. Die Verwendung des stärkeren *tac*-Promotors (*tac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry) sorgte jedoch dafür, dass die Zellen das Wachstum nach Induktion der Genexpression weitgehend einstellten. Dies deckt sich mit der Vermutung, dass sich die gesteigerte Synthese auf die Zellen toxisch auswirkt und dadurch weniger funktioneller Rezeptor hergestellt wird (6.4.3). Vermutlich

versuchen die *E. coli* Zellen sehr viel Rezeptor in die Membran einzubauen, von denen ein Großteil fehlgefaltet sein könnte. Bei hohen Einbauraten in die Membran könnte es auch leicht zur Lyse der Zellen aufgrund des limitierten Platzangebotes kommen. Außerdem zeigten Wagner *et al.*, dass die Expression von Genen für Membranproteine zu einem Rückgang von Proteinen führen kann, die Bestandteil der Atmungskette sind, wodurch die Vitalität der Zellen ebenfalls beeinträchtigt wird (Wagner *et al.*, 2007).

Gleiches wurde für den D_{3wt}-Rezeptor beobachtet (*lac*-MBP-D_{3wt}-mCherry, *lac*-MBP-D_{3wt}-TrxA, *lac*-MBP-D_{3wt}-G_{ai1}). Die Zellen stellten das Wachstum ein, nachdem die Genexpression induziert wurde (Abb. 67). Die Herstellung des D₃-Rezeptors ist für die Zellen demnach schwierig. Wie bereits gemutmaßt (6.4.1), könnte dies an den Unterschieden in der primären Aminosäuresequenz des D_{2S}- und D₃-Rezeptors liegen. Um dies genauer zu verstehen, müssen wir zunächst aufklären, wie die Synthese der Membranproteine in *E. coli*, vor allem deren Faltung in die Membran, genau funktioniert.

Die an die Wachstumskurven anschließenden Western Blots lassen für alle untersuchten Konstrukte auf eine Produktzunahme in den ersten Stunden nach Induktion der Genexpression schließen (Abb. 61, Abb. 68). Im Vergleich dazu scheint die Produktausbeute nach Expression über Nacht wieder zurückgegangen zu sein. Um eine genauere Einsicht zu erlangen, wurden nach Expression für 4h und ÜN die Affinitäten von [³H]Spiperon an die Rezeptoren und die Rezeptordichten mithilfe von Radioligandenbindungstests bestimmt (Abb. 62, Abb. 69, Tab. 24).

Tab. 24: Affinitäten und Rezeptordichten nach Expression für 4h und ÜN im Vergleich.

	Zellen				Homogenate			
	K_D [nM]		B_{MAX} [Rezeptoren/Zelle]		K_D [nM]		B_{MAX} [pmol/mg]	
	4h	ÜN	4h	ÜN	4h	ÜN	4h	ÜN
<i>lac</i> -MBP-D _{2Swt} -mCherry	0,25	0,28	423	197	0,16	0,18	8,03	4,81
<i>lac</i> -MBP-D _{2S} I122A,L346A,L350A -mCherry	0,21	0,21	792	470	0,22	0,24	20,86	20,58
<i>lac</i> -MBP-D _{3wt} -mCherry	0,73	0,56	86	38	0,57	0,84	1,84	0,77
<i>lac</i> -MBP-D _{3wt} -TrxA	0,81	0,76	102	48	0,6	0,63	1,12	0,45
<i>lac</i> -MBP-D _{3wt} -G _{ai1}	0,53	0,2	76	13	0,43	0,82	1,68	0,64

Die ermittelten Werte bestätigten die Beobachtungen im Western Blot. Eine kürzere Expressionsdauer ist in jedem Fall ein Vorteil und sollte daher für weitergehende Experimente berücksichtigt werden. Wie zuvor resultierte die Expression in einer besseren Synthese der

D_{2S}-Dreifachvariante im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor. Auch war die Synthese des D₃-Rezeptors wieder deutlich niedriger als die des D_{2S}-Rezeptors. Um jedoch statistisch relevante Aussagen über den genauen Faktor der Optimierung treffen zu können, muss die Expression noch öfter wiederholt werden.

Insgesamt lässt sich anhand der Ergebnisse aussagen, dass die Herstellung des D_{2S}-Rezeptors im Vergleich zur Arbeit von Vanhauwe *et al.* deutlich gesteigert werden konnte (Vanhauwe *et al.*, 2000). Die Expression des Rezeptorgens in *E. coli* TOP10 für vier Stunden bei 20 °C erhöhte die Produktion des D_{2S}-Rezeptors von $1 \pm 0,2$ pmol/mg auf 8 pmol/mg für den D_{2Swt}-Rezeptor, und 21 pmol/mg für die D_{2S}-Dreifachvariante. Vor allem die Rezeptordichte der D₂-Dreifachvariante befindet sich im Vergleich zu anderen GPCRs, die in *E. coli* hergestellt wurden, im oberen Bereich, wodurch die Reinigung des Rezeptors in den benötigten Mengen vielversprechend ist. Die Dichten, die durchschnittlich von GPCRs in *E. coli* erreicht werden, liegen bei $\sim 0,3$ -15 pmol/mg (Sarramegna *et al.*, 2003).

Im Gegensatz dazu war die Synthese des D₃-Rezeptors (~ 100 Rezeptoren/Zelle) in dieser Arbeit im Vergleich zur Vorgehensweise von Vanhauwe *et al.* (~ 355 Rezeptoren/Zelle) deutlich niedriger. Interessanterweise scheint die Expression des D₃-Rezeptorgens unter Kontrolle des stärkeren *tac*-Promotors und ohne das C-terminale Fusionsprotein vielversprechender zu sein und sollte künftig nochmals genauer beleuchtet werden. Nichtsdestotrotz sind C-terminale Fusionsproteine, wie z.B. mCherry, sinnvoll, da diese als Reporterproteine für die Expression verwendet werden können.

6.4.6 Etablierung einer Strategie zur Optimierung der Proteinsynthese

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde eine Strategie zur Optimierung der Expression anhand von gerichteter Evolution für die Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ etabliert. Damit können Varianten des D_{2S}- und D₃-Rezeptors generiert werden, die in *E. coli* mit einer höheren Rezeptordichte hergestellt werden können (3.4). Zwar konnte die Synthese des D_{2S}-Rezeptors durch die Substitutionen I122A, L346A, L350A bereits gut gesteigert werden (792 Rezeptoren/Zelle), jedoch illustrierte die Herstellung des modifizierten NTR1, dass die Produktion von GPCRs in *E. coli* durchaus höher liegen kann (8600 Rezeptoren/Zelle). Notwendig ist dies vor allem auch für die Optimierung der Synthese des D₃-Rezeptors. Außerdem könnten Rezeptorvarianten, die besser von *E. coli* hergestellt werden ggf. auch eine höhere Thermostabilität aufweisen (Sarkar *et al.*, 2008).

Wie in der Einleitung eingangs beschrieben, setzt dieses System die Synthese des jeweiligen Rezeptors in *E. coli* und die Verfügbarkeit eines fluoreszenzmarkierten Liganden voraus (3.4). Die erfolgreiche Synthese der Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ wurde bereits präsentiert (6.4.1). Ein fluoreszenzmarkierter Ligand wurde im Rahmen der Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Peter Gmeiner (LS für Pharmazeutische Chemie, FAU) bereitgestellt.

Im ersten Schritt wurde eine Bibliothek aus Rezeptorvarianten mithilfe von *error-prone* PCR erstellt (5.4.5.1). Dabei wurden zwei Ansätze getestet, um eine Mutationsrate von 0-4,5 Mutationen/kb zu erreichen: **(1)** 10 ng Matrizen-DNA, 30 PCR-Zyklen (Schlinkmann & Plückthun, 2013), **(2)** 100 ng Matrizen-DNA, 23 PCR-Zyklen (GeneMorph II Random Mutagenesis Kit). Diese wurden anschließend mittels CPEC in den Vektor *lac*-MBP-mCherry kloniert (Abb. 70) und *E. coli* mit den entsprechenden Bibliotheken transformiert. Der Umfang lag zwischen $2-8 \times 10^5$ Klonen/Bibliothek (Tab. 22). Bevor die CPEC-Strategie die Klonierung der Bibliotheken für die Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ erfolgreich machte, wurde die Klonierung basierend auf Restriktionsenzymen wie in (Schlinkmann & Plückthun, 2013) durchgeführt. Jedoch resultierte die Verwendung von Restriktionsenzymen (NdeI, HindIII) lediglich in 1300 Klonen/Bibliothek, was im Vergleich zu den Ergebnissen von Schlinkmann *et al.* mit 10^8 Klonen/Bibliothek sehr niedrig ist. Eine ähnliche Tendenz wurde schon für die Klonierung des Gens *lacZ α* in den Expressionsvektor pUC19 beobachtet. Während die Klonierung mit CPEC zur Bildung von $5,6 \times 10^4$ Kolonien/ng Gen-Fragment führte, resultierte die Klonierung mit konventioneller Ligation in $1,2-1,5 \times 10^3$ Kolonien/ng Gen-Fragment (Quan & Tian, 2009, 2011). Daraus lässt sich schließen, dass die Klonierung mit Restriktionsenzymen nicht immer das Mittel der Wahl ist und wie in diesem Fall auch andere Klonierungsstrategien in Betracht gezogen werden müssen. Außerdem bieten Klonierungsmethoden wie CPEC oder die in dieser Arbeit ebenfalls verwendete Gibson-Assemblierung den großen Vorteil, dass sie sequenzunabhängig sind und keine einzigartigen und spezifischen Motive, wie z.B. Schnittstellen für Restriktionsenzyme aufweisen müssen, um die gewünschten Plasmide zu generieren (Quan & Tian, 2009).

Die Sequenzierungen der Bibliotheken ließen bereits die Tendenz erkennen, dass der Einsatz von 10 ng Matrizen-DNA und 30 Zyklen zu vielen Mutationen führte, wohingegen der Einsatz von 100 ng Matrizen-DNA und 23 Zyklen in weniger Mutationen resultierte (Abb. 71, Abb. 72). Daher wurden lediglich von den Bibliotheken D₂-100ng und D₃-100ng Einzelklone auf deren Mutationsrate überprüft und ermittelt wie viele Aminosäuren in den entsprechenden Rezeptorvarianten ausgetauscht wurden. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Mutationen und Substitutionen der Aminosäuren gleichmäßig über das ganze Gen bzw. den ganzen Rezeptor verteilt waren (Abb. 73). Eine Zusammenfassung zu den Mutationen, Aminosäureaustauschen und der Anteil an generierten Stopcodons ist in Tab. 25 zu sehen. Die Ergebnisse bestätigen, dass die Durchführung mit den Angaben im GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (100 ng Matrizen-DNA, 23 Zyklen) die richtige Wahl ist.

Tab. 25: Analyse der Bibliotheken nach Mutationen, ausgetauschte Aminosäuren und Stopcodons.

	D ₂ -100ng			D ₃ -100ng		
	Mutationen	Austausche	Stopcodons	Mutationen	Austausche	Stopcodons
MW	4	3		3	2	
SEM	0,5	0,5	4,8 %	0,5	0,4	5,6 %

MW = Mittelwert; SEM = *standard error of mean*

Als das System der gerichteten Evolution das erste Mal für einen GPCR umgesetzt wurde, wurden mehrere Bibliotheken von Rezeptorvarianten kombiniert, die 3-13 substituierte Aminosäuren enthielten. Nach den ersten vier Selektionsrunden mithilfe von FACS stellte sich heraus, dass Varianten mit 2-3 substituierten Aminosäuren angereichert wurden (Sarkar *et al.*, 2008). Offenbar scheint eine geringe Anzahl an ausgetauschten Aminosäuren vielversprechender zu sein und stimmt auch genau mit der geringen Anzahl an ausgetauschten Aminosäuren überein, die für die Bibliotheken D₂-100ng und D₃-100ng ermittelt wurden.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob die Expression der wildtypischen Rezeptorgene und der generierten Bibliotheken anhand des Reporterproteins mCherry ($\lambda_{\text{Anregung}}/\lambda_{\text{Emission}} = 561/615 \text{ nm}$) mithilfe des Durchflusszytometers untersucht werden kann. Zusätzlich wurde die Bindung des fluoreszenzmarkierten Liganden NMP130 ($\lambda_{\text{Anregung}}/\lambda_{\text{Emission}} = 488/525 \text{ nm}$) an die Rezeptoren analysiert (5.4.5.2). Dieser erlaubt die Selektion von Rezeptoren, die in der Membran gefaltet sind und eine hohe Affinität zum verwendeten Liganden aufweisen.

Die Expression der Konstrukte *lac*-MBP-D_{2Swt}-mCherry und *lac*-MBP-D_{3wt}-mCherry resultierte in einer Fluoreszenzzunahme bei 561/615 nm, was auf das Fusionsprotein mCherry zurückzuführen ist. Außerdem war eine leichte Zunahme der Fluoreszenz bei 488/525 nm zu erkennen, die auf der Bildung von Stoffwechselprodukten während der Expression der Konstrukte basieren könnte. Surre *et al.* zeigten, dass Stressoren die Autofluoreszenz in *E. coli* bei der untersuchten Wellenlänge erhöhen können und dass diese vermutlich durch eine gesteigerte Flavin-Biosynthese verursacht wird (Surre *et al.*, 2018).

Nach der Markierung mit NMP130 war eine Fluoreszenzzunahme bei 488/525 nm zu beobachten, die für die Zellen, in denen die Expression induziert wurde, größer ausfiel, als für die Zellen, in denen die Expression nicht induziert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass NMP130 zwar unspezifisch an die Zellen gebunden hat, die Zunahme der Fluoreszenz bei 488/525 nm jedoch größtenteils auf der spezifischen Bindung an die Rezeptoren beruhen könnte. Obwohl bereits gezeigt wurde, dass die Synthese des D_{2Swt}-Rezeptors deutlich höher ist als die des D_{3wt}-Rezeptors (Tab. 24), konnte beobachtet werden, dass die Fluoreszenzzunahme bei 488/525 nm nach der Markierung mit NMP130 für die Synthese des D_{2Swt}-Rezeptors scheinbar geringer ausfällt als für den D_{3wt}-Rezeptor. Dies könnte darin begründet

sein, dass die Affinität von NMP130 zum D_{2Swt} -Rezeptor ($K_D = 15$ nM) deutlich schlechter ist als zum D_{3wt} -Rezeptor ($K_D = 0,76$ nM) (4.2.19).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob NMP130 spezifisch an die beiden Rezeptoren bindet. Dafür sollte NMP130 durch die Zugabe eines zweiten sehr affinen Liganden (Haloperidol) vom Rezeptor verdrängt werden. Für die Radioligandenbindungstests wurde ein 5000facher Überschuss an unmarkiertem Ligand verwendet (4.2.18). Für die Verdrängung von NMP130 wurde ein 2000facher bzw. 4000facher Überschuss von Haloperidol getestet. (Abb. 76). Die Zugabe von Haloperidol sorgte jedoch für einen Ethanol-Anteil von 4 bzw. 8 % im Markierungsansatz. Die Kontrolle mit Ethanol, aber ohne Haloperidol, deutete bereits darauf hin, dass der Ligand NMP130 nur noch sehr schlecht an den D_{2Swt} -Rezeptor bindet, da die erwartete Fluoreszenzzunahme bei 488/525 nm nicht detektiert werden konnte. Aufgrund dessen konnte wahrscheinlich auch keine Verdrängung von NMP130 anhand einer Fluoreszenzabnahme bei 488/525 nm beobachtet werden, nachdem Haloperidol im Überschuss dazugegeben wurde. Da die Fluoreszenz jedoch nicht vollständig auf das Niveau der erwarteten Fluoreszenz bei unspezifischer Bindung zurückging, ist die unspezifische Bindung von NMP130 vermutlich eher noch verstärkt worden. Auch hierin scheint sich das Problem der niedrigen Affinität von NMP130 zum D_{2Swt} -Rezeptor widerzuspiegeln, denn die Ergebnisse für den D_{3wt} -Rezeptor entsprechen im Gegensatz dazu genau den Erwartungen. Der Ethanol-Anteil im Markierungsansatz resultierte in einer stärkeren Fluoreszenzzunahme bei 488/525 nm, was dafürspricht, dass Bindung von NMP130 an noch mehr D_{3wt} -Rezeptoren stattfinden konnte im Vergleich zu einem Ansatz ohne Ethanol. Außerdem konnte NMP130 durch den 2000fachen Überschuss an Haloperidol bereits teilweise und durch den 4000fachen Überschuss vollständig vom D_{3wt} -Rezeptor verdrängt werden, was die spezifische Bindung von NMP130 an den D_{3wt} -Rezeptor bekräftigt.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die unspezifische Bindung von NMP130 durch einen zusätzlichen Waschschrift während der Probenvorbereitung nach der Markierungsreaktion entfernt werden kann (Abb. 77). Dadurch besteht jedoch auch immer die Gefahr, dass spezifisch gebundener Ligand gewegewaschen werden könnte. Die gilt vor allem dann, wenn auf Rezeptorvarianten selektioniert werden soll, die zu einer höheren Synthese in *E. coli* führen, jedoch eine etwas niedrigere Affinität zum Fluoreszenzliganden aufweisen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Fluoreszenz bei 488/525 nm nach einem weiteren Waschschrift deutlich zurückging. Daher sollte auf diesen Waschschrift verzichtet werden.

Zu guter Letzt wurde die Expression der vier Rezeptorgen-Bibliotheken (D_2 -10ng, D_2 -100ng, D_3 -10ng und D_3 -100ng) in *E. coli* getestet, welche zuvor hergestellt wurden (Abb. 78). Die Fluoreszenzzunahme bei 561/615 nm fiel für die Bibliothek D_2 -10ng größer aus als für die Bibliothek D_2 -100ng, was auf eine bessere Expression für die Bibliothek D_2 -10ng hindeutet. Die Markierung mit NMP130 führte jedoch für beide D_2 -Bibliotheken nur zu einer geringen

Fluoreszenzzunahme bei 488/525 nm, wobei die Zunahme für die Bibliothek D₂-100ng etwas höher ausfiel als für die Bibliothek D₂-10ng.

Für die beiden D₃-Bibliotheken konnte ähnliches beobachtet werden (Abb. 79). Die Zunahme der Fluoreszenz bei 561/615 nm war stärker für die Bibliothek D₃-10ng als für die Bibliothek D₃-100ng. Dies weist zunächst auf eine bessere Expression der D₃-10ng-Bibliothek hin. Nach der Markierung mit NMP130 konnte für die Bibliothek D₃-10ng jedoch keine Fluoreszenzzunahme bei 488/525 nm mehr festgestellt werden, was dafürspricht, dass der Ligand NMP130 nicht an die generierten Rezeptorvarianten binden kann. Hingegen konnte für die Bibliothek D₃-100ng eine Fluoreszenzzunahme bei 488/525 nm nach Markierung mit NMP130 beobachtet werden, obgleich diese nicht so stark ausfiel wie für den wildtypischen D₃-Rezeptor. Die Ergebnisse stützen die Annahme, dass während der *error-prone* PCR durch die Verwendung von 10 ng Matrizen-DNA und 30 Zyklen zu viele Mutationen in den Rezeptorgenen generiert wurden. Entstandene Stopcodons können außerdem dafür gesorgt haben, dass die Translation vorzeitig beendet wird. Weiterhin führt die höhere Rate an ausgetauschten Aminosäuren vermutlich dazu, dass die orthosterische Bindetasche beeinträchtigt ist und der Fluoreszenzligand nicht mehr binden kann. Wird der Ansatz für die niedrige Mutationsrate in der *error-prone* PCR verwendet, wie im GeneMorph II Random Mutagenesis Kit beschrieben, fallen die Veränderungen in der Aminosäuresequenz insgesamt geringer aus. Damit sinkt auch die Wahrscheinlichkeit, dass die Funktion des Rezeptors beeinträchtigt wird, indem zu viele Aminosäuresubstitutionen auf einmal vorgenommen werden. Um die Markierung der D₂-Rezeptorvarianten noch zu optimieren, sollte ein Fluoreszenzligand für den D₂-Rezeptor mit einer höheren Affinität (≤ 1 nM) verwendet werden.

Die grundlegenden Schritte für das System der gerichteten Evolution konnten in dieser Arbeit für die Dopaminrezeptoren D₂ und D₃ somit erfolgreich etabliert werden. Der nachfolgende nächste Schritt wäre, Zellen mithilfe des FACS zu selektionieren, die die höchste Fluoreszenz basierend auf der Markierung mit dem Fluoreszenzliganden aufweisen. Die Herausforderung besteht darin, dass die separierten Zellen nach der Selektion noch vital sind und sich in Medium wieder anziehen lassen. Sarkar *et al.* geben vor, 0,1 bis 1 % der Zellen mit der höchsten Fluoreszenz aus einer Population von 10^7 - 10^8 Zellen zu sortieren (Sarkar *et al.*, 2008). Entsprechende Vorversuche wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits durchgeführt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *Cell Sorter* konnten 500 Zellen/s zuverlässig analysiert werden. Daher ist die Zeit, die für die Sortierung der Zellen benötigt wird, dementsprechend lang (~28h). Das birgt zum einen das Risiko, dass der Fluoreszenzligand wieder dissoziiert, aber vor allem auch, dass die Zellen in der Zwischenzeit in der Pufferumgebung absterben. Werden jedoch zu wenig Zellen für die nächste Selektionsrunde sortiert, erholen sich die Zellen nur schlecht oder verlieren stressbedingt sogar das Plasmid trotz Zugabe von Antibiotikum. Um dies am verwendeten Gerät zu optimieren, müssten eher 10-20 % der Zellen

mit höchster Fluoreszenz aus einer Population sortiert werden, die ca. der dreifachen Anzahl an initialen Klonen der Bibliotheken entspricht, um alle Klone zuverlässig abgedeckt zu haben. Das würde in etwa einer Population von $2,4 \times 10^6$ Zellen entsprechen, womit die benötigte Zeit zur Sortierung auf ca. 1,5h verkürzt werden könnte. Dafür müssten jedoch auch mehr Selektionszyklen durchgeführt werden. Alternativ gibt es auch *Cell Sorter*, mit denen ca. 30000 Zellen/s zuverlässig analysiert werden können, wodurch die Zeit, die für die Selektion benötigt wird, auf ca. 30 min gesenkt wird (Schlinkmann & Plückthun, 2013)

6.5 Ausblick

Wurde die Synthese der humanen Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ mithilfe von gerichteter Evolution gesteigert, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die generierten Varianten eine erhöhte Thermostabilität aufweisen. Dazu können aus *E. coli* isolierte Membranen, in denen der Rezeptor gefaltet ist, bei unterschiedlichen Temperaturen für verschiedene Zeitspannen inkubiert und anschließend mit dem Radioligandenbindungstest untersucht werden. Bindet der Ligand trotz Temperaturbehandlung mit erwarteter Affinität und wird vor und nach Behandlung die gleiche Rezeptordichte bestimmt, kann davon ausgegangen werden, dass der modifizierte Rezeptor im Vergleich zum Wildtypischen eine höhere Thermostabilität aufweist.

