

„Etablierung der *in vitro* Renaturierung von Vitamin K Epoxid
Reduktase“

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herr Frank Jaenecke

geb. am: 19.11.1981 in: Leipzig

Gutachter /in

1. Prof. Dr. Milton T. Stubbs

2. Prof. Dr. Klaus Gawrisch

3. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen

Halle (Saale), 02. Juli 2012

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
1.1 Vitamin K und seine Rolle in der enzymatischen γ -Carboxylierung spezifischer Glutamatreste	1
1.2 Die Rolle von Vitamin K Epoxid Reduktase (VKOR) im Vitamin K-Zyklus.....	3
1.3 Funktionen Vitamin-K-abhängiger Proteine.....	5
1.4 Identifizierung und Charakterisierung der VKOR-Aktivität.....	8
1.5 Identifikation des VKOR-Gens	9
1.6 Struktur von VKOR.....	11
1.7 Mechanismus der Vitamin K Epoxid Reduktion.....	14
1.8 Gewinnung von Membranproteinen für strukturelle Untersuchungen	15
1.9 Rekombinante Expression von Membranproteinen.....	18
1.10 <i>In vitro</i> - Renaturierung von Proteinen	20
1.11 Ziele der Arbeit.....	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Chemikalien	24
2.2 Medien, Lösungen und Puffer	24
2.3 Verwendete Plasmide und Bakterienstämme.....	27
2.4 Enzyme und Molekulargewichtstandards	28
2.5 Verwendete Kits	28
2.6 Oligonukleotide	28
2.7 Geräte	29
2.8 Molekularbiologische Methoden	30
2.8.1 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	30
2.8.2 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien.....	31
2.8.2.1 Herstellung chemokompetenter Zellen.....	31
2.8.2.2 Transformation	31
2.8.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	32
2.8.4 Polymerase-Ketten-Reaktion	32
2.8.4.1 Standard-PCR.....	32
2.8.4.2 Kolonie-PCR	32
2.8.5 Trennung von DNA mittels Gelelektrophorese	32
2.8.6 Restriktion von Plasmid-DNA.....	33
2.8.7 Reinigung von DNA-Fragmenten.....	33
2.8.8 Ligation von DNA-Fragmenten	34
2.8.9 Ortsgerichtete Mutagenese	34
2.8.10 Sequenzierung von DNA.....	35
2.9 Proteinchemische Methoden	36
2.9.1 Testexpression	36
2.9.2 <i>Fed batch</i> - Fermentation	36
2.9.3 Aufschluss von Bakterienzellen	37
2.9.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie.....	37
2.9.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Amidoschwarz-Färbung.....	38
2.9.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38

2.9.7	Western Blot	39
2.9.8	Isolierung und Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i> (Einschlusskörpern)	39
2.9.9	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)	40
2.9.10	Ameisensäurespaltung	40
2.9.11	Massenspektrometrische Bestimmung	41
2.9.12	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	42
2.9.13	Renaturierung unter Verwendung eines <i>artificial chaperone assisted</i> <i>refolding</i> –Systems	42
2.9.14	Präparation von Liposomen	43
2.9.15	Rekonstitution von Protein in Liposomen	43
2.9.16	Flotation der Lipide mit assoziiertem VKOR-Protein	44
2.10	Methoden zur Untersuchung von VKOR	44
2.10.1	Herstellung von Vitamin K Epoxid (nach Tishler <i>et al.</i> , 1940)	44
2.10.2	Kultivierung und Transfektion von HEK293-Zellen	45
2.10.3	Aktivitätstest mit rekonstituiertem VKOR und HEK Zellen	45
2.10.4	Quantifizierung von Vitamin-K-Derivaten durch analytische Reversed Phase (RP)-HPLC	46
2.10.5	Messung der dynamischen Lichtstreuung	47
2.10.6	CD-Spektroskopie	48
2.10.7	Fluoreszenzspektroskopie	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Klonierung und Screening von VKOR-Expressionsvektoren	50
3.2	Expression von humanen VKOR als KSI-Fusionsprotein	53
3.3	Reinigung und Säurespaltung des VKOR-Fusionsproteins	56
3.3.1	Optimierung der Säurespaltung des VKOR-Fusionsproteins	56
3.4	Analyse der Säurespaltung des KSI-VKOR-Fusionsproteins mittels Massenspektrometrie	57
3.5	Etablierung des Assays der enzymatischen Aktivität mit transient VKOR exprimierenden HEK293-Zellen	59
3.5.1	Einfluss des pH-Wertes im VKOR-Aktivitätstest	60
3.5.2	Einfluss des C-terminalen Hexahistidin-tags im VKOR- Aktivitätstest ...	62
3.6	<i>In vitro</i> Renaturierung von humanem VKOR	62
3.6.1	Einfluss der Proteinkonzentration auf die <i>in vitro</i> Renaturierung	63
3.6.2	Einfluss des pH-Wertes während der <i>in vitro</i> Renaturierung	65
3.6.3	Einfluss des verwendeten Detergens auf die Renaturierung	67
3.7	Rekonstitution von <i>in vitro</i> renaturiertem VKOR	68
3.7.1	Einfluss der Renaturierung und Rekonstitution auf die VKOR- Aktivität	69
3.7.2	Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von rekonstituiertem VKOR	71
3.7.3	Optimierung der Rekonstitutionsbedingungen	73
3.7.4	Einfluss des Lipids auf VKOR-Aktivität	75
3.7.4.1	Kontrolle der Rekonstitutionseffizienz durch Flotation	77
3.7.4.2	Einfluss der Lipid-Alkylkette auf die VKOR-Aktivität	78
3.7.5	Stabilität des rekonstituierten Proteins	79
3.7.6	Einfluss von Reduktionsmitteln während der Rekonstitution	80
3.7.7	Abschätzung der Renaturierungsausbeute für rekombinantes humanes VKOR	81
3.8	Weitere Charakterisierung der Eigenschaften von rekonstituiertem humanem VKOR	83

3.8.1	Einfluss von Detergens auf rekonstituiertes VKOR.....	83
3.8.1.1	Analyse der Aggregationsneigung infolge von DDM-Zugabe durch Messung der dynamischen Lichtstreuung	84
3.8.1.2	Analyse der strukturellen Integrität des humanen VKOR während der DDM-Zugabe durch Fluoreszenzspektroskopie	86
3.8.2	Änderungen der Fluoreszenzintensität von VKOR in Reaktion auf die Inkubation mit dem Reduktionsmittel DTT	88
3.8.3	Fern-UV-CD-Spektroskopie	90
4	Diskussion	93
4.1	Expression und Reinigung von rekombinantem VKOR.....	93
4.1.1	Etablierung eines bakteriellen Expressionssystems für die VKOR- Expression	93
4.1.2	Etablierung der Reinigung von VKOR unter denaturierenden Bedingungen.....	94
4.1.3	Monitoring der Renaturierung durch Bestimmung der VKOR- Enzymaktivität.....	96
4.2	Renaturierung von VKOR.....	96
4.3	Rekonstitution von VKOR.....	100
4.3.1	Einfluss der Zusammensetzung der Lipidumgebung	101
4.3.2	Einfluss reduzierender Bedingungen auf rekonstituiertes VKOR.....	103
4.3.3	Abschätzung der Reproduzierbarkeit der Experimente und der Effizienz der Renaturierung	104
4.4	Ausblick.....	105
5	Zusammenfassung	107
6	Literaturverzeichnis	109
7	Anhang	122
	Anhang 1: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des humanen VKOR, sowie resultierende Sequenzen aus der Klonierung in pET31b ...	122
	Anhang 2: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des verkürzten humanen VKOR, sowie der verwendeten VKOR-homologen Proteine und deren Klonierung	124
	Anhang 3: verwendete Detergenzien	128
	Anhang 4: verwendete Lipide	129
8	Danksagung	133
9	Lebenslauf	134
10	Selbstständigkeitserklärung	135

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1	Rolle von Vitamin K bei der enzymatischen γ -Carboxylierung von Glutamat.	1
Abb. 1.2	Interaktion von γ -Carboxyglutamatresten der Gla-Domäne des Prothrombin mit Kalziumionen.	2
Abb. 1.3	Vitamin K-Zyklus.	4
Abb. 1.4	Blutgerinnungskaskade und darin beteiligte Vitamin-K-abhängige Proteine.	6
Abb. 1.5	Beteiligung von Vitamin-K-abhängigen Proteinen an verschiedenen Prozessen.	7
Abb. 1.6	Struktur des VKOR-homologen Proteins aus <i>Synechococcus sp.</i>	11
Abb. 1.7	Modell der Übertragung von Redoxäquivalenten auf humanes VKOR.	13
Abb. 1.8	Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für Vitamin K Epoxid Reduktase.	14
Abb. 1.9	Vergleich von GPCR-Konstrukten für die Strukturaufklärung.	17
Abb. 2.1	Modifiziertes GeneTailor™-Verfahren für die ortsgerichtete Mutagenese größerer Sequenzbereiche.	35
Abb. 2.2	Renaturierung von humanem VKOR unter Verwendung eines modifizierten Rückfaltungssystems mit nicht-natürlichen Chaperonen.	42
Abb. 3.1	SDS-PAGE- und Western-Blot-Analyse der Expression des KSI-VKOR-Fusionsproteins in <i>E. coli</i> BL21(DE3).	53
Abb. 3.2	Western-Blot-Analyse der Expression des KSI-VKOR-Fusionsproteins in <i>E. coli</i> BL21(DE3) und <i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta.	54
Abb. 3.3	<i>Fed-batch</i> Fermentation von KSI-VKOR-Fusionsprotein in <i>E. coli</i> BL21(DE3). ..	55
Abb. 3.4	<i>Inclusion body</i> -Präparation und erster IMAC-Reinigungsschritt.	56
Abb. 3.5	Optimierung der Bedingungen für die Ameisensäurespaltung.	57
Abb. 3.6	Western Blot- (A) und SDS-PAGE-Analyse (B) des isolierten VKOR-Peptids nach der Ameisensäurespaltung.	58
Abb. 3.7	Massenspektrometrische Analyse des nach der Ameisensäurespaltung isolierten VKOR-Peptids.	59
Abb. 3.8	Quantifizierung des Vitamin K Epoxid-Umsatzes im VKOR-Aktivitätsassay.	60
Abb. 3.9	Einfluss des pH-Wertes und des C-terminalen Hexahistidin-tag im VKOR-Aktivitätstest.	61
Abb. 3.10	Vitamin K Epoxid-Umsatz in Abhängigkeit der applizierten Proteinmenge pro Puls während der Renaturierung.	64
Abb. 3.11	Spezifischer Vitamin-K-Umsatz in Abhängigkeit von der applizierten Proteinmenge pro Puls während der Renaturierung.	65
Abb. 3.12	Einfluss des Detergens und der Redoxbedingungen auf die Renaturierung von VKOR.	68
Abb. 3.13	Einfluss der Renaturierung und Rekonstitution auf VKOR-Aktivität.	70
Abb. 3.14	Inhibierung von rekonstituiertem VKOR durch Warfarin.	71
Abb. 3.15	Zeitabhängiger Verlauf der Umsetzung von Vitamin K Epoxid durch VKOR.	72
Abb. 3.16	Einfluss der OG-Konzentration im Rekonstitutionsansatz auf die VKOR- Aktivität.	73
Abb. 3.17	Einfluss des Protein-Lipid-Verhältnisses auf die VKOR-Aktivität.	74
Abb. 3.18	Abhängigkeit der VKOR-Aktivität von der Lipidumgebung.	76
Abb. 3.19	Proteinbestimmung des Lipid-assoziierten VKOR in verschiedenen Lipidmischungen durch Flotation und anschließende Färbung mit Amidoschwarz.	78
Abb. 3.20	Einfluss verschiedener Phosphatidylcholins auf VKOR-Aktivität.	79
Abb. 3.21	Lagerung von rekonstituiertem VKOR.	80
Abb. 3.22	Einfluss von Reduktionsmitteln während der VKOR-Rekonstitution.	81
Abb. 3.23	Semi-quantitative Bestimmung der VKOR-Mengen in HEK-Zellen durch Western Blot Analyse.	82
Abb. 3.24	Einfluss von DDM auf rekonstituiertes VKOR.	83
Abb. 3.25	Charakterisierung von rekonstituiertem VKOR durch Messung der dynamischen Lichtstreuung.	85

Abb. 3.26	Analyse der dynamischen Lichtstreuung von rekonstituiertem VKOR bei verschiedenen DDM-Konzentrationen.....	86
Abb. 3.27	Einfluss von DDM auf rekonstituiertes VKOR.....	87
Abb. 3.28	Einfluss von TCEP während der VKOR-Rekonstitution und Wirkung von DTT-Zugabe zu rekonstituiertem VKOR.	88
Abb. 3.29	Anstieg der VKOR-Fluoreszenzemission bei 341 nm nach DTT-Zugabe.	89
Abb. 3.30	Fern-UV-CD-Spektrum von VKOR in SDS, rekonstituiertem VKOR in POPC und in einer Mischung aus POPC/POPE/POPS/Cholesterol.	91
Abb. 3.31	Fern-UV-CD-Spektren von Lysozym ohne Lipide und in Gegenwart von POPC-Liposomen.	92
Abb. 4.1	Schematische Darstellung zur Gewinnung von humanem VKOR ausgehend von dessen unlöslicher Expression in <i>E. coli</i>	95
Abb. 4.2	Modell der Lokalisierung von VKOR.....	99
Abb. 4.3	Selektive Akkumulation von Membranproteinen in verschiedenen Membrandomänen.....	101
Tab. 1.1	Zusammensetzung von Membranen verschiedener Zellkompartimente	16
Tab. 1.2	Vergleich verschiedener Expressionssysteme.....	19
Tab. 3.1	Klonierung und Expression verschiedener VKOR-Konstrukte.	51
Tab. 3.2	Einfluss des pH-Werts während der Renaturierung.....	66
Tab. 3.3	Abschätzung der Renaturierungsausbeute.....	82

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCL	<i>B cell lymphoma</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
cDNA	codierende DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propansulfonat
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
Da	Dalton
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DDM	n-Dodecyl-β-D-Maltopyranosid
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dubbelco's Modified Eagle Medium</i>
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrosprayionisierung(-MS)
<i>et al.</i>	<i>et alteres</i>
FKS	Fetales Kälberserum
Gas	<i>growth arrest specific protein</i>
Gla	γ-Carboxyglutamat
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
His ₆ -tag	Hexahistidin-tag
His ₁₀ -tag	Decahistidin-tag
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hyg	Hygromycin
IB	<i>inclusion bodies</i> , Einschlusskörper
ICL	intrazellulärer <i>loop</i>
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IMP	Integrale Membranproteine
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Vitamin K
KH ₂	reduziertes Vitamin K (Hydrochinon)
KO	Vitamin K Epoxid
KSI	Ketosteroidisomerase
LB	Luria-Bertani Medium
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i> (-MS)
MBP	Maltose-Bindeprotein
MGP	Matrix Gla Protein
MS	Massenspektrometrie
NAD(P)H	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat), reduziert
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernresonanz

OG	n-Octyl- β -D-Glucopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Prolyldisulfidisomerase
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
POPS	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
siRNA	Small interfering RNA, kleine interferierende Ribonukleinsäuren
sp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TB	<i>Terrific Broth</i> (-Medium)
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLE	<i>tryptophane leader</i>
TM	Transmembran
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ÜZ	Übergangszustand
v/v	Volumen pro Volumen (volumenprozentual)
vgl.	Vergleichend
Vit.	Vitamin
VKOR, VKORC1	Vitamin K Epoxid Reduktase
VKORC1L1	Vitamin K Epoxid Reduktase ähnliches Protein
w/v	Gewicht pro Volumen (masseprozentual)

1 Einleitung

1.1 Vitamin K und seine Rolle in der enzymatischen γ -Carboxylierung spezifischer Glutamatreste

Vitamin K wurde in den 1930er Jahren im Zusammenhang mit dem Auftreten von Störungen bei der Blutkoagulation entdeckt (Dam, 1935). Die Vitamin K-Familie umfasst die Gruppen der strukturell ähnlichen Phyllochinone (Vit. K1), Menachinone (Vit. K2) und Menadion (Vit. K3) (Booth, 2009; Cranenburg *et al.*, 2007; Abb. 1.1). Sie alle weisen die aromatische Ringstruktur eines methylierten Naphtochinons auf, variieren jedoch in der aliphatischen Seitenkette. Phyllochinone sind vor allem in grünen Pflanzen zu finden, während Menachinone durch Bakterien der Darmflora synthetisiert werden können (Conly *et al.*, 1994; Cranenburg *et al.*, 2007). Menadione kommen nicht in der Natur vor und stellen eine synthetische Form des Vitamin K dar.

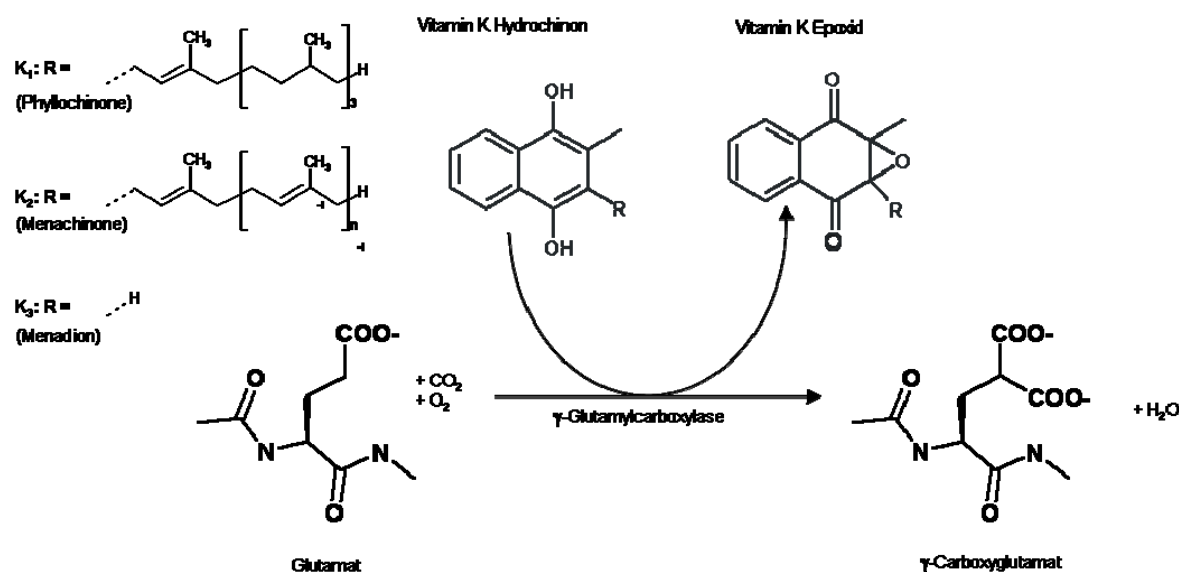


Abb. 1.1 Rolle von Vitamin K bei der enzymatischen γ -Carboxylierung von Glutamat. Vitamin K dient als Cofaktor für die γ -Carboxylierung spezifischer Glutamatreste in Vitamin-K-abhängigen Proteinen. Die verschiedenen Mitglieder der Vitamin-K-Familie unterscheiden sich in der Struktur der aliphatischen Seitenkette.

Die Vitamin K-abhängige Carboxylierung von Glutamatresten ist bislang die einzige bekannte enzymatische Reaktion, in der Vitamin K als Cofaktor benötigt wird (Furie *et al.*, 1999; Abb. 1.1). Sie wird durch das Enzym γ -Glutamyl-Carboxylase katalysiert, das in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist, und führt zur Einführung einer Carboxylgruppe an der γ -Position spezifischer Glutamatreste in

bestimmten Proteinen, die deswegen als Vitamin K-abhängige Proteine bezeichnet werden (Furie *et al.*, 1999; Kulman *et al.*, 2001; Suttie, 1985).

Um die Spezifität dieser Reaktion zu gewährleisten, besitzen diese Vitamin K-abhängigen Proteine im Bereich des Propeptids eine Erkennungssequenz für die γ -Carboxylierung, welche die Synthese von γ -Carboxyglutamat (Gla) in benachbarten Domänen des Vorläuferproteins vermittelt (Furie *et al.*, 1997; Jorgensen *et al.*, 1987). Zu den bisher bekannten Vitamin K-abhängigen Proteinen gehören eine Reihe von Blutgerinnungsfaktoren (Faktor VII, IX, X, Prothrombin), regulatorische Proteine der Blutgerinnung (Protein C und Protein S), Proteine aus mineralisiertem Gewebe (bone Gla protein und matrix Gla protein) sowie eine Reihe weiterer Proteine (Kapitel 1.3).

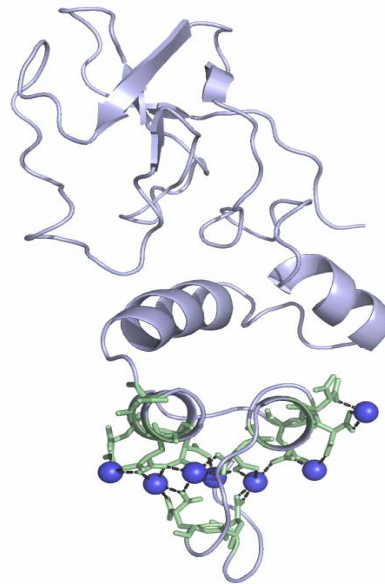


Abb. 1.2 Interaktion von γ -Carboxyglutamatresten der Gla-Domäne des Prothrombins mit Kalziumionen.

Die Gla-Domäne des Prothrombins ist in Bänderdarstellung gezeichnet (hellblau). γ -Carboxyglutamatreste (grün) interagieren durch ein Netzwerk von ionischen Wechselwirkungen mit Calcium-Ionen (dunkelblau). PDB-Code 2PF2, (Soriano-Garcia *et al.*, 1992)

Diese Gla-Modifikation verleiht reifen Vitamin K-abhängigen Proteinen die Fähigkeit Calcium- und andere Metallionen zu komplexieren - eine Voraussetzung, damit diese Proteine wie z. B. im Falle des Prothrombins mit Membranen reversibel interagieren können (Borowski *et al.*, 1986; Sperling *et al.*, 1978). Diese Interaktion beruht auf der Ausbildung ionischer Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Ion und der γ -Carboxylgruppe auf der einen Seite, sowie zu negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide auf der anderen Seite. Die Aufklärung der 3D-Struktur der Carboxyglutamat (Gla)-Domäne des Prothrombins zeigte ausgeprägte Bindungsnetzwerke zwischen den Carboxyglutamatgruppen des Proteins und komplexierten

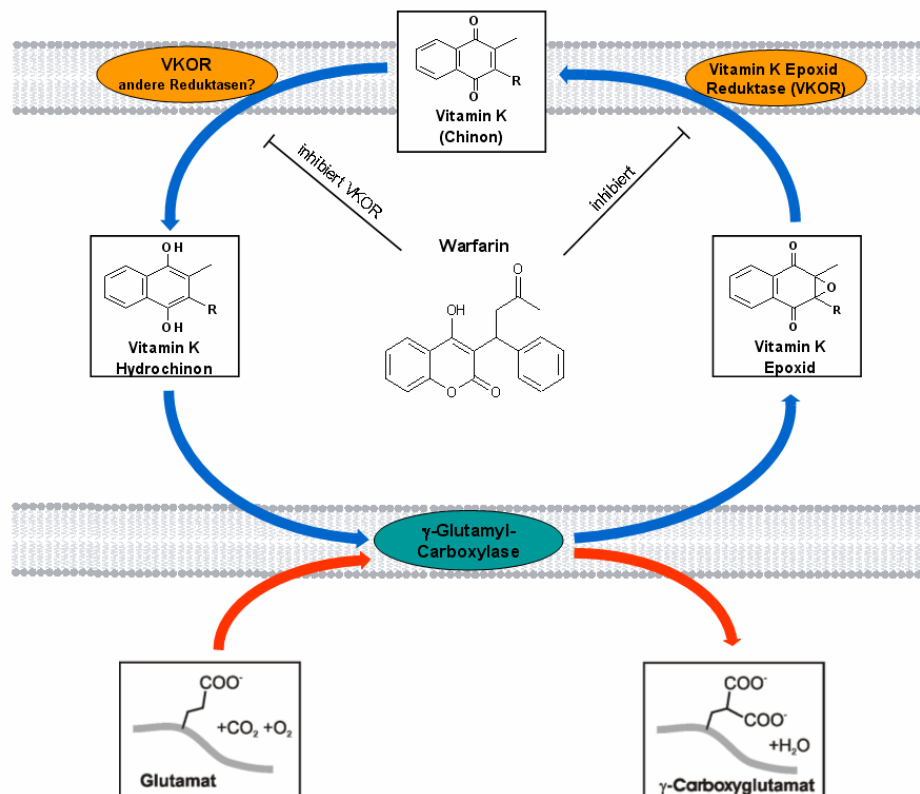
Calcium-Ionen und ist beispielhaft für diese Art der Interaktion (Soriano-Garcia *et al.*, 1992; Abb. 1.2).

1.2 Die Rolle von Vitamin K Epoxid Reduktase (VKOR) im Vitamin K-Zyklus

In der Form des Hydrochinons dient Vitamin K als Cofaktor für die γ -Carboxylierung von Glutamatresten durch γ -Glutamyl Carboxylase (Furie *et al.*, 1990; Kulman *et al.*, 2001, 2007; Wallin *et al.*, 2001) und wird bei dieser Reaktion zu Vitamin K Epoxid oxidiert (Furie *et al.*, 1999). Da die Aufnahme von Vitamin K aus der Nahrung limitiert ist, muss das produzierte Vitamin K Epoxid wieder zur reduzierten Form des Vitamin K umgewandelt werden, um den Vorrat an Cofaktor für die Carboxylierungsreaktion wiederherzustellen (Stafford, 2005; Tie *et al.*, 2005; Wallin *et al.*, 2001). Steht nicht genügend Vitamin K Hydrochinon zur Verfügung, resultiert dies in unvollständig modifizierten, biologisch inaktiven Vitamin K-abhängigen Proteinen. Die Umwandlung des Vitamin K Epoxids zum Vitamin K und dem Vitamin K Hydrochinon wird durch Vitamin K Epoxid Reduktase (VKOR) katalysiert, welches somit diesen als Vitamin K-Zyklus bezeichneten Redoxzyklus schließt (siehe Abb. 1.3).

Dabei wird der erste Schritt, die Umwandlung des Epoxids zu Vitamin K, allein von VKOR bewerkstelligt. An der Reduktion des Vitamin K zum Hydrochinon sind darüber hinaus wahrscheinlich noch andere Enzyme beteiligt, da die Inhibierung von VKOR durch Coumarin-ähnliche Verbindungen, wie z.B. Warfarin (Coumadin®) oder Phenprocoumon (Marcumar®), durch die Gabe von hohen Dosen Vitamin K kompensiert werden kann. Für NAD(P)H-abhängige-Chinon-Oxidoreduktase 1 (NQO1) konnte eine solche reduzierende Aktivität bereits gezeigt werden (Wallin *et al.*, 1981), obwohl aufgrund der sehr hohen eingesetzten Konzentrationen von Vitamin K eine physiologische Bedeutung dieser Reaktion *in vivo* jedoch fraglich ist. Neuere Untersuchungen an einem Säugerzell-basierten System für den Vitamin K-Zyklus bestätigten dies (Tie *et al.*, 2011), während Westhofen *et al.* (2011) zeigen konnten, dass ein VKOR-ähnliches Protein (VKORC1L1) zusammen mit VKOR die Reduktion von Vitamin K unter physiologischen Bedingungen übernehmen kann.

Eine Inhibierung von VKOR führt zum kompletten Verlust der katalytischen Aktivität des Enzyms für beide Reaktionen (Chu *et al.*, 2006). Infolge dieser Inhibierung kommt es zur Erschöpfung der Vorräte an reduziertem Vitamin K und damit zu einem



Während der γ -Carboxylierung spezifischer Glutamatreste wird der Cofaktor, reduziertes Vitamin K, zu Vitamin K Epoxid oxidiert. Die Reduktion des Epoxids zu Vitamin K erfolgt ausschließlich durch Vitamin K Epoxid Reduktase (VKOR), während an der weiteren Reduktion des Vitamin K zum Hydrochinon neben VKOR noch weitere Reduktasen beteiligt sein können. VKOR kann durch Coumarin-basierte Inhibitoren (z.B. Warfarin oder Phenprocoumon) gehemmt werden.

1.3 Funktionen Vitamin-K-abhängiger Proteine

Der intrinsische Weg der Blutgerinnungskaskade (siehe Abb. 1.4) wird über die Aktivierung von Faktor XII initiiert (Furie *et al.*, 1988). In der Folge kommt es zur proteolytischen Prozessierung von Faktor XI zur aktiven Form XIa, die in Gegenwart von Calcium-Ionen die Aktivierung von Faktor IX katalysiert. Dieser stellt ein Vitamin K-abhängiges Protein dar, welches an Membranoberflächen binden kann, wo es im Zusammenspiel mit Faktor VIIIa die Aktivierung des ebenfalls Vitamin K-abhängigen Faktor X bewirkt. In Gegenwart von Calcium und an die Membran gebundenen Co-faktor Va, katalysiert Faktor Xa schließlich die Aktivierung von Prothrombin zum Thrombin.

Carboxyglutamat-Modifizierungen von spezifischen Glutamatresten eines Proteins konnten erstmals für Prothrombin nachgewiesen und in Zusammenhang mit der Wirkung von Vitamin K gebracht werden (Nelsestuen *et al.*, 1974; Stenflo *et al.*, 1974). Darüber hinaus wurde für Prothrombin gezeigt, dass zwei sequentielle Metallionen-abhängige Konformationsänderungen notwendig sind, damit dieses Protein an Membranen binden kann (Borowski *et al.*, 1986).

Eine dominierende physiologische Rolle spielt *in vivo* der extrinsische Weg der Blutgerinnung (Furie *et al.*, 1988), während der intrinsische Weg wahrscheinlich ein redundant wirkendes System zur Absicherung einer funktionellen Hämostase darstellt (siehe Abb. 1.4). Kommt es infolge einer Verletzung der Blutgefäße zu einer Freisetzung des *Tissue Factors* (Gewebefaktors) auf der Oberfläche von verletzten Zellen, so kann dieser als Cofaktor für die Aktivierung eines weiteren Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktors, des Faktors VII, wirken. In Gegenwart von Calcium aktiviert nun der *Tissue Factor*-Faktor VIIa-Komplex die Faktoren X und IX und führt in der Folge wiederum zu einer Aktivierung von Prothrombin, das als Thrombin die Freisetzung von Fibrin aus Fibrinogen katalysiert, sowie eine Vielzahl von Faktoren der Kaskade reguliert.

Neben dieser Vielzahl von Vitamin K-abhängigen Blutgerinnungsfaktoren spielen noch zwei weitere regulatorisch wirkende Proteine eine Rolle. Protein C wird durch einen Komplex aus Thrombin und Thrombomodulin zu seiner aktiven Form prozessiert. Nach der Bindung von Protein C an das ebenfalls Vitamin K-abhängige, membranassoziierte Protein S, bewirkt dieser Komplex die Umwandlung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa zu inaktiven Formen. Damit wird eine effiziente

Regulierung der Blutgerinnung über die Verfügbarkeit dieser beiden Cofaktoren erreicht. Da ein Großteil der Reaktionen während der Blutgerinnung durch Vitamin K-abhängige Enzyme durchgeführt und reguliert wird, hat die stetige Verfügbarkeit von Vitamin K für die Modifikation von spezifischen Glutamatresten in den Gla-Domänen dieser Proteine einen maßgeblichen Einfluss auf die Aufrechterhaltung einer funktionellen Hämostase.

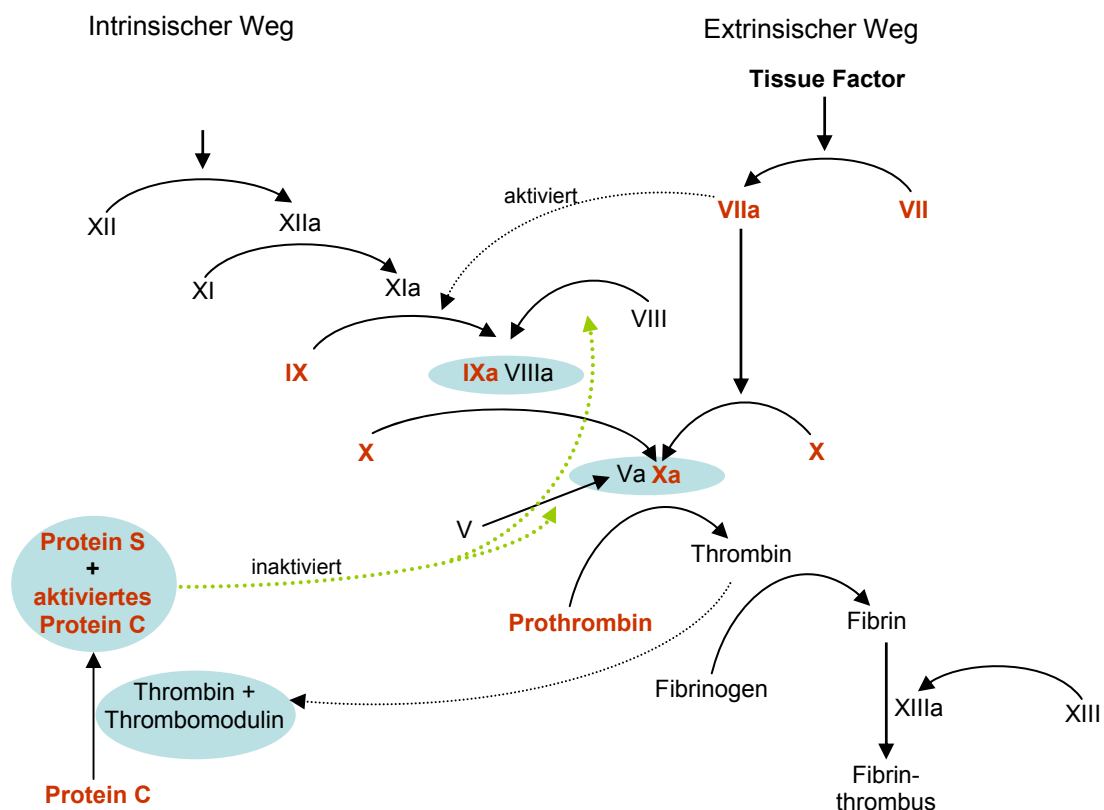


Abb. 1.4 Blutgerinnungskaskade und darin beteiligte Vitamin-K-abhängige Proteine.

Die Gerinnungsfaktoren VII, IX, X sowie Prothrombin/Thrombin sind Vitamin K-abhängige Proteine, die direkt in der Blutgerinnungskaskade involviert sind. Protein C und S sind ebenfalls Vitamin K-abhängig und bilden einen Komplex, der verschiedene Schritte der Blutgerinnungskaskade reguliert. Vitamin K-abhängige Proteine sind rot hervorgehoben; Proteinkomplexe sind blau hinterlegt.

Neben der Blutgerinnung sind Vitamin K-abhängige Proteine noch in einer Reihe weiterer Prozesse involviert (Booth, 2009; Danziger, 2008; siehe Abb. 1.5). So ist Osteocalcin in der Lage, direkt mit Calcium-Ionen auf Hydroxyapatitflächen zu interagieren (Poser *et al.*, 1979) und spielt daher eine wichtige Rolle bei der Homöostase von Knochenstruktur, indem es die Kristallisation von Hydroxyapatit unterbindet.

Das *Matrix Gla Protein* (MGP) ist ein weiteres Vitamin K-abhängiges Protein, das wichtige Funktionen im Organismus erfüllt. So wurde MGP in Zusammenhang mit der Calcium-Homöostase im Blut gebracht und scheint eine wichtige Rolle bei der

Vorbeugung der Kalzifikation von Arterien zu spielen (Luo *et al.*, 1997). Im Zusammenspiel mit *Bone Morphogenic Protein* (BMP)-2 reguliert MGP offenbar die Differenzierung vaskularer glatter Muskelzellen zu Osteoblasten (Zebboudj *et al.*, 2003). Außerdem wurde die Regulation der Knochenbildung durch Steuerung der Expression von MGP in Chondrozyten beschrieben (Julien *et al.*, 2007). Hierbei scheint das Protein eine ähnliche demineralisierende Funktion wie das Osteocalcin auszuüben (Murshed *et al.*, 2004).

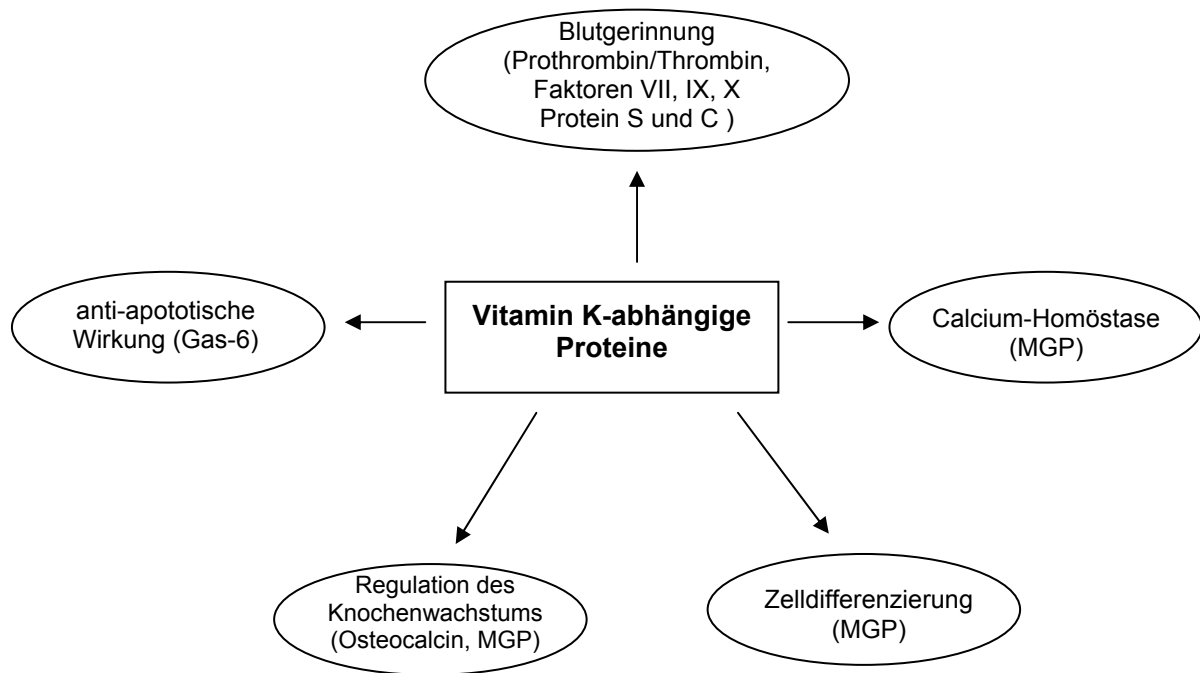


Abb. 1.5 Beteiligung von Vitamin-K-abhängigen Proteinen an verschiedenen Prozessen

In letzter Zeit wurden auch dem *Growth arrest-specific protein* (Gas)-6 physiologische Funktionen zugeordnet. Gas-6, welches an den Axl Rezeptor bindet, hat einen stimulierenden Einfluss auf die Produktion des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 und übt darüber einen protektiven Effekt auf endotheliale Zellen und vaskuläre glatte Muskelzellen aus (Hasanbasic *et al.*, 2004; Melaragno *et al.*, 2004). Es konnte auch gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Warfarin, diesen anti-apoptischen Effekt aufhebt (Hasanbasic *et al.*, 2005). Erhöhte Phosphat-Konzentrationen führen zu einer Absenkung der Gas-6 Expression und können somit ebenfalls zu einer verstärkten Apoptose und verstärkter Kalzifikation führen (Son *et al.*, 2006).

Zu den Vitamin K-abhängigen Proteinen gehören ebenfalls zwei Prolin-reiche Gla Proteine (PRGP1 und 2) sowie zwei Transmembran-Gla Proteine (TMG1 und TMG2), die in vielen adulten und fetalen Geweben exprimiert werden (Kulman *et al.*,

2001). Bisher wurde nur für PRGP2 eine mögliche Funktion in einer Signaltransduktion beschrieben, in der das Protein spezifisch an Yes-assoziiertes Protein (YAP) binden kann (Kulman *et al.*, 2007).

Kürzlich wurde mit dem Gla-reichen Protein (GRP) noch ein weiteres Protein gefunden, welches einen sehr hohen Anteil von Carboxyglutamat-Resten aufweist (Viegas *et al.*, 2008) und in Knorpel und Knochengewebe gefunden wurde. Es wird spekuliert, dass dieses Protein ebenfalls an der Regulation der Mineralisation in diesen Geweben beteiligt ist.

1.4 Identifizierung und Charakterisierung der VKOR-Aktivität

Bereits 1972 wurde vermutet, dass der anti-koagulatorische Effekt von Warfarin durch die Inhibition der Umwandlung von Vitamin K Epoxid zu Vitamin K verursacht wird (Bell *et al.*, 1972). Später wurde durch vergleichende Untersuchungen an Leber-Mikrosomen-Präparationen aus Warfarin-resistenten und nicht-resistenten Ratten nachgewiesen, dass Warfarin tatsächlich die Reduktion von Vitamin K Epoxid durch Vitamin K Epoxid Reduktase (VKOR) hemmt (Zimmermann *et al.*, 1974). Diese Inhibition wurde auch in Gegenwart des Reduktionsmittels DTT beobachtet, so dass eine Störung des Transfers von Redoxäquivalenten auf VKOR durch Warfarin ausgeschlossen wurde. Dies spricht für eine direkte Inhibition der Reduktase durch Warfarin.

In der Folge versuchte man, die Vitamin K Epoxid Reduktase Aktivität anhand von Untersuchungen mit Präparationen von Lebermikrosomen näher zu charakterisieren. Dabei wurde gezeigt, dass Thiolgruppen in die enzymatische Reaktion involviert sind (Lee *et al.*, 1984; Wallin *et al.*, 1987b), da die Modifizierung mit Iodacetamid und N-Ethylmaleimid die enzymatische Reaktion inhibierte. Außerdem wurde die Hypothese aufgestellt, dass sowohl die Reduktion des Epoxids als auch die Reduktion des Chinons vom gleichen Enzym durchgeführt werden (Preusch *et al.*, 1984) und beide Schritte durch Warfarin gehemmt werden können (Fasco *et al.*, 1982a).

Darüber hinaus wurden Enzymaktivitäten nachgewiesen, die ebenfalls die Reduktion des Chinons zum Hydrochinon katalysieren, aber nicht Warfarin-sensitiv sind (Fasco *et al.*, 1982b; Wallin *et al.*, 1982). Hierbei wirken NAD(P)H-abhängige Dehydrogenasen, deren Rolle unter physiologischen Bedingungen bislang ungeklärt ist, die jedoch

im Falle einer Warfarin Intoxikation die Reduktion des Vitamin K übernehmen können (Wallin *et al.*, 1987).

Zahlreiche Versuche präparierte Mikrosomen weiter zu reinigen und zu charakterisieren führten nicht zur Identifizierung eines Proteins mit VKOR-Aktivität (Begent *et al.*, 2001; Cain *et al.*, 1997; Mukharji *et al.*, 1985). Die Abnahme der VKOR-Aktivität bei der Solubilisierung von Mikrosomen korreliert dabei vermutlich mit einem Verlust der natürlichen Membranumgebung. Anhand der Phospholipase-Behandlung einer Präparation des Enzyms konnte gezeigt werden, dass Phospholipide essentiell für die VKOR-Aktivität zu sein scheinen (Wallin *et al.*, 1997).

1.5 Identifikation des VKOR-Gens

Unabhängig voneinander identifizierten 2004 zwei Gruppen ein Gen, welches für eine Warfarin-sensitive VKOR-Aktivität kodiert (Li *et al.*, 2004; Rost *et al.*, 2004). Durch vergleichende Kartierung von Genen, die für die Ausprägung einer Warfarin-Resistenz bei Ratten und Mäusen bzw. für die erbliche Defizienz verschiedener Vitamin K-abhängiger Gerinnungsfaktoren beim Menschen verantwortlich sind (Fregin *et al.*, 2002), wurde ein Bereich auf Chromosom 16 mit etwas mehr als 100 Genen gefunden, in dem das VKOR-Gen lokalisiert ist.

Rost *et al.* (2004) verglichen daraufhin, in welchen Genen Mutationen zu erblichen Defizienzen von Vitamin K-abhängigen Proteinen bzw. zu Resistenzen gegenüber Warfarin führten. Auf diese Weise konnte ein Gen identifiziert werden, das für ein Transmembranprotein der ER-Membran kodiert, das die Umsetzung von Vitamin K Epoxid katalysiert und durch Warfarin gehemmt werden kann. Da bis dato unklar ist, ob VKOR *in vivo* allein die Umsetzung von Vitamin K Epoxid bewerkstelligt oder Bestandteil eines größeren Komplexes ist, erhielt das Protein die Bezeichnung VKORC1, welche synonym zu VKOR gebraucht wird.

Li *et al.* (2004) konzentrierten sich auf Gene, die für Transmembranproteine mit unbekannter Funktion kodierten. Sie stellten siRNA-Pools her, mit denen sie versuchten, die Expression der einzelnen Gene in Zellen mit hoher endogener VKOR-Aktivität zu inhibieren. Sie fanden heraus, dass das Stilllegen eines einzelnen Genes die VKOR-Aktivität der untersuchten Zellen deutlich minderte. Durch Expression des Gens in Sf9-Insektenzellen, konnte VKOR produziert werden, das sich durch Warfarin hemmen ließ.

Die Identifizierung des VKOR-Gens eröffnete neue Möglichkeiten in Bezug auf die rekombinante Herstellung des Proteins. Damit war es erstmals möglich, Mutationsstudien an diesem Protein durchzuführen und funktionell bedeutende Aminosäuren zu identifizieren (Jin *et al.*, 2007; Rost *et al.*, 2005). Mit gereinigtem und rekonstituiertem VKOR konnte ebenfalls bewiesen werden, dass das Protein sowohl die Umsetzung von Vitamin K Epoxid zum Chinon als auch von Vitamin K zum Hydrochinon katalysiert und dass beide Reaktionen durch Warfarin inhibierbar sind (Chu *et al.*, 2006).

In der Folge wurden VKOR-homologe Proteine in einer Reihe weiterer Organismen identifiziert (Goodstadt *et al.*, 2004; Kulman *et al.*, 2007). Außer in Chordaten (u.a. Vertebraten und Urochordaten), Arthropoden (u.a. Insekten), Pflanzen und einer Reihe weiterer Eukaryoten wurden Proteine dieser weit verbreiteten Familie auch in Bakterien und Archaeen identifiziert. Einige dieser VKOR-homologen Proteine besitzen neben der VKOR-homologen Sequenz noch eine Thioredoxin-ähnliche Oxidoreduktase-Domäne. Für diese Domäne wurde eine Funktion in der Bereitstellung und Übertragung von Redoxäquivalenten auf die Cysteingruppen des aktiven Zentrums vermutet, die kürzlich für das VKOR-homologe Protein aus *Synechococcus sp.* bestätigt werden konnte (Li *et al.*, 2010). Bei den übrigen VKOR-ähnlichen Proteinen ohne diese Thioredoxin-ähnliche Domäne scheinen Oxidoreduktasen wie PDI oder DsbA an der Reduktion der Thiolgruppen des aktiven Zentrums beteiligt zu sein. In diesem Zusammenhang können VKOR und homologe Proteine an Prozessen der oxidativen Faltung von Proteinen beteiligt sein (Dutton *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2008; Wajih *et al.*, 2007) oder die Konzentration intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies regulieren (Schaafhausen *et al.*, 2010; Westhofen *et al.*, 2011).

Da lange Zeit unklar war, welche Proteine unter physiologischen Bedingungen Redoxäquivalente auf VKOR übertragen können, wurden für *in vitro*-Untersuchungen vor allem Dithiolverbindungen eingesetzt, um die Funktion eines Elektronendonors zu erfüllen (Fasco *et al.*, 1983a; Fasco *et al.*, 1983b; Wallin *et al.*, 1985). Auf Grundlage der Struktur des VKOR-homologen Proteins aus *Synechococcus sp.* (Li *et al.*, 2010), wurden Thioredoxin(Trx)-ähnliche ER-Proteine auf ihre Fähigkeit untersucht, mit einer VKOR-Mutante (Cys51Ala) ein Intermediat des wahrscheinlichen Elektronentransfermechanismus zu bilden (siehe Abb. 1.7). Auf diese Weise konnten die membranverankerten Trx-ähnliche Proteine TMX und TMX4, sowie ERp18 als mögliche physiologische Interaktionspartner von humanem VKOR

gefunden werden (Schulman *et al.*, 2010) und PDI als möglicher Interaktionspartner von VKOR (Wajih *et al.*, 2007) ausgeschlossen werden.

1.6 Struktur von VKOR

Eine wichtige Grundlage für die Aufklärung der VKOR-Struktur stellte die Identifikation des humanen VKORC1-Gens und homologer bakterieller Proteine dar (Goodstadt *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Rost *et al.*, 2004). Dies ermöglichte die Expression und Reinigung des VKOR-homologen Proteins aus *Synechococcus sp.* sowie die Bestimmung von dessen Kristallstruktur (Li *et al.*, 2010; siehe Abb. 1.6).

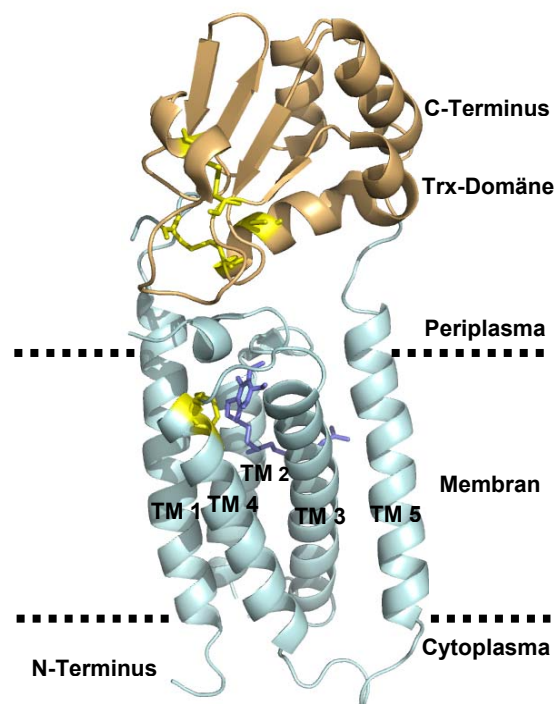


Abb. 1.6 Struktur des VKOR-homologen Proteins aus *Synechococcus sp.*

Das VKOR-homologe Protein besteht aus einer Transmembrandomäne (hellblau) und einer Thioredoxin-ähnlichen extrazellulären Domäne (orange). Cysteine sind gelb hervorgehoben. Im aktiven Zentrum des Proteins ist endogenes Ubichinon (dunkelblau) gebunden. PDB-Code: 3KP9, (Li *et al.*, 2010)

Das VKOR-homologe Protein besteht aus einer Transmembrandomäne und einer Thioredoxin (Trx)-ähnlichen extrazellulären Domäne. Die Membrandomäne besteht aus fünf Helices, von denen die ersten vier Transmembranhelices homolog zum humanen VKOR sind. Im Inneren des Bündels, das durch diese vier Transmembranhelices gebildet wird, ist endogenes Ubichinon gebunden, das wahrscheinlich als Akzeptor für übertragene Redoxäquivalente dienen kann. Die fünfte Transmembran-

helix bildet eine Verbindung zur Thioredoxin-ähnlichen Domäne des Proteins. Der N-Terminus des Proteins befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Dagegen sind der C-Terminus und der große *loop*-Bereich zwischen den Transmembranhelices TM1 und TM2 auf der periplasmatischen Seite lokalisiert. Dieser *loop* beinhaltet zwei stark konservierte Cysteinreste (Cys 50 und Cys 56), die essentiell für den Transfer der Elektronen von der Thioredoxin-ähnlichen Domäne auf die Cysteinreste (Cys 130 und Cys 133) im aktiven Zentrum von VKOR sind.

Die Übertragung der Struktur des homologen Proteins auf humanes VKOR zeigt, dass sich alle wichtigen Reste für die Übertragung von Redoxäquivalenten auf der luminalen Seite der ER-Membran befinden. Der vorgeschlagene Mechanismus für den Elektronentransport (siehe Abb. 1.7) beinhaltet zunächst die Reduktion der Cysteinreste im Redoxzentrum des Thioredoxin-ähnlichen Proteins im ER-Lumen. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Reduktion der Cysteinreste Cys 43 und Cys 51 im ER-luminalen *loop* zwischen TM1 und TM2. Anschließend erfolgt die Reduktion der Cysteinreste im aktiven Zentrum von VKOR durch die Cysteine des *loop*-Bereichs, bevor es zu einer Übertragung der Elektronen auf das Epoxid oder Chinon im aktiven Zentrum des Enzyms kommt.

