

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Expression, Isolierung und Funktionsanalyse des OR5 Geruchsrezeptors:
einem Vertreter der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren**

Eva S. Lemker

aus

Hannover

2005

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. D. Oesterhelt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 24. November 2005

.....

Dissertation eingereicht am: 24.11.2005

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Cramer

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2006

Teile dieser Arbeit bzw. im Rahmen der Dissertation angefertigte Arbeiten wurden bzw. werden veröffentlicht:

M. A. Deverall, E. Gindl, E.-K. Sinner, H. Besir, J. Ruehe, M. J. Saxton and C. A. Naumann. Membrane lateral mobility obstructed by polymer-tethered lipids studied at the single molecule level (2004). *Biophys. J.* (88): 1875-1886.

Robelek, R., Lemker, E., Wiltschi, B., Sinner, E. Cell-free in vitro transcription and translation of membrane proteins into tethered planar lipid layers (2005). EP 05023705.6.

E. Lemker, R. Bruno, A. Vogt-Eisele, D. Oesterhelt, E.-K. Sinner. *Expression of the odorant receptor OR5 in P19 cells-a stem cell line with convincing properties as a platform for functional expression of GPCRs.* (in Bearbeitung)

E. Lemker, D. A. Griffith, D. Oesterhelt, E.-K. Sinner. *Functional expression and purification of a rat odorant receptor OR5 in Saccharomyces cerevisiae.* (in Bearbeitung)

Konferenzpräsentationen:

Summer School

Mai 2002, Naurod

"The functional characterization of recombinant odorant receptors in neuronal cells by electrophysiological methods"

A. Vogt, E. Gindl, A. Offenhäusser, W. Knoll, D. Oesterhelt, E. -K. Sinner

International Workshop on Nanostructures and Advanced Functional Materials

6-10 Oktober 2002, Naurod

"Expression of odorant receptors for functional analysis, purification and crystallisation"

E. Sinner, E. Gindl

GSF Research Center

24.-25. Oktober 2002, München

"Expression of odorant receptors for functional analysis, purification and crystallization"

E. Gindl, A. Vogt, D. A. Griffith, A. Offenhäusser, W. Knoll, D. Oesterhelt, E. -K. Sinner

International Congress on Protein Expression & Protein Function

25.-28. Mai 2003, Berlin

"Expression of odorant receptors for functional analysis, purification and crystallisation"

E. Gindl, A. Vogt, D. A. Griffith, A. Offenhäuser, W. Knoll, D. Oesterhelt, E.-K. Sinner

Elso 2003 conference

20.-24. September 2003, Dresden

"Functional expression of the odorant receptor OR5 from Rattus norvegicus"

E. Gindl, E.-K. Sinner

40th Winter Seminar

22.-29. Januar 2005, Klosters, Schweiz

Poster:

"Functional expression and purification of the odorant receptor OR5, a G-protein coupled receptor from Rattus norvegicus"

E. Lemker, D. A. Griffith, D. Oesterhelt, E.-K. Sinner

Vortrag:

"Functional expression and purification of the odorant receptor OR5 from Rattus norvegicus: comparison of two eukaryotic expression systems"

Posterpreis:

International Congress on Protein Expression & Protein Function (DGPF 2003)

"Expression of odorant receptors for functional analysis, purification and crystallisation"

E. Gindl, A. Vogt, D. A. Griffith, A. Offenhäuser, W. Knoll, D. Oesterhelt, E.-K. Sinner

1.	Einleitung	1
1.1.	G-Protein gekoppelte Rezeptoren: bedeutende Vertreter der zellulären Oberflächenrezeptoren	1
1.2.	Funktion von olfaktorischen Rezeptoren	5
1.2.1.	<i>Genetische Grundlage olfaktorischer Rezeptoren</i>	<i>5</i>
1.2.2.	<i>Protein-Struktur olfaktorischer Rezeptoren</i>	<i>7</i>
1.2.3.	<i>Signaltransduktion</i>	<i>9</i>
1.2.3.1.	<i>Der cAMP-Signaltransduktionsweg</i>	<i>9</i>
1.2.3.2.	<i>Die IP₃-Kaskade: ein weiterer beteiligter Signaltransduktionsweg?.....</i>	<i>11</i>
1.3.	Fragestellung der Arbeit.....	13
2.	Material und Methoden	15
2.1.	Organismen, Plasmide und Oligonukleotide.....	15
2.2.	Nährmedien	18
2.2.1.	<i>Medien für Escherichia coli</i>	<i>18</i>
2.2.2.	<i>Medien für Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>18</i>
2.2.3.	<i>Medien für die Säugerzellkultur</i>	<i>19</i>
2.2.4.	<i>Medienzusätze</i>	<i>20</i>
2.3.	Zellkulturen	20
2.3.1.	<i>Stammkultur-Haltung</i>	<i>20</i>
2.3.2.	<i>Propagierung P19-Zellen.....</i>	<i>21</i>
2.3.3.	<i>Neuronale Differenzierung P19-Zellen</i>	<i>21</i>
2.3.4.	<i>Propagierung BHK-21-Zellen.....</i>	<i>22</i>
2.3.5.	<i>Transfektion von P19-Zellen</i>	<i>22</i>
2.3.5.1.	<i>Lipid-basierte Transfektion von P19-Zellen</i>	<i>22</i>
2.3.5.2.	<i>Semliki Forest Virus (SFV): hoch effiziente Infektion von P19-Zellen</i>	<i>22</i>
2.3.6.	<i>Herstellung rekombinanter Semliki Forest Viren und Infektion der P19-Zellen ..</i>	<i>23</i>
2.3.6.1.	<i>In vitro Generierung von mRNA</i>	<i>23</i>
2.3.6.2.	<i>Transfektion mittels Elektroporation</i>	<i>23</i>
2.3.6.3.	<i>Ernte und Aktivierung der Virus-Stammsuspensionen</i>	<i>24</i>
2.3.6.4.	<i>Infektion der P19-Zellen</i>	<i>24</i>

2.4.	Molekularbiologische Methoden	25
2.4.1.	Standardmethoden.....	25
2.4.2.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
2.4.3.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	26
2.4.4.	Phenol/Chloroform-Extraktion	27
2.4.5.	DNA-Sequenzierung	27
2.4.6.	Northern-Blot	28
2.4.7.	Markierung von DNA-Sonden mit $\alpha^{32}P$ -dATP	28
2.4.8.	Northern-Hybridisierung	29
2.4.9.	Echtzeit-PCR	29
2.4.9.1.	Probenherstellung für die Echtzeit-PCR	29
2.4.9.2.	cDNA-Quantifizierung in der Echtzeit-PCR	30
2.5.	Immunologische Arbeiten	30
2.5.1.	Generierung und Reinigung eines monoklonalen OR5-Antikörpers	30
2.5.1.1.	Kopplung eines OR5-Haptens an Keyhole limpet hemocyanine (KLH)	30
2.5.1.2.	Immunisierung von Mäusen mit OR5-Peptid	31
2.5.1.3.	Generierung von Hybridoma-Zelllinien	31
2.5.1.4.	Aufreinigung monoklonaler OR5-Antikörper	32
2.5.2.	Enzyme linked Immunosorbent Assay“ (ELISA): Selektion von Hybridomazellen und Immunglobulinklassen-Bestimmung	33
2.5.2.1.	Selektion von Hybridomazellen	33
2.5.2.2.	Bestimmung der Immunglobulin-Klasse	34
2.5.3.	Kovalente Kopplung von monoklonalen Antikörpern an Protein A-Sepharose....	34
2.5.4.	Regeneration der OR5-Antikörper-Sepharose	35
2.5.5.	Immunfluoreszenz-Markierung an ganzen Zellen	35
2.5.5.1.	Fixierung und Immunfluoreszenz-Markierung von Hefezellen.....	35
2.5.5.2.	Fixierung und Immunfluoreszenz-Markierung von P19-Zellen	36
2.5.6.	BIACORE	38
2.6.	Biochemische Methoden	38
2.6.1.	Standardmethoden.....	38

2.6.2.	<i>Präparation von Gesamtprotein aus S. cerevisiae</i>	39
2.6.3.	<i>Isolierung von Gesamtmembranen aus S. cerevisiae</i>	39
2.6.4.	<i>Isolierung von Gesamtmembranen aus P19-Zellen</i>	40
2.6.5.	<i>Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation</i>	40
2.6.5.1.	<i>Abtrennung von ribosomalen Proteinen aus Gesamtmembranpräparationen</i>	40
2.6.5.2.	<i>Fraktionierung von Organellen</i>	41
2.6.6.	<i>Proteinfällungen</i>	41
2.6.6.1.	<i>TCA-Fällung</i>	42
2.6.6.2.	<i>Ethanol-Fällung</i>	42
2.6.6.3.	<i>Ammoniumsulfat-Fällung</i>	42
2.6.7.	<i>Deglykosylierung von OR5-Protein</i>	42
2.6.8.	<i>Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)</i>	43
2.6.9.	<i>Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen</i>	44
2.6.9.1.	<i>Coomassie-Färbung</i>	44
2.6.9.2.	<i>Silberfärbung</i>	44
2.6.10.	<i>Densitometrische Analyse der Konzentrationen von Proteinen in Polyacrylamidgelen und Western-Blot</i>	44
2.6.11.	<i>Western-Blot-Analyse</i>	45
2.6.12.	<i>Quantifizierung von Proteinmengen</i>	46
2.6.13.	<i>Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität in S. cerevisiae</i>	46
2.6.13.1.	<i>Qualitative Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität von Hefestämmen auf X-Gal-Indikatorplatten</i>	46
2.6.13.2.	<i>Quantitative Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität in S. cerevisiae</i>	46
2.6.14.	<i>Proteinsequenz-Analysen</i>	47
2.6.15.	<i>Circulär Dichroismus (CD)-Spektroskopie</i>	48
2.7.	<i>Expression und Aufreinigung von OR5</i>	48
2.7.1.	<i>Expression von OR5 in S. cerevisiae-Produktionsstämmen</i>	48
2.7.2.	<i>Solubilisierung und Isolierung des heterolog synthetisierten OR5-Rezeptors</i>	48
2.7.2.1.	<i>Vorbereitung von Gesamtmembranen für die Solubilisierung</i>	48
2.7.2.2.	<i>Solubilisierung von OR5</i>	49

2.7.2.3.	<i>Regenerierung und Beladung von Ni-NTA-Agarose</i>	49
2.7.2.4.	<i>Ni-NTA-Chromatographie</i>	50
2.7.2.5.	<i>Kationenaustauscherchromatographie</i>	51
2.7.2.6.	<i>Affinitätschromatographie mit OR5-Antikörpern</i>	51
2.7.2.7.	<i>Gelfiltration</i>	52
2.8.	Messung der Tryptophanfluoreszenz: Bestimmung der Funktionalität des isolierten OR5-Rezeptors	52
2.9.	Kristallisation	53
2.10.	Ca ²⁺ -Imaging	53
2.11.	Chemikalien, Enzyme und Gase	54
3.	Experimente und Ergebnisse	55
3.1.	Expression des Geruchsrezeptors OR5	58
3.1.1.	<i>Expression von OR5 in der Säugetier-Zelllinie P19</i>	58
3.1.1.1.	<i>Expression von OR5 unter Verwendung konstitutiver Vektoren</i>	60
3.1.1.1.a.	<i>Nachweis von OR5 auf Transkriptionsebene</i>	60
3.1.1.1.b.	<i>Nachweis von OR5 auf Translationsebene: Western-Blot und Immunfluoreszenz-Markierung</i>	61
3.1.1.2.	<i>Expression von OR5 unter Verwendung des Semliki Forest Virus-Expressionssystems</i>	62
3.1.1.2.a.	<i>Nachweis von OR5 auf Transkriptionsebene</i>	64
3.1.1.2.b.	<i>Nachweis von OR5 auf Translationsebene: Western-Blot und Immunfluoreszenz-Markierung</i>	65
3.1.2.	<i>Expression von OR5 in Saccharomyces cerevisiae</i>	67
3.1.2.1.	<i>Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität in OR5-Expressionsstämmen</i>	69
3.1.2.1.a.	<i>Qualitative Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität</i>	69
3.1.2.1.b.	<i>Quantitative Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität</i>	71
3.1.2.2.	<i>Quantitativer Vergleich der OR5-Proteinsynthesestärken im Western-Blot</i>	72
3.1.2.3.	<i>Nachweis von OR5 in der Immunfluoreszenz-Markierung</i>	73
3.1.2.4.	<i>Quantifizierung des OR5-Proteins aus S. cerevisiae wI</i>	74
3.1.2.5.	<i>Vergleich der OR5-Proteinsynthesestärken unter verschiedenen Wachstumsbedingungen</i>	75

3.1.2.6.	<i>Vergleich der OR5-Proteinsynthesestärken in S. cerevisiae- und P19-Zellen</i>	77
3.2.	Untersuchungen zur N-Glykosylierung und Lokalisation des OR5-Rezeptors	78
3.2.1.	<i>N-Glykosylierung</i>	78
3.2.1.1.	<i>Deglykosylierung des in S. cerevisiae produzierten OR5-Proteins</i>	79
3.2.1.2.	<i>Deglykosylierung des in P19-Zellen produzierten OR5-Proteins</i>	79
3.2.2.	<i>Lokalisation des OR5-Rezeptors in der Zelle</i>	80
3.2.2.1.	<i>Lokalisation von OR5 in S. cerevisiae w1</i>	80
3.2.2.2.	<i>Lokalisation von OR5 in OR5-pSFV1Cap infizierten P19-Zellen</i>	81
3.2.3.	<i>Expression und Lokalisation von OR5: Zusammenfassung</i>	82
3.3.	Generierung eines monoklonalen Antikörpers spezifisch für den Geruchsrezeptor OR5 aus <i>Rattus norvegicus</i>	83
3.3.1.	<i>Antigen-Herstellung und Generierung von Hybridomazellen</i>	83
3.3.2.	<i>Identifizierung und Isolierung von OR5-Antikörpern</i>	85
3.3.3.	<i>Biacore: Analyse des IgG2b OR5-Antikörpers 22-145-3</i>	88
3.3.4.	<i>Kopplung OR5-spezifischer Antikörper an Protein A-Sepharose</i>	90
3.4.	Isolierung des Geruchsrezeptors OR5	91
3.4.1.	<i>Isolierung von OR5 aus S. cerevisiae w1</i>	91
3.4.1.1.	<i>Gesamtmembranpräparation und Solubilisierung</i>	91
3.4.1.2.	<i>Immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)</i>	94
3.4.1.3.	<i>OR5-Affinitätschromatographie</i>	95
3.4.1.4.	<i>Ionenaustauscherchromatographie: MonoS</i>	98
3.4.1.5.	<i>Gelfiltration an Sephadex S-200</i>	100
3.4.2.	<i>Isolierung von OR5 aus OR5-SFV1Cap-infizierten P19-Zellen</i>	103
3.4.3.	<i>Isolierung des OR5-Proteins: Zusammenfassung</i>	104
3.5.	Charakterisierung des isolierten OR5-Proteins	105
3.5.1.	<i>CD-Spektroskopie</i>	105
3.5.2.	<i>Funktionalität des Rezeptors: Analyse der Tryptophanfluoreszenz</i>	106
3.5.3.	<i>Kristallisation von OR5</i>	109
3.5.4.	<i>Charakterisierung des isolierten OR5-Proteins: Zusammenfassung</i>	111

3.6.	Charakterisierung der Säugetier-Stammzelllinie P19	112
3.6.1.	<i>Qualitativer Nachweis von GapDH, OMP, G_{olf}, G_q und oCNC2</i>	113
3.6.2.	<i>Relative Quantifizierung von OMP-, G_{olf}- und G_q-mRNA durch Echtzeit-PCR</i>	116
3.6.3.	<i>Detektion neuronaler und olfaktorischer Marker in P19-Zellen auf Protein-Ebene</i>	120
3.6.4.	<i>In vivo Funktionsnachweis des in P19-Zellen exprimierten OR5-Rezeptors</i>	121
3.6.5.	<i>Charakterisierung P19-Zellen: Zusammenfassung</i>	124
4.	Diskussion	125
4.1.	Heterologe Expression von GPCRs	125
4.1.1.	<i>Die murine Stammzelllinie P19: eine ideale Plattform zur funktionellen Expression von Geruchsrezeptoren?</i>	127
4.1.2.	<i>Die Hefe Saccharomyces cerevisiae als potentes Expressionssystem für einen Geruchsrezeptor</i>	131
4.2.	Ist der produzierte Geruchsrezeptors OR5 mit „Lipid Rafts“ in der Plasmamembran assoziiert?	135
4.3.	Lokalisation des Geruchsrezeptors in <i>S. cerevisiae</i> Membranen	137
4.4.	Isolierung und Kristallisation von Membranproteinen	137
4.5.	Die künstliche Nase	141
5.	Zusammenfassung	144
6.	Literaturverzeichnis	147

1. Einleitung

1.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren: bedeutende Vertreter der zellulären Oberflächenrezeptoren

Jede Zelle wird durch eine äußere Membran von ihrer Umwelt getrennt. Eine selektive Permeabilität dieser Membran ermöglicht die Aufrechterhaltung des intrazellulären Milieus. Es handelt sich hierbei jedoch nicht nur um eine Diffusionsschranke, die Zellmembran beherbergt auch eine Vielzahl von Membranproteinen, die für eine geregelte Interaktion der Zelle mit ihrer Umgebung notwendig sind. Diese so genannten Oberflächenrezeptoren sind für die meisten membranspezifischen Funktionen wie z. B. Zell-Zell-Kommunikationsprozesse, die Weiterleitung externer Signale oder auch Zelladhäsionsvorgänge verantwortlich. Unterteilt werden die Rezeptoren in Ionenkanäle, Rezeptor-Tyrosinkinasen und 7-Transmembranhelix-Rezeptoren (z. B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren), wobei alle drei Gruppen sehr unterschiedlichen Mechanismen unterliegen. Allen gemeinsam ist jedoch, dass sie durch Konformationsänderungen ein externes Signal in das Zellinnere weiterleiten und dadurch eine zelluläre Antwort auslösen.

Seit der Klonierung des ersten G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR) im Jahre 1983, dem Rinderopsin (Nathans, J. und Hogness, D. S., 1983), wurden über 5.000 Mitglieder der GPCR-Rezeptorgruppe beschrieben (Fredriksson, R. und Schioth, H. B., 2005). GPCRs stellen eine große Familie membranständiger Zelloberflächenrezeptoren dar, welche nicht nur in Vertebraten und Invertebraten nachgewiesen wurden, sondern auch in Protozoen, Pilzen und Pflanzen (Marsh, L. und Herskowitz, I., 1988; Josefsson, L. G. und Rask, L., 1997; Hill, C. A. *et al.*, 2002; Takeda, S. *et al.*, 2002; Kulkarni, R. D. *et al.*, 2005; Srivastava, D. P. *et al.*, 2005). Innerhalb der Gruppe der membrangebundenen Rezeptoren weisen sie die größte Diversität auf der Grundlage von nur einem Wirkungsprinzip auf.

Bekannte Beispiele für die Vermittlung von extrazellulären Signalen in das Zellinnere durch GPCRs sind olfaktorische, gustatorische, visuelle Reize und Schmerzempfindungen, aber auch in Zellwachstum oder Kommunikationsprozesse ist diese Rezeptorgruppe involviert. Eine Signalperzeption durch GPCRs kann durch die Bindung verschiedenster Liganden ausgelöst werden. Typische Liganden sind z.B. Neurotransmitter, Chemoattraktanden, Hormone, Cytokine, Photonen sowie Geruchsstoffe. Die Vielseitigkeit der Liganden lässt offensichtlich auf einen großen evolutionären Erfolg dieser Rezeptorklasse schließen.

Einleitung

Allen GPCRs gemeinsam ist eine 7-transmembranale, α -helikale Domänen-Topologie, ihre Kopplung an ein heterotrimeres G-Protein (siehe unten, cAMP-Signaltransduktion) auf der intrazellulären Seite des Rezeptors sowie eine extrazelluläre Ligandenbindestelle (Katada, S. *et al.*, 2005). Die Superfamilie der GPCRs unterteilt sich grob in sechs Familien (Bockaert, J. und Pin, J. P., 1999), wobei die größte Gruppe aus den Rhodopsin-ähnlichen GPCRs mit einem Anteil von über 90% besteht (Palczewski, K. *et al.*, 2000) (Abb. 1). Ein wichtiger Vertreter ist Rhodopsin, das Sehpigment der Stäbchenzelle in der Retina von Säugetieren. Dieser Familie werden auch die Geruchsrezeptoren zugeordnet.

Ein strukturell ähnlicher, jedoch nicht verwandter Rezeptor ist das archaeale Bakteriorhodopsin, das als lichtgetriebene Protonenpumpe ohne Beteiligung eines G-Proteins fungiert und ebenfalls keinerlei Verwandtschaft zu Photorezeptoren höherer Organismen aufweist (Oesterhelt, D. und Stoerkenius, W., 1971; Kayushin, L. P. und Skulachev, V. P., 1974; Henderson, R., Grigorieff, N., 1995).

Innerhalb der Familien bestehen Sequenzähnlichkeiten in der Aminosäurezusammensetzung. Zwischen verschiedenen Familien fallen sie, wenn überhaupt vorhanden, jedoch sehr gering aus. Dennoch können all diese Rezeptoren aufgrund ihrer Funktion, Aminosäuretertiärstruktur und der Beteiligung eines G-Proteins zu der großen Familie der GPCRs zusammengefasst werden.

In Tabelle 1 sind beispielhaft einige der bekanntesten GPCRs aufgeführt. Auffällig ist die hohe Diversität von natürlichen Liganden, die im Widerspruch zu stehen scheint zu der einheitlichen, globalen Struktur der GPCRs. Demnach muss die Ligandenspezifität der Rezeptoren durch eine starke Variabilität ihrer Feinstruktur determiniert sein.

Tab. 1: Prominente Beispiele für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

<i>Rezeptor</i>	<i>G-Protein</i>	<i>Ligand</i>	<i>Effektorprotein</i>
Geruchsrezeptoren	G _{olf}	Geruchsmoleküle	Adenylatcyclase
Rhodopsin	Transducin	Licht	cGMP-Phosphodiesterase
β -adrenerger Rezeptor	G _s	Adrenalin	Adenylatcyclase
Geschmacksrezeptoren	G _{ga}	Nahrungsmittel	Adenylatcyclase
muscarinischer Acetylcholinrezeptor	G _i	Acetylcholin	Kaliumkanal
Chemotaxisrezeptor	G _q	Peptid	Phospholipase C

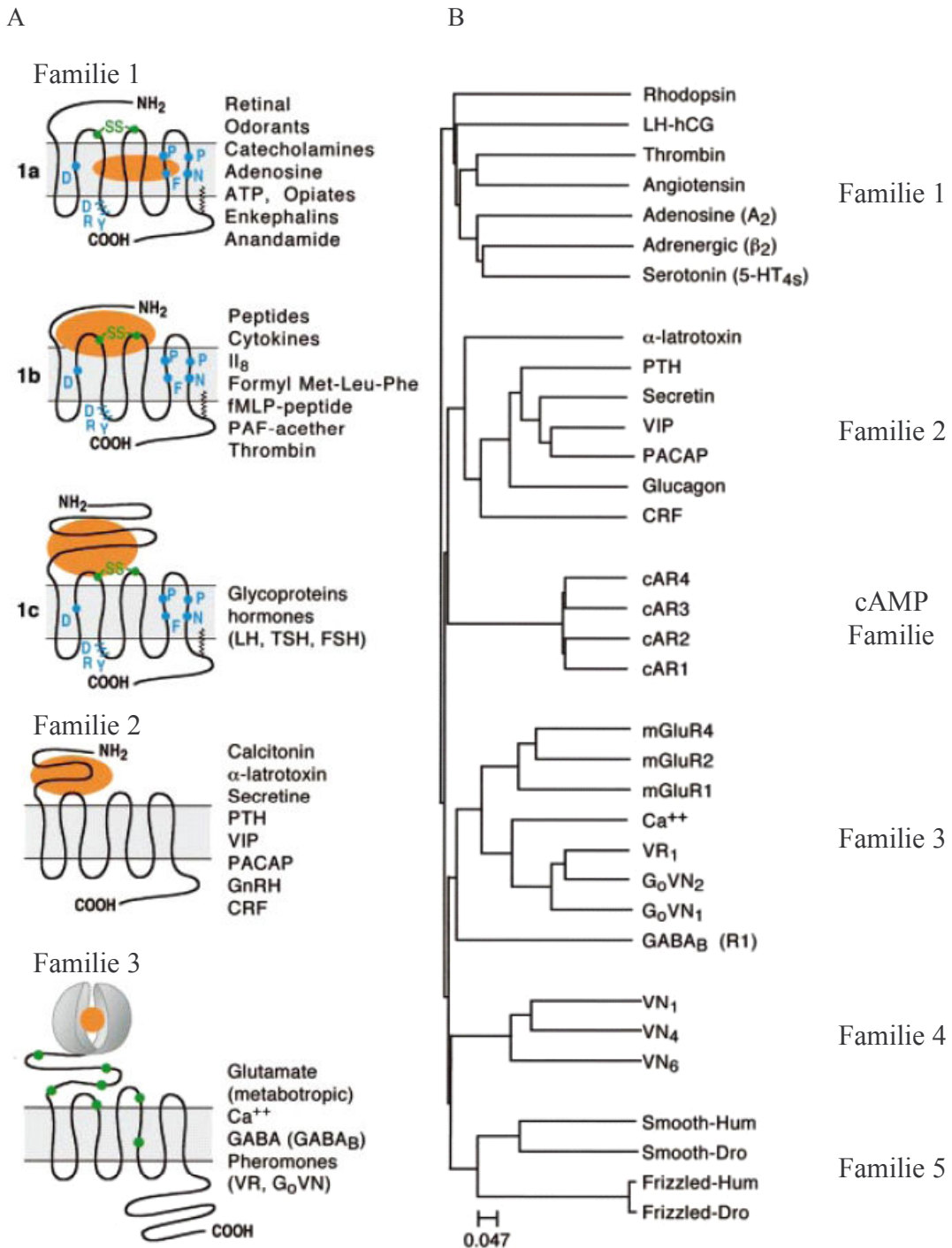


Abb. 1: Klassifizierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nach Bockeaert und Pin (Bockeaert, J. und Pin, J. P., 1999). A: Schematische Darstellung der Familien 1-3; B: Klassifizierung aller Familien. Familie 1: Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren. In dieser Gruppe sind die Geruchsrezeptoren klassifiziert. Die Gruppe 1a zeichnet sich durch kleine Ligandenmoleküle und eine Ligandenbindungsstelle innerhalb der 7 Transmembran-Region aus. Gruppe 1b enthält Rezeptoren zur Bindung von Peptiden. Glykoprotein Hormonrezeptoren sind in der Gruppe 1c zusammengefasst. Familie 2: Sekretin-ähnliche Rezeptoren. Die Familie 2 weist eine ähnliche Morphologie, aber keine Sequenzähnlichkeit zur ersten Gruppe auf. Familie 3 umfasst mGluRs und Ca^{2+} -detektierende Rezeptoren sowie G_o gekoppelte $GABA_B$ -, Pheromon- und Geschmacks- Rezeptoren. Die Familien 4/5/cAMP enthalten G_i gekoppelte Pheromonrezeptoren, Rezeptoren, die in die embryonale Entwicklung involviert sind, sowie cAMP Rezeptoren, welche bisher jedoch erst in *D. discoideum* gefunden wurden. Es existieren einige weitere Rezeptoren, die keiner dieser Gruppen zugeordnet werden können, bzw. deren Liganden noch nicht bekannt sind. Der Ligand ist in orange dargestellt.

Die Beteiligung von GPCRs an vielfältigen physiologischen Vorgängen macht deutlich, dass sie Auslöser für zahlreiche, oft schwerwiegende Krankheiten sein können. Allein die Tatsache, dass es sich bei über >1% der Gene in Vertebraten um GPCR-Gene handelt (Bockaert, J. und Pin, J. P., 1999), macht diese Rezeptorklasse zu einer wichtigen Zielstruktur für die pharmakologische Forschung. Noch deutlicher wird ihre besondere Stellung in Anbetracht dessen, dass derzeit über die Hälfte aller verschreibungspflichtigen Medikamente auf diese Rezeptoren wirken, darunter bekannte Beispiele wie die Betablocker, Neuroleptika und Antihistaminika. Die gezielte Modellierung von Medikamenten ist jedoch nur möglich, wenn Informationen über Funktion *und* Struktur eines Rezeptors vorliegen. Dennoch ist Rinderopsin (Abb. 2) der bisher einzige Vertreter dieser Gruppe, dessen Struktur im atomaren Bereich aufgeklärt werden konnte (Palczewski, K. *et al.*, 2000). Obwohl Versuche unternommen werden, für eine Reihe von GPCRs Medikamente auf Grundlage dieser Struktur zu entwickeln, mangelt es letztendlich an genaueren Informationen über die Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion. Die Hauptgründe hierfür sind sowohl physiologischer als auch methodischer Natur, da GPCRs in homologen Systemen nur in sehr geringen Mengen exprimiert werden, und auch mit Hilfe heterologer Systeme und gängiger chromatographischer Verfahren noch keine ausreichenden Mengen eines isolierten Rezeptors produziert werden konnten (Tate, C. G., 2001; Sarramegna, V. *et al.*, 2003). Außerdem ist die Kristallisation hydrophober Membranproteine bisher nur in wenigen Fällen gelungen (Sowadski, J. M., 1994). Die Ursachen hierfür sind ebenfalls vielfältig, ein Aspekt ist aber z. B. der notwendige, jedoch interferierende Einsatz von Detergenzien als Lösungsvermittler.

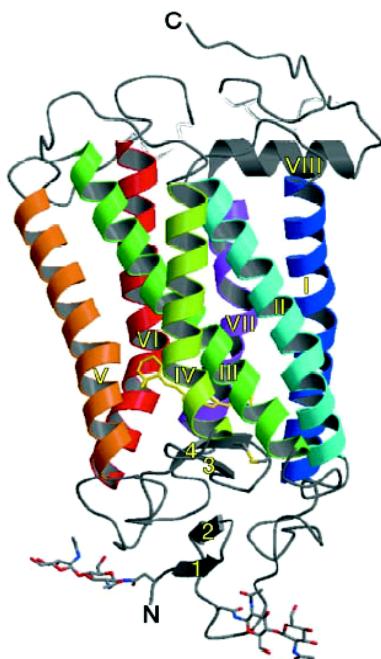


Abb. 2: Ansicht der dreidimensionalen Struktur von Rinderopsin parallel zur Membranebene nach Palczewski *et al.* (Palczewski, K. *et al.*, 2000). Die Transmembrandomänen sind mit I-VII gekennzeichnet.

1.2. Funktion von olfaktorischen Rezeptoren

1.2.1. Genetische Grundlage olfaktorischer Rezeptoren

Durch das olfaktorische System wird eine große Anzahl strukturell sehr unterschiedlicher Moleküle aus der Umwelt detektiert und unterschieden. Einige Vertebraten weisen eine wirklich beeindruckende Duftunterscheidungsfähigkeit auf, die gelegentlich sogar die differenzierte Wahrnehmung von Enantiomeren einer chemischen Substanz erlaubt. Am Beispiel der Lepidoptera konnte außerdem eine bisweilen außerordentliche, quantitative Sensitivität nachgewiesen werden: diese Insekten sind in der Lage, einzelne Moleküle eines artspezifischen Pheromons wahrzunehmen (Seyffert, W., 1998).

Vergleicht man diese Art der Reizverarbeitung mit z. B. dem visuellen System, wird offensichtlich, dass sich die Signalerkennung der Olfaktion nicht mit einigen wenigen Rezeptortypen erklären lässt, sondern einem wesentlich komplexeren System unterliegen muss. Erste Erkenntnisse zu speziellen Oberflächenrezeptoren, welche in der Olfaktion als „Übersetzer“ externer Geruchsmoleküle in ein für den Organismus verwertbares Signal fungieren, stammen aus dem Jahre 1991, als Richard Axel und Linda Buck erstmalig Mitglieder der Geruchsrezeptorfamilie klonieren konnten (Buck, L. und Axel, R., 1991). In den Jahren seit dieser Entdeckung konnten Informationen zur Organisation und Verarbeitung der Informationen in Nase, olfaktorischem Bulbus (Riechkolben) und dem olfaktorischen Kortex im Gehirn gewonnen werden.

Im Genom der Maus z. B. werden verschiedene Typen von olfaktorischen Rezeptoren (OR) durch rund 1400-1500 Gene kodiert, beim Menschen wurden rund 900 entsprechende Gene identifiziert (Young, J. M. *et al.*, 2002). OR-Gene enthalten keine Introns (Buck, L. und Axel, R., 1991), weisen eine Größe von durchschnittlich 1.000 bp auf und sind auf mindestens 24 Clustern mit jeweils ca. 10 bis 100 Genen im Genom verteilt (Zhang, X. und Firestein, S., 2002; Gaillard, I. *et al.*, 2004). Rund 20% dieser Gene in der Maus sind Pseudogene und kodieren demnach für nicht mehr funktionelle Rezeptoren (Young, J. M. *et al.*, 2002; Zhang, X. und Firestein, S., 2002; Gaillard, I. *et al.*, 2004; Mombaerts, P., 2004). Sequenzuntersuchungen haben gezeigt, dass Menschen deutlich weniger Geruchsstoffe als andere Vertebraten wahrnehmen können. Trotzdem wären wir theoretisch immer noch in der Lage, tausende verschiedene Stoffe zu unterscheiden. Die im Vergleich geringere olfaktorische Leistung des Menschen beruht auf einem hohen Anteil an Pseudogenen von rund 60 bis 70% (Rouquier, S. *et al.*, 1998; Mombaerts, P., 1999; Glusman, G. *et al.*, 2001). Zurückzuführen ist dieser Effekt offenbar auf unterschiedliche Selektionsdrücke

zum Erhalt funktioneller Geruchsrezeptoren im Laufe der Evolution und wurde verursacht durch Leserahmen-Verschiebungen, Deletionen oder Mutationen (Mombaerts, P., 1999). Noch bei den Altweltaffen beträgt der Anteil dieser Pseudogene nur ca. 25 bis 30%, während bis hin zu den Hominoiden ein zeitabhängiger Verlust tatsächlich funktioneller OR-Gene erfolgte (Gaillard, I. *et al.*, 2004).

OR-Gene lassen sich in die Klasse I-Gene (fischähnliche OR-Gene), welche zu einem geringeren Anteil auch in Vertebraten vertreten sind, sowie die Klasse II-Gene (Tetrapoden-spezifische OR-Gene), die bisher jedoch ausschließlich in terrestrischen Vertebraten gefunden wurden, unterteilen (Freitag, J. *et al.*, 1998; Glusman, G. *et al.*, 2000). Ursprünglich wurde angenommen, dass die Klasse I-Gene für jene Rezeptoren kodieren, welche nur wasserlösliche Geruchsstoffe binden, während stark flüchtige, unlösliche Liganden den Rezeptoren der Klasse II-Genen zugeordnet waren. Später wurden jedoch auch in der Maus flüchtige Liganden der Klasse I-Rezeptoren identifiziert (Malnic, B. *et al.*, 1999). Zusätzlich zeigte sich im Menschen ein vergleichsweise geringer Anteil an Pseudogenen unter den Klasse I-Genen, was auf einen positiven Selektionsdruck schließen lässt. Demnach übernehmen die Klasse I-Gene auch in Vertebraten eine wichtige Funktion. Eine neuere Hypothese besagt, dass Klasse I-Gene für Rezeptoren kodieren, welche hydrophile bis moderat hydrophobe, flüchtige Substanzen erkennen, während an Klasse II-Rezeptoren ausschließlich hydrophobe Komponenten binden (Gaillard, I. *et al.*, 2004).

Die Expression der Rezeptoren in den neuronalen Zellen unterliegt einer strengen Regulierung. Ein fundamentaler Grundsatz auf dem Gebiet der Geruchsrezeptor-Forschung ist die Annahme ausschließlicher Expression von nur einem Typus Geruchsrezeptor pro olfaktorischer Nervenzelle (Ngai, J. *et al.*, 1993; Vassar, R. *et al.*, 1993; Chess, A. *et al.*, 1994). Eine Ausnahme stellt offenbar die Rezeptor-Expression in Insekten dar, da für *Drosophila* die Co-Expression zweier Geruchsrezeptoren gezeigt werden konnte (Goldman, A. L. *et al.*, 2005). Es bleibt bisher unklar, ob diesem Antagonismus eine divergente Entwicklung zugrunde liegt, oder ob weitere Organismen eine Co-Expression von Geruchsrezeptoren aufweisen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ORs von nur einem Allel transkribiert werden (Chess, A. *et al.*, 1994; Efstratiadis, A., 1995; Malnic, B. *et al.*, 1999). Der Mechanismus einer solchen monoallelischen Expression ist allerdings noch nicht vollkommen geklärt. Einem stochastischen Modell unterliegt die zufällige Wahl eines OR-Gens. Dazu bedarf es jedoch eines Prozesses oder einer Expressionsmaschinerie, die ihrerseits auch singular ist, also nur mit einem Allel interagieren kann. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Regulation durch Genkonversion. Ein anderer möglicher Mechanismus wäre die Interaktion mit einer Lokus-Kontroll-Region (LCR). Kürzlich konnte das

Vorkommen eines LCR-ähnlichen Elements stromaufwärts von OR-Clustern in Mensch und Maus gezeigt werden (Nagawa, F. *et al.*, 2002). Inwieweit dieses Element alleine oder in Kombination mit anderen Kontrollorganen für die OR-Genwahl verantwortlich ist, muss jedoch noch eingehender untersucht werden.

Die funktionelle Proteinsynthese eines Geruchsrezeptors in einer Zelle bewirkt, dass ausschließlich seine Expression über die gesamte Lebensdauer des Neurons aufrechterhalten wird. Dementsprechend muss ein Signal existieren, das die Transkription weiterer OR-Gene verhindert. Shykind und Mitarbeiter schlagen einen Mechanismus der negativen Rückkopplung durch das Geruchsrezeptorprotein vor (Shykind, B. M. *et al.*, 2004; Shykind, B. M., 2005). Offenbar sind jedoch nur funktionelle ORs in der Lage, diese Rückkopplung auszuführen. Die zufällige Wahl eines Pseudogens durch die Expressionsmaschinerie führt dazu, dass dessen Expression in dem Neuron wieder abgeschaltet und ein alternatives OR-Gen exprimiert wird. Dieser stochastisch zufällige Mechanismus wird nun solange ausgeführt, bis ein funktionelles OR-Gen ausgewählt wurde. Erst dann wird die Expression über das oben erwähnte, noch nicht bekannte Signal, endgültig stabilisiert. Aufgrund von Untersuchungen durch Shykind und Mitarbeiter konnte gezeigt werden, dass dieses Hin- und Herschalten in einer sehr frühen Phase während der Reifung des olfaktorischen Neurons geschieht, also noch vor dessen Verschaltung mit dem Glomerulus im olfaktorischen Bulbus (Shykind, B. M. *et al.*, 2004). Das Ausschalten von Pseudogenen vergrößert das Spektrum der aktiven ORs im Geruchsepithelium und verhindert toxische Effekte durch funktionsunfähige Rezeptoren. Dennoch könnte das Vorkommen von Pseudogenen eine Art Genpool darstellen, auf dessen Basis durch genetische Veränderungen das Repertoire funktioneller Rezeptoren bei Bedarf vergrößert werden kann. Ein solcher Vorgang könnte ursächlich für den schnellen Größenzuwachs dieser Genfamilie gewesen sein.

1.2.2. Protein-Struktur olfaktorischer Rezeptoren

Geruchsrezeptoren bestehen aus 300 bis 350 Aminosäuren und enthalten wie alle GPCRs 7 Transmembrandomänen (TM). Zwei hoch konservierte Cysteine in den extrazellulären Schlaufen 1 und 2 könnten an der Ausbildung einer Disulfidbrücke beteiligt sein. In der N-terminalen Region befindet sich die Konsensussequenz NXS/T, welche eine N-Glykosylierungsstelle darstellt (Tarentino, A. L. *et al.*, 1985). Durch Sequenzanalysen verschiedener ORs und Rhodopsin konnten innerhalb der Klasse II-ORs (S. 6) konservierte Aminosäuren C-terminal der TM VII nachgewiesen werden. Aufgrund diverser Analysen mit C-terminal trunkierten ORs wird

vermutet, dass der C-Terminus der Rezeptoren eine entscheidende Rolle für die Ausbildung der korrekten Proteinkonformation und einer damit verbundenen G-Protein-Kopplung und -Spezifität einnimmt. So konnte gezeigt werden, dass trunkierte Formen des Geruchsrezeptorproteins mOR-EG in HEK-293-Zellen geringere Funktionalitäten durch verminderte G-Protein-Kopplung aufwiesen (Katada, S. *et al.*, 2004). Fünf weitere konservierte Sequenzabschnitte in der intrazellulären Schlaufe 1 und 2, am Ende von TM III und V, am Anfang von TM VI sowie in der TM VII identifizieren einen unbekanntem Rezeptor eindeutig als Geruchsrezeptor (Probst, W. C. *et al.*, 1992). ORs enthalten auch hypervariable Regionen wie die der Transmembrandomänen III, IV und V (Pilpel, Y. und Lancet, D., 1999; Fuchs, T. *et al.*, 2001), wobei vor allem die Transmembrandomänen IV, V und VI an der Ausbildung der Ligandenbindetasche beteiligt sind (Buck, L. und Axel, R., 1991; Singer, M. S. und Shepherd, G. M., 1994; Afshar, M., Hubbard, R. E. und Demaille, J., 1998; Katada, S. *et al.*, 2005). Durch die starke Variabilität dieser Regionen ergibt sich ein hohes Potential zur Bindung zahlreicher, verschiedener Liganden. Die intrazellulären Schlaufen 2 und 3 bilden potentiell das G-Protein Erkennungsepitop aus (Pilpel, Y. und Lancet, D., 1999).

Trotz dieser konservierten Bereiche innerhalb aller ORs handelt es sich um eine sehr heterogene Proteingruppe, die extrem variabel in ihrer Aminosäuresequenz ist. Ein Sequenzvergleich des OR-Repertoires der Maus ergab eine Aminosäuresequenz-Identität von durchschnittlich 37%. Die minimale Übereinstimmung zwischen zwei OR-Proteinen lag bei 25% (Mombaerts, P., 2004). Im Vergleich dazu besteht innerhalb einer anderen GPCR-Unterfamilie, der Gruppe der Opiat-Rezeptoren, eine Aminosäure-Homologie von 50-64% (Kampa, M. *et al.*, 2001).

Diese Arbeit befasste sich mit dem aus 345 Aminosäuren bestehenden Geruchsrezeptor OR5 aus *Rattus norvegicus*. Ein Modell seiner putativen zwei-dimensionalen Struktur ist in Abbildung 3 dargestellt. Bekannt ist bislang nur seine Ligandenspezifität für Lilial und Lylal (Raming, K. *et al.*, 1993).

Einleitung

Bindung zwischen Rezeptor und Ligand stattfindet. Hydrophile Geruchsstoffe können in die wässrige Phase der Nasenschleimhaut eintreten, ob in diesem Fall ebenfalls ein erleichterter Transport durch Bindeproteine erfolgt, ist noch unklar. Modifizierende und degradierende Proteine in der wässrigen Phase der Nasenschleimhaut können Geruchsstoffe abbauen oder strukturell verändern, so dass auch eine Inaktivierung dieser Moleküle möglich ist.

Eine durch die Bindung des Liganden ausgelöste, noch nicht bekannte Konformationsänderung des Rezeptors führt zur Aktivierung eines cytosolisch gebundenen G-Proteins, G_{olf} . Bei G-Proteinen handelt es sich um heterotrimere, GTP-bindende Proteine, an deren α - Untereinheit durch Aktivierung ein GDP/GTP Nukleotidaustausch stattfindet (Jones, D. und Reed, R., 1987). Durch diesen Austausch dissoziiert das G-Protein von dem Rezeptor und zerfällt in seine nun GTP-enhaltende α -Untereinheit und einen $\beta\gamma$ -Komplex (Liu, H.-Y. und Seifert, R., 2002). Sowohl $G\alpha_{GTP}$ als auch der $\beta\gamma$ -Komplex können in der Folge Effektorsysteme aktivieren. Bisher ist bekannt, dass durch $G\alpha_{GTP}$ eine Adenylylcyclase des Types III aktiviert wird, wodurch der cAMP-Spiegel in olfaktorischen Rezeptor Neuronen (ORN) sehr schnell ansteigt (Sklar, P. *et al.*, 1986; Lowe, G. *et al.*, 1989; Bakalyar, H. A. und Reed, R. R., 1990). Die Bindung von cAMP an Ca^{2+} -permeable „cyclic nucleotid gated“ Kanäle führt anschließend zu einem Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle (Zufall, F. *et al.*, 1994), welches Cl^- -Kanäle öffnet (Reed, R. R., 1992; Kleene, S., 1993; Lowe, G. und Gold, G. H., 1993; Frings, S. *et al.*, 1995; Hallani, M. *et al.*, 1998). Der anschließende Cl^- -Ausstrom, basierend auf einer sehr hohen Cl^- -Konzentration in den neuronalen Zellen, führt zu einer nichtlinearen Verstärkung der durch Ca^{2+} ausgelösten Membran-Depolarisierung (Reuter, D. *et al.*, 1998).

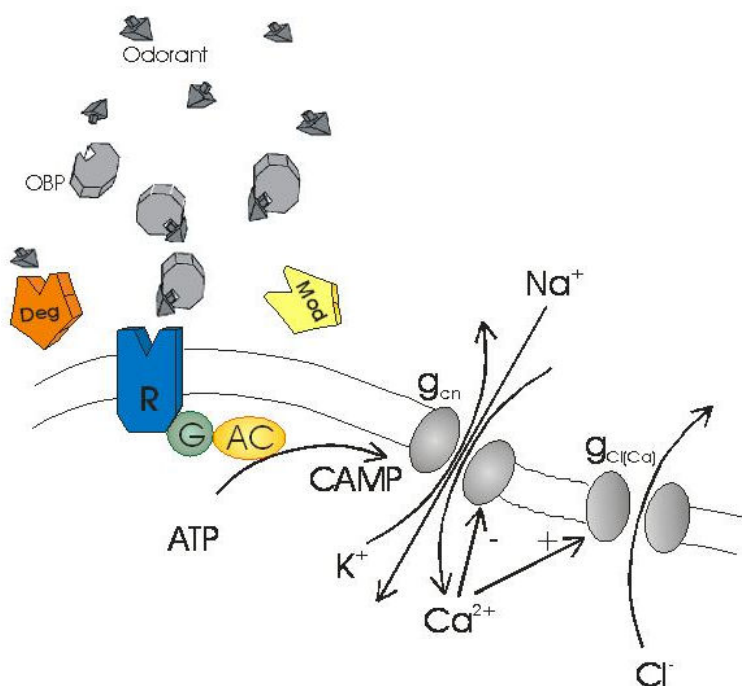


Abb. 4: Schematische Darstellung der olfaktorischen Signalkaskade über den cAMP-Weg. OBP: „Odorant Bindungs Protein“; Deg: degradierendes Enzym; Mod: modulierendes Enzym; R: Geruchsrezeptor; G: G-Protein; AC: Adenylylcyclase; g_{cn} : cAMP-aktivierter Kationenkanal; $g_{Cl(Ca)}$: Ca^{2+} -aktivierter Cl^- Kanal.

Schließlich kommt es zu einer „Alles-oder-Nichts“-Antwort, die zur Generierung von Aktionspotentialen führt, welche über die Axone an die Neuronen des olfaktorischen Bulbus und von dort in höhere Hirnregionen weitergeleitet werden (Abb 5).

1.2.3.2. Die IP₃-Kaskade: ein weiterer beteiligter Signaltransduktionsweg?

Nachdem Sklar und Kollegen 1986 postulierten, dass Geruchsstoffe in zwei verschiedene Subklassen unterteilt werden können, welche unterschiedliche Transduktionsmechanismen auslösen (Sklar, P. *et al.*, 1986), wurde durch mehrere Arbeitsgruppen beschrieben, dass einige Geruchsstoffe nicht zu einer Erhöhung der Adenylylcyclase-Aktivität führten. Allerdings erfolgte ein Anstieg von Inositol 1,4,5- Triphosphat (IP₃) in der Zelle (Boekhoff, I. *et al.*, 1990) und eine Beteiligung des IP₃-Signalübertragungsweges schien deshalb wahrscheinlich. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass beide Transduktionswege in der olfaktorischen Signalübertragung eine wichtige Rolle spielen (Restrepo, D. *et al.*, 1996). Die am IP₃-Mechanismus beteiligten Rezeptoren sind über ein weiteres G-Protein, G_q, an die Phospholipase C gekoppelt. Diese Lipase spaltet die Kopfgruppe des Membranphospholipids Phosphatidylinositol in Diacylglycerol und wasserlösliches IP₃ (Restrepo, D. *et al.*, 1996), wodurch IP₃-aktivierbare Ca²⁺- sowie nicht selektive Kationen-Kanäle geöffnet werden. In Folge dessen strömen vermehrt Ca²⁺ und Na⁺ in die neuronalen Zellen ein, wodurch eine Depolarisierung der neuronalen Membran erfolgt.

IP₃-aktivierbare Kanäle wurden vorwiegend in Invertebraten (Restrepo, D. *et al.*, 1990; Fadool, D. A. und Ache, B. W., 1992) und erst sehr viel später vereinzelt in Vertebraten gefunden (Lowe, G. und Gold, G. H., 1993). Der cAMP-Weg schien der dominante oder eventuell der einzige olfaktorische Signaltransduktionsweg in Vertebraten zu sein (Brunet, L. J. *et al.*, 1996; Belluscio, L. *et al.*, 1998; Gold, G. H., 1999; Wong, S. T. *et al.*, 2000; Takeuchi, H. *et al.*, 2003). Inzwischen wurde jedoch die Expression InsP₃-aktivierbarer Kanäle in den olfaktorischen Neuronen einiger Vertebraten eindeutig nachgewiesen. Da diese jedoch verglichen mit cAMP-aktivierbaren Kanälen in sehr geringer Dichte in der Zellmembran vorkommen (Kaur, R. *et al.*, 2001), muss eine eventuelle Beteiligung und die genaue Funktion dieses Signaltransduktionsweges in der Olfaktion generell bzw. bei Vertebraten noch genauer untersucht werden (Chen, S. *et al.*, 2000; Barry, P. H., 2003; Takeuchi, H. *et al.*, 2003; Takeuchi, H. und Kurahashi, T., 2003).

Zusammengefasst erscheint der cAMP-Transduktionsweg zumindest der dominante bzw. durch ein größeres Geruchsstoffspektrum ausgelöste Weiterleitungsmechanismus in der Olfaktion zu sein. Das Vorhandensein von IP₃-aktivierbaren Kanälen in der Membran von ORNs und

Einleitung

Geruchsstoffen, welche zwar keine cAMP-, jedoch eine IP₃-Kaskade aktivieren können, macht eine Mitwirkung dieses zusätzlichen Signalweges wahrscheinlich.

Obwohl ein Teil der zellulären Grundlagen des Geruchssinns bereits entschlüsselt ist, fehlen genaue Kenntnisse zur Rezeptor-Liganden-Bindung, der molekularen Rezeptor-Struktur sowie der komplexen Verarbeitung der olfaktorischen Signale. Daher sind auch in Zukunft zelluläre Analysesysteme notwendig, die weitere Untersuchungen dieser Rezeptorgruppe ermöglichen. In dieser Arbeit waren wir in der Lage, zwei experimentelle Plattformen zu etablieren, mit deren Hilfe die Funktionalität eines rekombinanten Geruchsrezeptors gezeigt und Voraussetzungen für strukturelle Untersuchungen geschaffen wurden.

1.3. Fragestellung der Arbeit

Die Familie der Geruchsrezeptoren ist zwar ein zentrales Forschungsgebiet, dennoch ist wenig über sie bekannt. Im Folgenden wird dargestellt, worin die beiden Hauptursachen für die Problematik der Analyse von Geruchsrezeptoren bestehen und welche Strategien in dieser Arbeit gewählt wurden, um einen experimentellen Ansatz zur Untersuchung von Geruchsrezeptoren zu finden:

1. Erst wenigen Geruchsrezeptoren konnten Liganden zugeordnet werden (Krautwurst, D. *et al.*, 1998; Zhao, H. *et al.*, 1998; Touhara, K. *et al.*, 1999; Wetzel, C. H. *et al.*, 1999; Kajiya, K. *et al.*, 2001; Gaillard, I. *et al.*, 2002; Mombaerts, P., 2004). Da noch keine Struktur eines Geruchsrezeptors bekannt ist, können bislang Modellvorstellungen nur über Sequenzhomologien innerhalb der Rezeptorgruppe oder anhand verwandter Rezeptoren, z. B. dem Rinderopsin, erstellt werden. Offensichtlich reichen diese Modelle jedoch nicht aus, um effektiv Liganden zuzuordnen oder Struktur-Funktion-Zusammenhänge zu erkennen. Das HEK-293-Zellsystem erwies sich zwar als das bisher effektivste heterologe Expressionssystem für diese Art von Rezeptoren, doch auch hier ist die Zahl beschriebener, funktionell exprimierter ORs begrenzt (Mombaerts, P., 2004). Es gibt also nur wenige Möglichkeiten, Geruchsrezeptoren funktionell zu exprimieren, und daher besteht ein Bedarf an weiteren Expressionssystemen, um diese Rezeptoren *in vivo* untersuchen zu können.

2. Neben der Problematik einer funktionellen Expression gibt es bislang kein Expressionssystem, welches die Herstellung geeigneter Mengen für eine Strukturaufklärung dieser Rezeptoren ermöglicht. Die Menge der synthetisierten Rezeptoren ist in der Regel zu gering oder die Zielproteinspezies liegt in Einschlusskörpern vor.

Zu 1) Die funktionelle Expression mit korrekter Translokation des Membranproteins sollte in Kombination mit einer Semliki Forest Virus-basierten Infektion in Säugetier P19-Zellen durchgeführt werden. Ausgewählt wurde diese Zelllinie aufgrund folgender Tatsachen: es handelt sich bei der P19-Zelllinie um Teratokarzinom-Zellen, welche ursprünglich aus embryonalen Stammzellen, implantiert in Hodengewebe, generiert wurden. Einem Gewebe also, in dem *in vivo* eine Geruchsrezeptor-Expression nachgewiesen wurde (Goto, T. *et al.*, 2001). Ein weiterer vielversprechender Umstand war die Differenzierbarkeit dieser Fibroblasten-ähnlichen Zellen in neuronale Zellen, dem Zelltyp, der auch *in vivo* für olfaktorische Neuronen vorliegt. Dementsprechend lautet die Annahme, dass es sich um eine optimale Zelllinie für die Expression rekombinanter ORs handeln kann, die zur zeitgerechten Expression aller für die olfaktorische

Signalkaskade notwendigen Bestandteile befähigt ist. Die Zelllinie sollte bezüglich ihrer Eignung als Expressionsplattform für Geruchsrezeptoren charakterisiert und Expressionsstudien am Beispiel des Rezeptors OR5 durchgeführt werden.

Zu 2) Die Überexpression des Membranproteins zur quantitativen Isolierung erfolgte in Hefe. Gegenüber *E. coli* ist der Hefeorganismus zur Durchführung posttranslationaler Modifikationen fähig. Ein Vorteil im Vergleich zu Säugerzellen sind die hohen erreichbaren Zelldichten. Primärgewebe kam für diese Fragestellung nicht in Frage: eine Isolierung wäre mit sehr geringen Ausbeuten verbunden, eine Problematik, die durch die Verwendung von heterologen Expressionssystemen umgangen werden kann. Es wurde eine „unfolded protein response“ (UPR)-kontrollierte Expression in *Saccharomyces cerevisiae* (Griffith, D. A. *et al.*, 2003) ausgewählt, um zu gewährleisten, dass überwiegend korrekt gefaltetes Rezeptorprotein gebildet wird. Mit dieser Arbeit sollten erstmals durch eine optimierte Expression, Produktion und Isolierung ausreichende Proteinmengen des Geruchsrezeptors OR5 (aus *R. norvegicus*) mit einer Homogenität von >90% zur Verfügung gestellt werden, um biochemische und strukturelle Charakterisierungen durchzuführen.

Zusätzlich sollten monoklonale OR5-Antikörper generiert werden, um eine spezifische Detektion und Immunopräzipitation des Geruchsrezeptors OR5 zu ermöglichen.

Zusammengefasst tragen die etablierten Systeme dazu bei, die genaue Rolle der ORs in der Geruchswahrnehmung in Zukunft entschlüsseln zu können. Mit Hilfe der P19-Zelllinie wird die OR-Charakterisierung in einem heterologen System ermöglicht, und durch den Gebrauch des Hefeexpressionsystem und die optimierte Isolierungs-Strategie kann das Material für eine Strukturaufklärung bereitgestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

Tab. 2: verwendete Organismen.

Stamm	Relevanter Geno- oder Phänotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ϕ 80d/ <i>lacZ</i> M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hspR17</i> ($r_k^- m_k^+$) <i>supE44</i> λ <i>thi-1 gyrA96</i>	(Hanahan, D., 1983)
<i>E. coli</i> able	<i>relA1</i>	Stratagene # 200170
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> BJ5464	Mat alpha; <i>ura3-52; trp1; leu2del1;</i> <i>his3del200; pep4::HIS3; prb1del1.6R; can1;</i> GAL 1	ATCC # 208288 (LGC Promochem, Wesel)
P19	Teratocarcinoma, <i>Mus musculus</i>	ATCC # CRL-1825
BHK-21	Zelllinie aus Nieren v. 5 „unsexed“, 1 d alten Hamstern (<i>Mesocricetus auratus</i>)	ATCC # CCL10

Tab. 3: verwendete Vektoren und Plasmide.

Plasmid	Relevantes Merkmal	Referenz
<i>pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO</i> [®]	3' Thymidin Überhang, kovalente Topoisomerase, <i>CMV</i> -Promotor	Invitrogen # 081701
<i>pITy-3</i> <i>pMEGA2</i>	δ -Integrations Vektor; 3.2 kb; <i>Kan</i> ^R <i>Gal4p, Gal80p, Gal3p; 2μ, URA3, LEU2,</i> <i>Amp</i> ^R	Jason Burbank (Sil, A. K. <i>et al.</i> , 2000)
<i>PJS-U(URA)</i>	<i>UPRE, ICL1</i> -Promotor, <i>LacZ</i>	(Griffith, D. A. <i>et al.</i> , 2003)
<i>pSFV2</i> <i>pSFV1Cap</i> <i>pSFV2Helper</i> <i>pSFV3-LacZ</i>	Semliki Forest Virus, 11033 bp, <i>Amp</i> ^R SFV, Capsid, 12049 bp, <i>Amp</i> ^R SFV, Strukturgene, 8194 bp <i>LacZ</i>	Dr. K. Lundström, Epalinges, Schweiz Dr. K. Lundström Dr. K. Lundström

Tab. 4: Plasmid-Konstrukte.

Plasmidname	Relevantes Merkmal (endständige Schnittstellen des klonierten Gen)	Insertionsgröße	Ursprungsvektor
<i>pEG2</i>	<i>Bam</i> HI, <i>OR5</i>	945 (<i>OR5</i>)	<i>pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO</i> [®]
<i>pEG1</i>	<i>Bam</i> HI, His ₆ , Xa, <i>OR5</i>	945 (<i>OR5</i>) + 54 bp	<i>pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO</i> [®]
<i>OR5-SFV2 # 8</i>	<i>Bam</i> HI, His ₆ , Xa, <i>OR5</i>	945 (<i>OR5</i>) + 54 bp	<i>SFV2</i>
<i>OR5-SFV1Cap # 6</i>	<i>Bam</i> HI, His ₆ , Xa, <i>OR5</i>	945 (<i>OR5</i>) + 54 bp	<i>SFV1Cap</i>
<i>OR5-pITy3 (diverse)</i>	<i>Bam</i> HI, His ₅ , Flag, <i>OR5</i>	945 (<i>OR5</i>) + 36 bp	<i>pITy3</i>

Tab. 5: verwendete Oligonukleotide für die Klonierung von *pEG2* und *pEG1* (für Klonierung *OR5-SFV2 #8*, *OR5-SFV1Cap #6*). Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. *OR5* Start- und Stop-Kodons sind **fett** geschrieben. *OR5 His Übergang*, *His Übergang forw. 2* und *His Übergang forw.1* wurden überlappend für die Klonierung eines *Bam*HI/His₆/Xa/*OR5* Konstruktes für die Ligation in die *pSFV*-Vektoren verwendet. Als reverses Oligonukleotid diente 2.6. *OR5 BIAS*. Mit den Oligonukleotiden 2.7. *Pst*I/*Sac*II und 2.6. *Pst*I/*Sac*II wurde ein *OR5*-Amplifikat hergestellt, welches für die Ligation mit dem CT-TOPO-GFP Vektor eingesetzt wurde.

Bezeichnung/Sequenz	Zielgen/Region	Länge	Schnittstelle
<i>OR5 His Übergang</i> 5´-GGTATCGAAGGTAGAA ATG ACAGAAAGGAACCAAAC-3´	<i>OR5</i> aus <i>Rattus norvegicus</i> , +1 - +20	35	-
<i>His Übergang forw. 2</i> 5´-TCTCATCATCATCATCATCATGGTATCGAAGGTAGA-3´	His ₆ /Xa	36	-
<i>His Übergang forw.1</i> 5´-AAAGGATCC <u>AGTACTACC</u> ATGGGGGTTCTCATCATCATCAT-3´	His ₆	42	<i>Bam</i> HI/ <i>Sca</i> I
2.6. <i>OR5 BIAS</i> 5´-GCGGATCC TTA TAGGTTTAGTTGAATTTTTC-3´	<i>OR5</i> aus <i>Rattus norvegicus</i> , +523 - Stop	31	<i>Bam</i> HI
2.7. <i>Pst</i> I/ <i>Sac</i> II 5´-GCGAAACCGCGG <u>CTGCAG</u> ATG AACGGGACCGAGGGCCCAA-3´	<i>OR5</i> aus <i>Rattus norvegicus</i> , +1 - +23	41	<i>Pst</i> I/ <i>Sac</i> II
2.6. <i>Pst</i> I/ <i>Sac</i> II 5´-GCGACCGCGG <u>CTGCAG</u> TTA TAGGTTTAGTTGAATTTTTC-3´	<i>OR5</i> aus <i>Rattus norvegicus</i> , +523 - Stop	39	<i>Pst</i> I/ <i>Sac</i> II

Tab 6: verwendete Oligonukleotide für die Amplifizierung von *GapDH*, *OMP*, *G_{olf}(α)* und dem „cyclic nucleotide-gated olfatoric channel“ (*cNgOCh*; später als *oCNC2* bezeichnet) in PCR-Reaktionen.

Bezeichnung	Zielgen/Ursprung	Sequenz	Amplikongröße
GapDH sense 44	<i>GapDH</i>	5´-AAAATGGTGAAGGTCGGTGT-3´	
GapDH antisense 288	(<i>Mus musculus</i>)	5´-CTCACCCCATTTGATGTTAG-3´	346
<i>G_{olf}(α)</i> sense 12	<i>G_{olf}(α)</i>	5´-GGGCAACAGCAGCAAGACCG-3´	
<i>G_{olf}(α)</i> antisense 360	(<i>Mus musculus</i>)	5´-TCAAAGTCAGTGATAGGGCCTATG-3´	381
OMP sense 74	<i>OMP</i>	5´-TGCGGCTCCGAGTAGAGA-3´	
OMP antisense 399	(<i>Mus musculus</i>)	5´-TACATGACCTTGCGGATCTTG-3´	372
cNgOCh sense 1640	<i>cNgOCh</i>	5´-GCACTGGCACTATCCGTAGTCTGG-3´	
cNgOCh antisense 2096	(<i>Mus musculus</i>)	5´-GACTTCGGAGGGACATCAGCATAAT-3´	481

Tab. 7: verwendete Oligonukleotide für Echtzeit-PCR Messungen.

