

## Identifizierung von artifiziellen Liganden eines in Nanodiscs inkorporierten integralen Membranproteins

Marina Pavlidou

Forschungszentrum Jülich GmbH  
Institute of Complex Systems (ICS)  
Strukturbiochemie (ICS-6)

# Identifizierung von artifiziellen Liganden eines in Nanodiscs inkorporierten integralen Membranproteins

Marina Pavlidou

Schriften des Forschungszentrums Jülich  
Reihe Schlüsseltechnologien / Key Technologies

Band / Volume 80

---

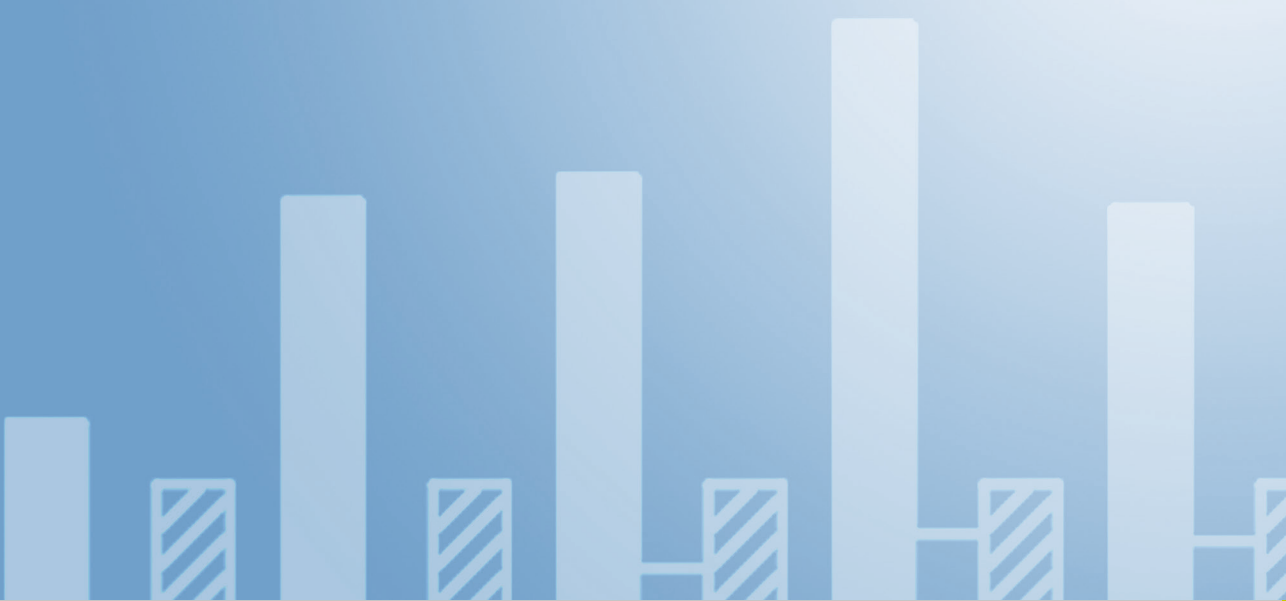
ISSN 1866-1807

ISBN 978-3-89336-942-3

# INHALTSVERZEICHNIS

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b><u>EINLEITUNG</u></b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | <b>MEMBRANPROTEINE</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1.1    | Klassen von Membranproteinen  | 1         |
| 1.1.2    | Die Funktion von Membranproteinen   | 2         |
| 1.1.3    | Membranproteine als Zielproteine für pharmakologische Wirkstoffe                            | 4         |
| 1.2      | <b>UNTERSUCHUNG VON MEMBRANPROTEINEN</b>  | <b>5</b>  |
| 1.2.1    | Modellmembranen   | 6         |
| 1.2.2    | Zellfreie Expression von Membranproteinen   | 10        |
| 1.3      | <b>BAKTORIORHODOPSIN</b>  | <b>11</b> |
| 1.3.1    | <i>Halobacterium salinarum</i>  | 11        |
| 1.3.2    | Die Funktionsweise von Bakteriorhodopsin  | 12        |
| 1.3.3    | Bakteriorhodopsin als Modell eines integralen Membranproteins                               | 13        |
| 1.3.4    | Bakteriorhodopsin in Nanodiscs  | 14        |
| 1.4      | <b>PHAGENDISPLAY</b>  | <b>15</b> |
| 1.4.1    | Morphologie und Lebenszyklus filamentöser Phagen  | 15        |
| 1.4.2    | Das Prinzip von Phagendisplayselktionen   | 17        |
| 1.4.3    | Anwendungen von Phagendisplay   | 18        |
| 1.4.4    | Phagendisplay und Membranproteine   | 19        |
| 1.5      | <b>ZIEL DIESER ARBEIT</b>   | <b>20</b> |
| <b>2</b> | <b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>   | <b>22</b> |
| 2.1      | <b>MATERIAL</b>   | <b>22</b> |
| 2.1.1    | Bakterienstämme   | 22        |
| 2.1.2    | Plasmide  | 23        |
| 2.1.3    | Oligonukleotide   | 23        |
| 2.1.4    | Antikörper, Enzyme und Peptide  | 24        |
| 2.1.5    | Kits  | 25        |
| 2.1.6    | Nährmedien, Puffer und andere Lösungen  | 26        |
| 2.1.7    | Größenmarker  | 29        |
| 2.1.8    | Chemikalien   | 29        |
| 2.1.9    | Geräte und sonstige Materialien   | 30        |
| 2.1.10   | Software  | 31        |
| 2.2      | <b>METHODEN</b>   | <b>32</b> |
| 2.2.1    | Gentechnische Methoden  | 32        |
| 2.2.2    | Methoden der Proteinbiochemie   | 34        |
| 2.2.3    | Herstellung von Nanodiscs   | 38        |
| 2.2.4    | Immunologische Methoden   | 41        |
| 2.2.5    | Phagendisplay   | 42        |
| <b>3</b> | <b><u>ERGEBNISSE</u></b>  | <b>46</b> |
| 3.1      | <b>HERSTELLUNG VON NANODISCS</b>  | <b>46</b> |
| 3.1.1    | Optimierung der Nanodisc-Herstellung  | 46        |
| 3.1.2    | Herstellung von Nanodiscs im präparativen Maßstab   | 48        |
| 3.1.3    | Stabilität von Nanodiscs in Detergens   | 50        |