Für die Kristallisation des VKOR-homologen Proteins aus *Synechococcus sp.* wurde eine mutierte Variante eingesetzt (Cys56Ser), die sich in einem arretierten Zustand der Elektronenübertragung befindet. Dabei konnte eine Disulfidbrücke zwischen dem benachbarten, nicht-mutierten Cysteinrest (Cys50) und einem Cysteinrest der Thioredoxin-ähnlichen Domäne (Cys209) gefunden werden, die das Modell der Elektronenübertragung stützt. Ebenso scheint eine kovalente Bindung zwischen dem Cysteinrest Cys133 des aktiven Zentrums und dem C1-Atom des gebundenen Ubichinons ausgebildet zu sein, was im Einklang mit dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus zur Reduktion des VKOR-Substrats steht (Kapitel 1.7).

Für VKOR-Proteine von Säugetieren wurden eine Reihe von Mutationen gefunden, die entweder zu einer Warfarin-Resistenz oder zu Vitamin K-Defizienz führen. Viele dieser Mutationen sind in der Nähe des aktiven Zentrums bzw. im ER-luminalen *loop* lokalisiert und beeinflussen wahrscheinlich die Bindung des Substrates oder haben einen Einfluss auf die Elektronenübertragung. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Warfarin und andere VKOR-Inhibitoren offenbar im aktiven Zentrum von VKOR oder in unmittelbarer räumlicher Nähe binden können (Goodstadt *et al.*, 2004; Rost *et al.*, 2004).

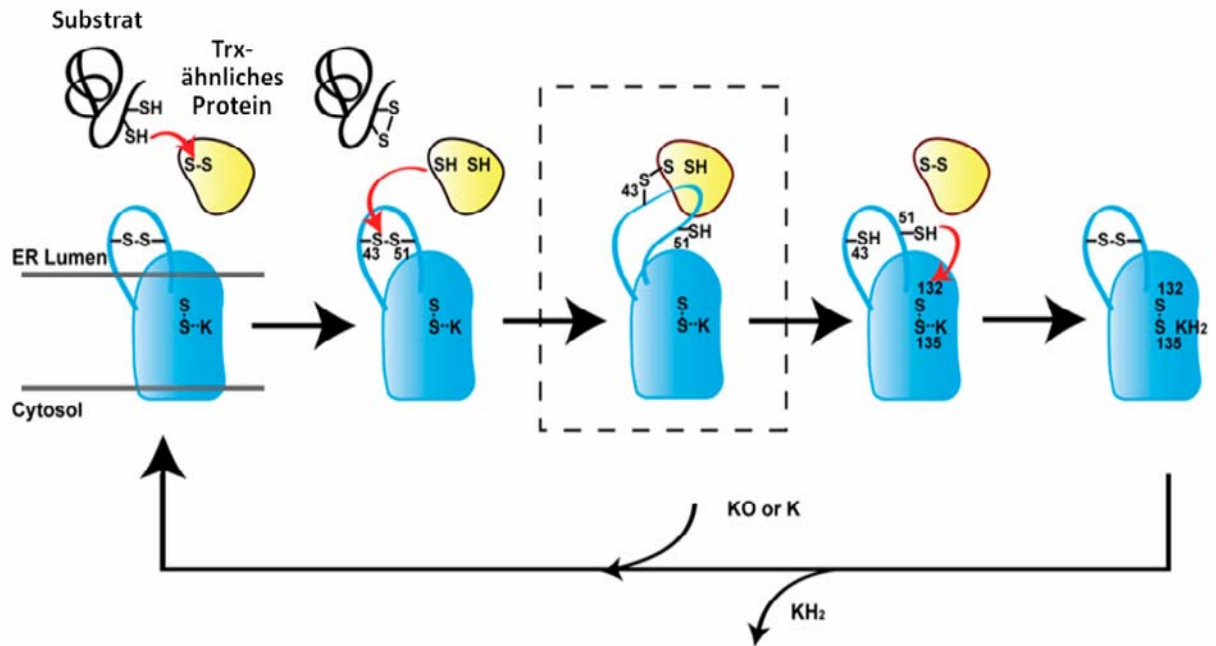


Abb. 1.7 Modell der Übertragung von Redoxäquivalenten auf humanes VKOR.

Während der Bildung von Disulfidbrücken im Substratprotein werden Elektronen auf das Thioredoxin-ähnliche Protein übertragen. Es folgt die Reduktion der Cysteinreste des luminalen loops von VKOR, bevor die Redoxäquivalente auf die Cysteinreste 132 und 135 im aktiven Zentrum des Proteins transferiert werden. Anschließend werden die Elektronen auf das Chinon oder Epoxid im aktiven Zentrum des Enzyms übertragen. (nach Schulman *et al.* 2010)

Die Aufklärung der Struktur des VKOR-homologen Proteins aus *Synechococcus sp.* konnte somit viele Hinweise auf die Funktion des Enzyms auf molekularer Ebene geben. Es bestehen aber auch einige Unterschiede zum humanen Protein. So lässt sich das bakterielle VKOR nur durch sehr hohe Warfarin-Konzentrationen hemmen, während Ferulenol, ein strukturell ähnlicher Antagonist, das Enzym stark inhibiert. Der wichtigste Punkt ist jedoch, dass das bakterielle Enzym Vitamin K Epoxid nicht umsetzen kann und nur die Reaktion von Vitamin K zu Vitamin K Hydrochinon katalysiert. Daher sollte das VKOR-homologe Protein, das in dieser Eigenschaft eher dem humanen VKOR-ähnlichen Protein ähnelt (Westhofen *et al.*, 2011), besser als Vitamin K Reduktase bezeichnet werden. Diese differierende Funktionalität beider VKOR-Proteine weist auf mögliche strukturelle Unterschiede zwischen beiden Proteinen hin.

1.7 Mechanismus der Vitamin K Epoxid Reduktion

Basierend auf vorhandenen Daten (Dowd *et al.*, 1995; Silverman, 1981) zur Umsetzung von Vitamin K Epoxid durch VKOR wurde durch Davis *et al.* (2007) ein Modell des Mechanismus der Enzymkatalyse entwickelt (siehe Abb. 1.8). Dieses Modell umfasst zehn Spezies, darunter zwei Übergangszustände, die durch quantenchemische Berechnungen optimiert und deren Energien berechnet wurden.

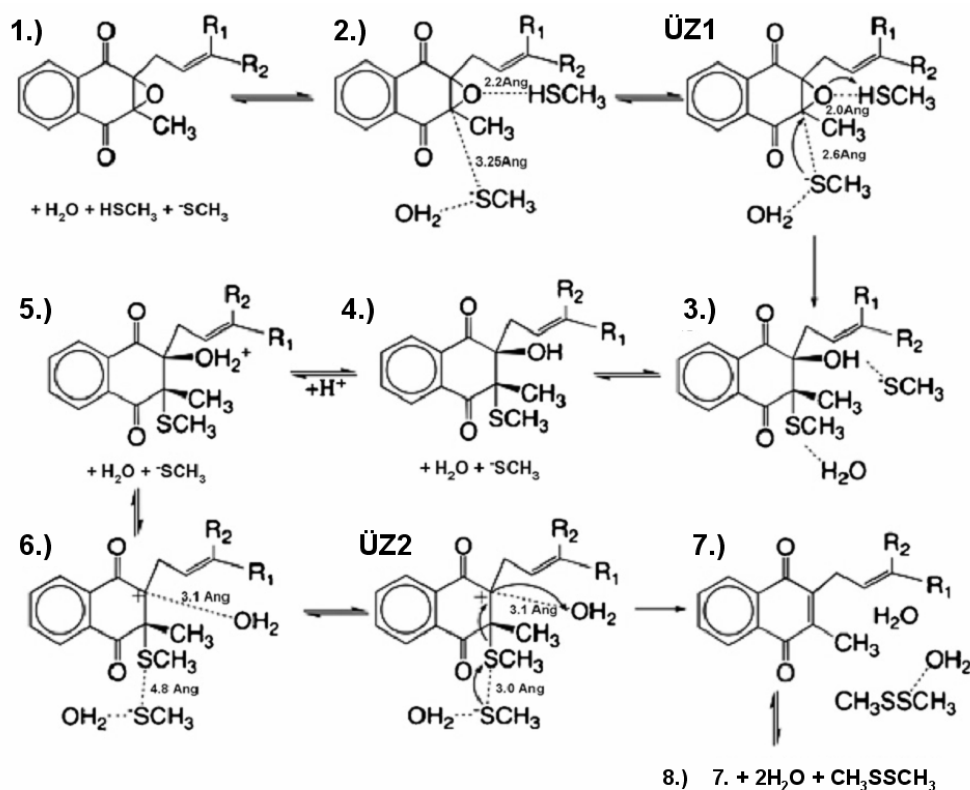


Abb. 1.8 Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für Vitamin K Epoxid Reduktase.

Das Modell umfasst acht Spezies und zwei Übergangszustände (ÜZ). Modifiziert nach Davis *et al.*, 2007

Nach dem initialen Bruch der Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten des aktiven Zentrums liegen eine protonierte und eine deprotonierte Thiolgruppe vor. Im nachfolgenden Übergangszustand interagiert die Epoxidgruppe mit dem Wasserstoff des protonierten Cysteinrestes, während die deprotonierte Cysteingruppe dem Epoxid-Kohlenstoff mit der daran befindlichen Methylgruppe nahe kommt. Es erfolgt die Bindung des deprotonierten Cysteins an das Epoxid-Kohlenstoff und ein Transfer des Protons von der Donor-Thiolgruppe auf den Epoxid-Sauerstoff. Im nun folgenden zweiten Teil des Mechanismus kommt es zur Protonierung der zuvor gebildeten Hydroxylgruppe, zur Eliminierung des dadurch gebildeten Wassermoleküls und der Translokation der nun negativ geladenen freien Thiolgruppe zu der Stelle am Vitamin

K Intermediat, an der die andere Thiolgruppe gebunden ist. Im zweiten Übergangszustand kommt es zur Interaktion der beiden Cysteingruppen miteinander und in der Folge zum Bruch der Bindung zwischen dem Vitamin K-Intermediat und der daran kovalent gebundenen Cysteingruppe. Dabei wird die ursprüngliche intramolekulare Disulfidbrücke zwischen den Thiolgruppen der Cysteine wieder hergestellt. Das gebildete Vitamin K wird aus dem aktiven Zentrum des Enzyms verdrängt und das Enzym ist für einen weiteren Reaktionszyklus bereit.

1.8 Gewinnung von Membranproteinen für strukturelle Untersuchungen

Membranproteine haben eine essentielle Bedeutung für zahlreiche physiologische Prozesse wie die molekulare Erkennung und Bindung von Liganden, in der Signaltransduktion und der Regulation des Transports von Elektronen, Ionen und anderen Substanzen durch die Zellmembran (Gordon *et al.*, 2008; Kiefer, 2003; Wu *et al.*, 2008). Ihre zentrale Rolle zeigt sich unter anderem daran, dass etwa 20-30 % eines jeden Genoms für Membranproteine kodieren und sie über 50 % aller *targets* für Medikamente darstellen (Krogh *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2006; Wallin *et al.*, 1998). So sind eine ganze Reihe schwerwiegender Erkrankungen auf die Fehlfunktion von Membranproteinen zurückzuführen, wie Cystische Fibrose, Alzheimer, Bluthochdruck, Herzversagen, Schlaganfälle und einige Arten von Tumoren (Joubert *et al.*, 2010; Mus-Veteau, 2010).

Membranproteine lassen sich in periphere Membranproteine, die mit der Oberfläche der Lipidmembran assoziiert sind und in integrale Membranproteine (IMP), von denen wenigstens ein Teil in der Membran eingebettet ist, klassifizieren. Innerhalb der Gruppe der integralen Membranproteine werden nach dem vorherrschenden Faltungstyp des integrierten Membransegments häufig noch α -helikale IMPs und β -Faltblatt-IMP unterschieden, wobei die erstere Gruppe zahlenmäßig die größte ist.

Trotz ihrer herausragenden Bedeutung sind bislang nur wenige Membranproteinstrukturen bekannt. Von den etwa 50.000 bekannten Strukturen der Protein Datenbank stammen nur ca. 309 von Membranproteinen (Stand: Dezember 2011). Die Aufklärung der Funktion und Struktur von Membranproteinen wird dabei stark durch deren eingeschränkte Verfügbarkeit limitiert (Gordon *et al.*, 2008; Grishammer *et al.*, 1995; Kiefer, 2003; Wu *et al.*, 2008). Die größten Schwierigkeiten stellt neben

oftmals geringer Expression vor allem die Stabilisierung von Membranproteinen in wässrigen Lösungen während der Reinigung und weiteren Charakterisierung dar (Carpenter *et al.*, 2008).

Integrale Membranproteine sind in ihrer nativen Umgebung in die Lipiddoppelschicht der Membran eingebettet. Diese trägt zur Stabilität des Proteins bei, indem sie es in einer geeigneten hydrophoben Umgebung hält (Opekarova *et al.*, 2003). Dabei kommt es auch zu direkten und indirekten Wechselwirkungen zwischen dem Protein und den benachbarten Lipiden der Membran. Die Zusammensetzung der Lipidmembran und deren biophysikalische Eigenschaften können daher einen maßgeblichen Einfluss auf das Protein und dessen Funktion ausüben (Bogdanov *et al.*, 1998, 1999, 2002; Lee, 2004; Tate, 2001). Die Membranumgebung von VKOR besitzt beispielsweise eine Lipidzusammensetzung wie sie für humane Lebermikrosomen in Tab. 1.1 wiedergegeben ist.

Tab. 1.1 Zusammensetzung von Membranen verschiedener Zellkompartimente

Die unterschiedliche Zusammensetzung verschiedener zellulärer Membranen ist wiedergegeben. ER: aus Waskell *et al.*, 1982; Plasmamembran, Mitochondrien und Golgi: nach van Meer *et al.*, 2008.

	humane Leber-Mikrosomen (ER)	Plasma-membran	Mitochondrien-membran	Golgi-membran
Phosphatidylcholin (PC)	49%	ca. 40%	ca. 45%	ca. 50%
Phosphatidylethanolamin (PE)	31%	ca. 25%	ca. 30%	ca. 20%
Phosphatidylserin (PS)+ Phosphoinositol (PI)	14%	ca. 15%	ca. 10%	ca. 15%
Sphingomyelin	6%	ca. 20%	ca. 5%	ca.15%
			Cardiolipin: 10%	

Um Membranproteine für die Strukturaufklärung bereitzustellen, müssen diese zunächst aus der nativen Membran solubilisiert und gereinigt werden. Hierbei ist der Einsatz von Detergenzien notwendig, die durch ihren amphiphilen Charakter die Löslichkeit in wässrigen Lösungen vermitteln können. Allerdings weisen viele Membranproteine in Detergensmizellen eine deutlich verminderte Stabilität auf (Carpenter *et al.*, 2008; Popot *et al.*, 2003).

Die Stabilisierung von integralen Membranproteinen wurde erfolgreich eingesetzt, um den β 2-adrenergen Rezeptor, den β 1-adrenergen Rezeptor und den Adenosin A_{2A} -Rezeptor strukturellen Untersuchungen zugänglich zu machen (Magnani *et al.*, 2008; Rosenbaum *et al.*, 2007; Serrano-Vega *et al.*, 2008; Abb. 1.9). In diesen Fällen wurden flexible terminale Bereiche der Proteine verkürzt oder besonders bewegliche

loop-Bereiche deletiert. Weitere Modifikationen beinhalteten im Falle des β 2-adrenergen Rezeptors die Einführung einer Lysozym-Fusion, die den flexiblen dritten intrazellulären *loop* (ICL3)-Bereich ersetzen und die Kristallisation erleichtern sollte (Cherezov *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2007). Ein anderer Ansatz mit β 2-adrenergen Rezeptor verwendete ein F_{ab} -Antikörperfragment gegen den gleichen *loop* zur Co-Kristallisation, das diesen stabilisieren sollte und Kristallkontakte zwischen den Antikörperfragmenten vermittelte (Rasmussen *et al.*, 2007). Um den β 2-Rezeptor zu stabilisieren wurde in beiden Fällen nach der Extraktion des Rezeptors mit Detergens und Reinigung durch Antikörper- und Liganden-Affinitätschromatographie der inverse Agonist Carazolol hinzu gegeben.

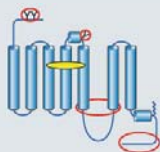
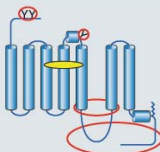
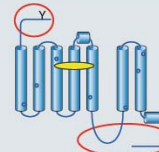
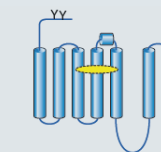
GPCR	β 2-AR-Fab	β 2-AR-T4 Lysozym A2A-T4 Lysozym	β 1-AR	Rhodopsin Opsin
Kristallisations methode	Kristallisation in DMPC-Bicellen (mit CHAPSO)	<i>in meso</i> Kristallisation in Monoolein-Lipidphasen mit Zusatz von Cholesterol	Kristallisation in Detergensemizellen aus Octylglucopyranosid	Kristallisation in Detergensemizellen aus Octylthioglucoosid
Topologie				
stabilisierender Ligand	inverser Agonist (Carazolol)	inverser Agonist (Carazolol) bzw. Antagonist (ZM241385)	Antagonist (Cyanopindolol)	mit und ohne cis-Retinal
Stabilisierung für Kristallisation	ICL3 durch F_{ab} - Fragment stabilisiert, F_{ab} vermittelt Kristallkontakte	ICL3 durch T4- Lysozym ersetzt, Lysozym vermittelt Kristallkontakte	Punktmutationen zur Verbesserung der Expression und Stabilität	natives Protein ohne Modifikationen
Sonstige Modifikationen	verkürzter C-Terminus, N-Glykosylierungsstellen modifiziert, N-terminaler Affinitätstag	verkürzter C-Terminus, verkürzter ICL3, N-Glykosylierungsstellen modifiziert, C- bzw. N-terminaler Affinitätstag	verkürzter N- und C-Terminus, verkürzter ICL3, Palmytoylierungsstelle modifiziert, C-terminaler Affinitätstag	keine Modifikationen

Abb. 1.9 Vergleich von GPCR-Konstrukten für die Strukturaufklärung.

In vielen Fällen war eine Deletion oder Modifikation von flexiblen Bereichen der Proteine bzw. die Beseitigung von Glykosylierungsstellen notwendig (rote Ellipsen), um Rezeptoren für die Kristallisation verfügbar zu machen. Eine zusätzliche Stabilisierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von spezifischen Liganden (gelbe Ellipsen). Für den β 1-adrenergen Rezeptor wurde eine Reihe von Punktmutationen eingeführt, um eine stabilere Variante des Rezeptors zu erhalten (blaue Kreise). Modifiziert nach Rosenbaum *et al.*, 2009

Ein sehr aufwändiges Mutagenesescreeing führte im Falle des β 1-adrenergen Rezeptors zur Generierung einer stabileren Variante des Proteins in einer inaktiven Konformation, welche die Kristallisation des Rezeptors in Gegenwart eines Antagonisten ermöglichte (Warne *et al.*, 2008). Auch im Falle des Adenosin A_{2A} -Rezeptors wurde der C-Terminus verkürzt und der dritte intrazelluläre *loop* durch T4-Lysozym ersetzt, um den Rezeptor zu stabilisieren. Die gesamte Reinigung erfolgte in Gegenwart von NaCl, Cholesterol und hoher Konzentrationen von Theophyllin, welches vor der Kristallisation des Rezeptors gegen einen hochspezifischen Antagonisten ausgetauscht wurde (Jaakola *et al.*, 2008).

Während der β 1-adrenerge Rezeptor in Detergensmizellen kristallisiert wurde, war bei allen anderen Proteinen der Zusatz von Lipiden für die Kristallisation notwendig. Eine der beiden Strukturen des β 2-adrenergen Rezeptors wurde in DMPC-Bicellen erhalten, während die übrigen Strukturen *in meso* in kubischen Lipidphasen bestehend aus Monoolein und zugesetztem Cholesterol kristallisiert wurden.

1.9 Rekombinante Expression von Membranproteinen

Häufig stellt bereits die Proteinexpression von Membranproteinen eines der größten Hindernisse zu deren Charakterisierung dar. So wurden einige abundant vorkommende Membranproteine aus natürlichen Quellen gewonnen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das bovine Rhodopsin, welches aus der Retina von Rinderaugen gewonnen werden kann (Palczewski *et al.*, 2000). Nur in seltenen Fällen werden Membranproteine jedoch in diesen Ausmaßen in Geweben exprimiert. Oftmals stellt die rekombinante Überexpression in geeigneten Systemen die einzige Alternative dar, um ausreichende Mengen Protein für dessen Charakterisierung zu erhalten (Tate, 2001; siehe Tab. 1.2). Die Produktion des Proteins in einem heterologen System ist dabei oft mit einer Vielzahl weiterer Probleme verbunden, da die Proteine oftmals nur in sehr geringen Mengen produziert werden oder toxisch auf den Wirtsorganismus wirken (Junge *et al.*, 2008; Kiefer, 2003).

Bakterielle Expressionssysteme besitzen den großen Vorteil hoher Reproduktionsraten von Bakterienzellen, geringer Kosten und der Produktion des Zielproteins in großen Mengen. Die Einfachheit des Systems macht es möglich eine Vielzahl von verschiedenen Konstrukten in kurzer Zeit zu testen und die Expression des Systems auf diese Art zu optimieren (Tucker *et al.*, 1996). Somit wäre der Einsatz bakterieller

Expressionssysteme eine gute Option, um Membranproteine in adäquaten Mengen für strukturelle Untersuchungen zu gewinnen.

Das Fehlen von Systemen, die essentielle posttranslationale Modifikationen am exprimierten Protein vornehmen können, oder die Produktion des Proteins in unlöslicher Form (*inclusion bodies*) sind jedoch Nachteile bakterieller Systeme. Auch die Möglichkeit strukturell wichtige Disulfidbrücken korrekt auszubilden ist im bakteriellen Expressionssystem limitiert, kann aber durch das Verwenden von speziellen Stämmen wie z. B. *E. coli* Origami (DE3) oder von Fusionen des Zielproteins mit periplasmatischen Proteinen z.B. Maltose-Bindeprotein (MBP) teilweise kompensiert werden. Beispiele für erfolgreich exprimierte MBP-Fusionen von GPCRs sind der Cannabinoid CB2-Rezeptor (Yeliseev *et al.*, 2005), der Neurotensin-Rezeptor (White *et al.*, 2004) und der Adenosin-A_{2A} Rezeptor (Weiss *et al.*, 2002), die in signifikanten Mengen erhalten werden konnten.

Ein weiterer problematischer Punkt ist die Zusammensetzung der Lipidmembranen in bakteriellen Wirten. Diese weist große Unterschiede (geringer Cholesterolgehalt, wenig Sphingolipide, keine mehrfach ungesättigten Lipide) zu eukaryotischen Membranen auf und kann daher die Eigenschaften und Funktionalität des integrierten Membranproteins negativ beeinflussen. Für die Bindungseigenschaften des Oxytocin- (Gimpl *et al.*, 1995, 1997), Transferrin- (Nunez *et al.*, 1982) und des humanen μ -Opioid-Rezeptors (Hasegawa *et al.*, 1987) konnte ein solcher Einfluss bereits gezeigt werden.

Tab. 1.2 Vergleich verschiedener Expressionssysteme

	Prokaryoten		Eukaryoten		zellfreie Expression
	<i>E. coli</i>	Hefen	Insektenzellen	Säugerzellen	
Expressionsquantität	sehr hoch	hoch	niedrig-mittel	niedrig	niedrig-mittel
Komplexität des Kulturmediums	niedrig	niedrig	hoch	hoch	hoch
Zellwachstum	sehr hoch	hoch	niedrig	niedrig	-
posttranslationale Modifikationen	keine	Phosphorylierung, Acetylierung, Acylierung, O-Glykosylierung, einfache N-Glykosylierung (Mannosereich)	Phosphorylierung, Acetylierung, Acylierung, O-Glykosylierung, komplexe N-Glykosylierung (keine Sialinsäure)	Phosphorylierung, Acetylierung, Acylierung, O-Glykosylierung, komplexe N-Glykosylierung	Modifikationen begrenzt möglich (abhängig von Zellextrakt)

Eine gebräuchliche Strategie, sich die Vorteile bakterieller Expressionssysteme zunutze zu machen und die genannten Nachteile zu umgehen, stellt die Expression homologer Proteine aus *E. coli* und anderen bakteriellen Wirten dar. Etwa 78 % aller

gegenwärtig bekannten Strukturen von Membranproteinen stammen aus Prokaryoten (Carpenter *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010).

Für die Überexpression eukaryotischer Proteine wurden bislang überwiegend Hefen oder Insektenzellen als Expressionssysteme genutzt. Neben der schwierigeren Handhabung haben diese Systeme vor allem den Nachteil, dass oft nur geringe Proteinausbeuten erzielt werden können (siehe Tab. 1.2). Daher besteht der Bedarf, Methoden zu entwickeln, die höhere Proteinausbeuten in diesen Systemen oder die Produktion eukaryotischer Proteine in bakteriellen Systemen ermöglichen. Für die Verwendung von bakteriellen Expressionssystemen sind zum einen die Expression und der nachfolgende Einbau des Membranproteins in die bakterielle Zellmembran möglich als auch die Expression des Proteins in unlöslicher Form innerhalb der Bakterienzelle.

Die Expression in *inclusion bodies* (Einschlusskörpern) stellt hierbei eine alternative Strategie dar, mit der große Mengen Protein produziert und einige der genannten Probleme umgangen werden können (Junge *et al.*, 2008; Kiefer, 2003; McCusker *et al.*, 2007). Das erhaltene Protein wirkt weniger toxisch, lässt sich leicht isolieren und ist weniger empfänglich für proteolytischen Abbau. Das in *inclusion bodies* akkumulierte Protein ist jedoch inaktiv und erfordert die Rückfaltung in eine funktionelle Konformation.

1.10 *In vitro* - Renaturierung von Proteinen

Für Proteine, die sich nicht in ihrer nativen Form exprimieren lassen oder deren Renaturierung etabliert ist, stellt die Produktion in *inclusion bodies* (IBs, Einschlusskörpern) oft eine geeignete Alternative dar, um große Mengen des rekombinanten Proteins zu erhalten. Die Expression von sehr hydrophoben Proteinen oder von Proteinen, die in ihrer nativen Struktur Disulfidbrücken aufweisen, führt oft zur Deponierung des rekombinanten Proteins in *inclusion bodies* (Lilie *et al.*, 1998).

Während für viele cytosolische Proteine die *in vitro* - Renaturierung heutzutage ein etablierter Prozess ist, bleibt die Entwicklung von Verfahren zur Renaturierung von Membranproteinen eine herausfordernde Aufgabe (Booth *et al.*, 2006). Aufgrund der Tatsache, dass in der nativen Proteinstruktur hydrophobe Bereiche exponiert sind, haben selbst nativ gefaltete Membranproteine eine Tendenz zur Aggregation

während der *in vitro* - Renaturierung. Dass die Etablierung von Renaturierungsprotokollen für Membranproteine nicht trivial ist, drückt sich in der sehr geringen Zahl rückgefalteter Membranproteine aus. So wurden innerhalb der letzten 15 Jahre nur etwa zehn eukaryotische Membranproteine zurückgefaltet, die in großen Mengen in *E. coli* produziert wurden, darunter der BLT1-Rezeptor (Baneres *et al.*, 2003a, 2003b), 5-HT₄-Rezeptor (Baneres *et al.*, 2005), Neurotensin-Rezeptor (Kiefer *et al.*, 1996), NPY-Rezeptor (Schmidt *et al.*, 2009), ein Desoxynukleotid-Transporter (Dolce *et al.*, 2001), ein Glutamat-Transporter (Fiermonte *et al.*, 2002), sowie Toc75 und LHC2 (Rogl *et al.*, 1998). Die Renaturierung des humanen β -barrel-Membranproteins VDAC-1 erlaubte sogar die Gewinnung ausreichender Mengen für die Aufklärung von NMR-Strukturen (Hiller *et al.*, 2008). Für prokaryotische Membranproteine ist vor allem die *in vitro* - Renaturierung von integralen Membranproteinen mit β -barrel-Struktur mittlerweile ein etablierter Prozess (Bannwarth *et al.*, 2003).

Um die Renaturierung eines Proteins zu ermöglichen, muss nach der Isolierung der Einschlusskörper und deren Solubilisierung mit Hilfe starker Denaturantien die Konzentration des Denaturants durch Verdünnen oder Dialyse stark abgesenkt werden (Lilie *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 1996). Da Guanidinium und Harnstoff zumeist nicht in der Lage sind, helikale Membranproteine vollständig zu denaturieren (Chen *et al.*, 1999; Zardeneta *et al.*, 1994), müssen in diesem Schritt denaturierende Detergenzien wie z.B. Natriumdodecylsulfat (SDS) für die Solubilisierung eingesetzt werden, die später durch nicht-denaturierende Detergenzien ersetzt werden, um eine Faltung in eine native Proteinkonformation zu erlauben.

Die Effizienz der Renaturierung wird durch den konkurrierenden Einfluss von korrekter Faltung und Aggregation bestimmt (De Bernardez Clark *et al.*, 1998; Kiefhaber *et al.*, 1991). Da die Proteinaggregation eine Reaktion zweiter oder höherer Ordnung ist, während die Renaturierung des Proteins eine Reaktion erster Ordnung darstellt, wird durch den Einsatz von hohen Konzentrationen ungefalteten Proteins die Aggregation begünstigt. Daher stellt die Zugabe des denaturierten Proteins in mehreren Pulsen in eine stark verdünnte Lösung eine Möglichkeit dar, um den Anteil von ungefaltetem Protein während der Renaturierung niedrig zu halten und die Faltungsausbeute zu erhöhen (Nguyen *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 2002). Diese Pulsrenaturierung lässt sich mit einem Verfahren kombinieren, das als *artificial chaperone system* bezeichnet wird (Rozema *et al.*, 1996; siehe Abb. 2.2, S.42). Dabei bindet zunächst das denaturierende Detergens an ungefaltete hydrophobe

Bereiche des Proteins und unterbindet sowohl Aggregation als auch Faltung des Proteins. Im nachfolgenden Schritt wird Cyclodextrin hinzu gegeben, welches Detergensmoleküle in seiner hydrophoben Kavität binden kann. Auf diese Weise wird das denaturierende Detergens sukzessive vom Protein abgezogen und erlaubt dessen Faltung in die native Struktur. Zur weiteren Stabilisierung des Membranproteins in der wässrigen Umgebung werden gleichzeitig milde, nicht-denaturierende Detergenzien oder Lipide eingesetzt.

Neben der Kontrolle von Temperatur, pH-Wert und Redoxbedingungen des Puffers können auch einige Additive einen günstigen Effekt auf die Renaturierung ausüben (Lilie *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 1996). So können nicht-denaturierende Konzentrationen von Chaotropen eingesetzt werden, um Faltungsintermediate und denaturiertes Protein in Lösung zu stabilisieren und die Kinetik der Renaturierung zu verlangsamen (Orsini *et al.*, 1978). Zucker, Polyalkohole (z.B. 20 % Glycerol) und andere Osmolyte stabilisieren den nativen Zustand des Proteins (Bolen *et al.*, 2001). Das gebräuchlichste Additiv ist jedoch die Aminosäure L-Arginin in Konzentrationen zwischen 0,4 M und 1,2 M (Arora *et al.*, 1996; Brinkmann *et al.*, 1992; Oneda *et al.*, 1999). Wie Guanidinium stabilisiert es ungefaltete Peptide und Intermediate durch eine Erhöhung der Solubilität (Reddy *et al.*, 2005), übt jedoch keinen Effekt auf die thermodynamische Stabilität des nativ gefalteten Proteins aus. Die *gap effect* - Theorie (Baynes *et al.*, 2005) beschreibt die Wirkung von L-Arginin als *neutral crowder*, einer Substanz die in hohen Konzentrationen selektiv die freie Energie von Protein-Protein-Komplexen erhöht, aber keinen Einfluss auf die Renaturierungsreaktion hat.

In Proteinen mit Disulfidbrücken kann deren Ausbildung durch den Zusatz eines Redoxsystems zum Renaturierungspuffer, bestehend aus reduzierten und oxidierten Formen von niedermolekularen Thiolverbindungen wie Glutathion, Cystein oder Cysteamin ermöglicht werden (Rudolph *et al.*, 1996; Wetlaufer *et al.*, 1987). Da die native Konformation des Proteins thermodynamisch begünstigt ist, wird die korrekte Disulfidverbrückung stabilisiert, während inkorrekte Cystinbindungen aufgebrochen werden und eine weitere Faltung des Proteins zur nativen Form erfolgen kann.

1.11 Ziele der Arbeit

Das humane Enzym Vitamin K Epoxid Reduktase (VKOR) katalysiert die schrittweise Umsetzung von Vitamin K Epoxid zu Vitamin K Hydrochinon, einem essentiellen Cofaktor für die γ -Carboxylierung von spezifischen Glutamatresten in Vitamin-K-abhängigen Proteinen, zu denen u.a. eine Reihe von Blutgerinnungsfaktoren gehören. Aufgrund seiner zentralen Rolle stellt VKOR ein attraktives Ziel für die Inhibierung durch Coumarin-basierte Substanzen dar, die seit langem als Antikoagulantien in der medizinischen Praxis eingesetzt werden. Die strukturelle Charakterisierung der Interaktion von VKOR mit Substraten bzw. Inhibitoren steht jedoch noch am Anfang und benötigt große Mengen gereinigten Proteins.

Die Identifikation des Gens ermöglichte die rekombinante Produktion des humanen Proteins sowie die Durchführung erster Mutationsstudien. Mit dem bisher etablierten Verfahren, humanes VKOR in Sf9-Insektenzellen zu exprimieren und aus deren mikrosomalen Membranen zu solubilisieren und zu reinigen, war es bislang jedoch nicht möglich, Protein in ausreichender Homogenität und in genügenden Mengen bereitzustellen. Daher besteht die Notwendigkeit neue Systeme zu entwickeln, die die Voraussetzungen für biochemische und strukturelle Studien mit dem humanen Enzym schaffen können.

Eine vielversprechende Strategie für die Gewinnung des Membranproteins stellt die Expression in bakteriellen Expressionssystemen in Form von *inclusion bodies* und die anschließende Reinigung und Renaturierung des Proteins dar. Mit diesem Verfahren konnten kürzlich erfolgreich große Mengen von funktionalem NPY-Rezeptor (Schmidt *et al.*, 2009) und vom PTH-Rezeptor (Oschman, 2008) produziert werden. Auch andere GPCRs ließen sich bereits in Form von *inclusion bodies* in großen Mengen gewinnen (Baneres *et al.*, 2005; Michalke *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher basierend auf dieser Strategie ein System entwickelt werden, mit dem natives VKOR in adäquaten Mengen für dessen biochemische, biophysikalische und strukturelle Charakterisierung bereitgestellt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in der Reinheitsstufe p.A. von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Biozym (Oldendorf), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Medien, Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden die mit den Enzymen gelieferten bzw. die im Kit enthaltenen Puffer eingesetzt. Die Standardpuffer und –medien wurden laut Sambrook *et al.* (1989) angesetzt. Der pH-Wert der Medien wurde mit NaOH bzw. HCl vor dem Autoklavieren (Dampfsterilisation bei 120 °C) auf pH 7,5 eingestellt. Zusätze, die nicht hitzestabil sind, wurden im Anschluss dazu gegeben.

LB-Agar	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) Agar-Agar
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl
TB-Medium	1,2 % (w/v) Trypton, 2,4 % (w/v) Hefeextrakt, 4 % Glycerol (v/v), 10 mM K ₂ HPO ₄ , 10 mM KH ₂ PO ₄
SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose
Hefeextrakt-Medium: (für Fermentation)	5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Glukose, 0,05 % (w/v) NH ₄ Cl, 0,068 % (w/v) MgSO ₄ , 1,1 % (w/v) KH ₂ PO ₄
Glukose-feeding-Lösung: (für Fermentation)	30 % (w/v) Hefeextrakt (Dt. Hefewerk, Hamburg), 12,5 % (w/v) Glukose (KMF Laborchemie)

Fairbanks A	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue 250G
Fairbanks B	10 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue 250G
Fairbanks C	10 % (v/v) Essigsäure, 0,002 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue 250G
Fairbanks D	10 % (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz- Färbelösung	0,1 % (w/v) Amidoschwarz, 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz- Entfärbelösung	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure
PBS-Puffer	10 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , 150mM NaCl, pH 7,2
PBST-Puffer	0,02% (v/v) Tween in PBS-Puffer
Blockierungslösung	4% (w/v) Magermilchpulver in PBST-Puffer
ECL-Lösung A	100 µl 250 mM Luminol (in DMSO), 44 µl 90 mM Coumarsäure (in DMSO), 1 ml 1 M TrisHCl, pH 8,5 ad 10 ml ddH ₂ O
ECL-Lösung B	6,4 µl 30 % (v/v) Wasserstoffperoxid 1 ml 1 M TrisHCl, pH 8,5 ad 10 ml ddH ₂ O
ECL-Substratlösung	1 ml ECL-Lösung A, 1 ml ECL-Lösung B
10x PCR-Puffer	200 mM Tris/HCl, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM KCl, 20 mM MgSO ₄ , 1 % (v/v) Triton X-100

TAE-Puffer	40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3
5x DNA-Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau in 1x TAE Puffer
10x Lämmli-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, 200 mM Glycin, 0,3 mM SDS, pH 8,9
SDS-Sammelgelpuffer 5x	0,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer 5x	1,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8
6% PAGE-Sammelgel (für 3 Gele)	1,2 ml 30 % Polyacrylamid/0,8 % Methylenbisacrylamid, 1,5 ml SDS-Sammelgelpuffer, 3,3 ml Wasser, 25 µl 10 % APS-Lösung, 7 µl TEMED
15% PAGE-Trenngel (für 3 Gele)	5 ml 30 % Polyacrylamid/0,8 % Methylenbisacrylamid, 2,5 ml SDS-Trenngelpuffer SDS-PAGE; 2,5 ml Wasser, 35 µl 10 % APS-Lösung, 7 µl TEMED
3 x SDS-Probenpuffer (reduzierend)	175 mM Tris/HCl, 6 % (w/v) Glycerin , 5 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) β-Mercaptoethanol, 0,0125 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
Aufschlusspuffer	50 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff, 15 mM SDS, pH 7,5
IB I-Puffer	0,1 M Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 7,0
IB II-Puffer	0,1 M Tris/HCl, 60 mM EDTA, 1,5 M NaCl
IB III-Puffer	0,1 M Tris/HCl, 20 mM EDTA
Solubilisierungspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , 15 mM SDS, 50 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8,0
IMAC-Auftragungspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , 15 mM SDS, pH 8,0
IMAC-Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , 15 mM SDS, pH 4,4

Rückfaltungspuffer	25 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 M L-Arginin-HCl, 0,1 % (w/v) DDM, 0,1 % (w/v) CHAPS, 25 mM Methyl-β-Cyclodextrin, 1 mM EDTA, pH 8,0
Rekonstitutionspuffer	25 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, pH 8,3
VKOR-Assaypuffer	25 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, 30 % Glycerol, pH 8,3
HEK-VKOR-Assaypuffer	25 mM Imidazol, 0,5% CHAPS, pH 8,3

2.3 Verwendete Plasmide und Bakterienstämme

Plasmid	Resistenz	Restriktionsstellen	Referenz/Bezugsquelle
pET11	Amp	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	Novagen
pET15b	Amp	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	Novagen
pET19b	Amp	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	Novagen
pET31b	Amp	<i>Xho</i> I	Novagen
pTCLE	Amp	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI	siehe Staley <i>et al.</i> , 1994
pBCL99	Amp	<i>Afl</i> III/ <i>Xho</i> I	siehe Thai <i>et al.</i> , 2005
pBCL173	Amp	<i>Afl</i> III/ <i>Xho</i> I	siehe Thai <i>et al.</i> 2005
pCEP4	Hyg	<i>Hind</i> III/ <i>Not</i> I	Invitrogen

Das Plasmid pCEP4-VKOR wurde freundlicherweise von Prof. Dr. J. Oldenburg (Uniklinik Bonn) zur Verfügung gestellt. Es basiert auf dem kommerziell erhältlichen pCEP4-Plasmid von Invitrogen.

<i>E. coli</i> TOP10 (Invitrogen)	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBBC</i>), Φ80/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>
<i>E. coli</i> XL1 blue (Stratagene)	<i>rec A1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , [F' <i>proAB lacI_qΔM15 Tn 10 Tet^R</i>]
<i>E. coli</i> BL21(DE3) (Novagen)	B, F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (<i>r_B-m_B</i> -), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta	B, F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (<i>r_B-m_B</i> -), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), pRARE (Cam ^R)

2.4 Enzyme und Molekulargewichtstandards

Benzonase	Sigma
Pfu-DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
100 bp/1 kbp DNA-Mol.-gewichtstandards	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
Broadrange Protein-Standard	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
LMW Protein-Molekulargewichtstandard	Amersham Biosciences (Freiburg)

2.5 Verwendete Kits

Qiagen Plasmid Mini Kit, Qiagen (Hilden)
 Qiagen Plasmid Midi Kit, Qiagen (Hilden)
 QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen (Hilden)
 QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen (Hilden)
 QIAquick Minelute Gel Extraction Kit, Qiagen (Hilden)

2.6 Oligonukleotide

Nukleotide, die während der jeweiligen Mutagenese geändert oder eingefügt wurden, sind farbig hervorgehoben.

mut-DP-pET31 forward

5'- CAC GCA TGC CAG ATG CTG **GAT CCG** CTC GAG ATG GGT AGC ACC-3'

mut-DP-pET31 reverse

5' – GGT GCT ACC CAT CTC GAG **CGG ATC** CAG CAT CTG GCA TGC GTG -3'

mut-DL-pet31 forward

5'- GA TGA CGC CAC GGT GGA AGA **TCT** CGT GGG TTC CGA GCC CAG - 3'

mut-DL-pet31 reverse

5'- CTG GGC TCG GAA CCC ACG AGA **TCT** TCC ACC GTG GCG TCA TC - 3'

mut-pCEP-VKOR forward

5'PHOS-**CAC CAC CAC CAC** TGA GCC CTG AAT TCT GCA GAT ATC CAT CAC -3'

mut-pCEP-VKOR reverse

5'PHOS- **GTG GTG CTC GAG** GTG CCT CTT AGC CTT GCC CTG GGG TTC -3'

2.7 Geräte

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
Bioreaktor	Biostat C-DCU	B. Braun Biotech International
Blot Apparatur	Hoefer Semi-Phor TE-70	Pharmacia Biotech
CD Spektropolarimeter	J-810	Jasco
Elektrophoresekammer	Hoefer SE260	Amersham
	Easy Cast	Owl
Extruder		
Flow Box	Hera Safe	Heraeus
Fluorimeter	Fluoromax-2	Jobin Yvon Spex
FPLC	Äkta FPLC	GE Healthcare
French Press	Gaulin Homogenisator	APV Schröder
	LAB 60/60 bzw.	
	Micro LAB 40/60	
Heizblock	Block Heater	Stuart Scientific
HPLC	Probengeber Gina50	Gynkotek
	Pumpe Model P580A LPG	
	Detektor UVD 170S oder 340S	
Inkubator	TH30	Edmund Bühler
Massenspektrometer	ESI-Q-TOF 2	Waters
	Ultraflex-II TOF/TOF	Bruker Daltonics
Membran- Vakuumpumpe	MZ-2C	vacuubrand
Mikroskop	KL1500 LCD 10447158	Leica
Mixer	Vortex-2 Genie	Scientific Industries
PCR Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
	MyCycler thermal cycler	BioRad
pH-Meter	pH 526	WTW
Power Supply	EPS 300	Pharmacia Biotech
	Consort E835	Consort
Rotationsverdampfer	Laborota 4010	Heidolph
SpeedVac	RCT 60	Jouan
SpeedVac	SpeedVac Plus SC110A	Savant
Spektrophotometer	Ultrospec 4000	Pharmacia Biotech
	Nano Drop ND-1000	Kisker
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultra-Turrax	T25	Janke & Kunkel
		IKALabortechnik
UV/VIS	Ultrospec 3300 pro	Amersham Biosciences
UV-Handlampe	NU-4 KL	Benda
UV-Illuminator	UVT-20M	Herolab
Waagen	TE3102S bzw.	Sartorius
	BP4100S	Sartorius
	Analytical plus	Ohaus
Wasserbad	Julabo C-5B	Julabo
Zetasizer (DLS)	Nano-S	Malvern
Zentrifugen	Biofuge pico	Heraeus
	Universal 32R	Hettich Zentrifugen
	Sigma 1-14	Sartorius
	Avanti J-20 bzw. J-25	Beckman Coulter Inc.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde die Absorption einer Probe mit einem Volumen von 2 µl bei 260 nm durch Verwendung des NanoDrop-Spektrophotometers nach Angaben des Herstellers bestimmt.

Alternativ dazu erfolgte die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration photometrisch durch Bestimmung der Absorption einer DNA-Lösung in einer

geeigneten Verdünnung bei 260 nm ($A_{260\text{nm}}$). Zur Berechnung der DNA-Konzentration dienten folgenden Formeln:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} * V * 50$$

$$\text{Konzentration } [\mu\text{mol/ml}] = A_{260\text{nm}} * V * 1000 / (15 * A + 7,1 * C + 12 * G + 8,4 * T)$$

V = Verdünnungsfaktor

2.8.2 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

2.8.2.1 Herstellung chemokompetenter Zellen

250 ml LB- Medium wurden mit mehreren Einzelkolonien *E. coli* TOP10 angeimpft und bei Raumtemperatur bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{260\text{nm}} = 0,6$) unter Schütteln inkubiert (200 rpm). Die Zellen wurden 10 min auf Eis gehalten und durch Zentrifugation (4 °C, 4000 rpm, 15 min) gesammelt. Die Zellen wurden in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 Minuten auf Eis gehalten und erneut zentrifugiert. Die Bakterien wurden anschließend in 19,6 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und der Suspension DMSO (Endkonzentration 7 % (v/v)) zugegeben. Nach weiterer Inkubation für 10 Minuten auf Eis wurde die Zellsuspension aliquotiert (100 µl), in flüssigem Stickstoff (-180 °C) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.8.2.2 Transformation

Zur Transformation chemokompetenter Zellen wurde 1 µl (ca. 20 ng) einer Plasmidlösung bzw. 6-10 µl eines Ligationsansatzes mit frisch aufgetauten, kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen gemischt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension für 90 Sekunden einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen und danach für zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurde der Ansatz für 45 Minuten bei 37 °C unter Schütteln (600 rpm) inkubiert. 200 µl dieser Zellsuspension wurden auf eine LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der Transformation wurde eine Negativkontrolle mit untransformierten Zellen mitgeführt.

2.8.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmidpräparation erfolgte mittels QIAquick® Spin Miniprep Kits. Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden 5 ml LB-Medium (supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin) mit 5 µl der transformierten *E. coli*-Zellen bzw. einem Klon angeimpft und im Schüttelinkubator über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 10000 rpm. Das Zellpellet wurde entsprechend der Angaben des Herstellers weiterbehandelt. Dabei wurden die im Kit enthaltenen Puffer genutzt.

2.8.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

2.8.4.1 Standard-PCR

DNA wurde mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1985) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl amplifiziert (25-35 Zyklen: Denaturierung 0,5-1 min bei 96 °C, Anlagerung der Oligonukleotide 1-2 min bei 52-64 °C, Elongation bei 72 °C - je nach Länge der amplifizierten DNA-Sequenz). Ein Reaktionsansatz enthielt 1x PCR-Puffer, je 160 µM dNTP, 400 nM von jedem Oligonukleotid und 5 Einheiten *Pfu*- bzw. *Taq*- DNA-Polymerase. Alle Reaktionen begannen mit einer initialen Denaturierungsphase (3 min bei 96 °C) und wurden in einem PCR-Gerät mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Die jeweilige Schmelztemperatur der Oligonukleotide wurde nach Sambrook *et al.* (1989) berechnet.

2.8.4.2 Kolonie-PCR

Eine *E. coli*-Kolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher von der Agar-Platte in 30 µl ddH₂O überführt und zur Lyse der Zellen für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Von dem Zellaufschluss wurden 5 µl in einer PCR mit 50 µl Volumen eingesetzt.

2.8.5 Trennung von DNA mittels Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurden PCR-Produkte (Kapitel 2.8.4) und Produkte aus Restriktionsanalysen (Kapitel 2.8.6) auf ihr Molekulargewicht hin untersucht. Als Laufpuffer diente 1x TAE Puffer. Die Proben wurden in 1x DNA-Probenpuffer aufgenommen und neben einem geeigneten DNA-Molekulargewichtsstandard auf das Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte je nach

erwarteter Größe der DNA-Fragmente in Agarosegelen mit Konzentrationen zwischen 1 % und 3 % (w/v). Die Gele enthielten Ethidiumbromid (0,5 µg/ml), was eine anschließende Detektion der DNA-Banden im UV-Licht (302 nm) ermöglichte.

2.8.6 Restriktion von Plasmid-DNA

Mit einem Teil der präparierten Plasmid-DNA (500 ng) wurde jeweils ein Restriktionsverdau durchgeführt, um die Identität des Vektors bzw. eine erfolgreiche Insertion der VKOR-Nukleotidsequenz in den Zielvektor zu testen. Dafür wurden einem Restriktionsansatz von 15 µl zwei Restriktionsenzyme zugegeben (jeweils 5 Einheiten), die zur Entstehung von DNA-Fragmenten mit charakteristischer Größe bzw. zur Freisetzung des VKOR-DNA-Fragments führten. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert und enthielt neben dem entsprechenden 1x Restriktionspuffer (vom Hersteller mitgeliefert) außerdem noch 10 µg BSA.

Durch Plasmidpräparation erhaltene DNA bzw. durch PCR amplifizierte VKOR-Gen-Konstrukte wurden für präparative Zwecke in 50 µl-Ansätzen mit dem jeweils für die Enzyme geeigneten 1x Restriktionspuffer des Herstellers und 40 Einheiten des jeweiligen Enzyms verdaut. Der Ansatz enthielt außerdem 30 µg BSA und wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert.

Um eine Religation des geschnittenen pET-Vektors zu verhindern, wurde dieser anschließend dephosphoryliert. Dazu wurden dem präparativen Restriktionsverdau 10 Einheiten Alkalische Phosphatase hinzugegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert.

2.8.7 Reinigung von DNA-Fragmenten

Nach der Restriktionsspaltung wurden die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Extraktion aus dem Agarosegel gereinigt. Dazu wurden die DNA-Fragmente mit einer UV-Handlampe sichtbar gemacht und das gewünschte Produkt ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAquick® Gel Extraktion Kit nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 30 µl ddH₂O von der Säule eluiert. Die DNA-Konzentration wurde durch Intensitätsvergleich der Bande im Agarosegel mit fünf verschiedenen Mengen eines geeigneten DNA-Molekulargewichtsstandards abgeschätzt.

2.8.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch Restriktion erhaltene DNA-Fragmente (Kapitel 2.8.6 und 2.8.7) wurden durch Ligation in den entsprechenden Vektor kloniert. Dabei wurde der Vektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen behandelt wie die gewünschte *insert*-DNA. Ca. 10 ng Vektor-DNA wurden mit dem zu klonierenden DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1 : 4 bei 16 °C für 16 h inkubiert. Die Ligation erfolgte in 20 µl 1x T4-DNA-Ligationspuffer mit 400 Einheiten T4-DNA-Ligase. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden anschließend mit 5 µl des Ligationsansatzes transformiert.

2.8.9 Ortsgerichtete Mutagenese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Plasmide pET31-VKOR (*Quickchange*-Verfahren) und pCEP4-VKOR (modifiziertes GeneTailor™-Verfahren; Abb. 2.1) mittels zweier unterschiedlicher Techniken der ortsgerichteten Mutagenese modifiziert.