Bezeichnung	Zielgen/ Ursprung	Sequenz	Amplikongröße
GapDH 2 F	<i>GapDH</i>	5´-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3´	
GapDH 2 R	(<i>Mus musculus</i>)	5´-TTGAAGTCGCAGGAGACAACC-3´	89
OMP 1 F	<i>OMP</i> (odorant marker protein)	5´-TCACCAACCTCATGACACGC-3´	
OMP 1 R	(<i>Mus musculus</i>)	5´-CGTCTGCCTCATTCCAATCC-3´	93
Golf 1 F	<i>G_{olf}(α)</i>	5´-TGAGAGATCCAACGAGTACCAGC-3´	
Golf 1 R	(<i>Mus musculus</i>)	5´-GGTCTGTGGGTGTGTAGTCAACC-3´	95
Gq 1 F	<i>G_q(α)</i>	5´-CTGAATGACTTGGACCGTGTAGC-3´	
Gq 1 R	(<i>Mus musculus</i>)	5´-GTATTTCGATGATCCCTGTAGTGGG-3´	96
cNgOCh 1 F	<i>cNgOCh</i>	5´-CGACAAGGACGGCGAGG-3´	
cNgOCh 1 R	(<i>Mus musculus</i>)	5´-CGGCAGGTGTGGAAGCC-3´	88
cNgOCh 2 F	<i>cNgOCh</i>	5´-GGAGGGAAGACATACAGATCACTAGC-3´	
cNgOCh 2 R	(<i>Mus musculus</i>)	5´-CAGCACAGATAGGCTTTCAGGC-3´	131

2.2. Nährmedien

2.2.1. Medien für *Escherichia coli*

LB-(Luria-Bertani) Medium:

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
H ₂ O	ad 1.000 ml
pH 7,0	

Zur Herstellung von Festmedium-Platten wurde Bakto-Agar (Difco, Kansas City, MO, USA) in einer Endkonzentration von 2% [w/v] zugesetzt.

2.2.2. Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung von nicht selektiv angezogenen Hefestämmen erfolgte auf Vollmedium mit 2% [w/v] Dextrose:

YPD (*Yeast extract peptone dextrose*):

Hefeextrakt	10,0 g
Bakto-Pepton	20,0 g
Dextrose	20,0 g
H ₂ O	ad 1.000 ml

Die Medien wurden ohne Zucker autoklaviert und anschließend durch Zugabe des entsprechenden Volumens einer 20% [w/v] Stocklösung des sterilfiltrierten Zuckers auf die gewünschte Zucker-Endkonzentration eingestellt.

Für die Charakterisierung der Hefekulturen erfolgte die Anzucht in Vollmedium, in dem die Dextrose durch 4% [w/v] Raffinose ersetzt wurde. Die Expressionsinduktion erfolgte entweder durch direkte Zugabe von 2% [w/v] Galaktose oder nach Verwendung des Vollmediums durch Übertragung gewaschener Zellen in 2% [w/v] Galaktose YP-Medium.

Eine selektive Anzucht wurde durch Wachstum auf synthetischem Komplett-Medium ohne Uracil und Leucin erreicht:

SC ØUra ØLeu:

“Yeast nitrogen base” ØAminosäuren	6,7 g
“Drop out” Medium	1,4 g
Tryptophan	76 mg
Histidin	76 mg
Raffinose	40 g
0,5 M Natriumphosphat, pH 6,0	100 ml
H ₂ O	ad 1.000 ml

Das Minimalmedium wurde durch Filtration sterilisiert.

Für die Herstellung von Festmedium-Platten wurde 2% [w/v] Bakto-Agar (Difco) vor dem Autoklavieren zugesetzt.

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid (X-Gal)- oder Antibiotika- (siehe Tab. 8) haltige Platten wurden maximal 3 Monate bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3. Medien für die Säugerzellkultur

α-Mem Medium:

500 ml MEM Alpha Medium
 2,5% Foetal Calf Serum
 7,5% Newborn Calf Serum
 10 ml MEM Amino Acids (50x) (PAA, Cölbe)
 5 ml MEM Vitamins Solution (100x) (PAA)

Dulbecco's Medium:

250 ml Dulbecco's MEM/Nutrient Mix F12 Medium
 250 ml Iscove's modified Dulbecco's Medium
 10% [w/v] Foetal Calf Serum

Neurobasalmedium:

500 ml NeurobasalTM Medium
 2mM Glutamin
 1 ml N2-Supplement

Alle Komponenten wurden - wenn nicht anders angegeben - von Gibco (Karlsruhe) bezogen und sterilfiltriert geliefert.

2.2.4. Medienzusätze

In Tab. 8 sind die den Medien zugesetzten Substanzen aufgeführt. Die Zugabe erfolgte bei vorangehender Sterilisation durch feuchte Hitze nach Abkühlung auf mindestens 60°C.

Tab. 8: Medienzusätze.

Komponente	Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel	Sterilisation	Lagerung	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	100	50% [v/v] Ethanol	-	-20°C	100
IPTG (100 mM)	23,8	H ₂ O _{bidest.}	Filtration	-20°C	48
X-Gal	20	N,N'-Dimethylformamid	-	-20°C	40
G418	1.000	H ₂ O	-	-20°C	1.000
Retinolsäure	100	Ethanol p.a.	-	-20°C	150
N2-Supplement	100x	-	-	-20°C	0,2x

2.3. Zellkulturen

Soweit nicht anders angegeben, wurde für Zellkulturarbeiten 1x PBS ohne Kalzium und Magnesium verwendet (*Dulbecco's PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺*, PAA).

2.3.1. Stammkultur-Haltung

Die Lagerung von *E. coli*-Stämmen erfolgte über kürzere Zeiträume auf festen Komplexmedien bei 4°C. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Petrischalen mit Parafilm (Ochs, Bovenden) umwickelt. Zur Konservierung der Stämme wurden die Zellen 1:1 in 87%igem [v/v] Glycerin resuspendiert und bei -70°C gelagert.

S. cerevisiae- und P19-Säugerzell-Kulturen wurden in 4% [v/v] DMSO (Fluka, Seelze) im jeweiligen Medium bei -70°C gelagert.

Hybridomazellen wurden in Einfriermedium (2.5.1.3.) in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3.2. Propagierung P19-Zellen

P19 Mäuse-Teratokarzinom-Zellen wurden in Zellkulturflaschen in *α-Mem Medium* unter Zugabe von Aminosäuren, Vitaminen, Neugeborenen Rinderserumalbumin und fötalem Rinderserum (s. 2.2.3.) bei 37°C und 5% [v/v] CO₂ kultiviert. Nach jeweils zwei Tagen erfolgte ein Austausch des Mediums. Zur Erhaltung der Zellen war es erforderlich, die adhären Zellen nach 3-4 Tagen durch Trypsinierung zu ernten. Hierfür wurden die Zellen zuerst mit 1x PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml/25 cm² Trypsin/EDTA (Gibco) vom Boden gelöst und 5 min bei 400xg sedimentiert. Eine neue Kulturflasche wurde anschließend mit 1/5 der Zellen inokuliert und mit frischem Medium versehen.

2.3.3. Neuronale Differenzierung P19-Zellen

P19-Zellen wurden mit leichten Modifikationen nach dem Protokoll von Jones-Villeneuve (Jones-Villeneuve, E. M. *et al.*, 1983) in neuronale Zellen differenziert. Eine zu 50-60% bewachsene T₇₅-Zellkulturflasche wurde mit 1 µM Retinolsäure (RA, Sigma-Aldrich, Seelze) versetzt und über Nacht bei 37°C und 5% [v/v] CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend geerntet (s. 2.3.2.), ein Aliquot mit Trypanblau angefärbt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. 10⁶ Zellen wurden in 10 ml *α-MEM Medium* aufgenommen und in eine 9 mm Petrischale (Greiner, Frickenhausen) überführt, in der sie für 4 Tage nicht-adhären kultiviert wurden. Während dieser Zeit bildeten sich sogenannte „embryonic bodies“ aus, die nach einer Zentrifugation (5 min, 400xg) durch Inkubation für 1 min mit 1 ml Trypsin/EDTA teilweise gelöst wurden. Die Zellen konnten nun je nach weiterer Verwendung in Zellkulturflaschen, 6- oder 12-well Platten in einer Dichte von 40.000 Zellen/cm² ausgesät werden. Während dieser Zeit wurde Neuronenspezifisches Medium, *NeurobasalTM Medium* (Gibco), verwendet, welches nach jeweils drei Tagen erneuert wurde. In der Regel wurde mit neuronal differenzierten Zellen weitergearbeitet, welche 10 Tage RA-induziert waren. Wurden die Zellen auf Glasoberflächen ausgesät, war eine Vorbehandlung der Glasträger mit Poly-L-Lysin (MW 70.000-150.000, Sigma-Aldrich) notwendig. Hierfür wurden die Oberflächen in 0,5 mg/ml einer Poly-L-Lysin Lösung in PBS für 10-60 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend mit PBS gespült und getrocknet.

2.3.4. Propagierung BHK-21-Zellen

BHK-21-Zellen benötigten ein Gemisch aus *Dulbecco's MEM/Nutrient Mix F12* Medium, *Iscove's modified Dulbecco's* Medium und FCS (s. 2.2.3.) zum Wachstum. Die Kultivierung fand ebenfalls bei 37°C und 5% [v/v] CO₂ statt. Das Ernten der Zellen war wie für die P19-Zellen beschrieben (s. 2.3.2.) möglich. Die Zellen wurden 1:5 – 1:10 verdünnt in eine neue Kulturflasche überführt.

2.3.5. Transfektion von P19-Zellen

Säugerzellen können mit verschiedenen Techniken und Reagenzien mit DNA oder RNA transfiziert werden. Es wurde ein Lipid-basiertes Reagenz zur Transfektion von Plasmid-DNA in P19-Zellen sowie ein virales Infektionssystem verwendet.

2.3.5.1. Lipid-basierte Transfektion von P19-Zellen

*Metafectene*TM von Biontex (München) ist ein polykationisches Transfektionsreagenz, welches in Kombination mit einem neutralen Kolipid in liposomaler Form vorliegt. Der Lipidkomplex bindet an die DNA und komplexiert diese zu einer sehr kompakten Struktur, was die Transfektionseffizienz verbessert. Die totale Freilegung der Fremd-DNA in der Zelle ermöglicht anschließend die Transkription und Translation der neu eingeführten Gene.

Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

2.3.5.2. Semliki Forest Virus (SFV): hoch effiziente Infektion von P19-Zellen

Eine weitere Form der Transfektion von Säugerzellen wurde mit einem *Semliki Forest Virus* basierten Expressionssystem durchgeführt. Aufgrund der Verteilung der viralen Proteine auf zwei Vektoren, dem rekombinanten Vektor und dem *pSFVHelper2*, welcher Verpackungssignal-defizient ist, handelte es sich um ein virales System, welches nicht zur fortlaufenden Autoreplikation befähigt ist (Liljeström, P. und Garoff, H., 1991).

2.3.6. Herstellung rekombinanter Semliki Forest Viren und Infektion der P19-Zellen

2.3.6.1. *In vitro* Generierung von mRNA

Zunächst musste die linearisierte DNA über eine Phenol/Chloroform Fällung (s. 2.4.4.) gereinigt und mit Ethanol gefällt werden.

Die *in vitro* Transkription des *SpeI* linearisierten *OR5-pSFV2 # 8-* bzw. *OR5-pSFV1Cap # 6-* Plasmides und des *pSFV-Helper2* wurde durch einen SP6-Promotor im Vektor initialisiert.

Reaktionsansatz:

Plasmid	2,5 µg
10x SP6-Puffer	5 µl
10 mM m7G(5')ppp(5')G (CAP)	5 µl
50 mM DTT (Sigma-Aldrich)	5 µl
rNTP-Mix	5 µl
H ₂ O	ad 45 µl
RNAsin (50 U)	1,5 µl
SP6-RNA-Polymerase (100 U)	3,5 µl

Der Ansatz wurde anschließend 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der Transkription wurden abschließend 2 µl der Reaktion auf einem 1% [w/v] Agarosegel analysiert.

2.3.6.2. Transfektion mittels Elektroporation

BHK-21-Zellen einer dicht bewachsenen T₁₇₅-Zellkulturflasche wurden wie beschrieben (s. 2.3.4.) geerntet und anschließend 1x mit Mg²⁺/Ca²⁺-freiem PBS gewaschen. Nachdem die Zellen erneut sedimentiert wurden, konnten diese in 3,2 ml Mg²⁺/Ca²⁺-freiem PBS aufgenommen werden. Die erreichte Zelldichte von rund 10⁷ Zellen/ml war optimal für die Elektroporation. Für einen Elektroporationsansatz wurden 0,4 ml der Zellen mit dem gesamten *in vitro* Transkriptions-Ansatz der rekombinanten RNA und dem halben Ansatz der Helfer-RNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben (0,2 cm, BioRad, München). Die Elektroporation erfolgte in einem *Gen-Pulser* der Firma BioRad in zwei aufeinander folgenden Pulsen mit einer Spannung

von 1,5 kV, einer Kapazität von 25 μF sowie unendlichem Widerstand. Die erreichten Zeitkonstanten pro Puls betragen 0,7 - 0,8 ms.

Sofort im Anschluss wurden die Zellen in 10 ml frisches Medium in eine T₂₅-Zellkulturflasche überführt und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

2.3.6.3. Ernte und Aktivierung der Virus-Stammsuspensionen

Die Produktion von Viren erfolgt bei infizierten Zellen durch zelluläre Assemblierung und Abschnürung über die Zellmembran in das extrazelluläre Medium. Demnach konnten die Viren durch Abnahme des Zellüberstandes gesammelt und bei -20°C gelagert werden.

Um eine höhere Sicherheit des Systems zu gewährleisten, wurde mit einem Helfer-Konstrukt (*pSFV-Helper2*) gearbeitet, in welchem die für die Spaltung des p62-Proteins verantwortlichen Aminosäuren mutiert worden sind (Berglund, P. *et al.*, 1993). Demnach mussten die rekombinanten Viruspartikel vor dem Gebrauch durch eine Behandlung mit α -Chymotrypsin (100x: 20 mg/ml in PBS, sterilfiltriert, Sigma-Aldrich) aktiviert werden. Der Virusstock wurde hierfür mit 1/100 Volumen einer α -Chymotrypsin-Lösung versetzt und für 15 min bei RT inkubiert, wodurch eine Spaltung des p62-Proteins in die strukturellen Proteine E3 und E2 erfolgte. Zum Abstoppen der Reaktion wurde dem Ansatz anschließend 1/20 Volumen des Proteaseinhibitors Aprotinin (20x: 10 mg/ml in PBS, sterilfiltriert, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugesetzt.

2.3.7. Infektion der P19-Zellen

P19-Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und mit einer vorher angesetzten, dem Virustiter angepassten Verdünnung versetzt. Das Volumen wurde jeweils so gewählt, dass die Zellen ausreichend bedeckt waren. Nach einer Inkubation von 1h bei 37°C und 5% CO₂ wurde soviel frisches Medium zugesetzt, dass eine weitere Kultivierung von 23 h möglich war. Abschließend wurden die Zellen geerntet und für Proteinpräparationen (s. 2.6.4.) oder Immunmarkierungen (s. 2.5.5.2.) verwendet.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Standardmethoden

In der Regel wurden molekularbiologische Standardmethoden nach Sambrook durchgeführt (Sambrook, J. *et al.*, 1989).

Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt a. Main) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

Mit Hilfe des *QIAquick-Gelextraction-Kits* von Qiagen (Hilden) wurden DNA Fragmente aus Agarosegelen nach Herstellerangaben isoliert.

Die Analyse von DNA erfolgte durch Gelelektrophorese in 1- oder 2%igen [w/v] Agarosegelen in TBE Puffer (890 mM Tris Base, 20 mM EDTA, 890 mM Borsäure, pH 8).

Eine Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm und einer Umrechnung durch die Formel $cDNA (\mu\text{g/ml}) = A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times 50$.

Zur Fällung von DNA wurde die DNA-Lösung mit 1,5 Volumen Ethanol und 10% [v/v] 3 M Natriumacetat, pH 5,2 versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Nach Pelletierung der DNA (12.000xg, 30 min, 4°C) wurde der Überstand entfernt und das Sediment in H₂O aufgenommen.

Klonierungen von DNA in TOPO-Vektoren wurden mit Hilfe des *TOPO TA Expression Kit* von Invitrogen (Karlsruhe) nach Herstellerangaben angefertigt.

Die Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte durch die CaCl₂-Methode (Cohen, S. N. *et al.*, 1972; Inoue, H. *et al.*, 1990).

Transformationen von *E. coli*-Zellen wurden nach Hanahan (Hanahan, D., 1983) durchgeführt.

Plasmide wurden aus *E. coli* mittels des Qiagen *Mini-Prep-Kits* nach Herstellerangaben isoliert. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 230 Upm, 37°C in LB-Medium in Anwesenheit von 100 µg/ml Ampicillin (Endkonzentration).

Die Transformation von *S. cerevisiae* wurde nach dem Protokoll der „high efficiency plasmid transformation of yeast“ durchgeführt (Agatep, R. *et al.*, 1998).

Die Bestimmung der optischen Dichte von Kulturen erfolgte durch Trübungsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem *UV 160 A* Spektralphotometer von Shimadzu (Kyoto, Japan) oder einem *Ultrospec 200A* von Amersham Biosciences (Freiburg). In der Regel wurden die

Proben 1:10 in H₂O verdünnt und gegen H₂O in 1 ml Plastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen.

RNA aus adhären wachsenden P19-Zellen wurde mit *peqGold TriFast* Lösung von Peqlab (Erlangen) nach Herstellerangaben präpariert.

Die *in vitro* Transkription für die Northern-Blot-Methode wurde nach Standardmethoden unter Verwendung einer *T7-Polymerase* (Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt.

2.4.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis, K. *et al.*, 1986) wurde in der Regel in 50 µl Ansätzen in einem *T3 Thermocycler* (Biometra, Göttingen) mit Taq-DNA-Polymerase (eigene Herstellung in der AG Oesterhelt (Pluthero, F. G., 1993)), *Pfu-DNA-Polymerase* (Promega, Madison, USA) oder *TaKaRa™ Taq-Polymerase* (Chemicon, Hofheim) durchgeführt. Die Programme umfassten eine 5-minütige Denaturierung der DNA bei 96°C und 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung (96°C, 30 s), Anlagerung (T_m , 30 s) und Synthese (72°C, die Elongationsdauer war abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes und betrug in der Regel 1min/kb). Das Programm wurde mit einer Inkubation von 10 min bei 72°C abgeschlossen, um eine Fertigstellung von Abbruchfragmenten zu gewährleisten. Für die PCR-Reaktionen wurden in allen Fällen homologe Oligonukleotide verwendet.

Die Berechnung der T_m erfolgte als eine Näherung über die Sequenz des Oligonukleotides mit Hilfe folgender Formel:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 2 (N_A + N_T) + 4 (N_G + N_C)$$

2.4.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation eines DNA-Fragmentes mit einem Vektor wurden beide Bestandteile mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut (s. 2.4.1.). Der Vektor wurde anschließend mit einigen Einheiten *shrimp alkalischer Phosphatase* (Roche Diagnostics GmbH) dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern. Unter Verwendung des *PCR purification kits* der Firma Qiagen wurden die Enzyme entfernt. Zur Ligation wurde ein Teil Vektor mit 5 Teilen DNA-Fragment in 1x Ligationspuffer unter Zugabe von 3 U *T4-DNA Ligase* von NEB bei 4°C über Nacht oder 1 h bei RT inkubiert.

2.4.4. Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Abtrennung von Nukleinsäuren aus proteinhaltigen Lösungen wurden Phenol/Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Die wässrige Lösung wurde mit einem Volumen *Rotiphenol* (Roth, Karlsruhe) versetzt und gemischt. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei RT und 20.000xg wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen. Durch die erneute Zugabe von einem Volumen Chloroform wurde die wässrige Lösung von Phenol-Resten befreit. Nach gründlichem Mischen beider Phasen und erneuter Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen und eine Ethanol-Natriumacetat-Fällung durchgeführt (siehe 2.4.1.).

2.4.5. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger, F. S. *et al.*, 1977) durch PCR mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden unter Verwendung des *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* von Applied Biosystems GmbH (Darmstadt). Dieses Gemisch enthält Reaktionspuffer, dNTPs, BigDye-Terminatoren, MgCl₂ sowie die *AmpliTaq FS-Polymerase*.

Reaktionsansatz:

DNA	500 ng-1 µg
Oligonukleotid	10 pmol
BigDye	3 µl
H ₂ O	ad 15 µl

PCR-Bedingungen:

96°C	30 sec
T _m	30 sec
60°C	4 min
30 Zyklen	

Nach Aufreinigung der PCR Probe über eine *Micro-Spin G-50 Säule* von Pharmacia Biotech AB (Freiburg) zur Entfernung überschüssiger dNTPs und BigDye Terminatoren wurde die Probe in einem Vakuum-Konzentrator (*Speed vac concentrator*, Bachofer, Reutlingen) getrocknet und mit 3,5 µl Auftragspuffer (0,025 mM EDTA 1:5 in Formamid, 50 mg/ml Blue Dextran) versetzt. Der

Ansatz wurde 5 min bei 96°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Von der Probe wurden 1,5 µl auf das Sequenziergel aufgetragen.

Die Auftrennung und Sequenzierung wurde an einem *ABI Prism™ 377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems GmbH) durchgeführt.

2.4.6. Northern-Blot

Ein Teil RNA (5 µg) aus P19-Säugerzellen wurde mit 3 Teilen RNA-Denaturierungspuffer versetzt und 10 min bei 65°C denaturiert. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt und anschließend auf einem denaturierenden Agarosegel (1,2 % [w/v], 1x MOPS-Puffer, 5,88% [v/v] einer 37%igen [w/v] Formaldehydlösung) über Nacht bei 20 V in 1x Mops-Puffer aufgetrennt. Die Geldokumentation erfolgte auf einem UV-Transluminator. Anschließend wurde die RNA auf eine *Hybond-N⁺* Nylonmembran (Amersham Biosciences) durch Kapillar-Blot nach Standardmethoden (Sambrook, J. *et al.*, 1989) transferiert. Eine Quervernetzung der RNA an die Nylonmembran wurde durch Belichtung für ca. 30 sek in einem *UV Stratalinker 2400* (Stratagene, Amsterdam, NL) bei 120.000 µJ -0 µJ erreicht.

Denaturierungspuffer:

10x MOPS	1 ml
Formamid 100% [w/v]	5 ml
Glyzerin 87% [v/v]	1,34 ml
Xylencyanol (gesättigte Lsg.)	100 µl
Bromphenolblau (gesättigte Lösung)	100 µl
Ethidiumbromid (Roche Diagnostics GmbH)	50 µl
H ₂ O	670 µl

10x MOPS:

500 mM MOPS
10 mM EDTA

2.4.7. Markierung von DNA-Sonden mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP

Für die Herstellung von Sonden wurden entweder PCR-Produkte oder Plasmide als Matrizen sowie der *Prime-It® II Random Primer Labeling Kit* (Stratagene) verwendet. Fünfundzwanzig ng eines PCR-Fragments wurden mit 10 µl *Random Oligonucleotid Primern* versetzt und das Reaktionsvolumen mit RNase-freiem H₂O auf 34 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 µl *5x *dATP Primer Puffer*, 5 µl [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP (Amersham Biosciences) und 1 µl Klenow Enzym

(5U/ μ l) wurde die Probe 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde im Anschluss durch Zugabe von 2 μ l *Stopmix* beendet. Überschüssige Oligonukleotide wurden entfernt, indem die Probe durch eine *AutoSeq G50 Sepharose Säule* (Amersham Biosciences) zentrifugiert wurde. Vor Verwendung der Sonde erfolgte eine Denaturierung für 5 min bei 95°C mit einer anschließenden Inkubation auf Eis für 5 min. Die Sonde konnte in einer Plexiglaskammer bei -20°C gelagert werden.

2.4.8. Northern-Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde zuerst für 1 h mit Hybridisierungspuffer (*Rapid Hybridisation Buffer*, Amersham Biosciences) prähybridisiert und anschließend 2 h bei 65°C mit der Sonde hybridisiert. Gewaschen wurde 2x für 15 min bei RT mit 1x SSC (150 mM NaCl, 15 mM Natriumzitat, pH 7,0), 0,1% [w/v] SDS, gefolgt von 2x 15 min bei 65°C mit 0,1x SSC, 0,1% [w/v] SDS. Die Membranen wurden im feuchten Zustand in Frischhaltefolie verpackt und mit Kodak *X-Ray* Filmen (Kodak Ag, Stuttgart) entsprechend der Signalstärke bei -70°C in Kassetten mit Verstärkerfolie exponiert.

2.4.9. Echtzeit-PCR

2.4.9.1. Probenherstellung für die Echtzeit-PCR

Die Durchführung von Echtzeit-PCR-Analysen erforderte die Generierung von DNA-freier RNA als Ausgangsmaterial. Hierfür wurden RNA-Proben wie unter 2.4.1. beschrieben präpariert und mit Hilfe des *DNA-freeTM* Kits von Ambion (Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom) nach Herstellerangaben von DNA-Kontaminationen befreit. Zur Überprüfung, ob nach der Reaktion noch DNA-Kontaminationen vorhanden waren, wurde 1 μ l der Probe als Matrize in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Bei Entstehung eines Amplifikates wurde nochmals ein DNase Verdau mit anschließender Kontrolle durchgeführt. Die Integrität der DNase-behandelten RNA wurde im 1%igen Agarosegel wie unter Kap. 2.4.6 beschrieben untersucht, bevor die RNA-Probe für eine *in vitro* Transkription verwendet wurde. Die *in vitro* Transkription der DNA-freien RNA erfolgte unter Verwendung der *TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents* der Applied Biosystems GmbH.

2.4.9.2. cDNA-Quantifizierung in der Echtzeit-PCR

Zwischen 5 und 100 ng der amplifizierten cDNA wurden als Matrize für Echtzeit-PCR-Ansätze unter Verwendung von *SYBR[®] Green* (Applied Biosystems GmbH) und den in Tabelle 12 angegebenen Oligonukleotiden verwendet. Um Pipettierfehler auszuschließen wurden jeweils 25 µl Quatruplets einer Probe angefertigt. Als Negativkontrolle für jede Bedingung diente jeweils ein Quatruplet ohne cDNA. Um die entstandenen Amplifikationen vergleichen zu können, wurde jeweils der CT-Wert einer Bedingung gegen den CT-Wert der cDNA der endogenen Kontrolle (GapDH) normalisiert. Anschließend erfolgte eine Auswertung auf Grundlage der $\Delta\Delta$ -CT-Methode.

2.5. Immunologische Arbeiten

2.5.1. Generierung und Reinigung eines monoklonalen OR5-Antikörpers

2.5.1.1. Kopplung eines OR5-Haptens an *Keyhole limpet hemocyanine* (KLH)

Die Kopplung des zu immunisierenden Peptides, dem synthetisch hergestellten C-Terminus des OR5-Rezeptors aus *Rattus norvegicus*, erfolgte mit Hilfe des *Maleimide Activated BSA, KLH Conjugation Kit* von Sigma-Aldrich. Das synthetische Peptid wurde in 20 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 6,6, 0,1 M EDTA, 80 mM Saccharose, angesetzt. Zur Überprüfung der Kopplungseffizienz nach Abschluß der Reaktion wurden 50 µl ungekoppeltes Peptid entnommen und bis zur Analyse bei 4°C aufbewahrt. Zur Kopplung wurde eine 5 mg/ml Lösung des Maleimid-aktivierten KLH in 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6,6, 0,23 M NaCl, 2 mM EDTA und 80 mM Saccharose im molaren Verhältnis von 1:1.000 mit dem synthetischen Peptid vorsichtig gemischt. Zur Vermeidung von Oxidationsreaktionen wurde die Probe im direkten Anschluß für 1-2 min mit N₂ begast und verschlossen. Die Konjugation erfolgte während einer 2-stündigen Inkubation bei RT. Erneut wurde eine Probe (100 µl) entnommen, um anschließend das Verhältnis zwischen den freien Cysteinresten vor und nach der Kopplung zu ermitteln. Die Isolierung der KLH-Peptid-Konjugate aus dem Reaktionsansatz sowie die Überprüfung der Kopplungseffizienz erfolgte ohne Modifikation nach Angaben des Herstellers mit Hilfe der im Kit enthaltenen *Sephadex G-25M* Gel-Filtrationseinheiten bzw. des Reagents 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure.

2.5.1.2. Immunisierung von Mäusen mit OR5-Peptid

Für die Immunisierung wurden 2 weibliche Balb/C Mäuse im Alter von 4-5 Wochen verwendet. Das Antigen wurde in zwei Ansätzen mit verschiedenen Adjuvants vermischt, *Alu-Gel-Suspension/Pertussis* (SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg; Sigma-Aldrich) bzw. *Freundsches Adjuvant* (Sigma-Aldrich). Über einen Zeitraum von 2 Monaten wurden die Immunisierungen durch subkutane Applikation des Antigens unter das Bauchfell durchgeführt:

AluGelS/ Pertussis:

Tag 1	100 µg Antigen + 20 µl AluGelS
Tag 17	100 µg Antigen + 20 µl Pertussis
Tag 28	100 µg Antigen + 20 µl AluGelS
Tag 38	150 µg Antigen + 20 µl Pertussis
Tag 51	150 µg Antigen + 20 µl AluGelS
Tag 58	150 µg Antigen + 20 µl AluGelS
Tag 62	100 µg Antigen

Freund-Complete:

Tag 1	100 µg Antigen + 100 µl Freund-Complete
Tag 27	100 µg Antigen + 100 µl Freund-Incomplete
Tag 37	150 µg Antigen + 100 µl Freund-Incomplete
Tag 62	150 µg Antigen + 100 µl Freund-Incomplete

2.5.1.3. Generierung von Hybridoma-Zelllinien

Zuerst wurden PAI (PAIB₃Ag81)-Myelomazellen geerntet und in sterile Falcon-Gefäße überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 1.000xg wurden die Zellen 2x mit 25 ml RPMI-Medium ohne HEPES gewaschen und erneut sedimentiert. Verwendet wurden ca. $2,5 \times 10^7$ Zellen für die Fusion mit 1×10^4 Milzzellen. Zur Präparation der Milzzellen wurde diese durch steriles Öffnen des Peritoneums herauspräpariert und in RPMI-Medium ohne HEPES überführt. Durch mehrmaliges Waschen in diesem Medium wurde ein Großteil störender Fibroblasten entfernt, und die Milz anschließend zerkleinert. Die Zellen mussten in einem Homogenisator weiter vereinzelt werden bevor sie mit den Myelomazellen für die Fusion vermischt werden konnten.

Die Fusion der murinen Milzzellen mit den Myelomazellen wurde unter Verwendung von PEG 4.000 durchgeführt (Harlow, E. und Lane, D., 1998). Dazu wurden die vermischten Zellen flächig verteilt, mit 0,5 ml PEG 4000 versetzt und 1 min bei 37°C im Wasserbad und anschließend 1 min bei RT inkubiert. Nach vorsichtiger Zugabe von RPMI-Medium ohne HEPES über 5 min wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert, anschließend 5 min niedertourig zentrifugiert und das Pellet in RPMI-Medium mit 5% Briclone (Gibco) resuspendiert und ausplattiert. Nach 24 h wurde das RPMI-Medium gegen HAT-Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden anschließend über 3 Tage

in 5% CO₂, 37°C inkubiert und nachfolgend ohne BriClone kultiviert. Zellen, die im HAT-Selektivmedium angewachsen waren, konnten für eine weitere Kultivierung in Aminopterin-freies HT-Medium (HAT-Medium ohne Aminopterin) überführt werden. Diese Zellen wurden im Anschluß vereinzelt, um monoklonale Zelllinien zu erhalten und konnten dann mittels ELISA (s. 2.5.2) auf ihre Antikörperspezifität getestet und in Einfriermedium in flüssigem N₂ gelagert werden.

HAT-Medium:

RPMI Medium	571,5 ml
HT-Stocklösung	5,5 ml
Aminopterin	95 nM

RPMI Medium:

RPMI 1640 (Gibco)	500 ml
(Hepes	25 mM)
FCS (Gibco)	10% [v/v]
Glutamin (Gibco)	20 mM
Kanamycin	0,1 mM
β-Mercaptoethanol	100 μM

Anzuchtmedium für die Antikörper-Isolierung:

500 ml PFHM II proteinfrei (Gibco)
1x Glutamax-I (Invitrogen)

Einfriermedium:

RPMI 1640 mit 25 mM Hepes und L-Glutamine	70% [v/v]
FCS (Gibco)	20% [v/v]
DMSO	12 % [v/v]
β-Mercaptoethanol	0,98% [v/v]

2.5.1.4. Aufreinigung monoklonaler OR5-Antikörper

Ein Liter gefrorener Kulturüberstand wurde über Nacht im Kühlschrank aufgetaut, unter Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt und dialysiert (s. 2.6.6.3.). Das Dialysat wurde im Anschluß auf eine NaCl-Konzentration von 3 M eingestellt. Zur Aufreinigung zirkulierte die Probe über Nacht bei 4°C über vorher mit Waschpuffer (100 mM Tris, 3 M NaCl, pH 8,9) äquilibrierte 2 ml *Affi-Gel Protein A Agarose for IgG Purification* (BioRad). Nach Waschen der Säule mit 100-150 ml Waschpuffer wurde der Antikörper mit 20 Säulenvolumen (SV) 0,1 M Zitronensäure, pH 4,0 eluiert. Zur Neutralisierung des Eluates wurden umgehend je 50-100 μl

2 M Tris, pH 9,0 pro Fraktion zugegeben und der pH-Wert kontrolliert. Alle Fraktionen mit einer optischen Dichte über 1,0 wurden vereinigt und über Nacht gegen 2x 2 l PBS dialysiert. Zur Regeneration der Protein A Säule wurde diese mit 25 ml Regenerationspuffer (0,1 M Zitronensäure, pH 3,0) und anschließend mit Waschpuffer gewaschen, bis ein pH-Wert von 8,9 erreicht war. Die dialysierte Antikörperlösung wurde à 30 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

PBS (1x):

KCl	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
NaCl	8 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,15 g/l

2.5.2. „Enzyme linked Immunosorbent Assay“ (ELISA): Selektion von Hybridomazellen und Immunglobulinklassen-Bestimmung

2.5.2.1. Selektion von Hybridomazellen

Zur Detektion und Isolierung von Hybridomazellen, welche Antikörper gegen das eingesetzte Antigen sezernieren, wurde der *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) verwendet.

Vor der Vereinzelung der Hybridomazellen wurden Zellüberstände von Zellgemischen bezüglich ihrer Antikörperspezifität untersucht. Dazu wurden 96-well Mikrotiterplatten (Nalge Nunc International Corp., Wiesbaden) mit 100 µl einer 1 mg/ml Lösung des synthetischen Peptides von OR5 über Nacht beschichtet, 3x mit PBS gewaschen und für 1 h mit 3% [w/v] Rinderserumalbumin (BSA) abgesättigt. Es wurden Inkubationen von 1 h mit 200 µl der Zellüberstände durchgeführt. Nachdem die Platten 3x mit PBS gespült wurden, folgte eine Inkubation mit 1:1.000 des *Immuno Pure® Goat anti Mouse HRP Antibody* (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) in 3% [w/v] BSA für 1 h. Die Platten wurden erneut 3x mit PBS gewaschen, und anschließend konnte die Detektionslösung aufgebracht werden. Verwendet wurde der *Alkaline Phosphatase Substrate Kit* von BioRad. Die Absorption der Farbreaktion wurde bei 405 nm gemessen, und die Proben unter Verwendung eines Nullwertes und einer Kontrolle ohne Zellüberstand ausgewertet. Nach Vereinzelung positiver Zellgemische wurde mit den Überständen der Zellklone ebenso verfahren.

2.5.2.2. Bestimmung der Immunglobulin-Klasse

Von positiven Zellklonen wurden die Überstände im Anschluß auf ihre Antikörpersubklasse untersucht. Hierfür wurden sowohl der *Mouse Typer Isotyping Panel* von BioRad als auch in nicht eindeutigen Fällen der *Ouchterlony* Test verwendet. Eine Bestimmung der Subklassen mit dem BioRad Kit wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung des *Goat anti Rabbit HRP Konjugate* (BioRad) durchgeführt.

Der Ouchterlony Test wurde auf Deckgläsern angefertigt, welche speziell vorbehandelt wurden: diese wurden 1 h in 1 M HCl eingelegt, 3x in H₂O_{dest} gewaschen und 30 min in 100% EtOH eingelegt. Nach dem Trocknen mit fusselfreiem Papier erfolgte eine Trockensterilisation für 4 h bei 160°C. Anschließend wurden die Deckgläser mit zwei Lagen Agarose beschichtet. Für die erste Schicht wurde 1 Tropfen 2% [w/v] Agarose in PBS aufgebracht und getrocknet. Die zweite Schicht bestand aus 3 ml 1,5% [w/v] Agarose, 2% [w/v] PEG 4.000 in PBS. Nachdem diese fest wurde, wurden mit einer Pasteurpipette, angeschlossen an eine Vakuumpumpe, vorsichtig Löcher in die Agarose gesaugt: um ein zentrales Loch wurden hexagonal 6 weitere Löcher in gleichen Abstand arrangiert. In einer feuchten Kammer aufbewahrt, konnten die vorbereiteten Deckgläser nun verwendet werden. Das mittlere Loch wurde mit 5 µl der zu testenden Antikörperlösung befüllt, während die äußeren Löcher jeweils 5 µl der polyklonalen Subklassen-Antikörper enthielten. Nach Inkubation über Nacht konnten die Tests ausgewertet werden. Eine Reaktion zwischen dem zu testenden Antikörper und dem entsprechenden Subklassen-Antikörper wurde durch eine weißliche Linie, verursacht durch Präzipitation von Antigen-Antikörper-Aggregaten, zwischen den ausgestanzten Löchern angezeigt.

2.5.3. Kovalente Kopplung von monoklonalen Antikörpern an Protein A-Sepharose

Fünzig ml Kulturüberstand monoklonaler Zellen wurden mit 500 µl *Affi PrepRProtein A Matrix* (BioRad) versetzt und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Nach Waschen der Sepharose in 2x 40 ml PBS wurde diese in 2 ml PBS resuspendiert, und ein 50 µl Aliquot für eine spätere Überprüfung der Kopplungseffizienz entnommen. Die Sepharose wurde 2x mit 12 ml 0,2 M Natriumborat, pH 9,0 gewaschen und anschließend in 10 ml 0,2 M Natriumborat resuspendiert. Kreuzreaktives, festes Dimethyl-Pimelimidat (Sigma-Aldrich) wurde in einer Endkonzentration von 20 mM zugefügt und 30 min bei RT rotierend inkubiert. Einer Waschung mit 0,2 M Ethanolamin, pH 8,0 folgte eine Inkubation für 2 h bei RT in 12 ml 0,2 M Ethanolamin, pH 8,0.

Nachdem die Sepharose 2x mit PBS gewaschen wurde, konnte diese in 1 ml PBS + 0,1% [w/v] Natriumazid bei 4°C gelagert werden. Von dieser Probe wurden erneut 50 µl entnommen, um die Kopplung der Antikörper an die Sepharose zu überprüfen. Hierfür wurden beide Proben in 6x Protein-Laufpuffer aufgenommen, für 5 min auf 95°C erhitzt, einer PAGE unterzogen und analysiert.

2.5.4. Regeneration der OR5-Antikörper-Sepharose

Zur Regeneration der Antikörper-Sepharose wurde diese mit jeweils 10 SV folgender Puffer in der Reihenfolge der Nummerierung gewaschen:

Puffer 1 und 5:

10 mM Tris, pH 8,0
140 mM NaCl

Puffer2:

50 mM Tris, pH 8,0
500 mM NaCl

Puffer 3:

50 mM Tris, pH 9,0
500 mM NaCl

Puffer 4:

50 mM Tris, pH 11,5
150 mM NaCl
0,1% Triton-X-100

Die Sepharose konnte über einen längeren Zeitraum in PBS + 0,1% [w/v] Natriumazid bei 4°C gelagert werden.

2.5.5. Immunfluoreszenz-Markierung an ganzen Zellen

2.5.5.1. Fixierung und Immunfluoreszenz-Markierung von Hefezellen

Fünf ml einer Hefekultur wurden in der frühen exponentiellen Phase geerntet und mit 1/10 Volumen 37% [w/v] Formaldehyd für 1 h bei RT fixiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 wurden die Zellen in 1 ml 50 µg/ml Zymolyase (ICN, Eschwege) in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5 und 2 µl/ml β-Mercaptoethanol resuspendiert und für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Effizienz der Sphäroplastierung wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen bei einer niedertourigen Zentrifugation sedimentiert und in 1 ml PBS aufgenommen.

Für die Mikroskopie wurden *Lab-Tek Chamber SlideTM* der Firma Nalge Nunc International Corp. verwendet. Vor Gebrauch wurden diese mit 10 µl einer 1 mg/ml Poly-L-Lysin-Hydrobromid (MW 400.000, Sigma-Aldrich) Lösung für 15 min beschichtet und anschließend mit PBS gewaschen und getrocknet. Nun konnten 10 µl der fixierten Zellen aufgebracht und nach 10 min alle überschüssigen Zellen durch vorsichtiges Waschen mit PBS entfernt werden. Drei % [w/v] BSA wurde sowohl zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen (30 min, RT) als auch zur Inkubation mit den Antikörpern verwendet. Diese wurden in vorgeschriebenen Konzentrationen verwendet und für 1 h bei RT auf den Zellen belassen. Zwischen und nach den Inkubationen wurde jeweils 3x mit PBS gewaschen. Um eine zusätzliche Anfärbung des Zellkerns zu erreichen, wurden die Zellen im Anschluß mit 10 µl 1 µg/ml DAPI (Sigma-Aldrich) für 1 min inkubiert und erneut gründlich gewaschen. Abschließend wurde ein kleiner Tropfen „*Mounting Medium*“ zugesetzt, der Objektträger mit einem Objektglas und klarem Nagellack verschlossen und bei -20°C gelagert.

Herstellung „*Mounting Medium*“:

50 mg ρ -Phenylenediamine (Sigma-Aldrich) wurden in 5 ml PBS, pH 9 bei RT gelöst und anschließend mit 45 ml 87% [v/v] Glycerin versetzt. Aliquote konnten bei -70°C im Dunkeln über längere Zeit gelagert oder direkt für die Dekonvoleszenz- und Konfokalmikroskopie verwendet werden.

2.5.5.2. Fixierung und Immunfluoreszenz-Markierung von P19-Zellen

P19-Säugerzellen wurden vor der Immunfluoreszenzmikroskopie entweder mit eiskaltem Methanol für 5 min bei -20°C fixiert und anschließend 3x mit PBS gewaschen oder mit Paraformaldehyd (PFA) behandelt. Zur Durchführung der PFA-Fixierung wurde frisches PFA wie folgt hergestellt: 4 g PFA (SERVA Electrophoresis GmbH) wurden in 80 ml 1x PBS, pH 7,4 aufgeschlämmt und vorsichtig auf ca. 60°C erwärmt. Anschließend wurde die Lösung auf 100 ml mit PBS aufgefüllt und durch einen Faltenfilter filtriert. Eine Lagerung war für ca. 1 Woche bei 4°C möglich.

Zur Fixierung wurde das Medium entfernt, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und 20 min in der PFA-Lösung bei RT inkubiert. Nach Entfernen der PFA-Lösung erfolgte eine Inkubation von 10 min bei RT mit 0,025% [w/v] Saponin (Sigma-Aldrich). Die Zellen mussten anschließend vorsichtig 3x mit PBS gewaschen werden.

Fixierte P19-Zellen wurden zuerst für 2 h bei RT mit 3% [w/v] BSA abgesättigt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu reduzieren. Der erste Antikörper wurde in 3% [w/v] BSA für 1 h oder bei 4°C über Nacht auf den Zellen inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch 3x vorsichtiges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper in 3% [w/v] BSA für 1 h inkubiert und überschüssiger Antikörper erneut durch 3x Waschen mit PBS entfernt.

Die Zellen wurden nun mit wenigen Millilitern PBS überschichtet und für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Zur Durchführung der Konfokalmikroskopie wurden die Zellen auf *Lab-Tek Chamber SlideTM* 4 Well Kammern kultiviert und weiterbehandelt. In allen Fällen wurden Negativkontrollen ohne ersten Antikörper angefertigt.

Zur Detektion von Bestandteilen der olfaktorischen Signalkaskade bzw. neuronaler Markerproteine wurden die P19-Zellen zur Differenzierung auf sterilisierte, mit 0,5 mg/ml Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht. Auf den Objektträgern wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und für eine Immunmarkierung verwendet.

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 9: Primär- und Sekundärantikörper für die Immunmarkierung von P19-Zellen.

Antikörper	Epitop	Markierung	Verdünnung
Anti-His (Molecular Probes)	His ₅	-	1:5.000
Anti-OR5 (diese Arbeit)	OR5 C-Terminus	-	0,1 µg/ml
Anti-OMP (Margolis, F. L., 1972)	OMP aus Ratte	-	1:10.000
Anti-ACIII (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)	C-Terminus A Cyklase III aus Maus	-	1:100
Anti-oCNC2 (Bradley, J. <i>et al.</i> , 1997)	Fragment von rOCNC2 aus Ratte	-	1:200
Anti-β-Tubulin (Halfter, W. <i>et al.</i> , 2002)	Tubulin Retina aus Huhn	-	1:200
Anti-G _{olf} (Santa Cruz)	G _{α(olf)} aus Ratte	-	1:50
Ziege anti Maus (Chemicon)	Maus IgG	Cy3	1:200
Ziege anti Hase (Chemicon)	Hase IgG	Cy3	1:200
Hase anti Ziege (Chemicon)	Ziege IgG	Cy3	1:200

Die β -Tubulin und α CNC2 monoklonalen Antikörper – hergestellt durch W. Halfter und K. Zinn - wurden von der *Developmental Studies Hybridoma Bank* (The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242, USA) bezogen.

2.5.6. BIACORE

Zur Untersuchung der Antikörper-Spezifität sowie zur Bestimmung des K_D -Wertes als Maß für die Affinität eines Antikörpers wurden Bindungsstudien an einem BIACORE-Messgerät (Biacore, Freiburg) durchgeführt. Als Bindungsfläche diente ein *CM5-Chip* der Firma BIACORE, an welche das synthetische Antigen über Cystein gekoppelt wurde. Zur Beladung einer Spur des Chips wurden 500 μ l einer 0,5 mg/ml konzentrierten Antigen/PBS Lösung verwendet. Als Negativkontrolle diente eine mit Laminin „P19“ (19 Aminosäuren aus der α -Kette des Laminins) beladene Spur (0,02 mg/ml in PBS). Die beiden übrigen Spuren wurden mit verdünntem Antigen (20%) und 100% des Verdünners beladen. Die Verdünnung erfolgte mit *RB212*. Bindungskinetiken wurden bei 20°C mit einer Injektionszeit von 30 min und einer Flussrate von 10 μ l/min durchgeführt. Die verwendeten Antikörpermolaritäten betragen 500, 250, 125, 62,5, 31,5 und 0 nM.

2.6. Biochemische Methoden

2.6.1. Standardmethoden

Eine Proteinbestimmung nach Bradford wurde mit Bradford-Lösung von BioRad nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine Standardkurve wurde unter Verwendung von 1 μ g, 2,5 μ g, 5 μ g, 10 μ g und 20 μ g BSA/Reaktionsansatz erstellt.

Proteinbestimmungen mit Hilfe des *Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit* (Perbio Science Deutschland GmbH) wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung des halben angegebenen Reaktionsvolumens angefertigt.

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden *Centriprep®* und *Microcon®* Zentrifugeneinheiten (Millipore, Schwalbach) mit einem *molecular weight cut off* (MWCO) von 10, 30 oder 50 kDa verwendet. Die Zentrifugationen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.2. Präparation von Gesamtprotein aus *S. cerevisiae*

Nach Sedimentation von 10 OD₆₀₀-Einheiten Zellen für 5 min bei 4.000xg und 4°C wurden diese einmal mit eiskaltem H₂O_{bidest} gewaschen. Das Sediment wurde nun in 200 µl eiskaltem *TCA-Puffer* (20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 50 mM Ammoniumazetat, 2 mM EDTA) unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (Leupeptin 1 µg/ml, Pepstatin A 1 µg/ml und PMSF 17.4 µg/ml oder 1 Tablette/50 ml *Complete EDTA-free Proteaseinhibitor* (Roche Diagnostics GmbH) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl eiskalter 20% [w/v] TCA und Glasperlen (Ø 425 - 600 µm) bis zu ca. 2/3 des Probenvolumens wurden die Zellen durch 4x 4 min starkes Schütteln auf einem Vortexer aufgebrochen. Die Lysate wurden in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt, die Glasperlen 2x mit 500 µl 1:1 TCA Puffer:20% [w/v] TCA gewaschen und die Überstände abgenommen. Nach Vereinigung der Überstände wurde die Probe 15 min auf Eis belassen und anschließend bei 16.000xg, 5 min, 4°C präzipitiert. Das Sediment konnte nun in 100 µl *TCA-Resuspensions-Puffer* (3% [w/v] SDS, 100 mM Tris Base pH 11,0), evtl. unter Zugabe von einigen Mikrolitern 2 M Tris, pH 9,0, aufgenommen und bei -70°C gelagert werden.

2.6.3. Isolierung von Gesamtmembranen aus *S. cerevisiae*

Nach Sedimentierung der Zellen für 5 min bei 4.000xg und 4°C wurden diese einmal mit eiskaltem H₂O_{bidest} gewaschen. Das Sediment wurde anschließend in Homogenisierungspuffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 10% [v/v] Glycerin; 0,25-0,5 g Zellnassgewicht/ml) resuspendiert. Um einen Abbau der Proteine durch Proteasen zu vermeiden, wurden Proteaseinhibitoren (s. 2.6.2) zugesetzt. Ein 70 ml Homogenisator (Braun, Melsungen) wurde mit 50 g Glasperlen (Sigma-Aldrich) und 20 ml Zellsuspension bestückt, und die Zellen durch 8 - 10x 1 min Homogenisierung mit jeweils 1 min Kühlung auf Eis zwischen den Inkubationen aufgeschlossen. Die Vollständigkeit des Aufschlusses wurde mikroskopisch überprüft. Der Überstand wurde in ein 50 ml Falcon-Gefäß (BD, Heidelberg) überführt und die Glasperlen 2x gewaschen. Dieser Überstand wurde ebenfalls in Falcon-Gefäße überführt und 2x bei 1.600xg, 5 min, 4°C zentrifugiert, um Zellbruchstücke zu entfernen. Die Sedimentation der Membranen erfolgte durch eine Ultrazentrifugation der Überstände (200.000xg, 1 h, 4°C). Nach Entfernen des cytosolischen Überstandes konnten die Membranen in 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 20% [v/v] Glycerin resuspendiert, mit Protease-Inhibitoren versetzt und bei -70°C gelagert werden.

2.6.4. Isolierung von Gesamtmembranen aus P19-Zellen

Die adhären wachsenden P19-Zellen konnten durch Zugabe von einigen Millilitern Mg^{2+}/Ca^{2+} -freiem PBS + 0,5 mM EDTA und kräftiges Klopfen vom Flaschenboden gelöst und durch eine Zentrifugation (5 min, 400xg, 4°C) sedimentiert werden. Das Sediment wurde anschließend in 10 ml PBS/T₁₇₅-Flasche unter Zusatz von Protease-Inhibitoren (s. 2.6.2.) resuspendiert. Die Zellen konnten mit Hilfe eines Hand-Homogenisators oder durch Sonifizierung aufgeschlossen werden. Für die Sonifizierung an einem *Sonifier cell disruptor B15* (Branson) wurden folgende Einstellungen gewählt: *output control 5, % duty cycle 50, pulsed, 3x 10 Pulse*. Durch eine niedertourige Zentrifugation (3.200xg, 15 min, 4°C) wurden intakte Zellen und Zelltrümmer entfernt und der Überstand mit 1 Volumen TEDG-Puffer verdünnt. Während einer Ultrazentrifugation (120.000xg, 90 min, 4°C) wurden die Gesamtmembranen sedimentiert. Das Sediment konnte nun in einem kleinen Volumen TEDG-Puffer + Proteaseinhibitoren aufgenommen werden und dauerhaft bei -20°C gelagert werden.

TEDG-Puffer:

20% [v/v] Glycerin

80% [v/v] TE-Puffer

vor Gebrauch Zugabe von 0,2 mM DTT.

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 7,5

0,2 mM EDTA

2.6.5. Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

2.6.5.1. Abtrennung von ribosomalen Proteinen aus Gesamtmembranpräparationen

Zur Abtrennung von ribosomalen Proteinen aus Gesamtmembranen wurde eine Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation mit 10%-60% [w/v] Saccharose durchgeführt. Dazu wurden eine 10%ige und eine 60%ige [w/v] Saccharoselösung in 50 mM Tris, pH 7,5, 800 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, 20% [v/v] Glycerin hergestellt, und der Gradient mit Hilfe eines Gradientenmischers in 30 ml Zentrifugenröhrchen (Beckman Coulter GmbH-Diagnostics, Krefeld, für TST 28) gegossen. Drei ml konzentrierte Membransuspension in oben genannten Puffer wurden vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen. Durch eine Ultrazentrifugation bei 25.000xg für 14 h, 4°C sollten die Membranen von den ribosomalen Proteinen abgetrennt werden. Die lipidhaltigen Membranen befanden sich vorwiegend in der oberen Hälfte des Gradienten, während die lipidfreien ribosomalen Proteine sich in einem höherprozentigen Bereich

des Gradienten sammelten. Nach Abnahme und Verdünnung der Membranfraktion mit Saccharose-freiem Puffer folgte eine Zentrifugation bei 30.000xg, 1 h, 4°C. Das Sediment konnte resuspendiert und bei -20°C gelagert werden.

2.6.5.2. Fraktionierung von Organellen

Zur Isolierung von Plasmamembranen aus *S. cerevisiae*- und P19-Zellanzuchten wurde eine Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Hierfür wurden eine 43- und eine 53%-ige [w/v] Saccharoselösung in H₂O hergestellt. Drei ml 53% [w/v] Saccharoselösung wurden in ein durchsichtiges Ultrazentrifugationsröhrchen (Beckman Coulter GmbH-Diagnostics) gegossen und mit 6 ml 43% [w/v] Saccharoselösung überschichtet. In TEDG-Puffer (s. 2.6.4.) resuspendierte und auf ca. 2 ml verdünnte (5-10 mg/ml) Gesamtmembranpräparationen (s. 2.6.3. und 2.6.4.) wurden vorsichtig auf den Gradienten pipettiert und mit TEDG-Puffer gegeneinander austariert. Während einer Zentrifugation im Ausschwingrotor (TST 41) bei 100.000xg und 4°C für 2 h bildeten sich verschiedene Phasen an der Grenze der beiden Zuckerkonzentrationen sowie an der Grenze zum Puffer aus. An der Phasengrenze zwischen Puffer und 43% [w/v] Saccharose sollten sich nun vorwiegend Mitochondrien, Golgi- und ER-Bestandteile befinden, während die Probe zwischen den beiden Zuckerkonzentrationen überwiegend Plasmamembranen enthielt. Zur Reduktion von Kontaminationen zwischen den Bestandteilen wurden die Proben mit einer Spritze vorsichtig abgezogen. Nach einer Verdünnung der zuckerhaltigen Proben mit mindestens 5 Volumen H₂O_{dest} wurden diese erneut ultrazentrifugiert (100.000xg, 4°C, 1 h), in TEDG-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.6.6. Proteinfällungen

Zur Fällung von Proteinen aus einer Lösung gibt es verschiedene Methoden, die sich darin unterscheiden, wie quantitativ das gesamte Protein gefällt wird und wie effektiv das Präzipitat anschließend wieder lösbar ist. TCA- und Ethanol-Fällungen wurden eingesetzt, um stark verdünnte Proben für eine Analyse durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu konzentrieren oder um Detergenzien zu entfernen, welche das Protein-Laufverhalten in der PAGE negativ beeinflussen.

Eine Fällung durch Ammoniumsulfat wurde eingesetzt, um lösliche Antikörper im Zuge der Antikörperaufreinigung zu präzipitieren.

2.6.6.1. TCA-Fällung

Eine Proteinprobe wurde mit 1 Volumen einer 50%igen [w/v] TCA-Lösung versetzt und 1 h auf Eis oder 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde das gefällte Protein für 5 min bei 10.000xg, 4°C sedimentiert und 1:1 in *TCA-Resuspensions-Puffer* (s. 2.6.2.):2 M Tris, pH 9,0 resuspendiert.

2.6.6.2. Ethanol-Fällung

Ein Volumen Probe wurde mit 3-9 Volumen eiskaltem EtOH_{absolut} versetzt und 1-2 h bei -20°C inkubiert. Nachdem die Probe 15 min bei 20.000xg und 4°C sedimentiert wurde, erfolgte ein weiterer Waschschrift in 80% [v/v] EtOH. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in *TCA-Resuspensions-Puffer* aufgenommen.

2.6.6.3. Ammoniumsulfat-Fällung

Zur Fällung von Proteinen aus Kulturüberständen monoklonaler Hybridzellen wurden 55 Teile einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung mit 45 Teilen Zellüberstand über einen Zeitraum von 1 h bei 4°C gemischt. Der Ansatz wurde anschließend mindestens über Nacht bei 4°C unter Rühren inkubiert. Die gefällten Proteine wurden für 20 min bei 10.000xg, 4°C zentrifugiert, das Präzipitat anschließend in 50-100 ml Dialysepuffer (100 mM Tris, pH 8,9) resuspendiert und über Nacht gegen mindestens 2x 2 l Dialysepuffer bei 4°C dialysiert.

2.6.7. Deglykosylierung von OR5-Protein

Zur Überprüfung des N-Glykosylierungsstatus eines Proteins kann eine Deglykosylierung mit *PNGase F* („N-Glycosidase F“, NEB) durchgeführt und anschließend das *PNGase F*-behandelte Protein mit nicht behandeltem Protein verglichen werden. *PNGase F* ist eine Amidase aus *Flavobacterium meningosepticum*, welche N-Glycan Ketten von Glykoproteinen hydrolysiert. Die verwendeten Puffer sowie 10% [w/v] NP-40 werden zusammen mit dem Enzym von NEB bereitgestellt.

Für die Durchführung wurden 5, 10 oder 20 µg Gesamtmembranen aus *S. cerevisiae*- oder P19-Zellen eingesetzt. Zuerst wurden die Membranen mit 10x *Glycoprotein Denaturing Buffer*

versetzt und 20 min bei 37°C denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 µl *G7 Reaction Buffer*, 1 µl 10% [w/v] *NP-40* und 1 µl *PNGase F* versetzt, auf 10 µl mit H₂O aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. Ein Kontrollansatz mit allen Bestandteilen jedoch ohne Enzym wurde ebenfalls angefertigt. Nun konnten die Proben über Western-Blot-Analyse miteinander verglichen werden, da die Glykosylierung eines Proteins die Größe und damit das Laufverhalten in der PAGE verändert.

2.6.8. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung von mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturierten Proteinen durch denaturierende PAGE erfolgte hauptsächlich nach Lämmli (Laemmli, U., 1970), in einzelnen Fällen auch nach Schägger (Laemmli, U., 1970; Schägger, H. und von Jagow, G., 1987). Für die Polymerisierung und als Radikalstarter für die Quervernetzung des Acrylamids wurden Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) verwendet. Zur besseren Auftrennung der Proteine wurden die Trenngele mit niederprozentigen Sammelgelen überschichtet. Vor dem Gellauf wurden die Proteinproben mit 1/6-1/3 Volumen 6x Denaturierungspuffer versetzt und 20 min bei 37°C inkubiert. Gele wurden mit Silber (Blum, H. *et al.*, 1987) (s. 2.6.9.2.) oder Coomassie Brilliant Blue G-250 bzw. Serva Blau R-250 angefärbt (Weber, K. und Osborn, M., 1969) (s. 2.6.9.1.).

Die Zusammensetzung der Gele und Laufpuffer wurde Standardprotokollen (s. 2.6.) entnommen.

6x Denaturierungspuffer:

0,35 M Tris/HCl, pH 6,8

0,35 M SDS

30% [v/v] Glyzerin

0,6 M DTT

0,175 mM Bromphenolblau

2.6.9. Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

2.6.9.1. Coomassie-Färbung, modifiziert (Weber, K. und Osborn, M., 1969)

Polyacrylamidgele wurden nach Beendigung der Elektrophorese für mindestens 30 min bei RT unter leichtem Schütteln in der Färbelösung (0,01% [w/v] Serva Blau G-250 bzw. Serva Blau R-250, 40% [v/v] Methanol, 10% [v/v] Eisessig) inkubiert. Bei Benutzung von Coomassie G-250-Färbelösung wurden die Gele zuvor in Fixierlösung (50% [v/v] Methanol, 12,5% [v/v] Eisessig) für mindestens 15 min vorbehandelt. Anschließend wurde das Gel kurz mit H₂O_{dest} gespült und dann in Entfärberlösung (10% [v/v] Methanol, 10% [v/v] Eisessig) inkubiert, bis eine vollständige Entfärbung des Hintergrundes erfolgt war. Nach der Entfärbung wurden die Gele für mindestens 1 h in 10% [v/v] Ethanol und 5% [v/v] Glycerin inkubiert und anschließend zwischen zwei Zellophanblättern 2 Tage getrocknet. Die getrockneten Gele wurden zur Protokollierung digitalisiert (Agfa Snapscan 600 Flachbett Scanner; Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie. KG, Köln) und bei RT aufbewahrt.

2.6.9.2. Silberfärbung, modifiziert (Blum, H. *et al.*, 1987)

Zur Färbung von Proteinen mit Silbernitrat wurde das Gel nach Beendigung der Elektrophorese 1-24 h bei RT in Fixierlösung (50% [v/v] Methanol, 12% [v/v] Eisessig, 0,037% [v/v] Formaldehyd) leicht schüttelnd inkubiert. Um das Methanol für die weiteren Schritte zu entfernen, wurde das Gel 3x für 5 min mit 50% [v/v] Ethanol gewaschen und 1 min in einer 2 mM Thiosulfatlösung inkubiert. Nach 3xigen Waschen mit H₂O_{bidest} für jeweils 20 sek wurde das Gel 20 min in einer Silbernitratlösung (24 mM AgNO₃, 0,0555% [v/v] Formaldehyd) imprägniert und anschließend mit H₂O für jeweils 20 sek gewaschen. Die Proteine im Gel wurden dann mit 1,13 M Na₂CO₃, 0,08 mM Thiosulfat, 0,074% [v/v] Formaldehyd entwickelt. Zum Stoppen der Färbereaktion wurde die Entwicklerlösung rasch durch 50 mM EDTA, pH 7-8 ersetzt. Anschließend erfolgte ebenfalls eine Trocknung und Archivierung der Gele.

2.6.10. Densitometrische Analyse der Konzentrationen von Proteinen in Polyacrylamidgelen und Western-Blot

Die Färbungsintensität von mit Coomassie gefärbten Proteinen aus Polyacrylamidgelen wurde für densitometrische Analysen mit Hilfe des PC-Programmes *Scion Image* (Scion Corporation,

Frederick, Maryland, USA; Release Beta 4.0.2) ausgewertet. Mit Western-Blots wurden zur Bestimmung der Färbungsintensitäten ebenso verfahren. Die Verteilung der Färbungsintensität wurde anhand der Pixelauswertung graphisch ermittelt und die Peakflächen durch Integration berechnet.