Im nächsten Schritt müssen die Rezeptoren gereinigt werden. Da die Reinigung der rekombinanten D_{2S}- und D₃-Rezeptoren nicht erfolgreich sein wird, solange der ICL3 in gesamter Länge vorhanden ist, muss dieser zunächst gekürzt werden. Hilfe hierbei könnte die *Primer-aided truncation for the creation of hybrid proteins* (PATCHY)-Methode bieten, mit der eine Bibliothek aus Rezeptorvarianten hergestellt werden könnte, die unterschiedliche Längen des ICL3 beinhalten (Stabel *et al.*, 2017). Diese müssen im Anschluss mit einem Test bezüglich der Ligandenbindung bzw. G-Protein-Kopplung auf funktionale Rezeptorvarianten mit möglichst kurzem ICL3 durchsucht werden.

Üblicherweise werden Membranproteine im Zuge der Reinigung mithilfe von Detergenzien aus der Membran solubilisiert. Detergenzien können sich jedoch negativ auf die Stabilität der Membranproteine auswirken, was oftmals dazu führt, dass die Membranproteine denaturiert werden. Daher muss die Detergenzstabilität erhöht werden. Für die Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ kann hierzu die *Cellular high-throughput encapsulation, solubilization and screening* (CHESS)-Methode Verwendung finden (Scott & Plückthun, 2013). Die Solubilisierung mit Detergenzien hat den Vorteil, dass die Dopaminrezeptoren hinterher in einer Lipidumgebung z.B. in Form von Nanodiscs rekonstituiert werden können, bei der die Zusammensetzung der Lipide selbst bestimmt werden kann. Die Lipidumgebung kann dabei beispielsweise variiert werden, um ihre Auswirkungen auf die Signalweiterleitung der Dopaminrezeptoren zu untersuchen.

Alle vorgeschlagenen Methoden zur Optimierung von Synthese, Verkürzung des ICL3 und Detergenstabilität haben gemeinsam, dass die Rezeptorvarianten direkt experimentell getestet werden. Dies ist der große Vorteil gegenüber den computergestützten Methoden, wie sie im Rahmen der Herstellung des D₂-Rezeptors für die Cryo-EM-Struktur in der aktiven Konformation verwendet wurden (Yin *et al.*, 2020), denn bekanntermaßen müssen alle rational designten Rezeptorvarianten letztendlich auch experimentell charakterisiert werden, um die vorhergesagten Modifikationen zu prüfen.

Alternativ zu den Detergenzien kann Styren-Maleinsäure-Anhydrid (SMA) für die Solubilisierung verwendet werden. SMA ist ein Polymer, welches sich in die Membran einlagert und spontan kleine SMA-Lipidpartikel (SMALPs) bildet. Dabei agiert SMA als molekulares Schneidwerkzeug, um GPCRs in Abwesenheit von Detergenzien aus der Membran zu schneiden. Gleichzeitig sorgt es für den Erhalt der Lipide, welche die Rezeptoren ringförmig umgeben. Das Ergebnis ist ähnlich zu einer „klassischen“ Nanodisc, bei welcher der Rezeptor von Lipiden und dem MSP umgeben ist. GPCRs in SMALPs haben vergleichbare pharmakologische Eigenschaften, wie membrangebundene GPCRs. Außerdem weisen sie im Vergleich zu Rezeptoren, die mit Detergenzien solubilisiert wurden, eine höhere Stabilität auf (Wheatley *et al.*, 2016).

Können die Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ anschließend mit chromatographischen Methoden im mg-Maßstab gereinigt werden, müssen mit diesen Proteinen die zwingend erforderlichen strukturellen Untersuchungen durchgeführt werden. Bisher gibt es für den D₂-Rezeptor lediglich zwei Strukturen in der inaktiven und eine in der aktiven Konformation (Wang *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2020). Für den D₃-Rezeptor ist bis dato nur eine Struktur in der inaktiven Konformation gelöst (Chien *et al.*, 2010). Für ein besseres Verständnis der beiden Rezeptoren auf molekularer Ebene, müssen deutlich mehr Strukturen mit Kristallographie und Cryo-EM gelöst werden, vor allem in Kombination mit den zytosolischen Interaktionspartnern. Neben der Interaktion mit den G-Proteinen, muss dabei auch die Interaktion des D₂- und D₃-Rezeptors mit Arrestin strukturell analysiert und dessen Auswirkungen auf Organismus beleuchtet werden (Del'Guidice *et al.*, 2011; S. Yang *et al.*, 2016; Donthamsetti *et al.*, 2018). Dabei gilt es vor allem herauszufinden, wie die beiden Rezeptoren zwischen G-Protein-Kopplung und Arrestin-Rekrutierung unterscheiden können. Außerdem ist es sehr wichtig, die Dopaminrezeptoren in Kombination mit unterschiedlichen pharmakologischen Liganden (Agonisten, partielle Agonisten, Antagonisten, inverse Agonisten) strukturell zu untersuchen. Dies kann Hinweise auf die konformelle Zustände während der Aktivierung der Dopaminrezeptoren D_{2S} und D₃ liefern. Zusätzlich helfen diese Daten, die benötigten neuen Liganden zu designen, die sich vor allem durch eine hohe Subtyp-Selektivität auszeichnen müssen (Moritz *et al.*, 2018; Congreve *et al.*, 2020).

Da Methoden wie Kristallographie und Cryo-EM nur begrenzt Aussagen über die Dynamik von Proteinen erlauben, sollten künftig auch NMR-Studien für die weitere Charakterisierung der Dopaminrezeptoren durchgeführt werden. Damit lässt sich das Gleichgewicht der Rezeptoren zwischen den verschiedenen konformellen Zuständen analysieren, welches durch die Bindung von Liganden beeinflusst wird (Bostock *et al.*, 2019)

7. Literaturverzeichnis

- Amarandi, R.-M., Hjortø, G. M., Rosenkilde, M. M., & Karlshøj, S. (2016). Probing Biased Signaling in Chemokine Receptors. *Methods Enzymol*, 570, 155-186. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.09.001>
- Baneres, J.-L., Martin, A., Hullot, P., Girard, J.-P., Rossi, J.-C., & 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(4), 801-814. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00438-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00438-8)
- Banères, J.-L., Popot, J.-L., & Mouillac, B. (2011). New advances in production and functional folding of G protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol*, 29(7), 314-322. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.002>
- Basu, D., Castellano, J. M., Thomas, N., & Mishra, R. K. (2013). Cell-free protein synthesis and purification of human dopamine D₂ receptor long isoform. *Biotechnol Prog*, 29(3), 601-608. <https://doi.org/10.1002/btpr.1706>
- Bayburt, T. H., Grinkova, Y. V., & Sligar, S. G. (2002). Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett*, 2(8), 853-856. <https://doi.org/10.1021/nl025623k>
- Bayburt, T. H., & Sligar, S. G. (2010). Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett*, 584(9), 1721-1727. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.024>
- Beaulieu, J.-M., Espinoza, S., & Gainetdinov, R. R. (2015). Dopamine receptors. IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol*, 172(1), 1-23. <https://doi.org/10.1111/bph.12906>
- Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*, 63(1), 182-217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Bernhard, F., & Tozawa, Y. (2013). Cell-free expression - Making a mark. *Curr Opin Struct Biol*, 23(3), 374-380. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.03.012>
- Blaber, M., Zhang, X., & Matthews, B. W. (1993). Structural Basis of Amino Acid α Helix Propensity. *Science*, 260(5114), 1637-1640. JSTOR. <https://doi.org/10.1126/science.8503008>
- Bond, R. A., Lucero Garcia-Rojas, E. Y., Hegde, A., & Walker, J. K. L. (2019). Therapeutic Potential of Targeting β -Arrestin. *Front Pharmacol*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00124>
- Bostock, M. J., Solt, A. S., & Nietlispach, D. (2019). The role of NMR spectroscopy in mapping the conformational landscape of GPCRs. *Curr Opin Struct Biol*, 57, 145-156. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.030>
- Butini, S., Nikolic, K., Kassel, S., Brückmann, H., Filipic, S., Agbaba, D., Gemma, S., Brogi, S., Brindisi, M., Campiani, G., & Stark, H. (2016). Polypharmacology of dopamine receptor ligands. *Prog Neurobiol*, 142, 68-103. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.03.011>
- Bylund, D. B., & Toews, M. L. (1993). Radioligand binding methods: Practical guide and tips. *Am J Physiol*, 265(5 Pt 1), L421-429. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1993.265.5.L421>
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., & Hamm, H. E. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev*, 24(6), 765-781. <https://doi.org/10.1210/er.2000-0026>
- Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., & Waldeck, B. (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science (New York, N.Y.)*, 127(3296), 471. <https://doi.org/10.1126/science.127.3296.471>
- Chambers, A. C., Aksular, M., Graves, L. P., Irons, S. L., Possee, R. D., & King, L. A. (2018). Overview of the Baculovirus Expression System. *Curr Protoc Protein Sci*, 91, 5.4.1-5.4.6. <https://doi.org/10.1002/cpps.47>
- Chen, I., Dorr, B. M., & Liu, D. R. (2011). A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(28), 11399-11404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101046108>

- Chien, E. Y. T., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Han, G. W., Hanson, M. A., Shi, L., Newman, A. H., Javitch, J. A., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2010). Structure of the human dopamine D₃ receptor in complex with a D₂/D₃ selective antagonist. *Science (New York, N. Y.)*, 330(6007), 1091-1095. <https://doi.org/10.1126/science.1197410>
- Chun, E., Thompson, A. A., Liu, W., Roth, C. B., Griffith, M. T., Katritch, V., Kunken, J., Xu, F., Cherezov, V., Hanson, M. A., & Stevens, R. C. (2012). Fusion Partner Toolchest for the Stabilization and Crystallization of G Protein-Coupled Receptors. *Structure*, 20(6), 967-976. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.04.010>
- Congreve, M., de Graaf, C., Swain, N. A., & Tate, C. G. (2020). Impact of GPCR Structures on Drug Discovery. *Cell*, 181(1), 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.003>
- Del'Guidice, T., Lemasson, M., & Beaulieu, J.-M. (2011). Role of β -Arrestin 2 Downstream of Dopamine Receptors in the Basal Ganglia. *Front Neuroanat*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00058>
- Denisov, I. G., Grinkova, Y. V., Lazarides, A. A., & Sligar, S. G. (2004). Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer nanodiscs with controlled size. *J Am Chem Soc*, 126(11), 3477-3487. <https://doi.org/10.1021/ja0393574>
- Desbuquois, B., & Aurbach, G. D. (1971). Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J Clin Endocrinol Metab*, 33(5), 732-738. <https://doi.org/10.1210/jcem-33-5-732>
- Dodevski, I., & Plückthun, A. (2011). Evolution of three human GPCRs for higher expression and stability. *J Mol Biol*, 408(4), 599-615. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.051>
- Donthamsetti, P., Gallo, E. F., Buck, D. C., Stahl, E. L., Zhu, Y., Lane, J. R., Bohn, L. M., Neve, K. A., Kellendonk, C., & Javitch, J. A. (2018). Arrestin recruitment to dopamine D₂ receptor mediates locomotion but not incentive motivation. *Mol Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0212-4>
- Drew, D., Fröderberg, L., Baars, L., & de Gier, J.-W. L. (2003). Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1610(1), 3-10. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00707-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00707-1)
- Egloff, P., Hillenbrand, M., Klenk, C., Batyuk, A., Heine, P., Balada, S., Schlinkmann, K. M., Scott, D. J., Schütz, M., & Plückthun, A. (2014). Structure of signaling-competent neurotensin receptor 1 obtained by directed evolution in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(6), E655-E662. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317903111>
- Erickson, H. P. (2009). Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biol Proced Online*, 11, 32-51. <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x>
- Fan, L., Tan, L., Chen, Z., Qi, J., Nie, F., Luo, Z., Cheng, J., & Wang, S. (2020). Haloperidol bound D₂ dopamine receptor structure inspired the discovery of subtype selective ligands. *Nat Commun*, 11(1), 1074. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14884-y>
- Fernandez, T. J., De Maria, M., & Lobingier, B. T. (2020). A cellular perspective of bias at G protein-coupled receptors. *Protein Sci*, 29(6):1345-1354. <https://doi.org/10.1002/pro.3872>
- Fikes, J. D., Barkocy-Gallagher, G. A., Klapper, D. G., & Bassford, P. J. (1990). Maturation of *Escherichia coli* maltose-binding protein by signal peptidase I *in vivo*. Sequence requirements for efficient processing and demonstration of an alternate cleavage site. *J Biol Chem*, 265(6), 3417-3423.
- Focke, P. J., Hein, C., Hoffmann, B., Matulef, K., Bernhard, F., Dötsch, V., & Valiyaveetil, F. I. (2016). Combining *In vitro* Folding with Cell-Free Protein Synthesis for Membrane Protein Expression. *Biochemistry*, 55(30), 4212-4219. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00488>
- Franke, B., Opitz, C., Isogai, S., Grahl, A., Delgado, L., Gossert, A. D., & Grzesiek, S. (2018). Production of isotope-labeled proteins in insect cells for NMR. *J Biomol NMR*, 71(3), 173-184. <https://doi.org/10.1007/s10858-018-0172-7>
- Fraser, M. J. (1992). The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic gene expression system. *Curr Top Microbiol Immunol*, 158, 131-172. https://doi.org/10.1007/978-3-642-75608-5_6

- Gaberc-Porekar, V., & Menart, V. (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods*, 49(1), 335-360. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00207-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00207-X)
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Hrsg.), *The Proteomics Protocols Handbook* (S. 571-607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 6(5), 343-345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Gleason, F. K., & Holmgren, A. (1988). Thioredoxin and related proteins in procaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 4(4), 271-297. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02747.x>
- Goddard, A. D., Dijkman, P. M., Adamson, R. J., dos Reis, R. I., & Watts, A. (2015). Reconstitution of membrane proteins: A GPCR as an example. *Methods Enzymol*, 556, 405-424. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.01.004>
- Goerke, A. R., & Swartz, J. R. (2008). Development of cell-free protein synthesis platforms for disulfide bonded proteins. *Biotechnol Bioeng*, 99(2), 351-367. <https://doi.org/10.1002/bit.21567>
- Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol*, 6(8), 613-624. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>
- Grisshammer, R. (2017). New approaches towards the understanding of integral membrane proteins: A structural perspective on G protein-coupled receptors. *Protein Sci*, 26(8), 1493-1504. <https://doi.org/10.1002/pro.3200>
- Grünewald, S., Reiländer, H., & Michel, H. (1996). *In vivo* reconstitution of dopamine D_{2S} receptor-mediated G protein activation in baculovirus-infected insect cells: Preferred coupling to G₁₁ versus G₁₂. *Biochemistry*, 35(48), 15162-15173. <https://doi.org/10.1021/bi960757w>
- Gubellini, F., Verdon, G., Karpowich, N. K., Luff, J. D., Boël, G., Gauthier, N., Handelman, S. K., Ades, S. E., & Hunt, J. F. (2011). Physiological Response to Membrane Protein Overexpression in *E. coli*. *Mol Cell Proteomics*, 10(10). <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.007930>
- Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. (2020). Biased GPCR signaling: Possible mechanisms and inherent limitations. *Pharmacol Ther*, 107540. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107540>
- Harris, N. J., Reading, E., Ataka, K., Grzegorzewski, L., Charalambous, K., Liu, X., Schlesinger, R., Heberle, J., & Booth, P. J. (2017). Structure formation during translocon-unassisted co-translational membrane protein folding. *Sci Rep*, 7(1), 8021. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08522-9>
- Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H., & Surmeier, D. J. (2000). D₂ dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci*, 20(24), 8987-8995. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-24-08987.2000>
- Heydenreich, F. M., Vuckovic, Z., Matkovic, M., & Veprintsev, D. B. (2015). Stabilization of G protein-coupled receptors by point mutations. *Front Pharmacol*, 6, 82. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00082>
- Hill, S. J. (2006). G-protein-coupled receptors: Past, present and future. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S27-37. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706455>
- Hitchman, R. B., Siaterli, E. A., Nixon, C. P., & King, L. A. (2007). Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. *Biotechnol Bioeng*, 96(4), 810-814. <https://doi.org/10.1002/bit.21177>
- Horovitz, A., Matthews, J. M., & Fersht, A. R. (1992). α-Helix stability in proteins: II. Factors that influence stability at an internal position. *J Mol Biol*, 227(2), 560-568. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90907-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90907-2)

- Hu, G.-M., Mai, T.-L., & Chen, C.-M. (2017). Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Sci Rep*, 7(1), 15495. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15707-9>
- Huang, Y., Todd, N., & Thathiah, A. (2017). The role of GPCRs in neurodegenerative diseases: Avenues for therapeutic intervention. *Curr Opin Pharmacol*, 32, 96-110. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.02.001>
- Hübner, H., Haubmann, C., Utz, W., & Gmeiner, P. (2000). Conjugated Enynes as Nonaromatic Catechol Bioisosteres: Synthesis, Binding Experiments, and Computational Studies of Novel Dopamine Receptor Agonists Recognizing Preferentially the D₃ Subtype. *J Med Chem*, 43(4), 756-762. <https://doi.org/10.1021/jm991098z>
- Isogai, S., Deupi, X., Opitz, C., Heydenreich, F., Tsai, C.-J., Brückner, F., Schertler, G., Vepintsev, D., & Grzesiek, S. (2016). Backbone NMR reveals allosteric signal transduction networks in the β_1 -adrenergic receptor. *Nature*, 530. <https://doi.org/10.1038/nature16577>
- Johnson, E. N., & Druey, K. M. (2002). Heterotrimeric G protein signaling: Role in asthma and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 109(4), 592-602. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.122636>
- Junge, F., Schneider, B., Reckel, S., Schwarz, D., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2008). Large-scale production of functional membrane proteins. *Cell Mol Life Sci*, 65(11), 1729-1755. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8067-5>
- Junge, Friederike, Haberstock, S., Roos, C., Stefer, S., Proverbio, D., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2011). Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins. *N Biotechnol*, 28(3), 262-271. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.07.002>
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2012). Diversity and Modularity of G Protein-Coupled Receptor Structures. *Trends Pharmacol Sci*, 33(1), 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.09.003>
- Katti, S. K., LeMaster, D. M., & Eklund, H. (1990). Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J Mol Biol*, 212(1), 167-184. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90313-B](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90313-B)
- Kebabian, J. W., & Calne, D. B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277(5692), 93-96. <https://doi.org/10.1038/277093a0>
- Kiefer, H., Krieger, J., Olszewski, J. D., Von Heijne, G., Prestwich, G. D., & Breer, H. (1996). Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli*: Purification, reconstitution, and ligand binding. *Biochemistry*, 35(50), 16077-16084. <https://doi.org/10.1021/bi9612069>
- Klammt, C., Perrin, M. H., Maslennikov, I., Renault, L., Krupa, M., Kwiatkowski, W., Stahlberg, H., Vale, W., & Choe, S. (2011). Polymer-based cell-free expression of ligand-binding family B G-protein coupled receptors without detergents. *Protein Sci*, 20(6), 1030-1041. <https://doi.org/10.1002/pro.636>
- Klenk, C., Ehrenmann, J., Schütz, M., & Plückthun, A. (2016). A generic selection system for improved expression and thermostability of G protein-coupled receptors by directed evolution. *Sci Rep*, 6, 21294. <https://doi.org/10.1038/srep21294>
- Kögler, L. M., Stichel, J., & Beck-Sickinger, A. G. (2019). Structural investigations of cell-free expressed G protein-coupled receptors. *Biol Chem*, 401(1), 97-116. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0292>
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452-1456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>
- Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 12(2), 857-872. <https://doi.org/10.1093/nar/12.2.857>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Lane, J. R., Abramyan, A. M., Adhikari, P., Keen, A. C., Lee, K.-H., Sanchez, J., Verma, R. K., Lim, H. D., Yano, H., Javitch, J. A., & Shi, L. (2020). Distinct inactive conformations of the dopamine D₂ and D₃ receptors correspond to different extents of inverse agonism. *Elife*, 9, e52189. <https://doi.org/10.7554/eLife.52189>
- Lang, A. E., & Lozano, A. M. (1998a). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, 339(15), 1044-1053. <https://doi.org/10.1056/NEJM199810083391506>
- Lang, A. E., & Lozano, A. M. (1998b). Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*, 339(16), 1130-1143. <https://doi.org/10.1056/NEJM199810153391607>
- Laschet, C., Dupuis, N., & Hanson, J. (2018). The G protein-coupled receptors deorphanization landscape. *Biochem Pharmacol*, 153, 62-74. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.016>
- Lathe, G. H., & Ruthven, C. R. (1955). The separation of substances on the basis of their molecular weights, using columns of starch and water. *Biochem J*, 60(4), xxxiv.
- Lathe, G. H., & Ruthven, C. R. (1956). The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water. *Biochem J*, 62(4), 665-674. <https://doi.org/10.1042/bj0620665>
- Lefkowitz, R. J. (2004). Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 25(8), 413-422. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.06.006>
- Leitz, A. J., Bayburt, T. H., Barnakov, A. N., Springer, B. A., & Sligar, S. G. (2006). Functional reconstitution of β_2 -adrenergic receptors utilizing self-assembling Nanodisc technology. *Biotechniques*, 40(5), 601-612. <https://doi.org/10.2144/000112169>
- Liu, J., Zacco, A., Piser, T. M., & Scott, C. W. (2002). Microplate gel-filtration method for radioligand-binding assays. *Anal Biochem*, 308(1), 127-133. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00227-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00227-0)
- Lu, Y. (2017). Cell-free synthetic biology: Engineering in an open world. *Synth Syst Biotechnol*, 2(1), 23-27. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.02.003>
- Maeda, S., Qu, Q., Robertson, M. J., Skinnot, G., & Kobilka, B. K. (2019). Structures of the M₁ and M₂ muscarinic acetylcholine receptor/G protein complexes. *Science*, 364(6440), 552-557. <https://doi.org/10.1126/science.aaw5188>
- Magnani, F., Shibata, Y., Serrano-Vega, M. J., & Tate, C. G. (2008). Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A_{2a} receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(31), 10744-10749. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804396105>
- Manglik, A., & Kruse, A. C. (2017). Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Activation. *Biochemistry*, 56(42), 5628-5634. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00747>
- Marheineke, K., Grünewald, S., Christie, W., & Reiländer, H. (1998). Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS Lett*, 441(1), 49-52. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01523-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01523-3)
- McAllister, G., Knowles, M. R., Ward-Booth, S. M., Sinclair, H. A., Patel, S., Marwood, R., Emms, F., Patel, S., Smith, A., Seabrook, G. R., & Freedman, S. B. (1995). Functional Coupling of Human D₂, D₃, and D₄ Dopamine Receptors in HEK293 Cells. *J Recept Signal Transduct*, 15(1-4), 267-281. <https://doi.org/10.3109/10799899509045220>
- McCusker, E. C., Bane, S. E., O'Malley, M. A., & Robinson, A. S. (2007). Heterologous GPCR expression: A bottleneck to obtaining crystal structures. *Biotechnol Prog*, 23(3), 540-547. <https://doi.org/10.1021/bp060349b>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Milić, D., & Veprintsev, D. B. (2015). Large-scale production and protein engineering of G protein-coupled receptors for structural studies. *Front Pharmacol*, 6, 66. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00066>
- Milligan, G. (2003). Principles: Extending the utility of [³⁵S]GTPγS binding assays. *Trends Pharmacol Sci*, 24(2), 87-90. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(02)00027-5)