Bei dem *Quickchange*-Verfahren (Weiner *et al.*, 1994) werden zwei komplementäre Oligonukleotide eingesetzt, welche die gewünschte Mutation in der Mitte tragen und mit mindestens 12 Basen des Ausgangsplasmids auf beiden Seiten des mutierten Bereichs paaren können. Damit wurde eine PCR (Kapitel 2.8.4) mit *Pfu*-Polymerase bei 12 Minuten Elongationszeit und 18 Zyklen durchgeführt, bei der 2 µM von jedem Oligonukleotid sowie 25 bis 100 ng Ausgangsplasmid eingesetzt wurden. Nach der PCR-Reaktion wurde jedem Ansatz 1 µl *DpnI* zugesetzt und 2 h inkubiert, um das Ausgangsplasmid zu verdauen. Anschließend wurden *E. coli* XL1 blue-Zellen mit 8 µl aus dem Mutagenese-Ansatz transformiert. Bei der Mutagenese wurde stets versucht, mit der Mutation eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle in das Plasmid einzubringen, die eine schnelle Analyse auf erfolgreich mutierte Klone erlaubt. Die erfolgreiche Mutation wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

Während mit dem *Quickchange*-Verfahren bis zu 6 Nukleotide mutiert bzw. eingefügt werden können, erlaubt das zweite Verfahren das Einbringen von noch größeren mutierten Bereichen. Dabei wurden zwei Oligonukleotide eingesetzt, auf welche die einzubringende Mutation aufgeteilt wird, so dass diese Oligonukleotide jeweils an ihrem 5'-Ende einen Teil der Mutation tragen. Zudem sind diese Oligonukleotide an ihrem 5'-Ende phosphoryliert, während der 3'-Bereich komplementär zum Ausgangsplasmid ist. Damit wurde eine Standard-PCR (Kapitel 2.8.4) mit *Pfu*-Polymerase bei

24 Minuten Elongationszeit und 30 Zyklen durchgeführt, in deren Verlauf ein linearisiertes PCR-Produkt entsteht, das neben der ursprünglichen Plasmidsequenz die komplette Mutation aufgeteilt auf das 5'-Ende und das 3'-Ende trägt (siehe Abb. 2.1). Anschließend wurde wie oben beschrieben ein *DpnI*-Verdau zur Restriktion der methylierten DNA des Originalplasmids durchgeführt und die PCR-Produkte über Nacht bei 16 °C ligiert, bevor *E. coli* TOP10-Zellen mit 8 µl des Mutageneseansatzes transformiert wurden (Kapitel 2.8.2 und 2.8.8).

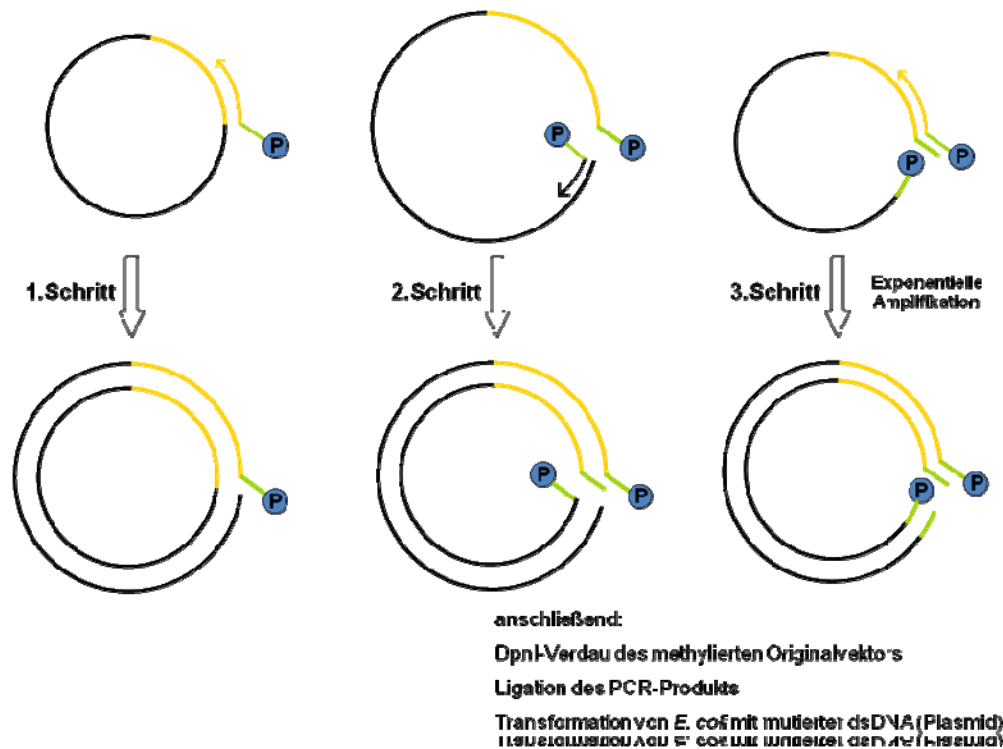


Abb. 2.1 Modifiziertes GeneTailor™-Verfahren für die ortsgerichtete Mutagenese größerer Sequenzbereiche.

Im ersten Schritt erfolgt die Amplifikation mit einem der Primer, so dass ein Oligonukleotid mit der zum ursprünglichen Plasmid komplementären Sequenz entsteht, das in 5'-Position einen Teil der Mutation trägt. Dieses Oligonukleotid dient im zweiten Schritt zur Amplifikation eines weiteren Oligonukleotids, das nun neben der ursprünglichen Plasmidsequenz die komplette Mutation aufgeteilt auf das 5'-Ende und das 3'-Ende trägt. Dieses Oligonukleotid ist nun das *template* für die exponentielle Amplifikation der gesamten Plasmidsequenz inklusive der einzubringenden Mutation. Nach der PCR-Reaktion schließt sich ein *DpnI*-Verdau des Originalplasmids, eine Ligation des linearisierten PCR-Produkts und die Transformation des auf diese Weise generierten Plasmids an.

2.8.10 Sequenzierung von DNA

Etwa 1 µg gereinigter Plasmid-DNA wurde mittels einer SpeedVac-Apparatur getrocknet. Zur weiteren Analyse wurde die getrocknete Plasmid-DNA an die Firma eurofins MWG Operon (Martinsried) versandt. Die Firma führt die Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durch.

2.9 Proteinchemische Methoden

2.9.1 Testexpression

Der Klon eines mit dem gewünschten Plasmid transformierten *E. coli*-Stammes wurde von einer Agar-Platte bzw. aus einer Glycerin-Kultur in ein Vorkulturröhrchen mit 4 ml LB-Medium und dem passenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Eine Testexpression von neuen Proteinkonstrukten wurde im *batch*-Verfahren in 250 ml Schüttelkolben mit 50 ml LB- oder TB-Medium bei 37 °C und 125 rpm durchgeführt. Die Kulturen wurden mit dem benötigten Antibiotikum in entsprechender Konzentration versehen und 1 %ig (v/v) mit der Vorkultur inokuliert. Bei einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von etwa 1,0 AU wurden die Kulturen mit 1 mM IPTG induziert und 3 h bei 37 °C weiter inkubiert. Nach der Induktion wurde stündlich eine Probe entnommen, um die optische Dichte zu bestimmen und die Produktion des gewünschten Proteins mittels SDS-PAGE analysieren zu können. Durch Zentrifugation (5000 x g, 10 min) wurde die Kultivierung beendet und die Zellpellets bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert.

Die Herstellung größerer Proteinmengen erfolgte unter den gleichen Bedingungen in 5 l-Schüttelkolben mit 1,5 Liter LB- bzw. TB-Medium.

2.9.2 Fed batch- Fermentation

Um große Mengen des VKOR-Membranproteins zu erhalten, wurden *fed-batch*-Fermentationen im Bioreaktor mit 6 l Fermentationsmedium durchgeführt. Der Bioreaktor verfügte über eine Regelung der Temperatur, des pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdrucks. Die Rührgeschwindigkeit und die Begasungsrate wurden dem Sauerstoffbedarf der Kultur automatisch angepasst. Die Hauptkultur wurde in Gegenwart des benötigten Antibiotikums mit 2 x 200 ml einer Vorkultur in LB-Medium angeimpft. Stündlich wurden Proben entnommen, um die OD_{600nm} und den Glukosegehalt überprüfen zu können. Nachdem die Glukose aufgebraucht war, startete die Zugabe der Glukose-*feeding*-Lösung. Ab einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 60 AU wurde mit 1 mM IPTG induziert und stündlich eine Probe entnommen, um die Produktion des Proteins verfolgen zu können. Nach 3 h

Expression wurde die Kultur zentrifugiert (5000 x g, 10 °C, 15 min) und das Zellpellet bei -80 °C gelagert.

2.9.3 Aufschluss von Bakterienzellen

Die Zellpellets der Proben, die während der Testexpressionen bzw. *fed batch*-Fermentationen (Kapitel 2.9.1 und 2.9.2) genommen wurden, wurden in 100 µl Aufschlusspuffer suspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl SDS-Probenpuffer hinzu gegeben und die Proben mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.9.6.) und ggf. Western Blot (Kapitel 2.9.7) auf eine Expression des VKOR-Proteins analysiert.

Nach der Fermentation wurden geerntete Zellen in 4 ml IB I-Puffer pro g Zellen mit dem Ultraturrax resuspendiert. Es wurden 2 mg Lysozym pro g Zellen hinzugefügt und für 45 min bei 4 °C gerührt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels French Press in drei Passagen mit 800 ml Nutzvolumen und einem Druck von 580 bar. Im Anschluss wurde die DNA durch einen enzymatischen Verdau mit 10 µl Benzonase pro Liter Zellaufschlussvolumen bei pH 8,0 mit 3 mM MgCl₂ für 45 min bei 4 °C abgebaut.

2.9.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie

Die Konzentration einer Proteinlösung wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm ($A_{280\text{nm}}$) am UV-Spektrophotometer nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet.

$$A_{280\text{nm}} = c * d * \epsilon_{280\text{nm}}$$

A = Absorption (AU); ϵ = Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$); d = Schichtdicke (cm)

c = Konzentration (M)

Der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{nm}}$ eines Proteins lässt sich dabei aus der Summe der mit den spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten gewichteten Anzahl n von Tryptophan- und Tyrosin-Resten sowie der Cystine (Gill *et al.*, 1989) errechnen:

$$\epsilon_{280\text{nm}} = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} * n_{\text{Tryptophan}} + 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} * n_{\text{Tyrosin}} + 125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} * n_{\text{Cystine}}$$

2.9.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Amidoschwarz-Färbung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in Proben von rekonstituiertem VKOR wurde eine Färbung mit Amidoschwarz durchgeführt (Schaffner *et al.*, 1973). Dafür wurden 10 µl der Probe auf eine Nitrocellulosemembran (Bio-Rad, München) aufgetragen und diese dann mit Amidoschwarz-Färbelösung für 2 min angefärbt. Nach erfolgter Inkubation der Membran wurde diese entfärbt und die Intensität der Spots mit denen einer Vergleichsreihe mit Lysozymlösungen bekannter Konzentration, die auf die gleiche Weise behandelt wurden, verglichen.

2.9.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erlaubt die Auftrennung von Proteinen in denaturierter Form anhand ihrer molaren Masse (Laemmli, 1970). Resultierend aus der Bindung des im Gel und Probenpuffer enthaltenen SDS wird das Protein denaturiert und erhält eine negative Nettoladung.

Die Proben wurden im Verhältnis 1 : 1 mit SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert, bevor sie auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen und analysiert wurden. Als Referenz wurde der Größenstandard ‚BenchMark Protein Ladder‘ (Invitrogen) mitgeführt.

Stark verdünnte Proben wurden mittels TCA-Fällung konzentriert. Hierzu wurden 100 µl bis 1 ml der gewünschten Probe mit ddH₂O auf 1 ml aufgefüllt und mit 200 µl 10 % (w/v) Trichloressigsäure versetzt. Die präzipitierten Proteine wurden bei 12500 x g für 15 min zentrifugiert, der Überstand komplett entfernt und das Pellet mit 50 µl 1,5 M Tris/HCl, pH 7,4 gelöst. Das gelöste Pellet wurde ebenfalls im Verhältnis 1 : 1 mit reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Es wurden SDS-PAGE-Gele mit einem 12 %- oder 15 %-igen Trenngel verwendet. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte bei 10 A für etwa 20 min und anschließend bei 25 A für etwa 1 Stunde in Gegenwart von 1x Lämmli-Laufpuffer. Das Gel wurde nach der Elektrophorese jeweils 60 min in den Fairbanks-Lösungen A, B, C und D gefärbt bzw. entfärbt.

2.9.7 Western Blot

VKOR-Proteinkonstrukte mit einem His₆-tag konnten mit dem Western Blot detektiert werden. Zunächst wurde ein SDS-Gel (Kapitel 2.9.6) mit His-tag-Proteinmarker (BenchMark His-tagged Protein Standard, Invitrogen) angefertigt. Das Gel wurde in einer Blot-Apparatur auf einer Nitrocellulosemembran bei 300 mA und 4 V für 2 h geblottet. Die Membran wurde anschließend in Blockierungspuffer für 1,5 h bei 20 °C inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Maus-IgG gegen His₆-tag, Roche) in Blockierungspuffer mit 0,05 % (v/v) des Antikörpers über Nacht bei 4 °C. Nach zwei Waschschritten mit Blockierungspuffer für je 10 min wurde die Membran mit 0,05 % (v/v) des Sekundärantikörpers (Ziege-IgG gegen Maus-IgG, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase, Chemicon International) in Blockierungspuffer für 4 h bei 4 °C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten für je 10 min in PBST-Puffer ohne Magermilchpulver erfolgte die Immunodetektion. Nach Zugabe von 1 ml einer 1 : 1 Mischung aus ECL I- und ECL II-Lösung auf die Membran, wurde diese in Folie eingeschlagen und ein aufgelegter Film (Chemiluminescent Detektionsfilm, Roche) in einer Filmkassette belichtet. Nach dem Waschen in Entwickler (Kodak Processing Chemicals Developer, Sigma), Wasser und Fixierer (Kodak Processing Chemicals Fixer, Sigma) wurden die Positionen von Proteinen mit einem His₆-tag auf dem Film sichtbar.

2.9.8 Isolierung und Solubilisierung von *inclusion bodies* (Einschlusskörpern)

Die unlöslich exprimierten Proteine reicherten sich in *E. coli* in so genannten *inclusion bodies* (IBs, Einschlusskörpern) an. Diese wurden nach dem Zellaufschluss (Kapitel 2.9.3) durch die *inclusion-body*-Präparation von der löslichen Proteinfraction getrennt. Zu den aufgeschlossenen Zellen in IB I-Puffer wurde die Hälfte des Volumens an IB II-Puffer hinzugefügt und bei 4 °C für 45 min gerührt. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (30000 x g, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in IB II-Puffer mit dem Ultraturrax suspendiert. Es wurde nochmals 45 min unter Rühren inkubiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in IB III-Puffer resuspendiert, gefolgt von drei weitere Zentrifugations- und Waschschritten. Das daraufhin erhaltene Pellet konnte bei -20 °C gelagert werden (Rudolph *et al.*, 1996).

Die *inclusion bodies* wurden mit 5 ml Solubilisierungspuffer pro mg IB für 5 h bei Raumtemperatur gelöst und reduziert. Nicht gelöstes Protein wurde im Anschluss durch Zentrifugation bei 20000 x g für 15 min abgetrennt. Die solubilisierten *inclusion bodies* wurden dann zweimal für 4 h und einmal für 16 h gegen Solubilisierungspuffer ohne DTT dialysiert und bei -20 °C gelagert (Rudolph *et al.*, 1996).

2.9.9 Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die solubilisierten *inclusion bodies* (Kapitel 2.9.8.) bzw. Proben aus der Ameisensäurespaltung (Kapitel 2.9.10) wurden zunächst gegen IMAC-Bindepuffer dialysiert und anschließend zentrifugiert (4 °C, 20.000 x g, 15 min). Danach wurde die Lösung auf eine mit IMAC-Bindepuffer äquilibrierte 5 ml HisTrap FF Säule (GE Healthcare) appliziert. Der C-terminale Hexahistidin-tag ermöglicht die Affinitätsbindung des Proteins an die Säule basierend auf der Chelatisierung von immobilisierten Ni²⁺-Ionen des Säulenmaterials durch die Imidazoliumgruppen des His₆-tags.

Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte durch Absenken des pH-Wertes auf 4,4. Die Proteinkonzentration der Fraktionen des Elutionspeaks wurde durch Messung der Absorption A_{280nm} von verdünnten Proben bestimmt (Kapitel 2.9.4). Zudem wurden die Elutionspeaks mittels SDS-PAGE auf ihre Proteinzusammensetzung analysiert (Kapitel 2.9.6).

2.9.10 Ameisensäurespaltung

Jeweils 40 mg KSI-VKOR-Fusionsprotein wurden für die Ameisensäurespaltung (Li *et al.*, 2001; Ryan *et al.* 2003) eingesetzt. Dabei wurde das Fusionsprotein im denaturierten Zustand bei 70 °C in Gegenwart von 45 % Ameisensäure über eine Dauer von 7 h präferentiell zwischen einem Aspartat- und einem Prolinrest (-DP-) gespalten, die zuvor durch ortsgerichtete Mutagenese zwischen der Peptidsequenz von KSI und VKOR in das Fusionsprotein eingefügt worden waren. Nach der Spaltung erfolgte eine Dialyse gegen NiNTA-Bindepuffer, bevor in einer nachfolgenden Affinitätschromatographie (Kapitel 2.9.9) das VKOR-Peptid über den C-terminalen His₆-tag isoliert und angereichert wurde.

2.9.11 Massenspektrometrische Bestimmung

Um eine Modifikation des VKOR-Peptids während der Ameisensäurespaltung (Kapitel 2.9.10) auszuschließen, wurde das isolierte VKOR-Peptid massenspektrometrisch untersucht. Dafür wurde sowohl ein tryptischer bzw. chymotryptischer Verdau des Peptids als auch eine Chloroform/Methanol-Fällung durchgeführt.

Zur Messung der Peptidmasse einzelner Peptidfragmente durch MALDI-MS wurde das isolierte VKOR-Fragment auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetragen und das Gel in frisch angesetzter Fairbanks A und D Lösung ge- bzw. entfärbt. Die Proteinbanden wurden mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten. Die weitere Probenpräparation, die *In-Gel*-Spaltung mit ProteaseMAX™/Trypsin-Verstärker (Promega, Mannheim) und MALDI-TOF-TOF-Messung wurde freundlicherweise von Mathias Mueller (AG Sinz, Institut für Pharmazie, MLU Halle) durchgeführt.

Für die Bestimmung der Peptidgesamtmasse wurde eine Chloroform-Methanol-Präzipitation des Peptids durchgeführt (Venter *et al.*, 2002). Dafür wurden 0,5 ml Proteinlösung (0,4 mg/ml) mit 1,5 ml Methanol und 0,5 ml Chloroform gemischt. Anschließend wurde 1 ml ddH₂O hinzugegeben und gründlich gemischt. Nach Zentrifugation (9000 x g, 3 min) wurde die obere Phase abgenommen und verworfen. Nach Zugabe von weiteren 1,5 ml Methanol wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet vorsichtig unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl Ameisensäure aufgenommen und sofort auf eine prääquilibrierte 3 ml-Sephadex-Säule (Sephadex LH-20) aufgetragen. Für die Äquilibration der Säule sowie als Laufmittel wurde hierbei Methanol/Chloroform /1 % Ameisensäure verwendet (4 : 4 : 1). Die aufgefangenen Fraktionen (ca. 0,4 ml) wurden unter einem Stickstoffstrom auf 50 µl eingeeengt und 5 µl davon auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht und mittels Amidoschwarz-Färbung auf vorhandenes Protein untersucht (Kapitel 2.9.5). Protein enthaltende Fraktionen wurden 1 : 1 mit Ameisensäure gemischt und mittels ESI-MS an einem Esquire-LC-Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Analytik, Bremen) analysiert. Die Messungen an den Massenspektrometern wurden freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (Max-Planck-Institut für Proteinfaltung, Halle(Saale)) durchgeführt.

2.9.12 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Filtrationseinheiten (Amicon-Ultra 10, Millipore) mit 10kDa MWCO (*molecular weight cutoff*) wurden verwendet, um Proteinlösungen bis zu einem Volumen von 200 ml zu konzentrieren. Dazu wurden die Filtrationseinheiten in einer Tischzentrifuge bei 20 °C und 3000 x g zentrifugiert. Insbesondere vor der Puls-Renaturierung (Kapitel 2.9.13) und vor der Rekonstitution in Liposomen (Kapitel 2.9.15) fand diese Methode Anwendung.

2.9.13 Renaturierung unter Verwendung eines *artificial chaperone assisted refolding* –Systems

Das gereinigte VKOR-Peptid wurde mit Hilfe eines *artificial chaperone assisted refolding*-Systems (Rozema *et al.*, 1996) zurückgefaltet. Dabei wird das SDS durch mildere, nicht-denaturierende Detergenzien ersetzt, und somit eine Renaturierung ermöglicht (siehe Abb. 2.2).

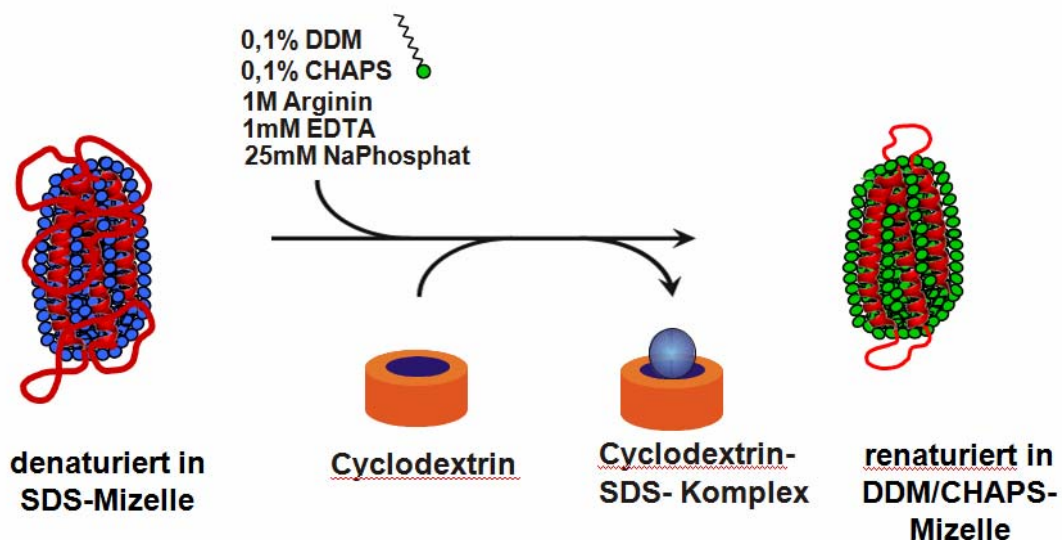


Abb. 2.2 Renaturierung von humanem VKOR unter Verwendung eines modifizierten Rückfaltungssystems mit nicht-natürlichen Chaperonen.

Humanes VKOR, das nach der Reinigung in denaturierter Form in SDS-Mizellen vorliegt, wurde mit einem modifizierten Rückfaltungssystem mit nicht-natürlichen Chaperonen renaturiert (Rozema *et al.*, 1996). Dabei erfolgt ein Austausch des SDS-Detergens gegen eine Kombination der milden Detergenzien DDM und CHAPS, der eine Renaturierung des Proteins ermöglicht.

Im Rückfaltungspuffer wurde dafür eine Kombination aus DDM und CHAPS eingesetzt. Der Rückfaltungspuffer enthielt darüber hinaus Methyl- β -Cyclodextrin, das bevorzugt SDS bindet und damit die Interaktion des VKOR-Peptides mit DDM und CHAPS befördert. Um die Aggregation von Protein zu vermindern und möglichst

hohe Ausbeuten an nativ gefalteten VKOR zu erhalten, wurde Arginin als weiteres Additiv im Rückfaltungspuffer verwendet und dieses System mit der Methode der Pulsrenaturierung kombiniert (Nguyen *et al.*, 2002; Rudolph & Fischer 1990; Winter *et al.*, 2002).

Dabei wurde das gereinigte VKOR-Protein in VKOR-Rückfaltungspuffer gegeben, so dass die Proteinkonzentration in jedem dieser Pulse um 3 µg Protein pro ml Rückfaltungspuffer erhöht wurde. Insgesamt wurden sieben Proteinpulse appliziert und mindestens 6 Stunden zwischen den einzelnen Pulsen inkubiert.

2.9.14 Präparation von Liposomen

Für die Präparation von Liposomen wurden Lipide in der gewünschten Menge und Zusammensetzung in einem Rundkolben eingewogen, in Chloroform gelöst und gründlich gemischt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel an einem Rotationsverdampfer abgedampft, wobei ein gleichmäßiger Film aus den Lipiden im Kolben zurückblieb. Dieser Lipidfilm wurde durch Zugabe von Rekonstitutionspuffer und 10minütiges kräftiges Schütteln gelöst, gefolgt von einer 30minütigen Inkubation im Wasserbad bei 37 °C und wiederholtem kräftigen Mischen. Danach wurde die Lipidlösung auf Cryoröhrchen verteilt und zehn Gefrier-Tau-Zyklen durchgeführt, wobei die Lipidlösung mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren und im Wasserbad wieder aufgetaut wurde. Gefolgt wurde diese Prozedur von einer 10maligen Extrusion der Lipidlösung durch eine Filtermembran mit einer Porengröße von 100 nm, wobei vorrangig unilamellare Liposomen mit einer definierten Größe entstehen.

2.9.15 Rekonstitution von Protein in Liposomen

Der VKOR-Renaturierungsansatz wurde auf etwa 1/5 des Volumens eingeeengt (Kapitel 2.9.12). Die erhaltenen Liposomen (Kapitel 2.9.14) wurden durch Zugabe von n-Octyl-β-D-glucopyranosid (OG) destabilisiert. 1 ml davon wurde mit 3 ml des zuvor konzentrierten VKOR gemischt. Die Konzentration an OG wurde so gewählt, dass im Rekonstitutionsansatz durch Zugabe der Proteinlösung eine Endkonzentration von 22 mM erhalten wurde. Anschließend erfolgte eine Dialyse über 4 Tage gegen 500 ml Rekonstitutionspuffer pro 4 ml Rekonstitutionsansatz mit täglichem Wechsel des Dialysepuffers.

2.9.16 Flotation der Lipide mit assoziiertem VKOR-Protein

Um Lipid-assoziiertes VKOR von nicht-rekonstituierten Protein abzutrennen und die Rekonstitutionseffizienz in verschiedenen Lipidmischungen abschätzen zu können, wurden Flotationsexperimente (Wang *et al.*, 2006) mit VKOR-Rekonstitutionsproben durchgeführt.

80 µl Probe von rekonstituiertem VKOR wurden mit 50 µl einer 2,5 M Saccharose-lösung in Rekonstitutionspuffer gemischt und in ein Zentrifugenröhrchen (TLA-100, Beckman-Coulter) überführt. Der Ansatz wurde mit 100 µl einer 0,75 M-Saccharose-lösung in Rekonstitutionspuffer gefolgt von 50 µl Rekonstitutionspuffer überschichtet. Danach erfolgte die Zentrifugation der Proben in einem TLA-100-Rotor bei 250000 x g für eine Stunde. Die obere 60 µl-Fraktion wurde vorsichtig abgenommen und auf 80 µl mit Rekonstitutionspuffer aufgefüllt. 10 µl davon wurden für die Proteinbestimmung mit Amidoschwarz (Kapitel 2.9.5) eingesetzt und mit 10 µl der ursprünglichen Rekonstitutionsprobe (vor der Flotation) verglichen, um die Effizienz der Rekonstitution abschätzen zu können.

2.10 Methoden zur Untersuchung von VKOR

2.10.1 Herstellung von Vitamin K Epoxid (nach Tishler *et al.*, 1940)

100 mg Vitamin K₁ (Merck, Darmstadt) wurden in Ethanol gelöst, 200 mg Na₂CO₃ hinzugegeben und gründlich gemischt. Nach Zugabe von 1,2 ml 30 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung wurde für 2,5 h bei 70 °C inkubiert. Dabei entfärbte sich die anfangs leicht gelbe Lösung mit zunehmendem Umsatz des Vitamin K₁. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis abgekühlt und 5 ml Wasser sowie 10 ml Diethylether zugegeben. Nach 5minütigem kräftigen Schütteln wurde die obere Phase abgenommen und Na₂SO₄ zum Entwässern hinzugegeben. Danach wurde der Überstand evaporiert, der verbleibende schwach gelbe, ölige Rest gewogen und in einem definierten Volumen Ethanol gelöst um eine 8,5 mM Stammlösung zu erhalten. Aliquots der Stammlösung wurden bei 4 °C gelagert.

2.10.2 Kultivierung und Transfektion von HEK293-Zellen

Um den Assay der enzymatischen VKOR-Aktivität (Kapitel 2.10.3) zu etablieren, wurden HEK293-Zellen genutzt, welche mit dem pCEP4-VKOR-Plasmid transfiziert wurden und danach transient VKOR exprimierten.

Dafür wurde eine HEK293-Zellkultur in einem geeigneten Medium (DMEM, 10 % FKS, 0,5 % Gentamycin) herangezogen. Das Medium wurde alle 2 Tage erneuert und die Zellen beim Erreichen von > 95 % Konfluenz im Kulturgefäß auf neue Kulturgefäße aufgeteilt.

Die Transfektion wurde mit Lipofectamin™ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für eine 4 ml-Kultur in einer 25 cm³-Flasche wurden 15 µg Plasmid (pCEP4-VKOR) und 20 µl Lipofectamin™ eingesetzt und die Kultur über Nacht in Gegenwart der Transfektionslösung inkubiert, bevor die transfizierten Zellen geerntet wurden.

Zum Ernten der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Nachdem die Zellen in kaltem PBS suspendiert und in ein Falcon-Gefäß überführt waren, wurde zentrifugiert (9000 x g, 15 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µl (50 % Glycerol, 0,5 % CHAPS, 25 mM Imidazol) resuspendiert. Aliquots von 30 µl wurden bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Nicht transfizierte HEK-Zellen wurden auf die gleiche Weise kultiviert und geerntet und dienten als Negativkontrolle für die Etablierung des Aktivitätsassays.

2.10.3 Aktivitätstest mit rekonstituiertem VKOR und HEK Zellen

Die enzymatische Aktivität von VKOR wurde durch den quantitativen Umsatz von Vitamin K Epoxid zu Vitamin K bestimmt (Chu *et al.*, 2006; Rost *et al.*, 2004; Wallin *et al.*, 1985). Dafür wurden 100 µl Probe mit rekonstituiertem VKOR (Kapitel 2.9.15) zu 460 µl VKOR-Assaypuffer gegeben. Dem Ansatz wurden 20 µl DTT (150 mM) hinzugefügt, gut gemischt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 20 µl Vitamin K Epoxid (850 µM) wurde die Reaktion gestartet und für 1 h bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Isopropanol/Hexan und Mischen abgestoppt und anschließend kurz zentrifugiert (13000 rpm, 3 min). Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß

transferiert und evaporiert. Der Rückstand wurde in 50 µl Ethanol gelöst und die Proben bis zur Analyse mittels RP-HPLC bei -80 °C eingefroren.

Um die enzymatische Aktivität von HEK293-Zellen zu bestimmen, wurden einem 30 µl-Aliquot dieser Zellen 530 µl HEK-VKOR-Assaypuffer hinzugegeben und gründlich gemischt. Danach wurde DTT hinzugegeben und wie oben beschrieben weiter mit dem Ansatz verfahren. Ansätze, an denen eine Warfarin-Inhibierung von VKOR getestet werden sollte, wurden nach Zugabe von 10 µl 6 mM Warfarin (Sigma, Deisenhofen) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die enzymatische Reaktion durch Addition des Vitamin K Epoxids gestartet wurde.

Im Vergleich zu den bereits publizierten Verfahren (Rost *et al.*, 2004; Wallin *et al.*, 1985) wurden größere Mengen Vitamin K Epoxid eingesetzt, um sicherzustellen, dass der Substratumsatz während der gesamten Zeit linear und gleichmäßig verläuft und zudem gut quantifizierbar ist (vgl. Abb. 3.15, S. 72). Zudem wurde ein anderer Puffer für die Messungen des renaturierten VKOR eingesetzt, da für die transfizierten HEK293-Zellen Puffer verwendet wird, der das Detergens CHAPS in einer Konzentration von 0,5% (w/v) enthält. Diese CHAPS-Konzentration wird verwendet, um die HEK293-Zellen zu lysieren und somit die VKOR-Aktivität dieser Zellen zugänglich zu machen und andererseits VKOR weitestgehend in der physiologischen Umgebung der ER-Membran zu belassen. Rekombinantes, renaturiertes VKOR zeigte in diesem Puffer keine Enzymaktivität und ebenso war kein Substratumsatz durch HEK293-Zellen in Gegenwart des Puffers zu sehen, mit dem die Enzymaktivität des renaturierten VKOR gemessen wurde (Daten nicht gezeigt).

2.10.4 Quantifizierung von Vitamin-K-Derivaten durch analytische Reversed Phase (RP)-HPLC

Die Quantifizierung des Vitamin K Epoxid-Umsatzes erfolgte mittels Reversed Phase (RP)-HPLC an einem Dionex Gynkotek HPLC-System. Es wurde eine Acclaim™ 120 C18-Säule (Dionex) mit Methanol als mobile Phase verwendet um die Vitamin-K-Derivate aufzutrennen. Die Elutionspeaks wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert und der Vitamin K Epoxid-Umsatz über die Integration der Peakflächen mit Hilfe der Steuer- und Auswertungssoftware „Chromeleon“ (Version 4.23) quantifiziert.

Der erfolgte Substratumsatz ist die Menge an gebildeten Vitamin K bezogen auf die gesamte Menge an Vitamin K und Vitamin K Epoxid. Aus diesem prozentualen Umsatz lässt sich leicht die absolute Menge des umgesetzten Epoxids bestimmen, wenn man mit der Gesamtmenge des für den Assay eingesetzten Substrates multipliziert. Die spezifische VKOR-Aktivität erhält man, indem man die absolute Menge des umgesetzten Epoxids durch die Enzymmenge dividiert.

$$\frac{Vit.K_{HPLC}}{Vit.K_{HPLC} + Vit.KO_{HPLC}} = \text{Umsatz}$$

$$\text{Umsatz} \cdot Vit.KO_{Assay} = Vit.K_{Assay}$$

$$\frac{\left(\frac{Vit.K_{Assay}}{n_{VKOR}} \right)}{\text{Zeiteinheit}} = \text{spezifische VKOR-Aktivität}$$

Beispiel: Peakfläche Vitamin K (Vit.K_{HPLC}) = 1,694

Peakfläche Vitamin K Epoxid (Vit.KO_{HPLC}) = 18,306

Eingesetzte Menge Vitamin K Epoxid (Vit.KO_{Assay}) = 17 nmol

(20 µl einer 850 µM Lösung Vitamin K Epoxid)

Eingesetzte VKOR-Menge (n_{VKOR}) = 2 nmol

Zeitdauer für VKOR-Aktivitätsassay = 3600 sec

Daraus ergibt sich ein Umsatz von 8,47% (= 0,0847). Es wurden im VKOR-Aktivitätsassay also rechnerisch 1,44 nmol (= 1440 pmol) Vitamin K (Vit.K_{Assay}) gebildet. Dies entspricht einer spezifischen Aktivität von 1,440 nmol Vit.K/ 2 nmol VKOR in einem Zeitraum von einer Stunde (= 3600 sec), also 0,2 pmol Vit.K/ nmol VKOR/ sec.

2.10.5 Messung der dynamischen Lichtstreuung

Der hydrodynamische Durchmesser von Partikeln (z.B. Proteinen, Liposomen oder Proteinaggregaten) wurde durch die Messung der dynamischen Lichtstreuung (DLS) an einem Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments, Malvern, UK) bestimmt. Diese Methode basiert auf der Messung von Lichtintensitätsänderungen in der Probe und korreliert diese mit der Brown'schen Bewegung der Partikel in der Lösung. Die

Beziehung zwischen der Partikelgröße und dem Diffusionskoeffizient wird durch die Stokes-Einstein-Gleichung beschrieben:

$$HD = kT/3 \pi \eta D$$

HD = hydrodynamischer Durchmesser; D = translationaler Diffusionskoeffizient (m²/s)

k_B = Boltzmann-Konstante (1,3806503 x 10⁻²³ m² kg s⁻² K⁻¹); T = Temperatur (K)

η = dynamische Viskosität (mPa*s oder kg m⁻¹s⁻¹)

Die unterschiedlichen Größen werden daher durch die Analyse des Streulichts bestimmt, das durch die Bestrahlung der Probe mit einem 632 nm-He/Ne-Laser reflektiert wird. Die Interpretation der Daten erfolgt durch die Auswertung der Größenverteilung im Bezug zur Intensität des Streulichtes. Dabei wird einbezogen, dass Partikel mit unterschiedlichen Größen das Licht unterschiedlich stark streuen. Dies macht die Methode sehr attraktiv, wenn Proben mit sehr heterogener Größenverteilung der darin befindlichen Partikel analysiert werden müssen.

Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Als Material wurde Protein mit einem refraktiven Index von 1,45 in einer wässrigen Umgebung definiert. Die Äquilibrationszeit der Probe vor der Messung betrug 1 min. Die Intensitätsregulierung und Positionierung des Lasers, sowie die Anzahl der Messungen für einen Scan wurden vom Gerät automatisch festgelegt. Die Auswertung erfolgte mit der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software.

2.10.6 CD-Spektroskopie

Fern-UV-CD-Spektren wurden an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter in Quarzglasküvetten (106-QS, Hellma) mit Schichtdicken von 0,5 mm aufgenommen. Von jeder Probe wurden 30 Spektren bei einer Temperatur von 20 °C akkumuliert. Die Datenpunkte wurden in Abständen von 0,2 bis 1 nm bei einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min gemessen. Außerdem wurden auf die gleiche Weise Spektren von proteinfreien Proben gemessen, die alle Probenkomponenten (Puffer und Lipid) außer dem Protein enthielten. Die um den Beitrag der Puffer-Lipid-Spektren korrigierte Elliptizität der Probenspektren wurde anschließend in mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest umgerechnet:

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A}$$

Θ = gemessene Elliptizität in Grad

c = Proteinkonzentration in mg/ml

d = Schichtdicke der Küvette in cm

M_r = Molekulargewicht des Proteins in g/mol

N_A = Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül

2.10.7 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren der aufgereinigten Proteine wurden an einem Fluoromax-2 Spektrofluorimeter (SPEX Instruments S. A. Inc., Edison, USA) in 1 cm Quarzglas-küvetten (Hellma, Müllheim) aufgenommen. Die Anregung der Tryptophan-Fluoreszenz erfolgte bei 295 nm und für die Fluoreszenz von Tryptophanen und Tyrosinen bei 280 nm. Die Emission wurde im Wellenlängenbereich zwischen 310 und 390 nm (für Anregung bei 295 nm) oder 300 nm bis 400 nm (für Anregung bei 280 nm) aufgezeichnet. Die Spektren wurden mit einer Zeitkonstante von 0,2 s und einer Spaltbreite von 1 nm bei der Anregung und von 5 nm bei der Emission aufgenommen. Als Proteinkonzentration wurden 50 µg/ml eingesetzt. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Screening von VKOR-Expressionsvektoren

Die Expression von integralen Membranproteinen stellt oftmals den limitierenden Faktor zu deren Reinigung und Charakterisierung dar (Gordon *et al.*, 2008; Junge *et al.*, 2008; Kiefer, 2003; McCusker *et al.*, 2007). Um eine Expression des humanen VKOR zu erhalten, war es daher notwendig eine Reihe von Expressionskonstrukten zu generieren und auf eine Expression zu testen. Dafür wurde eine VKOR-Gensequenz (siehe Anhang 1) verwendet, welche Codon-optimiert für die Expression in *E. coli* ist, und die nach Amplifikation mit entsprechenden Oligonukleotiden über passende Restriktionsschnittstellen in verschiedene Expressionsvektoren kloniert wurde (siehe Tab. 3.1, Kapitel 2.8.2 bis 2.8.9). Die Klonierungen des humanen VKOR-Gens in pET11a, pET15b (N-terminaler His₆-tag), pET19b (N-terminaler His₁₀-tag), pET31b (N-terminales Ketosteroidisomerase-Peptid und C-terminaler His₆-tag), pTCLE (N-terminales Tryptophan-*leader*-Peptid und intrinsischem His₆-tag), pBCL99 und pBCL173 (N-terminales B-Zell-Lymphoma-Peptid, das 99 bzw. 173 Aminosäuren umfasst; N- und C-terminaler His₆-Tag) wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit von Frau Beatrice Epler in der AG Stubbs durchgeführt.

Die verwendeten Vektoren verfügen alle über einen T7-Promotor, der eine starke Überexpression des Zielproteins bewirkt (Studier *et al.*, 1986). Während die Vektoren pET15b und pET19b zur Fusion von VKOR mit einem N-terminalen His-tag verwendet wurden, erlauben pTCLE (Calderone *et al.*, 1996; Staley *et al.*, 1994), pET31b (Baneres *et al.*, 2005) und die pBCL-Vektoren (Thai *et al.*, 2005) die Expression von VKOR mit N-terminalen Fusionen von Peptiden, die eine verstärkte Einlagerung des Proteins in *inclusion bodies* (Einschlusskörpern) bewirken sollen, welches mit einer verringerten Toxizität gegenüber dem exprimierenden Wirt einhergeht (Kiefer, 2003). Auf diese Weise kann eine stabile und signifikante Expression des integralen Membranproteins erreicht werden (Baneres *et al.*, 2005).

Darüber hinaus wurden auch VKOR-homologe Proteine von *Bifidobacterium longum*, *Arabidopsis thaliana* und *Sulfolobus solfataricus* (Goodstadt *et al.*, 2004), sowie ein humanes VKOR-Konstrukt, welches um die ersten 31 N-terminalen Aminosäuren verkürzt ist, in die Expressionsvektoren pET11a, pET15b, pET19b und pTCLE kloniert (siehe Anhang 2).

Die VKOR-homologen Proteine aus Prokaryoten wurden ausgewählt, da vermutet wurde, dass das ebenfalls prokaryotische Expressionssystem in *E. coli* möglicherweise eher zu einer erfolgreichen Expression führen würde. Das homologe Protein aus *Arabidopsis thaliana* stellt ein interessantes Zielprotein dar, da es C-terminal mit einer Thioredoxin-ähnlichen Domäne fusioniert ist, die vermutlich - in Analogie zum VKOR-homologen Protein aus *Synechococcus sp.* (Li *et al.*, 2010) - für den Transfer von Redoxäquivalenten auf das aktive Zentrum des Enzyms wichtig ist. Das verkürzte VKOR-Protein wurde ausgewählt, weil spekuliert wurde, dass eine Deletion der ersten Transmembran-Helix, deren Sequenz als ein mögliches Signalpeptid identifiziert wurde (SignalP3.0; Bendtsen *et al.*, 2004), zu einer verringerten Insertion des exprimierten Proteins in die Membran führen könnte.

Tab. 3.1 Klonierung und Expression verschiedener VKOR-Konstrukte.

Codon-optimierte VKOR-cDNA von humanem VKOR (hVKOR), einer N-terminal verkürzten Variante des humanen VKOR (Δ N31hVKOR, As 32-163), sowie von VKOR-homologen Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* (Arabid.VKOR), *Bifidobacterium longum* (Bifido.VKOR) und *Sulfolobus solfataricus* (Sulfol.VKOR) wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen in verschiedene Plasmide kloniert (siehe Anhang 2). Eine signifikante Expression konnte jedoch nur für das humane VKOR in pET31b (KSI-VKOR-Fusionsprotein) erhalten werden (siehe Anhang 1).

Plasmid	Klonierung	Besonderheit	hVKOR	Δ N31-hVKOR	Bifido.VKOR	Arabid.VKOR	Sulfol.VKOR
pET-11a	<i>NdeI / BamHI</i>	keine tags	—	—	—	—	—
pET-15b	<i>NdeI / BamHI</i>	His ₆ -tag (NTer)	—	—	—	—	—
pET-19b	<i>NdeI / BamHI</i>	His ₁₀ -tag (NTer)	—	—	—	—	—
pTCLE	<i>NdeI / BamHI</i>	TLE-Peptid (NTer) His ₆ -tag (intern)	—	—	—	—	—
pET-31b	<i>XhoI</i>	KSI-Peptid (NTer) His ₆ -tag (CTer)	+	kein Konstrukt	kein Konstrukt	kein Konstrukt	kein Konstrukt
pBCL99	<i>AflIII / XhoI</i>	BCL-Peptid (NTer, 99As) His ₆ -tag (NTer,CTer)	—	kein Konstrukt	kein Konstrukt	kein Konstrukt	kein Konstrukt
pBCL173	<i>AflIII / XhoI</i>	BCL-Peptid (NTer, 173As) His ₆ -tag (NTer,CTer)	—	kein Konstrukt	kein Konstrukt	kein Konstrukt	kein Konstrukt

getestete *E. coli* Stämme: BL21 (DE3); BL 21 (DE3) Rosetta

VKOR: Vitamin K Epoxid Reduktase
TLE: Tryptophan-Leader-Peptid
KSI: Ketostereoidisomerase-Peptid
BCL: B cell lymphoma extra large (BCL-XL)-Peptid

Die genannten VKOR-Konstrukte wurden in den *E. coli*-Expressionsstämmen BL21 (DE3) und BL21 (DE3) Rosetta auf eine mögliche Produktion des rekombinanten Proteins untersucht (Kapitel 2.9.1). Dabei konnte für keines dieser VKOR-Konstrukte eine Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nur das in pET31b exprimierte Ketosteroidisomerase (KSI)-VKOR-Fusionsprotein zeigte eine Expression, die mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse bestätigt werden konnte (siehe Abb. 3.1). Dieses Fusionsprotein weist ein hydrophobes Peptid aus dem Enzym Ketosteroidisomerase auf, welches N-terminal vor dem humanen VKOR lokalisiert ist. Außerdem besitzt es C-terminal einen Hexahistidin-tag, der nachfolgend eine effiziente Reinigung des SDS-solubilisierten Proteins ermöglicht. Da eine proteolytische Spaltung des KSI-VKOR-Fusionsproteins in Gegenwart von SDS nicht durchführbar ist und auch nicht davon ausgegangen werden kann, dass das Protein nach einer Renaturierung in Detergens-haltigen Puffern gespalten werden kann (Thai *et al.*, 2005) bzw. längere Zeit stabil in diesen Puffern ist, wurde eine chemische Spaltung des KSI-VKOR-Fusionsproteins als Alternative in Betracht gezogen.

Um eine effiziente Spaltung des Fusionsproteins unter denaturierenden Bedingungen zu ermöglichen, wurde durch ortsgerichtete Mutagenese zwischen dem KSI- und dem VKOR-Peptid eine Aspartat-Prolin-Sequenz eingefügt (Kapitel 2.8.9), die durch ihren säurelabilen Charakter eine Spaltung durch Inkubation mit Ameisensäure ermöglicht (Li *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2003), so dass ein VKOR-Peptid resultiert, welches N-terminal die Aminosäuresequenz Pro-Leu-Glu vor der eigentlichen VKOR-Sequenz besitzt. Ein weiterer Vorteil gegenüber der ebenfalls gebräuchlichen Bromcyan-Spaltung ist neben der geringeren Toxizität, dass die Aminosäuresequenz des VKOR-Peptids selbst nicht verändert werden musste, um eine selektive Spaltung des Fusionsproteins zu erreichen, und somit Mutationen der Methioninreste in der eigentlichen Sequenz des Proteins vermieden wurden. Durch eine weitere ortsgerichtete Mutagenese wurde zudem eine schon bestehende Ameisensäurespaltstelle in der Sequenz des KSI-Peptids (Pro39Leu) mutiert, um diese alternative Spaltstelle zu entfernen und die Zahl möglicher Reaktionsspaltprodukte, die in Vorversuchen bei der Ameisensäurespaltung beobachtet wurden, zu begrenzen und höhere Ausbeuten des VKOR-Peptids zu erhalten.

3.2 Expression von humanen VKOR als KSI-Fusionsprotein

Im Rahmen der Testexpressionen als Schüttelkolben-Kultur (Kapitel 2.9.1) konnte das KSI-VKOR-Fusionsprotein im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) unlöslich, in Form von *inclusion bodies* erhalten werden. Die besten Proteinausbeuten wurden hierbei mit TB-Medium erzielt (siehe Abb. 3.1). Bei der Analyse mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.9.6) erscheint das KSI-VKOR-Fusionsprotein nach der Induktion mit IPTG als schwache Bande, deren Höhe der erwarteten Gesamtmasse des Fusionsproteins von 33,4 kDa entspricht. Durch Western-Blot-Analyse (Kapitel 2.9.7) mit Antikörpern gegen den C-terminalen Hexahistidin-tag konnte die Expression bestätigt werden.

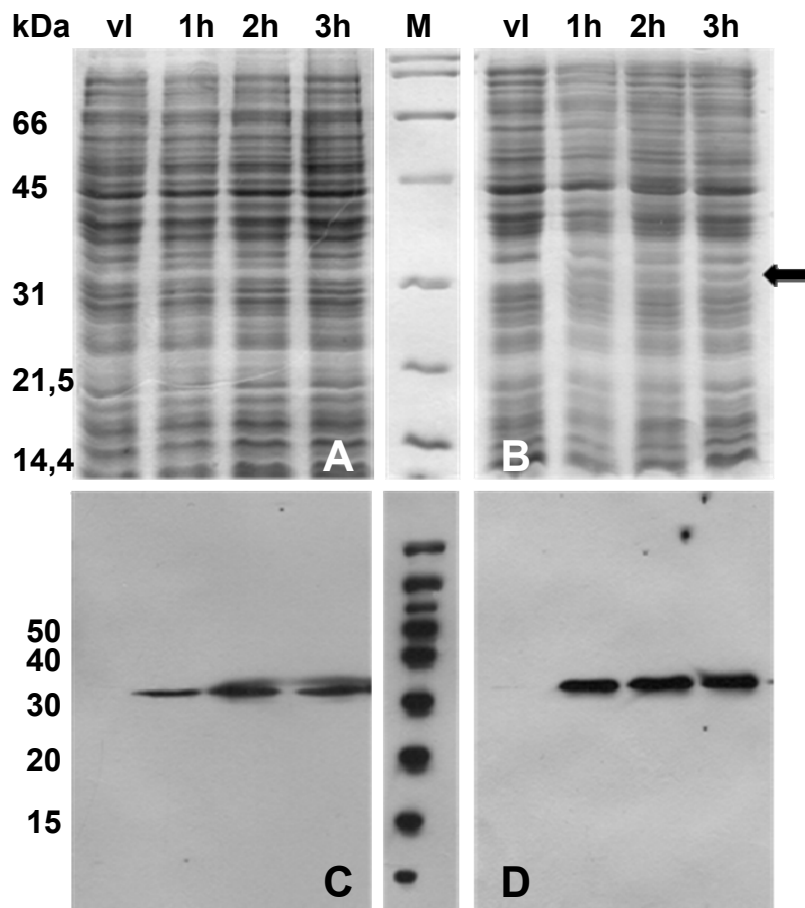


Abb. 3.1 SDS-PAGE- und Western-Blot-Analyse der Expression des KSI-VKOR-Fusionsproteins in *E. coli* BL21(DE3).

SDS-PAGE-Analyse der Expression des KSI-VKOR-Fusionsproteins durch *E. coli* BL21(DE3) in LB-Medium (A) und TB-Medium (B). Das erwartete Produkt war als schwache Bande im Polyacrylamid-Gel zu sehen (Pfeil). (C)+(D) Durch Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen den C-terminalen His₆-Tag konnte die Expression bestätigt werden. M: Größenstandard für SDS-PAGE bzw. Western Blot; vl: Probe vor Induktion der Expression; 1h-3h: Proben 1 h bis 3 h nach Induktion der Expression.

Da es nach drei Stunden zu keiner weiteren Zunahme des exprimierten Proteins kam (Daten nicht gezeigt), wurde die Expression stets auf drei Stunden begrenzt, bevor die Zellen geerntet wurden. Aufgrund der mutmaßlichen Toxizität des exprimierten Membranproteins wurde versucht, die Induktion der Kulturen bei höheren optischen Dichten vorzunehmen. Dabei stellte sich heraus, dass eine späte Induktion der *E. coli*-Kultur bei einer optischen Dichte zwischen 1,0 und 1,2 zu größeren Mengen des exprimierten Proteins führte. Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) Rosetta exprimierte ebenfalls VKOR, jedoch nicht in größeren Mengen als der BL21 (DE3)-Stamm, der kein Plasmid für die Komplementierung seltener tRNAs besitzt (siehe Abb. 3.2).

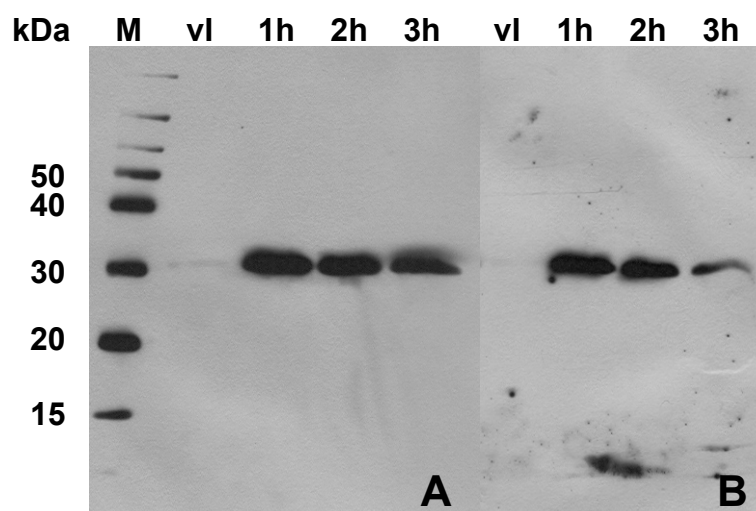


Abb. 3.2 Western-Blot-Analyse der Expression des KSI-VKOR-Fusionsproteins in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) Rosetta.