2.6.11. Western-Blot-Analyse

Zur immunologischen Analyse von Proteinen mit Antiseren wurden die Proteine nach dem Tankblot-Verfahren bei 400 mA für 60 min auf eine Nitrocellulosemembran ProtranBA 83 (Schleicher & Schuell, Dassel) bzw. eine *Westran*®S PVDF-Membran (Schleicher & Schuell) übertragen. Als Transferpuffer, mit dem zusätzlich auch die Membran, das Gel und das Filterpapier (Whatman, Maldstone, GB) angefeuchtet wurden, diente *Towbinpuffer* (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,01% [w/v] SDS, 20% [v/v] Methanol, pH 8,2 – 8,4). Bei Verwendung einer PVDF-Membran wurde diese vor dem Transfer 1 min in Methanol_{absolut} eingelegt, und der Methanolgehalt im *Towbinpuffer* auf 10% [v/v] reduziert. Nach dem Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine Inkubation der Membran für 1 h bei RT in 0,2% [w/v] *I-Block*TM (Perbio Science Deutschland GmbH)/1x TTBS abgesättigt. Die Zugabe des Antiserums erfolgte ebenfalls in *I-Block*TM über Nacht bei 4°C. Nach 3xigem Waschen der Membranen mit TTBS-Puffer für je 10 min wurde diese 1 h mit HRP-konjugiertem, Ziege anti Maus *ImmunoPure*® Antikörper (Perbio Science Deutschland GmbH) inkubiert und dann erneut 3x 10 min mit 1x TTBS-Puffer gewaschen. Die Detektion von Proteinen erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *Western-Star*TM *chemiluminescent immunoblot detection kit* (Perbio Science Deutschland GmbH). Bei Durchführung eines DOT-Blots wurden die zu untersuchenden Proben direkt auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetropft und gleich dem Western-Blot (nach abgeschlossenem Transfer) behandelt.

Die Dokumentation der Fluoreszenz erfolgte durch Belichtung von Kodak *X-OMAT-AR* Röntgenfilmen (Kodak Ag).

1x TTBS:

50 mM Tris, pH 8,0

150 mM NaCl

0,1% [v/v] Tween® 20

2.6.12. Quantifizierung von Proteinmengen

Für die Quantifizierung eines His₆-markierten Proteins wurde ein Vergleich im Western-Blot mit His₅ markiertem Kontrollprotein *Positope*TM (Invitrogen) durchgeführt. Es wurde eine Konzentrationsreihe von 10, 20, 40 und 100 ng des Kontrollproteins angefertigt und verschiedene Mengen der Gesamtmembranen des Expressionsstammes *w1* mit Auftragspuffer versetzt und eine PAGE (2.6.8.) und Western-Blot-Analyse (2.6.11.) mit His₅-Antikörper (Molecular Probes, Karlsruhe) durchgeführt. Der Blot wurde digitalisiert und mit Hilfe der *Scion Image* Software (Scion Corporation, Release Beta 4.0.2) densitometrisch ausgewertet.

2.6.13. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität in *S. cerevisiae*

2.6.13.1. Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität von Hefestämmen auf X-Gal-Indikatorplatten

Die β -Galaktosidase-Aktivität von Hefekolonien wurde zur Vorauswahl von Expressionsstämmen mit Hilfe einer Übersichtung mit X-Gal von auf YPD-Platten gewachsenen Hefeklonen untersucht.

Zur Anfertigung des Übersichtungsagars wurden 92 ml 0,5 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 und 0,5 g niedrig schmelzende Agarose vermischt und auf 55°C erhitzt. Nach Zugabe von 2 ml 10% [w/v] SDS, 0,5 ml 20 mg/ml X-Gal, 5,5 ml N,N'-Dimethylformamid und 0,05 ml β -Mercaptoethanol wurden die Kulturplatten mit diesem Gemisch vorsichtig überschichtet und für 2-3 Tage bei 30°C kultiviert. Die Stärke der β -Galaktosidase-Aktivität einer Kolonie zeigte sich durch eine unterschiedlich ausgeprägte Blaufärbung der Kultur, verursacht durch die enzymatische Spaltung von X-Gal durch die β -Galaktosidase.

2.6.13.2. Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität in *S. cerevisiae*

Die Anzucht der Produktionsstämme erfolgte in YP-Medium + 4% [w/v] Raffinose, und eine Induktion des rekombinanten Gens wurde durch Zugabe von 2% [w/v] Galaktose bei einer OD₆₀₀ von 1,0 ausgelöst. Nach einer Induktionszeit von 4 h wurden 10 OD₆₀₀ Einheiten der Zellen geerntet und sedimentierte. Das Sediment wurde anschließend in 250 μ l 100 mM Tris-Cl, pH 8,0, 1 mM Dithiothreitol, 20% [v/v] Glycerin resuspendiert und mit Glasperlen wie unter

2.5.3. beschrieben aufgebrochen. Nach Zugabe von weiteren 250 μl Puffer wurde der Überstand abgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und durch eine Zentrifugation bei 20.000xg, 15 min, 4°C von Zelltrümmern befreit. Der geklärte Extrakt konnte nun bei -20°C bis zur Durchführung der Enzymbestimmung gelagert werden.

Zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität wurden zuerst maximal 60 μl des Extraktes mit 540 μl Z-Puffer (60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pH 7,0, vor Gebrauch: +35 μl β -Mercaptoethanol/10 ml Puffer) versetzt. Nach Vorinkubation der Proben bei 28°C für 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 120 μl *o*-nitrophenol- β -galactoside (ONPG; Stammlösung 4 mg/ml in Z-Puffer) initiiert und bei 28°C inkubiert, bis die Probe leicht gelblich (OD_{420} 0,3-0,7) wurde. Die Reaktion wurde vor der Bestimmung der optischen Dichte bei 420 nm durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Na_2CO_3 Lösung gestoppt. Nachdem alle Reaktionszeiten notiert und eine Proteinbestimmung der Proben mit dem *BCA-Kit* (s. 2.6.1.) durchgeführt wurde, konnte die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase in den Proben unter zu Hilfenahme folgender Formel bestimmt werden:

$$(\text{OD}_{420} \times 1.7) / (0.0045 \times \text{Proteinkonzentration} \times \text{Extrakt Volumen} \times \text{Zeit}),$$

wobei OD_{420} der optischen Dichte des Produktes, *o*-nitrophenol, entspricht. Der in die Gleichung eingeflossene Faktor 1,7 korrigiert das Reaktionsvolumen. Der Faktor 0,0045 entspricht der optischen Dichte von 1 nmol *o*-nitrophenol, die Proteinkonzentration wurde angegeben in mg/ml und das Extraktvolumen wurde auf Milliliter bezogen. Die Zeit wurde in Minuten gerechnet. Die resultierende spezifische Aktivität wurde in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein angegeben.

2.6.14. Proteinsequenz-Analysen

Zur Bestimmung der Sequenz eines gereinigten Proteins wurde entweder eine Lösung verwendet, oder die auf eine PVDF-Membran übertragene Probe, die nach Anfärbung mit Coomassie R-250 aus der Membran ausgeschnitten wurde. In der Arbeitsgruppe von Prof. Lottspeich (MPI für Biochemie, Martinsried) wurde eine N-terminale Edman-Sequenzierung durchgeführt. Durch diese Methode kann die Abfolge der Aminosäuren durch den schrittweisen Abbau der jeweils N-terminalen Aminosäure bestimmt werden.

2.6.15. Circulär Dichroismus (CD)-Spektroskopie

CD-Spektren wurden an einem Jasco J715 Spektropolarimeter (Jasco, Japan) mit Power Supply PS-150J und Peltier-Element PFD-350S bei 4°C gemessen. Die verwendete Software war das Windows Programm J-700. Die Probe wurde zuvor in 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Digitonin auf eine Konzentration von ~100 nM eingestellt. Die Messungen wurden in Quartz-Küvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 cm durchgeführt. Spektren wurden im Bereich zwischen 195 und 250 nm mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/min und einer Auflösung von 1,0 nm aufgenommen. Vier Messungen wurden gemittelt, um das Signal/Rausch Verhältnis zu verbessern.

2.7. Expression und Aufreinigung von OR5

2.7.1. Expression von OR5 in *S. cerevisiae*-Produktionsstämmen

Die Anzucht von Startkulturen der *S. cerevisiae* Stämme erfolgte in SCØuraØleu Selektivmedium. Bei einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) zwischen 4 und 5 wurden die Zellen mit einer OD_{600nm} von 0,25 in YP-Medium mit 2% [w/v] Dextrose oder YP-Medium mit 4% [w/v] Raffinose überführt. Bei Gebrauch des YP-Mediums mit 2% [w/v] Raffinose erfolgte eine Induktion durch Zugabe von 2% [w/v] Galaktose bei einer OD_{600nm} von 1,0. In YPD-Medium angezogene Zellen wurden zur Induktion der Expression nach 48 h 3x mit kaltem H₂O gewaschen und in YP-Medium mit 2% [w/v] Galaktose überführt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 12 h.

2.7.2. Solubilisierung und Isolierung des heterolog synthetisierten OR5-Rezeptors

Glyzerin wurde während der Aufreinigung, jedoch in nach und nach abnehmenden Konzentrationen den Puffern zugesetzt, da es speziell bei Membranproteinen einen stabilisierenden Effekt ausübt.

2.7.2.1. Vorbereitung von Gesamtmembranen für die Solubilisierung

Um vor der eigentlichen Reinigung von OR5 aus Gesamtmembranen von *S. cerevisiae* (s. 2.6.3.) eine teilweise Entfernung von Proteinen, die peripher an Membranen angelagert sind, zu

erreichen, wurden die Membranen zuerst in Hochsalz Puffer (50 mM Tris, pH 7,5, 600 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, 20% [v/v] Glycerin) aufgenommen und für 1 h, 4°C bei 100.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment im gleichen Puffer resuspendiert. Ein weiterer Reinigungseffekt wurde anfangs durch eine Präsolubilisierung mit einem Detergenz erzielt, welches zwar einen hohen Anteil von ~50% an Gesamtmembranproteinen aber < 10% OR5 aus der Membran löst. Hierfür wurde 1% [v/v] Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) für 1 h bei 4°C verwendet. Nach einer Zentrifugation (1 h bei 100.000xg und 4°C) wurde das Sediment in Solubilisierungspuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 400 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, 20% [v/v] Glycerin) aufgenommen. Im Falle einer Solubilisierung mit Zwittergent 3-16 (Calbiochem, Darmstadt) wurde der oben beschriebene Puffer benutzt. Bei Verwendung von 1-Palmitoyl-2-Hydroxy-*sn*-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-Glycerol)] (LPG, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) wurde der gleiche Puffer ohne NaCl eingesetzt.

2.7.2.2. Solubilisierung von OR5

Fünfhundert mg der vorbereiteten Gesamtmembranen (s. 2.7.2.1.) in Solubilisierungspuffer wurden mit 1 g Zwittergent 3-16 (Calbiochem) oder 0,5 bzw. 1 g LPG (Avanti Polar Lipids) versetzt und in einem Gesamtvolumen von 50 ml für 1 h gerührt (Zwittergent 3-16: RT, LPG: 4°C). Nach anschließender Ultrazentrifugation (1h, 4°C, 100.000xg) wurde der Überstand, welcher die solubilisierten Proteine enthielt, für die nachfolgende Reinigung verwendet.

2.7.2.3. Regenerierung und Beladung von Ni-NTA-Agarose

Zur Regeneration und Beladung der *Ni-NTA-Agarose* (Qiagen) wurde die Matrix in eine Säule überführt und vorerst mit 2 SV Regenerationspuffer (6 M Guanidiniumchlorid, 0,2 M Essigsäure) gewaschen. Der Regenerationspuffer wurde anschließend durch Waschung der Säule mit 5 Volumen H_2O_{bidest} entfernt und mit 3 Volumen 2% [w/v] SDS behandelt. In aufsteigenden Konzentrationen wurde die Säule nun mit je 1 Volumen 25, 50 und 75% [v/v] Ethanol gewaschen, gefolgt von 5 Volumen 100% Ethanol. Anschließend wurde in absteigenden Konzentrationen mit 1 Volumen 75, 50 und 25% [v/v] Ethanol gewaschen und abschließend 1 Volumen H_2O_{bidest} verwendet. Um die Sepharose vollständig von zweiwertigen Ionen zu befreien, folgte nun eine Behandlung mit 5 Volumen 100 mM EDTA, pH 8,0. Nach kurzem Waschen mit H_2O konnte die Sepharose wieder mit 5 Volumen 100 mM $NiSO_4$ beladen werden.

Abschließend wurde die Sepharose mit 2 Volumen H₂O und 2 Volumen Regenerationspuffer gewaschen und in 20% [v/v] Ethanol bei 4°C gelagert.

2.7.2.4. Ni-NTA-Chromatographie

Für den ersten Reinigungsschritt wurde das am C-Terminus mit His₆ markierte Protein an eine Ni-NTA-Matrix gebunden. Dazu wurde 1 ml der Ni-NTA-Agarose pro 25 ml löslicher Anteil aus der LPG-Solubilisierung verwendet. Nach Zugabe von 15 mM Imidazol (Endkonzentration; Merck, Darmstadt) erfolgte eine Inkubation bei 4°C für 2 h. Da anfangs zur Optimierung der Reinigung auch Zwittergent 3-16 für die Solubilisierung eingesetzt wurde, dieses jedoch bei niedrigen Temperaturen ausfällt, erfolgte ein Teil der Solubilisierungen und Ni-NTA-Chromatographieschritte bei RT. Nach der Inkubation wurde die Ni-NTA-Agarose in eine Säule überführt und die Proteine chromatographisch getrennt. Die verwendete Flussrate betrug 0,5 ml/min, drei aufeinanderfolgende Waschschrte (je 15 SV) wurden in Anwesenheit von 50 mM Imidazol durchgeführt. Die Elution erfolgte durch einen Imidazolgradienten über 10 SV bis zu einer Endkonzentration von 500 mM Imidazol.

Waschpuffer I:

50 mM Tris, pH 7,5
600 mM NaCl
30% [v/v] Glycerin
50 mM Imidazol

Waschpuffer II:

50 mM Tris, pH 7,5
150 mM NaCl
5% [v/v] Glycerin
50 mM Imidazol

Waschpuffer III:

50 mM Tris, pH 7,5
150 mM NaCl
50 mM Imidazol

Elutionspuffer:

50 mM Tris, pH 7,5
150 mM NaCl
250 mM Imidazol

Allen Puffern wurde 0,05% [w/v] DDM zugesetzt.

Relevante Fraktionen wurden anschließend mittels Western-Blot analysiert oder in dem nächsten Reinigungsschritt, der OR5-Affinitäts- bzw. Ionenaustauscherchromatographie (s. 2.7.2.5. und 2.7.2.6.), eingesetzt.

2.7.2.5. Kationenaustauscherchromatographie

Da der OR5-Rezeptor einen statistisch ermittelten pI von 8,29 hat, wurde ein Kationentauscher gewählt. Als Trägermaterial wurde eine *MonoS*-Säule von der Firma Amersham Biosciences mit einem SV von 1 ml verwendet. Untersucht wurde das Bindungs- und Elutionsprofil bei den pH-Werten 6,7 und 7,3. Als Puffersystem wurde Natriumphosphatpuffer gewählt. Die Elution erfolgte mit 600 mM NaCl bei einer Flußrate von 0,5 ml/min. Es wurden 0,5 ml Elutionsfraktionen gesammelt.

Im Anschluß erfolgte die Analyse der Elutionsfraktionen mittels Immunoblot.

Natriumphosphat-Puffer:

50 mM Natriumphosphat
pH 6,7 bzw. 7,3
0,05% [w/v] DDM

Elutionspuffer:

50 mM Natriumphosphat
pH 6,7 bzw. 7,3
600 mM NaCl
0,05% [w/v] DDM

2.7.2.6. Affinitätschromatographie mit OR5-Antikörpern

Unter Verwendung des eigens hergestellten Antikörpers gegen den C-Terminus des OR5-Proteins war ein Reinigungsschritt über die OR5-Antikörper/-Antigen Bindung möglich. Die Herstellung der Chromatographie-Matrix unter Verwendung von Protein A Sepharose ist in Kapitel 2.5.3. beschrieben.

Nach Äquilibrierung von 2-5 ml der Antikörper-Sepharose und Konzentrierung des Eluates aus der Ni-NTA-Chromatographie auf ca. das 2-fache Volumen des Matrixvolumens erfolgte eine Inkubation im „Batch“-Verfahren für 2 h oder über Nacht bei 4°C. Die Sepharose wurde anschließend in eine *Econo-Column*® Chromatographiesäule (BioRad) gefüllt und mit 20 SV Waschpuffer gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit 10 SV Niedrig-pH-Puffer. Das Eluat musste sofort durch Zugabe von 100 µl Tris, pH 9,0/ml neutralisiert werden, um eine Denaturierung des Proteins zu verhindern. Der pH-Wert wurde mit einer pH-Meßelektrode überprüft. Die Analyse der Elutionsfraktion erfolgte ebenfalls mit Hilfe von Immunoblot unter Verwendung von OR5-Antikörpern. Nachdem das Eluat anschließend auf 50 µl eingengt wurde, konnte es in der Gelfiltration eingesetzt werden.

Waschpuffer:

50 mM Tris, pH 7,5

150 mM NaCl

Elutionspuffer:

0,2 M Glyzin

150 mM NaCl

pH 2,8

Den Puffern wurde jeweils 0,05% [w/v] DDM oder [w/v] 0,1% Digitonin zugesetzt.

2.7.2.7. Gelfiltration

Die Gelfiltration stellt eine Ausschlußchromatographie dar, in welcher Proteine nach ihrem apparenten Molekulargewicht getrennt werden. Das verwendete Säulenmaterial *Superdex-200* mit einem SV von 2,4 ml wurde von Pharmacia Biotech bezogen. Alle verwendeten Proben wurden zuvor in einer *Airfuge* (Beckman Coulter GmbH-Diagnostics) von Präzipitaten befreit. Die Flussrate während der Auftrennung betrug 40 µl/min. Die aufgetragene Probe hatte ein Volumen von 40 µl, was < 2% des SV entspricht. Es wurden 80 µl-Fractionen gesammelt und anschließend für die Analyse über PAGE und Western-Blot vorbereitet oder für nachfolgende Messungen verwendet.

Äquilibrierungs-/Laufpuffer:

20 mM Tris, pH 7,5

150 mM NaCl

0,05% [w/v] DDM oder 0,1% [w/v] Digitonin

2.8. Messung der Tryptophanfluoreszenz: Bestimmung der Funktionalität des isolierten OR5-Rezeptors

Die Funktionalität eines Proteins wurde mit Hilfe der Protein-eigenen Tryptophanfluoreszenz untersucht. Für die Messung der Tryptophanfluoreszenz wurden gereinigter OR5-Rezeptor (2.6.17.) und „Lysmeral“=Lilial (R. C. Treatt, Suffolk, UK) bzw. Octanal (Sigma-Aldrich) als Liganden verwendet, wobei Octanal als Negativkontrolle diente. Die Messung wurde an einem *F-2000 Fluorescence Spectrophotometer* von Hitachi (Tokyo, Japan) in 4 ml Quarz Küvetten und mit einem Reaktionsvolumen von 3 ml durchgeführt. Die vorher konzentrierte Proteinprobe wurde in einer Endkonzentration von 33 µg/ml im Reaktionspuffer (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM

NaCl, 0,05% Digitonin) eingesetzt. Alle Proben waren mit 0,02% [w/v] Digitonin versetzt. Die Anregung des Proteins erfolgte bei 280 nm, die Messung der Emission bei 328 nm. Die Zugabe des Liganden erfolgte aus einer 10 oder 100 mM Stocklösung in DMSO, wobei darauf geachtet wurde, dass die Endkonzentration des DMSO im Messansatz geringer als 1% [v/v] war. Messungen wurden mit folgenden Ligandenkonzentrationen durchgeführt: 0, 10, 100, 200, 400, 600, 800 und 1.000 μM . Zuvor 1 h bei 37°C in 0,4% [w/v] SDS denaturierter Rezeptor wurde ebenfalls vermessen und diente als „inaktive“ Kontrolle.

2.9. Kristallisation

Für die Kristallisation von gereinigtem OR5-Rezeptor wurde eine Proteinlösung von 5-7 mg/ml in 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Digitonin eingesetzt. Ein μl der Proteinlösung wurde mit 1 μl der einzelnen Pufferbedingungen aus dem *Crystal Screen Basic* von Sigma-Aldrich als hängender Tropfen auf ein 22 mm silikonisiertes Glasplättchen (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) pipettiert (Q-Platten, 24 Behälter) und über der Reservoir-Flüssigkeit bei 18°C gelagert. Zusätzlich wurde der *Additive Screen*TM von Hampton Research nach Herstellerangaben verwendet. Das Kristallwachstum wurde mikroskopisch verfolgt und mit einer Olympus Digitalkamera dokumentiert. Entstandene Kristalle wurden mittels Röntgenstrukturanalyse auf ihre Diffraktions-Fähigkeit untersucht.

2.10. Ca^{2+} -Imaging

Die Funktionalität des in P19-Zellen exprimierten Geruchsrezeptors OR5 wurde *in vivo* durch das sogenannte „Calcium Imaging“ mit einem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff untersucht. Dadurch kann der Ca^{2+} -Ionen-Fluß bzw. die -Verteilung in einer Zelle sichtbar gemacht werden. Verwendet wurde die zellpermeable Acetoxymethylester-Form des Farbstoffes *Fluo-4* (Molecular Probes) in einer Enkonzentration von 1 μM in *Ringers*-Lösung (140 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 2 mM Na-Pyruvat, 9,4 mM Glukose, 1,25 mM KH_2PO_4 , 5 mM HEPES, pH 7,4). Zur Erhöhung der Löslichkeit des Farbstoffes wurde ein Aliquot einer 1 mM *Fluo-4* Stocklösung mit dem gleichen Volumen 20% *Pluronic F-127* (Molecular Probes) in DMSO gemischt und anschließend in *Ringers*-Lösung auf 1 μM *Fluo-4* und 0,02% *Pluronic F-127* verdünnt und für die Beladung der Zellen verwendet. Zusätzlich wurde die Lösung mit 0,2 mM *Probenezid* (Sigma-Aldrich), einem organischen Anionen-Transport Inhibitor, versetzt,

um ein Ausströmen der de-esterifizierten Form des Farbstoffes zu verringern. Die Aufnahme von *Fluo-4* in die P19-Zellen erfolgte während einer 15 min Inkubation bei RT. Die Zellen wurden anschließend mit *Ringers-Lösung/Probenezid* gewaschen, um lose assoziierten Farbstoff zu entfernen und weitere 30 min bei RT inkubiert, um eine vollständige Deesterifizierung des Farbstoffes in der Zelle zu gewährleisten. Vor Zugabe von 10 μ M (Endkonzentration) des Liganden und nach Zugabe (1, 5, 15, 30, 45 und 60 sek) wurde die durch Anregung für 0,3336 Sekunden bei 488 nm induzierte Fluoreszenzänderung bei >515 nm an einem Zeiss *Axiovert 100* Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) verfolgt. Zur Anregung wurde eine 100 W Quecksilberdampf-Lampe und zur Signalerfassung eine Digital Kamera (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee) sowie die Software *Simple PCI* (Compix Inc., Cranberry Township, USA) verwendet.

2.11. Chemikalien, Enzyme und Gase

Chemikalien wurden wenn nicht anders angegeben von den Firmen Merck und Sigma-Aldrich bezogen und hatten die Qualitätsstufe „zur Analyse“.

Enzyme für die Molekularbiologie stammten von New England Biolabs.

Standardproteine für die Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden von Invitrogen und Pharmacia Biotech AB bezogen.

Acrylamid/ Bisacrylamid stammte von National Diagnostics (Hessle Hull, England).

Alle verwendeten Detergenzien konnten von Sigma-Aldrich, Calbiochem, Biochemika (Seelze), Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA) oder Anatrace (Maumee, OH, USA) oder im Falle des LPG von Avanti Polar Lipids bezogen werden.

Proteaseinhibitoren wurden zum Großteil von der Roche Diagnostics GmbH bezogen.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden in der Arbeitsgruppe Oesterhelt oder von Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Gase stammten von der Westfalen AG (Münster).

3. Experimente und Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eukaryotische Zellsysteme für die funktionelle Expression des Geruchsrezeptors OR5 aus *Rattus norvegicus* sowie eine Reinigungsstrategie des Proteins mit anschließender Charakterisierung etabliert.

Die Ansprüche an ein Expressionssystem für die quantitative Isolierung eines Proteins unterscheiden sich maßgeblich von denen an ein Zellsystem für funktionelle Untersuchungen. Der entscheidende Parameter einer Protein-Isolierung ist der Expressionsgrad des Zielproteins, Faltung und Funktionalität sollten aber auch in dieser Fragestellung gegeben sein. Alternativ können Proteine aus Primärgewebe isoliert werden. Diese Variante stellt jedoch nur selten eine Alternative dar: neben einem häufig sehr niedrigen Expressionsgrad ruft die Beteiligung von Primärgewebe nicht nur logistische, sondern in vielen Fällen auch ethische Probleme hervor. Außerdem können mit heterologen Expressionssystemen deutlich höhere Expressionsraten erreicht werden als mit homologen Systemen, es resultieren jedoch geringere Ausbeuten im Vergleich zur heterologen Expression cytosolischer Proteine (Grisshammer, R. und Tate, C. G., 1995; Gimelbrant, A. A. *et al.*, 1999). Bei der Entscheidung für ein heterologes Expressionssystem muss allerdings auch berücksichtigt werden, dass sich die Proteinsynthese prokaryotischer und eukaryotischer Zellen maßgeblich unterscheidet, wodurch der sinnvolle Gebrauch eines kompatiblen Systems entscheidend für die Proteinqualität ist.

Eine funktionelle Analyse ist auch mit niedrigen Expressionsniveaus möglich, die Komponenten der endogenen Signalweiterleitung müssen jedoch vollständig vorhanden sein-ein Aspekt, der für quantitative Isolierungen eine untergeordnete Rolle spielt. Um die Funktionalität einer rekombinanten Proteinspezies an ihrem Wirkungsort zu ermöglichen, muss ein Expressionssystem gewählt werden, in dem zunächst eine korrekte Translokation der Zielproteinspezies erfolgt. Untersuchungen zur Rezeptor-Induzierbarkeit zeigen im Anschluß, ob ein Zusammenwirken der zellulären Komponenten und der rekombinanten Proteinmoleküle erfolgt.

Die Bearbeitung der sehr unterschiedlichen Problemstellungen erforderte die Etablierung verschiedener zellulärer Expressionssysteme. Für die funktionelle Charakterisierung des rekombinanten Rezeptors *in vivo* wurde die Säugetierzelllinie P19 eingeführt. Sie stellt eine Alternative zu Primärzellen dar und besitzt zusätzlich das Potential zur neuronalen

Differenzierung - ein Aspekt, der unter Berücksichtigung der nativen Umgebung olfaktorischer Rezeptoren von Vorteil sein kann.

Die Arbeit an dieser Zelllinie begann mit einer eingehenden Untersuchung der P19-Zellen in Bezug auf Marker-Gene bzw. -Proteine, welche an der olfaktorischen Signalweiterleitung beteiligt sind. Die Methoden zur Analyse einzelner Signalkomponenten waren qualitative PCR, Immunmarkierung und quantitative Echtzeit-PCR. Zusätzlich wurden Expressions-Studien des Geruchsrezeptors OR5 in dieser Zelllinie durchgeführt. Abschließend wurde der funktionelle Nachweis des Rezeptors sowie seine Kopplung an cAMP-vermittelte Signaltransduktionsprozesse *in vivo* durch „Calcium Imaging“-Experimente gezeigt.

Für die Isolierung des Geruchsrezeptor-Proteins sollte ein Expressionssystem verwendet werden, welches eine Proteinsynthese in größerem Maßstab und in nativer Konformation erlaubt. *Escherichia coli* wird häufig zur Überexpression verwendet. Membranproteine liegen in diesem System jedoch in der Regel denaturiert in Form von Einschlusskörpern vor. Hefeexpressionssysteme weisen gegenüber prokaryotischen Zellsystemen verschiedene Vorteile für die Expression von Säugetier-Proteinen auf: sie stellen eine kostengünstige Alternative zur Säugerzellkultur dar, die neben genetischer Flexibilität und einfacher Handhabung im Gegensatz zu *E. coli* einige posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Glykosylierungen oder Acetylierungen, gewährleisten. Obwohl sich die Physiologie, die Membranzusammensetzung und auch die Arten der Modifikationen von denen der Säugetierzellen unterscheiden, konnten in der Vergangenheit diverse GPCRs in Hefe exprimiert werden (Arkinstall, S. *et al.*, 1995; Sudbery, P., 1996; Pausch, M. H., 1997). Zusätzlich können z. B. mit *Saccharomyces cerevisiae* hohe Zelldichten und Expressionsniveaus erreicht werden.

Die heterologe Expression von Membranproteinen kann jedoch auch in eukaryotischen Systemen manchmal aufgrund der notwendigen Proteinfaltung und -Translokation unter Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparates zu einer Überlastung der zellulären Translokationsmaschinerie führen. Eine dadurch verursachte, erhöhte Fehlfaltung der heterologen Proteine ist die Folge. Dieser unerwünschte Effekt lässt sich durch eine Reduktion der Expression, die Verwendung eines potenteren Expressionssystems oder die Zugabe von z. B. Chaperonen oder Transkriptionsfaktoren, verringern. Es ist demnach offensichtlich, dass Expressionssysteme, welche es erlauben, den Faltungsstatus eines rekombinanten Proteins zu kontrollieren, zu einer optimalen Proteinsynthese führen können.

Einen Lösungsansatz hierfür bietet das „unfolded protein response“ (UPR)-kontrollierte Hefeexpressionssystem (Griffith, D. A. *et al.*, 2003). Es ist bekannt, dass durch den UPR-

Mechanismus fehlgefaltetes Proteins im ER detektiert wird, wodurch letztendlich die Transkription diverser Gene, z. B. Chaperon-Gene, reguliert wird. In dem verwendeten System wird durch Integration eines UPR-Element-gekoppelten *LacZ*-Gens eine im ER ausgelöste UPR durch die auftretende β -Galaktosidase-Aktivität dargestellt. Mit Hilfe dieses Systems können demnach Stämme selektiert werden, die die Produktion eines Rezeptorproteins unter geringer Beteiligung der UPR aufweisen und so einen hohen Anteil des Proteins im nativen Zustand produzieren (Abb. 15/16).

Nach Optimierung der Geruchsrezeptorexpression in dem Hefestamm *S. cerevisiae* erfolgte die Isolierung des Rezeptors mit dem Ziel der funktionellen und strukturellen Charakterisierung *in vitro*. Es wurden verschiedene Proteinreinigungs-Strategien verfolgt, so dass letztendlich ein optimiertes Protokoll zur Isolierung des Geruchsrezeptors etabliert und im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet werden konnte.

In diesem Zusammenhang sind auch die Generierung OR5-spezifischer, monoklonaler Antikörper sowie deren Verwendung bei den angewandten Detektions- und Chromatographiemethoden zu erwähnen. Verglichen zu polyklonalen Antikörpern und herkömmlichen Protein-, „Tags“ bietet ein monoklonaler Antikörper eine weit höhere Affinität und Spezifität, wodurch eine Methoden-Optimierung, z. B. der Aufreinigung, ermöglicht wird. Da die Lokalisation eines heterologen Proteins einen Hinweis auf seinen Faltungszustand gibt, können OR5-Antikörper auch für diese Fragestellung effektiv eingesetzt werden. Bei Herstellung eines Antikörpers gegen den C-Terminus eines Proteins kann außerdem die vollständige Translation des rekombinanten Proteins nachgewiesen werden. Basierend auf OR5-Antigenitätsanalysen erwies sich der C-Terminus als potentiell immunogen, weshalb dieser als Antigen zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet wurde.

Das für die Geruchsrezeptorexpression verwendete Zielgen umfasst den gesamten kodierenden Bereich von *OR5* aus *Rattus norvegicus*. Bei dem Genprodukt handelt es sich um ein stark hydrophobes Transmembranprotein, welches in anderen Zellsystemen nicht oder nur zum Teil zur Plasmamembran transportiert wird (McClintock, T. S. *et al.*, 1997; Krautwurst, D. *et al.*, 1998). Die folgenden Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob die P19- und *S. cerevisiae*-Zellsysteme für eine funktionelle Expression des G-Protein-gekoppelten Rezeptors tatsächlich geeignet sind, und somit weitere Analysen ermöglichen können, um funktionelle und strukturelle Aspekte eines Geruchsrezeptorproteins zu klären.

3.1. Expression des Geruchsrezeptors OR5

3.1.1. Expression von OR5 in der Säugetier-Zelllinie P19

Für die Expression des Geruchsrezeptors *OR5* aus *Rattus norvegicus* in Säugerzellsystemen wurde zu Beginn der Arbeit die cDNA des Rezeptors in verschiedene Vektoren kloniert (s. 2.1.), welche ausschließlich den Cytomegali Virus (CMV)-Promotor zur Initialisierung der Transkription enthielten. Es wird im Folgenden nur die Klonierung und Verwendung des Vektors *cDNA3.1CT-TOPO-GFP* beschrieben, da die Verwendung anderer konstitutiver Expressionsvektoren (z.B. *pDisplay*, *pCMVmycER* und *pcDNA3.1*) aufgrund der geringen Expressionsniveaus zu keinen zusätzlichen, aussagekräftigen Ergebnissen führte.

Die Klonierung von *OR5* in den Vektor *cDNA3.1CT-TOPO-GFP* (= *pEG2*) erfolgte über die TOPO-Isomerase-vermittelte Insertion eines *OR5*-PCR-Produktes mit 3'-überhängenden Adeninen (Abb. 6). Die in der PCR verwendeten Oligonukleotide können der Tabelle 5 entnommen werden.

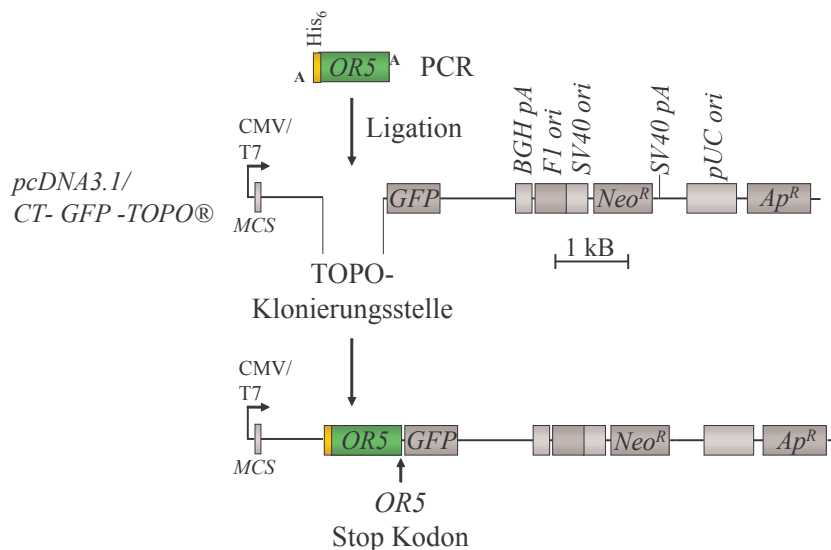


Abb. 6: Klonierung von *OR5* in *pcDNA3.1CT-TOPO-GFP*. Die Klonierung von *OR5* erfolgte durch eine TOPO-Isomerase-vermittelte Ligation in die multiple Klonierungsstelle des linearisierten TOPO-Vektors. Am C-Terminus des Geruchsrezeptors blieb das natürliche Stopkodon von *OR5* erhalten, um die Produktion eines *OR5*-GFP-Fusionsproteins zu unterbinden. Das für weitere Untersuchungen isolierte Konstrukt wurde *pEG2* genannt.

Zusätzlich wurde ein Expressionssystem eingesetzt (Lundstrom K, M. A., Buell G, Allet E, Adami N, Liljestrom P, 1994) (s. Abb. 10), welches auf dem Semliki Forest Virus (SFV) basiert und bereits erfolgreich für die Expression von GPCRs (Lundstrom K, M. A., Buell G, Allet E,

Adami N, Liljestrom P, 1994; Lundstrom K, M. A., Allet E, Ceszkowski K, Agudo G, Chollet A, Liljestrom P, 1995; Hoffmann, M. *et al.*, 2001; Lundstrom, K., 2003; Sen, S. *et al.*, 2003) und speziell auch von Geruchsrezeptoren eingesetzt wurde (Monastyrskaia, K. *et al.*, 1999; Lundstrom, K., 2003). Der SFV ist ein alpha-Virus aus der Familie der Togaviren und eines der bestuntersuchtesten viralen Systeme für die heterologe Genexpression in höheren Säugerzellen. Es war zu erwarten, dass aufgrund des viralen Promotors *Sp6* und hoher Infektionsraten eine stärkere Expression erzielt wird, jedoch keine stabile Zelllinie konstruiert werden kann (Lundstrom K, M. A., Buell G, Allet E, Adami N, Liljestrom P, 1994; Lundstrom K, M. A., Allet E, Ceszkowski K, Agudo G, Chollet A, Liljestrom P, 1999; Lundstrom, K., 2003).

Es wurden zwei SFV-Expressionsvektoren verwendet, *pSFV2* und *pSFVICap*, wobei *pSFVICap* lediglich eine zusätzliche Sequenz eines strukturellen Polyproteins des Virus (Cap) zwischen dem *mp4* Gen und der multiplen Klonierungsstelle des Vektors enthält. Es ist bekannt, dass das Einfügen dieser Sequenz die Proteinsyntheserate heterolog produzierter Proteine erhöht (Sjoberg, E. M. *et al.*, 1994).

Das ebenfalls durch PCR hergestellte Konstrukt für die Klonierung in die SFV-Vektoren *SFV2* und *SFVICap* enthielt N-terminal der Rezeptorsequenz eine Kozaksequenz, *Bam*HI/*Sca*I-Schnittstellen, einen kurzen Linker, eine *His*₆-Sequenz sowie eine *Faktor Xa*-Restriktionsschnittstelle (s. Abb. 7).

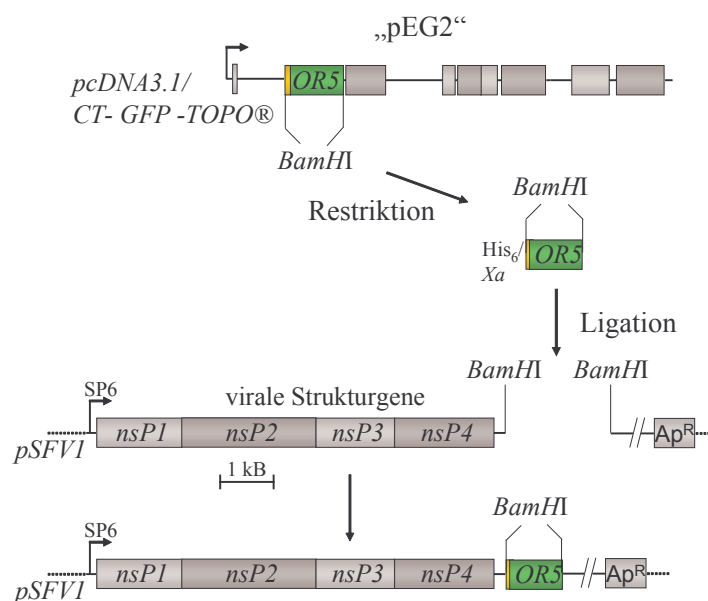


Abb. 7: Klonierung von OR5 in den viralen Vektor *pSFV1*. Die Klonierung von *OR5* erfolgte über Ligation in die *Bam*HI-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors.

Die Kozaksequenz, ein optimierter Transkriptionsstart in Vertebraten (Kozak, M., 1987), sollte die Transkription vor der Histidin-Abfolge gewährleisten, und damit die Produktion von unmarkiertem Rezeptor verhindern. Das PCR-Fragment wurde über eine TOPO-Klonierung in den Vektor *pcDNA3.1CT-TOPO-GFP* eingeführt (*pEG1*, s. 2.1.). Durch Restriktion wurde das Zielfragment aus dem Vektor isoliert und über die Restriktions-Schnittstellen in die viralen Vektoren umklont. Die korrekte Insertion und Sequenz wurde jeweils mittels Sequenzierung überprüft.

Die erhaltenen Konstrukte *OR5-pSFV2 # 8* und *OR5-pSFV1Cap # 6* (s. 2.1.) wurden im Anschluß zur Infektion der murinen P19-Zelllinie eingesetzt.

3.1.1.1. Expression von *OR5* unter Verwendung konstitutiver Vektoren

In einem initialen Experiment wurde überprüft, ob unter Verwendung des konstitutiven Expressionsvektors *pcDNA3.1CT-TOPO-GFP* das *OR5*-Rezeptorgen in P19-Zellen exprimiert wird. Dazu wurden die Plasmide *pEG2* oder *pEG1* über eine *Metafectene*-vermittelte Transformation (s. 2.3.5.1.) in die P19-Zellen eingebracht. Im Folgenden werden sowohl Western- (s. 2.6.11.) und Northern-Blot-Analysen (s. 2.4.6.) als auch Immunfluoreszenz-Untersuchungen (s. 2.5.5.) zum Nachweis der Rezeptor-cDNA bzw. des Proteins beschrieben. Das „Tag“-freie Konstrukt *pEG2* wurde für die Northern-Blot-Analysen eingesetzt, während ein Nachweis von *OR5*-Protein mit His₅-Antikörper nach Transformation mit *pEG1* im Western-Blot-Verfahren erfolgte.

3.1.1.1.a. Nachweis von *OR5* auf Transkriptionsebene

Eine besonders sensitive Methode zum Nachweis spezifischer RNA ist die radioaktive Markierung der Ribonukleinsäuren. In Kombination mit der Methode der Northern-Hybridisierung ist dadurch der Nachweis schon geringer Mengen einer bestimmten RNA-Spezies möglich.

Zur Durchführung von Northern-Blots (Abb. 8) wurde RNA verschiedener Zeitpunkte nach Transfektion der P19-Zellen mit *pEG2* verwendet. Da diese Art der Transfektion generell in einer stabilen Expression resultiert, konnten im Gegensatz zu den meisten viralen Infektionen auch lange Transfektionszeiten untersucht werden. Als Kontrolle diente eine auf T7-Polymerase-basierte *in vitro* Transkription des *pEG2*-Plasmides. Diese sollte zum Vergleich der

Laufeigenschaften des Transkriptes herangezogen werden. *OR5*-freie P19-RNA wurde als Negativ-Kontrolle verwendet. Anhand dieser Proben konnte gezeigt werden, dass die Verwendung einer P^{32} -markierten *OR5*-Sonde zu einer spezifischen Markierung von RNA in der Northern-Hybridisierung führte. In der *in vitro* Transkription (Spur 1) wurden neben einer unspezifischen Markierung der gesamten Spur zwei RNA-Fragmente markiert, welche im Bereich von ~1.250 und ~1.800 bp im Gel aufgetrennt wurden. Bei dem kleineren Fragment handelte es sich vermutlich um ein *OR5*-Transkript, wobei geringfügige Abweichungen eventuell auf eine Veränderung des Laufverhaltens durch Sekundärstrukturen oder ein unvollständige Denaturierung der RNA zurückzuführen sind. Das Fragment der Größe 1.800 bp lässt sich eventuell auf ein *OR5*/GFP-Transkript des Expressionsvektors *pEG2* zurückführen, da beide Gene theoretisch zusammen eine Größe von 1.864 bp aufweisen. Das markierte Transkript aus *pEG2* transformierten P19-Zellen entsprach jedoch nicht der kalkulierten Größe eines mRNA-*OR5*-Transkriptes von 945 bp (Spuren 3-8): die im Northern-Blot ermittelte Fragmentgröße der P^{32} -markierten RNA betrug <500 bp. Ursache hierfür war eventuell das Auftreten einer instabilen oder unvollständigen *OR5*-mRNA. Auch in Wiederholungen bestätigten sich die geringere Transkriptionsgröße und der zeitliche Verlauf der Expression.

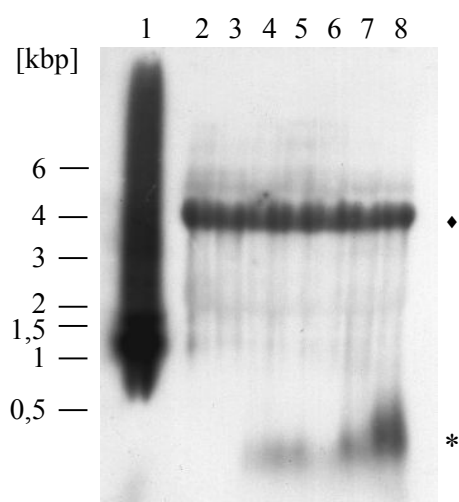


Abb 8: Northern-Hybridisierung mit einer *OR5*-spezifischen P^{32} -markierten Sonde. Jeweils 5 μ g RNA von P19-Zellen und *pEG2*-transfizierten P19-Zellen verschiedener Transfektionszeiten sowie 250 ng einer *pEG2*-*in vitro*-Transkription wurden in einer Northern-Hybridisierung auf das Vorkommen von *OR5*-RNA überprüft. Spur 1: *in vitro* Transkription *pEG2*; Spur 2: RNA P19-Zellen; Spur 3: RNA *pEG2* transfizierter P19-Zellen zum Zeitpunkt 0h; Spur 4-8: RNA *pEG2* transfizierter P19-Zellen zu den Zeitpunkten 12, 24, 40, 48 und 70 h in aufsteigender Reihenfolge. ♦, 26S rRNA; *, potentielles, verkürztes *OR5*-Transkript.

3.1.1.1.b. Nachweis von *OR5* auf Translationsebene: Western-Blot und Immunfluoreszenz-Markierung

In Western-Blot-Analysen wurde zunächst kein *OR5*-Protein detektiert (Daten nicht gezeigt); vermutlich weil die *OR5*-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag. Deshalb wurde der

Nachweis des Rezeptors auf Proteinebene durch Immunfluoreszenzmarkierungen geführt. Es wurden OR5-spezifische Signale in transfizierten Zellen generiert, in Anbetracht hoher Belichtungszeiten von bis zu 1 min handelte es sich jedoch vermutlich um eine sehr schwache Produktion des Rezeptors. Dennoch wurde die Spezifität der Markierung durch Kontrollen mit untransformierten P19-Zellen belegt.

Zusätzlich konnte nicht ausgeschlossen werden, dass ein unvollständig translatiertes Produkt entstanden war, da es - basierend auf den Ergebnissen aus den Northern-Blot-Experimenten - vermutlich zu einer unvollständigen Transkription des Gens gekommen war. Die Integrität des Proteins im C-terminalen Bereich war nicht gesichert, da es über eine Histidinabfolge am N-Terminus nachgewiesen wurde. Ein weiteres Problem war die geringe Transfektionseffizienz von i. d. R. 3-5% des verwendeten Lipid-basierten Transfektionssystems. Deshalb wurde die Verwendung der nicht-viralen Konstrukte zur Durchführung von OR5-Expressions- und Funktionsstudien an P19-Zellen eingestellt.

3.1.1.2. Expression von OR5 unter Verwendung des Semliki Forest Virus-Expressionssystems

Aufgrund dieser Resultate wurde im Folgenden ein virales Infektionssystem verwendet. Hierfür wurde das OR5-Gen in die Semliki Forest Virus Vektoren *pSFV2* und *pSFV1Cap* integriert und für die Infektion der Säugerzellen verwendet (*OR5-pSFV2* # 8, *OR5-pSFV1* # 6, siehe 2.1). Durch den Gebrauch dieses Systems wurden generell gute Infektionseffizienzen und hohe Expressionsgrade erreicht (Lundstrom, K. *et al.*, 1994; Lundstrom, K. *et al.*, 1999; Lundstrom, K., 2003). Die bisher im Zusammenhang mit dem SFV-System untersuchten Säugetier-Zelllinien sind HEK-293-, BHK-21-, COS-7, C6 Glioma-, OLF 442-, CHO-K1, Odora- sowie Primärzellen (Ulmanen, I. *et al.*, 1997; Monastyrskaja, K. *et al.*, 1999; Murrell, J. R. und Hunter, D. D., 1999; Hoffmann, M. *et al.*, 2001; Lundstrom, K., 2003; Sen, S. *et al.*, 2003; DiCiommo, D. P. *et al.*, 2004; Hague, C. *et al.*, 2004), jedoch nicht die P19-Zelllinie. Deshalb wurde zunächst die Kompatibilität des P19-Zellsystems mit dem viralen Infektionssystem überprüft und hierfür rekombinante Viruspartikel hergestellt.

Mittels einer Elektrottransformation der konstruierten Plasmide *OR5-pSFV2* # 8 und *OR5-pSFV1Cap* # 6 in BHK-21-Zellen wurden Virus-Stammsuspensionen erzeugt (s. 2.3.6.), mit denen eine Infektion von Säugerzellen möglich war. Ein schematischer Überblick über die Viruspartikel-Herstellung des Semliki Forest Virus-Systems ist in Abbildung 9 dargestellt.

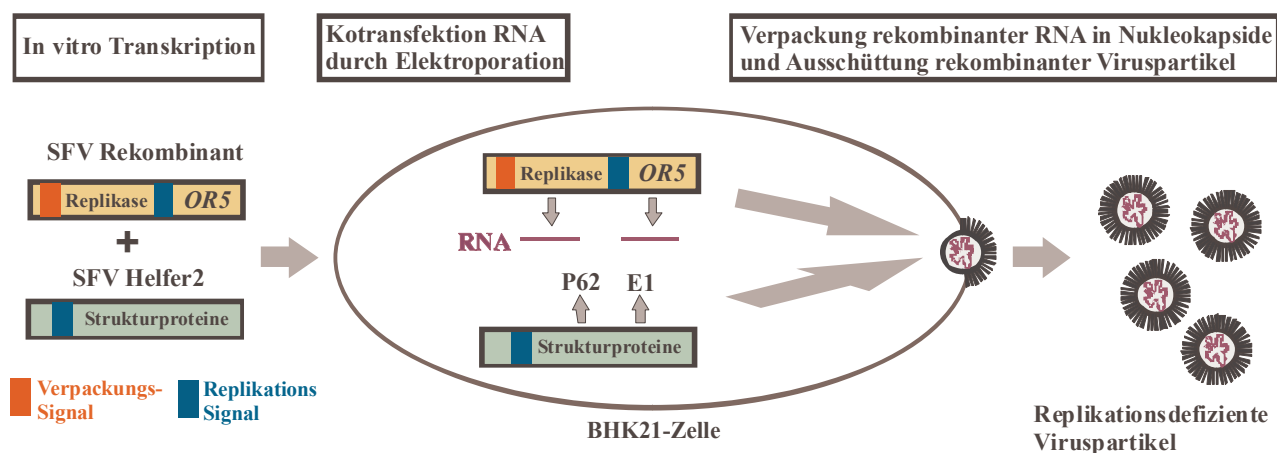


Abb. 9: Schematische Übersicht über das SFV-Expressionssystem von der *in vitro* Transkription bis zur Virusentstehung. Die Virusproduktion findet in BHK-21-Zellen statt.

Diese Viruspartikel wurden zur Infektion von P19-Zellen eingesetzt und anschließend die Infektionseffizienz und der Expressionsgrad von OR5 in diesem Zellsystem untersucht. Der Virustiter wurde in einem Parallelansatz mit *LacZ-pSFV2*-infizierten Zellen und einem anschließenden Enzymassay (basierend auf einer Spaltung von X-Gal) abgeschätzt (Daten nicht gezeigt).

Immunmarkierungsexperimente zeigten sehr deutlich, dass durch die Anpassung des Virustiters an die vorhandene Zellzahl mit beiden *OR5*-Konstrukten Infektionsraten von >80% erreicht werden (Abb. 10, Beispiel Infektion mit *OR5-pSFV1Cap # 6*).

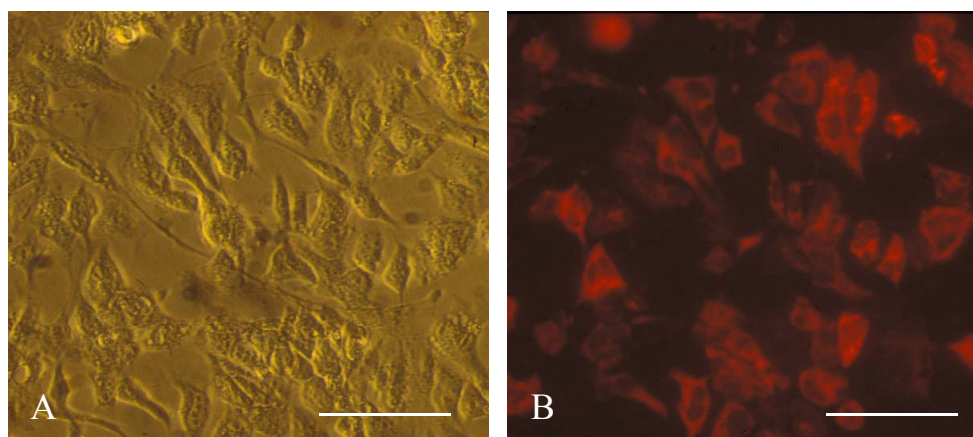


Abb. 10: Fluoreszenzmarkierung *OR5*-produzierender P19-Zellen mit monoklonalem *OR5*-Antikörper. A: Durchlichtaufnahme der P19-Zellen. B: *OR5-SFV1Cap # 6*-infizierte P19-Zellen wurden 8 h *post infectionem* mit Methanol fixiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung mit 22-145-3 und einem entsprechenden Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper durchgeführt. Skalierungsbalken 50 μm .

3.1.1.2.a. Nachweis von *OR5* auf Transkriptionsebene

Nach Infektion der Zellen mit den beiden Konstrukten sollte mit Hilfe von Northern-Hybridisierung (s. 2.4.8.) und Immunmarkierung (s. 2.5.5.2.) eine Quantifizierung des transkribierten *OR5*-Gens bzw. des *OR5*-Proteins durchgeführt und der Zeitpunkt höchster Transkriptionsrate ermittelt werden.

Aus Abbildung 11 geht deutlich hervor, dass durch Markierung mit einer radioaktiven *OR5*-Sonde spezifische Transkripte in der RNA von *OR5-pSFV2* # 8- und *OR5-pSFV1Cap* # 6-infizierten Zellen nachgewiesen werden konnten. Die Größe der markierten Transkripte lag jeweils über 10 kbp, da es sich um ungespleisste RNA handelte, die sich vom *OR5*-Gen und den viralen Genen der *pSFV*-Vektoren ableitet. Ein spezifisch markiertes Fragment der Größe 3 kbp in der RNA *OR5-pSFV1Cap* # 6-infizierter Zellen sowie ein 2 kbp großes RNA-Fragment aus *OR5-pSFV2* # 8-infizierten Zellen deutet auf ein schrittweises Splicen der Hauptfragmente hin. Die Transkriptionsrate war in *OR5-SFV1-Cap*-infizierten Zellen nicht erhöht, demnach erfolgt keine Regulation auf Transkriptionsebene. Die zeitabhängige Transkription verläuft unter Verwendung beider Konstrukte vergleichbar mit einem Transkriptionsmaximum im Bereich von 8 - 12 h. In Spur 1 und 6 ist jeweils RNA uninfizierter P19-Zellen aufgetragen, um die Spezifität der Markierung zu belegen.

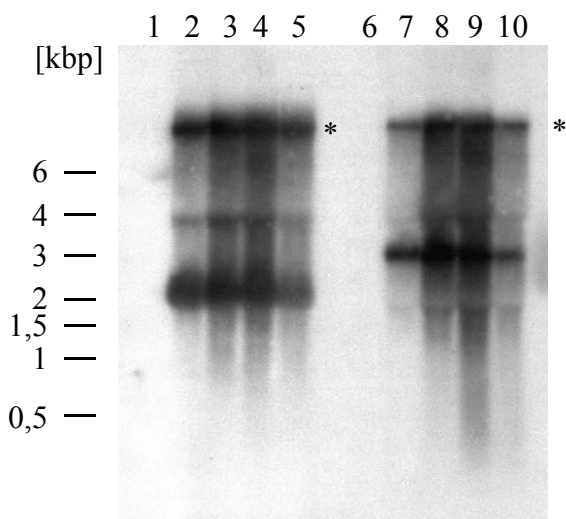


Abb. 11: Northern-Blot-Analyse infizierter P19-Zellen zum Nachweis von *OR5*-Transkripten. Jeweils 5 µg RNA *OR5-SFV2*- und *OR5-SFV1-Cap*-infizierter P19-Zellen verschiedener Infektionszeiten wurden im Northern-Blot nach Northern-Hybridisierung mit einer *OR5*-spezifischen Sonde auf das Vorkommen von *OR5*-haltigen RNA-Fragmenten untersucht. Spur 1 und 6: P19 RNA; Spuren 2-5: *OR5-SFV*-infizierte P19-Zellen (4, 8, 12, 24 und 48h); Spuren 7-10: *OR5-SFV-Cap*-infizierte P19-Zellen (4, 8, 12, 24 und 48h); *: Vollständige Transkripte der *OR5-pSFV2* # 8 und *OR5pSFV1Cap* # 6-Konstrukte.

Im Anschluß sollte die Produktion des rekombinanten Geruchsrezeptors auf Proteinebene sowohl durch Western-Blot-Analyse als auch durch Immunmarkierung erfolgen.

3.1.1.2.b. Nachweis von OR5 auf Translationsebene: Western-Blot und Immunfluoreszenz-Markierung

Verglichen mit der konstitutiven Expression steigerten die hohe Infektionsrate und die stärkere Expression des viralen Systems die OR5-Biosynthese, so dass das Rezeptorprotein im Western-Blot nachgewiesen werden konnte: in den nachfolgenden Western-Blot-Analysen reagierte der verwendete monoklonale OR5-Antikörper jeweils mit Proteinen, die auf einer Höhe von ca. 31 und 62 kDa im SDS-Gel aufgetrennt wurden, was der kalkulierten Größe des OR5-Monomers (37 kDa) und -Dimers (74 kDa) in etwa entspricht. Der Unterschied zwischen berechneter und im Gel detektierter Größe beruht auf dem Laufverhalten von Membranproteinen in Polyacrylamidgelen. Es ist bekannt, dass stark hydrophobe Proteine in der Gelelektrophorese ein geringeres apparentes Molekulargewicht aufweisen (verglichen mit dem realen Molekulargewicht) da sie proportional mehr SDS-Moleküle binden, wodurch eine höhere elektrophoretische Mobilität entsteht (Creighton, T. E., 1989).

Der Nachweis des Zielproteins durch Western-Blot wurde unter Verwendung von Gesamtmembranen (s. 2.6.4.) aus OR5-produzierenden P19-Zellen 12 h *post infectionem* mit *OR5-pSFV2 # 8* bzw. *OR5-pSFV1Cap # 6* geführt. Die Spezifität des OR5-Antikörpers wurde durch OR5-freie Kontrollen bestätigt. Ein Vergleich der OR5-Proteinsynthese der beiden Ansätze zeigte, dass unter Verwendung des *pSFV1Cap*-Vektors in den P19-Zellen deutlich mehr OR5 produziert wird als in Anwesenheit des *Capsid*-losen Konstruktes (Abb.12).

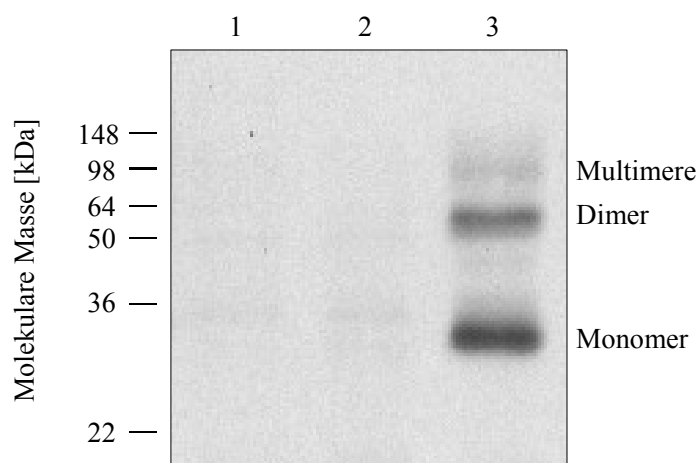


Abb. 12: Western-Blot-Analyse der OR5-Proteinbiosynthese in viral infizierten P19-Zellen. Je 5 µg Gesamtmembranen aus P19-Zellen (1) sowie *OR5-SFV2*- (2) und *OR5-SFV2Cap*-infizierten P19-Zellen (3) wurde im Western-Blot bezüglich der produzierten OR5-Proteinmenge untersucht. Zur Detektion wurde der OR5-Antikörper 22-145-3 und ein entsprechender HRP-konjugierter Sekundärantikörper verwendet.

So war das Rezeptor-Monomer und -Dimer in Membranen *OR5-pSFV1Cap # 6*-infizierter Zellen unter den gewählten Bedingungen im Western-Blot spezifisch nachweisbar (Spur 3), während

OR5 in Membranen *OR5-pSFV2 # 8*-infizierter Zellen im Rahmen der verwendeten Proteinmenge unterhalb der Detektionsgrenze lag (Spur 2). Die verschiedenen hohen Proteinsynthesegrade wurden durch OR5-Immunfluoreszenz-Markierungen von *OR5-pSFV2 # 8*- und *OR5-pSFV1Cap # 6*-infizierten Zellen bestätigt (Abb. 13).

Zu diesem Zweck wurden infizierte P19-Zellen nach verschiedenen Zeitabschnitten mit Methanol fixiert und Immunfluoreszenz-Detektionen des OR5-Proteins durchgeführt. Zwei Stunden *post infectionem* konnte in *OR5-pSFV2 # 8*-infizierten Zellen kein OR5-Protein durch Markierung mit OR5-spezifischen Antikörpern und Cy3 nachgewiesen werden, während *OR5-pSFV1Cap # 6*-infizierte Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits eine deutliche Fluoreszenz zeigten, die ihren Höhepunkt nach 8 h aufwies. Zellen, welche mit dem Capsidgen-losen *OR5*-Konstrukt infiziert wurden, zeigten im Vergleich mit *OR5-pSFV1Cap # 6*-infizierten Zellen zwar einen vergleichbaren Expressionsverlauf, jedoch waren die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten insgesamt geringer.

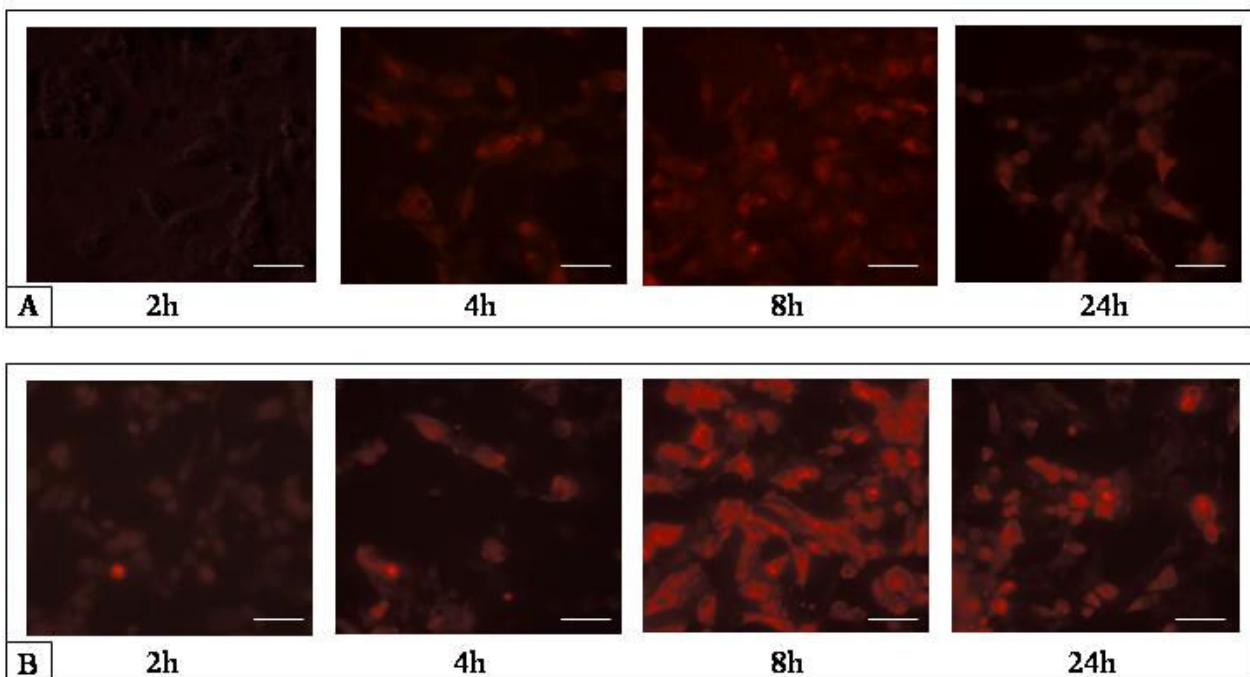


Abb. 13: Immunfluoreszenz-Markierung von OR5-produzierenden P19-Zellen. (A) *OR5-pSFV2 # 8*- und (B) *OR5-pSFV1Cap # 6*-infizierte P19-Zellen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten mit Methanol fixiert. Die Immunmarkierung wurde mit dem OR5-Antikörper 22-145-3 und einem entsprechenden Cy3-konjugierten Sekundäntikörper durchgeführt. Skalierungsbalken 20 μm .

