

**Die humanen Parathormon-Rezeptoren 1 und 2:
Heterologe Expression und Charakterisierung von
Peptidliganden und ihrer extrazellulären Bindungsdomänen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt bei der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Mathias Henze

geboren am 19. November 1981 in Halle (Saale)

Halle (Saale) 2015

Gutachter:

1. Dr. habil. Hauke Lilie
2. Prof. Dr. Jochen Balbach
3. Prof. Dr. Daniel Huster

Ort und Tag der öffentlichen Verteidigung: Halle (Saale), 22. Juni 2016

Darum bin ich jetzt so glücklich,
denn jetzt habe ich tatsächlich alles getan,
was ich konnte.

Rachel Carson

Zusammenfassung

Das physiologische Ziel für die Peptidliganden Parathormon (PTH), Parathormon-*related* Protein (PTHrP) und Tuberoinfundibular Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP 39) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) der Klasse B. Der humane Parathormon-Rezeptor 1 (PTHr1) hat eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der Kalziumhomöostase und der Knochenbildung. Der humane Parathormon-Rezeptor 2 (PTHr2) besitzt, neben seiner physiologischen Rolle im Kalzium- und Phosphathaushalt und im Knochen- und Knorpelmetabolismus, auch eine regulatorische Funktion bei der Ausbildung des Herzschlags und Schmerzvermittlungsprozessen im Körper. Trotz der neusten Ergebnisse über Struktur und Interaktion von PTHr1 mit seinen Liganden PTH und PTHrP gibt es bis heute nur wenig Informationen über die Struktur und den molekularen Mechanismus von PTHr2 und seinem natürlichen Liganden TIP 39. Auch über Spezifität von PTHr1 und PTHr2 für die unterschiedlichen Liganden PTH, PTHrP und TIP 39 ist nicht viel bekannt. Außerdem zeigt das humane Parathormon posttranslationale Phosphorylierungen, deren Einfluss auf die Rezeptorinteraktion bis heute nicht untersucht wurde. Die Charakterisierung der humanen Parathormon-Rezeptorfamilie auf molekularer Ebene führt zu einem erweiterten Verständnis für Rezeptor-Ligand-Interaktions- und Selektionsprozesse, sowie zur Gewinnung neuer Strukturinformationen. Diese helfen bei der Entwicklung chemisch modifizierter oder neuer Rezeptor-Liganden, die effektiv Krankheiten wie Osteoporose oder Herzrhythmusstörungen kontrollieren.

Als wichtige Grundlage zur strukturellen Analyse der molekularen Wechselwirkungen der humanen Parathormon-Rezeptoren 1 und 2, sowie ihrer Liganden, wurden in der vorliegenden Arbeit Protokolle entwickelt, die eine leistungsstarke und effiziente rekombinante Herstellung des unmarkierten und isopenmarkierten PTH (1-84), PTH (15-34), TIP 39 und der N-terminalen extrazellulären Domäne (ECD) des PTHr1 möglich machten, um sie für Ligandbindungsstudien und NMR-spektroskopische Untersuchungen zu verwenden. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von PTH zu einer Inaktivierung des Peptidhormons führt und dadurch die Rezeptorfunktion des PTHr1 und PTHr2 blockiert. In einem weiteren Schritt wurde die N-terminale extrazelluläre Rezeptordomäne des humanen PTH-Rezeptors 2 (ECD-PTHr2) kloniert, exprimiert und gereinigt. Als geeignetes Expressionssystem wurde *Escherichia coli* gewählt. Die N-terminale Domäne des PTHr2 wurde als SUMO-Fusionsprotein kloniert und in Form von *inclusion bodies* (IBs) exprimiert. Durch anschließende Renaturierung und SUMO-Spaltung wurden die IBs von ECD-PTHr2 in eine eigenständige, strukturierte und funktionale Proteindomäne überführt. Auch die für die Proteinfamilie charakteristischen und für die native Struktur wichtigen drei konservierten intrinsischen Disulfidbrücken wurden in der renaturierten Domäne bestätigt. ECD-PTHr2 konnte in ausreichenden Mengen hergestellt werden, um es zukünftig für die hochauflösende Strukturbiologie zu verwenden.

Summary

The three human peptide ligands parathyroid hormone (PTH), the related hormone PTHrP (PTH related protein) and tuberoinfundibular peptide (TIP 39) bind to the two known distinct PTH receptors, parathyroid hormone receptor 1 and 2 (PTHr1, PTHr2), in humans. Both receptors are class B G-protein coupled receptors (GPCRs). PTHr1 exhibits an important function during the regulation of calcium homeostasis and bone formation. PTHr2 also shows involvement in regulation of calcium and phosphate levels in the blood. In addition to this, PTHr2 holds a physiological function in regulation of heartbeat and mediation of pain. Combined the mentioned peptide and receptors compose the human parathyroid hormone receptor family. Despite, new findings for structure and binding of PTHr1 and the PTH and PTHrP ligands, less information is available about structure and binding mechanism of PTHr2 and the natural ligand TIP 39. Also the specificity of PTHr1 and 2 to bind the three ligands PTH, PTHrP and TIP 39 are still unclear. Furthermore the natural PTH (1-84) preserve posttranslationally modification via phosphorylation. However, there are currently no studies about the role of phosphorylation or the effect of phosphorylation on receptor binding. The characterisation of human parathyroid hormone receptor family on a molecular level will lead to an extended understanding for receptor binding and selectivity as well as retrieval of new structural information. All this research will help developing chemically modified or new receptor ligands, which effectively control diseases as osteoporosis or cardiac arrhythmia.

As foundation to characterise the interaction of PTHr1 and PTHr2 as well as their ligands on a molecular and structural height, within this thesis protocols were developed which allow a recombinant and high performance production of nonlabelled and isotopically labelled PTH ligands, TIP 39 and of the N-terminal extracellular domain (ECD) of PTHr1 which are suitable for ligand binding studies and NMR spectroscopic characterisation. Besides this work shows that phosphorylation of PTH (1-84) results in inactivation of the peptide hormone and thereby to a blocking of PTHr1 and PTHr2. Furthermore the present study provides a strategy to produce functional N-terminal extracellular domain of the parathyroid hormone receptor 2 (ECD-PTHr2) by SUMO-fusion system. Therefore ECD-PTHr2 was cloned as SUMO-fusion protein, expressed in *E. coli* and purified from inclusion bodies (IBs). Following refolding and SUMO cleavage reaction the IBs of ECD-PTHr2 could convert in a discrete, structured and functional protein domain. Also disulfide bond analysis of ECD-PTHr2 confirmed a conserved pattern of three disulfide bridges among different class B GPCR. The yield of refolded ECD-PTHr2 is sufficient for subsequent structural and functional studies.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungen	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren	1
1.1.1 Strukturelle Eigenschaften der GPCRs	3
1.1.2 Klassifizierung der GPCRs.....	6
1.1.3 Ligandenbindung und Signaltransduktion der GPCRs	8
1.1.4 Ligandenklassifizierung	9
1.2 Die Parathormon-Rezeptorfamilie.....	10
1.2.1 Parathormon-Rezeptoren / PTHR1 und PTHR2.....	10
1.2.2 Liganden der Parathormon-Rezeptoren 1 und 2	12
1.2.3 Ligandenbindung, Rezeptoraktivierung und Selektivität.....	16
1.3 Ziele dieser Arbeit	19
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Materialien.....	21
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.2.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR), Kolonie-PCR und <i>overlap extension</i> PCR	21
2.2.3 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten.....	23
2.2.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	24
2.2.5 Herstellung von Selektions-Agarplatten	24
2.2.6 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	24
2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese	25
2.2.8 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	25
2.3 Allgemeine Proteinchemische Methoden.....	25
2.3.1 Konzentration und Dialyse von Proteinlösungen	25
2.3.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26
2.4 Arbeiten mit rekombinanten Proteinen und Peptiden.....	26
2.4.1 Analyse der Proteinexpression in <i>E. coli</i> -Zellen	26
2.4.2 Zellaufschluss	27
2.4.3 SUMO-Fusionsstrategie	27
2.4.3 Herstellung der SUMO-Protease Ulp1	27
2.4.4 SUMO-Spaltung	28
2.4.5 Expression und Reinigung des humanen PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39 als SUMO-Fusionsproteine	28
2.4.6 Expression, Reinigung und Rückfaltung von humanem ECD-PTH1	32
2.4.7 Expression, Reinigung und Rückfaltung von humanem ECD-PTH2	35
2.5 Biophysikalische Methoden.....	37
2.5.1 Absorptionsspektroskopie (UV-Spektroskopie)	37
2.5.2 Circular dichroismus (CD-Spektroskopie)	38

	Thermisch induzierter Entfaltungsübergang	38
2.5.3	Fluoreszenzspektroskopie.....	39
	Gleichgewichtsfluoreszenztitration	39
	Bestimmung der Dissoziationskonstanten	40
	ANS-Fluoreszenzspektroskopie.....	41
	Guanidiniumchlorid induzierter Entfaltungsübergang	41
2.5.4	Refraktometrie	43
2.5.5	Oberflächenplasmonresonanz (<i>BIAcore</i> [®]).....	43
2.5.6	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	43
2.5.7	Massenspektrometrie.....	44
2.5.8	Analyse des Disulfidmusters von ECD-PTHR2.....	44
2.5.9	Magnetresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)	45
2.6	Zellbiologische Methoden.....	46
2.6.1	Herstellung von Zelllysaten und Kinase-Assays	46
2.6.2	cAMP-Akkumulationsassays.....	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Rekombinante Herstellung von Peptidhormonen als SUMO-Fusion.....	47
3.1.1	Expression, Reinigung und Charakterisierung von PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39.....	47
	PTH (1-84)	47
	PTH (15-34)	50
	TIP 39.....	53
3.2	Phosphorylierung von PTH (1-84).....	56
3.2.1	Charakterisierung von phosphoryliertem PTH (1-84)	57
3.2.2	Signaltransduktion des phosphorylierten PTH (1-84).....	59
3.3	Rekombinante Herstellung und Charakterisierung von humanem ECD-PTHR1	61
3.3.1	Expression, Reinigung und Rückfaltung von ECD-PTHR1	61
3.3.2	Strukturelle Charakterisierung von ECD-PTHR1	63
3.3.3	Bestimmung der Affinitäten des PTH (1-84)-Agonisten und TIP-Antagonisten zur ECD-PTHR1	64
3.3.4	Spektroskopische Charakterisierung von ECD-PTHR1 im Komplex mit humanen PTH (1-84).....	70
3.4	Rekombinante Herstellung und Charakterisierung von humanem ECD-PTHR2	73
3.4.1	Vorversuche und Arbeiten zur Herstellung von humanen ECD-PTHR2.....	73
3.4.2	Klonierung, Expression und Reinigung von ECD-PTHR2 als SUMO-Fusionsprotein	76
3.4.3	Massenspektrometrische Analyse von ECD-PTHR2.....	81
	Identifizierung von ECD-PTHR2	81
	Analyse des Disulfidbrückenmusters von ECD-PTHR2	82
3.4.4	Spektroskopische Charakterisierung von ECD-PTHR2.....	86
	UV-Absorption von ECD-PTHR2.....	86
	Fern-UV-CD-spektroskopische Untersuchung von ECD-PTHR2...	86
	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von ECD-PTHR2	87

ANS-Bindungsstudien an ECD-PTHR2	88
Untersuchung des Faltungszustandes von ECD-PTHR2 mittels 1D- ¹ H-NMR-Spektroskopie	90
3.4.5 Thermodynamische Stabilität von ECD-PTHR2.....	91
Thermische Stabilität von ECD-PTHR2.....	91
Chemische Stabilität	91
3.4.6 Untersuchung zur Wechselwirkung von ECD-PTHR2 mit TIP 39 und PTH (1-84).....	92
3.4.7 Ligandenbindungseigenschaften von ECD-PTHR2	93
4 Diskussion	95
4.1 Optimierte SUMO-Fusionsstrategie zur Produktion von humanem PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39	95
4.2 Ligandenphosphorylierung führt zur GPCR-Regulation	98
4.3 Ligandenwechselwirkungen an humanem ECD-PTHR1	100
4.4 Rekombinante Herstellung von humanem ECD-PTHR2 in <i>E. coli</i>	105
4.5 Biophysikalische Charakterisierung von ECD-PTHR2	109
4.6 Analyse der Ligandenwechselwirkungen von ECD-PTHR2	111
5 Ausblick	114
6 Literaturverzeichnis	116
Anhang/ Anhangsverzeichnis	134
Danksagung	161
Publikationen und Poster	163
Eidesstattliche Erklärung	164
Angaben zur Person	165

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ANS	8-Anilino-1-Naphtalensulfonsäure
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARA	Arachnidonsäure
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Absorbance Units</i>
bp	Basenpaare
BPA	Benzoyl-L-Phenylalanin
Bsp.	Beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIP	<i>cold induced protein</i>
CF	<i>cell-free</i>
CRF-R1	<i>Corticotropin-releasing-factor-Typ-1-Receptor</i>
CRF-R2b	<i>Corticotropin-releasing-factor-Typ-2b-Receptor</i>
CRLR	<i>Calcitonin-receptor-like-Receptor</i>
CV	<i>column volume</i>
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECD	extrazelluläre Domäne
ECL	extrazelluläre Schleife
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i>
GCGR	Glukagon-Rezeptor
GDP	Guanosindiphosphat
GIP-R	<i>Gastric-inhibitory-polypeptide-Receptor</i>
GLP	<i>Glucagon-like-Peptid</i>
GLP1-R	<i>Glucagon-like-Peptid 1-Rezeptor</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat

Abkürzungen

HGP	Human-Genom-Projekt
HIC	Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IBs	<i>inclusion bodies</i>
ICL	<i>intracellular loop</i>
IDDM	<i>Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>
IMAC	Immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPTG	Isopropylthiogalactosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
IUPHAR	internationale Union für Pharmakologie
kbp	1000 Basenpaare
LC/MS/MS	<i>Liquide Chromatography Mass Spectrometry / Mass Spectrometry</i>
LNB	<i>Long N-Termini</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight</i>
MBP	Maltose-Binde-Protein
MLU	Martin-Luther-Universität
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
NIDDM	<i>Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus</i>
NMR	Kernmagnetresonanz
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm
PAC-1R	<i>Pituitary-adenylatcyclase-activating-polypeptide-Typ-1-Rezeptor</i>
PACP	<i>Pituitary adenylat-cyclase activating polypeptide</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Datenbank
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon <i>related</i> Protein
PTHR1	Parathormon-Rezeptor 1
PTHR2	Parathormon-Rezeptor 2
RGS	Regulatoren für G-Protein-Steuerung
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatographie</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>Shrimp-alkalische Phosphatase</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SUMO	<i>Small Ubiquitin-Like Modifier</i>
7-TM	sieben α -helikale Transmembrandomänen
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin

Abkürzungen

TIP 39	Tuberoinfundibular-Peptid aus 39 Aminosäuren
TM	Transmembranbereich
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
TROSY	<i>Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
v/w	Volumen/Masse
v/v	Volumen/Volumen
VIP	Vasoaktives-intestinal-Peptid
VIPR	Vasoaktiv-Intestinal-Peptid-Rezeptor
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren wurden mit dem üblichen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

1 Einleitung

Der kleinste Baustein des Lebens ist die Zelle. Um ihr Inneres von der Umgebung abzugrenzen, bilden Zellen unter Mithilfe von Lipiden und Proteinen Membranen. Im Laufe der Evolution haben einzellige, aber auch komplexe mehrzellige Organismen Strategien entwickelt, um auf einwirkende Umwelteinflüsse zu reagieren. Das bedeutet, keine Zelle lebt in Isolation und ohne Kommunikation. Die Verständigung mit der Umwelt ist eine fundamentale Eigenschaft lebender Zellen. Diese findet man beim Einzeller, der mit seiner Gesamtheit auf einen Umweltreiz reagiert, bis hin zu mehrzelligen Organismen, bei denen eine ausschließliche Kommunikation zwischen den Zellen und der Umwelt nicht mehr ausreichend ist. Die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen nimmt in vielzelligen Organismen einen großen Stellenwert ein. Zellen entwickeln hier ein Kommunikationsnetzwerk, welches die Regulation lebensnotwendiger Prozesse, wie Stoffaustausch, Zellteilung, Zelldifferenzierung, Zellwachstum und den Metabolismus in diversen Geweben oder Organen erlaubt. Wichtige Moleküle, die Zellen bei der Kommunikation unterstützen, sind Membranproteine. Mit einer großen Bandbreite von Ionenkanälen, Transportern und Rezeptoren ist es Zellen daher möglich, mit ihrer Umgebung und anderen Zellen einen Informations- und Stoffaustausch durchzuführen. Durch membranständige Rezeptoren besitzen Zellen die Möglichkeit, spezifische extrazelluläre Signale von außen ins Zellinnere weiterzuleiten, um über eine intrazelluläre Signalkaskade eine adäquate biologische Antwort auszulösen^[1]. Für die interzelluläre Kommunikation spielen eine Vielzahl von extrazellulären Signalmolekülen wie Proteine, Peptide, Hormone, Aminosäuren, Lipide, Nukleotide, Steroide, Retinoide, Ionen, aber auch Photonen eine wichtige Rolle als Botenstoffe.

1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

Eine bedeutende Klasse von Membranrezeptoren sind die heterotrimeren Guanosin-triphosphat (GTP) bindenden Protein (G-Protein) gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Sie bilden bei Säugern die größte und vielfältigste Gruppe von Transmembranproteinen^[2, 3]. Im Rahmen des Human-Genom-Projekts (HGP), welches im Jahre 2001 als großer Meilenstein der naturwissenschaftlichen Forschung beendet wurde^[4, 5], konnte eine große Familie von ca. 1000 Genen identifiziert werden, die diese spezifischen Membranrezeptorproteine kodieren. Im Allgemeinen wird diese Rezeptorgruppe als G-Protein gekoppelte Rezeptoren bezeichnet, weil sie einen charakteristischen 7-Transmembranbereich (7-TM) aufweisen^[6-14], der über die Assoziation mit heterotrimeren G-Proteinen an eine zelluläre Signaltransduktionskaskade gekoppelt ist^[9]. Die Rezeptoren werden heute in den Genomen nahezu aller bekannten Eukaryoten, vom Einzeller wie *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe), bis hin zu komplexen Lebewesen wie *Drosophila* (Insekten), Pflanzen, *Homo sapiens* und vielen Tieren, nachgewiesen^[3, 17]. GPCRs sind in der Lage eine Vielzahl von extrazellulären chemischen und sensorischen Signalen (Liganden) aufzunehmen und diese Stimulationen in intrazelluläre Signale umzuwandeln (Abb. 1.1). Liganden, die GPCRs binden und aktivieren, zeigen eine hohe Variabilität in ihrer Erscheinungsform. Sie reichen

von lichtsensitiven Komponenten, über Duft- und Geschmacksstoffe, Pheromone, Hormone bis hin zu Neurotransmittern.

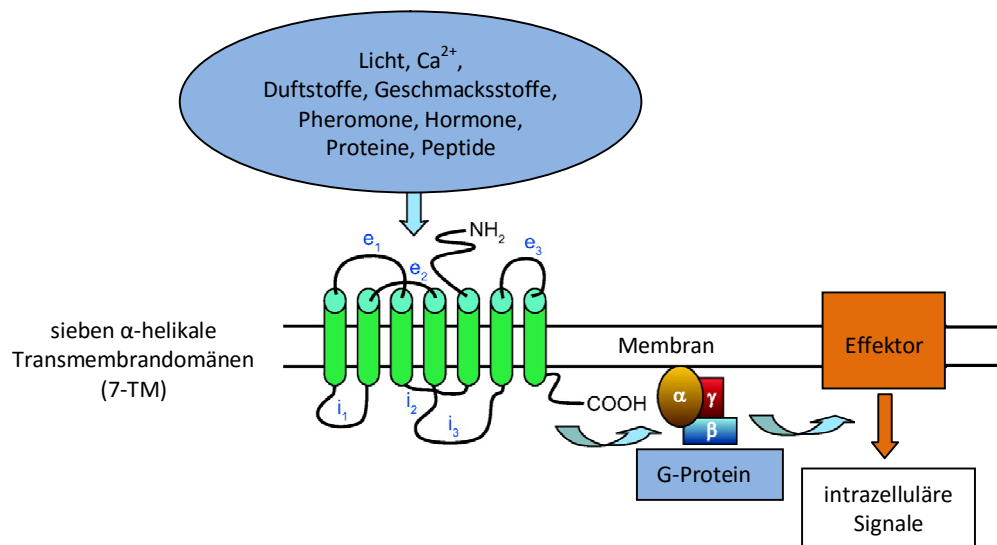


Abbildung 1.1: Stimulation von GPCRs durch unterschiedliche Signalmoleküle . GPCRs können durch verschiedene Signalmoleküle wie Licht, Hormone und Proteine stimuliert und in Folge dessen aktiviert werden. Dadurch erfolgt die zelluläre Bindung von G-Proteinen, die in einem weiteren Schritt Effektoren aktivieren, die das äußere Signal in intrazelluläre Signale umwandeln. e₁-e₃: extrazelluläre Schleifen, i₁-i₃: intrazelluläre Schleifen. Die Abbildung wurde aus [10] entnommen und modifiziert.

Aufgrund dieser Vielfalt an Interaktionspartnern sind GPCRs an einer Vielzahl physiologischer Prozesse, aber auch an der Entstehung verschiedener Stoffwechselerkrankungen, wie Diabetes, Osteoporose und Depressionen beteiligt. GPCRs sind damit eine wichtige Klasse von Proteinen mit bedeutendem pharmazeutischem Interesse^[7, 9, 16] und stellen schon heute die wichtigsten Zielstrukturen für fast die Hälfte der zugelassenen Medikamente weltweit^[7, 9, 11, 13, 15, 16, 31] dar. Im Nachfolgenden werden einige physiologische Funktionen aufgeführt, bei denen GPCRs eine wichtige Rolle spielen.

- Visualisierung: Hier nutzt das Opsin eine durch Photonen induzierte Isomerisierung, um elektromagnetische Strahlen in ein zelluläres Signal umzuwandeln. Bsp.: Rhodopsin
- Geruchswahrnehmung: Hier binden Rezeptoren des olfaktorischen Epitheliums Duftstoffe und Pheromone.
- Regulation des Immunsystems und von Entzündungen: Hier binden Chemokine-Rezeptoren Liganden, die eine interzelluläre Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems vermitteln. Beispiel: Histaminrezeptoren können entzündungsauslösende Stoffe binden und im Anschluss Zellen zu einer entzündungshemmenden Reaktion befähigen.
- Regulation der Verhaltenssteuerung und Gemütslage: Hier binden Rezeptoren des Hirngewebes spezifische Neurotransmitter, wie Serotonin, Dopamin und Glutamat.
- Regulation homöostatischer Prozesse: GPCRs regulieren die Aufnahme und/ oder Freisetzung bestimmter Hormone, die für die Aufrechterhaltung eines konstanten Blutzucker- oder Kalziumspiegels notwendig sind. Bsp.: Glucagon-Rezeptor, Parathormon-Rezeptor.

- Regulation der Transmission im autonomen Nervensystem: GPCRs haben eine regulatorische Funktion im sympathischen und parasympathischen Nervensystem und beeinflussen dadurch eine Vielzahl automatischer Funktionen des Körpers wie Blutdruck, Herzschlag und Verdauung.

1.1.1 Strukturelle Eigenschaften der GPCRs

G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind Membranproteine unterschiedlicher Länge, mit einer Aufteilung in verschiedene Klassen oder Familien. Ein sequenzieller Vergleich dieser verschiedenen GPCRs resultiert in wenig bis keiner Übereinstimmung, jedoch zeigen alle GPCRs eine gemeinsame strukturelle Topologie^[3, 30]. GPCRs besitzen abwechselnd hydrophobe und hydrophile Bereiche^[13]. Die hydrophoben Regionen werden von sieben α -helikalen Transmembrandomänen (7-TM) zu je 20-27 Aminosäuren gebildet. Diese Bereiche stellen ein Strukturgerüst dar, welches den Rezeptor in seiner Konformation stabilisiert. Hydrophile Bereiche befinden sich unter anderem in den drei extra- und den drei intrazellulären Schleifen (ECL, ICL, *Loops*), welche die helikalen 7-TM-Domänen miteinander verbinden^[33]. Auch die ECL und ICL zeigen eine große Variation in ihrer Größe von je 5-230 Aminosäuren. GPCRs besitzen zusätzlich eine hydrophile extrazelluläre N-terminale Domäne (ECD). Je nach Typ kann die Größe der ECDs zwischen einzelnen GPCRs stark variieren. Sie reicht von sehr kurz mit sieben Aminosäuren, bis extrem lang mit 595 Aminosäuren. Die hydrophilen Bereiche in den ECDs und ECLs dienen der Kontaktaufnahme bei extrazellulärer Ligandenbindung^[13]. Zusätzlich besitzen GPCRs auch eine intrazelluläre C-terminale Domäne mit hydrophilen Bereichen. Diese Segmente zeigen, abhängig von der GPCR-Klasse, ebenfalls eine starke Varianz in ihrer Größe von 12-360 Aminosäuren. Die C-terminale Domäne dient hier der intrazellulären G-Protein-Kopplung^[13, 16, 33].

Im Jahr 2012 wurde der Nobelpreis für Chemie an zwei Wissenschaftler verliehen, die sich wesentlich um das Verständnis der GPCRs verdient gemacht haben. Diese Auszeichnung unterstreicht die hohe Relevanz der GPCR-Forschung. Robert Lefkowitz konnte am Beispiel des β_2 -adrenergen-Rezeptors die Wirkungsweise von GPCRs aufklären^[9, 40]. Brian Kobilka wiederum entwickelte ein Verfahren, mit dem die Aufklärung von Kristallstrukturen möglich ist. Ihm gelang 2007 die erste Strukturaufklärung des humanen β_2 -adrenergen-Rezeptors und er konnte so die Anordnung der 7-TM-Helices und die Ligandenbindung zeigen^[45, 46].

Aufbauend auf Ergebnissen der zurückliegenden Jahre konnten somit einige neue und detaillierte Informationen über die Struktur und Funktion dieser wichtigen Familie von Membranproteinen gewonnen werden. Mit Hilfe von strukturbiologischen, hochauflösenden Methoden wie der NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie konnte für einige GPCRs die räumliche Anordnung, die Relevanz einzelner Bereiche und Domänen allein und bei Ligandenbindungsprozessen aufgeklärt werden. Dadurch kommt man einer vollständigen Aufklärung der Bindungs- und Aktivierungsmechanismen von GPCRs immer näher^[42, 45, 54]. Im Jahr 2000 wurde erstmalig die Kristallstruktur eines GPCR veröffentlicht. Es handelte sich hierbei um das bovine Rhodopsin^[42] in einer Auflösung von 2,8 Å. Die Struktur zeigt einen zirkulären, im Urzeigersinn gerichteten und dicht gepackten α -helikalen 7-TM-Bereich, der in der Membran angeordnet ist. Diese Struktur wurde 2004 durch eine höhere Auflösung bestätigt^[43, 44]. In den folgenden Jahren

konnten mit Hilfe der Röntgenkristallographie weitere GPCR-Strukturen gelöst werden. Hauptsächlich konnte der strukturelle Aufbau einiger GPCR-Bindungstaschen und die Wechselwirkungen mit Agonisten, Antagonisten und inversen Agonisten mit Transmembranbereichen der Rezeptoren beobachtet werden. Zusätzlich wurden aus den Daten der Kristallisation des humanen β_2 -adrenergen-, des Truthahn- β_1 -adrenergen-^[45-52] und des Adenosin- A_{2A} -Rezeptors^[56] konservierte Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Struktur und Aktivierung für GPCRs nachgewiesen. Zusammenfassend gesehen, gehören die genannten Rezeptoren alle zu GPCRs der Klasse A. Sie zeigen konservierte Interaktionsmechanismen zwischen den Liganden mit den Transmembranbereichen (TM) TM 2, TM 3 und TM 4^[51, 53]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass keine generellen familienkonservierten Rezeptor-Bindungstaschen für diese GPCRs existieren, sondern dass eine hohe Rezeptordiversität vorliegt und dadurch eine Ligandenselektion möglich ist^[53-63]. Die erhaltenen Strukturen können jedoch teilweise als Modell für andere Klassen der GPCRs dienen, sollten aber durch experimentelle NMR- und Röntgenkristallisationsexperimente überprüft werden.

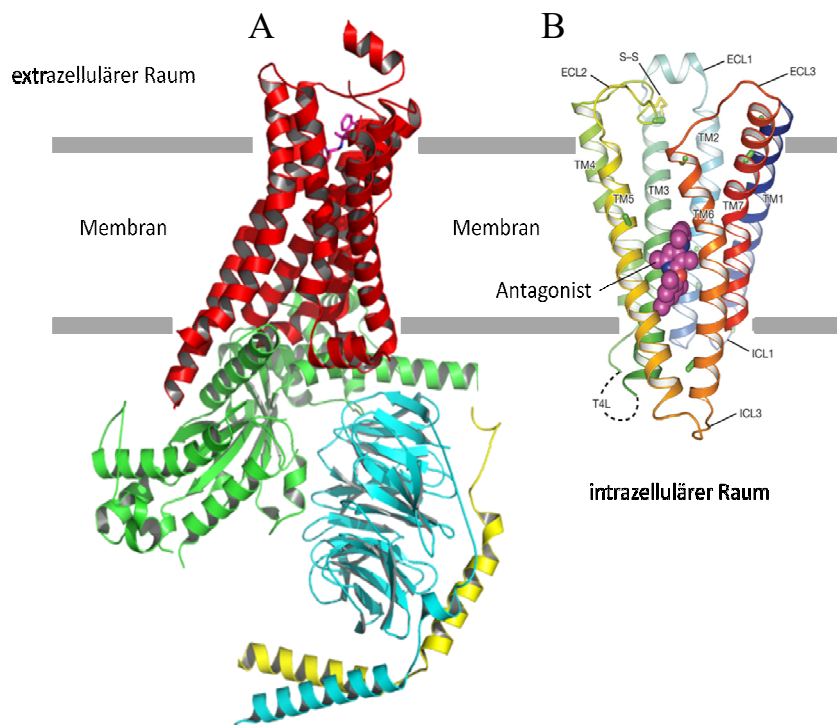


Abbildung 1.2: Struktureller Aufbau von GPCRs der Klasse A und B. **A:** Klasse A GPCR, β_2 -adrenergen-Rezeptor: rot (mit G-Protein Kopplung, G_α -Untereinheit: grün, G_β -Untereinheit: türkis, G_γ -Untereinheit: gelb). **B:** Klasse B GPCR, Corticotropin-Rezeptor (ohne extrazelluläre N-terminale und intrazelluläre C-terminale Domäne und ohne G-Protein Kopplung). Beide Rezeptorklassen zeigen den klassischen 7-TM-Domänen-Aufbau. TM1-TM7: Transmembranbereich, ECL1-ECL3: extrazelluläre *Loops*, ICL1-ICL3: intrazelluläre *Loops*. Das violett untersetzte Molekül ist der kleine Corticotropin-Rezeptor-Antagonist CP-276395. Die Abbildungen wurden aus [52 und 64] entnommen und modifiziert.

Erstmals konnte im Jahr 2013 die Kristallstruktur zweier GPCRs der Klasse B gelöst werden. Der strukturelle Einblick für den Glukagon- und Corticotropin-Rezeptor bestätigt die generelle strukturelle Topologie von GPCRs mit ihren 7-TM-Bereichen^[64, 65], wobei im Vergleich zu GPCRs der Klasse A Unterschiede in der Anordnung und Länge der einzelnen 7-TM-Bereiche zu erkennen sind. Jedoch wurden die Strukturen ohne die

hydrophilen Bereiche, wie der extrazellulären N-terminalen und intrazellulären C-terminalen Domäne gelöst, die für die Ligandenbindung und G-Proteinaktivierung wichtig sind. Diese Bereiche sind hoch flexibel und behindern dadurch die Kristallisation des Gesamtrezeptors. Die Abbildung 1.2 zeigt den generellen strukturellen Aufbau von GPCRs mit dem charakteristischen 7-TM-Bereich, als strukturellen Vergleich anhand des Klasse A β_2 -adrenergen-Rezeptors und den Klasse B Corticotropin-Rezeptor.

Trotz intensiver Anstrengungen über Jahrzehnte und der genannten Erfolge bleibt die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von GPCRs mit großen Herausforderungen und Schwierigkeiten verbunden. Bis heute gibt es deshalb im Vergleich zu anderen Proteinklassen nur wenige GPCR-Strukturen (ca. 20 Kristallstrukturen von sechs GPCRs). Außerdem zeigen alle bisher erhaltenen GPCR-Kristallstrukturen weitestgehend inaktive Konformationen^[42, 45-47, 59]. Um in Zukunft durch Vergleiche die Funktion von GPCRs noch besser zu verstehen, müssen auch aktive Konformationen für die Strukturaufklärung zugänglich werden.

Ein limitierender Schritt, nicht nur bei der Strukturaufklärung von GPCRs, bleibt die Herstellung relativ großer Mengen (Milligramm) an gereinigtem und thermodynamisch stabilem Protein. Die heterologe Expression in verschiedenen Zellsystemen (wie Bakterien-, Hefe-, Pilz-, Säugtier-, Insekten- und Pflanzenzellen), die Rezeptor-Extraktion aus Zellmembranen oder aus *inclusion bodies*, die Reinigung, Rückfaltung oder Rekonstitution in artifiziellen Membransystemen (*Nanodiscs*, Liposomen), sowie die Kristallisation oder die Handhabung hochkonzentrierter GPCR-Lösungen für NMR-spektroskopische Studien sind Faktoren, die schwer vorhersagbar und kaum kalkulierbar sind. Einige vielversprechende Ansätze, die beispielsweise ungeordnete und flexible Regionen und Domänen der Rezeptoren durch Verkürzung, artifizielle Stabilisierung mit *Fab*-Antikörperfragmenten und dem Einsatz von stabilisierenden Mutationen oder Liganden ordnen und stabilisieren^[45-48], beschreiben einen möglichen Weg zur Kristallisation von GPCRs. Weitere Versuche zielen auf eine verbesserte und leistungsstarke lösliche heterologe Expression von Membranrezeptoren und ihren Domänen. Durch den Einsatz von Fusionsproteinen wie z. B. dem Maltose-Binde-Protein (MBP)^[78] und der Co-Expression eines *redox-shuffling* Systems kann artifiziell modifiziertes und funktionales Protein in Milligrammmengen gewonnen werden. Auch die zellfreie (*cell-free*, CF) Expression und anschließende Rekonstitution von GPCRs in artifizielle und stabilisierende Membransysteme ist eine neue und interessante Methode, diese Proteine zu gewinnen und zu studieren. Jedoch muss hier noch eine starke Optimierung erfolgen, um einen für Strukturaufklärung relevanten Maßstab zu erreichen^[32]. Trotz der genannten Möglichkeiten lassen sich etablierte Protokolle nicht einfach auf die Gewinnung neuer GPCRs übertragen. Außerdem bleibt die Modifikation und Manipulation der GPCRs ein erheblicher Eingriff, der zu einem Verlust von nativen Eigenschaften des Rezeptors führt. Die rekombinante Herstellung von GPCRs bleibt deshalb auch in Zukunft eine zeitintensive Angelegenheit von „*trail and error*“, um geeignete Bedingungen für die Handhabung von volllängen Rezeptoren zu etablieren^[32].

Aufgrund der geschilderten Schwierigkeiten bei der Herstellung und Kontrolle von GPCRs stellt die Expression von Domänen und Rezeptorfragmenten eine Alternative für die Analyse von Struktur und Funktion der GPCRs dar^[67-72, 165]. Für einige extrazelluläre Domänen der GPCRs der Klasse B wurden mit Hilfe von NMR-Spektroskopie und

Röntgenkristallographie Strukturdaten allein und im ligandengebundenen Komplex gewonnen. Die lange extrazelluläre N-terminale Domäne der GPCRs der Klasse B steht im wissenschaftlichen Fokus, weil sie eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung und Selektivität, aber auch der Rezeptoraktivierung spielt^[168, 179, 181, 183]. Eine Vielzahl der GPCRs der Klasse B besitzt eine besondere Stellung bei der Entstehung verschiedener gesellschaftsrelevanter Stoffwechselkrankheiten wie z. B. Diabetes und Osteoporose. Daher ist die strukturelle Aufklärung des Komplexes aus Rezeptordomäne und Ligand von pharmazeutischem Interesse und hilft bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe.

Der humane Parathormon-Rezeptor 1 (PTHr1)^[74, 75, 78], der *Glucagon-like-Peptid* 1-Rezeptor (GLP-1R)^[79, 81], der *Corticotropin-releasing-factor*-Typ-1-Rezeptor (CRF-R1)^[72, 76], der *Pituitary-adenylatcyclase-activating-polypeptide*-Typ-1-Rezeptor (PAC-1R)^[71, 80], der humane *Gastric-inhibitory-polypeptide*-Rezeptor (GIP-R)^[82] und der Mäuse-*Corticotropin-releasing-factor*-Typ-2b-Rezeptor (CRF-R2b)^[73, 83] sind Bsp., für die strukturelle Informationen über die ECDs in Abwesenheit des Liganden und in hormongebundener Form gewonnen werden konnten^[180]. Die nachfolgende Abbildung 1.3 zeigt den generellen strukturellen Aufbau der N-terminalen Domänen der GPCRs der Klasse B. Die Struktur zeigt ein einheitliches Profil bestehend aus einer N-terminalen α -Helix und vier β -Strängen, die zwei antiparallele Faltblätter ausbilden. Zusätzlich wird die Domänenstruktur über ein konserviertes Netzwerk von drei intramolekularen Disulfidbrücken stabilisiert^[11, 14, 25, 69, 165, 180].

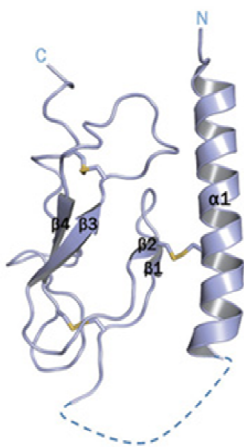


Abbildung 1.3: Allgemeiner struktureller Aufbau der extrazellulären N-terminalen Domäne der Klasse B GPCRs.

Die Struktur ist in drei Bereiche gegliedert und hellblau dargestellt. Sie besteht aus einer N-terminalen α -Helix ($\alpha 1$) und zwei Paaren antiparalleler β -Faltblätter ($\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$, $\beta 4$). Die drei konservierten Disulfidbrücken verbinden und stabilisieren die drei Bereiche und sind als gelbe Verbindungen dargestellt. Die Abbildung ist aus [180] entnommen.

1.1.2 Klassifizierung der GPCRs

Auf der Basis von Sequenzhomologie, sowie der Bindungseigenschaften und der Struktur ihrer Liganden, werden GPCRs in die Klassen A-F gegliedert^[18-23, 35]. Dieses System wird auch von der internationalen Union für Pharmakologie, dem IUPHAR-Komitee für Rezeptor-Nomenklatur und Klassifizierung, verwendet^[14, 291]. Im Jahr 2003 wurde aufgrund von neuen phylogenetischen Analysen der GPCR-kodierenden Gene das GRAFS-System eingeführt, welches die Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, *Frizzled/Taste 2*- und Secretin-Rezeptorfamilien beinhaltet^[11, 14 165, 291]. Nachfolgend werden die fünf Familien der GRAFS-Nomenklatur im Vergleich zur IUPHAR-Klassifizierung beschrieben. Die drei wichtigsten Familien/ Klassen der GPCRs sind in Abbildung 1.4 schematische dargestellt.

N-terminalen Domänen dieser Klasse weisen eine mittlere Größe von 60-170 Aminosäuren auf und sind in der Lage, Peptidhormone zu binden. Als Besonderheit besitzt die N-terminale Domäne sechs konservierte Cysteine, die ein Netzwerk aus drei Disulfidbrücken bilden (Abb. 1.3) und somit für die Struktur der Domäne und die Funktionalität der Ligandenbindung wichtig sind^[11, 14, 25, 69, 165, 180].

