

Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung  
des humanen Parathormon-Rezeptors

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Jan Oschmann

geb. am: 29. September 1972 in: Rudolstadt

Gutachter /in:

1. Herr Prof. Dr. Rainer Rudolph
2. Frau Prof. Dr. Anette Beck-Sickinger
3. Herr Prof. Dr. Udo Heinemann

Verteidigungsdatum: Halle (Saale), den 21.02.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000013682**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013682>]

Gutachter:

Herr Prof. Dr. Rainer Rudolph

Frau Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger

Herr Prof. Dr. Udo Heinemann

Verteidigt am 21.02.2008

## **Vorwort**

Eines der fundamentalsten Konzepte der modernen Biologie ist jenes der Rezeptoren. Sie stellen eine wichtige biochemische Komponente zwischen der Bindung von Molekülen und einer charakteristischen Zellreaktion auf diese Bindung dar.

Rezeptoren für die Vermittlung der Wirkung biologisch aktiver Substanzen faszinieren die Biologen seit mehr als einhundert Jahren. Zahlreiche physiologische Prozesse wären ohne die Interaktion dieser Substanzen mit ihren entsprechenden Rezeptoren nur stark eingeschränkt, oder überhaupt nicht möglich. Hierzu zählen solch wichtige Funktionen wie die synaptische Signalweiterleitung, die hormonelle Kontrolle lebenswichtiger Funktionen, und nicht zuletzt die Wahrnehmung der Umwelt in Form von Licht-, Geschmacks-, Geruchs-, und Schmerzreizen. Ebenso ist auch der therapeutische Effekt zahlreicher Medikamente auf die Rezeptorinteraktion zurückzuführen. Diese Auflistung lässt sich beliebig erweitern, und reflektiert eindrucksvoll die Vielfalt aber gleichzeitig auch die Komplexität der biologischen Prozesse, bei denen diese Rezeptoren eine bedeutende Rolle übernehmen.

Eine umfassende und in der vorliegenden Arbeit behandelte Rezeptorklasse ist die der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Pierce et al., 2002). Die Neurobiologie verwendet für diese Rezeptorenklasse die Bezeichnung metabotrope Rezeptoren, um sie eindeutig von einem anderen Rezeptorentyp, den ionotropen Rezeptoren (ligandengesteuerte Ionenkanäle) abzugrenzen. Diese Rezeptoren sind äußerst vielfältig hinsichtlich ihrer Topologie und Funktion, aber alle weisen als gemeinsames Merkmal sieben die Zellmembran durchspannende Domänen auf. Die gemeinsamen Domänen sind evolutionär hochkonserviert und erfüllen wichtige Funktionen in der Signalweiterleitung. Diese setzt sich intrazellulär allgemein durch die Bindung eines trimeren G-Proteins fort, und verhalf so der Rezeptorklasse zu ihrem Namen. Diese Rezeptoren finden sich in fast allen Lebewesen. So sind sie nicht nur in Wirbeltieren und Wirbellosen vertreten, sondern man findet sie auch in Protozoen, Pflanzen und Archaeobakterien. Im genetischen Programm des Menschen sind bisher cirka 1000 Gene entschlüsselt, die für G-Protein gekoppelte Rezeptoren codieren (Fredriksson et al., 2003). Mehr als die Hälfte dieser Rezeptoren werden hier den olfaktorischen Rezeptoren zugeordnet, wobei für einige G-Protein gekoppelte Rezeptoren jedoch bisher weder die Funktion noch der endogene Bindungspartner bekannt ist. Diese Rezeptoren bezeichnet man als sogenannte Orphan-GPCRs.

Die hohe Anzahl von über 30.000 publizierten Arbeiten unter dem Stichwort Rezeptoren ist sowohl Ausdruck für die Aktualität als auch für die Anziehungskraft die dieses Forschungsgebiet auf die Wissenschaft ausübt.

Grundlegende Gedanken und Ideen über die Bindung von Substanzen an die Oberfläche von Zellen entwickelte man bereits vor über 100 Jahren. Diese beruhten auf Beobachtungen, dass Zellen auf eine große Anzahl verschiedener Stoffe mit einer spezifischen und sensitiven Antwort reagieren.

Die erste wirkliche moderne Vorstellung eines Rezeptors beschreibt Paul Ehrlich in seiner „Seitenkettentheorie“ der Immunantwort. In dieser Theorie postuliert er die Existenz von „Seitenketten“ an der Zelloberfläche, die bestimmte Abschnitte von Wirkstoffen erkennen und diese dadurch binden. Sein häufig zitierter Satz „Corpora non agunt nisi fixata“ (Substanzen zeigen keine Wirkung wenn sie nicht gebunden sind) fasst kurz die Basis der Rezeptorbiologie zusammen (Ehrlich, 1913).

Die physiologisch pharmakologischen Analysen zur neuromuskulären Signalübertragung am Skelettmuskel durch Langley und Dale zu Beginn des 20-Jahrhunderts verhalfen der Rezeptoridee zu weiterer Popularität. Bemerkenswert hierbei war, dass sie diese Untersuchungen bereits an den beiden wichtigsten Gruppen der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Adrenorezeptor und muskarinischer Acetylcholinrezeptor) und den Ionenkanalrezeptoren (Nikotinacetylcholinrezeptor) durchführten (Dale, 1906; Langley, 1901; Langley, 1909a; Langley, 1909b).

Zwischen 1920 und 1970 entwickelten bedeutende Pharmakologen wie Ariens, Stephenson, Black und Furchgott diese frühen Konzepte zur klassischen Rezeptortheorie weiter, und schufen so die grundlegenden Methoden und den Formalismus zur quantitativen Analyse der Rezeptorwirkung (Furchgott, 1967; Furchgott, 1970).

Die Entwicklung zwischen 1960 und 1970 bestimmten Biochemiker wie Sutherland, Krebs und Rodbell. Sie studierten eingehend die molekulare Basis der Hormon- und Drogenwirkung und ebneten mit ihren Pionierarbeiten den Weg für das Verständnis der Signalübertragung durch Rezeptoren. Sutherland fand den Second Messenger c-AMP und das Enzym Adenylatcyklase, sein Kollege Krebs entdeckte die c-AMP abhängige Protein Kinase (Sutherland, 1971). Im Jahre 1971 schlug Rodbell die Existenz eines Guanin Nucleotid Regulatorischen Proteins als Informationsüberträger zwischen Hormonrezeptor und Adenylatcyklase vor (Birnbaumer et al., 1969; Birnbaumer et al., 1971; Birnbaumer and Rodbell, 1969; Rodbell et al., 1971). Jahre später isolierte Gilman dieses Protein und nannte es G<sub>s</sub>. (Gilman, 1987; Ross and Gilman, 1977).

Trotz dieser umfangreichen physiologischen und biochemischen Arbeiten wurde die Existenz von Rezeptoren zu Beginn der siebziger Jahre noch immer kontrovers diskutiert. Erst die Entwicklung neuer Methoden und Techniken zur Isolierung, Reinigung und Rekonstitution

von Rezeptoren sowie der Nachweis der Ligandenbindung durch radioaktive Bindungsassays verhalfen der Rezeptortheorie endgültig zum Durchbruch. Diese neuartigen Methoden ermöglichten so erstmals die Isolation und Anreicherung einzelner Rezeptoren aus der Zellmembran und schufen so die Voraussetzung für die Untersuchung auf molekularer Ebene. Konzentriert wurden diese Arbeiten auf drei Modellrezeptoren, den Nikotinacetylcholinrezeptor, den  $\beta_2$ -Adrenogeneren Rezeptor und Rhodopsin (Devillers-Thiery et al., 1993; Stryer, 1986; Stryer and Bourne, 1986). Ein wesentlicher Meilenstein in der Rezeptorforschung, der auch den Weg für die Entwicklung der  $\beta$ -Blocker bereitete, war die funktionelle Beschreibung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren durch die Chemiker Ahlquist und Black (Black, 1989). Mit Einführung der  $\beta$ -Blocker in die therapeutische Praxis bekamen die Mediziner ein wirksames Medikament zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen, und es gelang so die Mortalitätsrate bei Eintritt eines Herzinfarktes entscheidend zu senken.

Die Arbeiten der vergangenen dreißig Jahre entwickelten die einstmals abstrakte Idee der Rezeptoren zu einem umfassenden und eigenständigen physiologischen System mit konkreten Strukturen, Mechanismen und Regularien.

Viele Fragen zu elementaren Funktionsmechanismen, Strukturen und Wirkungen sind trotz intensiver Forschung noch weitgehend unbeantwortet und deren Lösung wird auch noch künftige Generationen von Biologen herausfordern.

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
I.1.	Rhodopsin, ein Modell für G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)	9
I.2.	Die molekulare Struktur G-Protein gekoppelter Rezeptoren und deren Klassifizierung	11
I.3.	Die Ligandenbindung und der Mechanismus der Signalweiterleitung in das Cytoplasma	15
I.4.	G-Proteine, intrazellulären Signalkaskaden und die Regulation der Rezeptorfunktion	19
I.5.	Der humane Parathormonrezeptor, seine Liganden und Funktion	23
I.6.	Problemstellung	27
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
II.1.	Häufig verwendete Chemikalien, Enzyme, Standards, Proteine und Kitsysteme	28
II.2.	Geräte und Zubehör	30
II.3.	Bakterienstämme	31
II.4.	Plasmide und Vektoren	32
II.5.	Oligonukleotidsequenzen	32
II.6.	Zusammensetzung häufig verwendeter Puffersysteme und Lösungen	33
II.7.	Medien und Lösungen für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	34
<b>II.8.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>35</b>
II.8.1.	Isolierung und Reinigung von Plasmid DNA	35
II.8.2.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	35
II.8.3.	DNA Sequenzierung	36
II.8.4.	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit Plasmid DANN	36
II.8.5.	Plasmid Screening	37
II.8.6.	Isolierung der DNA- Fragmente aus Agarosegelen	37
II.8.7.	DNA Restriktionsverdau	37
II.8.8.	Dephosphorylierung	38
II.8.9.	Ligierung	38
II.8.10.	Agarose-Gelelektrophorese	39
<b>II.9.</b>	<b>Proteintechnologische Methoden</b>	<b>40</b>
II.9.1.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	40
<b>II.9.2.</b>	<b>Rekombinante Proteinexpression</b>	<b>40</b>
II.9.2.1.	Expressionstest	40
II.9.2.2.	Bestimmung der segregativen Plasmidstabilität	40
II.9.2.3.	Bakterielle Fermentation	41
<b>II.9.3.</b>	<b>Proteingewinnung</b>	<b>42</b>
II.9.3.1	Isolierung der <i>Inclusion bodies</i>	42
II.9.3.2	Solubilisierung der <i>Inclusion bodies</i>	43
II.9.3.2	Solubilisierung der <i>Inclusion bodies</i>	43
<b>II.9.4</b>	<b>Chromatographische Vorreinigung und Konzentrierung</b>	<b>43</b>
II.9.4.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	43
II.9.4.2.	Immobilisierte Metallchelatchromatographie (IMAC)	44
<b>II.9.5</b>	<b>PTHR Renaturierung</b>	<b>45</b>

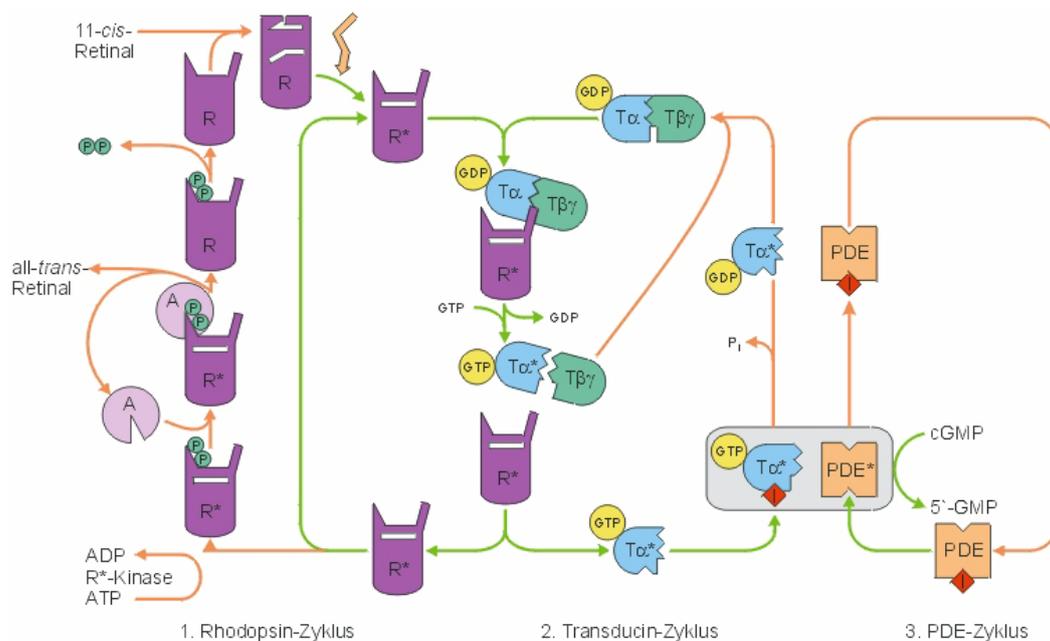
<b>II.10. Proteinchemische und analytische Methoden</b>	<b>47</b>
II.10.1. Analytische Reversed Phase Chromatographie (RP-HPLC)	47
II.10.2. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
II.10.3. Protein Transfer auf Membranen (Blot) und deren Detektion	47
II.10.4. Bestimmung der Proteinkonzentration	49
II.10.5. Massenspektrometrie	50
II.10.6. N-terminale Sequenzierung von Proteinen	50
II.10.7. Bestimmung der SDS Konzentration	50
<b>II.11. Biophysikalische Methoden</b>	<b>51</b>
II.11.1. Fluoreszenzspektroskopie	51
II.11.2. Ligandenbindungsanalysen mittels Fluoreszenzspektroskopie (Fluoreszenztitrationen)	51
II.11.3. Circular dichroismus	53
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>55</b>
<b>III.1. Herstellung des humanen Parathormonrezeptors (PTH1R)</b>	<b>55</b>
III.1.1. Klonierungsstrategien	55
<b>III.1.2. Rekombinante Proteinexpression</b>	<b>56</b>
III.1.2.1. Experimente zur Optimierung der Ausbeute an rekombinanten Rezeptorproteinen	57
III.1.2.2. Bakterielle Fermentation	60
III.1.2.3. Auswertung der Fermentation	63
III.1.2.4. Inclusion body Isolation	64
III.1.2.5. Inclusion body Solubilisation	65
<b>III.1.3. Proteinreinigung unter denaturierten Bedingungen</b>	<b>67</b>
III.1.3.1. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	67
III.1.3.2. Immobilisierte Metallchelatchromatographie IMAC	69
<b>III.2. Renaturierung des humanen Parathormonrezeptors</b>	<b>70</b>
III.2.1. <i>Artificial Chaperone System</i>	70
<b>III.3. Funktionelle und biophysikalische Charakterisierung des humanen PTH-Rezeptors</b>	<b>73</b>
III.3.1. Funktionelle Charakterisierung aufgrund von Fluoreszenzeigenschaften	73
III.3.1.1. Ligandenbindung	75
<b>III.3.2. Circular dichroismus</b>	<b>78</b>
<b>IV. Diskussion</b>	<b>83</b>
IV.1. Prokaryontische Expression des humanen Parathormonrezeptors in <i>Escherichia coli</i>	83
IV.2. Bakterielle Fermentation	86
IV.3. Renaturierung des humanen Parathormonrezeptors	87
IV.4. Ligandenbindung	89
<b>V. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>93</b>
<b>VI. Ausgewählte Literatur</b>	<b>94</b>

<b>V.II. Anhang</b>	<b>106</b>
VII.1. Mathematische Interpretation der Wachstumskurve	106
VII.2. Verwendete Abkürzungen	109

## I. Einleitung

### I.1. Rhodopsin, ein Modell für G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

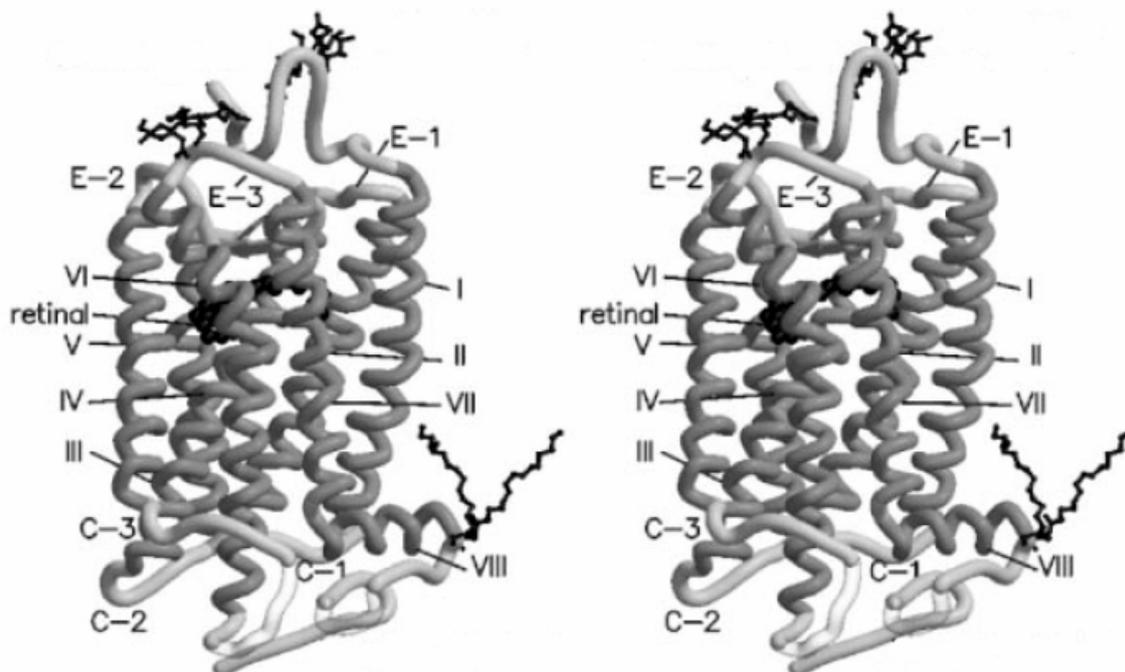
Rhodopsin ist das Sehpigment in den Stäbchenzellen der Säugetierretina und dient dem Sehen bei Dämmerlicht. Es ist weiterhin Namensgeber der größten von drei GPCR Familien, der Familie der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren, die mehr als 90 % aller GPCRs umfasst (Gether, 2000; Pierce et al., 2002; Rana and Insel, 2002). Durch umfassende Arbeiten seit der Klonierung von Rhodopsin im Jahr 1983 (Nathans and Hogness, 1983) konnten viele für GPCRs grundlegende Prinzipien aufgeklärt werden. Dies war nicht zuletzt deshalb möglich, weil Rhodopsin zu etwa 90 % in der Diskmembran des Stäbchenaußensegmentes enthalten ist, und Methoden zur Reinigung großer Mengen an funktionellem Protein entwickelt wurden.



**Abbildung 1: Aktivierungskaskade des Rhodopsins nach Lichtaktivierung.** Nach erfolgter Aktivierung des Rhodopsins [R\*] durch Photonen bindet dieses an das Transducin [T] und startet so die Signalkaskade. Die Abschaltung der Kaskade erfolgt durch Phosphorylierung des aktiven Rhodopsins [R\*] am C Terminus. Dies bewirkt die Bindung des Proteins Arrestin [A], was dann zur Abschaltung führt. Nach dem Austausch des all-trans- gegen ein 11-cis-Retinal kann das Rhodopsin wieder auf die Photonen reagieren. Wenn aktives Rhodopsin [R\*] an Transducin bindet, wird GDP gegen GTP ausgetauscht, und das Protein dissoziiert in eine  $\alpha$ -GTP Untereinheit und einen  $\beta\gamma$ -Komplex. Die  $\alpha$ -GTP Untereinheit bindet an die inhibitorische Untereinheit [I] der Phosphodiesterase [PDE]. Durch die Spaltung des GTP inaktiviert sich die  $\alpha$ -Untereinheit, und kann so den  $\beta\gamma$ -Komplex wieder binden und erneut aktiviert werden. Nach erfolgter Entfernung der inhibitorischen Untereinheit [I] ist die Phosphodiesterase [PDE] aktiv und hydrolysiert cGMP. Ein Absinken der Konzentration von  $\alpha$ -GTP führt zur Aktivierung der inhibitorischen Untereinheit [I] und diese hemmt die Aktivität der Phosphodiesterase [PDE].

Über das G-Protein der Stäbchenzelle, das Transducin, wird Rhodopsin als Effektor an eine cGMP spezifische Phosphodiesterase, gekoppelt und kann so den Spiegel des second messenger cGMP senken. Dies führt zur Hyperpolarisation der Plasmamembran durch Schließung cGMP-abhängiger Kationenkanäle und somit zur Umwandlung eines Lichtsignals in ein elektrisches Signal.

Als Sehpigment besteht Rhodopsin aus einem Apoprotein (Opsin) und einem Chromophor, der lichtempfindlichen Gruppe Retinal. Dieses Aldehyd-Derivat des Vitamin A ist im Grundzustand des Rhodopsins in der 11-cis-Konformation kovalent als inverser Agonist gebunden (Ernst and Bartl, 2002). Absorbiert Rhodopsin ein Photon, so isomerisiert das Retinal in die agonistische all-trans-Konformation und leitet damit die Aktivierung des Rhodopsins ein, die in wenigen Millisekunden zu einer aktiven Rezeptorkonformation führt. Die Entstehung der aktiven Konformation ist mit dem Durchlaufen verschiedener fotoaktiver Stadien verbunden, die charakteristische spektrale Absorptionseigenschaften zeigen.



**Abbildung 2: Stereobild der dreidimensionalen Struktur des Rhodopsins.** Die helikalen Segmente des Rhodopsins sind dunkelgrau gefärbt. Im Zentrum des Moleküls befindet sich das schwarz eingefärbte Retinal. Am oberen Ende der Abbildung ist der extrazelluläre N-terminale Abschnitt des Rhodopsins mit dem entsprechenden Glykosylierungsmuster anhand der *ball and stick* Darstellung gezeigt. Alle helikalen Bereiche sind mit römischen Ziffern gekennzeichnet. Die Loopregionen E1, E2 und E3 sind extrazellulär lokalisiert, während sich die Loopregionen C1, C2 und C3 intrazellulär befinden. (Stenkamp et al, 2005)

Dies erlaubt vielfältige spektroskopische Untersuchungen (Bartl et al., 2000; Fahmy et al., 1995; Shichida and Imai, 1998; Szundi et al., 1998), bis hin zu EPR-, NMR- und Fluoreszenzdepolarisationsmessungen, die Informationen über die Proteindynamik im

dunkeladaptierten- und lichtaktiven Zustand liefern (Altenbach et al., 2001; Columbus and Hubbell, 2002; Klein-Seetharaman, 2002; Mielke et al., 2002). Die Möglichkeit der Signaltransduktion durch Licht erleichtert im Gegensatz zu anderen GPCRs Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus.

Vor einigen Jahren konnte auch die Kristallstruktur des Grundzustandes von inaktiven Rhodopsins gelöst werden (Okada et al., 2002; Palczewski et al., 2000; Teller et al., 2001). Dies stellt einen entscheidenden Durchbruch in der GPCR Forschung dar, da sie bislang die einzige bekannte Struktur eines GPCR ist, und so die Modellierung anderer GPCRs mit einigen Einschränkungen erlaubt (Klabunde and Hessler, 2002).

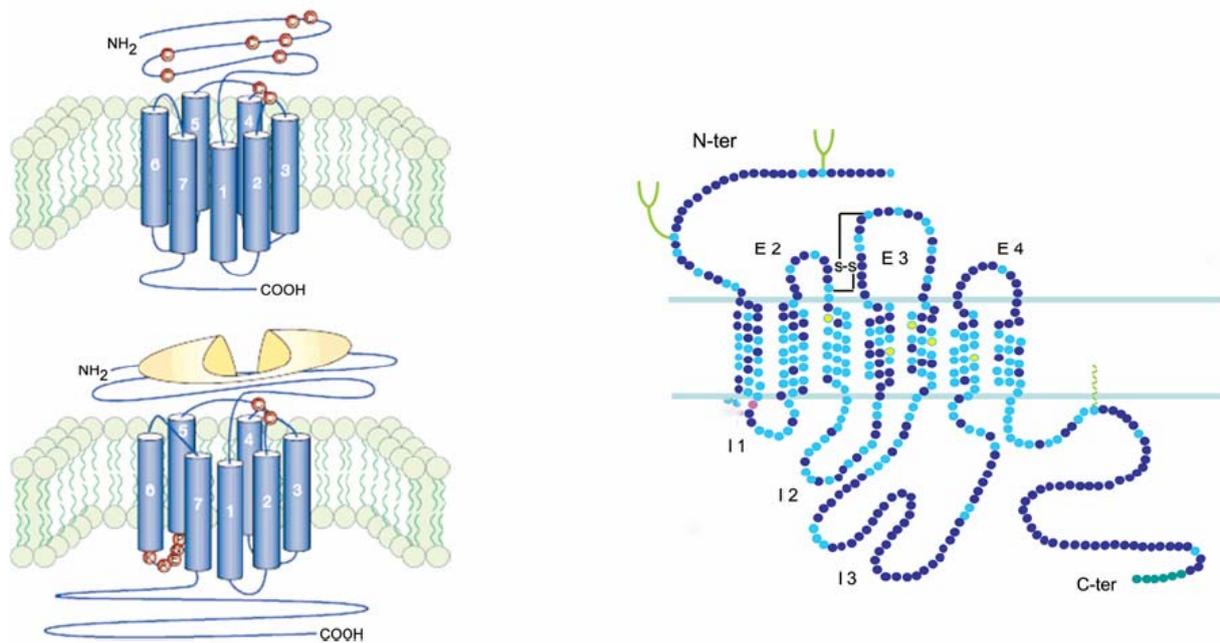
Am Rhodopsin wurden bereits zuvor wichtige und wegweisende Meilensteine der GPCR-Forschung erreicht. Hierzu zählen die Bestimmung der Primärstruktur (Hargrave et al., 1983), der Einsatz des ersten synthetischen GPCR Gens, die Herstellung rekombinanter Zelllinien zur Expression großer Rezeptormengen (Reeves et al., 1996) und die Detektion von Konformationsänderungen bei der Aktivierung (Farrens et al., 1996). Auch konnte mit Transducin, dem an das Rhodopsin koppelnden G-Protein, die erste Kristallstruktur eines G-Proteins gelöst werden. (Lambright et al., 1996; Noel et al., 1993).

## **I.2. Die molekulare Struktur G-Protein gekoppelter Rezeptoren und deren Klassifizierung**

Der strukturelle Aufbau G-Protein gekoppelter Rezeptoren ist evolutionär hochkonserviert, und umfasst eine glykosylierte N-terminale Proteindomäne variabler Länge, sieben helikale Transmembrandomänen, drei extrazelluläre Loopregionen, drei intrazelluläre Loopregionen und eine intrazelluläre C-terminale Proteindomäne. Ein weiterer intrazellulärer Loop kann bei der Palmitoylierung eines Cysteins der C-terminalen Proteindomäne ausgebildet werden. Dies ist beispielsweise für die wichtige Rezeptorklasse der  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren beschrieben (Kennedy and Limbird, 1993).

Die Anzahl der Aminosäuren und somit das Molekulargewicht ist sehr heterogen, und reicht von sehr kleinen Rezeptoren mit weniger als 300 Aminosäuren bis hin zu Rezeptoren mit mehr als 3000 Aminosäuren. Diese Variabilität ist vorwiegend auf die unterschiedliche Größe der N-terminalen Domänen und einzelner Loopregionen zurückzuführen. Die extrazellulären Bereiche der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, sowie Teile der Transmembrandomänen sind an der Wechselwirkung mit dem Liganden beteiligt. Die intrazellulären Bereiche erkennen und aktivieren selektiv die G-Proteine und triggern so das eingehende Signal (Strader et al., 1995; Wess et al., 1997).

Im Jahre 2000 gelang die Aufklärung der bisher einzigen Struktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors im atomaren Maßstab. Anhand dieser Struktur des Fotorezeptors Rhodopsin konnte die vorhergesagte Anzahl von sieben Transmembranhelices und deren Orientierung bestätigt werden (Farrens et al., 1996). So zeigt sich, dass die helikalen Bereiche nicht alle senkrecht in die Membran eingelagert sind, sondern die Neigungswinkel in Bezug auf die Membran recht unterschiedlich sind. Aus dieser Anordnung resultiert ein dichtgepackter Kernbereich, der zusätzlich durch die Ausbildung von Salz- und Wasserstoffbrücken stabilisiert wird. Möglicherweise dient dieser stabilisierte Bereich als Bindungstasche für den Liganden oder von einzelnen Ligandendomänen (Grossmann et al., 1998). Obwohl die helikalen Transmembranbereiche Cysteinseitenketten aufweisen, konnte man bisher noch keine intramolekularen Disulfidbrücken identifizieren.



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau G-Protein gekoppelter Rezeptoren.** Die linke Seite der Abbildung zeigt schematisch die Rezeptoren der Klasse B und C mit ihren Unterschieden in den N- und C-terminalen Proteindomänen. Deutlich zu sehen ist die hohe Variabilität in diesen beiden Rezeptorregionen und das Auftreten eines Disulfidbrückenmusters bei Rezeptoren der Klasse B. Die rechte Seite der Abbildung zeigt die zweidimensionale Projektion eines G-Protein gekoppelten Rezeptors. Zu sehen sind die N- und C-terminale Proteindomäne, die drei extrazellulären Loopregionen (E2-E4), die sieben helikalen Transmembranbereiche sowie die drei intrazellulären Loopregionen (I1-13).

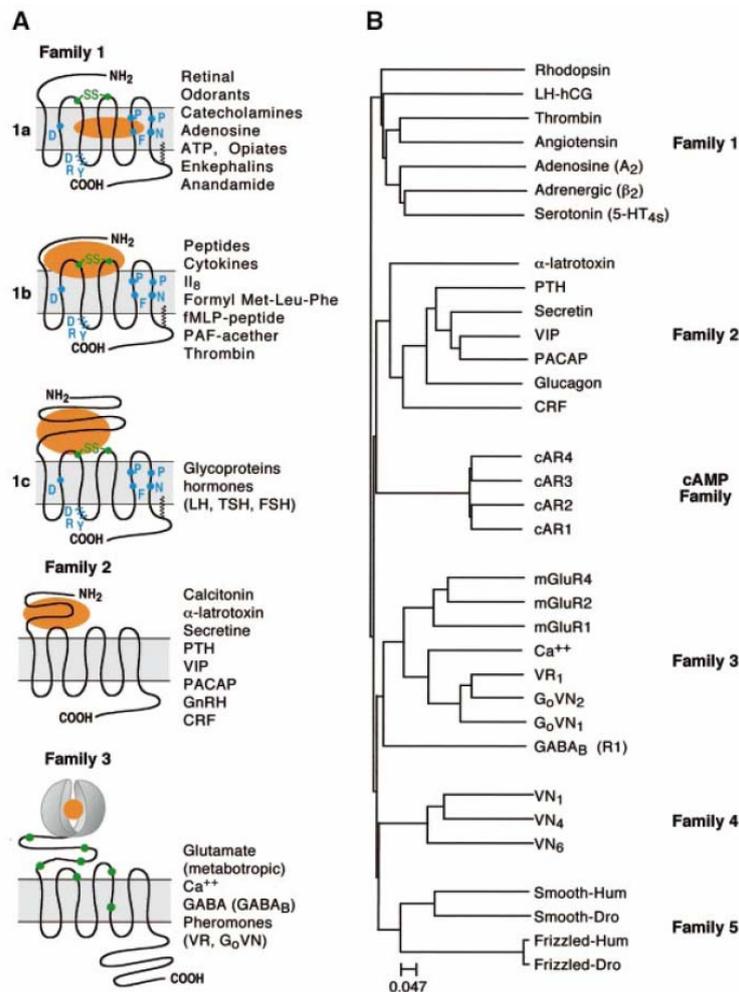
In den beiden extrazellulären Loopregionen 1 und 2 sind zwei hochkonservierte Cysteine lokalisiert, die zumindest bei Rhodopsin, dem TSH-Releasing-Hormon Rezeptor, dem Thromboxanrezeptor und dem Gonadotropin-Releasing-Hormon Rezeptor über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Karnik et al., 1988).

Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass in den meisten G-Protein gekoppelten Rezeptoren diese Disulfidbrücke konserviert ist, und wahrscheinlich eine konformationelle Restriktion auf diese Rezeptoren ausübt. Allerdings gibt es auch hier Ausnahmen, wie die peripheren Cannabinoidrezeptoren, denen diese Cysteinreste fehlen. Weitere Disulfidbrücken finden sich bei vielen G-Protein gekoppelten Rezeptoren im Bereich der N-terminalen Rezeptordomänen (Munro et al., 1993).

Anfang der 1990er Jahre erfolgte die erste systematische Klassifizierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren anhand von funktionellen Eigenschaften. Dieses System unterteilte diese Rezeptoren in sechs Gruppen, die jeweils mit den Buchstaben A bis F bezeichnet werden. So gehören zur Gruppe A alle Rezeptoren, die mit dem Rhodopsin verwandt sind, Gruppe B erfasst die Glycoproteinrezeptoren und die Gruppe C enthält die metabotropen Glutamatrezeptoren. Die beiden folgenden Gruppen D und E erfassen diejenigen Rezeptoren, die nicht in Wirbeltieren vorkommen. Zu ihnen zählen beispielsweise die Pheromonrezeptoren aus Hefen und die cAMP Rezeptoren aus Nematoden. Eine klare Abgrenzung gibt es zur Gruppe F. Zu dieser Gruppe gehören die archaebakteriellen Rhodopsine, die zu keiner Bindung von G-Proteinen fähig sind. In den vergangenen Jahren musste dieses System aufgrund der Entdeckung einer Vielzahl neuer G-Protein gekoppelter Rezeptoren erweitert werden. So erhielten die pflanzlichen Rezeptoren (MLO Rezeptoren), die Pheromonrezeptoren der Insekten, die Chemorezeptoren der Nematoden und die *Frizzled/Smoothed*- Rezeptoren der höheren Tiere eigene neue Gruppen (Beck-Sickinger, 1996; Kolakowski, 1994).

Ein zweites und neueres System zur Klassifizierung beruht auf phylogenetischen Untersuchungen. Dieses Klassifizierungssystem unterteilt die Rezeptoren in fünf Hauptgruppen, die Glutamat-, die Rhodopsin-, die Adhäsions-, die *Frizzled/Taste*- und die Sekretionsgruppe. Zur Glutamatgruppe zählt man unter anderem auch die metabotropen Glutamatrezeptoren, die eine wichtige Rolle in der synaptischen Signalweiterleitung spielen, sowie einige Geschmacksrezeptoren (*Taste 1*). Dominierendes und gemeinsames Merkmal dieser Rezeptoren ist eine ausgeprägte extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne. Die mit Abstand größte Gruppe ist die der Rhodopsinähnlichen Rezeptoren. Dieser Gruppe werden nahezu 90% aller G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet. Sowohl die Mehrheit aller Hormon- und Neurotransmitterrezeptoren, als auch die olfaktorischen Rezeptoren gehören zu dieser Klasse. Charakteristisch für die Struktur dieser Rezeptoren ist die relativ kleine N-terminale Ligandenbindungsdomäne. Eine Ausnahme hiervon bilden lediglich einige

Peptidrezeptoren. Merkmal der Adhäsionsrezeptoren sind sehr lange N-terminale Adhäsionssequenzen, die bis zu 2800 Aminosäuren lang sind.



**Abbildung 4: Klassifizierung und Vielfalt G-Protein gekoppelter Rezeptoren.** Die Abbildung A zeigt die drei wichtigen Klassen G-Protein gekoppelter Rezeptoren anhand von funktionellen Eigenschaften. Die Abbildung B orientiert sich am phylogenetischen System der Klassifizierung. Beide Klassifizierungssysteme sind hier überlagernd dargestellt. Die Familie 1 umfasst die größte Gruppe GPCRs mit den olfaktorischen Rezeptoren. Die Gruppe 1a enthält Rezeptoren für kleine Liganden, deren Bindung innerhalb der sieben Transmembranbereiche erfolgt. Die Gruppe 1b klassifiziert Rezeptoren, deren Peptidliganden innerhalb der N-terminalen Domäne und an den extrazellulären Loopregionen binden. Glykoproteinrezeptoren erfasst die Gruppe 1c. Die Bindung dieser Hormone erfolgt an eine große extrazelluläre Domäne. Die Rezeptoren der Familie 2 zeigen eine ähnliche Morphologie wie die Rezeptoren der Gruppe 1c, allerdings sind die Liganden große Peptidhormone. Die Familie 3 umfasst die metabotropen Glutamaterezeptoren, sowie einige an das G-Protein  $G_0$  bindende Pheromonrezeptoren. Familie 4 klassifiziert die Pheromonrezeptoren, die an das G-Protein  $G_i$  binden. Alle Rezeptoren, die an der embryonalen Entwicklung und an der Zellsegmentierung (Frizzled und Smoothended Smo Rezeptoren) beteiligt sind, werden der Familie 5 zugeordnet. cAMP Rezeptoren wurden nur in Nematoden gefunden, für Vertebraten sind sie bisher nicht beschrieben. (Bockeaert et al, 1999)

Eine heterogene Gruppe sind die *Frizzled/Taste* Rezeptoren, die sowohl aus Geschmacksrezeptoren (bitter, *Taste 2*) und aus Glycoproteinrezeptoren besteht. Glycoproteinrezeptoren übernehmen wichtige Kontroll- und Steuerfunktionen bei einer Reihe von Zellprozessen. Zur Secretingruppe zählen Rezeptoren für die Peptidhormone des Magen-

und Darmtraktes (VIP- und Glukagonrezeptor) und des Kalziumstoffwechsels (Kalzitinin- und Parathormonrezeptor). Diese Rezeptoren besitzen ebenfalls eine ausgeprägte N-terminale Hormonbindungsdomäne (Fredriksson et al., 2003).