Western-Blot-Analyse der Expression des KSI-VKOR-Fusionsproteins in den Stämmen *E. coli* BL21(DE3) (A) und *E. coli* BL21(DE3) Rosetta (B). M: Western Blot-Größenstandard; vl: Probe unmittelbar vor Induktion der Expression; 1h-3h: Proben 1 h bis 3 h nach Induktion der Expression

Daraufhin wurde versucht, die gefundenen Expressionsbedingungen auf eine Kultivierung in größeren Maßstab mittels *fed-batch* Fermentation zu übertragen, um größere Mengen des Proteins zu erhalten. Da initiale Versuche, KSI-VKOR-Fusionsprotein durch Fermentation in TB-Medium zu überexprimieren, nicht erfolgreich waren, wurde in der Folge auf Fermentation mit einem Hefeextrakt-Komplex-medium unter Verwendung einer Glukose-basierten *feeding*-Lösung zurückgegriffen (Kapitel 2.9.2), womit das Zielprotein schließlich erfolgreich exprimiert werden konnte (siehe Abb. 3.3).

Nach einer *lag*-Phase, in der sich die Zellen adaptieren und in der die optische Dichte der Kultur kaum ansteigt, folgt die *log*-Phase, in der die Kultur exponentiell wächst. Zu Beginn dieser Phase kommt es zu einem vollständigen Verbrauch der

Glukose im Fermentationsmedium, so dass mit der Zugabe zusätzlicher Glukose begonnen werden musste (*feeding*). Bei einer optischen Dichte von $OD_{600nm} \sim 60$ AU erfolgte der Übergang in die stationäre Phase und die Induktion der Expression des Zielproteins durch Zugabe von IPTG. Die Expressionsproben der Kultivierung zeigen, dass vor der Induktion kein KSI-VKOR-Fusionsprotein vorlag und dass nach der Induktion das Zielprotein erfolgreich exprimiert wurde (siehe Abb. 3.3). Auf diese Weise konnten im 6 l-Maßstab 600 g bis 800 g Biofeuchtmasse gewonnen werden. In Abb. 3.3 ist eine typische Wachstumskurve von *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen bei der Expression von KSI-VKOR-Fusionsprotein sowie die Analyse der Expression durch Western Blot dargestellt.

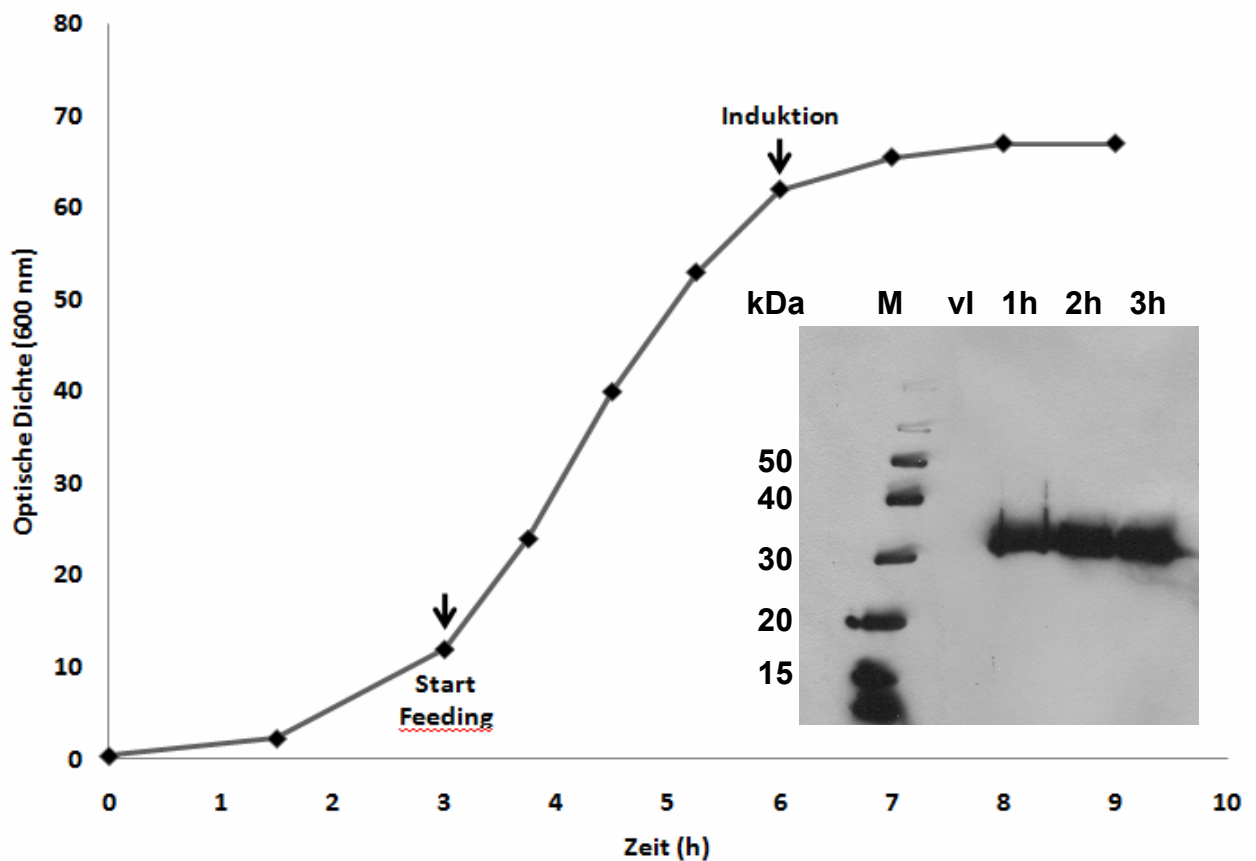


Abb. 3.3 *Fed-batch* Fermentation von KSI-VKOR-Fusionsprotein in *E. coli* BL21(DE3).

Typischer Verlauf einer Wachstumskurve für die *fed-batch* Fermentation von KSI-VKOR-Fusionsprotein. „Start Feeding“ bezeichnet den Beginn der Zugabe von Glukose-Feeding-Lösung. Nach der Induktion mit IPTG erfolgte die Expression des Fusionsproteins. Expressionsproben wurden mittels Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen den C-terminalen His₆-tag untersucht. M: Western Blot-Größenstandard; vl: Probe unmittelbar vor Induktion der Expression; 1h-3h: Proben 1 h bis 3 h nach Induktion der Expression.

3.3 Reinigung und Säurespaltung des VKOR-Fusionsproteins

Die aus der Fermentation gewonnenen Zellen wurden mit einem Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen und daraus die *inclusion bodies* isoliert (Kapitel 2.9.8). Nach der Solubilisierung des KSI-VKOR-Proteins in SDS, wurde das Fusionsprotein mittels Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) unter denaturierenden Bedingungen gereinigt (Kapitel 2.9.9). Dabei konnte das Fusionsprotein in großem Maße von kontaminierenden Proteinen abgetrennt werden (siehe Abb. 3.4).

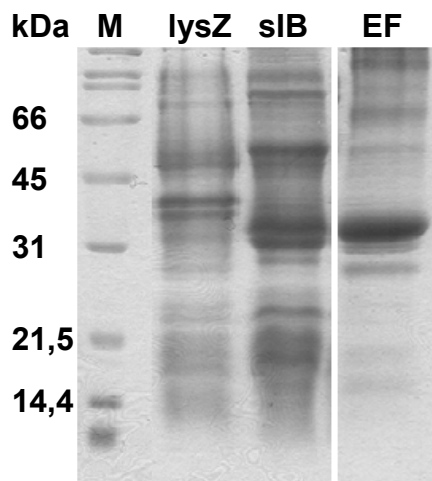


Abb. 3.4 Inclusion body-Präparation und erster IMAC-Reinigungsschritt.

Nach dem Zellaufschluss erfolgte die Isolierung der *inclusion bodies*. Das solubilisierte KSI-VKOR-Fusionsprotein (s. Pfeil) wurde unter denaturierenden Bedingungen mittels Metallionen-Affinitätschromatographie gereinigt. M:SDS-PAGE-Größenstandard; lysZ: aufgeschlossene Zellen; sIB: solubilisierte *inclusion bodies*; EF: Elutionsfraktion der IMAC-Reinigung.

3.3.1 Optimierung der Säurespaltung des VKOR-Fusionsproteins

Das KSI-VKOR-Fusionsprotein wurde nachfolgend einer Ameisensäurespaltung unterzogen, um das N-terminale KSI-Peptid von dem VKOR-Peptid abzutrennen (Kapitel 2.9.10). Im Anschluss kann das humane VKOR aufgrund des C-terminalen His₆-tag durch Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC, Kapitel 2.9.9) isoliert werden, während das KSI-Peptid nicht in der Lage ist, an die Chromatographie-Säule zu binden. Liegt während dieses Chromatographie-Schrittes noch ungespaltenes KSI-VKOR-Fusionsprotein vor, so wird dieses zusammen mit VKOR eluiert und stellt eine unerwünschte Kontamination dar (siehe Abb. 3.5, Probe „7-65“, obere Bande). Die Bedingungen der Spaltung wurden daher bezüglich der Zeit der Spaltung und der Temperatur optimiert, um einen vollständigen Umsatz des Fusionsproteins und gleichzeitig möglichst hohe Ausbeuten des VKOR-Peptids zu erhalten. Dabei zeigte die Spaltung über 7 h bei 70 °C in Gegenwart von 45 % Ameisensäure die besten Resultate, während bei 65 °C auch nach 9 h noch Fusionsprotein detektiert werden konnte (siehe Abb. 3.5). Die Spaltungen bei 70 °C über 8 h oder 9 h führten jedoch zu einer Abnahme der Menge des isolierten VKOR.

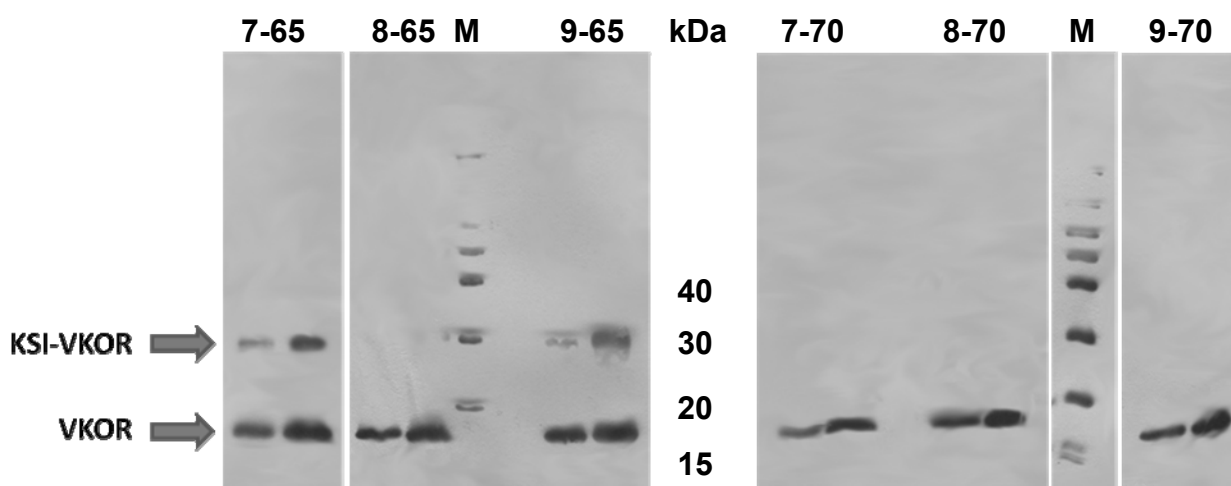


Abb. 3.5 Optimierung der Bedingungen für die Ameisensäurespaltung.

KSI-VKOR-Fusionsprotein wurde bei 65 °C oder 70 °C in Gegenwart von 45% Ameisensäure für 7 h, 8 h oder 9 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der VKOR-Peptide durch IMAC und die Analyse mittels Western-Blot mit Antikörpern gegen den C-terminalen His₆-tag. Dabei konnte sowohl das erwartete VKOR (VKOR'), als auch ungespaltenes KSI-VKOR-Fusionsprotein (KSI-VKOR') detektiert werden. Für jede Bedingung sind zwei Fraktionen der Elution gezeigt. M: Western-Blot-Größenstandard; 9-65: Spaltung für 9 h bei 65 °C; 9-70: Spaltung für 9 h bei 70 °C; 8-65: Spaltung für 8 h bei 65 °C; 8-70: Spaltung für 8 h bei 70 °C; 7-65: Spaltung für 7 h bei 65 °C; 7-70: Spaltung für 7 h bei 70 °C.

Die Analyse der eluierten Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western-Blot (Kapitel 2.9.6 und 2.9.7) zeigte, dass das VKOR-Peptid nach diesem Schritt in großer Reinheit und Homogenität für die Renaturierung vorliegt (siehe Abb. 3.6). Die durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm kalkulierte Proteinausbeute (Kapitel 2.9.4) für das SDS-denaturierte, gereinigte VKOR nach dieser zweiten IMAC-Reinigung liegt bei ca. 14 mg VKOR pro Liter Fermentationskultur.

3.4 Analyse der Säurespaltung des KSI-VKOR-Fusionsproteins mittels Massenspektrometrie

Das isolierte VKOR-Peptid wurde mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden (Kapitel 2.9.11) auf mögliche Modifikationen von Aminosäureresten infolge der harschen Reaktionsbedingungen während der Ameisensäurespaltung untersucht (z.B. Iminbildung oder Acylierung/Formylierung mit Aminseitengruppen, Acetalbildung oder Veresterung/Formylierung mit Hydroxylgruppen oder Carboxylgruppen).

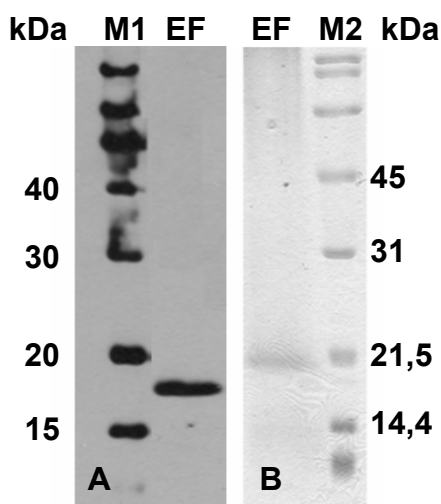


Abb. 3.6 Western Blot- (A) und SDS-PAGE-Analyse (B) des isolierten VKOR-Peptids nach der Ameisensäurespaltung.

Das nach der Ameisensäurespaltung isolierte VKOR-Peptid konnte mittels Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen den C-terminalen His₆-tag und durch SDS-PAGE nachgewiesen werden. Das kalkulierte Molekulargewicht des VKOR-Peptids beträgt ca. 19,5 kDa. Die Unterschiede im apparenten Molekulargewicht zwischen beiden Gelen sind auf unterschiedliche Acrylamid-Konzentrationen in beiden Gelen zurückzuführen. M1: Western Blot-Größenstandard; EF: Elutionsfraktion der IMAC zur Isolierung des VKOR-Peptids; M2: SDS-PAGE-Größenstandard.

Eine Entsalzung des gesamten Proteins durch RP-HPLC für die massenspektrometrische Analyse durch MALDI-TOF-TOF/ESI-TOF war nicht möglich, da das Protein nicht von der Säule (Jupiter C4-Säule, 5 µm, 300 Å, 250 x 4,6 mm, Phenomenex) eluiert werden konnte. Die Ursache könnte eine ungewöhnlich starke Wechselwirkung des hydrophoben Membranproteins mit der Säulenmatrix sein. Daraufhin wurde ein proteolytischer Verdau von VKOR mit Trypsin bzw. Chymotrypsin und anschließender massenspektrometrischer Analyse der entstandenen Spaltprodukte durch MALDI-TOF-TOF versucht. Dabei konnte neben einem 21 Aminosäuren (As) großen Peptid, welches den His₆-tag enthält, noch zwei weitere Peptide mit 16 und 8 As detektiert und zugeordnet werden (Abb. 3.7). Diese Peptide zeigten allesamt keine Modifikationen durch die Ameisensäurespaltung.

Aufgrund der geringen Sequenzabdeckung wurde als weitere Methode eine Chloroform/Methanol-Präzipitation einer Probe von gereinigtem VKOR durchgeführt, gefolgt von einer Reinigung über eine Sephadex LH-20-Säule, mit der noch vorhandene Detergenzien und Salze abgetrennt werden sollten (Venter *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte in der sich anschließenden Untersuchung mittels ESI-MS nicht ein Peptid mit der Masse des gesamten VKOR, sondern nur ein Fragment mit einer wesentlich kleineren Masse von 4933 Da detektiert werden (siehe Abb. 3.7).

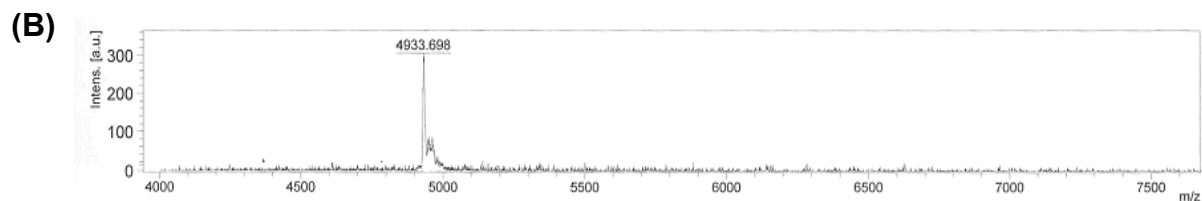


Abb. 3.7 Massenspektrometrische Analyse des nach der Ameisensäurespaltung isolierten VKOR-Peptids.

(A) Die Aminosäuresequenz des VKOR-Peptids, das aus der Ameisensäurespaltung resultiert, ist gezeigt. Die eigentliche VKOR-Aminosäuresequenz ist fett hervorgehoben. Bereiche des Proteins, die durch proteolytischen Verdau und MALDI-TOF-TOF identifiziert wurden, sind orange unterstrichen, während das C-terminale Fragment, das durch Chloroform/Methanol-Präzipitation und ESI-MS identifiziert werden konnte grün unterstrichen ist. (B) Das Spektrum einer ESI-MS-Analyse mit dem C-terminalen VKOR-Fragment ist zu sehen.

Eine nähere Analyse ergab, dass dieses Fragment den 41 C-terminalen Aminosäuren von VKOR entspricht und vermutlich als ein Nebenprodukt der Ameisensäurespaltung nach dem Asp131 gebildet wurde. Das erhaltene Fragment umfasste neben dem His₆-tag auch das aktive Zentrum von VKOR und zeigte keine Hinweise auf Modifikationen der detektierten Aminosäurereste infolge der Ameisensäurespaltung.

3.5 Etablierung des Assays der enzymatischen Aktivität mit transient VKOR exprimierenden HEK293-Zellen

Für die Etablierung eines Assays zur Bestimmung der VKOR-Enzymaktivität wurden HEK293-Zellen verwendet, die VKOR nach Transfektion mit dem Plasmid pCEP4-VKOR transient exprimierten (Kapitel 2.10.2). Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Johannes Oldenburg (Uni-Klinik Bonn) zur Verfügung gestellt.

Die Bestimmung der VKOR-Enzymaktivität basiert auf bereits publizierten Verfahren (Rost *et al.*, 2004; Wallin *et al.*, 1985) und wurde mit geringen Änderungen verwendet, um VKOR-exprimierende HEK293-Zellen und rekombinant produziertes,

renaturiertes VKOR vergleichen zu können (Kapitel 2.10.3). Die transient VKOR-exprimierenden HEK293-Zellen dienten vorrangig zur Validierung geeigneter Testbedingungen wie z.B. dem pH-Wert, der Untersuchung des Einflusses diverser Puffer sowie des His-tags und wurden außerdem in initialen Aktivitätstests zur Detektion der Aktivität von rekombinantem, renaturiertem VKOR als Positivkontrollen mitgeführt.

Der in dieser Arbeit verwendete VKOR-Aktivitätsassay (Kapitel 2.10.3) beruht auf einem Umsatz von Vitamin K Epoxid durch renaturiertes VKOR oder transfizierte HEK293-Zellen in Gegenwart des Reduktionsmittels DTT, der durch Zugabe von Coumarin-ähnlichen Verbindungen, z.B. Warfarin (Coumadin®) spezifisch gehemmt werden kann (Chu *et al.*, 2006; Rost *et al.*, 2004; Kapitel 1.2; siehe Abb. 3.8A).

Nach der erfolgter Inkubation im Dunkeln bei 30 °C wird die Reaktion abgestoppt und die organische Phase mit den Vitamin K-Derivaten extrahiert und evaporiert. Der Rückstand wurde in Ethanol aufgenommen und die darin gelösten Vitamin K-Derivate mittels RP-HPLC quantifiziert (siehe Abb. 3.8B, Kapitel 2.10.4).

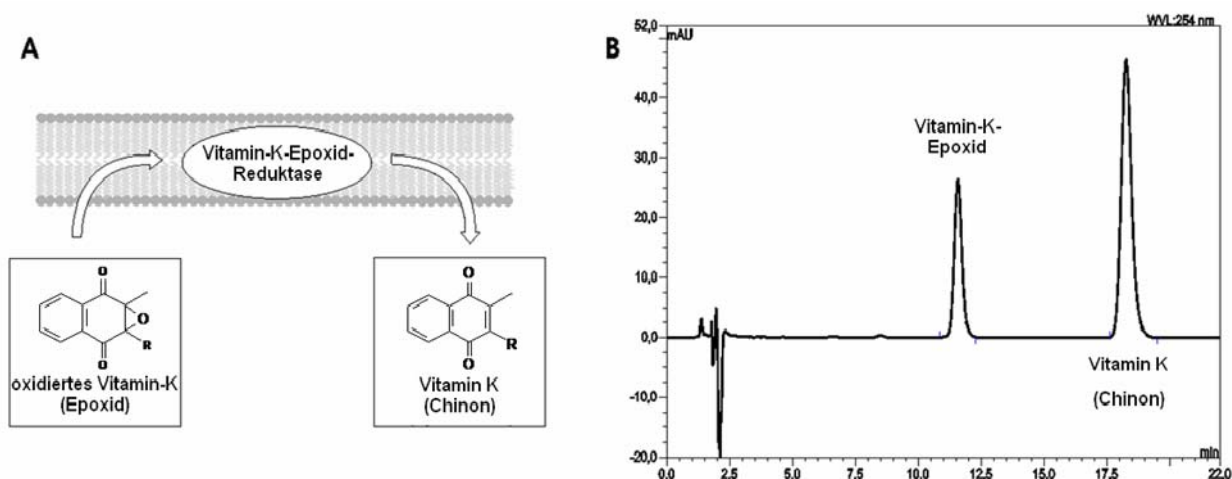


Abb. 3.8 Quantifizierung des Vitamin K Epoxid-Umsatzes im VKOR-Aktivitätsassay. Der VKOR-Aktivitätstest verfolgt die Reduktion von Vitamin K Epoxid zu Vitamin K (A). Die Quantifizierung der Vitamin K-Derivate erfolgt nach Isopropanol/Hexan-Extraktion durch chromatografische Auftrennung (B) auf einer C18-RP-HPLC-Säule (Dionex Acclaim 120, C18). Protokoll modifiziert nach Wallin *et al.* 1985.

3.5.1 Einfluss des pH-Wertes im VKOR-Aktivitätstest

Da von verschiedenen Arbeitsgruppen teils sehr unterschiedliche pH-Werte für den VKOR-Aktivitätsassay publiziert sind (Chu *et al.*, 2006; Rost *et al.*, 2004; Wallin *et al.*, 1985), wurde anhand VKOR-exprimierender HEK293-Zellen untersucht, welchen Einfluss der pH-Wert auf die Enzymaktivität von VKOR ausübt. Der untersuchte pH-

Bereich wurde gewählt, weil die Reinigung und Renaturierung des Proteins bei pH 8,0 erfolgte und der pH-Bereich während des Aktivitätstest nicht sehr stark davon abweichen sollte, um Proben von verschiedenen Zeitpunkten (z.B. vor Renaturierung, nach Renaturierung, nach Rekonstitution) einzubeziehen und vergleichen zu können. Es wurde eine deutliche pH-Abhängigkeit festgestellt (siehe Abb. 3.9). Eine Senkung des pH-Wertes von 8,3 auf 7,6 bewirkte eine Halbierung der gemessenen Enzymaktivität. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Einfluss des pH-Wertes auf die gemessene Enzymaktivität nicht unerheblich ist, wie dies in früheren Untersuchungen von VKOR in Präparationen aus Rattenlebermikrosomen berichtet wurde (Wallin *et al.*, 1985).

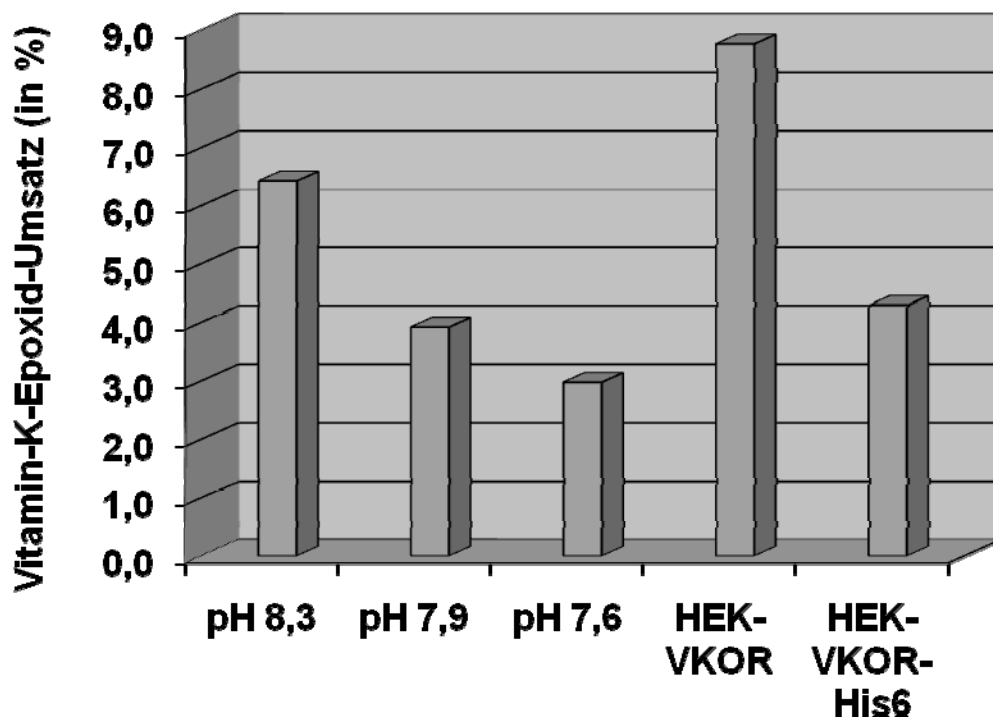


Abb. 3.9 Einfluss des pH-Wertes und des C-terminalen Hexahistidin-tag im VKOR-Aktivitätstest

Mit VKOR-exprimierenden HEK293-Zellen wurde der Einfluss des pH-Wertes und des C-terminalen His₆-tag auf die VKOR-Enzymaktivität untersucht. Dabei kann eine Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert bei dem der Aktivitätsassay durchgeführt wird, beobachtet werden. Die enzymatische Aktivität von Zellen, die VKOR mit einem C-terminalen His₆-tag exprimieren, ist im Vergleich zu Zellen, die das Wildtyp-Protein exprimieren, deutlich reduziert.

Infolge dieser Ergebnisse wurden alle Messungen der VKOR-Enzymaktivität bei einem pH von 8,3 durchgeführt. Der Bereich über einem pH von 8,3 wurde nicht berücksichtigt, weil davon ausgegangen wurde, dass die Cysteingruppen des Proteins im aktiven Zentrum, aufgrund ihres pK_a-Wertes, dann überwiegend deprotoniert vorliegen würden und es zu einer Verschiebung des Reaktionsgleich-

gewichtetes kommen könnte. Möglicherweise könnten diese Bedingungen zu einer sehr hohen Hintergrundaktivität beitragen, wie sie bei Chu *et al.*, 2006 für Proben mit nicht-rekonstituiertem VKOR zu sehen ist.

3.5.2 Einfluss des C-terminalen Hexahistidin-tags im VKOR-Aktivitätstest

Ebenso wurde mittels transient VKOR-exprimierender HEK293-Zellen der Einfluss eines C-terminalen His₆-tags untersucht, um Rückschlüsse auf die Aktivität des rekombinant hergestellten, renaturierten VKOR ziehen zu können. Dafür wurde in dem pCEP4-VKOR-Plasmid durch ortsgerichtete Mutagenese eine Sequenz eingefügt, die für einen His₆-tag kodiert, der ebenso wie beim renaturierten VKOR aus dem pET31b-Vektor über einen kurzen Linker (-Leu-Glu-) am C-Terminus angebracht ist (Kapitel 2.8.9). HEK-Zellen, die nach Transfektion mit diesem Plasmid (pCEP4-VKOR-His₆) transient VKOR mit einem C-terminalen Hexahistidin-tag exprimierten, wiesen gegenüber dem Wildtyp-VKOR eine um etwa 50 % reduzierte Aktivität auf (siehe Abb. 3.9). Es lässt sich also feststellen, dass die Einbringung eines His₆-tags die VKOR-Aktivität im Vergleich zum unmodifizierten Protein vermindert. Dieser Effekt muss berücksichtigt werden, falls man die Aktivität des rekombinant hergestellten VKOR mit der des Wildtyp-Proteins vergleichen möchte (Kapitel 3.7.7).

3.6 In vitro Renaturierung von humanem VKOR

Um VKOR in dessen funktionelle, native Form zu überführen, wurde das isolierte VKOR-Peptid mittels eines Systems zurückgefaltet (Kapitel 2.9.13), das auf dem in der Literatur beschriebenen *artificial chaperone assisted refolding* basiert (Rozema *et al.*, 1996). Die Methode ist eine Form der Rückfaltung durch schnelles Verdünnen, die routinemäßig zur Renaturierung eingesetzt wird (De Bernardez Clark *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 1996). Sie beruht auf einem Austausch des SDS gegen mildere, nicht denaturierend wirkende Detergenzien, wodurch eine Faltung des Proteins in eine native Konformation ermöglicht wird. Hierbei wird das SDS bevorzugt durch das zugesetzte Methyl- β -Cyclodextrin gebunden (*stripping*-Schritt), wodurch das Protein mit den milden, nicht-denaturierend wirkenden Detergenzien DDM und CHAPS, in Kontakt treten und in eine native Konformation falten kann. Die verwendete

Kombination dieser Detergenzien wurde bereits bei der Solubilisierung des Cannabinoid-Rezeptors erfolgreich eingesetzt (Yeliseev *et al.*, 2005, 2007). Um die Bildung von Proteinaggregaten zu minimieren, wurde das Verfahren mit der Technik der Pulsrenaturierung kombiniert (Nguyen *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 2002). Bei der Pulsrenaturierung wird das Protein sukzessive in zeitlich voneinander getrennten Pulsen zum Rückfaltungsansatz gegeben, um die Konzentration von ungefaltetem Protein und damit die Aggregationsneigung während des gesamten Renaturierungsprozesses gering zu halten.

In initialen Experimenten wurde zunächst die Löslichkeit von VKOR in Rückfaltungspuffern mit verschiedenen Additiven (0,5 M KCl, 30 % (v/v) Glycerol, 1 M L-Arginin) untersucht, die die Aggregation von Proteinen unterbinden sollen (Rudolph *et al.*, 1996). Dafür wurde die Proteinkonzentration in den Puffer schrittweise erhöht, bis makroskopische Proteinaggregate beobachtet werden konnten.

Dabei zeigte sich keine nennenswerte Löslichkeit von VKOR in Rückfaltungspuffern mit 0,5 M KCl oder ohne Additive, während in dem Rückfaltungspuffer mit 30 % (v/v) Glycerol Proteinkonzentrationen bis zu 20 µg/ml toleriert wurden. Mit 1 M Arginin als Additiv waren sogar bis zu einer Konzentration von über 40 µg/ml keinerlei Aggregate sichtbar, weshalb im Folgenden Arginin-basierte Rückfaltungspuffer verwendet wurden.

3.6.1 Einfluss der Proteinkonzentration auf die *in vitro* Renaturierung

Die Quantifizierung der spezifischen VKOR-Aktivität (siehe Kapitel 2.10.4) erfolgte in der gesamten Arbeit bezogen auf die Menge von gereinigtem, rekombinantem VKOR, welches für die Renaturierung eingesetzt wurde, also in der Regel ausgehend von 21 µg VKOR pro ml Renaturierungspuffer am Ende der Rückfaltung (nach sieben Pulsen). Die Menge von VKOR, die tatsächlich rekonstituiert wurde, kann durch Flotation der Lipidfraktion (Kapitel 3.7.4) mit dem assoziierten Protein und nachfolgender Bestimmung der Proteinkonzentration (Kapitel 2.9.5) abgeschätzt werden.

Um den Einfluss der Proteinkonzentration während der Renaturierung zu untersuchen, wurde VKOR in vier 45 ml-Faltungsansätzen parallel zurückgefaltet (Kapitel 2.9.13) wobei 1,5 µg, 3 µg, 4,5 µg, 6 µg VKOR-Protein je ml Renaturierungspuffer pro Puls zugesetzt wurden. Ab dem zweiten Puls wurden nach jedem Puls jeweils 7,5 ml des Rückfaltungsansatzes aufkonzentriert, in POPC rekonstituiert

(Kapitel 2.9.15, 1 ml konz. Protein + 0,33 ml Lipidlösung) und die enzymatische Aktivität bestimmt (Kapitel 2.10.3). Dabei zeigte sich in allen Ansätzen ein kontinuierlicher Anstieg der Aktivität, der mit dem Ansteigen der Proteinkonzentration während der Pulsrenaturierung korreliert. Für die beiden Ansätze, in denen größere Proteinmengen pro Puls eingesetzt wurden, erfolgte der Anstieg jedoch nicht linear zur Menge des in der Rückfaltung eingesetzten VKOR (siehe Abb. 3.10). Man erhält bei dem Ansatz mit 3 µg Protein je ml Renaturierungspuffer pro Puls verglichen mit dem 1,5 µg/ml-Ansatz, wie erwartet etwa die doppelte Aktivität.

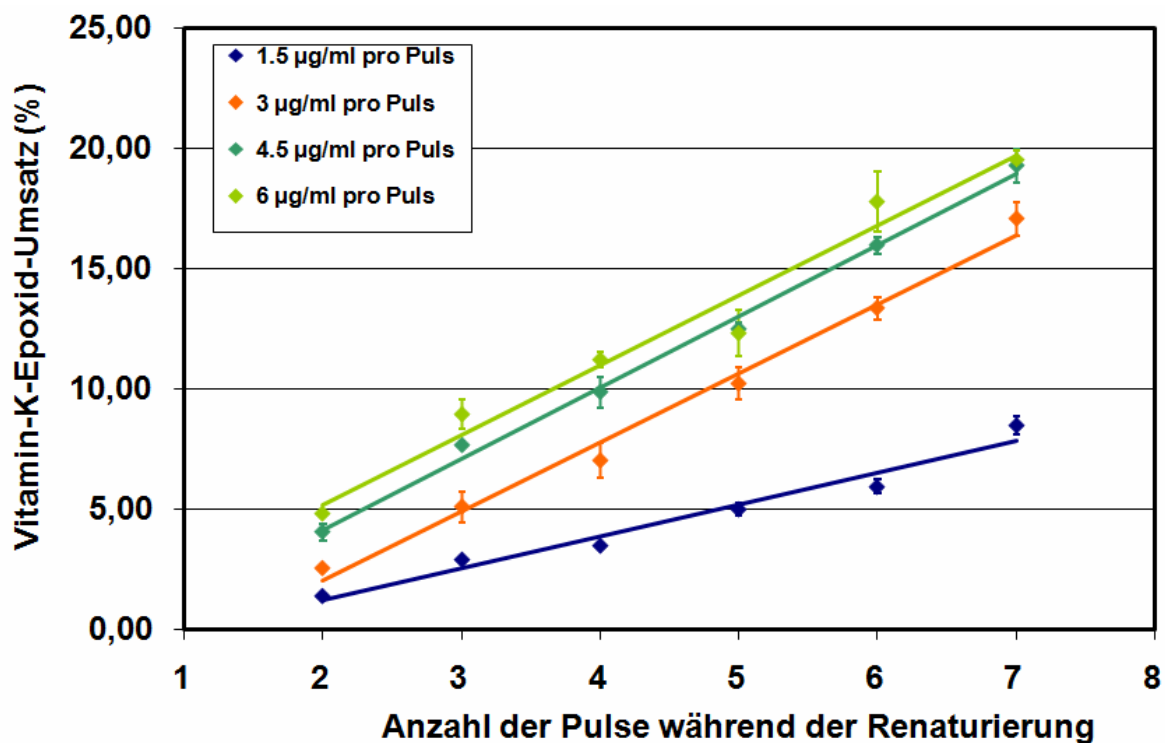


Abb. 3.10 Vitamin K Epoxid-Umsatz in Abhängigkeit der applizierten Proteinmenge pro Puls während der Renaturierung

In den untersuchten Renaturierungsansätzen wurden unterschiedliche Proteinmengen pro Puls appliziert. In allen Ansätzen steigt die Enzymaktivität durch den Anstieg der Menge von nativem Protein von Puls zu Puls stetig an. Bei den Ansätzen mit 4,5 µg/ml und 6 µg/ml pro Puls korreliert der Anstieg jedoch nicht mit der applizierten Gesamtproteinmenge im Vergleich zu den Ansätzen mit geringeren Proteinkonzentrationen. Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=3$).

Dagegen sind die Aktivitäten für die anderen Ansätze mit 4,5 µg/ml und 6 µg/ml VKOR-Protein zwar etwas höher als im 3 µg/ml-Ansatz, jedoch nicht wie erwartet 3- bzw. 4-mal so hoch wie im 1,5 µg/ml-Ansatz. Dies drückt sich ebenfalls in der spezifischen Aktivität der unterschiedlichen Ansätze aus (siehe Abb. 3.11). Während die spezifische Aktivität des 1,5 µg/ml-Ansatzes und des 3 µg/ml-Ansatzes dicht beieinander liegen, weisen die anderen beiden Ansätze ab dem vierten Puls deutlich

geringere Werte auf. Daher wurden bei allen weiteren Experimenten jeweils 3 μg Protein je ml Renaturierungspuffer pro Puls zur Rückfaltung von VKOR eingesetzt, um möglichst große Mengen zu renaturieren und gleichzeitig Verluste der spezifischen Enzymaktivität, wie sie durch Aggregation oder Faltung in enzymatisch inaktive Zustände auftreten können, zu vermeiden.

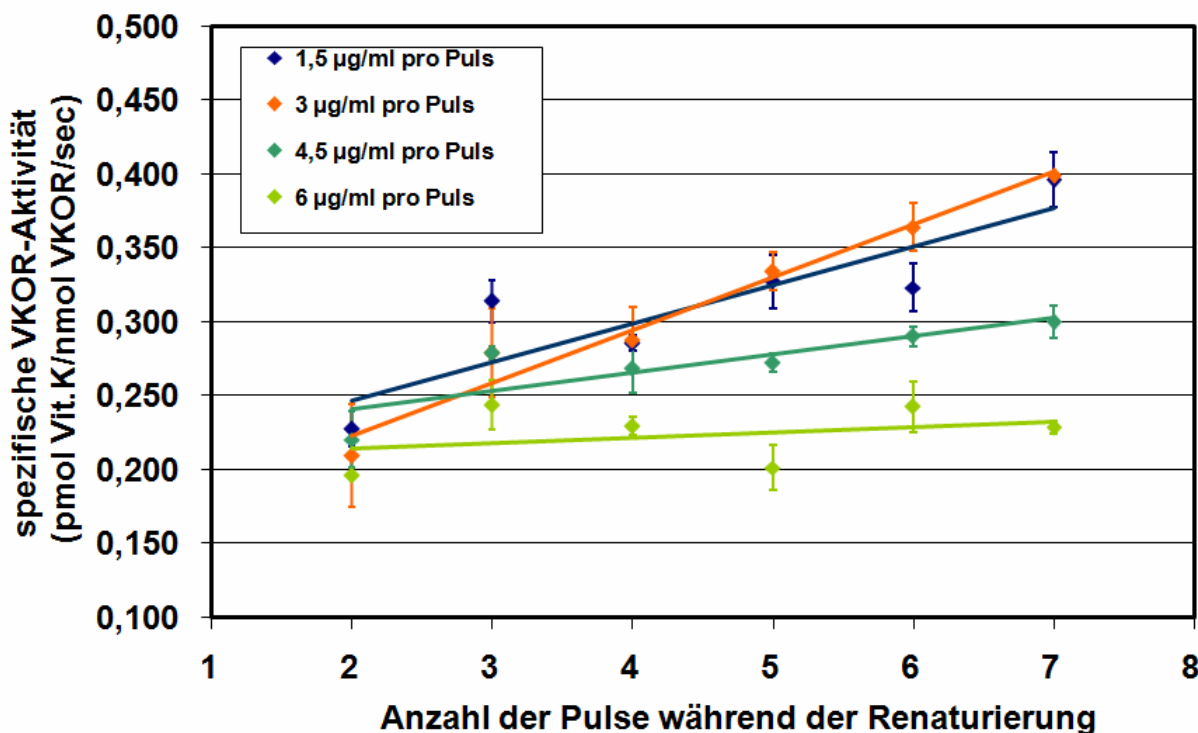


Abb. 3.11 Spezifischer Vitamin-K-Umsatz in Abhängigkeit von der applizierten Proteinmenge pro Puls während der Renaturierung.

In den untersuchten Renaturierungsansätzen wurden unterschiedliche Proteinmengen pro Puls appliziert. Die spezifische VKOR-Enzymaktivität der Ansätze mit 4,5 $\mu\text{g/ml}$ und 6 $\mu\text{g/ml}$ pro Puls ist gegenüber den Ansätzen mit 1,5 $\mu\text{g/ml}$ und 3 $\mu\text{g/ml}$ pro Puls deutlich verringert. Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=3$).

3.6.2 Einfluss des pH-Wertes während der *in vitro* Renaturierung

Für die Ausbeute an nativ gefaltetem Protein ist der pH-Wert während der *in vitro* Renaturierung ein wichtiger Parameter (Narita *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2002; Rudolph *et al.*, 2009). Ist die Wechselwirkung zwischen geladenen Aminosäureseitenketten oder die Ausbildung strukturell wichtiger Disulfidbrücken der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Faltung, kann man beispielsweise die Bildung von Thiolat-Anionen während der Renaturierung durch hohe pH-Werte beschleunigen. Das in der ER-Membran lokalisierte VKOR besitzt insgesamt 7 Cysteinreste, von denen sehr wahrscheinlich mindestens zwei (Cys43 und Cys51) zum ER-Lumen exponiert sind und eine Disulfidbrücke bilden können (Li *et al.*, 2010). Somit ist ein

Einfluss des pH-Wertes auf die Renaturierung von VKOR nicht auszuschließen. Da die Thiolatgruppe von Cysteinen einen pK_a -Wert von etwa 8,27 aufweist, wurde die Renaturierung im pH-Bereich zwischen 7,5 und 8,7 untersucht. Dafür wurden vier Renaturierungsansätze mit unterschiedlichem pH-Werten (pH 7,5; pH 7,9; pH 8,3 und pH 8,7) parallel zurückgefaltet. Anschließend wurden alle Ansätze in POPC rekonstituiert und deren enzymatische Aktivität bestimmt.

Tab. 3.2 Einfluss des pH-Werts während der Renaturierung.

Die Renaturierung von VKOR wurde bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die gemessenen Enzymaktivitäten des rekonstituierten Proteins zeigen nur geringe Abweichungen voneinander. Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=3$).

pH-Wert des Rückfaltungspuffers	spezifische VKOR-Aktivität (pmol Vit.K/nmol VKOR/sec)	spezifische VKOR-Aktivität mit Warfarin (pmol Vit.K/nmol VKOR/sec)
7,5	0,212 $\pm$ 0,007	0,021 $\pm$ 0,004
7,9	0,197 $\pm$ 0,010	0,028 $\pm$ 0,002
8,3	0,228 $\pm$ 0,019	0,024 $\pm$ 0,002
8,7	0,167 $\pm$ 0,005	0,024 $\pm$ 0,004

Dabei konnte keine Präferenz oder gar ein Optimum für einen bestimmten pH-Wert im untersuchten Bereich festgestellt werden (siehe Tab. 3.2). Lediglich der Wert für VKOR, das bei pH 8,7 zurückgefaltet wurde, fällt leicht gegenüber den anderen Bedingungen ab. Eine deutliche Steigerung der enzymatischen VKOR-Aktivität infolge einer verstärkten Renaturierung des Enzyms bei hohem pH-Wert konnte nicht gezeigt werden.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluss der Zusatz eines Redoxsystems aus reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH 2 mM : GSSG 1 mM) auf die Renaturierung von VKOR haben würde. Ein solches System ist ebenfalls geeignet, um die Bildung wichtiger Disulfidbrücken während der Faltung von VKOR zu unterstützen (Narita *et al.*, 2011; De Bernardez Clark *et al.*, 1999; De Bernardez Clark, 2001; Lilie *et al.*, 1998). Weitere Renaturierungsansätze enthielten ein Reduktionsmittel (4 mM TCEP oder 4 mM DTT). In diesen Ansätzen sollte die Renaturierung weniger effizient verlaufen, sofern sie von der Ausbildung von Disulfidbrücken abhängt. Zuvor veröffentlichte Daten (Chu *et al.*, 2006) zeigten, dass

der Zusatz eines Reduktionsmittels während der Rekonstitution von VKOR in Lipide einen entscheidenden Einfluss hatte. Daher könnte eine Rückfaltung unter reduzierenden Bedingungen möglicherweise zu verstärkter VKOR-Renaturierung führen, wenn man annimmt, dass VKOR unter reduzierenden Bedingungen in einer nativen Konformation stabilisiert wird. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Ansätze mit GSH/GSSG-Redoxsystem, TCEP oder DTT zeigten jedoch keine signifikante Änderung im Vergleich zu Renaturierungsansätzen ohne diese Komponenten (siehe Abb. 3.12) und steht damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Renaturierung bei verschiedenen pH-Werten. Somit scheint die Ausbildung von Disulfidbrücken für die Renaturierung von VKOR nicht bestimmend zu sein. Aber auch reduzierende Bedingungen scheinen nicht zu einer stärkeren Renaturierung des Proteins beizutragen, da kein höherer Vitamin K Epoxid-Umsatz beobachtet werden konnte.

3.6.3 Einfluss des verwendeten Detergens auf die Renaturierung

Das Detergens bzw. Detergensgemisch, das während der Renaturierung anstelle des SDS zur Solubilisierung des Membranproteins tritt, kann durch seine Interaktion mit VKOR maßgeblich bestimmen, inwieweit eine Faltung in eine native, enzymatisch aktive Form möglich ist. Um diesen Einfluss einschätzen zu können, wurde die Detergensenzusammensetzung während der *in vitro* Renaturierung variiert. Zum einen wurde DDM durch n-Octyl- β -D-galactopyranosid (OG) substituiert, so dass die Renaturierung in einem Detergensgemisch aus OG (1,5% (w/v), 3x cmc) und CHAPS (0,1 % (w/v), 0,2x cmc) anstelle von DDM (0,1% (w/v), 10x cmc) und CHAPS (0,1 % (w/v), 0,2x cmc) (Kapitel 2.9.13) durchgeführt wurde. Zum anderen wurde die *in vitro* Renaturierung in Gegenwart von DDM ohne den Zusatz von CHAPS untersucht.

Das Detergens OG, das auch während der Rekonstitution (Kapitel 2.9.15) eingesetzt wird, besitzt wie DDM eine Zuckerkopfgruppe und ist ein nicht-ionisches Detergens (beide gehören zur Gruppe der Alkylglucoside). Es weist jedoch eine deutlich kürzere aliphatische Alkylkette auf, die die hydrophoben Kontakte zum Membranprotein vermittelt (siehe Anhang 3). CHAPS ist ein mildes, wenig denaturierend wirkendes, zwitterionisches Detergens. Die Verwendung eines solchen ionischen Detergens in gemischten Mizellen, kann daher neben veränderten Interaktionen mit dem darin solubilisierten Membranproteinen, auch einen Einfluss auf die Verteilung elektro-

statischer Ladungen auf der Mizellenoberfläche haben und somit die Eigenschaften der Mizellen beeinflussen.

Nach der Rekonstitution des OG/CHAPS-Renaturierungsansatzes war keine enzymatische VKOR-Aktivität zu beobachten (siehe Abb. 3.12), während VKOR, das in Gegenwart von DDM und CHAPS rückgefaltet wurde, eine deutliche enzymatische Aktivität zeigte, die durch Warfarin spezifisch gehemmt werden kann. Bei der Rückfaltung, in der anstelle des DDM/CHAPS-Gemisches nur DDM allein verwendet wurde, zeigte sich interessanterweise ein deutlicher Rückgang der VKOR-Enzymaktivität (siehe Abb. 3.12). Die Zugabe von CHAPS im Renaturierungsansatz wirkt sich somit deutlich positiv auf die Menge an renaturiertem VKOR aus.

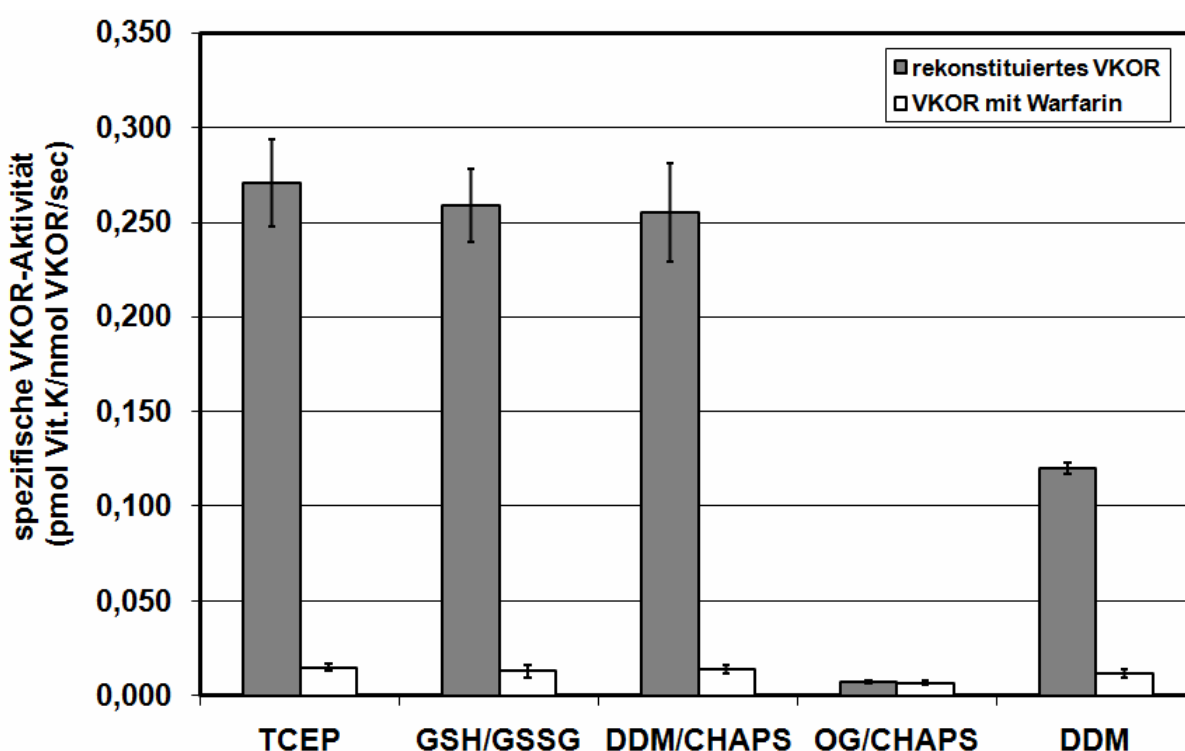


Abb. 3.12 Einfluss des Detergens und der Redoxbedingungen auf die Renaturierung von VKOR.

VKOR wurde unter unterschiedlichen Bedingungen renaturiert und die Enzymaktivität bestimmt. TCEP: mit Zusatz von 4 mM TCEP zum Rückfaltungspuffer; GSH/GSSG: Zusatz eines Redoxsystems aus 2 mM GSH und 1 mM GSSG; DDM/CHAPS: Standard-Renaturierung; OG/CHAPS: Renaturierung mit OG/CHAPS-Renaturierungspuffer; DDM: Renaturierung in DDM-Renaturierungspuffer (ohne CHAPS). Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (n=3).