1.1.3 Ligandenbindung und Signaltransduktion der GPCRs

Für GPCRs beginnt der Prozess der Signaltransduktion immer mit einer initialen Bindung eines Liganden. Durch die Bindung eines Liganden an extrazelluläre Bereiche wird der GPCR durch konformationelle Änderungen in seiner Struktur aktiviert und dient so als Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor, der den GDP-/ GTP-Austausch in der α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins (bestehen aus α , β und γ -Untereinheit) katalysiert, indem er mit ihm interagiert^[35]. GPCRs können verschiedene G-Proteine binden und dadurch unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden einleiten, abhängig vom Aktivierungszustand und Gewebe, in dem sie exprimiert werden. Die Einteilung der G-Proteine erfolgt nach Sequenzhomologie und funktioneller Analogie der α -Untereinheit des Proteins. Es gibt die G_i , G_q , G_s und G_{12} G-Proteine, deren jeweilige α -Untereinheit unterschiedliche zelluläre Effekte auslöst^[36]. Die Ausbildung des ternären Komplexes, bestehend aus Liganden, Rezeptor und G-Protein, führt im Anschluss zu einer Dissoziation des G-Proteins in die aktive Form, bestehend aus der GTP-gebundenen α -Untereinheit und der freien $\beta\gamma$ -Dimer-Untereinheit. Infolgedessen können die α -Untereinheit und das $\beta\gamma$ -Dimer für sie typische Effektor- oder Messenger-Systeme modellieren, die Freisetzung weiterer Botenstoffe (*second messenger*) initiieren oder blockieren^[36-38, 66] und dadurch eine zelluläre Antwort auslösen. Bei den Effektor/ Messenger-Systemen handelt es sich z.B. um die Adenylatcyclase (AC), Phospholipase A, C oder D, K^+ -, Cl^- -, Na^+ -Ionenkanäle, Protein-Phosphatkinasen und Protein-Phosphatasen und G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinase (GRK)^[39-41]. Mögliche *second messenger* sind zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositoltrisphosphat (IP_3), Diacylglycerin (DAG) und Arachnidonsäure (ARA). Das GTP-Nukleotid wird im Anschluss mit Hilfe der intrinsischen GTPase-Aktivität der α -Untereinheit zu GDP hydrolysiert. Danach wird durch Reassoziierung der GDP gebundenen α -Untereinheit mit der dimeren $\beta\gamma$ -Untereinheit der inaktive trimere Ausgangszustand für das G-Protein wieder hergestellt. Die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit wird durch Regulatoren für G-Protein-Steuerung (RGS-Proteine) kontrolliert^[35]. Nach der Aktivierung eines Rezeptors und der ausgelösten Signalkaskade muss eine Internalisierung, Desensibilisierung oder ein Recycling des GPCR erfolgen, da eine ständige Aktivierung zu pathologischen Erkrankungen führen kann. In diesem Zusammenhang spielt die $\beta\gamma$ -Untereinheit des trimeren G-Proteins eine wichtige Rolle. Sie kann nach liganden-induzierter Rezeptoraktivierung die GRK aktivieren, welche anschließend Serin- und Threoninreste in intrazellulären *Loop*-Regionen und in der C-terminalen Domäne des Rezeptors phosphoryliert^[41]. Dadurch kann β -Arrestin am Rezeptor binden, wodurch eine Desensibilisierung von G-Proteinen bewirkt wird. Außerdem wird der so entstandene Komplex anschließend in Endosomen internalisiert, wo der Rezeptor entweder dephosphoryliert und somit für die Zellmembran recycelt oder durch lysosomale Proteasen degradiert wird^[9, 41]. Eine Desensibilisierung kann neben GRK auch durch die *second*

messenger Proteinkinasen A und C ausgelöst werden. In Abbildung 1.5 ist ein Modell für den hier beschriebenen Zyklus der G-Protein-Aktivierung dargestellt^[66].

Für GPCRs wird angenommen, dass sie in einem konformationellen Gleichgewicht zwischen aktivem (R^*) und inaktivem Zustand (R) stehen^[34] und dadurch einen Einfluss auf die Affinität der Ligandenbindung und somit auf die Signaltransduktion nehmen. Gleichzeitig gibt es zahlreiche Hinweise, die zeigen, dass GPCRs nicht nur einen, sondern unterschiedliche Aktivierungszustände annehmen können^[36]. Diese verschiedenen Konformationen sind bis heute kaum verstanden. Die Bindung von Liganden kann bei einigen GPCRs auch die Ausbildung eines Monomer/ Dimer-Gleichgewichts verändern, was wiederum die Signaltransduktion über G-Proteine beeinflusst. Die Rezeptor-Oligomerisierung zu Homo- oder Heterodimeren konnte schon für verschiedene Klassen der GPCRs gezeigt werden^[38].

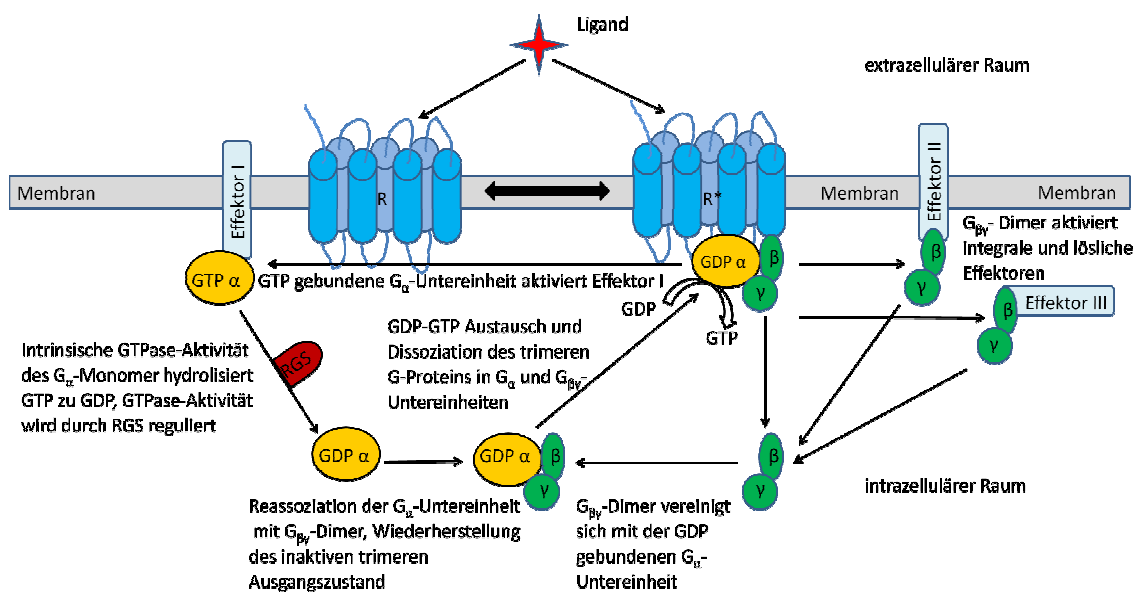


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung eines Modells für die GPCR induzierte Aktivierung durch heterotrimere G-Proteine. GDP: Guanosindiphosphat, GTP: Guanosintriphosphat, Effektor: z.B. Adenylatcyclase, Phospholipase C, G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase, RGS: Regulatoren für G-Protein-Steuerung. α , β , γ entsprechen den Untereinheiten des trimeren G-Proteins. R repräsentiert den inaktiven und R^* den aktiven Zustand des GPCR, die in einem konformationellem Gleichgewicht stehen.

1.1.4 Ligandenklassifizierung

Die Bindung von Liganden beeinflusst das konformationelle Gleichgewicht der GPCRs (R und R^*) auf unterschiedliche Weise. Diese Eigenschaft wird von der Pharmaindustrie zur Entwicklung neuer Wirkstoffe genutzt. Diese sollen den Zielrezeptor aktivieren, blockieren oder die Wirksamkeit eines endogenen Liganden erhöhen^[187]. Liganden, die an einer Signaltransduktion involviert sind, werden hinsichtlich ihrer Eigenschaften unterschieden. Es gibt drei fundamentale Eigenschaften, die Liganden auszeichnen: die Rezeptoraffinität, beschrieben durch die Gleichgewichtskonstante des Rezeptor-Ligand-Komplexes, die Wirksamkeit (*Efficacy*)^[187, 291] und der Bindungsort am Rezeptor. Liganden können orthosterisch oder allosterisch am Rezeptor binden. Orthosterische Liganden sind Moleküle, die an die endogene Bindestelle des Rezeptors binden, während allosterische Liganden andere Bindungsstellen besetzen und die Rezeptorfunktion beeinflussen^[187, 188]. Moleküle, die den Rezeptor binden und aktivieren, nennt man

Agonist. Ein Agonist, der eine maximale Systemantwort (Signaltransduktion) auslöst bzw. eine positive Wirksamkeit ($Efficacy = 1$) besitzt, wird als vollständiger Agonist bezeichnet und bindet den Rezeptor orthosterisch^[187-189, 291]. Von einem partiellen Agonisten wird gesprochen, wenn der Agonist eine verringerte Systemantwort liefert bzw. seine Wirksamkeit verringert ist ($Efficacy > 0$ und < 1) und den Rezeptor ebenfalls orthosterisch bindet. Dadurch blockiert er die Bindungsstelle für den vollständigen Agonisten^[188, 291]. Ein Agonist zeigt außerdem eine bevorzugte Affinität zur aktiven Konformation des Rezeptors, in dem er diesen stabilisiert. Als Antagonisten bezeichnet man Liganden, die sowohl eine Affinität für die aktive und inaktive Konformation des Rezeptors besitzen, aber keine Signaltransduktion auslösen ($Efficacy = 0$)^[187, 188, 291]. Es gibt kompetitive und nichtkompetitive Antagonisten. Kompetitive Antagonisten binden orthosterisch und können durch eine erhöhte Konzentration des Agonisten verdrängt werden, während bei nichtkompetitiven Antagonisten eine erhöhte Konzentration an Agonisten nicht zu einer Verdrängung führt, weil diese allosterisch binden^[187-189, 291]. Neben den aufgeführten Agonisten und Antagonisten gibt es noch inverse Agonisten. Diese sind in der Lage den Rezeptor orthosterisch zu binden und wirken als Antagonist. Zudem sind sie in der Lage, die basale Rezeptoraktivität, die sich bei Abwesenheit von Agonisten zeigt, zu blockieren, indem sie bevorzugt die inaktive Konformation des Rezeptors binden und diese stabilisieren^[187, 188, 291].

1.2 Die Parathormon-Rezeptorfamilie

Die Parathormon-Rezeptorfamilie der Säugetiere umfasst die beiden Klasse B GPCRs Parathormon-Rezeptor 1 und 2 (PTHr1, PTHr2) und die drei Liganden Parathormon (PTH), PTH-related-Protein (PTHrP) und das Tuberoinfundibular-Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP 39)^[84].

1.2.1 Parathormon-Rezeptoren / PTHr1 und PTHr2

PTH-Rezeptor 1 (PTHr1)

Eine erste erfolgreiche Klonierung des zur Secretin-Rezeptor-Familie (Klasse B GPCR) gehörenden Parathormon-Rezeptor 1 (PTHr1) erfolgte im Jahr 1991^[151]. Bis heute konnte er in einigen Säugetieren wie Opossum, Maus, Schwein und auch im Menschen nachgewiesen werden^[151-154]. PTHr1 wird vorwiegend in Knochen- und Nierenzellen exprimiert^[86, 157]. Er wurde aber auch in Herz-, Uterus-, Plazenta-, Mama-, Ovar-, Testis- und Leberzellen nachgewiesen^[158]. Der PTHr1 besitzt eine Länge von 593 Aminosäuren und wie alle Klasse B GPCRs eine lange, hydrophile N-terminale extrazelluläre Domäne. Die Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung und wird durch drei Disulfidbrücken zwischen Cys48-Cys117, Cys108-Cys148 und Cys131-Cys170 stabilisiert^[155]. PTHr1 bindet mit ähnlicher Affinität die Peptidhormone PTH und PTHrP^[155]. Infolgedessen wird der Rezeptor aktiviert. Durch die Aktivierung können mindestens zwei intrazelluläre Signaltransduktionswege eingeschlagen und die Bildung von *second messengern* initiiert werden. Dabei ist eine Kopplung über die Bildung von cAMP, Diacylglycerol (DAG) oder Inositoltrisphosphat (IP₃) möglich (Abb. 1.6). Die Peptidhormone werden wegen ihrer aktivierenden Funktion kompetitive Agonisten genannt. Das im Jahr 1999 neu entdeckte Tuberoinfundibular-Peptid aus 39 Aminosäuren

(TIP 39) bindet mit moderater Affinität PTHR1, führt aber nicht zur Aktivierung des Rezeptors und somit nicht zu einer intrazellulären Antwort. Das gleiche gilt für die verkürzten PTH (7-34)- und PTHrP (7-34)-Fragmente. TIP 39 und die genannten Fragmente werden deshalb als kompetitive Antagonisten bezeichnet^[139, 156]. Die Funktion und physiologische Bedeutung des PTHR1 steht im engen Zusammenhang mit der Regulation der Blut-Kalzium-Konzentration und hat dadurch direkten Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von Knochen^[155].

PTH-Rezeptor 2 (PTHR2)

Der PTHR2 wurde aufgrund von Sequenzhomologien zu anderen Peptidhormon-Rezeptoren im Jahr 1995 identifiziert und den GPCRs der Klasse B zugeordnet^[159]. Der humane PTHR2 besitzt eine Länge von 550 Aminosäuren und zeigt eine etwa 70%ige Sequenzhomologie, wobei ca. 52 % der Aminosäuren identisch zum humanen PTHR1^[136] sind. Die identischen Aminosäuren finden sich weitestgehend in den Transmembranabschnitten und den drei intrazellulären Schleifen wieder^[162]. Der PTH-Rezeptor 2 zeigt ebenfalls für die Secretin-Rezeptor-Familie typische strukturelle Eigenschaften. Er besitzt eine hydrophile extrazelluläre N-terminale Domäne, die aber im Vergleich zur 191 Aminosäuren langen ECD des PTH-Rezeptors 1 um ca. 70 Aminosäuren auf 120 Aminosäuren verkürzt ist. Jedoch wird auch für sie ein streng konserviertes Disulfidbrückenmuster zwischen den sechs Cysteinresten (C48-C72, C63-C103 und C86-C125) vermutet, welches bereits für andere Klasse B GPCRs nachgewiesen werden konnte^[67, 68, 160, 163-165].

Der PTHR2 ist in der Lage PTH zu binden und eine intrazelluläre Antwort auszulösen^[155], während PTHrP nur sehr schwach mit dem PTHR2 interagiert und keine Aktivierung des Rezeptors verursacht^[133, 160]. Die Suche nach dem endogenen Liganden für PTHR2 führte im Jahr 1999 zur Entdeckung des Tuberoinfundibular-Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP 39), welches den Rezeptor effektiv aktiviert^[135, 137, 141, 161]. Im Gegensatz zum PTHR1 kann der PTHR2 durch Bindung von PTH und TIP 39 nur die cAMP-Signalkaskade aktivieren (Abb. 1.6). Die Bildung des *second messenger* Inositolphosphat nach Bindung von TIP 39 oder PTH konnte nicht nachgewiesen werden^[167].

Die Funktionen und die physiologische Bedeutung des PTH-Rezeptors 2 sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Sie basieren jedoch auf Verteilung und Vorkommen im Gewebe und werden zurzeit intensiv untersucht^[160, 171]. In ersten Experimenten an Nagetieren konnte mit Hilfe von *Northern-Blot*-Untersuchungen gezeigt werden, dass eine starke Expression im Gehirn, im Pankreas und in der Plazenta erfolgt^[136, 162]. Durch die Anwendung sensitiverer *in situ* Hybridisierungsmethoden konnte eine Lokalisation von PTHR2 auch in weiteren Geweben nachgewiesen werden. Eine zusätzliche Expression des PTHR2 zeigt sich deutlich in Herz und Lungenzellen, aber auch im zentralen Nervensystem und Gehirn, wo PTHR2 mit dem Tuberoinfundibular-Peptid 39 vermutlich als neuromodulares System interagieren und endokrine und nozizeptive Regulationsmechanismen modellieren^[136, 159, 169] kann. Eine Überprüfung der Expression von PTHR2 in den Nieren lieferte eine nur geringe Menge im Vergleich zum PTHR1, der aufgrund der Kalziumresorption in der Niere stark vorhanden ist^[162, 167]. Durch die Anwendung von immunhistologischen Methoden konnte auch die Expression von PTHR2 in parafollikulären Schilddrüsenzellen nachgewiesen werden, wodurch dem PTHR2 eine Rolle

bei der Kalziumregulation und bei Knochenauf- und Knochenabbauprozessen eingeräumt wird^[136]. Auch der im Jahr 2009 erbrachte Nachweis, dass PTHR2 bei der Chondrozyten-Proliferation und -Differenzierung eine Rolle spielt, erhärtet eine Funktion im Knochen- und Knorpelmetabolismus^[140]. Zusätzlich erfolgte im Jahr 2009 auch die Veröffentlichung von Ergebnissen, die eine Verteilung des PTHR2 und seinem Liganden TIP 39 im Menschen untersuchten^[170]. Die Daten zeigen ebenfalls eine starke Verteilung des Rezeptor/ Hormon-Systems im Gehirn und der Hypophyse. Vermutlich besitzt das System ähnliche oder gleiche Regulationsmechanismen wie in Nagetieren. Die Mechanismen umfassen die Regulation der Ausschüttung und Bildung von Hypophysenhormonen, Schmerz- und Angststörungen und nozizetiven Informationsverarbeitung^[142, 171-173].

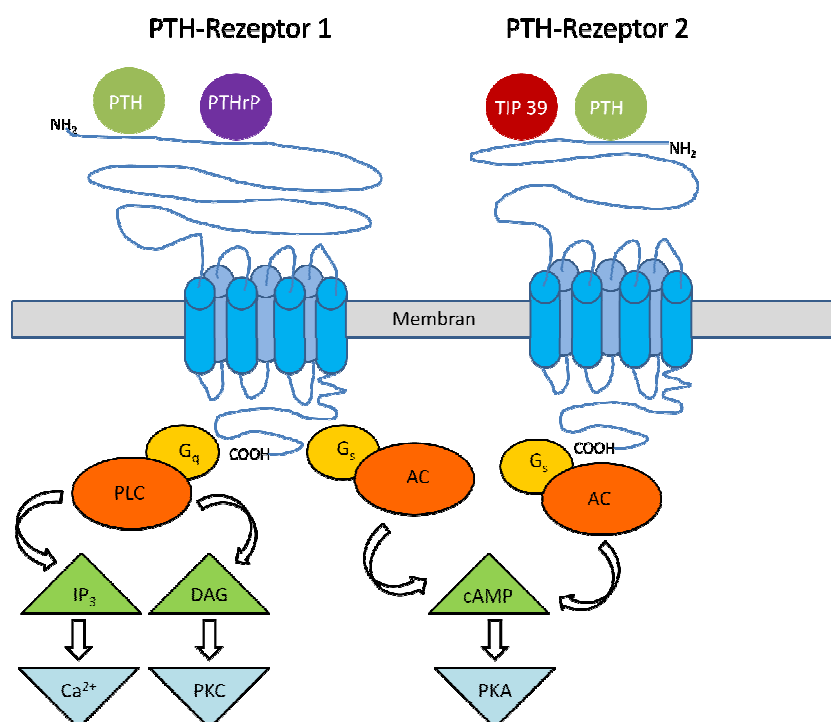


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der intrazellulären Signalübertragung des PTH-Rezeptors 1 und 2. Eine Kopplung des PTHR1 erfolgt nach der Bindung von PTH oder PTHrP sowohl an den cAMP-Signalweg als auch an den PLC-Signalweg. Im Gegensatz zum PTHR1 kann der PTHR2 nach Bindung und Aktivierung von TIP 39 oder PTH nur eine Aktivierung des cAMP-Signalwegs auslösen. G_q: G-Protein zur Kopplung an die PLC vermittelte Signaltransduktion, G_s: G-Protein zur Kopplung an die cAMP vermittelte Signaltransduktion, PLC: Phospholipase C, AC: Adenylatzyklase, IP₃: Inositoltriphosphat, DAG: Diacylglycerol, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, Ca²⁺: intrazelluläres Kalzium, PKC: Proteinkinase C, PKA: Proteinkinase A

1.2.2 Liganden der Parathormon-Rezeptoren 1 und 2

Parathormon (PTH)

PTH ist ein klassisches endokrines Peptidhormon und besitzt eine wichtige regulatorische Funktion bei der Kalzium- und Phosphathomöostase, bei der Aufrechterhaltung des Vitamin-D-Spiegels im Blut, sowie bei Knochenauf- und -abbauprozessen^[85-92]. Die Biosynthese des Parathormon erfolgt in den Epithelzellen der Nebenschilddrüse über die Ausbildung eines Präparathormons^[93], welches durch zelluläres Prozessieren in eine

aktive Form PTH (1-84) überführt und bis zur Freisetzung in sekretorischen Vesikeln oder frei im Cytosol gelagert wird^[94-96].

Die physiologische Freisetzung von aktivem PTH erfolgt bei einem reduzierten extrazellulären Kalziumspiegel und bei erhöhtem Phosphatgehalt im Blut. Bei diesen Bedingungen ist PTH, neben Calcitonin und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, der wichtigste Regulator des Kalziumhaushalts, indem es seine Wirkung auf Niere und Knochen entfaltet. In der Niere bewirkt die Bindung des PTH an den Parathormon-Rezeptor 1 eine verstärkte Resorption von Kalzium im distalen Tubulus. Zeitgleich erfolgt eine verminderte Resorption von Phosphat am proximalen Tubulus, indem die Expression der Natrium-Phosphat-Co-Transporter NPT-2a und NPT-2c beeinflusst wird^[97, 98]. Durch die von PTH in den Nierenzellen ausgelösten Signalkaskaden kommt es auch zur verstärkten Freisetzung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Dies bewirkt zusätzlich eine verstärkte Kalziumresorption an der Darmschleimhaut und führt zu einer rückgekoppelten Erhöhung des Kalziumblutspiegels und Wiederherstellung der Homöostase^[98-100]. Im Knochengewebe bewirkt PTH eine verstärkte Ausbildung neuer Osteoklasten und erhöht zudem ihre Aktivität. Infolge dessen kommt es zu einer gesteigerten Freisetzung von Kalzium- und Phosphationen ins Blut^[15, 17]. Paradoxerweise wird zeitgleich die Knochenneubildung stimuliert, indem PTH die Osteoblasten zum Knochenaufbau anregt. Aufgrund dieser anabolen Wirkung wird rekombinant hergestelltes PTH (1-34), unter der Markenbezeichnung „Teriparatid“, und PTH (1-84) zur Behandlung von Osteoporose verwendet^[101, 103]. Innerhalb des Blutkreislaufs hat intaktes PTH (1-84) eine relativ kurze Halbwertszeit von ca. zwei Minuten und wird durch Protolyse in Leber- oder Nebenschilddrüsenzellen in kürzere biologisch aktive PTH-Fragmente gespalten^[103-106]. Die dabei entstehenden amino- und carboxyterminalen Fragmente werden dann den Zielzellen zugeführt. Obwohl in zahlreichen Untersuchungen gezeigt wurde, dass ausschließlich die aminoterminalen Region des PTH-Moleküls PTH (1-34) für dessen beschriebene Bioaktivität ausreichend ist^[85, 102, 104, 155], gibt es auch Hinweise und Ergebnisse auf einen Rezeptor (CPTHR) in Osteocyten, der spezifisch C-terminale PTH-Fragmente erkennt^[88, 89, 107, 108] und damit einen rückgekoppelten Einfluss auf den Knochenbau ausüben kann.

Neben der zuvor beschriebenen Bindung und Aktivierung des PTHR1 ist humanes PTH (1-84) zusätzlich in der Lage den PTHR2 als Agonist zu binden und zu aktivieren^[185]. Unter physiologischen Bedingungen zeigt PTH auch posttranslationale Modifikationen. PTH wird in den Zellen der Nebenschilddrüse häufig in einem phosphoryliertem Zustand gefunden (ca. 10-20 % der Gesamtmenge)^[190]. Über die Rolle dieses modifizierten PTHs bei der Regulation von Signaltransduktionsprozessen und der Interaktion mit den PTH-Rezeptoren ist bis heute nur wenig bekannt.

Strukturinformationen über unterschiedlich lange PTH-Fragmente konnten mit Hilfe von NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie erhalten werden^[109-112]. PTH (1-34) besteht aus einer kurzen N-terminalen und einer längeren C-terminalen α -Helix, die über eine definierte *Loop*-Region von His14 bis Ser17 miteinander verbunden sind (Abb. 1.8).

Parathormon-related-Protein (PTHrP)

PTHrP ist ein analoges Peptidhormon und wird im Gegensatz zu PTH in fast jeder Zelle oder jedem Gewebetyp innerhalb des Körpers exprimiert^[113, 114]. Es konnte erstmalig aus

verschiedenen Tumoren, die eine Hyperkalzämie verursachen, isoliert werden^[114-117]. Im Vordergrund stehen hierbei Hyperkalzämieerkrankungen, die besonders bei Frauen mit Mammakarzinom^[118-120] auftreten.

Im Normalfall ist PTHrP ein para- und autokriner Faktor mit einer Vielzahl physiologischer Aufgaben. PTHrP ist an der Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung von fötalem und adultem Gewebe^[121], am transepithelialen Ca^{2+} -Transport in der Niere, der Plazenta, dem Eileiter und der Brustdrüse beteiligt^[98, 122]. Auch eine aktivierende Wirkung auf Osteoblasten und Osteoklasten konnte nachgewiesen werden^[123, 124], sowie eine Beteiligung an Muskelrelaxationsprozessen im Uterus und Gefäßen^[125] und bei der Entwicklung von Haut-, Haar-, Brustdrüsen- und Zahngewebe^[113]. Das ursprüngliche Genprodukt des humanen PTHrP besteht aus 141 Aminosäuren, wobei durch alternatives RNA-*Splicing* des Primärtranskripts weitere Proteinisoformen aus 139 und 173 Aminosäuren entstehen können. Diese Varianten sind dann bis zur AS 139 identisch^[126-128]. PTHrP wird auch als Polyhormon bezeichnet, da die Isoformen mit Hilfe der Prohormon-Konvertase innerhalb der exprimierenden Zellen zu kleineren, biologisch aktiven Peptid-Fragmenten prozessiert werden^[129]. Dadurch entsteht das N-terminale Fragment PTHrP (1-36), mit einer klassischen Bindungskompetenz für den PTHR1 und der sich anschließenden zellulären Signalkaskade^[130]. Es werden auch das *Midregion*-Fragment PTH (38-94) mit DNA Bindungs- und Regulationseigenschaften^[131] und das carboxyterminale PTHrP (107-139) gebildet. Neben den genannten Peptiden werden noch weitere Intermediatpeptide, wie PTHrP (1-86), PTHrP (1-94), PTHrP (107-138), PTHrP (107-153) und PTHrP (38-86), im Körper gefunden^[132]. Ihre physiologische Rolle ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. PTHrP bindet auch den PTHR2, löst hier aber keine messbare intrazelluläre Antwort aus und zeigt so eine antagonistische Wirkung^[133].

Vergleiche der Genorganisation^[127] und Proteinstrukturen^[111, 134] für PTH und PTHrP zeigen eine hohe Homologie und verweisen auf eine evolutionäre Verwandtschaft. Dennoch zeigen sich bei einem Aminosäuresequenzvergleich nur acht identische Aminosäuren innerhalb der ersten 13 Aminosäuren des N-terminalen Fragments und vereinzelt weitere in den höheren Bereichen bis AS 34 (Abb. 1.7). Die NMR-Struktur von PTHrP (1-34) zeigt viel Ähnlichkeit mit PTH (1-34)^[111, 134] (Abb. 1.8). PTHrP (1-34) besteht ebenfalls aus einer kurzen N-terminalen und einer längeren C-terminalen α -Helix, die über eine flexible Linker-Region miteinander verbunden sind^[111, 134].

Tuberoinfundibular-Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP 39)

TIP 39 konnte im Jahr 1999 als weiteres Peptidhormon in die Familie der Parathormonliganden aufgenommen werden^[84, 135, 136]. Es wurde erstmalig aus bovinem Hypothalamus isoliert und zeigte eine potente Aktivierung des humanen PTH-Rezeptors 2^[84]. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen bovinem und humanem TIP 39 lieferte eine eindeutige Übereinstimmung^[137, 138].

Aufgrund der umfassenden Gewebeverteilung von TIP 39 und einer Co-Lokalisation mit dem PTHR2 wird eine Vielzahl physiologischer Funktionen vermutet. Es wird eine Expression in fötalem und adultem Hirngewebe, im Cerebellum, im Rückenmark, in der Trachea, in Herz und Leber, sowie in Nieren und Chondrozytengewebe beobachtet^[15, 84, 135, 136, 140-143]. Dadurch ergeben sich unter anderem eine mögliche Rolle bei

der Schmerzempfindung und Weiterleitung^[144], aber auch ein Einfluss bei der Regulation des Blutdrucks, sowie im Knochen- und Knorpelmetabolismus^[143]. Eine zentrale Aufgabe besitzt das TIP 39/ PTHR2-System außerdem bei der Steuerung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse^[145]. TIP 39 und der physiologische Rezeptor PTHR2 bilden ein neuromodulatorisches System und können durch ihre Aktivität das limbische und endokrine System beeinflussen und auch als Antwort auf akustischen Stress gebildet werden^[146, 149].

TIP 39 bindet neben dem PTHR2 auch PTHR1, allerdings mit verminderter Affinität im Vergleich zu PTH (1-34). TIP 39 entfaltet hier jedoch eine antagonistische Wirkung auf die Signaltransduktion^[141, 147]. Die Entfernung der ersten sechs N-terminalen Aminosäuren von TIP 39 führt zu dem Antagonisten TIP (7-39) mit verbesserter Affinität für PTHR1 im Vergleich zu bekannten PTHR1-Antagonisten wie PTH (7-34) und PTHrP (7-34)^[139, 148]. In diesem Zusammenhang und mit der Stellung bei der Schmerzvermittlung ist TIP 39 eine gute Quelle für die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung von Hyperkalzämie und Osteoporose, aber auch zur Behandlung chronischer Schmerzen^[149].

TIP 39 wird höchst wahrscheinlich ebenfalls aus einem Propeptid gebildet^[141]. Es gibt aber bis zum jetzigen Zeitpunkt keine weiteren Hinweise für posttranslationale Modifikationen^[136, 138]. Die phylogenetische Analyse der drei Peptide PTH, PTHrP und TIP 39 liefert Hinweise, dass alle einen gemeinsamen Vorläufer haben^[137]. Dieses Vorläuferpeptid ist bis heute unbekannt. Dennoch zeigt ein Vergleich der Aminosäuresequenz der drei Peptide (Abb. 1.7) nur marginale Übereinstimmungen^[136]. TIP 39 zeigt eine Homologie von nur vier Aminosäuren in PTH und PTHrP und mit sechs in PTH allein. Werden aber ähnliche Aminosäuren beim Sequenzvergleich berücksichtigt, zeigt sich eine Erhöhung der Homologie auf ca. 50 %^[136]. Ein Vergleich der NMR-Strukturen (Abb. 1.8) zeigt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit der drei Peptide. TIP 39 besteht ebenfalls aus zwei α -helikalen Regionen, die von den Aminosäuren Ala5 bis Ala19 und Asn27 bis Leu34 gebildet werden und unter Mithilfe von flexiblen Bereichen einander zugeneigt sind^[150]. Für die Parathormon-Rezeptoren 1 und 2 gibt es also sequenziell verschiedene, aber strukturell ähnliche Liganden.

	10	20	30	
TIP39	S L A L A D D A A F R E R A R L L A A L E R R H W L N S Y M H K L L V L D A P	39		
PTH(1-34)	- - S V S E I Q L M H N L G K H L N S M E R V E W L R K K L Q D V H N F - - -	34		
PTHrP(1-36)	- - A V S E H Q L L H D K G K S I Q D L R R R F F L H H L I A E I H T A E I -	36		

Abbildung 1.7: Aminosäuresequenzvergleich von PTH (1-34), PTHrP (1-36) und TIP 39. Die Abbildung wurde aus [149] entnommen. Identische Aminosäuren sind schwarz schattiert und ähnliche AS sind mit grau untersetzt.

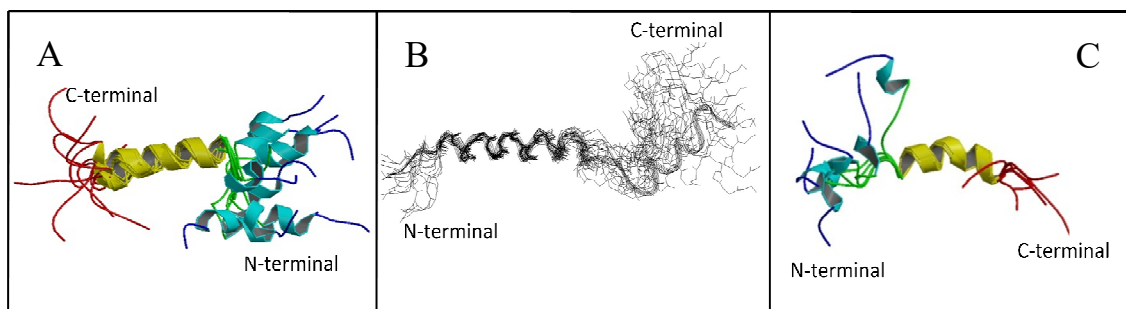


Abbildung 1.8: Strukturelle NMR-spektroskopische Darstellung der Liganden. A: PTH (1-34), B: TIP 39 und C: PTHrP (1-36). Die Abbildungen wurde aus [109, 134, 150] entnommen und modifiziert.

1.2.3 Ligandenbindung, Rezeptoraktivierung und Selektivität

***Two-domain-binding* Modell**

In den zurückliegenden Jahren konnte aus der Anwendung verschiedener funktioneller und biophysikalischer Experimente, wie *photo-affinity-cross-linking* mit *para*-Benzoyl-L-Phenylalanin (BPA) modifiziertem PTH und PTHrP^[174], Mutagenese- und Chimär-Studien mit den Rezeptoren und Liganden^[175, 176], FRET-Methoden^[177], *molecular-modeling*^[98, 177], Röntgenkristallographie^[75, 79] und NMR-Spektroskopie^[178, 179], wichtige Informationen über den generellen PTHR1/PTH-Bindungsmechanismus gewonnen werden^[180, 85, 98, 155]. Die Ergebnisse definieren die große N-terminale extrazelluläre Domäne des PTHR1 als Ligandenbindungsdomäne. Auch der Grenzbereich zwischen N-terminaler Domäne und der ersten Transmembranhelix sind für die Ligandenbindung wichtig. Außerdem besitzen die den Rezeptor aktivierenden Liganden zwei Interaktionbereiche mit dem Rezeptor. Der C-terminale Bereich des PTH (1-34) (AS 20-31) wird als Rezeptorbindungsfragment und der N-terminale Bereich des PTH (1-34) (AS 1-19) als Aktivierungsfragment bezeichnet. Aus diesen strukturellen Gegebenheiten resultiert die Vorstellung eines *two-domain-binding* Modell, für die Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung, auch *two-binding-step-mechanism* genannt (Abb. 1.9).

In diesem Modell bindet der Ligand mit zwei verschiedenen Assoziationsraten an den Rezeptor. Im ersten schnellen Schritt bindet die amphiphatische α -Helix des C-terminalen Bereichs des PTH (1-34), welche eine Schlüsselrolle für die Rezeptorerkennung, Bindung und Affinität hat, an die N-terminale Domäne des Rezeptors, indem PTH seine hydrophobe Oberfläche präsentiert^[85]. Auch die konservierten Aminosäuren Arg20 und Trp23 des PTH (1-34) sind für eine Bindung des PTHR1 nötig. Eine Mutation dieser Aminosäuren unterbindet die Wechselwirkung zwischen PTH und ECD-PTHR1^[179]. Anschließend, im zweiten und langsameren Schritt, interagiert das N-terminale Fragment des Liganden mit extrazellulären *Loop*- und Transmembranbereichen des Rezeptors (Juxtamembran-Regionen, J-Domänen, *core domain*) und löst dadurch eine Konformationsänderung des selbigen aus. Besonders erwähnenswert ist Val2 des PTH (1-34), welches für die Ausbildung einer α -Helix im Bereich der AS 1-19 nach einer Interaktion mit Met425 am extrazellulären Ende der Transmembran-Helix 6 des Rezeptors verantwortlich ist^[85, 98, 186]. Durch die Konformationsänderung von PTHR1 wird der Rezeptor aktiviert. Die Interaktion des Liganden mit den J-Domänen des Rezeptors sind essentiell für die Induktion und Stabilisierung konformationeller Änderungen im Rezeptor und die Aktivierung der G-Protein-Kopplung^[85]. Eine durch Agonisten induzierte Bewegung der Transmembran-Domänen (TM) TM3 und TM6 konnte für PTHR1 demonstriert werden^[155, 181]. Durch die Bewegung der TM-Domänen wird die Zugänglichkeit der zytoplasmatischen *Loops* für das heterotrimere G-Protein erhöht und im Folgenden durch den Austausch von GDP durch GTP ebenfalls aktiviert^[23, 155, 180].

Das hier beschriebene generelle Bindungs- und Aktivierungsmodell von PTHR1 und PTH stellt eine Vereinfachung dar, konnte aber auch durch ähnliche Studien für GLP1R und Glucagon (ebenfalls Klasse B GPCR und Peptidhormon) bestätigt werden^[181]. Das *two-domain-binding* Modell kann aufgrund gleicher struktureller Merkmale auf andere Klasse B GPCRs, wie den Parathormon-Rezeptor 2, den Calcitonin-Rezeptor oder den Glucagon-Rezeptor, übertragen werden^[149, 182]. Wegen der strukturellen Zusammenhänge und

Ähnlichkeiten ist die molekulare Basis für die Interaktion des TIP 39 und PTH-Liganden mit dem PTHR2 gut mit dem für PTHR1 beschriebenen *two-site-model* vereinbar^[183]. Die strukturellen und konformationellen Voraussetzungen für die Selektivität der Parathormon-Rezeptoren 1 und 2 und der drei Liganden PTH, PTHrP und TIP 39, aber auch für andere Rezeptoren und Liganden mit Selektionsvermögen, bleiben dennoch bis heute weitestgehend unklar^[180]. Unabhängig vom *two-domain-binding* Modell konnte für die isolierte N-terminale extrazelluläre Domäne des PTH-Rezeptors 1 und auch für andere Klasse B GPCR-Ectodomänen gezeigt werden, dass diese separat gegenüber ihren Liganden bindungsfähig sind, wobei die Affinität im Vergleich zum Gesamtrezeptor stark reduziert ist^[67-69, 78, 79, 82, 83, 102].