| 3.2      | <b>HERSTELLUNG VON MIT BAKTORIORHODOPSIN BELADENEN NANODISCS</b>                            | <b>51</b> |
| 3.2.1    | Mutagenese des bR-Expressionsplasmids   | 52        |
| 3.2.2    | Zellfreie Proteinsynthese von Bakteriorhodopsin in vorgeformte Nanodiscs                    | 52        |
| 3.3      | <b>IMMOBILISIERUNG BELADENER UND UNBELADENER NANODISCS AUF MIKROTITERPLATTEN</b>            | <b>57</b> |
| 3.4      | <b>SELEKTION VON LIGANDEN GEGEN BAKTORIORHODOPSIN-BELADENE NANODISCS ÜBER PHAGENDISPLAY</b> | <b>59</b> |
| 3.4.1    | Analyse der Selektion 1   | 60        |
| 3.4.2    | Analyse der Selektion 2   | 64        |
| 3.4.3    | Zusammenfassung der Analysen von Selektion 1 und Selektion 2                                | 66        |
| 3.5      | <b>EPITOPKARTIERUNG DER PHAGENKLONE GEGEN BAKTORIORHODOPSIN</b>                             | <b>68</b> |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>4</b> | <b><u>DISKUSSION</u></b>  | <b>71</b>  |
| 4.1      | <b>PRÄPARATION DES ZIELPROTEINS</b>   | <b>72</b>  |
| 4.1.1    | Effektivere Nanodisc-Assemblierung durch langsames Entfernen des Detergens  | 73         |
| 4.1.2    | Nanodiscs sind auch bei hohen Konzentrationen stabil  | 75         |
| 4.1.3    | Erfolgreicher Einbau von bR in Nanodiscs über zellfreie Proteinsynthese   | 75         |
| 4.1.4    | Zellfreie Proteinsynthese als allgemeine Methode zum Einbau von Membranproteinen in Nanodiscs                       | 76         |
| 4.2      | <b>PHAGENDISPLAY GEGEN MIT BAKTERIORHODOPSIN BELADENE NANODISCS LIEFERTE BAKTERIORHODOPSIN-SPEZIFISCHE LIGANDEN</b> | <b>77</b>  |
| 4.2.1    | Voraussetzungen für den erfolgreichen Einsatz von Nanodiscs im Phagendisplay  | 78         |
| 4.2.2    | Aus beiden Selektionen wurden bR-spezifische Klone isoliert   | 79         |
| 4.2.3    | Bakteriorhodopsin-spezifische Klone zeigten keine dominierende Aminosäuresequenz                                    | 81         |
| 4.2.4    | Nanodisc-spezifische Klone enthielten ein bekanntes Motiv   | 82         |
| 4.2.5    | Optimierungsvorschläge für Phagendisplayselektionen gegen Zielproteine in Nanodiscs                                 | 84         |
| 4.3      | <b>DIE SELEKTIERTEN LIGANDEN BANDEN EIN NICHT-LINEARES EPITOP VON BAKTERIORHODOPSIN</b>                             | <b>86</b>  |
| 4.4      | <b>RELEVANZ</b>   | <b>88</b>  |
| <b>5</b> | <b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>   | <b>90</b>  |
| <b>6</b> | <b><u>SUMMARY</u></b>   | <b>91</b>  |
| <b>7</b> | <b><u>LITERATUR</u></b>   | <b>92</b>  |
| <b>8</b> | <b><u>ANHANG</u></b>  | <b>100</b> |
| 8.1      | <b>SEQUENZEN</b>  | <b>100</b> |
| 8.2      | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>  | <b>101</b> |
| 8.3      | <b>AMINOSÄUREN</b>  | <b>103</b> |
| 8.4      | <b>PUBLIKATIONEN UND POSTERPRÄSENTATIONEN</b>   | <b>104</b> |
| 8.5      | <b>DANKSAGUNG</b>   | <b>105</b> |
| 8.6      | <b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b>  | <b>106</b> |



**Schlüsseltechnologien / Key Technologies**  
**Band / Volume 80**  
**ISBN 978-3-89336-942-3**