Diese Ergebnisse zeigten im Vergleich zur Northern-Blot-Analyse deutlich, dass die Capsidsequenz offensichtlich keinen Einfluss auf die Transkription der Gene hat, die 5'-Sequenz

der Capsid-mRNA jedoch eine Translationsverstärkung zur Folge hat. Dieser Effekt wurde bereits von Sjöberg und Mitarbeitern beschrieben (Sjöberg, E. M. *et al.*, 1994).

Für alle weiteren Untersuchungen wurden P19-Zellen mit *OR5-pSFV1Cap # 6* infiziert und für 8-12 h kultiviert, um eine optimale *OR5*-Expression zu gewährleisten.

3.1.2. Expression von OR5 in *Saccharomyces cerevisiae*

Die adhärent wachsenden P19-Zellen waren aufgrund ihrer vergleichbar geringen Zellzahl/Volumen nicht für eine Produktion des Geruchsrezeptors in größerem Maßstab geeignet. Deshalb wurde für diesen Zweck ein weiteres Expressionssystem etabliert. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde bereits erfolgreich für die funktionelle Biosynthese von Säugetier-Membranproteinen eingesetzt und sollte demzufolge für die Geruchsrezeptor-Produktion verwendet werden.

Zur Erstellung von Expressionsvektoren für das *S. cerevisiae*-Zellsystem wurde die Rezeptor-cDNA über PCR mit 5 N-terminalen Adeninen versehen, in einen modifizierten pYES260-Vektor (Griffith, D. A. *et al.*, 2003) kloniert, und eine vollständige Expressionskassette aus diesem Vektor durch Restriktion isoliert (Abb. 14). Die Expressionskassette, welche nun zusätzlich einen His₆- und Flag-Tag sowie einen *pGall*-Promotor und *tCYC1*-Terminator enthielt, wurde anschließend über die verwendeten Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pITy3 kloniert (s. 2.1.).

Dieser Vektor enthält als Selektionsmarker das *NEO*-Gen, welches für das Antibiotikum G418-Resistenzgen kodiert. Die C-terminal des *OR5*-Gens gelegenen FLAG- und His₆-Sequenzen sollten nach der Biosynthese des Proteins dessen Reinigung über Affinitätschromatographie ermöglichen.

Der Expressionsstamm *S. cerevisiae* BJ5646 ist ein Protease-defizienter Stamm, welcher zusätzlich die Plasmide pMEGA2ΔURA3 und pJS-U(URA3) enthält (siehe Abb. 15). Durch das Plasmid pMEGA2ΔURA3 (s. 2.1.) wird eine Überexpression der Transkriptionsfaktoren *gal4p*, *gal80p* und *gal3p* ausgelöst, wodurch eine Limitation der Expression auf Ebene der *Gal*-Gen-Promotoren verhindert wird (Sil, A. K. *et al.*, 2000). Das Reporter-Plasmid pJS-U(URA3) (s. 2.1.) beruht auf pJS-401 mit einem „unfolded protein response“ (UPR)-Element im *ICL1*-Promotor mit fusionierter *lacZ*-Sequenz. Die durch *LacZ*-kodierte β-Galaktosidase wird demnach durch UPR-

spezifische Transkriptionsfaktoren aktiviert, wodurch diese als Marker für den UPR-Status einer Zelle dienen kann.

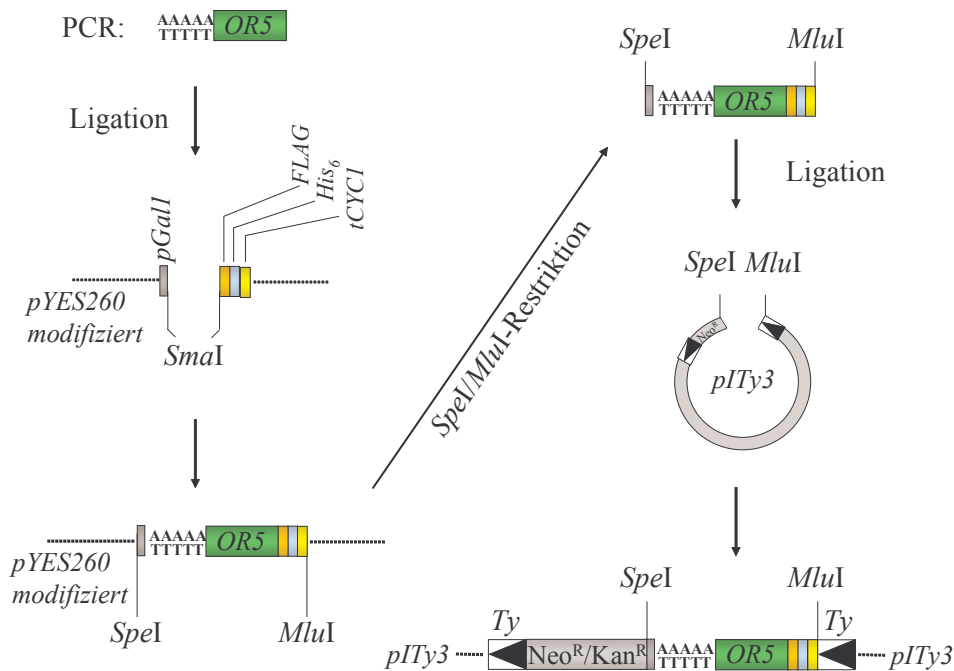


Abb. 14: Klonierung des rekombinanten *pITy3* Plasmides für die *OR5*-Expression in *S. cerevisiae* BJ5464. Zur Formation einer Expressionskassette wurde das Rezeptorgen in einen modifizierten *pYES260*-Vektor (Griffith, D. A. *et al.*, 2003) eingeführt und mit zusätzlichen Promotor-, Terminator und Tag-Sequenzen reisoliert. Die Expressionskassette wurde anschließend in den Zielvektor *pITy3* ligiert.

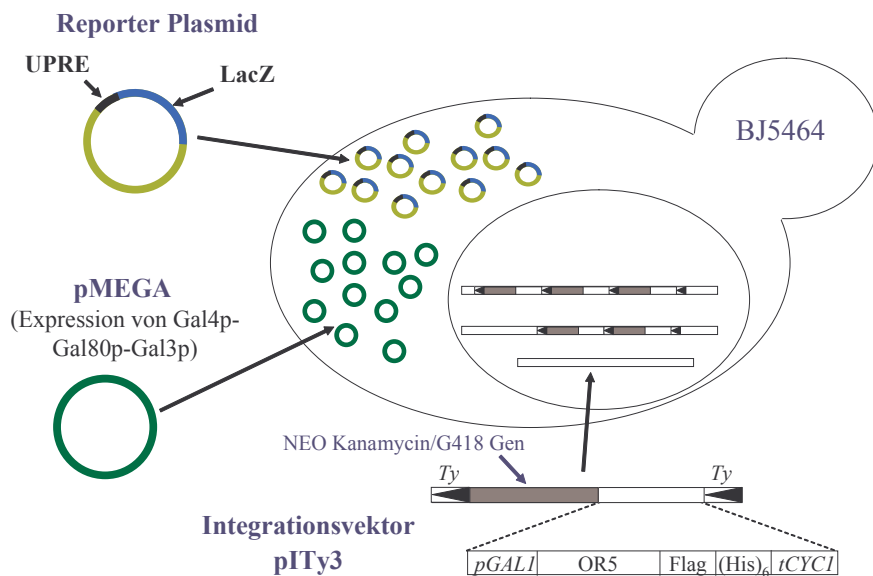


Abb. 15: Schematische Darstellung einer transformierten *S. cerevisiae*-Zelle für die Selektion von *OR5*-Expressionsstämmen (Modifiziert (Griffith, D. A. *et al.*, 2003)).

Die UPR beschreibt ein Signalsystem, welches bei Stressbedingungen im ER die Biosynthese verschiedener Proteine, wie z. B. ER-Degradierungsproteine und -Chaperone, induziert (Abb. 16). Ein Hauptbestandteil dieses Mechanismus ist die ER-membranständige Kinase Ire1p, die durch Bindung von Kar2p monomerisiert und dadurch inaktiv ist. Steigt die Menge ungefalteter Proteine im ER an, löst sich Kar2p und bindet an die denaturierten Proteine. Infolgedessen kommt es zu einer Dimerisierung und damit verbundenen Autoaktivierung von Ire1p. Die dadurch ausgelöste Signalkaskade führt letztendlich zu einer Verkürzung des Transkriptionsfaktors Hac1p, welcher in dieser Variante durch Bindung an eine spezielle DNA-Sequenz, dem UPR-Element (UPRE), die Expression seiner Zielgene steuert (Shamu, C. E. *et al.*, 1994).

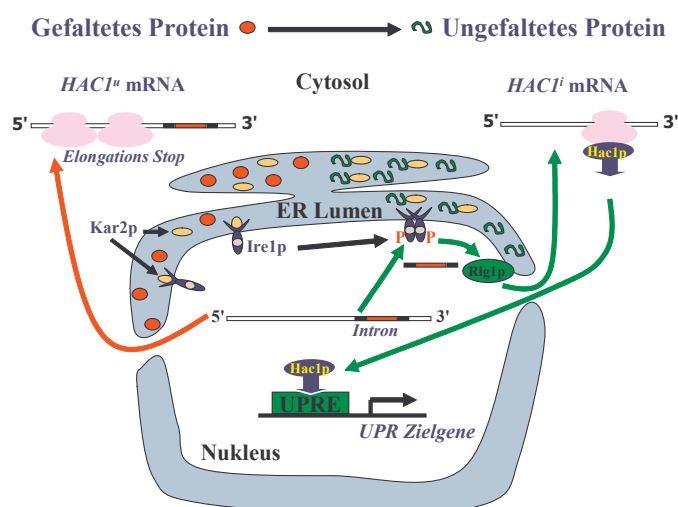


Abb. 16: Schematische Übersicht über das UPR (*unfolded protein response*)-System in eukaryotischen Zellen (Modifiziert (Griffith, D. A. *et al.*, 2003)).

Die Verwendung des UPRE/*LacZ*-Konstruktes ermöglicht somit eine Observierung der durch die Biosynthese des rekombinanten Proteins ausgelösten UPR durch eine Analyse der β -Galaktosidase-Aktivität. Mit dieser Proteinqualitätskontrolle ist die Selektion von geeigneten Expressionsstämmen mit geringen Mengen fehlgefaltetem Zielprotein möglich.

3.1.2.1. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität in *OR5*-Expressionsstämmen

3.1.2.1.a. Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Für die nachfolgenden Experimente wurden die Stämme BJ5464/pMEGA2 Δ URA3/pJS-U(URA3)/pITy und BJ5464/pMEGA2 Δ URA3/pJS-U(URA3)/pITy-OR5 konstruiert. Die Selektion der optimierten Expressionsstämmen wurde mit Hilfe eines gängigen β -Galaktosidase-Tests (s. 2.6.13.) durchgeführt.

Die Expressionskassette im pITy3-Vektor ist von *Ty* („transposon yeast“-)Sequenzen mit terminalen, „direkten Wiederholungen“ flankiert. *Ty*-Sequenzen sind hefespezifische, rund 6 kb große Retrotransposons, welche über ein RNA-Zwischenprodukt transponiert werden. Die *Ty*-Elemente *per se* kodieren für ein DNA-bindendes Protein sowie einen Komplex mit Integrase- und Reverse-Transkriptase-Aktivität, ähnlich den viralen *Gag*- und *Pol*-Sequenzen. Über die terminalen, direkten Sequenzwiederholungen erfolgt durch Transposition eine Insertion der Expressionskassette in das Hefegenom, welches meist über 30 solcher homologen Sequenzen aufweist (Roeder, G. S. und Fink, G. R., 1982). Bei der Insertion der *OR5*-enthaltenden Expressionskassetten kommt es gleichzeitig zur Aufnahme der bakteriellen TN903-Resistenz gegen Neomycin (G418). Eine Selektion der transformierten Zellen war so durch Zugabe von G418 möglich. Da stärkere Konzentrationen des Antibiotikums durch eine höhere Anzahl inserierter Resistenzkassetten komplementiert werden können, wurden über ansteigende G418-Konzentrationen verschiedene, unterschiedliche Mengen des Rezeptors exprimierende, Stämme ausgewählt. Diese Stämme wurden durch Überschichtung mit einem 5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Galaktosid (X-Gal)-haltigen Agar auf ihre β -Galaktosidase-Aktivität überprüft (Abb. 17). Durch enzymatische Spaltung des X-Gals entsteht die Substanz 5-Brom-4-Chlor-3-hydroxy-Indol, welche durch Oxidation in einen unlöslichen, blauen Indigofarbstoff umgewandelt wird. Dadurch wird die Höhe der β -Galaktosidase-Aktivität über die Intensität der Blaufärbung qualitativ sichtbar gemacht werden.

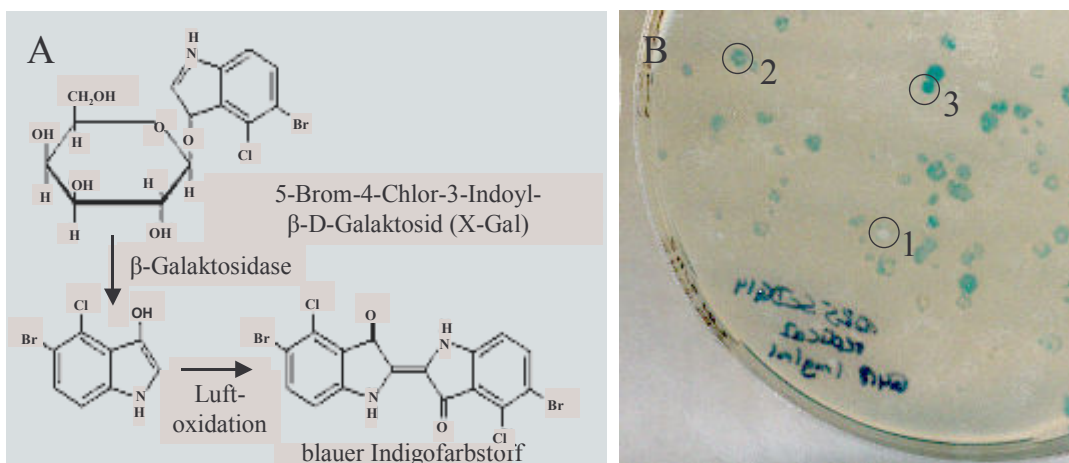


Abb. 17: A, Enzymatische Umsetzung des Substrates X-Gal und Oxidation des Indolderivates zum Indigofarbstoff. B, Beispiel für die qualitative Analyse der β -Galaktosidase-Aktivität rekombinanter *S. cerevisiae* Stämme im X-Gal-Überschichtungstest. Rekombinante *S. cerevisiae* Stämme wurden auf 1 mg/ml G418 angezogen. Die gewachsenen Kolonien wurden anschließend mit X-Gal-haltigem Agar überschichtet, eine Spaltung des Farbstoffes durch exprimierte β -Galaktosidase wurde durch Blaufärbung angezeigt. 1: Beispiel weiße Kolonie, 2: Beispiel hellblaue Kolonie, 3: Beispiel dunkelblaue Kolonie.

Jeweils drei der auf 1 mg/ml und 5 mg/ml G418 gewachsenen Stämme mit geringer (Kolonie weiß), mittelstarker (Kolonie hellblau) und starker (Kolonie dunkelblau) β -Galaktosidase-Aktivität wurden einer genaueren Untersuchung unterzogen. Besonderes Augenmerk wurde auf die OR5-Expressionsstärke in Kombination mit der durch die Expression ausgelösten UPR gelegt.

3.1.2.1.b. Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Zur Quantifizierung der induzierten β -Galaktosidase-Aktivität wurde ein Test in Lösung durchgeführt. In diesem Versuch wurde die β -Galaktosidase-Aktivität von Zellextrakten mit der zeitabhängigen Spaltung von *o*-Nitrophenol- β -Galaktosid (ONPG) bestimmt. Die Verwendung dieses Substrates anstelle von X-Gal war notwendig, da es sich bei dem Spaltungsprodukt von X-Gal um einen wasserunlöslichen Farbstoff handelt. Bei der Umsetzung des farblosen ONPG durch die β -Galaktosidase entsteht das gelbe Nitrophenol, sodass die enzymatische Reaktion anhand des Emissionsanstieges bei 420 nm verfolgt werden kann (s. Abb. 18).

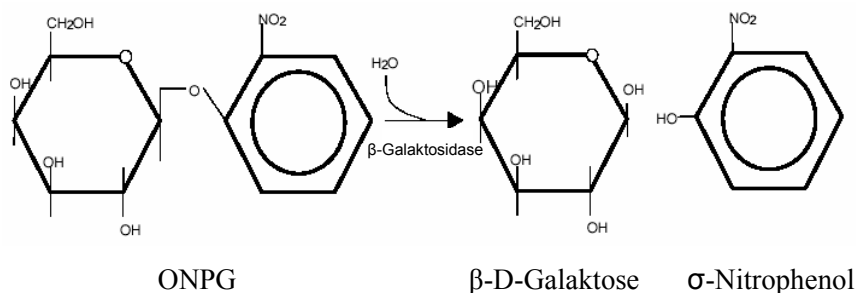


Abb. 18: Umsetzung von ONPG durch β -Galaktosidase.

Als Kontrolle für die UPR-induzierte β -Galaktosidase wurde ein Aliquot jeder Kultur mit DTT versetzt. DTT bewirkt eine Störung der Redox-Bedingungen im ER, wodurch eine Akkumulation falsch gefalteter Proteine im Lumen dieser Organelle auftritt, und damit die UPR ausgelöst wird. Als Negativkontrolle wurde BJ5464/pMEGA2 Δ URA3/pJS-U(URA3)/pITy eingesetzt. Für die Auswertung wurden drei voneinander unabhängig durchgeführte Messreihen herangezogen.

Die spezifischen β -Galaktosidase-Aktivitäten sind jeweils als das Vielfache der Enzymaktivitäten zum Zeitpunkt der Basalaktivität $t=0$ in Abbildung 19 dargestellt. Durch Zugabe von DTT wurde in allen Stämmen eine UPR ausgelöst, die im Schnitt ca. das sechsfache der β -Galaktosidase-Aktivität zum Zeitpunkt $t=0$ der Induktion betrug. Die UPR-Induktion nach 48 h Induktion mit Galaktose in YP-Medium fällt zwischen den rekombinanten Stämmen unterschiedlich aus.

Obwohl die β -Galaktosidase-Aktivitäten der „hellblauen“ und „dunkelblauen“ Kolonien (*hb1*, *hb2*, *hb3*, *db1*, *db2*, *db3*) vergleichbare Werte aufwiesen, zeigten die Stämme, welche zuvor durch geringe Enzymaktivitäten im Überschichtungstest auffielen, auch quantitativ deutlich geringere β -Galaktosidase-Aktivitäten (*w1*, *w2*, *w3*).

Besonders geringe UPR-Induktion zeigten die Expressionsstämme *w1* und *w3* mit $3,3 \pm 0,6$ und $1,6 \pm 0,5$ -facher β -Galaktosidase-Aktivität, bezogen auf den Zeitpunkt $t=0$ der Induktion.

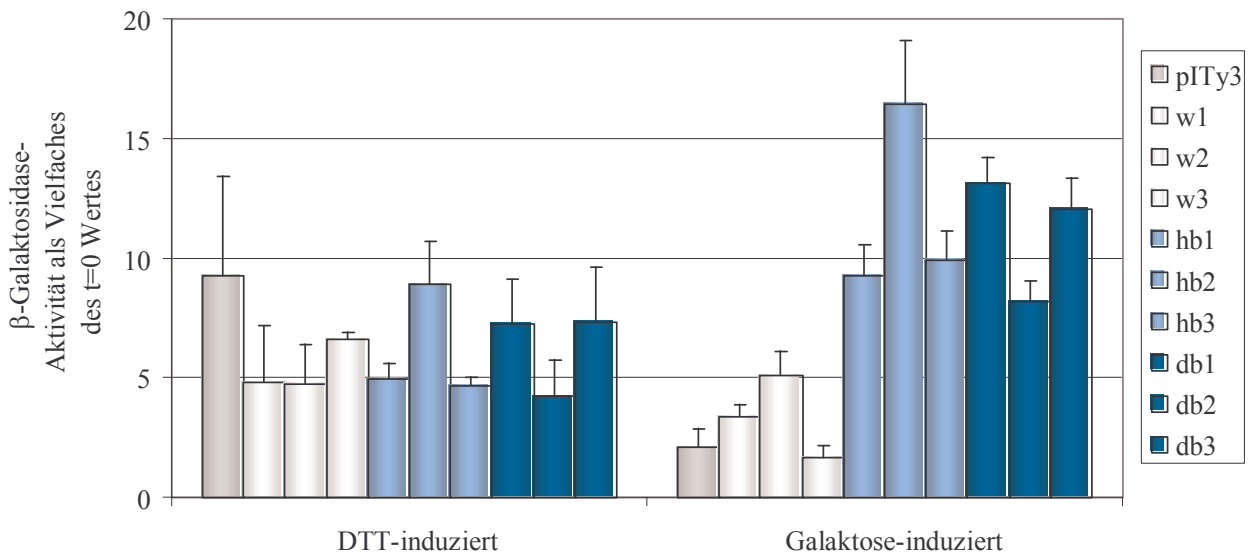


Abb. 19: β -Galaktosidase-Aktivität selektierter *S. cerevisiae*-Stämme. Gezeigt ist die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität von OR5-Produktionsstämmen und einer Negativkontrolle (pITy3) als Vielfaches ihrer Basalaktivität zum Zeitpunkt $t=0$ der Induktion. DTT-induziert: UPR-induzierte Stämme durch Zugabe von 3 mM DTT für 4 h. Galaktose-induziert: für 48 h mit 2% [w/v] Galaktose induzierte Stämme. Die Standardabweichungen wurden als SEM-Werte (STABW: \sqrt{n}) dargestellt, wobei $n=3$.

So wurde gezeigt, dass die Integration des *OR5*-Gens zu einer Expressions-gekoppelten UPR-Aktivierung führte. Diese Ergebnisse mussten nun im Kontext der *OR5*-Proteinsynthese beurteilt werden, um geeignete Selektionsstämme auszuwählen.

3.1.2.2. Quantitativer Vergleich der *OR5*-Proteinsynthesestärken im Western-Blot

Für den quantitativen Vergleich der Expressionen der verschiedenen Stämme wurden Zellanzuchten gleicher OD-Einheiten 4h nach Induktion geerntet, ein Gesamtzellextrakt präpariert (s. 2.6.2.) und Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass Stämme, in welchen während der Rezeptorproduktion eine stark erhöhte UPR auftrat, auch einen

entsprechend hohen OR5-Proteinsynthesegrad zeigten. Es sollte speziell untersucht werden, ob die Stämme *w1* und *w3* trotz geringer UPR-Induktion eine nachweisbare OR5-Produktion aufwiesen. Wie in Abb. 20 zu erkennen ist, konnte ein Stamm identifiziert werden, welcher eine geringe β -Galaktosidase-Aktivität, aber eine hohe Produktion des Zielproteins aufwies: der Stamm *w1* zeigte starke OR5-Proteinsynthese, während jene in den Stämmen *w2* und *w3* deutlich geringer ausfielen. Der OR5-Gehalt des Stammes *w1* war sogar vergleichbar hoch mit denen diverser „blauer“ Klone, also Stämmen, die eine starke UPR-Aktivierung durch die Geruchsrezeptor-Expression aufwiesen. Die Existenz von *S. cerevisiae*-Stämmen, welche trotz hoher Proteinsynthese von OR5 einen relativ niedrigen UPR-Grad aufweisen, läßt sich eventuell auf die Flexibilität des Proteinsynthese-Apparates zurückführen. Möglicherweise war in diesen Zellen aufgrund physiologischer Besonderheiten die Toxizität des Zielproteins kompensiert oder die Proteintranslokation erleichtert. Durch die Generierung solcher „angepasster“ Zellen bzw. die Wahl von Stämmen mit mittlerem Expressionsniveau bei einer nicht zu hohen zellulären Proteinfehlfaltung konnte aus 9 im Detail untersuchten Stämmen ein optimaler Produktionsstamm für die Aufreinigung von OR5 selektiert werden. Aufgrund seiner hohen OR5-Synthesekapazität kombiniert mit geringen UPR-Werten wurde der Expressionsstamm *w1* für alle anschließenden Untersuchungen ausgewählt.

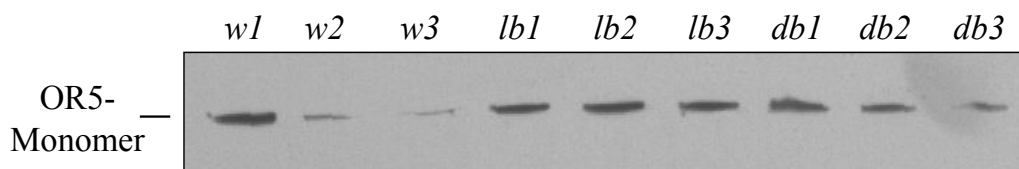


Abb. 20: Quantifizierung der OR5-Proteinsynthese verschiedener *S. cerevisiae*-Produktionsstämme im Western-Blot. Jeweils 5 μ g Gesamtzellextrakt verschiedener Produktionsstämme wurden im Western-Blot mit einem His₃-Antikörper zur Bestimmung der relativen OR5-Proteinsynthese analysiert.

3.1.2.3. Nachweis von OR5 in der Immunfluoreszenz-Markierung

Ein Nachweis des Zielproteins im Expressionsstamm *w1* auf Proteinebene erfolgte zusätzlich durch Immunfluoreszenz-Markierungen mit dem monoklonalen OR5-Antikörper 22-145-3 sowie einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Hefekolonien dieses Stammes eine OR5-Produktion aufwiesen (Abb. 21).

Bei dem verwendeten Expressionsvektor handelt es sich um einen integrativen Vektor, mit dessen Hilfe das Zielgen über *Ty*-Sequenzen und homologer Rekombination direkt ins Genom der Zelle integriert worden ist. Aus diesem Grund war zu erwarten, dass die entstandenen

Expressionsstämme genetisch stabil sind. Im Laufe der Arbeit mit dem ausgewählten Stamm wurde jedoch eine Veränderung des Expressionsmusters beobachtet. Eingehende Kontrollen und Vergleiche mit Hilfe von Western-Blot- sowie Immunmarkierungs-Analysen bestätigten eine deutliche Abnahme der Expressionsstärke im Laufe der Kultivierungen. Die genetische Flexibilität der Hefe erwies sich in diesem Fall als Nachteil, da offenbar genetische Modifikationen dazu geführt hatten, dass die Expression des Geruchsrezeptorproteins trotz der möglicherweise geringeren Sensitivität des Stammes *w1* verringert wurde. Beispielsweise zeigten nur noch ca. 10 % der Zellen des Produktionsstammes *w1* nach sechsmaliger Neuanzucht eine sichtbare OR5-Markierung in der Immunfluoreszenzuntersuchung (Daten nicht gezeigt), obwohl alle Zellen dieses Stammes direkt nach der Selektion mit G418 eine deutliche OR5-Proteinsynthese aufwiesen (Abb. 21). Die Reduktion konnte jedoch durch wiederholte Anzucht auf G418-haltigen YPD-Platten ausgeglichen werden, um somit eine hohe OR5-Proteinsyntheserate zu gewährleisten.

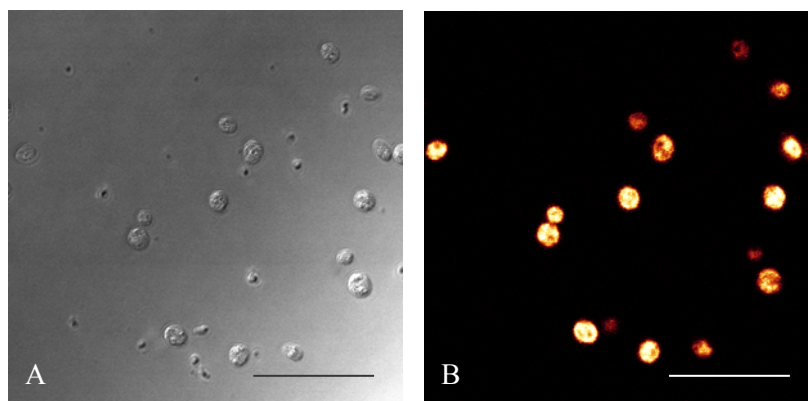


Abb. 21: Immunfluoreszenzmarkierung von OR5 in *S. cerevisiae*. A: Durchlichtbild des *S. cerevisiae*-Stammes *w1*; B: Immunfluoreszenz-Markierung mit OR5- und entsprechendem Cy3-konjugierten Antikörpern. Skalierungsbalken 50 μm .

3.1.2.4. Quantifizierung des OR5-Proteins aus *S. cerevisiae w1*

Anhand einer Konzentrationsreihe eines His₅-markierten Standardproteins kann die Menge eines produzierten, His_x-markierten Zielproteins im Western-Blot abgeschätzt werden. Für die Standardkonzentrationsreihe wurde das *Positope*TM-Protein von Invitrogen verwendet. Da es sich um ein lösliches Protein handelt, gibt der Vergleich mit einem Membranprotein wohl nur den Mengenbereich des Zielproteins OR5 in der verwendeten Probe an.

Zur Durchführung der OR5-Proteinquantifizierung in Membranen des Produktionsstammes *w1* wurden verschiedene Mengen Gesamtmembran und Plasmamembran verwendet. Diese wurden

zusammen mit aufsteigenden Mengen des *Positope*TM-Proteins einer PAGE unterzogen und anschließend im Western-Blot mit einem His₅-Antikörper analysiert. Für die densitometrische Auswertung der Western-Blot-Signale mit dem Programm *Scion Image* (Scion Corporation, Release Beta 4.0.2) wurden Blots verwendet, deren OR5-Signalintensitäten innerhalb der Signalintensitäten der Konzentrationsreihe des Standards lagen. Die Auswertung dieser Untersuchung ergab einen OR5-Anteil von ~0,9% (9 ng/μg) in Gesamtmembranen bzw. ~2,4% (24 ng/μg) in den Plasmamembranen des Produktionsstammes *w1* bei einer Ausbeute von ~250 mg Gesamtmembranen/Liter Kultur. Daraus ergibt sich eine 2,7-fache Anreicherung des OR5-Proteins in den Plasmamembranen verglichen mit Gesamtmembranen.

3.1.2.5. Vergleich der OR5-Proteinsynthesestärken unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Durch die Verwendung des *GALI*-Promotors war es zwingend notwendig, auf Glukose im Medium zu verzichten, da diese durch kompetitive Anlagerung inhibierend auf den Promotor wirkt. Dementsprechend wurde anfangs Raffinose als C-Quelle verwendet, und eine Induktion der OR5-Proteinsynthese direkt durch Zugabe von Galaktose in die Kultur durchgeführt. Im Laufe der Arbeit erwies sich die Raffinose jedoch als zu kostenintensiv für Anzuchten im großen Maßstab, zusätzlich kam es zu Lieferschwierigkeiten. Deshalb wurde untersucht, ob der selektierte Stamm *w1* auch unter Anzuchtbedingungen ohne Raffinose/mit einem alternativen Zucker eine vergleichbare Expressionsstärke aufweist. Zusätzlich musste in dem alternativen Medium die UPR-Induktion überprüft werden.

Verwendet wurde YP-2% Dextrose-Medium, in dem der Stamm bis zur stationären Phase angezogen wurde, die Induktion erfolgte dann nach Waschen der Zellen mit kaltem H₂O_{bidest} in YP-2% [w/v] Galaktose-Medium. Zum Vergleich der Proteinsyntheserate von OR5 unter beiden Anzuchtbedingungen wurden Proben zu verschiedenen Zeiten nach der Induktion entnommen. Die Analyse des Gesamtzellextraktes erfolgte anschließend im Western-Blot mit OR5-Primärantikörper (Abb. 22). In allen Proben konnte OR5-Protein nachgewiesen werden. Das Proteinsynthesemaximum wurde jedoch abhängig vom Medium zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht: bei Anzucht in YP-4% [w/v] Raffinose-Medium und Induktion mit Galaktose (Spur 1-5) lag die höchste Expression bei etwa 4h, während die Anzucht in YP-2% [w/v] Dextrose/YP-2% [w/v] Galaktose (Spur 6-10) zu einem Proteinsynthesemaximum im Bereich von 8 und 12 h führte. Zusätzlich war auch zu späteren Zeitpunkten nach Induktion eine deutlich höhere OR5-

Syntheserate zu beobachten. Generell wird deutlich, dass bei einer Kultivierung mit dem alternativen Medium vergleichbare maximale Proteinsyntheseraten erzielt wurden. Bevor alle Anzuchten auf das „neue“ Medium umgestellt werden konnten, musste nun noch belegt werden, dass der Gebrauch der veränderten Wachstumsbedingungen nicht zu einer stark erhöhten UPR führte.

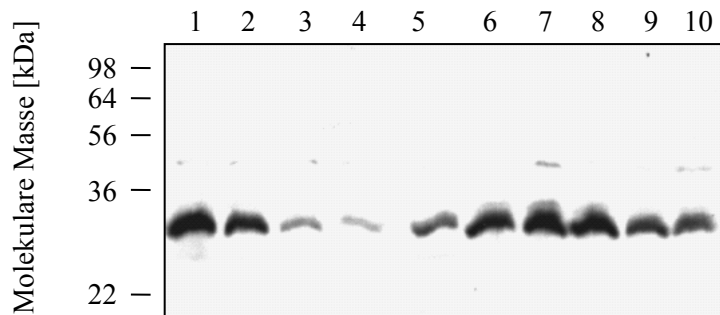


Abb. 22: Vergleich der OR5-Proteinsynthese bei Anzucht in YP-4% [w/v] Raffinose-Medium + 2% [w/v] Galaktose (1-5) und Anzucht in YP-2% [w/v] Dextrose mit Überführen in YP-2% [w/v] Galaktose-Medium (6-10). Aliquote der *wI* Kulturen beider Wachstumsbedingungen wurden jeweils 4, 8, 12, 24 und 48 h nach Induktion mit 2% [w/v] Galaktose entnommen, Gesamtzellextrakte hergestellt, diese einer PAGE unterzogen und im Western-Blot mit OR5-Antikörper analysiert. Spuren 1-5: 4, 8, 12, 24 und 48 h der in YP-4% [w/v] Raffinose + 2% [w/v] Galaktose angezogenen Kultur; Spuren 6-10: 4, 8, 12, 24 und 48 h der in YP-2% [w/v] Dextrose und YP-2% [w/v] Galaktose angezogenen Kultur.

Unter diesen Bedingungen ist eine Bestimmung der UPR-Stärke über das *LacZ*-Reporterplasmid nicht möglich, da der Selektionsdruck auf das Plasmid bei Anzucht in Vollmedium nicht aufrechterhalten wird. Dieser ist nur bei Anzucht in Uracil-freiem Medium gewährleistet: der verwendete Hefestamm ist nicht zur *de novo* Biosynthese von Uracil befähigt, da er kein Gen für die Orotidine-5'-Phosphat Decarboxylase trägt. Das Reporter-Plasmid jedoch enthält das *Ura3*-Gen, welches für dieses Enzym kodiert und so als Selektionsmarker verwendet werden kann.

Deshalb wurde die UPR über die Komponente Kar2p der UPR-Kaskade analysiert. Die Expressionsstärke von Kar2p in dem Produktionsstamm *wI* wurde unter beiden Wachstumsbedingungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Galaktose-Induktion im Western-Blot analysiert (Abb. 23). Die Quantifizierung durch eine densitometrische Auswertung lieferte vergleichbare Kar2p-Expression unter beiden Wachstumsbedingungen. Eine 4-stündige Induktion im YP-2% Galaktose-Medium führte sogar zu einer um 38% verringerten Kar2p-Biosynthese verglichen mit dem Raffinose-Medium. Nach 8 h Induktion waren unter beiden Wachstumsbedingungen gleiche Kar2p-Level erreicht, und nur die Probe des 24 h Wertes zeigte eine 2,2-fach erhöhte Kar2p-Biosynthese in YP-2% Dextrose/YP-2% Galaktose gegenüber der Anzucht in YP-4% Raffinose. Die lediglich 1,1-fach höhere Kar2p-Expression in YP-2%

Galaktose gegenüber dem Raffinose-Medium 12 h nach der Induktion zeigte deutlich, dass das alternative Expressionsmedium für die Anzucht des Produktionsstamms verwendet werden konnte. Alle folgenden Anzuchten zur Proteinisolierung fanden daher in diesem Medium statt.

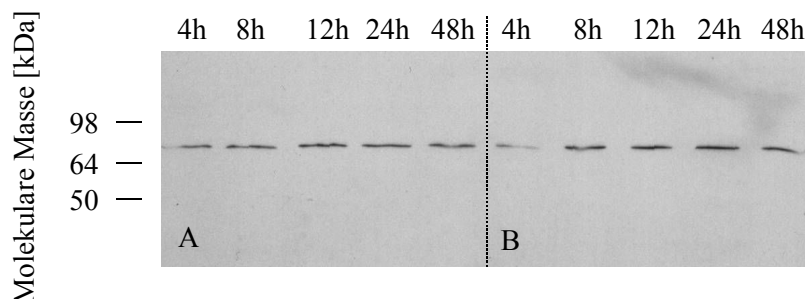


Abb. 23: Vergleich der Kar2p-Expression bei Wachstum auf YP-4% [w/v] Raffinose-Medium + 2% [w/v] Galaktose und Anzucht in YP-2% [w/v] Dextrose mit Induktion in YP-2% [w/v] Galaktose-Medium. Zu den Zeitpunkten 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h nach Induktion wurden Proben entnommen und Gesamtzellextrakt hergestellt. Der Nachweis im Western-Blot erfolgte durch einen Kar2p-Antikörper und einem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper. A: Anzucht in YP-4%Raffinose-Medium; B: Anzucht in YP-2%Dextrose/2% Galaktose-Medium.

3.1.2.6. Vergleich der OR5-Proteinsynthesestärken in *S. cerevisiae*- und P19-Zellen

Der OR5-Proteinsynthesegrad in Gesamtmembranen des *S. cerevisiae* Produktionsstammes *w1* und *OR5-pSFV2 # 8*- bzw. *OR5-pSFVICap # 6*-infizierter P19-Zellen wurde im Western-Blot mit Markierung durch den OR5-Antikörper verglichen.

Als Negativkontrollen wurden Membranen uninfizierter P19-Zellen und pITy3-transformierter *S. cerevisiae*-Zellen eingesetzt. Aus Abbildung 24 geht hervor, dass die Menge des Zielproteins in *OR5-pSFVICap # 6*- infizierten P19-Gesamtmembranen (Spur 5) in etwa einem Drittel des OR5-Proteins in den Hefegesamtmembranen (Spur 2) entsprach. Die produzierte OR5-Menge *OR5-pSFV2 # 8*-infizierter Zellen lag in diesem Experiment unterhalb der Detektionsgrenze. Da das OR5-Expressionsniveau in den P19-Zellen abhängig ist von der Infektionseffizienz – u.a. resultierend aus dem Virustiter –, wurde vor dem Experiment sichergestellt, dass die verwendete Viruslösung zu einer >80%igen Infektion der Zellen geführte hatte.

Durch diesen Vergleich wurde gezeigt, dass das *S. cerevisiae*-Expressionssystem - verglichen mit dem Säugerepressionssystem - signifikant höhere Ausbeuten des rekombinanten Proteins pro Milligramm Gesamtmembranen liefert. Deshalb wurde das Hefesystem zur Isolierung des Geruchsrezeptorproteins eingesetzt.

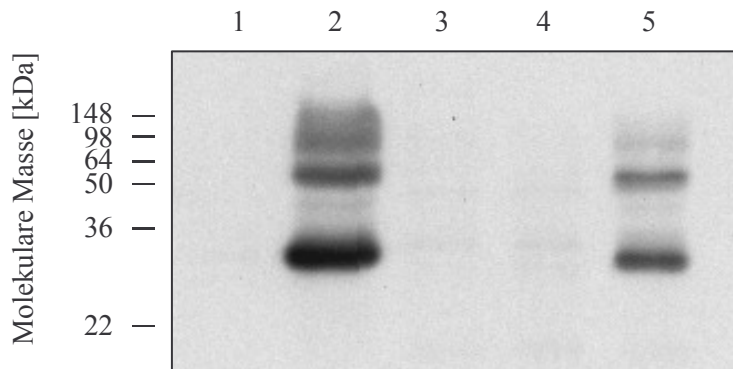


Abb. 24: Vergleich der OR5-Proteinsynthesestärke in P19- und *S. cerevisiae*-Zellen. Jeweils 5 µg Gesamtmembran-Präparationen wurden einer PAGE unterzogen und im Western-Blot mit OR5-Antikörper und entsprechendem HRP-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Spur 1: pITy3; Spur 2: *wI*; Spur 3: P19; Spur 4: *OR5-SFV2/P19*; Spur 5: *OR5-SFV1Cap/P19*.

3.2. Untersuchungen zur N-Glykosylierung und Lokalisation des OR5-Rezeptors

Membranproteine enthalten in der Regel Signalsequenzen für Glykosylierungen. Es wird angenommen, dass sie in Kombination mit dem Hydrophobizitätsstatus und der Ladungsverteilung eines Proteins Informationen liefern, in welches Zielkompartiment das Protein transloziert werden soll. Eine korrekte Translokation ist im Allgemeinen auch für die richtige Faltung und Fuktionalität eines Proteins von Bedeutung (Geisow, 1992). Aus diesem Grund wurde überprüft, inwieweit das rekombinante OR5-Protein in *S. cerevisiae*- und den P19-Zellen in glykosylierter Form synthetisiert wird, und damit eventuell o. g. Vorraussetzungen erfüllt sind.

3.2.1. N-Glykosylierung

Die Sequenz des OR5-Rezeptors enthält im N-terminalen Bereich des Proteins zweimal die potentielle Glykosylierungs-Konsensussequenz NXS/T (Tarentino, A. L. *et al.*, 1985; Wheatley, M. und Hawtin, S., 1999), wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann. Zum einen handelt es sich um die Sequenz NQTV an Position 5, zum anderen um die Aminosäure-Abfolge NLS an Position 65 der Aminosäuresequenz (Abb. 25). Innerhalb dieser Sequenzen kann Asparagin als Akzeptor des Oligosaccharides Glc3-Man9-GlcNAc2 dienen.



Abb. 25: N-terminale Aminosäuresequenz des Geruchsrezeptors OR5 mit potentiellen Glykosylierungsstellen. Dargestellt sind die ersten 80 Aminosäuren des OR5-Rezeptorproteins. Zur Identifizierung potentieller N-Glykosylierungs-Sequenzen wurde das Programm *NetNGlyc 1,0* (Center for Biological Sequence Analysis, Lyngby, DK) verwendet. Die N-Glykosylierungs-Signalsequenzen Asn-Xaa-Ser/Thr sind in blau dargestellt und unterstrichen. Asparagine, die eventuell N-glykosyliert sein können, sind in rot hervorgehoben.

3.2.1.1. Deglykosylierung des in *S. cerevisiae* produzierten OR5-Proteins

Eine mögliche N-Glykosylierung des Rezeptors wurde durch den Vergleich von *PNGase F*-behandelten und -unbehandelten Gesamtmembranen des Expressionsstammes *w1* im Western-Blot untersucht. *PNGase F* ist eine Amidase aus *Flavobacterium meningosepticum*, welche N-Glykanketten von Glykoproteinen hydrolysiert (Tarentino, A. L. *et al.*, 1985).

Die Behandlung mit *PNGase F* führte zu einem distinkteren Signal des OR5-Monomers im Western-Blot, das Laufverhalten in der PAGE wurde jedoch nicht weitergehend beeinflusst (Abb. 26, A). Daraus musste geschlossen werden, dass nur ein geringer Anteil des OR5-Rezeptors in *S. cerevisiae* in N-glykosylierter Form vorliegt.

Aufgrund der Möglichkeit, dass ein Ausbleiben der Protein-Modifizierung auf der Physiologie des Hefe-Expressionssystems beruht, wurde der N-Glykosylierungsstatus des Rezeptors im Anschluß ebenfalls in Säugerzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurde der rekombinante OR5-Rezeptor aus P19-Zellen analysiert.

3.2.1.2. Deglykosylierung des in P19-Zellen produzierten OR5-Proteins

Der Vergleich von *PNGase F*-behandelten und -unbehandelten Gesamtmembranen aus OR5-exprimierenden P19-Zellen resultierte in einer - verglichen mit dem Hefeexpressionssystem – noch geringeren N-Glykosylierung des Rezeptors. Der einzige Anhaltspunkt für eine N-Glykosylierung beruht auf einem sehr schwachen Signal oberhalb des OR5-Monomer-Signals, welches nur in der *PNGase F*-freien Probe in Abbildung 26, B, Spur 1 zu erkennen ist. Da trotz der vorhandenen N-Glykosylierungs-Signalsequenzen im OR5-Protein keine signifikanten Unterschiede im Glykosylierungs-Status festgestellt werden konnten, sollten Lokalisationsstudien Aufschluss über die Verteilung des OR5-Proteins in den Zellen geben.

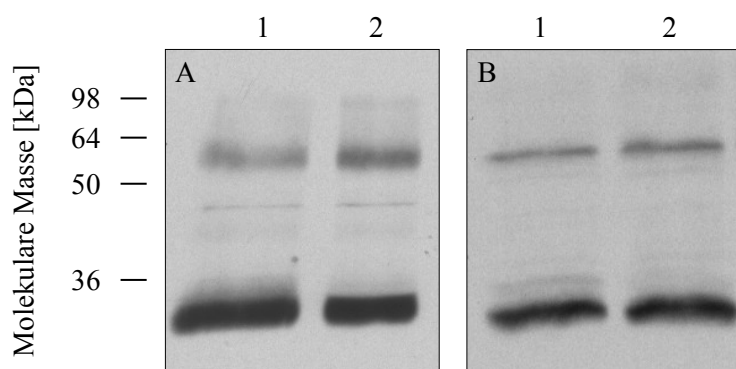


Abb. 26: Deglykosylierung des OR5-Proteins synthetisiert in *S. cerevisiae*- und P19-Zellen. Fünf μg Gesamtmembranen wurden *PNGase F*-behandelt, um den N-Glykosylierungsstatus des Rezeptors zu untersuchen. A: Membranen aus *S. cerevisiae w1*; B: Membranen aus *OR5-SFV1Cap*-infizierten P19-Zellen; Spur 1: Membranen ohne *PNGase*; Spur 2: Membranen mit *PNGase* behandelt.

3.2.2. Lokalisation des OR5-Rezeptors in der Zelle

3.2.2.1. Lokalisation von OR5 in *S. cerevisiae w1*

Die Verteilung des produzierten Membranproteins in der Zelle lässt sich unter anderem durch die Analyse der fraktionierten Zell-Membranbestandteile bestimmen. Mit Hilfe eines Saccharosegradienten wurden Plasmamembranen, Mikrosomen sowie Membranen des ER und Golgi-Bestandteile voneinander getrennt (s. 2.6.5.2.) und diese durch Western-Blot-Analyse untersucht. Anhand der densitometrischen Verteilung der OR5-Signale im Western-Blot wurde gezeigt, dass ~75% des exprimierten Rezeptors korrekt in die Plasmamembran transloziert wurden (Abb. 27, Spur 1). Unter 20% des rekombinanten Proteins befand sich - basierend auf dieser Analyse - in Golgi- und ER-Kompartimenten.

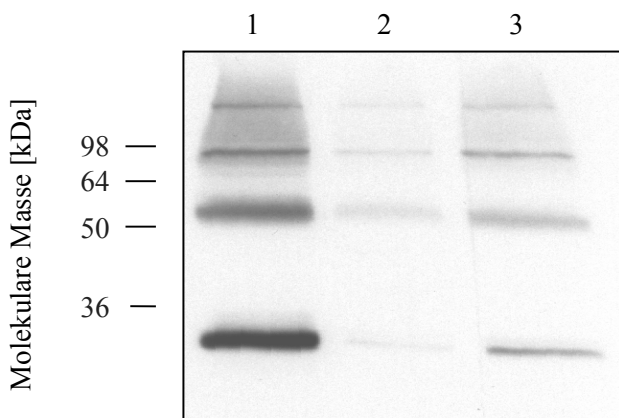


Abb. 27: Verteilung von OR5 in den Membranen des *S. cerevisiae*-Expressionsstammes *w1*. Eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation führte zur Trennung von Plasmamembran, Mikrosomen und Golgi/ER Membranen. Die einzelnen Membranspezies wurden jeweils im gleichen Volumen resuspendiert, gleiche Volumina in der PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Spur 1: Plasmamembran-Fraktion; Spur 2: Mikrosomen; Spur 3: Golgi/ER.

Immunfluoreszenz-Untersuchungen (s. 2.5.5.1.) sollten ebenfalls Aufschluß darüber geben, ob sich ein Großteil des Rezeptors in der Plasmamembran befand (Abb. 28). Deutlich zu erkennen ist eine durch die Cy3-Markierung (dargestellt in rot) detektierbare OR5-Produktion, wobei jedoch keine überwiegende Anreicherung in der Plasmamembran auftrat. Eine Kernfärbung (dargestellt in blau) wurde mit DAPI durchgeführt. Da ebenfalls eine auffällige Anhäufung des Zielproteins im Bereich des Zellkerns ausblieb, konnte aufgrund dieser Untersuchung nicht beurteilt werden, ob ein Großteil des OR5-Proteins - entgegen bisheriger Untersuchungen - im ER verblieben war.

Aufgrund der gegensätzlichen Ergebnisse aus der Analyse der Membranfraktionen und der Immunfluoreszenz-Markierung wurden die einzelnen Membranfraktionen im Western-Blot auf Kreuzkontaminationen untersucht. Es wurde durch eine Analyse mit Plasmamembran- und ER-spezifischen Marker-Antikörpern gezeigt, dass Kreuzkontaminationen zwischen den Fraktionen auftraten (Daten nicht gezeigt). Demnach wurde keine vollständige Trennung der verschiedenen

Membranspezies, aber zumindest eine deutlich Anreicherung der Membranbestandteile in den zugehörigen Fraktionen erreicht. Somit wurde im Western-Blot trotz geringfügiger Kreuzkontaminationen eine überwiegende Lokalisation des rekombinanten Proteins in der Plasmamembran gezeigt.

In Anbetracht aller erhaltenen Resultate war davon auszugehen, dass zwar ein Teil des rekombinanten Proteins nicht vollständig transloziert wurde, es sich jedoch um einen geringen Anteil handelte, sodass eine starke UPR-Aktivierung ausblieb. Deshalb wurde der Produktionsstamm *w1* für die Rezeptorproduktion ausgewählt.

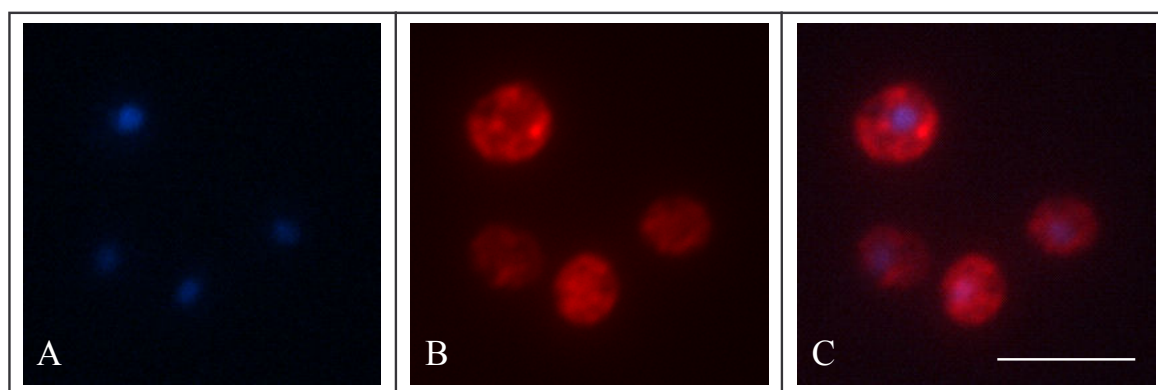


Abb. 28: Nachweis des OR5-Proteins im *S. cerevisiae*-Expressionsstamm *w1*. *S. cerevisiae w1*-Expressionszellen wurden mit Formaldehyd fixiert. Der Nachweis von OR5-Protein erfolgte mit dem OR5-Antikörper 22-145-3, die Kernfärbung wurde mit DAPI-Farbstoff angefertigt. Die Analyse erfolgte durch Dekonvolutions-Mikroskopie. A: DAPI-Färbung; B: OR5 Markierung/Cy3-Färbung; C: Übereinanderlegung beider Färbungen. Skalierungsbalken 20 μm .

3.2.2.2. Lokalisation von OR5 in *OR5-pSFV1Cap*-infizierten P19-Zellen

Die Verteilung des OR5-Proteins in den P19-Zellen wurde ebenfalls durch eine Trennung der Membranbestandteile und anschließende Analyse im Western-Blot untersucht.

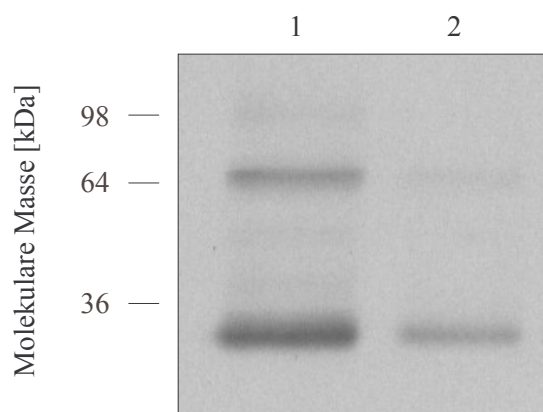


Abb. 29: Verteilung von OR5-Protein in Plasmamembran und Golgi/ER Membranen im P19-Expressionssystem. Eine Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation führte zur Trennung der Plasmamembran und der Golgi/ER Kompartimente. Spur 1: Plasmamembran-Fraktion; Spur 2: Golgi/ER-Fraktion.

Es ist deutlich zu erkennen (Abb. 29), dass der überwiegende Anteil des produzierten Zielproteins in der Plasmamembran (Spur 1) vorliegt. Ein Anteil von ca. 20% des Rezeptors befindet sich in anderen Membranfraktionen, wie z.B. Golgi und ER Membranen (Spur 2).

Dieses Ergebnis wurde durch ein Immunfluoreszenz-Markierungsexperiment bestätigt. Nach Infektion der Zellen mit *OR5-pSFV1Cap # 6* und anschließender Expression für 8 h wurde eine Immunmarkierung durchgeführt. Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie wurde ein Großteil des OR5-Proteins nach Markierung mit einem OR5-Antikörper und Cy3-konjugierten Sekundärantikörper eindeutig in der Peripherie der Zelle, der Plasmamembran, nachgewiesen (Abb. 30, B). Das Rezeptorprotein wurde demnach - auch ohne die Verwendung fusionierter Transport-Signalsequenzen - korrekt zur Plasmamembran transloziert.

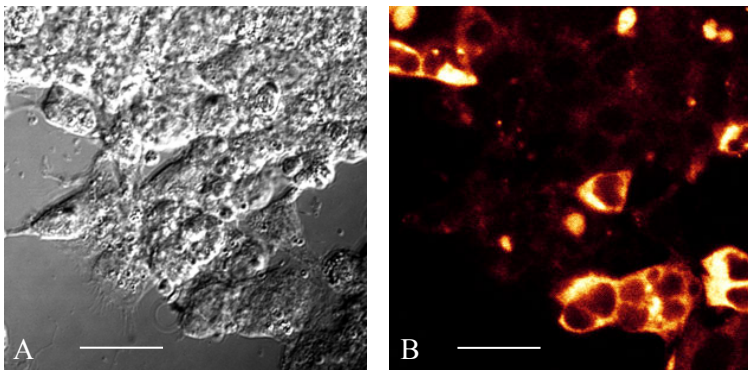


Abb. 30: Lokalisation des OR5-Proteins in P19-Zellen. 12 h *OR5-SFV1-Cap*-infizierte P19-Zellen wurden Methanolfixiert und mit OR5- und Ziege-anti-Maus Cy3-konjugiertem Antikörper immunmarkiert. Die Analyse der Zellen erfolgte durch Konfokal-Mikroskopie. A: Durchlicht; B: Fluoreszenzmarkierung. Skalierungsbalken 20 μ m.

3.2.3. Expression und Lokalisation von OR5: Zusammenfassung

Der Gebrauch von konstitutiven Vektoren sowie die Transfektion mit Hilfe von Lipiden resultierten in einer schwachen OR-Expression sowie niedriger Transfektionseffizienzen. Durch Infektion der P19-Zellen mit rekombinanten Viruspartikeln wurde eine starke Geruchsrezeptor-Expression sowie hohe Transfektionseffizienzen von über 80% erzielt. Aufgrund höherer OR5-Biosyntheseraten bei Verwendung des Capsidgen-haltigen Klonierungsvektors wurde dieser für nachfolgende Untersuchungen ausgewählt. In P19-Zellen exprimierter OR5 Rezeptor zeigte zwar nur schwache N-Glykosylierung, dennoch erfolgte die korrekte Translokation des Proteins zur Plasmamembran. Die Untersuchung des UPR-Status und der OR5-Expressionsstärke in *S. cerevisiae* ermöglichte die Selektion eines effektiven Expressionsstammes mit einer OR5-Biosyntheserate von 0,9ng/ μ g Gesamtmembranen. Auch in Hefe erfolgte nur eine schwache N-Glykosylierung, die Ergebnisse zur Proteintranslokation waren nicht eindeutig.

3.3. Generierung eines monoklonalen Antikörpers spezifisch für den Geruchsrezeptor OR5 aus *Rattus norvegicus*

Zu Beginn der Arbeit erfolgte die Detektion des Geruchsrezeptors über eine fusionierte Histidin-Sequenz. Es zeigte sich jedoch, dass die Herstellung von OR5-Antikörpern u. a. für die chromatographische Isolierung des Rezeptors durch Immunopräzipitation notwendig war. Generell bieten monoklonale Antikörper zusätzlich die Möglichkeit, „Tag“-freie heterologe Proteine zu produzieren. Dadurch sollen Veränderungen der nativen Proteinstruktur und – Funktion, verursacht durch zusätzliche Aminosäuresequenzen, vermieden werden.

Der sinnvolle Gebrauch von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern ist methodenabhängig. Monoklonale Antikörper erkennen und binden spezifisch Antigene, die im Fall von Proteinen aus wenigen Aminosäuren, aber auch aus definierten Tertiärstrukturen bestehen können. Solche Antikörper werden häufig für komplexe Methoden, wie z. B. die Immunopräzipitation oder Co-Kristallisation verwendet. Polyklonale Antikörper hingegen stellen ein Gemisch verschiedener Spezifitäten dar und sind demnach nur bedingt einsetzbar, z. B. in Detektionsmethoden. Um ein breites Untersuchungsspektrum zu ermöglichen, war es deshalb notwendig, monoklonale Antikörper herzustellen.

3.3.1. Antigen-Herstellung und Generierung von Hybridomazellen

Zum damaligen Zeitpunkt stand kein gereinigtes OR5-Protein zu Verfügung. Aus diesem Grund wurde ein synthetisches Peptid des Geruchsrezeptors zur Immunisierung verwendet. Anhand von Computeranalysen wurden zwei Peptidsequenzen des Proteins als potentiell immunogen ermittelt: die zweite extrazelluläre Schleife sowie der C-Terminus des OR5-Proteins. Eine Synthese der extrazellulären Domäne war aus technischen Gründen nicht möglich, weswegen der 20 Aminosäuren lange, synthetisch hergestellte C-Terminus des Rezeptors zur Immunisierung verwendet wurde. Die Sequenz $\text{NH}_3^+\text{-RDIKGAMERIFIFCKRKIQLNL-COO}^-$ des C-Terminus wurde N-terminal mit einem Cystein versehen, um das Hapten über eine Thioetherbindung an die reaktiven Maleimidgruppen des immunogenen Trägersubstrates „keyhole limpet haemocyanine“ (KLH) zu koppeln (s. 2.5.1.1.). KLH ist ein $\sim 8\text{-}9 \times 10^3$ kDa großes Protein aus *Megathura crenulata*, welches durch seinen hohen Anteil an Lysinresten leicht modifiziert werden kann. Die Kopplung an ein großes Trägerprotein wie KLH war notwendig, da Haptene mit einem Molekulargewicht von weniger als 3 kDa oftmals keine ausreichende Immunantwort hervorrufen können.

Die Immunisierung (s. 2.5.1.2.) wurde an zwei weiblichen, vier - fünf Wochen alten *Balb/C* Mäusen über einen Zeitraum von zwei Monaten mit 4 (Alu/Pertussis) bzw. 7 (Freundsches Adjuvant) Injektionen mit steigenden Konzentrationen des Antigens durchgeführt.

Durch die Fusion von Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten-Zellen einer immunisierten Maus mit Myelomazellen (Tumorzelle eines B-Lymphozyten) (Kearney et al. 1979) ist es möglich, Hybridzellen zu erzeugen, welche sowohl die Fähigkeit der Antikörperproduktion als auch die Unsterblichkeit einer Krebszelle in sich vereinen. Diese Zellen können sich demzufolge unbegrenzt vermehren, während sie ebenfalls dauerhaft Antikörper gegen das Antigen sezernieren, mit dem die Maus immunisiert wurde. Eine Selektion der Hybridzellen erfolgt über das Wachstumsmedium. Es enthält Aminopterin, einen Inhibitor der *de novo* Biosynthesewege zur Nukleotidherstellung. Folglich müssen die B-Lymphozyten einen Stoffwechselnebenweg benutzen, um ihre Nukleinsäuren zu bilden. Dieser Syntheseweg wurde in den verwendeten Myelomazellen durch Behandlung mit 8-Azaguanin und eine dadurch ausgelöste Mutation ausgeschaltet. Die Zellen können daher im unfusionierten Zustand nicht in Medium wachsen, welches Hypoxanthin, Thymin und den Inhibitor Aminopterin enthält. Die unfusionierten Milzzellen wiederum sind nicht überlebensfähig, da es sich nicht um proliferierende Zellen handelt. Demnach vermehren sich nur Fusionszellen, welche anschließend auf ihre Antikörperproduktion untersucht werden können.

In Abbildung 31 ist der methodische Verlauf bis zur Generierung von Hybridomazellen schematisch dargestellt.