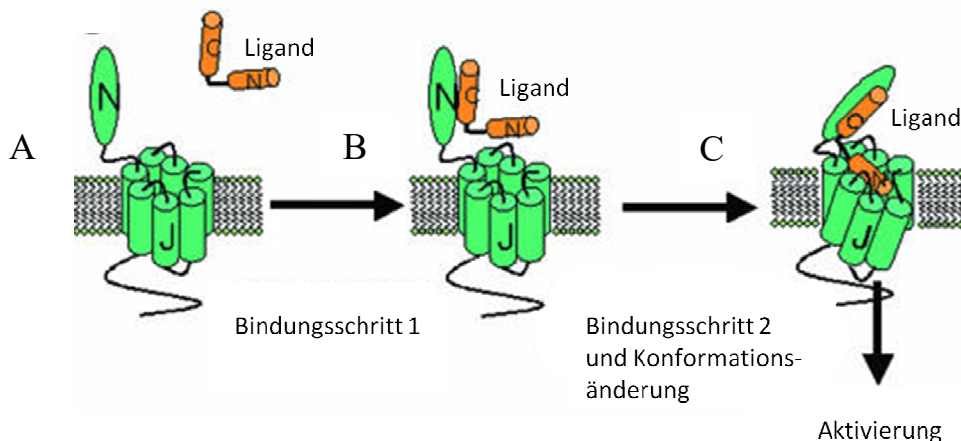


Abbildung 1.9: Mechanistische Darstellung des *two-domain-binding* Modells für die Bindung und Aktivierung von GPCRs. Im ersten Schritt kommt es zur Orientierung des Peptid-Liganden und des Rezeptors für eine initiale Bindung. Der initiale Komplex entsteht zwischen C-Terminus des Liganden und der N-terminalen Domäne des Rezeptors, (A). Im zweiten Schritt erfolgt die Assoziation der N-terminalen Bereiche des Liganden mit den J-Domänen-Bereich (extrazelluläre *Loops* und sieben Transmembrandomänen (7-TM) des Rezeptors), (B). Durch diese Interaktion wird eine Konformationsänderung der 7-TM- und der zyttoplasmatischen Domänen ausgelöst (C), was zur Bindung eines heterotrimeren G-Proteins und einer intrazellulären Signalantwort führt. Die Abbildung wurde aus [177] entnommen und modifiziert. Die Bindungsreaktion besteht aus zwei Assoziationsraten, einer schnellen für den ersten Bindungsschritt und einer langsameren für den zweiten Bindungsschritt. N: N-terminale Bereiche, C: C-terminale Bereiche, J: Juxtamembran-Regionen (J-Domänen, Transmembranbereiche).

Hot dog Modell

Das aus Strukturdaten von ECD-PTHR1/PTH und anderen ECD-Strukturen abgeleitete *hot dog* Modell ist eine weitere Vorstellung, wie man sich die Erkennung und Bindung von Liganden bei Klasse B GPCRs vorstellt. In Abbildung 1.10 ist der gemeinsame strukturelle Mechanismus der Peptidhormonerkenkung im Rahmen des *hot dog* Modells für einige Klasse B GPCR-Ectodomänen dargestellt. Es wird angenommen, dass auch dieses Modell für die Rezeptor-Ligand-Interaktion auf andere GPCRs der Klasse B übertragen werden kann^[78].

Bei diesem Modell steht die N-terminale Hormonbindungsdomäne im Vordergrund. Man geht davon aus, dass das Peptidhormon als amphiphatische Helix in einer hydrophoben Furche der N-terminalen Domäne des Rezeptors bindet^[78]. Diese Furche wird aus einer dreischichtigen α - β - β - α -Struktur gebildet. Zwei Paare antiparalleler β -Faltblätter sind über Linkerregionen miteinander verbunden. Die Struktur ist zusätzlich durch Disulfidbrücken

und hydrophobe Interaktionen in der Domäne stabilisiert. Als Begrenzung der β -Faltblätter bildet der N-terminale Bereich der extrazellulären Domäne eine längere und der äußerste C-terminale Bereich eine sehr kurze α -Helix (1-2 Windungen). Die lange N-terminale α -Helix und die C-terminalen β -Faltblätter bilden so die Ober- und Unterseite der Bindungstasche (zwei „Brötchenhälften“)^[78, 180]. Diese Organisationsstruktur und die prinzipielle Ligandenerkennung konnte für die humanen Rezeptor/Peptid-Systeme PTHR1/PTH, GLP1R/GLP1, GIPR/GIP und CRFR1/CRF nachgewiesen werden^[180]. Der α - β - β -Zustand ist wahrscheinlich ein konserviertes strukturelles Merkmal aller Klasse B GPCR-Ectodomänen. Er wird deshalb auch als *secretin family recognition fold* bezeichnet^[71].

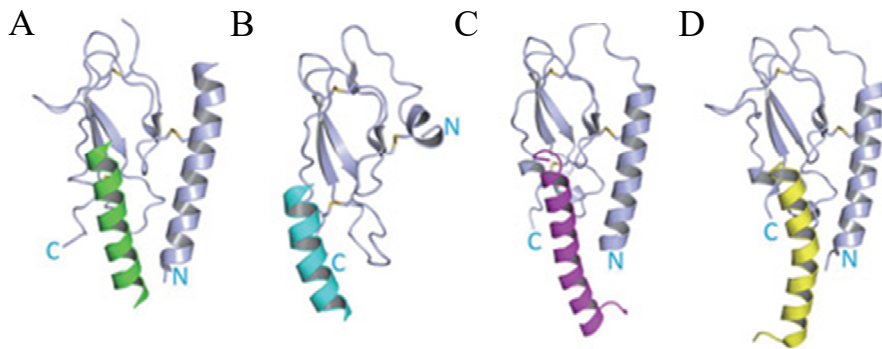


Abbildung 1.10: Strukturelle Architektur bekannter extrazellulärer N-terminaler Domänen von GPCRs der Klasse B (*secretin family recognition fold*) und Darstellung des *hot dog* Bindungsmodells. A: Struktur des hPTH1R/PTH Komplex mit der ECD in hellblau und PTH in grün, B: Struktur des hCRFR1/CRF Komplex mit ECD in hellblau und CRF in cyan, C: Struktur von hGIPR/GIP Komplex mit ECD in hellblau und GIP in magenta, D: Struktur des hGLP1R/GLP1 mit ECD in hellblau und GLP in gelb. Die Abbildung wurde modifiziert und aus [180] entnommen.

Ligandenselektivität

Die meisten Klasse B GPCRs zeigen die Eigenschaft mehr als einen Liganden zu binden^[180]. So zeigt z.B. der PAC-1-Rezeptor eine hohe Affinität gegenüber den bekannten PACA-Peptiden PACAP (1-38) und PACAP (1-27) und kann zusätzlich mit dem VIP interagieren. Auch die Peptide Exendin, Glucagon und Glucagon-*like*-Peptid zeigen eine Selektivität gegenüber dem Glucagon- und Glucagon-*like*-Peptid-Rezeptor^[79, 81, 181, 186].

Die Steuerung der Signaltransduktion in der Parathormon-Rezeptorfamilie erfolgt ebenfalls über eine selektive Bindung der Parathormon-Liganden PTH, PTHrP und TIP 39 an die beiden Rezeptoren PTHR1 und PTHR2. Der PTHR1 zeigt eine selektive Bindung und Aktivierung durch PTH und PTHrP, während der PTHR2 durch die selektive Bindung von TIP 39 und PTH aktiviert wird. Bis heute sind die strukturellen und konformationellen Voraussetzungen für die Selektivität der Parathormon-Rezeptoren 1 und 2 und der drei Liganden PTH, PTHrP und TIP 39, aber auch für andere Rezeptoren und ihre Liganden mit Selektionsvermögen noch nicht vollständig verstanden^[180]. Auf der Basis von radioaktiv markierten Ligandenbindungsstudien an Wildtyp- und Chimären- PTHR1- und PTHR2-Rezeptoren konnten die ersten sechs Aminosäuren von PTH und TIP 39 als wichtige Selektionsgröße identifiziert werden^[135, 139]. Auch Trp23, eine unveränderliche Aminosäure, ist möglicherweise verantwortlich für die selektive Bindung der beiden Liganden am PTHR2^[149, 169, 180].

Auch die extrazelluläre N-terminale Domäne der PTH-Rezeptoren und anderer Klasse B GPCRs spielt bei der Bindung verschiedener Liganden eine wichtige Rolle^[186]. Nach dem *two-domain-binding* Modell erfolgt eine Bindung der Liganden über C-terminale Bereiche der Peptidhormone an die N-terminale Domäne des Rezeptors, während die Rezeptoraktivierung durch Interaktion von N-terminalen Ligandbereichen mit der *core-domain* des Rezeptors erfolgt. Eine Bindung und Selektion von Liganden erfolgt somit vor der Rezeptoraktivierung über die Bindung an die extrazelluläre N-terminale Domäne des Rezeptors. Die N-terminale Domäne der Klasse B GPCRs ist vermutlich die entscheidende Selektionsdomäne des Rezeptors, um zwischen verschiedenen Liganden mit abweichenden Aminosäureresten im C-terminalen Bereich zu unterscheiden^[186]. Möglicherweise erfolgt die Selektion über divergente Affinitäten gegenüber den einzelnen Peptid-Liganden.

Für die PTH-Rezeptoren und andere GPCRs verschiedener Klassen wird aber auch angenommen, dass sie sich hinsichtlich ihrer Konformation flexibel verhalten können. Das heißt, neben einem inaktiven (R) und aktiven (R*, G-Protein gekoppelt) Zustand gibt es weitere verschiedene Aktivierungszustände der Rezeptoren (R⁰ⁱ⁺¹). Diese unterschiedlichen Konformationen der Rezeptoren können durch verschiedene selektive Liganden gebunden und stabilisiert und dadurch unterschiedliche Signalkaskaden eingeleitet werden^[85]. Die eben beschriebenen Interaktionsprozesse werden als ligandenbasierte konformationelle Selektivität bezeichnet und sind eine Erklärung, warum ein Rezeptor verschiedene Liganden binden kann. So konnte in Studien, welche die Interaktion von PTH und seinem PTH-Rezeptor untersuchten, eine neue *high-affinity* Konformation (R⁰) für PTHR1 identifiziert werden^[191], die wahrscheinlich nicht an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt ist, wie es sonst für den aktiven Zustand beschrieben wird. Im Vergleich mit PTHrP (1-36) bindet PTH (1-34) mit größerer Selektivität die aktive R⁰-Konformation als den R*-Zustand^[191].

1.3 Ziele dieser Arbeit

In den zurückliegenden zehn Jahren wurden einige Anstrengungen unternommen, um ein gutes Verständnis über die Funktion und Struktur der *Mammalia* Parathormon-Rezeptorfamilie zu gewinnen. Der Bindungsmechanismus für PTHR1 und seiner postulierten Liganden PTH und PTHrP ist bereits gut charakterisiert, während der Selektionsmechanismus der beiden PTH-Rezeptoren 1 und 2 zur Diskriminierung verschiedener Liganden (Agonisten und Antagonisten) immer noch unverstanden ist. Auch die Aufklärung des jüngeren TIP 39 und PTH-Rezeptor-2-Systems hinsichtlich seiner physiologischen Rolle im Kalzium- und Phosphathaushalt, bei der Schmerzvermittlung, sowie die molekularen Wechselwirkungen selbst, bekommt eine immer größere Bedeutung in der strukturellen und medizinischen Forschung^[149].

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Optimierung von Protokollen, die eine leistungsstarke und effiziente heterologe Expression und Reinigung der Peptidliganden PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39 erlauben, um sie anschließend strukturell und in Ligand-Bindungsstudien zu untersuchen. Neben der Bereitstellung größerer Peptidmengen sollte auch eine effiziente Isotopenmarkierung für die Peptide und die extrazelluläre N-terminale Domäne des PTH-Rezeptors 1 (ECD-PTHR1) erreicht werden, um hochaufgelöste NMR-spektroskopische Analysen an ihnen durchzuführen.

Trotz guter Kenntnisse der Signaltransduktionsprozesse und der Rezeptoraktivierung von PTHR1 ist bis heute sehr wenig über den Einfluss von posttranslational phosphoryliertem PTH auf die Rezeptoraktivierung bekannt. Aus diesem Grund sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob das rekombinant hergestellte humane PTH (1-84) im dephosphorylierten Zustand die PTH-Rezeptoren 1 und 2 aktivieren und binden, sowie im phosphorylierten Zustand deaktivieren und dadurch Einfluss auf die Regulation der GPCR-Aktivierung nehmen kann.

Alle bekannten Studien, die sich mit der Charakterisierung der molekularen Wechselwirkung von PTHR2 und seinen Liganden beschäftigen, beruhen auf *in vivo* Studien an PTHR2 exprimierenden Zelllinien. Bis heute ist es nicht gelungen, den gesamten Rezeptor oder definierte Domänen des humanen PTH-Rezeptor 2 für *in vitro* Studien zur Verfügung zu stellen. Um eine detaillierte biochemische und strukturelle Charakterisierung von PTHR2 zu initiieren sollte, als ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die für die Ligandenbindung wichtige extrazelluläre N-terminale Domäne des PTHR2 (ECD-PTH2) kloniert und mittels rekombinanter Expression in *E. coli* als eigenständiges Rezeptorfragment hergestellt werden. Anschließend sollte diese Proteindomäne auf die Ausbildung einer nativen Struktur mit korrekten Disulfidbrückenmuster untersucht und die Funktionalität von ECD-PTH2 durch die Bindungskompetenz gegenüber den spezifischen Agonisten TIP 39 und PTH (1-84) bestätigt werden. Mit der Gewinnung ausreichender Mengen homogenen Materials von ECD-PTH2 sollte auch eine Basis für hochauflösende strukturelle Untersuchungen (NMR-Spektroskopie, Kristallographie) geschaffen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien (Chemikalien, Enzyme, Peptide, Proteine, Plasmide, Mikroorganismen, Nährmedien, sowie die verwendeten Standards, *Kits* und sonstige Verbrauchsmaterialien, aber auch die genutzten Geräte, Zubehör und *Software*-Programme sind tabellarisch im Anhang 3 aufgeführt. Die benutzten Chemikalien hatten mindestens einen Reinheitsgrad von p.A.. Sie wurden von den Firmen VWR (Darmstadt, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, D), Applichem (Darmstadt, D), Gerbu, (Gaiberg, D) und Fluka (Buchs, CH) bezogen. Für die Herstellung von Pufferlösungen wurde doppelt deionisiertes und unter UV-Licht steril filtrierte Wasser verwendet und die erhaltenen Lösungen über einen Mikrofilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Der nötige pH-Wert wurde mit CH₃COOH, HCl, NaOH oder KOH eingestellt. Für Arbeiten mit Chromatographiesäulen wurden verwendete Pufferlösungen zuvor steril filtriert, entgast und bei 4 °C gelagert. Pufferlösungen, die für spektroskopische Untersuchungen verwendet wurden, wurden ebenfalls entgast und über einen 0,2 µm Filter filtriert. Verwendete Oligodesoxynucleotide (*Primer*) sind ebenfalls im Anhang (Tabelle A1) genannt und wurden, wie die für molekularbiologische Reaktionen verwendeten Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) und ATP, von den Firmen Invitrogen (Life Technologies, Darmstadt, D) und Fermentas, (St.Leon-Rot, D) bezogen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden 5 ml Übernachtskulturen der entsprechenden Bakterien, die das zu isolierende Plasmid enthielten, verwendet. Es wurden 2 ml der Kultur zentrifugiert (3 min, 7000 rpm, 4 °C) und das Pellet gemäß den Herstellerangaben mit dem Roti®-Prep Plasmid Mini-*Purification* System der Firma Jena *Bioscience* oder dem Wizard Plus DNA *Purification* System der Firma Promega aufgearbeitet. Der Zellaufschluss erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die über *SpinColumns* gereinigte Plasmid-DNA wurde mit 30 µl Nuklease freiem Wasser eluiert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert, durch *Seqlab* sequenziert und bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR), Kolonie-PCR und *overlap extension* PCR

PCR

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Im Prinzip besteht die PCR aus drei Zyklen. Der erste Schritt besteht aus der Auftrennung von DNA-Doppelsträngen (Denaturierung). Im zweiten Schritt erfolgt die Hybridisierung des *Primer*-Paares mit der denaturierten DNA (*Annealing*). Die Verlängerung (*Elongation*) der *Primer* unter Mithilfe von DNA-Polymerase ist der dritte Schritt. In dieser Arbeit wurden die *Taq*- und *Phusion*-DNA-Polymerase verwendet. Die *Phusion* besitzt im Vergleich zur *Taq*-Polymerase eine zusätzliche *Proofreading*-Funktion

und dadurch eine höhere DNA-Synthesegenauigkeit. Die Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes erfolgte nach den Herstellerangaben der verwendeten DNA-Polymerasen. Der Ansatz mit *Taq* in ddH₂O enthielt 2 U *Taq*-Polymerase, 1 x *Taq*-Reaktionspuffer, 25 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, je 0,2 µM *Primer* und ca. 5 ng *Template*-DNA. Für die Ansätze mit *Phusion* wurde 1x *Phusion*-Reaktionspuffer verwendet. Das Temperaturprogramm für die PCR setzte sich wie folgt zusammen: 2 min Pre-Denaturierung bei 95 °C, dann 30 Zyklen 10 s Denaturierung bei 95 °C, 15 s *Annealing* der *Primer*-Paare bei 55-69 °C und 10 s Elongation bei 72 °C. Anschließend erfolgte ein verlängerter Syntheseschritt für 10 min bei 72 °C. Abschließend wurde der Ansatz auf 4 °C gekühlt. Alle erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer erwarteten Nukleobasenlänge untersucht.

Kolonie-PCR

Um den Erfolg einer Klonierung zu überprüfen und um zu sehen, ob die inserierte DNA-Sequenz in einem Bakterien-Klon vorlag, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Bei der Kolonie-PCR wird keine gereinigte DNA als *DNA-Template* verwendet, sondern eine einzelne Bakterienkolonie. Das Volumen der Reaktionsansätze betrug hierbei jeweils nur 10 µl, wobei die vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen der einzelnen Komponenten eingehalten wurden. Der Ansatz enthielt als *Template* DNA einer Bakterienkolonie, *Taq*-Polymerase und das T7/ Terminator-*Primer*-Paar. Nach Durchführung der PCR-Reaktion wurde der Erfolg durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft und das Gel auf die erwartete Bandengröße analysiert.

Overlap extension PCR

Die *overlap extension* PCR verläuft im Prinzip wie eine normale PCR, mit dem Unterschied, dass das *DNA-Template* mit chimären *Primer*-Paaren in einer 1. PCR-Reaktion amplifiziert wurde. Das bedeutet, die verwendeten *Primer* enthielten Basen der cDNA (*Inserts*) und zusätzliche Basen für den Klonierungsvektor. Als Folge dieser 1. PCR-Reaktion entstanden *Mega-Primer*, die überlappende Regionen mit dem Zielvektor besaßen. In einer anschließenden 2. PCR-Reaktion diente der Zielvektor als *Template* zur Amplifizierung der *Mega-Primer*, die durch die verwendete *Phusion*-DNA-Polymerase verlängert wurden. Nach mehreren PCR-Zyklen wurde das neue mit *Insert* versehene Plasmid in einer Mischpopulation mit dem Ausgangsvektor akkumuliert. Der verbliebene und methylierte Ausgangsvektor wurde anschließend mit *DpnI* degradiert (1 µl *DpnI* Stammlösung zum 50 µl PCR-Ansatz und 1 h Inkubation bei 37 °C) und 5 µl des neuen Plasmids in *E. coli* DH5α Zellen transformiert. Die *overlap extension* PCR wurde zur Herstellung der Klonierungsvektoren von pTSnG-ECD-PTHR2 und pET-SUMO-ECD-PTHR2 benutzt. Dafür wurde die im Jahr 2010 neu entwickelte Methode nach Bryksin und Matsumura^[192] im Labor von Prof. Dr. Jochen Balbach etabliert. Die Abbildung 2.1 gibt einen schematischen Überblick über die beschriebene Prozedur.

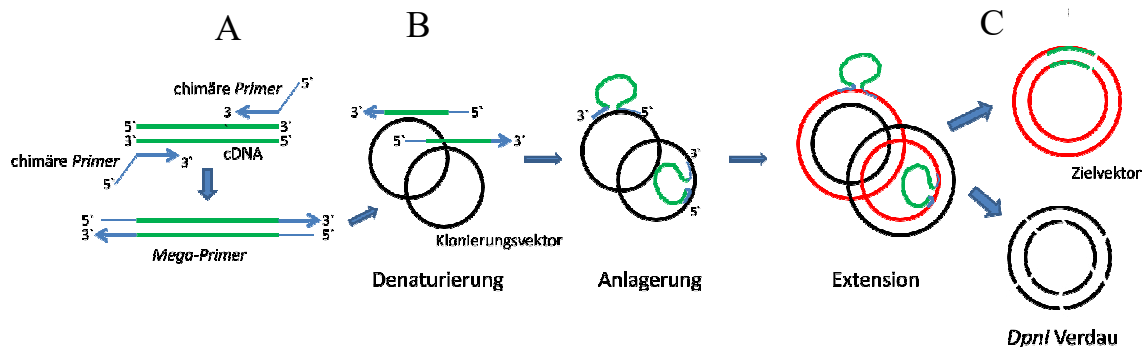


Abbildung 2.1: Schematische Übersicht für eine overlap extension PCR Klonierung nach Bryksin und Matsumura *et al.* **A:** In einer ersten PCR Reaktion wird die Ziel cDNA mit Hilfe von chimären Primern amplifiziert. Das daraus resultierende PCR-Produkt enthält überlappende Regionen des Klonierungsvektors. Es wurden Mega-Primer gebildet. **B:** Die Mega-Primer werden zusammen mit dem Klonierungsvektor in einer zweiten PCR-Reaktion amplifiziert, unter Verwendung des Klonierungsvektors als *Template*. Die Verlängerung des Inserts erfolgt durch die *Phusion*-DNA-Polymerase, bis sie die 5' Enden erreicht hat. **C:** Nach mehreren PCR-Zyklen wird der neue Zielvektor mit zwei kleinen Öffnungen (eine an jedem Strang) in einem Gemisch mit parentalem Plasmid akkumuliert. Durch einen *DpnI*-Verdau wird die parentale DNA abgebaut und der Zielvektor kann in *E. coli* Zellen transformiert werden. Die Abbildung wurde aus [192] entnommen und modifiziert.

2.2.3 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten

Restriktion

Die enzymatische Spaltung von DNA erfolgt durch Restriktionsendonukleasen. Diese sind in der Lage, innerhalb der DNA eine spezifische Zielsequenz zu erkennen. An dieser Erkennungssequenz können sie die DNA-Stränge durch hydrolytische Spaltung der Phosphordiesterbindung in zwei Hälften schneiden. Die Restriktion wurde hauptsächlich zur Herstellung von Restriktionsfragmenten aus Plasmid-DNA und PCR-Produkten verwendet, die ihren Einsatz für Klonierungsreaktionen finden sollten. Es wurden *fast digest* Enzyme verwendet, so dass die Inkubationszeit nur 15 min bei 37 °C betrug. Für einen 30 µl Ansatz in ddH₂O wurden ca. 3-5 µg DNA, 20 U Restriktionsenzym und 1 x *fast digest* Reaktionspuffer verwendet.

Dephosphorylierung

Für die Klonierung von enzymatisch verdauten DNA-Fragmenten ist es nötig, eine intramolekulare Religation der selbigen weitestgehend zu verhindern. Dafür wurde der Restriktionsansatz mit 2 µl *Shrimp*-alkalische Phosphatase (SAP) versetzt, welche die Abspaltung terminaler 5'-Phosphatgruppen erlaubt. Die Reaktion wurde nach 1 h Inkubation durch die Inaktivierung der Phosphatase mit einem 15 minütigen Hitzeschritt bei 65 °C beendet. Die dephosphorylierte DNA im Restriktionsansatz wurde anschließend für eine präparative Agarose-Gelelektrophorese verwendet, die gewünschte DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des *Wizard SV Gel and PCR Clean-UP Systems* gereinigt.

Ligation

Für die Ligation geschnittener und gereinigter DNA-Fragmente wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Sie ist in der Lage unter ATP-Verbrauch Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden verschiedener DNA-Fragmente herzustellen. Ein typischer Ligationsansatz hatte eine Größe von 20 µl und enthielt 1 x Ligasepuffer, 1 mM

ATP, 5 U T4-DNA-Ligase, Vektor und Insertionsfragment (molares Verhältnis 1:3, max. 400 ng). Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht und wurde durch einen 15 min dauernden Hitzeschritt bei 65 °C beendet.

2.2.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Überprüfung des Erfolgs von Ligationsreaktionen wurde die Plasmid-DNA sequenziert. Nach Plasmidpräparation wurden 5 µl mit 2 µl T7 Promotor- oder Terminatorsequenz als *Primer* versetzt und der Firma *Seqlab* (Göttigen, GER) oder QIAGEN (Hilden, GER) zur Sequenzierung zugesendet. Das Sequenzierergebnis wurde in elektronischer Form durch die oben genannten Firmen zur Verfügung gestellt.

2.2.5 Herstellung von Selektions-Agarplatten

Zum Ausplattieren und Kultivieren von Bakterien für bis zu drei Wochen war es nötig, dYT-Agarplatten herzustellen. Dafür wurde dYT-Medium (Anhang 3, Tabelle A6) zusammen mit 15 g/l Agar-Agar in demineralisiertem Wasser gelöst und im Autoklaven bei 121 °C sterilisiert. Danach wurde das Medium auf 40-50 °C abgekühlt, 250 µl des entsprechenden Selektionsantibiotikums (Kanamycin, Ampicilin und/ oder Chloramphenicol) unter sterilen Bedingungen zugegeben und in sterile Petrischalen gegossen. Durch ein weiteres Erkalten auf Raumtemperatur kommt es zum Erstarren des Agars. Die Platten sind dann verwendungsbereit und können für einen Monat bei 4 °C gelagert werden.

2.2.6 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen

Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen

Für die Transformation der verwendeten Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus[®] RIL, als auch für den Plasmidamplifikationsstamm *E. coli* TOP 10 und *E. coli* DH5 α wurden CaCl₂-kompetente Zellen nach einer leicht veränderten Methode von Cohen *et al.*^[193] hergestellt. Dafür wurden 50 ml dYT-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur der genannten *E. coli*-Zellen beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden die Kulturen für 10 min auf Eis gekühlt und die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 3000 rpm, 4 °C) geerntet. Die Zellen wurden dann mit 10 ml einer sterilen, eiskalten 100 mM CaCl₂-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde darauf in 1,5 ml 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Im letzten Schritt wurde die Zellsuspension unter leichtem Schütteln mit 1,5 ml eisgekühltem, sterilem 87 %igen Glycerin (v/v) versetzt. Es wurden 150 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

Transformation von E. coli-Zellen

Zur Transformation wurde ein Aliquot CaCl₂-kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2-4 µl des gewünschten Expressionsvektors oder mit 20 µl Ligationsansatz versetzt und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 45 s einem Hitzepuls bei 42 °C ausgesetzt, im Anschluss sofort in 600 µl dYT-Medium überführt und für 30-60 min bei 600 rpm und 37 °C im Thermomixer schüttelnd inkubiert (Expression der Resistenz vermittelnden Gene). Anschließend wurden sie zentrifugiert (4 min, 3000 rpm, 4 °C) und

auf Selektions-Agarplatten plattiert. Die Anzucht der Zellen auf Agarplatten erfolgte bei 37 °C über Nacht im Brutschrank.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Größe und Reinheit, sowie zur präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten, wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden, abhängig von der Länge der aufzutrennenden DNA, Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 1,3 % (w/v) und 2 % (w/v) in 1 x TAE-Puffer hergestellt. Die Proben wurden mit 6 x DNA-Auftragungspuffer (Probenpuffer) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei 110 V für 45 bis 65 Minuten. Zur Auswertung der aufgetrennten DNA-Banden wurden die Agarosegele 30 min. in einer Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml in 1 x TAE-Puffer) gefärbt. Die erhaltenen DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Licht (302 nm) visualisiert und analysiert und wenn nötig aus dem Gel präpariert. Die Zusammensetzung des 1 x TAE- und des Probenpuffers sind im Anhang 3 in Tabelle A11 aufgeführt.

2.2.8 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Um für die Klonierungsexperimente saubere DNA-Fragmente zu erhalten, wurden die verwendeten DNA-Lösungen zur Auftrennung und Reinigung auf ein Agarosegel aufgetragen. Die erhaltenen DNA-Banden wurden durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht, markiert und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte nach den Angaben des *Wizard SV Gel* und *PCR CleanUp System* der Firma Promega. Die DNA wurde mit 30 µl Nuklease freiem Wasser eluiert und bei einer Temperatur von -20 °C gelagert.

2.3 Allgemeine proteinchemische Methoden

2.3.1 Konzentration und Dialyse von Proteinlösungen

Konzentration

Proteinlösungen wurden mit Hilfe von *Viva Spin* Zentrifugalkonzentratoren konzentriert. Die Konzentratoren, auch Ultrafiltrationseinheiten genannt, besitzen Membranen mit definierter Porengröße (*molecular weight cutoff*, MWCO) und damit ein definiertes molekulares Ausschlussvolumen. Lösungen mit Proteinen und niedermolekularen Bestandteilen kleiner des MWCO passieren die Membran ungehindert, während Proteine größer als die Membranporen sich im Folgenden durch die Zentrifugation anreichern. Es wurden Konzentratoren mit einem MWCO von 3,5 kDa, 5,0 kDa und 10,0 kDa verwendet. Die Proteinlösungen wurden bei maximal 4000 g und 4 °C zentrifugiert, bis die gewünschte Proteinkonzentration durch Volumenverringerung eingestellt wurde. Proteinlösungen mit einem Volumen größer 300 ml wurden mittels *Viva Flow Membran*, MWCO von 10 kDa, entsprechend der Herstellerangaben konzentriert.

Dialyse

Dialyse wurde zum Pufferwechsel von Proteinlösungen durchgeführt. Es wurden Dialyseschläuche mit einem MWCO von 1,0 kDa, 3,5 kDa und 5,0 kDa verwendet. Diese wurden vor Benutzung bei 60 °C mit einer 100 mM NaHCO₃ und 10 mM EDTA, pH 7,0

Lösung behandelt und anschließend extensiv mit 60 °C doppelt destilliertem Wasser gespült. Zur Dialyse wurde die Proteinlösung mit einer Pipette in den Dialyseschlauch überführt und die Dialyseschläuche während einer Dialyse an beiden Enden mit Klammern abgedichtet. Die Dialysen erfolgten bei 4 °C oder Raumtemperatur.

2.2.9 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung und Analyse von denaturierten Proteinen nach ihrem apparenten Molekulargewicht in einem elektrischen Feld. Für SDS-PAGE wurden kommerzielle NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Gele oder selbst hergestellte Gele verwendet. Die Herstellung erfolgte nach Schägger und von Jogow^[194] entsprechend der Proteingröße mit 12,5%igen und 15%igen Trenngelen (Länge ca. 5 cm). Die Proteinproben wurden vor der Auftragung mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:3 versetzt und bei 90 °C für fünf Minuten vollständig denaturiert. Das im Probenpuffer enthaltene SDS denaturiert die Proteine und erzeugt eine negative Ladung an der Polypeptidkette. Die Proteine wandern dadurch im elektrischen Feld zur Anode und werden durch die Siebstruktur des SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25 mA für das Sammelgel, 45 mM für das Trenngel und einer Spannung von 150 V durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteinbanden durch Behandlung des Gels mit Fixier-, Färbe- und Waschlösung sichtbar gemacht. Die Zusammensetzung für die hergestellten SDS-Gele und verwendeten Lösungen sind im Anhang 3 in Tabelle A12 aufgeführt. Zur Herstellung nativer Polyacrylamidgele wurde kein SDS zugesetzt.

2.4 Arbeiten mit rekombinanten Proteinen und Peptiden

2.4.1 Analyse der Proteinexpression in *E. coli*-Zellen

Für Testexpressionen wurden erfolgreich transformierte *E. coli*-Zellen auf dYT-Medium Agarplatten selektiert und im Anschluss in 5 ml Vorkultur (dYT-Medium mit Selektionsantibiotika) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde mit diesen Zellen ein frisches dYT-Medium (50-100 ml) mit einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,1 inokuliert. Bei 37 °C erfolgte die Inkubation der Zellkultur bis zu einer OD_{600} von 0,7-1,0. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Induktion der Proteinexpression mit 1 mM finaler Konzentration Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) initiiert. Die Zellen wurden für vier Stunden induziert, nach jeder Stunde eine 2 ml Probe entnommen und diese für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden zur Normierung der Konzentration entsprechend der optischen Dichte mit dem entsprechenden Volumen in Lysepuffer resuspendiert und im Anschluss über drei Gefrier/ Tau Zyklen in flüssigen Stickstoff und bei 37 °C oder mittels Ultraschall (Amplituden 45 %, Puls 7 s) aufgeschlossen. Nach Zellaufschluss wurde die Zellsuspension zur Trennung von löslichen und unlöslichen Zellbestandteilen oder Protein-Einschlusskörpern (*inclusion bodies*, *IBs*) zentrifugiert (15 min bei 16000 g). Das Pellet mit Zellbestandteilen oder *IBs* wurde in Harnstoffpuffer gelöst und ebenfalls wie der Zellüberstand mit SDS-Probenpuffer versetzt und durch SDS-PAGE analysiert.

2.4.2 Zellaufschluss

Alle in dieser Arbeit gewonnenen Proteine wurden in *E. coli*-Zellen expremiert und zur Reinigung aus ihnen isoliert. Somit stellt der Zellaufschluss einen wesentlichen Bestandteil für die Proteinreinigung dar. Für alle Proteinreinigungen wurde der Zellaufschluss mit Hilfe des Mikrofluidizer durchgeführt. Dafür wurden die gelagerten Zellpellets in 3-5 ml pro Gramm Zellpellet Resuspensionspuffer (50 mM Na₂HPO₄ 100 mM NaCl 15 mM Imodazol, pH 8,0 ^{4 °C}) resuspendiert, mit Lysozym behandelt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter 2000 psi in drei Passagen bei 4 °C. Um die durch den Zellaufschluss freigelegte DNA zu degradieren, wurde der Suspension 10 µg/ml DNase I und 3 mM MgCl₂ zugesetzt und diese für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Außerdem wurde dem aufgeschlossenen Zellysate noch Proteaseinhibitor-*Cocktail* zugesetzt, um den Abbau des gewünschten Zielproteins zu verhindern. Am Ende wurden alle unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation mit dem SS 34 Rotor bei 20000 rpm und 4 °C sedimentiert.

2.4.3 SUMO-Fusionsstrategie

Die SUMO-Fusionsstrategie ist eine leistungsfähige und preisgünstige Methode zur Expression von Peptiden und Proteinen, die mit herkömmlichen Methoden nur in unzureichenden Mengen hergestellt werden können^[195]. Als Fusionspartner für das gewünschte Peptid oder Protein wird SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*, Smt3) aus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Es enthält einen N-terminalen Hexahistidin-*Tag* (*His₆-Tag*) und ist dadurch für eine Reinigung mittels Immobilisierter-Metallchelate-Affinitätschromatographie zugänglich. Der Einsatz des SUMO-Fusionsproteins führt zu einer verbesserten Löslichkeit und höheren Expressionsraten und erlaubt eine rückstandsfreie Abspaltung des Zielmoleküls. Es eignet sich auch als Faltungshelfer und unterstützt die Proteinrückfaltung aus *inclusion bodies*, indem es Faltungsintermediate stabilisiert und in Lösung hält^[196-199]. Zur Abspaltung des SUMO-Fusionsproteins wurde die SUMO-Protease Ulp 1 hergestellt, welche spezifisch die Tertiärstruktur von SUMO erkennt und spaltet. Für die hier durchgeführten Klonierungen und Expressionen wurde ein leicht veränderter pETSUMOadapt Expressionsvektor verwendet. Dieser besitzt eine zusätzliche *multiple cloning site*^[199] (*mcs*) und ermöglicht dadurch das Einfügen beliebiger DNA-Sequenzen durch geeignete Wahl der jeweiligen Schnittstellen und Restriktionsenzyme. Die SUMO-Fusionstrategie wurde zur Gewinnung der Peptidhormone PTH (1-84), PTH (15-34), TIP 39 und von ECD-PTH2 angewendet.

2.4.4 Herstellung der SUMO-Protease Ulp1

Für die Expression der SUMO-Protease Ulp1 wurde der transformierte Zellstamm *E. coli* BL21 pLysS verwendet. Die Zellan-zucht erfolgt im 2 l Ansatz dYT-Medium, bei 37 °C und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 bis 2,0. Anschließend wurde die Expression durch die Zugabe von 0,75 mM IPTG induziert und der Ansatz für weitere 3,5 bis 4 h, bei 30 °C inkubiert. Nach der Zellernte wurde das Zellpalet in 50 mM Tris/HCL, 20 % Saccharose, pH 8,0 ^{4 °C} resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Zur Reinigung von Ulp1 wurde die Zellsuspension mit 350 mM NaCl, 1 mM Mercaptoethanol, 0,2 % Igepal und 15 mM Imidazol versetzt und für den Zellaufschluss, mittels Ultraschall, verwendet. Zur

Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wurde der Ansatz zentrifugiert und anschließend für eine Immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie verwendet. Ulp1 wurde mit 250 mM Imidazol von der Säule eluiert und anschließend zur Entfernung des selbigen dialysiert. Für die Langzeitlagerung wurde Ulp1 mit 50 % Glycerin versetzt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.5 SUMO-Spaltung

Bei der SUMO-Spaltung oder Hydrolyse handelt es sich um eine Methode zur Spaltung von SUMO-Fusionsproteinen. Die Abspaltung von SUMO erfolgt sehr spezifisch und unabhängig von den nachfolgenden Aminosäuren im Fusionsprotein, direkt nach dem terminalen Diglycinmotiv von SUMO. Der dadurch freigelegte Fusionspartner besitzt somit einen natürlichen N-Terminus. Die Spaltung von SUMO-Fusionsproteinen wurde durch den Zusatz von Ulp 1 zur Proteinlösung initiiert (eigene Herstellung). Die fusionsproteinhaltige Lösung wurde im Verhältnis 1:10, bezogen auf das Volumen der Proteinlösung, mit SUMO-Proteasepuffer (0,5 M Tris/HCl, 2 % Igepal, 10 mM DTT, pH 8,0 ⁴°C) und anschließend im Verhältnis 1:100 mit Ulp1 (20-80 µg/ml Endkonzentration) versetzt. Der Spaltansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur gegen IMAC-Äquilibriumspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0 ²⁵°C) dialysiert und die Spaltreaktion durch das Auftragen auf eine Ni²⁺-Sephrose-Säule gestoppt. Mit Hilfe des N-terminalen His₆-Tags kann SUMO, die SUMO-Protease und ungespaltenes Fusionsprotein aus dem Spaltungsansatz entfernt werden, während das Zielpeptid oder Protein im Durchlauf der Ni²⁺-Sephrose-Säule aufgefangen wird. Das Waschen der Säule erfolgte mit IMAC-Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0 ²⁵°C). Zur Reinigung der Säule wurden ungespaltenes Fusionsprotein, SUMO und SUMO-Protease in IMAC-Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8,0 ²⁵°C) eluiert und die Säule mit IMAC-Äquilibriumspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0 ²⁵°C) äquilibriert. Der Erfolg der Spaltungsreaktion wurde durch SDS-PAGE überprüft.

2.4.6 Expression und Reinigung des PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39 als SUMO-Fusionsproteine

Zellanzucht, Expression und Zellaufschluss

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39 wurden als SUMO-Fusionsproteine mit N-terminalen His₆-Tag exprimiert. Dafür wurden jeweils die verwendeten Expressionsplasmide pET-SUMO-TIP 39, pET-SUMO-PTH (1-84) und pET-SUMO-PTH (15-34) erzeugt, in chemisch kompetente Zellen (BL21(DE3) CodonPlus[®] RIL) transformiert und auf dYT-Agarplatten in Gegenwart von Chloramphenicol und Kanamycin kultiviert. Je eine vereinzelt Kolonie wurde verwendet, um eine erste 5 ml Vorkultur (dYT-Medium, 25 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Kanamycin) zu inokulieren. Das Zellwachstum erfolgte bei 37 °C für 8 h und bei kräftigem Schütteln (300 rpm) im Schüttelkolbeninkubator (Innova 40, New Brunswick). Diese Kultur wurde zur Inokulation einer zweiten Vorkultur (2 x 50 ml dYT-Medium, 25 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Kanamycin) im Verhältnis 1:1000 verwendet. Die zweite Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C im Thermoschüttler Innova 40 inkubiert und am nächsten Tag

zur Kultivierung in die Hauptkultur (6 x 650 ml dYT-Medium, 25 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Kanamycin) in 2 l Schüttelkolben (mit Schikanen) überführt. Die optische Dichte beim Start der Inokulation der Hauptkultur betrug 0,05. Nachdem das Zellwachstum bei 37 °C eine OD₆₀₀ von 0,9-1,5 erreicht hatte, wurde die Expression des rekombinanten SUMO-Fusionsproteins durch die Zugabe von 1 mM IPTG im Ansatz induziert. Die Zellen wurden, nach 3,5 bis 4 h Inkubation bei 37 °C, durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 7000 rpm (Rotor SLA 3000) geerntet. Das Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Das Zellpellet wurde in 3 m/g Zellen in Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0^{25 °C}) resuspendiert und die erhaltene Suspension für den Zellaufschluss verwendet. Das löslich exprimierte SUMO-Fusionsprotein wurde durch Zentrifugation für 45 min bei 4 °C und 20000 rpm (Rotor SS 34) von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt.

Immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Nach erfolgreichem Zellaufschluss und Sedimentation unlöslicher Zellbestandteile wurde das Rohlysat auf eine mit 3 Säulenvolumen (CV) IMAC-Äquilibrierungspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0^{25 °C}) äquilibrierte 15 ml Ni²⁺-Sephrose-Säule mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Das SUMO-Fusionsprotein wurde mit Hilfe eines spezifischen N-terminalen His₆-Tag an das IMAC-Säulenmaterial gebunden und an einem ÄKTA-Purifier-System bei 4 °C gereinigt. Unspezifische Proteine wurden im Durchfluss gesammelt und dadurch vom Zielprotein abgetrennt. Nach einem Waschschrift mit 5 CV IMAC-Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0^{25 °C}) wurden die SUMO-Fusionsproteine mit 3 CV über einen Stufengradienten in 50 % IMAC-Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8,0^{25 °C}) bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert.

SUMO-Spaltung und 2. Immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie

Alle fusionsproteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und gegen SUMO-Dialysepuffer (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 8,0^{25 °C}) dialysiert. Dieser Dialyseschrift diente der Entfernung von hochkonzentriertem Imidazol aus der Proteinlösung und der Einstellung einer optimalen Salzkonzentration für die sich anschließende Hydrolyse des SUMO-Fusionsproteins durch die tertiärstrukturspezifische SUMO-Protease Ulp1. Die optimale Salzkonzentration für die SUMO-Protease Ulp1 liegt bei niedrigen Imidazol- und NaCl-Konzentrationen (unter 150 mM)^[200, 201]. Die SUMO-Spaltung erfolgte wie unter 2.4.5 beschrieben. Das durch die Spaltung freigesetzte Zielpeptid (TIP 39, PTH (1-84) oder PTH (15-34)) wurde durch ein erneutes Auftragen des Spaltansatzes auf eine zweite Ni²⁺-Sephrose-Säule (Flussrate 1 ml/min) von der SUMO-Protease, SUMO und ungespaltenem Fusionsprotein getrennt.

Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Als finaler Reinigungsschrift wurde eine Gelfiltration für die peptidhaltigen Fraktionen mit einer HiLoad 16/60 Superdex 75 *prep grade* (für PTH (1-84)) oder HiLoad 26/600 Superdex 30 *prep grade* (für PTH (15-34) und TIP 39), bei einer Flussrate von 1 ml/min, in Gelfiltrationspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 0,03 % Natriumazid, 1 mM EDTA, pH 7,5^{25 °C}) durchgeführt. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 5 ml. Die durch

Größenausschlusschromatographie erhaltenen Peptidlösungen wurden anschließend gegen 20 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer dialysiert. Die Peptidlösungen wurden am Ende in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend lyophilisiert. Alle chromatographischen Reinigungsschritte wurden durch UV-Detektion bei 280 nm verfolgt und als Chromatogramm aufgezeichnet. Die Reinheit der Peptide wurde mittels Massenspektrometrie und SDS-PAGE überprüft.

Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatographie (RP-HPLC)

Bei Peptiden mit einer Größe unter 5000 Da wurde als letzter Reinigungsschritt statt der Gelfiltration eine RP-HPLC durchgeführt (für PTH (15-34) und TIP 39). Dafür wurden die Peptidlösungen auf eine HPLC-Säule (SP 250/10 Nucleosil 500-5 C18) aufgetragen und über hydrophobe Wechselwirkungen an die Säule gebunden. Mit Hilfe des Laufmittels A (H₂O, 0,1 % TFA) und Laufmittels B (H₂O, 80 % Acetonitril, 0,1 % TFA) wurde über 60 min ein linearer Gradient von 20 auf 55 % Acetonitril zur Elution der Peptide erzeugt. Den Peptidlösungen wurde, wenn vorhanden, restliches Acetonitril durch Rotationsverdampfung (für ca. 60 min, bei 210 mbar, 40 °C und 70 rpm) entfernt. Die wasserhaltigen Peptidlösungen wurden dann in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend lyophilisiert.

Lyophilisation

Bei der Lyophilisation wird auf schonende Weise das Verdampfen von Wasser aus einer wässrigen Lösung unterhalb ihres Gefrierpunktes erzwungen. Diesen Prozess bezeichnet man als Sublimation. In Folge dieses Vorgangs wird eine in der Lösung gelöste Substanz getrocknet und damit für einen langen Zeitraum haltbar gemacht. Die in dieser Arbeit erhaltenen durchgefrorenen Peptidlösungen wurden zur Lyophilisation an die Vakuumkammer der Lyophille angeschlossen. Durch eine Temperatur- und Druckabsenkung auf minus 60 °C und 0,37 mbar (Haupttrocknung) wurde das als Eis vorliegende Wasser vom festen direkt in den gasförmigen Aggregatzustand überführt. Am Ende der Lyophilisation lag das Peptid in Pulverform vor und wurde bei -20 °C gelagert.

Isotopenmarkierte Expression und Reinigung

Für die Expression der uniform ¹⁵N oder doppelt ¹⁵N/ ¹³C isotopenmarkierten Peptide PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39 wurde als erstes, eine Einzelkolonie von der Agarplatte entnommen und für die erste 5 ml Vorkultur in dYT-Medium mit 25 µg/ml Chloramphenicol und 50 µg/ml Kanamycin bei 37 °C angezogen. Um das dYT-Medium gegen ¹⁵N oder ¹⁵N und ¹³C angereichertes M9-Medium auszutauschen, wurde eine Verdünnung von 1:100 der ersten Vorkultur in eine zweite Vorkultur mit M9-Medium (2 x 100 ml M9-Minimalmedium, 25 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Kanamycin) gegeben und für 14 h bei 37 °C im Schüttelkolbeninkubator (Innova 40, New Brunswick) inkubiert. Mit Hilfe der zweiten Vorkultur konnte die Hauptkultur (4 x 650 ml M9-Minimalmedium, 25 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Kanamycin in 2 l Schüttelkolben mit Schikanen) mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert werden. Das Zellwachstum der Hauptkultur, bei 37 °C wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9-1,5 verfolgt. Die Proteinexpression wurde ab diesem Zeitpunkt durch die Zugabe von 1 mM IPTG im Ansatz induziert und die Temperatur anschließend auf 27 °C reduziert. Die Zellen wurden nach einer Induktionszeit von 14 h

durch Zentrifugation geerntet und bei -80 °C bis zur anstehenden Reinigung aufbewahrt. Die Durchführung der Reinigung erfolgte analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise. In Abbildung 2.2 ist eine schematische Darstellung der erläuterten Reinigungsstrategie wiedergegeben.

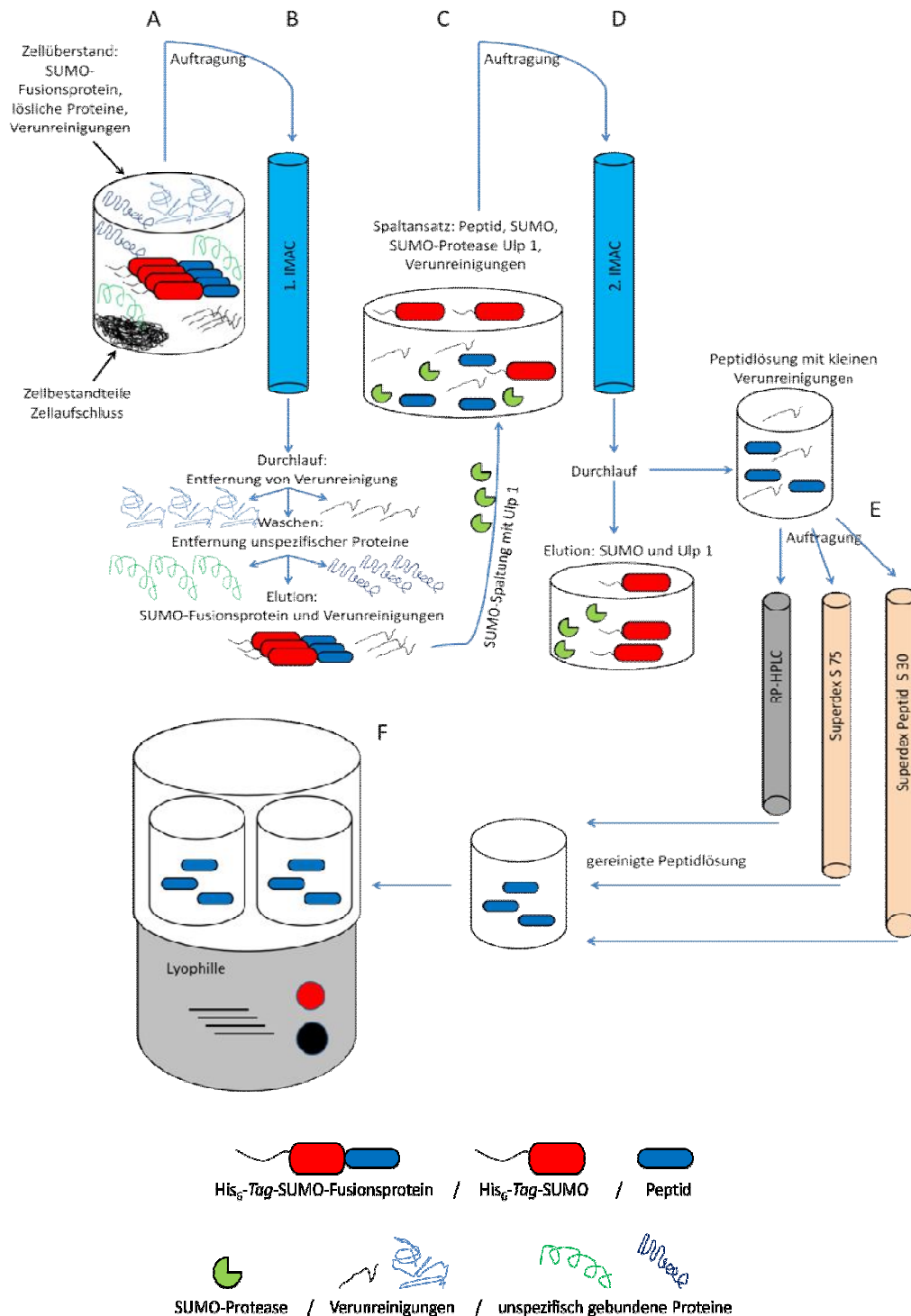


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Reinigungsstrategie für Peptidhormone aus SUMO-Fusionsproteinen. A: Zellsuspension nach Zellaufschluß, Separierung in lösliche und unlösliche Bestandteile, B: Auftragung des Zellüberstandes auf IMAC-Säule, spezifische Bindung des SUMO-Fusionsproteins mittels His₆-Tag, Elution erfolgt über Imidazolgradienten, C: Abspaltung des SUMO-Fusionspartners vom Zielpeptid/-protein durch Ulp1 (SUMO-Protease), D: IMAC-Reinigung zur Entfernung von Ulp1 und abgespaltenem SUMO, Durchlauf enthält Zielpeptid/-protein, E: finale Reinigung, Auftragung der Peptid-/ Proteinlösung auf Gelfiltrations- oder RP-HPLC-Säule, F: Lyophilisation der gereinigten Peptid-/ Proteinlösung zur langfristigen Lagerung.

2.4.7 Expression, Reinigung und Rückfaltung von humanem ECD-PTHR1

Zellanzucht

Für die Herstellung der humanen extrazellulären N-terminalen Domäne des PTHR1 wurden aus einer Kryo-Glycerinkultur kompetente BL21(DE3) CodonPlus[®] RIL *E. coli*-Zellen, die den Expressionsvektor pET15b-ECD-PTHR1₂₃₋₁₉₁ enthielten, bei 37 °C auf dYT-Agarplatten in Gegenwart von 25 µg/ml Chloramphenicol und 50 µg/ml Ampicillin über 12 h angezogen. Der Expressionsvektor kodiert für den N-terminalen Rezeptoranteil Tyr23 bis Ile191, besitzt einen N-terminalen His₆-Tag und steht unter T7-Promotor-kontrolle. Eine Einzelkolonie wurde von der Agarplatte entnommen und in 5 ml dYT-Medium, ebenfalls mit entsprechender Menge an Chloramphenicol und Ampicillin, für eine erste Vorkultur überführt. Es folgte eine Inkubation für 8 h bei 37 °C im Schüttelkolbeninkubator Innova 43. Die Vorkultur wurde im Anschluss für die Inokulation einer zweiten Vorkultur, im Verhältnis 1:1000 von 2 x 100 ml, verwendet. Im Anschluss wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C und 300 rpm schüttelnd angezogen. Mit Hilfe der zweiten Vorkultur wurde die 4 l Hauptkultur (dYT-Medium, 25 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Kanamycin) im Bioreaktor (5 l Fermenter, *New Brunswick Scientific*) inokuliert. Der Startwert der OD₆₀₀ lag bei 0,05. Mit Hilfe von Mess- und Regeltechnik wurde während der Fermentation die Temperatur bei 37 °C, der pH-Wert bei 7-7,5 und der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) bei mindestens 30 % Luftsättigung konstant gehalten. Als Kohlenstoffquelle wurde Glukose verwendet, während die Versorgung mit Stickstoff über Ammoniumchlorid erfolgte. Nachdem die Zellen bei 37 °C wuchsen und eine OD₆₀₀ von 7,0 erreicht hatten, wurden 400 ml einer *feeding*-Lösung (pro 100 ml H₂O: 7,5 g Hefeextrakt und 16 g Glukose) über einen Zeitraum von 1,5 h in den Fermenter gegeben. Dieser Schritt war nötig, weil die Glukose in dem vorgelegten dYT-Medium verbraucht war. Die Bakterien wurden im Anschluss bis zu einer OD₆₀₀ von 12,0-14,0 inkubiert und dann mit 1 mM IPTG im Ansatz zur Expression induziert. Nach 5 h Induktion bei 37 °C und 600 rpm Rührgeschwindigkeit wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 15 min, 4 °C und 7000 rpm (Rotor SLA 3000) geerntet. Das erhaltene Zellpellet wurde bei -80 °C gelagert.

Inclusion body-Präparation (IB-Präp.)

Während der Expression wurde ECD-PTHR1 in Form von unlöslichen Einschlusskörpern (*inclusion bodies*, *IBs*) in *E. coli* angereichert. Aus diesem Grund mussten sie aus dem nach Zellaufschluss und Zentrifugation erhaltenen Pellet isoliert und im Anschluss durch Renaturierung in eine funktionale Form überführt werden. Die Präparation und Solubilisierung des Zielproteins erfolgte nach der Methode von Rudolph und Lilie^[202]. Die Reinigung der GPCR-Domäne ECD-PTHR1 erfolgte mit Abwandlungen nach einem von Ulla Grauschopf *et al.* etablierten Protokoll^[67]. Die Abfolge der distinkten Reinigungsschritte wurde aber beibehalten. Die geernteten Zellen wurden als erstes in *IB*-Resuspensionspuffer (100 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,0^{25 °C}) mit dem Ultra-Turrax-Homogenisator resuspendiert und anschließend der Zellaufschluss durchgeführt. Nach Homogenisierung und Zellaufschluss wurde das Zelllysate mit 0,5 Volumenanteil *IB*-Tritonpuffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 60 mM EDTA, 6 % Triton-X 100, pH 7,0^{25 °C}) versetzt und für 40 min leicht rührend bei 4 °C inkubiert. Zur Abtrennung löslicher Bestandteile des Zellaufschlusses wurden die unlöslichen *IBs* durch Zentri-

fugation für 45 min bei 4 °C und 20000 rpm (Rotor SS 34) pelletiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene *IB*-Pellet wurde zur Entfernung weiterer Zell- und Membranbestandteile in wiederholenden Waschschrritten gereinigt. Dafür wurden die *IBs* durch Zentrifugation (30 min bei 4 °C und 20000 rpm, Rotor SS 34) sedimentiert und je 2x in einem 1:3 Gemisch aus *IB*-Tritonpuffer und *IB*-Waschpuffer (100 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA, pH 7,0^{25 °C}) und 3-6x in *IB*-Waschpuffer resuspendiert und gewaschen. Die Reinigungen mit *IB*-Waschpuffer alleine wurden solange wiederholt, bis keine Schaumbildung mehr zu beobachten war. Die Reinheit der isolierten *IBs* wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Bis zur Solubilisierung wurden die *IB*-Pellets bei -20 °C gelagert.

Solubilisierung

Durch Solubilisierung wurden die *IBs* in einen löslichen Zustand überführt und waren dadurch für eine chromatographische Reinigung zugänglich. Dafür wurden die *IBs* für 2-3 h bei Raumtemperatur in 10 ml Solubilisierungspuffer (100 mM Tris/HCl, 6 M GdmCl, 1 mM EDTA, 100 mM DTT, pH 8,0^{4 °C}) pro Gramm *IBs* resuspendiert. Der Einsatz von DTT im Solubilisierungspuffer diente der vollständigen Reduktion von richtigen und falschen Disulfidbrücken, die sich während der Expression oder durch Oxidation während des Zellaufschlusses in ECD-PTHR1 gebildet hatten. Anschließend wurde unlösliches Zellmaterial durch Zentrifugation für 45 min bei 4 °C und 20000 rpm (Rotor SS 34) pelletiert und verworfen, während der Überstand mit dem solubilisierten Protein zur weiteren Reinigung zur Verfügung stand. Nach der Solubilisierung wurde der pH-Wert des Ansatzes mit 37 %iger HCl in den sauren pH-Bereich von 2,5-3,5 titriert und zur vollständigen Entfernung von DTT gegen *IB*-Dialysepuffer (4 M GdmCl, 10 mM HCl, pH 4,0^{4 °C}) dialysiert. Die Entfernung von DTT war nötig, um die Reduktion von Ni²⁺-Ionen in sich anschließenden Reinigungsschritten zu verhindern. Die solubilisierten und dialysierten *IBs* wurden bis zur weiteren Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

Immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Der erste chromatographische Reinigungsschritt von ECD-PTHR1 war eine IMAC unter denaturierenden Bedingungen. Zur Bindung der solubilisierten ECD-PTHR1 über einen His₆-Tag an Ni²⁺-Sephrose wurde der pH-Wert des Ansatzes mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Das mit 3 CV IMAC-Äquilibriumspuffer (100 mM Tris/HCl, 4 M GdmCl, pH 8,0^{4 °C}) äquilibrierte Säulenmaterial (15 ml Ni²⁺-Sephrose) wurde bei einer Flussrate von 2 ml/min mit dem *IB*-Solubilisat beladen und nach der Bindung der Proteine mit 3 CV IMAC-Waschpuffer (100 mM Tris/HCl, 4 M GdmCl, pH 6,3^{4 °C}) gespült, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution des Proteins erfolgte durch einen pH-*shift* mit 1,5 CV IMAC-Elutionspuffer (100 mM Tris/HCl, 4 M GdmCl, pH 4,0^{4 °C}). Das gereinigte ECD-PTHR1 wurde zur Entfernung von Ni²⁺-Ionen anschließend gegen 4 M GdmCl, 10 mM HCl, 1 mM EDTA, pH 4,0^{4 °C} dialysiert.

Renaturierung

Weil das ECD-PTHR1 nach dem ersten chromatographischen Reinigungsschritt in einem denaturierten Zustand vorlag, wurde es mit Hilfe der Pulsrenaturierung wieder in einen nativen und gefalteten Zustand überführt. Die solubilisierten und IMAC gereinigten *IBs* wurden dafür in mehreren Pulsen in Rückfaltungspuffer (50 mM Tris/HCl, 1 M L-Arginin,

1 mM EDTA, 5 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 8,0^{4 °C}) pipettiert. Dafür wurde der Rückfaltungspuffer über 12 h gründlich entgast und das eingesetzte *redox-shuffling*-System, bestehen aus oxidiertem (GSSG) und reduziertem (GSH) Glutathion, kurz vor dem ersten Puls dem Renaturierungsansatz zugesetzt und die dadurch ausgelöste Änderung des pH-Werts stets korrigiert. Die Rückfaltung erfolgte bei 4 °C in 2 l Rückfaltungspuffer in 2 l Schottflaschen. Die Pulssetzung erfolgte alle 8 h unter Rühren und mit einer 1000 µl Eppendorf-Pipette durch tropfenweises Zugeben der Proteinlösung in den Rückfaltungsansatz. Für die Durchführung der Pulsrenaturierung wurden nachfolgende limitierende Faktoren berücksichtigt. Die maximale Proteinmenge, die pro Puls zugegeben wurde, betrug 50 µg/ml. Die Proteinendkonzentration im Rückfaltungsansatz betrug 0,1 mg/ml und die maximale Konzentration von GdmCl 0,1 M. Nach dem letzten Puls wurde der Renaturierungsansatz für weitere 96 h bei 4 °C inkubiert und anschließend mit Hilfe einer *Viva Flow* Membran 200 (MWCO 10,0 kDa) über mehrere Tage auf 200 ml bis 150 ml konzentriert.

Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)

Zur weiteren Abtrennung von Verunreinigungen, falscher und ungefalteter Proteinspezies wurde der aufkonzentrierte Rückfaltungsansatz einer Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie zugeführt. Dafür wurde der Proteinlösung langsam und portionsweise 1 M sehr fein gemörsertes Ammoniumsulfat unter leichtem Rühren zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C wurde ausgefallenes Protein durch Zentrifugation (45 min, bei 4 °C und 20000 rpm, Rotor SS 34) aus dem Rückfaltungsansatz entfernt. Der Überstand wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min auf eine mit 5 CV HIC-Aquilibriumspuffer (50 mM Tris/HCl, 0,8 M L-Arginin, pH 8,0^{4 °C}) äquilibrierte FF *high sub* Phenyl-Sepharose 5 ml Säule aufgetragen. Im Anschluss an die Proteinbindung wurde die HIC-Säule mit 8 CV HIC-Äquilibriumspuffer gespült und über einen linear abfallenden Ammoniumsulfatgradienten von 1 M auf 0 M mit HIC-Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, 0,8 M L-Arginin, pH 8,0^{4 °C}) eluiert. Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen wurden im Anschluss vereinigt und mit 1 mM EDTA versetzt, um sie vor proteolytischem Abbau zu schützen. Zur weiteren Reinigung wurde das Eluat mit Konzentratoren (*VivaSpin* 15R, MWCO 10,0 kDa) auf 1-2 mg/ml konzentriert.

Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltration mit einer Superdex 75 *prep grade* Säule 16/60 durchgeführt. Dafür wurden jeweils 4 ml HIC-Eluat auf eine mit 2 CV Gelfiltrationspuffer (50 mM Tris/HCl, 300 mM (NH₄)₂SO₄, pH 8,0^{25 °C}) äquilibrierte Säule, bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Der Säulendurchlauf wurde in definierten Fraktionen gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden anschließend mit Hilfe des Chromatogramms und über SDS-PAGE identifiziert und vereinigt. Zur langfristigen Lagerung wurde die Proteinlösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Verwendung wieder langsam auf Eis aufgetaut. Die Proteinkonzentration wurde mittels Absorptionsspektroskopie und der Extinktionskoeffizient mit Hilfe von *Protparam Swiss Database* ermittelt. Die Expression und der Reinigungsverlauf wurden durch SDS-PAGE analysiert. Für sich anschließende

spektroskopische und analytische Messungen wurde das Protein gegen Messpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 8,0^{20 °C}) dialysiert.

Isotopenmarkierte Expression und Reinigung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte auch die Herstellung der N-terminalen Domäne in ¹⁵N-isotopenmarkierter Form. Dafür wurden die BL 21(DE3) CodonPlus[®] RIL *E. coli*-Zellen in M9-Minimalmedium angezogen, welches ¹⁵N isotopenmarkiertes Ammoniumchlorid beinhaltet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Gegensatz zur Herstellung von unmarkierten ECD-PTHR1 in sechs 2 l Schüttelkolben mit Schikanen, in einer 4 l Hauptkultur (6 x 650 ml M9-Minimalmedium, 25 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Ampicillin). Die Expression, Reinigung und Renaturierung erfolgte analog zu der für unmarkiertes ECD-PTHR1 beschriebenen Prozedur.

2.4.8 Expression, Reinigung und Rückfaltung von humanem ECD-PTHR2

Erstellung des Expressionsvektors pET-SUMO-ECD-PTHR2

Für die Expression der natürlichen N-terminalen extrazellulären Domäne des humanen PTH-Rezeptors 2 wurde die SUMO-Fusionsstrategie gewählt^[199]. Sie führt zu einer verbesserten Proteinexpression und unterstützt die Proteinrückfaltung^[196-198]. Zur Erstellung des Expressionsplasmids wurden Standardklonierungstechniken und *overlap extension* PCR^[192] verwendet. Mit Hilfe von chimären *Primern* wurde die kodierende Region für Asp27 bis Gln138 aus einer cDNA des humanen PTHR2 durch PCR amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde für eine weitere PCR verwendet, bei der der Expressionsvektor pET-SUMOadapt als *Template* diente. Die Verlängerung des hybridisierten Inserts erfolgte durch *Phusion*-DNA-Polymerase, bis sie das 5'-Ende des *Inserts* erreicht hatte. Nach einigen PCR-Zyklen wurde der neue Zielvektor akkumuliert. Nach der Degradierung des verbliebenen Ausgangsvektors durch *DpnI* wurde das neue Plasmid in chemisch kompetente DH5α *E. coli* transformiert. Die Insertion der ECD-PTHR2 Gensequenz in den Expressionsvektor wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Zellanzucht

Für die Expression, Rückfaltung und Reinigung der humanen Rezeptordomäne ECD-PTHR2 wurde eine Einzelkolonie frisch transformierter BL21(DE3) CodonPlus[®] RIL verwendet, um eine 5 ml Vorkultur (dYT-Medium, Chloramphenicol, Kanamycin) zu inokulieren. Die Zellen trugen den Vektor pET-SUMO-ECD-PTHR2₂₇₋₁₃₈. Der Expressionsvektor kodiert für den N-terminalen Rezeptoranteil Asp27 bis Gln138, besitzt einen N-terminalen His₆-Tag und steht auch unter T7-Promotorkontrolle. Das Wachstum der ersten Vorkultur erfolgt bei 37 °C über 7-8 h. Diese Vorkultur wurde verwendet, um eine frische Übernachtskultur (2 x 50 ml dYT-Medium, 25 µg/ml Chloramphenicol und 50 µg/ml Kanamycin) mit einer Start OD₆₀₀ von 0,05 anzupflanzen. Diese Übernachtskultur wurde am nächsten Tag zur Inokulation (Start OD₆₀₀ 0,05) der Hauptkultur (6x 650 ml dYT-Medium in 2 l Schüttelkolben mit Schikanen, 25 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Kanamycin) überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 kultiviert und die Expression von ECD-PTHR2 als SUMO-Fusionsprotein durch den Zusatz von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Die Induktion wurde für 4 h

durchgeführt und die Zellen im Anschluss zur Zellernte für 15 min bei 4 °C mit dem Rotor SLA 3000 bei 7000 rpm zentrifugiert. Durch Zellaufschluss wurde das Zellpellet in eine Zellsuspension überführt, aus der durch Zentrifugation (Rotor SS 34, 45 min bei 4 °C und 20000 rpm) SUMO-ECD-PTHR2 in Form von *inclusion bodies* gewonnen wurde.

Inclusion body Präparation und Solubilisierung

Da SUMO-ECD-PTHR2 als unlösliche *IBs* exprimiert wurde, wurde ebenfalls nach Rudolph und Lilie^[202] eine *IB*-Präparation durchgeführt. Für die Solubilisierung von SUMO-ECD-PTHR2 wurde das Pellet für 3 h in Solubilisierungspuffer (100 mM Tris/HCl, 4 M GdmCl, 1 mM EDTA, 100 mM DTT, pH 8,0^{4 °C}) solubilisiert und erneut für 45 min, bei 4 °C und 20000 rpm (Rotor SS 34) zentrifugiert. Der Überstand, der das solubilisierete Fusionsprotein enthielt, wurde aufbewahrt, sein pH-Wert mit HCl in den sauren Bereich abgesenkt und gegen *IB*-Dialysepuffer (4 M GdmCl, 10 mM HCL, pH 3,5^{4 °C}) dialysiert. Das verbliebene Zellpellet, das weitere Zellbestandteile und andere unlösliche Bestandteile enthielt, wurde verworfen.

Pulsrenaturierung

Die solubilisierten *IBs* wurden mit Hilfe der Pulsrenaturierung renaturiert. Dafür wurden sie, wie unter Kapitel 2.4.7 beschrieben, tropfenweise mit Hilfe einer 1000 µl Eppendorf-Pipette und unter leichtem Rühren in entgasten Rückfaltungspuffer (100 mM Tris/HCl, 0,8 M L-Arginin, 1 mM EDTA, 5 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 8,5^{4 °C}) pipettiert. Bei der Rückfaltung wurden wieder limitierende Faktoren berücksichtigt. Die maximale Proteinmenge pro Puls betrug 50 µg/ml, die Endkonzentration an Protein im Rückfaltungsansatz betrug 0,1 mg/ml und eine maximale Konzentration an GdmCl 0,1 M. Die Renaturierung erfolgte in 1 l Schottflaschen, die 1 l Rückfaltungspuffer enthielten. Es wurde alle 6 h eine Pulssetzung durchgeführt. Nach dem letzten Puls wurde der Renaturierungsansatz für weitere 72 h bei 4 °C inkubiert und anschließend mit Hilfe von *Viva Flow* Membranen (MWCO 5,0 kDa) bei 20 °C über 2-3 Tage auf 150 ml bis 100 ml konzentriert.

Immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Das renaturierte SUMO-ECD-PTHR2 enthält einen N-terminalen His₆-Tag. Dieser erlaubt eine Reinigung mit Hilfe einer IMAC. Dafür wurde der konzentrierte Rückfaltungsansatz gegen IMAC-Äquilibriumspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 15 mM Imidazol, pH 8,0^{25 °C}) dialysiert. Dieser Schritt war nötig, um eine L-Arginin Konzentration von 0,1 M einzustellen. Arginin ist ein potentes Proteinrückfaltungsadditiv, aber seine Aminogruppe steht in direkter Konkurrenz zu den Aminogruppen des His₆-Tags und behindert dadurch die Proteinbindung an der Chromatographiesäule^[203]. Nach Dialyse wurde der Rückfaltungsansatz auf eine mit 3 CV IMAC-Äquilibriumspuffer äquilibrierte HisTrap HP 5 ml Ni-Säule, mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min, aufgetragen. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Verunreinigungen wurde die Säule extensiv mit 8 CV IMAC-Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 35 mM Imidazol, pH 8,0^{25 °C}) gespült. Die Elution des SUMO-Fusions-Proteins erfolgte über einen Stufengradienten mit 0,25 M Imidazol bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min in IMAC-Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol,

pH 8,0^{25 °C}). Die Elution wurde kontinuierlich bei 280 nm aufgezeichnet, die eluierten Proteinfractionen vereinigt und für die SUMO-Spaltung verwendet.

SUMO-Spaltung und 2. Immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die vereinigten Elutionsfraktionen des ersten IMAC-Reinigungsschritts wurden, wie unter Kapitel 2.4.5 beschrieben, mit SUMO-Proteaspuffer (0,5 M Tris/HCl, 2 % Igepal, 10 mM DTT, pH 8,0^{4 °C}) in einem Verhältnis von 1:10 (v/v) versetzt. Um das Fusionsprotein vom SUMO-Fusionspartner zu befreien, wurde die Spaltreaktion durch den Zusatz der SUMO-Protease Ulp1 in einem Verhältnis von 1:100 (20-80 µg/ml Endkonzentration) eingeleitet. Das dadurch freigesetzte ECD-PTHR2 besitzt einen nativen und anhangsfreien N-Terminus. Der Spaltansatz wurde für 2 h und bei Raumtemperatur gegen IMAC-Äquilibriumspuffer dialysiert und im Anschluss erneut auf eine zweite, mit 3 CV IMAC-Äquilibriumspuffer gespülte HisTrap HP 5 ml Ni²⁺-Säule, bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min, aufgetragen. Die SUMO-Protease, freies SUMO und ungespaltenes SUMO fusioniertes ECD-PTHR2 konnten durch diesen Reinigungsschritt entfernt werden, während ECD-PTHR2 im Durchlauf der zweiten IMAC gesammelt wurde. Die Kinetik der SUMO-Spaltung wurde durch SDS-PAGE analysiert. Der gesammelte Durchlauf wurde mit Konzentratoren (*Viva Spin* 15R, MWCO 5,0 kDa) bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml konzentriert.

Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Zur finalen Reinigung von ECD-PTHR2 wurde der konzentrierte Durchlauf des 2. IMAC-Reinigungsschrittes in 5 ml Fraktionen auf eine selbst gepackte, mit Gelfiltrationspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0^{4 °C}) äquilibrierte, Superdex 75 *prep grade* 16/60 Gelfiltrationssäule, mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min, aufgetragen. Für eine SDS-PAGE-Analyse wurden Proben von den einzeln aufgeführten Expressions- und Reinigungsschritten genommen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe von Absorptionsspektroskopie bestimmt. Für sich anschließende spektroskopische und strukturelle Analysen wurde das Protein gegen Messpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 8,0^{20 °C}) dialysiert. Das Molekulargewicht von ECD-PTHR2 wurde durch ESI-Massenspektrometrie bestimmt und der monomere Zustand von ECD-PTHR2 durch analytische Gelfiltration auf einer Superdex G75 *prep grade* 10/300 Säule überprüft.

2.5 Biophysikalische Methoden

2.5.1 Absorptionsspektroskopie (UV-Spektroskopie)

Zur Bestimmung der Protein-, Peptid- und DNA-Konzentration wurden UV-Absorptionsspektren im Bereich von 220-350 nm aufgenommen. Bei den Proteinen handelte es sich um chromatographisch gereinigte Fraktionen, die zur Aggregatentfernung zuvor zentrifugiert (Eppendorf-Tischkühlzentrifuge 4515D, 30 min, 4 °C, 12000 rpm) wurden. Die Absorptionsspektren wurden in Präzisionsküvetten (Quarzglas Suprasil®, Hellma), bei Raumtemperatur und mit dem entsprechenden Puffer als Referenz aufgenommen. Die Konzentration des jeweiligen Proteins oder der DNA konnte mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Gleichung 2.1), nach Messung der Absorption, bei 280 nm für Proteine und 260 nm für DNA ermittelt werden.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Gleichung 2.1

A: Absorption bei 280 nm, ε : molarer Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, c : Proteinkonzentration in M, d : Schichtdicke der verwendeten Küvette in cm.

Die für die jeweiligen Proteine und Peptide verwendeten Extinktionskoeffizienten wurden mit Hilfe des ExPASy *Bioinformatics Resource Portal* und dem dort befindlichen *ProtParam Tool*, nach der Methode von Gill und Hippel, aus den Werten für Tryptophan, Tyrosin und Cystein ermittelt^[204]. Für die Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurde die Extinktion der Lösung bei 260 nm und ein Extinktionskoeffizient von 0,02 $\mu\text{l}/(\text{ng} \cdot \text{cm})$ verwendet.

2.5.2 Circular dichroismus (CD-Spektroskopie)

Die CD-Spektroskopie arbeitet mit zirkular polarisiertem Licht. Dabei verwendet man die Eigenschaft von chiralen Molekülen, die die links- und rechtspolarisierten Komponenten des zirkular polarisierten Lichts unterschiedlich absorbieren. Aufgrund der unterschiedlichen Absorption entsteht elliptisch polarisiertes Licht, welches die Probe verlässt und im CD-Spektrometer detektiert werden kann. CD wird deshalb auch als Elliptizität (θ) bezeichnet. Im fern-UV-Bereich (160 nm-250 nm) nutzt man die Peptidbindung als optisch aktives Molekül und ermöglicht dadurch die Charakterisierung von Sekundärstrukturelementen im Protein. Die optischen Eigenschaften von aromatischen Aminosäuren, wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin werden hingegen zur Analyse von Tertiärstrukturelementen im nah-UV-Bereich (250 nm-310 nm) verwendet. Die fern-UV-CD-Spektroskopie wurde zur Analyse von Sekundärstrukturelementen und zur Beobachtung thermisch induzierter Entfaltungsübergänge durchgeführt. Die für die CD-Messungen verwendeten Proteinkonzentrationen und die Zusammensetzung der Pufferlösungen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Alle gemessenen CD-Spektren wurden um den Beitrag des Pufferspektrums korrigiert.

Fern-UV-CD-Spektren wurden an einem Jasco J-815 CD-Spektrometer aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm über dem spektralen Bereich von 195-260 nm. Die Spektren wurden zur Verbesserung des Signal/ Rauschverhältnis aus 20 Akkumulationen gemittelt. Bei einer Bandbreite von 2 nm und einer Integrationszeit von 1 s betrug die Messgeschwindigkeit 10 nm/min. Die gemessene Elliptizität wurde im Anschluss mit Gleichung 2.2 in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure $[\theta]_{MRW}$ (*mean residue weight*) umgerechnet.

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta \cdot 100 \cdot MW}{c \cdot d \cdot N_{AS}}$$

Gleichung 2.2

$[\theta]_{MRW}$: mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure in $\text{Grad cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$, θ : gemessene Elliptizität in Grad, c : molare Konzentration des Proteins, d : Schichtdicke der Küvette in cm, N_{AS} : Anzahl der Aminosäuren im Protein.

Thermisch induzierter Entfaltungsübergang

Zur Bestimmung der konformationellen Stabilität von ECD-PTHR2 wurden thermisch induzierte Entfaltungsübergänge durchgeführt, welche die Gleichgewichtslage zwischen nativem (N) und entfaltetem (U) Zustand verschieben. Die thermisch induzierten Entfaltungsübergänge wurden an einem Jasco J-815 CD-Spektrometer mit Peltierelement

gemessen. In einer temperierbaren Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm), in einem Temperaturintervall von 15 °C-95 °C und bei einer Heizrate von 0,5 °C/min wurden die Experimente durchgeführt. Die Elliptizität wurde bei 220 nm aufgezeichnet. Die Datenaufnahme erfolgte immer nach einer Temperaturzunahme von 0,2 °C. Nach der Messung erfolgte eine Normalisierung der Ergebnisse auf 1 für die native und 0 für die entfaltete Konformation. Die Auswertung und Ermittlung des temperaturabhängigen Übergangsmittelpunkt für die Entfaltungsreaktion erfolgte mittels nicht linearer Regression und der *Software* Grapf-Fit 5.0.

2.5.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie arbeitet mit Molekülen, die eine intrinsische, aber auch extrinsische Fluoreszenz besitzen können. Aromatische Aminosäuren wie Tryptophan oder Tyrosin sind solche intrinsischen Fluoreszenzsonden in Proteinen. Extrinsische Fluorophore wie ANS, GFP und Rhodamin- oder Cyaninfarbstoffe werden hingegen über eine kovalente Bindung an ein zu untersuchendes Proteinmolekül gebunden.

Fluoreszenzspektren wurden an einem Jasco FP-6500 Spektralfluoreszenzphotometer aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in einer 800 µl oder 2000 µl Quarzglas-Fluoreszenzküvette. Die Messgeschwindigkeit betrug 200 nm/min, die Integrationszeit 0,5 s, die Anregungsbandbreite 3 nm und die Emissionbandbreite 5 nm. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm, 295 nm oder 350 nm. Die spektrale Breite variierte abhängig vom Experiment zwischen 310-400 nm und 400-600 nm. Alle Spektren wurden durch das Emissionsspektrum des Messpuffers korrigiert. Die verwendeten Konzentrationen und Pufferbedingungen sind in den jeweiligen Experimenten angegeben.