### **I.3. Die Ligandenbindung und der Mechanismus der Signalweiterleitung in das Cytoplasma**

Die Ligandenbindung und die damit verbundene Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors ist ein mehrstufiger Prozess, der die eigentliche Ligandenbindung, die Konformationsänderung des Rezeptors und die Bindung und Aktivierung eines G-Proteins einschließt. Abhängig von der Art des Liganden, sind an dessen Bindung verschiedene Rezeptorbereiche beteiligt. So können sowohl extrazelluläre, transmembranäre als auch intrazelluläre Bereiche beteiligt sein. Kleine Moleküle wie zum Beispiel Glutamat oder Kalziumionen binden ausschließlich an extrazelluläre Domänen, wobei die hierdurch ausgelöste Konformationsänderung eine Signalübertragung in die Zelle ermöglicht. Viele Neurotransmitterrezeptoren arbeiten nach diesem Prinzip und besitzen bis zu 600 Aminosäuren lange extrazelluläre Domänen (Bockaert and Pin, 1999). Es gibt aber auch sehr kleine Liganden (z.B. Adrenalin, Histamin, Serotonin, Acetylcholin), deren Bindungsstelle sich im Kernbereich der Transmembranhelices befindet (Gether and Kobilka, 1998; Kobilka and Gether, 1998). Rhodopsin und die Opsinrezeptoren besitzen kovalent gebundene und in den transmembranären Bereichen lokalisierte Liganden, die eine Rezeptoraktivierung durch Konformationsänderung hervorrufen (Ernst and Bartl, 2002). Neuropeptide wie Vasopressin und Oxytocin besetzen gleich mehrere transmembranäre und extrazelluläre Domänen gleichzeitig, während große Peptidhormone (Glukagon) primär an extrazelluläre Domänen binden (Gardella and Juppner, 2000). Die Bindung dieser Liganden und die sich anschließende Konformationsänderung folgen den physikalischen Gesetzen der Thermodynamik, so dass diese Vorgänge mathematisch beschrieben werden können. Für die bei der Ligandenbindung ablaufenden Prozesse sind in der Literatur einige Modelle beschrieben (Kenakin, 2001; Leff, 1995a; Leff, 1995b; Lefkowitz, 1993; Lefkowitz et al., 1993). Diese Modelle beruhen auf einem durch Ligandenbindung induzierten allosterischen Mechanismus<sup>1</sup>, der eine Konformationsänderung des Rezeptors induziert. Gemäß dieser Vorstellung existieren Rezeptoren in mindestens zwei unterschiedlichen Zuständen R und R\*, die miteinander im Gleichgewicht stehen. R stellt dabei eine Rezeptorkonformation dar, die

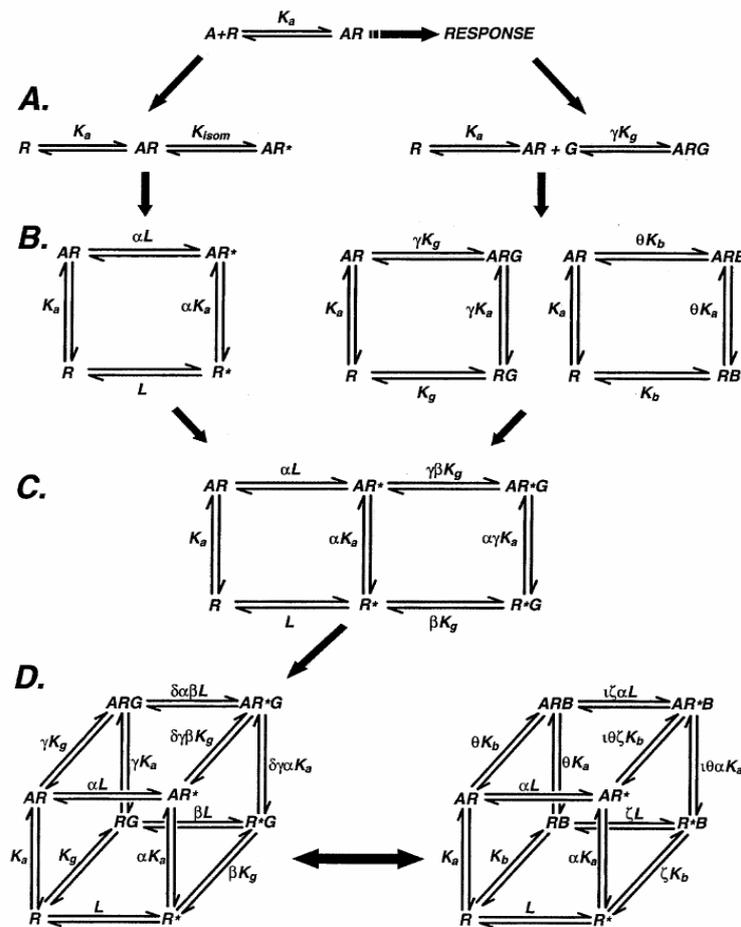
---

<sup>1</sup>Der Allosterische Effekt wird durch die beiden nachfolgende Prozesse beschrieben.

**Allosterische Interaktion:** beschreibt die Interaktion zwischen zwei topographisch unterschiedlichen Bindungsregionen am selben Rezeptor

**Allosterische Transition:** beschreibt die Isomerisation des Rezeptors zwischen sich ändernden Konformationen

keine G-Proteine aktivieren kann und deshalb inaktiv ist.  $R^*$  bindet an G-Proteine und ist aktiv. Solange keine Liganden gebunden sind, liegt das Gleichgewicht zwischen  $R$  und  $R^*$  auf der Seite der inaktiven Rezeptoren (Gleichgewichtskonstante  $K = [R]/[R^*] \gg 1$ ). Dennoch sind auch unter diesen Bedingungen einige Rezeptoren aktiv und sorgen für eine meßbare Basalaktivität. Liganden besitzen nun unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Rezeptorkonformationen, die sich in unterschiedlichen Assoziationskonstanten  $K_A$  und  $K_A^*$  ausdrücken.



**Abbildung 5: Die Entwicklung der allosterischen Modelle für G-Protein gekoppelte Rezeptoren.** Das erste Modell beruhte auf der Annahme, dass nach dem Massenwirkungsgesetz die Bindung des Liganden (A) an den Rezeptor (R) erfolgt. Dies lässt sich mittels der Gleichgewichtskonstante ( $K_A$ ) beschreiben und resultiert in einer Antwort. Dies bildet die Grundlage für die Weiterentwicklung des Modells. Im Abschnitt A bindet der Agonist an den Rezeptor und ruft dadurch eine Isomerisierung hervor, wobei das Signal am Rezeptor verbleibt (links) oder weitergeleitet mit dem G-Protein interagiert (rechts). Im Abschnitt B kann der Rezeptor spontan in den aktiven Zustand ( $R^*$ ) isomerisieren (links), oder das G-Protein (G) binden, bzw. den allosterischen Ligand (B). Die Gleichgewichtskonstanten  $K_A$ ,  $K_b$ , und  $K_g$  müssen aufgrund der thermodynamischen Gesetze durch die Kooperationsfaktoren  $\alpha$ ,  $\gamma$  und  $\theta$  korrigiert werden. Abschnitt C zeigt das *extended ternary complex model* von Samara et al in dem nur die aktive Rezeptorkonformation mit dem G-Protein interagiert (im Text beschrieben). Abschnitt D zeigt das CTC Modell mit der G-Protein Bindung an die aktive Konformation des Rezeptors. Dieses Modell ist identisch mit dem allosterischen two- state model von Hall (rechts). (Christopoulos et al, 2002)  
Die Wirksamkeit eines Liganden besteht in der Fähigkeit desselben, das Gleichgewicht zwischen beiden Konformationen zu verschieben. Liganden, die mit hoher Affinität an  $R^*$

binden, verschieben das Gleichgewicht zugunsten der aktiven Rezeptoren; sie werden als Agonisten bezeichnet.

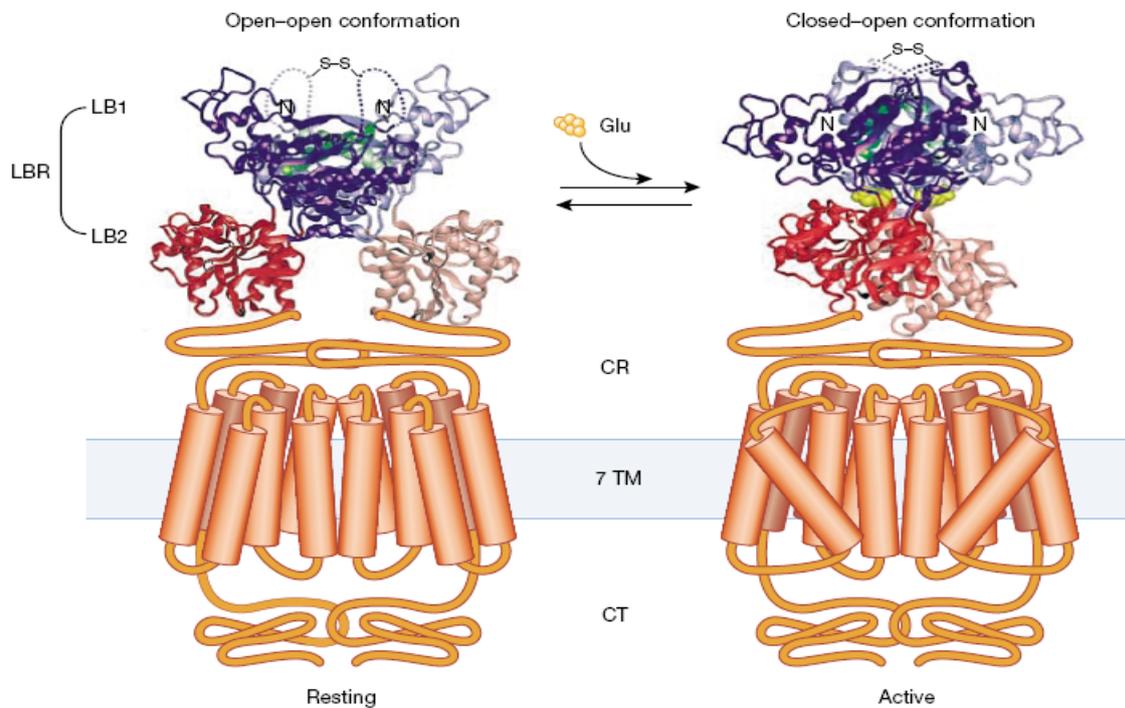
Bindet ein Ligand mit hoher Affinität an die inaktive Rezeptorkonformation und reduziert damit den Anteil aktiver Rezeptoren, so wirkt er als inverser Agonist (Chidiac et al., 1994). Inverse Agonisten zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Rezeptorantwort unter das übliche Basallevel drücken. Liganden, die sowohl an R und R\* binden und keinen Einfluß auf das Gleichgewicht zwischen beiden Konformationen ausüben, werden als kompetitive Agonisten bezeichnet. Bindet ein Ligand nur schwach an R\* und verschiebt das Gleichgewicht nur sehr wenig, wirkt er als partieller Agonist.

Das Modell der konformationellen Selektion wird durch eine Reihe experimenteller Untersuchungen gestützt, die vor allem an konstitutiv-aktiven Rezeptormutanten durchgeführt wurden (Lefkowitz et al., 1993; Lefkowitz and Premont, 1993; Schwartz and Rosenkilde, 1996; Spiegel, 1996). Es wird davon ausgegangen, daß der inaktive Rezeptor konformationellen Einschränkungen unterliegt, die erst bei Aktivierung (oder spezifischer Mutation) aufgehoben werden und dadurch eine Wechselwirkung zwischen G-Proteinen und C-terminalem Rezeptorbereich zulassen (Gether et al., 1997a; Gether et al., 1997b; Kjelsberg et al., 1992; Lefkowitz and Premont, 1993).

Obwohl viele bekannte Eigenschaften G-Protein gekoppelter Rezeptoren durch dieses Modell beschrieben werden können, deuten neuere experimentelle Befunde darauf hin, dass zukünftig noch komplexere Modelle aufgestellt werden müssen, um die Bindung zwischen Rezeptoren und Liganden und die damit verbundenen Aktivierungsprozesse besser beschreiben zu können (Kenakin, 1997a; Kenakin, 1997b).

Für eine Reihe von G-Protein gekoppelten Rezeptoren wird eine Dimerisierung von Rezeptormolekülen als Voraussetzung sowohl für die Ligandenbindung als auch für die Aktivierung des trimeren G-Proteins diskutiert (Terrillon et al., 2004). Möglicherweise fusionieren durch die Ausbildung von disulfidverbrückten Homodimeren die großen extrazellulären Bindungsdomänen dieser Rezeptoren zu einer *bi-lobed ligand binding region* (LBR) (Kunishima et al., 2000). Diese Region besteht aus zwei Subdomänen und einem cysteinreichen Abschnitt, der die LBR mit der Transmembranregion verbindet. Die Ligandenbindungsregion (LBR) des Rezeptors befindet sich entweder in der geschlossenen oder in einer offenen Konformation. Die beiden ligandenfreien Subdomänen der LBR weisen entweder eine „*open-open*“ oder eine „*closed-open*“ Konformation auf. Die „*open-open*“ Konformation ist ein Ruhezustand, während der Wechsel in die „*closed-open*“ Konformation zur Bindung des Agonisten führt. Dies führt zur Aktivierung des Rezeptors und damit zur

Signalweiterleitung. Antagonisten hingegen stabilisieren die „*open-open*“ Konformation, und die Aktivierung des Rezeptors findet nicht statt (Galvez et al., 2001).

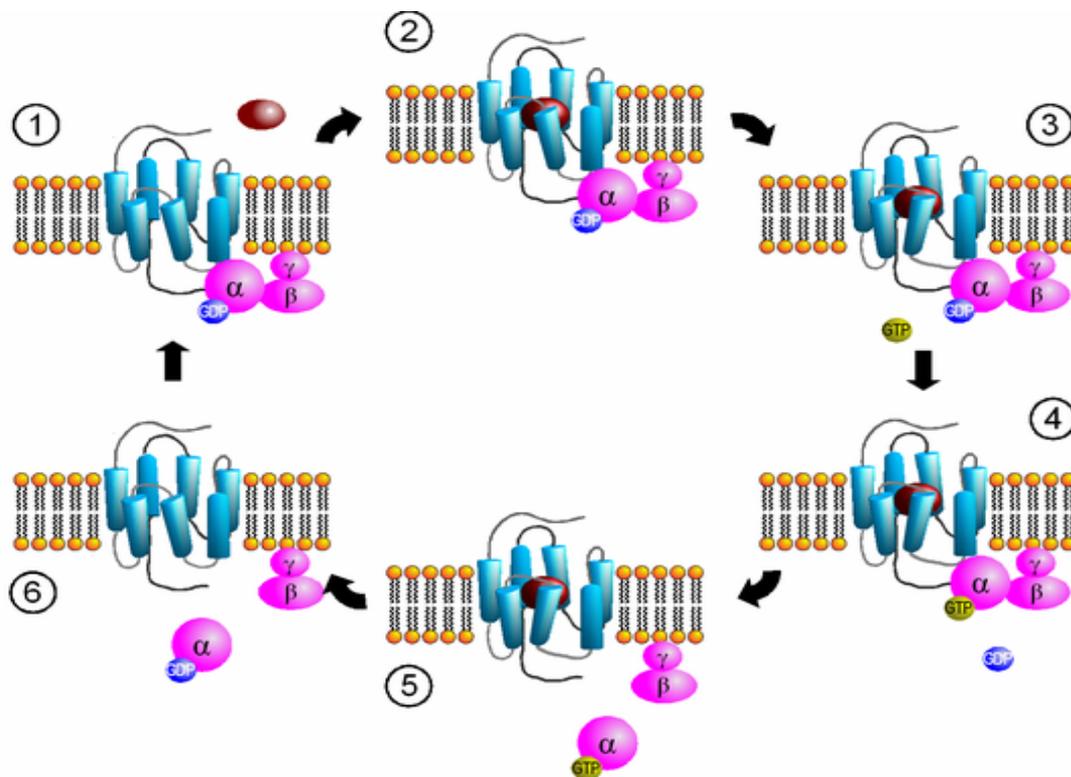


**Abbildung 6: Die Kristallstruktur der Ligandenbindungsdomäne des metabotropen Glutamaterezeptors**  
 Dieser Rezeptor ist essentiell für die Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems und er bildet ein Homodimer. Der Rezeptor besitzt eine große extrazelluläre Domäne und bildet als Homodimer eine Ligandenbindungsregion (LBR), die durch eine cysteinreiche Region (CR) mit der Transmembranregion verbunden ist. Die Kristallstruktur der LBR zeigt zwei Subdomänen (LB1 und LB2) und die linke Seite der Abbildung zeigt die ligandenfreie Konformation, während rechts der natürliche Agonist Glutamat gebunden ist. Die LBR des Homodimers befindet sich entweder in der offenen oder in der geschlossenen Konformation. Das ligandenfreie Dimer ist entweder in der „*open-open*“ oder in der „*closed-open*“ aktiven Konformation. Die Bindung des Agonisten stabilisiert die „*closed-open*“ Konformation und führt zu einem Orientierungswechsel der Subdomänen. Dieser Wechsel der Orientierung ist mit der Aktivierung des Rezeptors gekoppelt. (Moepps et al 2003)

Durch die Entwicklung neuer Technologien und Methoden wird der dynamische Prozess der Ligandenbindung an die verschiedenen Rezeptoren immer genauer und besser verstanden. So ermöglicht das Verfahren des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers bereits Aussagen über den Ablauf der Ligandenbindung an lebenden rezeptorexprimierenden Zellen (Vilardaga et al., 2003).

#### I.4. G-Proteine, intrazellulären Signalkaskaden und die Regulation der Rezeptorfunktion

Aktivierte G-Proteine sind für die Weiterleitung und Verstärkung des durch die Ligandenbindung ausgelösten Signals in das Zellinnere verantwortlich. Hierzu bindet die intrazelluläre Domäne des inaktiven Rezeptors ein aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  Untereinheit) bestehendes G-Protein, von denen mehrere Isoformen existieren (Klein et al., 2000; Nobles et al., 2005). Die einzelnen Rezeptoren zeigen hierbei eine Selektivität für ein oder mehrere G-Protein Isoformen (Hamm, 1998).

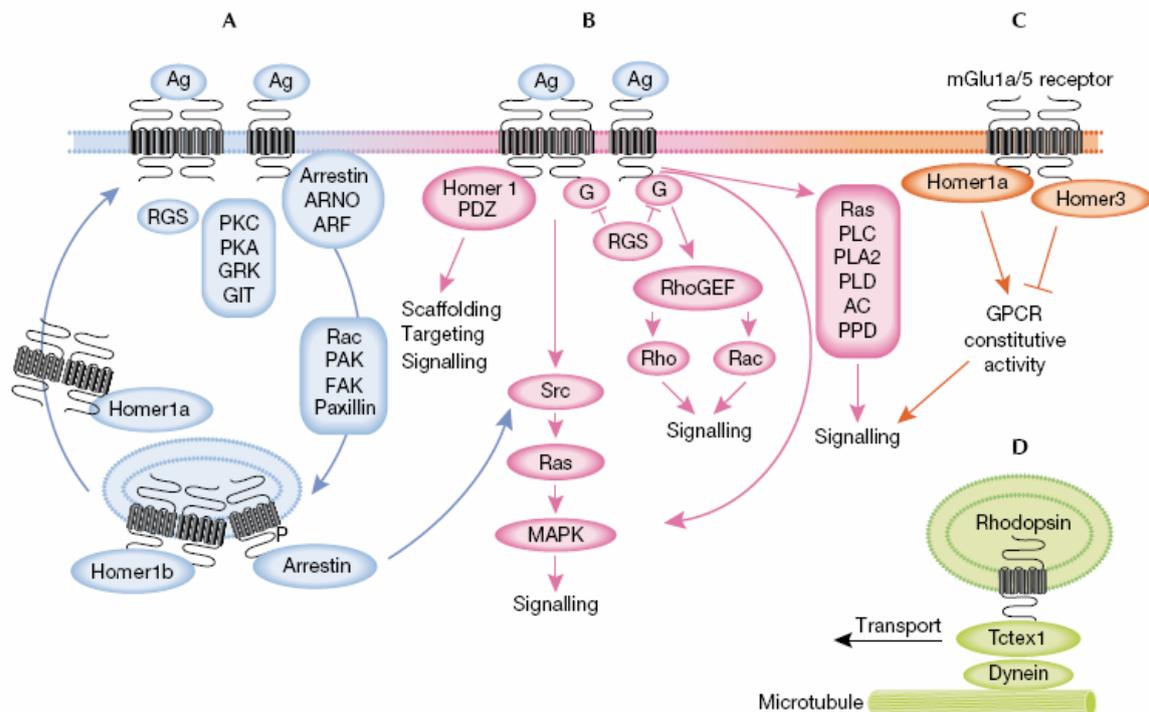


**Abbildung 7: Der G-Protein Aktivierungszyklus ausgelöst durch die Aktivierung eines GPCR.** Die Weiterleitung des extrazellulären Signals erfolgt durch die Bindung und Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins an den Rezeptor. Die Bindung des G-Proteins findet bereits am nichtaktiven Rezeptor statt (1). Die Aktivierung beginnt mit der Ligandenbindung und endet im Austausch von GDP gegen GTP (2 bis 4). Dieser Austausch ermöglicht die Abspaltung der  $\alpha$  Untereinheit und die Aktivierung nachgeschalteter Enzyme (5). Das gebundene GTP wird hydrolysiert und die Assemblierung der Untereinheiten erfolgt erneut (6). Das G-Protein steht nun für die erneute Signalweiterleitung wieder zur Verfügung.

Bindet nun der Ligand an die entsprechenden extrazellulären Domänen, so kommt es vielfach zur Auflösung einer Salzbrücke zwischen der dritten und siebenten Transmembranhelix. Die erhöhte Flexibilität des Rezeptors führt zu einer Konformationsänderung, die gleichzeitig einen GTP-Austausch (*GTP-exchange factor*) des Rezeptors induziert (Marullo et al., 1990; Yeagle and Albert, 2007; Yeagle et al., 2007). Diese Aktivität führt zum Austausch des an die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins gebundenen GDPs durch GTP. Dieser Austausch destabilisiert

den Komplex aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit und die  $\alpha$ -Untereinheit trennt sich von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die jetzt aktiven G-Proteine können nun das exogene Signal der Ligandenbindung in das Zellinnere weiterleiten. Je nach Untereinheit werden weitere zell- oder membranständige Proteine aktiviert oder deaktiviert (Tsunoda et al., 1997). Als wichtige nachgeschaltete Proteine seien hier die Adenylatcyclase (Bek et al., 2001), die durch die  $G\alpha_s$  Untereinheit aktiviert wird, und die Phospholipase C (Booden et al., 2002; Hashim et al., 2006; Smrcka et al., 1991), deren Aktivierung durch  $G\alpha_q$  erfolgt, genannt. Beide Enzyme sind an der Bildung von *Second Messengern* beteiligt. Diese *Second Messenger* nehmen eine Schlüsselposition in der Signalkaskade ein, da durch deren Bildung eine Signalverstärkung ermöglicht wird. Nach einiger Zeit bewirkt die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins in Kombination mit GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) eine Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP (de Vries et al., 2000; Ross and Wilkie, 2000). Somit kann die  $\alpha$ -Untereinheit wieder mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit fusionieren und erneut als heterotrimeres G-Protein an einen Rezeptor binden (Malbon, 2004).

Neben der Aktivierung eines G-Proteins können G-Protein gekoppelte Rezeptoren auch alternative Wege für die Signalweiterleitung nutzen. Zahlreiche Rezeptoren sind fähig, sogenannte nichtklassische Signalmoleküle zu binden. Durch die Interaktion mit diesen Molekülen können diese Rezeptoren alternative Signalwege steuern. So interagiert beispielsweise der metabotrope Glutamatrezeptor (m-GluR) mit dem HOMER Protein und bestimmt dadurch seine Lokalisation in der postsynaptischen Membran (Ango et al., 2002; Guhan and Lu, 2004). Der  $\beta_2$  Rezeptor moduliert unabhängig von G-Proteinen die Funktion des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Austauschers, und sorgt so auch für die Aufrechterhaltung des Zellpotentials (Hall et al., 1998). Oft dienen diese alternativen Signalwege der Selbstregulation und Lokalisation der Rezeptoren. Besonders die bereits oben beschriebene Interaktion mit dem HOMER Protein, aber auch die Bindung von Arrestin führt oft zur Regulation der Rezeptoraktivität. Diese regulierenden Prozesse sind für die Kommunikation und für das Überleben der Zelle von essentieller Bedeutung. Man unterscheidet hier zwei grundlegende Prozesse, die einerseits zur Erhöhung der Rezeptoranzahl in der Zellmembran führen (Up-Regulierung), oder zur Entfernung funktionstüchtiger Rezeptoren beitragen (Down-Regulierung). Beide Prozesse sind äußerst komplex und laufen in mehreren Stufen ab, wobei hier die Steuerung auch indirekt über GPCRs erfolgen kann. Die Erhöhung der Rezeptoranzahl nimmt ihren Anfang in der Proteinbiosynthese am Endoplasmatischen Retikulum (Kleizen and Braakman, 2004; Williams et al., 2007). Der Transport zum Golgi-Apparat und von dort in Golgi-Vesikeln zur Zellmembran wird wiederum durch verschiedene Proteine gesteuert.



**Abbildung 8: Die Signalweiterleitung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren.** In lebenden Zellen findet man G-Protein gekoppelte Rezeptoren als Monomere, Homodimere oder als Heterodimere. (A) Auf die anhaltende Rezeptoraktivierung durch den gebundenen Agonisten folgt eine schnelle Reduktion der Antwort durch Phosphorylierung oder durch Arrestinbindung an den phosphorylierten Rezeptor. Dies führt zur Internalisierung des Rezeptors, wobei an diesem Prozess weitere Proteine beteiligt sind. Der internalisierte Rezeptor interagiert mit intrazellulären Signalwegen, wobei spezifische Proteine den Rezeptor in intrazellulären Kompartimenten halten oder ihn markieren und so zur Plasmamembran transportieren. (B) Einige Beispiele für Rezeptoraktivierte Signalwege. Nach der Rezeptoraktivierung und der damit gekoppelten G-Protein Aktivierung binden Proteine der GTPase Superfamilie wie z.B. Rho, Ras, Tyrosinkinasen und MAP Kinasen und reagieren als Signalintegratoren. (C,D) Die Interaktion von GPCR's mit „nichtklassischen“ Bindungspartnern ist wichtig für die Regulation der Rezeptorfunktion und für die korrekte zelluläre Lokalisation. Zum Beispiel induziert oder verhindert die Bindung von HOMER 1 und HOMER 3 an den metabotropen Glutamaterezeptor die konstitutive Aktivität dieses Rezeptors im Neuron. Rhodopsin reagiert als Rezeptor für cytoplasmatisches Dynein durch die Bindung des Dynein light chain t-complex protein.

AC, adenylyl cyclase; Ag, Agonist; ARF, ADP-ribosylation factor; ARNO, ARF nucleotide binding site opener; FAK, focal adhesion kinase; G, G protein; GRK, GPCR kinase; GIT, GRK-interacting protein; mGluR1a/5, metabotropic glutamate receptor 1a/5; PAK, p21-activated kinase; PDZ, PSD-95/Dlg1/ZO-1 domain-containing protein; PIX, PAK-interacting guanine-nucleotide-exchange factor; PKC, protein kinase C; PKA, protein kinase A; PLC, phospholipase C; PLA2, phospholipase A2; PLD, phospholipase D; PPD, phosphodiesterase; RhoGEF, Rho guanine exchange factor; RGS, regulator of G-protein signalling; Tctex1, t-complex testis-expressed. (Moepps et al 2003)

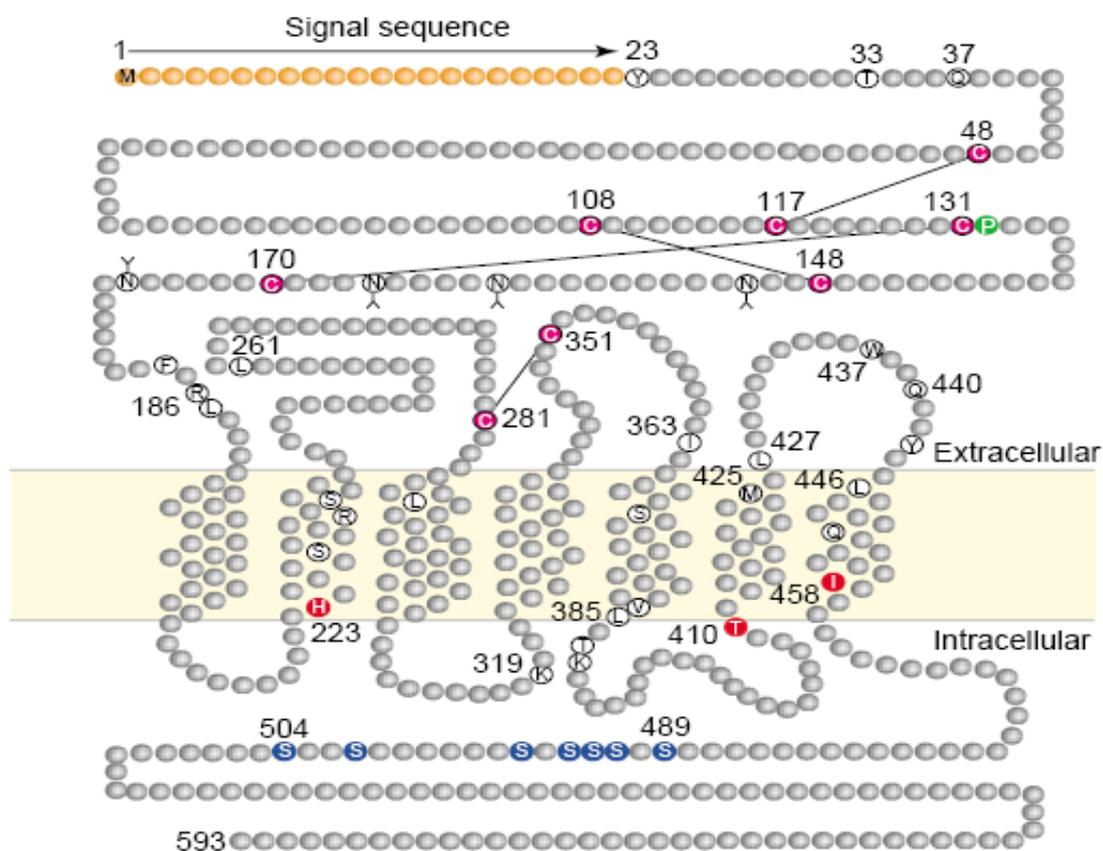
So sind beispielsweise Chaperone und Rezeptoraktivität modifizierende Proteine in diese Transportvorgänge involviert (Bermak and Zhou, 2001; Zerangue et al., 1999). Eine weitere Möglichkeit der Regulation besteht in der Glykosylierung der Rezeptoren (van Koppen and Nathanson, 1990). Die bei vielen Rezeptoren beobachtete und diskutierte Oligomerisierung wird gleichfalls als eine wichtige Voraussetzung für einen Membrantransport erachtet. Durch die Kopplung an HOMER Proteine, PSD-95, oder Spinophilin können in Vesikel verpackte Rezeptoren in die Zellmembran eingebaut werden (Zhu et al., 2001). Nach einiger Zeit der Rezeptoraktivierung, beobachtet man eine deutliche Abnahme der Rezeptorantwort. Diese

Abnahme entsteht durch das „Abschalten“ einiger Rezeptormoleküle aufgrund der Phosphorylierung bestimmter C-terminaler Serin- oder Threoninreste durch Proteinkinasen. Erfolgt diese Phosphorylierung durch *Second Messenger* aktivierbare Kinasen (cAMP und Proteinkinase A oder Diacylglycerin und Proteinkinase C) führt dies oft zu einem negativen Rückkopplungsmechanismus, da die Signaltransduktion aufgrund der geringeren Affinität zum G-Protein unterbrochen wird (Daaka et al., 1997a; Daaka et al., 1997b; Zaman et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit der Phosphorylierung über G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen ist ebenso möglich. Diese Kinasen haben mehrere Möglichkeiten der Einflussnahme auf die Signalweiterleitung. Sie können beispielsweise mit allen drei Untereinheiten des G-Proteins interagieren, und verhindern so dessen Interaktion mit dem Rezeptor. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Wirkung als GTPase aktivierendes Protein, wobei hier eine Beschleunigung der Hydrolyse von an der  $\alpha$ -Untereinheit gebundenem GTP zu GDP auftritt (de Vries et al., 2000; Ross and Wilkie, 2000). Eine dritte beschriebene Funktion ist die als Serin/Threonin Kinase, die direkt den Rezeptor phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren kommt es aufgrund der starken negativen elektrischen Ladung und der damit verbundenen elektrostatischen Wechselwirkungen zu einer Konformationänderung des Rezeptors, welche die Affinität und somit die Stärke des Signals beeinflusst. Weiterhin ermöglicht diese Modifizierung die Bindung von Arrestin an den Rezeptor, wobei hierdurch gleichzeitig die Bindung des G-Proteins verhindert wird. Arrestine, besonders  $\beta$ -Arrestine fungieren als „*Scaffold*“ Proteine und vermitteln so die Bindung für eine Vielzahl weiterer Proteine, insbesondere die von MAP Kinasen und Clathrin (Krupnick and Benovic, 1998; Pitcher et al., 1998a; Pitcher et al., 1998b; Zhang et al., 1997). Die Reaktion mit Clathrin führt zu einer Internalisierung des Rezeptors in Membranvesikel (*clathrin coated vesicles*) (Gaidarov et al., 1999; Laporte et al., 1999; Santini and Keen, 2002). Der internalisierte Rezeptor kann nachfolgend abgebaut oder *recycled* werden und gelangt wieder an die Zelloberfläche. Eine Funktion als intrazellulärer Rezeptor ist ebenfalls möglich (Luttrell et al., 1999a; Luttrell et al., 1999b).

All diese Beispiele verdeutlichen die wichtige regulatorische Funktion der Phosphorylierung auf die dem Rezeptor nachgeschaltete Signalübertragung- und verarbeitung.

## I.5. Der humane Parathormonrezeptor, seine Liganden und Funktion

Humane Rezeptoren für die Peptidhormone Parathormon (PTH) und Parathormon-*related peptide* (PTHrP) kommen hauptsächlich und in hoher Anzahl im Knochengewebe und der Niere vor. Sie sorgen in diesen Organen für die Parathormon-abhängige Regulierung des Mineralstoffhaushalts. Darüber hinaus vermittelt der Parathormon-Rezeptor (PTHrR) die parakrine Wirkung des PTHrP, das eine entscheidende Rolle im Prozess der endochondralen Knochenbildung spielt (Mannstadt et al., 1999). Schon 1978 konnten Goltzman und Mitarbeiter den PTHrR als G-Protein gekoppelten Rezeptor identifizieren (Goltzman, 1978a; Goltzman, 1978b).



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des humanen Parathormonrezeptors.** Die Abbildung zeigt die anhand von Computermodellen vorhergesagte Domänenstruktur. Die gezeigte Disulfidbrückenstruktur beruht auf Experimenten mit N-terminalen Rezeptorfragmenten. Aminosäuren für die Ausbildung eines Glykosylierungsmusters sind mit gegabelten Symbolen unterlegt. Weitere wichtige Aminosäuren sind farblich unterlegt, wobei die Aminosäurepositionen für die Krankheitsbilder der Blomstrand chondrodysplasia (inaktiver Rezeptor) und der Jansen chondrodysplasia (konstitutiv aktiver Rezeptor) mit grün und rot gekennzeichnet sind.

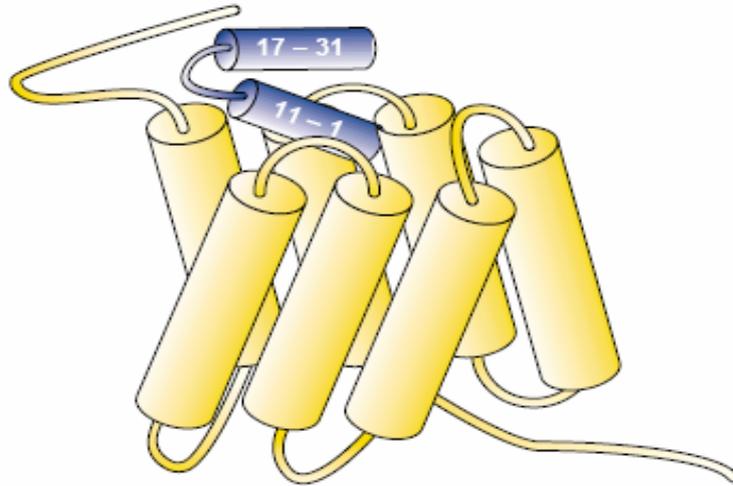
1995 wurde ein zweiter Subtyp des Parathormon-Rezeptors (PTHrR2) entdeckt (Usdin et al., 1995), der auf Parathormon, nicht aber auf PTHrP reagiert und dessen biologische Bedeutung bislang unbekannt blieb. Beide Rezeptoren gehören zur Familie B der G-Protein gekoppelten

Rezeptoren und aktivieren mehrere intrazelluläre Signalkaskaden, darunter den lange bekannten Signalweg über die Adenylatzyklase mit einem Anstieg des intrazellulären cAMP und den Phospholipase C Weg mit einer Bildung von Diacylglycerol, Inositolphosphaten und einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Zusammen mit den Rezeptoren für Calcitonin, Glucagon, Glucagon-like Peptide, Secretin, PACAP und anderen zeichnen sie sich durch eine große N-terminale Domäne mit sechs konservierten Cysteinseitenketten aus.

Die Aktivierung des PTHR durch Bindung seiner Liganden scheint zwei Schritte zu beinhalten, wobei in einem Schritt eine spezifische Wechselwirkung des N-terminalen Rezeptoranteils und der Exoloops mit den Peptidhormonen ausgebildet wird, im anderen Schritt die Interaktion dieses Komplexes mit Transmembrananteilen zur Signalübertragung führt (Behar et al., 1996a; Ji et al., 1998; Mannstadt et al., 1999; Rolz et al., 1999). Der PTH-Ligand des PTHR wird in einer reifen Form von 84 Aminosäuren in den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüsen, PTHrP in mehreren durch alternatives mRNA *Splicing* produzierten Formen zwischen 139 und 173 Aminosäuren gebildet. Zur Aktivierung des PTHR und des PTHR2 sind jedoch die 34 Aminosäuren langen N-terminalen Fragmente beider Hormone ausreichend (Mannstadt et al., 1999). Beide Liganden zeigen eine signifikante Sequenzhomologie der ersten 13 Aminosäureresten, was auf die funktionelle Bedeutung dieser Aminosäuren bei der Aktivierung der Rezeptoren hindeutet. Im Bereich zwischen Aminosäure 14 und 34 sinkt die Homologie deutlich, oberhalb Aminosäure 34 ist keine Ähnlichkeit mehr feststellbar. Die Liganden PTH1-34 und PTHrP1-36 konnten mittels NMR strukturell untersucht werden (Barden and Kemp, 1994; Gronwald et al., 1997; Marx et al., 1995) und weisen definierte Sekundärstrukturelemente auf.

Der C-terminale Bereich enthält eine stabile  $\alpha$ -Helix, die durch eine flexible Region mit einer weniger stabilen N-terminalen  $\alpha$ -Helix verbunden ist. Mutagenesestudien und *cross-linking*-Experimente deuten daraufhin, daß die C-terminalen Bereiche (Aminosäuren 15 bis 34) beider Liganden über die  $\alpha$ -helikale Struktur mit dem N-terminalen Anteil des PTHR wechselwirken, die N-terminalen Aminosäuren jedoch mit Aminosäureresten der Transmembranhelices interagieren und so für eine Weiterleitung des Signals, bzw. eine aktivierte Konformation R\* des Rezeptors verantwortlich sind (Adams et al., 1998; Behar et al., 1996a; Behar et al., 1996b; Bisello et al., 1998; Carter et al., 1999; Gardella et al., 1996a; Gardella et al., 1996b; Gardella et al., 1996c; Juppner, 1994; Juppner et al., 1994; Lee et al., 1995; Mannstadt et al., 1998; Marx et al., 1998; Turner et al., 1996). Zusätzlich zu den regulatorischen Wirkungen auf den Kalziumhaushalt wirkt PTH bei der Aufrechterhaltung der

Normkonzentration des Phosphats im Blut durch eine Inhibierung der Phosphatresorption in den proximalen und distalen Nierentubuli mit.