- Milligan, G., & Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: A short history. *Br J Pharmacol*, 147(Suppl 1), S46-S55. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706405>
- Min, C., Zheng, M., Zhang, X., Guo, S., Kwon, K.-J., Shin, C. Y., Kim, H.-S., Cheon, S. H., & Kim, K.-M. (2015). N-linked Glycosylation on the N-terminus of the dopamine D₂ and D₃ receptors determines receptor association with specific microdomains in the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1853(1), 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.024>
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol Rev*, 78(1), 189-225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Moritz, A. E., Free, R. B., & Sibley, D. R. (2018). Advances and Challenges in the Search for D₂ and D₃ Dopamine Receptor-Selective Compounds. *Cell Signal*, 41, 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.07.003>
- Munk, C., Isberg, V., Mordalski, S., Harpsøe, K., Rataj, K., Hauser, A. S., Kolb, P., Bojarski, A. J., Vriend, G., & Gloriam, D. E. (2016). GPCRdb: The G protein-coupled receptor database - an introduction. *Br J Pharmacol*, 173(14), 2195-2207. <https://doi.org/10.1111/bph.13509>
- Nanoff, C., & Freissmuth, M. (2012). ER-bound steps in the biosynthesis of G protein-coupled receptors. *Subcell Biochem*, 63, 1-21. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4765-4_1
- Nasr, M. L., Baptista, D., Strauss, M., Sun, Z.-Y. J., Grigoriu, S., Huser, S., Plückthun, A., Hagn, F., Walz, T., Hogle, J. M., & Wagner, G. (2017). Covalently circularized nanodiscs for studying membrane proteins and viral entry. *Nat Methods*, 14(1), 49-52. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4079>
- Nirenberg, M. W., & Matthaei, J. H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 47(10), 1588-1602. <https://doi.org/10.1073/pnas.47.10.1588>
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., & Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5480), 739-745. <https://doi.org/10.1126/science.289.5480.739>
- Park, S. H., Das, B. B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H. J., Chu, M., Kiefer, H., Maier, K., De Angelis, A. A., Marassi, F. M., & Opella, S. J. (2012). Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature*, 491(7426), 779-783. <https://doi.org/10.1038/nature11580>
- Pédélecq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C., & Waldo, G. S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 24(1), 79-88. <https://doi.org/10.1038/nbt1172>
- Perez, J. G., Stark, J. C., & Jewett, M. C. (2016). Cell-Free Synthetic Biology: Engineering Beyond the Cell. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023853>
- Perreault, M. L., Hasbi, A., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2014). Heteromeric dopamine receptor signaling complexes: Emerging neurobiology and disease relevance. *Neuropsychopharmacology*, 39(1), 156-168. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.148>
- Peterson, Y. K., & Luttrell, L. M. (2017). The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol Rev*, 69(3), 256-297. <https://doi.org/10.1124/pr.116.013367>
- Pivonello, R., Ferone, D., Lombardi, G., Colao, A., Lamberts, S. W. J., & Hofland, L. J. (2007). Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol*, 156 Suppl 1, S13-S21. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02353>
- Plourde, G., Lavoie, J.-P., Rousseau-Mignerou, S., & Nadeau, A. (1991). Validation of the polyethylene glycol precipitation technique for the characterization of rat ventricular β -adrenoceptors. *Anal Biochem*, 192(2), 426-428. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90559-C](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90559-C)

- Porter-Stransky, K. A., & Weinshenker, D. (2017). Arresting the Development of Addiction: The Role of β -Arrestin 2 in Drug Abuse. *J Pharmacol Exp Ther*, 361(3), 341-348. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.240622>
- Pregenzer, J. F., Alberts, G. L., & Im, W. B. (1997). Agonist-induced [35 S]GTP γ S binding in the membranes of *Spodoptera frugiperda* insect cells expressing the human D₃ dopamine receptor. *Neurosci Lett*, 226(2), 91-94. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00251-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00251-6)
- Proverbio, D., Roos, C., Beyermann, M., Orbán, E., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2013). Functional properties of cell-free expressed human endothelin A and endothelin B receptors in artificial membrane environments. *Biochim Biophys Acta*, 1828(9), 2182-2192. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.031>
- Pucadyil, T. J., & Chattopadhyay, A. (2004). Cholesterol modulates ligand binding and G protein coupling to serotonin_{1A} receptors from bovine hippocampus. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1663(1), 188-200. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.03.010>
- Puigbò, P., Bravo, I. G., & Garcia-Vallve, S. (2008). CAIcal: A combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biol Direct*, 3, 38. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-38>
- Quan, J., & Tian, J. (2009). Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways. *PLoS One*, 4(7), e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
- Quan, J., & Tian, J. (2011). Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat Protoc*, 6(2), 242-251. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.181>
- Ramwani, J., & Mishra, R. K. (1986). Purification of bovine striatal dopamine D₂ receptor by affinity chromatography. *J Biol Chem*, 261(19), 8894-8898.
- Rasmussen, S. G. F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R. P., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F. X., Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2007). Crystal structure of the human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Nature*, 450(7168), 383-387. <https://doi.org/10.1038/nature06325>
- Rasmussen, S. G. F., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T. A., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., & Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the β_2 -adrenergic receptor-G_s protein complex. *Nature*, 477(7366), 549-555. <https://doi.org/10.1038/nature10361>
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(6), 1760-1765. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>
- Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(7), 3116-3120. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.7.3116>
- Rigaud, J.-L., Levy, D., Mosser, G., & Lambert, O. (1998). Detergent removal by non-polar polystyrene beads. *Eur Biophys J*, 27(4), 305-319. <https://doi.org/10.1007/s002490050138>
- Roos, C., Kai, L., Haberstoch, S., Proverbio, D., Ghoshdastider, U., Ma, Y., Filipek, S., Wang, X., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2014). High-level cell-free production of membrane proteins with nanodiscs. *Methods Mol Biol*, 1118, 109-130. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-782-2_7
- Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G. F., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H.-J., Yao, X.-J., Weis, W. I., Stevens, R. C., & Kobilka, B. K. (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β_2 -adrenergic receptor function. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5854), 1266-1273. <https://doi.org/10.1126/science.1150609>

- Ross, E. M., & Gilman, A. G. (1977). Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem*, 252(20), 6966-6969.
- Roth, C. B., Hanson, M. A., & Stevens, R. C. (2008). Stabilization of the human β_2 -adrenergic receptor TM4-TM3-TM5 helix interface by mutagenesis of Glu122(3.41), a critical residue in GPCR structure. *J Mol Biol*, 376(5), 1305-1319.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.028>
- Rues, R.-B., Dong, F., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2018). Systematic optimization of cell-free synthesized human endothelin B receptor folding. *Methods*, 147, 73-83.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.01.012>
- Rues, R.-B., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2016). Co-translational formation and pharmacological characterization of β_1 -adrenergic receptor/nanodisc complexes with different lipid environments. *Biochim Biophys Acta*, 1858(6), 1306-1316.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.031>
- Rues, R.-B., Henrich, E., Boland, C., Caffrey, M., & Bernhard, F. (2016). Cell-Free Production of Membrane Proteins in *Escherichia coli* Lysates for Functional and Structural Studies. *Methods Mol Biol*, 1432, 1-21.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3637-3_1
- Saarenpää, T., Jaakola, V.-P., & Goldman, A. (2015). Baculovirus-Mediated Expression of GPCRs in Insect Cells. *Methods Enzymol*, 556, 185-218.
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.12.033>
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T. I., & Overington, J. P. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 16(1), 19-34.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>
- Sari, D., Gupta, K., Thimiri Govinda Raj, D. B., Aubert, A., Drncová, P., Garzoni, F., Fitzgerald, D., & Berger, I. (2016). The MultiBac Baculovirus/Insect Cell Expression Vector System for Producing Complex Protein Biologics. *Adv Exp Med Biol*, 896, 199-215. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27216-0_13
- Sarkar, C. A., Dodevski, I., Kenig, M., Dudli, S., Mohr, A., Hermans, E., & Plückthun, A. (2008). Directed evolution of a G protein-coupled receptor for expression, stability, and binding selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(39), 14808-14813.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0803103105>
- Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P., & 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(8), 1529-1546.
<https://doi.org/10.1007/s00018-003-3168-7>
- Scatchard, G. (1949). The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann NY Acad Sci*, 51(4), 660-672.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1949.tb27297.x>
- Schlinkmann, K. M., & Plückthun, A. (2013). Directed evolution of G protein-coupled receptors for high functional expression and detergent stability. *Methods Enzymol*, 520, 67-97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391861-1.00004-6>
- Schneider, E. H., & Seifert, R. (2010). Sf9 cells: A versatile model system to investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, 128(3), 387-418. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.07.005>
- Schwarz, D., Klammt, C., Koglin, A., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2007). Preparative scale cell-free expression systems: New tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods*, 41(4), 355-369. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.001>
- Scott, D. J., & Plückthun, A. (2013). Direct Molecular Evolution of Detergent-Stable G Protein-Coupled Receptors Using Polymer Encapsulated Cells. *J Mol Biol*, 425(3), 662-677. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.11.015>
- Seifert, R., Wenzel-Seifert, K., & Kobilka, B. K. (1999). GPCR-G α fusion proteins: Molecular analysis of receptor - G-protein coupling. *Trends Pharmacol Sci*, 20(9), 383-389.
[https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01368-1](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01368-1)

- Serdiuk, T., Steudle, A., Mari, S. A., Manioglu, S., Kaback, H. R., Kuhn, A., & Müller, D. J. (2019). Insertion and folding pathways of single membrane proteins guided by translocases and insertases. *Sci Adv*, 5(1), eaau6824. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau6824>
- Sharp, P. M., & Li, W.-H. (1987). The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res*, 15(3), 1281-1295. <https://doi.org/10.1093/nar/15.3.1281>
- Shilling, P. J., Bumbak, F., Scott, D. J., Bathgate, R. A. D., & Gooley, P. R. (2017). Characterisation of a cell-free synthesised G protein-coupled receptor. *Sci Rep*, 7(1), 1094. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01227-z>
- Simon, M. I., Strathmann, M. P., & Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5007), 802-808. <https://doi.org/10.1126/science.1902986>
- Skerra, A., & Schmidt, T. G. (2000). Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol*, 326, 271-304. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)26060-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)26060-6)
- Skretas, G., & Georgiou, G. (2009). Genetic Analysis of G Protein-Coupled Receptor Expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 102(2), 357-367. <https://doi.org/10.1002/bit.22097>
- Spano, P. F., Govoni, S., & Trabucchi, M. (1978). Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 19, 155-165.
- Stabel, R., Stüven, B., Ohlendorf, R., & Möglich, A. (2017). Primer-Aided Truncation for the Creation of Hybrid Proteins. *Methods Mol Biol*, 1596, 287-304. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6940-1_18
- Surre, J., Saint-Ruf, C., Collin, V., Orenge, S., Ramjeet, M., & Matic, I. (2018). Strong increase in the autofluorescence of cells signals struggle for survival. *Sci Rep*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30623-2>
- Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J.-A., Nairn, A. C., & Greengard, P. (2004). DARPP-32: An integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 269-296. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121415>
- Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X.-Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G Proteins. *J Mol Biol*, 428(19), 3850-3868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Tucker, J., & Grisshammer, R. (1996). Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 317 (Pt 3), 891-899. <https://doi.org/10.1042/bj3170891>
- Vallone, D., Picetti, R., & Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*, 24(1), 125-132. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(99\)00063-9](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(99)00063-9)
- Vanhauwe, J. F., Jossion, K., Luyten, W. H., Driessen, A. J., & Leysen, J. E. (2000). G protein sensitivity of ligand binding to human dopamine D₂ and D₃ receptors expressed in *Escherichia coli*: Clues for a constrained D₃ receptor structure. *J Pharmacol Exp Ther*, 295(1), 274-283.
- Vauquelin, G., Geynet, P., Hanoune, J., & Strosberg, A. D. (1977). Isolation of adenylate cyclase-free, β -adrenergic receptor from turkey erythrocyte membranes by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(9), 3710-3714. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.9.3710>
- Vauquelin, G., Geynet, P., Hanoune, J., & Strosberg, A. D. (1979). Affinity chromatography of the β -adrenergic receptor from turkey erythrocytes. *Eur J Biochem*, 98(2), 543-556. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb13215.x>
- Wacker, D., Stevens, R. C., & Roth, B. L. (2017). How ligands illuminate GPCR molecular pharmacology. *Cell*, 170(3), 414-427. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.009>

- Wagner, S., Baars, L., Ytterberg, A. J., Klussmeier, A., Wagner, C. S., Nord, O., Nygren, P.-A., van Wijk, K. J., & de Gier, J.-W. (2007). Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics*, 6(9), 1527-1550. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600431-MCP200>
- Wang, J., Gareri, C., & Rockman, HA. (2018). G Protein-Coupled Receptors in Heart Disease. *Circ Res*, 123(6), 716-735. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311403>
- Wang, S., Che, T., Levit, A., Shoichet, B. K., Wacker, D., & Roth, B. L. (2018). Structure of the D₂ dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone. *Nature*, 555(7695), 269-273. <https://doi.org/10.1038/nature25758>
- Wang, S., Wacker, D., Levit, A., Che, T., Betz, R. M., McCorvy, J. D., Venkatakrishnan, A. J., Huang, X.-P., Dror, R. O., Shoichet, B. K., & Roth, B. L. (2017). D₄ dopamine receptor high-resolution structures enable the discovery of selective agonists. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6361), 381-386. <https://doi.org/10.1126/science.aan5468>
- Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem*, 87, 897-919. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033910>
- Weiss, H. M., & Grishammer, R. (2002). Purification and characterization of the human adenosine A_{2a} receptor functionally expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 269(1), 82-92. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2002.02618.x>
- Wheatley, M., Charlton, J., Jamshad, M., Routledge, S. J., Bailey, S., La-Borde, P. J., Azam, M. T., Logan, R. T., Bill, R. M., Dafforn, T. R., & Poyner, D. R. (2016). GPCR-styrene maleic acid lipid particles (GPCR-SMALPs): Their nature and potential. *Biochem Soc Trans*, 44(2), 619-623. <https://doi.org/10.1042/BST20150284>
- Wiktor, M., Morin, S., Sass, H.-J., Kebbel, F., & Grzesiek, S. (2013). Biophysical and structural investigation of bacterially expressed and engineered CCR5, a G protein-coupled receptor. *J Biomol NMR*, 55(1), 79-95. <https://doi.org/10.1007/s10858-012-9688-4>
- Wilde, M., Klausberger, M., Palmberger, D., Ernst, W., & Grabherr, R. (2014). Tnao38, high five and Sf9 - evaluation of host-virus interactions in three different insect cell lines: Baculovirus production and recombinant protein expression. *Biotechnol Lett*, 36(4), 743-749. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1429-6>
- Wiseman, D. N., Otchere, A., Patel, J. H., Uddin, R., Pollock, N. L., Routledge, S. J., Rothnie, A. J., Slack, C., Poyner, D. R., Bill, R. M., & Goddard, A. D. (2020). Expression and purification of recombinant G protein-coupled receptors: A review. *Protein Expr Purif*, 167, 105524. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.105524>
- Yan, Z., Song, W. J., & Surmeier, J. (1997). D₂ dopamine receptors reduce N-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol*, 77(2), 1003-1015. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.1003>
- Yang, J.-P., Cirico, T., Katzen, F., Peterson, T. C., & Kudlicki, W. (2011). Cell-free synthesis of a functional G protein-coupled receptor complexed with nanometer scale bilayer discs. *BMC Biotechnol*, 11, 57. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-57>
- Yang, S., Ben-Shalom, R., Ahn, M., Liptak, A. T., van Rijn, R. M., Whistler, J. L., & Bender, K. J. (2016). β -Arrestin-Dependent Dopaminergic Regulation of Calcium Channel Activity in the Axon Initial Segment. *Cell Rep*, 16(6), 1518-1526. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.098>
- Yeliseev, A. A., Wong, K. K., Soubias, O., & Gawrisch, K. (2005). Expression of human peripheral cannabinoid receptor for structural studies. *Protein Sci*, 14(10), 2638-2653. <https://doi.org/10.1110/ps.051550305>
- Yin, J., Chen, K.-Y. M., Clark, M. J., Hijazi, M., Kumari, P., Bai, X.-C., Sunahara, R. K., Barth, P., & Rosenbaum, D. M. (2020). Structure of a D₂ dopamine receptor - G protein complex in a lipid membrane. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2379-5>
- Yokogawa, M., Fukuda, M., & Osawa, M. (2019). Nanodiscs for Structural Biology in a Membranous Environment. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 67(4), 321-326. <https://doi.org/10.1248/cpb.c18-00941>

- Zhang, R., & Xie, X. (2012). Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*, 33(3), 372-384. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.173>
- Zhao, J., Deng, Y., Jiang, Z., & Qing, H. (2016). G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Alzheimer's Disease: A Focus on BACE1 Related GPCRs. *Front Aging Neurosci*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00058>
- Zou, Y., Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2012). N-terminal T4 lysozyme fusion facilitates crystallization of a G protein-coupled receptor. *PloS One*, 7(10), e46039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046039>
- Zweemer, A. J. M., Toraskar, J., Heitman, L. H., & IJzerman, A. P. (2014). Bias in chemokine receptor signalling. *Trends Immunol*, 35(6), 243-252. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.02.004>

8. Abkürzungsverzeichnis

A ₂₂₀	Absorption bei 220 nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
AC	Adenylylzyklase
AcNPV	<i>Autographa californica nuclear polyhedrosis virus</i>
Amp	Ampicillin
AP-2	<i>vesicular transport adaptor protein</i>
ApoA1	Apolipoprotein A1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
<i>bla</i>	Gen für β -Lactamase
Bluo-Gal	5-Bromo-3-indolyl β -D-galactopyranosid
B _{MAX}	maximale Rezeptordichte
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHESS	<i>Cellular high-throughput encapsulation, solubilization and screening</i>
CHS	Cholesteryl-Hemisuccinat
Cryo-EM	<i>Transmission electron cryomicroscopy</i>
CPEC	<i>Circular Polymerase Extension Cloning</i>
CXCR1	Chemokinrezeptor 1
DAG	Diacylglycerol
DARPP-32	Dopamin- und cAMP-reguliertes-Phosphoprotein
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-Maltopyranosid
DMPG	1,2-Dimyris-toyl-sn-Glycero-3-Phosphoglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoglycerol
DTT	Dithiothreitol
ECL1-3	extrazelluläre Schleifen 1-3
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPCR	<i>error-prone</i> PCR
EPR	<i>Electron paramagnetic resonance</i>
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ERKs	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAU	Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
GB	Gesamtbindung
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
Gent	Gentamycin

GIRK	<i>G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GRKs	G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Haemagglutinin
HDL	<i>High-Density</i> Lipoprotein-Partikel
HK	Hauptkultur
IAA	2-Iodacetamid
ICL1-3	intrazelluläre Schleifen 1-3
α_5 I	α_5 Integrin-Fragment
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
korr SpezB	korrigierte spezifische Bindung
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LS	Lehrstuhl
MBP	Maltosebindeprotein
MOI	Multiplizität der Infektion
MSP	<i>membrane scaffold protein</i>
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NTPs	Nukleosidtriphosphate
NTR1	Neurotensinrezeptor 1 aus <i>Rattus</i>
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ori	Replikationsursprung
PA-Gele	Polyacrylamid-Gele
PATCHY	<i>Primer-aided truncation for the creation of hybrid proteins</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMF	Peptidmassen-Fingerprint
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMTs	Photomultiplier

POPG	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoglycerol
PTM	posttranslationale Modifikation
RM	Reaktionsmix
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>standard error of mean</i>
sfGFP	<i>superfolder GFP</i>
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SMA	Styren-Maleinsäure-Anhydrid
SMALPs	<i>styrene maleic acid lipid particles</i>
SOC-Medium	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression-Medium</i>
SpezB	spezifische Bindung
SV	Säulenvolumen
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TM	transmembrane Helix
<i>T. ni</i>	<i>Trichoplusia ni</i>
tRNA	Transfer-RNA
UB	unspezifische Bindung
UBT	Universität Bayreuth
ÜN	über Nacht
V0	initiale Virengeneration
V1	Virengeneration 1
V2	Virengeneration 2
VK	Vorkultur
VM	Versorgungsmix

9. Anhang

9.1 Verwendete Plasmide

Tab. 26: Verwendete Plasmide.