Gleichgewichtsfluoreszenztitration

Zur Untersuchung von Ligandenbindungseigenschaften und der Bestimmung von Dissoziationskonstanten (K_D) wurde Fluoreszenztitration eingesetzt. Die Funktionalität und die native Struktur der rekombinant hergestellten extrazellulären N-terminalen Domäne des PTH-Rezeptors 1 (ECD-PTHR1) und des PTH-Rezeptors 2 (ECD-PTHR2) sollten so überprüft werden. Durch die Bildung eines Protein-Ligand-Komplexes kann die Fluoreszenz von mindestens einem der Bindungspartner messbar verringert werden. Diese Fluoreszenzlöschung (*quenching*) ist abhängig von der Konzentration des Bindungspartners und der Dissoziationskonstante des Komplexes. Die Messung der Fluoreszenzänderung über eine Konzentrationsreihe des zugegebenen Bindungspartners erlaubt die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des gebildeten Komplexes.

Es wurde die Bindung der Liganden PTH (1-84), PTH (15-34), TIP 39 und TIP (7-39) an die extrazelluläre N-terminalen Domäne von PTHR1 und PTHR2 untersucht und die Abnahme der intrinsischen Proteinfluoreszenz bei zunehmender Ligandenkonzentration gemessen. Bei den Titrationsexperimenten wurde die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz bei 295 nm angeregt und die Änderung des Fluoreszenzsignals bei 342 nm verfolgt. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in Quarzglas-Fluoreszenzküvetten. Für die Messungen wurden 0,8 ml oder 2 ml einer 0,5 µM oder 1 µM Proteinlösung in der Küvette über Nacht vorinkubiert. Die Vorinkubation erfolgte zur Einstellung eines konstanten Fluoreszenzsignals. Nach der Einstellung eines stabilen Fluoreszenzsignals wurden maximal bis zu ca. 40 µl der jeweiligen Liganden-Lösung (240 µM-325 µM), in Schritten von 0,5 µl bis 4 µl,

der Rezeptordomäne zugesetzt und für die Gleichgewichtseinstellung jeweils für 3 min unter Rühren inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde anschließend über drei Messungen gemittelt. Die geringe Volumenzunahme im Verlauf der Titrations (ca. 2% bis 5%) wurde bei der anschließenden Auswertung vernachlässigt. Die gemessenen Fluoreszenzintensitätswerte wurden nach Abzug der Fluoreszenz der Pufferlösung zusätzlich um die intrinsische Fluoreszenz des eingesetzten Liganden mit Hilfe einer Ausgleichsgeraden korrigiert, auf 100% skaliert und gegen die Gesamtkonzentration des zugegebenen Liganden aufgetragen. Zur Ermittlung der Ausgleichsgeraden wurde eine Puffer-Titration unter gleichen Bedingungen für die Liganden in Abwesenheit der Rezeptordomäne durchgeführt. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante wurde anschließend durch Angleichung der mittels Fluoreszenztitration erhaltenen Bindungskurve an die quadratische Gleichung 2.10 ermittelt. Die für die Fluoreszenztitration verwendeten Pufferlösungen sind in den Abbildungslegenden angegeben.

Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Für eine reversible Gleichgewichtsreaktion und einer 1:1 Stöchiometrie der beiden Bindungspartner Rezeptor-Domäne (R) und Ligand (L) wird angenommen, dass sie bei jedem Schritt der Fluoreszenztitration im chemischen Gleichgewicht stehen. Dabei wird das Verhältnis zwischen komplexiertem und unkomplexiertem Bindungspartner durch das Massenwirkungsgesetz in Gleichung 2.3 beschrieben.



Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ergibt sich aus Formel 2.4.

$$K_D = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]}$$
 Gleichung 2.4

Ersetzt man nun $[R]$ und $[L]$ durch die Gleichungen 2.5 und 2.6, dann ergibt sich folgender Zusammenhang für die Dissoziationskonstante (Gleichung 2.7).

$[R_t] = [R] + [RL]$ **Gleichung 2.5**

$[L_t] = [L] + [RL]$ **Gleichung 2.6**

$$K_D = \frac{([R_t] - [RL]) \cdot ([L_t] - [RL])}{[RL]}$$
 Gleichung 2.7

K_D : Dissoziationskonstante, $[R_t]$: Gesamtkonzentration des eingesetzten Rezeptors, $[L_t]$: Gesamtkonzentration des eingesetzten Liganden, $[R]$: freie Rezeptorkonzentration, $[L]$: freie Ligandenkonzentration, $[RL]$: Konzentration Rezeptor/ Ligand-Komplex.

Durch das Lösen der Gleichung 2.7 und Auflösen nach $[RL]$ ergibt sich die Gleichung 2.8.

$$[RL] = \frac{([R_t] + [L_t] + K_D)}{2} - \sqrt{\frac{([R_t] + [L_t] + K_D)^2}{4} - [R_t] \cdot [L_t]}$$
 Gleichung 2.8

Die gemessene Fluoreszenz (F) nach jedem Titrationschritt setzt sich wie in Gleichung 2.9 aus den einzelnen Fluoreszenzbeiträgen der im Gleichgewicht befindlichen Spezies zusammen.

$$F = F_t - \Delta F_{max} \cdot \frac{[RL]}{[R_t]} \quad \text{Gleichung 2.9}$$

F : gemessene Fluoreszenz, F_t : totale Grundfluoreszenz des Rezeptors, ΔF_{max} : maximale Fluoreszenzänderung nach Bindung des Liganden.

Werden die Konzentrationen der einzelnen Terme in Gleichung 2.9 durch die Gleichung 2.8 ersetzt, ergibt sich für die Gesamtfluoreszenz die Gleichung 2.10, aus deren Zusammenhang die Dissoziationskonstante ermittelt werden kann.

$$F = F_t - \frac{\Delta F_{max}}{2 \cdot [R_t]} \cdot \left[([R_t] + [L_t] + K_D) - \sqrt{([R_t] + [L_t] + K_D)^2 - 4 \cdot [R_t] \cdot [L_t]} \right] \quad \text{Gleichung 2.10}$$

ANS-Fluoreszenzspektroskopie

Das Reagenz 8-Anilino-1-Naphthalensulfonsäure (ANS) ist eine Chemikalie, die an exponierte, hydrophobe Bereiche von Proteinen binden kann. Durch diese Bindung verstärkt sich die Fluoreszenzquantenausbeute des ANS. Für die ANS-Bindungsstudien mit ECD-PTHR2 wurde eine 30 mM ANS-Stammlösung angesetzt. Vor der Messung wurde ANS in 100-fachem molarem Überschuss zur Proteinlösung gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen. Zur Aufnahme der Spektren erfolgte eine Anregung bei 280 nm (Anregungswellenlänge des Proteins) und bei 350 nm (Anregungswellenlänge für ANS). Die Spektren wurden zwischen 400 und 600 nm bei 20 °C aufgenommen.

Guanidiniumchlorid induzierter Entfaltungsübergang

Neben den thermisch induzierten Entfaltungsübergängen für ECD-PTHR2 wurde unter Einsatz von Fluoreszenzspektroskopie auch die konformationelle Stabilität der Domäne mittels chemisch induzierter Denaturierung untersucht. Die konformationelle Stabilität beschreibt ein Gleichgewicht zwischen nativem $[N]$ und denaturiertem $[U]$ Zustand des Proteins. Entsprechend eines Zweizustandsmodells liegt das Protein während der Entfaltung, bei Abwesenheit von charakterisierbaren Intermediaten, in einem Gleichgewicht ($N \rightleftharpoons U$) aus nativem und entfaltetem Protein vor^[205, 206]. Mit Hilfe des Zweizustandsmodells kann die Gleichgewichtskonstante der Entfaltungsreaktion, aus der Verfolgung spektroskopischer Unterschiede, zwischen N und U ermittelt werden (Gleichung 2.11).

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{[y_N - y_{obs}]}{[y_{obs} - y_U]} \quad \text{Gleichung 2.11}$$

K_U : Gleichgewichtskonstante der Entfaltungsreaktion, $[U]$: Konzentration des entfaltenen Proteins, $[N]$: Konzentration des gefalteten Proteins, y_N : spektroskopische Messgröße im nativen Zustand, y_U : spektroskopische Messgröße im denaturiertem Zustand, y_{obs} : spektroskopische Messgröße während der Entfaltungsreaktion in Abhängigkeit des Vorhandensein eines Mischverhältnis von N und U .

Im thermodynamischen Gleichgewicht wird die freie Enthalpie der Entfaltung (ΔG_U) durch die Gleichgewichtskonstante K_U beschrieben und kann durch Gleichung 2.12 mathematisch dargestellt werden.

$$\Delta G_U = -RT \cdot \ln K_U \quad \text{Gleichung 2.12}$$

ΔG_U : freie Enthalpie der Entfaltung im Zweizustandsmodell, R : universelle Gaskonstante, T : Temperatur in K, $[U]$: Konzentration des entfalteten Proteins, $[N]$: Konzentration des gefalteten Proteins.

Die freie Enthalpie der Entfaltung kann durch Entfaltungsübergänge ermittelt werden, bei der die Gleichgewichtslage, durch den Einsatz von Denaturierungsmitteln oder Temperatur und Druck, verschoben wird. Bei der Entfaltung von Proteinen wird von einer linearen Abhängigkeit der Proteinstabilität von der Denaturierungsmittelkonzentration, dem *linear extrapolation model* (LEM), ausgegangen^[205, 206, 207] (Gleichung 2.13). Es beschreibt die freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels und auch die Kooperativität (m) des Entfaltungsübergangs. Die Kooperativität des Entfaltungsübergang ist proportional zur Änderung der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche des Proteins während der Denaturierung^[206, 207].

$$\Delta G_U = \Delta G_U(H_2O) + m \cdot [D] \quad \text{Gleichung 2.13}$$

ΔG_U : freie Enthalpie der Entfaltung im Zweizustandsmodell, $\Delta G_U(H_2O)$: freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (0 M GdmCl), m : Kooperativität des Entfaltungsübergangs, $[D]$: Konzentration des Denaturierungsmittels.

Besitzt das Protein unterschiedliche spektroskopische Eigenschaften für den nativen und denaturierten Zustand ($y_{N,U}$), kann die Entfaltung darüber verfolgt werden. Das spektroskopische Signal des nativen und denaturierten Proteinzustandes ist dabei ebenfalls durch eine lineare Abhängigkeit vom Denaturierungsmittel gekennzeichnet (Gleichung 2.14). Der resultierende lineare Anstieg $m_{N,U}$ und das spektroskopische Signal des nativen und denaturierten Zustand, in Abwesenheit des Denaturierungsmittels, ($y_{N,U}^0$) beschreibt die Basislinie des nativen bzw. denaturierten Proteins.

$$y_{N,U} = y_{N,U}^0 + m_{N,U} \cdot [D] \quad \text{Gleichung 2.14}$$

$y_{N,U}$: spektroskopische Messgröße des nativen bzw. entfaltenen Proteins, $y_{N,U}^0$ spektroskopische Messgröße des nativen bzw. entfaltenen Proteins in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (0 M GdmCl), $m_{N,U}$: lineare Abhängigkeit des spektroskopischen Signals von der Denaturierungsmittelkonzentration, $[D]$: Konzentration des Denaturierungsmittels.

Die spektroskopische Messgröße y_{obs} (Signalintensität) über die der Entfaltungsübergang in Abhängigkeit vom Denaturierungsmittel verfolgt wird kann durch die Kombination der Gleichungen 2.11 bis 2.14 durch Gleichung 2.15 dargestellt werden.

$$y_{obs}([D]) = \frac{(y_N^0 + m_N [D]) + (y_U^0 + m_U [D]) \cdot e^{\frac{\Delta G_U(H_2O) + m \cdot [D]}{RT}}}{1 + e^{\frac{\Delta G_U(H_2O) + m \cdot [D]}{RT}}} \quad \text{Gleichung 2.15}$$

y_{obs} : spektroskopische Messgröße während der Entfaltungsreaktion (Vorhandensein eines Mischverhältnis von N und U), $y_{N,U}^0$ spektroskopische Messgröße des nativen bzw. entfalteten Proteins in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (0 M GdmCl), $m_{N,U}$: lineare Abhängigkeit des spektroskopischen Signals von der Denaturierungsmittelkonzentration, $[D]$: Konzentration des Denaturierungsmittels, $\Delta G_U(H_2O)$: freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels (0 M GdmCl), R : universelle Gaskonstante.

Für die Stabilitätsmessungen wurden die Proben von ECD-PTHR2 gegen den entsprechenden Messpuffer dialysiert und im Anschluss daran in den gleichen Puffer mit ansteigenden Konzentrationen von Guanidiniumchlorid (GdmCl) 0-6 M verdünnt. Die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen ist in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 20 °C inkubiert und am nächsten Tag mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers (Jasco, FP 6500) vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte unter der Annahme des eben beschriebenen Zweizustandsmodells nach Pace und Scholz^[206].

2.5.4 Refraktometrie

Da bei den Experimenten für die chemisch induzierte Entfaltung GdmCl als Denaturierungsmittel eingesetzt wurde, musste im Anschluss an jede Messung die genaue Konzentration von GdmCl ermittelt werden. Durch die Differenz der Brechungsindizes (Δn) des Puffers in Abwesenheit und in Gegenwart des Denaturierungsmittels konnte die Konzentration nach Gleichung 2.16 bestimmt werden. Die Bestimmung der Brechungsindizes erfolgte mit einem Refraktometer der Firma Krüss (Hamburg, D).

$$[GdmCl] = 57.147 \cdot \Delta n + 38.68 \cdot (\Delta n)^2 - 91.6 (\Delta n)^3 \quad \text{Gleichung 2.16}$$

$[GdmCl]$: GdmCl-Konzentration in mol/l, Δn : Differenz der Brechungsindizes der Pufferlösung ohne und mit GdmCl

2.5.5 Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore[®])

Die Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*) ist ein optischer Effekt, der zum Nachweis und zur Quantifizierung einer molekularen Interaktion genutzt werden kann. Mit Hilfe eines optischen Systems wird die Veränderung des Brechungsindex, welcher durch eine Änderung der Massenkonzentration von Makromolekülen an einer Grenzschicht ausgelöst wird, auf einem Sensorchip gemessen. Für die Bindungsanalyse wird als erstes ein Zielmolekül auf ein Biosensorsystem (Sensor Chip SA CM 5) kovalent immobilisiert, während anschließend über ein kontinuierliches Flusssystem der zweite Interaktionspartner über die Oberfläche des Sensorsystems geleitet wird. Als letzter Schritt wird der entstandene Assoziationskomplex durch Entfernung des flexiblen Bindungspartners aufgelöst. Mit Hilfe von BIAcore[®] wurde das Assoziationsvermögen von ECD-PTHR1 und TIP (7-39) untersucht. Die Messung erfolgte an einem BIAcore[®] T100 (Uppsala, Schweden) in Messpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) bei 20 °C und einer Flussrate von 30 µl/min. Die primäre Amidgruppe des ECD-PTHR1 wurde unter Anwendung eines Biotinylierungs-Kits (Biotinylation Kit-21335,

Thermo Fisher Scientific, Germany) chemisch biotinyliert und über Streptavidin kovalent am Sensorchip immobilisiert. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen des TIP (7-39)-Liganden (0,1-50 μM) injiziert und für 120 s assoziiert. Daraufhin wurde der Chip mit Messpuffer für 300 s. gespült. Durch die Injektion von Waschpuffer (10 mM Glycin/HCl, pH 2,5) wurde der Bindungspartner gelöst und die Regeneration der Sensorchipoberfläche hergestellt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *BIAevaluation-Software* (*GE Healthcare Life Sciences*).

2.5.6 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die ITC beruht auf der Eigenschaft, dass chemische Reaktionen mit einer Änderung der Enthalpie (ΔH) verbunden sind, d.h. bei einer exothermen Reaktion wird Wärme frei ($\Delta H < 0$) und bei einer endothermen Reaktion wird die Enthalpie erhöht ($\Delta H > 0$), so dass diese Reaktion nur unter Wärmezufuhr abläuft^[208]. Die Änderung der Enthalpie wird bei der ITC in Form von Wärmemengen (Q) ermittelt, die als Kompensationsleistung zur Aufrechterhaltung isothermer Bedingungen bei Komplexbildungsreaktionen nötig sind. ITC wird oft gewählt, um Protein-Ligand-Interaktionen zu analysieren, da sie eine sehr genaue Methode zur Quantifizierung chemischer Reaktionen und ihrer thermodynamischen Beschreibung ist. ITC hat den Vorteil, dass aus einem Experiment die freie Reaktionsenthalpie (ΔG), die Enthalpie, die Gleichgewichtsassoziationskonstante (K_A) bzw. aus dem Kehrwert die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D), die Stöchiometrie (N) und die Reaktionsentropie (ΔS) für eine Interaktion bestimmt werden können^[209].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das VP-ITC Mikrokolorimeter der Firma MicroCalTM für die Bindungsanalyse von ECD-PTHr1 und dem PTH (1-84)-Liganden verwendet. Dazu wurde in eine auf 20 °C temperierte Messzelle, die von einem adiabatischen Mantel umschlossen ist, 1445 μl des ersten Interaktionspartners vorgelegt und im Anschluss über 20 Injektionen (Gesamtvolumen 240 μl) der zweite Interaktionspartner schrittweise hinzu titriert. Zwischen jedem Titrationsschritt wurde 350 s inkubiert, dadurch war es dem System möglich, wieder ein thermodynamisches Gleichgewicht einzustellen. Die Rührgeschwindigkeit der Messungen betrug 307 rpm. Die durch die Titration des zweiten Interaktionspartners auftretende Verdünnungswärme wurde durch ein Referenzexperiment (Titration des zweiten Interaktionspartners in Pufferlösung) ermittelt und zur Korrektur des Messsignals verwendet. Die benutzten Proteinkonzentrationen und Pufferlösungen werden in den Abbildungslegenden wiedergegeben. Alle gereinigten Peptide und rückgefalteten Proteine wurden zunächst auf die gewünschte Konzentration mit Messpuffer durch Verdünnung eingestellt und anschließend gemeinsam gegen Messpuffer dialysiert. So konnte sichergestellt werden, dass beide Interaktionspartner unter denselben Pufferbedingungen vorlagen und keine Verdünnungseffekte die Messung beeinflussten. Während der Dialyse entstandene Aggregate wurden durch Zentrifugation (Eppendorf-Tischkühlzentrifuge 4515D, 30 min, 4 °C, 12000 rpm) entfernt und die Proteinkonzentration im Überstand mittels UV-Absorption bestimmt. Die durch ein ITC-Experiment erhaltenen Daten wurden mit der ITC angepassten *Origin 7.0-Software* analysiert.

2.5.7 Massenspektrometrie

Alle in dieser Arbeit hergestellten Peptide und Proteine wurden durch Massenspektrometrie identifiziert. Dafür wurden die einzelnen Proben in ionisierte Komponenten überführt und in einem elektromagnetischen Feld hinsichtlich des Masse-Ladungsverhältnis separiert. Für die massenspektrometrische Analyse wurden zwei Methoden verwendet. *Electrospray Ionization* (ESI) und *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI). Die massenspektrometrischen Analysen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Angelika Schierhorn (Max-Planck-Gesellschaft Halle, MLU Halle-Wittenberg) und von Dr. Christian Ihling (Institut für Pharmazie, Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. Andrea Sinz, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

2.5.8 Analyse des Disulfidmusters von ECD-PTHR2

Die Analyse der Disulfidverbrückung des ECD-PTHR2 erfolgte in Kooperation mit Dr. Christian Ihling. Dafür wurde das renaturierte und gereinigte ECD-PTHR2 einem Pepsin-Verdau unterzogen. Es wurden 10 µl Proteinlösung (20 µg/ml) mit 30 µl 100 µM KCl, pH 1,5 versetzt und anschließend Pepsin im Verhältnis 1:10 (Enzym : Protein, v/v) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min. bei 37 °C inkubiert und durch schnelles Abkühlen auf 4 °C gestoppt. Die Probe wurde dann direkt mit der Tandem-Massenspektrometriemethode *Liquide Chromatography Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry* (LC/MS/MS) analysiert. Die Auswertung der Daten und die Identifizierung der durch den Verdau erhaltenen Peptidfragmente und der gebildeten Disulfidbrücken erfolgte mit der *DBond-Software* (Bruker, Karlsruhe).

2.5.9 Magnetresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Für die Charakterisierung struktureller und dynamischer Eigenschaften von Makromolekülen in Lösung ist die Magnetresonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) eine etablierte Methode. Die NMR-Spektroskopie ist eine wenig sensitive Methode, was den Einsatz von hoch konzentrierten Peptid- oder Proteinlösungen erfordert (µM-mM). Bei der NMR-Spektroskopie wird das Resonanzsignal von magnetisch aktiven Atomkernen, die einen von Null verschiedenen Kernspin besitzen, detektiert. Im Zusammenhang mit der Aufklärung von Struktur- und Dynamikinformationen von Proteinen und Peptiden interessiert man sich besonders für die Kerne mit einem halbzahligen Spin, wie ^1H , ^{15}N und ^{13}C .

Im Rahmen dieser Arbeit wurde NMR-Spektroskopie für die Untersuchung der Peptidhormone PTH (1-84), PTH (15-34), TIP 39 und der N-terminalen extrazellulären Domänen des PTH-Rezeptors 1 und 2 verwendet. Neben der eindimensionalen ^1H -NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung der Tertiärstruktur und des Oligomerisierungszustandes von ECD-PTHR2 wurden auch zweidimensionale ^1H - ^{15}N -HSQC-Experimente (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)^[210,211] für die Charakterisierung der isotopenmarkierten Peptidhormone und von ^{15}N markiertem ECD-PTHR1 in Gegenwart von PTH (1-84) genutzt. Wiederum dreidimensionale Verfahren wurden verwendet, um eine eindeutige sequenzielle Aminosäurezuordnung (*Assignment*) von Amidprotonenresonanzsignalen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von PTH (1-84) und PTH (15-34) zu erreichen. Dafür wurden ^{15}N -NOESY-HSQC- (*Nuclear Overhauser Enhancement*

Spectroscopy), sowie ^{15}N -TOCSY-HSQC- (*Total Correlation Spectroscopy*) Experimente für uniform isotopenmarkiertes Peptid (^{15}N) und die TROSY (*Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy*) basierten Tripelresonanz-Experimente HNCA und HNCACB^[212,213] für doppelt isotopenmarkiertes Peptid ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$) durchgeführt. Das Ansetzen der NMR-Experimente und die sequenzielle Aminosäurezuordnung für PTH (15-34) erfolgte mit Unterstützung von Mohanraj Gopalswamy (Institut für Physik, Arbeitsgruppe Biophysik, MLU Halle-Wittenberg). Von ihm wurde freundlicherweise auch die Prozessierung der Messspektren und die sequenzielle Aminosäurezuordnung für PTH (1-84) durchgeführt. Durch die Zuordnung der einzelnen Amidprotonenresonanzsignale in den ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der genannten Peptide sind weitere Experimente möglich, die eine Identifikation spezifischer Aminosäuren, die an einer Wechselwirkung mit einem Bindungspartner beteiligt sind, erlauben (M. Gopalswamy, Dissertation in Vorbereitung, MLU Halle-Wittenberg). Die Aufnahme von HNCA und HNCACB-Spektren erfolgte mit 1024(^1H), 64(^{15}N) und 48(^{13}C) bzw. 1024(^1H), 64(^{15}N) und 128(^{13}C) Datenpunkten. ^{15}N -NOESY-HSQC- und ^{15}N -TOCSY-HSQC-Spektren wurden mit 1024(^1H), 352(^1H) und 64(^{15}N) Datenpunkten aufgenommen. Die Mischzeit der NOESY- und TOCSY-Experimente betrug 120 ms und 100 ms. Von M. Gopalswamy wurden auch ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren zur Bindungsanalyse des phosphorylierten PTH (1-84) und ECD-PTHR1 aufgenommen. Alle aufgeführten NMR-Spektren wurden bei 25 °C an einem Bruker Avance III 600 MHz oder 800 MHz Spektrometer aufgenommen. Die Prozessierung der Spektren erfolgte mit *NMRPipe*^[214] und die Darstellung mit *NMRView*^[215]. Alle verwendeten Konzentrationen und Pufferbedingungen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden wiedergegeben.

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Herstellung von Zelllysaten und Kinase-Assays

Die *in vitro* Phosphorylierung des rekombinant hergestellten humanen PTH (1-84) erfolgte durch die Inkubation mittels kinasehaltigen Zellextrakts, der aus *Human Embryonic Kidney* 293-Zellen (HEK 293) oder aus Nebenschilddrüsenzellen von Rinderzellen hergestellt wurde. Das Experiment zur Phosphorylierung wurde freundlicherweise von Dr. Amit Kumar durchgeführt (Arbeitsgruppe Biophysik, MLU Halle-Wittenberg, D). Die Homogenisierung der Zellextrakte, die verwendeten Pufferlösungen und Konzentrationen, sowie Reaktionstemperatur und Zeiten sind in Kumar *et al.*^[185] aufgeführt.

2.6.2 cAMP-Akkumulationsassay

Die Analyse intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse erfolgte mit Hilfe von cAMP-Akkumulationsassays an HEK 239-Zellsystemen, welche die humanen Parathormon-Rezeptoren 1 und 2 exprimierten. Die Experimente wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dan Donnelly von Dr. Clara Wishart durchgeführt (*School of Biomedical Sciences*, Universität Leeds, UK). Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung der Zellpräparation, verwendeten Pufferlösungen und Konzentrationen, sowie der Datenanalyse ist ebenfalls in Kumar *et al.*^[185] beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinante Herstellung von Peptidhormonen als SUMO-Fusion

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Peptidhormone PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39 wurden durch rekombinante Expression in BL21(DE3) CodonPlus[®] RIL *E. coli*-Zellen als SUMO-Fusionsproteine hergestellt. Die Strategie der Expression mit Hilfe eines Fusionsproteins wurde gewählt, weil kleine Peptide in Bakterien eine kurze Halbwertszeit besitzen und sehr schnell abgebaut werden. Die SUMO-Fusionsstrategie zeigt eine erhöhte lösliche Expression und Halbwertszeit von Proteinen^[197]. Das für die Expression verwendete SUMO-Fusionssystem vermittelt einen N-terminalen His₆-Tag, der eine Reinigung des Zielmoleküls mit einer Immobilisierten-Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) möglich macht. Zwischen dem N-terminalen His₆-Tag und dem zu reinigenden Zielpeptid ist das SUMO-Protein lokalisiert, was durch eine tertiärstruktur-spezifische SUMO-Protease (Ulp1) zusammen mit dem His₆-Tag abgespalten werden kann. Dadurch entsteht ein anhangsfreies Peptid ohne artifizielle Verlängerungen oder Modifikationen des N-Terminus^[196]. Eine schematische Darstellung des SUMO-Fusionskonstrukts ist in Abbildung 3.1 gezeigt. Die Herstellung der humanen Peptide erfolgte, mit leichten Abwandlungen, durch die Übertragung der von Bosse-Doenecke *et. al.*^[199] entwickelten Methode, in un- und isotonenmarkierter Form. Ziel war die Entwicklung und Optimierung von Protokollen zur Herstellung ausreichender Mengen an Probenmaterial, die auch eine strukturelle Charakterisierung der Peptide mittels NMR-Spektroskopie möglich machen. Für die Erstellung der Expressionsvektoren des humanen PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39 wurde die codierende Gen-Sequenz für eine Expression in *E. coli* optimiert (*codon usage* Optimierung) und mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bsa*I und *Bam*HI in den pET-SUMOadapt-Vektor kloniert^[199] (Anhang 4, 4.1). Nach Expression und Reinigung wurden die gewonnenen Peptide durch Massenspektrometrie identifiziert und anschließend mit NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die Peptide wurden außerdem als Liganden in Fluoreszenzbindungsstudien zur Analyse der Interaktion mit den N-terminalen Domänen der Parathormon-Rezeptoren 1 und 2 verwendet und für PTH (1-84) der Einfluss einer Phosphorylierung auf die Rezeptoraktivierung von PTHR1 und PTHR2 untersucht.

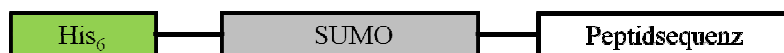


Abbildung 3.1: Allgemeine schematische Darstellung des SUMO-Fusionsproteins. Die Konstrukte besitzen einen N-terminalen His₆-Tag, auf dem das SUMO-Protein folgt. C-terminal zur SUMO-Sequenz liegt die Aminosäuresequenz des zu reinigenden Peptids.

3.1.1 Expression, Reinigung und Charakterisierung von PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39

PTH (1-84)

Für die Herstellung des humanen Parathormon-Rezeptor 1 Agonisten PTH (1-84) wurde der pET-SUMOadapt-PTH (1-84) Expressionsvektor (Anhang 4, 4.2) in BL21(DE3) CodonPlus[®] RIL *E. coli*-Zellen transformiert und anschließend die Expression in Gegenwart von dYT-Medium bei 37 °C für 4 h durchgeführt. Für die Expression von

unmarkiertem PTH (1-84) wurde typischerweise eine OD_{600} von 5 bis 7 erreicht. Das entsprach einer Ausbeute an Zellmaterial (Biofeuchtmasse) von ca. 7,5 g/l Kulturmedium. PTH (1-84) wurde als lösliches SUMO-Fusionsprotein exprimiert (Abb. 3.2).

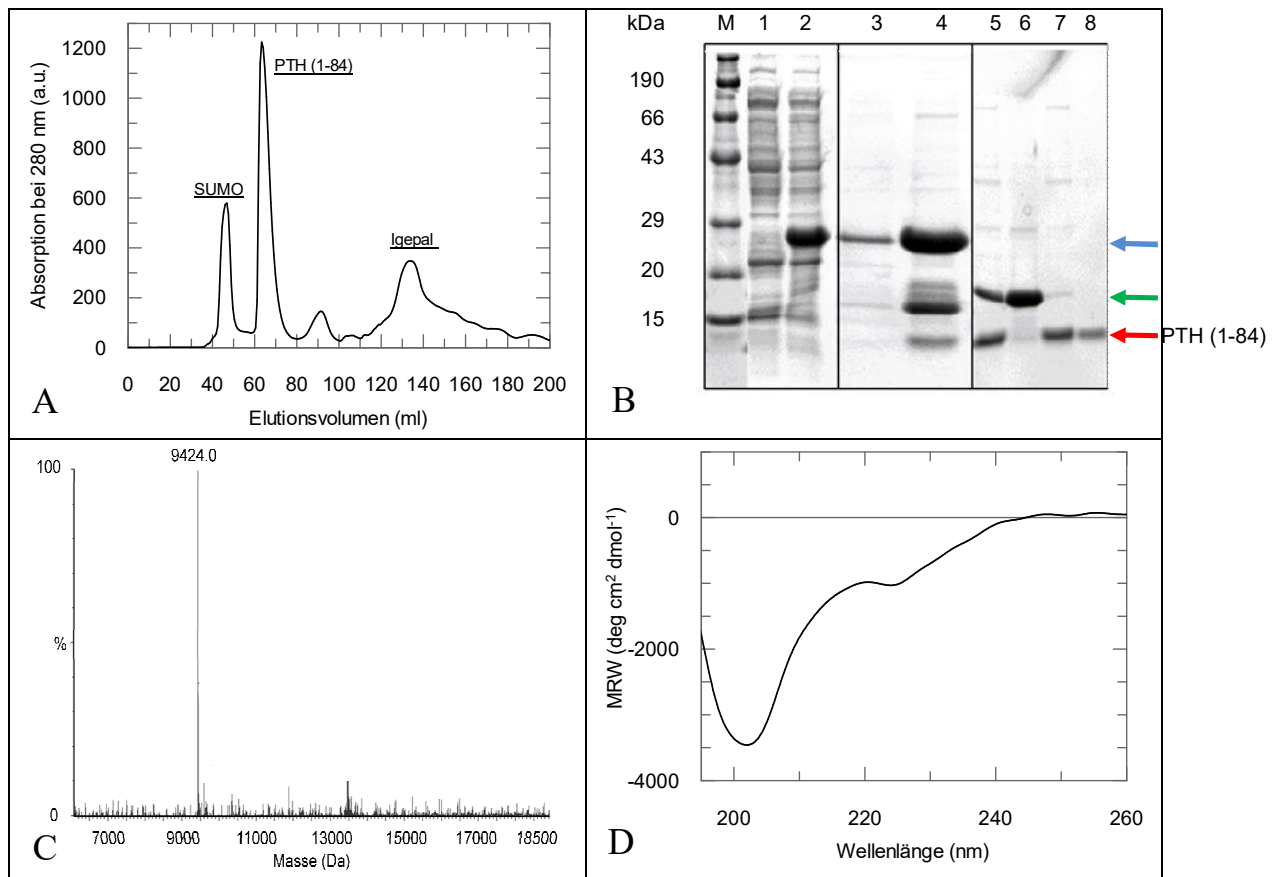


Abbildung 3.2: Reinigung und Charakterisierung von PTH (1-84). **A:** Gelfiltration PTH (1-84). Zur finalen Reinigung wurde der Durchlauf der 2. IMAC auf eine selbst gepackte Superdex 75 *prep grade* Chromatographiesäule aufgetragen und in 50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0,03 % NaN_3 , 1 mM EDTA bei pH 7,5 und 25 °C eluiert. Die Elutionsfraktionen von 60-75 ml Retentionsvolumen (RV) wurden gesammelt, mit SDS-PAGE und Massenspektrometrie analysiert. Die Elutionsfraktionen im Bereich von 40 ml RV beinhaltenen SUMO und aggregiertes PTH (1-84). Restliches Igepal, was während der SUMO-Spaltung verwendet wurde, konnte ab einem RV von ca. 120 ml von der Säule gewaschen werden. **B:** SDS-PAGE der Expression und Reinigungsschritte. Die Proben wurden mittels 4-12,5%igem Gradientengel und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. M: Protein-Marker. 1: Zellysate vor Induktion. 2: Zellysate nach 2 h Induktion. Es ist eine Expressionsbande bei ca. 25 kDa zu erkennen, die dem SUMO-PTH (1-84)-Fusionsprotein (**blauer Pfeil**) entspricht. 3: Fusionsprotein nach 1. IMAC-Reinigungsschritt. 4: SUMO-Spaltung nach 5 min. 5: SUMO-Spaltung nach 1,5 h. 6: SUMO-Protein (**grüner Pfeil**), Elution nach 2. IMAC-Reinigungsschritt. 7: PTH (1-84) Peptid-Durchlauf nach 2. IMAC. 8: PTH (1-84) Elutionfraktion der Gelfiltration bei 70 ml RV. Es ist eine einzelne Bande bei ca. 10 kDa zu erkennen, die PTH (1-84) entspricht. Die Laufhöhe des gereinigten PTH (1-84) ist mit einem **roten Pfeil** markiert. **C:** ESI-Massenspektrum von PTH (1-84). Die theoretische molekulare Masse von 9424,7 Da für monomeres PTH (1-84) konnte detektiert werden. **D:** Fern-UV-CD-Spektrum von PTH (1-84). Die Peptidkonzentration betrug 10 μM . Das Spektrum wurde in 50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaSO_4 , pH 6,5 aufgenommen und 12-fach akkumuliert. Die Messtemperatur betrug 20 °C.

Durch Zellaufschluss, Fraktionierung der Zellbestandteile und Zentrifugation wurde das Fusionsprotein mit Hilfe einer Immobilisierten-Metallchelate-Affinitätschromatographie aus dem Zellüberstand isoliert. Nach Dialyse der Elutionsfraktionen und anschließender SUMO-Spaltung (2.4.4, 2.4.5) mittels SUMO-Protease Ulp1 wurde PTH (1-84) durch

einen zweiten IMAC-Reinigungsschritt von SUMO, SUMO-Protease und ungespaltenem Fusionsprotein getrennt. Der aufgefangene Durchfluss, der anhangfreies PTH (1-84) enthielt, wurde mittels Gelfiltration (selbst gepackte Säule, *S75 prep grade*) gereinigt. Das bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm aufgezeichnete Chromatogramm (Abb. 3.2 A) zeigt eine deutliche Elutionsspitze bei 60 ml Retentionsvolumen, die PTH (1-84) entspricht. Der große *Peak* im Ausschlussvolumen der Säule (bei 30-40 ml Retentionsvolumen) zeigt das Vorhandensein von Aggregaten und Peptiden von höherer oligomerer Spezies und Reste des SUMO-Fusionsproteins, welche durch die Gelchromatographie von PTH (1-84) abgetrennt werden konnten. Die auftretenden Elutions-*Peaks* bei einem Retentionsvolumen von 100 ml entsprechen Igepal, das während der SUMO-Spaltung als Zusatz im SUMO-Spaltungspuffer verwendet wurde. Nach Abschluss der Reinigung wurde PTH (1-84) zur weiteren Aufbewahrung lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. Insgesamt wurden aus einem Liter Kulturvolumen ca. 50-75 mg PTH (1-84) präpariert.

Die Expression und die Reinheit des SUMO-Fusionsproteins und des PTH-Peptids zwischen den einzelnen Reinigungsschritten, sowie die Effizienz der SUMO-Spaltung wurden mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.2 B). Anschließend wurde die Identität durch Massenspektrometrie überprüft. Das Massenspektrum (Abb. 3.2 C) zeigt die detektierte Masse m/z des rekombinant exprimierten und gereinigten, humanen PTH (1-84) von 9424,0 Da und entspricht damit dem erwarteten theoretischen Molekulargewicht von 9424,7 Da. Zur Charakterisierung der Sekundärstruktur wurden fern-UV-CD-Spektren aufgenommen (Abb. 3.2 D). Das CD-Spektrum von PTH (1-84) zeigt ein lokales Minimum bei 220 nm und ein weiteres bei 205 nm. Das Spektrum zeigt keine stark ausgeprägte Sekundärstruktur und lässt einen geringen Anteil von α -helikalen Bereichen erkennen. Es entsprach damit publizierten CD-Spektren des N-terminalen Fragments PTH (1-34)^[109, 111] und lässt vermuten, dass die Region der Aminosäuren 35-84 als *random coil* vorliegt.

Die Expression und Reinigung von ^{15}N - und ^{13}C - ^{15}N -isotopenmarkiertem PTH (1-84) erfolgte analog zur beschriebenen Prozedur für unmarkiertes PTH (1-84), jedoch mit kleinen Abweichungen. Als Kulturmedium wurde M9-Minimalmedium verwendet, das mit ^{15}N -Ammoniumchlorid und/oder ^{13}C -Glukose angereichert war. Die Expression erfolgte hier über Nacht und bei 27 °C. Die maximale OD_{600} betrug 5 und aus einer Biofeuchtmasse von 5,25 g/l M9-Medium konnten 15-22 mg Peptid gewonnen werden. Mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Tripelresonanz-Experimenten (2.5.9, HNCA, HNCACB, ^{15}N -NOESY-HSQC, ^{15}N -TOCSY-HSQC) wurde die Konstitution von einfach und doppelt isotopenmarkiertem PTH (1-84) bestätigt und eine vollständige Zuordnung der Amidprotonenresonanzsignale für das Proteinrückgrat im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum erreicht (Abb. 3.3). Die Aminosäuresequenz von humanem PTH (1-84) ist im Anhang 4 unter 4.7 aufgeführt. Die Zuordnung der Resonanzsignale beginnt mit der Aminosäure Val2, weil für die erste Aminosäure kein Signal detektiert werden kann. Der Grund dafür liegt im schnellen chemischen Austausch zwischen der freien Aminogruppe der ersten Aminosäure des Peptids mit dem Lösungsmittel. Dadurch kann keine Korrelation zwischen ^{15}N und ^1H ausgebildet und detektiert werden. Wegen fehlender Amidprotonen zeigen Pro40, Pro43 und Pro51 keine Resonanzen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum. Die eindeutige Zuordnung der Amidprotonenresonanzsignale ist ein wichtiger Zwischenschritt für eine weiterführende

Charakterisierung der Interaktionsreaktion von PTH (1-84) mit der extrazellulären Domäne des humanen Parathormon-Rezeptor 1 und 2 durch NMR-Titrationsstudien. Mit Hilfe der aminosäurespezifischen Zuordnung der Amidprotonenresonanzsignale war es auch möglich, spezifische Serinreste zu identifizieren, die bei der Phosphorylierungsreaktion von PTH (1-84) eine wichtige Rolle spielen^[185]. Die Reinheit, die quantitative Ausbeute und die effiziente Isotopenmarkierung von PTH (1-84) waren ausreichend, um strukturelle Studien mit Hilfe von NMR und anderen Methoden durchzuführen.