**Abbildung 10: Die Bindung des PTH (1-34) Liganden an den Rezeptor.** Die Abbildung zeigt die Ligandenbindung an den PTH-Rezeptor aufgrund der zwei Domänen Hypothese. An dieser Interaktion sind prinzipiell zwei mechanistische Schritte beteiligt, die Interaktion des C-terminalen Ligandenendes (17-31) mit der extrazellulären Rezeptordomäne und die Interaktion der N-terminalen Ligandendomänen mit der Transmembranregion des Rezeptors. Dieses Modell beschreibt also gleichzeitig die Rezeptoraffinität und die Rezeptoraktivierung.

In Säugern ist PTH der wichtigste Regulator der Kalziumionen-Homöostase (Potts et al., 1997a; Potts et al., 1997b). Die Synthese des Hormons wird dabei durch die extrazelluläre Kalziumkonzentration geregelt, die durch den Kalzium Sensor der Nebenschilddrüsenzellen gemessen wird (Brown et al., 1993). Als Antwort auf eine niedrige Kalziumionenkonzentration der Extrazellularflüssigkeit ( $< 2,5$  mM) wird PTH in die Blutbahn abgegeben und wirkt hauptsächlich an Knochengewebe und Niere zur Wiederherstellung des Norm-Kalziumniveaus (Khundmiri and Lederer, 2002; Khundmiri et al., 2003). Im Nierengewebe stimuliert PTH über seine Wechselwirkung mit dem PTH-Rezeptor direkt die tubuläre Reabsorption von Kalzium und die Aktivität der Transkription der D3-1 $\alpha$ -Hydrolase, was zur Verstärkung der 1,25-Dihydroxyvitamin-D3-abhängigen Kalziumabsorption im Darm führt. Im Knochengewebe kann PTH eine schnelle Freisetzung von Kalzium aus der Knochenmatrix bewirken (Bringhurst et al., 1989a; Bringhurst et al., 1989b). Es vermittelt darüberhinaus auch längerfristige Änderungen des Kalziumstoffwechsels durch eine direkte Wirkung auf Osteoblasten und eine indirekte aktivierende Wirkung auf Osteoklasten.

PTHrP wurde als häufigste Ursache des Syndroms der humoralen Hyperkalzämie in malignen Erkrankungen entdeckt (Suva et al., 1987), bei denen das Hormon durch den Tumor überproduziert wird. Bei gesunden Menschen spielt es eine essentielle Rolle in der Skelettentwicklung. Die Wirkung des PTHrP entfaltet sich dabei über die Aktivierung des

PTHrP in prähypertrophen Chondrocyten der metaphysealen Wachstumsplatten während der Ausbildung des Skeletts. Auch weitere wichtige Funktionen bei Entwicklungsvorgängen werden beiden Molekülen zugeschrieben (Mannstadt et al., 1999). PTH und PTHrP gehören zu den wenigen Substanzen, denen eine knochenaufbauende Wirkung nachgewiesen werden konnte (Dempster et al., 1993). Bei geeigneter Applikation, nämlich intermittierend als wiederholte subkutane Injektionen, können PTH und PTHrP eine anabole Wirkung am Skelett besitzen (Chevalley and Rizzoli, 1999). Dies konnte sowohl an ovariectomierten Ratten als einem Tiermodell der Osteoporose (Mitlak et al., 1996) als auch in ersten kleinen Pilotstudien am Menschen demonstriert werden (Plotkin et al., 1998; Reeve, 1996). In einer Studie mit einer allerdings kleinen Fallzahl an Frauen mit Osteoporose Risikoerkrankungen kam es nicht nur zu einem ausgeprägten Knochenmassegewinn, sondern auch zu einer signifikanten Reduktion der Wirbelkörperfrakturen. Inzwischen ist das PTH Peptidfragment 1-34 als Therapeutikum bei Osteoporose unter dem Handelsnamen Forsko<sup>®</sup> von der FDA zugelassen. Die wichtige Rolle der PTH/PTHrP-vermittelten Signalübertragung durch den PTH-Rezeptor bei der Steuerung der Entwicklung von Knorpel und Knochen offenbart sich auch bei einigen seltenen vererbaren Erkrankungen, die durch eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors oder durch eine Hemmung der Signalübertragung aufgrund von Rezeptormutationen verursacht werden. Bei der Chondrodysplasie vom Typ Jansen konnten drei Punktmutationen in genomischer Patienten-DNA festgestellt werden. His223 Arg, Thr410 Pro, oder Ile458 Arg-Mutationen führten zu einer konstitutiven, von Agonisten unabhängigen Rezeptoraktivierung. Dies führt neben einer daraus resultierenden Hyperkalzämie u.a. zu einer verzögerten endochondralen Knochenbildung mit Zwergwuchs und gesteigertem Knochenauf- und -abbau (Schipani et al., 1995; Schipani et al., 1999; Schipani et al., 1996; Schipani et al., 1997). Mutationen, die eine Signalübertragung des PTH-Rezeptors verhindern, wurden in zwei verschiedenen Fällen der Chondrodysplasie vom Typ Blomstrand entdeckt. Diese sehr seltene, autosomal rezessiv vererbare Erkrankung geht mit einer frühzeitigen Skelettreifung und einer verstärkten Ossifikation einher (Blomstrand et al., 1985). In einem Fall waren 11 Aminosäuren der Transmembranhelix 5 deletiert (Jobert et al., 1998), im anderen Fall konnte eine Punktmutation, die die hochkonservierte Aminosäureseitenkette Pro132 gegen Leucin austauschte (Zhang et al., 1998), nachgewiesen werden. Beide Mutationen verminderten die Bindung von PTH und PTHrP an den Rezeptor und führten zu einer starken Reduktion der Signalantwort im cAMP-Assay.

## I.6. Problemstellung

Die Forschung der letzten Jahre auf dem Gebiet der G-Protein gekoppelten Rezeptoren war gekennzeichnet durch die Aufklärung der intrazellulären Signaltransduktionswege, an denen diese Rezeptoren beteiligt sind. Gegenwärtig konzentriert man sich auf die Aufklärung der molekularen Prinzipien der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand um so ihre physiologische Rolle zu klären. Grosse Anstrengungen werden auch hinsichtlich der strukturellen Aufklärung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren unternommen. Diese strukturelle Aufklärung auf atomarer Basis wird entscheidend zum Verständnis der Ligandenbindung und die an diese gekoppelte Signalweiterleitung in das Zellinnere beitragen. Bisher sind diese Versuche allerdings aufgrund der niedrigen zur Verfügung stehenden Proteinmenge gescheitert.

Das primere Ziel dieser Arbeit besteht nun darin, am Beispiel des Parathormonrezeptors Methoden und Protokolle zu etablieren, die den Rezeptor in für die Strukturaufklärung erforderlichen Mengen bereitstellt. Besonders die Entwicklung und Etablierung von Expressionsprotokollen auf prokaryontischer Basis mit der Produktion des Rezeptors als *Inclusion bodies* und die anschließende Renaturierung des PTH Rezeptors stehen hierbei im Focus. Eine erste biochemische und biophysikalische Charakterisierung soll die Funktionalität des Rezeptors dabei bestätigen.

## II. Material und Methoden

### II.1. Häufig verwendete Chemikalien, Enzyme, Standards, Proteine und Kitsysteme

Für die Herstellung aller verwendeten Lösungen und Puffersysteme wurde deionisiertes Wasser verwendet. Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Appllichem, Fluka, Sigma Aldrich oder Roth bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden Substanzen mit dem Reinheitsgrad p.A. verwendet.

Chemikalien	Bezugsquelle
Agarose	ICN, Meckenheim
Ampicilin	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	ROTH, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	ROTH, Karlsruhe
Bradford Reagenz	BIORAD, München
Bromphenolblau	ROTH, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G 250	ROTH, Karlsruhe
Cyclohexyl-n-hexyl- $\beta$ -D-maltosid	MERCK, Darmstadt
n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid	MERCK, Darmstadt
Dithiothreitol, DTT	ICN, Meckenheim
Ethylendiamintetraacetat, EDTA	ICN, Meckenheim
Ethidiumbromid	GIBCO BRL, Karlsruhe
Glutathion, oxidiert, GSSG	ROCHE Diagnostics, Penzberg
Glutathion, reduziert, GSH	ICN, Meckenheim
Guanidinhydrochlorid, GuaHCL	NIGU Chemie,
n-Hexan	ROTH, Karlsruhe
Imidazol	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid, IPTG	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Kanamycin	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Kalziumchlorid	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
L-Arginin; L-Argininhydrochlorid	AJINOMOTO C INC., Tokio (Japan)
Magermilchpulver	APPLICHEM, Darmstadt

<b>Chemikalien (Fortsetzung)</b>	<b>Bezugsquelle (Fortsetzung)</b>
Methyl- $\beta$ -cyclodextrin	FLUKA, Deisenhofen
Natriumazid	ROTH, Karlsruhe
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat, SDS	ICN, Meckenheim
Natriumhydroxid	ROTH, Karlsruhe
Polyethylenglykol, PEG 30.000	FLUKA, Buchs (Schweiz)
2-Propanol	ROTH, Karlsruhe
Protease Inhibitor Mix	ROCHE Diagnostics, Penzberg
Trifluoressigsäure, TFA	ROTH, Karlsruhe
Trichloressigsäure, TCA	MERCK, Darmstadt
Tris-hydroxymethyl-aminomethan, TRIS	ICN, Meckenheim
<b>Enzyme und Standards</b>	<b>Hersteller</b>
1 kbp/100bp-DNA Marker	NEW ENGLAND BIOLAB, NEB, Frankfurt/Main
LMW Protein-Molekulargewichtsstandard	GE HEALTHCARE, Freiburg
Benzonase <sup>®</sup> purity grade II (250 U/ $\mu$ l)	MERCK, Darmstadt
Rinderserumalbumin, BSA	BOEHRINGER, Mannheim
Lysozym	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Pfu- Polymerase	PROMEGA, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	NEW ENGLAND BIOLAB, NEB, Frankfurt/Main
Shrimp Alkalische Phosphatase	NEW ENGLAND, BIOLAB, NEB, Frankfurt/Main
T4-DNA-Ligase (1U/ $\mu$ l)	NEW ENGLAND BIOLAB, NEB, Frankfurt/Main
Thrombin (bovin)	SIGMA ALDRICH, Deisenhofen
<b>Antikörper</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-Mouse-Ig-Peroxidase	BIORAD, München
Anti-Chicken-Ig-Peroxidase	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Anti-His-Ig-aus Huhn	QIAGEN, Hilden
Anti-PTHr-Ig aus Hase	Dr. Konrad Honold, Roche Diagnostics, Penzberg

<b>Kitsystem</b>	<b>Hersteller</b>
QIAquick Minielute Gel Extraktion Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Midiprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraktion Kit	QIAGEN, Hilden
<b>Sonstige Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
BioTrace™ Nitrocellulose Membran	PALL-GELMANN, Dreieich
BioTrace™ PVDF Membran	PALL-GELMANN, Dreieich
Dialyseschläuche Spectropor	ROTH, Karlsruhe
Glukosesensorstäbchen	MERCK, Darmstadt
Minisette FSQ, cut off 10 kDa	PALL-GELMANN, Dreieich
Zentrifugalkonzentratoren Macrosep	PALL-GELMANN, Dreieich
Zentrifugalkonzentratoren AMICON-Ultra	MILLIPORE, Schwalbach

## II.2. Geräte und Zubehör

Außer den nachfolgend aufgelisteten Geräten wurden zusätzlich noch die Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.

<b>Gerätetyp</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
<b>Bioreaktor Biostat ED (10 Liter)</b> mit Prozessleitsystem MCFSwIn und Mess- und Steuersystem C-DCU	B. BRAUN, Melsungen
Blotapparat Semi-Dry Hoefer Semiphor	GE HEALTHCARE, Freiburg
<b>Chromatographieanlagen</b>	
ÄKTA purifier 100	GE HEALTHCARE, Freiburg
ÄKTA explorer 100	GE HEALTHCARE, Freiburg
ÄKTA FPLC	GE HEALTHCARE, Freiburg
Gynkotec HPLC-System	DIONEX, Idenstein
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	BIORAD, München
Gaulin- Hochdruckhomogenisator Lab 40	APV, Lübeck
Gaulin- Hochdruckhomogenisator Lab 60	APV, Lübeck

<b>Chromatographiesäulen und Material</b>	
Ni-NTA HIS-Bind Resin	NOVAGEN, Bad Soden
Phenyl Sepharose low sub	GE HEALTHCARE, Freiburg
Superdex S75 (prep grade)	GE HEALTHCARE, Freiburg
Superdex S200 (prep grade)	GE HEALTHCARE, Freiburg
Nucleosil 500-5 C3 PPN	MACEREY-NAGEL, Düren
<b>Sequenziergerät für DNA Proben</b>	
Li-COR 4000	MWG BIOTECH, Ebersberg
<b>Spektrometer</b>	
CD- Spektrometer Jasco J 810	JASCO GmbH, Groß-Umstadt
Fluoreszenzspektrometer F-4500	HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES, UK
Fluoromax-3	SPEX INSTRUMENTS, Edison, USA
UV/Vis Spektrometer DU 640	BECKMAN, München
Tangentialflussfiltrationssystem ProVario	PALL-GELMAN, Dreieich
Thermocycler Mastercycler Gradient	EPPENDORF, Hamburg
<b>Zentrifugen</b>	
Avanti J-20/25/30l	BECKMAN, Palo Alto, USA
Optima TLX Ultrazentrifuge	BECKMAN, Palo Alto, USA
Biofuge Fresco, Pico	HERAEUS, Hanau

### II.3. Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E.coli</i> TOP 10	<i>F</i> <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) <i>Ö80lacZ</i> . <i>M15</i> , <i>.lacX74 recA1</i> ,, <i>deoR</i> , <i>araD139</i> ,.( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , ( <i>StrR</i> ) <i>endA1 nupG</i>	INVITROGEN, Carlsbad, USA
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	<i>B</i> , <i>F</i> <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , [ <i>dcm</i> ], [ <i>lon</i> ], <i>hsdSB</i> ( <i>rB-mB</i> -), <i>galλ</i> (DE3)	NOVAGEN, Bad Soden
<i>E.coli</i> BL21 (DE3) Codon Plus (RIL)	<i>B</i> , <i>F</i> <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <i>rB- mB</i> -) <i>dcm</i> + <i>Tetr gal</i> (DE3) <i>endA</i> <i>Hte[argU ileY leuW Camr]</i>	STRATAGENE, Niederlande

## II.4. Plasmide und Vektoren

Plasmidbezeichnung	Verwendung	Herkunft
pET 11a-PTHr	Expression des PTHr ohne zusätzlichen Tag	diese Arbeit
pET 11a- $\alpha$ -Gluc-PTHr	Expression des PTHr mit den N-terminal fusionierten ersten fünf Aminosäuren (M, T, I, S, D) der $\alpha$ -Glucosidase	diese Arbeit
pET 34b-CBD-PTHr	Expression des PTHr als Fusionsprotein mit der Zellulosebindedomäne	diese Arbeit
pGEX TK2-GST-PTHr	Expression des PTHr als GST Fusionsprotein	diese Arbeit
pET 15b-PTHr	Expression des PTHr mit N-terminalem Histidin Tag	diese Arbeit

## II.5. Oligonukleotidsequenzen

Primerbezeichnung	Basensequenz
T7 Promotor	CGA AAT TAA TAC GAC TCA C
T7 Terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G
pET 11a-PTHr forward	GGG AAA CTT CAT ATG <b>TAC GCG CTG GTG GAT GCA</b>
pET 11a-PTHr reverse	CAC GGA TCC TCA <b>CAT GAC TGT CTC CCA CTC</b>
pET 11a- $\alpha$ -Gluc-PTHr forward	GGA ATT CCA TAT GAC GAT ATC CGA TTA <b>CGC GCT GGT GGA TGC AGA TGA</b>
pET 11 $^{\circ}$ - $\alpha$ -Gluc-PTHr reverse	CGC GGA TCC TTA <b>CAT GAC TGT CTC CCA CTC TTC CTG TAG C</b>
pET 34b-CBD-PTHr forward	AAA CAA TTG GAT <b>ACG CGC TGG TGG ATG CAG ATG A</b>
pET 34b-CBD-PTHr reverse	CGC ATC CTA <b>ACA TGA CTG TCT CCC ACT CTT CCT GTA GCA</b>
pGEX TK2-GST-PTHr forward	CGG GAT CCT <b>ACG CGC TGG TGG ATG CAG ATG A</b>
pGEX TK2-GST-PTHr reverse	CTA TTA <b>CAT GAC TGT CTC CCA CTC TTC CTG TAG CA</b>
pET 15b-PTHr forward	GGG AAA CTT CAT ATG <b>TAC GCG CTG GTG GAT GCA</b>
pET 15b-PTHr reverse	CAC GGA TCC TCA <b>CAT GAC TGT CTC CCA CTC</b>

Die Planung der einzelnen Nukleotidsequenzen erfolgte mit dem Programm Gene Runner. Die Sequenzierprimer enthielten eine Markierung mit dem Farbstoff IRD 800 am 5'-Ende. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) und Metabion (Martinsried) HPLC bzw. HPSF gereinigt bezogen.

## II.6. Zusammensetzung häufig verwendeter Puffersysteme und Lösungen

Bezeichnung	Komponenten
Laufpuffer Agarose-Elektrophorese: 50×TAE	1 M Tris-HCl; 2 M Essigsäure; 0,1 M EDTA, pH 8,1
Laufpuffer für DNA-Sequenzierung: 5×TBE Puffer	0,45 M Tris-HCl; 0,45 M Borsäure; 10 mM EDTA, pH 8,0
Laufpuffer SDS-PAGE	50 mM Tris, 380 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.3
Probenauftragspuffer SDS-PAGE	62 mM Tris, pH 6.8, 10% (v/v) Glycerin, 2.1% (w/v) SDS, 50 mM DTT
PAGE Färbelösung	10% (v/v) Essigsäure, 0.006 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250
PAGE Fixierer	10% (v/v) Essigsäure, 25% (v/v) 2-Propanol
PAGE Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure
PAGE Sammelgel-Puffer: 5×Puffer	0.5 M Tris, 0.4% (w/v) SDS, pH 6.8
PAGE Trenngel-Puffer: 5×Puffer	1.5 M Tris, 0.4% (w/v) SDS, pH 8.8
Probenpuffer SDS-PAGE reduzierend	2 ml Sammelgelpuffer, 2 ml 16% (w/v) SDS, 4 ml Glycerin, 2 ml 0.2 % (w/v) Bromphenolblau, 2 ml 2-Mercaptoethanol, pH 6.8
Probenpuffer SDS-PAGE oxidierend	2 ml Sammelgelpuffer, 2 ml 16% (w/v) SDS, 4 ml Glycerin, 2 ml 0.2% (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8
Probenpuffer Agarose-Gelelektrophorese	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50% (w/v) Glycerin, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7.2
Western Blot Inkubations- und Waschlösung	10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.02% Tween 20, pH 7.5
Western Blot Detektion: ECL-Lösung 1	1 ml 250 mM Luminol (in DMSO), 0.44 ml Cumarsäure 90 mM (in DMSO), 10 ml 1M Tris pH 8.5 ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O
Western Blot Detektion: ECL-Lösung 2	64 µl Wasserstoffperoxid (30% (v/v)), 10 ml 1M Tris pH 8.5 ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O

## II.7. Medien und Lösungen für die Kultivierung von *Escherichia coli*

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Allgemeine Medien</b>	
LB-Medium	10g/l Trypton; 5g/l Hefextrakt, 5g/l Natriumchlorid
LB-Agar Medium	LB Medium unter Zusatz von 40g/l Agar Agar
SOC-Medium	20 mM Glucose; 20g/l Trypton; 5g/l Hefextrakt; 0,5 g/l NaCl; 10mM MgCl <sub>2</sub> ; 10mM MgSO <sub>4</sub> ; pH 7.50
TBT-Medium	10g/l Trypton, 10g/l Hefextrakt, 5g/l Natriumchlorid
<b>Bioreaktorkultivierungsmedien</b>	
Hefeextrakt Vollmedium	50g/l Hefeextrakt (CMV Hefewerk Hamburg); 0,5g/l Ammoniumchlorid;
Glukose Lösung	5g/l Glukose
di-Kaliumhydrogenphosphatlösung	11g/l di- Kaliumhydrogenphosphat; (gelöst in 500 ml Wasser)
Magnesiumsulfatlösung	0,68g/l Magnesiumsulfat; (gelöst in 500ml Wasser)
Feeding Lösung	250ml/l Glycerin; 300g/l Hefeextrakt
pH Regulatorlösungen	10% Phosphorsäure; 10% Kaliumhydroxidlösung

## II.8. Molekularbiologische Methoden

### II.8.1. Isolierung und Reinigung von Plasmid DNA

Plasmide wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birboim and Doly, 1979) unter Verwendung verschiedener Kits (Qiagen) präpariert. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer 5 ml *E.coli* Übernachtskultur erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach der Vorschrift des Herstellers. Für die Reinigung von DNA nach Restriktionsspaltungen, Polymerase-Kettenreaktionen oder Dephosphorylieren wurde das QIAquick PCR Purification Kit verwendet. Zur Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet bzw. für die Extraktion von Fragmenten mit einer Länge von unter 100 bp das QIAquick Minielute Gel Extraction Kit.

### II.8.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA-Abschnitten aus einem DNA-Strang (Templat) (Mullis et al., 1986). Mit einer zyklischen Abfolge von Strangtrennung, *annealing* und *extension* wird bei Verwendung einer temperaturstabilen Polymerase eine nahezu exponentielle Anreicherung von DNA-Fragmenten erreicht (Tabelle.1) Für präparative PCR-Reaktionen wurde wegen der höheren Genauigkeit *Pfu*-Polymerase und zu analytischen Zwecken *Taq*-Polymerase verwendet.

**Tabelle 1: PCR Programmübersicht zur Amplifikation der DNA Sequenz des PTH Rezeptors**

<b>1 Startprodukt</b>			
<b>PCR Schritt</b>	<b>Temperatur / °C</b>	<b>Zeit / min</b>	<b>Bemerkung</b>
1. Denaturierung	95°C	5.00 min	Denaturierung
2. Pause	95°C		<i>Hot Start</i> Polymerasenzusatz
3. Denaturierung	95°C	1.00 min	Denaturierung
4. Primer Anealing	64°C (Tm Primer)	1.00 min	Absenken der Tm um 0.5°C pro PCR Zyklus
5. Ketten- verlängerung	73°C	2.00 min	Anheben der Synthesezeit um 3s pro PCR Zyklus
6. Wiederholung des Zyklus			Neun Zyklen zur Generierung eines PCR Startproduktes

<b>2 Synthese</b>			
7. Denaturierung	95°C	1.00 min	Denaturierung
8. Primer Annealing	60°C	1.00 min	Primer Annealing
9. Kettenverlängerung	73°C	2.30 min	Anheben der Synthesezeit um 3s pro PCR Zyklus
10. Wiederholung des Zyklus			20 Wiederholungen zur DNA Synthese
11. Endsynthese	73°C	7.00 min	Endsynthese

### II.8.3. DNA Sequenzierung

Die DNA-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) diente in der vorliegenden Arbeit zur Verifizierung der Sequenz von Expressionskonstrukten. Zur Sequenzierung wurde Plasmid-DNA aus einer Übernachtskultur präpariert. Durch Einsatz von ortsspezifischen, markierten Primern wurde der entsprechende DNA-Abschnitt in einer Reaktion unter Verwendung des Sequi-Therm EXCEL™II *Long-read* DNA Sequenzierkit LC nach Herstellerangaben präpariert. Nach der Denaturierung der DNA durch 10-minütige Inkubation bei einer Temperatur von 70°C erfolgte die Analyse der Sequenz an einem Li-COR 4000 Sequenziergerät.

### II.8.4. Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid DNA

Die Einführung von Plasmiden in *E.coli* wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Die Überführung der *E.coli*-Stämme in eine transformationskompetente Form erfolgte nach Ausubel und Mitarbeitern (Ausubel, 1987). Dabei wurden die Zellen nach Animpfung mit einer Übernachtskultur in einem Verhältnis 1:100 bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0.5-0.6 bei 578 nm kultiviert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Zellen abzentrifugiert (15 min; 4000 x g; 4 °C), 3 x mit einer eiskalten und sterilen 10 % (w/v) Glycerinlösung gewaschen und anschließend in 1/1000 Volumen 10 % (w/v) Glycerin aufgenommen und in 40 µl Aliquots bei -80 °C zu weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Elektroporation wurde mit 50-100 ng Plasmid-DNA unter Verwendung eines Gene-Pulser II Elektroporationsgerätes (Gene Pulser System, Bio Rad, Hercules, U.S.A.) bei 2,5 kV; 25 µF und 200 Ω durchgeführt. Nach sofortiger Zugabe von 1 ml SOC-Medium zu den Zellen und einer einstündigen Inkubation bei 37 °C, wurden die Zellen zur Selektion auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### II.8.5. Plasmid Screening

Die Methode wurde zur schnellen Suche nach Klonen, welche Plasmide mit dem gewünschten Insert enthalten, angewendet. Hierzu wurden die Übernachtskulturen mit Phenol-Chloroform lysiert. Dabei fallen die Zellproteine aus, während die DNA und RNA in Lösung bleiben. Zu 100 µl einer Übernachtskultur wurden 50 µl Phenol-Chloroform (1:1 (w/v)) und 10 µl 10 mM Tris-HCl, 60 % (v/v) Glycerin und 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8,0 zugegeben, kräftig gemischt und anschließend 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Von der oberen wässrigen Phase wurden 20 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

### II.8.6. Isolierung der DNA- Fragmente aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA auf einem 1,5 % Agarosegel und Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

### II.8.7. DNA Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen können einen DNA-Strang unter Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen spalten (McClarín et al., 1986). Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 10-20 µl durchgeführt. Ein 20 µl Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen.

**Tabelle 2: Komponenten der Restriktionsspaltung zur Restriktionsanalyse**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Masse</b>
DNA-Lösung	5 µl alternativ 0.1-1 µg
10xPuffer	2 µl
(BSA-Lösung 10 mg/ml)	0.2 µl
Restriktionsenzym	1 µl = 5 - 20 Einheiten
deionisiertes Wasser	20 µl

Inkubiert wurde mindestens 3-4 h bei 37 °C. Bei präparativer Durchführung wurde der Ansatz verdoppelt oder verdreifacht und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### II.8.8. Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung von 5' DNA-Enden ist notwendig, um bei Klonierungen in einem linearisierten Vektor mit kompatiblen Enden eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Diese Reaktion wird von der Alkalischen Phosphatase katalysiert. Ein typischer Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen.

**Tabelle 3: Komponenten des Dephosphorylierungsansatzes**

Komponente	Volumen
DNA	15 - 20 $\mu$ l
Puffer (10x)	3 $\mu$ l
Alkalische Phosphatase	1 $\mu$ l (5 units)
deionisiertes Wasser	30 $\mu$ l

Die Reaktionsmischung wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

### II.8.9. Ligierung

Zur Einklonierung von Genfragmenten in einen geöffneten Vektor müssen die Enden der DNA Doppelstränge wieder kovalent über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft werden. Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert diese endergonische Reaktion mittels ATP-Hydrolyse.

Ein Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen.

**Tabelle 4: Komponenten des Ligationsansatzes**

Komponente	Volumen
5x Ligasepuffer (mit ATP)	4 $\mu$ l
Vektorfragment	x $\mu$ l
Insertfragment	y $\mu$ l
T4-Ligase	1 $\mu$ l (1 Unit)
deionisiertes Wasser	20 $\mu$ l

Für die Masse des einzusetzenden Inserts DNA wurde folgende Berechnungsformel verwendet

$$ng_{Insert} = \frac{4 \times Bp_{Insert} \times ng_{Vektor}}{Bp_{Vektor}} .$$

[Gl. II.8.9.1]

$ng_{Insert}$ : Masse der einzusetzenden Insert DNA

$Bp_{Insert}$ : Grösse des DNA Inserts in Basenpaaren

$ng_{Vektor}$ : Masse der eingesetzten Vektor DNA

$Bp_{Vektor}$ : Grösse der Vektor DNA in Basenpaaren

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

### II.8.10. Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA wurden 0,8-1,5 %-ige Agarosegele verwendet. Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V. Die DNA wurde nach Inkubation in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) nachgewiesen.

## **II.9. Proteintechnologische Methoden**

### **II.9.1. Kultivierung von *Escherichia coli***

Die Transformation der entsprechenden bakteriellen Expressionstämme erfolgte mittels Elektroporation. Zur Proteinexpression wurde der *E.coli* Stamm BL21 (DE3) bzw. BL21 (DE3) Codon Plus RIL verwendet. Die Stammhaltung von Expressionskulturen erfolgte in Form von Glycerinkulturen. Dafür wurden die bakteriellen Zellen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und auf einer Agarplatte mit dem zugehörigen Antibiotikum ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden einzelne Kolonien gepickt und in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht kultiviert. Diese Übernachtskulturen wurden 1:1 mit 25 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Kulturen erfolgte bei -80°C.

### **II.9.2. Rekombinante Proteinexpression**

#### **II.9.2.1. Expressionstests**

Expressionstests wurden im 50 ml Maßstab durchgeführt. Dafür wurde das LB-Medium mit 500 µl einer Übernachtskultur und dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Kultiviert wurde bei 37°C unter ständiger Schüttelbewegung. Die Proteinexpression wurde bei einer optischen Dichte zwischen 0.6 und 0.8 durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Anhand der Expressionstests wurden die für die Proteinexpression optimalen Parameter, wie beispielsweise Wachstumstemperatur und Induktionsdauer ermittelt.

#### **II.9.2.2. Bestimmung der segregativen Plasmidstabilität**

Zur Bestimmung der segregativen Plasmidstabilität wurde die zu untersuchende Kultur in einer 1:10 Verdünnungsreihe soweit mit Medium vermischt, dass bei einer anschließenden Ausplattierung auf Nähragarplatten mit einer Kolonienzahl zwischen 10 und 100 zu rechnen war. Anschließend wurden drei Verdünnungsstufen in einem Bereich zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-7}$  sowohl auf selektionsdruckfreien als auch selektiven Platten (Antibiotika) ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von ca. 10-16 Stunden bei einer Temperatur von 37°C wurden die Platten ausgezählt und miteinander verglichen. Die durchschnittliche Anzahl der Kolonien auf den antibiotikahaltigen Platten dividiert durch die Anzahl der Kolonien auf den selektionsfreien Platten selbiger Verdünnung multipliziert mit einhundert ergibt eine

prozentuale Plasmidstabilität. Zur Verringerung der Fehlerbreite wurde jeder Plattierungsversuch dreimal wiederholt.

### **II.9.2.3. Bakterielle Fermentation**

Als Bioreaktor für die Kultivierung diente ein Biostat ED Reaktor der Firma B. Braun Melsungen mit digitalem Meß- und Regelsystem (DCU) sowie dem Prozeßleitsystem MCFSwin. Als grundlegendes Kultivierungsverfahren kam das *Fed-Batch* Verfahren auf Basis eines Hefeextrakt-Vollmediums zur Anwendung (Zusammensetzung Abschnitt 2.7). Hiefür wurden zunächst 5 Liter Medium für 30 min bei einer Temperatur von 121 °C im Reaktor autoklaviert. Nach Abkühlung auf 37 °C schließt sich die Zugabe der separat autoklavierten Lösungen von Glucose, Magnesiumsulfat und Kaliumdihydrogenphosphat an. Der pH Wert wird gegebenenfalls auf pH 7.20 mittels Zugabe einer 10 %-igen Kaliumhydroxidlösung korrigiert. Durch Zuschalten der automatischen Kaskadenregelung für die Sauerstoffzufuhr wird eine konstante und gleichmäßige Belüftung gewährleistet. Der minimale Sauerstoffpartialdruck wird auf einen Wert von 40% eingestellt. Die Kaskadenregelung benötigt einige Stunden für ein stabiles Regelverhalten. Dies ist vor Beginn der eigentlichen Fermentation zu beachten, so dass diese erst einige Stunden später gestartet werden kann. Der Fermentationsprozess startet mit der Inokulation von ca. 300 ml einer Übernachtskultur. Fermentiert wird bis zur Induktion bei einer Medientemperatur von 37°C und einem Sauerstoffpartialdruck von mindestens 40%. Alle wichtigen Parameter unterliegen der automatischen Steuerung, so dass Eingriffe in den Prozess nicht erforderlich sind. Der Einsatz von Antischaummitteln sollte sparsam und nur bei Notwendigkeit erfolgen. Der pH-Wert wird automatisch durch die Zugabe einer 10 %-igen Phosphorsäure bzw. einer 10 %-igen Kaliumhydroxidlösung auf 7,00 reguliert. Nach vollständigem Verbrauch der zugesetzten Glukose (gemessen mit Glukosenachweisstäbchen) erfolgt die kontinuierliche und automatische Zugabe von 120-240 g Feedinglösung pro Stunde. Das Erreichen einer optischen Dichte  $OD_{600\text{ nm}}$  von 50-70 kennzeichnet den Induktionsbeginn der Proteinexpression. Die Temperatur des Mediums wird hierzu auf 35°C abgekühlt, und die Induktion mit 1 mM IPTG initiiert. Die Proteinexpression erfolgt nach Induktion für ca. 3 bis 4 Stunden. Durch Zentrifugation mit 1500 x g, 4 °C für 15 min wird die bakterielle Zellmasse pelletiert und kann anschließend bei -20 °C langfristig gelagert werden.

### II.9.3. Proteingewinnung

#### II.9.3.1. Isolierung der *Inclusion bodies*

Das in *Escherichia coli* rekombinant hergestellte PTH Rezeptorprotein lagert sich vorwiegend cytoplasmatisch in unlöslichen Proteineinschlusskörperchen ab, den sogenannten *inclusion bodies*. Zur Isolierung dieser *inclusion bodies* wird das bakterielle Zellpellet in Resuspensionspuffer (5g/20ml) aufgenommen und mittels eines Ultraturrax (8000-9000 rpm) vollständig homogenisiert. Der Zusatz des Enzyms Lysozym (1.5mg/g Zellmaterial) bewirkt ein Aufbrechen der bakteriellen Zellwand, wobei der Einsatz der Hochdruckdispersion diesen Prozess noch vervollständigt. Die Hochdruckdispersion wird bei einem minimalen Druck von 600 bar mittels einer Lab 40/60 Hochdruckdispersionseinheit (APV Gaulin) in drei Passagen durchgeführt. Das so aufgeschlossene Zellmaterial wird anschließend mit Benzonase (2-5U/g Zellmaterial) versetzt, und für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Isolation der *Inclusion bodies* erfolgt über einen Zentrifugationsschritt bei 48.000 x g und 4 °C für 30 min. Das so gewonnene IB Pellet wird zur weiteren Reinigung insgesamt 4 Waschschritten unterzogen. Im ersten Schritt wird das Pellet mit Waschpuffer 1 versetzt, mittels Ultraturrax vollständig homogenisiert, und für 20 min bei 20.000 rpm 4 °C erneut zentrifugiert. Die nachfolgenden Waschschrritte folgen diesem Schema wobei hier jeweils die Waschpuffer 2 und 3 eingesetzt werden. Das so isolierte und vorgereinigte IB Material kann nun bei -20 °C stabil über mehrere Wochen gelagert werden.

#### **Puffer und Lösungen:**

Resuspensionspuffer:	100 mM Tris/HCl 2-5 mM n-Dodecyl-β-D-maltosid 20 mM EDTA pH 7.2
Waschpuffer 1	100 mM Tris/HCL 800 mM NaCl 1 mM EDTA pH 7.2
Waschpuffer 2	100 mM Tris/HCl 2-5 mM n-Dodecyl-β-D-maltosid 1mM EDTA pH 7.2
Waschpuffer 3	100 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 7.2

### II.9.3.2. Solubilisierung der *Inclusion bodies*

Nach erfolgreicher Isolation der Inclusion bodies aus *Escherichia coli* müssen diese zur vollständigen und stabilen Solubilisierung mit IB-Solubilisierungspuffer im Verhältnis 1:10 versetzt werden (10g IB Material mit 100 ml IB Solubilisierungspuffer). Der Prozess der Solubilisierung läuft über einen Zeitraum von 12-16 Stunden bei Raumtemperatur ab. Anschließend wird das Proteinsolubilisiert mittels Zentrifugation (48.000xg, 30 min, 15 °C) von unlöslichen Bestandteilen getrennt. Das Solubilisiert weist ein klares und bernsteinfarbenes Aussehen auf. Zur Lagerung muss das Solubilisiert gegen IMAC Dialysepuffer dialysiert werden (Abschnitt II.9.4.2). Dieses Proteinisolat lässt sich so bei einer Temperatur von -20°C mehrere Wochen stabil lagern. Wird das Inclusion body Solubilisiert für die nachfolgende Hydrophobe Interaktionschromatographie benutzt, benötigt man keine weitere Nachbehandlung und das Solubilisiert kann direkt gebunden werden.

#### **Puffer und Lösungen:**

IB- Solubilisierungspuffer:            100 mM Tris/HCl  
    20 mM SDS  
    50 mM DTT  
    1 mM EDTA  
    pH 8.2

### II.9.4. Chromatographische Vorreinigung und Konzentrierung

#### II.9.4.1. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Als Trägermaterial für die hydrophobe Interaktionschromatographie wird Phenyl Sepharose (GE Healthcare) verwendet. Durch tropfenweise Zugabe von 20 % 2-Propanol zur Proteinlösung (starkes rühren, Emulsionsbildung) und nachfolgendes Überleiten des Gemisches über das Trägermaterial wird der PTH Rezeptor gebunden. Anschließend wird der Träger mit HIC Waschpuffer 1 solange gewaschen, bis eine klare wässrige Lösung fließt. Anschließend kann mit HIC Waschpuffer 2 über ca. 3-5 Säulenvolumina gewaschen werden. Nachfolgend muss gründlich mit HIC Waschpuffer 3 (mind. 10 Säulenvolumina) gewaschen werden, um alle Reste des HIC Waschpuffers 2 zu entfernen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt mit HIC Elutionspuffer.

Für die Bindung von ca. 5 mg PTH Rezeptorprotein benötigt man ca 10 ml Phenyl Sepharose Trägermaterial.

**Puffer und Lösungen:**

HIC Bindungspuffer:	IB Proteinsolubilisat mit 20 % 2-Propanol
HIC Waschpuffer 1:	100 mM Tris/HCl 5 % 2-Propanol pH 7.2
HIC Waschpuffer 2	100 mM Tris/HCl 6 M Guanidinhydrochlorid pH 7.2
HIC Waschpuffer 3	100 mM Tris/HCl pH 7.2
HIC Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl 20 mM SDS pH 8.0

**II.9.4.2. Immobilisierte Metallchelatchromatographie (IMAC)**

Aufgrund des gentechnisch fusionierten N-terminalen Histidin Tags ist es möglich, den Rezeptor über eine Komplexbindung an eine mit Nickelionen beladene immobilisierte Nitrilotriessigsäurematrix (Ni-NTA) zu binden.