Plasmide	Rezeptor-variante	Resistenz	Promotor	Fusion N-Term.	Fusion C-Term.	Verkürzungen	Oligodesoxy-nukleotide	Herkunft
pEX-K4-D ₃ - <i>T.ni</i>	wt	Kan						Eurofins Genomics
pACEBac1-D ₃ wt	wt	Gent	polyhedrin	HA, FLAG	TEV, Twin-Strep		1,2;3,4	diese Arbeit
pET28a-MSP1E3D1		Kan	T7	His ₆ , TEV				Dr. Frank Bernhard, Universität Frankfurt
pET28a-cMSP1E3D1		Kan	T7	His ₆ , TEV	LPGTG, His ₆		5,6;7,8	diese Arbeit
pET29-Sortase		Kan	T7		His ₆			<i>addgene</i> Plasmid #75144, Prof. David R. Liu, Harvard University
pEX-K4-D ₃ - <i>E. coli</i>	L119W	Kan						Eurofins Genomics
pET21a-D ₃	L119W	Amp	T7	KPYDGP	sfGFP, Strep		9,10;11,12	diese Arbeit
pEX-A2-D ₃ ΔR222-R318	L119W	Amp				ΔM1-Y31, ΔR222-R318		Eurofins Genomics
pET21a-D ₃ ΔR222-R318	L119W	Amp	T7	KPYDGP	sfGFP, Strep	ΔM1-Y31, ΔR222-R318	9,10;11,12	diese Arbeit
pET21a-D ₃ ΔT225-L315	L119W	Amp	T7	KPYDGP	sfGFP, Strep	ΔM1-Y31, ΔT225-L315	13,14;15,16	diese Arbeit
pET21a-D ₃ ΔN228-L310	L119W	Amp	T7	KPYDGP	sfGFP, Strep	ΔM1-Y31, ΔN228-L310	17,14;18,16	diese Arbeit

pEX-A2-D ₃ ΔR222-R318-Cys	C37A, C51A, C102A, C114A, C122A, C147A, C166A, C400S	Amp				ΔM1-Y31, ΔR222-R318		Eurofins Genomics
pET21a-D ₃ ΔR222-R318-Cys	C37A, C51A, C102A, C114A, C122A, C147A, C166A, C400S	Amp	T7	KPYDGP	sfGFP, Strep	ΔM1-Y31, ΔR222-R318	19,20;21,22	diese Arbeit
pET21a-D ₃ ΔT225-L315-Cys	C37A, C51A, C102A, C114A, C122A, C147A, C166A, C400S	Amp	T7	KPYDGP	sfGFP, Strep	ΔM1-Y31, ΔT225-L315	13,14,15,16	diese Arbeit
pET21a-D ₃ ΔN228-L310-Cys	C37A, C51A, C102A, C114A, C122A, C147A, C166A, C400S	Amp	T7	KPYDGP	sfGFP, Strep	ΔM1-Y31, ΔN228-L310	17,14;18,16	diese Arbeit
pcDNA3.1-D ₃	wt	Amp	CMV					Dr. Dorotheé Weikert, FAU
pcDNA3.1-D _{2S}	wt	Amp	CMV					Dr. Dorotheé Weikert, FAU
pcDNA3.1-D ₃ ΔR222-R318	L119W	Amp	CMV			ΔM1-Y31, ΔR222-R318	23,24;25,26	diese Arbeit
pcDNA3.1-D ₃ ΔT225-L315	L119W	Amp	CMV			ΔM1-Y31, ΔT225-L315	23,24;25,26	diese Arbeit
pcDNA3.1-D ₃ ΔN228-L310	L119W	Amp	CMV			ΔM1-Y31, ΔN228-L310	23,24;25,26	diese Arbeit
pcDNA3.1-D ₃ ΔR222-R318-Cys	C37A, C51A, C102A, C114A, C122A, C147A, C166A, C400S	Amp	CMV			ΔM1-Y31, ΔR222-R318	27,24;28,29	diese Arbeit
pcDNA3.1-D ₃ ΔT225-L315-Cys	C37A, C51A, C102A, C114A, C122A, C147A, C166A, C400S	Amp	CMV			ΔM1-Y31, ΔT225-L315	27,24;28,29	diese Arbeit
pcDNA3.1-D ₃ ΔN228-L310-Cys	C37A, C51A, C102A, C114A, C122A, C147A, C166A, C400S	Amp	CMV			ΔM1-Y31, ΔN228-L310	27,24;28,29	diese Arbeit

<i>lac</i> -MBP		Amp	lac			16,30;31,14	diese Arbeit
pEX-K4-D _{2Swt}	wt	Kan					Eurofins Genomics
<i>lac</i> -D _{2Swt}	wt	Amp	lac			16,32;33,14	diese Arbeit
pET28c-mCherry		Kan					Prof. Andreas Möglich, UBT
<i>lac</i> -MBP-mCherry		Amp	lac			34,35;36,37	diese Arbeit
<i>lac</i> -MBP-D _{2Swt}	wt	Amp	lac	MBP		16,38;39,14	diese Arbeit
<i>lac</i> -MBP-D _{2Swt} -mCherry	wt	Amp	lac	MBP	TEV, mCherry	40,41;42,43	diese Arbeit
<i>lac</i> -MBP-D _{2S} I122A-mCherry	I122A	Amp	lac	MBP	TEV, mCherry	44,45	diese Arbeit
<i>lac</i> -MBP-D _{2S} L346A,L350A-mCherry	L346A, L350A	Amp	lac	MBP	TEV, mCherry	46,47	diese Arbeit
<i>lac</i> -MBP-D _{2S} I122A,L346A,L350A-mCherry	I122A, L346A, L350A	Amp	lac	MBP	TEV, mCherry	44,45	diese Arbeit
<i>tac</i> -MBP-D _{2Swt} -mCherry	wt	Amp	tac	MBP	TEV, mCherry	40,41;42,43	diese Arbeit
<i>lac</i> -MBP-sfGFP		Amp	lac			48,49;50,51	diese Arbeit
<i>lac</i> -MBP-D _{2Swt} -sfGFP	wt	Amp	lac	MBP	TEV, sfGFP	40,41;42,43	diese Arbeit
pET32a-TrxA		Amp					LS Biochemie IV, UBT
<i>lac</i> -MBP-D _{2Swt} -TrxA	wt	Amp	lac	MBP	TEV, TrxA	52,53;54,55	diese Arbeit
pEX-K248-Gai1		Kan					Eurofins Genomics
<i>lac</i> -MBP-D _{2Swt} -Gai1	wt	Amp	lac	MBP	TEV, Gai1	56,57;58,59	diese Arbeit
<i>lac</i> -MBP-D _{3wt} -mCherry	wt	Amp	lac	MBP	TEV, mCherry	16,60;61,14	diese Arbeit
<i>lac</i> -MBP-D ₃ L119W-mCherry	L119W	Amp	lac	MBP	TEV, mCherry	62,63;64,65	diese Arbeit
<i>lac</i> -MBP-D _{3wt} -sfGFP	wt	Amp	lac	MBP	TEV, sfGFP	16,60;61,14	diese Arbeit
<i>lac</i> -MBP-D ₃ L119W-sfGFP	L119W	Amp	lac	MBP	TEV, sfGFP	62,63;64,65	diese Arbeit
<i>lac</i> -MBP-D _{3wt} -Trx	wt	Amp	lac	MBP	TEV, Trx	52,53;54,55	diese Arbeit

<i>lac</i> -MBP-D _{3wt} -Gai1	wt	Amp	lac	MBP	TEV, Gai1		56,57;58,59	diese Arbeit
pEX-K248-NTR ₁	A86L, H103D, H105Y, A161V, R167L, R213L, V234L, I253A, H305R, F358V, S362A	Kan				ΔM1-A49, ΔV280-I295, ΔP389-Y424		Eurofins Genomics
<i>lac</i> -MBP-NTR ₁ -mCherry	A86L, H103D, H105Y, A161V, R167L, R213L, V234L, I253A, H305R, F358V, S362A	Amp	lac	MBP	TEV, mCherry	ΔM1-A49, ΔV280-I295, ΔP389-Y424	66,67;68,69	diese Arbeit

9.2 Sequenzen

cMSP1E3D1

Gelb: His₆-Anhang, Pink: TEV-Schnittstelle, Cyan: Sortase-Erkennungssequenz

```

ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAT CAT GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC AGC ACC TTT < 60
M G S S H H H H H H E N L Y F Q G S T F
AGC AAA CTG CGT GAA CAG CTG GGC CCG GTG ACC CAG GAA TTT TGG GAT AAC CTG GAA AAA < 120
S K L R E Q L G P V T Q E F W D N L E K
GAA ACC GAA GGC CTG CGT CAG GAA ATG AGC AAA GAT CTG GAA GAG GTG AAA GCG AAA GTG < 180
E T E G L R Q E M S K D L E E V K A K V
CAG CCG TAT CTG GAT GAC TTT CAG AAA AAA TGG CAG GAA GAG ATG GAA CTG TAT CGT CAG < 240
Q P Y L D D F Q K K W Q E E M E L Y R Q
AAA GTG GAA CCG CTG CGT GCG GAA CTG CAG GAA GGC GCG CGT CAG AAA CTG CAT GAA CTG < 300
K V E P L R A E L Q E G A R Q K L H E L
CAG GAA AAA CTG AGC CCG CTG GGC GAA GAG ATG CGT GAT CGT GCG CGT GCG CAT GTG GAT < 360
Q E K L S P L G E E M R D R A R A H V D
GCG CTG CGT ACC CAT CTG GCG CCG TAT CTG GAT GAC TTT CAG AAA AAA TGG CAG GAA GAG < 420
A L R T H L A P Y L D D F Q K K W Q E E
ATG GAA CTG TAT CGT CAG AAA GTG GAA CCG CTG CGT GCG GAA CTG CAG GAA GGC GCG CGT < 480
M E L Y R Q K V E P L R A E L Q E G A R
CAG AAA CTG CAT GAA CTG CAG GAA AAA CTG AGC CCG CTG GGC GAA GAG ATG CGT GAT CGT < 540
Q K L H E L Q E K L S P L G E E M R D R
GCG CGT GCG CAT GTG GAT GCG CTG CGT ACC CAT CTG GCG CCG TAT AGC GAT GAA CTG CGT < 600
A R A H V D A L R T H L A P Y S D E L R
CAG CGT CTG GCG GCC CGT CTG GAA GCG CTG AAA GAA AAC GGC GGT GCG CGT CTG GCG GAA < 660
Q R L A A R L E A L K E N G G A R L A E
TAT CAT GCG AAA GCG ACC GAA CAT CTG AGC ACC CTG AGC GAA AAA GCG AAA CCG GCG CTG < 720
Y H A K A T E H L S T L S E K A K P A L
GAA GAT CTG CGT CAG GGC CTG CTG CCG GTG CTG GAA AGC TTT AAA GTG AGC TTT CTG AGC < 780
E D L R Q G L L P V L E S F K V S F L S
GCG CTG GAA GAG TAT ACC AAA AAA CTG AAC ACC CAG CTG CCG GGC ACC GGC GCG GCA GCG < 840
A L E E Y T K K L N T Q L P G T G A A A
CTG GAA CAT CAT CAT CAT CAT CAT TAA < 867
L E H H H H H H -

```

Sortase

Gelb: His₆-Anhang

```

ATG CAA GCT AAA CCT CAA ATT CCG AAA GAT AAA TCA AAA GTG GCA GGC TAT ATT GAA ATT < 60
M Q A K P Q I P K D K S K V A G Y I E I
CCA GAT GCT GAT ATT AAA GAA CCA GTA TAT CCA GGA CCA GCA ACA CGC GAA CAA TTA AAT < 120
P D A D I K E P V Y P G P A T R E Q L N
AGA GGT GTA AGC TTT GCA GAA GAA AAT GAA TCA CTA GAT GAT CAA AAT ATT TCA ATT GCA < 180
R G V S F A E E N E S L D D Q N I S I A
GGA CAC ACT TTC ATT GAC CGT CCG AAC TAT CAA TTT ACA AAT CTT AAA GCA GCC AAA AAA < 240
G H T F I D R P N Y Q F T N L K A A K K
GGT AGT ATG GTG TAC TTT AAA GTT GGT AAT GAA ACA CGT AAG TAT AAA ATG ACA AGT ATA < 300
G S M V Y F K V G N E T R K Y K M T S I
AGA AAC GTT AAG CCA ACA GCT GTA GAA GTT CTA GAT GAA CAA AAA GGT AAA GAT AAA CAA < 360
R N V K P T A V E V L D E Q K G K D K Q

```

TTA ACA TTA ATT ACT TGT GAT GAT TAC AAT GAA GAG ACA GGC GTT TGG GAA ACA CGT AAA < 420
L T L I T C D D Y N E E T G V W E T R K

ATC TTT GTA GCT ACA GAA GTC AAA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA < 471
I F V A T E V K L E H H H H H H -

D_{2S}-Rezeptor

Gensequenz 1 wurde für die Expression in HEK-Zellen verwendet (5.4.1.3), Gensequenz 2 für die Expression in *E. coli* (5.4).

1 ATG GAT CCA CTG AAT CTG TCC TGG TAT GAT GAT GAT CTG GAG AGG CAG AAC TGG AGC CGG < 60
2 ATG GAC CCA CTG AAC CTG TCA TGG TAC GAC GAC GAT CTT GAA CGT CAA AAC TGG TCA CGT < 60
M D P L N L S W Y D D D L E R Q N W S R

1 CCC TTC AAC GGG TCA GAC GGG AAG GCG GAC AGA CCC CAC TAC AAC TAC TAT GCC ACA CTG < 120
2 CCG TTT AAC GGA TCG GAT GGA AAG GCC GAT CGA CCT CAC TAC AAC TAT TAC GCC ACT CTC < 120
P F N G S D G K A D R P H Y N Y Y A T L

1 CTC ACC CTG CTC ATC GCT GTC ATC GTC TTC GGC AAC GTG CTG GTG TGC ATG GCT GTG TCC < 180
2 CTC ACA CTG CTC ATT GCC GTC ATT GTA TTC GGC AAT GTT TTG GTT TGC ATG GCA GTG TCA < 180
L T L L I A V I V F G N V L V C M A V S

1 CGC GAG AAG GCG CTG CAG ACC ACC ACC AAC TAC CTG ATC GTC AGC CTC GCA GTG GCC GAC < 240
2 AGG GAA AAG GCT CTT CAG ACT ACC ACG AAC TAC CTT ATC GTG AGC CTT GCT GTA GCT GAC < 240
R E K A L Q T T T N Y L I V S L A V A D

1 CTC CTC GTC GCC ACA CTG GTC ATG CCC TGG GTT GTC TAC CTG GAG GTG GTA GGT GAG TGG < 300
2 TTG CTC GTG GCT ACC CTC GTC ATG CCA TGG GTC GTC TAC TAC GAG GTA GTC GGT GAG TGG < 300
L L V A T L V M P W V V Y L E V V G E W

1 AAA TTC AGC AGG ATT CAC TGT GAC ATC TTC GTC ACT CTG GAC GTC ATG ATG TGC ACG GCG < 360
2 AAA TTT AGC CGT ATC CAT TGC GAC ATC TTC GTT ACA CTG GAT GTT ATG ATG TGC ACA GCT < 360
K F S R I H C D I F V T L D V M M C T A

1 AGC ATC CTG AAC TTG TGT GCC ATC AGC ATC GAC AGG TAC ACA GCT GTG GCC ATG CCC ATG < 420
2 TCC ATC CTG AAC CTA TGT GCC ATC TCC ATT GAC CGC TAT ACT GCA GTC GCG ATG CCT ATG < 420
S I L N L C A I S I D R Y T A V A M P M

1 CTG TAC AAT ACG CGC TAC AGC TCC AAG CGC CGG GTC ACC GTC ATG ATC TCC ATC GTC TGG < 480
2 CTC TAC AAC ACC AGG TAC AGT AGC AAA CGA CGT GTT ACG GTG ATG ATT AGC ATT GTC TGG < 480
L Y N T R Y S S K R R V T V M I S I V W

1 GTC CTG TCC TTC ACC ATC TCC TGC CCA CTC CTC TTC GGA CTC AAT AAC GCA GAC CAG AAC < 540
2 GTA TTA TCC TTC ACG ATT TCC TGT CCT CTG TTG TTC GGT CTG AAC AAT GCT GAC CAG AAC < 540
V L S F T I S C P L L F G L N N A D Q N

1 GAG TGC ATC ATT GCC AAC CCG GCC TTC GTG GTC TAC TCC TCC ATC GTC TCC TTC TAC GTG < 600
2 GAA TGC ATC ATA GCC AAT CCT GCC TTT GTA GTC TAC TCC TCC ATC GTA TCG TTC TAC GTT < 600
E C I I A N P A F V V Y S S I V S F Y V

1 CCC TTC ATT GTC ACC CTG CTG GTC TAC ATC AAG ATC TAC ATT GTC CTC CGC AGA CGC CGC < 660
2 CCG TTC ATT GTG ACC CTT TTG GTG TAC ATC AAG ATC TAC ATC GTC CTT AGA CGC CGC AGG < 660
P F I V T L L V Y I K I Y I V L R R R R

1 AAG CGA GTC AAC ACC AAA CGC AGC AGC CGA GCT TTC AGG GCC CAC CTG AGG GCT CCA CTA < 720
2 AAA CGT GTC AAT ACA AAG AGA AGC TCT AGA GCC TTC AGA GCG CAT CTC AGA GCG CCC TTG < 720
K R V N T K R S S R A F R A H L R A P L

1 AAG GAG GCT GCC CGG CGA GCC CAG GAG CTG GAG ATG GAG ATG CTC TCC AGC ACC AGC CCA < 780
2 AAA GAA GCA GCT AGA CGA GCT CAA GAG CTC GAA ATG GAG ATG CTG AGT AGT ACC TCT CCA < 780
K E A A R R A Q E L E M E M L S S T S P

1 CCC GAG AGG ACC CGG TAC AGC CCC ATC CCA CCC AGC CAC CAC CAG CTG ACT CTC CCC GAC < 840
2 CCA GAA CGC ACC AGG TAT TCT CCC ATT CCT CCC TCA CAC CAC CAA CTG ACT CTA CCT GAT < 840
P E R T R Y S P I P P S H H Q L T L P D

1 CCG TCC CAC CAT GGT CTC CAC AGC ACT CCC GAC AGC CCC GCC AAA CCA GAG AAG AAT GGG < 900
2 CCC AGT CAT CAT GGC TTG CAC TCG ACT CCC GAT TCT CCA GCT AAG CCG GAA AAG AAC GGA < 900
P S H H G L H S T P D S P A K P E K N G

```

1 CAT GCC AAA GAC CAC CCC AAG ATT GCC AAG ATC TTT GAG ATC CAG ACC ATG CCC AAT GGC < 960
2 CAC GCA AAA GAC CAC CCA AAG ATA GCC AAG ATT TTC GAG ATT CAG ACC ATG CCT AAC GGT < 960
  H  A  K  D  H  P  K  I  A  K  I  F  E  I  Q  T  M  P  N  G

1 AAA ACC CGG ACC TCC CTC AAG ACC ATG AGC CGT AGG AAG CTC TCC CAG CAG AAG GAG AAG < 1020
2 AAA ACG AGG ACC AGT CTC AAG ACT ATG AGC AGA CGC AAG CTG TCT CAA CAG AAG GAG AAG < 1020
  K  T  R  T  S  L  K  T  M  S  R  R  K  L  S  Q  Q  K  E  K

1 AAA GCC ACT CAG ATG CTC GCC ATT GTT CTC GGC GTG TTC ATC ATC TGC TGG CTG CCC TTC < 1080
2 AAA GCC ACA CAG ATG TTG GCT ATC GTT CTA GGT GTG TTC ATC ATC TGT TGG CTA CCG TTC < 1080
  K  A  T  Q  M  L  A  I  V  L  G  V  F  I  I  C  W  L  P  F

1 TTC ATC ACA CAC ATC CTG AAC ATA CAC TGT GAC TGC AAC ATC CCG CCT GTC CTG TAC AGC < 1140
2 TTC ATC ACT CAC ATC CTC AAC ATC CAC TGT GAC TGC AAC ATT CCT CCC GTG TTA TAC TCT < 1140
  F  I  T  H  I  L  N  I  H  C  D  C  N  I  P  P  V  L  Y  S

1 GCC TTC ACG TGG CTG GGC TAT GTC AAC AGC GCC GTG AAC CCC ATC ATC TAC ACC ACC TTC < 1200
2 GCA TTT ACT TGG TTA GGC TAT GTG AAT TCA GCG GTG AAT CCC ATA ATC TAC ACT ACC TTC < 1200
  A  F  T  W  L  G  Y  V  N  S  A  V  N  P  I  I  Y  T  T  F

1 AAC ATT GAG TTC CGC AAG GCC TTC CTG AAG ATC CTC CAC TGC < 1242
2 AAC ATA GAA TTC CGT AAA GCC TTC TTA AAG ATC CTG CAC TGC < 1242
  N  I  E  F  R  K  A  F  L  K  I  L  H  C

```

D₃-Rezeptor

Gensequenz 1 wurde für die Expression in HEK-Zellen verwendet (5.1.2, 5.3.3.1), Gensequenz 2 für die Expression in *T. ni* (5.1) und in *E. coli* (5.4). Für die zellfreie Expression und die anschließende Untersuchung der Rezeptorvarianten aus der zellfreien Expression in HEK-Zellen wurde Gensequenz 3 verwendet (5.3).

```

1 ATG GCA TCT CTG AGT CAG CTG AGT AGC CAC CTG AAC TAC ACC TGT GGG GCA GAG AAC TCC < 60
2 ATG GCT AGC CTA TCA CAA CTG TCC TCC CAC TTG AAC TAC ACA TGT GGT GCC GAG AAT TCA < 60
3 ATG GCA AGC CTG AGC CAG CTG AGC TCA CAT CTG AAT TAT ACC TGT GGT GCA GAA AAT AGT < 60
  M  A  S  L  S  Q  L  S  S  H  L  N  Y  T  C  G  A  E  N  S

1 ACA GGT GCC AGC CAG GCC CGC CCA CAT GCC TAC TAT GCC CTC TCC TAC TGC GCG CTC ATC < 120
2 ACA GGC GCC TCA CAA GCA AGG CCT CAT GCC TAC TAT GCG TTG AGC TAC TGT GCT CTT ATC < 120
3 ACC GGT GCA AGC CAG GCA CGT CCG CAT GCG TAT TAT GCA CTG AGC TAT TGT GCA CTG ATT < 120
  T  G  A  S  Q  A  R  P  H  A  Y  Y  A  L  S  Y  C  A  L  I

1 CTG GCC ATC GTC TTC GGC AAT GGC CTG GTG TGC ATG GCT GTG CTG AAG GAG CGG GCC CTG < 180
2 TTG GCC ATT GTA TTC GGA AAC GGA TTA GTC TGT ATG GCG GTA TTG AAA GAG CGT GCA TTG < 180
3 CTT GCG ATT GTT TTT GGT AAT GGT CTG GTT TGT ATG GCC GTT CTG AAA GAA CGT GCA CTG < 180
  L  A  I  V  F  G  N  G  L  V  C  M  A  V  L  K  E  R  A  L

1 CAG ACT ACC ACC AAC TAC TTA GTA GTG AGC CTG GCT GTG GCA GAC TTG CTG GTG GCC ACC < 240
2 CAG ACT ACC ACC AAC TAC CTA GTA GTG TCG TTA GCT GTC GCA GAT CTA CTT GTG GCT ACC < 240
3 CAG ACC ACG ACC AAT TAT CTG GTT GTT AGC CTG GCA GTT GCC GAT CTG CTG GTT GCG ACC < 240
  Q  T  T  T  N  Y  L  V  V  S  L  A  V  A  D  L  L  V  A  T

1 TTG GTG ATG CCC TGG GTG GTA TAC CTG GAG GTG ACA GGT GGA GTC TGG AAT TTC AGC CGC < 300
2 CTT GTC ATG CCG TGG GTG GTC TAC CTT GAA GTC ACC GGA GGT GTC TGG AAC TTT TCC CGC < 300
3 CTT GTT ATG CCG TGG GTT GTG TAT CTG GAA GTT ACC GGT GGC GTT TGG AAT TTT AGC CGT < 300
  L  V  M  P  W  V  V  Y  L  E  V  T  G  G  V  W  N  F  S  R

1 ATT TGC TGT GAT GTT TTT GTC ACC CTG GAT GTC ATG ATG TGT ACA GCC AGC ATC CTT AAT < 360
2 ATT TGC TGT GAT GTG TTT GTC ACC CTA GAC GTC ATG ATG TGC ACT GCT AGC ATC TTG AAC < 360
3 ATT TGC TGT GAT GTT TTT GTG ACC CTG GAT GTT ATG ATG TGT ACC GCA AGC ATT TGG AAT < 360
  I  C  C  D  V  F  V  T  L  D  V  M  M  C  T  A  S  I  L/W  N

1 CTC TGT GCC ATC AGC ATA GAC AGG TAC ACT GCA GTG GTC ATG CCC GTT CAC TAC CAG CAT < 420
2 CTC TGC GCC ATC AGT ATC GAC AGA TAC ACT GCA GTG GTG ATG CCC GTT CAC TAT CAG CAT < 420
3 CTG TGT GCA ATT AGC ATT GAT CGT TAT ACC GCA GTT GTT ATG CCG GTT CAT TAT CAG CAT < 420
  L  C  A  I  S  I  D  R  Y  T  A  V  V  M  P  V  H  Y  Q  H

1 GGC ACG GGA CAG AGC TCC TGT CGG CGC GTG GCC CTC ATG ATC ACG GCC GTC TGG GTA CTG < 480
2 GGA ACG GGA CAA TCC TCT TGC AGA AGG GTT GCT CTC ATG ATA ACG GCT GTT TGG GTT CTT < 480
3 GGC ACC GGT CAG AGC AGT TGT CGC CGT GTT GCA CTG ATG ATT ACC GCA GTG TGG GTT TTA < 480
  G  T  G  Q  S  S  C  R  R  V  A  L  M  I  T  A  V  W  V  L