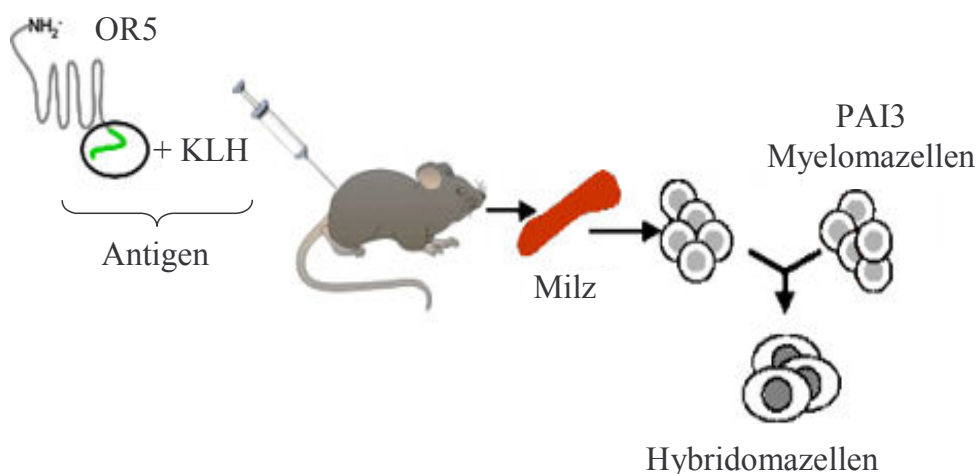


Abb. 31: Schematische Darstellung der Immunisierung und Zellfusion. Eine Balb/C Maus wurde mit KLH-gekoppeltem Antigen immunisiert, und anschließend eine Fusion der Milzzellen mit PAIB₃Ag81 Myelomazellen durchgeführt.

3.3.2. Identifizierung und Isolierung von OR5-Antikörpern

Nach der Phase der Immunisierung, Präparation der Milzzellen und Fusion mit immortalisierten PAIB₃Ag81 Myeloma-Zellen wurden die Überstände der entstandenen Hybridome mit der ELISA- (s. 2.5.2.) und Dot-Blot-Methode (s. 2.6.11.) bezüglich ihrer Antikörper-Spezifität untersucht. Diese beiden Methoden wurden gewählt, da verschiedene Antikörper oftmals in unterschiedlichen Methoden reaktiv sind. Demnach kann ein im ELISA nicht reaktiver Antikörper durchaus spezifische Signale in der Immunmarkierung an ganzen Zellen oder im Western-Blot hervorrufen.

In verschiedenen Seren beider Mäuse wurden OR5-Antikörper nachgewiesen. In Abbildung 32 ist beispielhaft ein ELISA (A) und der dazugehörige Dot-Blot (B) dargestellt. Die Beschichtung der ELISA-Platten, bzw. der Nitrocellulosemembran für die Dot-Blot-Methode, erfolgte mit in PBS gelöstem, synthetischen OR5-Peptid. Nach Behandlung mit Antikörperüberständen erfolgte die Inkubation mit einem Sekundärantikörper. Durch ein an diesen Antikörper gekoppeltes Enzym - eine alkalische Phosphatase bzw. eine Meerrettich-Peroxidase - kommt es zur enzymatischen Spaltung eines Farbsubstrates. Unterschiedliche Färbungsintensitäten zeigen somit verschieden starke Reaktivitäten getesteter Antikörperüberstände an. So war die Selektion hochaffiner Antikörper möglich (z.B. a3, c2, e5, h1).

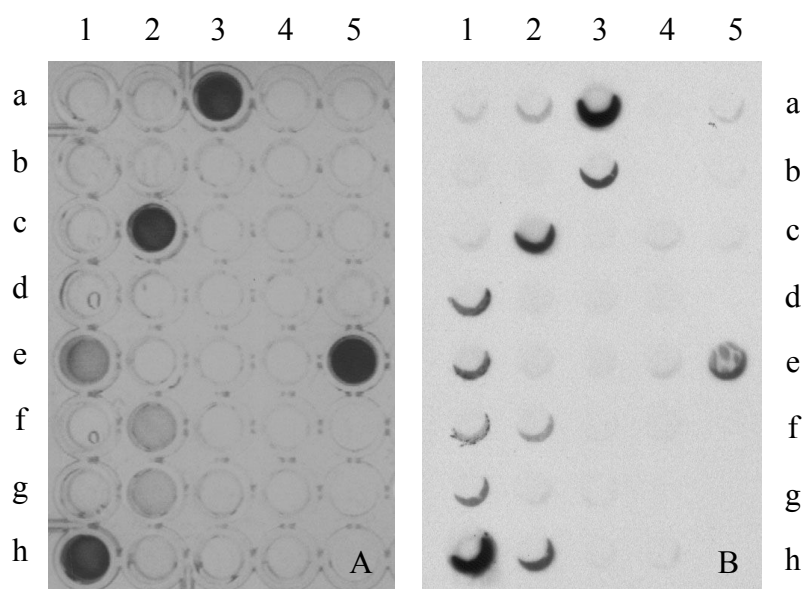


Abb. 32: Selektion von OR5-Antikörpern in Hybridomazellüberständen. Zellüberstände von Hybridomazellgemischen wurden im ELISA und DOT-Blot auf OR5-Antigenbindung getestet. Eine ELISA-Platte und eine Nitrocellulosemembran wurden mit OR5-Peptid beschichtet und 1h bei RT mit Hybridomazellüberständen inkubiert. Anschließend erfolgte die Nachweisreaktion mit alkalischer Phosphatase bzw. Peroxidase-vermittelter Farbreaktion. A: ELISA; B: DOT-Blot.

Nach Selektion OR5-Peptid-spezifischer Antikörper wurde eine Subklassenbestimmung mit dem *Mouse Typer Isotyping Panel* von BioRad durchgeführt (s. 2.5.2.2.), um IgG-produzierende Zelllinien zu identifizieren. Nur diese Subklasse kommt für eine dauerhafte Antikörperproduktion in Frage, da IgMs instabile Vorläufer-Antikörper der primären Immunantwort sind, weswegen sie häufig auch „Frühantikörper“ genannt werden. Der Ouchterlony Test (Ouchterlony, O., 1953) wurde in einigen nicht eindeutigen Fällen zusätzlich durchgeführt (s. 2.5.2.2.). Diese Methode beruht auf der so genannten radialen Doppeldiffusion von kompatiblen Antigenen und Antikörpern in einer Agarosematrix mit Ausbildung einer sichtbaren Präzipitation an der Grenzfläche ihrer Diffusionsfronten. Der Subklassentest von Sigma-Aldrich beruht zwar auch auf einer Bindung Antikörper-Subklassen-spezifischer Antikörper, es traten jedoch teilweise Mehrfachsignale auf.

Durch die Kombination dieser Methoden wurden verschiedene Zelllinien identifiziert, welche OR5-IgG1 und -IgG2b-spezifische monoklonale Antikörper sezernierten. Von insgesamt 282 untersuchten monoklonalen Antikörperüberständen zeigten fünf IgG1- und sechs IgG2b-Antikörper spezifische Wechselwirkungen mit dem C-Terminus von OR5.

Die Reinigung der Antikörper 22-145-3 und 23-40-3 erfolgte durch Affinitätschromatographie an Protein A Sepharose mit anschließender Dialyse (s. 2.5.1.4.). Die Reinheit der isolierten Antikörper wurde jeweils durch denaturierende Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung kontrolliert.

Abbildung 33 zeigt die Untereinheiten des gereinigten Antikörpers 22-145-3 in der PAGE.

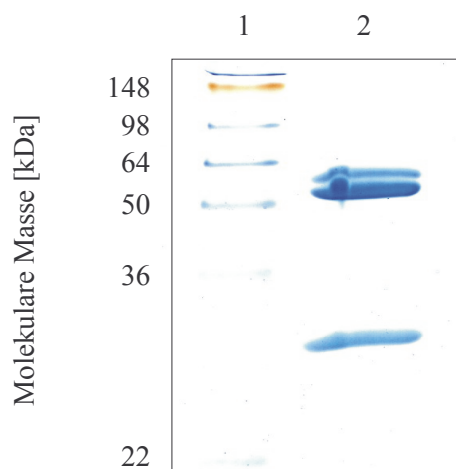


Abb. 33: Coomassie-Färbung des gereinigten, denaturierten IgG2b Antikörpers 22-145-3 in der PAGE. Über Protein A Sepharose gereinigter Antikörper wurde bei 95°C denaturiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-G250 gefärbt. 1: Größenstandard; 2: Untereinheiten des Antikörpers mit der Nummer 22-145-3.

In Abbildung 34 sind die im ELISA gemessenen und gegen einen Leerwert ohne Erstantikörper korrigierten Extinktionswerte der gereinigten monoklonalen OR5-Antikörper 22-145-3 und 23-40-3 dargestellt. Der Anstieg der Extinktionswerte um das bis zu 121-fache gegenüber einer Kontrolle, in der kein Erstantikörper eingesetzt wurde, belegt deutlich eine spezifische Interaktion des Antikörpers mit dem OR5-Antigen. Die verschiedenen hohen Extinktionen weisen auf unterschiedlich starke Antigen-Affinitäten der monoklonalen Antikörper hin.

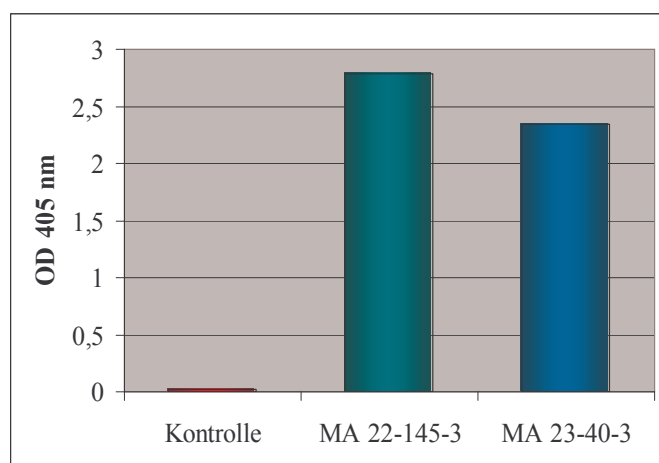


Abb. 34: Vergleich spezifischer Antikörper/Antigen-Bindungen gemessen im ELISA. Dargestellt sind die im ELISA gemessenen Extinktionswerte von zwei monoklonalen OR5-Antikörpern nach Anbindung an das synthetische OR5-Peptid und Bindung eines Sekundärantikörpers verglichen mit einer Kontrolle ohne Primärantikörper.

Vier OR5-spezifische Antikörper (22-134-3, 22-27-7, 23-40-4 und 22-145-3) wurden im Anschluss im Western-Blot und der Immunmarkierung an fixierten P19-Zellen (s. 2.5.5.2.) getestet. Obwohl alle Antikörper im ELISA spezifisch mit dem OR5-Peptid reagierten, waren im Western-Blot nur der Antikörper 22-145-3 und in der Immunmarkierung an fixierten Zellen alle bis auf den Antikörper 22-134-3 reaktiv. Die Reaktivitäten der vier Antikörper in den verschiedenen Methoden sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10: Isolierte monoklonale OR5-Antikörper und ihre Reaktivitäten in angewandten Methoden. -: Detektion von OR5 in Methode nicht möglich; +: Detektion von OR5 in Methode möglich; n.g.: nicht getestet.

Bezeichnung Antikörper	Antikörper-subklasse	ELISA	Western-Blot	Immunmarkierung	Immunopräzipitation
22-134-3	IgG1	+	-	-	n.g.
22-27-7	IgG1	+	-	+	n.g.
23-40-4	IgG1	+	-	+	-
22-145-3	IgG2b	+	+	+	+

Im Zuge der Antikörper-Charakterisierungen wurde aus einer Vielzahl monoklonaler Antikörper ein Repertoire OR5-spezifischer Antikörper isoliert, mit denen die Detektion des denaturierten Rezeptorproteins im Western-Blot und der Immunmarkierung fixierter Zellen möglich war.

Da sich der IgG2b Antikörper 22-145-3 besonders durch seine Methoden-Unabhängigkeit und die zusätzliche Bindungsfähigkeit des nativen Rezeptor hervorhob, wurden seine Spezifität und Affinität in BIACORE-Messungen (s. 2.5.6.) untersucht.

3.3.3. Biacore: Analyse des IgG2b OR5-Antikörpers 22-145-3

Die BIACORE-Messungen lieferten die Bestätigung für die Spezifität und hohe Affinität des isolierten monoklonalen IgG2b Antikörpers 22-1-45-3. Demzufolge konnte dieser OR5-Antikörper in weitere Untersuchungen integriert werden.

Der Meßaufbau eines BIACORE-Experimentes besteht in der Immobilisierung einer Substanz auf einem Sensorchip und der anschließenden Untersuchung der Bindungsfähigkeit des zu testenden Bindungspartners an dieser Oberfläche. Die Wechselwirkung kann durch das Phänomen der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR) in Echtzeit verfolgt werden. Ein Anstieg des SPR-Signals nach Injektion des Analyten auf die Oberfläche zeigt eine Bindung der Moleküle an den immobilisierten Liganden an.

Das synthetische OR5-Peptid wurde über den N-Terminus an einen *CM5-Chip* der Firma BIACORE gekoppelt. Dieser Chip enthält vier unabhängig voneinander ansteuerbare Oberflächenbereiche, so dass parallel verschiedene Oberflächenbelegungen getestet werden konnten. Spur 1 auf der Chipoberfläche wurde zur Durchführung einer Negativkontrolle mit einem zufällig gewählten Peptid, dem Laminin „P19“ (19 Aminosäuren) aus der α -Kette des Laminins, beladen. Spur 2 wurde mit reinem OR5-Peptid beladen, während auf Spur 3 eine 80:20 Verdünnung des OR5-Peptides mit einem *RB212*-Peptid und auf Spur 4 100% [mol/mol] des Verdünners *RB212* aufgebracht wurden. Der Verdünner *RB212* wurde gewählt, weil aufgrund seiner Sequenz keine Phasenseparation mit dem OR5-Peptid zu erwarten war, und insofern eine Verdünnung der verfügbaren Bindungsepitope auf der Oberfläche erreicht werden sollte.

Abbildung 35A belegt eine konzentrationsabhängige Bindung des OR5-Antikörpers 22-145-3 an das synthetische OR5-Peptid. Aus Kurvenform, Signalthöhe und der Konzentration des eingesetzten Analyten ist eine Berechnung der Bindungsstärke (Affinität, K_D -Wert) möglich. Zu diesem Zweck wurden Kurvenanpassungen für jeden Kurvenverlauf einer Analytenkonzentration

vorgenommen, die in der Abbildung jeweils der schwarzen Kurve entsprechen. Generell liegen die ermittelten K_D -Werte von monoklonalen Antikörpern im Bereich von $x \cdot 10^{-8}$ bis $x \cdot 10^{-10}$. Der aus diesen Messungen ermittelte K_D Wert des verwendeten Antikörpers betrug $1,9 \cdot 10^{-9}$, welcher auf eine hochaffine Bindung zwischen dem Antikörper 22-145-3 und dem OR5-Peptid hinweist.

Die Spezifität des Antikörpers wurde durch Bindung von 500 nM 22-145-3 an alle 4 Spuren untersucht (Abb. 35B). Es trat eine signifikante Präferenz für das Antigen auf (Spur 2), wobei jedoch ebenfalls eine schwächere Bindung an die *RB212*-Moleküle stattfand (Spur 1). Da vorher keine Referenzen etabliert waren, konnten Kreuzreaktionen nicht ausgeschlossen werden, wie im Falle des Verdünners *RB212*. Die Spezifität konnte dennoch deutlich anhand der Negativkontrolle gezeigt werden: das Laminin-Fragment interagiert nicht mit dem getesteten Antikörper (Spur 4).

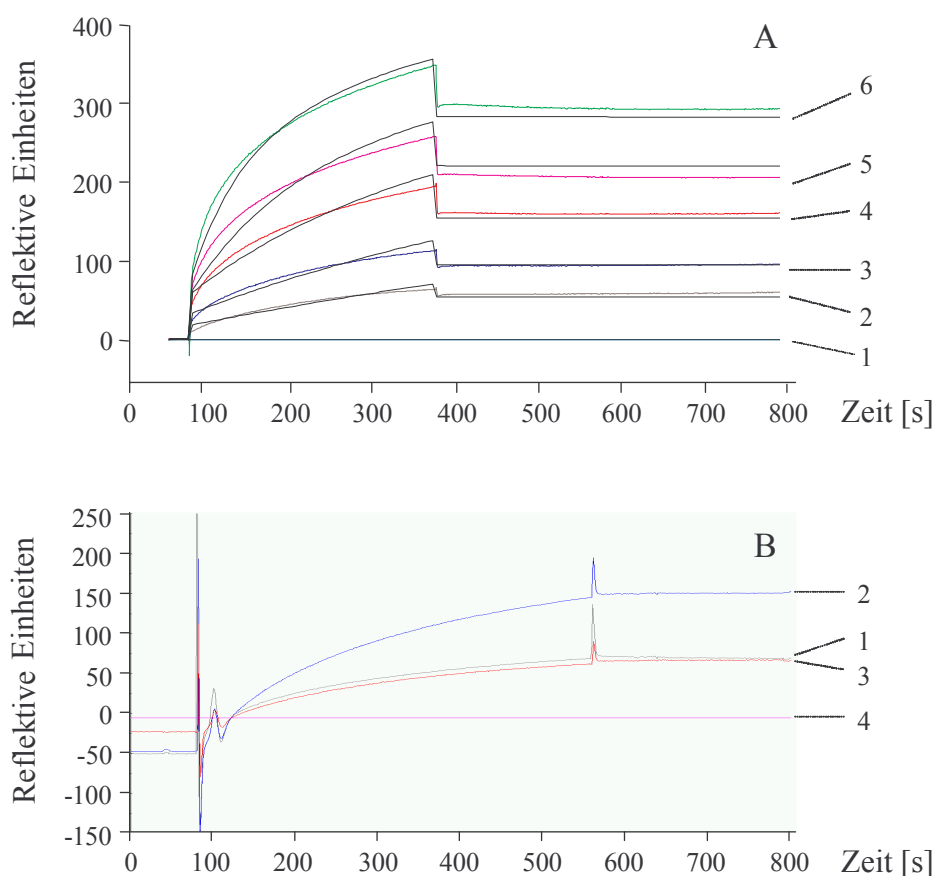


Abb. 35: BIACORE-Messung: Bindung des IgG2b OR5-Antikörpers 22-145-3. A: Dosisabhängige Bindung an das synthetische OR5-Peptid. Verschiedene Konzentrationen des Antikörpers wurden auf dem OR5-Peptid beschichteten BIACORE-Chip analysiert. Kurve 1: 0 nM Antikörper ; Kurve 2: 31,5 nM 22-145-3; Kurve 3: 62,5 nM 22-145-3; Kurve 4: 125 nM 22-145-3; Kurve 5: 250 nM 22-145-3; Kurve 6: 500 nM 22-145-3. Die schwarzen Kurven beschreiben die Kurvenanpassungen der einzelnen Läufe. B: Bindung des Antikörpers 22-145-3 an verschiedene Substrate. 500 nM des Antikörpers wurden für die Analyse der Antikörper-Spezifität eingesetzt. Spur 1: 100% RB212; Spur 2: 100% OR5-Peptid; Spur 3: 20% OR5-Peptid/80% RB212; Spur 4: Laminin.

3.3.4. Kopplung OR5-spezifischer Antikörper an Protein A-Sepharose

Die gereinigten monoklonalen OR5-Antikörper wurden nicht nur zur Detektion sondern auch zur Reinigung von OR5 mittels Affinitätschromatographie verwendet. Zu diesem Zweck wurden zunächst der IgG1 Antikörper 23-40-3 und der IgG2b-Antikörper 22-145-3 an Protein A-Sepharose gekoppelt (s. 2.5.3.). Die Kopplung an Immunglobulin-bindendes Protein A aus *Staphylococcus* bietet den Vorteil, dass die Antikörper gerichtet über ihren Fc-Teil gebunden werden, und so ihre Fab-Domänen ohne sterische Hinderung für die Antigen-Bindung exponiert werden (Eliasson, M. *et al.*, 1989).

Die Verwendung einer solchen Matrix ermöglichte die Analyse der Antigen - Bindungsfähigkeit der beiden Antikörper in der Immunopräzipitation.

Nach einer Inkubation mit solubilisiertem OR5-Protein wurden je ein Aliquot der Sepharose, des Durchflusses sowie der Waschschrte entnommen und durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Es zeigte sich, dass der IgG2b-Antikörper 22-145-3 eine hohe Affinität zum nativen Antigen aufwies, da der Hauptanteil des Zielproteins an der Antikörper-Sepharose gebunden war, und nur ein geringer Anteil im Durchfluss detektiert wurde. Es erfolgte jedoch keine OR5-Bindung an die IgG1 23-40-3-gekoppelte Sepharose. Das Zielprotein wurde eindeutig im Durchfluss und dem Waschschrte, jedoch nicht gebunden an der Sepharose, nachgewiesen. (Abb. 36). Entsprechend wurde in allen nachfolgenden Affinitätschromatographien mit Antikörper-Sepharose der IgG2b-Antikörper 22-145-3 zur Kopplung an die Sepharosematrix verwendet.

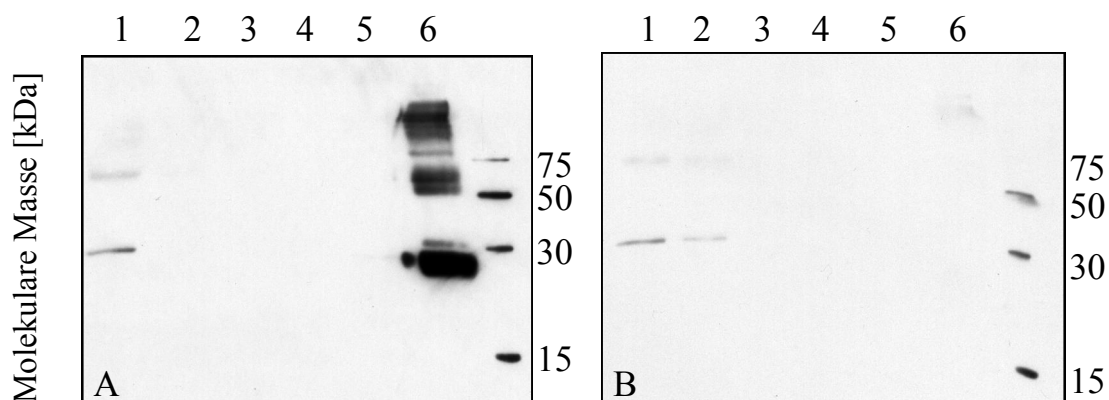


Abb. 36: Immunopräzipitation des Rezeptorproteins mit OR5-spezifischem IgG2b-Antikörper. Isolierter OR5-spezifischer IgG2b-Antikörper 22-145-3 wurde an Protein A-Sepharose gekoppelt und mit LPG-solubilisiertem OR5-Protein inkubiert. Die Bindung des Antigens OR5 an die Antikörpersepahrose wurde im Western-Blot mit einem His₅-Antikörper überprüft. Spur 1: Überstand LPG-Solubilisierung OR5; Spur 2-5: Waschen der Sepharose nach Inkubation mit Solubilisierungsüberstand; Spur 6: Protein A-Sepharose nach Inkubation mit solubilisiertem OR5-Rezeptor.

3.4. Isolierung des Geruchsrezeptors OR5

3.4.1. Isolierung von OR5 aus *S. cerevisiae w1*

Durch die Etablierung einer optimierten Protein-Reinigungsstrategie wurde der Geruchsrezeptor OR5 mit einer hohen Reinheit aus rekombinanter *S. cerevisiae* isoliert.

3.4.1.1. Gesamtmembranpräparation und Solubilisierung

Da der OR5-Rezeptor in den Membranen von *S. cerevisiae* vorliegt, wurde im ersten Reinigungsschritt die Gesamtmembranfraktion isoliert. Aus ~20-30 g Zellen/Liter Kultur (Nassgewicht [w/w]) konnten i. d. R. ~ 250-300 mg Gesamtmembranen präpariert werden. Durch eine anschließende Hochsalz-Behandlung (s. 2.7.2.1.) wurden Membran-assoziierte Proteine entfernt, und die gewonnenen Membranen anschließend zur Proteinsolubilisierung mit Detergenz versetzt (s. 2.7.2.2.). Bei diesem Vorgang werden integrale Membranproteine aus der Membran herausgelöst. Die Stabilisierung der Membranproteine in einem polaren Milieu muss dann von anderen Molekülen als den Lipidmolekülen der Membran übernommen werden (Thomas, T. C. und McNamee, M. G., 1990). Diese Aufgabe übernehmen die Detergenzien, die durch ihre amphiphilen Eigenschaften als Lösungsvermittler fungieren. Die verwendeten Puffer wurden zusätzlich weitestgehend mit Glycerin versetzt, um den stabilisierenden Effekt dieses Agens auf Membranproteine zu nutzen.

Die Solubilisierung des Geruchsrezeptors erwies sich als problematisch, da ein Großteil des OR5-Proteins nicht durch gängige Detergenzien aus der Membran herausgelöst wurde. In Tabelle 11 sind die untersuchten Detergenzien sowie die OR5-Solubilisierungseffizienzen aufgelistet. Nur wenige Detergenzien konnten das OR5-Protein in Lösung überführen, und nur das synthetische Lysophosphatidylglycerol 1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)] (LPG, Abb. 37) bewirkte eine OR5-Solubilisierung von >50%. Zwittergent 3-16 erwies sich ebenfalls als geeignet, da unter bestimmten Bedingungen OR5-Solubilisierungen von annähernd 50% erreicht wurden.

In Abbildung 38 sind beispielhaft im Western-Blot-analytierte Solubilisierungen mit 8 Detergenzien aufgeführt. Das Detergenz FOS12 zeigte zwar eine höhere Solubilisierungseffizienz als viele andere Detergenzien, eine OR5-Solubilisierung von ~40% konnte aber nur durch den Einsatz eines relativ hohen Detergenz:Protein Verhältnisses von 1:4 erreicht werden. Ein weiteres Problem für die Verwendung der genannten Detergenzien war die Skalierung der Solubilisierungsansätze auf größere Volumina. Die Testsolubilisierungen wurden in jeweils

Ergebnisse

500 µl durchgeführt, während ein Ansatz für Proteinisolierungen im Maßstab mehrerer 100 ml lag. Es zeigt sich, dass die im kleinen Volumen erreichten Solubilisierungseffizienzen stark abnahmen, wenn größere Volumina verwendet wurden. Letztendlich wurden in dieser Arbeit die beiden effizientesten Detergenzien, LPG und Zwittergent 3-16, verwendet, wobei auch bei diesen Detergenzien eine deutliche Reduktion der Solubilisierungseffizienz in großen Volumina auftrat.

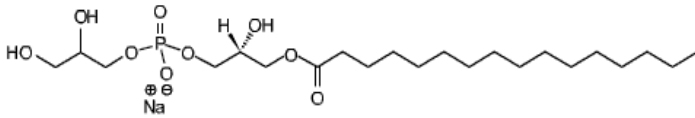


Abb. 37: 1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)] (LPG).

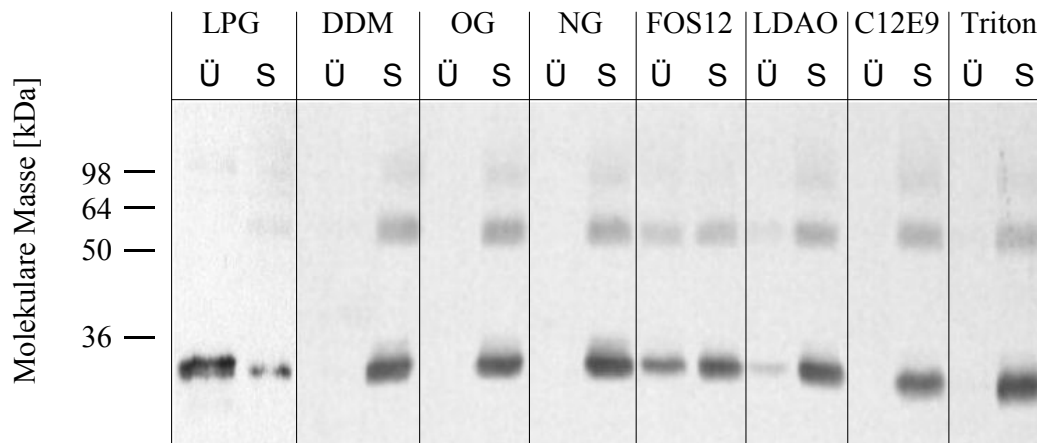


Abb. 38: Solubilisierungen von OR5-Protein aus Gesamtmembranen des Produktionsstammes *S. cerevisiae* w1. Die Solubilisierung von OR5 erfolgte bei 4°C für jeweils 30 min in einem Volumen von 500 µl. Nach Fraktionierung der Proben in der Ultrazentrifugation für 60 min bei 100.000xg wurde die OR5-Solubilisierung anhand der Verteilung des Zielproteins in Cytosol bzw. Gesamtmembranen über SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot bestimmt. LPG, Endkonzentration 1%; DDM, Endkonzentration 2%; OG, Endkonzentration 2%; NG, Endkonzentration 2%; FOS12, Endkonzentration 2%; LDAO, Endkonzentration 2%; C12E9, Endkonzentration 1%; Triton-X 100, Endkonzentration 1%.

Die Abhängigkeit der Solubilisierungseffizienz vom LPG:Protein-Verhältnis ist in Abbildung 39 dargestellt. Aus dem Experiment geht deutlich hervor, dass durch die Verwendung höherer Detergenz:Protein-Verhältnisse eine verbesserte Solubilisierungseffizienz von bis zu 100% erreicht wurde. Da es sich bei LPG jedoch um ein Lipid handelt, welches zum einen verhältnismäßig kostenintensiv und zum anderen bei höheren Konzentrationen durch die Viskosität schlecht handhabbar ist, wurde in der Regel mit einem Detergenz:Protein Verhältnis von 1:1 gearbeitet.

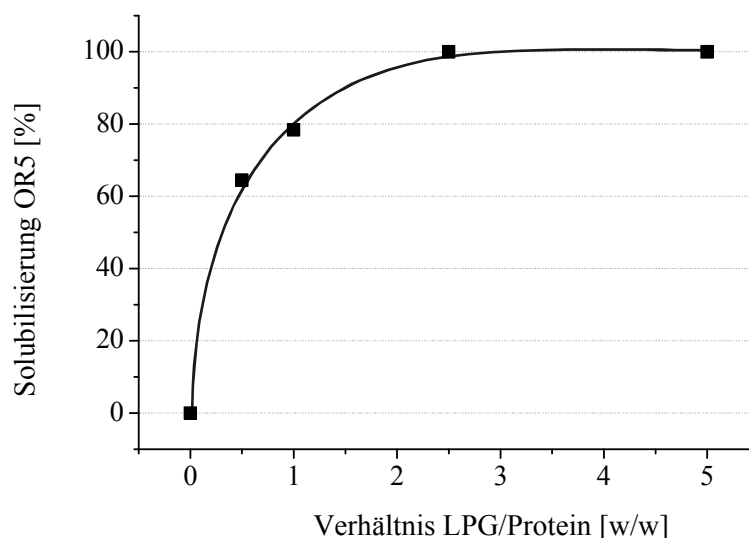


Abb. 39: Konzentrationsabhängige Solubilisierung von OR5 aus Gesamtmembranen des Produktionsstammes *wI*. Jeweils 2,5 mg Gesamtmembranen des Produktionsstammes *wI* wurden in 500 μ l Reaktionsvolumen mit aufsteigenden Mengen (1,25 mg-12,5 mg) LPG versetzt und 1 h bei 4°C gemischt. Nach Fraktionierung der Proben in der Ultrazentrifugation für 60 min bei 100.000xg wurde die OR5-Solubilisierung anhand der Verteilung des Zielproteins in Cytosol bzw. Gesamtmembranen über SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot bestimmt.

Anfangs wurden die Gesamtmembranen vor der eigentlichen Solubilisierung 1 h mit 1% (w/v) Lauryldimethylamin-N-oxid (LDAO) versetzt, welches ~50% der zelleigenen Membranproteine in großen Volumina, jedoch <10% des rekombinanten Proteins aus der Membran löste (Daten nicht gezeigt). Diese „Präsolubilisierung“ sollte als Reinigungsschritt verwendet werden, um einen Großteil der hefeeeigenen Membranproteine schon vor der eigentlichen OR5-Isolierung zu entfernen. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Solubilisierungseffizienz von LPG durch diese Vorbehandlung der Membranen stark reduziert wurde. Ursache hierfür war eine Veränderung der Membranzusammensetzung, wodurch sich das Solubilisierungsverhalten nachfolgender eingesetzter Detergenzien verändern kann. Demnach konnte diese Methode nicht verwendet werden, um die Reinigung des Geruchsrezeptors zu optimieren.

Obwohl Zwittergent 3-16 im Vergleich zu LPG eine schwächere Solubilisierungseffizienz gegenüber OR5 aufwies, wurde es verwendet, wenn Vorgehensweisen getestet oder optimiert werden mussten, da LPG verhältnismäßig kostenintensiv ist. Zu diesem Zweck wurde gezeigt, dass das Detergenz gegenüber LPG keine Veränderung der Reinigungsprofile verursachte, und insofern als Ersatz-Detergenz bei kleineren Ansätzen fungieren konnte.

Gereinigtes OR5-Protein, welches in Funktionsstudien oder Kristallisationsansätzen verwendet wurde, resultierte jedoch in allen Fällen aus Isolierungen mit vorangegangener LPG-Solubilisierung.

Tab. 11: Zur Solubilisierung von OR5 verwendete Detergentien. Gezeigt sind alle untersuchten Detergenzien; die Solubilisierungsansätze wurden in einem Volumen von 500 µl angefertigt. Detergentien, welche eine OR5-Solubilisierung von >10%, sind **fett** geschrieben, die %-Werte nach dem Detergenz gegen den Anteil solubilisierten OR5-Proteins bei einer Konzentration von 2% im Reaktionsvolumen an. Alle anderen bewirkten eine OR5-Solubilisierung von <10%.

<p><u>Fluka:</u> Octaethyleneglycol-Monododecylether Octaethyleneglycol-Monotetradecylether Octaethyleneglycol-Monohexadecylether Octaethyleneglycol-Monooctadecylether LDAO, 10,7%</p>	<p><u>Anatrace:</u> Anagrade Hega-8 Anagrade Hega-9 Anagrade Hega-10 Anagrade Mega-8 Anagrade Mega-9 Anagrade Mega-10 N-Dodecylphosphocholine (FOS-12), 38,9%</p>
<p><u>Biomol:</u> Nonyl-β-D-Maltosid Cymal-1 (Cyclohexyl-Methyl-β-D-Maltosid) 1-S-Octyl-β-D-Thioglukosid N-Heptyl-β-D-Glukosid Decyl-β-D-Glukosid N-Tridecyl-β-D-Maltosid N-Tetradecyl-β-D-Maltosid Cymal-2 (Cyclohexyl-ethyl-β-D-Maltosid) Cymal-3 (Cyclohexyl-Propyl-β-D-Maltosid) Cymal-4 (Cyclohexyl-Butyl-β-D-Maltosid) Cymal-5 (Cyclohexyl-Pentyl-β-D-Maltosid) Cymal-6 (Cyclohexyl-hexyl-β-D-Maltosid) N-Nonyl-β-D-Thioglukosid Nonyl-β-D-glukosid Undecyl-β-D-Maltosid N-Decyl-β-D-Maltopyranoside Octyl-β-D-Glukopyranosid N-Dodecyl-β-D-Maltosid</p>	<p><u>Andere:</u> Digitonin (Sigma-Aldrich) C8E5 (Bachem, Bubendorf, Schweiz) 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-glycerol (Avanti Polar Lipids) Zwittergent 3-14 (Calbiochem) Octaethylenglycol Monododecyl Ether (C28H58O9) Octaethylenglycol Monohexadecyl Ether (C32H66O9) LPC (Sigma-Aldrich) Triton (Roth) Sarcosine/Digitonin (Sigma-Aldrich) LPG (Avanti Polar Lipids), 83,2% Zwittergent 3-16 (Calbiochem), 43,1%</p>

3.4.1.2. Immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Bei der Klonierung von *OR5* in den pITy3-Vektor (s. 3.1.2., Abb. 15) wurde C-terminal eine Histidinabfolge sowie eine Flag-Sequenz eingeführt. Deshalb konnte zur Proteinisolierung ein Chromatographieschritt mit Ni-NTA (s. 2.7.2.4.) integriert werden. Der erste Reinigungsschritt wurde durch Bindung des solubilisierten Rezeptorproteins an Ni-NTA-Agarose in Anwesenheit von 5 mM Imidazol und anschließender Elution mit Imidazol durchgeführt. Exemplarisch ist ein Reinigungsprofil in Abbildung 40 dargestellt. In den Fraktionen 35-38 des Wasch-Vorganges mit 50 mM Imidazol erfolgte die Elution von Proteinen, bei welchen es sich jedoch basierend auf

einer Analyse durch Immunoblot nicht um OR5-Protein handelte. Das Zielprotein eluierte über einen Bereich von 14 0,5 ml Fraktionen (ml 48-55) mit einem Elutionsmaximum in den Fraktionen 56/57 (ml 51; 221 mM Imidazol). Die Elutionsfraktionen 53-61 wurden anschließend vereinigt, und ein Aliquot zur Analyse des Reinheitsgrades in der SDS-PAGE analysiert. Obwohl eine Aufkonzentrierung des Zielproteins erreicht wurde, zeigten die zusätzlich zum OR5-Protein im Gel aufgetrennten Proteinbanden deutlich, dass ein einziger Chromatographieschritt zur vollständigen Reinigung von OR5 nicht ausreichte (Abb. 42). Deshalb war die Einführung eines weiteren Reinigungsschrittes notwendig. Da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit bereits hochspezifische OR5-Antikörper vorlagen, sollte die IMAC-Methode mit einer Affinitätschromatographie unter Verwendung der monoklonalen OR5-Antikörper kombiniert und so ein höherer Reinheitsgrad des Geruchsrezeptors erzielt werden.

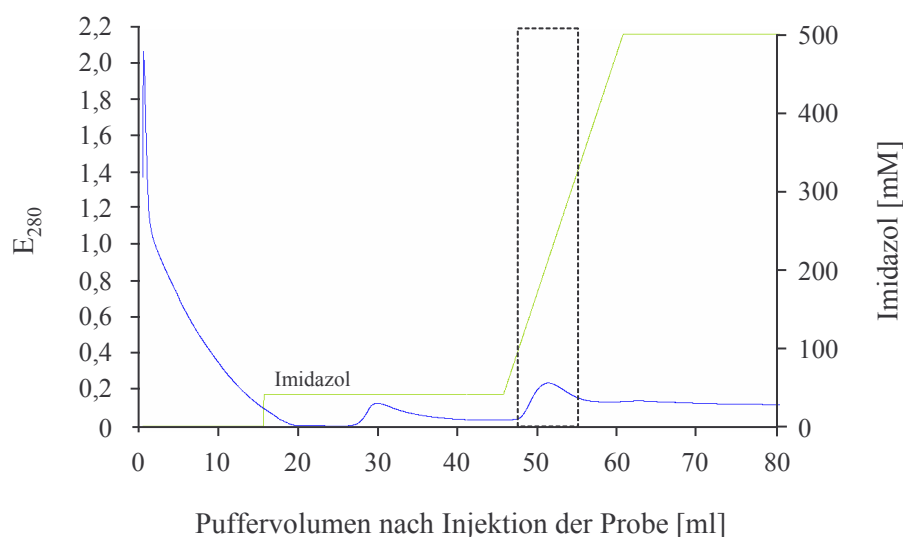


Abb. 40: Elutionsprofil einer Ni-NTA Chromatographie mit LPG-solubilierten Gesamtmembranen des *S. cerevisiae*-Produktionsstammes *w1*. Die Inkubation des Solubilisierungs-Überstandes mit Ni-NTA-Agarose erfolgte über Nacht bei 4°C unter langsamen Schwenken. Die Agarose wurde anschließend in eine Chromatographiesäule überführt und nach dargestelltem Reinigungsprofil gewaschen und mit ansteigender Konzentration Imidazol behandelt. Die Elutions-Fractionen wurden in einem Kollektor gesammelt und weiteren Analysen unterzogen.

3.4.1.3. OR5-Affinitätschromatographie

Monoklonale Antikörper eignen sich nicht nur zur Detektion von Proteinen sondern auch für die Immunopräzipitation eines Antigens. Die Affinitätschromatographie basiert auf der biospezifischen Interaktion zwischen einem Liganden und dessen Zielmolekül. An einer festen Matrix immobilisierte Liganden oder Antikörper binden das Zielprotein, welches im Anschluss gezielt eluiert werden kann. Diese Methode ist sehr effektiv zur Proteinisolierung einsetzbar. Der

einzig kritische Schritt bei der Verwendung einer Antikörper-Chromatographie ist die Elution bei niedrigem pH. Kurzzeitig liegt das eluierte Protein bei einem niedrigen pH-Wert vor, wodurch die Stabilität des Proteins beeinträchtigt werden kann. Durch Integration der hergestellten OR5-Antikörper in die Reinigungsstrategie wurde ein deutlicher Reinigungseffekt gegenüber dem Eluat aus der Ni-NTA-Chromatographie erzielt (Abb. 41).

Zur Herstellung einer Affinitätsmatrix wurde gereinigter OR5-Antikörper mit Hilfe von kruzreaktivem Dimethylpimelimidat an eine *Affi Prep Protein A Matrix* von BioRad gekoppelt (s. 2.5.3). Anschließend wurde ein Chromatographie-Lauf mit einer pH-induzierten Elution des Proteins durchgeführt (s. 2.7.2.6.). Ein Aliquot dieser Probe wurde zur Analyse des Reinheitsgrades in der PAGE getrennt und mit Coomassie G-250 gefärbt.

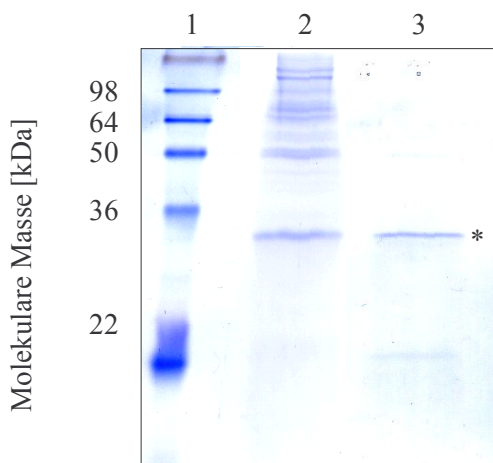


Abb. 41: Vergleich des OR5-Reinheitsgrades nach Ni-NTA- und Ni-NTA+OR5-Affinitätschromatographie. Jeweils ein Aliquot der Ni-NTA-Elution und der Elution der OR5-Affinitätschromatographie wurden einer PAGE unterzogen und mit Coomassie gefärbt. Spur 1: *SeeBlue Plus 2* Größenstandard; Spur 2: Elutionsfraktion der Ni-NTA-Chromatographie; Spur 3: Elutionsfraktion der OR5-Affinitätschromatographie; *: OR5-Monomer.

Durch die Kombination der Ni-NTA- und Antikörper-Affinitäts-Chromatographien wurden zwar größtenteils Verunreinigungen im höhermolekularen Bereich entfernt, durch massenspektroskopische Methoden (AG Oesterhelt, Frank Siedler, MPI für Biochemie, Martinsried) und N-terminale Sequenzierung (AG Lottspeich, MPI für Biochemie, Martinsried) wurde jedoch anstelle von OR5 das 60S-ribosomale Hefeprotein *RL2* identifiziert. Da das OR5-Protein jedoch erfolgreich durch Immunmarkierung nachgewiesen wurde, war die OR5-Probe offensichtlich durch das ribosomale Protein kontaminiert und wurde aufgrund ähnlicher Größe in der Gelelektrophorese nicht abgetrennt.

Um auch diese Kontamination zu entfernen, musste das Reinigungsprotokoll weiter optimiert werden. Zuerst wurde der Versuch unternommen, das ribosomale Protein durch eine geeignete Vor-Fraktionierung der Gesamtmembranen zu entfernen. Diese Fraktionierung ist mit Hilfe eines

kontinuierlichen 10-60% [w/v] Saccharose-Gradienten (s. 2.6.5.1.) möglich: durch die anschließende Zentrifugation reichern sich die Membranbestandteile in dem Bereich des Gradienten an, der ihrer eigenen Schwebedichte entspricht.

Bedingt durch die unterschiedliche Dichte der ribosomalen Proteine und der Membranen konnten 2 Hauptfraktionen isoliert werden, von denen jene mit der geringeren Dichte vorwiegend die Membranen, jene der höheren Dichte die Ribosomen enthalten sollte. Um die Effektivität dieser Methode zu überprüfen, wurde die Verteilung des OR5-Proteins in den einzelnen Fraktionen im Western-Blot analysiert. Wie aus Abbildung 42 ersichtlich wird, konnte der Saccharosegradient nicht als Reinigungsverfahren eingesetzt werden, da ~55% des Zielproteins in der schwereren, der „ribosomalen“ Fraktion (1) nachgewiesen wurden, während sich nur 31,5% des Proteins in der leichteren, der „Membranproteinfraktion“ (3) befanden. 13,8% des Proteins war zudem präzipitiert und während der Zentrifugation sedimentiert.

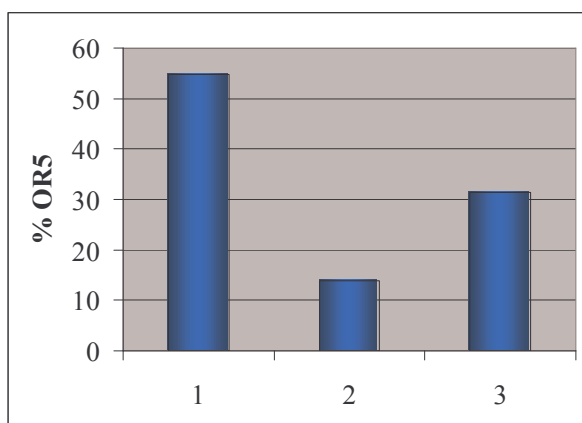


Abb. 42: Verteilung von OR5 in verschiedenen Fraktionen eines 10-60% kontinuierlichen Saccharose-Gradienten. Gesamtmembranen wurden wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben hergestellt und in einem 10-60% [w/v] Saccharosegradienten aufgetrennt. 1: untere Fraktion („ribosomale Fraktion“); 2: Sediment; 3: obere Fraktion („Membranfraktion“). Die Signalstärken im Western-Blot wurden mit *Scion Image* (Scion Corporation, Release Beta 4.0.2) bestimmt und graphisch dargestellt.

Die bisher gewählten chromatographischen Methoden führten offenbar nicht zu einer ausreichenden Reinheit des Geruchsrezeptors. Außerdem wurde durch die Gradientenzentrifugation keine effektive Abtrennung der ribosomalen Proteine vom OR5-Protein erzielt. Aufgrund dessen mußte ein alternativer Reinigungsschritt in Kombination bzw. anstelle eines der bisher verwendeten Chromatographieverfahren eingeführt werden. Ausgewählt wurde ein Ionenaustauscher.

3.4.1.4. Ionenaustauscherchromatographie: MonoS

Das Verfahren der Ionenaustauscherchromatographie (s. 2.7.2.5.) beruht auf der reversiblen Adsorption von geladenen, löslichen Biomolekülen an immobilisierte, geladene Gruppen einer Trägermatrix durch elektrostatische Wechselwirkungen. Die Interaktion ist dabei abhängig von der Ladung des Trägermaterials und der Ladung der Biomoleküle unter gewählten pH-Bedingungen. Es existieren zwei Typen von Ionenaustauscher Gruppen: die Anionenaustauscher mit den geladenen Gruppen Diethylaminoethyl (DEAE) und Quaternary Ammonium (Q) oder Kationenaustauscher mit den Gruppen Carboxymethyl (CM) oder Sulphopropyl (SP). Die Wahl der Ionenaustauschermatrix ist determiniert durch den pI des Zielproteins und die pH-Bedingung. Der pI beschreibt den pH-Wert, bei dem die Anzahl der positiven Ladungen im Molekül der Anzahl der negativen Ladungen entspricht, und das Molekül demnach eine Nettoladung von 0 besitzt. Für diese chromatographische Methode muss daher bei einem pH-Wert gearbeitet werden, der entweder mindestens 1 pH-Einheit unter oder über dem pI des Zielproteins liegt. Bei Proteinen mit einem relativ hohen pI-Wert, wie es für OR5 mit einem pI von 8,4 der Fall ist, ist ein Kationenaustauscher die Methode der Wahl. Gebundene Analyten werden anschließend kompetitiv mit Salz eluiert.

Ausgewählt wurde die MonoS-Säule von Amersham Biosciences. Um eine gute Bindung von OR5 und einen hohen Reinigungseffekt zu erzielen, wurde ein Lauf- und Probenpuffer im Bereich von pH 6,7-7,3 verwendet, bedingt durch den pI-Wert des Geruchsrezeptors. Ein für diesen pH-Bereich geeignetes Puffersystem basiert auf Na-Phosphat. Der Vergleich zweier Natrium-Phosphat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten zeigte, dass die pH-Werte deutlich das Elutionsverhalten von OR5 beeinflussten (Abb. 43).

Während das Zielprotein bei einem pH-Wert von 7,3 innerhalb eines Elutionsmaximums bei 415 mM NaCl eluierte, zeigten sich bei Verwendung des Puffers mit pH 6,7 zwei Elutionsmaxima im Bereich von 222 und 425 mM NaCl. Nach Überprüfung der Verteilung von OR5 innerhalb der Elutionspeaks stellte sich jedoch heraus, dass OR5 über den gesamten Bereich eluierte. Unabhängig vom pH-Wert war OR5 immer auch im Durchfluß zu finden. Da bei einem pH-Wert von 7,3 jedoch eine vorwiegende OR5-Elution im Bereich der Schulter nach dem Elutionsmaximum (462-535 mM NaCl) erfolgte, und somit eine deutlichere Abtrennung des Zielproteins erzielt werden konnte, wurde diese Bedingung für weitere Versuche gewählt.

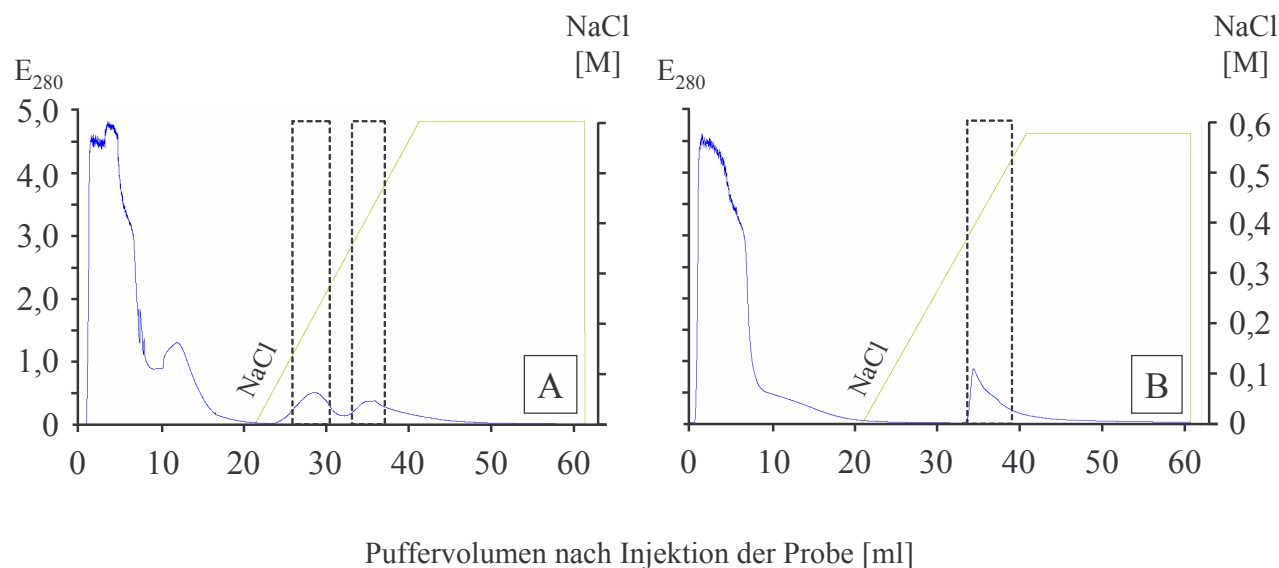


Abb. 43: Elutionsprofile LPG-solubilisierter Gesamtmembranen des *S. cerevisiae*-Produktionsstammes w1 in der MonoS-Chromatographie. Vergleich verschiedener pH-Werte des Natriumphosphat-Puffers: A: pH 6,7; B: pH 7,3. Gestrichelte Kästen markieren die untersuchten Elutionsfraktionen.

Um einen optimalen Reinigungseffekt zu erzielen, musste vorerst geklärt werden, welche Chromatographieverfahren in welcher Kombination die besten Ergebnisse erzielen. Deshalb wurden parallel zwei Reinigungen von Zwittergent 3-16 solubiliertem OR5 durchgeführt: die Hälfte des solubilierten Proteins wurde für eine Reinigung mittels IMAC (s. 2.7.2.4.) und OR5-Affinitätschromatographie (s. 2.7.2.6.) verwendet, während die andere Hälfte einer Kationenaustauschchromatographie mit anschließender OR5-Affinitätschromatographie unterzogen wurde. Das jeweils erhaltene Eluats nach der OR5-Affinitätschromatographie wurde im Western-Blot mit dem OR5-Antikörper 22-145-3 untersucht. Sehr deutlich ist ein Unterschied in der detektierten Menge des Rezeptors nach den verschiedenen Reinigungen zu erkennen (Abb 44). Obwohl aus Gründen der Vergleichbarkeit gleiche Volumina der jeweiligen Elutionsfraktionen verwendet wurden, lag der Geruchsrezeptor im Eluat der Ni-NTA/OR5-Affinitätschromatographie deutlich über der Detektionsgrenze im Western-Blot (Spur 1), während die OR5-Ausbeute unter Verwendung des Kationenaustauschers minimal war (Spur 2).

Eine mögliche Erklärung für dieses Resultat ist eine strukturelle Veränderung des Zielproteins durch Inkubation mit dem „harten“ Ionenaustauscher, so dass der C-Terminus eventuell in der nachfolgenden Affinitäts-Chromatographie nicht mehr zugänglich war.

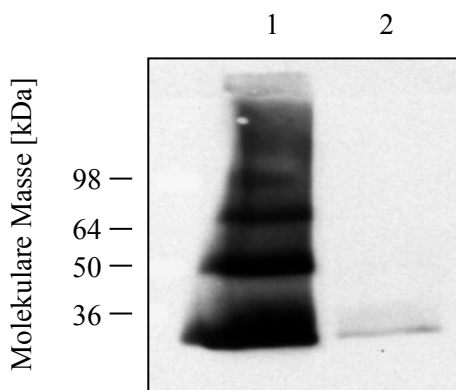


Abb. 44: Nachweis von OR5 im Western-Blot nach Ni-NTA/OR5-Affinitätschromatographie und MonoS/OR5-Affinitätschromatographie. Die Elutionsfraktionen der OR5-Affinitätschromatographie wurden mit 25% TCA gefällt und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis von OR5 im Western-Blot erfolgte mit OR5-Antikörper. Spur 1: Elution nach Aufreinigung mit Ni-NTA und OR5 Affinitätschromatographie; Spur 2: Elution nach Aufreinigung mit MonoS und OR5-Affinitätschromatographie.

Da der Gebrauch der untersuchten Kationenaustauscherchromatographie-Methode zu einem hohen Verlust des Zielproteins führte, wurde die Verwendung dieser Methode verworfen. Aufgrund weiterer Optimierungen der IMAC parallel zu den Arbeiten mit der MonoS-basierten Chromatographie konnten Bedingungen identifiziert werden, die zu einer erhöhten Reinheit des Zielproteins führten. Aufgrund dessen wurde die schon etablierte Kombination Ni-NTA/OR5-Affinitätschromatographie nach Optimierung der IMAC verwendet (siehe Abb. 47): so wurde zum einen die Imidazol-Konzentration während der Inkubation des Solubilisierungsüberstandes mit der NTA-Agarose von 5 mM auf 10 mM Imidazol erhöht. Zum anderen wurde die Agarose mit 45 statt 20 SV in Anwesenheit von 50 mM Imidazol gewaschen. Mit diesem Protokoll wurde die Reinheit des Rezeptorproteins erhöht, und in Folge die Anfangssequenz TERNQTV von OR5 in dieser Präparation durch N-terminale Sequenzierung nachgewiesen (AG Prof. Lottspeich, Lauf-Nr. 133, 08.06.04). Offensichtlich konnte die Kontamination durch das ribosomale Protein *RL2* durch die Optimierung der Inkubations- und Waschbedingungen eliminiert werden.

3.4.1.5. Gelfiltration an Sephadex S-200

Es ist bekannt, dass die Tendenz von Proteinen, Kristalle auszubilden, mit ihrem Reinheitsgrad, aber auch mit der Zunahme der Monodispersität steigt. Da dies vor allem Proteine betrifft, die selten kristallisieren - wie z.B. Membranproteine - sollte dieser Aspekt durch die Verwendung der Gelfiltration (s. 2.7.2.7.) berücksichtigt werden. Dieser finale Reinigungsschritt erhöhte erneut den Reinheitsgrad des Zielproteins, sodass die Proteinisolierung abgeschlossen werden konnte.

Während der Gelfiltration erfolgt eine Auftrennung der Proteine über ihr apparentes Molekulargewicht. Die Trennung basiert auf dem unterschiedlichen Permeationsverhalten der Moleküle durch ein definiertes, poröses Trägermaterial, wobei das hydrodynamische Volumen

der Probenmoleküle ihre Aufenthaltsdauer in der Matrix bestimmt. Dadurch können eventuell vorhandene Oligomere des Proteins vom Monomer abgetrennt werden. Zusätzlich kann dieser Chromatographieschritt für einen Austausch des Probenpuffers genutzt werden.

Aufgrund der geringen Proteinmengen konnte eine *Superdex-200* Säule mit einem SV von 2,4 ml (Pharmacia Biotech AB) verwendet werden. Als Laufpuffer diente Glycerin-freier Niedrigsalzpuffer. Im Elutionsprofil (Abb. 45) sind in den Fraktionen 4 bis 13 (0,86-1,66 ml) mindestens 4 Maxima zu erkennen, welche nach genauerer Untersuchung durch Western-Blot-Analysen (s. 2.6.11.) alle eluiertes OR5-Protein enthielten. Der Vergleich von Western-Blot und Coomassie-Färbung zeigte, dass die Fraktionen 11-13 (1,42-1,66 ml) die größte Menge des OR5-Proteins sowie die geringsten Kontaminationen enthielten. Das Maximum bei 1,47 ml ist nach Vergleich mit dem Größenstandard auf ein Molekül mit einer Größe von ~ 114.000 Da zurückzuführen. Hierbei handelt es mit aller Wahrscheinlichkeit um das OR5-Monomer (37 kDa), eingebettet in eine Digitonin-Mizelle (60×1.229 Da). Die Berechnung erfolgte anhand der Kav-Werte, die linear gegen die logarithmisch aufgetragenen Molekulargewichte der Standardproteine geplottet wurden. Dabei ist $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$, wobei V_e dem Elutionsvolumen, V_o dem Totvolumen (0,9 ml) und V_t dem Bettvolumen (2,4 ml) der Säule entspricht. Alle größeren Komplexe sind vermutlich auf größere Mizellen mit eventuell höherer Anzahl OR5-Moleküle oder auch Aggregate zurückzuführen.

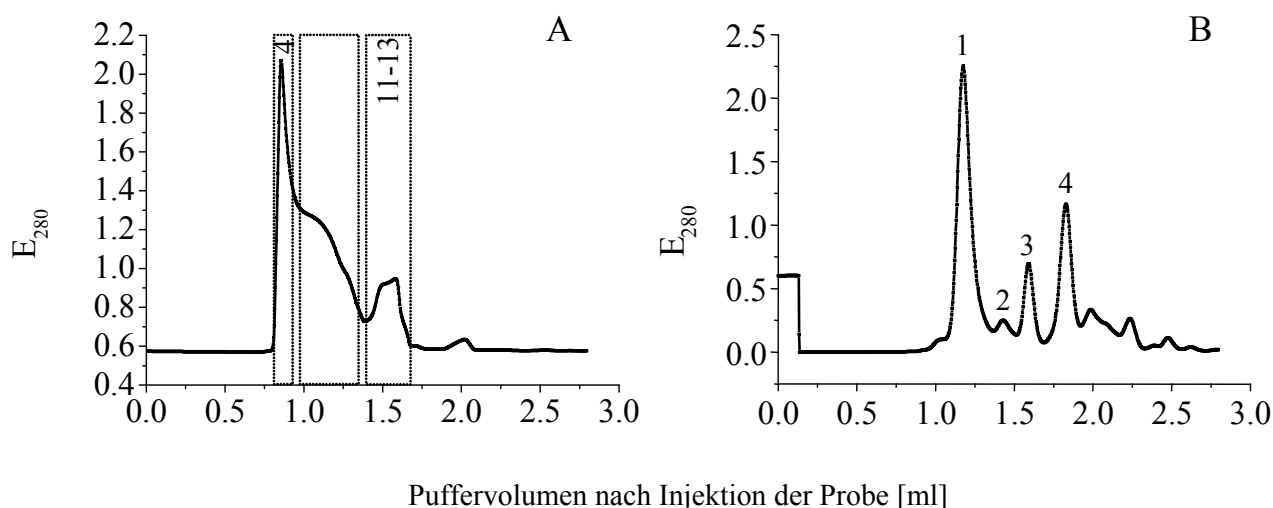


Abb. 45: Elutionsprofil der Gelfiltration einer OR5-Protein-haltigen Probe nach Ni-NTA und Antikörper-Chromatographie. A: Elutionsprofil der OR5-haltigen Proteinprobe; B: Elutionsprofil des Standards (Amersham Biosciences): 1: Ferritin, 440 kDa; 2: Aldolase 158 kDa; 3: Ovalbumin, 43 kDa; 4: Ribonuklease A, 13.700 Da. Gestrichelte Kästen markieren die untersuchten Elutionsfraktionen.

Die Fraktionen 11-13 (Abb. 46) wurden nach entsprechender Konzentrierung für nachfolgende Experimente, z. B. Tryptophanfluoreszenz Messungen, CD-Analysen und Kristallisationsansätze verwendet.

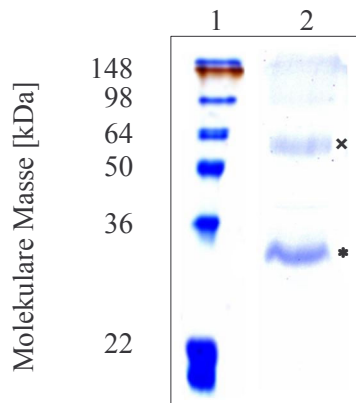


Abb. 46: Coomassie-Färbung des isolierten OR5-Rezeptors aus dem *S. cerevisiae*-Produktionsstamm *w1* nach einer abschließenden Gelfiltration. 1, Größenstandard; 2, Fraktionen 11-13. *, OR5-Monomer; x, OR5-Dimer.

Durch die Optimierung des Isolierungsverfahrens (Abb. 47) konnten letztendlich jeweils ca. 0,125-0,175 mg OR5/l Kultur mit einem hohen Reinheitsgrad isoliert werden.