Diese Trägermatrix wird vor der eigentlichen Proteinbindung mit fünf Säulenvolumen Äquilibrationpuffer gewaschen, und auf einen pH Wert von 8.0 eingestellt. Das Protein eluat der vorangegangenen Hydrophoben Interaktionschromatographie wird tropfenweise (rühren, Emulsionsbildung) mit 2-5 % n-Hexan vermischt und an den Träger im Durchfluss gebunden. Anschließend wird mit IMAC Waschpuffer 1 (10 Säulenvolumina) gründlich gewaschen und nachfolgend mit IMAC Waschpuffer 2 (10 Säulenvolumina). Eluiert wird der gebundene PTH Rezeptor mit IMAC Elutionspuffer. Die Errechnung des benötigten Trägermaterials ergibt sich aus der gemessenen Proteinkonzentration, wobei hier eine Bindekapazität von 3-5 mg Rezeptor pro 1 mg Trägermaterial zugrunde liegt. Der pH Wert des Proteineluates wird anschließend durch tropfenweise Zugabe einer 5 M Natriumhydroxidlösung auf pH 8.0 angehoben, und mit 50 mM DTT versetzt. Nachfolgend wird das Eluat für mehrere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die nachfolgende Dialyse des Eluates gegen IMAC-Dialysepuffer dient der Entfernung des Reduktionsmittels DTT vor der Renaturierung. Der IMAC-Dialysepuffer wird hierbei drei mal im Abstand von 12-16 Stunden gewechselt.

**Puffer und Lösungen:**

IMAC Bindungspuffer:	HIC Proteineluat mit 2-5 % n-Hexan
IMAC Waschpuffer 1	100 mM Tris/HCL 15 mM SDS pH 8.0
IMAC Waschpuffer 2	50 mM Natriumphosphat 5 mM SDS pH 6.5-7.0
IMAC Elutionspuffer	100 mM Tris/Acetat 15 mM SDS pH 4.5
IMAC Dialysepuffer	100 mM Tris/Acetat 15 mM SDS pH 4.5

**II.9.5. PTHR Renaturierung**

Vor Beginn des eigentlichen Renaturierungsprozesses muss das Proteingemisch auf Reste des Reduktionsmittels DTT geprüft werden. Dies kann durch eine Probennahme mit Zugabe einer Nickelsulfatlösung geprüft werden. Färbt sich diese Lösung braun muss das noch vorhandene DTT durch nochmalige Dialyse gegen IMAC Dialysepuffer vollständig entfernt werden. Erst wenn das Reduktionsmittel vollständig entfernt ist, kann der eigentliche Renaturierungsprozess beginnen.

Der gelöste PTH Rezeptor wird mit eiskaltem Renaturierungspuffer auf eine SDS Endkonzentration von 2-5 mM SDS verdünnt. Die Proteinkonzentration darf 200µg/ml nicht überschreiten, ansonsten muss weiter verdünnt werden. Anschließend muss der pH Wert gegebenenfalls durch Zugabe einiger Tropfen einer 1 M Natriumhydroxidlösung auf pH 8.0 korrigiert werden. Anschließend wird das Redoxshufflingsystem bestehend aus 5 mM GSH und 1 mM GSSG zugegeben und gut verrührt. Hieran schließt sich die tropfenweise Zugabe der Methyl-β-cyclodextrinlösung an. Die Konzentration dieser Lösung wird durch die aktuelle SDS Konzentration bestimmt. Sie ist immer doppelt so hoch wie die noch vorhandene molare SDS Konzentration, und beträgt im geschilderten Fall 4-10 mM. Die benötigte Menge an pulverförmigen Methyl-β-cyclodextrin wird in einem angemessenen Volumen eiskalten Renaturierungspuffer gelöst. Zum Schluss wird das auf -20°C abgekühlte wässrige Detergenzgemisch bestehend aus Cyclohexyl-n-hexyl-β-D-maltosid und N-Dodecyl-β-D-maltosid zugegeben, und der gesamte Renaturierungsansatz für mehrere Stunden (8-16 h) auf -20°C abgekühlt. Die Konzentration des Detergenzgemisches richtet sich nach der molaren Konzentration an Methyl-β-cyclodextrin und liegt aufsummiert im selben

Konzentrationsbereich (4-10 mM). Die pulverförmigen Substanzen werden wiederum in einer angemessenen Menge eiskalten Renaturierungspuffers gelöst und nach vollständiger Auflösung auf -20°C abgekühlt.

Der tiefgefrorene Ansatz wird im Anschluss bei einer Temperatur von 4°C langsam aufgetaut. Ist dieser Auftauprozess vollständig abgeschlossen erfolgt die Zugabe von Kalziumchlorid. Die zugesetzte Kalziumchloridkonzentration wird wiederum durch die ursprünglich vorhandene SDS Konzentration bestimmt, und ist doppelt so hoch. Auch die Zugabe des Redoxshufflingsystems in den ursprünglichen Konzentrationen wird wiederholt. Der Ansatz wird dann mindestens für weitere 24 Stunden bei 4°C gelagert.

Die Abtrennung der eingesetzten Renaturierungsadditive erfolgt durch Verwendung einer Gelfiltrationssäule Superdex S 200. Die Säule wird vor Beginn der Abtrennung hierzu mit dem fünffachen Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer S 200 äquilibriert. Das aufgetragene Probenvolumen richtet sich nach dem Volumen der Säule, und beträgt maximal 10% des Gesamtvolumens. Hierdurch erreicht man eine vollständige Abtrennung aller Additive vom renaturierten Protein.

#### **Puffer und Lösungen:**

Renaturierungspuffer:	100 mM Tris/HCl 1 mM GSSG (nachfolgend) 5 mM GSH (nachfolgend) 1 mM EDTA pH 8.2
Gelfiltrationspuffer S 200	100 mM Tris/HCl 2 mM Cyclohexyl-n-hexyl-β-D-maltosid 2 mM n-Dodecyl-β-D-maltosid 1 mM EDTA pH 7.2

## II.10. Proteinchemische und analytische Methoden

### II.10.1. Analytische *Reversed Phase* Chromatographie (RP-HPLC)

Zur Analyse der Reinheit und zur Präparation von Proteinen für massenspektrometrische Untersuchungen wurde *Reversed Phase* Chromatographie an einer Nucleosil 500-5 C3 PPN Säule (Macherey-Nagel) durchgeführt. Als mobile Phase diente ein Propanol-Hexan-Acetonitril-Gemisch (75%-2%-23%), das mit 0.05 %-iger Trifluoressigsäure (TFA) versetzt wurde. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm bzw. 250 nm. Die *Reversed Phase* Chromatographie wurde an einem Gynkotek HPLC-System (Dionex) durchgeführt.

Der verwendete Gradient weist einen linearen Verlauf über eine Zeit von 120 min auf.

#### **Puffer und Lösungen:**

Laufmittelsystem A	Wasser mit 0.05% TFA
Laufmittelsystem B	75% Acetonitril 23% 2-Propanol 2% n-Hexan 0.05% TFA

### II.10.2. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch SDS-PAGE wird eine Auftrennung von Proteinen in denaturierter Form nach ihrem Molekulargewicht erreicht. Die Proteine bilden mit dem in der Lösung und im Probenpuffer vorhandenen SDS Komplexe, erhalten somit eine negative Nettoladung und können dann entsprechend ihrer Größe getrennt werden.

Entsprechend des Molekulargewichts der zu analysierenden Proteine wurden 12- oder 15%-ige Trenngele verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 35 mA für 50-60 min durchgeführt.

Die SDS-PAGE wurde in Abhängigkeit von der Fragestellung mit reduzierendem Probenpuffer mit 50 mM DTT oder oxidierenden Bedingungen durchgeführt. Letztere erlaubten die Analyse von disulfidverbrückten Komplexen. Für die Probenvorbereitung, zur Analyse von disulfidverbrückten Komplexen, wurde zunächst ein 100-facher molarer Überschuss (bezogen auf die SH-Gruppen im Protein) Jodacetamid (gelöst in 1 M Tris, pH 8.5) zugegeben. Die dadurch stattfindende irreversible Carbamoylmethylierung der Thiolgruppen verhindert weitere Reaktionen mit freien Thiolen während der Probenbereitung. Allerdings wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass die Modifizierung mit Jodacetamid teilweise zur Artefaktbildung führt, so dass in solchen Fällen auf den Einsatz von Jodacetamid verzichtet wurde und die Proben nach Zugabe von oxidierendem Probenpuffer,

jedoch ohne vorheriges Erhitzen, analysiert wurden. Die Visualisierung der Proben erfolgte entweder durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blau G-250 (PAGE-Färbelösung) oder für eine empfindlichere Detektion durch Silbernitratfärbung (Nesterenko et al., 1994). Als Molekularmassenstandard diente ein LMW-Proteinstandard (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

### **II.10.3. Protein Transfer auf Membranen (Blot) und deren Detektion**

Im Anschluss an eine gelektrophoretische Trennung von Proteinen können diese auf eine Membran transferiert werden. Der Transfer erfolgte in einer Semidry-Blotting Apparatur (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach der Methode von Kyhse-Andersen (Kyhse-Andersen, 1984) für mindestens 1 Stunde, bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 40 mA. Für eine nachfolgende immunologische Detektion von Proteinen wurden diese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, für die N-terminale Sequenzierung hingegen auf eine PVDF-Membran.

#### **Protein Blot für immunologische Detektionen (Western Blot)**

Als Puffer für den Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran diente 1×SDS-Laufpuffer (Abschnitt II.6). Die Membran und das SDS-Gel wurden zwischen einige Lagen an Whatman-Papier, das mit SDS-Laufpuffer getränkt wurde, gelegt und der Transfer gestartet. Zur Blockierung der unspezifischen Wechselwirkung zwischen Antikörper und Membran wurde die Membran nach dem Blot in 5%-iger (w/v) Magermilchlösung (in TBT-Puffer) für 20 Minuten inkubiert. Dann erfolgten die Zugabe des ersten Antikörpers direkt zur Magermilchlösung und eine weitere Inkubation für 6 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Dann wurde die Membran 3-mal mit TBT-Puffer gewaschen und das entsprechende Antikörper-Peroxidase-Konjugat zugegeben (1:2000 verdünnt in 5%-iger Magermilchlösung). Mit der durch Zugabe der beiden ECL-Detektionslösungen (2.6) ausgelösten Chemilumineszenz wurde ein Retina XBD Röntgenfilm für eine Dauer von 10 s bis 15 min belichtet.

#### **Protein Blot für die N-terminale Sequenzierung**

Die PVDF-Membran wurde zunächst für 5 Minuten mit reinem Methanol benetzt. Der Transfer der Proteine fand unter denselben technischen Bedingungen statt wie für den Immunblot. Als Transfer-Puffer diente: 50 mM Natrium-Borat, pH 9.0, 20% (v/v) Methanol. Die Membran wurde nach dem Blot für 1 Minute mit 10 % (v/v) Essigsäure, 0.006 % (m/v)

Coomassie G250 gefärbt und dann anschließend durch 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol für eine Dauer von 5 bis 10 Minuten wieder entfärbt.

#### II.10.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von gereinigten Proteinen erfolgte mittels UV-VIS Absorptionsspektroskopie an einem DU-7400 Diodenarray Spektrophotometer (Beckman Hercules, USA). Bei bekannter Aminosäure-Sequenz kann der molare Absorptionskoeffizient näherungsweise wie folgt berechnet werden (Pace et al., 1995):

$$\epsilon_{280} [M^{-1} * cm^{-1}] = 5500 \times n_{Tryptophan} + 1490 \times n_{Tyrosin} + 125 \times n_{Disulfidbrücken} \quad [\text{Gl. II.10.4.1}]$$

Mit Hilfe der Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm kann somit die Konzentration des Proteins gemäß des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt werden.

$$A = \epsilon \times c \times d \quad [\text{Gl. II.10.4.2}]$$

A gemessene Absorption

$\epsilon$  molarer Absorptionskoeffizient ( $M^{-1} cm^{-1}$ )

c molare Konzentration der Probe (mol/l)

d Schichtdicke der Küvette (cm).

**Tabelle 5: wichtige Extinktionskoeffizienten**

Protein bzw. Peptid	$\epsilon_{280} [M^{-1} \times cm^{-1}]$
PTH-Rezeptor	118070
N-PTH-Rezeptor	37770
PTH Ligand (1-34)	5690

Die Konzentrationsbestimmung von solubilisierten *inclusion bodies* oder ungereinigten Proteinlösungen erfolgte entweder nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) oder durch die Ermittlung der Konzentration nach Warburg und Christian. Dafür wurde der BioRad®-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 0.05 bis 2 mg/ml verwendet. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Warburg und Christian wurde nachfolgende Gleichung eingesetzt.

$$\text{Protein}(\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}) = 1.55 \times A_{280} - 0.76 \times A_{260}$$

**[Gl. II.10.4.3]**

Alle Spektren wurden in 1 cm Quarzglas-Küvetten (Hellma, Müllheim) über einen Wellenlängenbereich von 240 nm bis 340 nm mit Puffer als Referenz aufgenommen.

### **II.10.5. Massenspektrometrie**

Die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen mittels Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn und Dr. Marc Kipping (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt. Hierfür wurden Spektren von durch RP-HPLC entsalzten Proben durch MALDI-TOF Massenspektrometrie an einem REFLEX Spektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen) oder durch ESI-Massenspektrometrie an einem Esquire-LC Ionenfallen-Massenspektrometer aufgenommen.

### **II.10.6. N-terminale Sequenzierung von Proteinen**

Die N-terminale Fusion des Histidin-tags an den PTH Rezeptor wurde durch Proteinsequenzierung verifiziert. Dafür wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (2.10.5.2), aus der die zu analysierende Proteinbande ausgeschnitten und das Protein eluiert wurde. Die ersten 5 bis 7 N-terminalen Aminosäuren wurden an einem Applied Biosystems 476A Gasphasen Sequenzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) bestimmt. Die Sequenzanalyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. K. P. Rücknagel (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

### **II.10.7. Bestimmung der SDS Konzentration**

Die Konzentration des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lässt sich in wässrigen Lösungen durch das Anfärben mit Metylenblau bestimmen. Zur Bestimmung der vorhandenen SDS Konzentration muss der gebundene Farbstoff in eine organische Phase überführt und anschließend spektroskopisch vermessen werden. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 651 nm ist hierbei ein Maß für die vorhandene SDS Konzentration. Eine Eichreihe mit bekannten SDS Konzentrationen ermöglicht so eine Quantifizierung.

300 µl der zu untersuchenden Probe werden mit 300 µl Färbelösung in 2 ml Eppendorftubes vermischt. Anschließend werden 1,2 ml Chloroform hinzupipettiert und der Ansatz gevortext. Die Ansätze werden bei Maximalgeschwindigkeit in einer Eppendorfschwingzentrifuge für 5 min bei

Raumtemperatur zentrifugiert, wobei eine Phasentrennung eintritt. Die obere wässrige Phase und die Interphase werden vorsichtig mit einer Pasteurpipette entfernt und die untere organische Phase in einem Eppendorftube mit 50-100 mg Natriumsulfat versetzt und geschüttelt. Anschließend kann die Absorbtion der „trockenen“ organischen Phase bei 651 nm bestimmt werden.

### **Puffer und Lösungen:**

Färbelösung:           250 mg Methylenblau  
                              50 mg Natriumsulfat  
                              10 ml konz. Schwefelsäure  
                              auf 1000 ml Wasser

## **II.11. Biophysikalische Methoden**

### **II.11.1.       Fluoreszenzspektroskopie**

Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluoromax-3 Spektrofluorimeter (SPEX Instruments S.A., Inc., Edison, NJ, U.S.A.) in 1 cm Quartzglasküvetten (Hellma, Müllheim) durchgeführt. Die Aufnahme von Emissionsspektren erfolgte nach Anregung der Fluorophore bei 295 nm (Tryptophan) und 275 nm (Tyrosin und Tryptophan) mit einer Zeitkonstante von 0,2 s (Bandbreite bei Anregung 1 nm; Bandbreite bei Emission 5 nm). Proteinkonzentrationen und Pufferbedingungen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Alle Spektren wurden um den Pufferbeitrag korrigiert.

### **II.11.2.       Ligandenbindungsanalysen       mittles       Fluoreszenzspektroskopie (Fluoreszenztitrationen)**

Die Analyse der Bindung des PTH Peptides an den Rezeptor erfolgte anhand der intrinsischen Fluoreszenz der an der Bindung beteiligten Tryptophane. Sowohl der Rezeptor, als auch der Ligand enthalten in ihren Bindungsregionen entsprechende Tryptophane. Dabei führt eine Bindung des PTH Liganden an den Rezeptor u.a. zu einer Änderung der Hydrophobizität in der unmittelbaren Umgebung dieser beteiligten Tryptophane. Dieser Umstand äußert sich in veränderten Fluoreszenzeigenschaften dieser Aminosäuren. Verfolgt man nun beispielsweise die Intensitätsänderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration, so lässt sich daraus die Bindungsstärke bestimmen, die in Form der Dissoziationskonstante  $K_D$  angegeben wird.

Zur Aufnahme der einzelnen Emissionsspektren im Wellenlängenbereich zwischen 300 und 400 nm wurde bei 295 nm angeregt. Die Zeitkonstante wurde auf 1 s erhöht und beide Bandbreiten auf 5 nm eingestellt. Die Messung startet durch Zugabe des PTH Liganden,

wobei hier vor Aufzeichnungsbeginn eine Inkubationszeit von 2 min vorausgeht. Folgende Konzentrationen fanden für die jeweiligen Messungen Verwendung.

- PTH Rezeptor 50 nM (3000 $\mu$ l)
- PTH Ligand 1 nM/3 $\mu$ l und 5 nmol/3 $\mu$ l

Zur Auswertung wurde das Emissionsmaximum bei 340 nm herangezogen. Die einzelnen Messwerte wurden um den Pufferwert korrigiert.

Die Datenanalyse der Titrationsexperimente erfolgte über nichtlineare Regression. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  wurde durch die Lösung einer quadratischen Gleichung, für die Rezeptor–Ligand Komplexkonzentration in einem bimolekularen Gleichgewicht errechnet. Als Vereinfachung wurde eine Bindung mit einer Stöchiometrie im Verhältnis von 1:1 angenommen.

Es gilt folgender Zusammenhang:



wobei das Gesetz zur Erhaltung der Masse gilt,

$$R_0 = [R + L] \quad \text{[Gl. II.11.2.1]}$$

$$L_0 = [L + RL] \quad \text{[Gl. II.11.2.2]}$$

und sich somit die Dissoziationskonstante unter Bildung des Komplexes (RL) errechnet aus.

$$K_D = \frac{(R_0 - RL) \times (L_0 - RL)}{RL} \quad \text{[Gl. II.11.2.3]}$$

Das Auflösen der Gleichung nach RL liefert folgende Lösung für den Komplex

$$RL = \frac{(R_0 + L_0 + K_D) - \sqrt{(R_0 + L_0 + K_D)^2 - R_0 \times L_0}}{2} \quad \text{[Gl. II.11.2.4]}$$

Die Abnahme des Signals im Gleichgewicht bei steigender Zugabe von freiem Liganden ist gleich dem Bindungsgrad  $[RL] / [R_0]$ , multipliziert mit der maximalen Änderung, die man bei Sättigung (Bindungsgrad 1;  $[RL] / [R_0] = 1$ ) erhält. Damit ergibt sich das Gesamtsignal aus der Summe des Signals ohne Ligand und der partiellen Signaländerung bei Ligandenzugabe. Für die beobachtete Fluoreszenzintensität ( $F_{\text{beo}}$ ) bedeutet dies, dass sie sich zusammensetzt aus einem intrinsischen Fluoreszenzanteil des freien Rezeptors ( $F_R$ ) in Abwesenheit des Liganden, einem zunehmenden Fluoreszenzanteil, der aus der Zunahme der Konzentration des gebildeten Rezeptor Liganden Komplexes ( $F_{RL}$ ) resultiert sowie der Fluoreszenz des freien Liganden.

$$F_{\text{beo}} = F_R + \Delta F_{\text{max}} \times \frac{RL}{R_0} \quad \Delta F_{\text{max}} = F_{\text{Theo}} - F_R \quad \text{[Gl. II.11.2.5]}$$

so dass sich bei Einsetzen der Gleichung [II.11.2.4] folgende Funktion für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_D$  ergibt.

$$F_{\text{beo}} = F_R - \Delta R_{\text{max}} \times \frac{\left( R_0 + L_0 + K_D - \sqrt{(R_0 + L_0 + K_D)^2} \right) - R_0 \times L_0}{2 R_0} \quad [\text{Gl. II.11.2.6}]$$

$F_{\text{beo}}$ : beobachtete Fluoreszenzintensität

$F_R$ : intrinsische Fluoreszenz des freien Rezeptors

$F_{\text{Theo}}$ : theoretische Fluoreszenzintensität bei vollständiger Ligandenbindung (Bindungsgrad 1)

$R_0$ : eingesetzte Rezeptorkonzentration

$L_0$ : eingesetzte Ligandenkonzentration

RL: Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplex

### **Puffer und Lösungen:**

Messpuffer 1:            100 mM Tris/HCl  
                               2 mM Cyclohexyl-n-hexyl- $\beta$ -D-maltosid  
                               2 mM n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid  
                               pH 7.2

### **II.11.3. Circular dichroismus**

Zur ersten Analyse der sekundären Proteinstrukturen und der näheren Umgebung der Tryptophane wurden sowohl Fern-UV-CD Spektren im Wellenlängenbereich von 185 nm bis 250 nm und Nah-UV-CD Spektren im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 400 nm am JASCO J 810 aufgenommen. Die Aufnahme der Fern-UV-CD Spektren erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 15  $\mu$ M (1mg/ml) in einer 1mm Quartz Küvette (Probenvolumen 300  $\mu$ l) bei 25°C. Akkumuliert wurden hier 20 Spektren mit einer Integrationszeit von 2s pro Nanometer. Für die Aufnahme der Nah- UV CD Spektren vergrößert sich nur der Schichtdicke auf 1 cm.

Die gemessenen Elliptizitäten  $\Theta$  konnten nach Pufferkorrektur in die mittleren molaren Elliptizitäten pro Aminosäurerest  $\Theta_{\text{MRW}}$  (in Grad  $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{dmol}^{-1}$ ) nach folgender Gleichung umgerechnet werden.

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \times 100 \times M}{d \times c \times n_{AS}}$$

[Gl. II.11.3.1]

$\Theta_{MRW}$ : Elliptizität pro Aminosäurerest

$\Theta$ : gemessene Elliptizität

M: Molekulargewicht in g/mol

D: Küvettendurchmesser

c: Proteinkonzentration in g/l

$n_{AS}$ : Anzahl der Aminosäuren

### **Puffer und Lösungen:**

Messpuffer 2: 50 mM Natriumphosphat  
2 mM Cyclohexyl-n-hexyl- $\beta$ -D-maltosid  
2 mM n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid

## III. Ergebnisse

### III.1. Herstellung des humanen Parathormonrezeptors (PTH1R)

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der humane Parathormonrezeptor rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt, renaturiert und biophysikalisch charakterisiert. Abschnitt III.1 beinhaltet hauptsächlich die Ergebnisse der rekombinanten Proteinproduktion sowie eine Darstellung der angewendeten Reinigungsverfahren. Die Problematik der funktionellen Renaturierung wird ausführlich in Abschnitt III.2 behandelt, während sich Abschnitt III.3 mit der biochemischen Charakterisierung und ersten biophysikalischen Messungen auseinandersetzt.

#### III.1.1. Klonierungsstrategien

Grundlegend für die rekombinante Expression des Parathormonrezeptors im prokaryontischen Organismus *E. coli* waren die umfangreichen Arbeiten von Grauschopf und Bazarsuren zur Überexpression humaner Rezeptordomänen (Bazarsuren et al., 2002; Grauschopf et al., 2000). Diese Arbeiten dokumentieren eindrucksvoll die Möglichkeit der bakteriellen Überexpression der hormonbindenden N-terminalen Domänen des humanen Parathormon- und des *Glucagon-like-peptide* Rezeptors.

Allerdings wurden in beiden Fällen die Hormonbindungsdomänen nicht löslich, sondern als *Inclusion bodies* exprimiert. Für beide Domänen lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits umfangreiche Daten zur Renaturierung vor, so dass eine Expression des vollständigen humanen Parathormonrezeptors sowohl in löslicher als auch unlöslicher Form angestrebt wurde, wobei die funktionelle Expression in der Regel eine Fusion an Proteine des periplasmatischen Raumes wie zum Beispiel an das *Maltose-binding* Protein erfordert. Alle für die Klonierung eingesetzten Vektoren stellen das Zielprotein unter die Kontrolle eines T 7 Promotors, um so ein starkes Expressionsniveau zu erreichen. Zur Klonierung wurde die codierende Sequenz des humanen Parathormonrezeptors von Tyr 23 bis Met 571 mittels PCR amplifiziert und in die verschiedenen Vektoren kloniert. Hierbei lieferte das Standard PCR Verfahren nur schlechte Ausbeuten an verwendbarer cDNA, so dass eine Optimierung einzelner Reaktionsschritte nötig war. Das *Touch down* Verfahren, bei dem die Annealingtemperatur in den ersten neun Zyklen konstant um 0.5°C abgesenkt wird und gleichzeitig die Zeit für die Kettenelongation konstant um 0.03 s erhöht wird, steigerte die Ausbeute an verwendbarer cDNA erheblich. Auch die Zugabe der *Pfu*-Polymerase nach erfolgter Denaturierung des DNA-Stranges (*Hot start*) wirkte sich positiv auf den Erfolg der

Reaktion aus. Die Richtigkeit der so amplifizierten und klonierten Gensequenz wurde jeweils durch DNA Sequenzanalyse überprüft.

Eine Übersicht der verwendeten Klonierungsvektoren und der damit verfolgten Expressionsstrategie liefert nachfolgende Tabelle.

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Klonierungssysteme**

<b>Bezeichnung des Klonierungsvektors</b>	<b>Fusionskonstrukt</b>	<b>Expressionsstrategie</b>
pET 11a	Keine Fusion	Expression als Inclusion bodies
pET 15b	Fusion mit N-terminalem Histidin Tag	Expression als Inclusion bodies
pET 34b	Fusion mit der Zellulosebindedomäne	lösliche Expression
pGEX TK2	Fusion mit GST	lösliche Expression
pET 11a 5AS $\alpha$ -Gluc.	Fusion mit den ersten 5 AS der $\alpha$ -Glucosidase	lösliche Expression

Die Verwendung von Tyr 23 als N-terminale Aminosäure ergab sich aus der Charakterisierung der Prozessierung des murenen Rezeptorproteins im eukaryontischen Expressionssystem (Grauschopf et al., 2000).

Die erzeugten Fusionskonstrukte enthalten zwischen der Fusionsdomäne und dem PTH Rezeptor eine Schnittstelle für die Protease Thrombin. Somit besteht bei Bedarf die Möglichkeit einer Abspaltung des Fusionsanteils nach erfolgter Proteinexpression. Diese Notwendigkeit zur Abspaltung ergibt sich insbesondere bei allen biophysikalischen Messungen, und natürlich bei Experimenten zur Strukturaufklärung.

Alle klonierten Rezeptorvarianten wurden hinsichtlich ihrer Expressionsausbeute getestet, wobei keine der Varianten eine eindeutige und reproduzierbare Expression in *Escherichia coli* aufwies. Anhand dieser Ergebnisse fiel daher die Wahl für die Optimierung der Expressionsbedingungen auf die beiden Konstrukte ohne Fusionsprotein, da deren Vorteile im Verzicht auf spätere proteolytische Spaltungen des Fusionspartners lagen.

### **III.1.2. Rekombinante Proteinexpression**

Mit den gegenwärtig verfügbaren rekombinanten Expressionssystemen sind bisher einige Schwierigkeiten bei der Gewinnung ausreichender Rezeptorproteinmengen verbunden. Die Gründe hierfür sind äußerst komplex und beruhen auf dem Zusammenspiel einer Vielzahl von miteinander verketteten Faktoren. Eine solche Verkettung findet man in Form der Beeinflussung von zellulären und genetischen Faktoren durch die Umweltbedingungen die

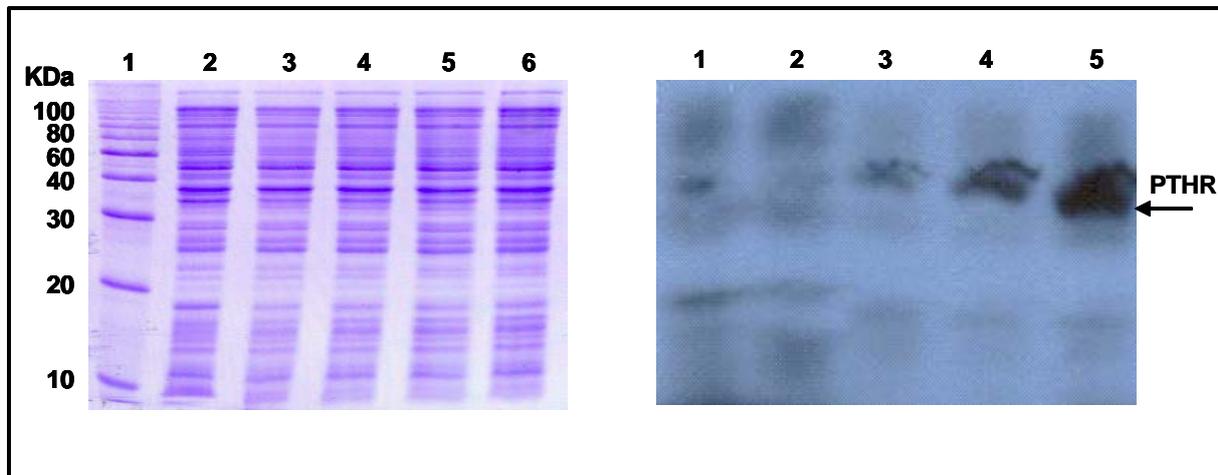
auf eine Bakterienkultur wirken. So hat zum Beispiel die Kopienzahl einen Einfluss auf das Wachstum und die Kultivierung plasmidhaltiger Zellen und umgekehrt beeinflussen die Wachstumsbedingungen die Plasmidkopienzahl. Oft folgt dieser Prozess einer einfachen Regel, wonach eine hohe Plasmidanzahl zu einer hohen Proteinexpression führt (French, 1996). Es gibt jedoch auch eindeutige Limitierungen, wo eine weitere Erhöhung der Kopienzahl nicht in einer Steigerung der Expression resultiert (Nacken et al., 1996). Ursache solcher Limitierungen sind zum Beispiel erschöpfte Transkriptions- bzw. Translationskapazitäten der Zelle (Kim, 1991).

Die Suche nach den idealen Bedingungen kann unter Umständen sehr zeitaufwendig und kostenintensiv werden, stellt aber bisher die einzige Möglichkeit dar für entsprechende Charakterisierungen ausreichende Proteinmengen zu erhalten. So ist dies für eine umfassende biophysikalische Beschreibung und die strukturelle Aufklärung von Proteinen von fundamentaler Bedeutung.

#### **III.1.2.1. Experimente zur Optimierung der Ausbeute an rekombinanten Rezeptorproteins**

Über die rekombinante Expression von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in *Escherichia coli* gibt es bisher noch relativ wenige aussagekräftige Daten. Verwendung finden hierbei sehr oft Fusionskonstrukte, die den Rezeptor entweder in das Periplasma exportieren oder an ein in *Escherichia coli* gut exprimierbares Protein koppeln. Die in dieser Arbeit verfolgte Strategie der Rezeptorexpression in Form von *Inclusion bodies* wird bisher recht selten angewendet, da dies die nachfolgende Etablierung eines Renaturierungsprozesses voraussetzt, der sich an den jeweiligen Eigenschaften des Proteins orientiert. Für die rekombinante Proteinexpression wurde das pET 15b Vektorsystem anfangs in den *Escherichia coli* Stamm BL 21 (DE3) transformiert. Aufgrund der ungünstigen *Codon Usage* erfolgte später eine weitere Transformation des Expressionsvektors in den Stamm *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus (RIL), der zusätzliche Codons für eukaryontische t-RNAs besitzt, und so die ungünstige *Codon Usage* verbessert. Die Expression des PTH Rezeptors startete zunächst in Schüttelkulturen mit LB-Medium als Nährstoffquelle ohne zusätzliche Modifikationen, die lediglich zur Selektion das Antibiotikum Ampicillin enthielten. Kultiviert wurde bei einer Temperatur von 37 °C bis zu einer optischen Dichte bei 600nm von 0.5-0.8. Anschließend induziert man die Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG. Nach vierstündiger Induktion wurde die bakterielle Schüttelkultur geerntet und analysiert. Das Ergebnis der Analyse zeigt eine niedrige Expression des Rezeptors und ist eindeutig wie die nachfolgende Abbildung zeigt, nur mittels einer Western Blot Analyse zu bestätigen. Die Ursachen dieser niedrigen

Expressionsrate des Rezeptors waren zu diesem Zeitpunkt völlig unbekannt, und sollten in weiteren Experimenten geklärt werden.



**Abbildung 11: Analyse der Expression des humanen Parathormonrezeptors.** Die linke Abbildung zeigt ein 12 % iges SDS Gel mit Gesamtproteinproben vor der Induktion und 1 bis 4 Stunden nach der Induktion. Die rechte Abbildung zeigt eine entsprechende Western Blot Analyse zur Identifizierung des Rezeptorproteins durch einen monoklonalen Antikörper. Das Kulturmedium wurde mit einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3) PTHR angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der Induktion der rekombinanten Proteinexpression durch IPTG wurden zu den angegebenen Zeiten Proben genommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und nach Erhitzen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

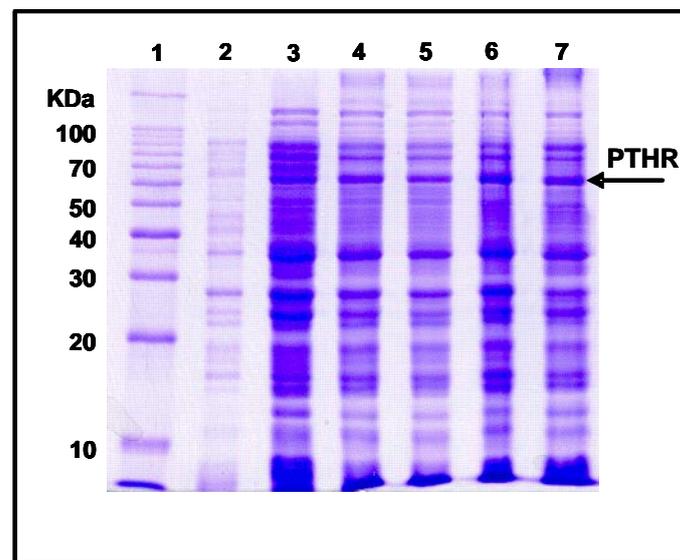
Legende SDS Gel: (1) LMW Proteinstandard; (2) Zellysate vor der Induktion; (3) Zellysate 1.Stunde nach Induktion; (4) Zellysate 2.Stunden nach Induktion; (5) Zellysate 3.Stunden nach Induktion; (6) Zellysate 4.Stunden nach Induktion

Legende Western Blot: (1) Zellysate vor der Induktion; (2) Zellysate 1.Stunde nach Induktion; (3) Zellysate 2.Stunden nach Induktion; (4) Zellysate 3.Stunden nach Induktion; (5) Zellysate 4.Stunden nach Induktion

Für das weitere erfolgreiche Arbeiten war die systematische Klärung der Ursachen jener niedrigen Expressionsrate von entscheidender Bedeutung. Hierzu wurden zahlreiche Versuchsreihen durchgeführt, deren Prinzip in der Modulation einzelner Parameter bestand. Die Auswertung erfolgte anschließend hinsichtlich einer Expressionsteigerung. Durch die Modulation der Temperatur, der Sauerstoffzufuhr und der Medienzusammensetzung konnte keine entscheidende Verbesserung erreicht werden. Die weiteren Versuche konzentrierten sich daher auf die Analyse der Plasmidstabilität. Hierzu erfolgte eine Ausstrich der zu untersuchenden Kultur sowohl auf selektionmarkerfreie- und selektionsmarkerhaltige Agarplatten. Ein Vergleich der Kolonienzahl gibt Auskunft über die prozentuale Stabilität. Dieses Ergebnis war überraschend, da man teilweise nach einer längeren Inkubationszeit (Expressionzeit) keine plasmidhaltigen Zellen mehr vorfand. Auch der durchschnittliche prozentuale Anteil plasmidhaltiger Zellen lag nur noch bei 10-20%. Gleichzeitige Messungen der  $\beta$ -Lactamaseaktivität ergaben teilweise so hohe Aktivitäten, dass zugesetztes Ampicillin ( $600\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ ) innerhalb von wenigen Minuten abgebaut wurde. Durch diese rasche Zersetzung des Ampicillins war daher der nötige Selektionsdruck zur Stabilisierung des

Plasmides nicht mehr vorhanden. Der beschleunigte Abbau des Ampicillins und der damit verbundene abnehmende Selektionsdruck führt so zu einem massiven Plasmidverlust der bakteriellen Zellen. Daher ist die ungenügende Stabilität die Ursache der niedrigen Expression. Zu deren Erhöhung mussten also Maßnahmen zur Plasmidstabilisierung ergriffen werden.

Durch den Zusatz von 1% Glucose zum Kultivierungsmedium und die gleichzeitige Erhöhung des Selektionsdruckes aufgrund des Einsatzes eines abbaustabileren Antibiotikums gelang erstmals der Nachweis einer eindeutigen Expressionsbande im SDS Page.



**Abbildung 12: Proteinexpression des PTH Rezeptors in LB- Medium mit 1% Glucose und steigender Antibiotikakonzentration.** Im SDS-Gel erkennt man eine schwache aber dennoch deutliche Expressionsbande im Bereich von 60-70 KDa. (1) LMW Proteinstandard; (2) Zellysate vor Induktion; (3) Zellysate nach 4.Stunden unter Induktion und 100 µg Carbapenem; (4) Zellysate nach 4.Stunden unter Induktion und 200 µg Carbapenem; (5) Zellysate nach 4.Stunden unter Induktion und 300 µg Carbapenem; (6) Zellysate nach 4.Stunden unter Induktion und 400 µg Carbapenem; (7) Zellysate nach 4 Stunden unter Induktion und 500 µg Carbapenem

Die Kombination eines stabileren Antibiotikums in Verbindung mit 1% Glucose zur Reprimierung des Promotors sowie der Wechsel des Expressionsstamms führt erstmals zur sichtbaren Expression des Parathormonrezeptors im SDS Page. Die Erhöhung der Antibiotikakonzentration wirkt sich nicht wesentlich steigernd auf die Expression aus, so dass hier im normalen Konzentrationsbereich gearbeitet werden kann.

Die Produktion des Rezeptors als Inclusion bodies ist für das Überleben der Zelle und daher auch für die Ausbeute rekombinanten Proteins äußerst wichtig. Experimente zeigten, dass eine zu niedrige Expression zur Insertion des Rezeptors in die bakterielle Zellmembran führt, und so entweder zum Absterben der jeweiligen Zelle oder zum Plasmidverlust führt. Letzteres beobachtet man allerdings vorwiegend im Fermentationsprozess bei nachlassender

Antibiotikawirkung. Daher ist die Auswahl eines geeigneten induzierbaren Promotors neben der Plasmidstabilität ein weiterer wichtiger Punkt, der sich positiv auf die Proteinexpression auswirkt. Als einer der stärksten induzierbaren Promotoren gilt der aus dem Phagen T7. Mit diesem Promotor ist eine starke Proteinproduktion durch einfache Induktion mit IPTG möglich. Ein großer Nachteil des T7 Promotors verbirgt sich in einer schwachen Hintergrundexpression, die bereits ohne Induktion auftritt. Für Proteine, die keine cytotoxischen Effekte hervorrufen, ist dies vernachlässigbar, für die Expression des humanen PTH Rezeptors hat dies aber aufgrund der vorab erwähnten experimentellen Daten dramatische Folgen. Daher muss diese Hintergrundexpression soweit minimiert werden, dass sie folgenlos bleibt. Dies gelingt möglicherweise durch den Zusatz von 1% Glucose zum Medium. Glucose minimiert die Hintergrundexpression des nichtinduzierten T7 Promotors, so dass keine cytotoxische Effekte die zum Abbruch der Expression führen auftreten.