```

1 GCC TTT GCT GTG TCC TGC CCT CTT CTG TTT GGC TTT AAT ACC ACA GGG GAC CCC ACT GTC < 540
2 GCT TTT GCC GTA TCG TGT CCA CTT CTC TTC GGC TTC AAC ACT ACT GGC GAT CCG ACA GTT < 540
3 GCG TTT GCA GTT AGC TGT CCG CTG CTG TTT GGT TTT AAT ACG ACC GGT GAT CCG ACC GTT < 540
A F A V S C P L L F G F N T T G D P T V

1 TGC TCC ATC TCC AAC CCT GAT TTT GTC ATC TAC TCT TCA GTG GTG TCC TTC TAC CTG CCC < 600
2 TGC TCC ATT TCC AAT CCC GAC TTC GTG ATC TAC AGC TCA GTC GTA AGC TTC TAC CTT CCT < 600
3 TGT AGC ATT AGC AAC CCG GAT TTT GTG ATT TAT AGC AGT GTT GTG AGC TTT TAT CTG CCG < 600
C S I S N P D F V I Y S S V V S F Y L P

1 TTT GGA GTG ACT GTC CTT GTC TAT GCC AGA ATC TAT GTG GTG CTG AAA CAA AGG AGA CGG < 660
2 TTT GGC GTA ACC GTT CTC GTA TAC GCC AGA ATC TAC GTC GTG CTC AAG CAG AGA AGA AGG < 660
3 TTT GGT GTT ACC GTT CTG GTT TAT GCA CGT ATT TAT GTT GTT CTG AAA CAG CGT CGT CGC < 660
F G V T V L V Y A R I Y V V L K Q R R R

1 AAA AGG ATC CTC ACT CGA CAG AAC AGT CAG TGC AAC AGT GTC AGG CCT GGC TTC CCC CAA < 720
2 AAA CGC ATC TTA ACC AGA CAG AAC TCT CAG TGC AAT TCA GTG CGA CCT GGA TTT CCG CAG < 720
3 AAA CGT ATT CTG ACA CGC CAG AAT AGC CAG TGT AAT AGC GTT CGT CCG GGT TTT CCG CAG < 720
K R I L T R Q N S Q C N S V R P G F P Q

1 CAA ACC CTC TCT CCT GAC CCG GCA CAT CTG GAG CTG AAG CGT TAC TAC AGC ATC TGC CAG < 780
2 CAA ACA CTG AGC CCA GAT CCT GCA CAC TTG GAA CTC AAG CGT TAC TAC TCA ATC TGT CAG < 780
3 CAG ACC CTG AGT CCG GAT CCT GCA CAT TTA GAA CTG AAA CGT TAT TAT AGC ATT TGT CAG < 780
Q T L S P D P A H L E L K R Y Y S I C Q

1 GAC ACT GCC TTG GGT GGA CCA GGC TTC CAA GAA AGA GGA GGA GAG TTG AAA AGA GAG GAG < 840
2 GAC ACA GCT CTG GGA GGT CCC GGT TTC CAG GAA CGT GGT GGA GAA CTC AAA CGC GAA GAA < 840
3 GAT ACC GCA TTA GGT GGT CCT GGT TTT CAA GAA CGT GGC GGT GAG CTG AAA CGT GAA GAA < 840
D T A L G G P G F Q E R G G E L K R E E

1 AAG ACT CGG AAT TCC CTG AGT CCC ACC ATA GCG CCT AAG CTC AGC TTA GAA GTT CGA AAG < 900
2 AAG ACC CGC AAT AGC CTC AGT CCA ACG ATT GCG CCC AAG CTC TCT CTT GAG GTT CGT AAG < 900
3 AAA ACC CGT AAT AGC CTG TCA CCG ACC ATT GCA CCG AAA CTG AGC CTG GAA GTT CGT AAA < 900
K T R N S L S P T I A P K L S L E V R K

1 CTC AGC AAT GGC AGA TTA TCG ACA TCT TTG AAG CTG GGG CCC CTG CAA CCT CGG GGA GTG < 960
2 CTC TCT AAC GGT AGG TTG TCC ACT TCG TTG AAG TTG GGT CCT TTG CAA CCG AGA GGC GTG < 960
3 CTG AGT AAT GGT CGT CTG AGC ACC AGC CTG AAA CTG GGT CCG CTG CAG CCT CGT GGT GTT < 960
L S N G R L S T S L K L G P L Q P R G V

1 CCA CTT CGG GAG AAG AAG GCA ACC CAA ATG GTG GCC ATT GTG CTT GGG GCC TTC ATT GTC < 1020
2 CCA CTG CGA GAG AAG AAA GCT ACT CAG ATG GTC GCG ATA GTG CTG GGT GCC TTC ATC GTT < 1020
3 CCG TTA CGT GAA AAA AAA GCA ACC CAG ATG GTT GCA ATT GTT CTG GGT GCA TTT ATT GTT < 1020
P L R E K K A T Q M V A I V L G A F I V

1 TGC TGG CTG CCC TTC TTC TTG ACC CAT GTT CTC AAT ACC CAC TGC CAG ACA TGC CAC GTG < 1080
2 TGC TGG TTA CCC TTC TTC TTA ACG CAC GTT CTG AAC ACT CAC TGC CAA ACT TGC CAC GTA < 1080
3 TGT TGG CTG CCG TTT TTT CTG ACC CAT GTT CTG AAT ACC CAT TGT CAG ACC TGT CAT GTT < 1080
C W L P F F L T H V L N T H C Q T C H V

1 TCC CCA GAG CTT TAC AGT GCC ACG ACA TGG CTG GGC TAC GTG AAT AGC GCC CTC AAC CCT < 1140
2 TCA CCC GAA CTG TAT TCC GCC ACC ACT TGG CTG GGC TAT GTC AAT AGT GCG CTG AAC CCA < 1140
3 AGT CCG GAA CTG TAT AGC GCA ACG ACC TGG TTA GGT TAT GTT AAT AGC GCA CTG AAT CCG < 1140
S P E L Y S A T T W L G Y V N S A L N P

1 GTG ATC TAT ACC ACC TTC AAT ATC GAG TTC CGG AAA GCC TTC CTC AAG ATC CTG TCT TGC < 1200
2 GTC ATC TAC ACA ACC TTC AAC ATT GAG TTC CGT AAA GCC TTC CTG AAG ATT CTG TCT TGT < 1200
3 GTT ATC TAT ACC ACG TTT AAC ATC GAA TTT CGC AAA GCC TTT CTG AAA ATT CTG AGC TGC < 1200
V I Y T T F N I E F R K A F L K I L S C

NTR1

ATG GGC CCA AAT AGC GAT CTT GAT GTG AAC ACG GAC ATC TAT TCG AAA GTG CTG GTT ACC < 60
M G P N S D L D V N T D I Y S K V L V T

GCT ATC TAC CTT GCA CTG TTC GTT GTC GGC ACA GTA GGA AAC TCG GTT ACC CTC TTT ACT < 120
A I Y L A L F V V G T V G N S V T L F T

TTG GCA CGG AAG AAA TCA CTG CAG AGC CTC CAG TCT ACC GTC GAC TAC TAT CTG GGC TCA < 180
L A R K K S L Q S L Q S T V D Y Y L G S

CTG GCT CTG AGC GAT CTG CTG ATC CTT CTG TTA GCA ATG CCG GTA GAG TTA TAC AAC TTC < 240
L A L S D L L I L L L A M P V E L Y N F

ATC TGG GTG CAC CAT CCG TGG GCG TTT GGT GAT GCA GGC TGT CGT GGC TAT TAC TTT CTG < 300
 I W V H H P W A F G D A G C R G Y Y F L
 CGC GAT GCC TGT ACG TAT GCA ACA GCG CTC AAT GTC GTT TCC CTG AGC GTC GAA CTG TAT < 360
 R D A C T Y A T A L N V V S L S V E L Y
 TTG GCC ATT TGC CAT CCC TTT AAA GCC AAA ACC CTG ATG TCC CGC AGT CGC ACG AAG AAA < 420
 L A I C H P F K A K T L M S R S R T K K
 TTC ATC TCG GCG ATT TGG CTG GCG AGT GCC TTA CTG GCC ATT CCC ATG CTG TTT ACG ATG < 480
 F I S A I W L A S A L L A I P M L F T M
 GGT CTG CAG AAT CTG TCA GGT GAT GGT ACC CAT CCA GGC GGG TTA GTT TGC ACT CCG ATT < 540
 G L Q N L S G D G T H P G G L V C T P I
 GTA GAC ACT GCG ACT CTG AAA GTG GTG ATC CAG GTT AAC ACC TTC ATG TCC TTT CTG TTC < 600
 V D T A T L K V V I Q V N T F M S F L F
 CCG ATG CTT GTC GCT AGT ATT CTC AAT ACC GTC ATT GCC AAC AAA CTT ACC GTG ATG GTA < 660
 P M L V A S I L N T V I A N K L T V M V
 CAT CAG GCA GCC GAA CAA GGT CGC GTA TGC ACC GAA CCT GGG CGT GTG CAA GCT CTG CGC < 720
 H Q A A E Q G R V C T E P G R V Q A L R
 CGT GGA GTG TTG GTT CTG CGT GCT GTG GTT ATT GCG TTC GTC GTG TGT TGG TTA CCG TAT < 780
 R G V L V L R A V V I A F V V C W L P Y
 CAT GTT CGT CGC CTG ATG TTT TGC TAT ATT AGC GAT GAA CAG TGG ACG ACA TTT CTG TTT < 840
 H V R R L M F C Y I S D E Q W T T F L F
 GAC TTC TAT CAC TAC TTC TAC ATG CTG ACC AAT GCC TTG GTG TAT GTG TCT GCG GCG ATT < 900
 D F Y H Y F Y M L T N A L V Y V S A A I
 AAC CCT ATC CTG TAC AAC TTA GTG AGC GCG AAT TTC CGC CAA GTG TTT CTG TCG ACG TTA < 960
 N P I L Y N L V S A N F R Q V F L S T L
 GCG TGC TTG TGT CCG < 975
 A C L C P

MBP

ATG AAA ATA AAA ACA GGT GCA CGC ATC CTC GCA TTA TCC GCA TTA ACG ACG ATG ATG TTT < 60
 M K I K T G A R I L A L S A L T T M M F
 TCC GCC TCG GCT CTC GCC AAA ATC GAA GAA GGT AAA CTG GTA ATC TGG ATT AAC GGC GAT < 120
 S A S A L A K I E E G K L V I W I N G D
 AAA GGC TAT AAC GGT CTC GCT GAA GTC GGT AAG AAA TTC GAG AAA GAT ACC GGA ATT AAA < 180
 K G Y N G L A E V G K K F E K D T G I K
 GTC ACC GTT GAG CAT CCG GAT AAA CTG GAA GAG AAA TTC CCA CAG GTT GCG GCA ACT GGC < 240
 V T V E H P D K L E E K F P Q V A A T G
 GAT GGC CCT GAC ATT ATC TTC TGG GCA CAC GAC CGC TTT GGT GGC TAC GCT CAA TCT GGC < 300
 D G P D I I F W A H D R F G G Y A Q S G
 CTG TTG GCT GAA ATC ACC CCG GAC AAA GCG TTC CAG GAC AAG CTG TAT CCG TTT ACC TGG < 360
 L L A E I T P D K A F Q D K L Y P F T W
 GAT GCC GTA CGT TAC AAC GGC AAG CTG ATT GCT TAC CCG ATC GCT GTT GAA GCG TTA TCG < 420
 D A V R Y N G K L I A Y P I A V E A L S
 CTG ATT TAT AAC AAA GAT CTG CTG CCG AAC CCG CCA AAA ACC TGG GAA GAG ATC CCG GCG < 480
 L I Y N K D L L P N P P K T W E E I P A
 CTG GAT AAA GAA CTG AAA GCG AAA GGT AAG AGC GCG CTG ATG TTC AAC CTG CAA GAA CCG < 540
 L D K E L K A K G K S A L M F N L Q E P
 TAC TTC ACC TGG CCG CTG ATT GCT GCT GAC GGG GGT TAT GCG TTC AAG TAT GAA AAC GGC < 600
 Y F T W P L I A A D G G Y A F K Y E N G
 AAG TAC GAC ATT AAA GAC GTG GGC GTG GAT AAC GCT GGC GCG AAA GCG GGT CTG ACC TTC < 660
 K Y D I K D V G V D N A G A K A G L T F

CTG GTT GAC CTG ATT AAA AAC AAA CAC ATG AAT GCA GAC ACC GAT TAC TCC ATC GCA GAA < 720
L V D L I K N K H M N A D T D Y S I A E

GCT GCC TTT AAT AAA GGC GAA ACA GCG ATG ACC ATC AAC GGC CCG TGG GCA TGG TCC AAC < 780
A A F N K G E T A M T I N G P W A W S N

ATC GAC ACC AGC AAA GTG AAT TAT GGT GTA ACG GTA CTG CCG ACC TTC AAG GGT CAA CCA < 840
I D T S K V N Y G V T V L P T F K G Q P

TCC AAA CCG TTC GTT GGC GTG CTG AGC GCA GGT ATT AAC GCC GCC AGT CCG AAC AAA GAG < 900
S K P F V G V L S A G I N A A S P N K E

CTG GCA AAA GAG TTC CTC GAA AAC TAT CTG CTG ACT GAT GAA GGT CTG GAA GCG GTT AAT < 960
L A K E F L E N Y L L T D E G L E A V N

AAA GAC AAA CCG CTG GGT GCC GTA GCG CTG AAG TCT TAC GAG GAA GAG TTG GTG AAA GAT < 1020
K D K P L G A V A L K S Y E E E L V K D

CCG CGT ATT GCC GCC ACT ATG GAA AAC GCC CAG AAA GGT GAA ATC ATG CCG AAC ATC CCG < 1080
P R I A A T M E N A Q K G E I M P N I P

CAG ATG TCC GCT TTC TGG TAT GCC GTG CGT ACT GCG GTG ATC AAC GCC GCC AGC GGT CGT < 1140
Q M S A F W Y A V R T A V I N A A S G R

CAG ACT GTC GAT GAA GCC CTG AAA GAC GCG CAG ACT < 1176
Q T V D E A L K D A Q T

mCherry

ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG GAT AAC ATG GCC ATC ATC AAG GAG TTC ATG CGC TTC AAG < 60
M V S K G E E D N M A I I K E F M R F K

GTG CAC ATG GAG GGC TCC GTG AAC GGC CAC GAG TTC GAG ATC GAG GGC GAG GGC GAG GGC < 120
V H M E G S V N G H E F E I E G E G E G

CGC CCC TAC GAG GGC ACC CAG ACC GCC AAG CTG AAG GTG ACC AAG GGT GGC CCC CTG CCC < 180
R P Y E G T Q T A K L K V T K G G P L P

TTC GCC TGG GAC ATC CTG TCC CCT CAG TTC ATG TAC GGC TCC AAG GCC TAC GTG AAG CAC < 240
F A W D I L S P Q F M Y G S K A Y V K H

CCC GCC GAC ATC CCC GAC TAC TTG AAG CTG TCC TTC CCC GAG GGC TTC AAG TGG GAG CGC < 300
P A D I P D Y L K L S F P E G F K W E R

GTG ATG AAC TTC GAG GAC GGC GGC GTG GTG ACC GTG ACC CAG GAC TCC TCC CTG CAG GAC < 360
V M N F E D G G V V T V T Q D S S L Q D

GGC GAG TTC ATC TAC AAG GTG AAG CTG CGC GGC ACC AAC TTC CCC TCC GAC GGC CCC GTA < 420
G E F I Y K V K L R G T N F P S D G P V

ATG CAG AAG AAG ACC ATG GGC TGG GAG GCC TCC TCC GAG CGG ATG TAC CCC GAG GAC GGC < 480
M Q K K T M G W E A S S E R M Y P E D G

GCC CTG AAG GGC GAG ATC AAG CAG AGG CTG AAG CTG AAG GAC GGC GGC CAC TAC GAC GCT < 540
A L K G E I K Q R L K L K D G G H Y D A

GAG GTC AAG ACC ACC TAC AAG GCC AAG AAG CCC GTG CAG CTG CCC GGC GCC TAC AAC GTC < 600
E V K T T Y K A K K P V Q L P G A Y N V

AAC ATC AAG TTG GAC ATC ACC TCC CAT AAC GAG GAC TAC ACC ATC GTG GAA CAG TAC GAA < 660
N I K L D I T S H N E D Y T I V E Q Y E

CGC GCC GAG GGC CGC CAC TCC ACC GGC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG AGC GCG < 714
R A E G R H S T G G M D E L Y K S A

sfGFP

ATG AGC AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA GTT GTC CCA ATT CTT GTT GAA TTA GAT GGT < 60
M S K G E E L F T G V V P I L V E L D G

GAT GTT AAT GGG CAC AAA TTT TCT GTC CGT GGA GAG GGT GAA GGT GAT GCT ACA AAC GGA < 120
D V N G H K F S V R G E G E G D A T N G

AAA CTC ACC CTT AAA TTT ATT TGC ACT ACT GGA AAA CTA CCT GTT CCG TGG CCA ACA CTT < 180
 K L T L K F I C T T G K L P V P W P T L
 GTC ACT ACT CTG ACC TAT GGT GTT CAA TGC TTT TCC CGT TAT CCG GAT CAC ATG AAA CGG < 240
 V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K R
 CAT GAC TTT TTC AAG AGT GCC ATG CCC GAA GGT TAT GTA CAG GAA CGC ACT ATA TCT TTC < 300
 H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I S F
 AAA GAT GAC GGG ACC TAC AAG ACG CGT GCT GAA GTC AAG TTT GAA GGT GAT ACC CTT GTT < 360
 K D D G T Y K T R A E V K F E G D T L V
 AAT CGT ATC GAG TTA AAG GGT ATT GAT TTT AAA GAA GAT GGA AAC ATT CTT GGA CAC AAA < 420
 N R I E L K G I D F K E D G N I L G H K
 CTG GAG TAC AAC TTT AAC TCA CAC AAT GTA TAC ATC ACG GCA GAC AAA CAA AAG AAT GGA < 480
 L E Y N F N S H N V Y I T A D K Q K N G
 ATC AAA GCT AAC TTC AAA ATT CGC CAC AAC GTT GAA GAT GGT TCC GTT CAA CTA GCA GAC < 540
 I K A N F K I R H N V E D G S V Q L A D
 CAT TAT CAA CAA AAT ACT CCA ATT GGC GAT GGC CCT GTC CTT TTA CCA GAC AAC CAT TAC < 600
 H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y
 CTG TCG ACA CAA TCT GTC CTT TCG AAA GAT CCC AAC GAA AAG CGT GAC CAC ATG GTC CTT < 660
 L S T Q S V L S K D P N E K R D H M V L
 CTT GAG TTT GTA ACT GCT GCT GGG ATT ACA CAT GGC ATG GAT GAG CTC TAC AAA AGC GCG < 720
 L E F V T A A G I T H G M D E L Y K S A

TrxA

ATG AGC GAT AAA ATT ATT CAC CTG ACT GAC GAC AGT TTT GAC ACG GAT GTA CTC AAA GCG < 60
 M S D K I I H L T D D S F D T D V L K A
 GAC GGG GCG ATC CTC GTC GAT TTC TGG GCA GAG TGG TGC GGT CCG TGC AAA ATG ATC GCC < 120
 D G A I L V D F W A E W C G P C K M I A
 CCG ATT CTG GAT GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC < 180
 P I L D E I A D E Y Q G K L T V A K L N
 ATC GAT CAA AAC CCT GGC ACT GCG CCG AAA TAT GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG < 240
 I D Q N P G T A P K Y G I R G I P T L L
 CTG TTC AAA AAC GGT GAA GTG GCG GCA ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG < 300
 L F K N G E V A A T K V G A L S K G Q L
 AAA GAG TTC CTC GAC GCT AAC CTG GCC < 328
 K E F L D A N L A