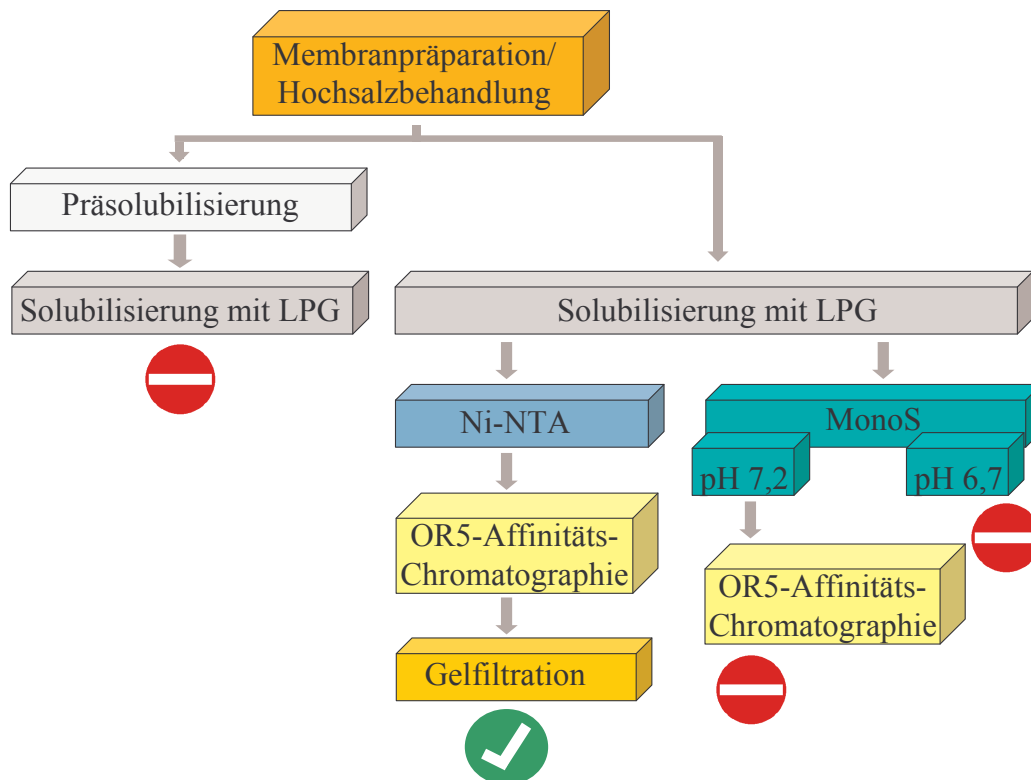


Abb. 47: Übersicht über die Reinigungsstrategien zur Isolierung von OR5. Nach Optimierung der Ni-NTA/OR5-Affinitätschromatographie wurde diese Methodenkombination zur Isolierung des Geruchsrezeptors verwendet.

3.4.2. Isolierung von OR5 aus *OR5-SFV1Cap*-infizierten P19-Zellen

Durch die virale Infektion mit dem verwendeten Semliki Forest Virus wird die Translationsmaschinerie der Wirtszelle zum größten Teil für die Produktion von viral kodierten Proteinen eingesetzt. Zum einen resultiert daraus die hohe und schnelle Letalität der Zellen, zum anderen werden dadurch große Mengen des Zielproteins gebildet, welches zudem in einem relativ hohen Reinheitsgrad vorliegt, da weniger kontaminierende endogene Zellproteine gebildet werden (Lundstrom, K. *et al.*, 1994). Um zu überprüfen, ob dieser Umstand eine schnellere und verbesserte Reinigung des Rezeptors ermöglicht, wurde parallel zu den Reinigungen von OR5 aus *S. cerevisiae* eine Proteinisolierung aus OR5-produzierenden P19-Zellen durchgeführt.

Zur Expression wurden die *OR5-Cap-SFV1*-infizierten Zellen 12 h kultiviert. Anschließend erfolgte eine Gesamtmembranpräparation. Ausgehend von diesen Membranen wurde eine Solubilisierung und Reinigung des Geruchsrezeptors - wie schon für das Hefeexpressionssystem beschrieben – durchgeführt (s. 2.7.). Die Proteinprobe wurde anschließend ohne Durchführung einer Gelfiltration mittels SDS-PAGE analysiert, und eine wässrige Probe für die N-terminale Sequenzierung eingesetzt. Wie aus Abbildung 48 ersichtlich, konnte eine hohe Reinheit des Geruchsrezeptor-Monomers erzielt werden.

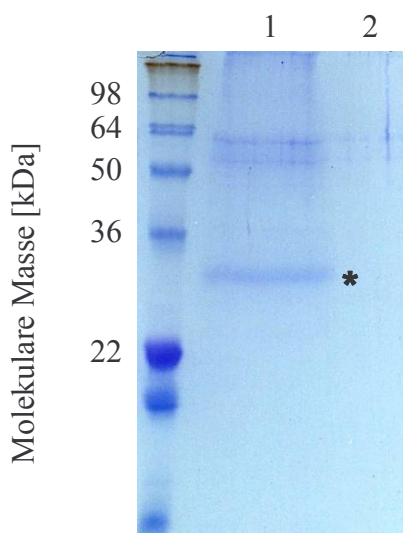


Abb. 48: Isolierung von OR5 aus P19-Zellen nach Infektion mit *OR5-SFV1Cap* #6. Nach Ni-NTA und OR5-Affinitätschromatographie wurde eine Probe des Eluates einer SDS-PAGE unterzogen und mit Coomassie angefärbt. Spur 1, Elutionsfraktion; Spur 2, Auftragspuffer; *: OR5-Monomer.

Die Proteinbanden zwischen 55 und 60 kDa rühren von Verunreinigungen im Auftragspuffer her, wie aus einem Vergleich mit der Spur 2, in der nur Auftragspuffer verwendet wurde, zu erkennen ist.

Durch eine Edman-Proteinsequenzierung wurde die N-terminale Aminosäurefolge GSSTTMGGC ermittelt (AG Prof. Lottspeich, MPI f. Biochemie, Martinsried; Lauf-Nr. 43, 20.02.04). Diese

entspricht dem N-terminalen Abschnitt der Aminosäuresequenz des His₆/Xa/OR5 Fusionsproteins (s. 3.1.1., Abb. 7) inklusive der zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen. Die Reinheit des isolierten Fusionsproteins betrug >95% (mündliche Mitteilung Herr Mentele, AG Prof. Lottspeich).

Da es sich bei den P19-Zellen um adhärent wachsende Zellen handelt, konnten jedoch nur sehr geringe Zellzahlen und damit geringe Proteinausbeuten erzielt werden. Daher wurde die Entscheidung getroffen, dass trotz eines sehr hohen Reinheitsgrades des aus P19-Zellen gewonnenen Zielproteins eine Verwendung dieses Zellsystems zum Zwecke der quantitativen Proteinisolation nicht in Frage kam.

3.4.3. Isolierung des OR5-Proteins: Zusammenfassung

Der heterolog produzierte Rezeptor OR5 wurde aus Gesamtmembranen von *S. cerevisiae w1* durch Solubilisierung, Ni-NTA-Chromatographie, OR5-Affinitätschromatographie und Gelfiltration isoliert. Die Ausbeute lag aufgrund der geringen Solubilisierungsraten und Verlusten während der Chromatographien im Bereich von ~5%. Die N-terminale Sequenzierung sowie Immunmarkierung im Western-Blot belegte eindeutig die Existenz von OR5 in der Proteinprobe am Ende der Isolierung. Durch die Analyse der Proteinprobe konnte ein Reinheitsgrad des Geruchsrezeptors von >90% abgeschätzt werden.

Isolierter Rezeptor aus rekombinanten P19-Zellen wies sogar einen Reinheitsgrad von >95% auf und wurde ebenfalls durch N-terminale Sequenzierung bestätigt. Aufgrund geringer Zellzahlen konnte das Säugerzellsystem jedoch nicht für die quantitative Isolierung des Geruchsrezeptors genutzt werden.

Auf der Basis der bislang durchgeführten Untersuchungen konnte noch nicht beurteilt werden, ob das isolierte Protein funktionell vorliegt. Der Faltungsstatus des Rezeptors sollte nunmehr durch CD-Spektroskopie, und die Funktionalität über Bindungsstudien mit Hilfe der Protein-eigenen Tryptophanfluoreszenz ermittelt werden.

3.5. Charakterisierung des isolierten OR5-Proteins

3.5.1. CD-Spektroskopie

Das Phänomen des „zirkulären Dichroismus“ kann zur Messung der optischen Aktivität asymmetrischer Moleküle in Lösung genutzt werden. Der zirkuläre Dichroismus beschreibt die Abhängigkeit der Differenz der Absorptionskoeffizienten zwischen links- und rechtszirkulär polarisiertem Licht einer chiralen Verbindung von der Wellenlänge. Zirkulärdichroismus und optische Rotationsdispersion werden zusammen als „Cotton Effekt“ beschrieben, wobei das Auftreten von Absorptionsmaxima einer chiralen Verbindung in Abhängigkeit von der Wellenlänge dargestellt wird. Die charakteristischen Cotton Effekte von Peptidbindungen liegen in den Bereichen 222 (n- π^* -Transition), 208-210 (π - π^* (II)-Transition) und 191-193 nm (π - π^* (\perp)-Transition). Anhand dieser Effekte kann der α -helikale- bzw. β -Faltblatt-Anteil eines Proteins bestimmt werden (s. 2.6.15.). Da es bei vollständig denaturierten Proteinen zur Aufhebung der positiven und negativen Cotton-Effekte kommt, kann demnach gezeigt werden, ob sich das examinierte Protein in einem gefalteten Zustand befindet.

Die vermessene OR5-Proteinprobe wies zwei negative Minima bei 222 und 209 nm sowie einen positiven Cotton-Effekt zwischen 195 und 203 nm auf (Abb. 49). Dieser Verlauf ist charakteristisch für einen hohen Anteil an α -Helices.

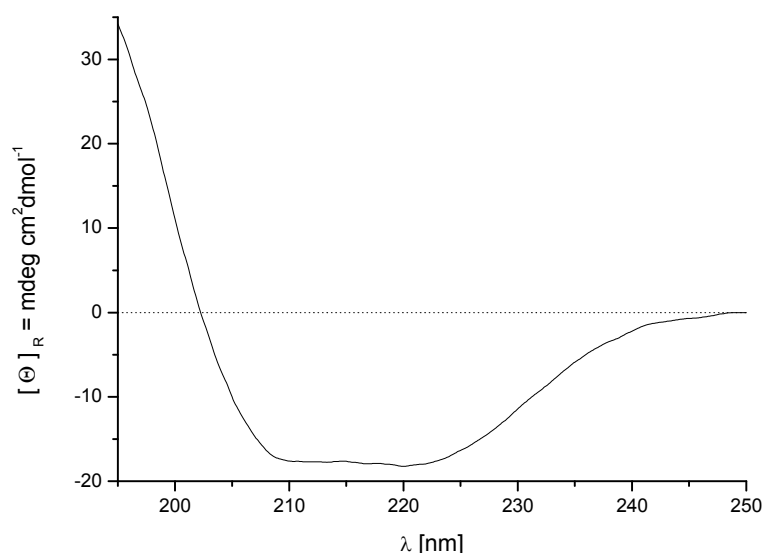


Abb. 49: CD-Spektrum des isolierten OR5-Proteins. Eine Probe der Fraktionen 11-13 aus der Gelfiltration wurde zur Erstellung des CD-Spektrums verwendet. Die Probe lag in 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl und 0,05% Digitonin vor. Die Messung erfolgte bei 4°C, einer Bandweite von 1 nm, einer Scan-Geschwindigkeit von 50 nm/min sowie einer Küvetten-Schichtdicke von 0,1 cm. Vier Scans wurden zur Erstellung der gezeigten CD-Kurve gemittelt und gegen einen Puffer-Leerwert korrigiert.

Basierend auf einer Analyse der OR5-Aminosäuresequenz mit Hilfe des Vorhersage-Programmes *PROFsec* (Rost, B., 2004) liegt der α -helikale Anteil des Proteins im Bereich von 56%. Es handelt sich demnach um ein überwiegend α -helikales Protein, wie für den isolierten Rezeptor ebenfalls durch die CD-Messung belegt wurde.

3.5.2. Funktionalität des Rezeptors: Analyse der Tryptophanfluoreszenz

Geruchsrezeptoren sind funktionell aktive Proteine, welche durch Ligandenbindung über eine Konformationsänderung Informationen an G-Proteine im Zellinneren weiterleiten. Da es sich nicht um enzymatische Proteine handelt, ist ein Nachweis der Funktionalität nicht über Substratumsetzungen nachvollziehbar. Deshalb war der direkte Nachweis einer Ligandenbindung notwendig, um zu überprüfen, ob funktionell aktiver Rezeptor synthetisiert und isoliert werden konnte. Anhand der nachfolgenden Untersuchung wurde gezeigt, dass über 90% der isolierten Rezeptorspezies eine Liganden-induzierte Reduktion der Tryptophanfluoreszenz aufwiesen.

In vitro ist es möglich, Konformationsänderungen von Proteinen über Veränderungen ihrer Autofluoreszenz nachzuweisen. Die drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin weisen dominante Autofluoreszenzen mit einem Absorptionsmaximum im Bereich von ~280 nm auf (worauf auch hauptsächlich der photometrische Nachweis von Proteinen beruht). Der größte Emissionsanteil ist dabei auf Tryptophan zurückzuführen. Eine Veränderung der Tryptophan-Umgebung innerhalb oder auch an der Oberfläche eines Proteins, zum Beispiel eine Änderung der Polarität oder des pH-Wertes, führen zu einer Verschiebung oder einem „Löschen“ der Emissionsmaxima des Tryptophans. So wird ein Tryptophan, welches sich in einer hydrophoben Tasche befindet, bei Excitation eine schwächere Emission aufweisen als ein Tryptophan in wässriger Umgebung. Komplexbildungen oder Ligandenbindungen können demnach die Tryptophanemission verändern, wenn sich durch eine Bindung die direkte Umgebung des/der zu messenden Tryptophans/Tryptophanmoleküle ändert. OR5 enthält nur ein einzelnes Tryptophan innerhalb der Transmembrandomäne IV an Position 149 der Aminosäuresequenz, welches zudem im Bereich der putativen Ligandenbindestelle liegt (Singer, M. S. und Shepherd, G. M., 1994). Die fusionierten Histidin- und Flag-Sequenzen enthielten keine weiteren Tryptophane, welche das Fluoreszenzspektrum des Proteins beeinflusst hätten. Dieser Umstand sollte es ermöglichen, eine Konformationsänderung durch Ligandenbindung bzw. eine Ligandenbindung im Bereich des Tryptophans über eine Veränderung der Emission bei 328 nm sichtbar zu machen, wie bereits durch Kiefer und Mitarbeiter für OR5 aus transformiertem *E. coli* gezeigt wurde (Kiefer, H. *et al.*, 1996).

Die bisher bekannten Liganden des Geruchsrezeptors OR5 aus *R. norvegicus* sind Lilial (Abb. 50) und Lylal. Deshalb wurde die Tryptophanfluoreszenzemission des Rezeptors in Abhängigkeit von Lilial vermessen (s. 2.8.).

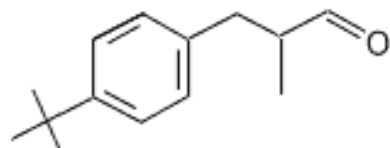


Abb. 50: Strukturformel von Lilial.

Hierfür wurde die Fluoreszenzemission des isolierten Rezeptors nach Zugabe von steigenden Liliakonzentrationen gemessen. Die Emissionswerte wurden für jede Ligandenkonzentration aufgezeichnet, und die relativen Fluoreszenzintensitäten nach Subtraktion der Emissionen des Liganden in TBS berechnet (Abb. 51).

Eine konzentrationsabhängige Abnahme der Fluoreszenz des nicht denaturierten Rezeptorproteins nach Zugabe des Liganden trat auf. Der steile Abfall der Fluoreszenz schon bei niedrigen Liliakonzentrationen (10 und 100 μM) weist auf eine affine, definierte Liganden-Rezeptor-Bindung hin. Der durch Zugabe von 0,4% [w/v] SDS denaturierte Rezeptor diente als Negativkontrolle und wies einen signifikant schwächeren Abfall der gemessenen Fluoreszenz auf. Zusätzlich war deutlich zu erkennen, dass die Abnahme der Emission nicht der für das native Protein beobachteten annähernd „exponentiellen“ Abnahme entsprach, sondern bis zu einer Liliakonzentration von $\sim 100 \mu\text{M}$ eher konstant blieb, um dann bei höheren Liganden-Konzentrationen nahezu linear abzunehmen. Dieser Kurvenverlauf deutet auf eine unspezifische Reaktion oder auf eine Restaktivität durch unvollständige Denaturierung bzw. Rückfaltung des SDS-denaturierten Rezeptorproteins hin. Der deutliche Anstieg im niedermolaren Bereich des Liganden kann nicht auf eine Autofluoreszenz des Liganden zurückgeführt werden, da die dargestellten Werte bereits gegen die Kontrollwerte normalisiert worden waren. Dieser Verlauf könnte auf eine unspezifische Reaktion des Rezeptors mit dem Liganden zurückzuführen sein, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft wurde.

Eine weitere Kontrolle wurde mit isoliertem Rezeptor und einem Rezeptortyp-fremden Liganden, Octanal, durchgeführt. Trotz identischer Bedingungen zur Messung mit nicht denaturiertem OR5-Protein und Lilial wurde ein signifikant unterschiedlicher Verlauf der Emissionsänderung beobachtet. Eine steile Abnahme der Tryptophan-Emission bei niedrigen Liganden-Konzentrationen bleibt aus, erst bei höheren Konzentrationen des Liganden Octanal entsteht ein ähnlicher Kurvenverlauf mit vergleichbarem Emissions-Endpunkt bei maximaler

Ligandenkonzentration wie es schon für den SDS-denaturierten Rezeptor beobachtet wurde. Beide Kontrollen belegen, dass eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem isolierten Rezeptor und Lilial auftrat und ein großer Prozentsatz des isolierten Rezeptors im aktiven Zustand vorliegt.

Zur weiteren Auswertung der Daten wurde angenommen, dass die relative Fluoreszenzintensität des Rezeptors ohne Liganden $F_0=1$ ist, und die des Rezeptors mit Liganden F_1 . Außerdem wurde vorausgesetzt, dass die Konzentrationen des ungebundenen Liganden $[x]$ gleich der totalen Ligandenkonzentration ist, da bei einer Rezeptorkonzentration von ~ 100 nM mit einem Liganden-Überschuß gemessen wurde. Daraus ergibt sich die Bindungsgleichung $y=(K_D+F_1*[x])/([x]+K_D)$, wobei K_D der Dissoziationskonstanten des Rezeptor/Liganden-Komplex entspricht. Die Funktion wurde anschließend an die erhaltenen Werte des nicht denaturierten Rezeptors + Lilial angepasst, um den K_D -Wert der Reaktion zu berechnen. Dadurch konnten ein Anteil von 91% funktionellen Rezeptors an dem gesamten isolierten Protein bei hohen Ligandenkonzentrationen und ein K_D -Wert von $94\mu\text{M}$ bestimmt werden.

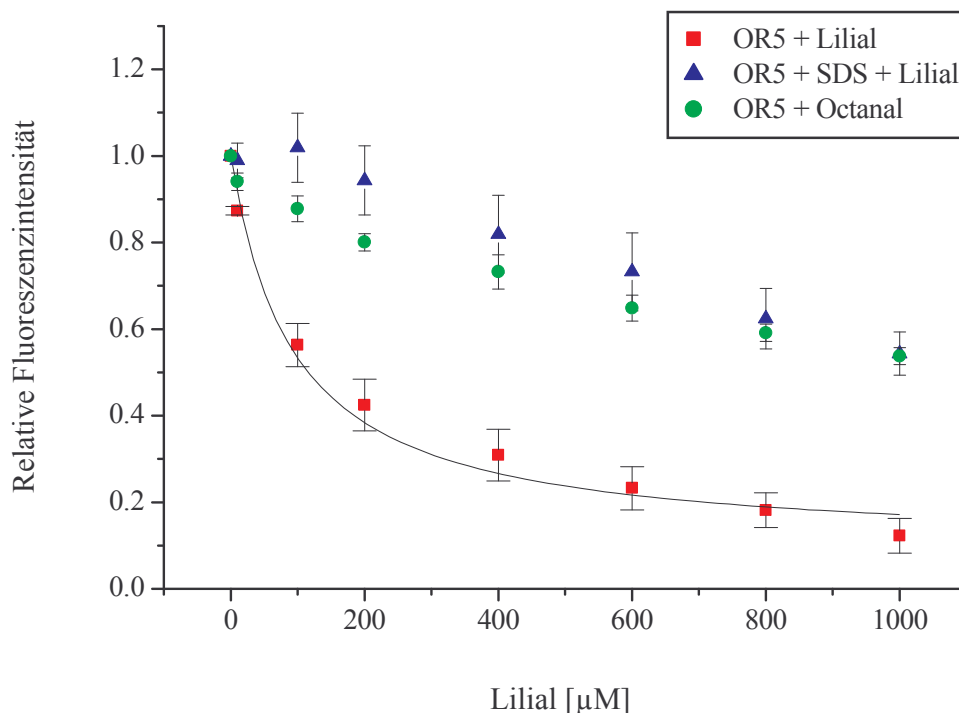


Abb. 51: Tryptophanfluoreszenz des OR5-Proteins in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration. LPG-solubilisierter und durch Affinitätschromatographien und Gelfiltration isolierter OR5-Rezeptor aus dem *S. cerevisiae* Expressionsstamm 5/5w in 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,02% Digitonin wurde in einer Endkonzentration von ~ 33 $\mu\text{g/ml}$ in einem Volumen von 3 ml vermessen. ■: OR5-Rezeptor + Lilial; ▼: in 0,4% SDS denaturierter OR5-Rezeptor + Lilial; ◆: OR5-Rezeptor + Octanal. Die dargestellten setzen sich aus jeweils 3 unabhängigen Messreihen zusammen; alle Werte wurden durch Subtraktion der entsprechenden Nullwerte (Puffer + Ligand) korrigiert. Die Standardabweichungen wurden durch den SEM-Wert dargestellt (Stabw: (\sqrt{n}) , wobei $n=3$).

3.5.3. Kristallisation von OR5

Ein weiteres Ziel der Etablierung optimierter Expressionsstämme und der Reinigung des Geruchsrezeptorproteins war der Erhalt von homogenem Protein für strukturelle Untersuchungen. Nachdem gezeigt wurde, dass mit dem verwendeten Reinigungsprotokoll eine Reinheit von >90% erzielt werden kann, sollte das Rezeptorprotein kristallisiert werden (s. 2.9.).

Das Grundprinzip eines Kristalls ist der geordnete, symmetrische Aufbau einer immer wiederkehrenden Einheitszelle, der kleinsten Einheit des Kristalls. Ursprünglich wurde die Kristallisation als Reinigungsschritt von chemischen und biologischen Substanzen verwendet, da Kristalle eine hohe Homogenität aufweisen. Diese strukturierte Homogenität ist bedingt durch die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften von Molekülen sowie dem notwendigen, energetisch günstigen Zustand eines Kristalls.

Proteinkristalle werden aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften vor allem zur strukturellen Analyse genutzt. Dabei ist die Fähigkeit eines Kristalls, Röntgenstrahlung zu beugen von entscheidender Bedeutung. Dies wird jedoch nur in Kristallen hoher Qualität beobachtet. Um geeignete Bedingungen zu identifizieren, in denen hochwertige Kristalle entstehen können, müssen demnach eine Reihe von Zusätzen untersucht werden, welche die Kristallisation des Zielproteins ermöglichen. Zu diesem Zweck werden sogenannte Kristallisations-„Screens“ eingesetzt.

Die verwendete Kristallisationstechnik war die Methode des „hanging drop“, da hierfür relativ geringe Volumina der Proteinlösung nötig sind. Die Ansätze wurden zwar bei RT pipettiert, anschließend jedoch dauerhaft bei konstant 18°C gelagert. Verwendet wurde der *Crystal Screen Kit Basic* von Sigma-Aldrich. Kristallisations-„Screens“ bieten durch die Kombination von verschiedenen Faktoren, wie unterschiedliche pH-Werte und Fällungsmittel, einen breiten Bereich an Bedingungen, unter denen ein Protein kristallisieren könnte. Da aus der Literatur bekannt ist, dass eine Ligandenbindung die Kristallisationsfähigkeit positiv beeinflussen kann, wurden verschiedene Bedingungen auch zusätzlich mit Ligand versetzt. So wurde z.B der *Crystal Screen* in zwei Teile aufgeteilt, wobei in der ersten Hälfte (Bedingung Nr. 1 - Nr. 25) gereinigtes Protein eingesetzt wurde, während in der zweiten Hälfte (Bedingung Nr. 26 - Nr. 49) mit gereinigtem Protein - versetzt mit 1,2 mM Ligand - gearbeitet wurde. Die Probe stammte in diesem Fall aus einer vorher durchgeführten Tryptophanfluoreszenz-Messung und wurde zur optimalen Ausnutzung anschließend nicht verworfen, sondern auf eine Konzentration von ca. 6 mg/ml eingengt und für Kristallisationsansätze verwendet.

Die Kristallisation des OR5-Rezeptors führte zur Bildung von verschiedenen, nadelförmigen Kristallen. Des Weiteren wurden sehr dünne, trigonale Kristalle in Bedingung Nr. 2 beobachtet, welche jedoch nach 4 Tagen wieder zerfielen. Unter der Bedingung Nr. 11 entstanden 158 Kristalle unterschiedlicher Größe mit überwiegend oktaedrischer Form (Abb. 52; A). Der Puffer dieser Bedingung enthielt 0,1 M Natriumzitat (pH 5,6) sowie 1 M Ammonium-Dihydrogenphosphat. Der Gebrauch der Bedingung Nr. 43 führte zur Bildung eines kleinen, eventuell kubusförmigen Kristalls sowie einer längeren Nadel (E, F). Der Gebrauch von Additiven (Kombination der Bedingungen 24, 37 und 42 mit den Additiven 1-25 aus dem *Additive Screen*TM von Hampton Research) führte zur Ausbildung eines weiteren Proteinkristalls: bei Verwendung des Additivs Strontiumchlorid entstand unter der Puffer-Bedingung 43 ein einzelner quadratischer Kristall (G). Ein wichtiges Merkmal der Kristalle A, F und G ist ihre Entstehungsphase. Sie wurden erstmals 6 Monate nach Anfertigung des Kristallisationsansatzes beobachtet. In Anwesenheit von 1 mM Lillial, dem Rezeptorliganden, konnte die Bildung stärkerer Nadeln (Bedingung Nr. 43, E) sowie eines rechteckigen, polarisierenden Kristalls (Bedingung Nr. 37, D) beobachtet werden. Bei letzterem handelte es sich um den größten Kristall mit einem Ausmaß von ca. 120x 40 µm.

Die Entscheidung, ob eine kristalline Struktur aus Protein oder Salz besteht, ist ohne detaillierte Untersuchungen nicht möglich. Ein Merkmal eines Proteinkristalles ist unter anderem seine Fähigkeit, Licht zu polarisieren. Dennoch reicht dieser Effekt nicht aus, um im Vorfeld eine eindeutige Zuordnung von Protein oder Salz durchzuführen: selbst einige Kristalle aus anorganischen Salzen polarisieren Licht, manche Proteinkristalle aufgrund ihrer Form wiederum nicht. Eine Licht-Polarisation wurde für die Kristalle der Bedingungen Nr. 11, 24, 37 und 43 beobachtet. Unter Bedingung Nr. 24 wurde eine Polarisation durch den Kristall nur für den in Abbildung 52 A ausgewiesenen Kristall gezeigt, jedoch nicht für den Nadelkuster der gleichen Bedingung (B).

Alle in Abbildung 52 aufgeführten Kristalle wurden bei 100 K tiefgefroren und röntgenkristallographisch untersucht. Diese Analyse der Kristalle ergab, dass es sich in allen Fällen mit aller Wahrscheinlichkeit um Protein-Kristalle handelte, da keine Salzreflexionen auftraten. Die Identifikation von Proteinkristallen wird in der Regel durch N-terminale Sequenzierung durchgeführt. Diese Methode eignet sich jedoch nur, wenn genügend Material einer Kristall-Spezies vorhanden ist. Da häufig jedoch nur einzelne Kristalle entstehen, können diese über die sensitive Methode der Silberfärbung in der PAGE sichtbar gemacht und mit dem Zielprotein verglichen werden. Eine abschließende Identifizierung ist dadurch jedoch nicht

möglich, da nur die Laufeigenschaften des Kristallproteins analysiert werden. Die Analyse der Kristalle in der PAGE wird in Kürze noch durchgeführt, kann jedoch nicht im Rahmen der vorgelegten Arbeit erörtert werden. Die Qualität der Kristalle ließ keine Beugung der Röntgenstrahlung zu, weshalb keine Strukturaufklärung des OR5-Proteins durchgeführt werden konnte.

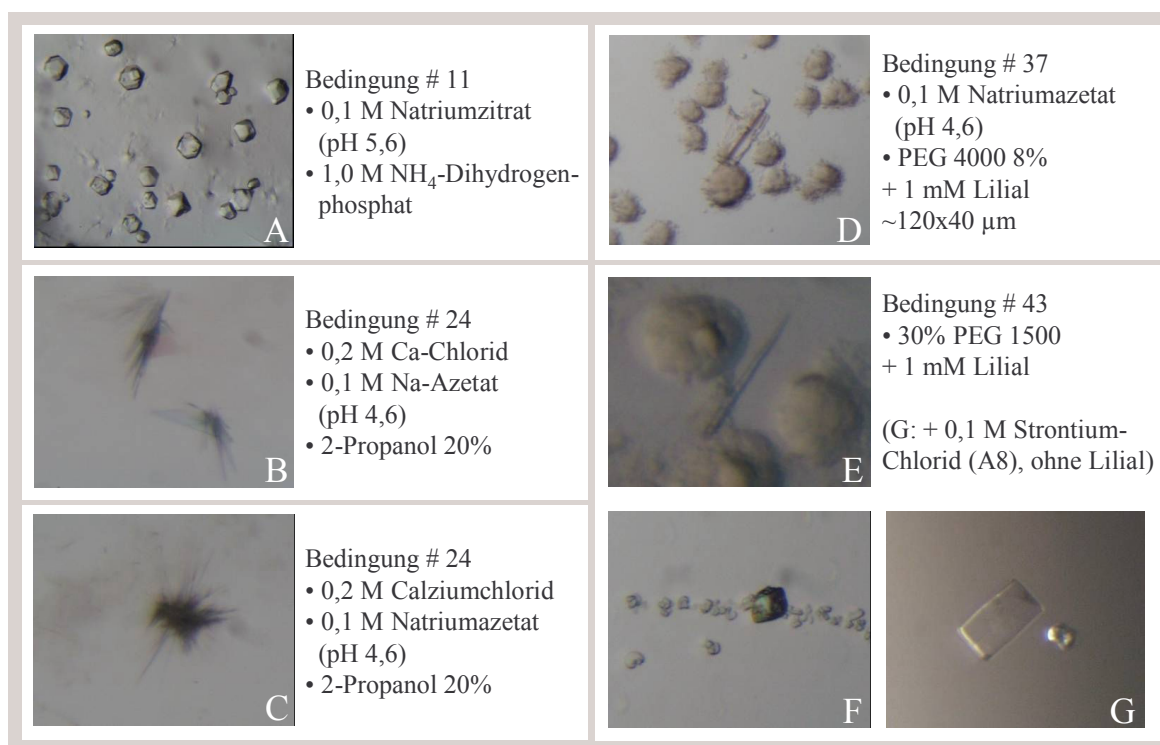


Abb. 52: Protein-Kristalle. Proben des aus *S. cerevisiae w1* isolierten OR5-Proteins wurden zur Untersuchung der kristallisierbarkeit mit verschiedenen Bedingungen des *Crystal screen basic* von Sigma-Aldrich versetzt. Es bildeten sich verschiedene hexagonale (A), nadelförmige (B, C, E) und quadratische (D, F, G) Kristalle aus.

3.5.4. Charakterisierung des isolierten OR5-Proteins: Zusammenfassung

Mit dem verwendeten *S. cerevisiae*-Hefesystem konnten Expressionsraten von 0,9% [w/w] rekombinanter Rezeptor/Gesamtmembranen erzielt werden, wodurch eine Isolierung im mg-Bereich möglich wurde. Durch die Optimierung der Reinigung von OR5 wurde hochreines Rezeptorprotein generiert. Aufgrund des effizienten Expression-systems wurde mit Kulturansätzen von jeweils wenigen Litern gearbeitet, um letztendlich aus jeweils 4 Litern Kultur und damit ~1 g Gesamtmembranen ~0,5 mg hochreines OR5-Protein zu erhalten. Dadurch wurden funktionelle Analysen und Vorarbeiten zur strukturellen Untersuchung des Rezeptors ermöglicht.

Durch die Messung der Tryptophanfluoreszenz des Proteins in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration wurde die Funktionalität des isolierten Geruchsrezeptors gezeigt. Zusätzlich wurde die Faltung des Proteins mittels CD-Spektroskopie belegt.

Die Kristallisation des Zielproteins resultierte in verschiedenartigen Kristallen, von denen 9 Kristalle mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht wurden. Wie aus der Literatur bekannt, ist die Entstehung von Membranprotein-Kristallen von hoher Qualität äußerst selten. Da auch im Fall der OR5-Kristalle keine Streufähigkeit vorhanden war, bedarf es weiterer Optimierungen im Bereich der Kristallisationsbedingungen.

3.6. Charakterisierung der Säugetier-Stammzelllinie P19

Abschließend wurde eine Charakterisierung der P19-Stammzelllinie durchgeführt und untersucht, ob der rekombinante Geruchsrezeptor OR5 in diesen Zellen funktionell produziert wird. Die angewandten Methoden umfassten Echtzeit-PCR (s. 2.4.9.) zur relativen Quantifizierung verschiedener olfaktorischer Marker-Gene, Immunfluoreszenz-Markierungen (s. 2.5.5.2.) zum Nachweis dieser Marker auf Proteinebene sowie „Calcium-Imaging“ (s. 2.10.), womit erfolgreich eine Kopplung des rekombinanten Rezeptors an eine endogene Signaltransduktionskaskade gezeigt wurde.

P19 Embryonale Karzinom-Stammzellen sind pluripotente Zellen, die durch Zugabe von Retinolsäure (RA) in neuronale Zellen differenziert werden können (Jones-Villeneuve, E. *et al.*, 1982; Jones-Villeneuve, E. M. *et al.*, 1983; Bain, G. *et al.*, 1994) (Abb. 53). RA ist ein Derivat des Vitamin A, welches *in vivo* die Differenzierung von neuronalen und hematopoetischen Vorläuferzellen beeinflusst. Außerdem kann RA die Differenzierung von Krebszellen, wie Teratokarzinomen, Leukämiezellen und vielen immortalisierten Zelllinien induzieren (Cheung, W. M. W. *et al.*, 2001). Es ist beschrieben, dass die P19-Zelllinie nach Induktion der Differenzierung verschiedene Markerproteine von neuronalen Zellen ausbildet (Jones-Villeneuve, E. M. *et al.*, 1983; Martins, A. H. *et al.*, 2005) und demnach einen neuronalen Phänotyp aufweist. Zusätzlich stammt diese Krebszelllinie aus Hodengewebe, in welchem die Expression von endogenen Geruchsrezeptoren bereits nachgewiesen wurde (Parmentier, M. *et al.*, 1992; Goto, T. *et al.*, 2001).

Aus diesen Gründen nahmen wir an, dass die P19-Zellen in neuronaler Form eine gute Plattform für die funktionelle Expression von OR5 bieten. Um diese Annahme zu untersuchen, sollten die

Zellen zuerst auf das Vorhandensein von G_{olf} , einem an der Geruchssignalkaskade beteiligten G-Protein, überprüft werden.

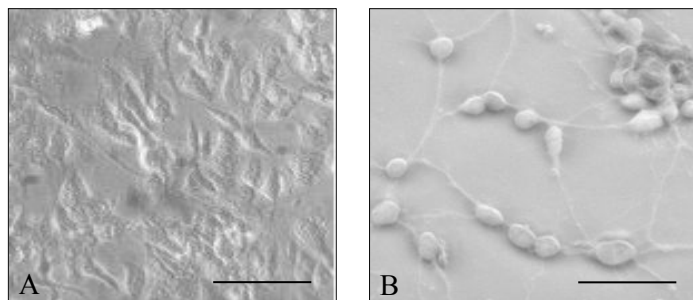


Abb. 53: Fibroblasten-ähnlicher (A) und neuronaler (B) Phänotyp der murinen Stammzelllinie P19. Skalierungsbalken 50 μ m.

3.6.1. Qualitativer Nachweis von *GapDH*, *OMP*, *G_{olf}*, *G_q* und *oCNC2*

Für den qualitativen Nachweis von G_{olf} wurde eine Northern-Hybridisierung (s. 2.4.8.) mit radioaktiv markierter G_{olf} -cDNA durchgeführt. Als Target wurden RNA-Proben verwendet, die sowohl aus nicht infizierten P19-Zellen als auch aus *OR5-SFV2* #8- und *OR5-SFV1Cap* #6-infizierten Zellen gewonnen worden waren. Als Kontrolle diente RNA aus *LacZ-SFV2*-infizierten P19-Zellen.

Wie aus Abbildung 54 zu erkennen ist, wurde ein unspezifisches Signal auf Höhe der 18S rRNA bei $\sim 1,8$ kbp generiert. Eine G_{olf} -spezifische Markierung müsste in diesem Experiment im Bereich der vollständigen RNA-Fragmentlänge von G_{olf} bei 1.146 bp entstehen. Basierend auf diesem Resultat musste vorerst davon ausgegangen werden, dass G_{olf} in P19-Zellen nicht transkribiert wird. Nachfolgende Ergebnisse belegten jedoch eindeutig eine Expression von G_{olf} in Fibroblasten-ähnlichen und neuronalen P19-Zellen.

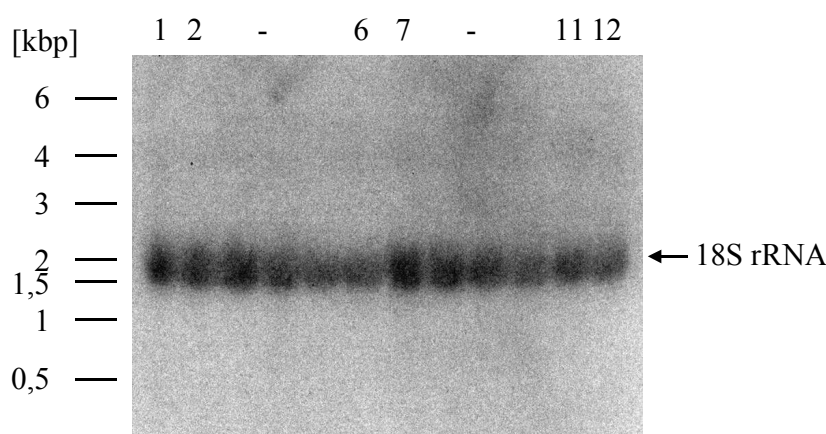


Abb. 54: Northern-Blot mit einer G_{olf} -spezifischen Sonde. Jeweils 10 μ g RNA aus P19-Zellen wurde verwendet, und mit einer G_{olf} -spezifischen P^{32} -markierten Sonde in der Northern-Hybridisierung inkubiert. Spur 1: RNA P19-Zellen, Spuren 2-6: RNA *OR5-pSFV2* # 8-infizierte P19-Zellen mit aufsteigenden Infektionszeiten von 2, 4, 8, 12 und 24 h; Spuren 7-11: RNA *OR5-pSFV1Cap* # 6-infizierte P19-Zellen mit aufsteigenden Infektionszeiten von 2, 4, 8, 12 und 24 h; Spur 12: RNA 8 h *LacZ*-infizierte P19-Zellen.

Da die olfaktorische Signalkaskade u. U. auch über ein anderes G-Protein, G_q, vermittelt sein könnte, wurde ebenfalls das Vorkommen dieses G-Proteins in den P19-Zellen untersucht. G_q könnte involviert sein, da nachweislich bei einigen Geruchsrezeptoren die Anbindung ihres Liganden zu keinem cAMP-, jedoch zu einem IP₃ Anstieg in der Zelle führt (Boekhoff, I. *et al.*, 1990). Die Untersuchungen zu diesem G-Protein wurden jedoch nicht als Northern-Blot-Experiment ausgeführt, sondern in nachfolgende Analysen der cDNA aus P19-Zellen integriert.

Hierfür wurde die cDNA der P19-Zellen auf verschiedene Bestandteile der olfaktorischen Signalkaskade überprüft (Abb. 55), unter anderem erneut auf G_{olf}. Weitere untersuchte Marker waren OMP, das *Odorant Marker Protein*, welches nach der Maturation in olfaktorischen Neuronen exprimiert wird, sowie eine Untereinheit des „*cAMP nucleotide gated olfactoric channel*“ (*oCNC2*; Bezeichnung der Oligonukleotide: *cNgOCh*), welcher innerhalb der cAMP-vermittelten olfaktorischen Signalweiterleitung geöffnet wird und das Einströmen von Kationen zur Depolarisierung der neuronalen Membran erlaubt. Als endogene Kontrolle für die Beschaffenheit der verwendeten RNA bzw. der *in vitro* transkribierten cDNA, wurde zusätzlich Glycerinaldehyd-Dehydrogenase (GapDH) mit einbezogen. Bei diesem Gen handelt es sich um ein so genanntes „*house keeping gene*“, welches laut Literaturangaben nicht bzw. sehr geringfügig reguliert wird (Murphy, C. L. und Polak, J. M., 2002; Ullmannova, V. und Haskovec, C., 2003; Mahoney, D. J. *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde RNA aus gereiften Turbinatzellen des Geruchsepithels der Maus sowie neuronal differenzierten P19- und *OR5-pSFV2Cap # 6*-infizierten P19-Zellen verwendet. In der PCR wurden jeweils Gen-spezifische Oligonukleotide (s. 2.1.) eingesetzt. Diese Oligonukleotide wurden anhand der jeweiligen cDNA-Sequenz aus der Hausmaus, *Mus musculus*, konstruiert. Um zu differenzieren, ob es sich bei dem PCR-Produkt um ein Amplifikat der genomischen DNA oder der cDNA handelt, wurden Intron-übergreifende Oligonukleotid-Paare verwendet. Demnach entstünden bei der Amplifikation genomischer DNA größere Fragmente als bei einer Transkription basierend auf cDNA. Die Integrität der RNA sowie der Erfolg der durchgeführten *in vitro* Transkription wurden durch eine gelelektrophoretische Analyse der RNA und die GapDH-Amplifikate belegt.

Alle cDNA-Präparationen lieferten ein PCR-Produkt mit 346 Bp, welches dem untersuchten GapDH-Fragment entsprach. In der Kontroll-PCR ohne cDNA entstand kein DNA-Produkt. Die Verwendung von OMP-spezifischen Oligonukleotiden zeigte das Vorkommen von OMP-cDNA in allen Zellproben, deutlich zu erkennen sind jedoch Konzentrationsunterschiede zwischen der cDNA neuronaler und Fibroblasten-ähnlicher P19-Zellen.

Entgegen der Ergebnisse aus den G_{olf} Northern-Blot-Experimenten wurde in einer PCR mit G_{olf} -spezifischen Oligonukleotiden und cDNA aus undifferenzierten P19-Zellen ein PCR-Produkt generiert. Die Stärke des Amplifikationssignals nimmt jedoch bei Verwendung von cDNA aus neuronal differenzierten P19-Zellen deutlich ab. Dieser Konzentrationsunterschied war - bezogen auf die Konzentrationen der *GapDH*-Amplifizierung - eventuell auf eine verminderte Transkription zurückzuführen. Dieses Resultat steht jedoch im direkten Widerspruch mit der gestellten Arbeitshypothese, die eine Hochregulierung dieser Signaltransduktions-Komponenten nach der neuronalen Differenzierung vermuten ließ. Noch deutlicher war eine Konzentrationsreduktion der *oCNC2*-Amplifikate mit cDNA aus neuronalen P19-Zellen als Matrize zu erkennen. Hier wurde sowohl auf Basis der Turbinaten-cDNA als auch mit P19-cDNA und cDNA von infizierten P19-Zellen ein 481 bp großes Amplifikat erzeugt. Es wurde jedoch keine DNA bei Verwendung der cDNA neuronaler P19-Zellen vervielfältigt, was bedeuten kann, dass die Transkription des *oCNC2*-Gens nach Differenzierung der Zellen herunterreguliert wird. Aufgrund der Genproduktgröße wurde ausgeschlossen, dass die unterschiedlichen Mengen aus verschiedenen Anteilen genomischer- und cDNA- basierter Transkription resultierten.

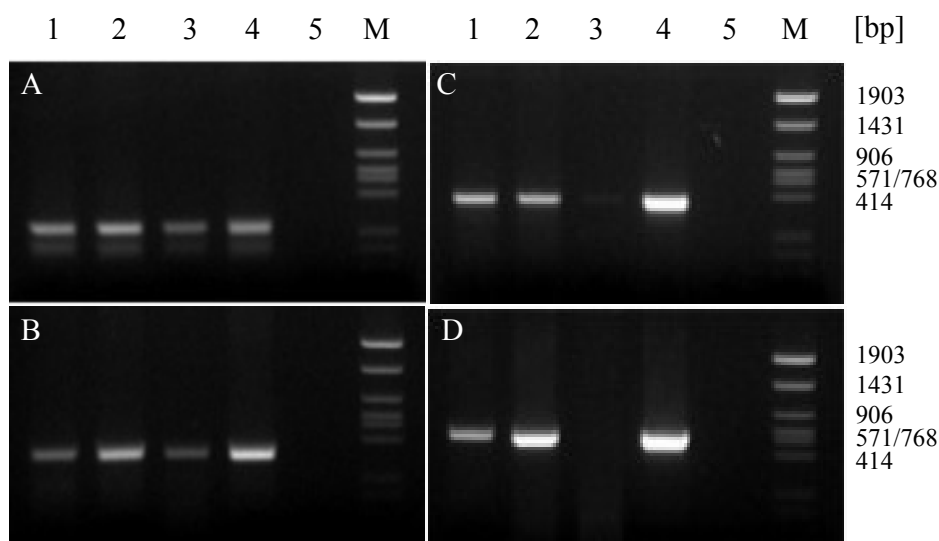


Abb. 55: Amplifizierung von *GapDH*-, *OMP*-, *G_{olf}*- und *oCNC2*-DNA aus P19-Zellen. Es wurden *GapDH*-, *OMP*-, *G_{olf}*- und *oCNC2*-spezifische Oligonukleotide verwendet. Als Matrize dienten je 2 μ g cDNA aus P19-Zellen (2), neuronal differenzierter P19-Zellen (3), *OR5-SFV2Cap*-infizierter P19-Zellen (1) sowie adulter Turbinatenzellen aus der Maus (4). In Spur 5 wurde anstelle einer cDNA-Matrize H_2O eingesetzt M: Größenstandard Φ 1074/*RsaI* (50 ng). A: PCR mit *GapDH*-spezifischen Oligonukleotiden; B: *OMP*-spezifische Oligonukleotide; C: *G_{olf}(α)*-spezifische Oligonukleotide; D: *oCNC2*-spezifische Oligonukleotide. Es wurden *GapDH*-, *OMP*-, *G_{olf}*- und *oCNC2*-Amplifikate in den Längen 346, 372, 381 und 481 bp generiert.

Ob die beobachteten Mengenunterschiede auf methodische Artefakte (wie z. B. unterschiedliche Reinheiten der verwendeten RNA und damit verbundene Effizienz-Unterschiede in der *in vitro* Transkription) oder auf eine verringerte Transkriptionen in neuronalen P19-Zellen zurückzuführen waren, ließ sich nicht mit der gewählten Methode der qualitativen PCR ermitteln. Demnach konnten diese Ergebnisse nicht quantitativen Interpretationen zur Regulation olfaktorischer Gene in P19-Zellen dienen.

Zusammengefasst lieferte dieses Experiment einen Hinweis darauf, dass sich der Transkriptionslevel der untersuchten Gene im Verlauf der P19-Differenzierung verändert. Da jedoch eine *Hochregulierung* der untersuchten Gene nach neuronaler Differenzierung als wahrscheinlicher erschien, und eine Quantifizierung mit dieser Methode nicht möglich war, sollte eine relative Quantifizierung der Genexpressionen durch Echtzeit-PCR-Messungen erfolgen.

3.6.2. Relative Quantifizierung von *OMP*-, *Golf*- und *Gq*-mRNA durch Echtzeit-PCR

Für die Durchführung von Echtzeit-PCR-Messungen wurden zunächst genspezifische Oligonukleotidpaarungen mit dem Programm *Primer ExpressTM Version 4.0* (Applied Biosystems, Darmstadt) ermittelt. Die Oligonukleotide wurden nach Länge, T_M und GC-Gehalt ausgewählt. Jeweils zwei Oligonukleotid-Paarungen pro Gen wurden in einer PCR mit P19-cDNA als Vorlage auf ihre Spezifität getestet. Nur jene Oligonukleotid-Paarungen, welche ein Amplifikat der entsprechenden Größe lieferten, wurden für weitere Untersuchungen herangezogen. Um optimierte Oligonukleotid-Konzentrationen einzusetzen, wurden verschiedene Mischungsverhältnisse der ausgewählten Oligonukleotide in Echtzeit-PCR-Messungen eingesetzt und gelelektrophoretisch untersucht: jedes Oligonukleotid wurde in allen Kombinationen mit seinem Gegen-Oligonukleotid in verschiedenen Konzentrationen verwendet und das Produkt analysiert. In Tabelle 12 sind die optimierten Oligonukleotid-Paarungen aufgeführt.

Tab. 12: In Echtzeit-PCR-Messungen eingesetzte Oligonukleotidpaarungen und verwendete Konzentrationen.
F: Hauptstrang Nukleotid; R: Gegenstrang Nukleotid.

Oligonukleotid	F [nM]	R [nM]	Oligonukleotid	F [nM]	R [nM]
GapDH # 2	900	300	Gq # 1	900	300
OMP #1	900	300	(cNgOCh # 1	300	300)
Golf # 1	300	300	(cNgOCh # 2	900	50)

Die Messungen zur relativen Quantifizierung der *in vitro* transkribierten cDNA wurden mit einer RNA-Probe aus Fibroblasten-ähnlichen P19-Zellen und drei Proben neuronal differenzierter P19-Zellen durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass keine Amplifikationen von Resten genomischer DNA in den RNA-Proben erfolgen konnte, wurden alle Proben vorher mit DNase behandelt, bis in einer PCR mit den Oligonukleotiden OMP # 1 in 40 Zyklen kein DNA-Produkt mehr entstand (Abb. 56, Spuren 4 und 6). Zusätzlich wurden je 100 ng der DNase-behandelten RNA-Proben einer Echtzeit-PCR Messung mit dem Primerpaar OMP #1 für 42 Zyklen bei 60°C unterzogen, um definitiv auszuschließen, dass noch transkribierbare DNA in den Proben vorhanden war. Als Positivkontrolle diente in diesem Experiment unverdaute RNA aus P19-Zellen. Die RNA-Proben wurden anschließend einer *in vitro* Transkription unterzogen. Jeweils 100 ng der entstandenen cDNA wurde in Echtzeit-PCR-Messungen eingesetzt.

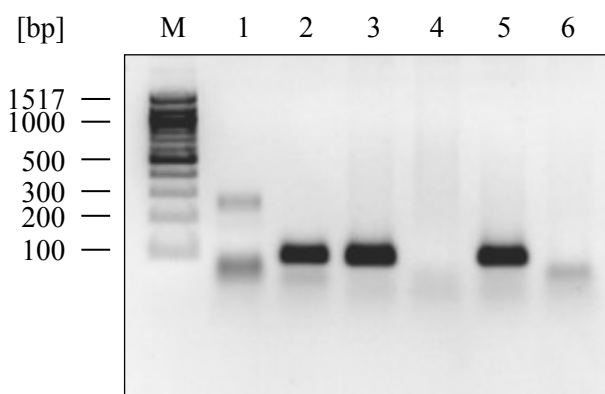


Abb. 56: Kontrolle des DNase-Verdaus von RNA aus P19-Zellen durch PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden OMP #2. M, 100 bp DNA Standard (NEB); Spur 1: H₂O ohne RNA (Negativkontrolle); Spur 2: unverdaute RNA als Template (Positivkontrolle); Spur 3: P19-RNA – DNase; Spur 4: P19-RNA + DNase; Spur 5: RNA neuronaler P19-Zellen – DNase; Spur 6: RNA neuronaler P19-Zellen + DNase.

Für die Detektion der Amplifikationsprodukte wurde der Fluoreszenz-Farbstoff *SYBR[®] Green* (Applied Biosystems GbmH) verwendet. Die Quantifizierung erfolgte durch kontinuierliche Erfassung der Fluoreszenzsignale, die Intensität der Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur PCR-Produktmenge. Da der verwendete Farbstoff sequenzunabhängig jede vorliegende dsDNA markiert, mussten die Oligonukleotid-Systeme auf Dimerbildung und unspezifische Amplifikationen untersucht werden. Sowohl die Agarosegel-Analysen (Daten nicht gezeigt) als auch die Schmelzkurven-Analysen (Abb. 57) belegten die ausschließliche Bildung von Amplifikaten der kalkulierten Größen sowie einzelne Maxima für die kalkulierten Schmelztemperaturen. Die Spezifität der Reaktionen wurde zusätzlich durch Kontrollansätze ohne die jeweilige cDNA überprüft.

Die Daten der einzelnen Echtzeit-PCR-Läufe wurden durch die Wahl eines Schwellenwertes im linearen Bereich der logarithmischen Darstellung der Amplifikationen (Abb. 58) und die $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet. Mit dieser Methode ist ein direkter Vergleich von Amplifikationen verschiedener Proben möglich. Dazu müssen die Amplifikationen mit einer endogenen Kontrolle verglichen werden, da auf diese Weise systemimmanente Schwankungen zwischen den verschiedenen Proben, z. B. unterschiedliche Effizienzen der reversen Transkriptase und Polymerase oder auch Mengenunterschiede der eingesetzten cDNA, eliminiert werden.

Durch den Vergleich mit der endogenen Kontrolle, in diesem Fall *GapDH*, können demnach alle Amplifikationen normalisiert und so miteinander in Relation gesetzt werden. Die Berechnung ist im Folgenden im Detail beschrieben: Nach Normalisierung aller Proben der verschiedenen Phänotypen (Fibroblasten-ähnlich und neuronal) durch Subtraktion des C_t -Wertes der endogenen Kontrolle ($=\Delta C_t$) werden die zu vergleichenden Werte ebenfalls voneinander subtrahiert. Es ergibt sich der sogenannte $\Delta\Delta C_t$ -Wert. Die Regulation der Gene wird durch die Formel $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ beschrieben.

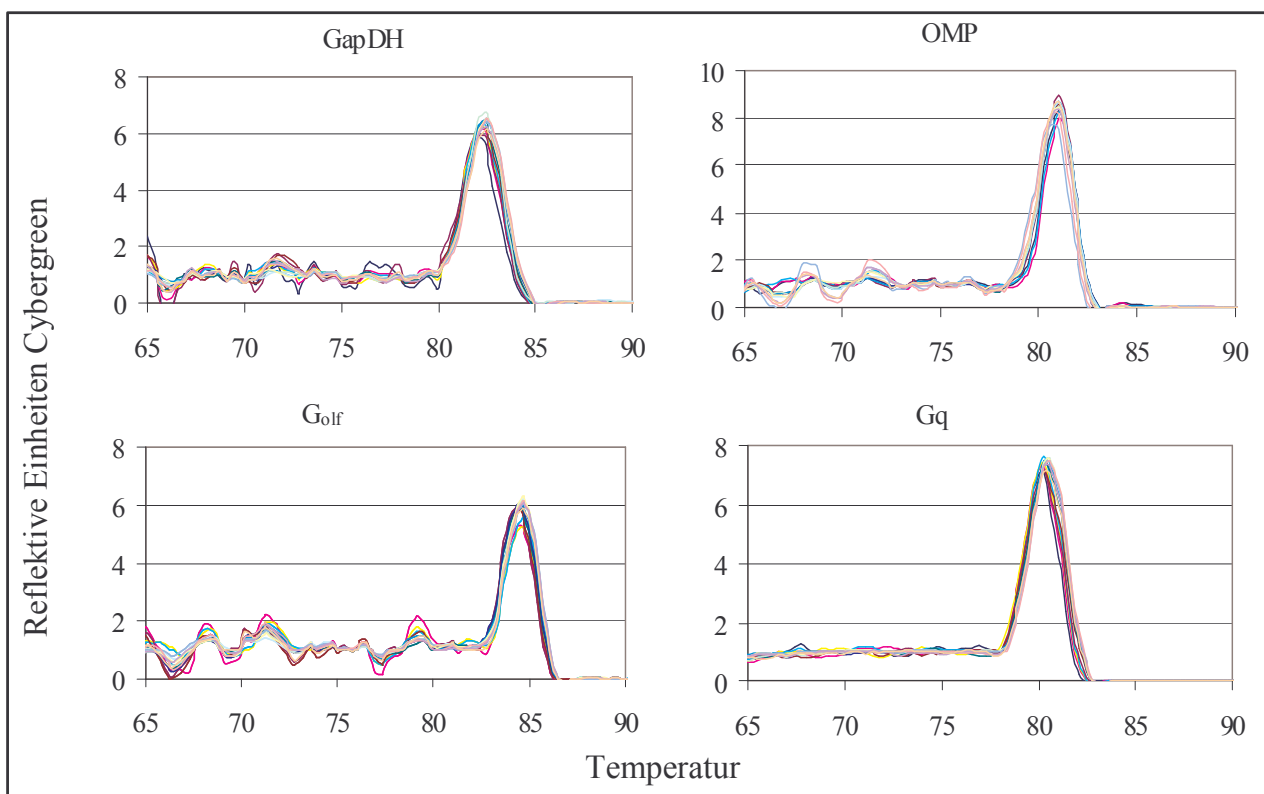


Abb. 57: Schmelzkurven- Analyse der Echtzeit-PCR. Die Schmelzkurven der untersuchten Proben (cDNA Fibroblasten-ähnlicher P19-Zellen, drei cDNA neuronale P19-Zellen, jeweils Triplets) wurden übereinandergelegt.

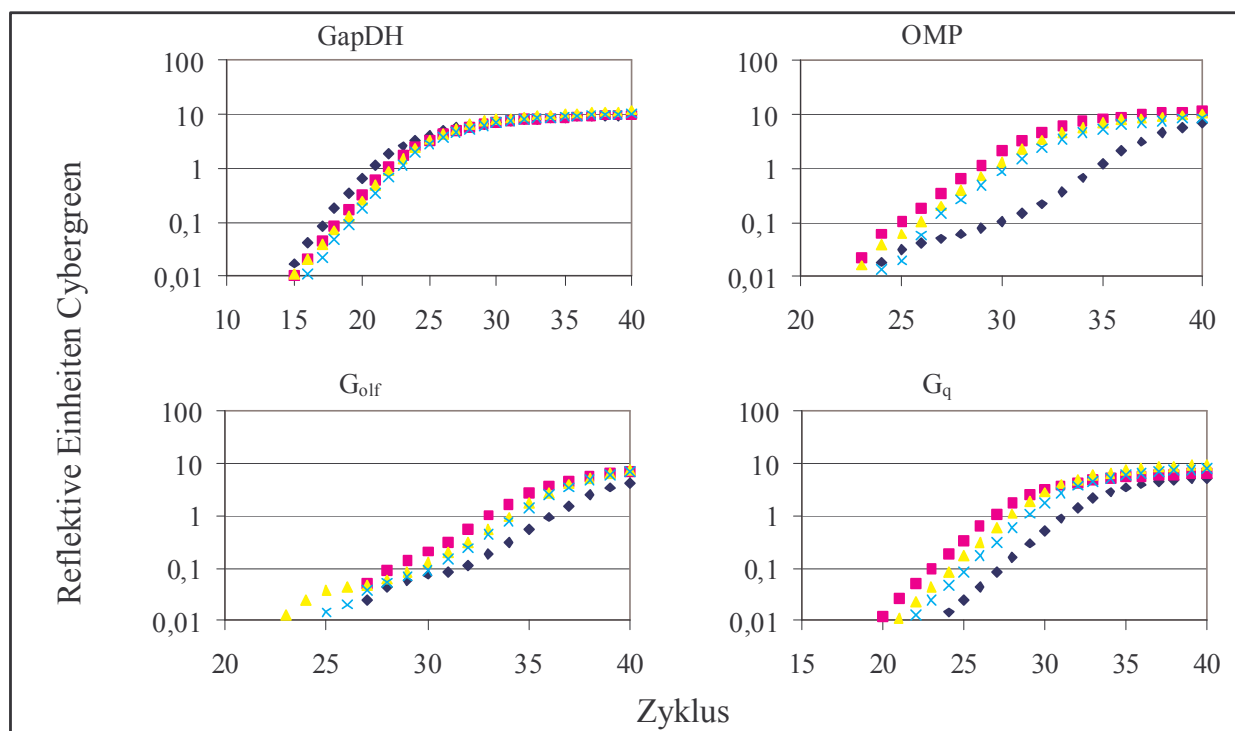


Abb. 58: Logarithmische Darstellung der Echtzeit-PCR-Amplifikationen mit *GapDH*-, *OMP*-, *G_{olf}* und *G_q*-spezifischen Oligonukleotiden. Jeweils 100 ng cDNA aus P19-Zellen und jeweils 3 unabhängigen Ansätzen neuronaler P19-Zellen wurden einer Echtzeit-PCR unterzogen. Die im linearen Bereich ermittelten CT-Werte wurden für die Berechnung des $\Delta\Delta CT$ -Wertes in Relation zu *GapDH* herangezogen. \blacklozenge : cDNA P19-Zellen; \blacksquare , cDNA neuronale P19-Zellen #1; \blacktriangle , cDNA neuronale P19-Zellen #2; \times , cDNA neuronale P19-Zellen #3.

Mit Hilfe dieser Auswertungsmethode wurde gezeigt, dass die neuronale Differenzierung der P19-Zellen mit einer Hochregulation der Markergene *OMP*, *G_{olf}* und *G_q* einhergeht (Abb. 59). Besonders auffällig war eine signifikante Hochregulation des *OMP*-Gens in neuronalen P19-Zellen um das 102 ± 12 -fache gegenüber fibroblasten-ähnlichen P19-Zellen. Das olfaktorische G-Protein *G_{olf}* zeigte eine Hochregulation auf das 12 ± 2 -fache nach 10 Tagen neuronaler Differenzierung, und auch *G_q* war signifikant hochreguliert. Für dieses „alternative“ G-Protein ergab sich eine positive Regulation um das 25 ± 7 -fache im Verlauf der Zelldifferenzierung. Eine Wiederholung der Messungen mit einer weiteren, unabhängigen RNA-Probe aus Fibroblasten-ähnlichen P19-Zellen zeigte methodisch bedingte Schwankungen, eventuell verursacht durch minimale Parameter-Schwankungen während der Präparation der RNA. Trotzdem konnte auch in der Wiederholung die deutliche Hochregulation der untersuchten Markergene im Größenbereich der oben genannten Werte bestätigt werden.

Eine Auswertung der PCR-Läufe mit den *oCNC2*-Oligonukleotiden war nicht möglich, da selbst die Benutzung von 100 ng der cDNA nicht zu reproduzierbaren Gen-Amplifikationen führte. Dementsprechend musste vorerst davon ausgegangen werden, dass das *oCNC2*-Gen eventuell im

Genom vorhanden ist, jedoch nur in sehr geringen Mengen transkribiert wird. Ein weiterer Grund könnte methodisch begründet sein, da in einzelnen Amplifikationen die Vervielfältigung dieses Gens gezeigt werden konnte, die Oligonukleotide aber offensichtlich noch besser optimiert werden müssen, um stabile, reproduzierbare Werte zu generieren. Diese Annahme wurde im Anschluß durch den Nachweis des Proteins in der Immunmarkierung bestätigt.