### **III.1.2.2. Bakterielle Fermentation**

Der erfolgreichen Entwicklung und Etablierung eines Fermentationsprozesses kam in dieser Arbeit eine Schlüsselrolle zu. Die Fermentation im Bioreaktor ermöglicht durch die Regulation der relevanten Parameter konstante und reproduzierbare Expressionsbedingungen. Auf der Suche nach geeigneten Basisverfahren fiel die Auswahl auf das Fed Batch Prinzip. Dieses Verfahrensprinzip gewährleistet durch den ständigen Ersatz der verbrauchten Nährstoffe eine über einen langen Zeitraum kontinuierliche Wachstums- und Expressionsphase.

Die Entwicklung und Anpassung des Fed Batch Verfahrens an die Bedingungen der Rezeptorexpression stützt sich vorwiegend auf die in den vorherigen Experimenten gewonnenen Daten. So setzt sich das Fermentationsmedium aus Hefeextrakt, Salzen und Glukose zusammen. Ebenso besteht die Feeding Lösung aus hochkonzentriertem Hefeextrakt mit Glycerin als schnell verfügbarer Kohlenstoffquelle. Der Einsatz von Glycerin als Kohlenstoffquelle in der Feeding Lösung bedingt eine Minimierung des Stoffwechselproduktes Acetat.

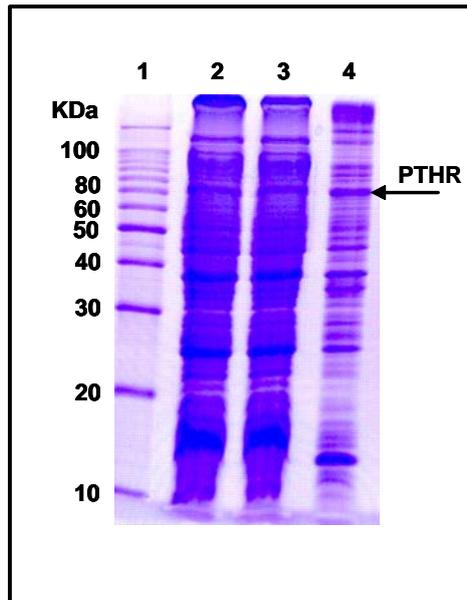
Die nachfolgende Tabelle listet alle wichtigen Fermentationsparameter mit ihren Werten auf.

Tabelle 6: Zusammenstellung aller wichtigen quantitativen Prozessparameter der Fermentation

Fermentationsparameter	Parameterbereich	Steuerung durch
Temperatur (T)	Wachstumsphase 37°C Expressionsphase 35°C	PID Temperaturregler
Sauerstoffpartialdruck (pO <sub>2</sub> )	20-80 % Sättigung	Rührung; Luftzufuhr; Sauerstoffzufuhr
pH Wert (pH)	pH Bereich 6.80-7.20	pH Regulationslösungen
Feeding Rate (Flow)	120-210 g/h <i>Feeding</i> Lösung	Waage in Kombination mit Pumpsystem

Gestartet wird der Fermentationsprozess durch Inokulation einer entsprechenden bakteriellen Übernachtskultur, die zur Entfernung der sekretierten  $\beta$ -Laktamase vorher abzentrifugiert und mit Medium gewaschen wird. Hierdurch vermeidet man eine Kontamination des Fermentationsmediums mit diesem Enzym, und erhöht so wesentlich die Plasmidstabilität. Die starke Verdünnung der Übernachtskultur während der Inokulation führt anfänglich zu einer 60-120 minütigen Wachstumsverzögerung. Ist diese *lag*-Phase beendet, beschreibt die Kultur ein exponentielles Wachstum. Zur weiteren möglichen Verbesserung der Plasmidstabilität in der Wachstumsphase wird dem Medium zweistündlich 600  $\mu\text{g/ml}$  Carbpenicillin zugesetzt. Ist die zugesetzte Glukose nach ungefähr 3 bis 4 Stunden vollständig verbraucht startet das *Feeding*. Besteht keine Möglichkeit die Glukosekonzentration im Medium durch direkte Messungen zu bestimmen, erkennt man den Glukoseverbrauch am plötzlichen und schnellen Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes. Der richtige Feedingzeitpunkt entscheidet maßgeblich über die spätere Proteinexpression. Wird dieser Zeitpunkt um mehr als 30 Minuten verpasst, ist überhaupt keine oder nur noch eine schwache Expression zu beobachten.

Ab einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 50 löst man die Proteinproduktion durch Induktion mit IPTG aus. Nach 20 bis 30 Minuten wächst die induzierte *Escherichia coli* Kultur nicht weiter, und beschreibt einen stationären Zustand. Möglicherweise ist dieses Verhalten eine Folge der beginnenden Proteinproduktion. Das Absenken der Temperatur um 2° C dient wiederum der Verbesserung der Plasmidstabilität, da nach Induktion keine weitere Antibiotikazugabe erfolgt. Nach 4 Stunden unter Promotorinduktion beginnt die bakterielle Fermentationskultur abzusterben. Dies kennzeichnet das Ende der Fermentation und die Isolierung der Zellen kann durch Zentrifugation erfolgen. Gelagert wird das so pelletierte Material bei einer Temperatur von -20 °C oder für die Langzeitlagerung bei -80 °C. Bei dieser Lagerung konnte keine Degradation des Materials beobachtet werden.

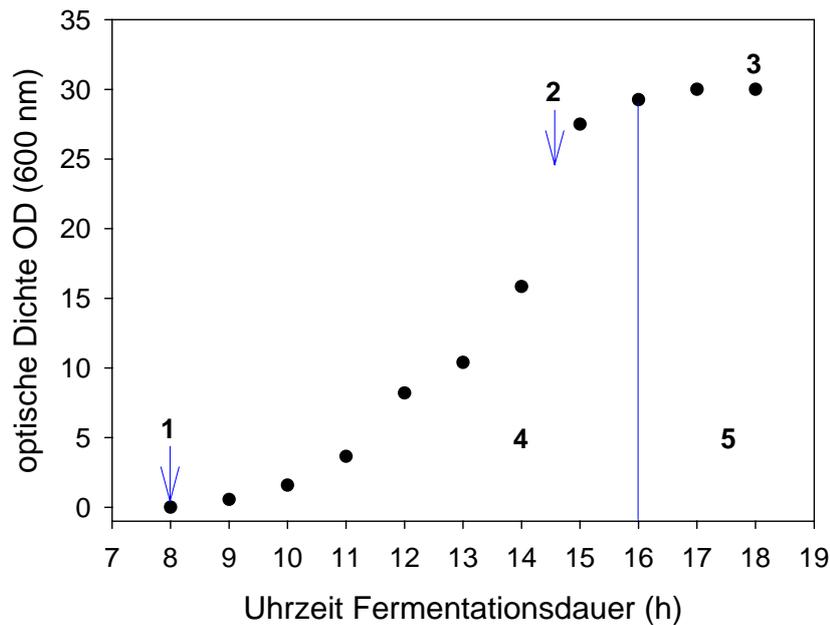


**Abbildung 13: Proteinexpression des PTH Rezeptors im Fermentationsverfahren und die Lokalisation als *Inclusion body* Protein.** Die Abbildung dokumentiert das Ergebnis der Fed Batch Fermentation, und zeigt den exprimierten Parathormonrezeptor als *Inclusion body* Protein. Für diesen Nachweis erfolgte eine Zentrifugation des Zellysates bei 48.000 xg für 30 min. Das angefallene IB Protein wurde in SDS Probenpuffer solubilisiert und aufgetragen. (1) LMW Proteinstandard; (2) Proteinlysat des Zellaufschlusses; (3) Proteinlysat des Zellüberstandes; (4) Isolierte *Inclusion bodies*

Trotz intensiver Überwachung und Steuerung der Fermentationsparameter ist sowohl die Expressionsrate als auch die Homogenität des isolierten *Inclusion body* Materials sehr unterschiedlich. Die Ursachen hierfür konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Besonders die Qualität der *Inclusion bodies* hinsichtlich der Homogenität ist starken Schwankungen unterworfen. Dies äußert sich in unterschiedlichen quantitativen Anteilen von verkürzten Expressionsprodukten des PTH Rezeptors. Eine nachfolgende Reinigung wird durch diese Fragmente stark erschwert, da diese am C-terminalen Abschnitt verkürzt sind und daher durch den vorhandenen N-terminalen Histidin Tag mittels Affinitätsreinigung nicht abgetrennt werden können.

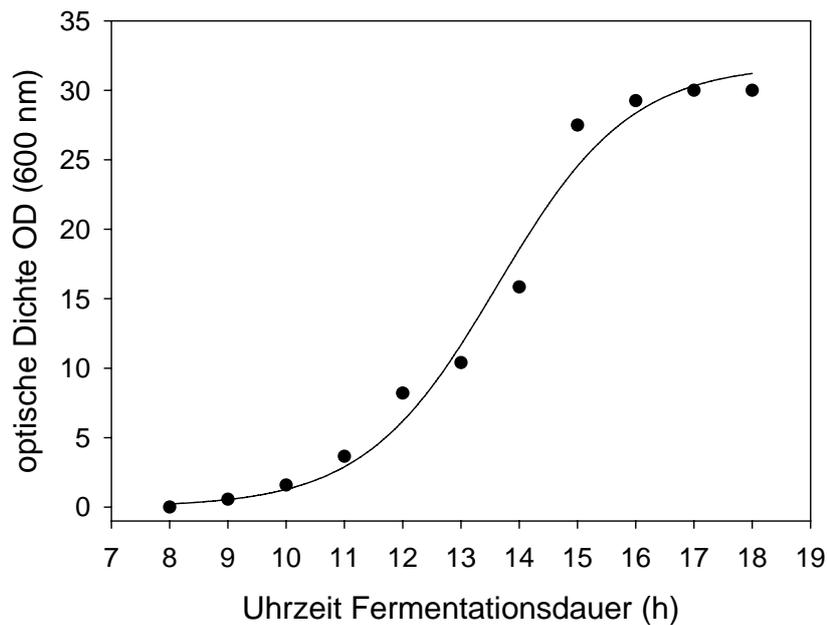
### III.1.2.3. Auswertung der Fermentation

Die Wachstums- und Entwicklungszyklen einer bakteriellen Fermentationskultur werden in einer Wachstumskurve erfasst. In Abbildung 14 ist diese für die Fermentation des humanen Parathormonrezeptors dargestellt. Sehr deutlich ist hier die beschriebene anfängliche Wachstumsverzögerung, die sich anschließende Wachstumsphase und der Übergang in die stationäre Phase nach Promotorinduktion zu erkennen.



**Abbildung 14: Wachstumskurve der bakteriellen Suspensionskultur im Fed Batch Bioreaktor mit Hefeextrakt Vollmedium** (1) Inokulation der bakteriellen Vorkultur, (2) Induktionszeitpunkt mit 1mM IPTG, (3) Fermentationsende, (4) Wachstumsphase, (5) stationäre Phase

Zur Beschreibung der experimentell gewonnenen Daten und zur Erfassung der inneren Gesetzmäßigkeiten denen das bakterielle Wachstum folgt wird eine kontinuierliche Approximation der experimentellen Daten im gegebenen Intervall vorgenommen. Jedem Zeitpunkt  $t$  wird somit eine bestimmte Zellzahl  $b$  zugeordnet, so dass sich die in Abbildung dargestellte Funktion  $b(t)$  ergibt.



**Abbildung 15:** Kontinuierliche Approximation der Wachstumsdaten aus der Fed Batch Kultur mit folgender Zuordnung  $t \rightarrow b; b(t)$ . Die Fitfunktion ist eine Form der logistischen Kurve  $L(t) = \frac{a}{1 + \exp(b - ct)}$ .

Diese Funktion lässt sich mit einer logistischen Kurve beschreiben, wobei diese einen exponentiellen- und einen limitierenden Anteil enthält (Anhang).

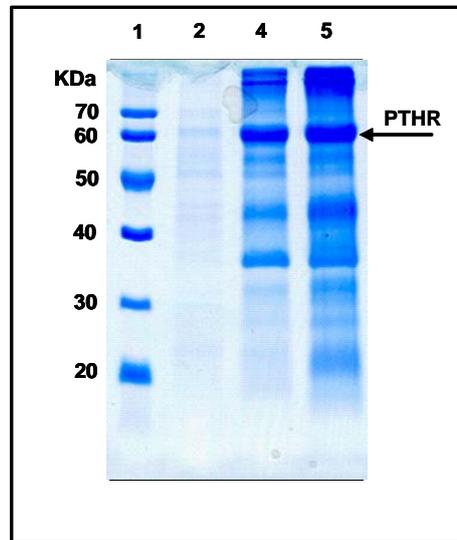
#### III.1.2.4. *Inclusion body Isolation*

Die rekombinante Überexpression heterologer oder homologer Proteine in *Escherichia coli* führt recht häufig zur deren Ablagerung als *Inclusion bodies*, wobei hier allerdings eine Korrelation zwischen spezifischen Proteineigenschaften wie zum Beispiel dem Molekulargewicht oder dem Faltungsmechanismus und der Aggregationsaffinität bisher nicht möglich ist. Einzig das Auftreten von Disulfidbrücken korreliert direkt mit der Neigung zur Bildung von *Inclusion bodies* im Cytosol, da im Cytoplasma ein für die Ausbildung von Disulfidbrücken ungünstiges Redoxpotential vorliegt.

Um die biologisch inaktiven Aggregate des humanen PTH-Rezeptors in eine native Proteinkonformation zu überführen, ist es von fundamentaler Bedeutung, geeignete Isolations- und Solubilisierungsverfahren zu entwickeln, die sich an den spezifischen Eigenschaften des Rezeptors orientieren.

Die Isolation des humanen PTH-Rezeptors folgt grundlegend den Protokollen von Rudolph et al, wobei aber aufgrund der bei Membranproteinen auftretenden erhöhten Hydrophobizität mehrere Modifikationen zusätzlich einfließen. So wird dem Resuspensionspuffer ein mildes und nicht denaturierendes Detergenz in Form von Alkyl- $\beta$ -D-glucosiden oder Alkyl- $\beta$ -D-

maltosiden zugesetzt. Der Zusatz dieser Detergentien bewirkt ein Ablösen schwach hydrophob gebundener Proteine von den Inclusion bodies, und verbessert so deren Reinheitsgrad nach erfolgter Isolation durch Zentrifugation.



**Abbildung 16: Reinheit der isolierten Inclusion bodies des PTH-Rezeptors.**

(1) Molekularmassenstandard; (2) Waschschrift unter Zusatz von Alkyl- $\beta$ -D-glucosiden bzw.-maltosiden; (4) Isolierte *Inclusion bodies* (5) Isolierte *Inclusion bodies* (höhere Konzentration)

Zusätzliche Waschschriffe, so zum Beispiel mit Guanidinhydrochlorid, Harnstoff und deren Kombinationen, verbesserten die Reinheit der Inclusion bodies nicht wesentlich, so dass zur Isolation nur nichtionische und milde Detergentien genutzt wurden.

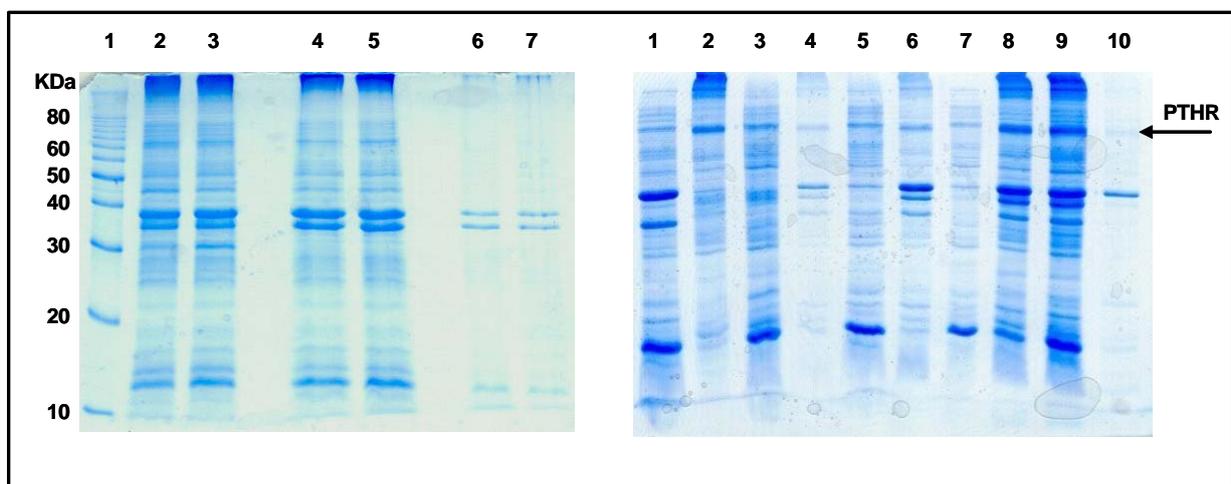
### III.1.2.5. *Inclusion body* Solubilisation

Für die erfolgreiche Renaturierung des PTH- Rezeptors ist eine vollständige Solubilisierung der *Inclusion bodies* eine wichtige Voraussetzung. Als Membranprotein mit sieben sehr hydrophoben Transmembranbereichen ist der Einsatz der klassischen Denaturierungsmittel für den PTH-Rezeptor nur eingeschränkt möglich. Die Verwendung von Guanidinhydrochlorid oder Harnstoff führt zu einer unvollständigen Solubilisation der *Inclusion bodies*. Nach mehreren Stunden beginnt das teilweise solubilisierte Protein bereits wieder zu aggregieren. Leider fallen bei diesem Prozess auch fast alle Proteinverunreinigungen mit aus, so dass dieser Effekt für eine Aufreinigung nicht weiter genutzt werden konnte.

**Tabelle 7: Eingesetzte Substanzen und deren Konzentration zur Solubilisierung der Inclusion bodies**

Substanz	Eingesetzte Konzentration
CTAB	20-50 mM
Natriumdodecylsulfat (SDS)	20-50 mM
CHAPS	4-10 mM
Triton X-100	1-5 mM
NN-Dimethyl-dodecylamin-N-oxid (LDAO)	50-100 mM
Lauroylsarcosin	30-40 mM
Harnstoff	8 M
Guanidinhydrochlorid	6 M

Zur Verbesserung der Solubilisation wurden dem Ansatz in Gegenwart von Guanidinhydrochlorid oder Harnstoff zusätzlich verschiedene milde nichtionische oder zwitterionische Detergentien zugesetzt.



**Abbildung 17: Experimente zur Löslichkeit der Inclusion bodies durch verschiedene denaturierend wirkende Substanzen.**

**Gel links** (1) Molekularmassenstandard; (2) Überstand der Solubilisierung mit Lauroylsarcosin; (3) Pellet der Solubilisierung mit Lauroylsarcosin; (4) Überstand der Solubilisierung mit Harnstoff (5) Pellet der Solubilisierung mit Harnstoff; (6) Überstand der Solubilisierung mit Guanidinhydrochlorid; (7) Pellet der Solubilisierung mit Guanidinhydrochlorid

**Gel rechts** (1) Überstand der Solubilisierung mit LDAO; (2) Pellet der Solubilisierung mit LDAO; (3) Überstand der Solubilisierung mit CTAB; (4) Pellet der Solubilisierung mit CTAB; (5) Überstand der Solubilisierung mit Triton X-100; (6) Pellet der Solubilisierung mit Triton X-100; (7) Überstand der Solubilisierung mit CHAPS; (8) Pellet der Solubilisierung mit CHAPS; (9) Überstand der Solubilisierung mit SDS; (10) Pellet der Solubilisierung mit SDS

Dies führte allerdings zu keiner verbesserten Löslichkeit, bestenfalls war eine Aggregationsverzögerung zu beobachten. Auch der Einsatz von nichtdenaturierenden

Detergentien, die sich bei der Isolation von Rezeptoren aus zellulären Membranen bewährt haben, führte nicht zu einer stabilen und vollständigen Solubilisierung des PTH Rezeptors. Aus der Vielzahl der getesteten Detergentien erwies sich das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) als geeignet. Durch Zusatz von 20-25 mM SDS zum Solubilisierungspuffer gelang es, den PTH-Rezeptor vollständig und über einen langen Zeitraum stabil zu solubilisieren. Wichtig für die Solubilisation ist eine SDS Konzentration, die oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration (CMC) liegt. Unterhalb dieses für Detergentien charakteristischen Parameters ist die Löslichkeit des Rezeptors stark herabgesetzt. Für eine erfolgreiche Solubilisierung scheint daher die Ausbildung von Micellen eine wichtige Rolle zu spielen. Dieser Prozess verläuft quantitativ über einen Zeitraum von 12 bis 16 Stunden bei einer Temperatur oberhalb von 15°C. Unter diesen Bedingungen löst sich der PTH Rezeptor nahezu vollständig, und nur eventuell vorhandene DNA fällt aus und lässt sich durch Zentrifugation entfernen. Die so solubilierten PTH Rezeptor *Inclusion bodies* sind stabil und lassen sich über einen langen Zeitraum sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4 °C lagern.

### **III.1.3. Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen**

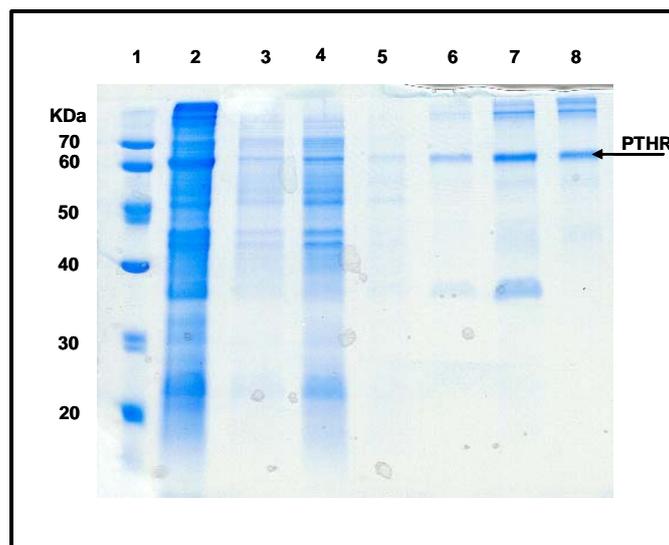
#### **III.1.3.1. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)**

Charakteristisch für die Inclusion bodies des humanen Parathormonrezeptors ist ein sehr inhomogenes Proteinexpressionsmuster mit vielen verkürzten Rezeptorfragmenten und ein hoher Verunreinigungsgrad durch bakterielle Proteine. Besonders die verkürzten PTH Rezeptorfragmente lassen sich nicht über eine IMAC Affinitätschromatographie entfernen, da diese ebenso wie der vollständige Rezeptor einen N-terminal fusionierten Histidin Tag besitzen. Differenzen zwischen den einzelnen Fragmenten bestehen allerdings hinsichtlich des Molekulargewichtes und der elektrischen Gesamtladung. Daher ist es theoretisch möglich, für die Abtrennung dieser Fragmente sowohl die Gelfiltration als auch eine Ionenaustauschchromatographie zu verwenden. Experimente zeigten allerdings, dass diese Unterschiede nur bedingt hierzu benutzt werden können, da das Detergenz sowohl durch die Micellenbildung als auch durch die anionische Ladung das chromatographische Verhalten der Proteine verändert. Daher fiel im Rahmen dieser Arbeit die Entscheidung auf die hydrophobe Interaktionschromatographie. Allerdings wirkt sich auch bei diesem Verfahren die Anwesenheit von SDS negativ auf die Bindung des Proteins an die hydrophobe Matrix aus. Ohne entsprechende Modifikationen der Reinigungsprotokolle findet überhaupt keine, oder nur eine sehr eingeschränkte Immobilisierung des Zielproteins am Trägermaterial statt. Als geeignete Substanz für die Verbesserung der Proteinbindung erwies sich Propanol. Der

langsame und tropfenweise Zusatz von 15-20 % 2-Propanol zu den solubilisierten *Inclusion bodies* ermöglichte erstmals eine quantitative Proteinbindung ohne vorherige Präzipitation. Vermutlich lässt sich dieser Effekt des Propanols mit einer teilweisen Auflösung der micellaren Detergenzstruktur erklären, so dass Detergenzmonomere mit dem gebundenen Rezeptorprotein am Träger gebunden werden. Der denaturierte humane Parathormonrezeptor bindet unter diesen Bedingungen sehr fest an den hydrophoben Träger, so dass diese feste und starke Bindung nur durch den erneuten Aufbau eines micellaren Systems gelöst werden kann. Selbst Waschschrte mit Guanidinhydrochlorid lösen diese Bindung nicht.

Die Elution des gebundenen Rezeptorproteins muss daher wiederum durch SDS erfolgen, dessen Konzentration sich oberhalb der kritischen Micellenbildungskonzentration von 8 mM (reines Wasser) befinden muss.

Der durchgeführte Waschschrte mit 6 M Guanidinhydrochlorid entfernt große Anteile der Verunreinigungen. Das vorherige und nachfolgende gründliche Waschen mit Tris Puffer verbessert das Reinigungsergebnis nicht wesentlich, verhindert aber die Aggregation des freien SDS bei Kontakt mit Guanidinhydrochlorid.



**Abbildung 18: Elution des PTH-Rezeptors von der hydrophoben Interaktionschromatographie unter denaturierenden Bedingungen.**

(1) Molekularmassenstandard; (2) Solubilisiertes IB-Material; (3) Waschen mit Tris Puffer; (4) Waschen mit 6 M Guanidinhydrochlorid; (5) Waschen mit Tris Puffer; (6) Elutionsfraktion 1 mit 20 mM SDS (7) Elutionsfraktion 2 mit 20 mM SDS (8) Elutionsfraktion 3 mit 20 mM SDS

Das Puffersystem besteht aus 100 mM Tris/HCl, pH 7.2.

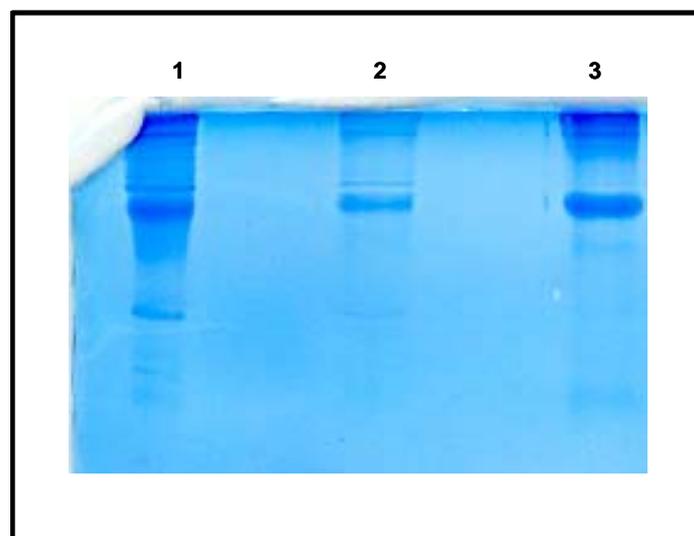
Der Waschschrte unter Zusatz von 6M Guanidinhydrochlorid weist in diesem Verfahren eine hohe Reinigungseffizienz auf.

Nach mehreren Reinigungsprozeduren durch dieses Verfahren verliert das Trägermaterial wahrscheinlich auf Grund des an der Matrix verbleibenden SDS an Bindungskapazität und

muss getauscht werden. Ein Regenerationsverfahren für den verbrauchten Träger ist bisher noch nicht entwickelt.

### III.1.3.2. Immobilisierte Metallchelatchromatographie IMAC

Ein weiterer Reinigungsschritt nutzt den fusionierten Histidin Tag für eine Affinitätschromatographie durch die Chelatkomplexbindung zwischen den Histidinen und dem immobilisierten Nickelionen. Unter denaturierenden Bedingungen weist dieses Chromatographieverfahren allerdings eine schlechtere Reinigungseffizienz als unter vergleichbaren nativen auf. Eine Ursache hierfür ist sowohl die Möglichkeit der Ausbildung kovalenter Disulfidbrücken zwischen unverbrückten freien Cysteinen, aber auch die Micellenbildung durch das Detergenz SDS. Diese Micellen binden über hydrophobe Wechselwirkungen eine Reihe von Proteinen, so dass deren Entfernung maßgeblich behindert wird. Ein weiterer unerwünschter Effekt ist die Abschwächung der Bindungsstärke zwischen dem Histidin Tag und den immobilisierten Nickelionen. Bei einer Detergenzkonzentration von 50 mM findet bereits keinerlei Bindung des Rezeptors an die Säulenmatrix mehr statt. Die Herstellung einer Emulsion durch den Zusatz von 2-5% n-Hexan verbessert sowohl grundlegend die Rezeptorbindung, als auch den Reinheitsgrad des nachfolgenden Proteineluates.



**Abbildung 19: Elution des PTH Rezeptors von der Nickelionen Affinitätschromatographie unter denaturierten Bedingungen.**

(1) Säulendurchlauf; (2) Waschdurchlauf mit IMAC Waschpuffer 2; (3) Elution mit 20 mM SDS und ph Shift auf 4.50.

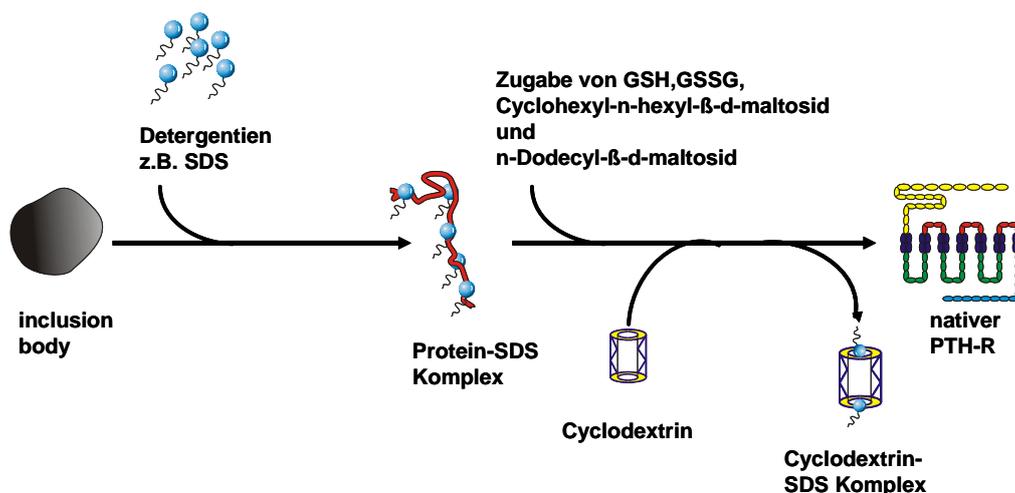
Die Kombination der beiden chromatographischen Reinigungsverfahren weist einen Weg zur Reinigung des humanen Parathormonrezeptors unter denaturierenden Bedingungen. Während

die hydrophobe Interaktionschromatographie mehrheitlich die verkürzten Rezeptorfragmente und *E.coli* Proteine entfernt, wirkt die Metallchelatchromatographie konzentrierend und nachreinigend. Der im SDS Gel sichtbare hochmolekulare Proteinanteil ist ebenfalls PTH Rezeptor, wobei dieses ungewöhnliche Laufverhalten möglicherweise auf micellare SDS-Proteinkomplexe zurückzuführen ist. Somit steht nahezu homogenes Proteinmaterial für die nachfolgende Renaturierung zur Verfügung.

## III.2. Renaturierung des humanen Parathormonrezeptors

### III.2.1. Artificial Chaperone System

Das Artificial Chaperone System zur Optimierung der Proteinausbeute während des Renaturierungsprozesses basiert auf den Arbeiten von Gellman und Mitarbeitern. Sie entwickelten ein System zur schonenden Entfernung der klassischen Denaturierungsmittel basierend auf dem Zusatz von SDS und zeigten erfolgreich die Renaturierung der Proteine Anhydrase B, Lysozym und Citrat Synthase.



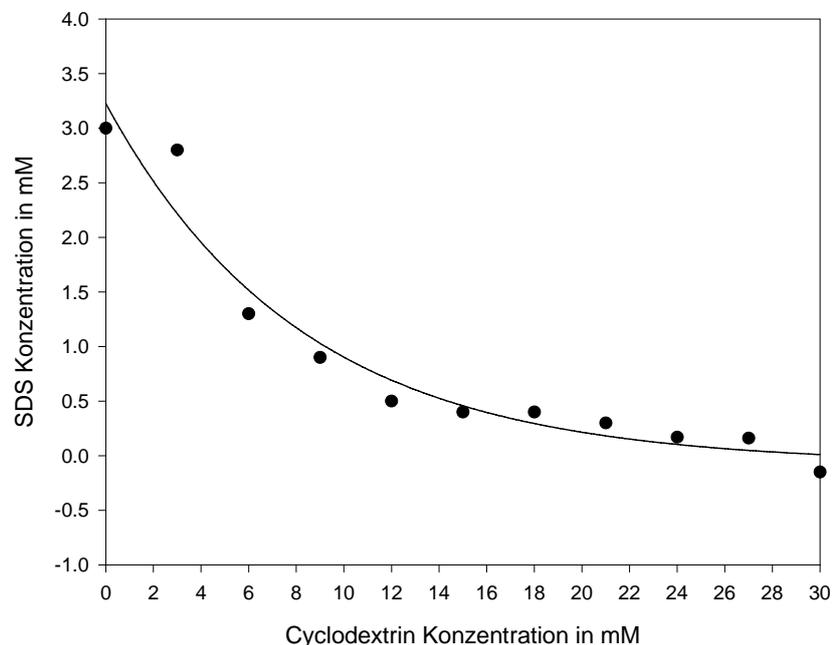
**Abbildung 20: Schematische Darstellung des modifizierten Artificial Chaperone Systems zur Renaturierung des humanen Parathormonrezeptors.** Die isolierten Inclusion bodies werden durch das Detergenz SDS stabil solubilisiert. Es entsteht ein Protein SDS Komplex mit bei Raumtemperatur starken hydrophoben Wechselwirkungen. Ein Abkühlen führt zur Abschwächung dieser Wechselwirkung, so dass zugesetztes Cyclodextrin das SDS komplexiert und somit vom Protein entfernt. Die Zugabe von Cyclohexyl-n-hexyl-β-D-maltosid und von n-Dodecyl-β-D-maltosid verhindert die Aggregation des Proteins durch erneute Micellenbildung. Beide Detergentien wirken nicht denaturierend. GSSG und GSH ermöglichen aufgrund des Redoxshufflings die Ausbildung eines korrekten Disulfidbrückenmusters.

Im ursprünglichen *Artificial Chaperone* System wird die denaturierende Konzentration von Harnstoff- oder Guanidinhydrochlorid soweit abgesenkt, dass kein denaturierender Effekt mehr beobachtet wird. Dies geschieht durch Dialyse oder Pulsen in einen Verdünnungspuffer. Gleichzeitig verhindert der Zusatz von SDS die Aggregation des Proteins. Durch den anschließenden Zusatz von Cyclodextrin wird das gebundene SDS vom Protein durch

Komplexierung entfernt und die Renaturierung gestartet. Unter diesen Bedingungen muss ein zwölfmaliger molarer Überschuss an Cyclodextrin für eine vollständige Komplexierung des SDS eingesetzt werden. In proteinfreien wässrigen Puffersystemen genügt für die Komplexierung bereits ein Verhältnis von 1:1.

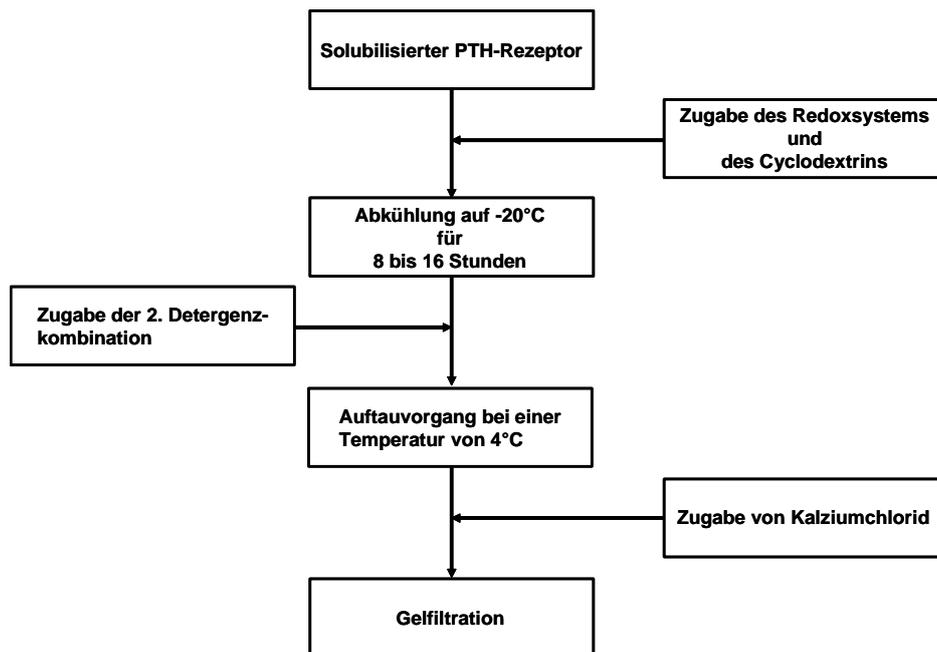
Für die Anwendung auf die Renaturierung des humanen Parathormonrezeptors musste das *Artificial Chaperone* System zahlreichen Modifikationen und Anpassungen unterzogen werden. Zur korrekten Ausbildung eines Disulfidbrückenmusters wird dem Renaturierungspuffer ein Redoxsystem bestehend aus GSH und GSSG zugesetzt. Die Konzentrationsverhältnisse beider Substanzen orientieren sich dabei an den Bedingungen, die sich als optimal für die Renaturierung der Hormonbindungsdomäne erwiesen haben.

Eine weitere kritische Phase ist der Detergenzaustausch von SDS gegen ein nichtionisches und mildes Detergenz. Wendet man das unmodifizierte System mit dem Verhältnis SDS zu Cyclodextrin von 1:10 an, führt dies aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeit zur sofortigen Aggregation des Parathormonrezeptors. Ist hingegen die Konzentration an Cyclodextrin zu niedrig wird nicht das gesamte vorhandene SDS komplexiert und der Rezeptor ist weiterhin inaktiv.



**Abbildung 21: Notwendige Konzentration zur vollständigen Komplexierung von SDS bei Raumtemperatur** Man benötigt in einer PTH Rezeptorproteinhaltigen Lösung bei Raumtemperatur zur vollständigen Komplexierung einen zehnfachen molaren Überschuss an Cyclodextrin. Die SDS Konzentration wurde durch die Anfärbung mit Methyleneblau bestimmt (Abschnitt II.10.7).