3.7 Rekonstitution von *in vitro* renaturiertem VKOR

Integrale Membranproteine sind in nativen Systemen in der Doppellipidschicht der Zellmembran bzw. in den Membranen der Zellkompartimente eingebettet. Oftmals hat die Zusammensetzung und die biophysikalischen Eigenschaften dieser Lipid-

membranen einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität und Funktion des Proteins (Bowie, 2001; Opekarova *et al.*, 2003). Weiterhin bestehen deutliche Unterschiede zwischen einem Membranprotein, das solubilisiert in Detergens-Mizellen vorliegt und einem in einer Lipiddoppelschicht, ähnlich der nativen Membran, rekonstituierten Protein. Für Detergenzien besteht ein schnelles Gleichgewicht zwischen Detergens-Monomeren in wässriger Lösung und den Detergensmolekülen der Mizellen, was auch als „dissoziativer Charakter“ bezeichnet wird (Popot *et al.*, 2003) und den Einsatz von Detergenzien zur Solubilisierung von Membranproteinen ermöglicht. Stabilisierend wirkende inter- und intramolekulare Interaktionen werden dadurch jedoch vermindert, was sich in einer verstärkten Tendenz zur Aggregation oder in einer reduzierten Aktivität des Proteins zeigen kann. Dagegen weist eine Lipidumgebung keinen solchen dissoziativen Charakter und damit andere biophysikalische Eigenschaften auf.

3.7.1 Einfluss der Renaturierung und Rekonstitution auf die VKOR-Aktivität

Zunächst wurde untersucht, ob VKOR aus dem Renaturierungsansatz ohne nachfolgende Rekonstitution eine enzymatische Aktivität zeigt. Während des Renaturierungsschrittes (Kapitel 2.9.13) erfolgte bereits der Austausch des Detergens SDS gegen die Detergenzienkombination aus DDM und CHAPS, welche die Faltung von VKOR in eine native Konformation erlauben sollte. Somit hätte man erwarten können, dass VKOR bereits nach diesem Schritt eine nachweisbare Enzymaktivität zeigen würde. Es konnte allerdings keine VKOR-Aktivität für diesen Ansatz („VKOR⁺-POPC“) nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.13).

Daher wurde VKOR nach dem Renaturierungsschritt in eine Lipidumgebung rekonstituiert (Kapitel 2.9.15; Karlsson *et al.*, 2003; Wijngaards *et al.*, 1977), die eventuell besser geeignet sein würde, um die biophysikalischen Eigenschaften der ER-Membran zu simulieren. Als Lipid wurde POPC eingesetzt, das ein Hauptbestandteil der nativen Membran ist (Waskell *et al.*, 1982). Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, der Renaturierungspuffer ohne zugegebenes VKOR enthielt („Puffer+POPC“). Nach erfolgter Rekonstitution des renaturierten VKOR konnte eine signifikante VKOR-Aktivität nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.13; „VKOR⁺+POPC“), die durch Warfarin gehemmt werden kann, während die Negativkontrolle keinerlei enzymatische Aktivität zeigte. Um festzustellen, ob eine

Renaturierung von VKOR nach Rekonstitution in Lipide spontan erfolgt, wurde eine Probe von gereinigtem VKOR, das in SDS-Mizellen vorliegt, direkt und ohne den Renaturierungsschritt in POPC rekonstituiert („VKOR⁺+POPC“). In diesem Ansatz konnte jedoch keine enzymatische Aktivität beobachtet werden (siehe Abb. 3.13). Eine spontane Faltung des VKOR-Proteins in einen funktionell aktiven Zustand innerhalb der Lipidumgebung kann daher ausgeschlossen werden. Der Schritt der Rückfaltung mittels *artificial chaperone assisted refolding* in Rückfaltungspuffer mit DDM/CHAPS ist somit essentiell, um nach der Rekonstitution zu aktivem VKOR zu gelangen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob die verwendeten Detergenzien durch die exzessive Dialyse komplett aus den Rekonstitutionsansätzen entfernt werden konnten (Kapitel 2.9.15). Somit ist nicht zweifelsfrei geklärt, ob das Protein nach der Rekonstitution in Liposomen oder Bizellen vorliegt. Eine elektronenmikroskopische Analyse des rekonstituierten Proteins würde mehr Klarheit bringen, konnte in der vorhandenen Zeit aber nicht mehr durchgeführt werden.

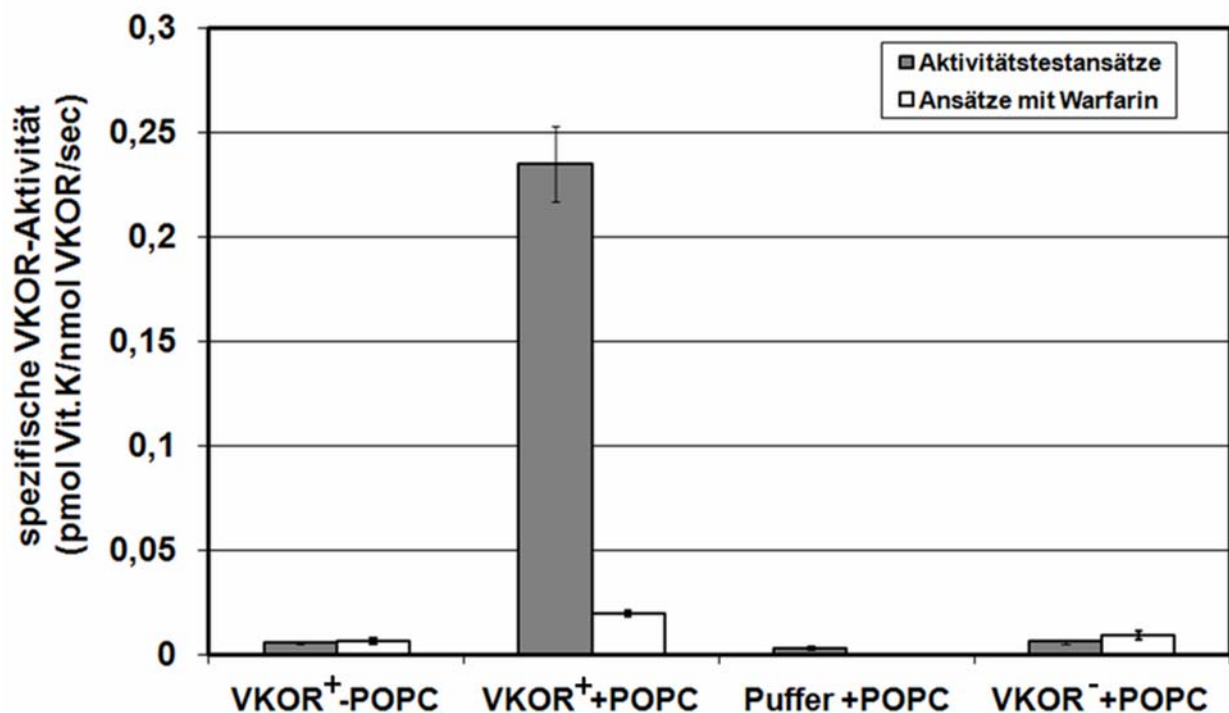


Abb. 3.13 Einfluss der Renaturierung und Rekonstitution auf VKOR-Aktivität.

VKOR aus der Renaturierung wurde ohne Rekonstitution direkt für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität verwendet („VKOR⁺-POPC“). VKOR, das nach der Renaturierung rekonstituiert wurde, zeigte eine deutliche enzymatische Aktivität („VKOR⁺+POPC“), während eine Kontrolle mit Renaturierungspuffer ohne VKOR nach der Rekonstitution keine Aktivität aufwies („Puffer+POPC“). Die direkte Rekonstitution von gereinigtem VKOR in POPC ohne vorherige Renaturierung führte ebenfalls nicht zu aktivem Protein („VKOR⁺+POPC“). Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (n=3).

Die Aktivität von VKOR scheint jedoch strikt an das Vorliegen einer Lipidumgebung gebunden zu sein. Die Empfindlichkeit der enzymatischen VKOR-Aktivität gegenüber Detergenzien in früheren Arbeiten (Begent *et al.*, 2001; Cain *et al.*, 1997; Mukharji *et al.*, 1985; Wallin *et al.*, 1997) und die Größe der entstandenen Spezies lassen vermuten, dass wahrscheinlich eher Liposomen entstanden sein könnten. Daher werden die erhaltenen Ergebnisse für das Vorliegen von VKOR-Proteoliposomen diskutiert.

3.7.2 Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von rekonstituiertem VKOR

Um die enzymatische Aktivität des rekonstituierten VKOR zu validieren, wurde versucht VKOR durch die Zugabe des Antagonisten Warfarin zu inhibieren (siehe Abb. 3.14). Es zeigte sich, dass VKOR spezifisch und konzentrationsabhängig gehemmt werden konnte. Der ermittelte IC_{50} -Wert von $2,5 \mu M$ ist in Übereinstimmung mit zuvor publizierten Werten in der Literatur (Chu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2004; Rost *et al.*, 2004).

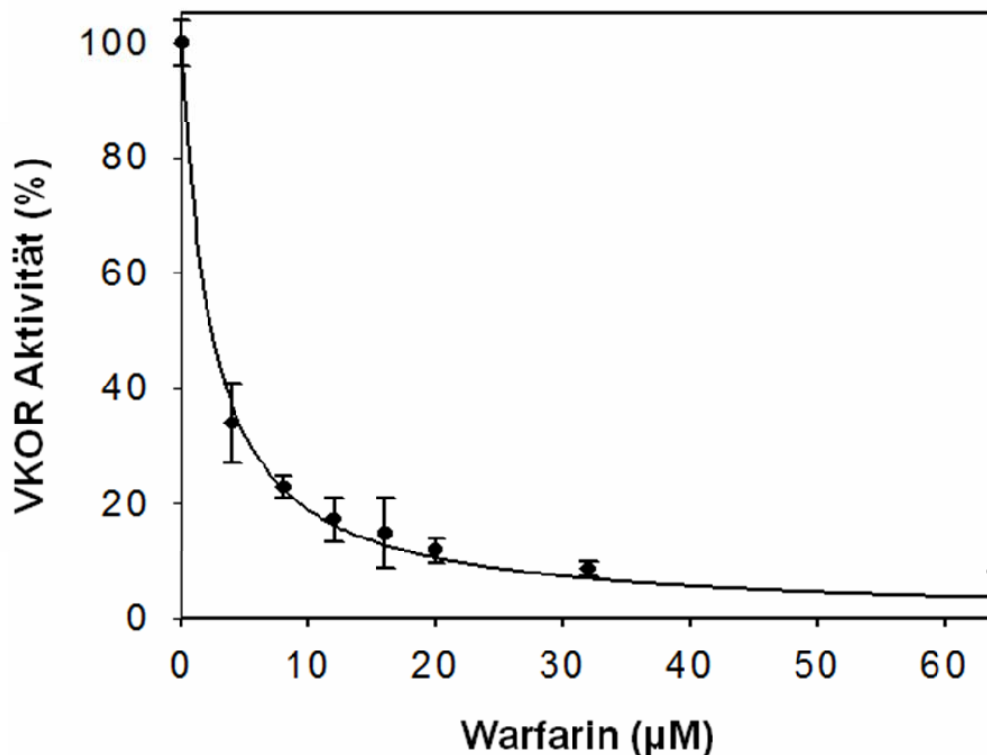


Abb. 3.14 Inhibierung von rekonstituiertem VKOR durch Warfarin.

Renaturiertes VKOR, welches in POPC rekonstituiert worden war, wurde durch Zugabe unterschiedlicher Warfarin-Konzentrationen inhibiert ($f = 128,74 * 4,56417 / (1,33041 * (1 + x/0,530263) + 4,56417)$, $R = 0,99818226$). Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=3$).

Weiterhin wurde eine Verlaufskurve der enzymatischen Reaktion in Gegenwart von je 17 nmol Vitamin K Epoxid und 37,5 µg VKOR (1,92 nmol), welches typische Mengen für die in dieser Arbeit verwendeten Aktivitätsassays sind, bestimmt (siehe Abb. 3.15). Dafür wurde die enzymatische Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt und der Umsatz von Vitamin K Epoxid quantifiziert. Es konnte ein linearer Anstieg des umgesetzten Substrats bis zu einer Dauer von mindestens einer Stunde angepasst werden ($f(x)=0,265 \cdot x$, $R^2=0,996$). Nach dieser Zeit kommt es zu einer Verlangsamung der Reaktion. Dies könnte durch die Abnahme der Konzentration an vorhandenem Substrat unter die Sättigungskonzentration oder durch die Annäherung der Reaktion an den Gleichgewichtszustand bedingt sein. Anhand dieser Resultate wurde daher eine maximale Inkubationszeit von 60 Minuten für die Aktivitätstests festgesetzt, da bis zu diesem Zeitpunkt eine Bestimmung von Umsatzraten für die enzymatische Reaktion möglich ist.

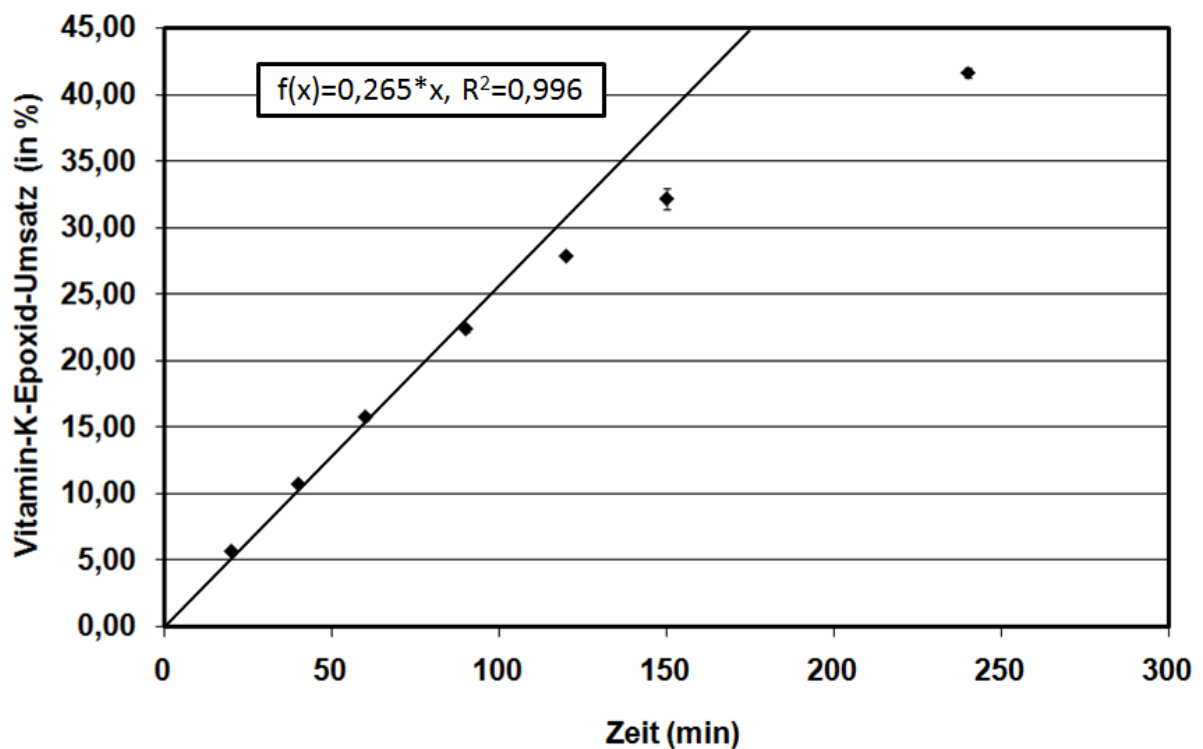


Abb. 3.15 Zeitabhängiger Verlauf der Umsetzung von Vitamin K Epoxid durch VKOR. Die Umsetzung von 17 nmol Vitamin K Epoxid durch renaturiertes, rekonstituiertes VKOR (1,92 nmol) wurde über einen Zeitraum von 4 h hinweg bestimmt. Dabei ist der Substratumsatz bis zu einer Dauer von 60 min im *steady state* (linearer Fit: $f(x)= 0,265 \cdot x$, $R^2= 0,996$), bevor es zu einer Verlangsamung der enzymatischen Reaktion kommt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=3$).

3.7.3 Optimierung der Rekonstitutionsbedingungen

Wie bereits gezeigt, konnte VKOR erfolgreich mittels *artificial chaperone assisted refolding* zurückgefaltet und rekonstituiert werden. Um jedoch die enzymatische Aktivität des rekonstituierten Proteins, die in initialen Experimenten nur etwa 0,04 pmol Vitamin K/nmol VKOR/sec betrug, und die damit korrelierende Menge an aktivem VKOR zu erhöhen, wurden die Rekonstitutionsbedingungen einer Optimierung unterzogen. Dabei wurden Parameter wie Detergengkonzentration von OG, das Protein : Lipid-Verhältnis und die Lipidzusammensetzung analysiert.

In initialen Versuchen zur Rekonstitution war beobachtet worden, dass bei der Rekonstitution von VKOR höhere Aktivitäten erreicht wurden, wenn das Detergens OG in einem 12-fachen molaren Überschuss gegenüber dem Lipid POPC eingesetzt wurde, anstelle eines molaren Verhältnisses von nur 4 : 1 (Daten nicht gezeigt).

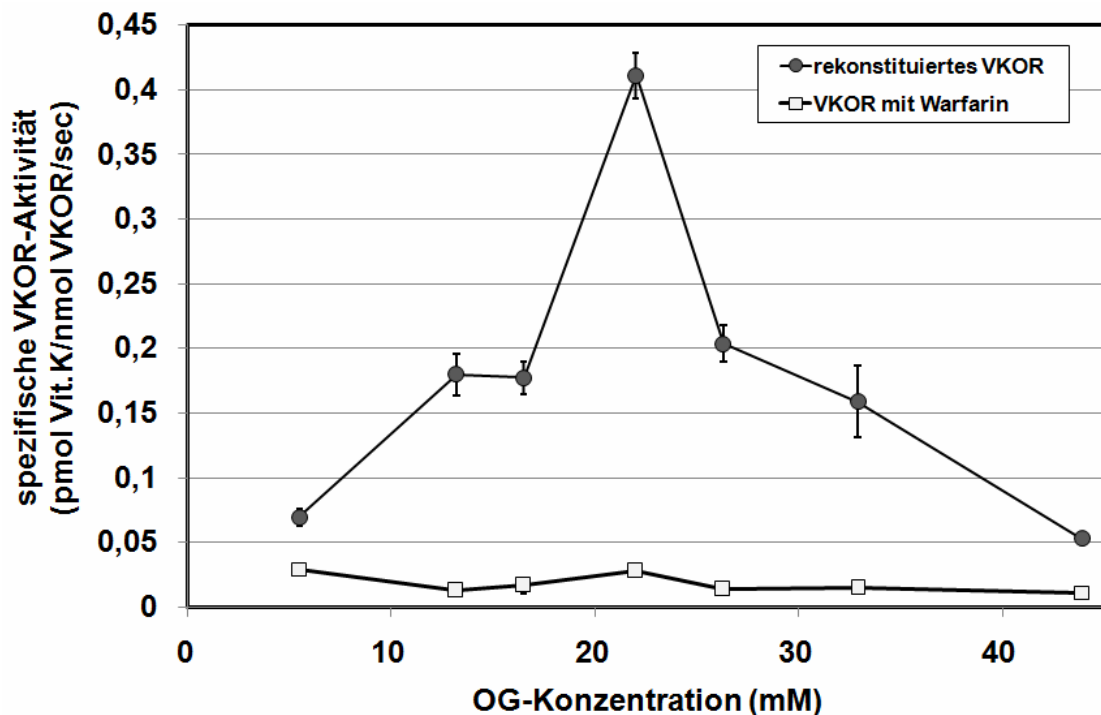


Abb. 3.16 Einfluss der OG-Konzentration im Rekonstitutionsansatz auf die VKOR-Aktivität.

Renaturiertes VKOR wurde in Gegenwart verschiedener OG-Konzentrationen rekonstituiert und die Enzymaktivität bestimmt. Das beobachtete Optimum für eine effiziente Rekonstitution von nativem VKOR liegt bei einer Endkonzentration von etwa 22 mM OG im Rekonstitutionsansatz vor der Entfernung des Detergens. Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=3$).

Daher wurde versucht, die Rekonstitutionseffizienz weiter zu verbessern, indem zu 3 ml rückgefaltetem VKOR ($315 \mu\text{g} = 16,15 \text{ nmol} = 4,0375 \mu\text{M}$), 1 ml Liposomen ($4 \text{ mg POPC} = 5,263 \mu\text{mol} = 1,316 \text{ mM}$) hinzugegeben wurden, die mit unterschiedlichen Mengen von OG (6,4 mg bis 51 mg) destabilisiert worden waren. Auf diese

Weise ergaben sich unterschiedliche Endkonzentrationen des Detergens OG im Rekonstitutionsansatz (zwischen 5,5 mM und 44 mM), während die Konzentration der anderen Detergenzien, des Proteins und des Lipids gleich blieb. Anschließend wurden die Rekonstitutionsansätze über 96 h hinweg dialysiert, bevor die enzymatische Aktivität untersucht wurde (Kapitel 2.10.3).

Bei der Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten zeigte sich, dass Rekonstitutionsansätze, die eine Endkonzentration von 22 mM OG vor der abschließenden Dialyse zur Entfernung der Detergenzien enthielten, die höchste VKOR-Aktivität zeigten (siehe Abb. 3.16). Das beobachtete Optimum für die Rekonstitution ist schmal, da bei einer Abweichung um 4 mM nur noch in etwa die Hälfte der enzymatischen Aktivität erreicht wird. Daher muss die OG-Konzentration sehr genau im Rekonstitutionsansatz eingestellt sein. Zwei Effekte könnten maßgeblich zu dieser Situation beitragen. Zum einen muss ausreichend Detergens vorhanden sein, um die Lipide im Ansatz zu solubilisieren und so die Insertion von VKOR in die Lipidumgebung zu befördern. Zum anderen könnte OG einen denaturierenden Effekt auf das renaturierte VKOR ausüben, so dass höhere Detergenzkonzentrationen die Menge an nativem VKOR und damit die enzymatische Aktivität beeinträchtigen.

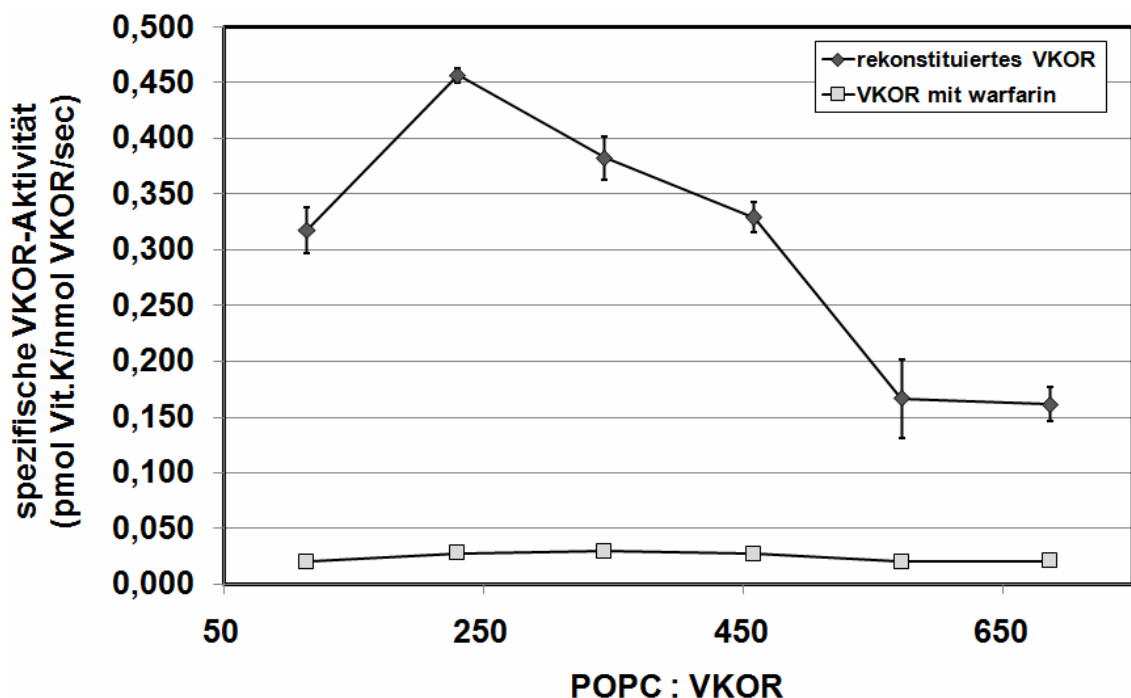


Abb. 3.17 Einfluss des Protein-Lipid-Verhältnisses auf die VKOR-Aktivität.

Renaturiertes VKOR wurde mit unterschiedlichen Mengen POPC rekonstituiert. Das beobachtete Optimum der VKOR-Aktivität liegt bei einem molaren Protein : POPC-Verhältnis von etwa 1 : 230. Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=3$).

Eine weitere wichtige Kenngröße der Rekonstitution ist das Verhältnis von Protein zu Lipid. Daher wurden zu 3 ml rückgefaltetem VKOR ($450\ \mu\text{g} = 23,08\ \text{nmol} = 5,77\ \mu\text{M}$) 1 ml POPC-Liposomen mit unterschiedlicher Lipidmenge (2 mg bis 12 mg = $2,631\ \mu\text{mol}$ bis $15,789\ \mu\text{mol} = 0,657\ \text{mM}$ bis $3,947\ \text{mM}$) hinzugegeben, die alle mit der gleichen Menge OG ($25,55\ \text{mg} = 88,1\ \mu\text{mol} = 22\ \text{mM}$) destabilisiert wurden. Somit ist in allen Ansätzen neben einer gleichen Protein- und DDM-Konzentration auch eine gleichmäßige OG-Konzentration eingestellt, so dass das Protein : Lipid-Verhältnis allein variiert wurde. Hierbei wurde ein Optimum für ein molares Protein : Lipid -Verhältnis von 1 : 230 beobachtet (siehe Abb. 3.17).

3.7.4 Einfluss des Lipids auf VKOR-Aktivität

Da VKOR nur nach Rekonstitution in eine Lipidumgebung enzymatisch aktiv ist (Kapitel 3.7.1), besitzen Lipide offenbar einen maßgeblichen Einfluss auf die Enzymaktivität von VKOR. Daher stellt sich die Frage, ob auch die Eigenschaften des Lipids die VKOR-Aktivität beeinflussen. So könnte zum Beispiel die Verwendung von Lipiden mit einer anderen Kopfgruppe oder anderen Alkylketten zu veränderten biophysikalischen Eigenschaften oder anderen Interaktionen mit dem eingebetteten Membranprotein führen (Lee, 2004)

In der nativen Membran existiert eine Mischung von verschiedenen Lipiden, die jedoch nicht zufällig und gleichmäßig in der Membran verteilt sind (Zachowski, 1993), sondern deren Verteilung neben Diffusionsprozessen durch verschiedene Transporter (Kim *et al.*, 2008), Interaktionen zwischen den Lipiden sowie Interaktionen zwischen Proteinen und Lipiden gesteuert wird. Dies kann zu einer lokalen Anhäufung bestimmter Lipide führen, so dass bestimmte Strukturen, wie z.B. Caveolae oder Mikrodomänen (sog. *rafts*) ausgebildet werden können (Epand, 2006). *In vitro*-Systeme verfügen dagegen *a priori* nicht über Transporter und Flipasen, so dass die Verteilung der Lipide nur von Diffusionsprozessen und Interaktionen zwischen den Lipiden abhängt. Daher würde man eine gleichmäßigere Verteilung der Lipide in *in vitro*-Systemen erwarten können.

Da man spekulieren könnte, dass sich eine Rekonstitution von VKOR in einer Lipidumgebung mit einer ähnlichen Zusammensetzung wie die native ER-Membran, positiv auf die enzymatische Aktivität des Enzyms auswirkt, wurde VKOR in Membranen rekonstituiert, die in ihrer Zusammensetzung (50 % POPC, 30 % POPE, 15 % POPS, 5 % Cholesterol) mikrosomale Membranen der humanen Leber

(Waskell *et al.*, 1982) simulieren sollten. Überraschenderweise zeigte VKOR in dieser Lipidmischung nur einen sehr geringen Vitamin K Epoxid-Umsatz gegenüber dem in POPC rekonstituierten Protein (siehe Abb. 3.18).

Um zu ermitteln, welche der Lipidkomponenten einen Einfluss auf die Enzymaktivität besitzen, wurde VKOR in modifizierten Lipidmischungen rekonstituiert, in denen jeweils eines dieser Lipide nicht enthalten war und die anderen Lipide im selben Verhältnis (10 POPC: 6 POPE : 3 POPS : 1 Cholesterol) zueinander den fehlenden Anteil ergänzten. Fehlte beispielsweise das Lipid POPS, so wurde eine Mischung mit 58,82 % POPC/35,3 % POPE/5,88 % Cholesterol hergestellt. Ohne POPE war die Zusammensetzung dagegen 71,43 % POPC/ 21,43 % POPS/ 7,14 % Cholesterol. Die Rekonstitution von VKOR in einer Lipidumgebung ohne Cholesterol (POPC, POPE und POPS) führte zu einer etwa 3-fach höheren Aktivität (etwa 35 % der Aktivität in POPC-Liposomen) als in der Mischung mit allen Komponenten (siehe Abb. 3.18).

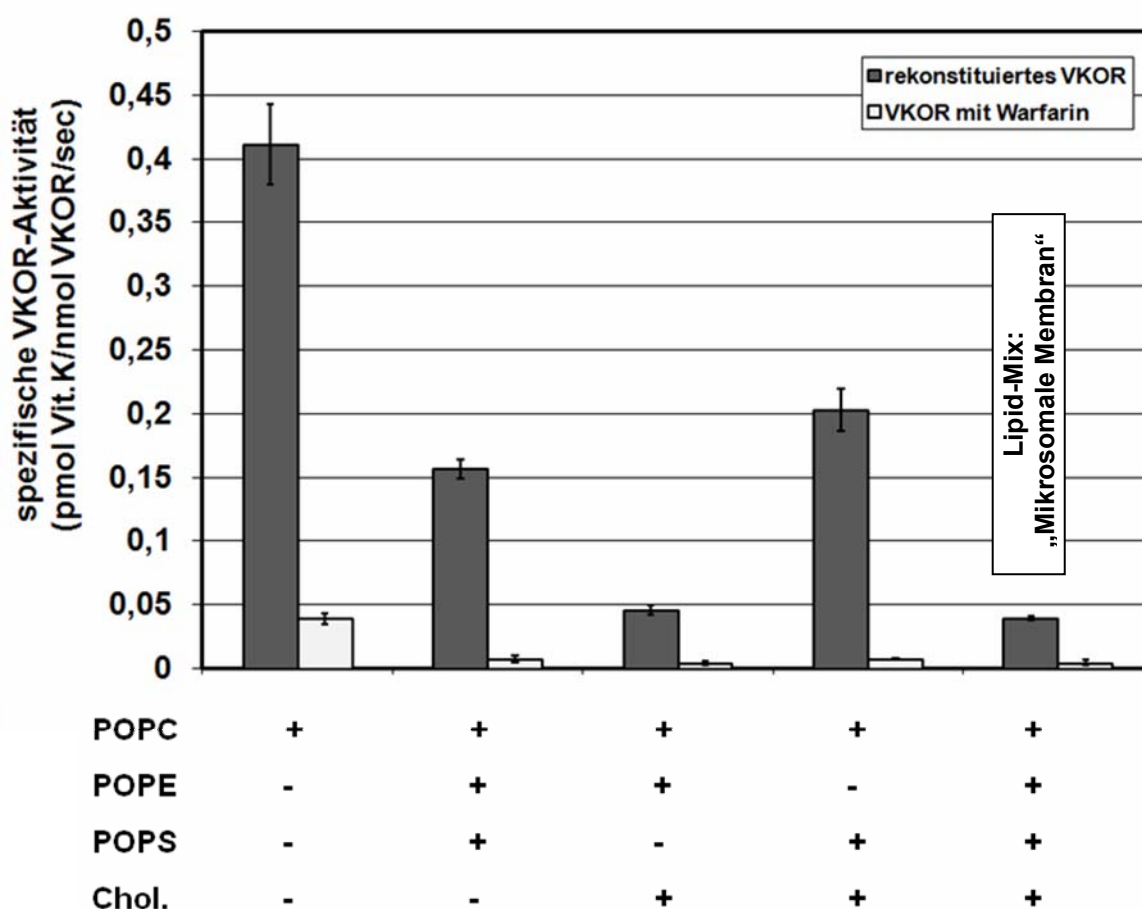


Abb. 3.18 Abhängigkeit der VKOR-Aktivität von der Lipidumgebung.

Renaturiertes VKOR wurde in verschiedene Lipidmischungen rekonstituiert. Die gemessenen Enzymaktivitäten weichen deutlich von einander ab, so dass ein Einfluss der Lipidumgebung auf die VKOR-Aktivität vermutet werden kann. Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (n=3).

Die Abwesenheit von POPS in der Lipidmischung (POPC, POPE, Cholesterol) zeigte kaum einen Effekt auf den Vitamin K Epoxid-Umsatz gegenüber der Mischung mit allen Lipiden. In einer Lipidkomposition aus POPC, POPS und Cholesterol - ohne POPE - wurde mehr als die 4-fache Aktivität der Mischung mit allen Lipiden und etwa 50 % der VKOR-Aktivität in POPC gemessen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Cholesterol und vor allem POPE einen negativen Effekt auf die VKOR-Aktivität in der POPC/POPE/POPS/Cholesterol-Mischung haben.

3.7.4.1 Kontrolle der Rekonstitutionseffizienz durch Flotation

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte nicht nur Ausdruck einer ungleichen Rekonstitutionseffizienz in den einzelnen Lipidmischungen sind, wurde mit den rekonstituierten Proben ein Flotationsexperiment durchgeführt (Kapitel 2.9.16). Dabei flotieren die Lipide mit dem assoziierten Protein während einer Ultrazentrifugation auf einem Saccharosegradienten. Nach dem Ultrazentrifugationsschritt wurde der Überstand komplett abgenommen und auf das ursprünglich eingesetzte Volumen mit Puffer aufgefüllt. Auf diese Weise können in der sich anschließenden Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Amidoschwarz-Färbung (Kapitel 2.9.5), die Proben vor und nach der Flotation verglichen werden und somit die Rekonstitutionseffizienz direkt abgeschätzt werden (siehe Abb. 3.19). Die Abschätzung der VKOR-Konzentration in den Rekonstitutionsproben vor der Flotation anhand einer Lysozym-Eichreihe ergibt eine Konzentration von etwa 0,12 mg/ml ($\sim 1,2 \mu\text{g}$). Da in allen Ansätzen die gleiche Menge VKOR für die Rekonstitution verwendet wurde, sollte die ermittelte Konzentration in allen Ansätzen vor der Flotation gleich sein. Eventuelle Abweichungen sind somit in der Methode der Proteinbestimmung begründet.

Nach der Flotation wurden in allen Proben etwa gleiche Mengen VKOR ermittelt, so dass die in den Aktivitätstest festgestellten Unterschiede wahrscheinlich durch den Einfluss der Lipidumgebung auf das rekonstituierte VKOR hervorgerufen werden. Die Proteinkonzentration in den Lipidfraktionen nach der Flotation beträgt zwischen 0,03 und 0,04 mg/ml ($\sim 0,3$ bis $0,4 \mu\text{g}$). Damit lässt sich abschätzen, dass die Rekonstitutionseffizienz für alle Proben etwa 25 % bis 33 % beträgt.

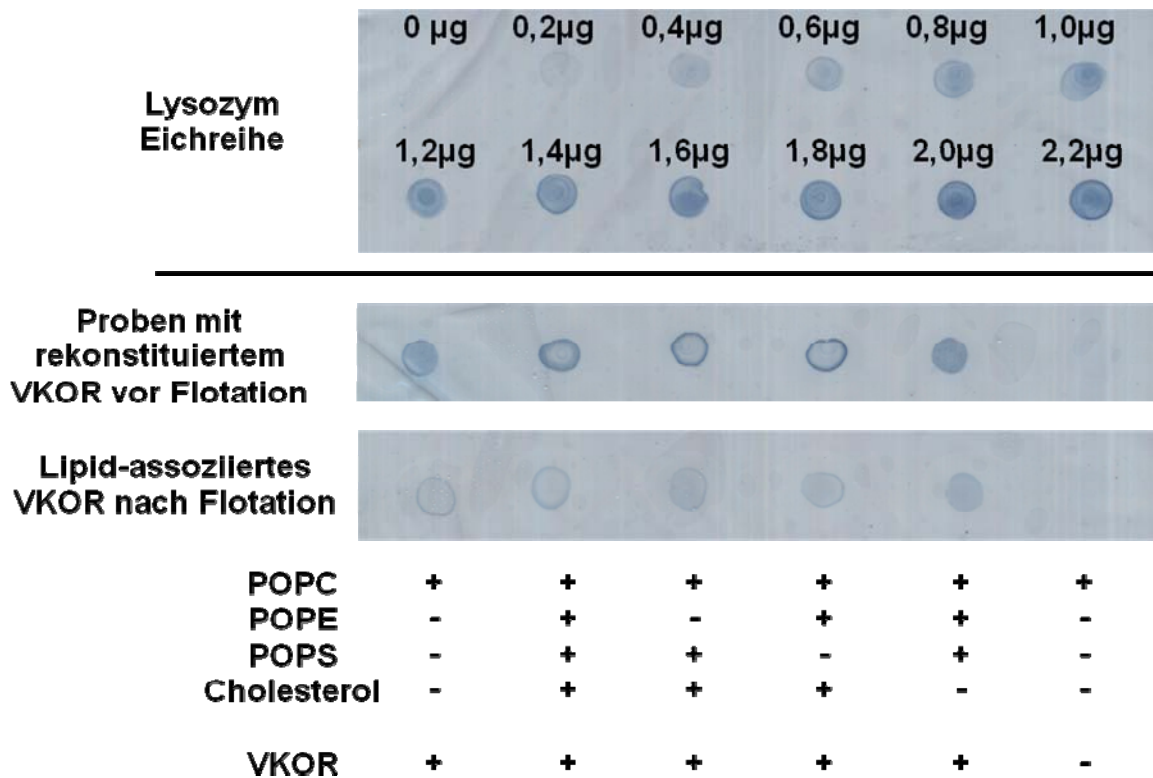


Abb. 3.19 Proteinbestimmung des Lipid-assoziierten VKOR in verschiedenen Lipidmischungen durch Flotation und anschließende Färbung mit Amidoschwarz.

Nach Rekonstitution von VKOR in verschiedene Lipidmischungen wurde die Lipidfraktion floriert und die Proteinmenge durch Amidoschwarz-Färbung und Abschätzung gegen eine Lysozym -Eichreihe vor und nach Flotation bestimmt. Die Rekonstitutionseffizienz war bei allen getesteten Lipidmischungen ähnlich und bewegte sich zwischen 25 und 33 %.

3.7.4.2 Einfluss der Lipid-Alkylkette auf die VKOR-Aktivität

Um den Einfluss von Lipiden auf die Funktionalität von VKOR etwas genauer zu analysieren, wurde das Protein in Lipiden rekonstituiert, die mit Phosphocholin (PC) zwar alle die gleiche Kopfgruppe aufwiesen, aber unterschiedliche Alkylketten besitzen (siehe Anhang 4). Eine wichtige biophysikalische Kenngröße für Lipide ist die Temperatur für die Hauptumwandlung (T_m), dem Übergang zwischen Gelphase (L_β) und flüssig-kristalliner (L_α) Phase. Dieser Übergang ist gekennzeichnet durch die Zunahme der Rotationsfreiheitsgrade der Acylketten. Dadurch erhöht sich der Volumenbedarf der Acylketten und es kommt zu einer lateralen Expansion der Lipiddoppelschicht, wodurch die Membranfluidität zunimmt. Die Übergangstemperatur steht daher in Zusammenhang mit der Fluidität des jeweiligen Lipids.

DPPC besitzt zwei lange gesättigte Palmitylketten (C16:0, C16:0) und die höchste Übergangstemperatur (41 °C) der hier verwendeten Lipide, während DMPC mit seinen zwei kürzeren Myristylgruppen (C14:0) eine Hauptübergangstemperatur von

23 °C aufweist (Binder *et al.*, 2003). Weiterhin wurde DOPC (C18:1, C18:1) eingesetzt, das mit seinen zwei Oleoylketten zwei ungesättigte Alkylketten aufweist und eine Übergangstemperatur von -20 °C besitzt. Außerdem wurde POPC (C16:0, C18:1; $T_m = -2$ °C) verwendet, welches eine Palmityl- und eine Oleoylgruppe besitzt, da es zumeist in dieser Arbeit für die Rekonstitution von VKOR verwendet wurde.

Für das in DPPC rekonstituierte VKOR konnte keine signifikante enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, während in DMPC eine geringe enzymatische Aktivität beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3.20). Die Analyse der Enzymaktivitäten zeigte weiterhin, dass die Rekonstitution von VKOR in DOPC und POPC einen nahezu gleich hohen Vitamin K Epoxid-Umsatz ermöglicht.

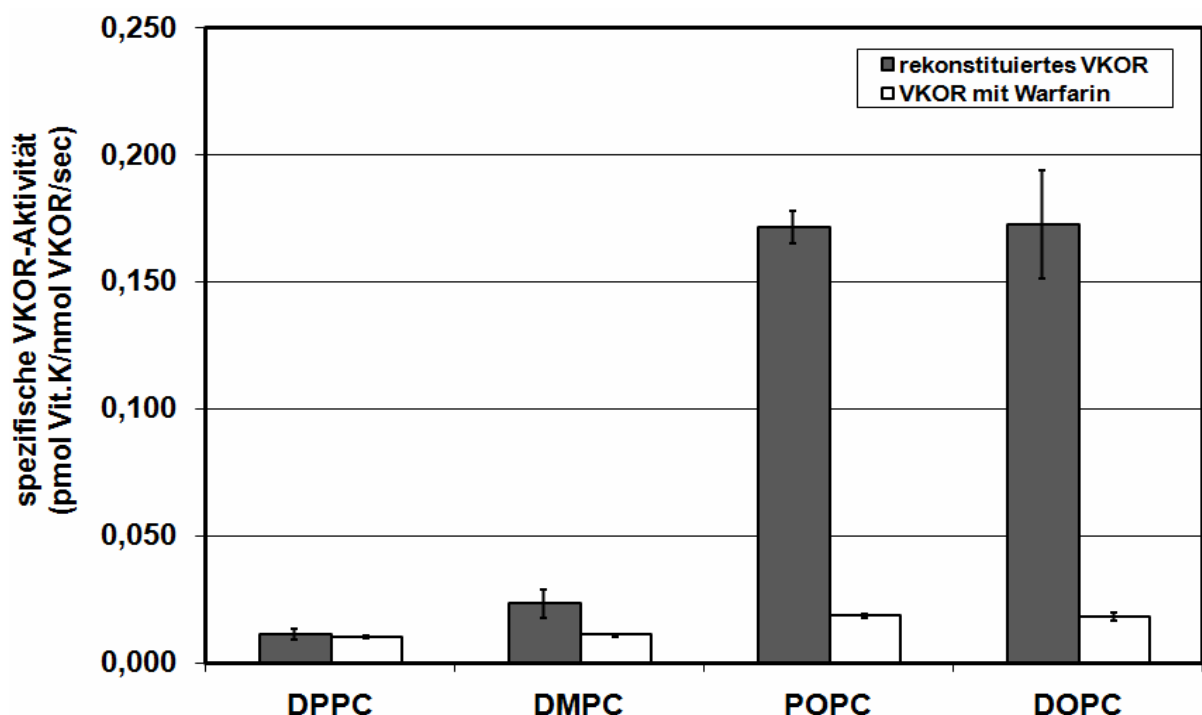


Abb. 3.20 Einfluss verschiedener Phosphatidylcholins auf VKOR-Aktivität.

Renaturiertes VKOR wurde in verschiedene Phosphatidylcholin-Lipide rekonstituiert. Die unterschiedlichen gemessenen Enzymaktivitäten belegen den Einfluss der Lipidumgebung auf die enzymatische Aktivität. Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=3$).

3.7.5 Stabilität des rekonstituierten Proteins

Rekonstituiertes VKOR-Protein wurde eine Woche bei 6 °C bzw. bei 22 °C belassen, um geeignete Bedingungen für die Lagerung des Proteins zu finden. Anschließend erfolgte eine erneute Untersuchung der Enzymaktivität. Von einer Lagerung bei tieferen Temperaturen (-20 °C bzw. -80 °C) wurde in diesem Versuch abgesehen, da befürchtet wurde, dass das Einfrieren und Auftauen der Probe zur Zerstörung der Lipidstruktur und der Bildung multilamellarer Vesikel führen könnte. Die Bestimmung

der VKOR-Aktivität ergab, dass nach einer Woche Lagerung bei Raumtemperatur noch 30 % der ursprünglichen Aktivität gemessen wurden, während die Lagerung bei 6 °C zu einer verbliebenen Aktivität von etwa 60 % führte (siehe Abb. 3.21). Somit konnte gezeigt werden, dass sich eine Lagerung bei 6 °C günstiger auf die Stabilität auswirkte, als eine Lagerung bei höheren Temperaturen. Daher wurde das rekonstituierte VKOR-Protein für weitere Untersuchung stets bei 6 °C gelagert, wenn die Experimente nicht unmittelbar im Anschluss an die Rekonstitution durchgeführt wurden.

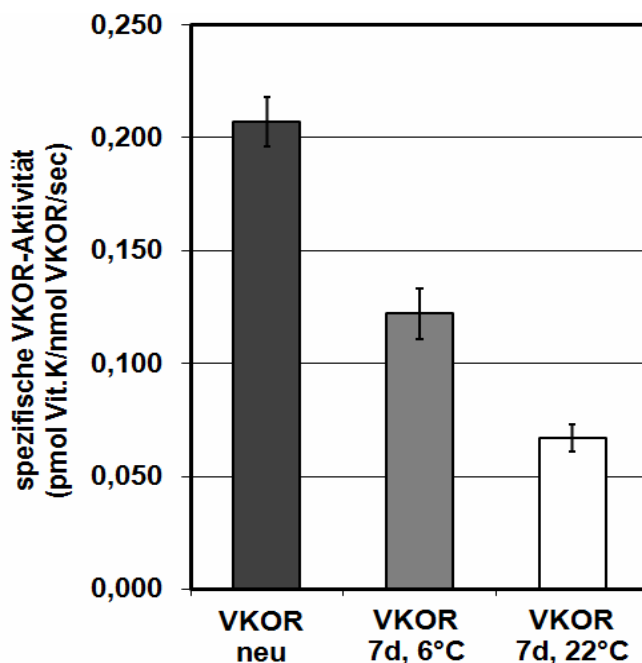


Abb. 3.21 Lagerung von rekonstituiertem VKOR.

Rekonstituiertes VKOR wurde bei 6 °C oder 22 °C für eine Woche gelagert und die Enzymaktivität bestimmt. Durch Lagerung bei 6 °C konnte deutlich mehr VKOR in seiner funktionellen Form beibehalten werden. Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (n=3).

3.7.6 Einfluss von Reduktionsmitteln während der Rekonstitution

Chu und Mitarbeiter (2006) zeigten, dass der Zusatz eines Reduktionsmittels während der Rekonstitution offenbar essentiell für die Ausprägung der enzymatischen VKOR-Aktivität ist. Daher wurde der Zusatz von 4 mM TCEP oder 4 mM DTT zum Dialysepuffer während der letzten 48 h (von 96 h) der Rekonstitution untersucht. Zusätzlich wurde ein Ansatz mitgeführt, dem kein Reduktionsmittel zugegeben wurde. Interessanterweise konnte für rekonstituiertes VKOR-Protein aus diesem Ansatz eine enzymatische Aktivität beobachtet werden (siehe Abb. 3.22), die durch Warfarin spezifisch gehemmt werden kann. Der Rekonstitutionsansatz mit TCEP zeigte eine vergleichbar hohe enzymatische Aktivität, während der Ansatz mit DTT eine fast doppelt so hohe Aktivität wie der Ansatz ohne Reduktionsmittel aufwies. Somit lässt sich konstatieren, dass die Zugabe eines Reduktionsmittels während der Rekonstitution nicht obligat ist. DTT hat jedoch einen signifikanten Einfluss auf die

gemessene enzymatische Aktivität des rekonstituierten Proteins. Die Hauptursache, warum dieser Effekt bei TCEP nicht auftritt, liegt vermutlich in der geringeren Membrangängigkeit von TCEP im Vergleich zu DTT begründet (Cline *et al.*, 2004; Wallin *et al.*, 2002).

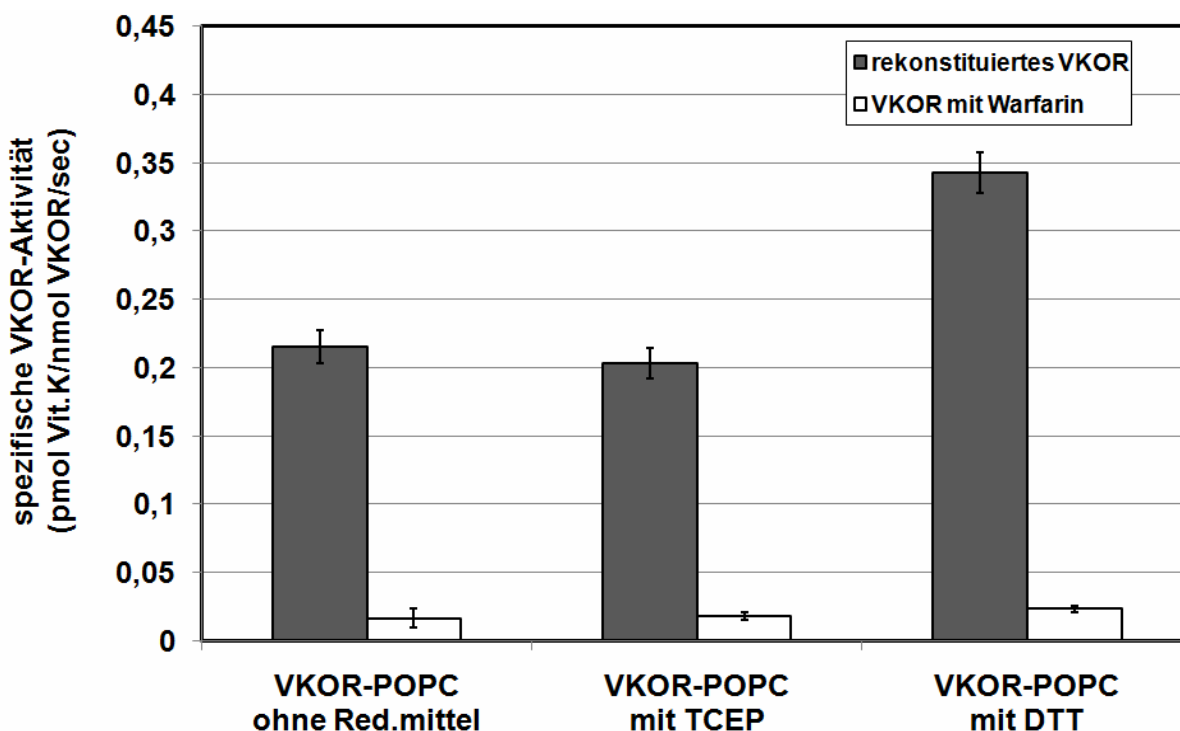


Abb. 3.22 Einfluss von Reduktionsmitteln während der VKOR-Rekonstitution.

Während der letzten 48 h der Rekonstitution wurden dem Rekonstitutionspuffer entweder 4 mM TCEP oder 4 mM DTT hinzugegeben. Während die Zugabe von TCEP keine Änderung der gemessenen Enzymaktivität bewirkt, führt die DTT-Zugabe zu einer deutlichen Steigerung der VKOR-Aktivität. Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=3$).

Ob der für DTT beobachtete Effekt auf einer kompletteren Reduktion der Cysteinreste des aktiven Zentrums, auf einer Stabilisierung des rekonstituierten VKOR unter reduzierenden Bedingungen oder auf einer weiteren Renaturierung von falschgefalteten Protein beruht, lässt sich zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht eindeutig beantworten.

3.7.7 Abschätzung der Renaturierungsausbeute für rekombinantes humanes VKOR

HEK293-Zellen, die transient VKOR-His₆ exprimierten, wurden genutzt, um den Erfolg der Renaturierung des humanen VKOR abzuschätzen. Hierfür wurde die Menge an VKOR in den transfizierten Zellen durch Western-Blot-Analyse semi-quantitativ bestimmt, wofür unterschiedliche Mengen von rekombinantem,

gereinigtem VKOR als Standard dienten (siehe Abb. 3.23). Anschließend wurden die gemessenen Enzymaktivitäten von transfizierten HEK293-Zellen mit denen von renaturiertem, in POPC rekonstituiertem VKOR verglichen und auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen, um spezifische VKOR-Aktivitäten zu erhalten.