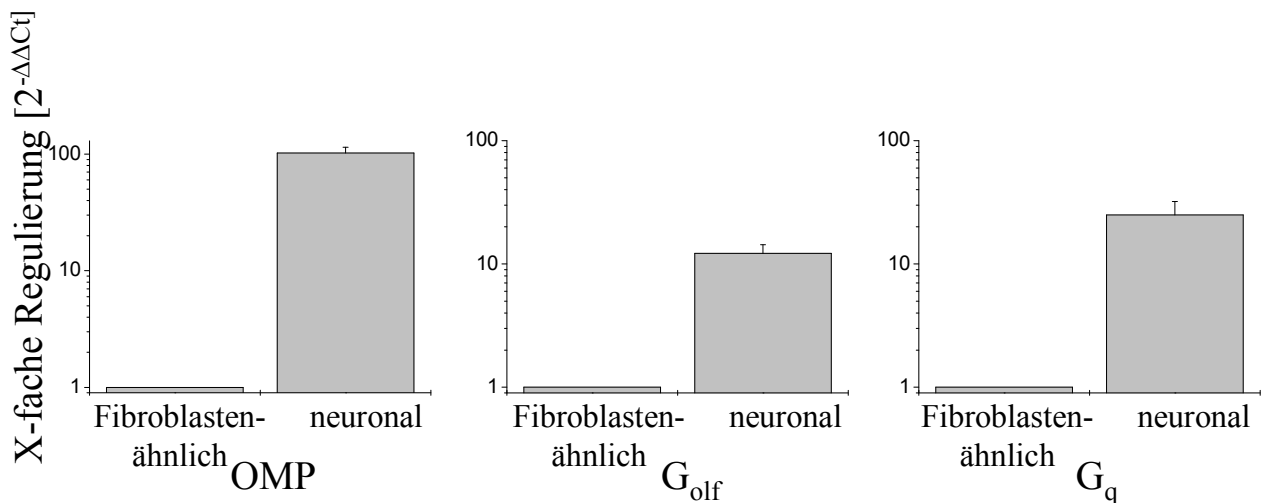


Abb. 59: Relative Quantifizierung der cDNA von *GapDH*-, *OMP*-, *G_{olf}*- und *oCNC2*-DNA aus P19-Zellen. Jeweils 100 ng cDNA von Fibroblasten-ähnlichen und neuronalen P19-Zellen wurden mit spezifischen Oligonukleotiden einer Echtzeit-PCR von 30 Zyklen mit *SYBR® Green* unterzogen. Die gemittelten, relativen Werte setzen sich aus 3 unabhängigen Messungen zusammen, die Standardabweichungen sind als SEM-Werte (STABW: \sqrt{n}) dargestellt. *GapDH* diente als endogene Kontrolle.

3.6.3. Detektion neuronaler und olfaktorischer Marker in P19-Zellen auf Proteinebene

Parallel zum Nachweis olfaktorischer Marker auf Transkriptions-Ebene wurde über Immunfluoreszenzmarkierungen zusätzlich eine erfolgte Translation der Markerproteine untersucht. Wie unter 2.5.5.2. beschrieben, wurden Fibroblasten-ähnliche und neuronal differenzierte, fixierte P19-Zellen einer Immunmarkierung mit folgenden Antikörpern unterzogen: anti-OMP, anti- G_{olf} , anti-oCNC2, anti-A cyclase III sowie anti-Tubulin als neuronalen Marker. Die Fluoreszenzmarkierung mit *Cy3* und *Alexa-488* wurde durch entsprechende Sekundärantikörper vermittelt.

Alle fünf Markerproteine konnten auf Proteinebene in neuronal differenzierten P19-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 60).

In Tubulin-markierten P19-Zellen (A) war eine dominante Färbung Tubulin-haltiger neuronaler Axone zu erkennen, während die OMP- (E), G_{olf} - (C), ACIII- (B) und oCNC2- (D) vermittelten Markierungen vor allem Proteine im Zellkörper des Neurons nachwiesen. Die ACIII-Markierung zeigte eine auffällige Clusterung des Proteins in vielen distinkten Abschnitten der Plasmamembran. Die Detektion von G_{olf} und dem Kationen-Kanal erfolgte überwiegend in der Plasmamembran der Zellkörper, während die Markierung mit OMP-spezifischen Antikörpern eine eher uniforme Verteilung des Proteins aufwies.

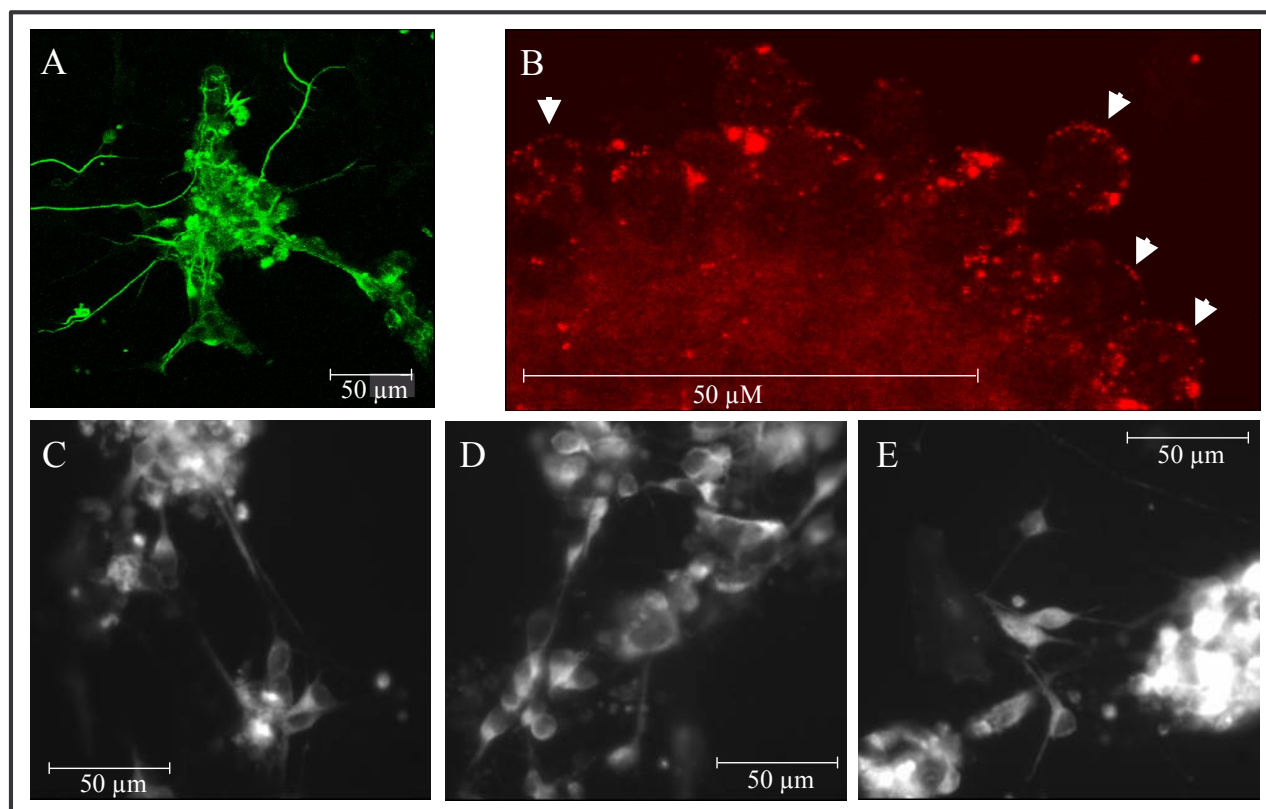


Abb. 60: Nachweis der OMP-, ACIII-, Tubulin-, G_{olf} - und oCNC2-Proteine in neuronal differenzierten P19-Zellen. Die Immunmarkierung erfolgte mit Tubulin-, OMP-, G_{olf} -, oCNC2- und Adenylylzyklase III-Antikörpern und einem entsprechenden Cy3-konjugierten Sekundärantikörper. A: Tubulin-Markierung (Falschfarbe grün); B: Adenylylzyklase III-Markierung (Falschfarbe rot); C: G_{olf} -Markierung (schwarz-weiss); D: oCNC2-Markierung (schwarz-weiss); E: OMP-Markierung (schwarz-weiss).

3.6.4. *In vivo* Funktionsnachweis des in P19-Zellen exprimierten OR5-Rezeptors

Nachdem gezeigt wurde, dass der Geruchsrezeptor OR5 in den Säugetier P19-Zellen zur Plasmamembran transloziert wird, und die Zelllinie zusätzlich alle – untersuchten –

Voraussetzungen für eine erfolgreiche funktionelle Expression dieses Rezeptortypes und die Signalweiterleitung aufweist, erfolgte ein Funktionsnachweis *in vivo*. Die hierfür verwendete Methode war das sogenannte „Calcium Imaging“ (s. 2.10.), mit dem durch die Verwendung eines Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes eine Verteilung bzw. der Fluß von Kalziumionen in der Zelle visualisiert wird. Verwendet wurde der Farbstoff Fluo-4 (Molecular Probes), der ohne gebundene Ca^{2+} -Ionen eine sehr geringe Emission bei 488 nm aufweist, nach Ca^{2+} -Anbindung jedoch eine Fluoreszenzverstärkung um das 4-5-fache zeigt. Durch die Anregung bei einer einzigen Wellenlänge können zwar keine Quantifizierungen durchgeführt werden, es kann jedoch bei Rezeptorfunktionalität ein Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen qualitativ nachgewiesen werden.

Untersucht wurde die Kopplung des heterologen Geruchsrezeptors OR5 an cAMP-vermittelte Signaltransduktions-Wege sowohl in Fibroblasten-ähnlichen als auch in neuronal differenzierten P19-Zellen. Fibroblasten-ähnliche Zellen wurden miteinbezogen, da auch für diese Zellmorphologie eine korrekte Translokation des Rezeptors zur Plasmamembran gezeigt wurde. Aufgrund einer häufig beobachteten direkten Korrelation des Faltungsstatus und der Translokation eines Proteins, bestand die Annahme, dass der Rezeptor auch in Fibroblasten-ähnlichen P19-Zellen funktionell an ein G-Protein bindet. Natürlich ist das Vorhandensein aller Komponenten der olfaktorischen Signalkaskade Voraussetzung für den durchgeführten Versuchsaufbau. Obwohl alle untersuchten endogenen Bestandteile auch in der nicht-neuronalen Zellform transkribiert werden, wurde deutlich gezeigt, dass die Transkription einiger Transduktions-Moleküle im Zuge der Differenzierung stark hochreguliert wird. Demnach war es zunächst unklar, ob der Rezeptor nur im neuronalen Phänotyp oder auch in Fibroblasten-ähnlichen Zellen an eine funktionelle Signalkaskade koppelt.

Anfangs wurden Fluoreszenz-Aufnahmen der Zellen vor Zugabe und ab 15 Sekunden nach Zugabe des Liganden angefertigt. Nach Optimierung der Methode wurden Fluoreszenzaufnahmen 1 Sekunde nach Zugabe von Liliol angefertigt. Anhand der Messungen unter zuletzt genannter Bedingung lässt sich schließen, dass der exprimierte Geruchsrezeptor in Fibroblasten-ähnlichen P19-Zellen offenbar entweder nicht funktionell vorliegt, nicht an eine Signalkaskade koppelt, oder die entsprechenden Komponenten der Signalkaskade nicht ausreichend exprimiert werden: Von 12 Messungen mit *OR5-SFV1Cap*-infizierten Zellen reagierten die Zellen nur einer Messung sehr stark mit einem Liganden-induzierten Ca^{2+} -Einstrom, die Zellen von 8 Messungen wiesen keine Änderung der Fluoreszenz auf, und in drei Ansätzen konnte ein Ca^{2+} -Einstrom sehr weniger Zellen beobachtet werden. *LacZ*-infizierte P19-Zellen dienten als Kontrolle und reagierten auf ähnliche Weise: im Rahmen von 12 Messungen erfolgte in einem Ansatz ein Liganden-

induzierter Ca^{2+} -Einstrom, die Zellen von sechs Ansätzen wurden nicht induziert, und in fünf Ansätzen wurde ein Ca^{2+} -Strom in vereinzelt Zellen beobachtet. In zwei Ansätzen mit Wildtyp-P19-Zellen erfolgten einmal keine Induktion und einmal eine schwache Induktion sehr weniger Zellen.

Aufgrund der Ergebnisse aus den Echtzeit-PCR-Analysen der Signalkaskaden-Komponenten (s. 3.6.2.) war es nun zweckmäßig, die Funktionalität des Rezeptors/der Kaskade in neuronal differenzierten P19-Zellen zu untersuchen. Dazu wurden 13 Ansätze neuronaler Zellen mit *OR5-SFV*-Vektoren infiziert und vor Zugabe sowie 1 Sekunde nach Zugabe des Liganden der Ca^{2+} -Strom über die Veränderung der Fluo-4-Fluoreszenz analysiert. In sieben Ansätzen (54%) erfolgte ein deutlicher Lilial-induzierter Anstieg der Fluoreszenz, während in zwei Ansätzen (15%) nur sehr wenige Zellen induziert wurden und vier Messungen (31%) in keiner Veränderung der Fluoreszenz durch Ligandenzugabe resultierten. Zusätzlich wurden vier Ansätze *LacZ-SFV2*-infizierter Zellen und ein Ansatz Wildtyp-P19-Zellen untersucht. Eine Messung mit *LacZ-SFV2*-infizierten Zellen ergab eine schwache Reaktion sehr weniger Zellen auf die Lilialzugabe, die anderen Messungen verliefen ohne eine Erhöhung der Fluoreszenz.

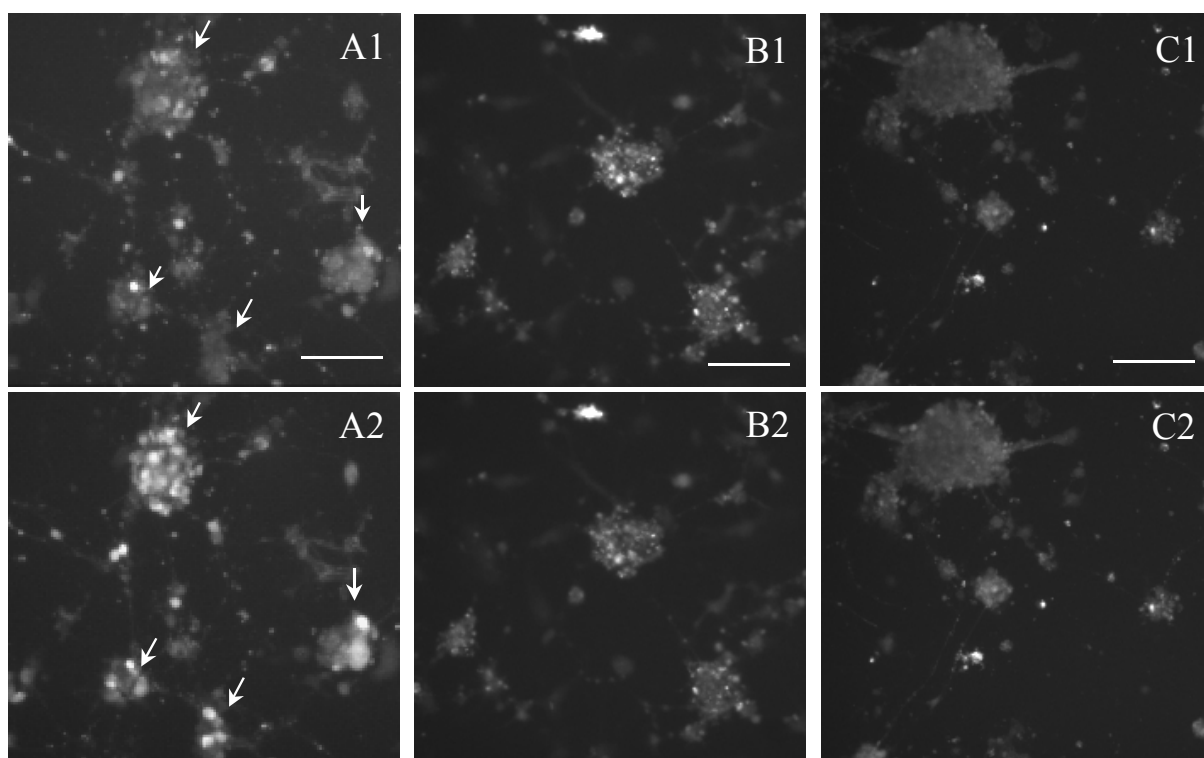


Abb. 61: Detektion der Fluo-4 Fluoreszenz vor und nach Zugabe von Lilial in infizierten und nicht infizierten P19-Zellen. Vor Zugabe von $10 \mu\text{M}$ des OR5-Liganden Lilial (1) und 1 Sekunde nach Zugabe (2) wurden Fluoreszenzaufnahmen (Ex 488nm, Em $>515\text{nm}$) von Fluo-4-beladenen P19-Zellen angefertigt. A: *OR5-SFV1Cap* # 6-infizierte P19-Zellen; B: *LacZ*-infizierte P19-Zellen; C: P19-Zellen. Pfeile weisen auf Regionen/Zellen hoher Induktion hin. Skalierungsbalken $100 \mu\text{m}$.

In Abbildung 61 sind beispielhaft Fluo-4-gesättigte, neuronale P19-Zellen vor und 1 Sekunde nach Ligandenzugabe dargestellt. Deutlich zu erkennen ist in den *OR5-SFVICap*-infizierten Zellen ein signifikanter Fluoreszenz-Anstieg in vielen Zellen, während die Kontrollen nach Ligandenzugabe keine sichtbaren Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten in den Zellen aufweisen.

Anhand einer Einzelzelle aus *OR5-SFVICap*-infizierten, neuronalen P19-Zellen ist deutlich ein Anstieg der Fluoreszenzemission um ein Vielfaches nach Zugabe (+) des Liganden zu erkennen (Abb. 62).

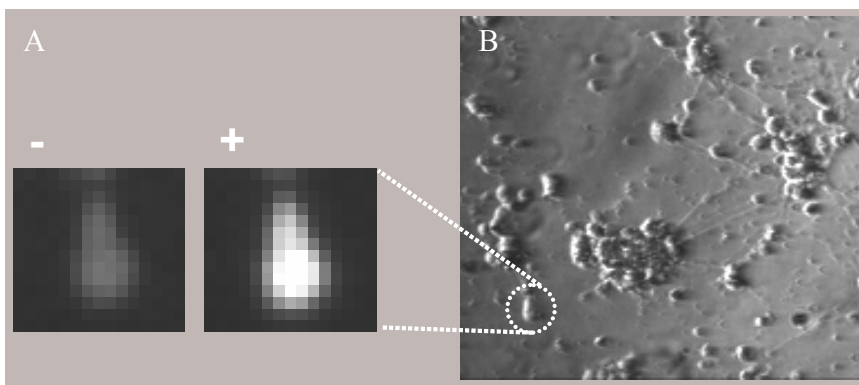


Abb. 62: Beispiel einer Lilial-induzierten *OR5-SFVICap*-infizierten neuronalen P19-Zelle vor und nach Zugabe des Liganden. Fluoreszenzaufnahmen von Fluo-4-beladenen, *OR5-SFVICap* # 6-infizierten P19-Zellen wurden vor und 1 Sekunde nach Zugabe von 10 μ M Lilial angefertigt. A: Fluoreszenzaufnahmen vor (-) und nach (+) Zugabe von Lilial; B: Durchlicht neuronale P19-Zellen.

3.6.5. Charakterisierung P19-Zellen: Zusammenfassung

Die vorangegangenen Ergebnisse belegen, dass in dem P19-Zellsystem eine Expression und korrekte Translokation des Geruchsrezeptors in die Plasmamembran erfolgt. Zusätzlich sind wichtige Marker enthalten, die auf einen Phänotyp ähnlich dem von olfaktorischen Neuronen hinweisen ((Jones-Villeneuve, E. M. *et al.*, 1983), Nachweis Tubulin in dieser Arbeit). Weiterhin wurden verschiedene, an der olfaktorischen Signalweiterleitung beteiligte Komponenten sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen: Die RNA-Hochregulierung von OMP und den G-Proteinen nach der neuronalen Differenzierung der P19-Zellen weisen darauf hin, dass das P19-Zellsystem ein hohes Potential für die funktionelle Expression von Geruchsrezeptoren bietet. Im Rahmen der „Calcium Imaging“-Experimente wurde gezeigt, dass eine funktionelle Kopplung des rekombinanten Geruchsrezeptors in der neuronalen Zellform der P19-Zellen erfolgt. Somit wird dieses Expressionssystem in Zukunft weitere Untersuchungen zur Funktion und Ligandenspezifität von Geruchsrezeptoren oder GPCRs *per se* ermöglichen.

4. Diskussion

4.1. Heterologe Expression von GPCRs

Die Interaktion von Zellen mit ihrer Umwelt wird durch eine Vielzahl verschiedener, membranständiger Rezeptoren ermöglicht. Aufgrund ihrer Funktionen wird offensichtlich, dass die Analyse dieser Proteine von großer medizinischer und pharmazeutischer Bedeutung ist. Deshalb gelangte diese Proteinspezies in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der Wissenschaft. Die Verfügbarkeit einzelner Membranproteine zu Untersuchungszwecken ist jedoch nicht immer gegeben. Ursache sind meist die geringen *in vivo* Expressionsraten von Membranproteinen. Es sind jedoch Proteinmengen im Milligramm-Bereich notwendig, um Methoden wie z. B. die Kristallisation zur Strukturaufklärung von Proteinen durchführen zu können. Selbst funktionelle Studien an Membranproteinen sind oft erschwert, da die Proteine durch Translokations-Störungen nicht zu ihrem Wirkungsort gelangen, bzw. nicht nativ gefaltet sind.

Trotz vielfältiger Ansätze in den letzten Jahrzehnten existieren nur wenige, erfolgreich etablierte Methoden für die heterologe Expression funktioneller Membranproteine. Membranproteine werden in heterologen Systemen in der Regel schlechter exprimiert als lösliche Proteine (Grisshammer, R. und Tate, C. G., 1995; Gimelbrant, A. A. *et al.*, 1999). Ein Grund hierfür liegt z. B. in fehlenden posttranslationalen Modifikationen eukaryotischer Membranproteine. Diese sind häufig jedoch notwendig, um die korrekte Faltung und Translokation des Proteins zur Membran zu gewährleisten (Otto, J. *et al.*, 1993; Katada, S. *et al.*, 2004; Quirk, P. L. *et al.*, 2004; Cai, G. *et al.*, 2005; MacKinnon, R., 2005). Die richtige Faltung eines Proteins ist eine Grundvoraussetzung für seine Funktion. Es besteht daher ein hoher Bedarf an heterologen Expressionssystemen, die eine effektive Produktion größerer Mengen nativer Membranproteine gewährleisten, um den wachsenden Anforderungen der analytischen Biochemie gerecht zu werden. In diesem Zusammenhang wurden in den letzten Jahren neben prokaryotischen auch vermehrt eukaryotische Zellsysteme für die Expression von eukaryotischen Membranproteinen etabliert (Stanasila, L. *et al.*, 1998; Sarramegna, V. *et al.*, 2003).

Auch Mitglieder aus der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, einer sehr großen Membranprotein-Familie, wurden schon in diversen Zellsystemen wie Bakterien, Hefen-, Insekten- und zahlreichen Säuger-Zellen mit sehr unterschiedlichen Resultaten exprimiert. Beim

Vergleich der Expressionssysteme fällt auf, dass Voraussagen über Proteinsyntheseraten von GPCRs in den verschiedenen Systemen nicht möglich sind. Im Gegenteil: in jedem einzelnen System wurde die Produktion immer als Rezeptortyp-abhängig beschrieben (Chapot, M. P. *et al.*, 1990; Sarramegna, V. *et al.*, 2003). Demnach musste bislang für jeden Rezeptortyp das effizienteste Zellsystem empirisch ermittelt werden.

Eine allgemein gültige Beobachtung war jedoch, dass alle bis dato in Säugerzellen heterolog exprimierten GPCRs zur spezifischen Ligandenbindung fähig waren. Mit nur einer Ausnahme von ~50 Expressionssystemen konnte zusätzlich eine funktionelle Kopplung an das dazugehörige G-Protein gezeigt werden (Sarramegna, V. *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass heterologe Säugerzellensysteme für *in vivo* Funktionsstudien sehr gut geeignet sind. Grund hierfür sind nicht nur die korrekte Proteinsynthese und Translokation zur Zielmembran, sondern auch das Vorhandensein der endogenen Proteine von an GPCRs angeschlossenen Signalkaskaden in den Zellen.

Diese Beobachtungen treffen jedoch nur in geringem Ausmaß auf die Expression von Geruchsrezeptoren als Mitglieder der GPCRs zu. Obwohl verschiedene heterologe Expressionssysteme wie z. B. *E. coli* (Kiefer, H. *et al.*, 1996), SF9 Insektenzellen (Raming, K. *et al.*, 1993; Nekrasova, E. *et al.*, 1996) und HEK-293 Säugerzellen (Gimelbrant, A. A. *et al.*, 1999; Hatt, H. *et al.*, 2001) seit Jahren für die Expression von Geruchsrezeptoren verwendet werden, war nur selten eine Funktionalität der Rezeptoren zu beobachten. Eine unzureichende Translokation zur Plasmamembran durch das verstärkte Zurückhalten der Rezeptoren im ER scheint der Hauptgrund für die oftmals ausbleibende funktionelle Proteinsynthese in heterologen Systemen zu sein (McClintock, T. S. *et al.*, 1997; Gimelbrant, A. A. *et al.*, 1999; Gimelbrant, A. A. *et al.*, 2001; Lu, M. *et al.*, 2003).

Aus diesen Gründen wurden im Rahmen der vorgelegten Arbeit neue OR-Expressionssysteme etabliert, welche die Translokation und Funktionalität des Geruchsrezeptors OR5 gewährleisten.

Als Säugerzellensystem für funktionelle Studien wurde die murine Zelllinie P19 ausgewählt. Diese stammt aus einem murinen Hodenkarzinom und ist für ihre Differenzierbarkeit in neuronale Zellen bekannt. Durch Goto und Mitarbeiter konnte gezeigt werden, dass u. a. in Hodengewebszellen die Expression von olfaktorischen Rezeptoren erfolgt (Goto, T. *et al.*, 2001). Das damit verbundene Potential der P19-Zelllinie zur funktionellen Produktion von Geruchsrezeptoren sollte in dieser Arbeit untersucht und für Funktionsstudien des OR5-Rezeptors im Rahmen seiner Signaltransduktion genutzt werden.

Für die weit größeren Mengen, die für eine Strukturanalyse benötigt werden, wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt. Dieses Expressionssystem sollte eine hohe Proteinsyntheserate sowie die Funktionalität der OR5-Proteinspezies gewährleisten, um eine Isolierung und strukturelle Untersuchung zu ermöglichen.

4.1.1. Die murine Stammzelllinie P19: eine ideale Plattform zur funktionellen Expression von Geruchsrezeptoren?

Embryonale Stammzellen besitzen die nahezu unbeschränkte Fähigkeit zur Zellteilung und das Potential, sich theoretisch in jeden Zelltyp des Ursprungsorganismus zu differenzieren. Eine Vielzahl muriner Zelllinien wurde aus embryonalen Stammzellen als permanente Zelllinie generiert. In Anbetracht ethischer Konflikte bezüglich humaner Stammzellforschung liefern sie eine gute Grundlage für Untersuchungen zur Zell- und Entwicklungsbiologie sowie der Zellregeneration.

Die *Odora*-Zellen, eine aus ORNs generierte Stammzelllinie, wurde bereits als Plattform für die Geruchsrezeptorexpression vorgestellt. In der *Odora*-Zelllinie wurde eine korrekte Translokation rekombinanter Geruchsrezeptorspezies gezeigt, was eventuell auf ihren Ursprung zurückzuführen ist. Allerdings wurde für diese Zelllinie der Transport zur Plasmamembran nur im differenzierten Zustand gezeigt, in undifferenzierten, Fibroblasten-ähnlichen Zellen werden ORs auch hier in Golgiapparat und Endosomen zurückgehalten (Murrell, J. R. und Hunter, D. D., 1999; Gimelbrant, A. A. *et al.*, 2001). In anderen Zellsystemen wurde die OR-Translokation nur durch Co-Transfektion von *odr-4*, einem Chaperon aus *Caenorhabditis elegans* (Dwyer, N. D. *et al.*, 1998; Gimelbrant, A. A. *et al.*, 2001), oder durch Fusionen von Transportsequenzen am N-Terminus des Rezeptors erreicht (Wellerdieck, C. *et al.*, 1997; Krautwurst, D. *et al.*, 1998; Bockaert, J. und Pin, J. P., 1999; Wetzel, C. H. *et al.*, 1999; Gimelbrant, A. A. *et al.*, 2001; Gaillard, I. *et al.*, 2002). So wurde z. B. gezeigt, dass OR-Chimären mit den ersten 20 Aminosäuren von Rhodopsin effizienter zur Plasmamembran transportiert werden. Weitere Fusionsstrategien beruhten z. B. auf der N-terminalen Membranimportsequenz eines Serotonin- sowie des 5-HT₃ Rezeptors.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich ebenfalls um eine Stammzelllinie, die murinen P19-Zellen, die als Expressionsplattform für den Geruchsrezeptor dienten. Es wurden zunächst eine eingehende Untersuchung der P19-Zellen, und anschließend ein erfolgreicher Funktionsnachweis des rekombinanten Rezeptors in diesen Zellen durchgeführt. Ausgewählt

wurde diese Zelllinie, da sie verschiedene Charakteristiken aufweist, welche für die funktionelle GPCR-Expression von Bedeutung sind. Diese Zelllinie ist eine Teratokarzinom-Stammzelllinie, die durch Implantation embryonaler Stammzellen in murines Hodengewebe generiert wurde. Retinolsäure (RA)-Behandlung induziert die Differenzierung von P19-Zellen in einen neuronalen Phänotyp (Jones-Villeneuve, E. *et al.*, 1982; Jones-Villeneuve, E. M. *et al.*, 1983), charakterisiert durch eine bipolare neuronale Morphologie und die Expression von Neurotransmittern sowie den neuronalen Markern β -III-Tubulin und Neurofilament-200 (Jones-Villeneuve, E. M. *et al.*, 1983; Martins, A. H. *et al.*, 2005). Die Reifung der P19-Zellen scheint ab dem 9. Tag nach RA-Induktion abgeschlossen, da zu diesem Zeitpunkt Synaptotagmin nachgewiesen werden kann (Parnas, D. *et al.*, 1998). Dieses Protein zeigt die Bildung von Synapsen in Neuronen an. Aufgrund des Nachweises verschiedener cholinergischer Marker und Subtypen des muskarinen Acetylcholinrezeptors (mAChR) wird diese Zelllinie als *in vivo*-Modell für die neuronale Differenzierung zur Untersuchung von mAChRs verwendet (Parnas, D. *et al.*, 1998). So konnte durch „Calcium Imaging“-Experimente gezeigt werden, dass nach neuronaler Differenzierung in diesen Zellen eine Kopplung des mAChR an die entsprechende Signalkaskade erfolgt (Martins, A. H. *et al.*, 2005). Da es sich bei dem muskarinen AChR ebenfalls um ein Mitglied der Familie der GPCRs handelt, welches über G_i Signale an das Zellinnere weiterleitet, basiert die vorliegende Arbeit auf der Annahme, dass die P19-Zellen ebenfalls eine gute *in vivo* Plattform für die funktionelle Kopplung von olfaktorischen GPCRs bieten.

In dieser Arbeit wurden die P19-Zellen als eine Zelllinie vorgestellt, die den Phänotyp gereifter olfaktorischer Rezeptorneuronen aufweist und nicht ursprünglich aus der embryonalen, olfaktorischen Plakode stammt. Die effiziente Translokation eines Geruchsrezeptors sowie die stabile Immortalisierung hebt die P19-Zelllinie von anderen in diesem Bereich verwendeten Zellsystemen ab, deren größtes Problem die mangelnde Translokation rekombinanter Rezeptoren zur Plasmamembran ist. Bislang wurde ausschließlich den ORNs die Fähigkeit zugeschrieben, nicht-manipulierte ORs korrekt zur Plasmamembran zu translozieren, und sogar einige olfaktorische Zelllinien waren nicht in der Lage, die Translokation dieser Rezeptorgruppe korrekt durchzuführen (McClintock, T. S. *et al.*, 1997; Gimelbrant, A. A. *et al.*, 1999). Eine Ursache für den Verbleib von Plasmamembranproteinen im ER ist neben der Fehlfaltung auch das Fehlen eines „Bindungspartners“ zur Heteromerisierung. Etwas ähnliches ist für GPCRs beschrieben, deren Akkumulation in Subbereichen der Plasmamembran nach Bockaert durch spezielle Helferproteine bewirkt wird (Bockaert, J. und Pin, J. P., 1999). Eventuell könnte in ORNs auch ein Transportsuppressor fehlen, der in anderen Zelllinien konstitutiv exprimiert wird. Worauf diese komplexen Transportmechanismen beruhen, bleibt unklar. Es wird jedoch offensichtlich,

Seite 128

dass sie in olfaktorischen Zellen streng kontrolliert sind, was erneut die besondere Stellung dieser Zellen hervorhebt. In dieser Arbeit wurde erstmals die funktionelle Translokation eines Geruchsrezeptors in einer nicht olfaktorischen Zelllinie ohne die Verwendung spezieller N-terminaler Transportsequenzen gezeigt. Abgesehen von einer Histidin-Abfolge und kurzen Linker-Sequenzen wurde die Expression des Geruchsrezeptors ohne Signalsequenzen durchgeführt. Im Unterschied zu der *Odora*-Zelllinie wird das rekombinante Geruchsrezeptorprotein sogar in nicht differenzierten Zellen in die Plasmamembran inseriert.

Nach unserem Wissen wurde diese Zelllinie bisher nicht auf typische olfaktorische Marker, wie beispielsweise das olfaktorische Marker Protein (OMP), untersucht. OMP ist ein cytoplasmatisches Protein, welches als genereller Marker für adulte olfaktorische Rezeptorneuronen (ORNs) bzw. vomeronasale Neuronen in Vertebraten gilt (Tarozzo *et al.*, 1998). Die Funktion des Proteins ist noch nicht vollständig geklärt, es existieren jedoch Hinweise darauf, dass OMP als allosterischer Modulator eines Bestandteiles der olfaktorischen Signalkaskade fungiert (Smith, P. C. *et al.*, 2002). Obwohl sich die Expression von Geruchsrezeptoren nicht ausschließlich auf Neuronen des olfaktorischen Epithels beschränkt, sondern auch in Gewebe aus Hoden, Herz, Milz und Ganglien nachgewiesen wurde (Parmentier, M. *et al.*, 1992; Drutel, G. *et al.*, 1995; Blache, P. *et al.*, 1998; Weber, M. *et al.*, 2002), ist die *OMP*-Expression nach allgemeiner Ansicht auf maturierte ORNs limitiert. Bei der P19-Zelllinie handelt es sich jedoch *nicht* um eine Zelllinie, welche aus Vorläuferzellen der ORNs generiert wurde, wie es für diverse, auf dem Gebiet der Olfaktion zu Forschungszwecken eingesetzten Zelllinien der Fall ist. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass *OMP* in den P19-Zellen exprimiert wird, und zusätzlich eine signifikante Hochregulierung der *OMP*-mRNA im Kontext der neuronalen Differenzierung erfolgt.

Das Vorkommen von G-Proteinen ist ebenfalls für diese Zelllinie beschrieben. Es handelt sich um $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$, welche offenbar eine wichtige Rolle in der neuronalen Differenzierung der P19-Zellen darstellen (Jho, E.-H. und Malbon, C. C., 1997), jedoch nicht an der olfaktorischen Signalkaskade beteiligt sind. Mit dem Nachweis von G_{olf} und G_q konnten wir den P19-Zellen zwei weitere endogene G-Proteine zuweisen. Bei G_{olf} handelt es sich um das olfaktorische G-Protein, welches vorwiegend in adulten ORNs exprimiert wird, unlängst jedoch auch in Spermien detektiert wurde (Baxendale, R. W. und Fraser, L. R., 2003; Spehr, M. *et al.*, 2004). Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass eine auf Olfaktion begründete Chemotaxis in Spermienzellen belegt wurde. G_q ist zum einen in Chemotaxisvorgänge involviert, zum anderen ist es aber auch hinsichtlich der Olfaktion erwähnenswert, da für verschiedene

Geruchsrezeptoren eine Kopplung über G_q an den Inositol 1,4,5- Triphosphat (IP3) - anstelle des cAMP Signaltransduktionsweges - gezeigt wurde (Boekhoff, I. *et al.*, 1990).

Ein weiteres Markerprotein ist die Adenylylcyclase III (ACIII), ein Membran-assoziiertes Protein, welches nach Aktivierung durch G-Proteine die Umsetzung von ATP zu cAMP katalysiert. Auch dieses Protein wurde ursprünglich im olfaktorischen Epithelium entdeckt und wird vorrangig dort exprimiert. Dieses Enzym wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit auf Protein-Ebene durch Immunmarkierungs-Experimente in der P19-Stammzelllinie detektiert.

Der Nachweis von OMP, G_{olf} und ACIII in den P19-Zellen liefert einen deutlichen Hinweis darauf, dass diese Zelllinie zahlreiche Eigenschaften von Neuronen des olfaktorischen Epitheliums aufweist. Es lässt sich spekulieren, dass die zelluläre Umgebung bei der Entstehung des Karzinoms (dem Hodengewebe) - etwa durch ausgeschüttete Botenstoffe - zu einer gewissen Modulation der Transkriptionsereignisse geführt hat, wodurch eine Art „Prägung“ der Zellen durch die Umgebung des Gewebes stattfand. Wie schon erwähnt, weisen Zellen aus Hodengewebe Ähnlichkeiten zu olfaktorischen Zellen auf, wodurch sich eventuell der besondere Phänotyp der P19-Zellen erklären lässt. Eine andere Möglichkeit ist natürlich eine große Heterogenität innerhalb der P19-Zellen, die unter anderem neuronale Zellen mit ORN-Phänotyp zulässt.

Die Funktionalität des exprimierten Geruchsrezeptors wurde durch Untersuchungen zum Liganden-induzierten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle belegt. Im Einklang mit den Ergebnissen zur Hochregulierung olfaktorischer Markerproteine nach Differenzierung der P19-Zellen ließ sich in über der Hälfte aller Messungen ein Ca^{2+} -Einstrom nach Zugabe des OR5-Liganden Lilial in neuronalen, *OR5-SFVICap*-infizierten Zellen zeigen. Trotz einer effizienten Translokation des Rezeptors auch in Fibroblasten-ähnlichen P19-Zellen war kein eindeutiger, Rezeptor-bedingter Ca^{2+} -Fluß zu beobachten. Sowohl in Zellen, welche *LacZ* exprimierten als auch in den *OR5*-infizierten Zellen erfolgte in 11,8 bzw. 16,7% der Messungen ein Ionenstrom nach Ligandenzugabe. Da davon auszugehen ist, dass ein korrekt translozierter Rezeptor - gerade im Falle der Geruchsrezeptoren – auch funktionell gefaltet sein muss, kann spekuliert werden, dass die ausbleibende Signaltransduktion in Fibroblasten-ähnlichen P19-Zellen auf Defizite im Bereich der Transduktions-Komponenten zurückzuführen ist. Trotz allem bedarf es weiterer Messungen und Kontrollen, um zu klären, ob diese vereinzelt Induktionen auf methodischen Interferenzen beruhen, oder auf eine teilweise erfolgte, spontane Differenzierung der Zellen und endogene Rezeptoren zurückzuführen sind.

Zusammengefasst erfolgte in P19-Zellen eine signifikante Hochregulierung verschiedener, für olfaktorische Neuronen charakteristischer Schlüsselemente im Verlauf der neuronalen

Differenzierung sowie der korrekte Transport eines exogenen Geruchsrezeptors zur Plasmamembran. Zusätzlich wurde ein entscheidender Hinweis auf die funktionelle Kopplung des rekombinanten Rezeptors an die Signalkaskade in neuronalen P19-Zellen erbracht.

Eine Zelllinie, welche die Fähigkeit besitzt, rekombinante ORs korrekt und funktionell zu translozieren, könnte Einblicke in grundlegende Transport- und Funktionsmechanismen geben. Diese Zelllinie soll in Zukunft als potente Plattform für Expressions- und Funktionsstudien weiterer olfaktorischer Rezeptoren sowie anderer GPCRs dienen.

4.1.2. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als potentes Expressionssystem für einen Geruchsrezeptor

Besonderes Augenmerk liegt neben funktionellen Untersuchungen auch auf der Strukturaufklärung von GPCRs, da bisher nur eine Struktur dieser Rezeptorfamilie, die des Rinderopsins, vorliegt (Palczewski, K. *et al.*, 2000). Da GPCRs momentan jedoch ~zwei Drittel aller pharmazeutisch aktiven Rezeptoren darstellen, ist die Strukturaufklärung von Mitgliedern dieser Familie sehr wichtig, um generelle Mechanismen zu entschlüsseln und in weitere Untersuchungen einzubeziehen.

In dieser Arbeit konnten unter anderem zwei grundlegende Problematiken der Membranprotein-Forschung bewältigt werden: zum einen wurde das OR-Protein bis zu einer hohen Homogenität isoliert, zum anderen reichten die erhaltenen Mengen aus, um neben den bereits beschriebenen Methoden in Zukunft weitere Untersuchungen wie z. B. die Integration des Rezeptors auf künstliche Oberflächen zu ermöglichen. Dieser Ansatz könnte Ergebnisse liefern, die eine Weiterentwicklung molekular-basierter Sensoren ermöglicht. Zusätzlich könnten durch Interaktionsstudien weitere Einblicke in Aktivierungs/Deaktivierungs-Vorgänge gewonnen werden.

Die strukturelle Untersuchung von Proteinen durch Kristallisation ist in der Regel ein langwieriger Prozess, da aufwendige Optimierungen notwendig sind, um geeignete Bedingungen für das Kristallwachstum zu identifizieren. Aus diesem Grund werden meist größere Mengen eines Proteins benötigt. Aufgrund der vergleichsweise geringen Menge an Geruchsrezeptoren in einem Organismus sollte das Geruchsrezeptorprotein OR5 nicht quantitativ aus Primärgewebe gewonnen werden. Deshalb wurde unter anderem die Isolierung des OR5-Proteins aus P19-Zellen untersucht. Aufgrund der geringen Zellzahl dieser adhärent wachsenden Zelllinie wurde jedoch ein weiteres Expressionssystem etabliert, um größere Mengen des Rezeptorproteins zu

produzieren. In der Regel werden für diese Art der Fragestellung *E. coli*- oder Hefezellen verwendet, da mit diesen Systemen höhere Zellmengen als mit Säugerzellen erreicht werden. In prokaryotischen Zellen können oft hohe Proteinsyntheseraten erzielt werden, wodurch das hydrophobe, rekombinante Protein allerdings meistens in Einschlußkörpern vorliegt. Dadurch kann eine Aufreinigung zwar erleichtert werden, je nach weiterer Verwendung bedarf es jedoch einer Rückfaltung in den potentiell nativen Zustand des Proteins. Dieser Vorgang funktioniert nicht immer und beinhaltet im Falle einer erfolgten Rückfaltung immer die Möglichkeit, zwar gefaltetes, jedoch nicht nativ gefaltetes Protein zu erhalten. Weil Hefe eine Art intermediäre Stellung zwischen prokaryotischen und höheren eukaryotischen Zellen einnimmt und für die Produktion von Säugetierproteinen verschiedene Vorteile von *E. coli*- und Säugerzellen in sich vereint, wurde sie unter anderem im Rahmen der vorgelegten Arbeit zur Expression von OR5 ausgewählt. Vorteile sind die einfache Handhabung und genetische Manipulierbarkeit, wie man es in ähnlicher Weise von Prokaryoten kennt. Außerdem sind relativ hohe Expressionsraten rekombinanter Proteine im Bereich von durchschnittlich ~1% Protein/Trockengewicht (Angabe aus LabFaqs, Roche Diagnostics GmbH) erreichbar - deutlich mehr als in Säugerzellen. Gegenüber *E. coli* besitzt Hefe die Fähigkeit, posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Glykosylierungen oder Acetylierungen, durchzuführen. Dadurch wird gegebenenfalls die korrekte Translokation zu den Zielkompartimenten ermöglicht. Es ist zwar bekannt, dass die Art der Modifikationen im Detail von denen in Säugerzellen abweicht, in der Regel können in Hefe jedoch auch komplexe Proteine, wie z. B. Membranproteine, funktionell exprimiert werden. Da Hefen endogene GPCRs sowie G-Proteine enthalten, wurde davon ausgegangen, dass sie posttranslationale Modifikationen zur Herstellung funktioneller GPCRs sowie die nötigen Translokationsprozesse durchführen können. Die von Säugermembranen abweichende Lipidzusammensetzung der Hefe sowie die schon erwähnten Unterschiede in der Glykosylierung könnten natürlich auch den nativen Zustand und die Funktionalität des rekombinanten Rezeptors beeinflussen (Kaushal, S. *et al.*, 1994). Es wurde jedoch bisher gezeigt, dass fast alle in Hefe exprimierten GPCRs zur Ligandenbindung fähig waren. Obwohl nur in wenigen Fällen eine G-Protein-Kopplung nachgewiesen wurde (King, K. *et al.*, 1995; Price, L. *et al.*, 1995; Kajkowski, E. M. *et al.*, 1997; Erickson, J. R. *et al.*, 1998), sollte das Hefesystem als zweites OR5-Expressionssystem verwendet werden, da für die Proteinsynthese des Rezeptors im großen Maßstab keine G-Protein-Bindung *in vivo* notwendig ist. Die Induktion des OR-Gens in dem rekombinanten *S. cerevisiae*-System erfolgte unter Kontrolle des starken *GALI*-Promotors, wodurch vergleichsweise hohe Expressionsniveaus erreicht wurden. In Kombination mit der durchgeführten Observierung des UPR-Zustandes der Expressionsstämme und der zusätzlichen

Co-Expression von Transkriptionsfaktoren wurde die Qualität der Proteinsynthese entscheidend optimiert. Die Produktion von funktionellem Protein ist eine grundlegende Voraussetzung für die Strukturaufklärung nativ gefalteter Proteine. Das verwendete Expressionssystem erwies sich als geeignet für die Proteinsynthese des Geruchsrezeptors, da neben den schon erwähnten Vorteilen eine spezifische Ligandenbindung am isolierten Rezeptor gezeigt werden konnte. Der Anteil funktionellen Proteins am isolierten Gesamtprotein betrug >90%. Zusätzlich wurde ein K_D -Wert von 94 μM erreicht. Die Affinität erscheint in Relation zu *in vivo* Rezeptor/Liganden-Paarungen gering, aufgrund der Hydrophobizität des Liganden, der Anwesenheit von Detergenz-Mizellen und der Abwesenheit von Odorant-Bindeproteinen im verwendeten *in vitro* System kann jedoch spekuliert werden, dass die tatsächliche Ligandenkonzentration in der wässrigen Phase wesentlich geringer als die absolute Konzentration war. Verglichen mit dem K_D -Wert von 340 μM eines aus *E. coli* isolierten OR5-Rezeptors (Kiefer, H. *et al.*, 1996) konnte für den aus Hefe isolierten Rezeptor demnach sogar eine wesentlich höhere Liganden-Affinität demonstriert werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass offensichtlich keine N-Glykosylierung des OR5-Rezeptors für seine Funktionalität *in vitro* notwendig war, kann argumentiert werden, dass ein prokaryotisches System ebenfalls für die Expression von Geruchsrezeptoren geeignet ist. Allerdings ist bisher nur ein Fall für eine Geruchsrezeptorproduktion in *E. coli* bekannt. Das Rezeptorprotein lag in Einschlusskörpern vor, wodurch eine Rückfaltung des denaturierten Rezeptors notwendig war. Trotz einer hohen Ausbeute von 20 mg/l Kultur wurde nach Aussage der Autoren keine Homogenität nach der Reinigung erzielt. Besonders hervorzuheben ist außerdem, dass die Autoren die hohe Expression nur durch gezielte Änderung der Ladungsverteilung des Rezeptors im N-terminalen Bereich der Aminosäure-Sequenz erreichen konnten (Kiefer, H. *et al.*, 1996). Im Vergleich war die Ausbeute des Geruchsrezeptors OR5 aus dem Expressionssystem Hefe in dieser Arbeit zwar wesentlich geringer, dafür lag das Protein in einer deutlich höheren Homogenität, und vor allem innerhalb des OR5-ORFs in Form der nativen Sequenz vor.

Erst kürzlich wurde durch Ishihara und Mitarbeiter gezeigt, dass ein auf *E. coli*-Lysat basierendes *in vitro* Transkriptions/Translationssystem in Gegenwart von Detergenz und Lipidvesikeln zu einer hohen Ausbeute löslicher GPCR-Proteine führte (Ishihara, G. *et al.*, 2005). Die Rezeptoren wurden in diesem Fall als Thioredoxin-Fusionsproteine in einer mengenoptimierten Form der *in vitro* Transkription/Translation produziert. Ein Beispiel stellt der muskarine Acetylcholinrezeptor mit einer Ausbeute von rund 1 mg/ml Translationsansatz dar. Eventuell könnte dieser Ansatz auch für die Proteinsynthese eines nicht notwendigerweise glykosylierten Geruchsrezeptorproteins in Betracht kommen. Ein Vorteil dieses *in vitro* Systems gegenüber

E. coli wäre die Vermeidung der Zielprotein-Denaturierung durch den direkten Einbau des translatierten Rezeptors in Lipidvesikel.

Verglichen mit dem in dieser Arbeit verwendeten Hefeexpressionssystem könnte durch die *in vitro* Translation der limitierende Schritt der Solubilisierung umgangen werden. Trotz allem ist zu bedenken, dass die *in vitro* Transkription/Translation keine Alternative zu einem Expressionssystem wie z. B. dem Hefesystem bietet, wenn quantitative Isolierungen vorgenommen werden sollen.

Entgegen der bislang veröffentlichten Ergebnisse war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, eine starke Geruchsrezeptorexpression in einem Hefesystem zu erzielen. Nach Durchführung der Isolierung inklusive der Solubilisierung konnte eine Zielprotein-Ausbeute von i. d. R. 5% der Ausgangsmenge erzielt werden. Auf den ersten Blick erscheint diese Ausbeute gering, es ist jedoch zu beachten, dass in großen Volumina mit Solubilisierungs-Effizienzen von nur ~10-15% gearbeitet wurde, und im Rahmen von drei Chromatographie-Schritten Verluste auftreten - sowohl durch unterbliebene Bindung als auch durch Präzipitation des Proteins. Deutlich wurde die Präzipitation von einem Teil des Proteins nach den ersten beiden Chromatographie-Schritten beobachtet. Diese ist eventuell auf die pH-induzierte Elution des Rezeptors nach der Antikörper-Chromatographie zurückzuführen.

Außerdem wurde gezeigt, dass es sich bei dem isolierten OR5-Protein um vorwiegend gefaltetes, funktionelles Protein handelt, welches zur Ligandenbindung befähigt ist. Zusätzlich wurde der Geruchsrezeptors OR5 im mg-Maßstab isoliert.

Ein ganz anderes Problem, welches nicht experimentell behoben werden kann, stellte die Solubilisierung des Rezeptors dar: trotz einer Vielzahl untersuchter Detergenzien wurden i. d. R. nur geringe Solubilisierungseffizienzen des Rezeptors erzielt. Eine mögliche Erklärung für die geringe solubilisierbarkeit liegt in der Akkumulation des Zielproteins in schwer löslichen Bereichen der Plasmamembran. Aus diesem Grund soll im folgenden Abschnitt eine mögliche Assoziation des Rezeptorproteins in so genannten „Lipid Rafts“ in der Plasmamembran diskutiert werden.

4.2. Ist der Geruchsrezeptors OR5 mit „Lipid Rafts“ in der Plasmamembran assoziiert?

Auffällig war die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete geringe Solubilisierbarkeit des heterolog synthetisierten Rezeptors aus den Membranen von *S. cerevisiae* und P19-Zellen. Vor allem die eingeschränkte Solubilisierungseffizienz von Triton X-100 – bekannt für hohe Solubilisierungseffizienzen - wirft die Frage auf, ob das Rezeptorprotein eventuell mit so genannten „Lipid Rafts“ in der Plasmamembran co-lokalisiert und deswegen einer Solubilisierung nicht zugänglich ist.

„Lipid Rafts“, oder genauer als Mikrodomänen bezeichnet, sind nach heutiger Ansicht sphingolipid- und cholesterinreiche Domänen innerhalb der Membran, die aufgrund höherer Acylketten-Schmelztemperaturen nicht in der konventionellen flüssig-kristallinen Phase (I_c), sondern in der so genannten „cholesterol-rich liquid ordered (I_o) phase“ vorliegen. Diese Bereiche in der Membran zeichnen sich neben einer geringen Dichte und einem hohen Anteil an Caveolin (Anderson, R. G. W., 1993) u. a. dadurch aus, dass sie in kalten Temperaturen nicht durch Triton X-100 gelöst werden: übrig bleibt unlösliches Lipid in Form von „Detergenz-resistenten Membranen“ (DRMs) (Brown, R. E. und Rose, J. K., 1992; Kubler, E. *et al.*, 1996; London, E. und Brown, D. A., 2000). Im Gegensatz dazu sind Phospholipide größtenteils Detergenz-löslich. DRMs treten in den meisten Säugerzellmembranen auf, wurden aber auch schon aus *S. cerevisiae* isoliert (Kubler, E. *et al.*, 1996).

Diesen Mikrodomänen werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. Neben einem Einfluß auf Sekretion und Endocytose sowie „Protein-Sortierung“ innerhalb der Membran (Fiedler, K. *et al.*, 1993; Brown, D. A. und London, E., 1998; Bagnat, M. *et al.*, 2000) ist eine wesentliche Funktion die erleichterte Initiierung von Signaltransduktionskaskaden (Lisanti, M. P. *et al.*, 1994; Simons, K. und Ikonen, E., 1997; Anderson, R. G. W., 1998; Brown, D. A. und London, E., 2000). Ein gut untersuchtes Beispiel ist $Fc\epsilon RI$, der IgE Rezeptor auf Basophilen und Mastzellen. Es konnte eine signifikante Co-Lokalisierung des Rezeptors mit einem gesättigten Lipid nachgewiesen werden, welches überwiegend in geordneten Domänen geringer Dichte in Membranen vorliegt (Spink, C. H. *et al.*, 1990; Thomas, J. *et al.*, 1994; Baird, B. *et al.*, 1999).

Des Weiteren ist eine Vielzahl anderer Schlüssel-moleküle aus verschiedenen Signaltransduktionsvorgängen in derartigen Membran-Clustern angereichert (Anderson, R. G. W., 1998). Es wurde zum Beispiel eine deutliche Co-Lokalisation von mehreren G-Proteingekoppelten Rezeptoren (Raposo, G. *et al.*, 1987; Raposo, G. *et al.*, 1989; Chun, M. *et al.*, 1994),

diversen G-Proteinen (Sargiacomo, M. *et al.*, 1993; Huang, C. *et al.*, 1997; Wu, C. *et al.*, 1997; Okamoto, T. *et al.*, 1998) und der Adenylylcyclase (Huang, C. *et al.*, 1997) mit DRMs innerhalb der Plasmamembran höherer Eukaryoten nachgewiesen. Im Falle der G-Proteine wurde gezeigt, dass Caveolin-1, welches als Bestandteil von Caveolae mit DRMs assoziiert ist, G-Proteine in die Mikrodomänen rekrutiert und eventuell sogar eine regulatorische Aufgabe übernimmt (Li, S. *et al.*, 1995; Li, S. *et al.*, 1996; Scherer, P. E. *et al.*, 1996). Ein weiteres Beispiel betrifft die Adenylylcyclase. Diese wurde, wie schon durch Huang und Mitarbeiter in Lymphom-Zellen gezeigt, im Rahmen dieser Arbeit durch Immunmarkierung in den P19-Zellen nicht homogen an der Plasmamembran, sondern in lokalen Anreicherungen nachgewiesen (Huang, C. *et al.*, 1997). Wie aus Abbildung 61 deutlich hervorgeht, liegt dieses Enzym punktuell in separierten Bereichen an der Plasmamembran vor. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die Arbeit von Schreiber und Mitarbeitern, in der dargestellt ist, dass Caveolin im olfaktorischen Epithel stark angereichert ist und auch Geruchsrezeptoren mit dem Auftreten von DRMs bzw. Caveolin korrelieren (Schreiber, S. *et al.*, 2000).

Das Vorkommen von zwei wichtigen Komponenten der olfaktorischen Signalkaskade in Mikrodomänen der Plasmamembran, die Hinweise darauf, dass GPCRs und im speziellen olfaktorische Rezeptoren ebenfalls in diesen Membrandomänen akkumulieren, sowie die Resultate aus dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass der heterolog produzierte Geruchsrezeptor OR5 auch in DRMs in *S. cerevisiae*- und P19-Zellmembranen vorliegt.

Zusammengefasst kann demnach postuliert werden, dass die olfaktorische Signaltransduktion ebenfalls einer funktionellen Organisation innerhalb spezialisierter Plasmamembran-Domänen unterliegt und die Anreicherung in den schwer löslichen DRMs ein generelles Phänomen ist.

Gerade weil es sich bei der Olfaktion um einen sehr schnellen und empfindlichen Detektionsmechanismus handelt, kann spekuliert werden, dass tatsächlich ein höherer Ordnungsgrad vorhanden sein muss, der ein Zusammenwirken der vielen Komponenten des Signaltransduktions-Apparates überhaupt ermöglicht. Diese spezielle zwei-dimensionale Anordnung in der Plasmamembran könnte *in vivo* den Zweck erfüllen, die Komponenten des olfaktorischen Signaltransduktions-Weges lokal zusammenzuführen, um Diffusionswege zu minimieren und das Wechselspiel zwischen Bestandteilen und auch verschiedenen Signalwegen besser zu kontrollieren.

In diesem Kontext sollen nun auch die widersprüchlichen Resultate zur Lokalisation von OR5 in rekombinanten *S. cerevisiae*-Zellen beleuchtet werden.

4.3. Lokalisation des Geruchsrezeptors in *S. cerevisiae*-Membranen

Im Hefeexpressionssystem führten verschiedene Untersuchungsmethoden zu widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der Rezeptors-Lokalisation. Für beide Expressionssysteme wurde durch die Methode der Membranseparation eine signifikante Anreicherung des Rezeptorproteins in der Plasmamembran gezeigt. Durch *in situ* Immunmarkierungen wurde ebenfalls eindeutig gezeigt, dass der rekombinante Rezeptor in P19-Zellen vorwiegend in der Plasmamembran vorliegt, während in den rekombinanten Hefezellen eine gleichmäßige, nicht nur auf die Plasmamembran beschränkte Verteilung des Zielproteins auftrat (Abb. 29).

Geht man nun aber von der oben beschriebenen bevorzugten Lokalisation des Rezeptors in Mikrodomänen der Plasmamembran aus, erwarten wir, dass das Protein entgegen der Ergebnisse der Immunmarkierungs-Experimente vor Allem in der Hefe-Plasmamembran lokalisiert sein sollte. Zu begründen ist diese Annahme damit, dass in den Membranen des ER in Hefe nur sehr geringe Konzentrationen von Sphingolipiden vorhanden sind (Patton, J. L. und Lester, R. L., 1991; Patton, J. L. und Lester, R. L., 1992). Da DRMs jedoch vorwiegend aus Sphingolipiden aufgebaut sind, und diese fast ausschließlich in der Plasmamembran vorliegen (Brown, D.A. und London, E, 1998), muss der Großteil des rekombinanten Rezeptors tatsächlich aus der Plasmamembran stammen.

Wenn also die geringe Triton X-100-Löslichkeit in direktem Zusammenhang mit der Assoziation des Rezeptors mit Mikrodomänen in der Plasmamembran steht, würde dieses Ergebnis in Kombination mit der Immunmarkierung im Western-Blot die *in situ* Markierung an fixierten Hefezellen relativieren. Zusätzlich muß betont werden, dass die geringe UPR-Aktivierung im rekombinanten Hefe-Expressionsstamm keinen Hinweis auf eine verstärkte Fehlfaltung und damit einen Verbleib des ORs im ER aufzeigte.

Das Abwägen aller erhaltenen Resultate lässt demnach eine überwiegende Anreicherung des rekombinanten Rezeptors in der Plasmamembran als wahrscheinlich erscheinen. Trotz allem kann diese offene Frage nur in weiteren Experimenten geklärt werden.

4.4. Isolierung und Kristallisation von Membranproteinen

Seit Aufklärung der ersten Struktur eines Proteins im Jahre 1965 (Blake, C. C. *et al.*, 1965) konnten bis dato die Strukturen von rund 30.000 Proteinen oder Proteinkomplexen gelöst werden. Bei genauer Durchsicht der Daten wird jedoch deutlich, dass es sich fast ausschließlich um

lösliche Proteine handelt. Ein sehr geringer Anteil von nur 88 Strukturen (Stand April 2005, http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html) sind auf Transmembranproteine zurückzuführen. Das entspricht einem Verhältnis von 341:1 Strukturen löslicher Proteine gegenüber Transmembranproteinen. Von diesen wenigen Membranprotein-Strukturen ist wiederum der Großteil bakterieller Herkunft, und es existiert bis dato erst ein Beispiel für ein heterolog exprimiertes Membranprotein, das einer Strukturaufklärung unterzogen werden konnte (Long, S. B. *et al.*, 2005). Diese Diskrepanz zwischen Strukturen von löslichen- zu Membranproteinen wird noch deutlicher, wenn man bedenkt, dass 20-30% aller offenen Leserahmen aus Eubakterien, Archaea und Eukaryoten für Membranproteine kodieren (Wallin, E. und von-Heijne, G., 1998).

Hauptursache für die geringe Zahl erfolgreicher Strukturaufklärungen von Membranproteinen liegt in der Schwierigkeit, sie zu isolieren, sowie dem negativen Einfluss ihrer Hydrophobizität und verwendeter Detergenzien auf die Kristallisation. Da Membranproteine *in vivo* nur in vergleichbar geringen Konzentrationen vorliegen, es jedoch ebenfalls schwierig ist, sie in heterologen Systemen im nativen Zustand zu produzieren (Tate, C. G., 2001), scheitert der Versuch, sie strukturaufklärenden Methoden zu unterziehen, meist schon *in nuce*.

Die Wahl des Expressionssystemes ist entscheidend für die Produktion von nativen Membranproteinen. Obwohl die Membraninsertion und Faltungsprozesse generellen Mechanismen unterliegen, existieren Unterschiede zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Systemen (Dobberstein, B., 1994). Eukaryotische Membranproteine werden unter Beteiligung des „Signal recognition particles“ ausnahmslos co-translational zur Membran transloziert, während die Translokation von prokaryotischen Membranproteinen zur inneren Membran post-translational erfolgen kann (Seluanov, A. und Bibi, E., 1997; de Gier, J.-W. und Luirink, J., 2001). Zusätzlich wirkt sich die Überproduktion heterologer sowie homologer Membranproteine häufig toxisch auf den Organismus aus, da die Integrität der Membranen durch den Insertionsvorgang gestört wird (Miroux, B. und Walker, J. E., 1998).

Doch auch nach einer erfolgreichen Proteinbiosynthese muss man sich erst noch den Problemen bei der Isolierung dieser stark amphipatischen Proteine widmen. Die native Umgebung des Proteins muss entfernt und durch Detergenzmoleküle ersetzt werden, welche in Form von Mizellen die Lipiddoppelschicht imitieren, ohne eine Denaturierung des Proteins zu verursachen. Das Entfernen und Ersetzen der natürlichen Lipidumgebung macht Membranproteine jedoch angreifbar für Proteasen. Während der proteolytische Verdau von Membranproteinen durch die Einbettung in die Lipiddoppelschicht stark verlangsamt wird, bieten Detergenzhüllen oft keinen

ausreichenden Schutz vor endogenen Proteasen. Deshalb ist es in vielen Fällen notwendig, Mixturen von verschiedenen Proteaseinhibitoren zuzusetzen, die vor allem die Aktivität von Metallo- und Serinproteasen inhibieren.