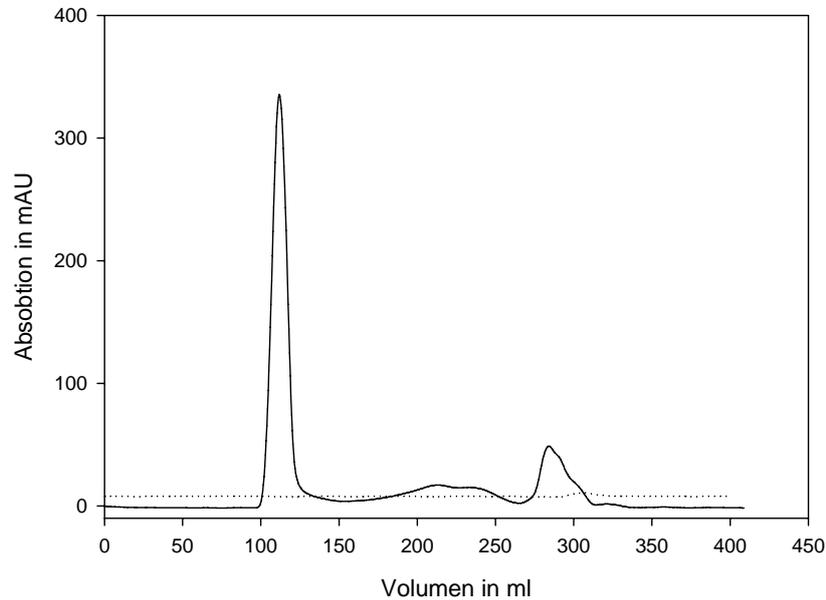
Die vollständige aber langsame Komplexierung des SDS durch Cyclodextrin und die erneute Micellenbildung durch Cyclohexyl-n-hexyl- $\beta$ -D-maltosid in Kombination mit n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid ist damit der Schlüssel zur erfolgreichen Renaturierung des Parathormonrezeptors. Sowohl die starke hydrophobe Wechselwirkung zwischen Rezeptor und SDS, als auch die Komplexierung durch Cyclodextrin unterliegen den Gesetzen der Physikalischen Thermodynamik. Besonders die Bindungen aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen unterliegen einer Abhängigkeit von der Temperatur. Dies kann thermodynamisch über eine Änderung der Entropie beschrieben werden. Um dies zu bestätigen müssen Messungen zur Bestimmung der Komplexierungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur durchgeführt werden. Diese Messungen wurden im Rahmen der Arbeit allerdings aufgrund fehlender Messgeräte nicht durchgeführt. Die weiteren Arbeiten erfolgten daher unter der Annahme, dass eine Absenkung der Temperatur sowohl zu einer Verlangsamung der Komplexierungsgeschwindigkeit, aber gleichzeitig auch zu einer Abschwächung der Wechselwirkung zwischen SDS und PTH-Rezeptor führt.



**Abbildung 22: Fließschema der Renaturierung des PTH-Rezeptors.** Nach Zusatz des Redoxsystems und des Cyclodextrins zum solubilisierten PTH-Rezeptor wird der Ansatz auf eine Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Der Zeitraum erstreckt sich hierbei über 8-16 Stunden. Vor Beginn des Auftauprozesses wird dem gefrorenen Ansatz das vorab in Renaturierungspuffer gelöste Detergenzgemisch zugegeben und bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Ist der Ansatz vollständig eisfrei wird zur Fällung des u.U. noch unkomplexierten SDS Kalziumchlorid zugesetzt. Der Ansatz wird so noch einige Stunden (12-16 Stunden) bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend gelfiltriert.

Das Abkühlen des Renaturierungsansatzes auf eine Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  führt zur Kristallbildung des wässrigen Puffersystems. Dieser Zustand wird für einige Stunden aufrechterhalten, bevor die Temperatur auf  $4^{\circ}\text{C}$  angehoben wird. Während dieser

Temperaturerhöhung findet wahrscheinlich die Komplexierung statt, wobei der Komplex aus SDS und Cyclodextrin sich aufgrund der Temperaturerhöhung stabilisiert. Unkomplexiertes SDS wird anschließend durch den Zusatz von Kalziumchlorid gefällt.



**Abbildung 23:** Elutionsprofil der Superdex S 200 Gelfiltration zur Abtrennung der Renaturierungsadditive. Der Peak 1 (100-130ml) zeigt das Rezeptoreluat und Peak 2 die niedermolekularen Additive.

Durch eine Gelfiltration an einer Superdex S 200 Säule werden alle anderen Renaturierungsadditive (Redoxsystem, Cyclodextrin, etc.) vom renaturierten Rezeptor entfernt und der Rezeptor befindet sich anschließend in einem 100 mM Tris Puffersystem mit 2-3 mM der entsprechenden Detergenzmischung (2 mM n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid und 2 mM Cyclohexyl-n-hexyl- $\beta$ -D-maltosid).

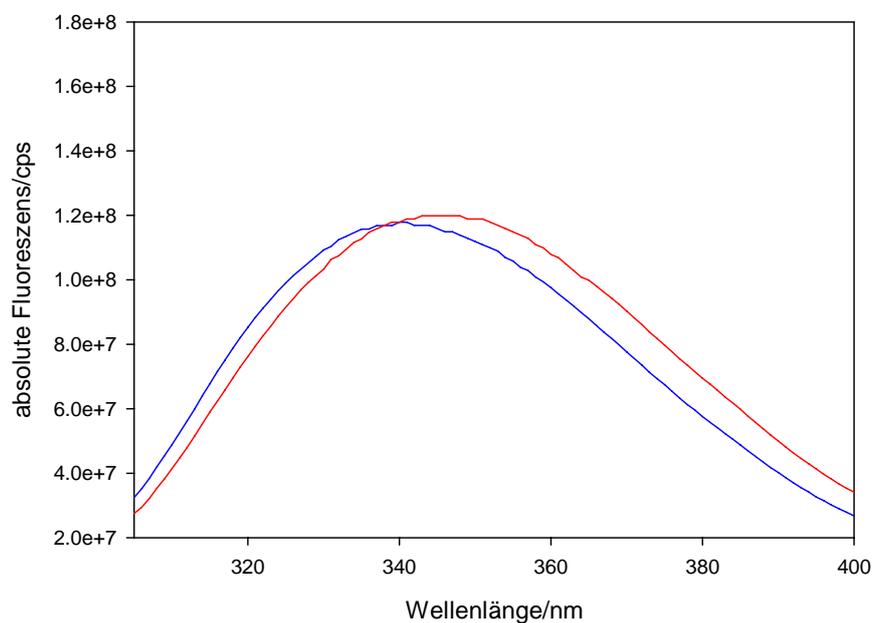
Der so renaturierte Rezeptor kann in diesem Puffersystem stabil ca. 14 Tage gelagert und weiter charakterisiert werden.

### III.3. Funktionelle und biophysikalische Charakterisierung des humanen PTH-Rezeptors

#### III.3.1. Funktionelle Charakterisierung aufgrund von Fluoreszenzeigenschaften

Der humane Parathormonrezeptor verfügt über zahlreiche aromatische Aminosäuren und weist dadurch distinkte Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften im UV Bereich auf. Die Fluoreszenz der aromatischen Seitenketten kann als empfindlicher Indikator für Änderungen in ihrer unmittelbaren chemischen Umgebung angesehen werden. Die bei der Proteinfaltung beobachtete Verschiebung des Intensitätsmaximums in Richtung größerer Wellenlänge resultiert aus der zunehmenden Exposition der aromatischen Seitenketten eines

entfalteten Proteins gegenüber dem Lösungsmittel (Holtzhauer, 1996). Somit erlaubt die Aufnahme von Fluoreszenzspektren Aussagen über die Konformation des Proteinmoleküles. Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzemissionsspektren des nativen und des in SDS denaturierten Rezeptors. Der renaturierte Parathormonrezeptor zeigt bei Anregung der Tryptophan- und Thyrosinseitenketten bei einer Wellenlänge von 280 nm ein Maximum an Fluoreszenzintensität bei 338 nm, während das Maximum des in SDS denaturierten Rezeptors rot verschoben bei 349 nm liegt, wobei sich die Signalamplitude nicht ändert. Für die N-terminale Hormonbindungsdomäne des PTH-Rezeptors konnte eine Rotverschiebung von 344 nm im Nativspektrum auf 354 nm im Spektrum des vollständig denaturierten Rezeptors gezeigt werden. Diese Wellenlängenverschiebungen haben ihre Ursache im stärkeren Kontakt der Fluorophore im entfalteten Protein mit dem sie umgebenden Lösungsmittel. Sind alle Tryptophanseitenketten eines Proteins lösungsmittlexponiert, so liegt das Emissionsmaximum bei 350 nm bis 352 nm (Holtzhauer, 1996). Eine Einbettung der aromatischen Seitenketten in eine hydrophobe Umgebung im Proteininneren verschiebt das Emissionsmaximum zu weitaus kürzeren Wellenlängen im Bereich von 320 nm bis 340 nm.



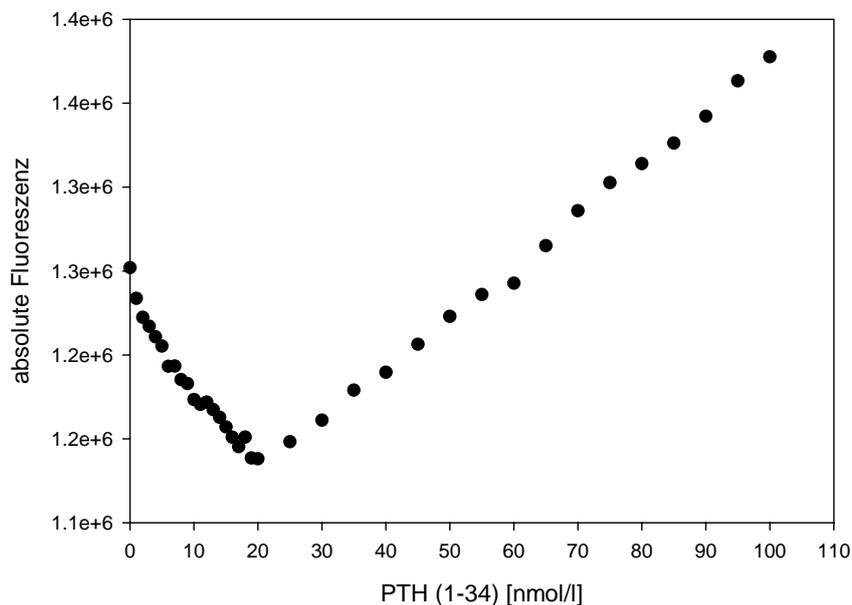
**Abbildung 24: Fluoreszenzemissionsspektren des renaturierten (blaue Linie) und des SDS denaturierten (rote Linie) PTH Rezeptors.** Die Spektren wurden bei einer Rezeptorkonzentration von 850 nmol/l (nM) bei 25°C und einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufgenommen.

Das Emissionsmaximum von 338 nm für den nativen PTH-Rezeptor deutet daher auf keine partielle Exposition von aromatischen Seitenketten zum Lösungsmittel hin. Für die N-terminale Hormonbindungsdomäne beträgt das Emissionsmaximum im nativen Zustand 344 nm. Dieser Wert deutet möglicherweise auf eine partielle Exposition der aromatischen

Seitenketten hin. Allerdings reichen diese Messungen für eine klare Definition des Proteinzustandes nicht aus und weitere Experimente, insbesondere hinsichtlich der Aktivität, müssen für eine klare Definition herangezogen werden.

### III.3.1.1. Ligandenbindung

Die hier gezeigten Bindungsanalysen erfolgten anhand der Änderung der intrinsischen Fluoreszenz des Parathormonrezeptors infolge der PTH (1-34) Peptidzugabe. Der Ligand hat allerdings ein Tryptophan, so dass die Änderung der bei 295 nm angeregten Fluoreszenz nicht eindeutig dem Rezeptor zugeschrieben werden konnte. Durch die Zugabe des PTH-Liganden verringert sich die beobachtete absolute Fluoreszenz bei 340 nm um 30% bis 40%. Dieser Signalabfall der absoluten intrinsischen Fluoreszenzaktivität beruht auf Quencheffekten deren Ursache strukturelle Veränderungen am Rezeptor bzw. am Liganden sind, welche durch die Bindung des Liganden an den PTH-Rezeptor hervorgerufen werden. Dieser Signalabfall der absoluten Fluoreszenzintensität bei Zugabe des PTH Liganden endet bei äquimolaren Konzentrationen von PTH und PTH-Rezeptor. Anschließend beginnt das Signal linear zu steigen und repräsentiert so die Zunahme von freien PTH.

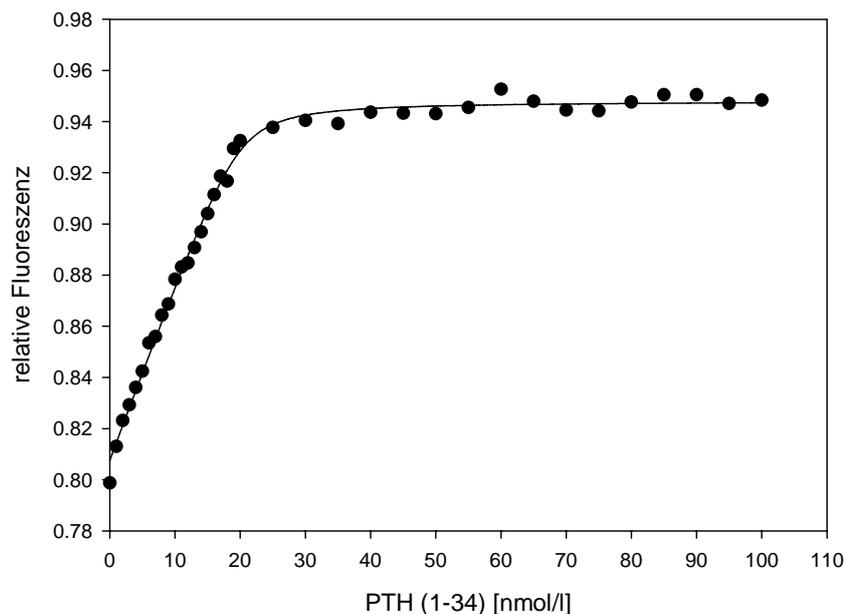


**Abbildung 25: Fluoreszenzquenching bei Zugabe des PTH Peptidliganden zum Rezeptor.** Die Messung erfolgte bei 25°C und einer Anregungswellenlänge von 295nm in PTHR Messpuffer 1. Die Konzentration des PTH Rezeptors betrug 50 nM. PTH Ligand wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 nM bis 100 nM hinzugegeben.

Die aufgenommenen Ligandenbindungskurven zeigten ein Sättigungsverhalten, dass sich an ein Bindungsmodell mit 1:1 Charakteristik anpassen ließ, und so eine Abschätzung der Dissoziationskonstanten des Komplexes aus Rezeptor und Ligand erlaubten. Wird für das

Bindungsverhalten die Grundlage einer 1:1 Stöchiometrie vorausgesetzt, so ergibt sich aus der Titrationsmessung in Abbildung 25, dass nur die Hälfte des eingesetzten Rezeptors aktiv ist. Ob es sich hierbei um einen statistischen Verteilungseffekt auf Grundlage der Orientierung des Rezeptors in der Micelle handelt, oder ob nur 50% funktionell aktiv sind, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Für die Abschätzung der Dissoziationskonstanten wurden die Messungen dreifach wiederholt und die Korrelationskoeffizienten der Datenanpassungen ermittelt. Diese lieferten stets Werte über 0.99, so dass die ermittelten Dissoziationskonstanten eine hinreichend genaue Annäherung an die Titrationskurve darstellen. Der relativ geringe Standardfehler der Approximation ist ebenfalls ein Ausdruck für die recht gute Beschreibung durch das 1:1 Bindungsmodell. Allerdings zeigt die Titrationskurve keine signifikante Krümmung, so dass eine genaue mathematische Bestimmung der Dissoziationskonstanten recht schwierig und fehlerhaft ist.



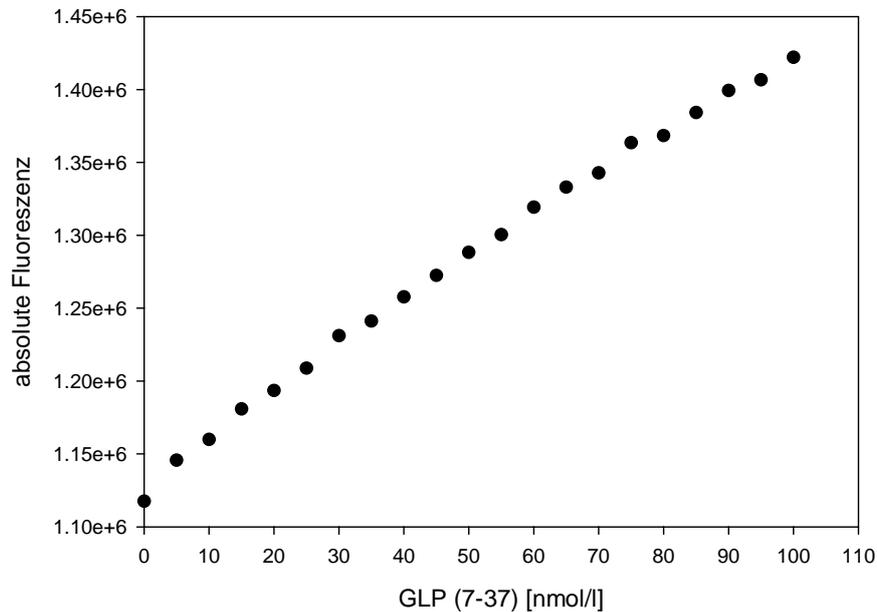
**Abbildung 26: Mathematische Approximation eines Bindungsmodells mit einer 1:1 Bindungscharakteristik.** Dieses Verfahren erlaubt die Angabe einer Dissoziationskonstante  $K_D$  für den Rezeptor Ligand Komplex mit  $5.7 \pm 3.4$  nM.

Daher stellt die berechnete Dissoziationskonstante von  $5.7 \pm 3.4$  nM wahrscheinlich einen oberen Grenzwert dar. Die tatsächliche Konstante ist sicherlich bedeutend niedriger.

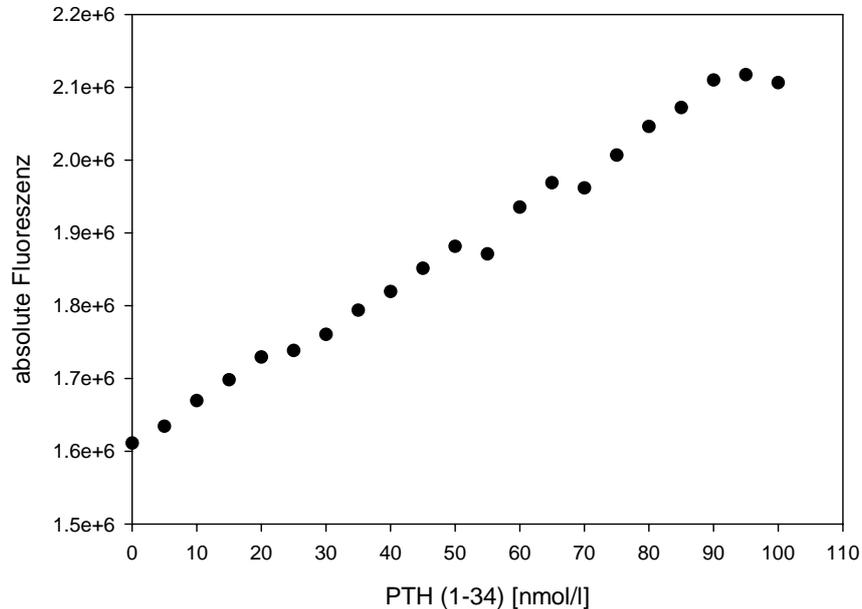
Zur Absicherung der Spezifität der gemessenen Bindungsdaten erfolgten folgende Kontrollexperimente unter jeweils gleichen experimentellen Bedingungen:

- Kontrollexperiment 1: Austausch des PTH Liganden gegen das GLP Peptid (7-37)
- Kontrollexperiment 2: SDS denaturierter PTH-Rezeptor

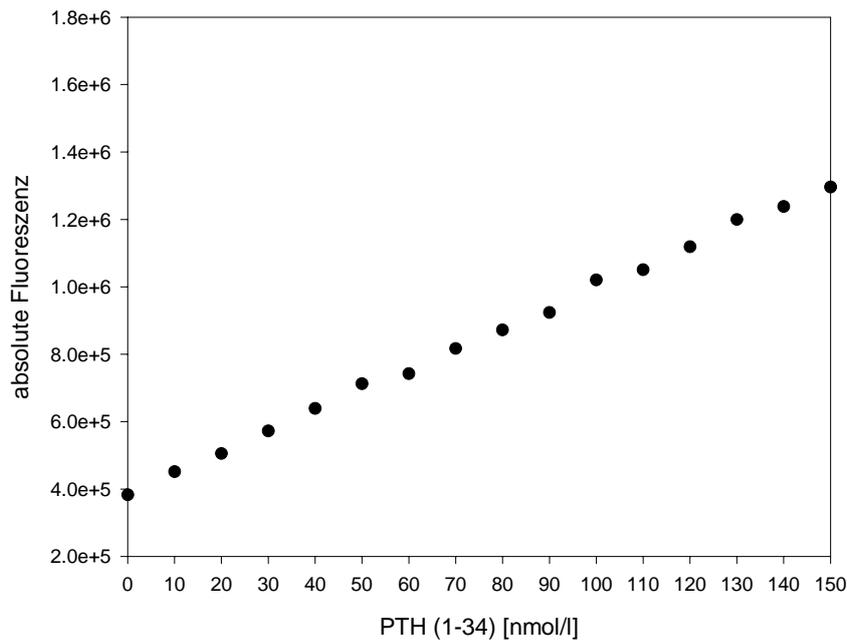
- Kontrollexperiment 3: Titration des PTH Liganden in Abwesenheit von PTHR.



**Abbildung 27: Kontrollexperiment 1 Fluoreszenztitration des GLP (7-37) Peptides zum PTH Rezeptor.** Zu 50 nM PTH Rezeptor wurden insgesamt 100 nM GLP-Peptid in 5 nM Schritten zupipettiert. Die Messung erfolgte bei 25°C bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm in PTHR Messpuffer 1.



**Abbildung 28: Kontrollexperiment 2 Fluoreszenztitration des PTH (1-34) Liganden zum denaturierten PTH- Rezeptor.** Zu 50 nM SDS denaturiertem PTH-Rezeptor wurden insgesamt 110 nM PTH Peptid in 5nM Schritten zupipettiert. Die Messung erfolgte bei 25°C bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm in PTHR Messpuffer 1.

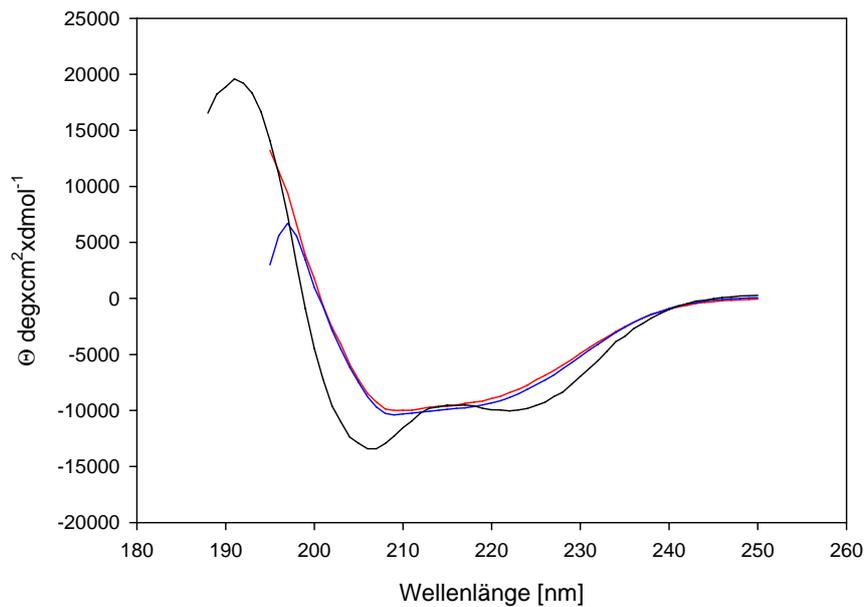


**Abbildung 29: Kontrollexperiment 3 Fluoreszenztitration des PTH (1-34) Peptides zum PTHR Messpuffer 1.** Zum PTHR Messpuffer 1 wurden insgesamt 150 nM PTH Peptid in 10 nM Schritten zupipettiert. Die Messung erfolgte bei 25°C und einer Anregungswellenlänge von 295 nm.

Alle drei Kontrollmessungen zeigen keinen Hinweis auf eine mögliche unspezifische Bindung des PTH Liganden (1-34). Es kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer spezifischen Interaktion des PTH Liganden mit dem Rezeptor ausgegangen werden. Die ermittelten Bindungsdaten und die daraus berechnete Dissoziationskonstanten konnten bisher leider noch nicht mit einer zweiten unabhängigen Bindungsmessung sicher bestätigt werden.

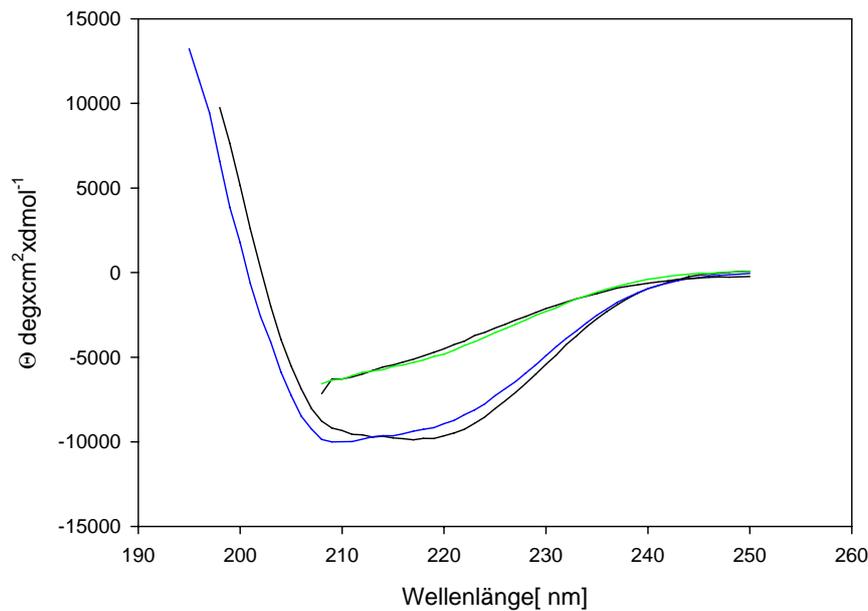
### III.3.2. Circulardichroismus

Um Aussagen über die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des isolierten Rezeptors treffen zu können, wurde der Rezeptor zunächst der Fern UV-CD-Spektroskopie unterzogen. Die Aufnahme solcher Spektren ermöglicht Aussagen über die einzelnen Anteile von Sekundärstrukturelementen an der Gesamtstruktur des zu untersuchenden Proteins. Weiterhin besteht die Möglichkeit der Beobachtung von Änderungen der Proteinstruktur aufgrund von Cofaktor- oder Ligandenbindung. Die Fern UV-CD-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 250 bis 190 nm aufgenommen. Das beste Signal- Rausch Verhältnis für die Spektrenaufnahme wurde bei Verwendung einer 1 mm Küvette und einer Proteinkonzentration von 15  $\mu$ M (1mg/ml) erzielt. Für die Messungen des PTH-Rezeptor-PTH Liganden Komplexes wurden die Konzentrationen so gewählt, dass sie gemäß der bestimmten Dissoziationskonstanten von 5,7 nM den Komplex zu mindestens 80% populieren.



**Abbildung 30: Fern UV-CD-Spektren des nativen PTH Rezeptors, Rezeptor im Komplex mit dem PTH Liganden und des freien PTH Liganden.** Die Spektren wurden bei 25°C in einer 1mm Küvette in PTHR Messpuffer 2 pufferkorrigiert aufgenommen. Die rote Linie zeigt das Spektrum des nativen PTH Rezeptors, während die blaue Linie den Rezeptor- Ligand Komplex zeigt. Die schwarze Linie zeigt das Spektrum des freien PTH Liganden.

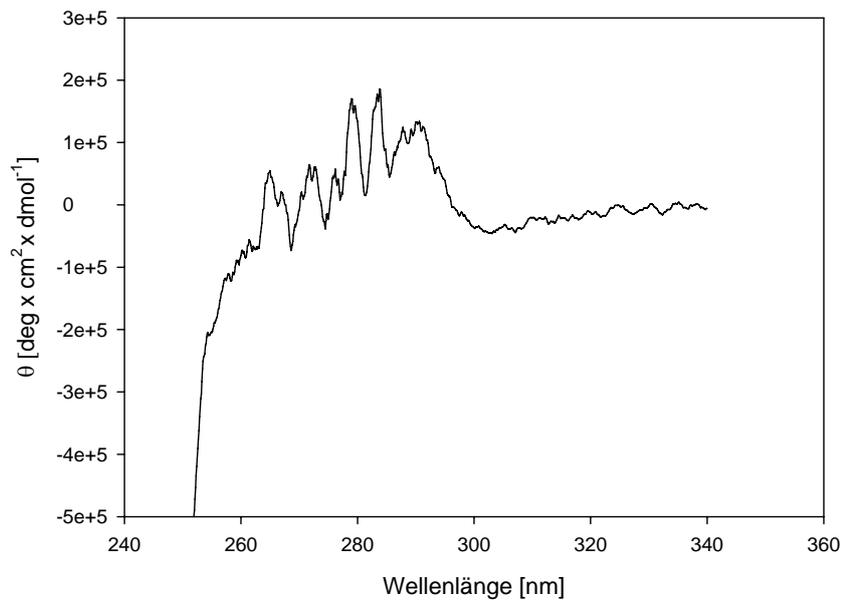
Das Fern UV-CD Spektrum des nativen PTH Rezeptors weist ein charakteristisches Minimum bei einer Wellenlängen von 207 nm auf. Dieses Minimum ist charakteristisch für  $\alpha$  helikale Strukturanteile. Der PTH Ligand als Peptidhormon mit definierter Sekundärstruktur in Lösung weist ein eigenes CD Spektrum auf, dessen Kurvenverlauf typisch für  $\alpha$ - helikale Strukturen ist. Weiterhin konnte nur eine sehr geringe Änderung der Sekundärstrukturen der beiden Bindungspartner bei Ausbildung des PTHR-PTH-Komplexes festgestellt werden. Es tritt hier allerdings ein deutliches Maxima bei 200 nm gegenüber dem Spektrum des PTH-Rezeptors auf. Es ist bisher nicht gesichert, ob diese Änderungen auf eine Strukturinduktion bei Bindung des Liganden zurückzuführen sind. Möglicherweise beobachtet man hier Änderungen in der Micellenstruktur des Detergenzes, die eventuell einen Einfluss auf die Konformation des eingeschlossenen PTH-Rezeptors haben und daher eine entsprechende Strukturänderung hervorrufen. Genaueres hierzu müssen aber entsprechende zusätzliche Experimente zeigen. Daher wird an dieser Stelle auf eine weitere Interpretation der aufgenommen Spektren verzichtet.



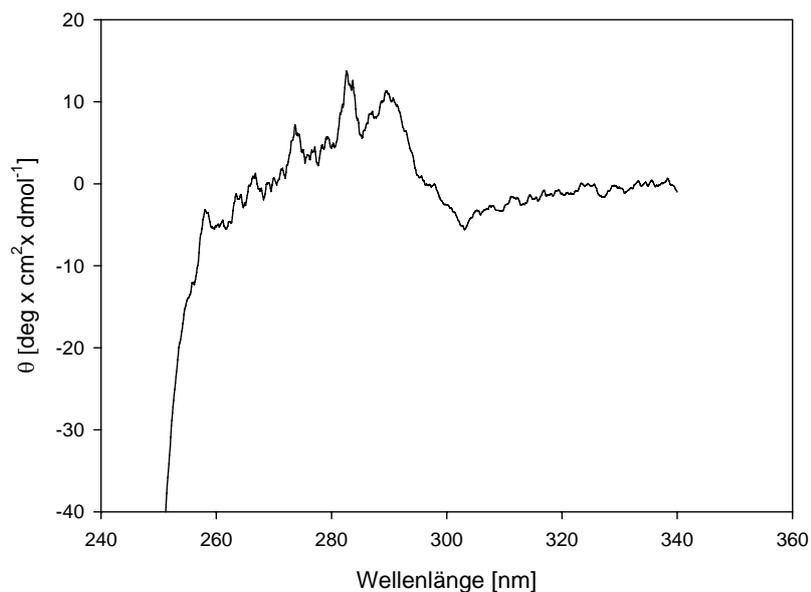
**Abbildung 31: Fern UV-CD Spektren des nativen (blau)-, des SDS denaturierten (schwarz)-, des Harnstoff denaturierten (grün)- und des Guanidiniumhydrochlorid denaturierten (braun) PTH Rezeptors.** Die Spektren wurden bei 25°C in einer 1mm Küvette in PTHR Messpuffer 2 aufgenommen und pufferkorrigiert.

Die aufgenommenen Fern UV-CD Spektren des nativen und des durch SDS, Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid denaturierten Rezeptors weisen deutliche strukturelle Änderungen auf. Die Denaturierung des Rezeptors durch die klassischen denaturierend wirkenden Substanzen Guanidiniumhydrochlorid und Harnstoff äußert sich in einer sehr deutlichen Abnahme des Fern-UV-CD Signals über den gesamten betrachteten Wellenlängenbereich. Es kommt durch diese beiden Substanzen, trotz des Zusatzes eines Detergenz, auch zur Denaturierung der stark hydrophoben und  $\alpha$  helikalen Transmembranbereiche. Der Zusatz von SDS äußert sich im Vergleich zu Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid in keiner vollständigen Denaturierung, sondern im Vorhandensein einer Reststruktur. Besonders die durch Guanidiniumhydrochlorid und Harnstoff denaturierten  $\alpha$  helikalen Transmembranbereiche scheinen strukturell intakt zu sein. Der denaturierende Effekt des SDS erstreckt sich wahrscheinlich nur auf einzelne Rezeptordomänen, zu denen möglicherweise die Ligandenbindende N- terminale Region und die kurze G-Protein bindende C- terminale Region gehören. Deren Denaturierung durch das SDS könnte die minimalen Unterschiede der Spektren zwischen nativen und SDS denaturierten Rezeptor erklären. Diese Messungen zeigen, dass zugesetztes SDS die strukturelle Integrität der hydrophoben Transmembranbereiche nicht vollständig zerstört, sondern wahrscheinlich nur weniger hydrophobe oder lösungsmittlexponierte geladene Strukturen aufgrund seiner eigenen starken negativen Ladung ändert. Diese strukturellen Veränderungen äußern sich allerdings in einem totalen Funktionsverlust des Rezeptors.

Aussagen über die asymmetrische Umgebung von aromatischen Proteinseitenketten und damit über die Tertiärstruktur lassen sich im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 350 nm im Nah-UV-Circulardichroismus Spektrum treffen. Zur Untersuchung der Tertiärstruktur des PTH Rezeptors wurden Nah-UV CD-Spektren im nativen und im denaturierten Zustand aufgenommen.



**Abbildung 32: Nah-UV-CD Spektrum des nativen PTH-Rezeptors.** Die Nah UV-CD Spektren einer  $15 \mu\text{M}$  ( $1\text{mg/ml}$ ) PTH Rezeptorlösung wurden in Messpuffer 2 in einer 1cm Küvette bei  $25^\circ\text{C}$  mit einer Integrationszeit von 7s bei einer Bandbreite von 1nm aufgenommen und jeweils 20 fach akkumuliert.



**Abbildung 33: Nah-UV-CD Spektrum des Guanidinhydrochlorid denaturierten PTH Rezeptors.** Die Aufnahme des Spektrums erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie für das Spektrum des nativen Rezeptors.

Im Wellenlängenbereich zwischen 270 und 290 nm sind Feinstrukturen mit einer deutlichen Intensität zu erkennen, die im Spektrum des denaturierten Rezeptors nicht vorhanden sind. Auch wird eine Abnahme der spektralen Intensität im Nah-UV-CD Spektrum des denaturierten Rezeptors beobachtet. Diese Abnahme ist typisch für ein chemisch denaturiertes Protein (Woody et al., 1996).

## IV. Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Etablierung eines Prozesses zur Gewinnung von funktionellem humanem Parathormonrezeptor basierend auf der rekombinanten Expression in *Escherichia coli*. Dieser Prozess lässt sich in drei Teilbereiche untergliedern: (1) die rekombinante Proteinproduktion im Fermentationsprozess, (2) die Reinigung des Proteins durch denaturierende chromatographische Verfahren, (3) die Renaturierung des gereinigten PTH Rezeptors. Die vorangegangenen Arbeiten von Grauschopf (Grauschopf et al., 2000) und Bazarsuren (Bazarsuren et al., 2002), die sich beide mit den hormonbindenden Domänen der PTH- bzw. GLP1-Rezeptors beschäftigten, schufen eine wesentliche Grundlage für die erforderlichen Maßnahmen zur rekombinanten Produktion vollständiger G-Protein gekoppelter Rezeptoren.

### IV.1. Prokaryontische Expression des humanen Parathormonrezeptors in *Escherichia coli*

Die Expression von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in *Escherichia coli* wird bisher noch recht selten angewandt, da sich das Rezeptorprotein hauptsächlich in Form von funktionslosen Aggregaten (*Inclusion bodies*) ablagert (Bane et al., 2007; Sarramegna et al., 2003). Diese Ablagerung von rekombinant hergestellten Proteinen in *Escherichia coli* ist ein häufig beobachtbares Phänomen (Marston, 1986), das besonders bei im nativen Zustand disulfidverbrückten Proteinen auftritt (Lilie et al., 1998). Daher müssen diese Proteine zur Wiedererlangung ihrer Funktionalität zusätzlich renaturiert werden. Dies erfordert die Entwicklung spezieller Verfahren, die dem jeweiligen Charakter des Proteins Rechnung tragen. Viele rekombinante Expressionsverfahren versuchen diesen Prozess der funktionellen Renaturierung zu vermeiden und exprimieren die Rezeptoren nativ in unterschiedlichen Expressionssystemen. Das klassische Expressionssystem für die funktionelle Expression G-Protein gekoppelter Rezeptoren ist die Zellkultur. Dieses System scheint allerdings nicht für die Produktion von größeren Mengen rekombinanten Rezeptorproteins geeignet. So zeigen Literaturdaten, dass in CHO Zellen (Grisshammer and Tate, 1995; Tate and Grisshammer, 1996) maximale Aktivitäten von 200 pmol/ mg Membranprotein erreicht werden (Lohse, 1992). In weiteren Fällen bewegen sich diese Aktivitäten in einem Bereich zwischen 0.3 pmol/mg Membranprotein (Felder et al., 1993) und 7 pmol/mg Membranprotein (Alexander et al., 2006; Turcatti et al., 1993). Diese Proteinmengen lassen sich unter Einbeziehung der Verluste durch die einzelnen Reinigungsoperationen allenfalls für einfache analytische Messungen verwenden, sie erreichen nicht das für eine detaillierte strukturelle Aufklärung

benötigte Niveau. Allerdings gelang die Herstellung von funktionellen PTH Rezeptor in HEK 293 Zellen mit Proteinausbeuten im Milligrammbereich (Gan et al., 2006).