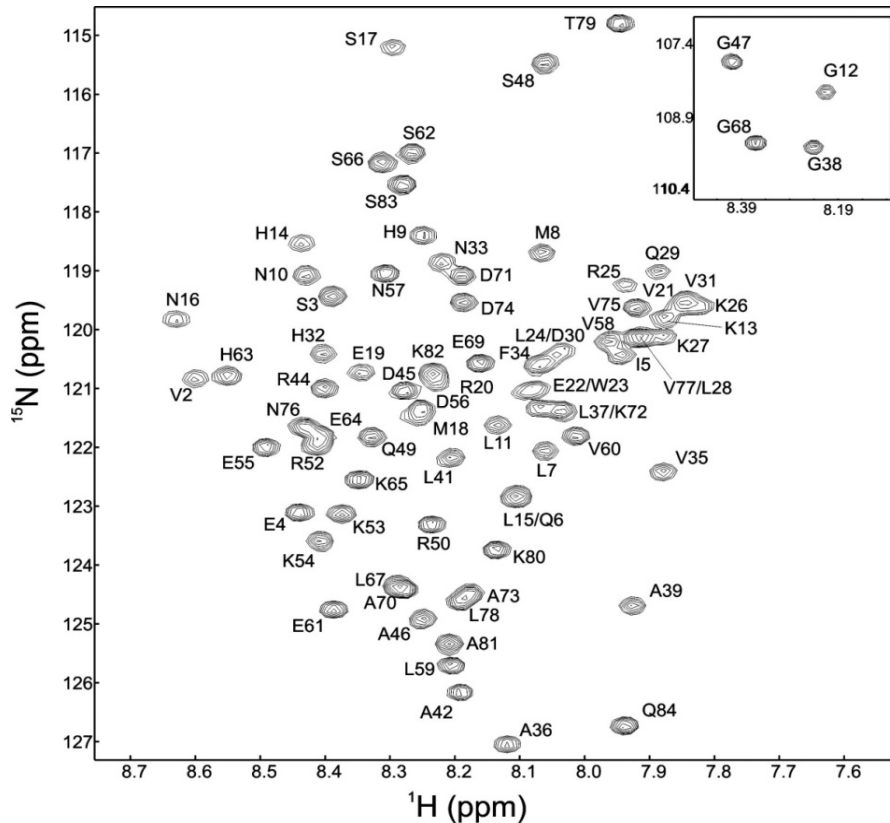


Abbildung 3.3: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von PTH (1-84). Die Messungen erfolgten in 10 mM Bis-Tris, 300 mM Na_2SO_4 , 0,02 % NaN_3 , 10 % D_2O (v/v) bei pH 5,5 und 25°C. Das Spektrum wurde an einem Bruker Avance III 800 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Amidprotonenresonanzsignale der detektierten und identifizierten Aminosäuren sind mit dem Einbuchstabencode der Aminosäuren beschriftet. Für die Aufnahme des Spektrums wurden 150 μM PTH (1-84) verwendet. Das rechts oben im Spektrum aufgeführte *Inset* zeigt die ausgelösten Amidprotonenresonanzen der Glycinreste. PTH (1-84) besitzt eine weitere Resonanz bei ca. 10 ppm, die durch die Seitenkette (*side chain*, *sc*) des Trp23 (W23sc) ausgelöst wird (hier nicht dargestellt).

PTH (15-34)

Auch die rekombinante Herstellung des PTH-Rezeptor 1 Antagonisten PTH (15-34) in un- und isotopenmarkierter Form erfolgte mit Hilfe der SUMO-Fusionsmethode. Typischerweise wurde während einer vier stündigen Induktion der Expression des Fusionsproteins in dYT-Medium eine maximale OD_{600} von 3 erreicht. Die Induktion der Expression für isotopenmarkiertes PTH (15-34) erfolgte über Nacht in M9-Minimalmedium bei 27 °C und erreichte eine maximale OD_{600} von 5-6. Für die präparativen Expressionen wurden ca. 4-6 g Biofeuchtmasse pro Liter Kulturmedium (dYT, M9) gewonnen. Die Präparation von un-, einfach- (^{15}N), sowie doppelt- ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$) isotopenmarkiertem PTH (15-34) erfolgte weitestgehend analog zur Herstellung von PTH (1-84).

Jedoch mit einem Unterschied im finalen Reinigungsschritt. Der Durchlauf, der das PTH (15-34) nach der zweiten IMAC-Reinigung enthielt, wurde bei ersten Reinigungsversuchen auf eine RP-HPLC-Säule (C₁₈-Säule) aufgetragen und in 55 % Acetonitril und 0,1 % TFA eluiert. Anschließend wurden die erhaltenen Peptidlösungen zur Entfernung des Acetonitrils durch Rotationsverdampfung eingeeengt und die erhaltene wässrige Peptidlösung zur Lyophilisation verwendet. Das erhaltene Peptid zeigte während dieser Methode der Reinigung Abbauprodukte und führte dadurch zu einer geringeren Ausbeute von ca. 0,9 mg pro Liter dYT Kulturmedium. Zur Verbesserung der Ausbeute wurde versucht, die Reinigungsprozedur zu beschleunigen und den durch intrinsische *E. coli*-Proteasen vermuteten Peptid-Abbau zu verhindern. Deshalb wurde bei weiteren Reinigungen von unmarkiertem und isotoopenmarkiertem (¹⁵N und/oder ¹³C) PTH (15-34) vom Zellaufschluss an mit dem Zusatz von Protease-Inhibitoren der Firma Sigma-Aldrich gearbeitet. Außerdem wurde der SUMO-Spaltansatz zur Abtrennung aller Verunreinigungen (z.B. SUMO und Ulp1) in einem finalen Reinigungsschritt direkt auf eine Superdex Peptid S30 *prep grade* Chromatographiesäule aufgetragen und in 20 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer eluiert. Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie konnte eine gute Trennleistung für das Peptid und SUMO erzielt (Abb. 3.4 A) und eine Erhöhung der Ausbeute im Vergleich zur RP-HPLC-Reinigung, von 1 mg auf ca. 3 mg pro Liter dYT-Kulturmedium, erreicht werden. PTH (15-34) eluierte bei einem Retentionsvolumen von ca. 190 ml. Während der modifizierten Reinigung mittels Gelfiltration wurden keine Abbauprodukte von PTH (15-34) beobachtet. Die Präparation von einfach- (¹⁵N) und doppelt- (¹⁵N/¹³C) isotoopenmarkiertem PTH (15-34) führte zu Ausbeuten von ca. 1 mg isotoopenmarkiertem Peptid pro eingesetztem Liter M9-Minimalmedium und waren damit ausreichend um eine NMR-spektroskopische Charakterisierung durchzuführen.

Wie zuvor bei PTH (1-84) wurde auch für PTH (15-34) die Expression und der Reinigungsverlauf durch SDS-PAGE kontrolliert (Abb. 3.4 B). Mit Hilfe von massenspektrometrischen Untersuchungen konnte zusätzlich das theoretisch erwartete Molekulargewicht von 2542,9 Da, durch die Detektion von 2542,8 Da, bestätigt und die hohe Reinheit von rekombinanten PTH (15-34) nachgewiesen werden (Abb. 3.4 C). Die Aufnahme eines fern-UV-CD-Spektrums (Abb. 3.4 D) für PTH (15-34) zeigt wie bei PTH (1-84) geringe α -helikale Strukturelemente.

Durch den Einsatz von NMR-Tripelresonanz-Experimenten (HNCA, HNCACB, ¹⁵N-NOESY-HSQC, ¹⁵N-TOCSY-HSQC) konnte eine fast vollständige Zuordnung der Amidprotonenresonanzsignale des Peptidrückrats und der Aminosäureseitenketten für PTH (15-34) im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum erreicht werden (Abb. 3.5). Insgesamt wurden 18 von 19 erwarteten Signalen des Peptidrückgrats detektiert und den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet. Das fehlende Amidprotonenresonanzsignal kann der Aminosäure Asp30 zugeschrieben werden, da diese nicht identifiziert wurde. Durch den chemischen Austausch mit dem Lösungsmittel kann auch hier keine Korrelation für die Start-Aminosäure Leu15 beobachtet werden. Auch die Zuordnung der Kreuzsignale für die Aminosäureseitenketten wurde bis auf Lys26 und Lys27 erreicht. Die hier durchgeführte Expression von PTH (15-34) und die sequentielle Zuordnung der Amidprotonenresonanzsignale ist ein wichtiger Zwischenschritt zur Durchführung von weiterführenden Interaktionsstudien. Mit Hilfe der hier durchgeführten Expressionen konnte reines und

isotopenmarkiertes PTH (15-34) in ausreichenden Mengen für weiterführende NMR-Titrationsexperimente und Strukturuntersuchungen mit der N-terminalen extrazellulären Domäne des PTH-Rezeptor 1 in Kooperation für Mohanraj Gopalswamy (Dissertation in Vorbereitung, Arbeitsgruppe Biophysik, MLU Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt werden.

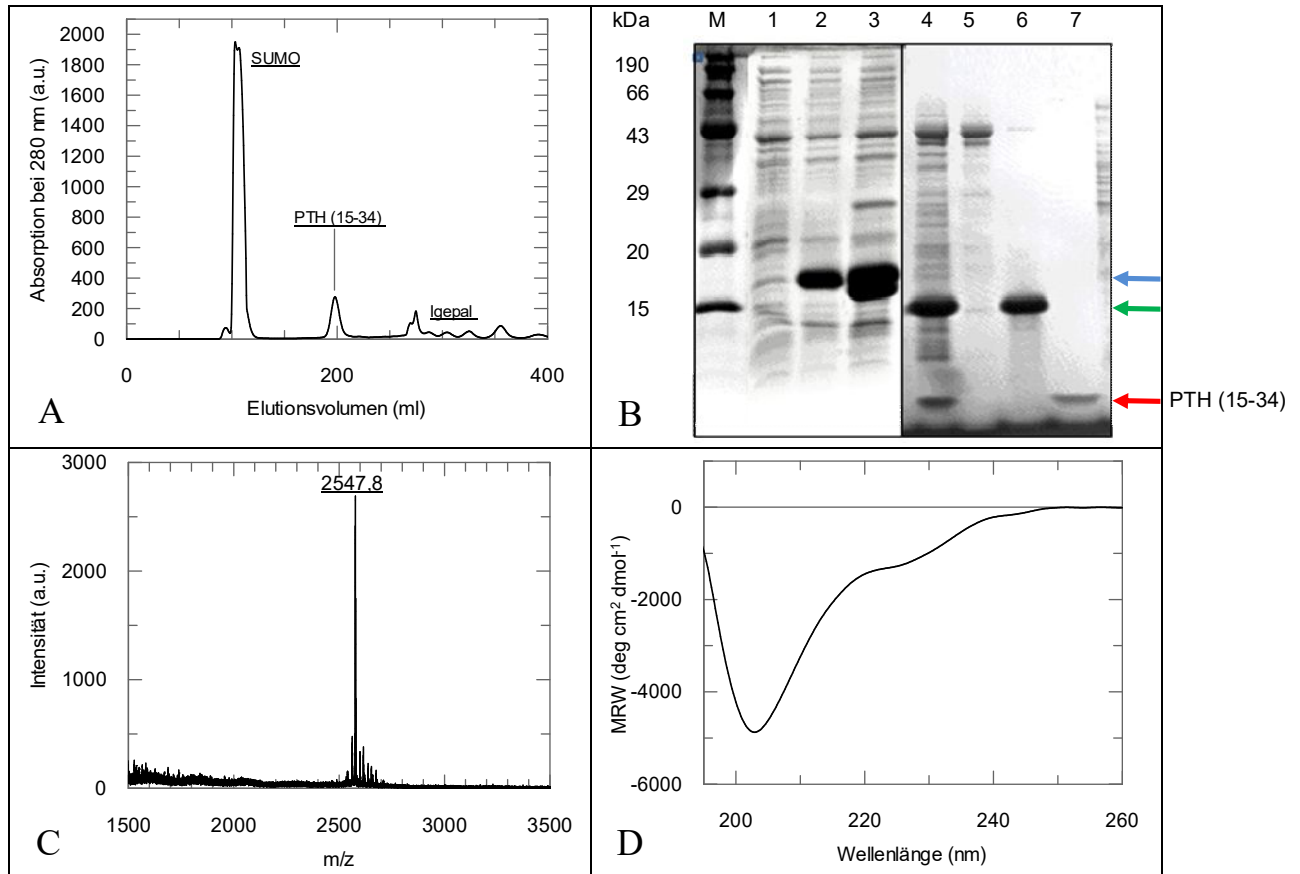


Abbildung 3.4: Reinigung und Charakterisierung von PTH (15-34). **A:** Gelfiltration des PTH (15-34). Zur finalen Reinigung wurde der SUMO-Spaltungsansatz auf Superdex Peptid S30 *prep grade* Chromatographiesäule aufgetragen und in 20 mM NH_4HCO_3 , pH 5,7 und 25 °C eluiert. Die Elutionsfraktionen von 190-205 ml Retentionsvolumen (RV) wurden gesammelt, mit SDS-PAGE und Massenspektrometrie analysiert. SUMO und die SUMO-Protease Ulp1 konnten bei ca. 100 ml RV von PTH (15-34) getrennt werden. **B:** SDS-PAGE der einzelnen Reinigungsschritte. Die Proben Expression und der durchgeführten Reinigungsschritte wurden mittels 4-15%igem Gradientengel und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. M: Protein-Marker, 1: Zelllysat vor Induktion. 2: Zelllysat nach 1 h Induktion. Es ist eine Expressionsbande bei ca. 17 kDa zu erkennen, die dem Fusionsprotein SUMO-PTH (15-34) entspricht (blauer Pfeil). 3: Zelllysat nach 4 h Induktion 4: SUMO-Spaltungsansatz nach 1. IMAC-Reinigungsprozedur. 5: Verdünnter SUMO-Spaltungsansatz. 6: Elutionsfraktion der Gelfiltration zeigt gespaltenes SUMO-Protein (grüner Pfeil). 7: PTH (15-34) Elutionsfraktion der Gelfiltration bei 200 ml RV. Es ist eine einzelne Bande bei ca. 3 kDa zu erkennen, die dem gereinigtem PTH (15-34) entspricht. Die Laufhöhe von PTH (15-34) durch einen roten Pfeil markiert. **C:** MALDI-TOF-Massenspektrum von PTH (15-34). Die theoretische molekulare Masse von 2542,9 Da für monomeres PTH (15-34) konnte detektiert werden. **D:** Fern-UV-CD-Spektrum von PTH (15-34). Die Peptidkonzentration betrug 10 μM . Das Spektrum wurde in 50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaSO_4 , pH 6,5 aufgenommen und 12-fach akkumuliert. Die Messtemperatur betrug 20 °C.

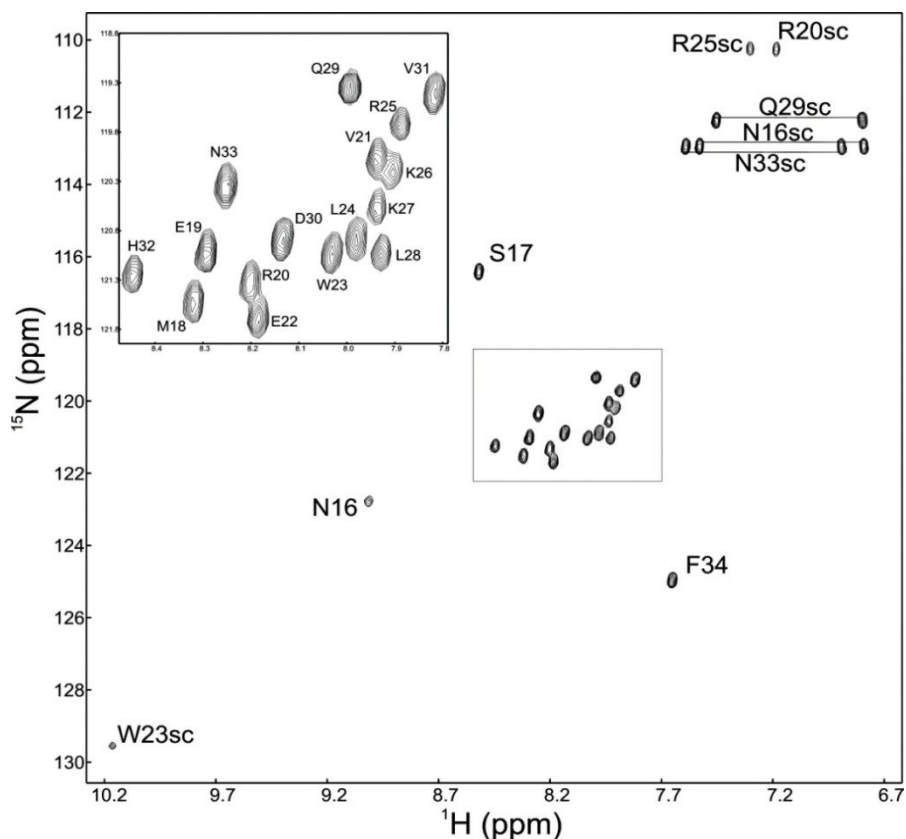


Abbildung 3.5: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von PTH (15-34). Die Messungen erfolgten in 10 mM Bis-Tris, 300 mM Na_2SO_4 , 0,02 % NaN_3 , 10 % D_2O (v/v) bei pH 5,5 und 25°C. Das Spektrum wurde an einem Bruker Avance III 800 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Amidprotonenresonanzsignale der detektierten und identifizierten Aminosäuren sind mit dem Einbuchstabencode der Aminosäuren beschriftet. Für die Aufnahme des Spektrums wurden 350 μM PTH (15-34) verwendet. Das links oben im Spektrum aufgeführte *Inset* zeigt die ausgelösten Amidprotonenresonanzen des Peptidrückgrats.

TIP 39

Auch der natürliche Ligand des humanen PTHR2, das Tuberoinfundibular-Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP 39) wurde mit Hilfe des SUMO-Expressionssystems in un- und isotope markierter Form hergestellt. Die Klonierung der *E. coli* optimierten cDNA von TIP 39 erfolgte wie für die PTH-Peptide beschrieben mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bsa*I und *Bam*HI in den pET-SUMOadapt-Vektor. Für die Expression wurde das Plasmid (Anhang 4, 4.4) ebenfalls in chemisch kompetente BL21(DE3) CodonPlus[®] RIL *E. coli*-Zellen transformiert. Für TIP 39 konnte eine lösliche Expression für un- und isotope markiertes Peptid festgestellt werden (Abb. 3.6 B). Die quantitative Expression zur Gewinnung des TIP-Peptids erfolgte in einer 3 l Hauptkultur bei 4 h Induktion durch IPTG. Typischerweise wurde bei der Expression in dYT-Medium und bei 37 °C eine maximale OD_{600} von 6 erreicht. Das entsprach einer Ausbeute an Zellmaterial von 7 g/l Kulturmedium. Für die Herstellung von isotope markiertem TIP 39 wurde die Expression über Nacht in M9-Minimalmedium und bei 27 °C durchgeführt. Bei dieser Expression konnte eine OD_{600} von 7 erreicht werden, was einer Biofeuchtmasse von 8 g/l Zellkultur entsprach.

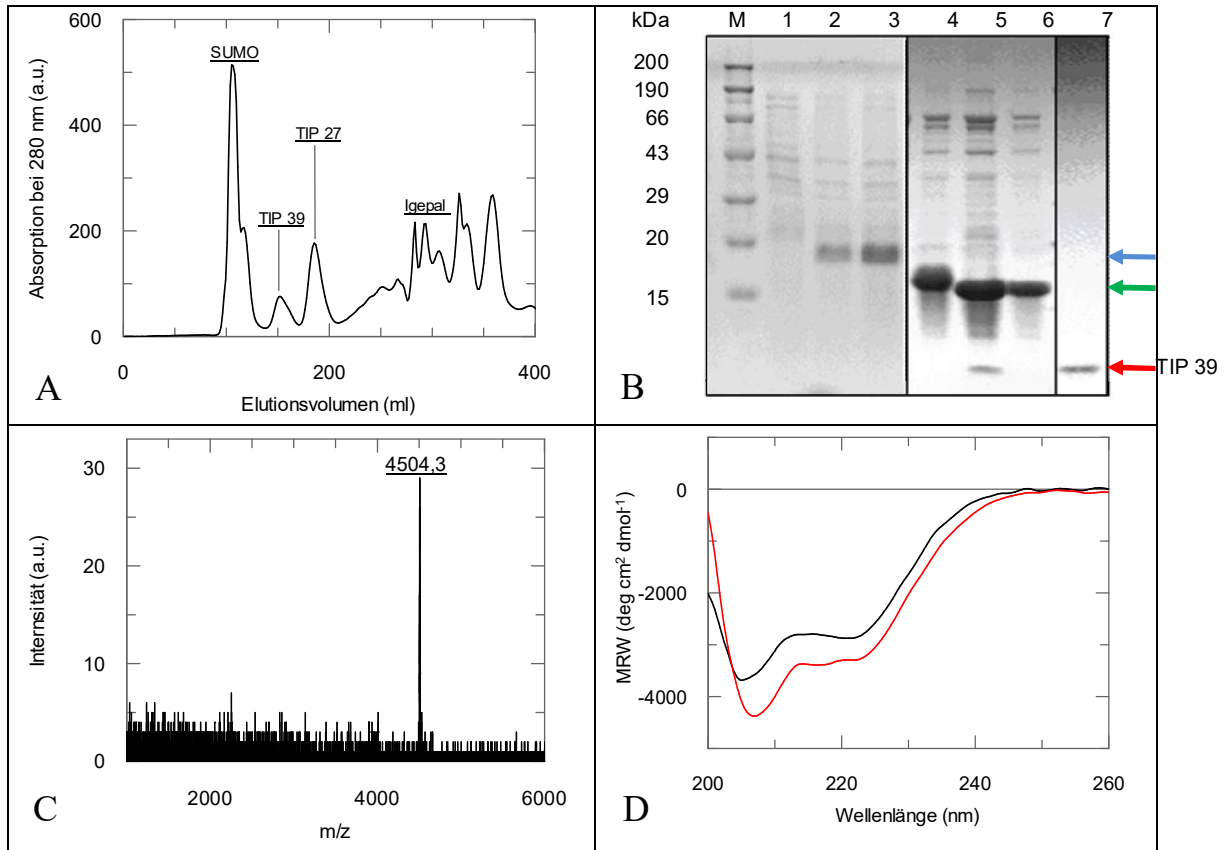


Abbildung 3.6: Reinigung und Charakterisierung von TIP 39. **A:** Gelfiltration des abgespaltenen TIP 39. Zur finalen Reinigung wurde der SUMO-TIP 39 Spaltungsansatz direkt auf eine Superdex Peptid S 30 *prep grade* Chromatographiesäule aufgetragen und in 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M Urea, 0,03 % NaN_3 , 1 mM EDTA bei pH 7,0 und 25 °C eluiert. Die Elutionsfraktionen, die bei einem Retentionsvolumen (RV) von 140-160 ml gesammelt wurden, wurden mit SDS-PAGE und Massenspektrometrie analysiert und anschließend zur Lagerung lyophilisiert. Die Elutionsspitze, die bei 100 ml RV detektiert wurde, entspricht SUMO, Ulp1 und anderen Verunreinigungen. TIP 27 wurde bei einem RV von 175-195 ml beobachtet. Das im SUMO-Spaltungspuffer verwendete Igepal wurde ab ca. 250 ml RV von der Säule gewaschen. **B:** SDS-PAGE der einzelnen Reinigungsschritte. Die Proben der durchgeführten Reinigungsschritte wurden mittels 4 bis 15%igem Gradientengel und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. M: Protein-Marker. 1: Zelllysat vor Induktion. 2: Zelllysat nach 30 min. Induktion. 3: Zelllysat nach 2 h Induktion. 4: Elution des SUMO-Fusionsproteins (blauer Pfeil) nach der 1. IMAC-Reinigung. 5: SUMO-Spaltungsansatz. 6: Elution von SUMO (grüner Pfeil) während der Gelfiltration. 7: TIP 39 Elutionsfraktion während der Gelfiltration bei 150 ml RV. Die Laufhöhe von TIP 39 bei ca. 4,5 kDa ist durch einen roten Pfeil markiert. **C:** MALDI-TOF-Massenspektrum von TIP 39. Die theoretische molekulare Masse von 4504,2 Da für monomeres TIP 39 konnte detektiert werden. **D:** Fern-UV-CD-Spektren von TIP 39. Die Peptidkonzentrationen betragen 10 μM . Es wurde eine Quarzglaszuvette mit 1 cm Schichtdicke verwendet. Die Spektren wurde in 50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaSO_4 , pH 6,0 (schwarz) und in 50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaSO_4 , pH 6,0 mit 100 mM DPC (rot) aufgenommen, 12-fach akkumuliert und um das jeweilige Pufferspektrum korrigiert.

Der Zellaufschluss und die Peptidreinigung für un- und isotonenmarkiertes TIP 39 erfolgte analog zu der für PTH (15-34) beschriebenen Prozedur mit kleinen Abweichungen. Auch hier wurde der SUMO-TIP 39-Spaltungsansatz zur abschließenden Reinigung und zur Abtrennung aller Verunreinigungen direkt auf eine Superdex Peptid S 30 *prep grade* Chromatographiesäule aufgetragen. Als Laufpuffer wurde jedoch in diesem Fall 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M Urea, 0,03 % NaN_3 , 1 mM EDTA und pH 7,0 bei 4 °C verwendet, weil TIP 39 dadurch weniger Aggregation während der

Reinigung zeigte. Mit der hier beschriebenen Methode, unter Verwendung einer Peptid-Gelfiltrationssäule, konnte für TIP 39 eine gute Trennleistung erreicht werden (Chromatogramm, Abb. 3.6 A). Zur Lagerung wurden die gewonnenen TIP 39-Peptidlösungen langsam gegen 20 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer dialysiert, anschließend bei einer Temperatur von -80°C gefroren und dann lyophilisiert. Das aus der Lyophilisation erhaltene Peptidpulver wurde dann bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Trotz des Einsatzes von Proteaseinhibitoren konnte die proteolytische Degradierung von TIP 39 während der Reinigung nicht verhindert werden. So wurde neben TIP 39 auch das verkürzte Fragment TIP (1-27) isoliert (Chromatogramm, Abb. 3.6 A). Die Reinigung und Lagerung von isotopen- und unmarkiertem TIP 39 erfolgte auf die gleiche Weise. Die erhaltenen Ausbeuten an gereinigtem TIP 39 lagen bei ca. 6 mg pro Liter verwendetem dYT-Medium und bei ca. 1,5 mg in isotopenangereichertem ^{15}N und/ oder ^{13}C M9-Minimalmedium.

Auch für die Expression und den Reinigungsverlauf, zur Gewinnung von TIP 39, wurde eine SDS-PAGE-Analyse durchgeführt (Abb. 3.6 B). Die hohe Reinheit und Identität des gereinigten TIP 39 wurde durch massenspektrometrische Untersuchungen bestätigt. Das detektierte Molekulargewicht von 4505,3 Da zeigte eine gute Übereinstimmung mit dem theoretisch erwarteten von 4504,2 Da (Abb. 3.6 C). Die fern-UV-CD-spektroskopische Analyse von humanem TIP 39 in Lösung zeigte strukturelle Homologien zu den untersuchten humanen PTH-Peptiden (Abb. 3.6 D), wobei deutlich mehr Strukturelemente bei TIP 39 vorhanden waren. TIP 39 zeigte ebenfalls kein absolutes und eindeutiges α -helikales CD-Spektrum. In Gegenwart von strukturinduzierenden Substanzen, wie DPC-Micellen, zeigt bovines TIP 39 dennoch einen deutlich größeren Anteil von ca. 85 % α -helikalen Strukturelementen^[150]. Für das in dieser Arbeit rekombinant hergestellte humane TIP 39 wurde in Abwesenheit dieser Chemikalien ein wesentlich geringerer Anteil an α -helikalen Strukturelementen von ca. 55 % identifiziert. Die Aminosäuresequenz von bovinem und humanem TIP 39 ist identisch. Jedoch konnte dieser Anteil durch den Zusatz von 100 mM DPC auf 64 % erhöht werden (Abb. 3.6 C).

Zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung von ^{15}N -isotopenmarkiertem TIP 39 wurden an einem Bruker Avance III 600 MHz-Spektrometer ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren aufgenommen (Abb. 3.7). Das Spektrum zeigt eine für Peptide typische Dispersion im Bereich der chemischen Verschiebung von 7-9 ppm. Von 38 erwarteten Amidprotonenresonanzen konnten 37 Resonanzen von Amidprotonen des Peptidrückgrats detektiert werden. Eine Zuordnung der einzelnen Amidprotonenresonanzsignale muss in Zukunft noch erfolgen. Dennoch lieferte auch die Expression von TIP 39 in Vollmedium und Minimalmedium Milligrammmengen, um in Zukunft weiterführende NMR-Experimente zur Zuordnung der Resonanzsignale des Peptids und Interaktionsstudien zur Identifizierung von Bindungsepitopen mit den Rezeptordomänen des PTH-Rezeptors 1 und 2 durchzuführen.

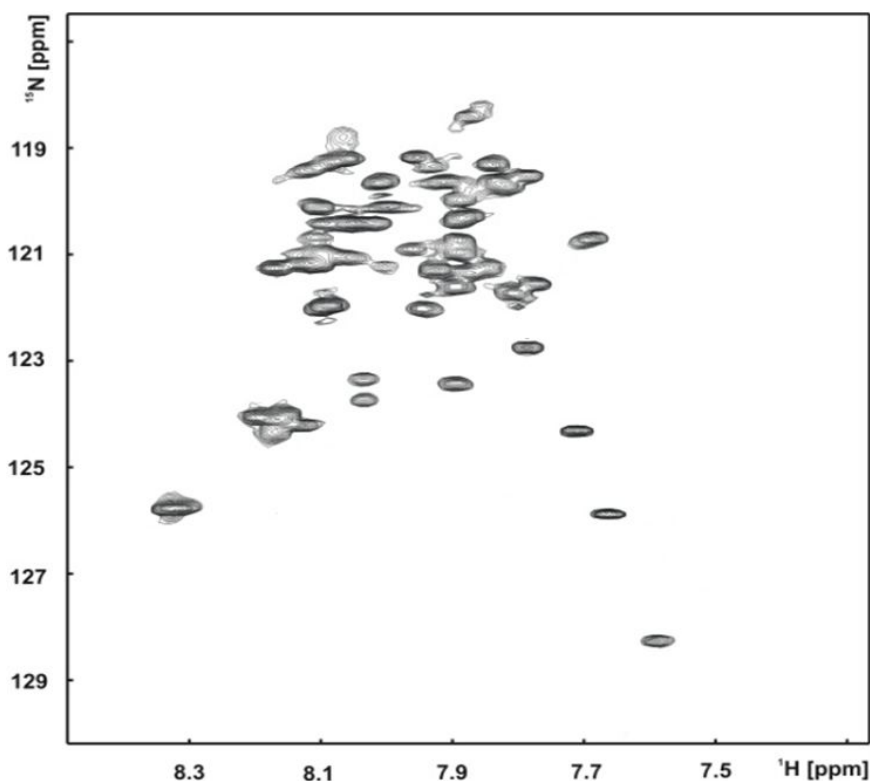


Abbildung 3.7: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von TIP 39. Die Messungen erfolgten in 10 mM Bis-Tris, 300 mM Na_2SO_4 , 0,02 % NaN_3 , 10 % D_2O (v/v) bei pH 6.0 und 25°C. Das Spektrum wurde an einem Bruker Avance III 600 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen. Für die Aufnahme des Spektrums wurden 210 μM TIP 39 verwendet. Im Spektrum dargestellt sind die detektierten Amidprotonenresonanzen des Peptidrückgrats. TIP 39 besitzt eine weitere Resonanzen bei ca. 10 ppm und zwischen 7 und 5,5 ppm, die durch Seitenketten (*side chain*, *sc*) des Trp25 (W25sc) und den fünf Argininresten des TIP 39 ausgelöst werden (hier nicht dargestellt). Eine Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Aminosäuren muss noch erfolgen.

3.2 Phosphorylierung von PTH (1-84)

Das humane Parathormon (PTH) besteht aus 84 Aminosäuren. Dennoch ist hinlänglich bekannt, dass die ersten N-terminalen 34 Aminosäuren des Peptidhormons für eine vollständige Bindung und Aktivierung des PTHR1 und 2 ausreichend sind^[216]. Humanes PTH (1-34) zeigt ein selektives Bindungsverhalten gegenüber den Parathormon-Rezeptoren 1 und 2^[216]. Die endokrinologische Aktivität dieses Peptidhormons besteht in der Regulation des Blutkalziumspiegels und des Knochenmetabolismus durch die Bindung von GPCRs und der nachfolgenden Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Unter physiologischen Bedingungen wird PTH in den Zellen der Nebenschilddrüsen posttranslational phosphoryliert. Der Anteil liegt bei ca. 20 % der Gesamtmenge des Hormons. Der Prozess der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Peptiden oder Proteinen ist ein weit verbreiteter zellulärer Mechanismus^[217], der auch für PTH im Jahr 1984 nachgewiesen werden konnte^[190]. Welche Rolle phosphoryliertes PTH bei intrazellulären Signaltransduktionsprozessen und bei der Bindung und Regulation des PTH-Rezeptors 1 und 2 spielt, ist bis heute nicht geklärt. Mit Hilfe des rekombinant hergestellten humanen PTH (1-84) wurden nachfolgend die Selektivität von PTH (1-84) gegenüber den humanen Parathormon-Rezeptoren 1 und 2 und der Effekt der Phosphorylierung auf die Rezeptoraktivierung und Bindung untersucht.

3.2.1 Charakterisierung von phosphoryliertem PTH (1-84)

Eine spezifische Proteinkinase zur Phosphorylierung von PTH (1-84) ist bis heute nicht bekannt. Zur *in vitro* Phosphorylierung von humanem PTH (1-84) wurde dieses mit einem präparierten Zellysate aus HEK 293-Zellen (*Human Embryonic Kidney*) oder mit einem Extrakt aus Nebenschilddrüsenzellen aus Rinderzellen (Daten nicht gezeigt) für drei Stunden bei 37 °C inkubiert (2.6.1). Die verwendeten Zellysate enthielten eine große Bandbreite an humanen Kinasen, von denen eine möglicherweise PTH (1-84) phosphorylieren kann. Da ein Großteil der Proteinkinasen cAMP-abhängig sind, wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich eine erhöhte Konzentration cAMP und ATP zugesetzt, um eine kovalente Modifikation von PTH (1-84) zu erreichen. Bei dem verwendeten ATP handelte es sich um isopenangereichertes ^{32}P -ATP, was eine hochenergetische β -Strahlung bzw. γ -Strahlung freisetzt, die für eine anschließende autoradiographische Analyse der Phosphorylierung von PTH verwendet wurde.

Autoradiographie

Zur Durchführung der autoradiographischen Analyse wurden die Reaktionsansätze von unbehandeltem und mit entsprechenden Zellysaten behandeltem PTH zuvor einer SDS-PAGE unterzogen (Abb. 3.8 A) und das Gel anschließend getrocknet. Durch das Auflegen eines Röntgenfilms auf das Gel wurden die phosphorylierten Proteine sichtbar gemacht. Die Auswertung der Autoradiographie (Abb. 3.8 B) zeigt eine deutliche Laufbande im erwarteten Größenbereich für phosphoryliertes PTH (1-84) schon nach 30 min. Das Auftauchen der Bande nach 30 min und nach einer Langzeitinkubation von 3 h mit dem Zellextrakt zeigt, dass die Phosphorylierung von PTH (1-84) mit Hilfe der Extrakte aus HEK 293-Zellysate und Nebenschilddrüsenzellen erfolgreich war.

Massenspektrometrie

Die Autoradiographie gibt eine klare Information darüber, dass PTH (1-84) phosphoryliert wurde. Dennoch ist keine Aussage über den Phosphorylierungsgrad möglich. Ob PTH (1-84) durch eine oder mehrere Phosphatgruppen modifiziert wurde, konnte mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie überprüft werden. Dafür wurde ^{15}N -isotopenmarkiertes PTH (1-84) verwendet, was durch die Inkubation mit dem oben genannten Nebenschilddrüsenzellen oder den HEK 293-Zellextrakten inkubiert und dadurch phosphoryliert wurde. Die Isotopenmarkierung war für nachfolgende NMR-spektroskopische Untersuchungen nötig, die zur Identifizierung der phosphorylierten Aminosäuren im PTH-Peptid und zur Bindungsanalyse mit dem PTH-Rezeptor 1 dienen. Als Kontrolle zeigte das unmodifizierte rekombinant exprimierte ^{15}N -PTH (1-84) einen Massenpeak bei 9551,2 Da (Abb. 3.9 A) und entspricht damit dem theoretisch erwarteten von 9549,7 Da. Theoretisch führt die Phosphorylierungsreaktion zu einer Addition von HPO_3 und damit zu einer Massenzunahme von 79,9 Da für jede einzelne Modifikation. Nach einer vollständigen Kinasereaktion (nach 3 h), durch die Inkubation mit HEK 293-Zellysate, konnte für PTH (1-84) ein Massenpeak bei 9792,2 m/z beobachtet werden (Abb. 3.9 B). Diese Masse entspricht dem theoretischen Molekulargewicht (9789,4 Da) eines isotopenmarkierten und phosphorylierten PTH (1-84), welches drei Phosphatgruppen trägt. Auch für die Inkubation mit Nebenschilddrüsenzellextrakt konnte eine dreifache Phosphorylierung von

PTH (1-84) mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

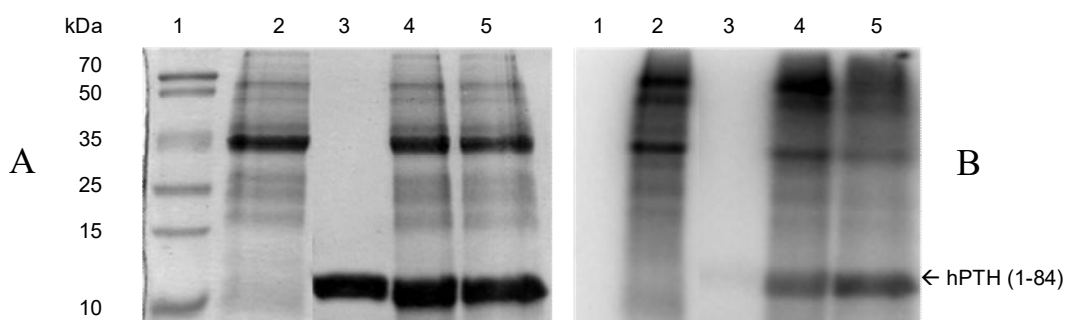


Abbildung 3.8: Phosphorylierung von PTH (1-84). **A:** SDS-PAGE des phosphorylierten PTH (1-84). Die SDS-PAGE wurden mit einem 4-12,5%igem Gradientengel und anschließender Coomassie-Färbung untersucht. Bahn 1: Proteinmarker, 2: HEK 293-Zelllysate, 3: PTH (1-84), 4: 30 min Inkubation von PTH (1-84) mit HEK 293 Zellextrakt, 5: 3 h Inkubation PTH (1-84) und HEK 293-Zellextrakt. **B:** Autoradiographie des SDS-Gels mit den zur Phosphorylierung verwendeten Proben. Auf das SDS-Gel wurde anschließend zur Identifizierung von phosphoryliertem PTH (1-84) ein Röntgenfilm aufgelegt. Durch die hochenergetische Strahlung des ^{32}P wurde der Film an den Stellen geschwärzt, an denen sich Phosphat inkorporierte Proteine und Peptide befanden. Phosphoryliertes PTH (1-84) ist auf dem abgebildeten Röntgenfilm markiert.