Gai1

ATG GGC TGT ACC CTC AGT GCC GAG GAT AAA GCT GCT GTG GAG AGA TCA AAG ATG ATC GAC < 60
 M G C T L S A E D K A A V E R S K M I D
 CGC AAT CTC CGT GAG GAC GGA GAG AAA GCC GCT AGG GAG GTC AAG CTG TTA CTC TTG GGT < 120
 R N L R E D G E K A A R E V K L L L L G
 GCT GGT GAA AGT GGT AAA TCC ACT ATC GTG AAG CAG ATG AAA ATC ATC CAT GAG GCG GGA < 180
 A G E S G K S T I V K Q M K I I H E A G
 TAT TCA GAG GAG GAA TGT AAG CAG TAT AAG GCG GTT GTG TAC AGC AAC ACC ATT CAA AGC < 240
 Y S E E E C K Q Y K A V V Y S N T I Q S
 ATC ATT GCC ATT ATT CGC GCA ATG GGA CGT CTT AAG ATC GAC TTT GGT GAC TCA GCA AGA < 300
 I I A I I R A M G R L K I D F G D S A R
 GCT GAT GAT GCT AGG CAA CTG TTC GTG CTG GCT GGT GCC GCT GAA GAA GGC TTC ATG ACA < 360
 A D D A R Q L F V L A G A A E E G F M T
 GCT GAA TTA GCG GGC GTA ATC AAA CGC TTA TGG AAA GAC TCT GGC GTA CAA GCG TGC TTT < 420
 A E L A G V I K R L W K D S G V Q A C F

```

AAC CGA TCC CGT GAA TAC CAG CTG AAC GAC AGT GCA GCC TAC TAC CTA AAC GAC CTA GAC < 480
N R S R E Y Q L N D S A A Y Y L N D L D

CGT ATA GCC CAA CCC AAT TAC ATC CCA ACA CAG CAA GAC GTA TTG CGA ACT AGG GTC AAA < 540
R I A Q P N Y I P T Q Q D V L R T R V K

ACG ACG GGT ATC GTC GAA ACC CAC TTC ACA TTT AAA GAC CTC CAC TTC AAG ATG TTC GAC < 600
T T G I V E T H F T F K D L H F K M F D

GTT GGA GGC CAA AGG TCT GAA CGC AAG AAA TGG ATA CAC TGC TTT GAG GGA GTT ACA GCC < 660
V G G Q R S E R K K W I H C F E G V T A

ATT ATT TTC TGT GTG GCA CTC TCC GAT TAC GAC TTG GTG CTG GCA GAG GAC GAA GAA ATG < 720
I I F C V A L S D Y D L V L A E D E E M

AAT CGC ATG CAT GAG AGC ATG AAA TTG TTC GAT TCC ATT TGC AAC AAC AAG TGG TTC ACT < 780
N R M H E S M K L F D S I C N N K W F T

GAC ACA TCG ATC ATA CTG TTC CTC AAC AAG AAG GAC CTT TTC GAG GAA AAG ATC AAG AAG < 840
D T S I I L F L N K K D L F E E K I K K

TCT CCG TTG ACT ATT TGC TAC CCT GAA TAT GCT GGC TCG AAT ACC TAT GAG GAA GCC GCA < 900
S P L T I C Y P E Y A G S N T Y E E A A

GCG TAC ATC CAG TGC CAG TTT GAG GAC CTT AAC AAG AGA AAG GAT ACC AAA GAG ATC TAC < 960
A Y I Q C Q F E D L N K R K D T K E I Y

ACG CAC TTC ACT TGT GCT ACC GAT ACC AAG AAT GTC CAG TTC GTG TTC GAT GCC GTT ACG < 1020
T H F T C A T D T K N V Q F V F D A V T

GAT GTC ATC ATA AAG AAC AAC CTG AAG GAT TGC GGT CTG TTC < 1062
D V I I K N N L K D C G L F

```

9.3 Der Codon Adaption Index (CAI)

Für den CAI wird die Codonverwendung eines Zielgens mit einer Referenztabelle verglichen. Die Referenztabelle enthält Sequenzen hoch exprimierter Gene eines Organismus, von denen die Frequenz der vorkommenden Codons bestimmt wurde. Es wird analysiert, inwieweit das Profil der Codonverwendung aus der Referenztabelle mit der Codonverwendung des zu untersuchenden Zielgens übereinstimmt. Der Index kann einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen, wobei ein Wert von 1 bedeutet, dass das Gen immer die Codons enthält, die am häufigsten in der Referenztabelle vorkommen. Der CAI kann als Indikator dienen, ob die heterologe Expression eines Gens erfolgreich sein kann (Sharp & Li, 1987; Puigbò *et al.*, 2008). Für die in dieser Arbeit verwendeten Gene wurde der CAI mit dem *Codon Adaptation Index Calculator* (<https://www.biologicscorp.com/tools/CAICalculator>) für die Organismen *E. coli*, *S. cerevisiae*, *S. frugiperda* und *Homo sapiens* berechnet (Tab. 27).

Tab. 27: Codon Adaption Index.

Codon Adaption Index				
Gen für	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>Homo sapiens</i>
cMSP1E3D1	0,97	0,56	0,77	0,72
Sortase	0,63	0,8	0,69	0,68
D ₂ (Sequenz 1)	0,62	0,54	0,85	0,85
D ₂ (Sequenz 2)	0,57	0,64	0,79	0,73
D ₃ (Sequenz 1)	0,59	0,57	0,79	0,8
D ₃ (Sequenz 2)	0,56	0,63	0,78	0,7
D ₃ (Sequenz 3)	0,86	0,66	0,7	0,69
NTR	0,73	0,61	0,74	0,7
MBP	0,77	0,65	0,78	0,73
mCherry	0,66	0,54	0,96	0,96
sfGFP	0,62	0,69	0,71	0,68
TrxA	0,78	0,62	0,77	0,74
G _{ai1}	0,61	0,65	0,79	0,75

9.4 Oligodesoxynukleotide

Tab. 28: Verwendete Oligodesoxynukleotide für die Klonierung.

#	5'→3'
1	GCATGGAGCCATCCACAATTCGAGAAATAATGATAGGATCGAATCGGACTTTCGAATCTAGAGCCTGCA
2	AGCGTAGTCAGGCACATCATAGGGGTACATCCGCGCCCGATGGTGGGA
3	TATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATG ACCCCTATGATGTGCCTGACTACG
4	TAGATTCGAAAGTCCGATTTCGATCCTATCATTATTTCTCGAATTGTGGATGGCTCCATGCAG
5	TGATGATGATGATGTTCCAGCGCTGCCGCGCCGGTGCCCGGCAGCTGGGTGTTTCAGTTTTTGGTATACTCTCCAGC
6	TCTGCTAACCCAGTAAGGCAACCC
7	ACCCAGCTGCCGGGCACCGGCGCGGCAGCGCTGGAACATCATCATCATCATTAGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC
8	TCGTTGAGGACCCGGCTAGG
9	TCGCAAAGCCTTTCTGAAAATTCTGAGCTGCGGTACCGGTGGTATGAGC
10	GCTTGCTGGACCATCGTATGGTTTCATATGTATATCTCCTTCTAAAGTTAAACAAAATTATTTT
11	TGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAACCATACGATGGTCCAGCAAGC
12	GAAAAGTTCTTCTCCTTTGCTCATACCACCGGTACCGCAGCTCAGAATTTTCAGAAAGGCTTTGCG
13	CGTCGCAAACGTATTCTGCAGCCGCGTGGTGTTCGTTACGTGAAAAAAAAGCAACC
14	ACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
15	CGGAACACCACGCGGCTGCAGAATACGTTTGCAGCAGCGCTGTTTCAGAAC
16	ATACCAAACGACGAGCGTGACACC
17	CGTATTCTGACCCGTCAGAACTGGGTCCGCTGCAGCCGCGTGGTGTTCGTTACGTGAAAAAAAAGCAACC
18	ACGCGGCTGCAGCGGACCCAGTTTCTGACGGGTGAGAATACGTTTGCAGCAGCGCTGTTTCAGA-AC
19	GCAAAGCCTTTCTGAAAATTCTGAGCAGTGGTACCGGTGGTATGAGCAAAGGAGAAGAAC
20	GCTCAGTGCATATGGACCATCGTATGGTTTCATATGTCTAGAGGGGAATTGTTATCCGCTCAC
21	GTGAGCGGATAACAATCCCCTCTAGACATATGAAACCATACGATGGTCCATATGCACTGAGC
22	GTTCTTCTCCTTTGCTCATACCACCGGTACCACTGCTCAGAATTTTCAGAAAGGCTTTGC
23	CAAAGCCTTTCTGAAAATTCTGAGCTGCTGATCTAGAGGGCCCGTTTAAACCC
24	ATAGCTCAGTGACATACATGGTGGCAAGCTTAAGTTTAAACGCTAGCCAGCTTGG

25 TAGCGTTTAAACTTAAGCTTGCCACCATGTATGCACTGAGCTATTGTGCACTGATTCTTGC
26 ATCAGCGGGTTTAAACGGGCCCTCTAGATCAGCAGCTCAGAATTTTCAGAAAGGCTTTGCG
27 CAAAGCCTTTCTGAAAATTCTGAGCAGTTGATCTAGAGGGCCGTTTAAACCC
28 TAGCGTTTAAACTTAAGCTTGCCACCATGTATGCACTGAGCTATGCAGCACTGATTCTTGC
29 ATCAGCGGGTTTAAACGGGCCCTCTAGATCAACTGCTCAGAATTTTCAGAAAGGCTTTGCG

30 CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAACAGCTCATTTTCAGAATATTTGCCAGAACCG
31 TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGG
32 TACCATGACAGGTTCAAGTGGGTCCATATGAATCTATGGTCCTTGTGGTCAATTGCTCGT
33 AGCAATTGACCAACAAGGACCATAGATTCATATGGACCCACTGAACCTGTCATGG
34 GCGGCATGGACGAGCTGTACAAGAGCGCGTGGAGCCATCCG
35 CATGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTGATCCTGATCCGTTATTGTTATTGTTGCC
36 CAACAATAACAATAACGGATCAGGATCAATGGTGAAGCAAGGGCGAGGAGG
37 TTCAAAGTGCAGGATGGCTCCACGCGCTCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
38 TTCTATTTTTCAAAGTGCAGGATGGCTCCAGCCTTGAAAATACAGGTTTTCAAGCTTGC
39 AAGCTTGAAAACCTGTATTTTCAAGGCTGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAATAGAAATAAAACG
40 AAGCTTGAAAACCTGTATTTTCAAGGC
41 CATATGAGTCTGCGCGTCTTTTCAG
42 ACTGTGATGAAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTCATATGGACCCACTGAACCTGTCATGGTACG-ACG
43 TTGTTATTGTTGCCCTTGAAAATACAGGTTTTCAAGCTTGCAAGTGCAGGATCTTTAAGAAGGCTTTA-CGG
44 TGCACAGCTTCCGCCCTGAACCTATG
45 CATAGGTTCAAGGCGGAAGCTGTGC
46 AGATGGCGGCTATCGTTGCAGGTGTGTTTCATCATCTGTTGGC
47 AACAGATGATGAACACACCTGCAACGATAGCCGCCATCTGTGTG
48 TGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAATAGAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGG
49 TTATTGTTATTGTTGCCCTTGAAAATACAGGTTTTCAAGCTTATTTAACATATGAGTCTGCGCGTCTTTCAAGGCTTC
50 GAAAACCTGTATTTTCAAGGCAACAATAACAATAACGGATCAGGATCAATGAGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAG
51 AGTCTTTGACTGAGCCTTTGTTTTATTTCTATTTTTCAAAGTGCAGGATGGCTCCACG
52 AAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCCTGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAATAGAAATAAAACG
53 TCAGGTGAATAATTTTATCGCTCATTGATCCTGATCCGTTATTGTTATTGTTGCC
54 AACAATAACGGATCAGGATCAATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACG
55 TTTCAAAGTGCAGGATGGCTCCAGGCCAGGTTAGCGTCGAGGAAC
56 TGAAGGATTGCGGTCTGTTCTGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAATAGAAATAAAACG
57 TCCTCGGCACTGAGGGTACAGCCCATTGATCCTGATCCGTTATTGTTATTGTTGCC
58 AACAATAACAATAACGGATCAGGATCAATGGGCTGTACCCTCAGTGCC
59 TATTTCTATTTTTCAAAGTGCAGGATGGCTCCAGAACAGACCGCAATCCTTCAGG
60 TACTGATGGCGCAGAGGTTCAAGATGCTAGCAGTGCACATCATGACG
61 ATGTGCACTGCTAGCATCTTGAACCTCTGCGCCATCAGTATCG
62 TTCCGTAAAGCCTTCTGAAGATTCTGTCTTGTAAAGCTTGAAAACCTGTATTTTCAAGGCAAC
63 AAGTGGGAGGACAGTTGTGATAGGCTAGCCATATGAGTCTGCGCGTCTTTCAAGG
64 AGCCCTGAAAGACGCGCAGACTCATATGGCTAGCCTATCACAAGTGCCTCCC
65 TTGCCTTGAAAATACAGGTTTTCAAGCTTACAAGACAGAATCTTCAGGAAGGCTTTACG
66 ACGTTAGCGTGCTTGTGTCCGAAGCTTGAAAACCTGTATTTTCAAGGCAAC
67 ATCAAGATCGCTATTTGGGCCATATGAGTCTGCGCGTCTTTTCAGG
68 AAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTCATATGGGCCAAATAGCGATCTTGATGTG
69 TGCCTTGAAAATACAGGTTTTCAAGCTTCCGACACAAGCACGCTAACG
70 AAGACGCGCAGACTCATATG
71 CCTTGAAAATACAGGTTTTCAAGCTT

Tab. 29: Verwendete *forward (for)* und *reverse (rev)* Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung.

#	5'→3'	Sequenzierung
1	GGAGATAATTTAAATGATAACCATC	pACEBac- <i>for</i>
2	TATGGCTGATTATGATCCTCTA	pACEBac- <i>rev</i>
3	TAATACGACTCACTATAGGG	T7-Promotor- <i>for</i>
4	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	T7-Terminator- <i>rev</i>
5	ACCGTTCTGGTTTATGCACG	Mitte-D3DR- <i>E. coli-for</i>
6	AGAGAACCCACTGCTTACTG	pcDNA3.1- <i>for</i>
7	GGCAAACAACAGATGGCTGG	pcDNA3.1- <i>rev</i>
8	ACGCAAACCGCCTCTCC	<i>lacI-for</i>
9	TGTGTGGAATTGTGAGCG	N-Term.- <i>malE-for</i>
10	TGGTGTAAACGGTACTGCCG	Mitte- <i>malE-for</i>
11	CCGCAGATGTCCGCTTTCTG	C-Term.- <i>malE-for</i>
12	AGCCACACAGATGTTGG	Mitte-D2DR- <i>T.ni-for</i>
13	TCAGGAGAGCGTTCACC	C-Term.- <i>Fusion-rev</i>
14	TGGCGTAAACGGTTCTCG	Mitte-D3DR- <i>T.ni-for</i>
15	TCTACATCGTCCTTAGACGC	D2DR-I122A- <i>for</i>

9.5 Herstellung von Nanodiscs

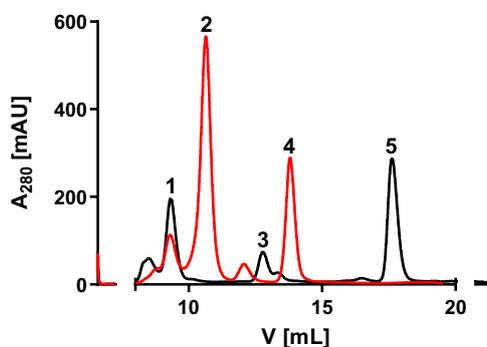


Abb. 80: Einzelläufe der Eichproteine. Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie anhand der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens für die Proben Thyroglobulin 669 kDa (1), Ferritin 440 kDa (2), Aldolase 158 kDa (3), Albumin 67 kDa (4), Ribonuklease A 13,7 kDa (5).

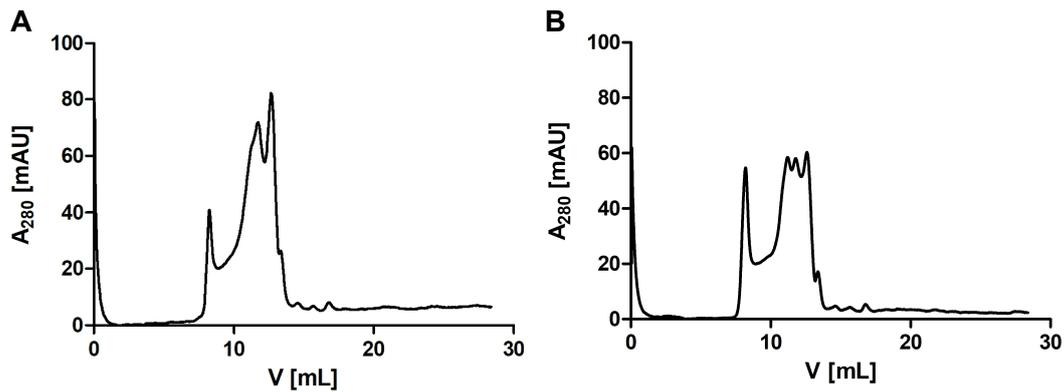


Abb. 81: Assemblierung von kovalent verknüpftem cMSP1E3D1 mit DOPG. Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie anhand der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens für kovalent verknüpftes cMSP1E3D1 mit DOPG in den Verhältnissen **A** 1:90 und **B** 1:100 (*Bio-Beads*).

9.6 Zellfreie Expression

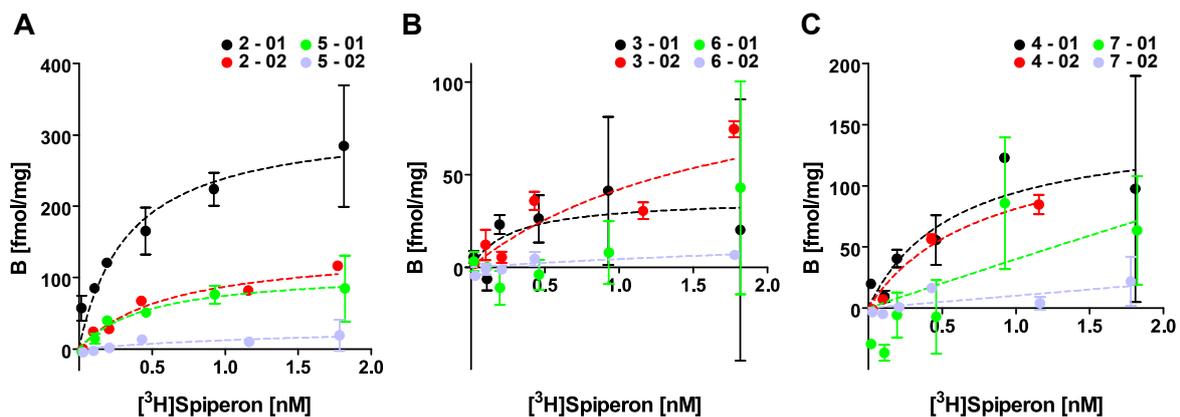


Abb. 82: Einzelmessungen des Radioligandenbindungstest für die D_3 -Rezeptorvarianten aus HEK-Zellen. Jede Variante wurde zweimal gemessen, die Messung erfolgte in Vierfachbestimmung. **(A)** Variante 2 (schwarz, rot) und 5 (grün, flieder). **(B)** Variante 3 (schwarz, rot) und 6 (grün, flieder). **(C)** Variante 4 (schwarz, rot) und 7 (grün, flieder). Aufgrund der hohen Standardabweichungen sind die Messungen teils nicht aussagekräftig (z.B. 2-01) oder es konnte keine Bindung (z.B. 5-02) detektiert werden.

9.7 Expression in *E. coli* und Implementierung der Optimierungsstrategie

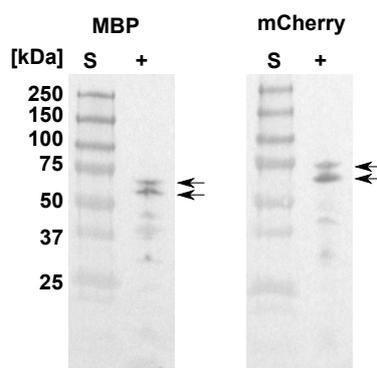


Abb. 83: Positivkontrolle für den Western Blot gegen MBP (links) und mCherry (rechts). Als Kontrolle wurde das Konstrukt *lac*-MBP-mCherry verwendet. Dieses beinhaltet keine Gensequenz für den Rezeptor und kann somit löslich in *E. coli* hergestellt werden. Es sind jeweils zwei Banden auf erwarteter Höhe zu seinen (Pfeile). Pfeile oben: Vollständiges Fusionsprodukt (theor. 73,3 kDa). Pfeile unten: Nach Abspalten der Signalsequenz des MBP (theor. 70,6 kDa). Molekulargewichtsstandard (S).

Tab. 30: K_D - und B_{MAX} -Werte für die Expression der Rezeptorgene von D_2 und D_3 über Nacht mit ganzen Zellen.