In den letzten Jahren haben sich weitere Expressionssysteme für die funktionelle Expression solcher Rezeptoren etabliert. Besonders die Expression in Baculovirus infizierten Insektenzellen wird hierfür favorisiert (Akermoun et al., 2005). Die Aktivitäten an funktionellem Rezeptorprotein bewegen sich hier in einem Bereich von 40 pmol/mg Membranprotein bis zu 270 pmol/mg Membranprotein. Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der Ausbeute ist die in vitro Expression in einem zellfreien Umfeld (Klammt et al., 2004). Die Expressionsausbeuten werden hier mit 1 mg/ml bis 2.7 mg/ml Rezeptorprotein angegeben. Allerdings sind diese Ausbeuten bisher nur für sehr kleine Membranproteine beschrieben. Ein weiteres für die rekombinante Expression von GPCRs verwendetes System ist die Hefe (Andre et al., 2006). Die Ausbeuten liegen hier in ähnlichen Bereichen wie für die oben beschriebenen Systeme. Einen Überblick über die verschiedenen Expressionssysteme für GPCRs gibt Grisshammer (Grisshammer et al., 2005).

Da die mit diesen Systemen bisher erreichten Expressionraten nicht für eine eingehende strukturelle Untersuchung des PTH-Rezeptors ausreichen, wurde stattdessen die Möglichkeit der prokaryontischen Überexpression in *Escherichia coli* genutzt, um so ausreichend Untersuchungsmaterial zu erhalten. *Escherichia coli* ist weiterhin der genetisch am besten untersuchte Organismus und es stehen mittlerweile zahlreiche Vektoren zur Verfügung, die eine einfache Übertragung von Genen erlauben. Neben dem Vorteil einer umfangreichen gentechnischen Methodensammlung besitzt *Escherichia coli* Eigenschaften, die es erlauben diesen Organismus relativ einfach und in grossen Mengen anzuzüchten (Schwab, 1993).

Die Expression des Gesamtrezeptors war anfangs sehr gering und eindeutig nur im Western Blot nachweisbar. Das niedrige Expressionsniveau ist nicht durch eine schlechte Initiierung der Translation limitiert, da die theoretische Sekundärstrukturanalyse der messenger RNA keine stabilen Loop Regionen im Bereich der Ribosomenbindungsstelle aufwies, die eine Anlagerung des Ribosoms verhindert hätten (Mathews et al., 1999). Weiterhin weist die Codon Usage des PTH Rezeptors einige ungünstige Aminosäurecodons zu der von *Escherichia coli* auf (Chen and Inouye, 1990). Dieses Problem wurde aber durch den Einsatz eines *E. coli* Expressionsstammes mit zusätzlichen Plasmiden für die in Prokaryonten seltenen t-RNAs gelöst. Durch die Auswahl eines starken induzierbaren Promotorsystems sollten die cytotoxischen Effekte, die durch eine partielle Insertion des Rezeptors in die bakterielle Zellmembran aufgrund einer niedrigen Expressionrate auftreten (Kiefer et al., 2000) verhindert werden. All diese Maßnahmen führten allerdings nicht zu einer erhofften

Steigerung der Expression, so dass eine Konzentration auf die Analyse der Plasmidstabilität erfolgte. Die Nutzung von plasmidbasierten Expressionssystemen kann durch eine niedrige Plasmidstabilität stark beeinträchtigt werden (Ollis et al., 1982). Vor allem der Replikationsmechanismus hat entscheidenden Einfluss auf die Plasmidstabilität und diese ist maßgeblich an der Produktivität eines plasmidbasierten Expressionssystems beteiligt (Sharma, 1993). Da plasmidfreie Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber plasmidtragenden Zellen haben, kann eine geringe Stabilität das Überwachsen einer Kultur mit plasmidfreien oder plasmidarmen Zellen bedeuten, was dann zu einer verminderten Expression führt (Lee, 1996). Die Analyse der Plasmidstabilität durch parallele Plattierung auf selektiven und nicht selektiven Agarplatten zeigte eine unter den bisherigen Kultivierungsbedingungen äußerst niedrige Stabilität von durchschnittlich 20%. Die Ursache dieser niedrigen Stabilität der Plasmide war der nachlassende Selektionsdruck durch den enzymatischen Abbau des Antibiotikums. So wiesen Messungen der Aktivität der sezernierten  $\beta$ -Lactamase auf hohe Abbauraten des Ampicillins hin. Diese Ergebnisse zeigten, dass der Plasmidstabilisierung für eine erfolgreiche Expression eine Schlüsselrolle zufiehl. Die Verbesserung der Stabilität ist an zwei wesentliche Faktoren gekoppelt:

- Erhöhung des Selektionsdruckes durch ein abbaustabiles Antibiotikum
- Optimierung der Kultivierungsparameter.

Der Selektionsdruck konnte durch den Austausch von Ampicillin gegen Carbenicillin bedeutend gesteigert werden, da dessen enzymatischer Abbau durch die  $\beta$ -Lactamase stark verlangsamt ist. Aber auch die Kultivierungsbedingungen beeinflussen die Stabilität nicht unwesentlich. So wirkt sich beispielsweise ein niedriger Sauerstoffpartialdruck ungünstig auf die Stabilität aus (Ryan W., 1989; Wrigley-Jones C.A., 1993). Ähnliches gilt für den pH Wert und die Phosphationenkonzentration. Auch eine Erniedrigung der Kultivierungstemperatur zeigte einen negativen Einfluss, was eigentlich verwundert, da sich hier der Unterschied zwischen den Wachstumsgeschwindigkeiten von plasmidfreien und plasmidtragenden Zellen reduzieren sollte (Gupta et al., 1995). Kultivierungsmedien zeigen unterschiedliche Einflüsse. Definierte Glukosemedien führen zu erhöhter Stabilität als komplexe Glukose-limitierte Medien (O'Kennedy et al., 1995) Minimalmedien bewirken höhere Stabilitäten als solche mit Aminosäurezugabe (Shu S., 1992). Das Verhältnis von Kohlenstoff- zu Stickstoffquellen senkt die Plasmidstabilität bei steigenden Kohlenstoffanteil (Huang, 1994). Die Verwendung von Antischaummitteln zeigt allerdings keinen Einfluss auf die Plasmidstabilität (Koch, 1995).

So gelang es durch den Austausch von Ampicillin gegen Carbapenem den Selektionsdruck auf die bakterielle Kultur zu erhöhen, was zu einer Stabilisierung der Plasmide führte. Dieser Stabilisierungseffekt verbesserte die rekombinante Proteinexpression erheblich, so dass eine eindeutige Expressionsbande nachweisbar war. Unterstützend auf die Steigerung der Expression wirkte sich der Zusatz von 1% Glucose zum Kultivierungsmedium aus. Daher konnte auf Grundlage dieser Optimierungen ein Fermentationsprozess entwickelt werden.

## IV.2. Bakterielle Fermentation

Das Verfahren der biotechnologischen Fermentation eröffnet die Möglichkeit, aufgrund der optimalen Nährstoffversorgung und Umweltbedingungen hohe Ausbeuten an rekombinanten Proteinen zu erhalten. Die Entwicklung des Verfahrens orientierte sich an den Ergebnissen der vorab durchgeführten Experimente zur Optimierung der Ausbeute. Insbesondere die Stabilität der Plasmide musste im Bioreaktor gewährleistet sein. Grundlage des Verfahrens bildete die Fed Batch Fermentation (Yee and Blanch, 1992) in einem Hefeextrakt Vollmedium (Reiling, 1985). Dieses Verfahren ermöglicht einen kontinuierlichen Zufluss an Nährstoffen und Spurenelementen, so dass hier sehr hohe optische Dichten und damit hohe Ausbeuten erzielt werden. Aufgrund der Erfahrungen mit der im Kultivierungsmedium vorhandenen  $\beta$ -Lactamaseaktivität wurde das Verfahren so optimiert, dass dieser Einfluss auf ein Minimum gesenkt wurde. Die  $\beta$ -Lactamase wird bei *Escherichia coli* ins Periplasma exportiert und gelangt teilweise in das Medium (Georgiou, 1988). Um eine Übertragung der sezernierten  $\beta$ -Lactamase aus der Vorkultur auf den Fermenter zu verhindern, ist ein Waschen der Vorkultur vor der Inokulation nötig. Dieser Schritt verhindert den sofortigen Abbau des zugesetzten Antibiotikums, so dass ein plasmidstabilisierender Effekt am Anfang der Fermentation durch das Antibiotikum gegeben ist. Problematisch ist das Aufrechterhalten dieses Selektionsdruckes über den gesamten Fermentationszeitraum. Durch kontinuierliche Zugabe von Ampicillin zum Medium ist dies jedoch nur zum Teil möglich. Erst der Austausch von Ampicillin durch das abbaustabilere Carbapenem gewährleistet einen Selektionsdruck bei kontinuierlicher Zugabe im zweistündigen Rhythmus. Unterstützend auf die Stabilität wirkt sich ein hoher Sauerstoffpartialdruck von mind. 40%, ein konstanter pH-Wert von 6.8 und der Zusatz von Glukose aus. Unter diesen Fermentationsbedingungen erreicht man durchschnittliche Ausbeuten von 50-100 Milligramm Rezeptorprotein pro Liter Fermentationsmedium. So konnten aus 1000 g bakterieller Zellfeuchtmasse ungefähr 800-1000 mg Rezeptorprotein isoliert werden. Der PTH-Rzeptor weist allerdings eine starke Heterogenität der isolierten *Inclusion bodies* auf. Es kommt hier zu einem vorzeitigen

Abbruch der Elongation der Proteinkette, deren Ursache möglicherweise eine Substratlimitierung während der Hochzelllichtfermentation ist (Balbas and Bolivar, 1990). Durch Optimierung der Zufütterungsstrategien könnte dieser Effekt zukünftig minimiert werden.

Um den Prozess weiter zu optimieren erfolgte eine mathematische Modellierung anhand der Wachstumskurve von *Escherichia coli*, die auf experimentellen Prozessdaten beruht. Die kontinuierliche Approximation der Wachstumsdaten beschreibt eine exponentielle Funktion (Pirt, 1985). Die inneren Gesetzmäßigkeiten, die einen Zusammenhang zwischen der Veränderungsrate und dem Wachstum herstellen, führen zu sogenannten Ratengleichungen aus denen man die Wachstumsrate errechnen kann (Segel, 1980). Diese Ratengleichungen sind Differentialgleichungen, wobei Gleichungen die einer Wachstumsfunktion zugrunde liegen auch als Verhulstgleichung (Braun, 1979) bezeichnet werden. Eine mögliche analytische Lösung dieser Differentialgleichungen ist die logistische Kurve, die das bakterielle Wachstum im Fermenter recht gut beschreibt. Diese Gleichung lässt sich durch einfaches Differenzieren lösen (Abramowitz, 1972; Braun, 1979; Segel, 1980). Die Lösung der Gleichung zeigt die Abhängigkeit des Wachstums von zwei Faktoren, die einen Zusammenhang zwischen dem bakteriellen Wachstum und der Proteinproduktion aufgrund der Replikationsrate aufzeigen. Für die Berechnung der entsprechenden Parameter (Nährstoffkonzentration, Sauerstoffpartialdruck etc.) die ein optimales Wachstum ermöglichen fehlen allerdings die entsprechenden experimentellen Daten. Diese Daten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht gewonnen werden.

### **IV.3. Renaturierung des humanen Parathormonrezeptors**

Die Entwicklung von Renaturierungsprotokollen für G-Protein gekoppelte Rezeptoren steht im Gegensatz zu den gut etablierten Methoden für  $\beta$ -barrel Membranproteine (Jähnig, 1997) erst am Anfang (Bane et al., 2007; Kiefer et al., 1996). Aufgrund der unvollständigen Solubilisierung des PTH Rezeptors durch die klassischen chemischen Denaturierungsmittel Guanidinhydrochlorid und Harnstoff musste der Rezeptor durch SDS solubilisiert werden. Das SDS bindet aufgrund von starken hydrophoben Wechselwirkungen (Reynolds and Tanford, 1970) an den Rezeptor und denaturiert diesen durch Auflösung der Tertiärstruktur unter teilweiser Beibehaltung der Sekundärstrukturelemente (Gelamo and Tabak, 2000; Takeda et al., 1985). Die erfolgreiche Renaturierung setzt daher ein nahezu vollständiges Entfernen des SDS vom Rezeptor voraus, da bereits geringe Konzentrationen von 200  $\mu\text{mol}$  zur Ausbildung eines Molten Globule Zustandes führen können (Xu and Keiderling, 2004; Xu

and Keiderling, 2006). Das Entfernen von SDS aus proteinhaltigen Lösungen gelingt unter anderem mit zylinderförmigen Cyclodextrinen, die im Inneren eine starke hydrophobe Kavität aufweisen, und somit einen stabilen SDS-Cyclodextrinkomplex ausbilden (Rozema and Gellman, 1996a; Rozema and Gellman, 1996b). Für eine vollständige Komplexierung muss allerdings ein zehn bis zwölfmaliger molarer Überschuss an Cyclodextrin eingesetzt werden. Setzt man diese errechnete Masse an Cyclodextrin dem solubilisierten PTH Rezeptor zu, tritt sofortige Aggregation ein, die auch nicht durch den gleichzeitigen Zusatz eines nichtdenaturierenden Detergenzes verhindert werden kann. Die Komplexbildung hängt aber auch von einer Reihe äußerer Faktoren, wie z.B. der Temperatur ab. Diese Abhängigkeiten haben Einfluss auf die stöchiometrischen Verhältnisse zwischen Cyclodextrin und dem Gastmolekül, wobei dieses üblicherweise 1:1 ist (Parrish, 1987; Szejtli, 1982). Unter den für die Proteinrenaturierung üblicherweise benutzten Bedingungen, bewirkt der Zusatz von äquimolaren Mengen an Cyclodextrin keinerlei wirksame Komplexierung. Um die Komplexierung des an den Rezeptor hydrophob gebundenen SDS dennoch zu erreichen muss daher die Temperatur geändert werden. Sowohl die Reaktionskinetik (Komplexierungskinetik) aber auch die Stärke der hydrophoben Wechselwirkungen hängen direkt von der Temperatur ab. Beide Reaktionsparameter werden bei einer Absenkung der Temperatur ebenfalls kleiner. Unterstützend für das vollständige Entfernen des gebundenen SDS vom Rezeptor wirkt sich auch ein Absenken der Konzentration unterhalb der kritischen Micellenkonzentration durch Verdünnen aus. Der Rezeptor zeigt bei diesem Verdünnungsvorgang keinerlei Aggregation, da bereits nanomolare Konzentrationen von SDS auf alpha helikale Transmembran Bereiche stabilisierend wirken (Micelli et al., 2004). Senkt man anschließend die Temperatur unter Zusatz von Cyclodextrin im stöchiometrischen Verhältnis von 1:2 auf  $-20^{\circ}\text{C}$  ab, bewirkt dies die Kristallbildung von Wasser und damit eine Minimierung der Hydrophobizität. Ist diese Kristallbildung vollständig wird die Temperatur wieder auf  $4^{\circ}\text{C}$  angehoben, und das Cyclodextrin komplexiert wahrscheinlich während dieser Temperaturerhöhung das SDS. Gleichzeitig stabilisiert sich der Cyclodextrin-SDS Komplex aufgrund des Anstiegs der Temperatur (Asche, 1990; Hirsenkorn, 1994). Die Aggregation des Rezeptors wird durch den Einbau der Transmembranbereiche in die sich ausbildenden Micellen des zweiten milden und nichtdenaturierend wirkenden Detergenzgemisches verhindert. Dieses Detergenzgemisch darf aufgrund seiner Eigenschaften nicht oder nur mit geringer Affinität vom Cyclodextrin komplexiert werden. Dies erreicht man durch anspruchsvolle stereochemische Strukturen (Aromaten, Verzweigungen), eine niedrige kritische Micellenkonzentration oder eine kurze Alkylkette. Die Mischung aus Cyclohexyl-n-

hexyl- $\beta$ -D-maltosid und n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid erfüllt diese drei Bedingungen und wird daher mit einer bedeutend niedrigeren Affinität als das SDS vom Cyclodextrin komplexiert (Loftsson, 1998; Loftsson et al., 1998; Loftsson and Olafsson, 1998; Loftsson and Petersen, 1998). Zur weiteren Unterstützung der Proteinfaltung sollte der niedermolekulare Faltungshelfer Arginin verwendet werden. Dieses niedermolekulare Faltungshilfsagens unterdrückt dabei die unproduktive Aggregation von Polypeptidketten oder Faltungsintermediaten während des Rückfaltungsprozesses, stabilisiert allerdings den nativen Zustand nicht (De Bernardez Clark et al., 1999; Lin and Timasheff, 1996; Reddy et al., 2005; Rudolph, 1998). Die Molekulare Grundlage hierfür ist der GAP Effekt (Baynes et al., 2005). Für diesen Effekt muss man allerdings sehr hohe Konzentrationen an Arginin verwenden, was zwangsläufig zu einer hohen Ionenstärke führt. Diese hohe Ionenstärke verschiebt die kritische Micellenkonzentration des SDS zu niedrigeren Werten (Reynolds and Tanford, 1970). Diese Verschiebung wirkt sich ungünstig auf das Komplexierungsverhalten aus, so dass der Rezeptor entweder denaturiert oder aggregiert. Daher wurde auf diesen niedermolekularen Faltungshelfer trotz seiner begünstigenden Wirkung auf den Renaturierungsprozess verzichtet. Zur Ausbildung des für die Rezeptorfunktion wichtigen Disulfidbrückenmusters wurde ein Redoxpuffer mit einem Gemisch aus reduziertem und oxidiertem Glutathion im molaren Verhältnis von 5:1 verwendet. Dies ermöglicht ein schnelles Reshuffling von bereits falsch ausgebildeten Disulfidbrücken (Lilie et al., 1998). Mit Hilfe dieses entwickelten Verfahrens gelang es eine Bindung des Liganden an den Rezeptor durch Fluoreszenzmessungen nachzuweisen. Die Ausbeute aufgrund dieser Messungen betrug ca. 30-50 % an renaturiertem Rezeptor. Das Fern UV-CD Spektrum des nativen PTH Rezeptors weist eine ausgeprägte Sekundärstruktur bestehend aus unterschiedlichen Anteilen von alpha helikalen und beta sheet Strukturen auf, die durch den Einsatz chemischer Denaturierungsmittel aufgelöst werden konnten. Über die Aufnahme von Nah-UV-CD Spektren gibt es einen Hinweis, dass verschiedene Bereiche des Rezeptors in Tertiärkontakte involviert sind. Für eine weitere Absicherung dieser Ergebnisse sind allerdings noch weitere Messungen nötig. Auch das Problem der Abtrennung des renaturierten Rezeptors vom inaktiven Rezeptor muss noch gelöst werden.

#### **IV.4. Ligandenbindung**

Die Bindung des PTH Liganden an den renaturierten Rezeptor konnte qualitativ durch Fluoreszenztitration in Lösung nachgewiesen werden. Diese Messungen ergaben eine Dissoziationskonstante von 5.7 nM. Da man bei der Ligandenbindung von GPCR's von einer

Wechselwirkung im Verhältnis von 1:1 ausgehen kann, ist eine inhomogene Rezeptorspezies bestehend aus unterschiedlichen Anteilen von nativen und denaturierten Rezeptor sehr wahrscheinlich. Bindungsmessungen mittels der Isothermalen Titrationskalorimetrie könnten eindeutig die Stöchiometrie der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor aufklären. Messungen mit diesem Verfahren konnten bisher nur in Ansätzen durchgeführt werden, wobei hier Effekte zu beobachten sind, die auf die Micellenbildung durch das Detergenz zurückzuführen sind. Diese müssen daher erst durch geeignete experimentelle Verfahren kompensiert werden, was bisher noch nicht gelungen ist. Die bisherige auf einer stöchiometrischen Annahme von 1:1 beruhende Bindungsaffinität von 5.7 nM ist etwas niedriger als die für den zellkulturexprimierten Gesamtrezeptor mit 0.5 nM-3.4 nM. Diese schlechtere Affinität kann mehrere Ursachen haben. So zeigen Experimente, dass die Affinität von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in vielen Fällen, wie im Beispiel des Serotonin 5-HT<sub>1a</sub>-Rezeptors (Bertin et al., 1992) und der humanen Opioid Rezeptoren (Stanasila et al., 1999), abhängig von der funktionellen Kopplung der trimeren G-Proteine an den Rezeptor ist. Es konnte so gezeigt werden, dass nach Expression dieser Rezeptoren in der Zellmembran von *Escherichia coli* eine Zugabe von G-Proteinen zur Membranpräparation zur Ausbildung eines hochaffinen Bindungszustandes führt. Die fehlende Glykosylierung der N-terminalen Domäne im prokaryontischen Expressionssystem könnte eine Herabsetzung der Bindungsfähigkeit im Vergleich mit dem glykosylierten Gesamtrezeptor bewirken. Karpf und Mitarbeiter (Karpf et al., 1987) beschrieben die Kompetitierung der Ligandenbindung an den PTH-Rezeptor durch Weizenkeimagglutinin. Dieses Protein bindet mit hoher Spezifität an die Zuckerreste des glykosylierten Rezeptors. Sie schlußfolgerten daraus eine mögliche Beteiligung der angefügten Zuckerketten direkt an der Ligandenbindung. Die Rolle der Glykosylierung scheint aber eher in der korrekten Verteilung der Rezeptoren und der Kontrolle deren Expression zu liegen, als in der Wechselwirkung mit Liganden (Beck-Sickinger, 1996). Beispielsweise wurde im Falle des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors bei Inhibierung der Glykosylierung durch Tunicamycin kein Einfluß auf die Ligandenbindung gefunden (George et al., 1986). Die Blockierung der PTH Bindung an den an Weizenkeimagglutinin gebundenen Rezeptor erfolgt möglicherweise durch eine sterische Behinderung der Ausbildung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung. Die Glykosylierungsstellen liegen alle in dem C-terminalen Bereich der N-terminalen, extrazellulären Rezeptordomäne, dem eine wichtige Rolle bei der Komplexbildung zugeschrieben wird. Gewißheit über einen Einfluß von Zuckerketten auf die Bindungsaffinität läßt sich aber erst durch weitere vergleichende Bindungsstudien mit dem deglykosylierten und glykosylierten Gesamtrezeptor erreichen.

Spektroskopisch ließen sich geringe Signaländerungen bei der Ausbildung des Komplexes feststellen. Ob diese einer Strukturänderung und/oder Umgebungsänderung des Liganden oder des Rezeptors zuzuschreiben sind, konnte aber nicht zweifelsfrei festgestellt werden. Wie NMR-Messungen gezeigt haben, ist der PTH Ligand auch im ungebundenen Zustand teilweise strukturiert (Marx et al., 1995) und besteht aus einem Ensemble unterschiedlichster Konformationen wie kürzere Peptidliganden (Gomez, 1997). Mutagenese- und Deletionsexperimente am PTH-Liganden weisen daraufhin, dass für die Ausbildung molekularer Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand bereits Strukturdetails im PTH Liganden vorliegen müssen (Barden and Kemp, 1994; Cohen et al., 1991; Marx et al., 1998). Es scheint sich somit bei der Hormon-Rezeptor-Bindung um eine Wechselwirkung zwischen zwei strukturierten Molekülen zu handeln, deren Peptidrückgrate schon vor Bindung eine ausgebildete Struktur besitzen. Dies wird im allgemeinen bei Wechselwirkungen größerer Proteinmoleküle, wie der Interaktion zwischen Proteinantigenen mit Antikörpern oder zwischen bestimmten Enzymen und ihren Inhibitorproteinen, beschrieben (Gomez, 1997). Bei kleineren Peptiden wird dagegen häufig von einer Strukturausbildung des Peptids erst im gebundenen Zustand ausgegangen (Creighton, 1993). Das Vorliegen einer Struktur im ungebundenen PTH-Liganden schließt aber dennoch eine mögliche Strukturänderung bei Ausbildung des Komplexes nicht aus. Die Bindung zwischen PTH-Rezeptor und PTH scheint eine Beeinflussung der Ligandenstruktur im gebundenen Zustand durch äußere Parameter zuzulassen, wodurch es zu einer partiellen Denaturierung kommen könnte. Dies wiederum hätte eine unkooperative Dissoziation zur Folge. Eine Strukturaufhebung des Liganden, sowie der Dissoziationsprozess konnten jedoch mit den gewählten Meßmethoden nicht detektiert werden. Die Wechselwirkung zwischen dem PTH Liganden und dem PTH Rezeptor scheint überwiegend hydrophober Natur zu sein. Der PTH Ligand selbst zeichnet sich durch einen hohen Anteil an unpolaren Aminosäuren aus (Leucin, Valin). Durch Mutageneseexperimente am Gesamtrezeptor konnte die Wichtigkeit hydrophober Aminosäuren am C-terminalen Ende der N-terminalen, extrazellulären Domäne für die Ligandenbindung nachgewiesen und bestätigt werden (Carter et al., 1999). So konnte gezeigt werden, daß Rezeptor-Interaktionen der Region Ser3 bis His14 des PTH-Liganden durch Mutationen in den Aminosäuren 182 bis 190 des PTH-Rezeptors beeinflusst werden. Dabei war die Art der Mutationen entscheidend für die Änderung der Bindungsaffinität. Eine Substitution der beiden hydrophoben Aminosäurereste Phe184 und Leu187 durch polare Aminosäuren resultierte in einer 10fachen bis 50fachen Reduktion der spezifischen PTH-Bindung. Ein Austausch mit unpolaren Aminosäuren, wie Valin oder Methionin ergab nur

eine zweifache Reduktion der spezifischen Ligandenbindung. Ob die Änderung der Bindungsaffinität dabei über eine direkte Störung der molekularen Wechselwirkung zwischen PTH und Rezeptor, oder über eine Strukturänderung des PTH-Rezeptors erfolgte, konnte aus diesen Experimenten nicht ersehen werden. Rolz und Mitarbeiter (Rolz et al., 1999) weisen dagegen auf starke Coulombinteraktionen hin, die in ihrem computergenerierten Bindungsmodell eine entscheidende Rolle bei der Bindung des Liganden spielen sollen. Sie verwenden zur Modellbildung, neben durch *cross-linking* identifizierten Interaktionspunkten, die in einer Lipidumgebung gewonnene NMR-Struktur eines Fragments des humanen PTH-Rezeptors, das die Aminosäureseitenketten 168 bis 198 umfasst. Dieses Fragment, das Teile der ersten Transmembranhelix beinhaltet, besteht darüberhinaus aus zwei amphipathischen Helices (Seitenketten 169 bis 176, und 180 bis 189), die auf der Oberfläche einer Lipidmizelle liegen. Helix Arg180–Met189 soll laut Modell mit der C-terminalen Helix des PTH-Liganden über Coulomb-Interaktionen in Wechselwirkung treten. Dabei wird auf die große Anzahl geladener Aminosäureseitenketten in der Region Thr177–Arg186 des PTH-Rezeptors und in der C-terminalen Helix des PTH-Liganden verwiesen. Es ist jedoch fraglich und in keiner Weise nachgewiesen, daß dieses untersuchte Fragment tatsächlich eine Struktur ausbildet, die derjenigen im Gesamtrezeptor entspricht.

Die experimentell ermittelten Daten zeigen, dass der humane PTH Rezeptor in *Escherichia coli* als inaktives *Inclusion body* Protein in grossen Mengen hergestellt werden kann. Nach erfolgter Renaturierung bindet der PTH Rezeptor seinen Liganden und zeigt eine ausgeprägte Sekundärstruktur. Weitere Messungen müssen diese Daten festigen und noch ungelöste Probleme klären.

## V. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung und Etablierung von Methoden zur Produktion ausreichender Proteinmengen des humanen Parathormonrezeptors. Durch die rekombinante Überexpression in *Escherichia coli* sollte dies ermöglicht werden. Focussiert wurde hierbei die Expression in Form von funktionslosen *Inclusion bodies*.

Zunächst erfolgte die Klonierung des PTH-Rezeptorgens in verschiedene Vektorsysteme, wobei für die unlösliche Expression die Vektoren pET 11a und pET 15b der Firma Novagen verwendet wurden. Die Entscheidung fiel hierbei auf den Expressionsvektor pET 15b, da dieser einen Histidin Tag besitzt der nachfolgende Reinigungen vereinfacht. Die rekombinante Expression war anfangs sehr niedrig und eindeutig nur mittels Western Blot nachweisbar. Verantwortlich hierfür ist eine sehr niedrige Plasmidstabilität, deren Ursache ein schnell nachlassender Selektionsdruck ist. Massnahmen die zur Erhöhung und Stabilisierung des Selektionsdruckes beitragen führten auch zu einem massiven Anstieg der Proteinausbeute. Mittels Fermentation besteht so die Möglichkeit ausreichend PTH-Rezeptor in Form von funktionslosen *Inclusion bodies* herzustellen.

Die Renaturierung des PTH-Rezeptors erfolgte durch eine modifizierte Variante des *Artificial Chaperone* Systems, wobei hier Ausbeuten von 30-50% an nativen löslichen Proteins erreicht wurden.

Durch die in der Arbeit etablierte Methode besteht nun die Möglichkeit, den PTH-Rezeptor in größeren Mengen als *Inclusion bodies* rekombinant herzustellen. Bei einer weiteren Optimierung der Renaturierung wäre eine Steigerung der Ausbeute an nativen Rezeptor zu erwarten. Vorteilhaft wäre hier sicherlich ein Austausch der bisher verwendeten Detergentien durch Lipidsysteme.

Die Arbeit stellt eine solide Grundlage zur weiteren Optimierung der Expression, Renaturierung und Reinigung des PTH-Rezeptors dar, so dass in naher Zukunft eine umfassende Charakterisierung durchführbar wird.

## VI. Ausgewählte Literatur

- Abramowitz, M., Stegun, I.A. (1972). Handbook of mathematical functions. Dover Publications, New York.
- Adams, A. E., Bisello, A., Chorev, M., Rosenblatt, M., and Suva, L. J. (1998). Arginine 186 in the extracellular N-terminal region of the human parathyroid hormone 1 receptor is essential for contact with position 13 of the hormone. *Mol Endocrinol* 12, 1673-1683.
- Akermoun, M., Koglin, M., Zvalova-Iooss, D., Folschweiller, N., Dowell, S. J., and Gearing, K. L. (2005). Characterization of 16 human G protein-coupled receptors expressed in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif* 44, 65-74.
- Alexander, S. P., Mathie, A., and Peters, J. A. (2006). Guide to receptors and channels, 2nd edition. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 3, S1-168.
- Altenbach, C., Klein-Seetharaman, J., Cai, K., Khorana, H. G., and Hubbell, W. L. (2001). Structure and function in rhodopsin: mapping light-dependent changes in distance between residue 316 in helix 8 and residues in the sequence 60-75, covering the cytoplasmic end of helices TM1 and TM2 and their connection loop CL1. *Biochemistry* 40, 15493-15500.
- Andre, N., Cherouati, N., Prual, C., Steffan, T., Zeder-Lutz, G., Magnin, T., Pattus, F., Michel, H., Wagner, R., and Reinhart, C. (2006). Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Sci* 15, 1115-1126.
- Ango, F., Robbe, D., Tu, J. C., Xiao, B., Worley, P. F., Pin, J. P., Bockaert, J., and Fagni, L. (2002). Homer-dependent cell surface expression of metabotropic glutamate receptor type 5 in neurons. *Mol Cell Neurosci* 20, 323-329.
- Asche (1990). Cyclodextrine. *Chemische Produktion* 9, 50-51.
- Ausubel, F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., & Struhl K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc.
- Balbas, P., and Bolivar, F. (1990). Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 185, 14-37.
- Bane, S. E., Velasquez, J. E., and Robinson, A. S. (2007). Expression and purification of milligram levels of inactive G-protein coupled receptors in *E. coli*. *Protein Expr Purif* 52, 348-355.
- Barden, J. A., and Kemp, B. E. (1994). Stabilized NMR structure of the hypercalcemia of malignancy peptide PTHrP[Ala-26](1-34)amide. *Biochim Biophys Acta* 1208, 256-262.
- Bartl, F., Ritter, E., and Hofmann, K. P. (2000). FTIR spectroscopy of complexes formed between metarhodopsin II and C-terminal peptides from the G-protein alpha- and gamma-subunits. *FEBS Lett* 473, 259-264.
- Baynes, B. M., Wang, D. I., and Trout, B. L. (2005). Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry* 44, 4919-4925.
- Bazarsuren, A., Grauschopf, U., Wozny, M., Reusch, D., Hoffmann, E., Schaefer, W., Panzner, S., and Rudolph, R. (2002). In vitro folding, functional characterization, and disulfide pattern of the extracellular domain of human GLP-1 receptor. *Biophys Chem* 96, 305-318.
- Beck-Sickinger (1996). Structural characterization and binding sites of G-protein-coupled receptors. *DDT* 1, 502-513.
- Behar, V., Nakamoto, C., Greenberg, Z., Bisello, A., Suva, L. J., Rosenblatt, M., and Chorev, M. (1996a). Histidine at position 5 is the specificity "switch" between two parathyroid hormone receptor subtypes. *Endocrinology* 137, 4217-4224.
- Behar, V., Pines, M., Nakamoto, C., Greenberg, Z., Bisello, A., Stueckle, S. M., Bessalle, R., Usdin, T. B., Chorev, M., Rosenblatt, M., and Suva, L. J. (1996b). The human PTH2 receptor:

- binding and signal transduction properties of the stably expressed recombinant receptor. *Endocrinology* 137, 2748-2757.
- Bek, M. J., Zheng, S., Xu, J., Yamaguchi, I., Asico, L. D., Sun, X. G., and Jose, P. A. (2001). Differential expression of adenylyl cyclases in the rat nephron. *Kidney Int* 60, 890-899.
- Bermak, J. C., and Zhou, Q. Y. (2001). Accessory proteins in the biogenesis of G protein-coupled receptors. *Mol Interv* 1, 282-287.
- Bertin, B., Freissmuth, M., Breyer, R. M., Schutz, W., Strosberg, A. D., and Marullo, S. (1992). Functional expression of the human serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor in *Escherichia coli*. Ligand binding properties and interaction with recombinant G protein alpha-subunits. *J Biol Chem* 267, 8200-8206.
- Birnbaumer, L., Pohl, S. L., and Rodbell, M. (1969). Adenyl cyclase in fat cells. 1. Properties and the effects of adrenocorticotropin and fluoride. *J Biol Chem* 244, 3468-3476.
- Birnbaumer, L., Pohl, S. L., and Rodbell, M. (1971). The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. II. Comparison between glucagon- and fluoride-stimulated activities. *J Biol Chem* 246, 1857-1860.
- Birnbaumer, L., and Rodbell, M. (1969). Adenyl cyclase in fat cells. II. Hormone receptors. *J Biol Chem* 244, 3477-3482.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bisello, A., Adams, A. E., Mierke, D. F., Pellegrini, M., Rosenblatt, M., Suva, L. J., and Chorev, M. (1998). Parathyroid hormone-receptor interactions identified directly by photocross-linking and molecular modeling studies. *J Biol Chem* 273, 22498-22505.
- Black, J. (1989). Nobel lecture in physiology or medicine--1988. Drugs from emasculated hormones: the principle of syntopic antagonism. *In Vitro Cell Dev Biol* 25, 311-320.
- Blomstrand, S., Claesson, I., and Save-Soderbergh, J. (1985). A case of lethal congenital dwarfism with accelerated skeletal maturation. *Pediatr Radiol* 15, 141-143.
- Bockaert, J., and Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18, 1723-1729.
- Booden, M. A., Siderovski, D. P., and Der, C. J. (2002). Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes G alpha q-coupled activation of RhoA. *Mol Cell Biol* 22, 4053-4061.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Braun, M. (1979). *Differentialgleichungen und ihre Anwendungen*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Bringhurst, F. R., Stern, A. M., Yotts, M., Mizrahi, N., Segre, G. V., and Potts, J. T., Jr. (1989a). Peripheral metabolism of [<sup>35</sup>S]parathyroid hormone in vivo: influence of alterations in calcium availability and parathyroid status. *J Endocrinol* 122, 237-245.
- Bringhurst, F. R., Zajac, J. D., Daggett, A. S., Skurat, R. N., and Kronenberg, H. M. (1989b). Inhibition of parathyroid hormone responsiveness in clonal osteoblastic cells expressing a mutant form of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol* 3, 60-67.
- Brown, E. M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M. A., Lytton, J., and Hebert, S. C. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366, 575-580.
- Carter, P. H., Shimizu, M., Luck, M. D., and Gardella, T. J. (1999). The hydrophobic residues phenylalanine 184 and leucine 187 in the type-1 parathyroid hormone (PTH) receptor functionally interact with the amino-terminal portion of PTH-(1-34). *J Biol Chem* 274, 31955-31960.

- Chen, G. F., and Inouye, M. (1990). Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids Res* 18, 1465-1473.
- Chevalley, T., and Rizzoli, R. (1999). [Bone and hormones. Effects of parathyroid hormone on the bone]. *Presse Med* 28, 547-553.
- Chidiac, P., Hebert, T. E., Valiquette, M., Dennis, M., and Bouvier, M. (1994). Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* 45, 490-499.
- Cohen, F. E., Strewler, G. J., Bradley, M. S., Carlquist, M., Nilsson, M., Ericsson, M., Ciardelli, T. L., and Nissenson, R. A. (1991). Analogues of parathyroid hormone modified at positions 3 and 6. Effects on receptor binding and activation of adenylyl cyclase in kidney and bone. *J Biol Chem* 266, 1997-2004.
- Columbus, L., and Hubbell, W. L. (2002). A new spin on protein dynamics. *Trends Biochem Sci* 27, 288-295.
- Creighton, T. E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*. 2nd edn H Freeman and Company, New York.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (1997a). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390, 88-91.
- Daaka, Y., Pitcher, J. A., Richardson, M., Stoffel, R. H., Robishaw, J. D., and Lefkowitz, R. J. (1997b). Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2180-2185.
- Dale, H. H. (1906). On some physiological actions of ergot. *J Physiol* 34, 163-206.
- De Bernardez Clark, E., Schwarz, E., and Rudolph, R. (1999). Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol* 309, 217-236.
- de Vries, D. S., Bruin, M. C., Bierings, M., and Revesz, T. (2000). [Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: indication for allogeneic stem cell transplantation]. *Ned Tijdschr Geneesk* 144, 1596-1598.
- Dempster, D. W., Cosman, F., Parisien, M., Shen, V., and Lindsay, R. (1993). Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev* 14, 690-709.
- Devillers-Thierry, A., Galzi, J. L., Eisele, J. L., Bertrand, S., Bertrand, D., and Changeux, J. P. (1993). Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: a prototype of ligand-gated ion channels. *J Membr Biol* 136, 97-112.
- Erhlich, P. (1913). *Lancet* 2, 445-451.
- Ernst, O. P., and Bartl, F. J. (2002). Active states of rhodopsin. *Chembiochem* 3, 968-974.
- Fahmy, K., Siebert, F., and Sakmar, T. P. (1995). Photoactivated state of rhodopsin and how it can form. *Biophys Chem* 56, 171-181.
- Farrens, D. L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W. L., and Khorana, H. G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274, 768-770.
- Felder, C. C., MacArthur, L., Ma, A. L., Gusovsky, F., and Kohn, E. C. (1993). Tumor-suppressor function of muscarinic acetylcholine receptors is associated with activation of receptor-operated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1706-1710.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272.
- French, C., Keshavarz-Moore E., Ward J.M. (1996). Development of a simple method for the recovery of recombinant proteins from the *Escherichia coli* periplasm. *Enzyme Microbiol Technol* 19, 332-338.
- Furchgott, R. F. (1967). The pharmacological differentiation of adrenergic receptors. *Ann N Y Acad Sci* 139, 553-570.
- Furchgott, R. F. (1970). Pharmacological characteristics of adrenergic receptors. *Fed Proc* 29, 1352-1361.