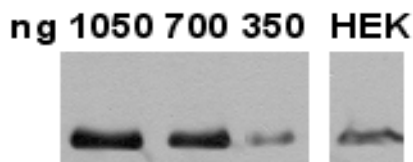


Abb. 3.23 Semi-quantitative Bestimmung der VKOR-Mengen in HEK-Zellen durch Western Blot Analyse.

Durch Western-Blot-Analyse wurde die Menge des in HEK293-Zellen (ein 30 μ l-Aliquot) exprimierten VKOR-His₆ abgeschätzt.

Tab. 3.3 Abschätzung der Renaturierungsausbeute.

Anhand der Quantifizierung der VKOR-Menge in HEK293-Zellen ließ sich die spezifische VKOR-Aktivität in diesem System berechnen und mit der des renaturierten, rekonstituierten VKOR vergleichen. Dadurch kann man eine Ausbeute nach Renaturierung und Rekonstitution zwischen 4,7 und 9,4 % abschätzen. Der Einfluss des His₆-tags auf die enzymatische Aktivität wurde hierbei berücksichtigt.

Probe	VKOR (ng)	VKOR (nmol)	Vitamin-K (pmol) in 60 min	spezifische VKOR-Aktivität (pmol Vit.K/nmol VKOR/sec)
renaturiertes VKOR in POPC	37800	1,94	3190	0,457
HEK293-VKOR mit His ₆ -tag	350-700	0,018-0,036	625	4,85-9,7
HEK293-VKOR ohne His ₆ -tag	350-700	0,018-0,036	1280	9,882-19,764

Geht man davon aus, dass VKOR im *in vivo* System komplett funktional ist, kann man eine Ausbeute für die Renaturierung und Rekonstitution von 4,7 bis 9,4 % abschätzen, d.h. zwischen 4,7 und 9,4 % des ursprünglich für die Renaturierung und spätere Rekonstitution eingesetzten Proteins scheinen in einer nativen Konformation zu sein. Bezieht man zusätzlich ein, dass wahrscheinlich nur Lipid-assoziiertes VKOR aktiv ist (vgl. Kapitel 3.7 und 4.3) und nimmt man Rekonstitutionsraten zwischen 25 und 33 % für VKOR an, die sich aus Messungen der Proteinkonzentration nach Flotation des Lipid-assoziierten VKOR abschätzen lassen (Kapitel 3.7.4), so ergeben sich theoretisch Ausbeuten zwischen 14,1 und 37,6 % für die Renaturierung allein.

3.8 Weitere Charakterisierung der Eigenschaften von rekonstituiertem humanem VKOR

3.8.1 Einfluss von Detergens auf rekonstituiertes VKOR

Um den Einfluss von Detergens auf die VKOR-Aktivität des bereits rekonstituierten Proteins in POPC zu untersuchen, wurden im Aktivitätstest verschiedene Mengen DDM in die Ansätze hinzu gegeben, so dass die DDM-Endkonzentrationen zwischen 0,1 mM und 4 mM lag (siehe Abb. 3.24). Ein weiterer Ansatz ohne zugegebenes DDM diente als Referenz für die Aktivität von rekonstituiertem VKOR. DDM wurde ausgewählt, da es ein mildes Detergens ist, das schon für die Renaturierung von VKOR eingesetzt wurde. Daher kann man davon ausgehen, dass es keinen denaturierenden Effekt auf VKOR ausübt, so dass eine DDM-Zugabe nur einen Effekt auf die Interaktion von VKOR mit der Lipiddoppelschicht haben sollte.

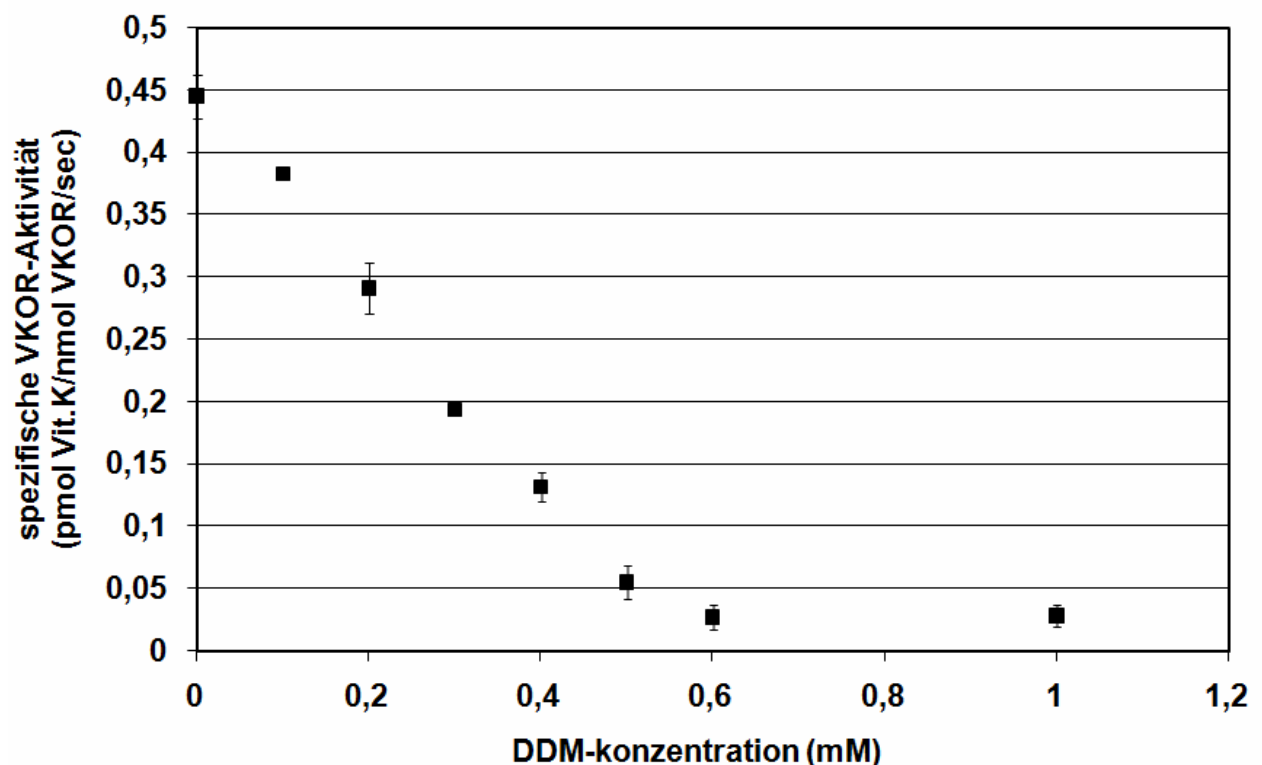


Abb. 3.24 Einfluss von DDM auf rekonstituiertes VKOR.

Zu rekonstituiertem VKOR wurden verschiedene Konzentrationen von DDM hinzugegeben und die Enzymaktivität bestimmt. Bis zu einer Konzentration von 0,5 mM DDM zeigt sich eine stetige Abnahme der VKOR-Aktivität. Bei DDM-Konzentrationen darüber ist keine VKOR-Aktivität feststellbar. Die Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=3$).

Bis zu einer DDM-Konzentration von 0,5 mM, die knapp der dreifachen kritischen Mizellaren Konzentration (cmc) von DDM entspricht, kam es zu einer kontinuierlichen

Abnahme der enzymatischen Aktivität. Bei noch höheren Konzentrationen konnte keine VKOR-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Dabei werden in Gegenwart von 0,2 mM DDM, was etwas über der cmc ($\sim 0,17$ mM) liegt, noch etwa 65% der Aktivität gemessen. Es scheint also zu einer zunehmenden Solubilisierung des Proteins und somit zu einer Abnahme der Interaktionen zwischen Lipid und VKOR zu kommen, die mit der Abnahme der Enzymaktivität korreliert. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass durch die DDM-Zugabe die Struktur der Lipidumgebung zerstört wird und es durch den Verlust der Lipidumgebung und dem dissoziativen Charakter der Detergensmoleküle zur Aggregation des solubilisierten Proteins kommt.

3.8.1.1 Analyse der Aggregationsneigung infolge von DDM-Zugabe durch Messung der dynamischen Lichtstreuung

Um das Auftreten von Aggregaten in Abhängigkeit von der DDM-Zugabe zu analysieren, wurde die Detergenszugabe zu rekonstituiertem VKOR mit Hilfe der Messung der dynamischen Lichtstreuung (DLS) untersucht. Diese Methode basiert auf dem Diffusionsverhalten von Partikeln in Lösung und der Streuung des Lichts, die je nach Größe des Partikels unterschiedlich stark ist. Somit lassen sich aus dem Streuungsverhalten der Probe der hydrodynamische Durchmesser der darin enthaltenen Partikel und deren Anteil in der Lösung bestimmen.

Zunächst wurden Proben mit VKOR untersucht, das in POPC-Liposomen rekonstituiert wurde („VKOR-POPC-Liposomen“). Zum Vergleich mit diesen Proteoliposomen dienten leere POPC-Liposomen, die während der Rekonstitution mit Rückfaltungspuffer ohne VKOR gemischt worden waren („POPC-Liposomen“). Dabei wurden in der Probe mit rekonstituiertem VKOR zwei Spezies detektiert (siehe Abb. 3.25). Die erste Spezies, die in diesen Proben zu 75 bis 80 % populierte war, besitzt einen Durchmesser zwischen 100 bis 110 nm und dürfte den gebildeten Proteoliposomen entsprechen (Madani *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011). Eine Spezies mit etwas geringerem Durchmesser (70 nm) kann auch in der Probe mit den leeren POPC-Liposomen gefunden werden. Die zweite Spezies, die den verbleibenden Teil der Probe ausmachte, besaß ihr Maximum bei unterschiedlichen Durchmessern zwischen 1000 und 3000 nm. Vermutlich handelt es sich hierbei um aggregiertes Protein (Chevalier *et al.*, 2010), das nicht rekonstituiert werden konnte, da diese Spezies in der Probe mit leeren POPC-Liposomen nicht zu finden war.

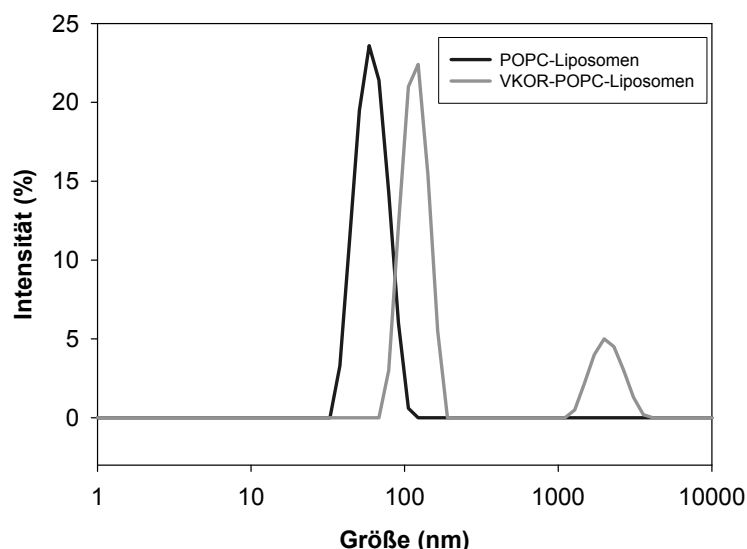


Abb. 3.25 Charakterisierung von rekonstituiertem VKOR durch Messung der dynamischen Lichtstreuung.

VKOR wurde nach der Rekonstitution durch DLS-Messung untersucht. Nach der Rekonstitution sind zwei Spezies in der Lösung zu sehen. Die erste Spezies besitzt eine Größe von etwa 100-110 nm und hat einen Anteil von 75-80 % an der Probe. Die zweite Spezies mit einem Anteil von 20 % besitzt eine Größe zwischen 1000-3000 nm.

Nach der Zugabe des Detergens zu VKOR, das in POPC rekonstituiert worden war, wurden jeweils fünf Messungen (Kapitel 2.10.5) über einen Zeitraum von 20 Minuten bei der erreichten DDM-Konzentration durchgeführt. Bis zu einer Endkonzentration von 1 mM DDM im Ansatz wurde die Detergengzugabe in 0,2 mM-Schritten untersucht. Ansätze mit DDM-Konzentrationen über 1 mM wurden in 0,5 mM-Schritten gemessen. Bis zu einer Konzentration von 1 mM DDM zeigten die Proben ein unverändertes Bild (siehe Abb. 3.26A und B). Beide Spezies, die vermutlich Proteoliposomen und makromolekularen Aggregaten zugeordnet werden können, waren in der Lösung zu beobachten. Da die relative Verteilung beider Spezies in diesem DDM-Konzentrationsbereich relativ konstant ist, scheint eine zunehmende Aggregation des Proteins als Hauptursache der abnehmenden enzymatischen Aktivität im Bereich bis 0,5 mM DDM, wie diese im VKOR-Aktivitätsassay zu sehen war (siehe Abb. 3.24), unwahrscheinlich zu sein.

Bei Konzentrationen über 1 mM DDM konnte nun eine Zunahme der mutmaßlichen Aggregatfraktion beobachtet werden, die mit dem Ansteigen der Detergenskonzentration einhergeht. Ab einer DDM-Konzentration von etwa 2,5 mM existieren vermutlich keine Proteoliposomen mehr. Es war nur noch eine Spezies mit einer Größe von etwa 40 nm neben den makromolekularen Aggregaten zu sehen, die nun den überwiegenden Teil der Probe ausmachten (siehe Abb. 3.26C). Bei Konzentrationen

höher als 6 mM DDM war neben der Proteinaggregatspezies nur noch eine sehr kleine Spezies zu beobachten (ca. 6 nm), die der Größe von DDM-Mizellen entsprechen könnte (Ma *et al.*, 2008; Wallace *et al.*, 2010).

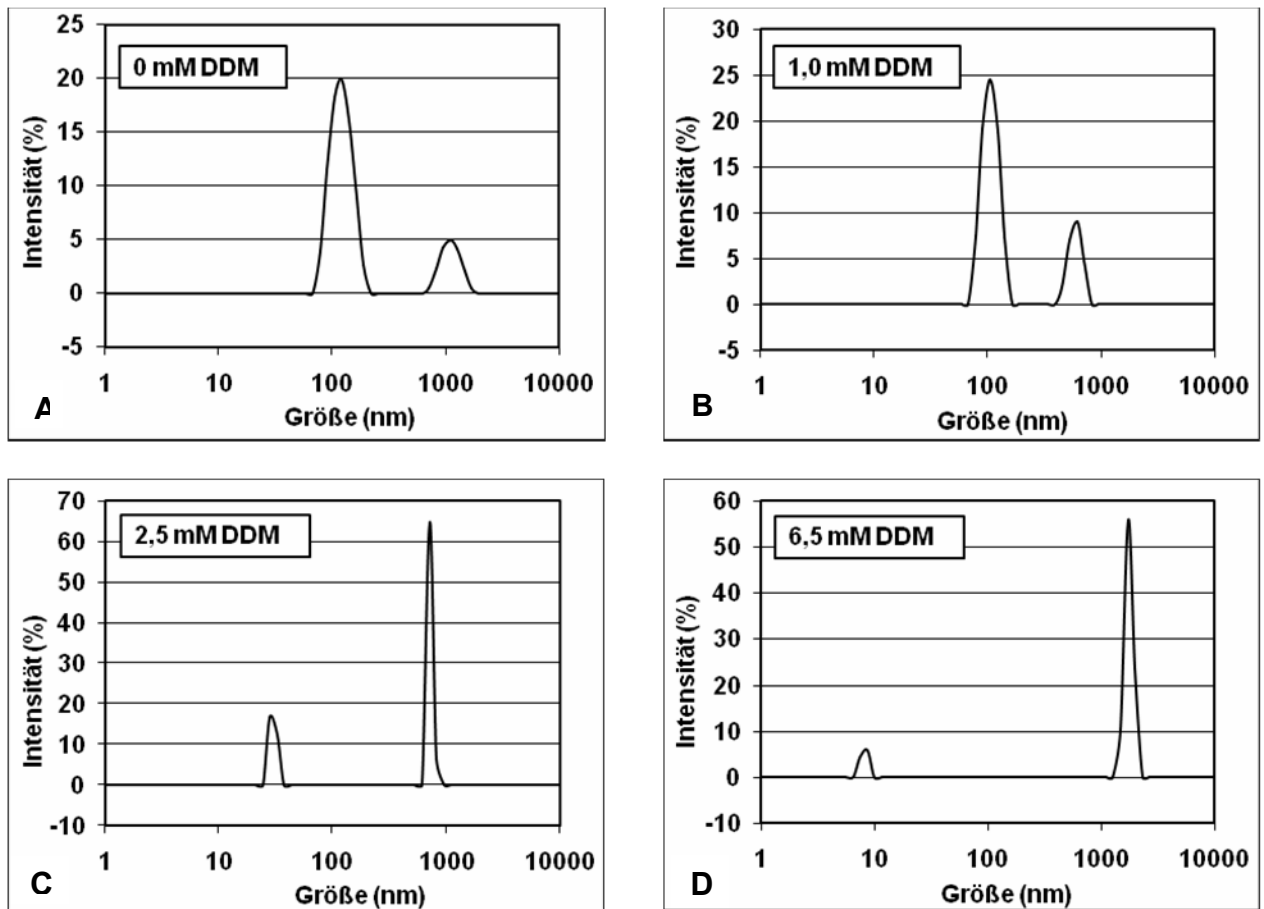


Abb. 3.26 Analyse der dynamischen Lichtstreuung von rekonstituiertem VKOR bei verschiedenen DDM-Konzentrationen.

Die Messung der dynamischen Lichtstreuung zeigte bis zu einer Konzentration von 1,5 mM DDM keine Änderungen der Verteilung zwischen den zwei beobachteten Spezies (A und B). Erst bei Konzentrationen über 1 mM ist eine Zunahme des Anteils der zweiten Spezies (vermutlich Aggregate) zu beobachten (C und D). Gleichzeitig kommt es zur Größenabnahme der ersten Spezies. Bei Konzentrationen von über 6 mM DDM hat diese Spezies eine Größe von 6-7 nm.

3.8.1.2 Analyse der strukturellen Integrität des humanen VKOR während der DDM-Zugabe durch Fluoreszenzspektroskopie

Eine Methode, die Aussagen über strukturelle Änderungen von Proteinen zulässt, stellt die Fluoreszenzspektroskopie dar. Hier werden aromatische Reste zur Fluoreszenz angeregt und emittieren Licht abhängig von ihrer chemischen Umgebung und deren Konzentration. Humanes VKOR besitzt jeweils sechs Tyrosin- und Tryptophan-Reste, die über die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins verteilt sind (siehe Anhang 1). Insbesondere die Tryptophan-Reste sollten nach dem

gegenwärtig akzeptierten Topologiemodell (Li *et al.*, 2010; Schulman *et al.*, 2010) an Positionen in der Nähe der Grenzfläche zwischen Lipidmembran und wässriger Phase lokalisiert sein und könnten damit interessant als Indikatoren für strukturelle Änderungen sein.

Wie bereits gezeigt, führte die Titration des Detergens DDM zu rekonstituiertem VKOR (in POPC) zu einer konstanten Abnahme der Enzymaktivität (siehe Abb. 3.24). Daher wurde mit rekonstituiertem VKOR eine Titration mit DDM bis zu einer Konzentration von 2 mM vorgenommen und die jeweiligen Fluoreszenzspektren gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe des Detergens zu keiner Änderung des Fluoreszenzspektrums führte (siehe Abb. 3.27).

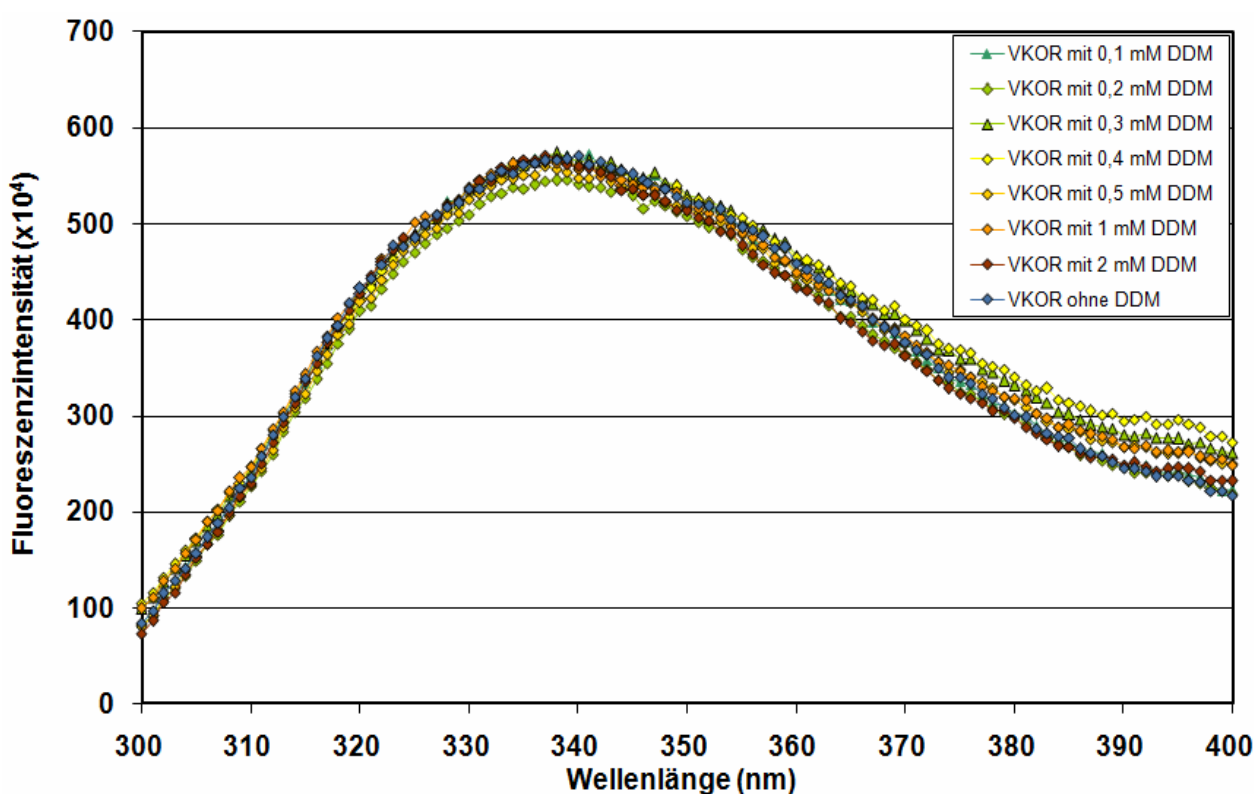


Abb. 3.27 Einfluss von DDM auf rekonstituiertes VKOR.

Zu rekonstituiertem VKOR wurden verschiedene Konzentrationen von DDM hinzugegeben und die Fluoreszenzspektren nach Anregung bei 280 nm gemessen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Fluoreszenz im gemessenen DDM-Konzentrationsbereich.

Eine Veränderung der Exposition von Tyrosin- oder Tryptophanresten des VKOR-Moleküls gegenüber ihrer Umgebung, die ein Hinweis auf strukturelle Änderungen von VKOR in Gegenwart von Detergens gewesen wäre, konnte demnach nicht nachgewiesen werden. Rekonstituiertes VKOR scheint somit im Bereich der eingesetzten Konzentrationen strukturell stabil gegenüber dem Einfluss von DDM zu sein. Wahrscheinlich kommt es durch die Zugabe von DDM also zunächst zu einer

Solubilisierung des VKOR-Proteins und zur Auflösung der Protein-Lipid-Interaktionen. Die damit einhergehende Reduktion der enzymatischen Aktivität impliziert, dass die Lipid-Umgebung offensichtlich kritisch für die VKOR-Aktivität ist.

3.8.2 Änderungen der Fluoreszenzintensität von VKOR in Reaktion auf die Inkubation mit dem Reduktionsmittel DTT

Es wurden weitere Fluoreszenzspektren von VKOR aufgenommen, welches in POPC rekonstituiert wurde. Diese Spektren wiesen ein Emissionsmaximum bei etwa 340 nm nach Anregung bei 280 nm bzw. 295 nm auf. Diese Spektren wurden mit VKOR verglichen, das aus demselben Rekonstitutionsansatz stammte und während der letzten 48 Stunden der Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer mit dem Reduktionsmittel TCEP dialysiert wurde. Da beide Spektren den gleichen Verlauf haben (siehe Abb. 3.28), scheint in beiden Ansätzen eine ähnliche Proteinstruktur ausgebildet zu sein. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Resultaten der VKOR-Aktivitätsassays, in denen beide Ansätze die gleiche Aktivität zeigten (Kapitel 3.7.6).

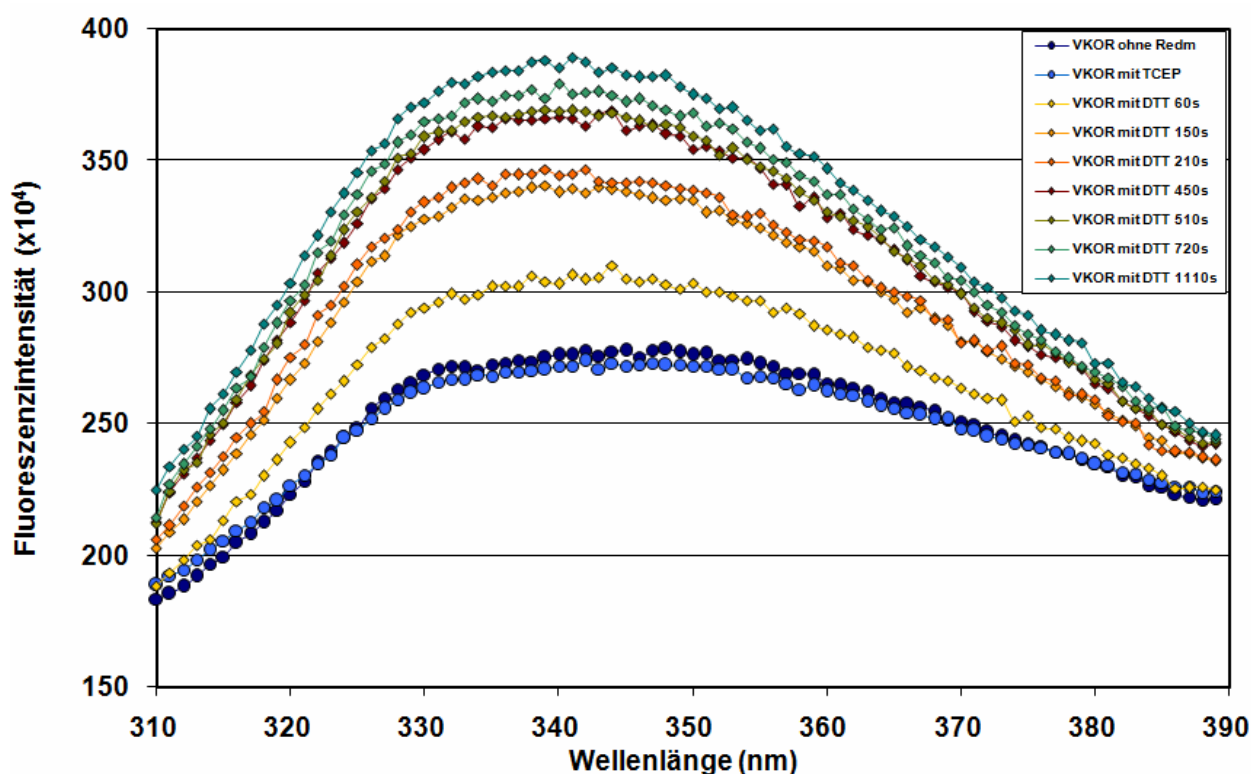


Abb. 3.28 Einfluss von TCEP während der VKOR-Rekonstitution und Wirkung von DTT- Zugabe zu rekonstituiertem VKOR.

Bei der Rekonstitution von renaturiertem VKOR wurde dem Rekonstitutionspuffer während der letzten 48 h TCEP (4 mM) hinzugegeben. Dies hatte jedoch keine Auswirkung auf das gemessene Fluoreszenzspektrum von VKOR nach Anregung bei 295 nm. Durch die Zugabe von 5 mM DTT zum rekonstituierten Protein kam es zu einem deutlichen Ansteigen der Fluoreszenzintensität. Das beobachtete Fluoreszenzmaximum blieb hingegen unverändert bei einer Wellenlänge von etwa 340 nm.

Die Zugabe von DTT (5 mM) führte zu einer zeitabhängigen Veränderung der gemessenen Spektren (siehe Abb. 3.28 und Abb. 3.29), die weder für eine DTT-Zugabe zu Rekonstitutionspuffer, noch zu POPC-Liposomen ohne VKOR beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Das Fluoreszenzsignal stieg innerhalb kurzer Zeit deutlich an und erreichte nach etwa fünf bis sechs Minuten ein Emissionsmaximum von etwa der 1,5-fachen Intensität, das bei der gleichen Wellenlänge von ca. 340 nm lag. Diese Änderung der Fluoreszenzintensität könnte möglicherweise ein Hinweis auf strukturelle Änderungen im Molekül sein.

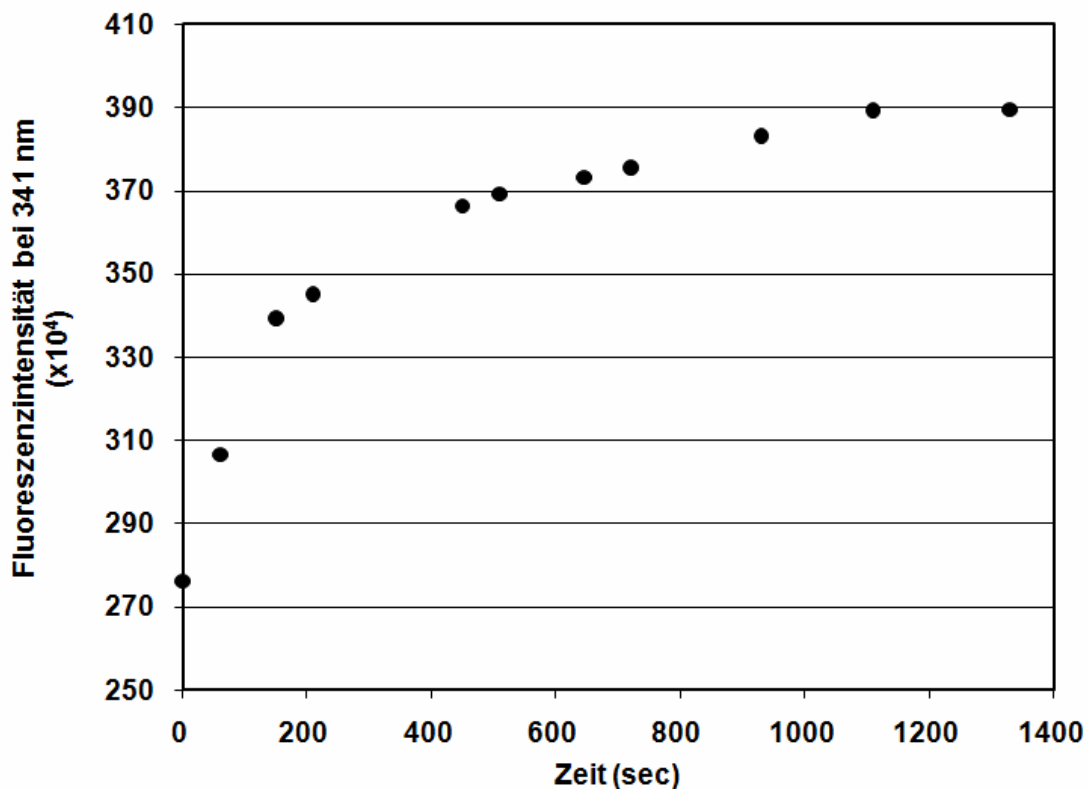


Abb. 3.29 Anstieg der VKOR-Fluoreszenzemission bei 341 nm nach DTT-Zugabe.

Durch die Zugabe von 5 mM DTT zu rekonstituiertem VKOR kam es zu einem deutlichen Ansteigen der Fluoreszenzintensität bei 341 nm.

Dass dieser Effekt nur nach Zugabe von DTT und nicht mit TCEP zu sehen ist, deutet daraufhin, dass die strukturelle Änderung im Zusammenhang mit einer Reduktion von Aminosäureseitenketten im Transmembranbereich des Proteins steht. TCEP ist im Gegensatz zu DTT sehr hydrophil und wenig membrangängig. Es kann daher nicht die Lipiddoppelschicht diffundieren und dort Cystine reduzieren. Ein mögliches Ziel für eine Reduktion stellen z.B. die Cysteinreste des aktiven Zentrums von VKOR (Cys132 und Cys135) dar, insbesondere da bereits positive Effekte einer DTT-Zugabe während der Rekonstitution auf die enzymatische VKOR-Aktivität

gezeigt wurden (Kapitel 3.7.6). Ohne weiterführende Experimente mit VKOR-Mutanten, in denen man die Cysteine des humanen VKOR mutiert, kann man jedoch nur spekulieren, ob diese Cysteine tatsächlich in diesem Prozess involviert sind und inwieweit diese Reduktion überhaupt eine Relevanz für die beobachteten Fluoreszenzunterschiede besitzt.

3.8.3 Fern-UV-CD-Spektroskopie

Die Aufnahme von Fern-UV-CD-Spektren gibt Aufschluss über vorhandene Sekundärstrukturen in Proteinen. Aufgenommene Spektren von gereinigtem VKOR-Protein, das vor der Renaturierung in SDS vorliegt, zeigen einen Verlauf, wie er für helikale Proteine erwartet werden kann (siehe Abb. 3.30, „VKOR in SDS“). Ein sehr deutliches Minimum ist bei einer Wellenlänge von 222 nm zu sehen, während ein zweites lokales Minimum bei 208 nm, das typisch für helikale Proteine ist, etwas weniger stark ausgeprägt ist (Greenfield *et al.*, 1969; Johnson, 1990). Eine Auswertung dieses Spektrums mit dem K2D-Server (Andrade *et al.*, 1993) ergab einen Anteil von 60 % α -Helices, 7 % β -Faltblätter und 33 % nicht-regelmäßig geordnete Struktur bezüglich der Sekundärstruktur des Proteins. Der große Anteil von Helices war erwartet worden, da bekannt ist, dass Membranproteine in SDS nicht vollständig denaturiert vorliegen, sondern eine Kernstruktur bestehend aus sehr stabilen, hydrophoben Transmembranhelices erhalten bleiben kann (Booth *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 1999; Renthal, 2006). Die Aufnahme eines Spektrums des rückgefalteten VKOR in Renaturierungspuffer, war aufgrund der hohen Arginin-Konzentrationen nicht möglich. Die Entfernung des Arginins resultierte stets in der Aggregation des Proteins.

Weiterhin wurden Fern-UV-CD-Spektren des renaturierten und in POPC rekonstituierten VKOR-Proteins aufgenommen (siehe Abb. 3.30). Dieses zeigte jedoch kein typisches Fern-UV-CD-Spektrum, wie es für ein überwiegend helikales, integrales Membranprotein zu erwarten wäre. So waren keine ausgeprägten Minima bei 222 nm und 208 nm, wie sie bei helikalen Strukturen typischerweise auftreten, zu sehen. Dagegen stieg die gemessene Elliptizität im Wellenlängenbereich von etwa 225 nm bis etwa 205 nm stark an. Dieser Anstieg war ungewöhnlich, könnte aber auf eine unregelmäßige Polarisierung des Lichtes durch die Lipidstrukturen in der Lösung zurückzuführen sein oder auf stattfindende Interaktionen zwischen den Lipiden der Membran und dem darin rekonstituierten Protein hinweisen. Eine Inhomogenität des

rekonstituierten VKOR-Proteins könnte ebenfalls als Ursache in Frage kommen, da denkbar ist, dass sowohl korrekt gefaltetes Protein, als auch inkorrekt gefaltetes Protein in der Probe vorliegt. Ein Spektrum von POPC-Liposomen ohne VKOR (siehe Abb. 3.30) zeigte keine signifikanten Veränderungen gegenüber dem Pufferspektrum, so dass der beobachtete Effekt nicht durch Korrektur mit dem Spektrum der leeren POPC-Liposomen herausgerechnet werden kann.

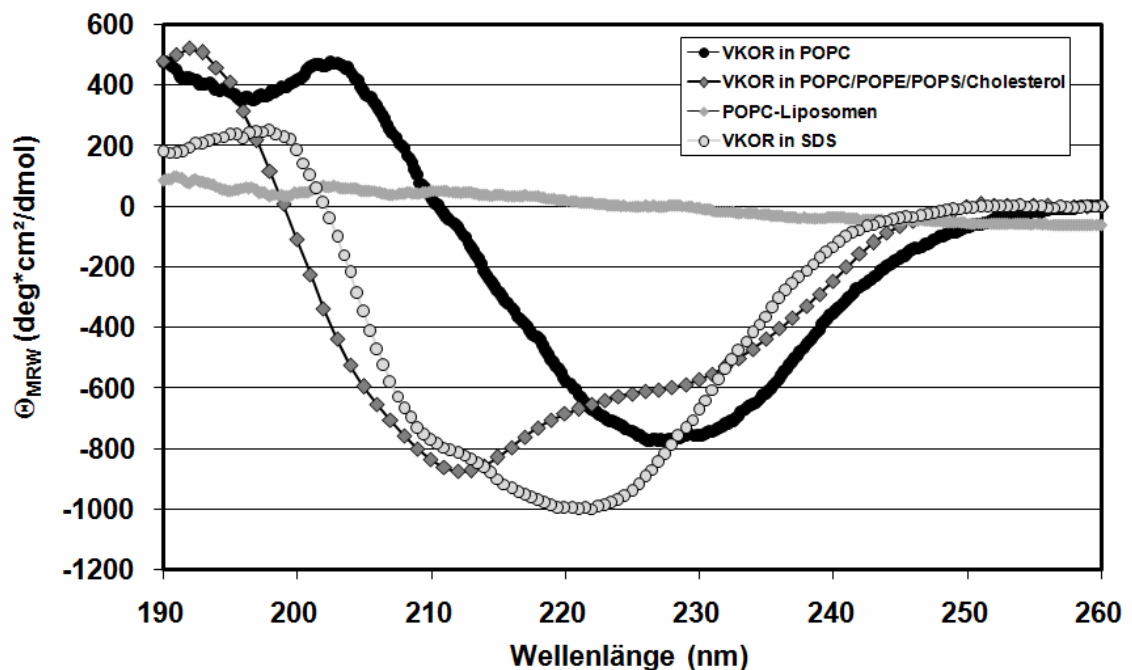


Abb. 3.30 Fern-UV-CD-Spektrum von VKOR in SDS, rekonstituiertem VKOR in POPC und in einer Mischung aus POPC/POPE/POPS/Cholesterol.

Vor der *in vitro* Renaturierung von VKOR und nach der Renaturierung und Rekonstitution in POPC wurde ein CD-Spektrum bestimmt. Es zeigte jedoch nicht den Verlauf eines typischen helikalen Proteins, wie es für VKOR erwartet wurde. Proteinkonz.: 0,45 mg/ml; 0,35 mg/ml für „VKOR in SDS“ ; Küvettendicke: 0,5 mm

In einem Kontrollexperiment wurde daher mit Lysozym als Referenzprotein ein Fern-UV-CD-Spektrum aufgenommen (siehe Abb. 3.31). Zum Vergleich diente eine Lysozym-Probe mit der gleichen Proteinkonzentration, in die zusätzlich die gleiche Menge POPC-Lipid gemischt wurde, wie sie in Proben mit rekonstituiertem VKOR enthalten war. Die Messung des CD-Spektrums dieser Probe zeigte ebenfalls ein Minimum bei einer Wellenlänge von 230 nm und eine Verschiebung der Elliptizität zwischen 225 nm und 205 nm im Vergleich zum Referenzspektrum. Der beobachtete Effekt scheint daher auf die Anwesenheit der POPC-Lipide in der Lösung zurückzuführen zu sein.

Einen weiteren Hinweis liefern Spektren von rekonstituiertem VKOR in einer Mischung aus POPC/POPE/POPS/Cholesterol, wie sie bereits zuvor für Messungen

der enzymatischen VKOR-Aktivität verwendet wurden (Kapitel 3.7.4). Diese Spektren zeigen nicht solch einen Anstieg wie er in den Proben mit POPC auftrat (siehe Abb. 3.30). Daher scheinen Unterschiede in den CD-Spektren tatsächlich von der Lipidumgebung und deren Beschaffenheit abzuhängen. Die Analyse des Spektrums in dieser Lipidmischung ergab einen Anteil von 31 % für α -helikale Strukturen, von 11 % für β -Faltblätter und 58 % für nicht-regelmäßig geordnete Strukturen. Die Ursache dafür, dass kein typisches Spektrum eines α -helikalen Proteins erhalten wurde und ein hoher Anteil an ungeordneten Strukturen zu finden ist, erklärt sich in dieser Probe vermutlich durch die Inhomogenität des rekonstituierten Proteins. Daher können auch keine Aussagen über die Sekundärstruktur von funktionellem, nativem VKOR getroffen werden, zumal das Protein in dieser Lipidmischung nahezu inaktiv ist. Außerdem ist unklar, welchen Beitrag die Lipide am gemessenen Spektrum haben. Die CD-Spektroskopische Untersuchung scheint daher nicht geeignet, um Aussagen über die vorhandene Sekundärstruktur von renaturiertem, enzymatisch aktivem VKOR zu erhalten, selbst wenn die Homogenität der Probe durch Flotation des Lipid-assoziierten Proteins und weitere Reinigungsschritte verbessert werden kann.

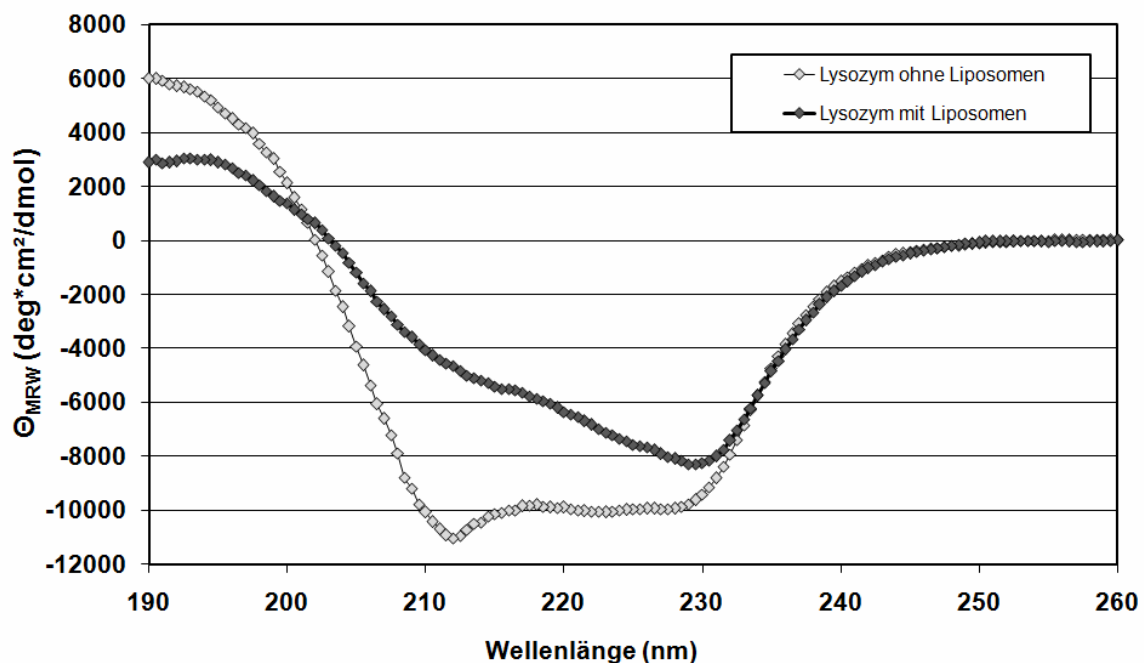


Abb. 3.31 Fern-UV-CD-Spektren von Lysozym ohne Lipide und in Gegenwart von POPC-Liposomen.

Ein Vergleich der gemessenen Lysozym-Spektren zeigt eine deutliche Änderung des CD-Spektrums in Gegenwart von POPC. Proteinkonzentration: 0,5 mg/ml; Küvettendicke: 0,5 mm

4 Diskussion

4.1 Expression und Reinigung von rekombinantem VKOR

4.1.1 Etablierung eines bakteriellen Expressionssystems für die VKOR-Expression

Die strukturelle Charakterisierung von humanem VKOR erfordert die Bereitstellung großer Mengen gereinigten Proteins. Bei integralen Membranproteinen stellt dies jedoch oftmals einen limitierenden Faktor dar, da diese Proteine gewöhnlich eine geringe endogene Expression zeigen und eine geringe Stabilität nach ihrer Solubilisierung in Mizellen besitzen (Diab *et al.*, 2007; Gordon *et al.*, 2008; Kiefer, 2003). Die rekombinante Überexpression von humanem VKOR in geeigneten Expressionssystemen könnte Protein in ausreichenden Mengen bereitstellen. Allerdings ist bislang nur die Expression von VKOR in Sf9-Insektenzellen und Säugerzellen beschrieben worden (Chu *et al.*, 2006; Rost *et al.*, 2004; Tie *et al.*, 2011). Die Produktion des Proteins lässt sich in diesen Systemen, verglichen mit bakteriellen Expressionssystemen, nur mit hohem Aufwand realisieren und erreicht häufig nicht die benötigten Milligrammmengen an gereinigtem Protein (McCusker *et al.*, 2007). Zudem konnte bei der Reinigung von VKOR, das in Sf9-Insektenzellen exprimiert wurde, keine vollständige Homogenität erreicht werden (Chu *et al.*, 2006).

Daher wurde in dieser Arbeit eine Reihe von Expressionskonstrukten generiert, um ein bakterielles Expressionssystem für VKOR zu etablieren (Kapitel 3.1). 22 Konstrukte zeigten dabei keine Expression, was auf eine Toxizität des exprimierten VKOR-Proteins hinweisen könnte, die auch in vielen anderen Fällen bei der heterologen Expression von Membranproteinen beobachtet wird (Junge *et al.*, 2008; Kiefer, 2003; Laage *et al.*, 2001; Mancina *et al.*, 2007; McCusker *et al.*, 2007; Tate, 2001; Thai *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008). Auch die Verwendung von VKOR-homologen Proteinen, sowie einer verkürzten VKOR-Variante führten nicht zu einer Expression. Lediglich für das KSI-VKOR-Fusionsprotein, das N-terminal ein hydrophobes Peptid der Ketosteroidisomerase (KSI) besitzt, konnte eine signifikante Expression beobachtet werden. Der Fusionspartner fördert in diesem Fall die Deponierung dieses Proteins in *inclusion bodies*, was die cytotoxische Wirkung vermindert und damit eine Expression erlaubt. Insbesondere für bakterielle Porine ist

die Proteinproduktion als *inclusion bodies* und deren anschließende *in vitro* Renaturierung mittlerweile ein etabliertes Verfahren (Bannwarth *et al.*, 2003), aber auch einige eukaryotische Membranproteine konnten in Form von *inclusion bodies* exprimiert und in eine funktionelle Form rückgefaltet werden (Baneres *et al.*, 2003, 2005; Dahmane *et al.*, 2009; Dolce *et al.*, 2001; Fiermonte *et al.*, 2002; Kiefer *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2009). Dass diese Expressionsstrategie mit mehreren Konstrukten versucht werden sollte, zeigen die Resultate mit den anderen VKOR-Fusionen (mit dem TLE-Peptid und den BCL-Peptiden), die ebenfalls die Proteinproduktion als *inclusion bodies* fördern sollten, aber nicht zur Proteinexpression führten. Ob es in diesen Fällen nicht zur Bildung von *inclusion bodies* kommt oder noch andere Faktoren eine Rolle spielen, lässt sich nur mutmaßen.

4.1.2 Etablierung der Reinigung von VKOR unter denaturierenden Bedingungen

Zahlreiche Versuche VKOR aus Mikrosomenpräparationen zu extrahieren und zu reinigen, führten nach der Zugabe von Detergens stets zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität (Begent *et al.*, 2001; Cain *et al.*, 1997; Mukharji *et al.*, 1985). Dies deutet daraufhin, dass VKOR möglicherweise nur eine geringe Funktionalität in Detergenzien besitzt bzw. natives VKOR in seiner funktionellen Form nur wenig stabil in Gegenwart von Detergenzien sein könnte. Daher sollte VKOR nach dessen Renaturierung ohne eine Vielzahl weiterer Reinigungsschritte für eine weitere Charakterisierung zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurde die Reinigung des Proteins unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Kapitel 3.3). Dies schloss die chemische Spaltung des Fusionsproteins durch Ameisensäure ein (Ryan *et al.*, 2003), da ein *in vitro* renaturiertes KSI-VKOR-Fusionsprotein durch das stark hydrophobe N-terminale KSI-Peptid vermutlich zur Aggregation neigen würde und eine Renaturierung mit anschließender proteolytischer Spaltung daher sehr schwierig wäre. Gegenüber proteolytischer Spaltung z.B. durch Enterokinase, Faktor Xa oder Thrombin hat diese Methode außerdem den Vorzug, dass Enzyminaktivierung und geringe Spezifität in Anwesenheit von Detergens vermieden wird (Thai *et al.*, 2005). Trotz der harschen Bedingungen während der chemischen Spaltung ergaben die mit gereinigtem VKOR durchgeführten massenspektrometrischen Analysen keinerlei Hinweise auf Modifikationen des Proteins (Kapitel 3.4).

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Reinigungsprotokoll (siehe Abb. 4.1) konnten etwa 14 mg gereinigtes VKOR pro Liter Fermentationsmedium gewonnen werden. Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, im Vergleich zum bisher publizierten Verfahren (Chu *et al.*, 2006), keinerlei kontaminierende Proteine, so dass VKOR nahezu homogen vorliegt. Das Protein zeigte, ebenso wie VKOR aus Sf9-Insektenzellen, ein etwas geringeres apparentes Molekulargewicht ($\sim 17,5$ kDa) als es die kalkulierte Masse ($\sim 19,5$ kDa) erwarten lässt. Diese leicht erhöhte elektrophoretische Mobilität ist bei Membranproteinen nicht ungewöhnlich, da die hydrophoben Transmembranhelices oft nicht denaturiert werden (Chen *et al.*, 1999; Gelamo *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 1985). Ein CD-Spektrum des gereinigten VKOR-Proteins (in SDS) zeigt deutlich, dass VKOR nicht komplett entfaltet vorliegt und α -helikale Strukturen existieren (Kapitel 3.8.3).

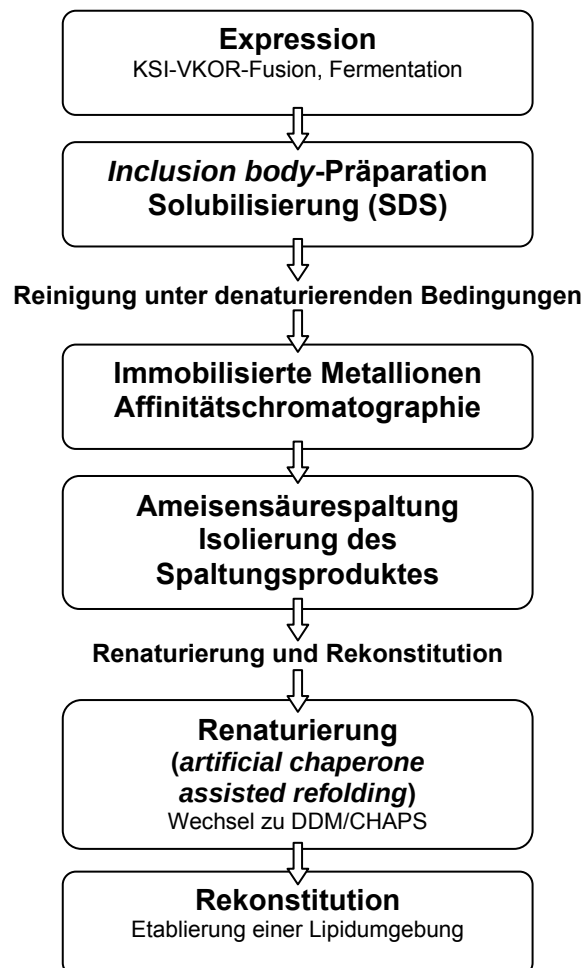


Abb. 4.1 Schematische Darstellung zur Gewinnung von humanem VKOR ausgehend von dessen unlöslicher Expression in *E. coli*.