K_D [nM] ganze Zellen						
	Messung				MW	SEM
	1	2	3	4		
<i>lac</i> -MBP- D_{2Swt}	0,11	0,41	0,33		0,28	0,09
<i>lac</i> -MBP- D_{2Swt} -mCherry	0,23	0,16	0,05	0,13	0,14	0,04
<i>lac</i> -MBP- D_{2S} I122A,L346A,L350A-mCherry	0,36	0,15	0,04	0,04	0,15	0,07
<i>tac</i> -MBP- D_{2Swt} -mCherry	0,26	0,15	0,22	0,22	0,21	0,02
<i>lac</i> -MBP- D_{2Swt} -sfGFP	0,24	0,16	0,05	0,08	0,13	0,04
<i>lac</i> -MBP- D_{2Swt} -TrxA	0,20	0,11	0,03	0,06	0,10	0,04
<i>lac</i> -MBP- D_{2Swt} -Gai1	0,16	0,14	0,10	0,18	0,15	0,02
<i>lac</i> -MBP- D_{3wt} -mCherry	0,16	0,09	1,09	0,71	0,51	0,24
<i>lac</i> -MBP- D_{3} L119W-mCherry	1,25	0,63	1,15	1,05	1,02	0,14

B_{MAX} [Rezeptoren/Zelle]						
	Messung				MW	SEM
	1	2	3	4		
<i>lac</i> -MBP- D_{2Swt}	6	11	3		7	2
<i>lac</i> -MBP- D_{2Swt} -mCherry	240	275	251	265	258	8
<i>lac</i> -MBP- D_{2S} I122A,L346A,L350A-mCherry	679	721	757	860	754	39
<i>tac</i> -MBP- D_{2Swt} -mCherry	207	233	230		191	32
<i>lac</i> -MBP- D_{2Swt} -sfGFP	327	384	290	298	325	21
<i>lac</i> -MBP- D_{2Swt} -TrxA	290	311	270	265	284	10
<i>lac</i> -MBP- D_{2Swt} -Gai1	162	197	166	262	197	23
<i>lac</i> -MBP- D_{3wt} -mCherry	41	48	52	41	45	3
<i>lac</i> -MBP- D_{3} L119W-mCherry	81	84	58	54	70	8

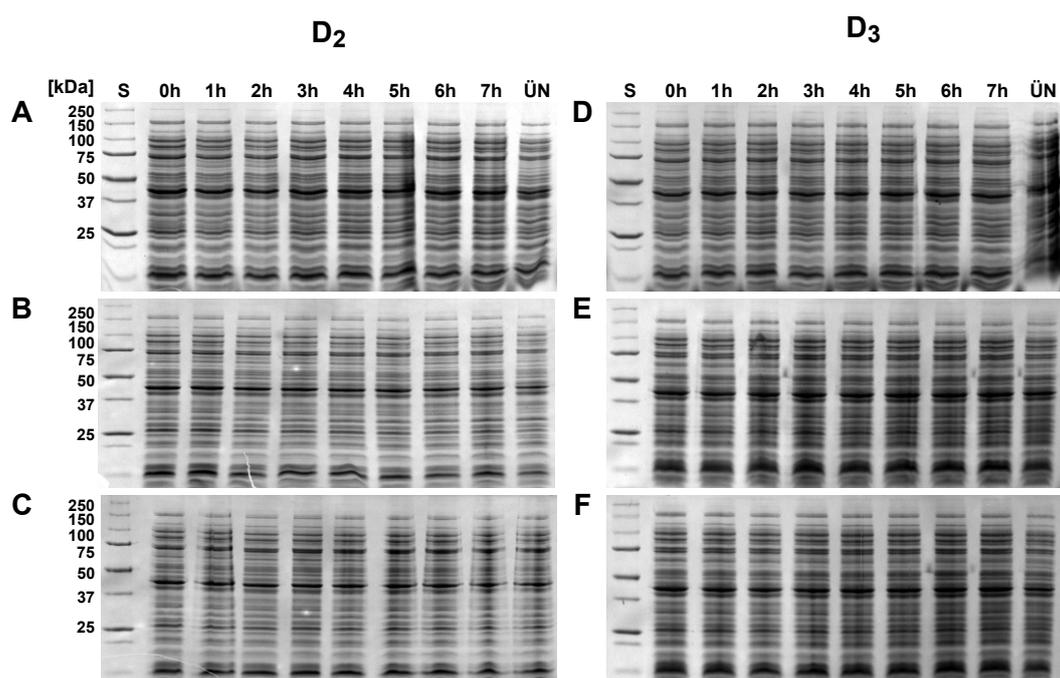
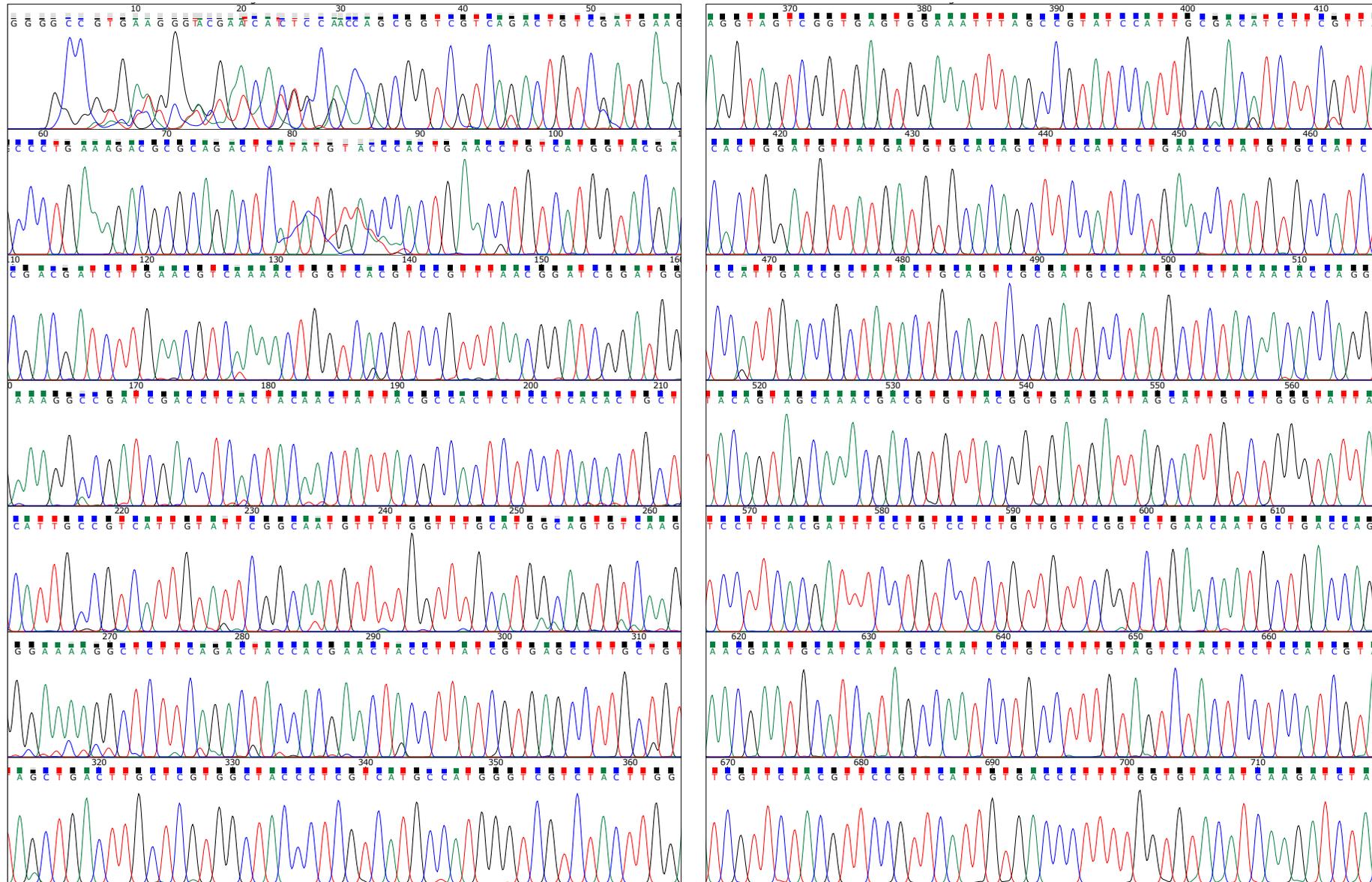
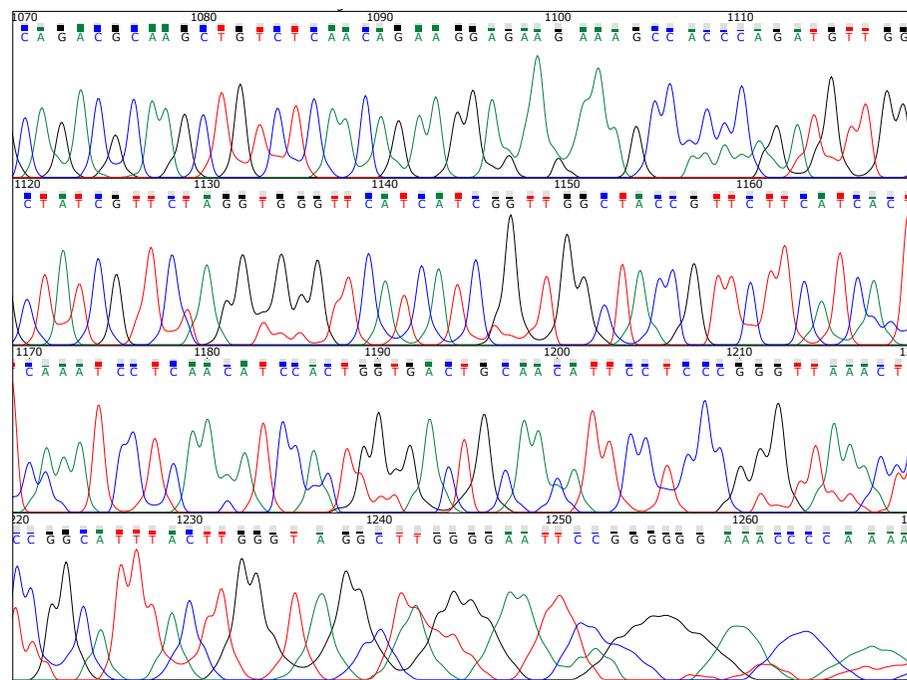
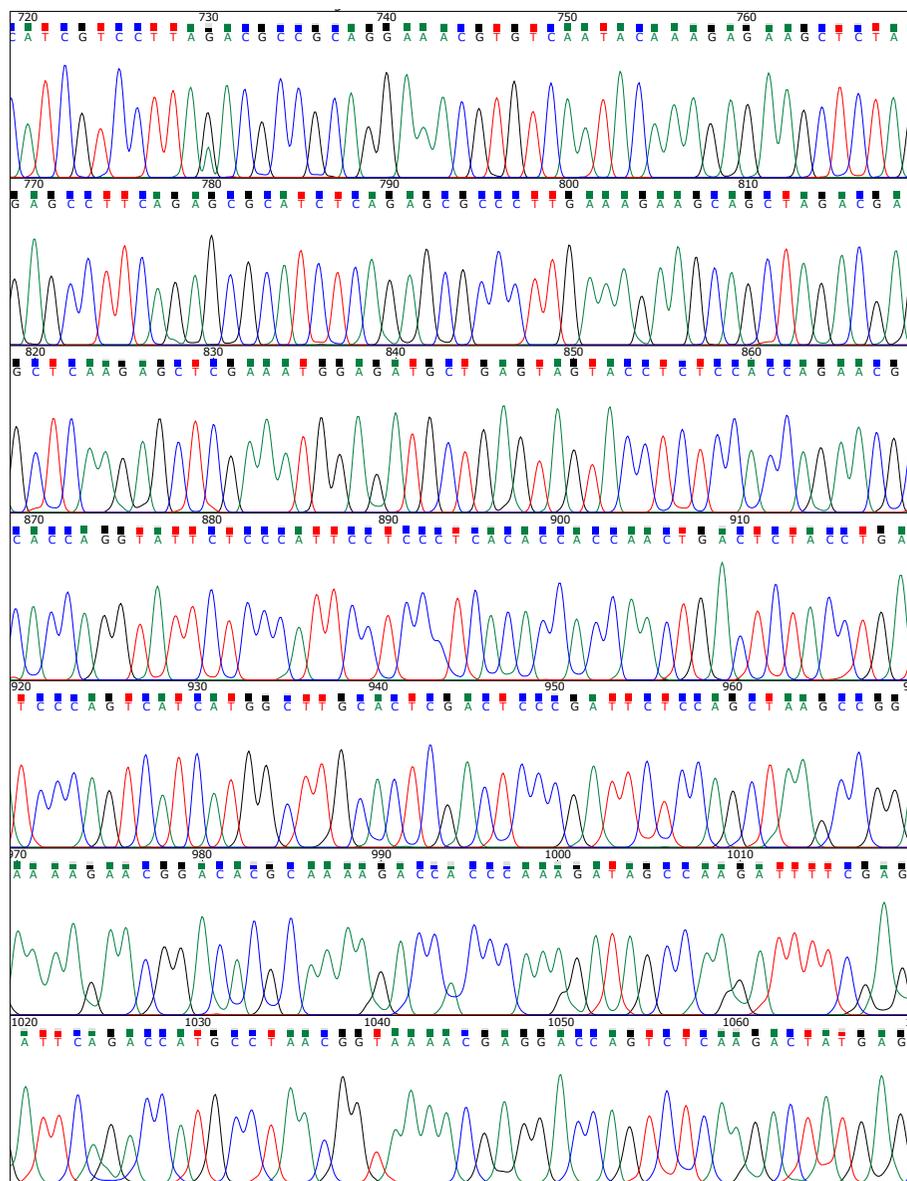


Abb. 84: SDS-PAGE für die Optimierung der Expressionsdauer. Die Expression erfolgte in *E. coli* TOP10 nach Induktion mit 0,5 mM IPTG über Nacht (4.2.6.3) und wurde mittels SDS-PAGE (10 %-Gel) für ganze Zellen analysiert. **(A)** *lac*-MBP- D_{2Swt} -mCherry **(B)** *lac*-MBP- $D_{2S I122A,L346A,L350A}$ -mCherry **(C)** *tac*-MBP- D_{2Swt} -mCherry **(D)** *lac*-MBP- D_{3wt} -mCherry **(E)** *lac*-MBP- D_{3wt} -TrxA **(F)** *lac*-MBP- D_{3wt} -G_{ai1}. Molekulargewichtsstandard (S).

Abb. 85: Vollständige Sequenzierung der Bibliothek D₂-10ng.





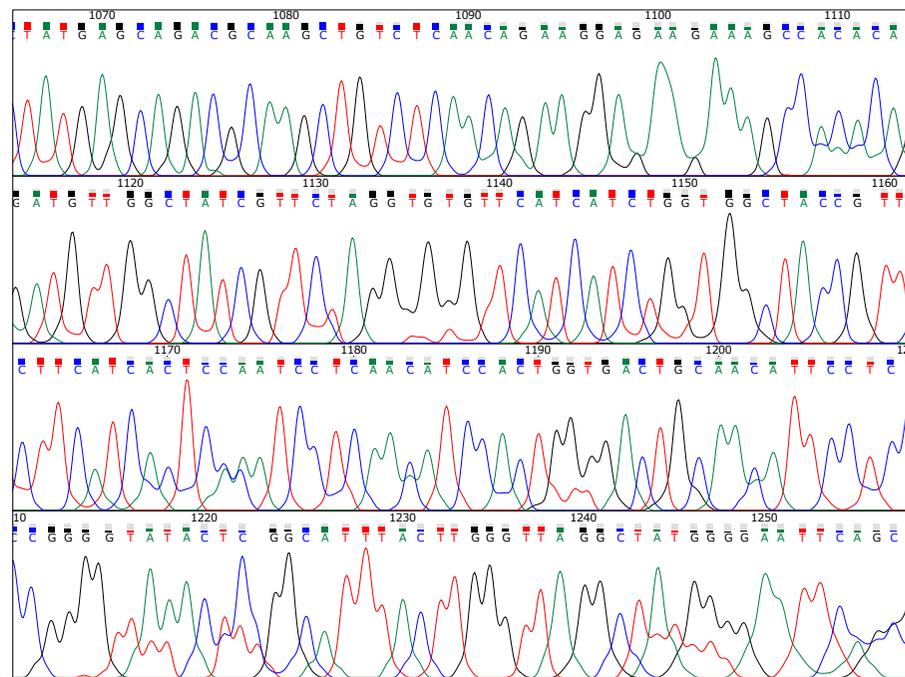
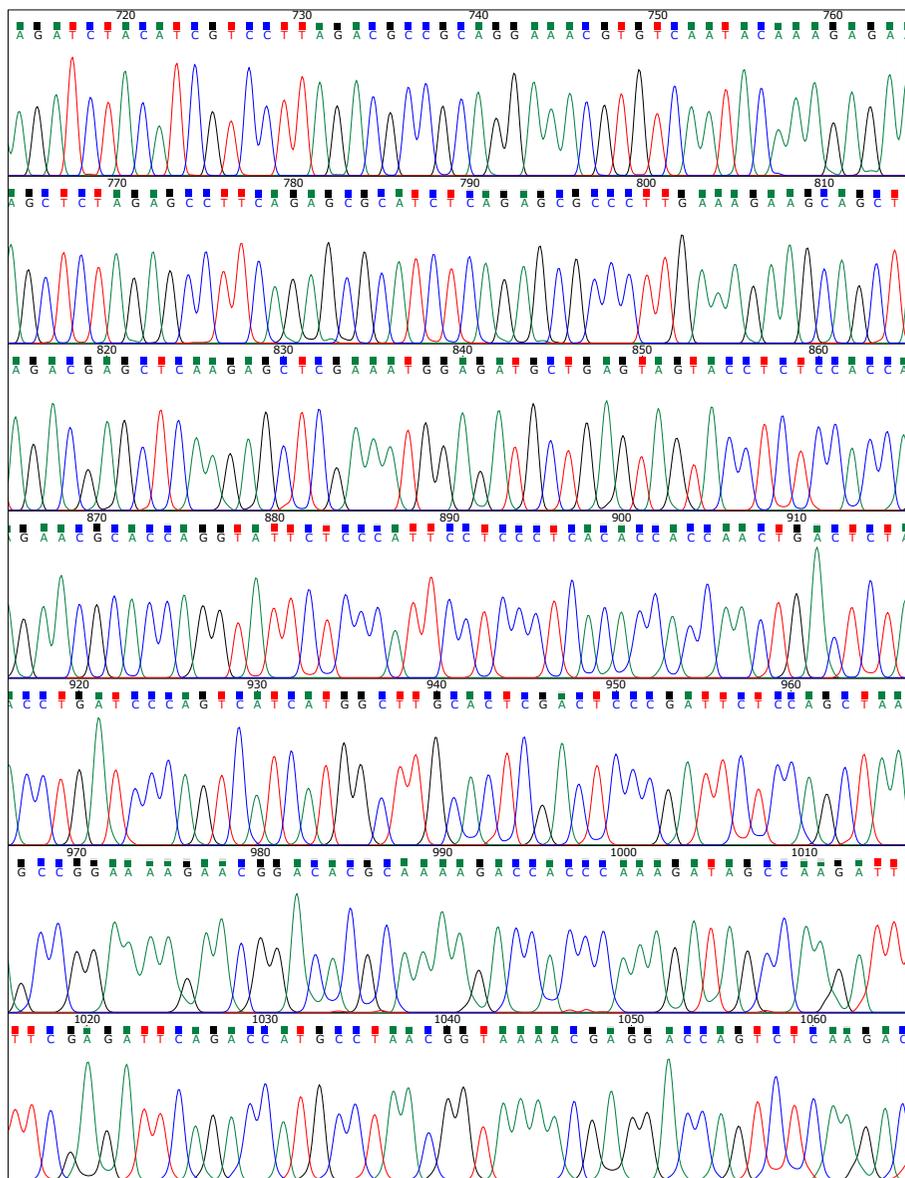
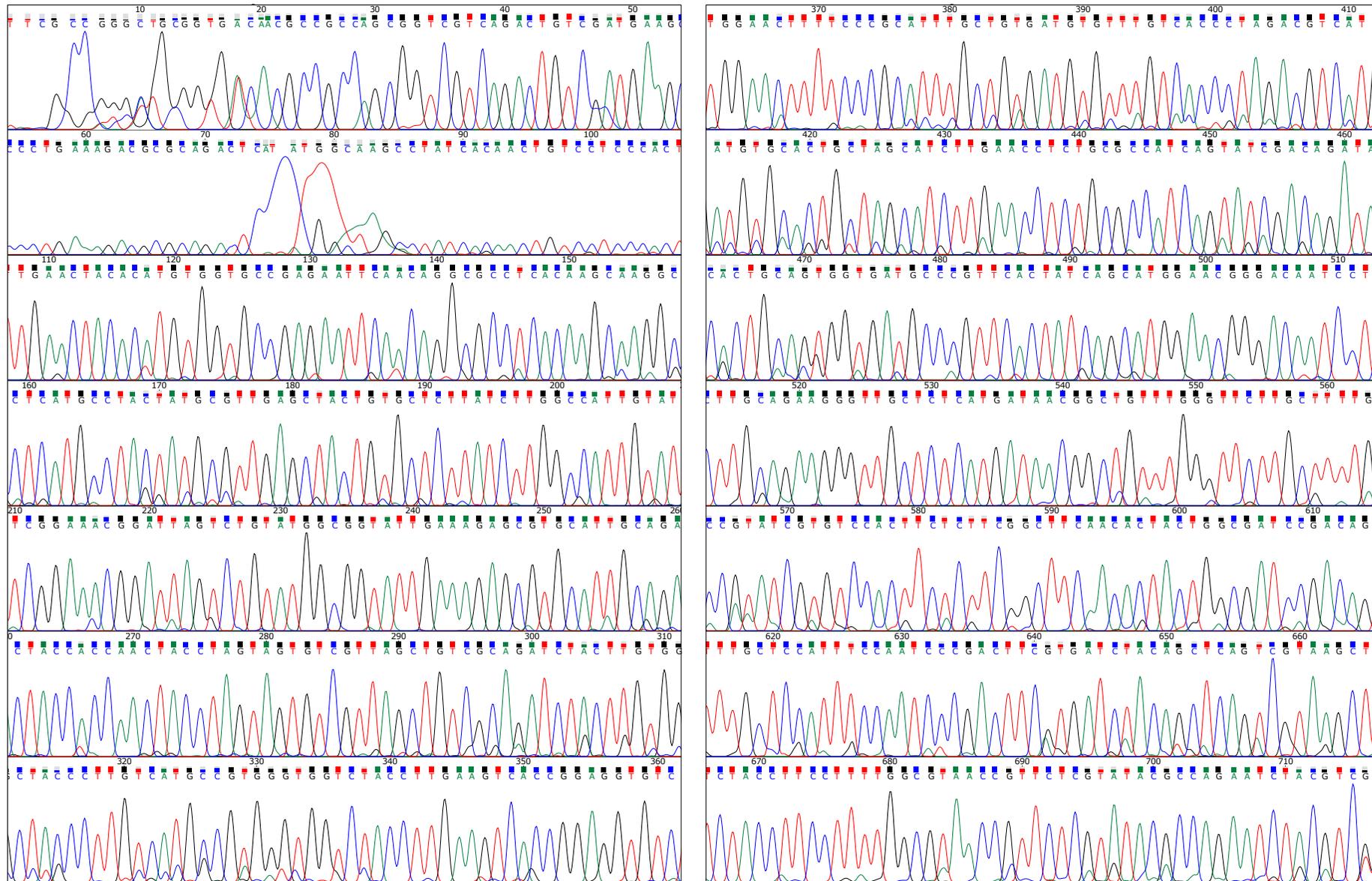


Abb. 87: Vollständige Sequenzierung der Bibliothek D₃-10ng.