- Gaidarov, I., Santini, F., Warren, R. A., and Keen, J. H. (1999). Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat Cell Biol* 1, 1-7.
- Galvez, T., Duthey, B., Kniazeff, J., Blahos, J., Rovelli, G., Bettler, B., Prezeau, L., and Pin, J. P. (2001). Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *Embo J* 20, 2152-2159.
- Gan, L., Alexander, J. M., Wittelsberger, A., Thomas, B., and Rosenblatt, M. (2006). Large-scale purification and characterization of human parathyroid hormone-1 receptor stably expressed in HEK293S GnTI- cells. *Protein Expr Purif* 47, 296-302.
- Gardella, T. J., and Juppner, H. (2000). Interaction of PTH and PTHrP with their receptors. *Rev Endocr Metab Disord* 1, 317-329.
- Gardella, T. J., Luck, M. D., Fan, M. H., and Lee, C. (1996a). Transmembrane residues of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor that specifically affect binding and signaling by agonist ligands. *J Biol Chem* 271, 12820-12825.
- Gardella, T. J., Luck, M. D., Jensen, G. S., Schipani, E., Potts, J. T., Jr., and Juppner, H. (1996b). Inverse agonism of amino-terminally truncated parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide (PTHrP) analogs revealed with constitutively active mutant PTH/PTHrP receptors. *Endocrinology* 137, 3936-3941.
- Gardella, T. J., Luck, M. D., Jensen, G. S., Usdin, T. B., and Juppner, H. (1996c). Converting parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) into a potent PTH-2 receptor agonist. *J Biol Chem* 271, 19888-19893.
- Gelamo, E. L., and 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, 2255-2271.
- George, S. T., Ruoho, A. E., and Malbon, C. C. (1986). N-glycosylation in expression and function of beta-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 261, 16559-16564.
- Georgiou, G., Shuler M.L., Wilson D.B. (1988). Release of periplasmic enzymes and other physiological effects of  $\beta$ -Lactamase overproduction in Escherichia coli. *Biotechnol Bioeng* 32, 741-748.
- Gether, U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 21, 90-113.
- Gether, U., Ballesteros, J. A., Seifert, R., Sanders-Bush, E., Weinstein, H., and Kobilka, B. K. (1997a). Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility. *J Biol Chem* 272, 2587-2590.
- Gether, U., and Kobilka, B. K. (1998). G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 273, 17979-17982.
- Gether, U., Lin, S., Ghanouni, P., Ballesteros, J. A., Weinstein, H., and Kobilka, B. K. (1997b). Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *Embo J* 16, 6737-6747.
- Gilman, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56, 615-649.
- Goltzman, D. (1978a). Examination of the requirement for metabolism of parathyroid hormone in skeletal tissue before biological action. *Endocrinology* 102, 1555-1562.
- Goltzman, D. (1978b). Parathyroid hormone and hyperparathyroidism: current concepts. *Can J Surg* 21, 285-289.
- Gomez, J. F. E. (1997). *Thermodynamic Approach to Molecular Design*. Bioscience.
- . *Structure-Based Drug Design: Thermodynamics, Modeling and Strategy* (eds J E Ladbury and P R Connelly) Landes Bioscience.
- Grauschopf, U., Lilie, H., Honold, K., Wozny, M., Reusch, D., Esswein, A., Schafer, W., Rucknagel, K. P., and Rudolph, R. (2000). The N-terminal fragment of human parathyroid

- hormone receptor 1 constitutes a hormone binding domain and reveals a distinct disulfide pattern. *Biochemistry* 39, 8878-8887.
- Grisshammer, R., and Tate, C. G. (1995). Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev Biophys* 28, 315-422.
- Grisshammer, R., White, J. F., Trinh, L. B., and Shiloach, J. (2005). Large-scale expression and purification of a G-protein-coupled receptor for structure determination -- an overview. *J Struct Funct Genomics* 6, 159-163.
- Gronwald, W., Schomburg, D., Tegge, W., and Wray, V. (1997). Assessment by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of the structural behaviour of human parathyroid-hormone-related protein(1-34) and its close relationship with the N-terminal fragments of human parathyroid hormone in solution. *Biol Chem* 378, 1501-1508.
- Grossmann, J. G., Crawley, J. B., Strange, R. W., Patel, K. J., Murphy, L. M., Neu, M., Evans, R. W., and Hasnain, S. S. (1998). The nature of ligand-induced conformational change in transferrin in solution. An investigation using X-ray scattering, XAFS and site-directed mutants. *J Mol Biol* 279, 461-472.
- Guhan, N., and Lu, B. (2004). Homer-PIKE complex: a novel link between mGluRI and PI 3-kinase. *Trends Neurosci* 27, 645-648.
- Gupta, R., Sharma, P., and Vyas, V. V. (1995). Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid, pCPPS-31, in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 41, 29-37.
- Hall, R. A., Premont, R. T., Chow, C. W., Blitzer, J. T., Pitcher, J. A., Claing, A., Stoffel, R. H., Barak, L. S., Shenolikar, S., Weinman, E. J., *et al.* (1998). The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Nature* 392, 626-630.
- Hamm, H. E. (1998). The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273, 669-672.
- Hargrave, P. A., McDowell, J. H., Curtis, D. R., Wang, J. K., Juszczak, E., Fong, S. L., Rao, J. K., and Argos, P. (1983). The structure of bovine rhodopsin. *Biophys Struct Mech* 9, 235-244.
- Hashim, S., Li, Y., and Anand-Srivastava, M. B. (2006). G protein-linked cell signaling and cardiovascular functions in diabetes/hyperglycemia. *Cell Biochem Biophys* 44, 51-64.
- Hirsenkorn (1994). Molekulare Zuckertüten mit vielfältigen Aufgaben. *Werk+Wirken* 6, 6-9.
- Holtzhauer (1996). Methoden in der Proteinanalytik.
- Huang, C. T., Peretti S.W., Bryers J.D. (1994). Effects of medium carbon to nitrogen ratio on biofilm formation and plasmid stability. *Biotechnol Bioeng* 44, 329-336.
- Jähnig, F., Surrey T. (1997). Folding and Insertion of Proteins into Membranes. *Membrane Protein Assembly*.
- Ji, T. H., Grossmann, M., and Ji, I. (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 273, 17299-17302.
- Jobert, A. S., Zhang, P., Couvineau, A., Bonaventure, J., Roume, J., Le Merrer, M., and Silve, C. (1998). Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Invest* 102, 34-40.
- Juppner, H. (1994). Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient family of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3, 371-378.
- Juppner, H., Schipani, E., Bringham, F. R., McClure, I., Keutmann, H. T., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M., Abou-Samra, A. B., Segre, G. V., and Gardella, T. J. (1994). The extracellular amino-terminal region of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor determines the binding affinity for carboxyl-terminal fragments of PTH-(1-34). *Endocrinology* 134, 879-884.
- Karnik, S. S., Sakmar, T. P., Chen, H. B., and Khorana, H. G. (1988). Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8459-8463.

- Karpf, D. B., Arnaud, C. D., King, K., Bambino, T., Winer, J., Nyiredy, K., and Nissenson, R. A. (1987). The canine renal parathyroid hormone receptor is a glycoprotein: characterization and partial purification. *Biochemistry* 26, 7825-7833.
- Kenakin, T. (1997a). Agonist-specific receptor conformations. *Trends Pharmacol Sci* 18, 416-417.
- Kenakin, T. (1997b). Protean agonists. Keys to receptor active states? *Ann N Y Acad Sci* 812, 116-125.
- Kenakin, T. (2001). Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *Faseb J* 15, 598-611.
- Kennedy, M. E., and Limbird, L. E. (1993). Mutations of the alpha 2A-adrenergic receptor that eliminate detectable palmitoylation do not perturb receptor-G-protein coupling. *J Biol Chem* 268, 8003-8011.
- Khundmiri, S. J., and Lederer, E. (2002). PTH and DA regulate Na-K ATPase through divergent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F512-522.
- Khundmiri, S. J., Rane, M. J., and Lederer, E. D. (2003). Parathyroid hormone regulation of type II sodium-phosphate cotransporters is dependent on an A kinase anchoring protein. *J Biol Chem* 278, 10134-10141.
- Kiefer, H., Krieger, J., Olszewski, J. D., Von Heijne, G., Prestwich, G. D., and Breer, H. (1996). Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli*: purification, reconstitution, and ligand binding. *Biochemistry* 35, 16077-16084.
- Kiefer, H., Vogel, R., and Maier, K. (2000). Bacterial expression of G-protein-coupled receptors: prediction of expression levels from sequence. *Receptors Channels* 7, 109-119.
- Kim, J.-Y., Ryu D.D.Y. (1991). The Effects of plasmid content, transcription efficiency and translation efficiency on the productivity of a cloned gene product in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 38, 1271-1279.
- Kjelsberg, M. A., Cotecchia, S., Ostrowski, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992). Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *J Biol Chem* 267, 1430-1433.
- Klabunde, T., and Hessler, G. (2002). Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem* 3, 928-944.
- Klammt, C., Lohr, F., Schafer, B., Haase, W., Dotsch, V., Ruterjans, H., Glaubitz, C., and Bernhard, F. (2004). High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur J Biochem* 271, 568-580.
- Klein-Seetharaman, J. (2002). Dynamics in rhodopsin. *Chembiochem* 3, 981-986.
- Klein, S., Reuveni, H., and Levitzki, A. (2000). Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3219-3223.
- Kleizen, B., and Braakman, I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 16, 343-349.
- Kobilka, B. K., and Gether, U. (1998). Examination of ligand-induced conformational changes in the beta 2-adrenergic receptor by fluorescence spectroscopy. *Adv Pharmacol* 42, 470-473.
- Koch, V., Ruffer H.M., Schügerl K., Innertsberger E., Menzel H., Weis J. (1995). Effects of antifoam agents on the medium and microbial cell properties and process performance in small and large reactors. *Process Biochem* 30, 435-446.
- Kolakowski, L. F., Jr. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2, 1-7.
- Krupnick, J. G., and Benovic, J. L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 289-319.

- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407, 971-977.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-209.
- Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311-319.
- Langley, J. N. (1901). Observations on the physiological action of extracts of the supra-renal bodies. *J Physiol* 27, 237-256.
- Langley, J. N. (1909a). On degenerative changes in the nerve endings in striated muscle, in the nerve plexus on arteries, and in the nerve fibres of the frog. *J Physiol* 38, 504-512.
- Langley, J. N. (1909b). On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of 'receptive' substances: Part IV. The effect of curari and of some other substances on the nicotine response of the sartorius and gastrocnemius muscles of the frog. *J Physiol* 39, 235-295.
- Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S., Caron, M. G., and Barak, L. S. (1999). The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3712-3717.
- Lee, C., Luck, M. D., Juppner, H., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M., and Gardella, T. J. (1995). Homolog-scanning mutagenesis of the parathyroid hormone (PTH) receptor reveals PTH-(1-34) binding determinants in the third extracellular loop. *Mol Endocrinol* 9, 1269-1278.
- Lee, S. Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 14, 98-105.
- Leff, P. (1995a). Inverse agonism: theory and practice. *Trends Pharmacol Sci* 16, 256.
- Leff, P. (1995b). The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 16, 89-97.
- Lefkowitz, R. J. (1993). G-protein-coupled receptors. Turned on to ill effect. *Nature* 365, 603-604.
- Lefkowitz, R. J., Cotecchia, S., Kjelsberg, M. A., Pitcher, J., Koch, W. J., Inglese, J., and Caron, M. G. (1993). Adrenergic receptors: recent insights into their mechanism of activation and desensitization. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 28, 1-9.
- Lefkowitz, R. J., and Premont, R. T. (1993). Diseased G protein-coupled receptors. *J Clin Invest* 92, 2089.
- Lilie, H., Schwarz, E., and Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* 9, 497-501.
- Lin, T. Y., and Timasheff, S. N. (1996). On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Sci* 5, 372-381.
- Loftsson, T. (1998). Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers. *Pharmazie* 53, 733-740.
- Loftsson, T., Masson, M., Sigurdsson, H. H., Magnusson, P., and Le Goffic, F. (1998). Cyclodextrins as co-enhancers in dermal and transdermal drug delivery. *Pharmazie* 53, 137-139.
- Loftsson, T., and Olafsson, J. H. (1998). Cyclodextrins: new drug delivery systems in dermatology. *Int J Dermatol* 37, 241-246.
- Loftsson, T., and Petersen, D. S. (1998). Cyclodextrin solubilization of ETH-615, a zwitterionic drug. *Drug Dev Ind Pharm* 24, 365-370.
- Lohse, M. J. (1992). Stable overexpression of human beta 2-adrenergic receptors in mammalian cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 345, 444-451.
- Luttrell, L. M., Daaka, Y., and Lefkowitz, R. J. (1999a). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 177-183.

- Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., *et al.* (1999b). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655-661.
- Malbon, C. C. (2004). Insulin signalling: putting the 'G-' in protein-protein interactions. *Biochem J* 380, e11-12.
- Mannstadt, M., Juppner, H., and Gardella, T. J. (1999). Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol* 277, F665-675.
- Mannstadt, M., Luck, M. D., Gardella, T. J., and Juppner, H. (1998). Evidence for a ligand interaction site at the amino-terminus of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor from cross-linking and mutational studies. *J Biol Chem* 273, 16890-16896.
- Marston, F. A. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J* 240, 1-12.
- Marullo, S., Emorine, L. J., Strosberg, A. D., and Delavier-Klutchko, C. (1990). Selective binding of ligands to beta 1, beta 2 or chimeric beta 1/beta 2-adrenergic receptors involves multiple subsites. *Embo J* 9, 1471-1476.
- Marx, U. C., Adermann, K., Bayer, P., Meyer, M., Forssmann, W. G., and Rosch, P. (1998). Structure-activity relation of NH2-terminal human parathyroid hormone fragments. *J Biol Chem* 273, 4308-4316.
- Marx, U. C., Austermann, S., Bayer, P., Adermann, K., Ejchart, A., Sticht, H., Walter, S., Schmid, F. X., Jaenicke, R., Forssmann, W. G., and *et al.* (1995). Structure of human parathyroid hormone 1-37 in solution. *J Biol Chem* 270, 15194-15202.
- Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D. H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 288, 911-940.
- McClarín, J. A., Frederick, C. A., Wang, B. C., Greene, P., Boyer, H. W., Grable, J., and Rosenberg, J. M. (1986). Structure of the DNA-Eco RI endonuclease recognition complex at 3 Å resolution. *Science* 234, 1526-1541.
- Micelli, S., Meleleo, D., Picciarelli, V., Stoico, M. G., and Gallucci, E. (2004). Effect of nanomolar concentrations of sodium dodecyl sulfate, a catalytic inductor of alpha-helices, on human calcitonin incorporation and channel formation in planar lipid membranes. *Biophys J* 87, 1065-1075.
- Mielke, T., Alexiev, U., Glasel, M., Otto, H., and Heyn, M. P. (2002). Light-induced changes in the structure and accessibility of the cytoplasmic loops of rhodopsin in the activated MII state. *Biochemistry* 41, 7875-7884.
- Mitlak, B. H., Burdette-Miller, P., Schoenfeld, D., and Neer, R. M. (1996). Sequential effects of chronic human PTH (1-84) treatment of estrogen-deficiency osteopenia in the rat. *J Bone Miner Res* 11, 430-439.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and 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.
- Munro, S., Thomas, K. L., and Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65.
- Nacken, V., Achstetter, T., and Degryse, E. (1996). Probing the limits of expression levels by varying promoter strength and plasmid copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 175, 253-260.
- Nathans, J., and Hogness, D. S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* 34, 807-814.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M., and Upton, S. J. (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* 28, 239-242.

- Nobles, M., Benians, A., and Tinker, A. (2005). Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18706-18711.
- Noel, J. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTP  $\gamma$ S. *Nature* 366, 654-663.
- O'Kennedy, R., Houghton, C. J., and Patching, J. W. (1995). Effects of growth environment on recombinant plasmid stability in *Saccharomyces cerevisiae* grown in continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 44, 126-132.
- Okada, T., Fujiyoshi, Y., Silow, M., Navarro, J., Landau, E. M., and Shichida, Y. (2002). Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5982-5987.
- Ollis, C. A., Munro, D. S., and Tomlinson, S. (1982). Characteristics of thyrotrophin-stimulated cyclic AMP production in cultured human thyroid cells from thyrotoxic tissue and non-toxic goitres. *J Endocrinol* 95, 237-244.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4, 2411-2423.
- 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., *et al.* (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.
- Parrish, M. A. (1987). Cyclodextrins-a review. *Speciality Chemicals* 12.
- Pierce, K. L., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.
- Pirt, S. J. (1985). Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh.
- Pitcher, J. A., Freedman, N. J., and Lefkowitz, R. J. (1998a). G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67, 653-692.
- Pitcher, J. A., Hall, R. A., Daaka, Y., Zhang, J., Ferguson, S. S., Hester, S., Miller, S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., and Barak, L. S. (1998b). The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin. *J Biol Chem* 273, 12316-12324.
- Plotkin, H., Gundberg, C., Mitnick, M., and Stewart, A. F. (1998). Dissociation of bone formation from resorption during 2-week treatment with human parathyroid hormone-related peptide-(1-36) in humans: potential as an anabolic therapy for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2786-2791.
- Potts, J. T., Jr., Gardella, T. J., Juppner, H., and Kronenberg, H. (1997a). The history of parathyroid hormone and its receptor: structure-based design of parathyroid hormone analogues. *Osteoporos Int* 7 Suppl 3, S169-173.
- Potts, J. T., Jr., Gardella, T. J., Juppner, H., and Kronenberg, H. M. (1997b). Structure based design of parathyroid hormone analogs. *J Endocrinol* 154 Suppl, S15-21.
- Rana, B. K., and Insel, P. A. (2002). G-protein-coupled receptor websites. *Trends Pharmacol Sci* 23, 535-536.
- Reddy, K. R., Lilie, H., Rudolph, R., and Lange, C. (2005). L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. *Protein Sci* 14, 929-935.
- Reeve, J. (1996). The European Prospective Osteoporosis Study. *Osteoporos Int* 6 Suppl 3, 16-18.
- Reeves, P. J., Thurmond, R. L., and Khorana, H. G. (1996). Structure and function in rhodopsin: high level expression of a synthetic bovine opsin gene and its mutants in stable mammalian cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11487-11492.
- Reiling, H. E., Laurila, H., and Fiechter, A. (1985). Mass-Culture of *Escherichia coli* Medium Development for Low and High-Density Cultivation of *Escherichia coli*-B/R in Minimal and Complex Media. *J Biotechnol* 2, 191-206.

- Reynolds, J. A., and Tanford, C. (1970). The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J Biol Chem* 245, 5161-5165.
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L., and Krans, H. M. (1971). The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* 246, 1877-1882.
- Rolz, C., Pellegrini, M., and Mierke, D. F. (1999). Molecular characterization of the receptor-ligand complex for parathyroid hormone. *Biochemistry* 38, 6397-6405.
- Ross, E. M., and Gilman, A. G. (1977). Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem* 252, 6966-6969.
- Ross, E. M., and Wilkie, T. M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 69, 795-827.
- Rozema, D., and Gellman, S. H. (1996a). Artificial chaperone-assisted refolding of carbonic anhydrase B. *J Biol Chem* 271, 3478-3487.
- Rozema, D., and Gellman, S. H. (1996b). Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme: modulation of the competition between renaturation and aggregation. *Biochemistry* 35, 15760-15771.
- Rudolph, R., Böhm G., Lilie H., Jaenicke R. (1998). *Protein Function: A Practical Approach* (ed TE Creighton), 57-99.
- Ryan W., P. S. J., Stark B.C. (1989). Expression of  $\beta$ -Lactamase by recombinant *Escherichia coli* strains containing plasmids of different sizes-effects of pH, phosphate and dissolved oxygen. *Biotechnol Bioeng* 37, 345-352.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Santini, F., and Keen, J. H. (2002). A glimpse of coated vesicle creation? Well almost! *Nat Cell Biol* 4, E230-232.
- Sarramegna, V., Talmont, F., Demange, P., and Milon, A. (2003). Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. *Cell Mol Life Sci* 60, 1529-1546.
- Schipani, E., Kruse, K., and Juppner, H. (1995). A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science* 268, 98-100.
- Schipani, E., Langman, C., Hunzelman, J., Le Merrer, M., Loke, K. Y., Dillon, M. J., Silve, C., and Juppner, H. (1999). A novel parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mutation in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3052-3057.
- Schipani, E., Langman, C. B., Parfitt, A. M., Jensen, G. S., Kikuchi, S., Kooh, S. W., Cole, W. G., and Juppner, H. (1996). Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *N Engl J Med* 335, 708-714.
- Schipani, E., Lanske, B., Hunzelman, J., Luz, A., Kovacs, C. S., Lee, K., Pirro, A., Kronenberg, H. M., and Juppner, H. (1997). Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13689-13694.
- Schwab (1993). *Principles of genetic engineering for Escherichia coli*. Pühler A (Edt) *Biotechnology Volume 2 Genetic Fundamentals and Genetic Engineering*, 373-426.
- Schwartz, T. W., and Rosenkilde, M. M. (1996). Is there a 'lock' for all agonist 'keys' in 7TM receptors? *Trends Pharmacol Sci* 17, 213-216.
- Segel, L. A. (1980). *Mathematical models in molecular and cellular biology*. Cambridge University Press, London.
- Sharma (1993). Insights into plasmid biology. *Curr Sci* 64, 283-285.

- Shichida, Y., and Imai, H. (1998). Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals. *Cell Mol Life Sci* 54, 1299-1315.
- Shu S., S. M. L. (1992). Amino acid supplementation decreases plasmid retention in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 40, 1197-1202.
- Smrcka, A. V., Hepler, J. R., Brown, K. O., and Sternweis, P. C. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* 251, 804-807.
- Spiegel, A. M. (1996). Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annu Rev Physiol* 58, 143-170.
- Stanasila, L., Massotte, D., Kieffer, B. L., and Pattus, F. (1999). Expression of delta, kappa and mu human opioid receptors in *Escherichia coli* and reconstitution of the high-affinity state for agonist with heterotrimeric G proteins. *Eur J Biochem* 260, 430-438.
- Strader, C. D., Fong, T. M., Graziano, M. P., and Tota, M. R. (1995). The family of G-protein-coupled receptors. *Faseb J* 9, 745-754.
- Stryer, L. (1986). Cyclic GMP cascade of vision. *Annu Rev Neurosci* 9, 87-119.
- Stryer, L., and Bourne, H. R. (1986). G proteins: a family of signal transducers. *Annu Rev Cell Biol* 2, 391-419.
- Sutherland, E. W. (1971). Cyclic AMP. An Introduction (Robisson GA et al,eds), 5-13.
- Suva, L. J., Winslow, G. A., Wettenhall, R. E., Hammonds, R. G., Moseley, J. M., Diefenbach-Jagger, H., Rodda, C. P., Kemp, B. E., Rodriguez, H., Chen, E. Y., and et al. (1987). A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 237, 893-896.
- Szejtli (1982). Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. *Akademiai Kiado Budapest* 24.
- Szundi, I., Mah, T. L., Lewis, J. W., Jager, S., Ernst, O. P., Hofmann, K. P., and Kliger, D. S. (1998). Proton transfer reactions linked to rhodopsin activation. *Biochemistry* 37, 14237-14244.
- Takeda, K., Takahashi, K., and Batra, P. P. (1985). Kinetic aspects of the interaction of horse heart cytochrome c with sodium dodecyl sulfate. *Arch Biochem Biophys* 236, 411-417.
- Tate, C. G., and Grisshammer, R. (1996). Heterologous expression of G-protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol* 14, 426-430.
- Teller, D. C., Okada, T., Behnke, C. A., Palczewski, K., and Stenkamp, R. E. (2001). Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Biochemistry* 40, 7761-7772.
- Terrillon, S., Barberis, C., and Bouvier, M. (2004). Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1548-1553.
- Tsunoda, S., Sierralta, J., Sun, Y., Bodner, R., Suzuki, E., Becker, A., Socolich, M., and Zuker, C. S. (1997). A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* 388, 243-249.
- Turcatti, G., Cezkowski, K., and Chollet, A. (1993). Biochemical characterization and solubilization of human NK2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Recept Res* 13, 639-652.
- Turner, P. R., Bambino, T., and Nissenson, R. A. (1996). Mutations of neighboring polar residues on the second transmembrane helix disrupt signaling by the parathyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 10, 132-139.
- Usdin, T. B., Gruber, C., and Bonner, T. I. (1995). Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem* 270, 15455-15458.
- van Koppen, C. J., and Nathanson, N. M. (1990). Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. *J Biol Chem* 265, 20887-20892.

- Villardaga, J. P., Bunemann, M., Krasel, C., Castro, M., and Lohse, M. J. (2003). Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol* 21, 807-812.
- Wess, J., Liu, J., Blin, N., Yun, J., Lerche, C., and Kostenis, E. (1997). Structural basis of receptor/G protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model systems. *Life Sci* 60, 1007-1014.
- Williams, B., Granholm, A. C., and Sambamurti, K. (2007). Age-dependent loss of NGF signaling in the rat basal forebrain is due to disrupted MAPK activation. *Neurosci Lett* 413, 110-114.
- Woody, R. W., Sugeta, H., and Kodama, T. S. (1996). [Circular dichroism of proteins: recent developments in analysis and prediction]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 41, 56-69.
- Wrigley-Jones C.A., R. H., Thomas C.R., Ward J.M. (1993). Stability of plasmid vector pIJ 303 in *Streptomyces lividans*. *Biotechnol Bioeng* 41, 148-155.
- Xu, Q., and Keiderling, T. A. (2004). Effect of sodium dodecyl sulfate on folding and thermal stability of acid-denatured cytochrome c: a spectroscopic approach. *Protein Sci* 13, 2949-2959.
- Xu, Q., and Keiderling, T. A. (2006). Stop-flow kinetics studies of the interaction of surfactant, sodium dodecyl sulfate, with acid-denatured cytochrome c. *Proteins* 63, 571-580.
- Yeagle, P. L., and Albert, A. D. (2007). G-protein coupled receptor structure. *Biochim Biophys Acta* 1768, 808-824.
- Yeagle, P. L., Bennett, M., Lemaitre, V., and Watts, A. (2007). Transmembrane helices of membrane proteins may flex to satisfy hydrophobic mismatch. *Biochim Biophys Acta* 1768, 530-537.
- Yee, L., and Blanch, H. W. (1992). Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 10, 1550-1556.
- Zaman, M. H., Berry, R. S., and Sosnick, T. R. (2002). Entropic benefit of a cross-link in protein association. *Proteins* 48, 341-351.
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22, 537-548.
- Zhang, J., Barak, L. S., Winkler, K. E., Caron, M. G., and Ferguson, S. S. (1997). A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J Biol Chem* 272, 27005-27014.
- Zhang, P., Jobert, A. S., Couvineau, A., and Silve, C. (1998). A homozygous inactivating mutation in the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor causing Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 3365-3368.
- Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Lehto, V. P., and Kornfeld, S. (2001). Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor. *Science* 292, 1716-1718.

## VII. Anhang

### VII.1. Mathematische Beschreibung der Wachstumskurve der Fermentation (Abschnitt III.1.2.3)

Die logistische Kurve beschreibt den Fermentationsverlauf, aber nicht die Faktoren, denen das Wachstum unterliegt. Das Wachstum der bakteriellen Zellkultur muss als deren Veränderung beschrieben werden. Dies gelingt mit der Bildung des Differenzenquotienten  $Q$  der Funktion  $b(t)$ , der auch als durchschnittliche Veränderung von  $b(t)$  bezeichnet wird. Dieser lautet dann im Intervall von  $t$  ( $t_1 \leq t \leq t_2$ )

$$Q[t_1, t_2] = \frac{b(t_2) - b(t_1)}{t_2 - t_1}. \quad \text{[Gl. III.1.2.3.1]}$$

Die durchschnittliche Veränderung ist allerdings nur für Intervalle wie dem gegebenen erklärt. Um jedem Zeitpunkt  $t$  in der Fermentationsdauer eine Veränderungsrate  $b'(t)$  der Zellzahl  $b$  zuzuordnen muss die Funktion differenziert bzw. abgeleitet werden.

$$\frac{db}{dt} = \frac{b(t + \tau) - b(t)}{\tau} \quad \text{[Gl. III.1.2.3.2]}$$

$\tau$  entspricht hier der durchschnittlichen Veränderung aus Gleichung III.1.2.3.1 für das Zeitintervall  $[t, t + \tau]$  ( $\tau > 0$ ), wobei  $\tau$  hier gegen Null tendiert, so dass das Zeitintervall auf einen Zeitpunkt  $t$  zusammenschmilzt.

Man ist nun in der Lage, einen Zusammenhang zwischen der Veränderungsrate  $b'(t)$  und dem bakteriellen Wachstum  $b(t)$  herzustellen. Unter der Annahme, dass die Veränderungsrate  $b'(t)$  proportional dem Wachstum  $b(t)$  ist ergibt sich ein Proportionalitätsfaktor  $P$  der beide Größen in einer Differentialgleichung miteinander verknüpft

$$b'(t) = Pb(t) \quad \text{mit } P > 0 \text{ und } t \geq 0. \quad \text{[Gl. III.1.2.3.3]}$$

Der eingeführte Proportionalitätsfaktor  $P$  besitzt die Dimension einer Zeit. Mit Hilfe der Differentialgleichung III.1.2.3.3 lässt sich das Wachstum der bakteriellen Zellkultur beschreiben, allerdings erklärt diese Gleichung die Wachstumsstagnation nach beginnender Promotorinduktion nicht. Man benötigt hierzu einen weiteren Faktor der auf der rechten Seite der Gleichung installiert werden muss. Dieser Faktor muss einen Zusammenhang zwischen beginnender Proteinproduktion und dem bakteriellen Wachstum herstellen. Leider liegen hierzu keine ausreichenden experimentellen Daten vor, so dass dieser Zusammenhang momentan nicht analytisch geklärt werden kann. Durch Einführung eines Faktors  $U$  der das aufgezeigte Problem berücksichtigt, lässt sich die Gleichung III.1.2.3.3 dennoch dahingehend erweitern.

$$\boxed{b'(t) = Pb(t) - \frac{P}{U}b(t) = Pb(t) \left[ 1 - \frac{b(t)}{U} \right]} \quad [\text{Gl. III.1.2.3.4}]$$

Man hat nun eine Differentialgleichung zur Verfügung, die bei bekanntem funktionellem Zusammenhang eine exakte Beschreibung des Fermentationsprozesses erlaubt. Eine mögliche analytische Lösung dieser Differentialgleichung ist die logistische Kurve  $L(t)$ , die den Wachstumsverlauf der bakteriellen Zellkultur in Abbildung recht gut beschreibt. Die logistische Kurve stellt eine zentrale Funktion in der Populationsdynamik dar und lautet folgendermaßen:

$$\boxed{L(t) = \frac{a}{1 + \exp(b - ct)}} \quad [\text{Gl. III.1.2.3.5}]$$

Zur Lösung muß man diese Gleichung nach den bekannten Regeln differenzieren. Als erste dieser Regeln nutzt man die Quotientenregel mit

$$a = x(t), 1 + \exp(b - ct) = y(t) \quad [\text{Gl. III.1.2.3.6}]$$

Dann gilt die Ableitung der elementaren Funktion  $x(t)$

$$x(t) = x'(t) = 0 \quad [\text{Gl. III.1.2.3.7}]$$

und für die Funktion  $y(t)$  die Summenregel

$$y(t) = y'(t) = (\exp(b - ct))' \quad [\text{Gl. III.1.2.3.8}]$$

Dieser Ausdruck muss nun nach der Kettenregel weiter abgeleitet werden

$$y'(t) = \exp(b - ct)(b - ct)' \quad [\text{Gl. III.1.2.3.9}]$$

Die Summenregel liefert

$$y'(t) = \exp(b - ct)(-c). \quad [\text{Gl. III.1.2.3.10}]$$

Die logistische Kurve lässt sich nun mit der Quotientenregel und den abgeleiteten Elementarfunktionen Gl. III.1.2.3.7 und Gl. III.1.2.3.10 differenzieren

$$L'(t) = \frac{-x(t)y'(t)}{y(t)^2} = \frac{ac \times \exp(b - ct)}{(1 + \exp(b - ct))^2} \quad [\text{Gl. III.1.2.3.11}]$$

Diese Ableitung beschreibt nun die Veränderungsrate der logistischen Funktion an der Stelle  $t \geq 0$ . Zur besseren Interpretation des Ergebnisses rechnet man weiter

$$L'(t) = \frac{a}{1 + \exp(b - ct)} \times \frac{c \times \exp(b - ct)}{1 + \exp(b - ct)} \quad [\text{Gl. III.1.2.3.12}]$$

$$\boxed{L(t)c \times \left[ 1 - \frac{1}{1 + \exp(b - ct)} \right]} = L(t)c \times \left[ 1 - \frac{L(t)}{a} \right] \quad [\text{Gl. III.1.2.3.13}]$$

Hier zeigt sich nun, dass die logistische Kurve eine Lösung der Differentialgleichung III.1.2.3.4 mit den Parametern  $P = c$  und  $U = a$  ist. Der Parameter  $c$  der logistischen Kurve ist

dem Proportionalitätsfaktor P und der Parameter a dem Faktor U gleichzusetzen. Beide Parameter erhalten so eine biologische Bedeutung. Als letzte Größe deren Bedeutung noch unklar ist, verbleibt noch der Parameter b in der logistischen Gleichung. Durch die Bedingung des Zeitpunktes  $t = 0$  am Fermentationsbeginn lässt sich die Gleichung für die logistische Kurve folgendermaßen schreiben

$$L(0) = \frac{a}{1 + \exp(b)} \quad \text{[Gl.III.1.2.3.14]}$$

$$b = \ln\left(\frac{a}{L(0)} - 1\right) \quad \text{[Gl.III.1.2.3.15]}$$

Der Parameter b ist also mit dem Anfangswert  $L(0)$  der Wachstumsfunktion verknüpft. Dieser Anfangswert wird von der Differentialgleichung zur Beschreibung des Fermentationsverlaufes allerdings nicht mit erfasst.

Durch die Anwendung mathematischer Verfahren auf die experimentellen Daten des bakteriellen Wachstums im Fermenter ist es gelungen, eine Differentialgleichung in Form der Gleichung III.1.2.3.4 zu finden, die den Mechanismus des Fermentationsprozesses beschreibt. Als eine Lösung dieser Gleichung konnte die logistische Kurve (Gl.III.1.2.3.5) mit den Parameter  $a = U$  und  $c = P$  gefunden werden. Der Fermentationsprozess wird also durch die Faktoren U und P gesteuert. Der Faktor U stellt einen Zusammenhang zwischen dem bakteriellem Wachstum und der Proteinproduktion her, während der Faktor P die Replikationsrate beschreibt.

**VII.2. Verwendete Abkürzungen**

bp	Basenpaare
CD	Circulardicroismus
c-AMP	cyclisches Adenosin-5-monophosphat)
c-GMP	cyclisches Guanosin-5-monophosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GDP	Guanosin-5-diphosphat
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GLP	Glukagon-like-peptid
GSH	Glutathion reduziert ( $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycin)
GSSG	Glutathion oxidiert
GTP	Guanosin-5-triphosphat
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IMAC	Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie
LBR	Ligandenbindungsregion
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorbition ionization time-of-flight</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PTH	Parathyroid Hormon
PTHr	Parathyroid-Hormon-Rezeptor
RP-HPLC	Umkehrphasen HPLC
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

## **Worte des Dankes**

*An dieser Stelle sei allen Personen gedankt, die am Entstehen und Fortgang dieser Arbeit Anteil hatten.*

*Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph möchte ich für die Vergabe des hochinteressanten und spannenden Themas danken. Weiterhin danke ich Ihm für die Unterstützung, sowie für die zahlreichen Ideen und Vorschläge, die ich sicherlich nicht immer quantitativ befolgt habe, obwohl sie sich sehr oft als äußerst hilfreich erwiesen.*

*Besonders Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Antje Kuntzsch, Frau Dr. Ariuna Basazuren und bei Frau Dr. Ulla Grauschopf, für die herausragende Betreuung und Unterstützung in den ersten Monaten meiner Promotion.*

*Auch Herrn Dr. Hauke Lilie gebührt besonderer Dank. Mit Ihm konnte man jederzeit über Probleme die während des Verlaufes der Arbeit auftraten konstruktiv diskutieren. So mancher Lösungsvorschlag oder experimentelle Ansatz erwies sich hierbei als „goldrichtig“. Weiterhin verdanke ich Ihm einen Einblick in die Geheimnisse der Proteinfaltung.*

*Frau Dr. Christine Magg danke ich für die konstruktiven Diskussionen biophysikalischer Probleme und für die kritische Korrektur meiner Arbeit.*

*Herrn Dr. Norman Koglin danke ich für die Durchführung der Synthese und der Tritium Markierung des PTH-Peptides sowie für die Durchführung zahlreicher radioaktiver Bindungsstudien.*

*Meinem ehemaligen „HiWi“ Christiane Harnisch möchte ich für die Geduld und Ausdauer bei der Durchführung der zahlreichen Reinigungsexperimente danken.*

*Herrn Roman Dallüge danke ich für die interessanten Einblicke in das Computergestützte Proteindesign und für die Hilfe beim Erlernen der Programmierung.*

*Bedanken möchte ich mich auch bei meinen ehemaligen Diplomandinnen Susann Schimmer und Kathrin Schröder-Tittmann, und ich wünsche Ihnen für Ihre Promotion viel Erfolg.*

*Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Proteintechnologie am Institut für Biotechnologie gilt mein besonderer Dank für die Schaffung einer angenehmen und kreativen Arbeitsatmosphäre, in der ich mich sehr wohlfühlt habe.*

*Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle an Frau Weichert, die stets ein offenes Ohr und Zeit für die Probleme „ihrer großen und kleinen Kinder“ hat und mit unkonventionellen Entscheidungen so manches schwieriges Problem und Projekt gelöst hat.*

*In bester Erinnerung wird mir die „Gruppe“ bleiben, deren Gesellschaft ich in den vergangenen Jahren sehr geschätzt habe, und die mir eine stetige Quelle der Aufmunterung und Erheiterung war. Meinen Gruß und Dank hiermit an: Christiane, Conny, Hilmar, Antje, Roman, Christoph sowie an Alfred, Doreen und Susi.*

*Anja danke ich nicht nur für die Geduld und das Verständnis bei der Anfertigung dieser Arbeit.....*



## **Lebenslauf**

### **Zur Person**

Jan Oschmann  
geboren am 29. September 1972  
in Rudolstadt  
ledig

### **Ausbildungsweg**

09/79 – 06/89	Besuch der Polytechnischen Oberschule“Johann Wolfgang Doebereiner“ in Rudolstadt/Schwarza
09/89 – 06/93	Berufsausbildung mit Abitur zum „Mess- und Regelmechaniker“
06/92	Abitur
06/93	Facharbeiterabschluss
10/93- 09/94	Ableistung des gesetzlichen Grundwehrdienstes
10/94 – 03/96	Berufstätigkeit als Mess- und Regelmechaniker
10/96 – 06/01	Studium der Biochemie am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit 10/01	Aufenthalt als wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle Anfertigung der vorliegenden Promotionsarbeit

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich mich bisher mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, daß die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegeben Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale), den