4.1.3 Monitoring der Renaturierung durch Bestimmung der VKOR-Enzymaktivität

Um den Erfolg der VKOR-Renaturierung verfolgen zu können, wurde ein Assay der enzymatischen Aktivität von VKOR genutzt, da die enzymatische Aktivität ein kritischer Indikator für die Ausprägung einer nativen VKOR-Struktur ist. Dafür wurde ein System mit transient VKOR exprimierenden HEK293-Zellen eingesetzt, das in der Literatur zuvor beschrieben worden war (Rost *et al.*, 2004). Anhand des Systems wurde untersucht, welchen Einfluss der pH-Wert auf die Enzymreaktion hat, da verschiedene Testbedingungen in der Literatur zu finden sind (Chu *et al.*, 2006; Rost *et al.*, 2004; Wallin *et al.*, 1985). Dabei konnte eine starke Abhängigkeit der Reaktion vom pH-Wert beobachtet werden (Kapitel 3.5.1), die im Widerspruch zu älteren Daten steht, die von nur geringfügigen Änderungen im pH-Bereich zwischen 7,0 und 8,5 berichten (Wallin *et al.*, 1985). Die in dieser Arbeit beobachtete Erhöhung der Enzymaktivität mit steigendem pH-Wert kann mit Blick auf den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus erklärt werden, da die Deprotonierung der Thiolgruppe eines Cysteins im aktiven Zentrum des Enzyms im ersten Schritt der Reaktion (siehe Abb. 1.8 (Schritte 1 bis ÜZ1)) durch hohe pH-Werte begünstigt wird.

4.2 Renaturierung von VKOR

Für die *in vitro* Renaturierung von eukaryotischen Membranproteinen ist bislang überwiegend die Solubilisierung und Verdünnung des Proteins in Sarkosyl-haltigen Lösungen beschrieben (Dolce *et al.*, 2001; Fiermonte *et al.*, 1993, 2002; Kiefer *et al.*, 1996). Daneben nutzten Baneres *et al.* (2003, 2005) absteigende Harnstoff-Gradienten in Gegenwart von Detergens-haltigen Puffern, um den BLT1- (LDAO-basierter Puffer) oder 5-HT₄-Rezeptor (Solubilisierung in Sarkosyl und nachfolgend Wechsel zu DMPC/CHAPS/CHS) zu renaturieren. In kürzlich erschienenen Arbeiten wurde häufig SDS zur Solubilisierung der Membranproteine eingesetzt und dieses nachfolgend gegen wenig denaturierende Detergenzien ausgetauscht, um eine Renaturierung zu erreichen (Dahmane *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2009; Schröder-Tittmann *et al.*, 2010).

Um natives VKOR zu erhalten wurde ein Renaturierungssystem verwendet, das in einigen Variationen bereits erfolgreich für die *in vitro* Renaturierung einiger G-Protein-gekoppelter Rezeptoren an der Universität Halle eingesetzt wurde (Schmidt *et al.*,

2009; Schröder-Tittmann *et al.*, 2010). Dieses System basiert grundsätzlich auf dem von Rozema und Gellman (1996) beschriebenen Rückfaltungssystem („*artificial chaperone assisted refolding*“) und ist eine Form der Rückfaltung durch schnelles Verdünnen. Hierbei erfolgt ein Austausch von SDS gegen mildere, nicht denaturierende Detergenzien, was die Faltung des Proteins in eine native, funktionelle Form ermöglicht. Dabei macht man sich zunutze, dass SDS sehr affin von Methyl- β -Cyclodextrin gebunden wird ($k_D = 22 \mu\text{M}$), während die Bindung von anderen Detergenzien meist deutlich schwächer ist (Promotion Peter Schmidt 2009). Kombiniert wurde dies mit der Methode der Pulsrenaturierung (Nguyen *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 2002), um die Ausbeute an korrekt gefalteten Protein zu erhöhen und die Proteinaggregation zu reduzieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Protein bis zu einer Menge von $3 \mu\text{g}$ pro ml Rückfaltungspuffer optimal für die Renaturierung ist, da bis zu dieser Konzentration die enzymatische VKOR-Aktivität linear zur Menge an VKOR im Renaturierungsansatz ansteigt (Kapitel 3.6.1, Abb. 3.10).

Beide Ansätze mit geringeren Mengen VKOR pro Puls zeigen die gleiche spezifische Aktivität, während der Zusatz von größeren Mengen zu einer Reduktion der spezifischen Aktivität führt. Die erhaltenen Daten stehen in Einklang mit den thermodynamischen Modellen zur *in vitro* Renaturierung (De Bernardez Clark *et al.*, 1998; Kiefhaber *et al.*, 1991), die eine Begünstigung der Aggregation beim Einsatz hoher Proteinkonzentrationen erwarten lassen.

Bei der *in vitro* Renaturierung von nicht in die Membran integrierten Proteinen ist bekannt, dass der pH-Wert einen maßgeblichen Einfluss haben kann (Narita *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2002; Lange *et al.*, 2004; Rudolph *et al.*, 2009), wenn die Bildung von Disulfidbrücken geschwindigkeitsbestimmend für die Faltung ist. Eine Renaturierung bei hohen pH-Werten kann die Deprotonierung der Thiolgruppe des Cysteins beschleunigen und damit die Ausbeute des nativen Proteins erhöhen.

Auf Grundlage der experimentellen Daten und der Struktur des VKOR-homologen Proteins aus *Synechococcus sp.* (Li *et al.*, 2010), kann man davon ausgehen, dass auch humanes VKOR Disulfidbrücken besitzt und diese möglicherweise einen Einfluss auf die *in vitro* Renaturierung haben würden. Daher wurde die Renaturierung bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert während der Faltung keinen Einfluss auf die Renaturierungsausbeute von VKOR ausübt (Kapitel 3.6.2, Tab. 3.2). Auch der Zusatz eines Redoxsystems, das

die Ausbildung einer korrekten Disulfidverbrückung stimulieren sollte (De Bernardez Clark, 2001; Lilie *et al.*, 1998), hatte keinen Effekt auf die Renaturierungsausbeute. Einen weiteren Hinweis lieferte der Zusatz von Reduktionsmitteln zum Renaturierungsansatz. In diesen Ansätzen war keinerlei Reduktion der VKOR-Aktivität zu sehen, was im Falle einer notwendigen Disulfidbrückenbildung während der Renaturierung erwartet worden wäre. Die erhaltenen Resultate lassen daher vermuten, dass die Faltung in eine native VKOR-Struktur nicht von der Ausbildung von Disulfidbrücken abhängt. Es ist dagegen wahrscheinlich, dass VKOR wie andere Membranproteine eine Faltung nach dem von Engelman und Popot postulierten Modell durchläuft (Engelman *et al.*, 2003; Popot *et al.*, 1990). Dieses fasst die hydrophoben Transmembranhelices als unabhängige, stabile Sekundärstruktureinheiten auf, die in einer zweiten Phase durch hydrophobe Wechselwirkungen miteinander interagieren und stärker geordnete Strukturen bilden. Dies bildet den Ausgangspunkt für die nachfolgende Faltung ungeordneter *loop*-Bereiche, Eintritt anderer Bereiche in die Lipidmembran, Bindung prostethischer Gruppen und Oligomerisierung. Die Beobachtung, dass VKOR in SDS bereits helikale Strukturen ausgebildet hat (siehe Abb. 3.30), stützt dieses Modell zusätzlich.

Als Konsequenz dieser Hypothese stellt sich die Frage, inwieweit die *in vitro* Renaturierung durch die Detergenumgebung beeinflusst wird, da eine Reihe von Parametern wie hydrophobe Dicke der Lipidmembran bzw. Detergensemizelle oder die Interaktionen mit den umgebenden Lipid- bzw. Detergensmolekülen verschieden auf die Interaktionen zwischen Transmembranhelices oder die nachfolgenden Schritte der Faltung wirken können. Von der Solubilisierung von Membranproteinen ist bekannt, dass verschiedene Detergenzien unterschiedlich gut geeignet sind, um die Funktionalität zu erhalten (Seddon *et al.*, 2004). Analog dazu spielt, aus den oben genannten Gründen, die Wahl des Detergens für die *in vitro* Renaturierung oft eine herausragende Rolle (Baneres *et al.*, 2003, 2005; Gorzelle *et al.*, 1999). Allgemein lässt sich sagen, dass Detergenzien mit längeren Alkylketten und nicht-ionische Detergenzien (z.B. Alkylglucoside) die Proteinfunktion oft besser erhalten (Seddon *et al.*, 2004).

Für die *in vitro* Renaturierung von VKOR zeigte sich, dass die Substitution von DDM durch ein anderes Alkylglucosid (OG) dazu führt, dass VKOR nicht renaturiert werden kann (Kapitel 3.6.3). Trotz struktureller Ähnlichkeit zwischen beiden Detergenzien (siehe Anhang 3) ist die Renaturierung von VKOR offenbar auf DDM

im Rückfaltungspuffer angewiesen. Dies ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Interaktion zwischen Detergens und Protein in beiden Fällen zurückzuführen. In der nativen Membran wird die korrekte Positionierung eines Membranproteins durch ionische Wechselwirkungen von geladenen Gruppen am Ende der Transmembranhelices mit den Kopfgruppen der Phospholipide (sowie Wassermolekülen) und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten der Lipide und den hydrophoben Transmembranbereichen des Proteins bestimmt (Andersson *et al.*, 1992; Lee, 2004; von Heijne *et al.*, 1988). Im Vergleich zu den Lipiden der nativen Membran besitzen Detergenzien jedoch kürzere Alkylketten. Dies kann dazu führen, dass das Protein deformiert wird, um sowohl ionische Wechselwirkungen als auch hydrophobe Interaktionen zu realisieren. Ein derartig missgefaltetes Protein liegt möglicherweise in den OG/CHAPS-Mizellen vor, so dass die native VKOR-Struktur darin nicht ausgebildet werden kann (siehe Abb. 4.2). Man kann vermuten, dass in den gemischten DDM/CHAPS-Mizellen das zwitterionische Detergens CHAPS vor allem ionische Wechselwirkungen mit dem Protein (und Wasser) realisiert, während DDM mit seiner langen Alkylkette vor allem hydrophobe Wechselwirkungen zum Protein eingeht ohne dieses strukturell zu beeinträchtigen. Ein Indiz, wie wichtig CHAPS hierbei ist, zeigt die Rückfaltung ohne dieses Detergens, die zu einer deutlich geringeren Renaturierungsausbeute führte (Kapitel 3.6.3).

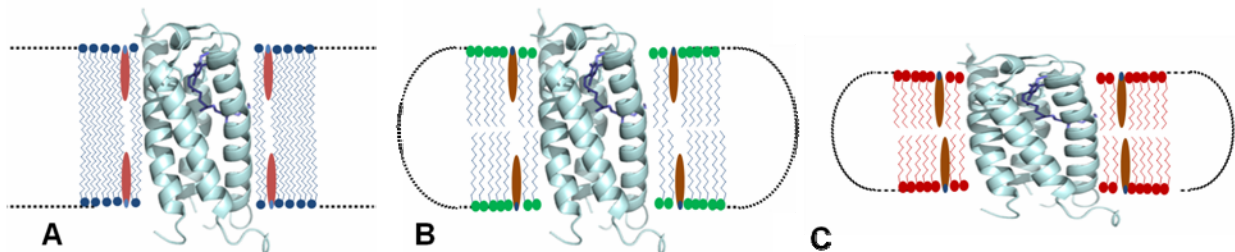


Abb. 4.2 Modell der Lokalisierung von VKOR

(A) In einer Membranumgebung wird die Positionierung von VKOR durch Interaktionen zwischen geladenen Aminosäuren des Proteins und den Kopfgruppen der Phospholipide sowie durch hydrophobe Interaktionen zwischen den Lipid-Alkylketten und hydrophoben Transmembranbereichen des Proteins bestimmt. Phospholipide sind in blau dargestellt, Cholesterol ist rot dargestellt. (B) Eine vergleichbare Situation wird während der Renaturierung von VKOR in DDM/CHAPS-Mizellen geschaffen. DDM ist grün und CHAPS in braun dargestellt. (C) In Gegenwart von OG/CHAPS-Mizellen kann es aufgrund der geringeren Länge der Detergens-Alkylketten und der damit einhergehenden geringeren hydrophoben Dicke jedoch nicht zur Renaturierung von VKOR kommen. OG ist in rot dargestellt, CHAPS in braun.

4.3 Rekonstitution von VKOR

Für den Nachweis der enzymatischen Aktivität war es notwendig, VKOR nach dem essentiellen Schritt der *in vitro* Renaturierung in eine Lipidumgebung zu rekonstituieren (Kapitel 3.7.1, Abb. 3.13). Die Spezifität der beobachteten Enzymaktivität konnte durch eine Inhibierung mit dem spezifischen Antagonisten Warfarin bestätigt werden. Der ermittelte IC_{50} -Wert von 2,5 μ M ist in guter Übereinstimmung mit den Werten in der Literatur (Begent *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2006; Rost *et al.*, 2004). Damit konnte in dieser Arbeit erstmals die Funktionalität von renaturiertem VKOR nach dessen Rekonstitution in POPC-Liposomen gezeigt werden. Dass eine Lipidumgebung eine unabdingbare Voraussetzung für VKOR-Aktivität ist, wurde bereits durch die Reinigung von VKOR aus Sf9-Insektenzellen gezeigt. Hierbei kam es zu einem Verlust der VKOR-Aktivität durch die Extraktion des Proteins aus den mikrosomalen Membranen (Chu *et al.*, 2006). Die enzymatische Aktivität des gereinigten Proteins wurde anschließend durch Rekonstitution von VKOR in DOPC-Membranen wieder erlangt. Zudem zeigte die Behandlung von VKOR-Präparationen mit Phospholipase A₂, einem Enzym das Lipide hydrolysiert, einen Einfluss auf die VKOR-Aktivität (Wallin *et al.*, 1997). In zahlreichen anderen Präparationen von VKOR wurde ebenfalls ein Verlust der Epoxid-Reduktase-Aktivität des Enzyms im Zuge der Solubilisierung mit Detergenzien festgestellt (Begent *et al.*, 2001; Cain *et al.*, 1997; Mukharji *et al.*, 1985; Wallin *et al.*, 1998). In allen diesen Fällen ist jedoch unklar, in welchem Ausmaß es zu einer Missfaltung oder Denaturierung des VKOR-Enzyms in den Detergenzmizellen kommt. Daher ist offen, ob die fehlende enzymatische Aktivität strukturelle Ursachen hat.

Um diesen Sachverhalt näher zu charakterisieren wurde rekonstituiertes VKOR mit verschiedenen Konzentrationen des Detergens DDM inkubiert. Dabei zeigte sich eine Abnahme der enzymatischen Aktivität bis zu einer Konzentration von 0,6 mM, was in etwa der dreifachen cmc von DDM entspricht (Kapitel 3.8.1). Es konnte jedoch kein Hinweis darauf gefunden werden, dass es in diesem Konzentrationsbereich zu strukturellen Änderungen oder einer Aggregation von VKOR kommt. Die erhaltenen Ergebnisse sprechen somit eher gegen eine strukturelle Deformierung von VKOR durch DDM und für einen Einfluss möglicher Protein-Lipid-Wechselwirkungen. Denkbar wäre, z.B. eine Stabilisierung möglicher Konformationszustände während der Katalyse, wie im Falle des Acetylcholin-

Rezeptors (daCosta *et al.*, 2009) oder des Oxytocin-Rezeptors (Gimpl *et al.*, 1997). Einschränkend muss man jedoch sagen, dass andere Detergenzien VKOR durchaus strukturell beeinträchtigen könnten. Der Einfluss von OG während der Renaturierung (Kapitel 3.6.3) und Rekonstitution (Kapitel 3.7.3) kann als Indiz dafür gesehen werden.

4.3.1 Einfluss der Zusammensetzung der Lipidumgebung

Es ist bekannt, dass auch die Zusammensetzung der Lipidmembran einen maßgeblichen Einfluss auf Membranproteine und deren Aktivität ausüben kann (Lee, 2004; Opekarova *et al.*, 2003). Für VKOR wurde nach dessen Rekonstitution in eine Lipidumgebung, die in ihrer Zusammensetzung der nativen Membran ähnelt, überraschend nur eine sehr geringe Enzymaktivität beobachtet, während in POPC eine deutliche VKOR-Aktivität zu sehen war (Kapitel 3.7.4). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Aktivität durch die Anwesenheit von Cholesterol, sowie in noch größerem Maße durch POPE verursacht wird und nicht auf eine unterschiedliche Rekonstitution zurückzuführen ist. Die erhaltenen Daten scheinen im Widerspruch zur Situation *in vivo* zu stehen. Man muss jedoch einbeziehen, dass Membranen *in vivo* keineswegs homogene Mischungen von Lipiden, sondern eher eine dynamisch strukturierte Mischung unterschiedlicher Membrandomänen sind (Vereb *et al.*, 2003). Die Verteilung von Lipiden variiert zum Teil sehr stark zwischen beiden Seiten der Membranen (Liscum *et al.*, 1995; Schroeder *et al.*, 1991; Yamaji-Hasegawa *et al.*, 2006; Zachowski, 1993), sowie in lateraler Richtung (Jacobson *et al.*, 1995) und wird durch aktiven Transport von Lipiden, Lipid-Lipid-Wechselwirkungen und Protein-Lipid-Wechselwirkungen gesteuert (Kim *et al.*, 2008; Vereb *et al.*, 2003).

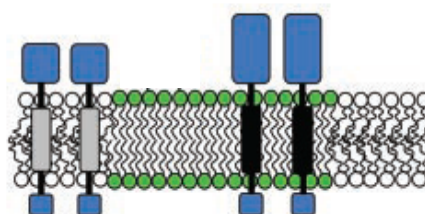


Abb. 4.3 Selektive Akkumulation von Membranproteinen in verschiedenen Membrandomänen.

Die Membran besteht aus Mikrodomänen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung (grün: Membrandomäne mit Lipiden in L β -Phase; weiß: Membrandomäne mit Lipiden in L α -Phase). Der Mechanismus einer selektiven Akkumulation kann durch die Präferenz des Proteins für bestimmte chemische oder physikalische Eigenschaften (Hydrophobizität, Membrandicke, Membranviskosität) der Lipid-Mikrodomäne erklärt werden. (nach Vereb *et al.*, 2003)

Unterschiedliche Eigenschaften und Aktivität von Membranproteinen kann eine Vielzahl von Ursachen haben. Das Membranprotein kann durch bestimmte Lipide stabilisiert werden, wie es für Cytochrom c Reduktase (Hayer-Hartl *et al.*, 1992) und einige GPCRs bekannt ist (Hanson *et al.*, 2008; Paila *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2005). Aber auch die Interaktion mit bestimmten Phospholipid-Kopfgruppen (Romsicki *et al.*, 1999) oder die Fluidität der Membran kann einen direkten Einfluss auf die Eigenschaften von Membranproteinen haben, wie dies für den Cholecystokinin-Rezeptor (Gimpl *et al.*, 1997), Carnitin-Palmitoyltransferase (Kolodziej *et al.*, 1990; McGarry *et al.*, 2000) sowie weitere Membranproteine (Gordon *et al.*, 1980) gezeigt wurde. Für die Photoaktivierung von Rhodopsin bestimmt eine Vielzahl von Faktoren wie *curvature stress* (Biegebeanspruchung) der Lipidmatrix, die hydrophobe Dicke der Lipidmembran, direkte Interaktionen des Proteins mit der Lipid-Kopfgruppe und der Lipid-Alkylkette, sowie die Lipidzusammensetzung der umgebenden Membran das Gleichgewicht zwischen den Metarhodopsin-Zuständen MI und MII (Soubias und Gawrisch 2011).

In einem weiteren Experiment wurde VKOR in Lipide mit einer Phosphatidylcholin-Kopfgruppe rekonstituiert, die sich nur in der Zusammensetzung ihrer Alkylketten unterscheiden (Kapitel 3.7.4.2). Hierbei ist zusätzlich interessant, dass VKOR eine vergleichbare Aktivität in POPC und DOPC zeigte, da für rekombinantes humanes VKOR aus Sf9-Insektenzellen, das in DOPC rekonstituiert wurde, bereits eine enzymatische Aktivität nachgewiesen wurde (Chu *et al.*, 2006). Da der Aktivitätstest für VKOR bei 30 °C durchgeführt wurde, kann man davon ausgehen, dass in DOPC und POPC nahezu 100% des Lipids im flüssig-kristallinen Zustand (L_{α} -Phase) vorliegen und die Lipiddoppelschicht eine ähnlich hohe Fluidität in beiden Fällen besitzt. In DMPC kann dagegen ein Teil des Lipids in der Gelphase (L_{β} -Phase) vorliegen, was in einer geringeren Fluidität resultieren würde. Für DPPC kann man annehmen, dass aufgrund der hohen Übergangstemperatur des Lipids nahezu alle Moleküle in der Gelphase vorliegen und die Membran daher nur eine sehr geringe Fluidität aufweist. Die erhaltenen Ergebnisse stehen daher in guter Übereinstimmung zur erwarteten Fluidität der Lipidmembran, in die VKOR rekonstituiert wurde.

Eine Korrelation der VKOR-Enzymaktivität mit der hydrophoben Dicke der Membran wie es z.B. für Na,K-ATPase (Cornelius *et al.*, 2001) und Diacylglycerolkinase (Pilot *et al.*, 2001) nachgewiesen wurde, konnte nicht beobachtet werden. In DMPC (C14:0, C14:0), das sehr dünne Lipiddoppelschichten bilden sollte, wurde eine

höhere Enzymaktivität beobachtet als in DPPC (C16:0, C16:0). Die VKOR-Enzymaktivität war jedoch in DOPC (C18:1, C18:1) und POPC (C16:0, C18:1), welche die dicksten Membranen bilden sollten, am größten.

Weitere Faktoren, die die unterschiedliche enzymatische Aktivität in verschiedenen Lipiden erklären können, sind z.B. eine veränderte Diffusion des Substrats in den verschiedenen Lipiden. Außerdem könnten trotz exzessiver Dialyse noch geringe Mengen Detergens in den Proben vorhanden sein, die die Phaseneigenschaften der Lipide beeinflussen. Allerdings würde man in diesem Fall erwarten, dass das Detergens aufgrund seines dissoziativen Charakters die Interaktionen zwischen den Lipiden schwächt und daher den Phasenzustand eher in Richtung flüssig-kristalliner Phase verschieben würde (Eley *et al.*, 2001; Karatekin *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2008). Eine weitere Erklärung wäre eine veränderte Protein-Lipid-Wechselwirkung in den verschiedenen Lipiden. Da alle verwendeten Lipide jedoch die gleiche Kopfgruppe besitzen, kommen nur veränderte Interaktionen mit den Alkylketten in Betracht. Nimmt man an, dass das Membranprotein statistisch mit allen Alkylketten gleich interagiert, würde man hierbei eine Abstufung der Aktivität zwischen POPC und DOPC erwarten können, da POPC noch eine Palmitylkette besitzt und daher von seiner Struktur zwischen DPPC und DOPC steht. Geht man allerdings von einer Präferenz der Interaktion zu ungesättigten Alkylketten aus, so könnten die beobachteten Aktivitäten vielleicht zum Teil durch diesen Effekt erklärt werden. Weiterführende Experimente, die diesen Sachverhalt klären können sind hierbei notwendig.

Die erhaltenen Ergebnisse implizieren daher, dass aktives VKOR *in vivo* vermutlich eher in Domänen mit niedriger Viskosität lokalisiert ist (siehe Abb. 4.3), bzw. dass die VKOR-Aktivität durch eine Änderung des Phasenzustands moduliert werden kann, wie dies durch Änderung der Lipidzusammensetzung in Anpassung an bestimmte Einflüsse geschehen kann (Epand *et al.*, 1988; Lundbaek, 2008; Romantsov *et al.*, 2009).

4.3.2 Einfluss reduzierender Bedingungen auf rekonstituiertes VKOR

Chu *et al.* (2006) beschreiben, dass die Zugabe des Reduktionsmittels THP während der Rekonstitution essentiell für die Wiedererlangung der enzymatischen Aktivität von VKOR ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass VKOR auch ohne Zugabe eines Reduktionsmittels nach der Rekonstitution enzymatisch aktiv ist, aber

die Zugabe von DTT die enzymatische Aktivität des rekonstituierten Proteins deutlich erhöht (Kapitel 3.7.6). Allerdings tritt dieser Effekt bei Zugabe von TCEP nicht auf. Dies spricht dafür, dass VKOR zum Zeitpunkt der Reduktion durch DTT bereits rekonstituiert ist und Reste im Transmembranbereich des Proteins betroffen sind. Messungen der intrinsischen Fluoreszenz zeigen keinerlei Änderungen für die TCEP-Zugabe, während der Anstieg der Fluoreszenz nach DTT-Zugabe auf strukturelle Änderungen oder auf die Reduktion quenchender Cystine hinweisen könnte (Kapitel 3.8.2). Allerdings lässt sich ohne weitere Experimente nur über die Bedeutung dieser Daten spekulieren. Durch die DTT-Zugabe könnten intermolekulare Disulfidbrücken reduziert werden, in deren Folge es zur Aufhebung des Quenchings kommt. Jedoch wäre auch ein geringer Effekt auf die Fluoreszenz und die enzymatische Aktivität für die TCEP-Zugabe zu erwarten gewesen, da einige Cysteinreste nach dem gegenwärtigen Strukturmodell (Li *et al.*, 2010; Schulman *et al.*, 2010) lösungsmittel-exponiert sind. Eine komplettere Reduktion der Cysteine im aktiven Zentrum ist ebenfalls nicht wahrscheinlich, da die beobachtete Änderung nach 10 Minuten bereits fast vollständig ist. Als Konsequenz dessen müssten alle Ansätze zur Bestimmung der VKOR-Aktivität die gleiche Aktivität zeigen, da die Reduktion bereits vor dem Start der Reaktion durch Substratzugabe abgeschlossen ist. Somit könnte eine stärkere Stabilisierung von VKOR in seiner reduzierten Form eine Ursache sein oder eine weitere Renaturierung falsch gefalteter Moleküle innerhalb der Membrenumgebung infolge der Reduktion. Gegen die letztgenannte Möglichkeit spricht, dass während der *in vitro* Renaturierung die native Struktur energetisch begünstigt ist und dadurch stabilisiert werden sollte (Lilie *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 1996), jedoch kein Effekt auf die Enzymaktivität durch die Zugabe von Reduktionsmitteln beobachtet wurde (Kapitel 3.7.6). Allerdings könnte es sein, dass die native Struktur des Membranproteins in einer Membrenumgebung deutlich besser stabilisiert wird als in Detergenzmizellen (Popot *et al.*, 2003).

4.3.3 Abschätzung der Reproduzierbarkeit der Experimente und der Effizienz der Renaturierung

Für humanes VKOR konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein Protokoll erarbeitet werden, um das Membranprotein in großen Mengen in einer inaktiven Form in *E. coli* zu produzieren und zu renaturieren. Nach der Rekonstitution in eine Lipidumgebung konnte die Funktionalität von VKOR gezeigt werden und eine Reihe

von Einflüssen auf die enzymatische Aktivität untersucht werden. Dabei wurde in allen Fällen VKOR wie beschrieben renaturiert und in POPC rekonstituiert, um einen internen Standard zum Vergleich zwischen verschiedenen Experimenten zu schaffen. Es ist aber zu sehen, dass die gemessene Enzymaktivität für diesen Standard zum Teil stark abweichen können. Diese Abweichungen können teilweise mit Pipettierfehlern beim Mischen der Rekonstitutionsansätze erklärt werden. Geht man von einer Ungenauigkeit der Pipetten von $\pm 5\%$ aus, können leicht Unterschiede in der OG-Konzentration im Rekonstitutionsansatz von $\pm 1,5\text{ mM}$ erreicht werden. Sieht man den großen Effekt, den Abweichungen von 3 mM haben, könnten große Unterschiede zwischen einzelnen Rekonstitutionsansätzen innerhalb eines Experiments auftreten. Da innerhalb der einzelnen Experimente die Schwankungen jedoch kleiner waren, liegt das Hauptproblem vermutlich in einer ungleichmäßigen Qualität der *in vitro* Renaturierung. Diese hängt von einer ganzen Reihe von Faktoren ab, z.B. der Proteincharge, der Temperatur, der Dauer zwischen den Renaturierungspulsen und der Mischung der Ansätze. Die besten erhaltenen Ausbeuten nach Renaturierung und Rekonstitution liegen zwischen $4,7\%$ und $9,4\%$. Bezieht man die Proteinverluste bei der Rekonstitution mit ein, liegt die Effizienz der Renaturierung zwischen $14,1\%$ und $37,6\%$.

Um vergleichbarere Werte zu erhalten, muss in zukünftigen Arbeiten funktionelles VKOR von inaktivem VKOR vor der Rekonstitution mittels Ligandenaffinitätschromatographie getrennt werden und nach der Rekonstitution Lipid-assoziiertes Protein durch Flotation isoliert werden. Auf diese Weise sollte es möglich sein, deutlich homogenere VKOR-Präparationen zu erhalten und somit die Enzymaktivität auf die tatsächliche Menge von aktivem Protein zu beziehen.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten die Grundlagen geschaffen werden, um humanes VKOR in bakteriellen Expressionssystemen als *inclusion bodies* zu produzieren, zu reinigen und zu renaturieren. Auf diese Weise scheint es möglich zu sein, humanes VKOR in zukünftigen Arbeiten in genügenden Mengen und ausreichender Reinheit für die strukturelle, biochemische und biophysikalische Charakterisierung zur Verfügung zu stellen. Dies stellt somit eines der wenigen Beispiele für die gelungene *in vitro* Renaturierung eines humanen Membranproteins dar.

Die strukturelle Charakterisierung des Membranproteins mit den etablierten Methoden kann jedoch weitere Herausforderungen mit sich bringen. Bislang konnte nicht geklärt werden, ob VKOR nach der Renaturierung bereits in der nativen Struktur vorliegt oder diese erst nach der Rekonstitution in Lipide erreicht wird. Die Charakterisierung mittels CD-Spektrophotometrie wurde in dieser Arbeit versucht (Kapitel 3.8.3), kann aber sowohl durch Arginin im Rückfaltungspuffer, als auch durch Lipide nach erfolgter Rekonstitution gestört werden. Daher ist diese Methode zur Untersuchung des Proteins nicht geeignet. Die Aufnahme von 1D-H-NMR-Spektren könnte hierbei Aufschluss geben, ab welchem Schritt VKOR gefaltet vorliegt.

Eine vielversprechende Alternative zur Charakterisierung von humanem VKOR stellt die Verwendung homologer bakterieller VKOR-Proteine dar. Oftmals lassen sich bakterielle Proteine besser heterolog in *E. coli* exprimieren und reinigen, so dass adäquate Mengen für die Strukturanalyse gewonnen werden können (Junge *et al.*, 2008; Tate, 2001). Die Aufklärung der Struktur eines VKOR-homologen Proteins aus *Synechococcus* sp. (Li *et al.*, 2010) ist hierfür beispielhaft zu nennen. Diese Struktur hat eine ganze Reihe neuer Erkenntnisse über die Topologie, mögliche Redoxpartner und den wahrscheinlichen Reaktionsweg des humanen Enzyms gebracht. Das bakterielle VKOR ist jedoch nicht in der Lage die Reduktion von Vitamin K Epoxid zu katalysieren. Die Ursache für diesen wichtigen Unterschied zwischen humanem und bakteriellem VKOR konnte bislang nicht anhand der Struktur und weiteren Untersuchungen beantwortet werden. Möglicherweise können zukünftige Mutationsstudien, die zu einer Epoxid-Reduktase-Aktivität des bakteriellen Enzyms führen, oder Varianten des humanen VKOR, die die Charakteristik des bakteriellen Enzyms aufweisen, diese Lücke schließen.

Weiterhin wäre es interessant, einzelne Schritte der enzymatischen Reaktion beobachten zu können. Hierfür könnten zum Beispiel Cysteinreste im Molekül mutiert und VKOR so in einer Phase des Reaktionsmechanismus fixiert werden, wie es schon zur Identifizierung der ER-Redoxpartner durchgeführt wurde (Schulman *et al.*, 2010). Auch die Einbringung von Fluoreszenzsonden an verschiedenen Stellen im Molekül könnte helfen, eventuelle Konformationsänderungen während der Reaktion verfolgen zu können und Interaktionen mit dem Redoxpartner zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Vitamin K Epoxid Reduktase ist ein integrales Membranprotein, das die enzymatische Umsetzung von Vitamin K Epoxid zu Vitamin K und Vitamin K Hydrochinon innerhalb des Vitamin K-Zyklus katalysiert. VKOR ist daher essentiell, um den Cofaktor für die γ -Carboxylierung von Vitamin K abhängigen Proteinen bereitzustellen und trägt somit zur Aufrechterhaltung einer funktionellen Blutgerinnung, der Kalzium-Homöostase in Blut und Knochengewebe und der Regulation proliferativer und apoptotischer Prozesse bei.

In dieser Arbeit wurde ein System etabliert, mit dem humanes VKOR erstmals im bakteriellen Expressionssystem in großen Mengen in Form von *inclusion bodies* produziert und unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden konnte. Ein Protokoll für die Renaturierung und Rekonstitution des Proteins wurde erarbeitet, mit dem es möglich war VKOR in nativer Form zu erhalten. Durch die Etablierung eines Assays der enzymatischen Aktivität war es möglich, die Funktionalität nachzuweisen und die Renaturierungsausbeuten durch den Vergleich mit VKOR exprimierenden HEK293-Zellen zu quantifizieren. Außerdem ermöglichte dies die Optimierung der Renaturierung und Rekonstitution und die weitere biochemische und biophysikalische Charakterisierung des Enzyms. Um VKOR für weiterführende strukturelle Untersuchungen bereitzustellen, sollte jedoch die Homogenität des renaturierten und rekonstituierten Proteins weiter verbessert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität stark durch die Lipidumgebung beeinflusst wird. In Lipidmischungen inhibieren POPE und Cholesterol offenbar die VKOR-Aktivität, während Phosphatidylcholine mit ungesättigten Alkylketten einen förderlichen Effekt besitzen. Die erhaltenen Daten aus den Enzymassays weisen auf Unterschiede des Lipidphasenzustands und des Diffusionsverhaltens als wahrscheinliche Ursachen der unterschiedlichen Aktivität hin. Die durchgeführten Flotationsexperimente sprechen gegen eine ungleichmäßige Effizienz der Rekonstitution in die verschiedenen Lipidmembranen als Grund für die differierenden VKOR-Aktivitäten. Der Verlust von Protein-Lipid-Wechselwirkungen scheint zu einer Abnahme der VKOR-Enzymaktivität führen zu können.

Ein Einfluss des pH-Wertes oder der Gegenwart von Redoxsystemen während der Renaturierung wurde nicht beobachtet. Daher scheinen keine strukturell wichtigen Disulfidbrücken in der Renaturierung von VKOR involviert zu sein.

Mit dem in dieser Arbeit etablierten System ist es möglich, natives humanes VKOR in geeigneten Mengen für dessen biochemische Charakterisierung zu gewinnen. Somit wurde die Grundlage geschaffen, um den Einfluss diverser Mutationen, von verschiedenen Antagonisten oder der Lipidumgebung sowie weiterer Faktoren auf dieses medizinisch bedeutsame Membranprotein zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Andersson, H., Bakker, E., & von Heijne, G. (1992). Different positively charged amino acids have similar effects on the topology of a polytopic transmembrane protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 267(3), 1491-1495.
- Andrade, M. A., Chacon, P., Merelo, J. J., & Moran, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng*, 6(4), 383-390.
- Arora, D., & Khanna, N. (1996). Method for increasing the yield of properly folded recombinant human gamma interferon from inclusion bodies. *J Biotechnol*, 52(2), 127-133.
- Baneres, J. L., Martin, A., Hullot, P., Girard, J. P., Rossi, J. C., & Parello, J. (2003a). Structure-based analysis of GPCR function: conformational adaptation of both agonist and receptor upon leukotriene B4 binding to recombinant BLT1. *J Mol Biol*, 329(4), 801-814.
- Baneres, J. L., & Parello, J. (2003b). Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J Mol Biol*, 329(4), 815-829.
- Baneres, J. L., Mesnier, D., Martin, A., Joubert, L., Dumuis, A., & Bockaert, J. (2005). Molecular characterization of a purified 5-HT4 receptor: a structural basis for drug efficacy. *J Biol Chem*, 280(21), 20253-20260.
- Bannwarth, M., & Schulz, G.E. (2003). The expression of outer membrane proteins for crystallization. *Biochim Biophys Acta*, 1610(1), 37-45.
- Baynes, B. M., Wang, D. I., & Trout, B. L. (2005). Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry*, 44(12), 4919-4925.
- Begent, L. A., Hill, A. P., Steventon, G. B., Hutt, A. J., Pallister, C. J., & Cowell, D. C. (2001). Characterization and purification of the vitamin K1 2,3 epoxide reductases system from rat liver. *J Pharm Pharmacol*, 53(4), 481-486.
- Bell, R. G., & Matschiner, J. T. (1972). Warfarin and the inhibition of vitamin K activity by an oxide metabolite. *Nature*, 237(5349), 32-33.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 340(4), 783-795.
- Binder, W. H., Barragan, V., & Menger, F. M. (2003). Lipidmembranen - Domänen und Rafts in Lipidmembranen, *Angewandte Chemie* (Vol. 115, pp. 5980-6007). Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- Bogdanov, M., & Dowhan, W. (1998). Phospholipid-assisted protein folding: phosphatidylethanolamine is required at a late step of the conformational maturation of the polytopic membrane protein lactose permease. *Embo J*, 17(18), 5255-5264.
- Bogdanov, M., & Dowhan, W. (1999). Lipid-assisted protein folding. *J Biol Chem*, 274(52), 36827-36830.
- Bogdanov, M., Heacock, P. N., & Dowhan, W. (2002). A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. *Embo J*, 21(9), 2107-2116.
- Bolen, D. W., & Baskakov, I. V. (2001). The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol*, 310(5), 955-963.
- Booth, P. J., & Curnow, P. (2006). Membrane proteins shape up: understanding in vitro folding. *Curr Opin Struct Biol*, 16(4), 480-488.
- Booth, S. L. (2009). Roles for vitamin K beyond coagulation. *Annu Rev Nutr*, 29, 89-110.

- Borowski, M., Furie, B. C., Bauminger, S., & Furie, B. (1986). Prothrombin requires two sequential metal-dependent conformational transitions to bind phospholipid. Conformation-specific antibodies directed against the phospholipid-binding site on prothrombin. *J Biol Chem*, 261(32), 14969-14975.
- Bowie, J. U. (2001). Stabilizing membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 11(4), 397-402.
- Brinkmann, U., Buchner, J., & Pastan, I. (1992). Independent domain folding of *Pseudomonas* exotoxin and single-chain immunotoxins: influence of interdomain connections. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(7), 3075-3079.
- Cain, D., Hutson, S. M., & Wallin, R. (1997). Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, 272(46), 29068-29075.
- Calderone, T. L., Stevens, R. D., & Oas, T. G. (1996). High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 262(4), 407-412.
- Carpenter, E. P., Beis, K., Cameron, A. D., & Iwata, S. (2008). Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol*, 18(5), 581-586.
- Chen, G. Q., & Gouaux, E. (1999). Probing the folding and unfolding of wild-type and mutant forms of bacteriorhodopsin in micellar solutions: evaluation of reversible unfolding conditions. *Biochemistry*, 38(46), 15380-15387.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K., & Stevens, R. C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 318(5854), 1258-1265.
- Chevalier, C., Al Bazzal, A., Vidic, J., Fevrier, V., Bourdieu, C., Bouguyon, E., Le Goffic, R., Vautherot, J. F., Bernard, J., Moudjou, M., Noinville, S., Chich, J. F., Da Costa, B., Rezaei, H., & Delmas, B. (2010). PB1-F2 influenza A virus protein adopts a beta-sheet conformation and forms amyloid fibers in membrane environments. *J Biol Chem*, 285(17), 13233-13243.
- Chu, P. H., Huang, T. Y., Williams, J., & Stafford, D. W. (2006). Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(51), 19308-19313.
- Cline, D.J., Redding, S.E., Brohawn, S.G., Psathas, J.N., Schneider, J.P., & Thorpe, C. (2004). New water-soluble phosphines as reductants of peptide and protein disulfide bonds: reactivity and membrane permeability. *Biochemistry*, 43(48), 15195-15203.
- Conly, J., & Stein, K. (1994). Reduction of vitamin K2 concentrations in human liver associated with the use of broad spectrum antimicrobials. *Clin Invest Med*, 17(6), 531-539.
- Cornelius, F. (2001). Modulation of Na,K-ATPase and Na-ATPase activity by phospholipids and cholesterol: I. Steady-state kinetics. *Biochemistry*, 40, 8842-8851.
- Cranenburg, E. C., Schurgers, L. J., & Vermeer, C. (2007). Vitamin K: the coagulation vitamin that became omnipotent. *Thromb Haemost*, 98(1), 120-125.
- daCosta, C. J., & Baenziger, J. E. (2009). A lipid-dependent uncoupled conformation of the acetylcholine receptor. *J Biol Chem*, 284(26), 17819-17825.
- Dam, H. (1935). The antihaemorrhagic vitamin of the chick. *Biochem J*, 29(6), 1273-1285.

- Dahmane, T., Damian, M., Mary, S., Popot, J.-L., & Baneres, J.-L. (2009). Amphipol-Assisted in Vitro Folding of G Protein-Coupled Receptors. *Biochemistry*, 48(27), 6516–6521.
- Danziger, J. (2008). Vitamin K-dependent proteins, warfarin, and vascular calcification. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3(5), 1504-1510.
- Davis, C. H., Deerfield, D., 2nd, Wymore, T., Stafford, D. W., & Pedersen, L. G. (2007). A quantum chemical study of the mechanism of action of Vitamin K epoxide reductase (VKOR) II. Transition states. *J Mol Graph Model*, 26(2), 401-408.
- De Bernardez Clark, E., Hevehan, D., Szela, S., & Maachupalli-Reddy, J. (1998). Oxidative renaturation of hen egg-white lysozyme. Folding vs aggregation. *Biotechnol Prog*, 14(1), 47-54.
- De Bernardez Clark, E., Schwarz, E., & Rudolph, R. (1999). Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol*, 309, 217-236.
- De Bernardez Clark, E. (2001). Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol*, 12(2), 202-207.
- Diab, C., Tribet, C., Gohon, Y., Popot, J. L., & Winnik, F. M. (2007). Complexation of integral membrane proteins by phosphorylcholine-based amphipols. *Biochim Biophys Acta*, 1768(11), 2737-2747.
- Dolce, V., Fiermonte, G., Runswick, M. J., Palmieri, F., & Walker, J. E. (2001). The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), 2284-2288.
- Dowd, P., Hershline, R., Ham, S. W., & Naganathan, S. (1995). Vitamin K and energy transduction: a base strength amplification mechanism. *Science*, 269(5231), 1684-1691.
- Dutton, R. J., Wayman, A., Wei, J. R., Rubin, E. J., Beckwith, J., & Boyd, D. (2010). Inhibition of bacterial disulfide bond formation by the anticoagulant warfarin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(1), 297-301.
- Eley, J. G., & Triumalashetty, P. (2001). In vitro assessment of alkylglycosides as permeability enhancers. *AAPS PharmSciTech*, 2(3), E19.
- Engelman, D. M., Chen, Y., Chin, C. N., Curran, A. R., Dixon, A. M., Dupuy, A. D., Lee, A. S., Lehnert, U., Matthews, E. E., Reshetnyak, Y. K., Senes, A., & Popot, J. L. (2003). Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett*, 555(1), 122-125.
- Epand, R. M., & Bottega, R. (1988). Determination of the phase behaviour of phosphatidylethanolamine admixed with other lipids and the effects of calcium chloride: implications for protein kinase C regulation. *Biochim Biophys Acta*, 944(2), 144-154.
- Epand, R. M. (2006). Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. *Prog Lipid Res*, 45(4), 279-294.
- Fasco, M. J., Hildebrandt, E. F., & Suttie, J. W. (1982a). Evidence that warfarin anticoagulant action involves two distinct reductase activities. *J Biol Chem*, 257(19), 11210-11212.
- Fasco, M. J., & Principe, L. M. (1982b). Vitamin K1 hydroquinone formation catalyzed by DT-diaphorase. *Biochem Biophys Res Commun*, 104(1), 187-192.
- Fasco, M. J., Preusch, P. C., Hildebrandt, E., & Suttie, J. W. (1983a). Formation of hydroxyvitamin K by vitamin K epoxide reductase of warfarin-resistant rats. *J Biol Chem*, 258(7), 4372-4380.
- Fasco, M. J., Principe, L. M., Walsh, W. A., & Friedman, P. A. (1983b). Warfarin inhibition of vitamin K 2,3-epoxide reductase in rat liver microsomes. *Biochemistry*, 22(24), 5655-5660.

- Fiermonte, G., Dolce, V., Palmieri, L., Ventura, M., Runswick, M. J., Palmieri, F., & Walker, J. E. (2001). Identification of the human mitochondrial oxodicarboxylate carrier. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal location. *J Biol Chem*, 276(11), 8225-8230.
- Fiermonte, G., Palmieri, L., Todisco, S., Agrimi, G., Palmieri, F., & Walker, J. E. (2002). Identification of the mitochondrial glutamate transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J Biol Chem*, 277(22), 19289-19294.
- Fregin, A., Rost, S., Wolz, W., Krebsova, A., Muller, C. R., & Oldenburg, J. (2002). Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood*, 100(9), 3229-3232.
- Furie, B., & Furie, B. C. (1988). The molecular basis of blood coagulation. *Cell*, 53(4), 505-518.
- Furie, B., & Furie, B. C. (1990). Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. *Blood*, 75(9), 1753-1762.
- Furie, B., Bouchard, B. A., & Furie, B. C. (1999). Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood*, 93(6), 1798-1808.
- Furie, B. C., Ratcliffe, J. V., Tward, J., Jorgensen, M. J., Blaszkowsky, L. S., DiMichele, D., & Furie, B. (1997). The gamma-carboxylation recognition site is sufficient to direct vitamin K-dependent carboxylation on an adjacent glutamate-rich region of thrombin in a propeptide-thrombin chimera. *J Biol Chem*, 272(45), 28258-28262.
- Gelamo, E. L., & Tabak, M. (2000). Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 56A(11), 2255-2271.
- Gill, S. C., & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, 182(2), 319-326.
- Gimpl, G., Klein, U., Reilander, H., & Fahrenholz, F. (1995). Expression of the human oxytocin receptor in baculovirus-infected insect cells: high-affinity binding is induced by a cholesterol-cyclodextrin complex. *Biochemistry*, 34(42), 13794-13801.
- Gimpl, G., Burger, K., & Fahrenholz, F. (1997). Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry*, 36(36), 10959-10974.
- Goodstadt, L., & Ponting, C. P. (2004). Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci*, 29(6), 289-292.
- Gordon, E., Horsefield, R., Swarts, H. G., de Pont, J. J., Neutze, R., & Snijder, A. (2008). Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 62(1), 1-8.
- Gordon, L. M., Sauerheber, R. D., Esgate, J. A., Dipple, I., Marchmont, R. J., & Houslay, M. D. (1980). The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes. *J Biol Chem*, 255(10), 4519-4527.
- Gorzelle, B.M., Nagy, J.K., Oxenoid, K., Lonzer, W.L., Cafiso, D.S., & Sanders, C.R. (1999). Reconstitutive Refolding of Diacylglycerol Kinase, an Integral Membrane Protein. *Biochemistry*, 38(49), 16373-16382.
- Greenfield, N., & Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 8(10), 4108-4116.
- Grisshammer, R., & Tate, C. G. (1995). Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev Biophys*, 28(3), 315-422.

- Hanson, M. A., Cherezov, V., Griffith, M. T., Roth, C. B., Jaakola, V. P., Chien, E. Y., Velasquez, J., Kuhn, P., & Stevens, R. C. (2008). A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure*, 16(6), 897-905.
- Hasanbasic, I., Cuerquis, J., Varnum, B., & Blostein, M. D. (2004). Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(3), H1207-1213.
- Hasanbasic, I., Rajotte, I., & Blostein, M. (2005). The role of gamma-carboxylation in the anti-apoptotic function of gas6. *J Thromb Haemost*, 3(12), 2790-2797.
- Hasegawa, J., Loh, H. H., & Lee, N. M. (1987). Lipid requirement for mu opioid receptor binding. *J Neurochem*, 49(4), 1007-1012.
- Hayer-Hartl, M., Schagger, H., von Jagow, G., & Beyer, K. (1992). Interactions of phospholipids with the mitochondrial cytochrome-c reductase studied by spin-label ESR and NMR spectroscopy. *Eur J Biochem*, 209(1), 423-430.
- Hiller, S., Garces, R. G., Malia, T. J., Orekhov, V. Y., Colombini, M., & Wagner, G. (2008). Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles. *Science*, 321(5893), 1206-1210.
- Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., Ijzerman, A. P., & Stevens, R. C. (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*, 322(5905), 1211-1217.
- Jacobson, K., Sheets, E. D., & Simson, R. (1995). Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*, 268(5216), 1441-1442.
- Jin, D. Y., Tie, J. K., & Stafford, D. W. (2007). The conversion of vitamin K epoxide to vitamin K quinone and vitamin K quinone to vitamin K hydroquinone uses the same active site cysteines. *Biochemistry*, 46(24), 7279-7283.
- Johnson, W. C., Jr. (1990). Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins*, 7(3), 205-214.
- Jorgensen, M. J., Cantor, A. B., Furie, B. C., Brown, C. L., Shoemaker, C. B., & Furie, B. (1987). Recognition site directing vitamin K-dependent gamma-carboxylation resides on the propeptide of factor IX. *Cell*, 48(2), 185-191.
- Joubert, O., Nehme, R., Bidet, M., & Mus-Veteau, I. (2010). Heterologous expression of human membrane receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol*, 601, 87-103.
- Julien, M., Magne, D., Masson, M., Rolli-Derkinderen, M., Chassande, O., Cario-Toumaniantz, C., Cherel, Y., Weiss, P., & Guicheux, J. (2007). Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway. *Endocrinology*, 148(2), 530-537.
- Junge, F., Schneider, B., Reckel, S., Schwarz, D., Dotsch, V., & Bernhard, F. (2008). Large-scale production of functional membrane proteins. *Cell Mol Life Sci*, 65(11), 1729-1755.
- Karatekin, E., Sandre, O., Guitouni, H., Borghi, N., Puech, P. H., & Brochard-Wyart, F. (2003). Cascades of transient pores in giant vesicles: line tension and transport. *Biophys J*, 84(3), 1734-1749.
- Karlsson, M., Fotiadis, D., Sjoval, S., Johansson, I., Hedfalk, K., Engel, A., & Kjellbom, P. (2003). Reconstitution of water channel function of an aquaporin overexpressed and purified from *Pichia pastoris*. *FEBS Lett*, 537(1-3), 68-72.
- Kiefer, H., Krieger, J., Olszewski, J. D., Von Heijne, G., Prestwich, G. D., & Breer, H. (1996). Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli*: purification, reconstitution, and ligand binding. *Biochemistry*, 35(50), 16077-16084.

- Kiefer, H. (2003). In vitro folding of alpha-helical membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1610(1), 57-62.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H., & Buchner, J. (1991). Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N Y)*, 9(9), 825-829.
- Kim, W. S., Weickert, C. S., & Garner, B. (2008). Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *J Neurochem*, 104(5), 1145-1166.
- Kobayashi, M., Struts, A. V., Fujiwara, T., Brown, M. F., & Akutsu, H. (2008). Fluid mechanical matching of H⁺-ATP synthase subunit c-ring with lipid membranes revealed by 2H solid-state NMR. *Biophys J*, 94(11), 4339-4347.
- Kolodziej, M. P., & Zammit, V. A. (1990). Sensitivity of inhibition of rat liver mitochondrial outer-membrane carnitine palmitoyltransferase by malonyl-CoA to chemical- and temperature-induced changes in membrane fluidity. *Biochem J*, 272(2), 421-425.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305(3), 567-580.
- Kulman, J. D., Harris, J. E., Xie, L., & Davie, E. W. (2001). Identification of two novel transmembrane gamma-carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4), 1370-1375.
- Kulman, J. D., Harris, J. E., Xie, L., & Davie, E. W. (2007). Proline-rich Gla protein 2 is a cell-surface vitamin K-dependent protein that binds to the transcriptional coactivator Yes-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(21), 8767-8772.
- Laage, R., & Langosch, D. (2001). Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins. *Traffic*, 2(2), 99-104.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lange, C., & Rudolph, R. (2004). Production of recombinant proteins for therapy, diagnostics, and industrial research by in vitro folding. *Protein Folding Handbook. Part II*, 1215-1250. Edited by J. Buchner and T. Kiefhaber, WILEY-VCH Verlag, ISBN: 3-527-30784-2.
- Lee, A. G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1666(1-2), 62-87.
- Lee, J. J., & Fasco, M. J. (1984). Metabolism of vitamin K and vitamin K 2,3-epoxide via interaction with a common disulfide. *Biochemistry*, 23(10), 2246-2252.
- Li, A., Sowder, R. C., Henderson, L. E., Moore, S. P., Garfinkel, D. J., & Fisher, R. J. (2001). Chemical cleavage at aspartyl residues for protein identification. *Anal Chem*, 73(22), 5395-5402.
- Li, T., Chang, C. Y., Jin, D. Y., Lin, P. J., Khvorova, A., & Stafford, D. W. (2004). Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*, 427(6974), 541-544.
- Li, W., Schulman, S., Dutton, R. J., Boyd, D., Beckwith, J., & Rapoport, T. A. (2010). Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nature*, 463(7280), 507-512.
- Lilie, H., Schwarz, E., & Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in E. coli. *Curr Opin Biotechnol*, 9(5), 497-501.
- Liscum, L., & Underwood, K. W. (1995). Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J Biol Chem*, 270(26), 15443-15446.