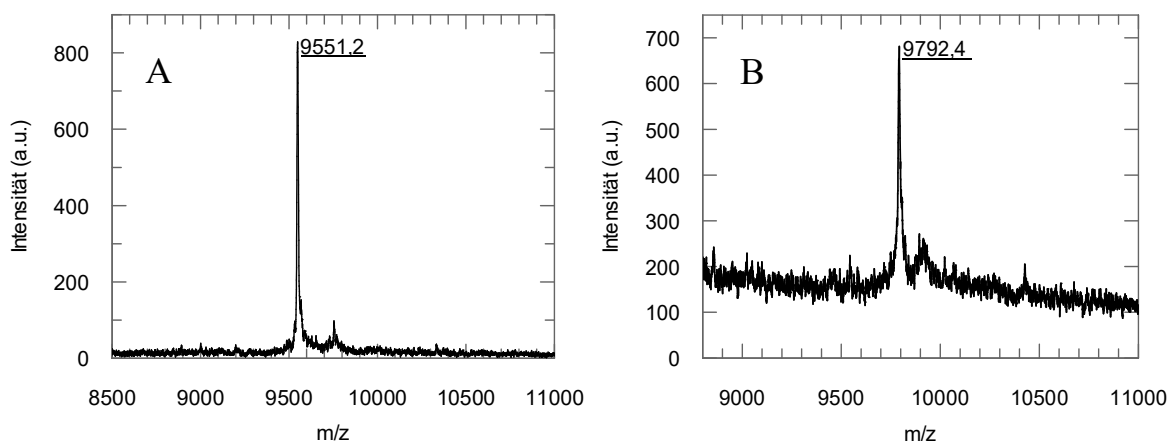


Abbildung 3.9: Massenspektrometrische Analyse der PTH (1-84) Phosphorylierung. **A:** MALDI-TOF-Massenspektrum des rekombinant exprimierten, gereinigten und isotopenmarkierten humanen ^{15}N -PTH (1-84) vor der Inkubation mit dem HEK 293-Zelllysate. Das theoretische und erwartete Molekulargewicht für ^{15}N -PTH (1-84) von 9549,7 Da konnte im Massenspektrum mit 9551,2 Da detektiert und dadurch bestätigt werden. **B:** MALDI-TOF-Massenspektrum von ^{15}N -PTH (1-84) nach dreistündiger Inkubation mit HEK 293-Zellextrakt. Nach der Kinasereaktion konnte für modifiziertes ^{15}N -PTH (1-84) eine molekulare Masse von 9792,2 Da bestimmt werden, was dem theoretischen Molekulargewicht von 9789,4 Da für 3-fach phosphoryliertes ^{15}N -PTH (1-84) entspricht.

NMR-Spektroskopie

Humanes PTH (1-84) besitzt sieben Serinreste in seiner Aminosäuresequenz. Welche der sieben Serine phosphoryliert waren, konnte durch die Aufnahme von ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren aufgeklärt werden. Durch einen Vergleich der Spektren des un- und phosphorylierten Zustands von PTH (1-84) konnten die N-terminal ständigen Aminosäuren Ser1, Ser3 und Ser17 als Phosphorylierungstellen in PTH (1-84) identifiziert, während die restlichen vier Serine (Ser48, Ser62, Ser66 und Ser83) keine Modifikationen zeigten^[185]. Zusätzlich wurde für einige benachbarte Aminosäuren der N-terminal phosphorylierten

Serine eine Änderung ihrer chemischen Verschiebung beobachtet^[185]. Analog zu früheren NMR-basierten PTH-Rezeptor 1 Bindungsstudien^[179] wurde mit der Aufnahme von ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren (Abb. 3.10) die Bindungskompetenz des phosphorylierten und des unphosphorylierten PTH (1-84) am Rezeptor untersucht. In beiden Fällen zeigte humanes PTH (1-84) eine Bindung gegenüber der extrazellulären Domäne des PTH-Rezeptors 1^[185].

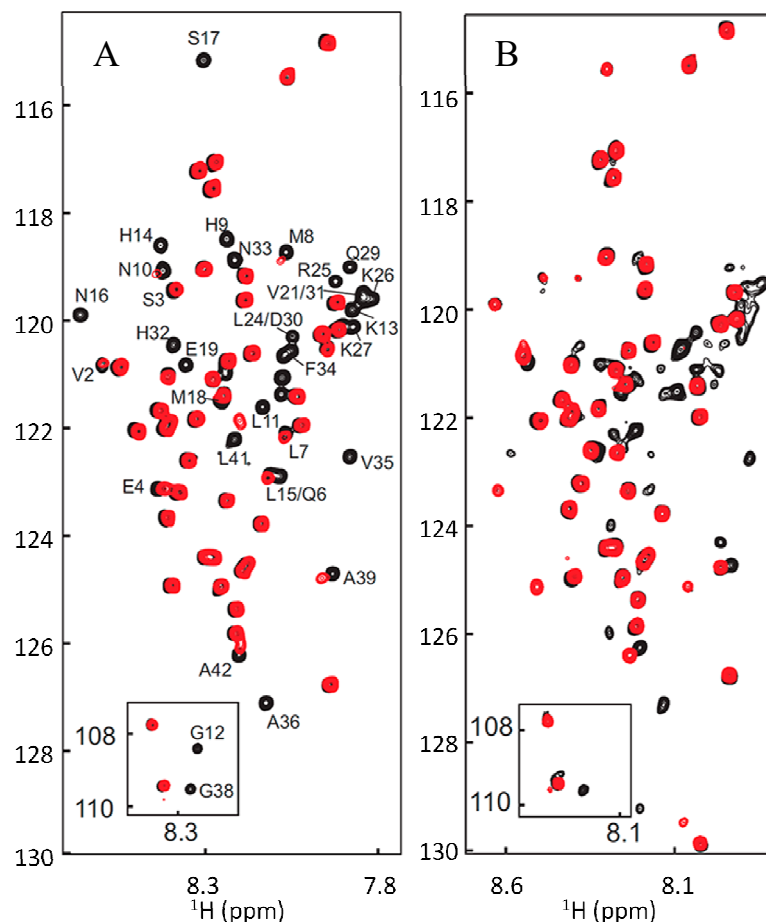


Abbildung 3.10: Bindungsanalyse von phosphoryliertem PTH (1-84) mit der extrazellulären Domäne des PTHR1. A: Zeigt die Überlagerung des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums von PTH (1-84) allein (schwarz) und in Gegenwart von ECD-PTHR1 (rot). B: Zeigt die Überlagerung des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums des phosphorylierten PTH (1-84) allein (schwarz) und in Gegenwart von ECD-PTHR1 (rot). Die Messungen erfolgten in 10 mM Bis-Tris, 300 mM Na_2SO_4 , 0,02 % NaN_3 , 10 % D_2O (v/v) bei pH 5,5 und 25°C. Die Spektren wurden an einem Bruker Avance III 800 MHz NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Amidprotonenresonanzsignale der detektierten und identifizierten Aminosäuren sind mit dem Einbuchstaben-code der Aminosäuren beschriftet. Das links unten im Spektrum aufgeführte *Inset* zeigt die ausgelösten Amidprotonenresonanzen der Glycinreste. Die Aufnahme der Spektren erfolgte freundlicherweise durch M. Gopalswamy (Arbeitsgruppe Biophysik, MLU Halle-Wittenberg).

3.2.2 Signaltransduktion des phosphorylierten PTH (1-84)

Zur Charakterisierung der zellulären Funktion von PTH (1-84) wurde untersucht, welchen Einfluss unphosphoryliertes und phosphoryliertes PTH (1-84) auf die Initiierung von cAMP-Signalkaskaden nehmen kann. Dafür wurden cAMP-Akkumulationsassays (2.6.2) durchgeführt. Zur Analyse der cAMP-Akkumulation, nach einer PTH (1-84) ausgelösten Stimulation, wurden gentechnisch modifizierte HEK 293-Zelllinien verwendet, die den

PTH-Rezeptor 1 oder PTH-Rezeptor 2 auf ihrer Zelloberfläche exprimierten^[218]. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

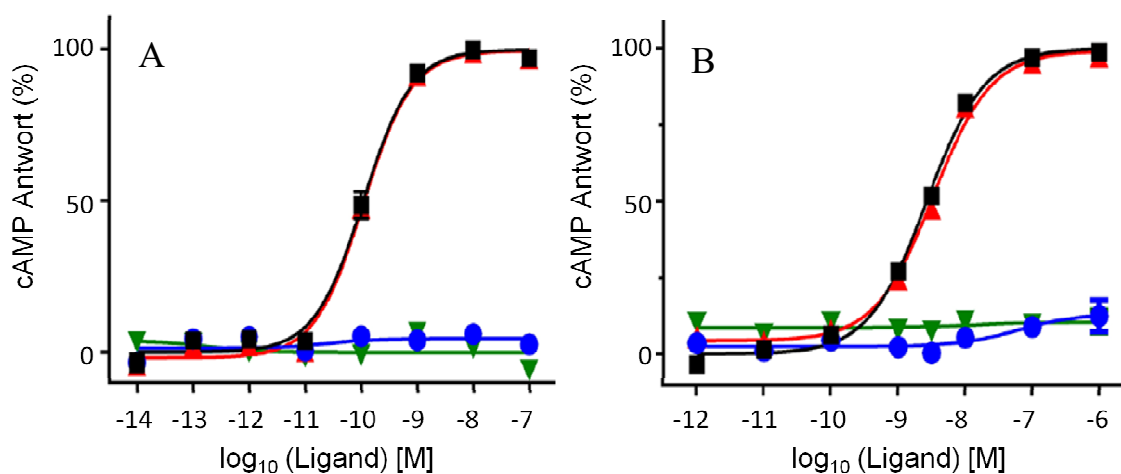


Abbildung 3.11: PTH (1-84) induzierte cAMP-Akkumulation in PTHR1 (A) und PTHR2 (B) exprimierenden HEK 293-Zellen. Schwarzes Quadrat: PTH (1-84), blauer Kreis: phosphoryliertes PTH (1-84), rotes Dreieck: dephosphoryliertes PTH (1-84), grünes Dreieck: HEK 293-Zellextrakt. Die Symbole ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehler werden durch Fehlerbalken angezeigt. Die erhaltenen Werte wurden als maximale Antwort von PTH (1-84) auf 100 % normiert. Die Messungen wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dan Donnelly von Dr. Clara Wishart durchgeführt (*School of Biomedical Sciences, Universität Leeds, UK*).

Die Auswertung der cAMP-Akkumulationsassays zeigt eine Aktivierung von PTHR1 und PTHR2 in Gegenwart von unmodifiziertem PTH (1-84). Es kommt zu einer konzentrationsabhängigen cAMP-Anreicherung in den Zellen (Abb. 3.11 A und B, schwarz)^[185]. Dieses Ergebnis bestätigt damit frühere Experimente zur Aktivierung des PTHR1^[98]. Gleichzeitig konnte auch erstmals für humanes PTH (1-84) gezeigt werden, dass es eine biologische Funktion gegenüber dem PTHR2 besitzt und diesen aktivieren kann. Die Ermittlung des pEC₅₀ aus der zellulären cAMP-Produktion für die einzelnen Reaktionen zeigte eine höhere Potenz von PTH (1-84) gegenüber dem PTHR1 (pEC₅₀ = 9,89 ± 0,09) im Vergleich zum PTHR2 (pEC₅₀ = 8,50 ± 0,13). PTH (1-84) besaß somit eine größere Selektivität für den PTHR1. Nachfolgend wurde untersucht, wie die cAMP-Bildung durch phosphoryliertes PTH (1-84) beeinflusst wird. Interessanterweise führt die Verwendung von phosphoryliertem PTH (1-84) fast zur vollständigen Inaktivierung des PTHR1 und PTHR2^[185]. In beiden Fällen war die cAMP-Akkumulation weitestgehend unterdrückt (Abb. 3.11 A und B, blau). Die cAMP-Produktion lag im Bereich von 5-7 % im Vergleich zur vollwertigen cAMP-Antwort, die durch funktionales und unphosphoryliertes PTH (1-84) ausgelöst wurde. Diese geringe cAMP-Bildung wurde auch in Kontrollexperimenten beobachtet, bei denen statt PTH (1-84) nur ein HEK 293-Zelllysat zu den rezeptor-exprimierenden Zelllinien gegeben wurde (Abb. 3.11 A und B, grün). Die geringe cAMP-Akkumulation ist auf die basale Aktivität der PTH-Rezeptoren zurückzuführen, wie sie auch bei anderen GPCRs vorhanden ist^[85]. Die hier untersuchte Aktivierung der PTH-Rezeptoren 1 und 2 durch humanes PTH (1-84) erfolgte also spezifisch. Der cAMP-Akkumulationsassay wurde auch mit dephosphoryliertem PTH (1-84) durchgeführt. Die Abspaltung der Phosphatgruppen erfolgte durch den Einsatz einer alkalischen Phosphatase gegenüber dem phosphoryliertem PTH (1-84). Mit dieser Remodifizierung von PTH (1-84)

konnte die biologische Aktivität von PTH (1-84) vollkommen wiederhergestellt und die Reversibilität der Phosphorylierungsreaktion gezeigt werden (Abb. 3.11 A und B, rot). Die Ermittlung der PTH-induzierten pEC_{50} -Werte, für diesen Fall, lieferte vergleichbare Ergebnisse ($pEC_{50} = 9,97 \pm 0,08$ für PTHR1 und $pEC_{50} = 8,56 \pm 0,13$ für PTHR2) wie zuvor für unmodifiziertes PTH (1-84). Humanes PTH (1-84) wird wahrscheinlich durch die Phosphorylierung inaktiviert und kann deshalb nicht die Aktivierung des PTHR1 und PTHR2 auslösen.

3.3 Rekombinante Herstellung und Charakterisierung von humanem ECD-PTHR1

Für die geplanten Untersuchungen der strukturellen Beschaffenheit der extrazellulären N-terminalen Domäne des PTHR1 (ECD-PTHR1) musste ECD-PTHR1 in ausreichenden Mengen unmarkiert, sowie isotonenmarkiert exprimiert und gereinigt werden. Bei der N-terminalen Domäne handelte es sich um das extrazelluläre Fragment, ausgehend von der Aminosäure Tyr23 bis Ile191 des PTH-Rezeptors 1. Die Reinigung von ECD-PTHR1 erfolgte mit einigen Modifikationen nach der Methode von Grauschopf *et al.*^[67]. Die strukturelle Integrität wurde durch spektroskopische Untersuchungen bestätigt und die Funktionalität durch Interaktionsstudien mit dem Agonisten PTH (1-84) und den Antagonisten TIP (7-39) und TIP 39 charakterisiert.

3.3.1 Expression, Reinigung und Rückfaltung von ECD-PTHR1

Das Gen von ECD-PTHR1 wurde durch Klonieren in den pET 15b-Expressionsvektor inseriert (Dr. Christine Magg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg). Der zur Verfügung gestellte Vektor kodiert für das extrazelluläre Rezeptorfragment mit N-terminalem His₆-Tag und steht unter T7-Promotorkontrolle. Das Plasmid wurde zur Expression in chemisch kompetente BL21(DE3) CodonPlus[®] RIL *E. coli*-Zellen transformiert, die dann in einer 4 l *fed-batch* Fermentation angezogen wurden. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 12-14 kultiviert und anschließend die Biosynthese von ECD-PTHR1 durch die Aktivierung des T7-Promotors mit IPTG induziert. Nach 4,5 h und einer OD₆₀₀ von 18 wurde mit der Zellernte begonnen. Es konnten 72 g Zellen Feuchtwicht geerntet werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Überexpression von ECD-PTHR1 und disulfidbrückenhaltiger Proteine im Zytoplasma von *E. coli* zur Aggregation und Entstehung von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*, *IBs*) führt^[67-69, 165]. Auch in diesem Fall wurde ECD-PTHR1 in Form von *IBs* exprimiert. Die Isolation und Reinigung der *IBs* erfolgte nach der Methode von Rudolph und Lilie *et al.*^[202]. Es konnten 7,0 g *IBs* gewonnen werden, das entspricht einer Ausbeute von ca. 10 %, bezogen auf die gesamte Zellfeuchtmasse. Anschließend wurden die *IBs* von ECD-PTHR1 solubilisiert und unter denaturierenden Bedingungen mittels IMAC gereinigt. Nach diesem ersten Reinigungsschritt wurden 350 mg denaturierte ECD-PTHR1 erhalten. Da ECD-PTHR1 in einem entfalteten Zustand vorlag, wurde es durch Pulsrenaturierung in Rückfaltungspuffer (Kapitel 2.4.6) in einen gefalteten Zustand überführt. Zur Abtrennung falsch- und ungefalteter Proteinspezies wurde für das renaturierte Protein eine Ammoniumsulfatpräzipitation durchgeführt und der Rückfaltungsansatz anschließend mittels HIC gereinigt. Im finalen Reinigungsschritt wurde ECD-PTHR1 durch Größenausschluss-

chromatographie von letzten Aggregaten, Oligomeren und Verunreinigungen getrennt. Die Ausbeute an homogenem gereinigtem Protein aus einer Fermentation betrug 105 mg. Das entspricht 30 %, bezogen auf die zur Proteinrückfaltung eingesetzte Proteinmenge und liegt damit in einer für die Herstellung von ECD-PTHr1 typischen Größenordnung^[1, 67]. Mit Hilfe einer SDS-PAGE-Analyse (Abb. 3.12 B) wurde die Überexpression von ECD-PTHr1 und der Verlauf der einzelnen Reinigungsschritte, sowie die Reinheit von ECD-PTHr1 überprüft. Das durch analytische Gelchromatographie erhaltene Elutionsprofil zeigt eine homogene Elutionsspitze für monomeres ECD-PTHr1 (Abb. 3.12 A). Mit Hilfe eines tryptischen Verdauens und N-terminaler Proteinsequenzierung konnte die Identität von ECD-PTHr1 durch eine massenspektrometrische Analyse nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Analyse wurde freundlicherweise von Frau Dr. Angelika Schierhorn (MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

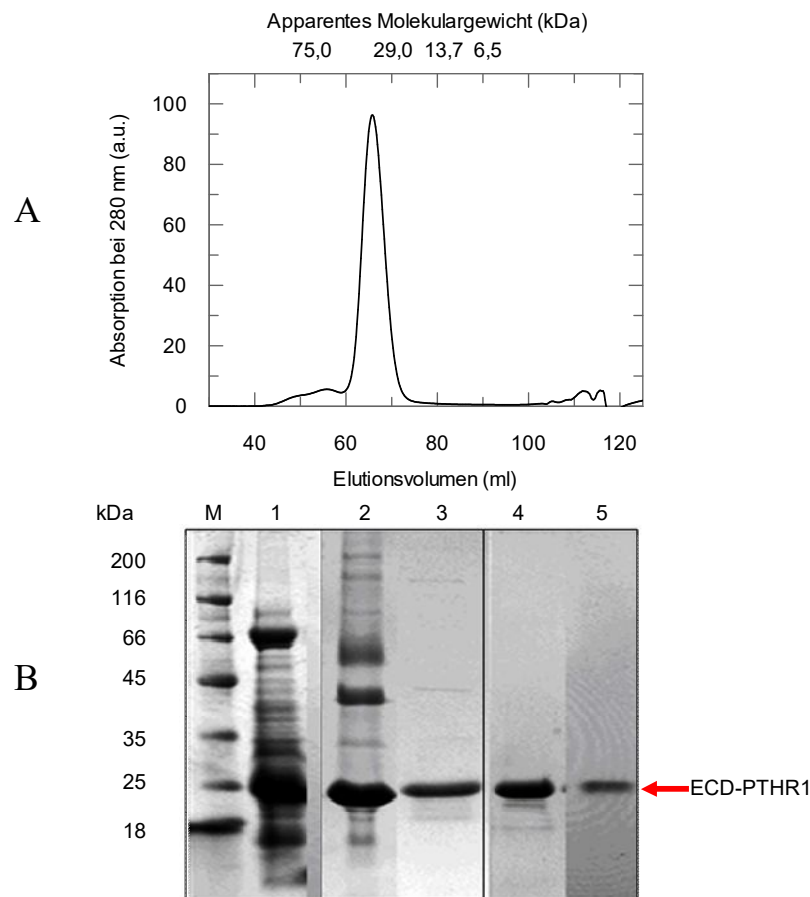


Abbildung 3.12: Reinigung von ECD-PTHr1. **A:** Größenausschlusschromatographie von ECD-PTHr1. Die Elutionsspitze, bei einem Retentionsvolumen von 70 ml, enthielt ECD-PTHr1. Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris/HCl, 300 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit pH 8,0 und 1 mM EDTA verwendet. Zur Bestimmung der apparenten Molekularmasse wurde die Säule mit Standardproteinen (GE *Healthcare*, Uppsala, S) kalibriert. **B:** SDS-PAGE-Analyse der Reinigungsschritte. Von jedem Reinigungsschritt wurden Proteinproben auf ein 4-12,5%iges Gradientengel aufgetragen und anschließend durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. M: Proteinmarker, 1: gereinigte und solubilisierte *inclusion bodies*, 2: Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen mittels IMAC 3: aufkonzentrierter Rückfaltungsansatz, 4: Proteinreinigung durch HIC, 5: Proteinreinigung durch Gelfiltration mittels selbst gepackter Superdex S 75 *prep grade* Chromatographiesäule. Die Laufhöhe von ECD-PTHr1 ist im Gel durch einen roten Pfeil markiert.

Entsprechend der beschriebenen Prozedur zur Gewinnung von ECD-PTHRI wurde auch ^{15}N -isotopenmarkiertes ECD-PTHRI exprimiert, renaturiert und gereinigt. Die Expression erfolgte weitestgehend analog zur unmarkierten Domäne mit kleinen Modifikationen wie z.B. die Verwendung von M9-Minimalmedium und dem Wachstum im Schüttelkolben mit Schikanen. Auf diese Weise konnten aus einem Liter *E. coli*-Zellkultur, durch Reinigung und Rückfaltung, 9 mg homogenes ^{15}N -isotopenmarkiertes ECD-PTHRI gewonnen werden. Das entspricht einer Ausbeute von 24 %, bezogen auf die zur Proteinrückfaltung eingesetzte Proteinmenge und zeigt, dass die Renaturierungsausbeuten von unmarkiertem und isotopenmarkiertem ECD-PTHRI vergleichbar sind. Das markierte Protein wurde für NMR-spektroskopische Analysen im Komplex mit dem humanen PTH (1-84) verwendet.

3.3.2 Strukturelle Charakterisierung von ECD-PTHRI

Um die renaturierte und gereinigte N-terminale Domäne des PTHRI für Bindungsstudien und NMR-Experimente nutzen zu können, musste sie zunächst auf ihre strukturelle und funktionelle Beschaffenheit überprüft werden. Mit Hilfe von Circular dichroismus (CD) und Fluoreszenzspektroskopie konnten Vergleichsdaten gewonnen werden, die eine native Konformation^[67] von ECD-PTHRI bestätigen. Sie werden deshalb kurz zusammengefasst:

Fern-UV-CD-spektroskopische Untersuchung von ECD-PTHRI

Zur Analyse der Sekundärstruktur des renaturierten ECD-PTHRI wurden fern-UV-CD-Spektren für das renaturierte und denaturierte Protein aufgenommen. In Abbildung 3.13 ist das Ergebnis der CD-spektroskopischen Analyse gezeigt. Für ECD-PTHRI im nativen Zustand sind ein Hauptminimum bei 204 nm und ein zweites, lokales Minimum bei 225 nm zu erkennen, die auf eine partielle α -helikale Struktur hinweisen. Eine quantitative Auswertung des nativen CD-Spektrums, hinsichtlich des Sekundärstrukturgehalts, erfolgte mit dem Programm CDPro/ CONTINLL und lieferte eine Zusammensetzung aus 33 % α -helikalem Anteil und 21 % Faltblattstruktur. Das fern-UV-CD-Spektrum des denaturierten ECD-PTHRI lieferte im Vergleich zum nativen, ein Spektrum, wie es für vollständig entfaltete Proteine erwartet wurde. Die hier ermittelten Strukturanteile für ECD-PTHRI liegen in einer vergleichbaren Größenordnung mit den bekannten Literaturwerten für Klasse B GPCR-Ectodomänen und ECD-PTHRI^[67, 68]. Das CD-Spektrum wurde in seiner Ausprägung erwartet, weil auch die Röntgenkristallstruktur von ECD-PTHRI einen dreischichtigen Aufbau mit zwei α -Helices, vier β -Faltblattstrukturen und langen ungeordneten Bereichen zeigt^[78].

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von ECD-PTHRI

Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie wurden weitere Informationen über die Konformation von ECD-PTHRI gewonnen. Die Fluoreszenzspektroskopie erlaubt Aussagen über die Lösungsmittelexposition von Tryptophanen und Tyrosinen. Ergeben sich deutliche Unterschiede in den Emissionsmaxima und Fluoreszenzintensität von nativer und denaturierter ECD-PTHRI, kann davon ausgegangen werden, dass die aromatischen Aminosäuren unterschiedlich im Lösungsmittel exponiert vorliegen. Die unterschiedliche Exposition der Aminosäuren bei verschiedenen Bedingungen ist somit ein guter Nachweis für eine ausgeprägte Tertiärstruktur des untersuchten Proteins. Das Ergebnis für die Aufnahme von Fluoreszenzspektren unter nativen und denaturierenden

Bedingungen von ECD-PTH_{R1} ist in Abbildung 3.14 gezeigt. Es erfolgte eine Anregung von Tyrosin- und Tryptophanresten bei 280 nm und von Tryptophanen alleine bei 295 nm. In beiden Fällen konnte eine bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums von ca. 340 nm im nativen auf ca. 350 nm im entfalteten Zustand beobachtet werden. Die Verschiebung des Emissionsmaximums ist auch mit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität unter denaturierenden Bedingungen für ECD-PTH_{R1} verbunden. Mit diesem Nachweis kann von einer ausgeprägten Tertiärstruktur der N-terminalen Domäne gesprochen werden.

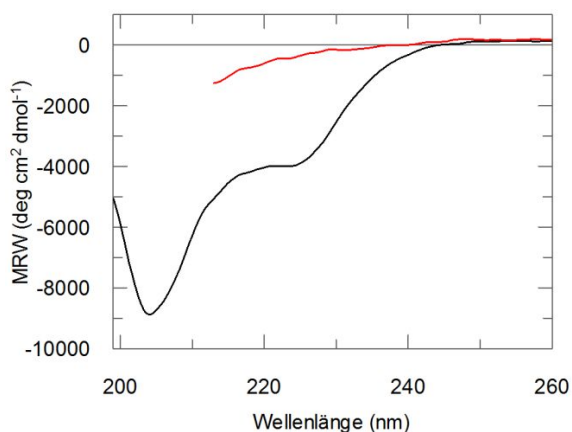


Abbildung 3.13: Fern-UV-CD-Spektrum des rekombinanten ECD-PTH_{R1}. Das native Spektrum (schwarz) wurde in 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA und pH 8,0 aufgenommen, 12-fach akkumuliert und um den Beitrag des Pufferspektrums korrigiert. Die Aufnahme im denaturierten Zustand (rot) erfolgte in Gegenwart von 6 M GdmCl. Für die Spektrenaufnahme wurde eine 1 cm Quarzglasküvette verwendet. Die Aufnahmen wurden bei 20 °C durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 15 µM ECD-PTH_{R1}.

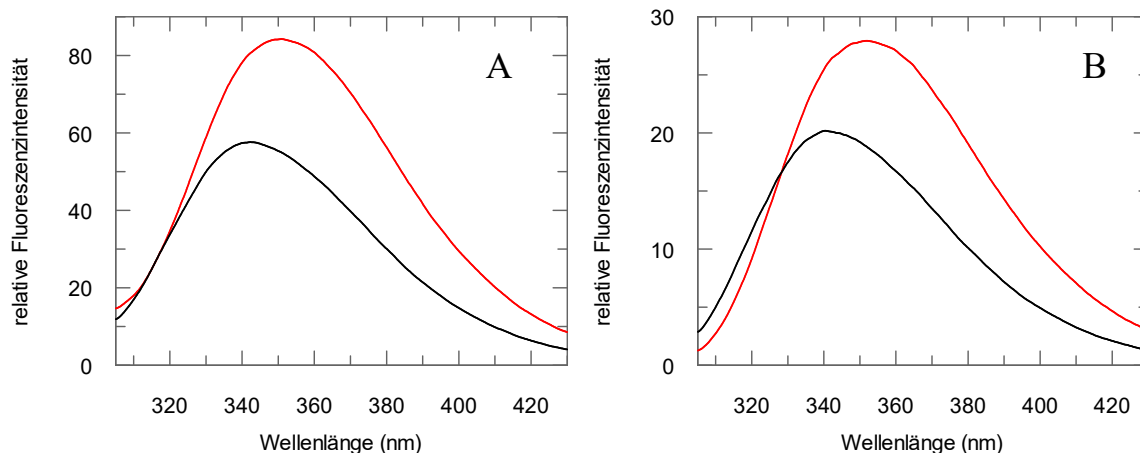


Abbildung 3.14: Fluoreszenzemissionsspektren des rekombinanten ECD-PTH_{R1}. Das native Spektrum wurde in 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA und pH 8,0 aufgenommen, 3-fach akkumuliert und um den Beitrag des Pufferspektrums korrigiert (schwarz). Die Aufnahme des Spektrums des denaturierten ECD-PTH_{R1} erfolgte in Gegenwart von 6 M GdmCl (rot). Auch diese Spektren wurden um den Pufferbeitrag korrigiert. **A:** Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. **B:** Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm. Für die Spektrenaufnahme wurde eine 1 cm Quarzglasküvette verwendet. Die Aufnahmen wurden bei 20 °C durchgeführt und die Proteinkonzentration betrug 1 µM ECD-PTH_{R1}.

3.3.3 Bestimmung der Affinitäten des PTH (1-84)-Agonisten und TIP-Antagonisten zur ECD-PTH_{R1}

Bindung des natürlichen Agonisten PTH(1-84)

Mit der Durchführung der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) wurde die Bindung des rekombinant hergestellten freien humanen Liganden PTH (1-84) an ECD-PTH_{R1} qualitativ und quantitativ untersucht. Es sollte damit der Nachweis für eine funktionale und native Proteindomäne erbracht und erstmals die Bindungskonstante für diese Interaktion *in vitro* bestimmt werden. Die Abb. 3.15 zeigt das computergestützte Ergebnis des Titrations-

experiments von ECD-PTHR1 mit PTH (1-84) bei 20 °C. Für die ITC-Messung wurden 25 μM ECD-PTHR1 in der Messzelle vorgelegt und PTH (1-84) mit einer Gesamtkonzentration von 280 μM schrittweise hinzu titriert.

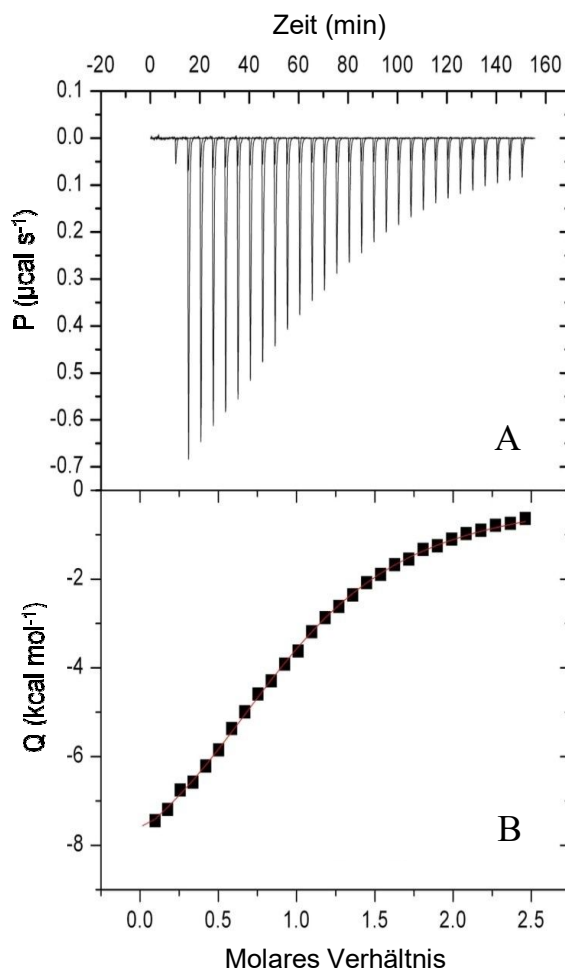


Abbildung 3.15: Isotherme Titrationskalorimetrie von ECD-PTHR1 und PTH (1-84). 280 μM PTH (1-84) wurde stufenweise über 28 Injektionen zu je 10 μl in die 25 μM ECD-PTHR1-Proteinlösung titriert. Das Protein und der PTH-Ligand wurden vor der Messung im selben Messpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl , pH 8,0) dialysiert, um Verdünnungswärmeeffekte während der Messung zu minimieren. Die ITC-Titration wurde bei 20 °C durchgeführt. **A:** Zeigt die elektronische Kompensationsleistung $\mu\text{cal/s}$ in Abhängigkeit von der Zeit in min. Es ist die Heizleistung, die benötigt wird, um die Temperatur zwischen Referenzzelle und Messzelle des ITC-Geräts nach jeder erfolgten Injektion des PTH-Liganden konstant zu halten. **B:** Auf der Ordinate ist die integrierte und um die Verdünnungswärme korrigierte Wärmemenge Q in kcal/mol des Liganden in Abhängigkeit vom molaren Rezeptor/Ligand-Verhältnis aufgetragen.

Aus dem Verlauf der elektronischen Kompensationsleistung, die zur Aufrechterhaltung von isothermen Versuchsbedingungen nötig ist, konnte man einen exothermen Verlauf der Reaktion für die Bindung zwischen ECD-PTHR1 und PTH (1-84) beobachten. Die Auswertung der Messdaten ergab eine Dissoziationskonstante (K_D) von $7,46 \pm 0,21 \mu\text{M}$. Mit der Messung der ausgetauschten Wärmemenge bei einer Interaktion ist es außerdem möglich, neben den Affinitäten weitere thermodynamische Parameter (freie Reaktionsenthalpie ΔG , Bindungsenthalpie ΔH und Bindungsentropie ΔS) zu bestimmen^[209], welche die Interaktionsreaktion beschreiben. Die Änderung der apparenten Bindungsenthalpie ΔH von $-9,78 \pm 0,10 \text{ kcal mol}^{-1}$ und die Entwicklung einer exothermen Reaktion zeigen, dass die Reaktion enthalpiegetrieben ist. Durch die negative Änderung der Bindungsentropie ΔS von $-9,91 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ist auch anzunehmen, dass einer oder beide Bindungspartner in der Zahl der thermisch zugänglichen Zustände eingeschränkt und/ oder Wassermoleküle an der Komplexbildung beteiligt sind^[67]. Die Stöchiometrie (N) der Bindung zeigt mit einem Wert von $0,99 \pm 0,007$ eine gute Übereinstimmung mit einem 1:1-Bindungsmodell. Das heißt, dass jedes Ligandmolekül an ein Rezeptormolekül gebunden hat und keine inaktiven Teilpopulationen in der Proteinlösung enthalten waren. Die freie Reaktionsenthalpie ΔG kann aus der thermodynamischen Gibbs-Helmholz-Gleichung hergeleitet werden, welche die Zusammensetzung der freien Enthalpie aus den beiden energetischen Komponenten der Bindungsenthalpie und Entropie mit $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$ beschreibt. Die hier ermittelte freie

Enthalpie für die Bindungsreaktion von ECD-PTHR1 und dem Liganden PTH (1-84) betrug $-6,87 \pm 0,10 \text{ kcal mol}^{-1}$. Um die Verdünnungswärme, die bei der Titration entsteht, in der Bindung beider Partner zu berücksichtigen, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Dafür wurde PTH (1-84) in Puffer titriert und der entstandene Wärmeumsatz von der Bindungsmessung abgezogen. Das durchgeführte ITC-Experiment bestätigte, dass ECD-PTHR1 in der Lage war, rekombinant hergestelltes humanes PTH (1-84) zu binden. Eine weitere unabhängige Methode zur Untersuchung der Bindungsreaktion von humanem ECD-PTHR1 sind Fluoreszenzmessung und Fluoreszenztitration. Mit diesen Experimenten ist ebenfalls eine Bestimmung von Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für die Komplexierung von ECD-PTHR1 mit PTH (1-84) möglich. In Abb. 3.16 ist die Titration von ECD-PTHR1 mit PTH (1-84) gezeigt. Für die Titration wurde $0,5 \mu\text{M}$ Rezeptordomäne in der Fluoreszenzküvette bis zur Einstellung eines stabilen Fluoreszenzsignals vorinkubiert und anschließend der Ligand schrittweise hinzu titriert. Unter den gewählten Bedingungen konnte eine Abnahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration bis zur Sättigung beobachtet werden. Bei weiterer Zugabe des Liganden über den Sättigungsbereich hinaus, erfolgte eine lineare Zunahme des Fluoreszenzsignals, ausgelöst durch die Eigenfluoreszenz des freien Liganden. In Kontrollexperimenten ohne Rezeptordomäne konnte die lineare Abhängigkeit der intrinsischen Ligandenfluoreszenz bei ansteigender Ligandenkonzentration gezeigt werden (Anhang 2, 2.1). Die bei 295 nm angeregte Fluoreszenz von ECD-PTHR1 wurde bei 342 nm verfolgt. Die Messwerte wurden um die linear ansteigende intrinsische Fluoreszenz von PTH (1-84) in Abwesenheit von ECD-PTHR1 und um den Beitrag der Pufferfluoreszenz korrigiert und auf 100% skaliert. Anschließend wurden die Datenpunkte durch nichtlineare Regression gemäß der Gleichung 2.10 angepasst. Unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie bei der Komplexbildung konnte für die beschriebene Komplexbildung von ECD-PTHR1 und PTH (1-84) ein K_D von $1 \mu\text{M} \pm 0,2 \mu\text{M}$ bestimmt werden.

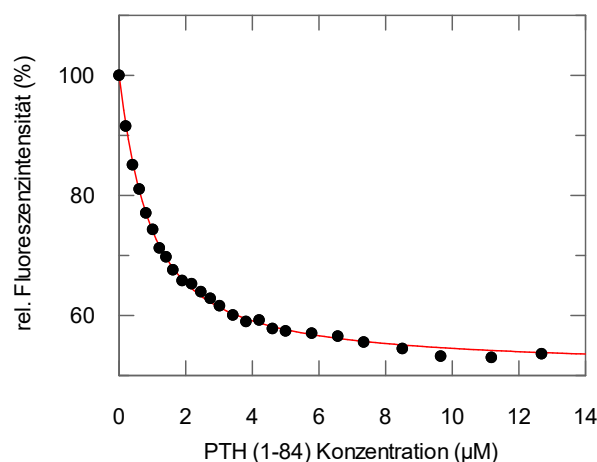


Abbildung 3.16: Fluoreszenztitration des rekombinant hergestellten ECD-PTHR1 mit PTH (1-84). Die Messung wurde in $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 100 mM NaCl , $\text{pH } 8,0$ bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Es wurde eine $0,5 \mu\text{M}$ ECD-PTHR1-Proteinlösung verwendet. Die bei 295 nm angeregte Fluoreszenz wurde bei 342 nm verfolgt und die Messwerte um den Beitrag der Pufferfluoreszenz und der intrinsischen Fluoreszenz des PTH (1-84)-Liganden in Abwesenheit von ECD-PTHR1 korrigiert und auf 100% skaliert. Die rote Linie entspricht der Anpassung der Datenpunkte an eine quadratische Gleichung.