Zusätzlich muss für jedes individuelle Membranprotein das geeignete Detergenz experimentell ermittelt werden. Abhängig vom Zielprotein und durch Unterschiede in der Lipid- und Membranzusammensetzung der nativen Membranfragmente können die Solubilisierungseffizienzen stark variieren. Ein Detergenz ist zu wählen, mit welchem unter geeigneten Pufferbedingungen die Aktivität des Proteins erhalten bleibt. Doch auch die Wahl des Puffersystems kann von entscheidender Bedeutung sein, da Membranproteine selbst in Gegenwart von Detergenzien zur Aggregation tendieren. In den meisten Fällen wird ein neutraler pH-Wert gewählt, da in diesem Bereich die Integrität von Membranprotein in der Regel am besten gewährleistet ist.

Die häufig (wie auch in dieser Arbeit) gewählte Methode der „Immobilisierten Metall-Affinitäts-Chromatographie“ (IMAC) bietet für die Membranprotein-Isolierung einige wesentliche Vorteile:

1. Die Protein-Absorption wird häufig in einem für die meisten Membranproteine geeigneten, neutralen pH-Bereich durchgeführt.
2. Die Separation kann problemlos in Anwesenheit von NaCl erfolgen. Der Zusatz von NaCl zur Erhöhung der ionischen Stärke ist ratsam, wenn es zur Aggregation des Proteins kommt.
3. Neutrale Detergenzien beeinträchtigen nicht die Protein-Bindung und Elution.
4. Viele verschiedene Puffersysteme sind mit der IMAC kompatibel, so dass ein für das Protein geeigneter Puffer verwendet werden kann.

Meist reicht ein Chromatographie Schritt jedoch nicht zur vollständigen Aufreinigung aus. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Reinigungsschritt mit Hilfe des in der vorliegenden Arbeit generierten, monoklonalen Antikörpers spezifisch gegen den OR5-Rezeptor etabliert. Die Kombination dieser beiden Methoden für die Aufreinigung des OR5-Rezeptors war erfolgreich. Eine Messung der Funktionalität zeigte, dass der Großteil des isolierten Proteins zur funktionellen Ligandenbindung fähig war.

Mit dem notwendigen Gebrauch von Detergenzien entsteht jedoch das nächste Problem: es ist bekannt, dass diese Lösungsvermittler einen negativen Einfluss auf die Kristallisation haben, da sie den perfekt strukturierten Aufbau eines Kristalls stören. Demnach müssen zur systematischen Analyse von Kristallisationsbedingungen für einzelne Membranproteine nicht nur die bekannten Additive wie Salz und Präzipitationsmittel, sondern auch verschiedene Detergenzien getestet werden. Eine systematische Untersuchung von Kristallisationsbedingungen wird jedoch

wiederum durch die Tatsache erschwert, dass in der Regel sehr geringe Ausbeuten hochgradig gereinigter Membranproteine zur Verfügung stehen.

Die Proteinkonzentration sowie Verunreinigungen in der Probe beeinflussen zusätzlich den Kristallisationsvorgang. Zu niedrige Proteinkonzentrationen verhindern eine für die Kristallisation notwendige Sättigung der Lösung, während zu hohe Konzentrationen zur Ausbildung von unspezifischen Proteinaggregaten oder fehlerhaften Kristallen führen können. Fremdstoffe können eine Kristallisation verhindern oder die Entstehung von Kristallen niedriger Qualität mit geringer Streufähigkeit verursachen. In der Regel liefern homogene Kristalle eine höhere Auflösung (Thomas, B. R. *et al.*, 1996; Moreno, A. *et al.*, 2005).

Im Falle des Geruchsrezeptors OR5 war zwar die Ausgangskonzentration des Rezeptors direkt nach der Expression im Hefesystem hoch (0,9% des Rezeptors in Gesamtmembranen), es wurde jedoch offensichtlich, dass die Isolation bis zu einer apparenten Homogenität nicht ohne die monoklonalen OR5-Antikörper möglich gewesen wäre. Trotz methodisch unvermeidbarer Verluste eines großen Anteils des Zielproteins konnte ein Teil des gereinigten Rezeptorproteins für Kristallisationsversuche verwendet werden. Es wurden verschiedene OR5-Kristalle erzeugt, welche jedoch keine Beugung von Röntgenstrahlung verursachten und demnach nicht zu einer Strukturaufklärung des Rezeptors verwendet werden konnten.

Bei einer kleinen Zahl erhaltener Kristalle ist es schwierig, generelle Aussagen über die untersuchten Kristallisationsbedingungen zu machen. Deshalb sollen hier nur drei Beobachtungen erörtert werden: es fällt auf, dass die beiden größeren Kristalle aus den Ansätzen stammen, welche in Anwesenheit des OR5-Liganden Lilial durchgeführt wurden. Dies könnte bedeuten, dass eine Zugabe des spezifischen Liganden die Kristallisation des Rezeptors fördert. Dieses Phänomen wurde bereits in mehreren Arbeiten beschrieben (Calmuschi, B. *et al.*, 2004; Koepke, J. *et al.*, 2005). So konnte die Kristallqualität und damit die Diffraktion verbessert werden. Dieser Aspekt wird deshalb in weiteren Versuchen, das OR5-Protein zu kristallisieren, beachtet werden. Die zweite Beobachtung betrifft das verwendete Präzipitationsmittel: Der größte Kristall entstand unter Präzipitation mit PEG-4.000, drei weitere Kristalle unter PEG geringerer Größe. Nach Durchsicht der verwendeten Präzipitationsmittel aller bisher kristallisierten Membranproteine fällt auf, dass dieses Additiv in überdurchschnittlich vielen Fällen (19 von 88) zu einer Kristallisation geführt hatte. PEG bewirkt auf der einen Seite - ähnlich wie Salze - eine mehr oder weniger ausgeprägte Dehydratisierung der anwesenden Proteine und zusätzlich eine Erhöhung der Dielektrizitätskonstante des Wassers, wodurch sich Makromoleküle - getrieben durch die höheren elektrostatischen Wechselwirkungen - vermehrt zusammenlagern. Durch Bildung einer

Art molekularen Netzwerkes zwischen PEG- und Wassermolekülen wird dieser Effekt zusätzlich verstärkt (McPherson, A., 1990). Wenn es sich bei PEG-4.000 um ein für die Membranproteinkristallisation besonders geeignetes Präzipitationsmittel handelt, könnte es auch im Falle von OR5 nach Verfeinerung der Bedingungen zur Bildung von Kristallen mit höherer Qualität führen. Dies könnte auch eine Co-Kristallisation mit den Fab-Fragmenten der isolierten OR5-Antikörper einschließen. Eine Vergrößerung der polaren Oberfläche eines Membranproteins kann die Formation von geordneten Kristallen erhöhen (Ostermeier, C. *et al.*, 1995; Hunte, C. und Michel, H., 2002). Erreicht wird dies in der Regel durch die Anlagerung polarer Domänen wie z. B. spezifischer Antikörper-Fragmente (Tormo, J. *et al.*, 1994; Ostermeier, C. *et al.*, 1995; Kwong, P. D. *et al.*, 1998). Eine andere Auffälligkeit betraf die Zeit, die zur Bildung von einigen Kristallen benötigt wurde. Solche Kristallisationsansätze, die erst nach bis zu 6 Monaten Kristallwachstum aufwiesen, enthielten jene Kristalle, welche rein optisch den strukturiertesten Aufbau besaßen. Diese Beobachtung gibt eindeutig einen Hinweis auf die notwendigen Konzentrationen der Proteinlösung und des Fällungsmittels. Nach einer Lagerzeit von mehreren Monaten kommt es zwangsläufig zur Konzentrierung der verwendeten Lösungen durch Verdunstung. Demnach sollte eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen zwingend den Gebrauch höherer Konzentrationen der Proteinlösung und/oder des verwendeten Puffers beinhalten. Zusammengefaßt erwiesen sich die Bedingungen Nr. 11, 37 und 43 des *Crystal Screens Basic* von Sigma als vielversprechend und sollten deshalb unter Variation der Konzentrationen aller beteiligten Substanzen in weitere Untersuchungen integriert werden.

Die detaillierte Strukturanalyse ist momentan eine der besten Möglichkeiten, Einsicht in die speziellen Funktionen dieser Proteingruppe zu bekommen und zu Grunde liegende biologische Prozesse vollständig zu verstehen. Kristalle von hoher Qualität für die Röntgenstrukturanalyse zu erhalten, bleibt zwar weiterhin kompliziert, die Erfahrung im Umgang mit Membranproteinen wächst jedoch von Jahr zu Jahr. Demnach scheint es absehbar, bis – aufgrund der vielen gewonnenen Resultate - die Struktur eines weiteren GPCRs gelöst werden kann.

4.5. Die künstliche Nase

Die künstliche Imitation vielschichtiger biologischer Systeme, wie z. B. die unserer Sinneswahrnehmungen, ist bis dato aufgrund ihrer Komplexität kaum erreichbar. Weinkenner oder Parfumeure beweisen „einen guten Riecher“, da sie in der Lage sind, weit mehr Düfte zu unterscheiden als untrainierte Menschen. Besonders eindrucksvoll sind einige nasale Fähigkeiten

aus dem Tierreich. So sind trainierte Hunde in der Lage, einer Duftspur über viele Kilometer zu folgen, obwohl nur wenige Duftmoleküle an Hauswänden, auf Wegen oder Gegenständen haften. Aufgrund guter Fern-, aber schlechter Nahsichtigkeit verlassen sich viele Tiere hauptsächlich auf ihren Geruchssinn zur Orientierung. Diese Beispiele unterstreichen die Sensitivität und Vielseitigkeit dieser Sinneswahrnehmung.

Trotz ausreichender Fähigkeiten ist der Mensch jedoch nicht in der Lage, alle Stoffe oder bestimmte Stoffe in geringen Konzentrationen zu riechen. In einigen Fällen, wie z. B. bei giftigen oder explosiven Stoffen, kann das tödliche Konsequenzen haben. Als Beispiele seien hier Stickstoffdioxid, Kohlendioxid, Wasserkontaminanten, Abbauprodukte verdorbener Lebensmittel oder auch Körpergerüche, verursacht durch bestimmte Krankheiten, zu nennen.

Der Aufbau so genannter „künstlicher Nasen“, erstmalig durch Persaud und Dodd beschrieben (Persaud, K. und Dodd, G., 1982), ist nicht mit dem biologischen System zu vergleichen. Sie basieren zwar auf hochempfindlichen Sensorsystemen, diese sind bisher jedoch aus Metalloxiden, Schwingquarzen oder leitfähigen Polymeren aufgebaut, die nach Ligandenbindung ihre Färbung, Resonanzfrequenz oder auch Leitfähigkeit ändern. Entsprechend der zu messenden Substanz wird eine reaktive Gruppe verwendet, die zur Bindung des Zielliganden befähigt ist, wodurch im Anschluss eine messbare Reaktion erfolgt. Im Falle von Metalloxid-Federbalken wird eine Veränderung der Krümmung durch Anlagerung des zu detektierenden Stoffes gemessen. Ein prominentes Beispiel für eine detektierbare Farbveränderung im biologischen System ist die unterschiedliche Färbung des Blutes durch Bindung von mehr oder weniger Sauerstoffmolekülen an das Hämoglobin in den roten Blutkörperchen. Die Eisenporphyrine lassen bei verstärkter Sauerstoff-Komplexierung das Blut heller erscheinen. Array-Systeme mit verschiedenen Metalloporphyrinen können demnach über substanzspezifische Bindungsmuster zum Nachweis verschiedener Substanzen eingesetzt werden. Sensoren, welche über die Leitfähigkeit Substanzen detektieren, sprechen mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten auf nahezu alle Gase an. Prinzipiell wird die Veränderung des Widerstandes ermittelt, sobald die Sensoren einer veränderten Gaszusammensetzung exponiert werden. Die resultierenden Muster werden dann mit vorhandenen Daten verglichen, um die Komponenten zu ermitteln. Ein weiteres Beispiel ist die Branderkennung mit Hilfe derartiger Sensorsysteme. In einem Fall wurden lichtempfindliche Messsensoren für den Nachweis von Stickstoffdioxid benutzt (Nezel, T. *et al.*, 2003). Nach Anbindung des Gases verändern die Kunststoffoberflächen der Sensoren ihre lichtdurchlässigen Eigenschaften. Durch die hohe Empfindlichkeit können Brände früher als durch herkömmliche Brandmelder nachgewiesen werden.

Künstliche Nasen haben sich schon für eine Vielzahl von Nachweisen bewährt und werden auch in Zukunft dazu beitragen, dass Sicherheit und Qualitätskontrollen verbessert werden. Es bleibt jedoch zu betonen, dass sie - trotz ihrer Bezeichnung- weder riechen, noch die biologische Nase ersetzen können. Es handelt sich „lediglich“ um Sensorsysteme, mit denen Gase oder Gasgemische identifiziert werden. Auf dieser Grundlage können jedoch weitere wichtige Aspekte, wie z. B. die Erkennung von Krankheiten auf Basis ihrer Erreger oder Abbauprodukte, bearbeitet werden. Erste Fortschritte im medizinischen Bereich konnten bislang bei Erkrankungen gemacht werden, in denen eine krankheitsbedingte Veränderung der Zusammensetzung der ausgeatmeten Luft auftritt. Dies betrifft z. B. Lungeninfektionen, wie Pneumonie oder Tuberkulose, Lungenkrebskrankungen, aber auch Diabetes Typ 2, Entzündungen im Rachenraum oder *Helicobacter pylorii* Infektionen (Pavlou, A. K. und Turner, A. P., 2000; Saini, S. *et al.*, 2001; Mohamed, E. I. *et al.*, 2002; Mohamed, E. I. *et al.*, 2003; Dalton, P. *et al.*, 2004; Pavlou, A. K. *et al.*, 2004; Shykhon, M. E. *et al.*, 2004; Turner, A. P. und Magan, N., 2004; Hanson, C. W., 3rd und Thaler, E. R., 2005). In diesen Fällen wurde mit einer „künstlichen Nase“ die ausgeatmete Luft der Patienten auf krankheitsspezifische Substrate untersucht und so ein einfaches Testsystem zur präventionellen und analytischen Diagnostik eingesetzt. Zusätzlich wurden künstliche Nasen bislang für Urinkontrollen zur Untersuchung auf bakterielle Infektionen verwendet.

Ob heterologe Expressionssysteme für olfaktorische Rezeptoren in Zukunft eventuell auch als nasale Nachweis-Systeme eingesetzt werden können, bleibt fraglich. Ein Hauptproblem ist sicherlich die geringe Stabilität und Lebensdauer dieser Zellsysteme. Denkbar wäre jedoch die Generierung einer stabilen Zelllinie, mit welcher bestimmte Substanzen über exprimierte Geruchsrezeptoren nachgewiesen werden. Solch ein System ließe sich jedoch vorwiegend im medizinischen Bereich einsetzen, da „on line“ Qualitätskontrollen für Lebensmittel, Gase und Wasserproben bedingt kompatibel mit „lebenden Sensorsystemen“ sind.

5. Zusammenfassung

Die Arbeit im Bereich der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört derzeit zu einer der größten Herausforderungen auf dem Gebiet der Struktur/Funktions-Analyse. Die bereits beschriebenen Schwierigkeiten zur Expression, Isolierung und Kristallisation von Mitgliedern dieser Rezeptorgruppe haben bisher die Strukturaufklärung von mehr als einem GPCR – dem des Rinderopsins - verhindert. Obwohl verschiedene Strategien verfolgt wurden, um diese Proteinfamilie zu untersuchen, existieren relativ wenige Informationen über die strukturellen Grundlagen einzelner Rezeptoren. Vor allem die Geruchsrezeptoren, Zielgruppe dieser Arbeit, entziehen sich unserem Verständnis: obwohl ORs vor über 14 Jahren identifiziert wurden sind die chemischen Selektivitäten einzelner ORs weitestgehend unbekannt, es existiert keine Struktur eines Geruchsrezeptors und nur in wenigen Expressionssysteme ist die funktionelle Expression einzelner Rezeptoren bisher gelungen. Deshalb sollte die Etablierung zweier Expressionssysteme weitere Untersuchungen zur funktionellen und strukturellen Analyse eines Modell-ORs ermöglichen:

1. Der ORF des Geruchsrezeptors OR5 aus *Rattus norvegicus* wurde in den Hefeexpressionsvektor pITy3 kloniert. Durch Analyse des UPR-Zustandes der Zellen und eine Co-Expression von Transkriptionsfaktoren wurde eine Qualitäts-optimierte Expression des Rezeptors in *S. cerevisiae* erzielt. Dieses Zellsystem wurde zur Produktion größerer Mengen des Rezeptors verwendet. Außerdem erfolgte eine Klonierung des ORFs in konstitutive, *pCMV*-basierte Expressionsvektoren und die Semliki Forest Virus-Vektoren pSFV2 und pSFV1-Cap, um die OR5-Expression in der Säugetier-Stammzelllinie P19 zu untersuchen.
2. Durch Verwendung des UPR-kontrollierten *S. cerevisiae*-Expressionssystemes konnten OR5-Expressionsstämme isoliert werden, die eine hohe Proteinsyntheserate des rekombinanten Rezeptors mit einem Anteil von 0,9% der Gesamtmembranen bei einer geringen Fehlfaltung (angezeigt durch die Höhe der UPR-Induktion) aufwiesen. Der Nachweis des Geruchsrezeptors erfolgte im Western-Blot, Northern-Blot und in der Immunfluoreszenz-Markierung an ganzen Zellen. Die Behandlung des Proteins mit *PNGase F* zeigte, dass nur ein sehr geringer Anteil des Proteins in N-glykosylierter Form vorlag.

3. Die Etablierung einer OR5-Reinigungsmethode ermöglichte eine Isolierung des Rezeptors von ~0,5 mg/g Gesamtmembranen mit einer Homogenität von >90%. Die Identifizierung des isolierten Rezeptors erfolgte durch N-terminale Sequenzierung.
4. Die Generierung, Identifizierung und Analyse von monoklonalen OR5-Antikörpern ermöglichte die hochselektive und spezifische Detektion ($K_D=1,65 \cdot 10^{-9}$) des Rezeptors sowie eine Optimierung der Isolierungsmethode.
5. Die Faltung des isolierten Rezeptors wurde durch CD-Analyse belegt. Demnach lag der Rezeptor eindeutig in der vorhergesagten, überwiegend α -helikalen Form vor.
6. Der funktionelle Nachweis des isolierten Rezeptors wurde durch Liganden-induzierte Änderung der Protein-eigenen Tryptophanfluoreszenz belegt. Bei einer Ligandenkonzentration von 1mM erwiesen sich $88 \pm 4\%$ des Rezeptors als aktiv. Die Extrapolation der Bindungskurve ergab einen Anteil von >91% aktiven Rezeptors und einen K_d -Wert von $94 \mu\text{M}$ bei hohen Ligandenkonzentrationen.
7. Durch den Einsatz des isolierten, aktiven Geruchsrezeptors wurden Proteinkristalle erzeugt, von denen 9 röntgenkristallographisch untersucht wurden. Aufgrund ihrer geringen Qualität erfolgte jedoch keine Beugung der Röntgenstrahlung. Weitere Kristallisationsversuche sollen zur Generierung von Kristallen höherer Qualität führen.
8. Die Verwendung eines konstitutiven Expressionssystems resultierte in einer sehr schwachen OR5-Expression. Offenbar wurde *OR5* zusätzlich unvollständig transkribiert. Durch Verwendung der SFV-basierten Expressionsvektoren wurde der Geruchsrezeptor in den P19-Zellen exprimiert und korrekt zur Plasmamembran transloziert. Der Nachweis des Rezeptors erfolgte im Western-Blot, Northern-Blot und in der Immunfluoreszenz-Markierung ganzer Zellen. Gleich dem Hefe-Expressionssystem lag das OR5-Protein ebenfalls in vorwiegend nicht-glykosylierter Form in den P19-Zellen vor.
9. Die Isolierung des in den P19-Zellen produzierten Rezeptors war mit einer resultierenden Homogenität von >95% möglich. Das Protein wurde durch N-terminale Sequenzierung identifiziert.

10. Die P19-Zelllinie wurde mit Hilfe von PCR, Echtzeit-PCR und Immunfluoreszenz-Markierungen auf das Vorkommen und zum Teil die Regulation der neuronalen und olfaktorischen Marker OMP, G_{olf}, G_q, oCNC2, ACIII und Tubulin untersucht. Die Echtzeit-PCR-Messungen ergaben eine positive Regulierung von OMP, G_{olf} und G_q im Zuge der neuronalen Differenzierung um das 102±12, 12±2 und 25±7-fache verglichen mit Fibroblasten-ähnlichen P19-Zellen. Die OMP-, G_{olf}-, oCNC2-, ACIII- und Tubulin-Proteine wurden anhand von Immunfluoreszenz-Markierungen eindeutig in neuronalen P19-Zellen nachgewiesen.

11. Die Funktionalität des Geruchsrezeptors im P19-Zellsystem wurde durch Ca²⁺-Imaging in Abhängigkeit des Liganden Lilial sowohl in Fibroblasten-ähnlichen als auch in neuronalen OR5-*pSFV1Cap*-infizierten P19-Zellen untersucht. In nicht differenzierten Zellen zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen OR5-*SFV1Cap*- und *LacZ-SFV2*-infizierten Zellen. In neuronalen, OR5-*SFV1-Cap*-infizierten P19-Zellen wurde in 54% der Messungen ein deutlicher Liganden-abhängiger Ca²⁺-Strom in vielen Zellen gezeigt. In den Negativkontrollen wurden in nur einer Messung Ca²⁺-Ströme in wenigen Einzelzellen beobachtet, die restlichen Ansätze wiesen keine Liganden-induzierte Fluoreszenzverstärkung auf.

Die in dieser Arbeit verwendeten Strategien zur Expression, Isolierung und funktionellen Analyse erwiesen sich als erfolgreich und liefern weitere Grundlagen für Untersuchungen zu dieser Rezeptorklasse. Ähnliche physiologische Voraussetzungen innerhalb der großen Proteinfamilie der GPCRs sowie bisherige Ergebnisse zu verschiedenen Mitgliedern lassen die Vermutung zu, dass die etablierten Systeme auch in Zukunft Anwendung für die Analyse weiterer GPCRs finden werden.

6. Literaturverzeichnis

Afshar, M., Hubbard, R. E. und Demaille, J. (1998). Towards structural models of molecular recognition in olfactory receptors. *Biochimie* **80**: 129-135.

Agatep, R., Kirkpatrick, R. D., Parchaliuk, D. L., Woods, R. A. und Gietz, R. D. (1998). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. *Technical Tips Online* **1**: P01525.

Anderson, R. G. W. (1993). Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **5**: 647-652.

Anderson, R. G. W. (1998). The caveolae membrane system. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 199-225.

Arkininstall, S., Edgerton, M., Payton, M. und Maundrell, K. (1995). Co-expression of the neurokinin NK2 receptor and G-protein components in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Letters* **375**: 183-187.

Bagnat, M., Keränen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. und Simons, K. (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3254–3259.

Bain, G., Ray, W. J., Yao, M. und Gottlieb, D. I. (1994). From embryonal carcinoma cells to neurons: the P19 pathway. *Bioessays* **16**: 343-348.

Baird, B., Sheets, E. D. und Holowka, D. (1999). How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E. *Biophys Chem* **82**: 109-119.

Bakalyar, H. A. und Reed, R. R. (1990). Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* **250**: 1403-1406.

Barry, P. H. (2003). The relative contributions of cAMP and InsP3 pathways to olfactory responses in vertebrate olfactory receptor neurons and the specificity of odorants for both pathways. *J. Gen. Physiol.* **122**: 247-250.

Baxendale, R. W. und Fraser, L. R. (2003). Immunolocalization of multiple Galpha subunits in mammalian spermatozoa and additional evidence for Galphas. *Mol Reprod Dev* **65**: 104-113.

Belluscio, L., Gold, G. H., Nemes, A. und Axel, R. (1998). Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* **20**: 69-81.

Berglund, P., Sjöberg, M., Garoff, H., Atkins, G. J., Sheahan, B. J. und Liljestrom, P. (1993). Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology (N Y)*. **11**: 916-920.

Blache, P., Gros, L., Salazar, G. und Bataille, D. (1998). Cloning and tissue distribution of a new rat olfactory receptor-like (OL2). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **242**: 669-672.

Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C. und Sarma, V. R. (1965). Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature* **206**: 757-761.

Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-98.

- Bockaert, J. und Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal* **18**: 1723-1729.
- Boekhoff, I., Tareilus, E., Strotmann, J. und Breer, H. (1990). Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *EMBO J* **9**: 2453-2458.
- Bradley, J., Zhang, Y., Bakin, R., Lester, H. A., Ronnett, G. V. und Zinn, K. (1997). Functional expression of the heteromeric "olfactory" cyclic nucleotide-gated channel in the hippocampus: a potential effector of synaptic plasticity in brain neurons. *J Neurosci* **17**: 1993-2005.
- Brown, D. A. und London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **14**: 111-136.
- Brown, D. A. und London, E. (1998). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol* **164**: 103-114.
- Brown, D. A. und London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **275**: 17221-17224.
- Brown, R. E. und Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**: 533-544.
- Brunet, L. J., Gold, G. H. und Ngai, J. (1996). General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* **17**: 681-693.
- Buck, L. und Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**: 175-87.
- Cai, G., Salonikidis, P. S., Fei, J., Schwarz, W., Schulein, R., Reutter, W. und Fan, H. (2005). The role of N-glycosylation in the stability, trafficking and GABA-uptake of GABA-transporter 1. *FEBS J* **272**: 1625-1638.
- Calmuschi, B., Alesi, M. und Englert, U. (2004). Ordered binary crystals via cocrystallisation of quasiracemic Pd(II) complexes in a borderline regime between inertness and lability. *Dalton Trans* **21**: 1852-1857.
- Chapot, M. P., Eshdat, Y., Marullo, S., Guillet, J. G., Charbit, A., Strosberg, A. D. und Delavier-Klutchko, C. (1990). Localization and characterization of three different beta-adrenergic receptors expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **187**: 137-144.
- Chen, S., Lane, A. P., Bock, R., Leinders-Zufall, T. und Zufall, F. (2000). Blocking adenylyl cyclase inhibits olfactory generator currents induced by "IP3-odors". *J Neurophysiol* **84**: 575-580.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H. und Axel, R. (1994). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* **78**: 823-34.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H. und Axel, R. (1994). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* **78**: 823-834.
- Cheung, W. M. W., Chu, A. H., Chu, P. W. K. und Ip, N. Y. (2001). Cloning and expression of a novel nuclear matrix-associated protein that is regulated during the retinoic acid-induced neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* **276**: 17083-17091.
- Chun, M., Liyanage, U., Lisanti, M. und Lodish, H. (1994). Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *PNAS* **91**: 11728-11732.

- Cohen, S. N., Chang, A. C. und Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2110-2114.
- Creighton, T. E. (1989). Protein structure: a practical approach. *IRL Press at Oxford university*.
- Dalton, P., Gelperin, A. und Preti, G. (2004). Volatile metabolic monitoring of glycemic status in diabetes using electronic olfaction. *Diabetes Technol Ther* **6**: 534-544.
- de Gier, J.-W. und Luirink, J. (2001). Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **40**: 314-322.
- DiCiommo, D. P., Duckett, A., Burcescu, I., Bremner, R. und Gallie, B. L. (2004). Retinoblastoma protein purification and transduction of retina and retinoblastoma cells using improved alphavirus vectors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**: 3320-3329.
- Dobberstein, B. (1994). On the beaten pathway. *Nature* **367**: 599-600.
- Drutel, G., Arrang, J. M., Diaz, J., Wisnewsky, C., Schwartz, K. und Schwartz, J. C. (1995). Cloning of OL1, a putative olfactory receptor and its expression in the developing rat heart. *Receptors Channels* **3**: 33-40.
- Dwyer, N. D., Troemel, E. R., Sengupta, P. und Bargmann, C. I. (1998). Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein. *cell* **93**: 455-466.
- Efstratiadis, A. (1995). Epigenetics. A new whiff of monoallelic expression. *Curr Biol* **5**: 21-4.
- Eliasson, M., Andersson, R., Olsson, A., Wigzell, H. und Uhlen, M. (1989). Differential IgG-binding characteristics of staphylococcal protein A, streptococcal protein G, and a chimeric protein AG. *J Immunol* **142**: 575-581.
- Erickson, J. R., Wu, J. J., Goddard, J. G., Tigyi, G., Kawanishi, K., Tomei, L. D. und Kiefer, M. C. (1998). Edg-2/Vzg-1 couples to the yeast pheromone response pathway selectively in response to lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **273**: 1506-1510.
- Fadool, D. A. und Ache, B. W. (1992). Plasma membrane inositol 1,4,5-trisphosphate-activated channels mediate signal transduction in lobster olfactory receptor neurons. *Neuron* **9**: 907-918.
- Fiedler, K., Kobayashi, T., Kurzchalia, T. V. und Simons, K. (1993). Glycosphingolipid-enriched, detergent-insoluble complexes in protein sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **32**: 6365.
- Flower, D. R., North, A. C. T. und Sansom, C. E. (2000). The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1482**: 9-24.
- Fredriksson, R. und Schiöth, H. B. (2005). The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* **67**: 1414-1425.
- Freitag, J., Ludwig, G., Andreini, I., Rossler, P. und Breer, H. (1998). Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *J Comp Physiol* **183**: 635-650.
- Frings, S., Seifert, R., Godde, M. und Kaupp, U. B. (1995). Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **15**: 169-179.
- Fuchs, T., Glusman, G., Horn-Saban, S., Lancet, D. und Pilpel, Y. (2001). The human olfactory subgenome: from sequence to structure and evolution. *Hum Genet* **108**: 1-13.
- Gaillard, I., Rouquier, S. und Giorgi, D. (2004). Olfactory receptors. *Cell Mol Life Sci* **61**: 456-69.

- Gaillard, I., Rouquier, S., Pin, J. P., Mollard, P., Richard, S., Barnabe, C., Demaille, J. und Giorgi, D. (2002). A single olfactory receptor specifically binds a set of odorant molecules. *Eur J Neurosci* **15**: 409-18.
- Gimelbrant, A. A., Haley, S. L. und McClintock, T. S. (2001). Olfactory receptor trafficking involves conserved regulatory steps. *J Biol Chem* **276**: 7285-90.
- Gimelbrant, A. A., Stoss, T. D., Landers, T. M. und McClintock, T. S. (1999). Truncation releases olfactory receptors from the endoplasmic reticulum of heterologous cells. *J Neurochem* **72**: 2301-11.
- Glusman, G., Bahar, A., Sharon, D., Pilpel, Y., White, J. und Lancet, D. (2000). The olfactory receptor gene superfamily: data mining, classification, and nomenclature. *Mammalian Genome* **11**: 1016 - 1023.
- Glusman, G., Yanai, I., Rubin, I. und Lancet, D. (2001). The complete human olfactory subgenome. *Genome Res* **11**: 685-702.
- Gold, G. H. (1999). Controversial issues in vertebrate olfactory transduction. *Annual Review of Physiology* **61**: 857-871.
- Goldman, A. L., Van der Goes van Naters, W., Lessing, D., Warr, C. G. und Carlson, J. R. (2005). Coexpression of two functional odor receptors in one neuron. *Neuron* **45**: 661-666.
- Goto, T., Salpekar, A. und Monk, M. (2001). Expression of a testis-specific member of the olfactory receptor gene family in human primordial germ cells. *Mol Hum Reprod* **7**: 553-8.
- Griffith, D. A., Delipala, C., Leadsham, J., Jarvis, S. M. und Oesterhelt, D. (2003). A novel yeast expression system for the overproduction of quality-controlled membrane proteins. *FEBS Letters* **553**: 45-50.
- Grisshammer, R. und Tate, C. G. (1995). Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev Biophys* **28**: 315-422.
- Hague, C., Uberti, M. A., Chen, Z., Bush, C. F., Jones, S. V., Ressler, K. J., Hall, R. A. und Minneman, K. P. (2004). Olfactory receptor surface expression is driven by association with the β 2-adrenergic receptor. *PNAS* **101**: 13672-13676.
- Halfter, W., Dong, S., Yip, Y.-P., Willem, M. und Mayer, U. (2002). A Critical Function of the Pial Basement Membrane in Cortical Histogenesis. *J. Neurosci.* **22**: 6029-6040.
- Hallani, M., Lynch, J. W. und Barry, P. H. (1998). Characterization of calcium-activated chloride channels in patches excised from the dendritic knob of mammalian olfactory receptor neurons. *J Membr Biol* **161**: 163-171.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hanson, C. W., 3rd und Thaler, E. R. (2005). Electronic nose prediction of a clinical pneumonia score: biosensors and microbes. *Anesthesiology* **102**: 63-68.
- Harlow, E. und Lane, D. (1998). PEG used as a fusogen to obtain hybridomas for monoclonal antibody production. *Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY* **211-213**.
- Hatt, H., Lang, K. und Gisselmann, G. (2001). Functional expression and characterization of odorant receptors using the Semliki Forest virus system. *Biol Chem* **382**: 1207-14.
- Henderson, R., Grigorieff, N (1995). Crystal structure of bacteriorhodopsin in purple membrane. *MMDB Structure Summary* **mmdbId:4665**.

- Hill, C. A., Fox, A. N., Pitts, R. J., Kent, L. B., Tan, P. L., Chrystal, M. A., Cravchik, A., Collins, F. H., Robertson, H. M. und Zwiebel, L. J. (2002). G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* **298**: 176-8.
- Hoffmann, M., Verzijl, D., Lundstrom, K., Simmen, U., Alewijnse, A. E., Timmerman, H. und Leurs, R. (2001). Recombinant Semliki Forest virus for over-expression and pharmacological characterisation of the histamine H2 receptor in mammalian cells. *European Journal of Pharmacology* **427**: 105-114.
- Hofmann, K. und Stoffel, W. (1993). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**: 166.
- Huang, C., Hepler, J. R., Chen, L. T., Gilman, A. G., Anderson, R. G. W. und Mumby, S. M. (1997). Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* **8**: 2365-2378.
- Hunte, C. und Michel, H. (2002). Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments. *Current Opinion in Structural Biology* **12**: 503-508.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Ishihara, G., Goto, M., Saeki, M., Ito, K., Hori, T., Kigawa, T., Shirouzu, M. und Yokoyama, S. (2005). Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors. *Protein Expr Purif* **41**: 27-37.
- Jho, E.-H. und Malbon, C. C. (1997). Galpha 12 and Galpha 13 mediate differentiation of P19 mouse embryonal carcinoma cells in response to retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **272**: 24461-24467.
- Jones, D. und Reed, R. (1987). Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium. *J. Biol. Chem.* **262**: 14241-14249.
- Jones-Villeneuve, E., McBurney, M., Rogers, K. und Kalnins, V. (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell Biol.* **94**: 253-262.
- Jones-Villeneuve, E. M., Rudnicki, M. A., Harris, J. F. und McBurney, M. W. (1983). Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonic carcinoma cells. *Mol Cell Biol* **3**: 2271-2279.
- Josefsson, L. G. und Rask, L. (1997). Cloning of a putative G-protein-coupled receptor from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* **249**: 415-420.
- Kajiya, K., Inaki, K., Tanaka, M., Haga, T., Kataoka, H. und Touhara, K. (2001). Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *J Neurosci* **21**: 6018-25.
- Kajkowski, E. M., Price, L. A., Pausch, M. H., Young, K. H. und Ozenberger, B. A. (1997). Investigation of growth hormone releasing hormone receptor structure and activity using yeast expression technologies. *J Recept Signal Transduct Res* **17**: 293-303.
- Kampa, M., Loukas, S., Tsapis, A. und Castanas, E. (2001). Receptorphin: A conserved peptide derived from the sequence of the opioid receptor, with opioid displacement activity and potent antiproliferative actions in tumor cells. *BMC Pharmacology* **1**: 9.
- Katada, S., Hirokawa, T., Oka, Y., Suwa, M. und Touhara, K. (2005). Structural basis for a broad but selective ligand spectrum of a mouse olfactory receptor: Mapping the odorant-binding site. *J. Neurosci.* **25**: 1806-1815.
- Katada, S., Tanaka, M. und Touhara, K. (2004). Structural determinants for membrane trafficking and G protein selectivity of a mouse olfactory receptor. *J Neurochem* **90**: 1453-63.

- Kaur, R., Zhu, X. O., Moorhouse, A. J. und Barry, P. H. (2001). IP₃-gated channels and their occurrence relative to CNG channels in the soma and dendritic knob of rat olfactory receptor neurons. *J Membr Biol* **181**: 91-105.
- Kaushal, S., Ridge, K. und Khorana, H. (1994). Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation. *PNAS* **91**: 4024-4028.
- Kayushin, L. P. und Skulachev, V. P. (1974). Bacteriorhodopsin as an electrogenic proton pump: reconstitution of bacteriorhodopsin proteoliposomes generating delta psi and delta pH. *FEBS Lett* **39**: 39-42.
- Kiefer, H., Krieger, J., Olszewski, J. D., Von Heijne, G., Prestwich, G. D. und Breer, H. (1996). Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli*: purification, reconstitution, and ligand binding. *Biochemistry* **35**: 16077-84.
- King, K., Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G. und Lefkowitz, R. J. (1995). Control of yeast mating signal transduction by a mammalian beta 2-adrenergic receptor and Gs alpha subunit. *Science* **250**: 121-123.
- Kleene, S. (1993). Origin of the chloride current in olfactory transduction. *Neuron* **11**: 123-132.
- Koepke, J., Ma, X., Fritsch, G., Michel, H. und Stockigt, J. (2005). Crystallization and preliminary X-ray analysis of strictosidine synthase and its complex with the substrate tryptamine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**: 690-703.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **15**: 8125-8148.
- Krautwurst, D., Yau, K. W. und Reed, R. R. (1998). Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell* **95**: 917-26.
- Kubler, E., Dohlman, H. G. und Lisanti, M. P. (1996). Identification of Triton X-100 Insoluble Membrane Domains in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Lipid requirements for targeting of heterotrimeric G-protein subunits. *J. Biol. Chem.* **271**: 32975-32980.
- Kulkarni, R. D., Thon, M. R., Pan, H. und Dean, R. A. (2005). Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Genome Biol* **6**: R24.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. und Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**: 648-659.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Li, S., Couet, J. und Lisanti, M. P. (1996). Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **271**: 29182-29190.
- Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casanova, J. E., Hansen, S. H., Nishimoto, I. und Lisanti, M. P. (1995). Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.* **270**: 15693-15701.
- Liljeström, P. und Garoff, H. (1991). A new generation of animal cell expression vectors based on the semliki forest virus replicon. *Biotechnology* **9**: 1356-1361.
- Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Tang, Z. und Sargiacomo, M. (1994). Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends in Cell Biology* **4**: 231-235.

- Liu, H.-Y. und Seifert, R. (2002). Distinct interactions of Gs[alpha]-long, Gs[alpha]-short, and G[alpha]olf with GTP, ITP, and XTP. *Biochemical Pharmacology* **64**: 583-593.
- London, E. und Brown, D. A. (2000). Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1508**: 182-195.
- Long, S. B., Campbell, E. B. und MacKinnon, R. (2005). Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science* **309**: 897-903.
- Lowe, G. und Gold, G. H. (1993). Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* **366**: 283-6.
- Lowe, G., Nakamura, T. und Gold, G. H. (1989). Adenylate cyclase mediates olfactory transduction for a wide variety of odorants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5641-5645.
- Lu, M., Echeverri, F. und Moyer, B. D. (2003). Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors. *Traffic* **4**: 416-33.
- Lundstrom, K. (2003). Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1610**: 90-96.
- Lundstrom K, M. A., Allet E, Cezkowski K, Agudo G, Chollet A, Liljestrom P (1995). High-level expression of G protein-coupled receptors with the aid of the Semliki Forest virus expression system. *J Recept Signal Transduct Res* **15**: 23-32.
- Lundstrom K, M. A., Allet E, Cezkowski K, Agudo G, Chollet A, Liljestrom P (1999). Alphaviruses as tools in neurobiology and gene therapy. *J Recept Signal Transduct Res* **19**: 673-686.
- Lundstrom K, M. A., Buell G, Allet E, Adami N, Liljestrom P (1994). High-level expression of the human neurokinin-1 receptor in mammalian cell lines using the Semliki Forest virus expression system. *Eur J Biochem* **224**: 917-921.
- Lundstrom, K., Mills, A., Allet, E., Cezkowski, K., Agudo, G., Chollet, A. und Liljestrom, P. (1999). Alphaviruses as tools in neurobiology and gene therapy. *J Recept Signal Transduct Res* **19**: 673-686.
- Lundstrom, K., Mills, A., Buell, G., Allet, E., Adami, N. und Liljestrom, P. (1994). High-level expression of the human neurokinin-1 receptor in mammalian cell lines using the Semliki Forest virus expression system. *Eur J Biochem* **224**: 917-921.
- Mackay-Sim, A. und Kittel, P. W. (1991). On the life span of olfactory receptor neurons. *Eur J Neurosci* **3**: 209-215.
- MacKinnon, R. (2005). Structural biology: Membrane protein insertion and stability. *Science* **307**: 1425-1426.
- Mahoney, D. J., Carey, K., Fu, M.-H., Snow, R., Cameron-Smith, D., Parise, G. und Tarnopolsky, M. A. (2004). Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. *Physiol. Genomics* **18**: 226-231.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. und Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* **96**: 713-23.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. und Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* **96**: 713-723.
- Margolis, F. L. (1972). A brain protein unique to the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 1221-1224.

- Marsh, L. und Herskowitz, I. (1988). STE2 protein of *Saccharomyces kluyveri* is a member of the rhodopsin/ β -adrenergic receptor family and is responsible for recognition of the peptide ligand alpha factor. *PNAS* **85**: 3855-3859.
- Martins, A. H., Resende, R. R., Majumder, P., Faria, M., Casarini, D. E., Tarnok, A., Colli, W., Pesquero, J. B. und Ulrich, H. (2005). Neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells modulates kinin B2 receptor gene expression and function. *J. Biol. Chem.*: M502513200.
- McClintock, T. S., Landers, T. M., Gimelbrant, A. A., Fuller, L. Z., Jackson, B. A., Jayawickreme, C. K. und Lerner, M. R. (1997). Functional expression of olfactory-adrenergic receptor chimeras and intracellular retention of heterologously expressed olfactory receptors. *Molecular Brain Research* **48**: 270-278.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem* **189**: 1-23.
- Miroux, B. und Walker, J. E. (1998). Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *Journal of Molecular Biology* **260**: 289-298.
- Mohamed, E. I., Bruno, E., Linder, R., Alessandrini, M., Di Girolamo, A., Poppl, S. J., Puija, A. und De Lorenzo, A. (2003). A novel method for diagnosing chronic rhinosinusitis based on an electronic nose. *An Otorrinolaringol Ibero Am* **30**: 447-457.
- Mohamed, E. I., Linder, R., Perriello, G., Di Daniele, N., Poppl, S. J. und De Lorenzo, A. (2002). Predicting Type 2 diabetes using an electronic nose-based artificial neural network analysis. *Diabetes Nutr Metab* **15**: 215-221.
- Mombaerts, P. (1999). Odorant receptor genes in humans. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 315-20.
- Mombaerts, P. (1999). Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* **286**: 707-711.
- Mombaerts, P. (2004). Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nature Reviews Neuroscience* **5**: 263-278.
- Monastyrskaia, K., Goepfert, F., Hochstrasser, R., Acuna, G., Leighton, J., Pink, J. R. und Lundstrom, K. (1999). Expression and intracellular localisation of odorant receptors in mammalian cell lines using Semliki Forest virus vectors. *J Recept Signal Transduct Res* **19**: 687-701.
- Moreno, A., Théobald-Dietrich, A., Lorber, B., Sauter, C. und Giegé, R. (2005). Effects of macromolecular impurities and of crystallization method on the quality of eubacterial aspartyl-tRNA synthetase crystals. *Acta Crystallographica Section D* **61**: 789-792.
- Moulton, D. G. und Beidler, L. M. (1967). Structure and function in the peripheral olfactory system. *Physiol Rev* **47**: 1-52.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51**: 263-273.
- Murphy, C. L. und Polak, J. M. (2002). Differentiating embryonic stem cells: GAPDH, but neither HPRT nor beta-tubulin is suitable as an internal standard for measuring RNA levels. *Tissue Eng* **8**: 551-559.
- Murrell, J. R. und Hunter, D. D. (1999). An olfactory sensory neuron line, odora, properly targets olfactory proteins and responds to odorants. *J Neurosci* **19**: 8260-70.

- Nagawa, F., Yoshihara, S.-i., Tsuboi, A., Serizawa, S., Itoh, K. und Sakano, H. (2002). Genomic analysis of the murine odorant receptor MOR28 cluster: a possible role of gene conversion in maintaining the olfactory map. *Gene* **292**: 73-80.
- Nathans, J. und Hogness, D. S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* **34**: 807-814.
- Nekrasova, E., Sosinskaya, A., Natochin, M., Lancet, D. und Gat, U. (1996). Overexpression, solubilization and purification of rat and human olfactory receptors. *Eur J Biochem* **238**: 28-37.
- Nezel, T., Zhylyak, G., Mohr, G. J. und Spichiger-Keller, U. E. (2003). Aquacyanocobalt(III)-cobyrinate as a key compound in NO₂-sensitive polymeric liquid membranes. *Anal Sci* **19**: 551-556.
- Ngai, J., Chess, A., Dowling, M. M., Necles, N., Macagno, E. R. und Axel, R. (1993). Coding of olfactory information: topography of odorant receptor expression in the catfish olfactory epithelium. *Cell* **72**: 667-80.
- Oesterhelt, D. und Stoeckenius, W. (1971). Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol* **233**: 149-152.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E. und Lisanti, M. P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**: 5419-5422.
- Ostermeier, C., Essen, L. O. und Michel, H. (1995). Crystals of an antibody Fv fragment against an integral membrane protein diffracting to 1.28 Å resolution. *Proteins*: 1.
- Ostermeier, C., Iwata, S., Ludwig, B. und Michel, H. (1995). Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase. *Nat Struct Biol* **2**: 842-846.
- Otto, J., DeWitt, D. und Smith, W. (1993). N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **268**: 18234-18242.
- Ouchterlony, O. (1953). Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Pathol Microbiol Scand* **32**: 230-240.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Trong, I. L., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. und Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**: 739-745.
- Parmentier, M., Libert, F., Schurmans, S., Schiffmann, S., Lefort, A., Eggerickx, D., Ledent, C., Mollereau, C., Gerard, C. und Perret, J., *et al.* (1992). Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. *Nature* **355**: 453-455.
- Parnas, D., Heldman, E., Branski, L., Feinstein, N. und Linial, M. (1998). Expression and localization of muscarinic receptors in P19-derived neurons. *J Mol Neurosci* **10**: 17-29.
- Patton, J. L. und Lester, R. L. (1991). The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J Bacteriol* **173**: 3101-3108.
- Patton, J. L. und Lester, R. L. (1992). Phosphatidylinositol phosphate, phosphatidylinositol bisphosphate, and the phosphoinositol sphingolipids are found in the plasma membrane and stimulate the plasma membrane H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **292**: 70-76.

- Pausch, M. H. (1997). G-protein-coupled receptors in *Saccharomyces cerevisiae*: high-throughput screening assays for drug discovery. *Trends in Biotechnology* **15**: 487-494.
- Pavlou, A. K., Magan, N., Jones, J. M., Brown, J., Klatser, P. und Turner, A. P. (2004). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* (TB) in vitro and in situ using an electronic nose in combination with a neural network system. *Biosens Bioelectron* **20**: 538-544.
- Pavlou, A. K. und Turner, A. P. (2000). Sniffing out the truth: clinical diagnosis using the electronic nose. *Clin Chem Lab Med* **38**: 99-112.
- Persaud, K. und Dodd, G. (1982). Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose. *Nature* **299**: 352-355.
- Pevsner, J., Hou, V., Snowman, A. und Snyder, S. (1990). Odorant-binding protein. Characterization of ligand binding. *J. Biol. Chem.* **265**: 6118-6125.
- Pilpel, Y. und Lancet, D. (1999). The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins. *Protein Sci* **8**: 989-977.
- Pluthero, F. G. (1993). Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **21**: 4850-4851.
- Price, L., Kajkowski, E., Hadcock, J., Ozenberger, B. und Pausch, M. (1995). Functional coupling of a mammalian somatostatin receptor to the yeast pheromone response pathway. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6188-6195.
- Probst, W. C., Snyder, L. A., Schuster, D. I., Brosius, J. und Sealfon, S. C. (1992). Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* **11**: 1-20.
- Quirk, P. L., Rao, S., Roth, B. L. und Siegel, R. E. (2004). Three putative N-glycosylation sites within the murine 5-HT_{3A} receptor sequence affect plasma membrane targeting, ligand binding, and calcium influx in heterologous mammalian cells. *J Neurosci Res* **77**: 498-506.
- Raming, K., Krieger, J., Strotmann, J., Boekhoff, I., Kubick, S., Baumstark, C. und Breer, H. (1993). Cloning and expression of odorant receptors. *Nature* **361**: 353-6.
- Raposo, G., Dunia, I., Delavier-Klutchko, C., Kaveri, S., Strosberg, A. D. und Benedetti, E. L. (1989). Internalization of beta-adrenergic receptor in A431 cells involves non-coated vesicles. *Eur J Cell Biol* **50**: 340-352.
- Raposo, G., Dunia, I., Marullo, S., Andre, C., Guillet, J. G., Strosberg, A. D., Benedetti, E. L. und Hoebeke, J. (1987). Redistribution of muscarinic acetylcholine receptors on human fibroblasts induced by regulatory ligands. *Biol Cell* **60**: 117-123.
- Reed, R. R. (1992). Signaling pathways in odorant detection. *Neuron* **8**: 205-209.
- Restrepo, D., Miyamoto, T., Bryant, B. P. und Teeter, J. H. (1990). Odor stimuli trigger influx of calcium into olfactory neurons of the channel catfish. *Science* **249**: 1166-1168.
- Restrepo, D., Teeter, J. H. und Schild, D. (1996). Second messenger signaling in olfactory transduction. *J Neurobiol* **30**: 37-48.
- Reuter, D., Zierold, K., Schroder, W. H. und Frings, S. (1998). A depolarizing chloride current contributes to chemoelectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ. *J. Neurosci.* **18**: 6623-6630.
- Roeder, G. S. und Fink, G. R. (1982). Movement of yeast transposable elements by gene conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 5621-5625.
- Rost, B. (2004). Profsec. *Meth. Mol. Biol.* **Submitted**.

- Rouquier, S., Taviaux, S., Trask, B. J., Brand-Arpon, V., van den Engh, G., Demaille, J. und Giorgi, D. (1998). Distribution of olfactory receptor genes in the human genome. *Nat Genet* **18**: 243-250.
- Saini, S., Barr, H. und Bessant, C. (2001). Sniffing out disease using the artificial nose. *Biologist (London)* **48**: 229-233.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.*
- Sanger, F. S., Nickelen, F. und Coulson, A. R. (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463 - 5467.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. und Lisanti, M. (1993). Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **122**: 789-807.
- Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P. und Milon, A. (2003). Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1529-1546.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 369-379.
- Scherer, P. E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H. F. und Lisanti, M. P. (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *PNAS* **93**: 131-135.
- Schreiber, S., Fleischer, J., Breer, H. und Boekhoff, I. (2000). A possible role for caveolin as a signaling organizer in olfactory sensory membranes. *J Biol Chem* **275**: 24115-23.
- Seluanov, A. und Bibi, E. (1997). FtsY, the prokaryotic signal recognition particle receptor homologue, is essential for biogenesis of membrane proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 2053-2055.
- Sen, S., Jaakola, V.-P., Heimo, H., Engstrom, M., Larjomaa, P., Scheinin, M., Lundstrom, K. und Goldman, A. (2003). Functional expression and direct visualization of the human [alpha]2B-adrenergic receptor and [alpha]2B-AR-green fluorescent fusion protein in mammalian cell using Semliki Forest virus vectors. *Protein Expression and Purification* **32**: 265-275.
- Seyffert, W. (1998). Lehrbuch der Genetik. *Gustav Fischer Verlag*.
- Shamu, C. E., Cox, J. S. und Walter, P. (1994). The unfolded-protein-response pathway in yeast. *Trends in Cell Biology* **4**: 56-60.
- Shykhon, M. E., Morgan, D. W., Dutta, R., Hines, E. L. und Gardner, J. W. (2004). Clinical evaluation of the electronic nose in the diagnosis of ear, nose and throat infection: a preliminary study. *J Laryngol Otol* **118**: 706-709.
- Shykind, B. M. (2005). Regulation of odorant receptors: one allele at a time. *Hum. Mol. Genet.* **14**: R33-39.
- Shykind, B. M., Rohani, S. C., O'Donnell, S., Nemes, A., Mendelsohn, M., Sun, Y., Axel, R. und Barnea, G. (2004). Gene switching and the stability of odorant receptor gene choice. *Cell* **117**: 801-815.

- Sil, A. K., Xin, P. und Hopper, J. E. (2000). Vectors allowing amplified expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Gal3p-Gal80p-Gal4p transcription switch: Applications to galactose-regulated high-level production of proteins. *Protein Expression and Purification* **18**: 202-212.
- Simons, K. und Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569.
- Singer, M. S. und Shepherd, G. M. (1994). Molecular modeling of ligand-receptor interactions in the OR5 olfactory receptor. *Neuroreport* **5**: 1297-300.
- Sjoberg, E. M., Suomalainen, M. und Garoff, H. (1994). A significantly improved Semliki Forest virus expression system based on translation enhancer segments from the viral capsid gene. *Biotechnology (N Y)* **12**: 1127-1131.
- Sklar, P., Anholt, R. und Snyder, S. (1986). The odorant-sensitive adenylyl cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants. *J. Biol. Chem.* **261**: 15538-15543.
- Smith, P. C., Firestein, S. und Hunt, J. F. (2002). The crystal structure of the olfactory marker protein at 2.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **319**: 807-821.
- Sowadski, J. M. (1994). Crystallization of membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **4**: 761-764.
- Spehr, M., Schwane, K., Riffell, J. A., Barbour, J., Zimmer, R. K., Neuhaus, E. M. und Hatt, H. (2004). Particulate adenylyl cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **279**: 40194-40203.
- Spink, C. H., Yeager, M. D. und Feigenson, G. W. (1990). Partitioning behavior of indocarbocyanine probes between coexisting gel and fluid phases in model membranes. *Biochim Biophys Acta* **1023**: 25-33.
- Srivastava, D. P., Yu, E. J., Kennedy, K., Chatwin, H., Reale, V., Hamon, M., Smith, T. und Evans, P. D. (2005). Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel *Drosophila* G-protein-coupled receptor. *J Neurosci* **25**: 6145-6155.
- Stanasila, L., Pattus, F. und Massotte, D. (1998). Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: human opioid receptors under scrutiny. *Biochimie* **80**: 563-571.
- Sudbery, P. (1996). The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr Opin Biotechnol* **7**: 517-524.
- Takeda, S., Kadowaki, S., Haga, T., Takaesu, H. und Mitaku, S. (2002). Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* **520**: 97-101.
- Takeuchi, H., Imanaka, Y., Hirono, J. und Kurahashi, T. (2003). Cross-adaptation between olfactory responses induced by two subgroups of odorant molecules. *J. Gen. Physiol.* **122**: 255-264.
- Takeuchi, H. und Kurahashi, T. (2003). Identification of second messenger mediating signal transduction in the olfactory receptor cell. *J. Gen. Physiol.* **122**: 557-567.
- Tarentino, A. L., Gomez, C. M. und Plummer, T. H., Jr. (1985). Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry* **24**: 4665-4671.
- Tarozzo, Cappello, De Andrea, Walters, Margolis, Oestreicher und Fasolo (1998). Prenatal differentiation of mouse vomeronasal neurones. *Eur J Neurosci* **10**: 392-396.
- Tate, C. G. (2001). Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Letters* **504**: 94-98.

- Thomas, B. R., Vekilov, P. G. und Rosenberger, F. (1996). Heterogeneity determination and purification of commercial hen egg-white lysozyme. *Acta Cryst* **52**: 776-784.
- Thomas, J., Holowka, D., Baird, B. und Webb, W. (1994). Large-scale co-aggregation of fluorescent lipid probes with cell surface proteins. *J. Cell Biol.* **125**: 795-802.
- Thomas, T. C. und McNamee, M. G. (1990). Purification of membrane proteins. *Methods Enzymol* **182**: 499-520.
- Tormo, J., Blaas, D., Parry, N. R., Rowlands, D., Stuart, D. und Fita, I. (1994). Crystal structure of a human rhinovirus neutralizing antibody complexed with a peptide derived from viral capsid protein VP2. *EMBO J* **13**: 2247-2256.
- Touhara, K., Sengoku, S., Inaki, K., Tsuboi, A., Hirono, J., Sato, T., Sakano, H. und Haga, T. (1999). Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4040-5.
- Turner, A. P. und Magan, N. (2004). Electronic noses and disease diagnostics. *Nat Rev Microbiol* **2**: 161-166.
- Ullmannova, V. und Haskovec, C. (2003). The use of housekeeping genes (HKG) as an internal control for the detection of gene expression by quantitative real-time RT-PCR. *Folia Biol (Praha)* **49**: 211-216.
- Ulmanen, I., Peranen, J., Tenhunen, J., Tilgmann, C., Karhunen, T., Panula, P., Bernasconi, L., Aubry, J. P. und Lundstrom, K. (1997). Expression and intracellular localization of catechol O-methyltransferase in transfected mammalian cells. *Eur J Biochem* **243**: 452-459.
- Vassar, R., Ngai, J. und Axel, R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* **74**: 309-18.
- Wallin, E. und von-Heijne, G. (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* **7**: 1029-1038.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
- Weber, M., Pehl, U., Breer, H. und Strotmann, J. (2002). Olfactory receptor expressed in ganglia of the autonomic nervous system. *J Neurosci Res* **68**: 176-184.
- Wellerdieck, C., Oles, M., Pott, L., Korsching, S., Gisselmann, G. und Hatt, H. (1997). Functional expression of odorant receptors of the zebrafish *Danio rerio* and of the nematode *C. elegans* in HEK293 cells. *Chem. Senses* **22**: 467-476.
- Wetzel, C. H., Oles, M., Wellerdieck, C., Kuczkowiak, M., Gisselmann, G. und Hatt, H. (1999). Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and *Xenopus Laevis* oocytes. *J Neurosci* **19**: 7426-33.
- Wheatley, M. und Hawtin, S. (1999). Glycosylation of G-protein-coupled receptors for hormones central to normal reproductive functioning: its occurrence and role. *Hum Reprod Update* **5**: 356-364.
- Wong, S. T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G. C., Lowe, G., Gaggar, A., Xia, Z., Gold, G. H. und Storm, D. R. (2000). Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* **27**: 487-497.
- Wu, C., Butz, S., Ying, Y.-s. und Anderson, R. G. W. (1997). Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **272**: 3554-3559.

Young, J. M., Friedman, C., Williams, E. M., Ross, J. A., Tonnes-Priddy, L. und Trask, B. J. (2002). Different evolutionary processes shaped the mouse and human olfactory receptor gene families. *Hum. Mol. Genet.* **11**: 535-546.

Zhang, X. und Firestein, S. (2002). The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci* **5**: 124-133.

Zhao, H., Ivic, L., Otaki, J. M., Hashimoto, M., Mikoshiba, K. und Firestein, S. (1998). Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science* **279**: 237-42.

Zufall, F., Firestein, S. und Shepherd, G. M. (1994). Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**: 577-607.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Ad	
A	Ampere
Å	Angström
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
Amp ^R	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches AMP
Ci	Curie
cm	Zentimeter
Da	Dalton
d. h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
dest.	destilliert
Dmso	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat-Mischung
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GDP	Guanidin-Diphosphat
GTP	Guanidin-Triphosphat
h	Stunde
i. d. R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
J	Joule
Kan ^R	Kanamycin-Resistenzgen
K _D	Dissoziationskonstante
l	Liter
λ	Wellenlänge
m	Meter
M	Molar
MeOH	Methanol
min	Minute
MW	Molekulargewicht

Abkürzungsverzeichnis

OD _x	optische Dichte bei x nm
o.g.	oben genannte
ORF	offener Leserahmen (<i>Open Reading Frame</i>)
p. a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionenaktivität
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
SV	Säulenvolumen
T	Zeit
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Saline (<i>Tris-Buffered Saline</i>)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit/Einheit
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
xg	-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoyl-β-D-galaktosid
z.b.	zum Beispiel
∅	Durchmesser

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. D. Oesterhelt für die Anregung zu diesem Thema, die mir in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung sowie die Möglichkeit, an interessanten Tagungen teilzunehmen.

Ein besonders herzlicher Dank gilt Dr. Eva-Kathrin Sinner für die gute Betreuung, ihr großes Vertrauen und ihre außerordentliche Begeisterungsfähigkeit (ohne die so manche Durststrecke noch trockener geworden wäre).

Dr. Christoph Naumann und Dr. Miranda Deverall danke ich für die interessante Zusammenarbeit zur Einzelmolekül-Messung von Bakteriorhodopsin.

Roxana Bruno danke ich für ihre spontane Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit bezüglich des Nachweises der olfaktorischen Markerproteine.

Unserer XL-Laborcrew danke ich sehr herzlich für die stete gute Laune, die Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit (in alphabetischer Reihenfolge): Birgit, Florian, Judith, Leslie und Simone. Ein nettes Arbeitsklima kann so viel ausmachen!!!

Dr. Douglas A. Griffith, Katrin und Peter danke ich ebenfalls sehr herzlich für die Unterstützung und Zusammenarbeit bei der Expression von OR5 in *S. cerevisiae*.

Natürlich möchte ich auch der gesamten Oe-Arbeitsgruppe für die außergewöhnlich gute Atmosphäre und die immer freundliche Hilfsbereitschaft danken.

Meinen guten Geistern Judith, Katrin und Steffi möchte ich dafür danken, dass sie mir tatkräftig geholfen haben, wann immer die Zeit knapp wurde, bzw. sich die Mühe gemacht haben, meine schriftliche Arbeit einem Grammatik-Check zu unterziehen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Jörg für seinen direkten und indirekten Ansporn sowie bei Frau Haack für ihre Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt auch allen, die mich auf technischer Ebene unterstützt habe: Walter Erhardt für schnelle Hilfe, wenn mal wieder ein Gerät oder Computer „Urlaub gemacht hat“; Uta Schimanko für die Oligo-Synthese; Kiki Weihrauch und Karin Rodewald für die Sequenzierungen; Kornelius Zeth und Martin Grininger für ihre Hilfe bei der Untersuchung der OR5-Kristalle; Reinhard Mentele aus der Arbeitsgruppe von Prof. Lottspeich für die N-terminalen Sequenzierungen sowie Leslie Barth für die Durchführung der CD-Messung.

Ein sehr großer und herzlicher Dank geht an meine bessere Hälfte Thorsten, der auch die weniger enthusiastischen Momente meines Labor-Lebens tapfer ertragen und durch seine gute Laune rosiger gemacht hat, mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich aufgefangen hat, wann immer es nötig war.

Schließlich möchte ich mich noch ganz besonders bei meiner Familie bedanken, die immer an mich geglaubt und bis hierher begleitet hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	21.03.1975
Geburtsort	Hannover
Familienstand	verheiratet (geborene Gindl)

Ausbildungsweg

1981-1985	Besuch der Grundschule in Godshorn
1985-1987	Besuch der Orientierungsstufe in Godshorn
1987-1990	Besuch des Gymnasiums Langenhagen
1990-1991	Besuch des Rupprecht-Gymnasiums München
1991-1994	Besuch der St. Anna-Gymnasiums München
05/1994	Abitur
10/1994	Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians-Universität München im Studiengang Biologie
09/1996	Vordiplom in den Fächern Zoologie, Botanik, Genetik und Physik
Herbst 1999	Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Genetik, Humangenetik und Psychologie
01/2000-12/2000	Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität München unter der Anleitung von Prof. Dr. V. Müller mit dem Thema „Untersuchungen zur Rolle von Bicarbonat im heterotrophen Stoffwechsel von <i>Acetobacterium woodii</i> “.
02/2001-Anfang 2006	Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung von Prof. Dr. D. Oesterhelt unter Anleitung von Dr. E.-K.- Sinner mit dem Thema: „ <i>Expression, Isolierung und Funktionsanalyse des OR5 Geruchsrezeptors: einem Vertreter der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren</i> “