- Lundbaek, J. A. (2008). Lipid bilayer-mediated regulation of ion channel function by amphiphilic drugs. *J Gen Physiol*, 131(5), 421-429.
- Luo, G., Ducey, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., Loyer, E., Behringer, R. R., & Karsenty, G. (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 386(6620), 78-81.
- Ma, J., & Xia, D. (2008). The use of blue native PAGE in the evaluation of membrane protein aggregation states for crystallization. *J Appl Crystallogr*, 41(Pt 6), 1150-1160.
- Madani, F., Peralvarez-Marín, A., & Graslund, A. (2011). Liposome Model Systems to Study the Endosomal Escape of Cell-Penetrating Peptides: Transport across Phospholipid Membranes Induced by a Proton Gradient. *J Drug Deliv*, 2011, 897592.
- Magnani, F., Shibata, Y., Serrano-Vega, M. J., & Tate, C. G. (2008). Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(31), 10744-10749.
- Mancia, F., & Hendrickson, W. A. (2007). Expression of recombinant G-protein coupled receptors for structural biology. *Mol Biosyst*, 3(10), 723-734.
- McCusker, E. C., Bane, S. E., O'Malley, M. A., & Robinson, A. S. (2007). Heterologous GPCR expression: a bottleneck to obtaining crystal structures. *Biotechnol Prog*, 23(3), 540-547.
- McGarry, J. D., & Brown, N. F. (2000). Reconstitution of purified, active and malonyl-CoA-sensitive rat liver carnitine palmitoyltransferase I: relationship between membrane environment and malonyl-CoA sensitivity. *Biochem J*, 349(Pt 1), 179-187.
- Melaragno, M. G., Cavet, M. E., Yan, C., Tai, L. K., Jin, Z. G., Haendeler, J., & Berk, B. C. (2004). Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol*, 37(4), 881-887.
- Michalke, K., Graviere, M. E., Huyghe, C., Vincentelli, R., Wagner, R., Pattus, F., Schroeder, K., Oschmann, J., Rudolph, R., Cambillau, C., & Desmyter, A. (2009). Mammalian G-protein-coupled receptor expression in Escherichia coli: I. High-throughput large-scale production as inclusion bodies. *Anal Biochem*, 386(2), 147-155.
- Mukharji, I., & Silverman, R. B. (1985). Purification of a vitamin K epoxide reductase that catalyzes conversion of vitamin K 2,3-epoxide to 3-hydroxy-2-methyl-3-phytyl-2,3-dihydronaphthoquinone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(9), 2713-2717.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-273.
- Murshed, M., Schinke, T., McKee, M. D., & Karsenty, G. (2004). Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol*, 165(5), 625-630.
- Mus-Veteau, I. (2010). Heterologous expression of membrane proteins for structural analysis. *Methods Mol Biol*, 601, 1-16.
- Narita, H., Nakagawa, A., Yamamoto, Y., Sakisaka, T., Takai, Y., & Suzuki, M. (2011). Refolding, crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of the whole extracellular regions of nectins. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 67(Pt 3), 344-348.
- Nelsestuen, G. L., Zytkevich, T. H., & Howard, J. B. (1974). The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J Biol Chem*, 249(19), 6347-6350.

- Nguyen, H. D., & Hall, C. K. (2002). Effect of rate of chemical or thermal renaturation on refolding and aggregation of a simple lattice protein. *Biotechnol Bioeng*, 80(7), 823-834.
- Nunez, M. T., & Glass, J. (1982). Reconstitution of the transferrin receptor in lipid vesicles. Effect of cholesterol on the binding of transferrin. *Biochemistry*, 21(17), 4139-4143.
- Oneda, H., & Inouye, K. (1999). Refolding and recovery of recombinant human matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from inclusion bodies expressed by *Escherichia coli*. *J Biochem*, 126(5), 905-911.
- Opekarova, M., & Tanner, W. (2003). Specific lipid requirements of membrane proteins--a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim Biophys Acta*, 1610(1), 11-22.
- Orsini, G., & Goldberg, M. E. (1978). The renaturation of reduced chymotrypsinogen A in guanidine HCl. Refolding versus aggregation. *J Biol Chem*, 253(10), 3453-3458.
- Oschman, J. (2008). Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung des humanen Parathormon-Rezeptors. *Dissertation* im Institut für Biochemie/Biotechnologie der MLU-Halle-Wittenberg
- Paila, Y. D., Tiwari, S., & Chattopadhyay, A. (2009). Are specific nonannular cholesterol binding sites present in G-protein coupled receptors? *Biochim Biophys Acta*, 1788(2), 295-302.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., & Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 289(5480), 739-745.
- Pilot, J.D., East, J.M., & Lee, A.G., (2001). Effects of bilayer thickness on the activity of diacylglycerol kinase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 40, 8188-8195
- Popot, J. L., & Engelman, D. M. (1990). Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry*, 29(17), 4031-4037.
- Popot, J. L., Berry, E. A., Charvolin, D., Creuzenet, C., Ebel, C., Engelman, D. M., Flotenmeyer, M., Giusti, F., Gohon, Y., Hong, Q., Lakey, J. H., Leonard, K., Shuman, H. A., Timmins, P., Warschawski, D. E., Zito, F., Zoonens, M., Pucci, B., & Tribet, C. (2003). Amphipols: polymeric surfactants for membrane biology research. *Cell Mol Life Sci*, 60(8), 1559-1574.
- Poser, J. W., & Price, P. A. (1979). A method for decarboxylation of gamma-carboxyglutamic acid in proteins. Properties of the decarboxylated gamma-carboxyglutamic acid protein from calf bone. *J Biol Chem*, 254(2), 431-436.
- Preusch, P. C., & Suttie, J. W. (1984). Relationship of dithiothreitol-dependent microsomal vitamin K quinone and vitamin K epoxide reductases inhibition of epoxide reduction by vitamin K quinone. *Biochim Biophys Acta*, 798(1), 141-143.
- Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450(7168), 383-387.
- Reddy, K. R., Lilie, H., Rudolph, R., & Lange, C. (2005). L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. *Protein Sci*, 14(4), 929-935.
- Rehemtulla, A., Roth, D. A., Wasley, L. C., Kuliopulos, A., Walsh, C. T., Furie, B., Furie, B. C., & Kaufman, R. J. (1993). In vitro and in vivo functional

- characterization of bovine vitamin K-dependent gamma-carboxylase expressed in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(10), 4611-4615.
- Renthal, R. (2006). An unfolding story of helical transmembrane proteins. *Biochemistry*, 45(49), 14559-14566.
- Rodriguez, G., Soria, G., Coll, E., Rubio, L., Barbosa-Barros, L., Lopez-Iglesias, C., Planas, A. M., Estelrich, J., de la Maza, A., & Lopez, O. (2010). Bicosomes: bicelles in dilute systems. *Biophys J*, 99(2), 480-488.
- Rogl, H., Kosemund, K., Kuhlbrandt, W., & Collinson, I. (1998). Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Lett*, 432(1-2), 21-26.
- Romantsov, T., Guan, Z., & Wood, J. M. (2009). Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1788(10), 2092-2100.
- Romsicki, Y., & Sharom, F. J. (1999). The membrane lipid environment modulates drug interactions with the P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry*, 38(21), 6887-6896.
- Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Yao, X. J., Weis, W. I., Stevens, R. C., & Kobilka, B. K. (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science*, 318(5854), 1266-1273.
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356-363.
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hortnagel, K., Pelz, H. J., Lappegard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E. G., Muller, C. R., Strom, T. M., & Oldenburg, J. (2004). Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, 427(6974), 537-541.
- Rost, S., Fregin, A., Hunerberg, M., Bevans, C. G., Muller, C. R., & Oldenburg, J. (2005). Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb Haemost*, 94(4), 780-786.
- Rozema, D., & Gellman, S. H. (1996). Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme: modulation of the competition between renaturation and aggregation. *Biochemistry*, 35(49), 15760-15771.
- Rudolph, R., & Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *Faseb J*, 10(1), 49-56.
- Rudolph, R. & Fischer, S. (1990). Process for obtaining renatured proteins. *US-Pat.* 4,933,434.
- Rudolph, R., & Lange, C. (2009). Strategies for the oxidative in vitro refolding of disulfide-bridge containing proteins. *Oxidative folding of peptides and proteins*, 192-219. Edited by J. Buchner and L. Moroder. Royal Society of Chemistry.
- Ryan, R. O., Forte, T. M., & Oda, M. N. (2003). Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I. *Protein Expr Purif*, 27(1), 98-103.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Manniatis. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2. Auflage ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467.
- Schaafhausen, A., Rost, S., Oldenburg, J., & Muller, C. R. (2010). Identification of VKORC1 interaction partners by split-ubiquitin system and coimmunoprecipitation. *Thromb Haemost*, 105(2), 285-294.
- Schaffner, W., & Weissmann, C. (1973). A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem*, 56(2), 502-514.
- Schmidt, P., Lindner, D., Montag, C., Berndt, S., Beck-Sickinger, A. G., Rudolph, R., & Huster, D. (2009). Prokaryotic expression, in vitro folding, and molecular pharmacological characterization of the neuropeptide Y receptor type 2. *Biotechnol Prog*, 25(6), 1732-1739.
- Schmidt, P. (2009). Prokaryotische Expression, *in vitro*-Faltung und Rekonstitution des Neuropeptid Y-Rezeptors Typ 2 für NMR-Strukturanalysen. *Dissertation im Institut für Biochemie/Biotechnologie der MLU-Halle-Wittenberg*
- Schröder-Tittmann, K., Bosse-Doenecke, E., Reedtz-Runge, S., Ihling, C., Sinz, A., Tittmann, K., & Rudolph, R. (2010). Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the human glucagon-like peptide-1 receptor. *Biochemistry*, 49(36), 7956-7965.
- Schroeder, F., Nemecz, G., Wood, W. G., Joiner, C., Morrot, G., Ayrault-Jarrier, M., & Devaux, P. F. (1991). Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte. *Biochim Biophys Acta*, 1066(2), 183-192.
- Schulman, S., Wang, B., Li, W., & Rapoport, T. A. (2010). Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(34), 15027-15032.
- Seddon, A. M., Curnow, P., & Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, 1666(1-2), 105-117.
- Serrano-Vega, M. J., Magnani, F., Shibata, Y., & Tate, C. G. (2008). Conformational thermostabilization of the beta1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(3), 877-882.
- Silverman, R. B. (1981). Chemical model studies for the mechanism of vitamin K epoxide reductase. *J Am Chem Soc*, 103, 5939-5941.
- Singh, A. K., Bhattacharyya-Pakrasi, M., & Pakrasi, H. B. (2008). Identification of an atypical membrane protein involved in the formation of protein disulfide bonds in oxygenic photosynthetic organisms. *J Biol Chem*, 283(23), 15762-15770.
- Son, B. K., Kozaki, K., Iijima, K., Eto, M., Kojima, T., Ota, H., Senda, Y., Maemura, K., Nakano, T., Akishita, M., & Ouchi, Y. (2006). Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate-induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway. *Circ Res*, 98(8), 1024-1031.
- Soriano-Garcia, M., Padmanabhan, K., de Vos, A. M., & Tulinsky, A. (1992). The Ca²⁺ ion and membrane binding structure of the Gla domain of Ca-prothrombin fragment 1. *Biochemistry*, 31(9), 2554-2566.
- Soubias, O., & Gawrisch, K. (2011). The role of the lipid matrix for structure and function of the GPCR rhodopsin. *Biochim Biophys Acta*, Epub ahead of print, in press, PMID: 21924236
- Sperling, R., Furie, B. C., Blumenstein, M., Keyt, B., & Furie, B. (1978). Metal binding properties of gamma-carboxyglutamic acid. Implications for the vitamin K-dependent blood coagulation proteins. *J Biol Chem*, 253(11), 3898-3906.
- Stafford, D. W. (2005). The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost*, 3(8), 1873-1878.
- Staley, J. P., & Kim, P. S. (1994). Formation of a native-like subdomain in a partially folded intermediate of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Protein Sci*, 3(10), 1822-1832.

- Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W., & Roepstorff, P. (1974). Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(7), 2730-2733.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189(1), 113-130.
- Suttie, J. W. (1985). Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem*, 54, 459-477.
- Takeda, K., Takahashi, K., & Batra, P. P. (1985). Kinetic aspects of the interaction of horse heart cytochrome c with sodium dodecyl sulfate. *Arch Biochem Biophys*, 236(1), 411-417.
- Tate, C. G. (2001). Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Lett*, 504(3), 94-98.
- Thai, K., Choi, J., Franzin, C. M., & Marassi, F. M. (2005). Bcl-XL as a fusion protein for the high-level expression of membrane-associated proteins. *Protein Sci*, 14(4), 948-955.
- Tie, J. K., Nicchitta, C., von Heijne, G., & Stafford, D. W. (2005). Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by in vitro translation/cotranslocation. *J Biol Chem*, 280(16), 16410-16416.
- Tie, J. K., Jin, D. Y., Straight, D. L., & Stafford, D. W. (2011). Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells. *Blood*, 117(10), 2967-2974.
- Tishler, M., Fieser, L. F., & Wendler, N. L. (1940). Hydro, oxido and other derivatives of vitamin K1 and related compounds. *J Am Chem Soc*, 62, 2866-2871.
- Tucker, J., & Grisshammer, R. (1996). Purification of a rat neurotensin receptor expressed in Escherichia coli. *Biochem J*, 317 (Pt 3), 891-899.
- Venter, H., Ashcroft, A. E., Keen, J. N., Henderson, P. J., & Herbert, R. B. (2002). Molecular dissection of membrane-transport proteins: mass spectrometry and sequence determination of the galactose-H⁺ symport protein, GalP, of Escherichia coli and quantitative assay of the incorporation of [ring-2-¹³C]histidine and (15)NH(3). *Biochem J*, 363(Pt 2), 243-252.
- Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Matyus, L., Waldmann, T. A., & Damjanovich, S. (2003). Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14), 8053-8058.
- Viegas, C. S., Simes, D. C., Laize, V., Williamson, M. K., Price, P. A., & Cancela, M. L. (2008). Gla-rich protein (GRP), a new vitamin K-dependent protein identified from sturgeon cartilage and highly conserved in vertebrates. *J Biol Chem*, 283(52), 36655-36664.
- van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2), 112-124.
- von Heijne, G., & Gavel, Y. (1988). Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem*, 174(4), 671-678.
- Wagner, S., Bader, M. L., Drew, D., & de Gier, J. W. (2006). Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends Biotechnol*, 24(8), 364-371.
- Wajih, N., Hutson, S. M., & Wallin, R. (2007). Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum. A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction. *J Biol Chem*, 282(4), 2626-2635.
- Wallace, S. J., Li, J., Nation, R. L., Prankerd, R. J., Velkov, T., & Boyd, B. J. (2010). Self-assembly behavior of colistin and its prodrug colistin methanesulfonate:

- implications for solution stability and solubilization. *J Phys Chem B*, 114(14), 4836-4840.
- Wallin, E., & von Heijne, G. (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci*, 7(4), 1029-1038.
- Wallin, R., & Suttie, J. W. (1981). Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K epoxidation. Evidence that the warfarin-sensitive microsomal NAD(P)H dehydrogenase reduces vitamin K1 in these reactions. *Biochem J*, 194(3), 983-988.
- Wallin, R., & Hutson, S. (1982). Vitamin K-dependent carboxylation. Evidence that at least two microsomal dehydrogenases reduce vitamin K1 to support carboxylation. *J Biol Chem*, 257(4), 1583-1586.
- Wallin, R., & Martin, L. F. (1985). Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver. Effects of warfarin. *J Clin Invest*, 76(5), 1879-1884.
- Wallin, R., & Martin, L. F. (1987a). Warfarin poisoning and vitamin K antagonism in rat and human liver. Design of a system in vitro that mimics the situation in vivo. *Biochem J*, 241(2), 389-396.
- Wallin, R., Patrick, S. D., & Martin, L. F. (1987b). Rat and human liver vitamin K epoxide reductase: inhibition by thiol blockers and vitamin K1. *Int J Biochem*, 19(11), 1063-1068.
- Wallin, R., & Guenther, T. M. (1997). Purification of warfarin-sensitive vitamin K epoxide reductase. *Methods Enzymol*, 282, 395-408.
- Wallin, R., Hutson, S. M., Cain, D., Sweatt, A., & Sane, D. C. (2001). A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *Faseb J*, 15(13), 2542-2544.
- Wallin, R., Sane, D. C., & Hutson, S. M. (2002). Vitamin K 2,3-epoxide reductase and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Thromb Res*, 108(4), 221-226.
- Wang, C. W., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2006). Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J Cell Biol*, 174(7), 973-983.
- Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., Leslie, A. G., Tate, C. G., & Schertler, G. F. (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 454(7203), 486-491.
- Waskell, L., Koblin, D., & Canova-Davis, E. (1982). The lipid composition of human liver microsomes. *Lipids*, 17(4), 317-320.
- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E., & Bauer, J. C. (1994). Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, 151(1-2), 119-123.
- Weiss, H. M., & Grisshammer, R. (2002). Purification and characterization of the human adenosine A(2a) receptor functionally expressed in Escherichia coli. *Eur J Biochem*, 269(1), 82-92.
- Westhofen, P., Watzka, M., Marinova, M., Hass, M., Kirfel, G., Muller, J., Bevans, C. G., Muller, C. R., & Oldenburg, J. (2011). Human vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) mediates vitamin K-dependent intracellular antioxidant function. *J Biol Chem*, 286(17), 15085-15094.
- Wetlaufer, D. B., Branca, P. A., & Chen, G. X. (1987). The oxidative folding of proteins by disulfide plus thiol does not correlate with redox potential. *Protein Eng*, 1(2), 141-146.

- White, J. F., Trinh, L. B., Shiloach, J., & Grisshammer, R. (2004). Automated large-scale purification of a G protein-coupled receptor for neurotensin. *FEBS Lett*, 564(3), 289-293.
- Wijngaards, G., van Deenen, L. L., & Hemker, H. C. (1977). Reconstitution and lipid requirements of porcine tissue thromboplastin. *Biochim Biophys Acta*, 488(1), 161-171.
- Winter, J., Lilie, H., & Rudolph, R. (2002). Renaturation of human proinsulin--a study on refolding and conversion to insulin. *Anal Biochem*, 310(2), 148-155.
- Wuu, J. J., & Swartz, J. R. (2008). High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents. *Biochim Biophys Acta*, 1778(5), 1237-1250.
- Xu, Y., Seven, A. B., Su, L., Jiang, Q. X., & Rizo, J. (2011). Membrane bridging and hemifusion by denaturated Munc18. *PLoS One*, 6(7), e22012.
- Yamaji-Hasegawa, A., & Tsujimoto, M. (2006). Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes. *Biol Pharm Bull*, 29(8), 1547-1553.
- Yao, Z., & Kobilka, B. (2005). Using synthetic lipids to stabilize purified beta2 adrenoceptor in detergent micelles. *Anal Biochem*, 343(2), 344-346.
- Yeliseev, A., Zoubak, L., & Gawrisch, K. (2007). Use of dual affinity tags for expression and purification of functional peripheral cannabinoid receptor. *Protein Expr Purif*, 53(1), 153-163.
- Yeliseev, A. A., Wong, K. K., Soubias, O., & Gawrisch, K. (2005). Expression of human peripheral cannabinoid receptor for structural studies. *Protein Sci*, 14(10), 2638-2653.
- Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J*, 294 (Pt 1), 1-14.
- Zardeneta, G., & Horowitz, P. M. (1994). Detergent, liposome, and micelle-assisted protein refolding. *Anal Biochem*, 223(1), 1-6.
- Zebboudj, A. F., Shin, V., & Bostrom, K. (2003). Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem*, 90(4), 756-765.
- Zimmermann, A., & Matschiner, J. T. (1974). Biochemical basis of hereditary resistance to warfarin in the rat. *Biochem Pharmacol*, 23(6), 1033-1040.

7 Anhang

Anhang 1: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des humanen VKOR, sowie resultierende Sequenzen aus der Klonierung in pET31b

Nukleotidsequenz der codonoptimierten cDNA des humanen VKOR und daraus resultierende Aminosäuresequenz:

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1 ATGGGTAGCACCTGGGGTAGCCCGGGTTGGGTTTCGTCTGGCGCTGTGTCTGACCGGTCTG 60
1 M G S T W G S P G W V R L A L C L T G L 20

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61 GTTCTGAGCCTGTATGCGCTGCATGTTAAAGCGGCCCGTGCCCGTGATCGTGATTATCGT 120
21 V L S L Y A L H V K A A R A R D R D Y R 40

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 GCCCTGTGTGATGTTGGCACCGCCATTAGCTGTAGCCGTGTGTTTAGCAGCCGTTGGGGT 180
41 A L C D V G T A I S C S R V F S S R W G 60

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 CGTGGTTTTGGTCTGGTGGAAACATGTTCTGGGCCAGGATAGCATTCTGAACCAGAGCAAC 240
61 R G F G L V E H V L G Q D S I L N Q S N 80

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241 AGCATCTTTGGCTGTATCTTCTACACCCTGCAGCTGCTGCTGGGTTGTCTGCGTACCCGT 300
81 S I F G C I F Y T L Q L L L G C L R T R 100

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301 TGGGCGAGCGTTCTGATGCTGCTGTCTAGCCTGGTTAGCCTGGCGGGTAGCGTTTATCTG 360
101 W A S V L M L L S S L V S L A G S V Y L 120

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
361 GCGTGGATTCTGTTCTTCGTTCTGTACGATTTCTGTATCGTGTGTATCACCACCTATGCC 420
121 A W I L F F V L Y D F C I V C I T T Y A 140

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
421 ATTAACGTGAGCCTGATGTGGCTGTCTTTTCGTAAAGTTCAGGAACCGCAGGGTAAAGCG 480
141 I N V S L M W L S F R K V Q E P Q G K A 160

-----|--
481 AAACGTCATTAA 492
161 K R H * 163

```

Nukleotidsequenz der codonoptimierten cDNA des humanen VKOR in pET31b und daraus resultierende Aminosäuresequenz des Fusionsproteins aus Ketosteroidisomerase-Peptid (gelb) und humanem VKOR (grün):

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1 ATGCATACCCAGAACACATCACCGCCGTGGTACAGCGCTTTGTGGCTGCGCTCAATGCC 60
1 M H T P E H I T A V V Q R F V A A L N A 20

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61 GGCATCTGGACGGCATCGTCGCGCTGTTTGCCGATGACGCCACGGTGGAAGATCTCGTG 120
21 G D L D G I V A L F A D D A T V E D L V 40

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 GGTTCGAGCCCGAGGTCCGGTACGGCTGCGATTCTGTGAGTTTTACGCCAACTCGCTCAA 180
41 G S E P R S G T A A I R E F Y A N S L K 60

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 CTGCCTTTGGCGGTGGAGCTGACGCAGGAGGTACGCGCGGTTCGCCAACGAAGCGGCCTTC 240
61 L P L A V E L T Q E V R A V A N E A A F 80

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241 GCTTTACCCGTCAGCTTCGAGTATCAGGGCCGCAAGACCGTAGTTGCGCCCATCGATCAC 300
81 A F T V S F E Y Q G R K T V V A P I D H 100

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301 TTTCGCTTCAATGGCGCCGGCAAGGTGGTGAGCATCCGCGCCTTGTTTGGCGAGAAGAAT 360
101 F R F N G A G K V V S I R A L F G E K N 120

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
361 ATTCACGCATGCCAGATGCTGGATCCGCTCGAGATGGGTAGCACCTGGGGTAGCCCCGGGT 420
121 I H A C Q M L D P L E M G S T W G S P G 140

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
421 TGGGTTCGTCTGGCGCTGTGTCTGACCGGTCTGGTTCTGAGCCTGTATGCGCTGCATGTT 480
141 W V R L A L C L T G L V L S L Y A L H V 160

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
481 AAAGCGGCCCGTGCCCGTGATCGTGATTATCGTGCCCTGTGTGATGTTGGCACCGCCATT 540
161 K A A R A R D R D Y R A L C D V G T A I 180

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
541 AGCTGTAGCCGTGTGTTTAGCAGCCGTGGGGTCTGTTGTTTGGTCTGGTGAACATGTT 600
181 S C S R V F S S R W G R G F G L V E H V 200

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
601 CTGGGCCAGGATAGCATTCTGAACCAGAGCAACAGCATCTTTGGCTGTATCTTCTACACC 660
201 L G Q D S I L N Q S N S I F G C I F Y T 220

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
661 CTGCAGCTGCTGCTGGGTTGTCTGCGTACCCGTTGGGCGAGCGTTCTGATGCTGCTGTCT 720
221 L Q L L L G C L R T R W A S V L M L L S 240

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
721 AGCCTGGTTAGCCTGGCGGGTAGCGTTTATCTGGCGTGATTCTGTTCTTCGTTCTGTAC 780
241 S L V S L A G S V Y L A W I L F F V L Y 260

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
781 GATTTCTGTATCGTGTGTATCACCACCTATGCCATTAACGTGAGCCTGATGTGGCTGTCT 840
261 D F C I V C I T T Y A I N V S L M W L S 280

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
841 TTTCGTAAAGTTCAGGAACCGCACGGTAAAGCGAAACGTCATCTCGAGCACCACCACCAC 900
281 F R K V Q E P H G K A K R H L E H H H H 300

-----
901 CACCAC 906
301 H H 302

```

Vorgenommene ortsgerichtet Mutationen zur Einbringung bzw. Deletion von Ameisensäurespaltstellen sind rot hinterlegt.

Anhang 2: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des verkürzten humanen VKOR, sowie der verwendeten VKOR-homologen Proteine und deren Klonierung.

#1 NdeI-vkor trunc.

Upstream-Primer zur Amplifizierung der Sequenz des verkürzten humanen vkorc1, mit *NdeI*-Schnittstelle zur Klonierung in pET-Vektoren; 37bp, Tm=63°C

5'-GGAT CAA CAT ATG CGT GAT CGT GAT TAT CGT GCC CTG-3'

#2 BamHI-vkor trunc.

Downstream-Primer zur Amplifizierung der Sequenz des verkürzten humanen vkorc1, mit *BamHI*-Schnittstelle zur Klonierung in pET-Vektoren; 31bp, Tm=63°C

5'-CTCC GGA TCC TTA ATG ACG TTT CGC TTT ACC-3'

Die Sequenz des verkürzten humanen VKOR wurde zunächst mittels PCR amplifiziert und anschließend durch Restriktionsverdau und anschließende Ligation in die gewünschten pET-Vektoren kloniert.

Die cDNA-Sequenzen der VKOR-homologen Proteine von *Bifidobacterium longum*, *Arabidopsis thaliana* und *Sulfolobus solfataricus* wurden von der Firma GeneArt bezogen und weisen bereits eine *NdeI*-Restriktionsstelle in 5'-Position und eine *BamHI*-Restriktionsstelle in 3'-Position zur Gensequenz auf. Daher wurden diese Gensequenzen klassisch durch Restriktionsverdau und anschließende Ligation in die gewünschten pET-Vektoren kloniert.

Nukleotidsequenz der codonoptimierten cDNA des N-terminal verkürzten humanen VKOR und daraus resultierende Aminosäuresequenz:

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1  CGTGATCGTGATTATCGTGCCCTGTGTGATGTTGGCACC GCCATTAGCTGTAGCCGTGTG 60
1  R  D  R  D  Y  R  A  L  C  D  V  G  T  A  I  S  C  S  R  V  20

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61  TTTAGCAGCCGTTGGGGTCGTGGT TTTGGTCTGGTGGAACATGTTCTGGGCCAGGATAGC 120
21  F  S  S  R  W  G  R  G  F  G  L  V  E  H  V  L  G  Q  D  S  40

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 ATTCTGAACCAGAGCAACAGCATCTTTGGCTGTATCTTCTACACCCTGCAGCTGCTGCTG 180
41  I  L  N  Q  S  N  S  I  F  G  C  I  F  Y  T  L  Q  L  L  L  60

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 GGTGTCTGCGTACCCGTTGGGCGAGCGTTCTGATGCTGCTGTCTAGCCTGGTTAGCCTG 240
61  G  C  L  R  T  R  W  A  S  V  L  M  L  L  S  S  L  V  S  L  80

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241 GCGGGTAGCGTTTATCTGGCGTGGATTCTGTTCTTCGTTCTGTACGATTTCTGTATCGTG 300
81  A  G  S  V  Y  L  A  W  I  L  F  F  V  L  Y  D  F  C  I  V  100

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301 TGTATCACCACTATGCCATTAAACGTGAGCCTGATGTGGCTGTCTTTTCGTAAAGTTTCAG 360
101 C  I  T  T  Y  A  I  N  V  S  L  M  W  L  S  F  R  K  V  Q  120

-----|-----|-----|
361 GAACCGCAGGGTAAAGCGAAACGTCATTAA 390
121 E  P  Q  G  K  A  K  R  H  *  129

```

Nukleotidsequenz der codonoptimierten cDNA des VKOR-homologen Proteins aus *Bifidobacterium longum* und daraus resultierende Aminosäuresequenz:

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1  ATGACCCGTAACACCGCGACCGATACCAGCAGCAGCACCACCAACACCACCCGCTGGGT  60
1  M  T  R  N  T  A  T  D  T  S  S  S  T  T  N  T  T  P  L  G  20

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61 CTGGCCGAAGCGCGTCCGCTGATTGGCTGGCGTCATAGCGCGACCTGGACCTATCTGATT  120
21 L  A  E  A  R  P  L  I  G  W  R  H  S  A  T  W  T  Y  L  I  40

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 ATGCTGATTGCGAGCGCGGTTGCGCTGGGTGCGAGCCTGATTCTGAGCGCGGAAACCCTG  180
41 M  L  I  A  S  A  V  A  L  G  A  S  L  I  L  S  A  E  T  L  60

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 CAACTGGCCCGTCATCCGAAAGCGCGCTGGGCTGCGATCTGAACAGCGTGGTGAGCTGT  240
61 Q  L  A  R  H  P  E  S  A  L  G  C  D  L  N  S  V  V  S  C  80

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241 AGCGCGGTTGCCAGAGCTGGCAGGCGGAAATTGCGAAATTTGGCGGCCTGAGCTATCCG  300
81 S  A  V  A  Q  S  W  Q  A  E  I  A  K  F  G  G  L  S  Y  P  100

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301 AACCGGTTTTTTGGCATTGCGGCGGAAAGCGTGTTTATTACCATTGCGGTGATTGGCCTG  360
101 N  A  F  F  G  I  A  A  E  S  V  F  I  T  I  A  V  I  G  L  120

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
361 GCCCGTGTAAGTGCCGCGTTGGTTTGCAGCTGCACCTGGCTGGGTGGTCTGGCCGCG  420
121 A  R  V  K  V  P  R  W  F  A  T  C  T  W  L  G  G  L  A  A  140

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
421 CTGGCCTATAGCTATTGGCTGTCTACCCAGAGCCTGTTTGTGATTCATGCGCTGTGCCCG  480
141 L  A  Y  S  Y  W  L  S  T  Q  S  L  F  V  I  H  A  L  C  P  160

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
481 TGGTGCCTGACCCCTGATGTTTAGCACCACCATTCAAGTTTATGGCCCTGAGCCATGCGACC  540
161 W  C  L  T  L  M  F  S  T  T  I  Q  F  M  A  L  S  H  A  T  180

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
541 GTGGCGGTTTCAGGGTCTGCCGAGCCGTAAAGCGGTGGCGGCGGATGATAGCGATGGCGAA  600
181 V  A  V  Q  G  L  P  S  R  K  A  V  A  A  D  D  S  D  G  E  200

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
601 GCGGAAGTTGCGGCGGTTCCGGCGGGTCTGAACAAATATTATCGCCTGAACATCGATCTG  660
201 A  E  V  A  A  V  P  A  G  L  N  K  Y  Y  R  L  N  I  D  L  220

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
661 ATGGTGGATATTCTGTGGATTGTGGCGATTGTGGTGCTGATTATTGTGACCGAAGGTGCG  720
221 M  V  D  I  L  W  I  V  A  I  V  V  L  I  I  V  T  E  G  A  240

-----|-----
721 GCGCTGTTTGCGGCG  735
241 A  L  F  A  A  245

```

Nukleotidsequenz der codonoptimierten cDNA des VKOR-homologen Proteins aus *Arabidopsis thaliana* und daraus resultierende Aminosäuresequenz

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1  ATGGCGCGTTTTGTGAGCGTGAGCAGCTGCCAGTTTCATTTTGGCTTTCGTGAAGTGAGC  60
1  M  A  R  F  V  S  V  S  S  C  Q  F  H  F  G  F  R  E  V  S  20

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61  CCGCCGAGCGTGACCAGCTATCCGCGTCGTTTTGAAGTGAGCGATCGTCGTTTTCCGGCG  120
21  P  P  S  V  T  S  Y  P  R  R  F  E  V  S  D  R  R  F  P  A  40

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121  ATTCCGATTAAATGCAGCAGCAGCGAACC GGAAAACGGCGAAGATAGCGCGCCGAGCCTG  180
41  I  P  I  K  C  S  S  S  E  P  E  N  G  E  D  S  A  P  S  L  60

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181  TCGAGCAGTAGCTCTAGCAGTACCAGCGAAGTGAGCACCAGCAATAGCAGCACCTATAAC  240
61  S  S  S  S  S  S  S  T  S  E  V  S  T  S  N  S  S  T  Y  N  80

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241  TGGTATACCGGCATTGGCGGTATTGGTATGCTGGATACCGCGTATCTGACCTATCTGAAA  300
81  W  Y  T  G  I  G  G  I  G  M  L  D  T  A  Y  L  T  Y  L  K  100

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301  GTGACCGGCAGCGATGCGTTTTGCCGATTGGCGGTGGCACCTGCGGCGATGTGCTGAAC  360
101  V  T  G  S  D  A  F  C  P  I  G  G  G  T  C  G  D  V  L  N  120

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
361  AGCGATTATGCGGTGGTGTTTGGCGTGCCGCTGCCGGTGATTGGCTTTGTGATGTATGGC  420
121  S  D  Y  A  V  V  F  G  V  P  L  P  V  I  G  F  V  M  Y  G  140

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
421  GTGGTGACCGCCCTGAGCGCGGAACTGGGCGAAGGCAACCTGCCGTTTGGCATTAGCAAA  480
141  V  V  T  A  L  S  A  E  L  G  E  G  N  L  P  F  G  I  S  K  160

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
481  AGCAACGGCCGTTTTGCGCTGTTTGGCATTACCACCGCGATGGCGAGCGCGAGCGCGTAT  540
161  S  N  G  R  F  A  L  F  G  I  T  T  A  M  A  S  A  S  A  Y  180

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
541  TTTCTGTATATCCTGAGCACCAAACCTGAGCGGCAGCAGCTGCCTGTATTGCCTGGTGAGC  600
181  F  L  Y  I  L  S  T  K  L  S  G  S  S  C  L  Y  C  L  V  S  200

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
601  GCGTTTCTGAGCTTTAGCCTGTTTTTCTGAGCGTGAAAGATGTGAAACTGCAAGAAATT  660
201  A  F  L  S  F  S  L  F  F  L  S  V  K  D  V  K  L  Q  E  I  220

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
661  CAGCAGGTTGTTGGCCTGCAAATTTGCCTGGCCATTATTGTGGTGGCGAGCCTGACCGCG  720
221  Q  Q  V  V  G  L  Q  I  C  L  A  I  I  V  V  A  S  L  T  A  240

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
721  AGCTATAGCACCGCGCAGCCGATTCCGAGCCGTAGCGGCGATATTGAACTGCCGTATTTT  780
241  S  Y  S  T  A  Q  P  I  P  S  R  S  G  D  I  E  L  P  Y  F  260

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
781  CGTACCGAAATTTCTAGCAGTAGCTCCCCGTATGCGATTGCGCTGGCCAAACATCTGAAC  840
261  R  T  E  I  S  S  S  S  S  P  Y  A  I  A  L  A  K  H  L  N  280

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
841 AGCATTGGCGCGAAAAATGTATGGTGCCTTTTGGTGCAGCCATTGCCTGGAACAGAAAGAA 900
281 S I G A K M Y G A F W C S H C L E Q K E 300

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
901 ATGTTTGGCCGTGAAGCGGCGAAAAGAACTGAACTATGTGGAATGCTTTCCGGATGGCTAT 960
301 M F G R E A A K E L N Y V E C F P D G Y 320

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
961 AAAAAAGGCACCAAAATCCTGAAAGCGTGC GCGGATGCGGCGATTGAAGGCTTTCCGACC 1020
321 K K G T K I L K A C A D A A I E G F P T 340

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1021 TGGATTATCAACGATAAAGTTCTGAGCGGTGAAATTGAACTGGCGGAACTGGCCGAAATG 1080
341 W I I N D K V L S G E I E L A E L A E M 360

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1081 ACCGGCTTTAGCCTGGATCAGGCGAACGAAACCAACCAGCTGCAA 1125
361 T G F S L D Q A N E T N Q L Q 375

```

Nukleotidsequenz der codonoptimierten cDNA des VKOR-homologen Proteins aus *Sulfolobus solfataricus* und daraus resultierende Aminosäuresequenz:

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1 ATGATCAAAAAAATCGGCATTGGCTTTAGCCTGATTGGTCTGATTGATAGCCTGTACCTG 60
1 M I K K I G I G F S L I G L I D S L Y L 20

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61 TTTATTCTGACCCGTCTGGAAAAACCGCTGATGTATTGCAACATTAGCAGCCTGGTGAAT 120
21 F I L T R L E K P L M Y C N I S S L V N 40

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 TGCAGCAAAGTGGAAATTTAGCCAGTTTAGCACCTTTCTGGGCATTCCGGATGCGCTGCTG 180
41 C S K V E F S Q F S T F L G I P D A L L 60

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 GGCACCATTTTTTTTAGCATCATGCTGATTCTGTGGATTCTGATGTTTACCGAAGAAGT 240
61 G T I F F S I M L I L W I L M F T E E L 80

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241 AAATATCTGTGGATTGTGGGCAGCGTGTTCACCATTTATCTGATCTACACCGAAATTCTG 300
81 K Y L W I V G S V F T I Y L I Y T E I L 100

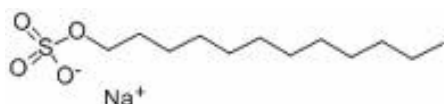
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301 ATTGGCAACATCTGCCTGTATTGCACCATTTGCGCATCTGAGCTGCCTGATTACAGGGCTTT 360
101 I G N I C L Y C T I A H L S C L I Q G F 120

-----|-----|
361 ATTATCTTTCATCGCAGC 378
121 I I F H R S 126

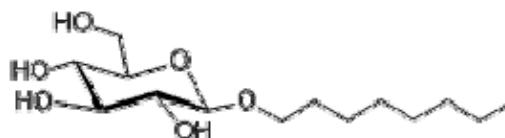
```

Anhang 3: verwendete DetergenzienSDS (Natriumdodecylsulfat)

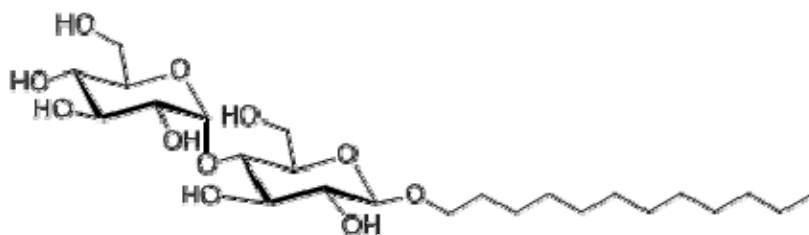
Synonyme: Natriumlaurylsulfat
Summenformel: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$
Molekulargewicht: 288,38
CMC (H_2O): ~ 8,2 mM (0,24%)
Aggregationsnummer: ~ 62
Strukturformel:

OG (n-Octyl-β-D-Glucopyranosid)

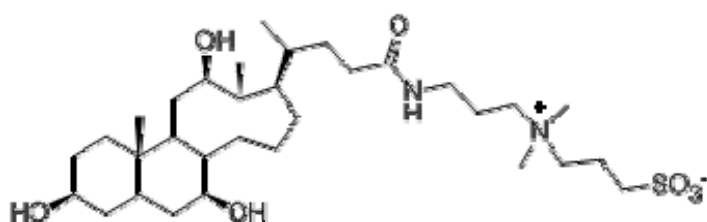
Synonyme: n-Octyl-β-D-Glucosid
Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_6$
Molekulargewicht: 292,4
CMC (H_2O): ~ 18-20 mM (0,53%)
Aggregationsnummer: ~ 27-100
Strukturformel:

DDM (n-Dodecyl-β-D-Maltopyranosid)

Synonyme: Laurylmaltosid; Dodecyl 4-O-α-D-Glucopyranosyl-β-D-Glucopyranosid
Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{O}_{11}$
Molekulargewicht: 510,6
CMC (H_2O): ~ 0,17 mM (0,0087%)
Aggregationsnummer: 78-149
Mizellengröße: 72 kDa
Strukturformel:

CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propanesulfonat)

Synonyme: N,N-Dimethyl-3-Sulfo-N-[3-[[3α,5β,7α,12α)-3,7,12-Trihydroxy-24-Oxocholan-24-yl]Amino]propyl]-1-Propanaminium-hydroxid
Summenformel: $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$
Molekulargewicht: 614,9
CMC (H_2O): ~ 8 mM (0,49%)
Aggregationsnummer: ~ 10
Strukturformel:



Anhang 4: verwendete Lipide

Die nachfolgend gezeigten Informationen und Formeln sind Angaben vom Hersteller der Lipide (Avanti Polar Lipids, Inc.).

POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin)

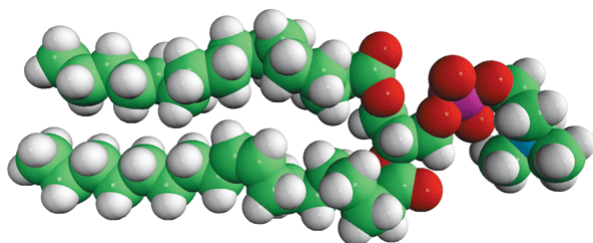
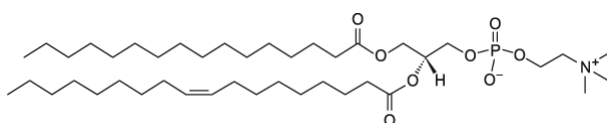
Synonyme: 1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin; (C16:0, C18:1)PC; PC(16:0/18:1(9Z))

Summenformel: C₄₂H₈₂NO₈P

Molekulargewicht: 760.076

Übergangstemperatur (Hauptübergang): -2°C

Strukturformeln:



POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin)

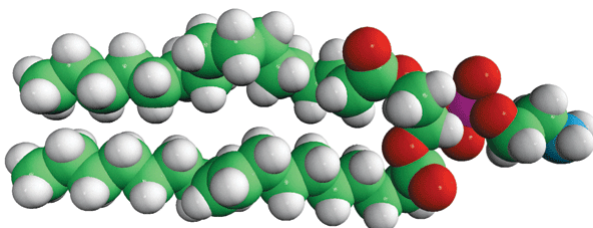
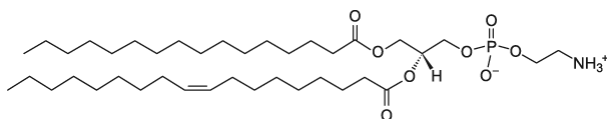
Synonyme: 1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin; (C16:0, C18:1)PE; PE(16:0/18:1(9Z))

Summenformel: C₃₉H₇₆NO₈P

Molekulargewicht: 717.996

Übergangstemperatur (Hauptübergang): 25°C

Strukturformeln:



POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin)(Natriumsalz)

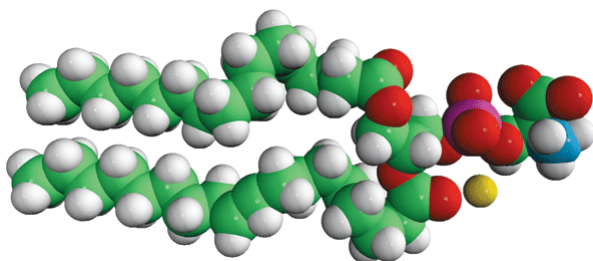
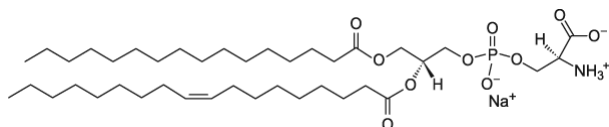
Synonyme: 1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin;
(C16:0, C18:1)PS; PS(16:0/18:1(9Z))

Summenformel: C₄₀H₇₅NO₁₀PNa

Molekulargewicht: 783.988

Übergangstemperatur (Hauptübergang): 14°C

Strukturformeln:

**DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin)**

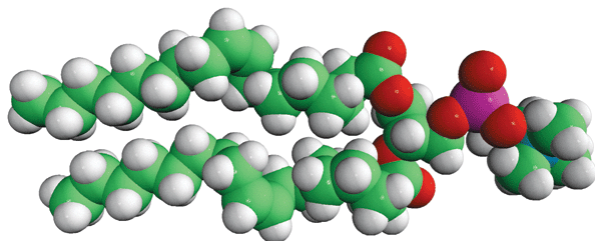
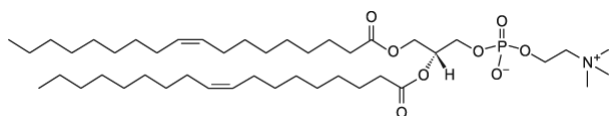
Synonyme: 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin; di(C18:1)PC;
PC(18:1(9Z)/18:1(9Z))

Summenformel: C₄₄H₈₄NO₈P

Molekulargewicht: 786.113

Übergangstemperatur (Hauptübergang): -20°C

Strukturformeln:



DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin)

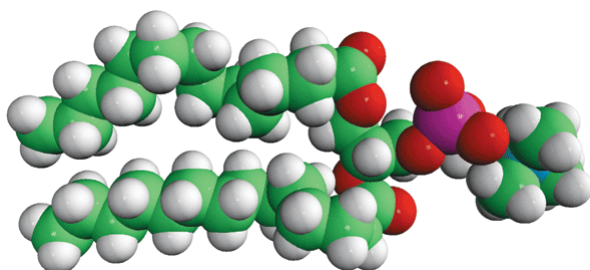
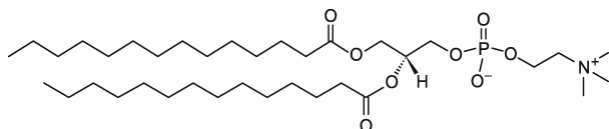
Synonyme: 1,2-ditetradecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin; di(C14:0)PC;
PC(14:0/14:0)

Summenformel: C₃₆H₇₂NO₈P

Molekulargewicht: 677.933

Übergangstemperatur (Hauptübergang): 23°C

Strukturformeln:

**DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin)**

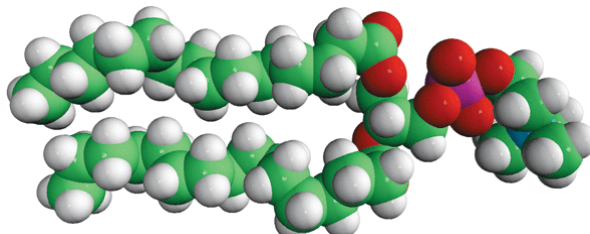
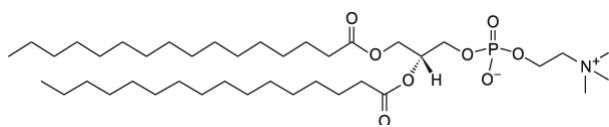
Synonyme: 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin; di(C16:0)PC;
PC(16:0/16:0)

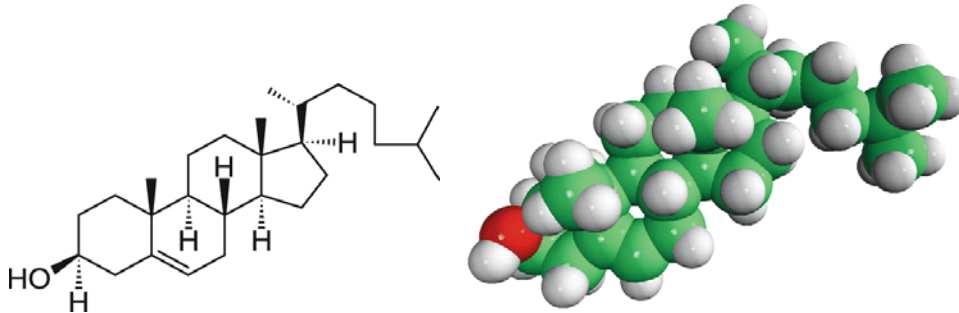
Summenformel: C₄₀H₈₀NO₈P

Molekulargewicht: 734.039

Übergangstemperatur (Hauptübergang): 41°C

Strukturformeln:



Cholesterol**Summenformel:** $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$ **Molekulargewicht:** 386.654**Strukturformeln:**

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herr Prof. Milton Stubbs, für die Möglichkeit dieses herausfordernde Thema zu bearbeiten. Ebenso möchte ich Dr. Christoph Parthier und Beatrice Epler danken, die durch ihre Vorarbeiten auf diesem Projekt dafür sorgten, dass es zur Vergabe des Themas kommen konnte. Weiterer Dank gebührt Prof. Milton Stubbs und Dr. Christoph Parthier für die exzellente Betreuung während der Arbeit. Ihr stetes Interesse, ihre zahllosen guten Hinweise und ihre ständige Diskussionsbereitschaft haben maßgeblichen Anteil daran, dass der Funke nicht ausging und das Projekt bis zum hier dokumentierten Stand voran gebracht werden konnte.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Johannes Oldenburg, Dr. Matthias Watzka, Phillip Westhofen und Milka Marinova für ihre Gastfreundschaft und die Unterstützung bei der Etablierung des Assays der VKOR-Enzymaktivität.

Ebenso gebührt mein Dank Prof. Hauke Lilie für seine Anregungen zu einigen wichtigen Experimenten, ohne die einige Fragen in dieser Arbeit unbeantwortet geblieben wären. Weiterhin möchte ich Dr. Peter Schmidt und Nils Drechsler für ihre Ratschläge bei der *in vitro* Renaturierung und Rekonstitution des Membranproteins danken, sowie Dr. Angelika Schierhorn und Mathias Müller für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen.

Für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre über all die Jahre möchte ich allen Mitgliedern der AG Stubbs danken.

Dr. Mikio Tanabe danke ich für seine Geduld und Unterstützung während der Fertigstellung der Arbeit.

Meiner Familie, meinen Freunden und meinen Eltern möchte ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung in dieser ganzen Zeit danken. Sie bilden meinen Rückhalt - das Fundament, auf dem ich bauen kann.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Frank Jaenecke
Anschrift	Johannesplatz 16; 06110 Halle/Saale
Geburtsdatum	19.11.1981
Geburtsort	Leipzig

Ausbildung:

09/1988 - 08/1992	Ernst-Schneller-Schule (Grundschule) in Leipzig
09/1992 - 07/2000	W.-Ostwald-Schule, Gymnasium mit vertieftem mathematisch-naturwissenschaftlichen Profil in Leipzig Abschluss: Abitur
08/2000 - 08/2001	Zivildienst
10/2001 - 03/2006	Biochemiestudium an der Universität Leipzig Abschluss: Diplom-Biochemiker
10/2005 - 03/2006	Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität Leipzig in der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr. Mario Mörl Thema: „Prozessierung überlappender tRNA-Vorläufer in <i>E. coli</i> “
09/2006 - 12/2009	Promotion am Institut für Biotechnologie an der Martin-Luther Universität Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr. Milton Stubbs Thema: „Etablierung der <i>in vitro</i> Renaturierung von Vitamin K Epoxid Reduktase“
seit 01/2010	wissenschaftlicher Mitarbeiter am ZIK HALOmem, Institut für Biotechnologie an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Dr. Mikio Tanabe

Halle/Saale, den 19.12.2011

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende, wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich erkläre weiterhin, dass andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle/Saale, den 19.12.2011