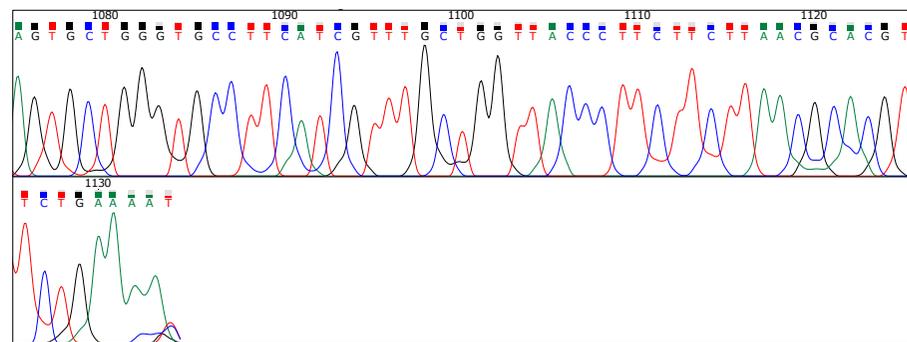
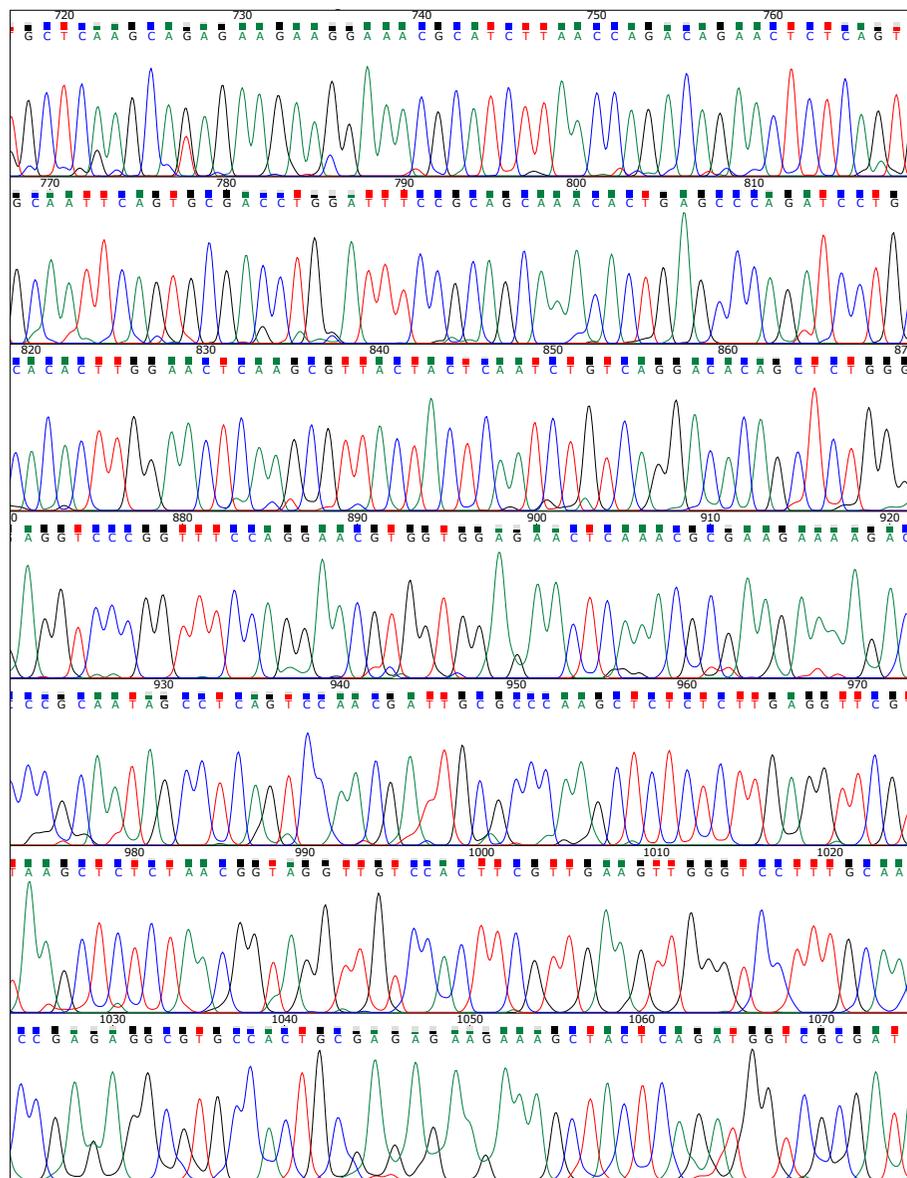
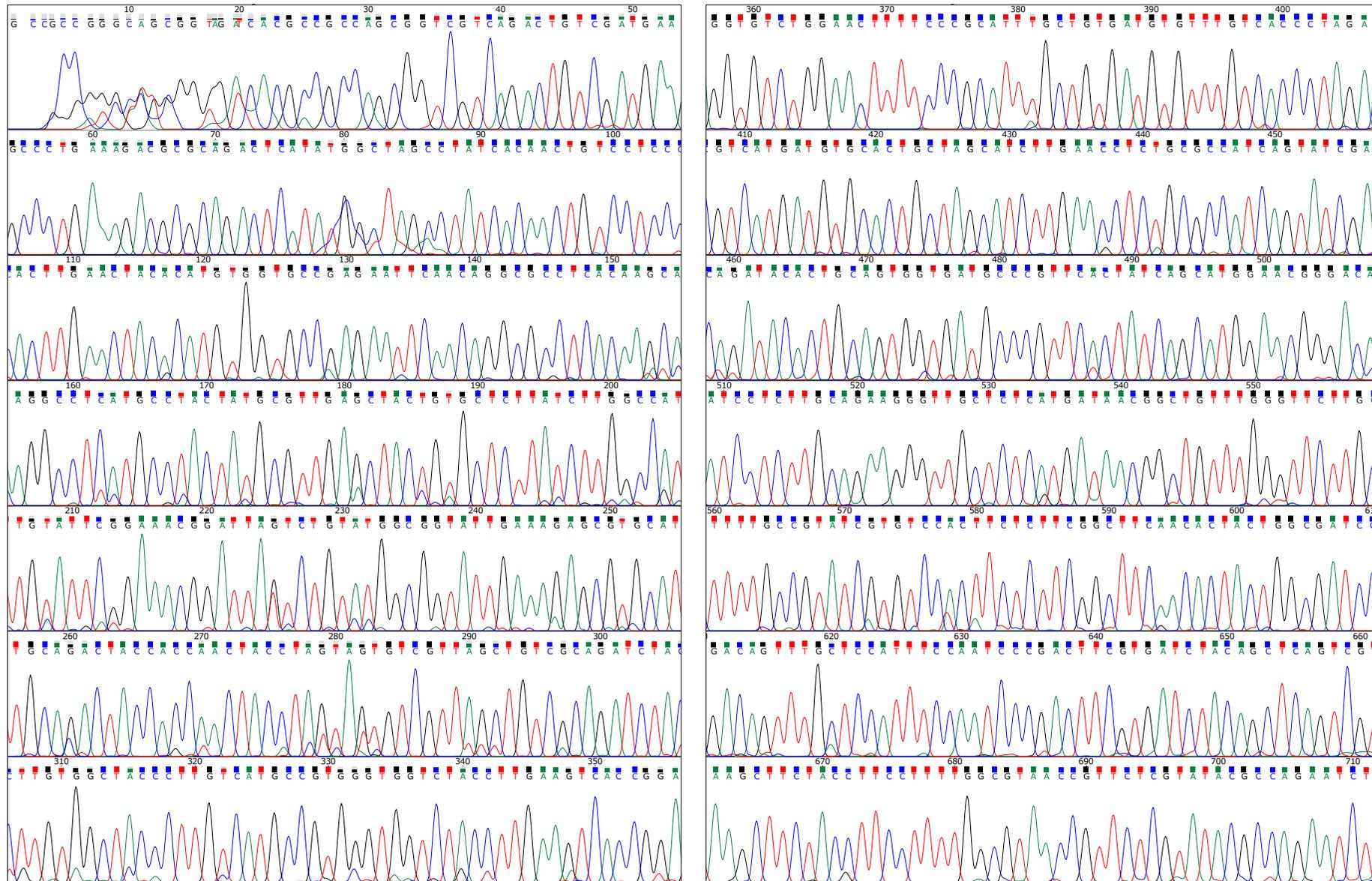
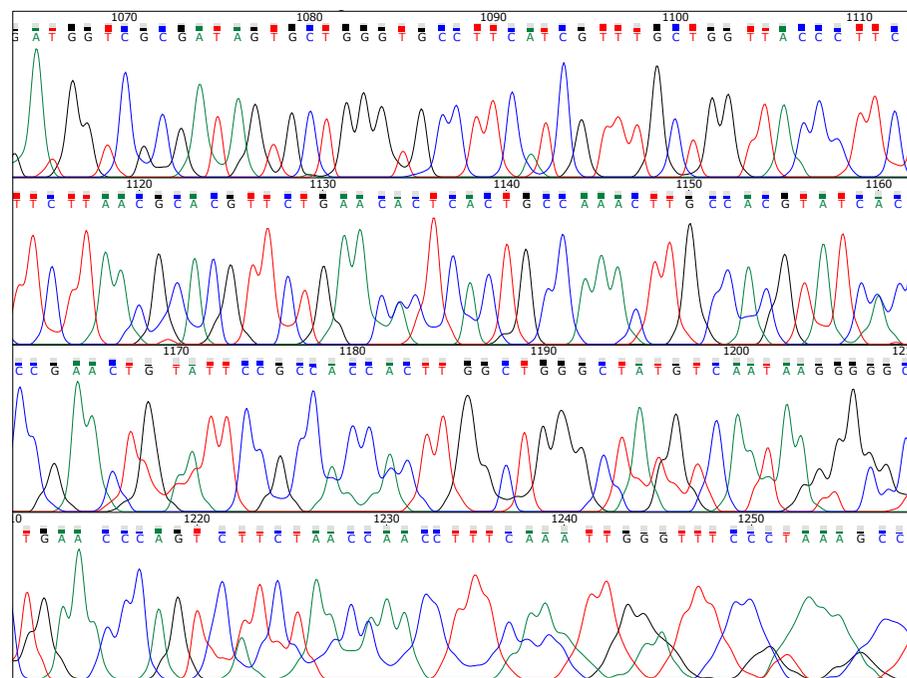
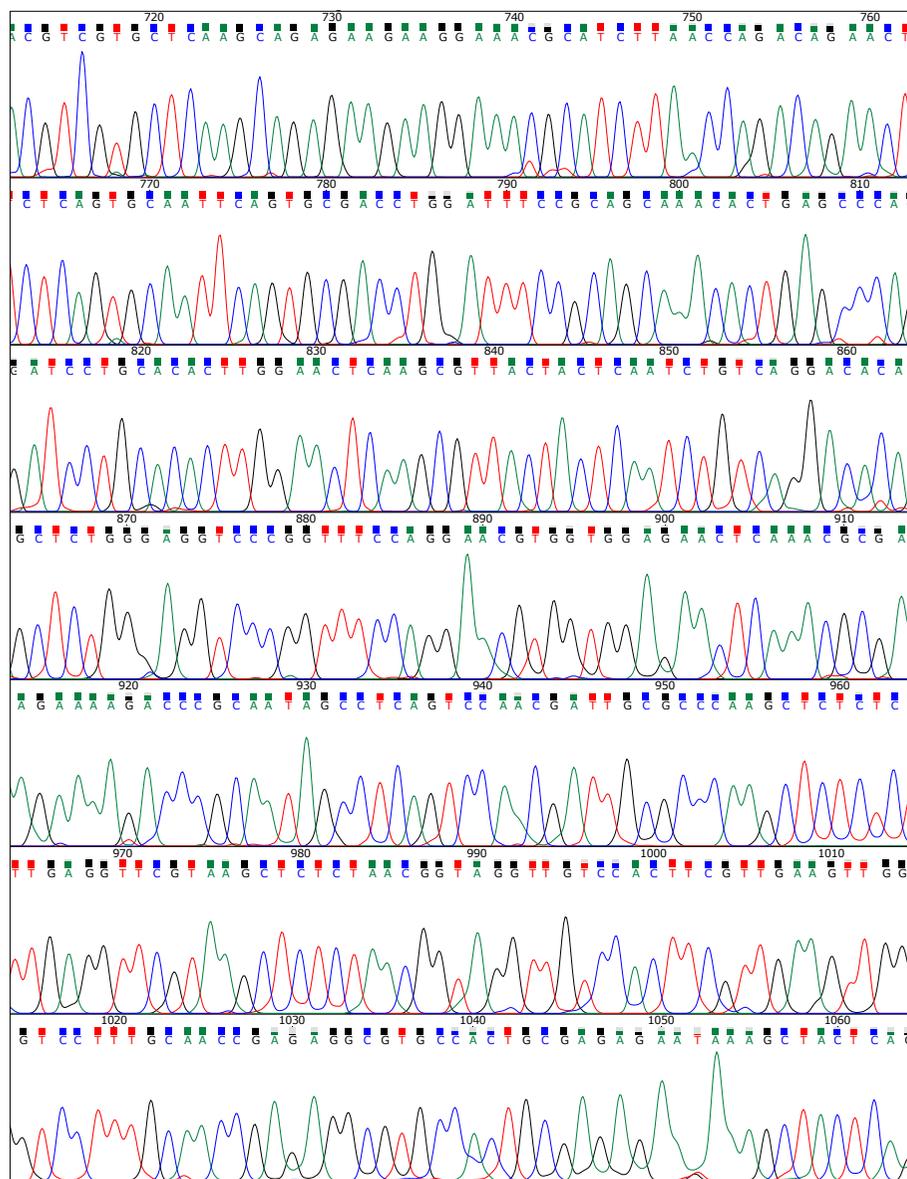


Abb. 88: Vollständige Sequenzierung der Bibliothek D₃-100ng.





Tab. 31: Analyse der Einzelklone der Bibliotheken D₂-100ng und D₃-100ng – Mutationen, Aminosäureaustausche und Stopcodons.

Klon	D ₂			D ₃		
	Mutationen	Austausche	Stopcodons	Mutationen	Austausche	Stopcodons
1	3	2		2	1	
2	9	8		-	-	
3	3	2	1	6	3	1
4	2	-	1	4	1	1
5	6	4		4	4	
6	-	-		1	1	
7	2	1		1	1	
8	6	5	1	5	2	1
9	3	1	1	5	4	
10	3	1		2	2	
11	7	5		6	3	
12	3	3		5	2	1
13	5	3		3	1	
14	5	4		2	1	
15	6	4		2	1	
16	4	3		1	1	
17	2	-		2	2	
18	8	6		1	-	
19	7	6		8	8	
20				2	-	
21				4	2	
22				7	5	
Gesamt	84	58	4	73	45	4
MW	4	3		3	2	

Sequenzalignments von Einzelklonen der Bibliothek D₂-100ng -

gelb: Aminosäureaustausche; pink: Stopcodons

```

D2_wt      MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon1   MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon2   MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon3   MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon4   MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 59
D2_Klon5   MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon6   MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon7   MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon8   MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon9   MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon10  MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon11  MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon12  MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon13  MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon14  MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon15  MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon16  MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon17  MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon18  MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
D2_Klon19  MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPHYNYATLLTLLIAVIVFGNVLVCMVA 60
*****

```

```

D2_wt      REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon1   REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon2   REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon3   REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon4   REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 119
D2_Klon5   REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon6   REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon7   REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon8   REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon9   REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon10  REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon11  REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon12  REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon13  REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon14  REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon15  REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon16  REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon17  REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon18  REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
D2_Klon19  REKALQTTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVGWKFSSRIHCDIFVTLDVMMCTA 120
* * * * *

```

```

D2_wt      SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon1   SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon2   SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon3   SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon4   SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 179
D2_Klon5   SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon6   SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon7   SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon8   SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon9   SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 179
D2_Klon10  SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon11  SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon12  SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon13  SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon14  SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon15  SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon16  SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon17  SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon18  SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
D2_Klon19  SILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWLSFTISCPFLFGLNNADQN 180
* * * * *

```

D2_wt ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon1 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon2 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon3 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon4 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 239
 D2_Klon5 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon6 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon7 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon8 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon9 NCIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 239
 D2_Klon10 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon11 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon12 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon13 KCIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon14 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon15 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon16 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon17 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon18 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240
 D2_Klon19 ECIIANPAFVVYSSIVSFYVPFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRKRVNTRKSSRAFRAHLRAPL 240

D2_wt KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon1 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon2 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon3 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon4 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 299
 D2_Klon5 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon6 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon7 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon8 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 299
 D2_Klon9 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 299
 D2_Klon10 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon11 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon12 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon13 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon14 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon15 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon16 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon17 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon18 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 D2_Klon19 KEARRAQELEMELSSSTSPPERTRYSPIPPSHHQLTLPDPSSHGLHSTPDSPAKPEKNG 300
 * * * * *

D2_wt HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon1 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon2 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon3 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon4 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 359
 D2_Klon5 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon6 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon7 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon8 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 359
 D2_Klon9 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 359
 D2_Klon10 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon11 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon12 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon13 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon14 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon15 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon16 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon17 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon18 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 D2_Klon19 HAKDHPKIAKIFEIQTMPNGKTRTSLKTMSSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPF 360
 * * * * *

```

D2_wt      FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon1   FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon2   FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon3   FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 413
D2_Klon4   FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 413
D2_Klon5   FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon6   FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon7   FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon8   FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 413
D2_Klon9   FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 413
D2_Klon10  FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon11  FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F I I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon12  FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon13  FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon14  FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon15  FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F Y I E F R K A F L K I P H C 414
D2_Klon16  FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon17  FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon18  F I T I L N I H C D C N I P P V L Y S A F T W L G Y N S A V N P I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
D2_Klon19  FITHILNIHCDCNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNP I I Y T T F N I E F R K A F L K I L H C 414
          *** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
    
```

Sequenzalignments von Einzelklonen der Bibliothek D₃-100ng -

gelb: Aminosäureaustausche; **pink:** Stopcodons

```

D3_wt      MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon1   MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon2   MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon3   MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon4   MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon5   MASLSQLS P H L N Y T C G A E N S T G A S Q P R P H A Y Y A L S Y C A L I L A I V F G N G L V C M A V L K E R A L 60
D3_Klon6   MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon7   MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon8   MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon9   MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGAS H A R P H A Y Y A L S Y C A L I L A I V F G N G L V C M A V L K E R A L 60
D3_Klon10  MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon11  MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQ A G P H A Y Y A L S Y C A L I L A I V F G N G L V C M A V L K E R A L 60
D3_Klon12  MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon13  MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon14  MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon15  MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon16  MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon17  MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon18  MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon19  MASLSQLSSHLNY I C G A E Y S T G A S Q A R P H A Y Y A L S Y C A L I L A I V F G N G L V C M A V L K E R A L 60
D3_Klon20  MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon21  MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALILAI VFGNGLVCM AVLKERAL 60
D3_Klon22  MASLSQLSSHLNYTCGAENSTGASQARPHAYYALS YCALI M A I V F G N G L V C M A V L K E R A L 60
          ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
    
```


D3_wt CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon1 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon2 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon3 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILSTRQNSQCNSVRPGFPQ 239
D3_Klon4 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 239
D3_Klon5 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon6 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon7 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon8 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 239
D3_Klon9 CSIYNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYTRIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon10 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon11 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon12 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon13 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon14 CSISNPDFVIYSLVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon15 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon16 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon17 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon18 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon19 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon20 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon21 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
D3_Klon22 CSISNPDFVIYSSVVSFYLPFGVTVLVYARIYVVLKQRRRKILTRQNSQCNSVRPGFPQ 240
*** *****

D3_wt QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon1 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon2 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon3 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 299
D3_Klon4 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 299
D3_Klon5 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon6 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon7 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon8 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 299
D3_Klon9 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon10 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon11 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon12 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 299
D3_Klon13 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon14 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon15 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon16 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon17 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon18 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon19 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon20 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon21 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
D3_Klon22 QTLSPDPAHLELKRYYSICQDTALGGPGFQERGGELKREEKTRNSLSPTIAPKLSLEVRK 300
*** *****

10. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen herzlich bedanken, die mich während der Promotion unterstützt und begleitet haben.

Allen voran gilt mein besonderer Dank meiner Doktormutter Prof. Dr. Birgitta Wöhrl. Danke, Birgit, für die gemeinsame Zeit, Dein offenes Ohr, die oftmals stundenlangen Gespräche in Deinem Büro, wenn mal wieder ein Problem zu lösen war und Deine generelle Unterstützung bei allen Herausforderungen, die während dieser Zeit auf mich zugekommen sind. Danke für die Motivation, die Förderung meiner persönlichen Weiterentwicklung und auch unsere vielen gemeinsamen Reisen nach Nah und Fern, die mir immer in guter Erinnerung bleiben werden.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen KollegInnen am Lehrstuhl Biochemie IV für die schöne Zeit. Danke, Benni, Thessa, Philipp, Andy, Uli, Ramona, Anja, Rainer, Kristian und Stefan, für die vielen Gespräche, die Unterstützung und unseren Spaß im gemeinsamen Alltag. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei all meinen StudentInnen, die ich fördern durfte und die im Rahmen von Praktika und Abschlussarbeiten an meinem Projekt mitgewirkt haben.

Mein Dank gilt auch dem Doktorandenkolleg *Receptor Dynamics* des Elitenetzwerk Bayerns sowie allen Mitgliedern, die ich im Rahmen des Programms kennenlernen durfte. Vor allem danke ich Dr. Harald Hübner, Dr. Dorotheé Weikert und Prof. Dr. Peter Gmeiner für die Kooperation und Zusammenarbeit, die erheblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Darüber hinaus möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Materialien, Geräte und Skripte bedanken sowie den Austausch an Fachwissen. Dies gilt besonders für Renate Gelfert, Julia Dietler und Prof. Dr. Andreas Möglich, Felix Klatt, Dr. Claus Kuhn und Dr. Andrea Di Fonzo sowie Dr. Ralf Rues und Dr. Frank Bernhard.

Weiterhin freue ich mich sehr, dass ich am Programm CoMento teilnehmen durfte. Vor allem die kollegiale Fallberatung mit Marion Breunig, Eleni Milona, Theresa Schilling, Sandra Weiß und Julia Wollmann hat geholfen, aufkommende Herausforderungen zu meistern. Danke Euch allen für unsere gemeinsamen Treffen und den regen Austausch.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meinem Mentor Dr. Finn Bauer. Danke, Finn, für die wertvolle Zeit, die Du Dir nimmst, sowie für die spannenden Einblicke und die inspirierenden Gespräche.

Abschließend möchte ich mich bei Robert, meinen Eltern, meinem Bruder, der ganzen Familie und meinen FreundInnen bedanken. Vielen lieben Dank für Eure Unterstützung bei all meinem Tun und dass Ihr immer für mich da seid.

11. (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....

Ort, Datum, Unterschrift