Aus den erhaltenen Fluoreszenzdaten können auch Rückschlüsse auf die strukturellen Eigenschaften des Komplexes von ECD-PTHR1 und PTH (1-84) gezogen werden. Ein Vergleich des gemessenen Fluoreszenzspektrums des Komplexes (ECD-PTHR1 und PTH (1-84)), mit dem theoretischen Fluoreszenzspektrum aus den einzeln aufsummierten Emissionsspektren der Rezeptordomäne und des Liganden, zeigten deutliche Unterschiede (Anhang 2, Abb. 2.2). Die hier beobachteten Änderungen der Fluoreszenz werden möglicherweise ausgelöst, weil einige Fluorophore eines oder beider Bindungspartner eine Änderung ihrer Lösungsmittelposition erfahren. Eine mögliche Ursache dafür ist die Abdeckung lösungsmittel exponierter Bereiche durch die bimolekulare Reaktion. Es besteht aber auch die Möglichkeit einer Änderung in der Tertiärstruktur (Expositions- oder Inkorporationsprozesse von Tryptophanresten), die während der Wechselwirkung der beiden Bindungspartner auftreten. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren sind ein qualitativer Nachweis für die Bindungsreaktion von ECD-PTHR1 und PTH (1-84).

In Kooperation mit Qi Zhang (*Innopofile*, MLU Halle-Wittenberg) wurde das Ligandenbindungsvermögen von ECD-PTHR1 gegenüber PTH (1-84) auch mit Hilfe von *surface plasmon resonance* (*BIAcore*[®]) untersucht. Mit dieser Methode konnte eine Bindung von PTH (1-84) beobachtet und damit die Funktionalität der Ectodomäne bestätigt werden. Die Auswertung der in diesem Experiment erhaltenen Daten zeigte eine konzentrationsabhängige Bindungsreaktion mit einer schnellen Assoziations- und Dissoziationsrate. Die ermittelte Dissoziationskonstante lag mit $6,77 \pm 0,5 \mu\text{M}^{[219]}$ in einer vergleichbaren Größenordnung und bestätigte damit die Ergebnisse der ITC- und Fluoreszenztitrationmessung.

Bei früheren *in vitro* Bindungsstudien von ECD-PTHR1 und PTH standen meist synthetische und/ oder verkürzte PTH-Fragmente im Vordergrund^[67, 179]. Die hier erstmalig mit ITC, *BIAcore*[®] und Fluoreszenztitration ermittelten Dissoziationskonstanten für die Interaktion von ECD-PTHR1 und PTH (1-84), zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen (Tabelle 3.1). Sie legen den Schluss nahe, dass freies und gebundenes ECD-PTHR1 gleichartig mit PTH (1-84) interagiert. Die Ergebnisse sind auch ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich die Kernbindungsregion für ECD-PTHR1 im N-terminalen Bereich des PTH (1-84)-Liganden befindet. Die Aminosäuren, über L37 hinaus, haben keinen nennenswerten Einfluss auf die Bindungskompetenz des PTH (1-84) zu ECD-PTHR1.

Tabelle 3.1: Vergleich der hier ermittelten Dissoziationskonstanten des PTH(1-84) mit bekannten Affinitäten des verkürzten PTH-Fragments PTH (1-34) zu ECD-PTHR1.

Method	PTH (1-84) K_D in μM	PTH (1-34) K_D in μM	Referenz
ITC	$7,5 \pm 0,2$	1,77	[67]
		$3,4 \pm 1,0$	[67]
		4,5	[179]
Fluoreszenz	$1,0 \pm 0,2$	--*	diese Arbeit
<i>BIAcore</i> [®]	$6,8 \pm 0,5$	$4,9 \pm 0,7$	[219]
		12,4	[67]

*: nicht gemessen

Bindung der Antagonisten TIP (7-39) und TIP 39

Seit jüngerer Zeit ist ein neuer Antagonist für den PTHR1 bekannt^[147, 148]. Es handelt sich hierbei um das Tuberoinfundibular-Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP 39). Seine N-terminal verkürzte Variante TIP (7-39) wird als hoch affiner Antagonist für den PTHR1 beschrieben. TIP 39 sowie TIP (7-39) besitzen nur vereinzelte Homologien zur Aminosäuresequenz der bekannten PTHR1-Agonisten PTH und PTHrP. Darüber hinaus konnte für TIP (7-39) auch gezeigt werden, dass es mit höherer Affinität, als die bisher bekannten Antagonisten PTH (7-34) und PTHrP (7-34), an den PTHR1 bindet und darüberhinaus keine basale Agonist-Aktivität zeigt^[147, 148]. Alle bisher durchgeführten Experimente zur Untersuchung der Bindung des TIP-Antagonisten an PTHR1 beruhen auf Studien mit rezeptorexprimierenden Zellsystemen. Für eine zukünftige molekulare und strukturelle Charakterisierung der Bindungsreaktion zwischen PTHR1 und TIP, wurde hier *in vitro* die Bindungskompetenz des renaturierten ECD-PTHr1 gegenüber TIP (7-39) und TIP 39 untersucht.

Die Analyse der Bindungsfähigkeit von ECD-PTHr1 gegenüber TIP (7-39) erfolgte durch *surface plasmon resonance* an einem *BIAcore*[®] T100. Dafür wurde ECD-PTHr1 nach Biotinylierung mit Hilfe von Streptavidin auf einem Sensorchip immobilisiert und anschließend TIP (7-39) injiziert. Die aufgenommenen Sensorgramme (3.17 A) variieren in der verwendeten Ligandenkonzentration (0-100 nM) und zeigen eine konzentrationsabhängige Interaktion. Die quantitative Auswertung der Bindungsreaktion (Abb. 3.17 B) nach einem 1:1 Bindungsmodell lieferte eine Dissoziationskonstante K_D von $0,18 \pm 0,03 \mu\text{M}$, eine Assoziationsrate k_1 von $(6,61 \pm 0,06) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und eine Dissoziationsrate k_2 von $0,11 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$. Die Affinität von ECD-PTHr1 gegenüber TIP (7-39) ist höher als für PTH (1-84)^[219]. Im Vergleich mit den kinetischen Parametern der Bindung von PTH (1-84) assoziiert TIP (7-39) 10-fach schneller (persönliche Mitteilung von Qi Zhang, *Innoprofile*, MLU Halle-Wittenberg).

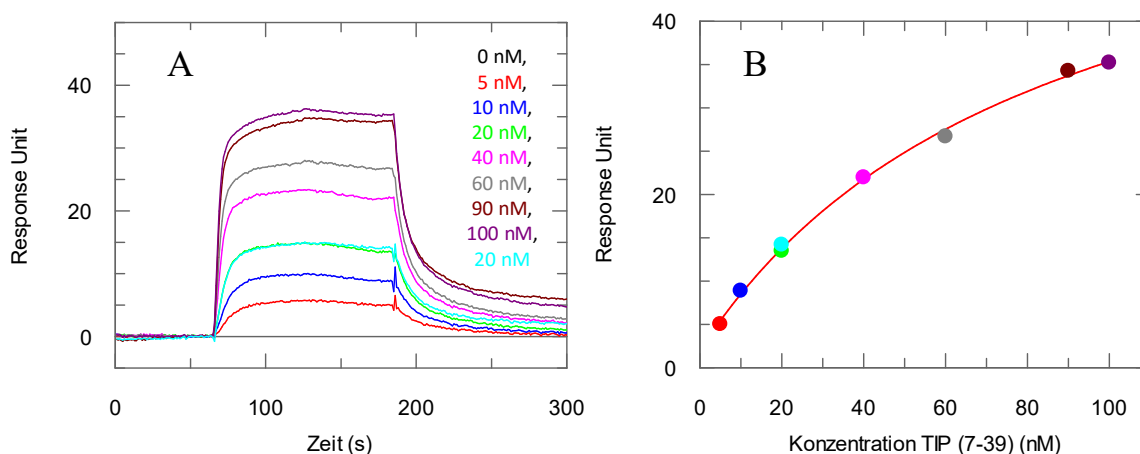


Abbildung 3.17: Oberflächenplasmonresonanzanalyse der Bindung von ECD-PTHr1 mit dem Antagonisten TIP (7-39). **A:** Sensorgramme von ECD-PTHr1 in Interaktion mit TIP (7-39). ECD-PTHr1 wurde mit Hilfe von Biotinylierung und Streptavidin auf die Sensorchipoberfläche immobilisiert und anschließend eine ansteigende Konzentration des Antagonisten TIP (7-39) injiziert. Die Injektionen erfolgten unter Bedingungen des kontinuierlichen Flusses von $30 \mu\text{l}/\text{min}$. Der verwendete Messpuffer bestand aus $50 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 150 mM NaCl , 1 mM EDTA , pH 8.0 und die Messtemperatur lag bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$. **B:** Auftragung der Plateauwerte der Assoziationsphase gegen die Konzentration von TIP (7-39). Die rote durchgezogene Linie entspricht der Extrapolation der Dissoziationskonstante, durch Anpassung an ein 1:1-Bindungsmodell.

Wie für die Bindung des Agonisten PTH (1-84) an ECD-PTH1R wurde mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie die Bindung der TIP-Antagonisten untersucht. Für die qualitative Analyse wurden Fluoreszenzspektren der Rezeptordomäne, sowie von freiem TIP (7-39) und TIP 39 aufgenommen. Um anschließend den Effekt der Ligandenbindung zu beurteilen, wurde ein Komplexspektrum, bestehend aus äquimolaren Mengen an Peptidligand und Ectodomäne, aufgezeichnet und mit dem theoretischen Fluoreszenzspektrum, aus der Summe der Einzelspektren von Ligand und Rezeptordomäne, verglichen. Auch für die Bindung von TIP (7-39) und TIP 39 konnte eine deutliche Abnahme und leichte Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums bei einer Bindung im molaren Verhältnis von 1:1 beobachtet werden (Anhang 2, Abb. 2.2), die eine Wechselwirkung zwischen beiden Bindungspartnern vermuten lässt. Für eine quantitative Auswertung wurden Fluoreszenztitrationen durchgeführt (Abb. 3.18).

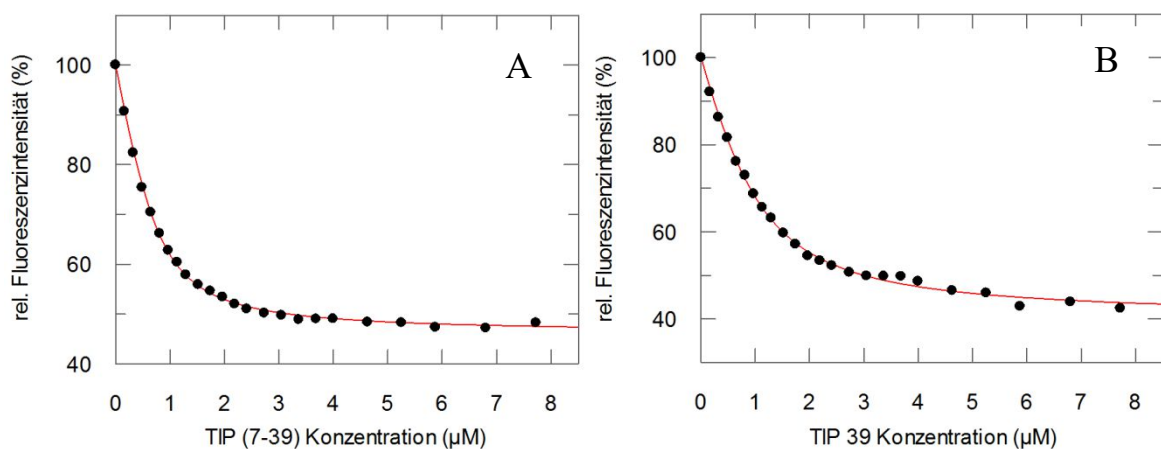


Abbildung 3.18: Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von ECD-PTH1R mit TIP-Antagonisten. **A:** Titration von TIP (7-39). **B:** Titration von TIP 39. Jeweils eine 1 μM ECD-PTH1R-Proteinlösung wurde mit den verschiedenen Antagonisten in 20 mM NaH_2PO_4 , 300 mM Na_2SO_4 , pH 6,0 bei 20 $^\circ\text{C}$ titriert. Die bei 295 nm angeregte Fluoreszenz von ECD-PTH1R wurde bei 342 nm verfolgt. Die Messwerte wurden jeweils um die Pufferfluoreszenz und die intrinsische Fluoreszenz der Antagonisten in Abwesenheit des Proteins korrigiert. Anschließend wurden die Messwerte durch nichtlineare Regression gemäß der quadratischen Gleichung 2.10 angepasst und die Dissoziationskonstanten bestimmt.

Wie bei der Bindung von PTH (1-84) wurde auch hier eine konzentrationsabhängige Abnahme des Fluoreszenzsignals bis zur Sättigung der Rezeptordomäne beobachtet. Darüber hinaus kam es zu einer linearen Zunahme der Fluoreszenz, ausgelöst durch die Eigenfluoreszenz der verwendeten Liganden (Anhang 2, Abb. 2.1). Zur Auswertung der Titration wurden die gemessenen Werte um den Beitrag dieser Eigenfluoreszenz korrigiert. Die Auswertung erfolgte durch nicht lineare Regression nach Gleichung 2.10 und führte zu einer Dissoziationskonstante K_D von $0,26 \pm 0,02 \mu\text{M}$ für die Bindung von TIP (7-39) und einer K_D von $0,48 \pm 0,05 \mu\text{M}$ für die Bindung von TIP 39. Beide Affinitäten lagen damit in einer vergleichbaren Größenordnung, wie der mittels *BIAcore*[®] ermittelte Wert. Anhand der durchgeführten Messungen kann davon ausgegangen werden, dass ECD-PTH1R mit TIP (7-39) und TIP 39 auch *in vitro* miteinander interagieren. Die *in vitro* Bindung von TIP 39 und ECD-PTH1R konnte qualitativ auch, durch erste NMR-Titrationsexperimente mit isotope-markiertem TIP 39 und der unmarkierten extrazellulären N-terminalen Domäne der PTH-Rezeptors 1, bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Eine zusätzliche quantitative Charakterisierung der Interaktionsreaktion von ECD-PTH_{R1} mit TIP (7-39) und TIP 39 mittels isothermer Titrationskalorimetrie führte jedoch zu keiner Freisetzung detektierbarer Wärmemengen (Anhang 2, Abb. 2.3). Eine Auswertung der erhaltenen Daten war damit nicht möglich.

3.3.4 Spektroskopische Charakterisierung von ECD-PTH_{R1} im Komplex mit humanem PTH (1-84)

CD-spektroskopische Analyse

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Zugabe von verkürzten PTH-Fragmenten zur N-terminalen Domäne des PTH-Rezeptors 1 keine deutliche Änderung von Sekundärstrukturelementen auslöst^[67, 254]. Nach den Fluoreszenzbindungsstudien von ECD-PTH_{R1} und dem PTH (1-84) Agonist kann davon ausgegangen werden, dass bei einem oder beiden Bindungspartnern strukturelle Änderungen während der Interaktion auftreten. Um nun zu überprüfen, ob ECD-PTH_{R1} eine durch Ligandenbindung abhängige strukturelle Änderung seiner Konformation und Sekundärstrukturelemente erfährt, wurden fern-UV-CD-Spektren aufgenommen (Abb. 3.19). Dafür wurde der Ligand im Verhältnis 1:1 mit der Rezeptordomäne gemischt. Bei der hier durchgeführten Untersuchung konnten für den Vergleich des gemessenen fern-UV-CD-Spektrums des Komplexes, bestehend aus Rezeptordomäne und Parathormon mit dem Summenspektrum der beiden Einzelspektren, nur geringe Unterschiede von Sekundärstrukturbestandteilen während der Komplexbildung beobachtet werden, was auf eine marginale Strukturinduktion während der Bindung hindeutet. Die erhaltenen Daten zeigen ein vergleichbares Ergebnis, wie es aus vorhergehenden Experimenten mit verkürzten PTH-Fragmenten bekannt ist^[67, 254].

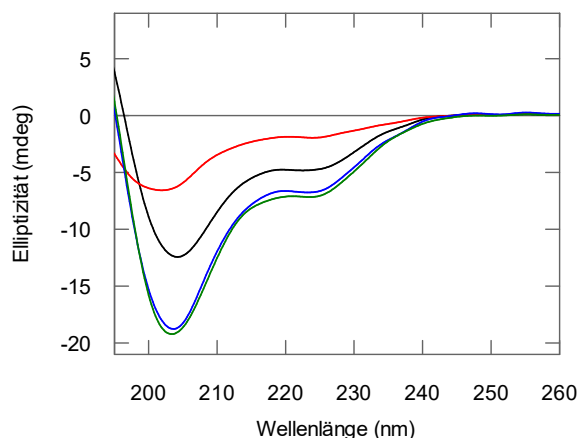


Abbildung 3.19: Fern-UV-CD-spektroskopische Charakterisierung der Komplexbildung aus ECD-PTH_{R1} und PTH (1-84). Die Messungen erfolgten in 20 mM NaH₂PO₄, 300 mM Na₂SO₄ und pH 6,0 bei 20 °C, in einer 1 cm Quarzglaszelle. Für jede Messung wurden 12 Spektren akkumuliert und um den Beitrag des Pufferspektrums in Abwesenheit von Protein und Ligand korrigiert. Die verwendeten Konzentrationen für die Messung der unabhängigen Spektren von ECD-PTH_{R1} (**schwarz**) und PTH (1-84) (**rot**) betragen 50 μM. Für die Messung des Komplexspektrums (**grün**) wurden die extrazelluläre N-terminale Domäne des PTH_{R1} und PTH (1-84) im molaren Verhältnis von 1:1 gemischt. Im Vergleich zum theoretisch erwarteten Komplexspektrum (**blau**), aus der Aufsummierung der Einzelspektren von ECD-PTH_{R1} und PTH (1-84), sind nur marginale Konformationsänderungen während der Komplexbildung zu beobachten.

NMR-spektroskopische Analyse

Wie in der Einleitung unter 1.2.3. beschrieben, wird für die Bindung des PTH-Liganden an die Ectodomäne des PTH-Rezeptors 1 ein *two-domain-binding* Modell postuliert^[78, 85, 177-180], wobei die C-terminale amphipathische α -Helix (Aminosäuren 20-31) in einer erweiterten hydrophoben Bindungsregion von ECD-PTHR1 bindet und der N-terminale Bereich des Liganden (Aminosäuren 1-19) mit Transmembranbereichen interagiert. Um zukünftig ein besseres Verständnis der molekularen Interaktion von Seiten der ECD-PTHR1 mit seinem Agonisten PTH (1-84) und verschiedenen Antagonisten zu bekommen, ist eine NMR-spektroskopische Identifikation von Bindungsepitopen auf Aminosäurebasis nötig. Mit Hilfe einer NMR-spektroskopischen Analyse können Vergleichsstudien für die Bindung von Agonisten und Antagonisten an GPCR-Domänen der Klasse B durchgeführt werden, um strukturelle und konformationelle Änderungen im Rezeptor und/oder Ligand zu bestimmen^[72, 280]. Die Zuordnung der Bindungsepitope in ECD-PTHR1 erfolgt dabei durch agonist- oder antagonistinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung der einzelnen Amidprotonenresonanzsignale im NMR-Spektrum.

Für die NMR-spektroskopische Analyse der Komplexbildung von ECD-PTHR1 und PTH (1-84) wurde ¹⁵N-istopenmarkiertes ECD-PTHR1 exprimiert und renaturiert. Das in Abbildung 3.17 A dargestellte 2D-¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum für ungebundenes ¹⁵N-markiertes ECD-PTHR1 zeigt eine geringe Verteilung der Amidprotonenresonanzsignale (schwarz) entlang der chemischen Verschiebung auf der ¹H-Protonen-Achse, im Bereich von 7,8 bis 8,8 ppm. Die Auflösung und niedrige Dispersion in diesem Bereich ist ein Hinweis auf einen hohen Anteil unstrukturierter Elemente und bestätigt das CD-Spektrum (Abb. 3.13), sowie Ergebnisse, die aufgrund des fragmentarischen Charakters der Domäne nur eine Teilstrukturierung ermöglicht haben^[67]. Eine Verbesserung der Spektrumsqualität konnte auch nicht durch die Änderung des pH-Werts oder der Temperatur während der Messung erreicht werden.

Der Effekt der Bindung von PTH (1-84) an ECD-PTHR1 wurde durch NMR-Titrationsexperimente untersucht. Die in Abbildung 3.17 B dargestellte Überlagerung des ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrums von ECD-PTHR1 in Abwesenheit (schwarz) und in Gegenwart von PTH (1-84) (rot), im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1,5, zeigt große Änderungen in der chemischen Verschiebung der Amidresonanzsignalen für den Komplex. Neben unveränderten Resonanzen kommt es zum Verlust, zur Verschiebung, zum Neuaufbau und zur Verbreiterung von Resonanzsignalen. Die verschiedenen Änderungen der Signale im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum des Liganden gebundenen ECD-PTHR1 zeigen, welche Rückgratamide in die Interaktion zwischen beiden Partnern involviert sind. Im Vergleich mit dem ungebundenen Zustand von ECD-PTHR1 zeigen sich im Komplexspektrum nur wenige neue Resonanzsignale mit hoher Dispersion. Das Ergebnis bestätigt das CD-Spektrum des PTH/ ECD-PTHR1-Komplex und ist ein Hinweis, dass es nur zu einer marginalen Strukturinduktion während der Komplexbildung von PTH (1-84) und ECD-PTHR1 kommt, die dann über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Liganden stabilisiert und dadurch als neue Signale im überlappenden NMR-Spektrum sichtbar werden. In beiden Spektren ist außerdem für einige Resonanzsignale ein starkes und breites Signal zu erkennen. Diese Signalbreite, aber auch die Abwesenheit einiger Resonanzen im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum des ungebundenen und gebundenen ECD-PTHR1, ist wahrscheinlich ein Beitrag des langsamen konformationellen Austauschs.

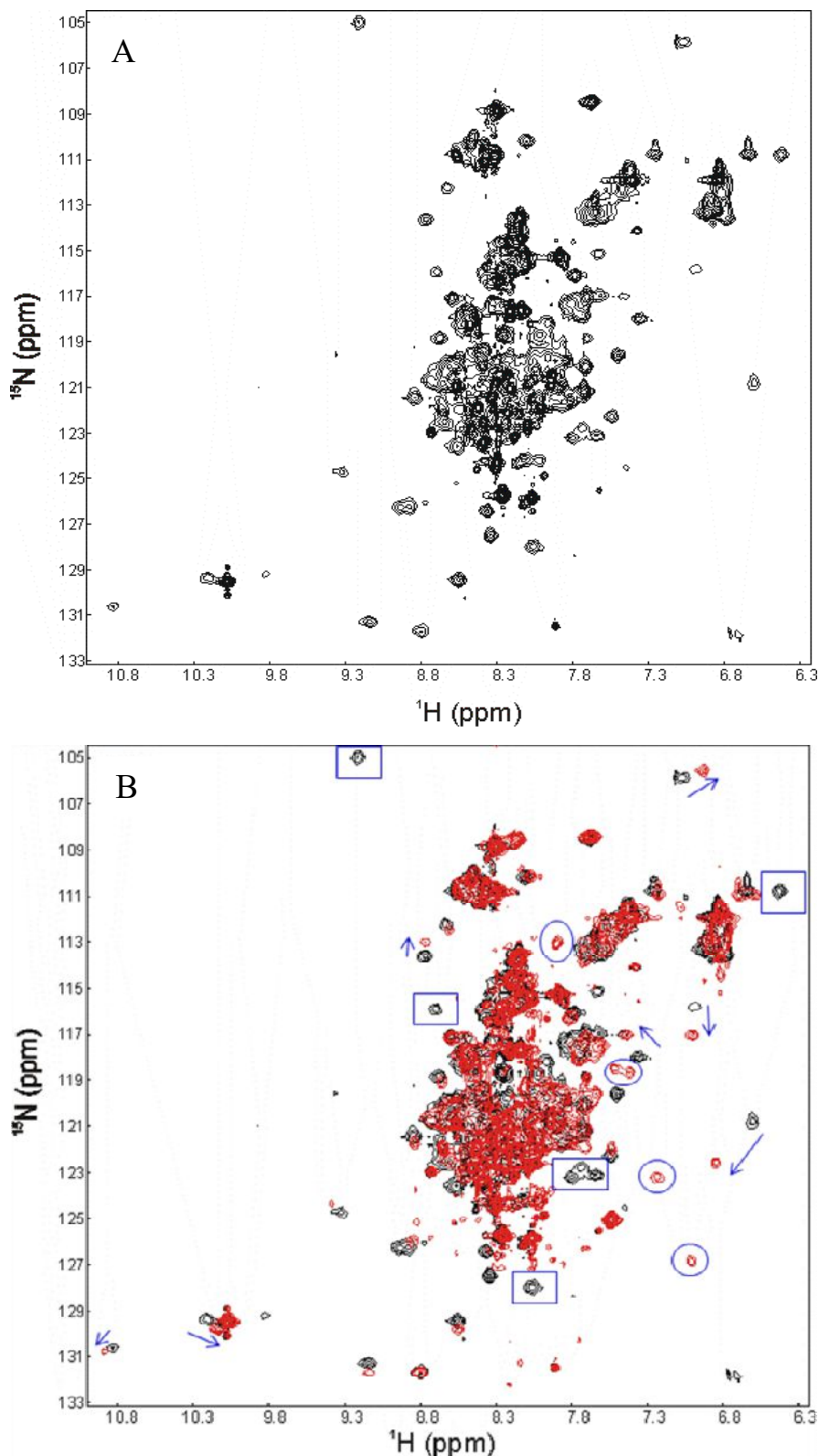


Abbildung 3.20: Vergleich der 2D ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren des ungebundenen ECD-PTHR1 mit PTH (1-84) gebundenen ECD-PTHR1. Die Messungen erfolgten in 10 % D_2O , 20 mM NaH_2PO_4 , 300 mM Na_2SO_4 , pH 6,0 bei 25 °C. Signaländerungen für die Amidprotonen des ECD-PTHR1 während der Komplexbildung von unmarkiertem PTH (1-84) werden durch blaue Quadrate, Kreise und Pfeile angezeigt. Quadrate: Signale des ungebundenen Zustands von ECD-PTHR1, die während der Komplexbildung mit PTH (1-84) verloren gehen. Kreise: Signale, die während der Komplexbildung neu entstehen. Pfeile: Signale, die während der Interaktion von ^{15}N -ECD-PTHR1 und PTH (1-84) über die chemische Verschiebung wandern. **A:** ^1H - ^{15}N -HSQC für ECD-PTHR1 im ungebundenen Zustand, 270 μM . **B:** Überlagerung der Spektren des ungebundenen ECD-PTHR1 (schwarz) und des mit PTH (1-84) komplexierten ECD-PTHR1 (rot).

Das Phänomen des langsamen konformationellen Austauschs (*slow conformational exchange*) wurde auch für andere Klasse B GPCR-Ectodomänen beschrieben, kann aber durch Komplexbildung mit einem affinen Liganden teilweise zurückgedrängt werden^[72, 83]. Wie in Abbildung 3.20 zu erkennen ist, konnte keine Verbesserung der Spektren, durch Unterbindung des *slow conformational exchange* nach Ligandenbindung, erreicht werden. Auch die Aufnahme von ¹H-¹⁵N-TROSY-Spektren zeigte ein vergleichbares Ergebnis. Aufgrund der geringen Spektrumsqualität, der geringen Dispersion und dem Fehlen von Amidprotonenresonanzsignalen im TROSY-Spektrum war eine aminosäurebasierte sequenzielle Zuordnung der Amidprotonenresonanzsignale für das Peptidrückgrat von ECD-PTHR1 nicht möglich.

3.4 Rekombinante Herstellung und Charakterisierung von humanem ECD-PTHR2

Bis heute ist es nicht gelungen, den gesamten humanen PTHR2 oder spezifische Domänen des Rezeptors *in vitro* zu gewinnen. Für eine geplante biochemische und biophysikalische Charakterisierung der extrazellulären N-terminalen Domäne des PTHR2 (ECD-PTHR2) sollte als erstes ein geeignetes Expressions- und Reinigungsverfahren etabliert werden, welches ausreichende Mengen (mg) N-terminale Rezeptordomäne liefert. In Zukunft soll mit der Herstellung ausreichender Mengen an ECD-PTHR2 ein besserer struktureller Einblick in die Ligandenselektivität und das Diskriminierungsvermögen der humanen Parathormon-Rezeptoren 1 und 2 gewonnen werden. Das nachfolgende Kapitel zeigt einige Strategien, die zur Klonierung, Expression, Reinigung und Charakterisierung von ECD-PTHR2 verfolgt wurden.

3.4.1 Vorversuche und Arbeiten zur Herstellung von humanen ECD-PTHR2

Für die Entwicklung einer brauchbaren Strategie zur heterologen Expression von ECD-PTHR2 wurden einige Vorversuche durchgeführt. Aufgrund des Umfangs der durchgeführten Experimente wird nur eine Auswahl an Versuchen kurz beschrieben. Deshalb haben die nachfolgenden Seiten einen zusammenfassenden Charakter. Eine Ausführliche Beschreibung der Ergebnisse findet sich im Anhang 1.

Plasmidkonstruktion, Expression, Rückfaltung, Reinigung und Charakterisierung von ECD-PTHR2 aus inclusion bodies

Die Klonierung, Expression und Renaturierung von ECD-PTHR1 aus *inclusion bodies* ist eine gute Plattform für die Herstellung von Klasse B GPCR-Ectodomänen und liefert ausreichende Mengen für biophysikalische Strukturuntersuchungen^[67]. Vor diesem Hintergrund und der Verwandtschaft von ECD-PTHR2 zur N-terminalen Domäne des PTHR1^[84, 139, 142, 160] sollte eine Expression in *E. coli* erfolgen und damit die beschriebene Methode zur Herstellung von ECD-PTHR1 auf die Gewinnung von ECD-PTHR2 übertragen werden. Trotz der vorhandenen Gemeinsamkeiten hinsichtlich einer hohen Sequenzhomologie und eines wahrscheinlich identischen Disulfidmusters zeigt ein Sequenz-*Alignment* für die beiden Rezeptoren eine deutlich kürzere Aminosäuresequenz für PTHR2, während PTHR1 einen stark verlängerten Bereich zwischen Cys48 und Cys108 besitzt^[78, 180] (Anhang 4, 4.9).

Nach erfolgreicher Klonierung des pET15b-ECD-PTH2-Expressionsvektors wurde ECD-PTH2 durch rekombinante Produktion in BL21(DE3) CodonPlus® RIL *E. coli*-Zellen und als unlösliche *inclusion bodies* hergestellt. Es handelte sich hierbei um das ECD-PTH2-Fragment ausgehend von Aminosäure Ala22 bis Tyr141. Die Überexpression von ECD-PTH2 als *IBs* konnte mittels SDS-PAGE überprüft werden, wo eine Expressionsbande bei einer erwarteten Laufhöhe von 16 kDa beobachtet wurde (Anhang 1, Abb. 1.1.1). Aus einem 3-Liter Expressionsansatz (Bioreaktor, dYT-Medium) konnten ca. 32 g Zellmaterial pro Liter Kulturvolumen gewonnen werden. Die erfolgreiche Präparation und Reinigung der *IBs* für ECD-PTH2 erfolgte wie unter Kapitel 2.4.7 beschrieben. Die Ausbeute lag bei 6,4 g pro Liter Bakterienkultur, was in einer vergleichbaren Größenordnung zur *IB*-Präparation von ECD-PTH1 steht. Die isolierten *IBs* von ECD-PTH2 wurden anschließend in Gegenwart von 5,5 M GdmCl solubilisiert und nachfolgend unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe eines fusionierten His₆-Tags und durch IMAC gereinigt (Anhang 1, Abb. 1.1.1). Das so erhaltene denaturierte ECD-PTH2 sollte anschließend, durch Rückfaltung in Renaturierungspuffer, in eine strukturierte und native Form überführt werden. Eine Übertragung der bekannten Renaturierungsbedingungen von ECD-PTH1 zur Rückfaltung von ECD-PTH2 war jedoch nicht erfolgreich. Auch die Variation der Konzentration an Protein, die Veränderung der Temperatur oder der Zusatz weiterer Rückfaltungsadditive führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Renaturierungsausbeute. Genauso wenig erfolgreich war der Einsatz des *artificial chaperon systems*^[1, 165, 222] für die Rückfaltung von ECD-PTH2.

Plasmidkonstruktion, Expression, Rückfaltung und Reinigung von ECD-PTH2 mit Hilfe einer Thioredoxin-SUMO-Fusion

Aus den vorangegangenen Versuchen wurde deutlich, dass eine Stabilisierung der Faltungsintermediate für ECD-PTH2 erreicht werden musste, um die starken Aggregationsprozesse während der Expression und/oder Rückfaltung zu minimieren. Eine wichtige Möglichkeit, die Rückfaltungsausbeute zu erhöhen, ist die Expression des Zielproteins als Fusionskonstrukt. In den zurückliegenden Jahren wurden verschiedene Proteinfusionstechnologien entwickelt, um eine verbesserte Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen in Bakterien zu erreichen. Eine Möglichkeit ist das Thioredoxin-fusionssystem. Die zytoplasmatische Akkumulation von Thioredoxin (Trx) führt in *E. coli* zu einer gesteigerten Ausbeute von co-exprimierten eukaryotischen Proteinen mit und ohne Disulfidbrücken^[223-226]. Außerdem vermindert es die Bildung von *inclusion bodies*^[227]. Die Überexpression von Trx unterstützt und katalysiert die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken und erhält damit die Funktionalität des Zielproteins^[228, 229]. Warum Thioredoxin einen positiven Einfluss auf die Expression von eukaryotischen Proteinen in bakteriellen Expressionssystemen nimmt, wird aktuell vielfach untersucht. Vermutlich besitzt Thioredoxin Chaperoneigenschaften^[228]. Die Verwendung des *Small Ubiquitin-like Modifier* (SUMO)-Proteins als Fusionspartner für eine verbesserte lösliche Expression mit höheren Expressionsraten, ist eine weitere anerkannte Strategie, ein schwierig zu exprimierendes Zielprotein herzustellen^[196, 197, 230, 231].

Aufgrund der Tatsache, dass es bis jetzt noch nicht gelungen war, die N-terminale Domäne des PTH2 in einer strukturierten und vor allem funktionalen Form zu gewinnen, wurde versucht, ECD-PTH2 als Fusionskonstrukt zu exprimieren. Dafür wurden das

Thioredoxin- und das SUMO-Gen mit dem Gen von ECD-PTHR2 und einem His₆-Tag fusioniert (Abb. 3.21). Für die Herstellung des Fusionskonstrukts wurden zwölf verschiedene Varianten mit Hilfe einer *overlap-extension* PCR^[192] in den pTsnG-Vektor (Anhang 4, Abb. 4.6) kloniert, die Unterschiede in der N- und C-terminalen Länge für die ECD-PTHR2-Aminosäuresequenz (Anhang 4, 4.8) aufwiesen. Die Verkürzung der N-terminalen Domäne geschah zur Erhöhung ihrer Löslichkeit während der Expression. C-terminal wurde versucht die Hydrophobizität der Ectodomäne zu verringern, indem der ersten Transmembranhelix nahestehenden Aminosäuren, entfernt wurden. Da eine Expression in *E. coli* erfolgen sollte, wurden alle Konstrukte ohne die Signalpeptidsequenz von ECD-PTHR2 generiert. Mit Hilfe der unterschiedlichen Fusionskonstrukte sollte eine lösliche oder unlösliche Expression überprüft werden. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine N- oder C-terminale Aminosäureverkürzung von ECD-PTHR2 Einfluss auf die Expression hat. Durch DNA-Sequenzierung konnte die korrekte Sequenz für elf der zwölf hergestellten Konstrukte bestätigt werden. Für diese Konstrukte wurde anschließend eine starke Expression in Autoinduktionsmedium^[235] (Anhang 1, Abb. 1.3.2) und dYT-Medium beobachtet, allerdings ausschließlich in Form von unlöslichen *inclusion bodies*.



Abbildung 3.21: Allgemeine schematische Darstellung des Thioredoxin-SUMO-ECD-PTHR2-Fusionsproteins. Das Konstrukt besitzt eine N-terminal lokalisierte Thioredoxin-Fusion und darauf folgend einen His₆-Tag und die SUMO-Fusion. C-terminal zur SUMO-Sequenz liegt die Aminosäuresequenz des rekombinant zu exprimierenden ECD-PTHR2-Proteins.

Um schließlich auch eine lösliche Expression, wenigstens für eins der elf Konstrukte zu forcieren, wurden die Expressionsbedingungen variiert. Eine lösliche Expression würde die Reinigung und Gewinnung von funktionalem ECD-PTHR2 erleichtern. Eine stufenweise Absenkung der Expressionstemperatur, sowie die Verwendung verschiedener *E. coli*-Stämme führten zu keiner sichtbaren löslichen Expression der Trx-SUMO-ECD-PTHR2-Fusionskonstrukte (Anhang 1, 1.3). Die Variation der Expressionsbedingungen und die N- oder C-terminale Verkürzung von ECD-PTHR2 hatten somit keinen Einfluss auf eine lösliche Expression von Trx-SUMO-ECD-PTHR2.

Um die Trx- und SUMO-Fusion als möglichen Faltungshelfer zu benutzen, wurden dennoch alle elf Konstrukte exprimiert. Die Isolierung, Reinigung und Solubilisierung der IBs erfolgte wie unter 2.4.7 beschrieben. Die Ausbeute an IBs lag zwischen 3 mg und 8 mg pro Liter Kulturmedium. Die Renaturierung der Fusionskonstrukte erfolgte durch Pulsrenaturierung in Rückfaltungspuffer (0,1 M Tris, 0,8 M L-Arginin, 1 mM EDTA, 5 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 8,5^{4°C}). Es wurden 0,5 l Rückfaltungsansätze verwendet. Die Menge an eingesetztem Fusionsprotein für die Renaturierung lag, abhängig vom Fusionskonstrukt, bei 22-45 mg. Während der Pulssetzung und anschließenden Inkubation zur Renaturierung des Proteins konnte visuell keine oder nur marginale Proteinpräzipitation für die Konstrukte beobachtet werden. Das heißt, die generierten Fusionsproteine wurden gut in Lösung gehalten. Nach dem letzten Puls und einer anschließenden Inkubation von 72 h wurden die Rückfaltungsansätze auf 50 ml konzentriert. Die nachfolgende Reinigung und Gewinnung von anhangfreiem ECD-PTHR2 wird detailliert im Anhang 1 unter 1.3. beschrieben. Zusammenfassend bleibt

festzuhalten, dass die Gewinnung von ECD-PTHR2 nur für eins der elf Konstrukte möglich war. Es handelte sich hierbei um das ECD-PTHR2-Fragment, ausgehend von der Aminosäure Tyr27-Gln138. Die Konzentrierung der Proteinlösung lieferte eine Ausbeute von 0,015 mg. Das entsprach einer sehr geringen Ausbeute von 0,075 % des für die Rückfaltung eingesetzten Proteins. Das hier entwickelte System erwies sich für die Anreicherung von ECD-PTHR2 als ungeeignet. Eine initiale Proteincharakterisierung konnte damit nicht erreicht werden. Deshalb wurde der geschilderte Ansatz, zur Gewinnung von nativen und funktionalem ECD-PTHR2 mit Hilfe einer Trx-SUMO-Fusion, nicht weiter verfolgt.

3.4.2 Klonierung, Expression, Renaturierung und Reinigung von ECD-PTHR2 als SUMO-Fusionsprotein

Nachdem die vorangegangenen Versuche zu keiner befriedigenden Ausbeute an funktionalem ECD-PTHR2 geführt haben, wurde in einem weiteren Ansatz versucht, das Zielprotein nur als SUMO-Fusion herzustellen. Bei einer wiederholten unlöslichen Expression sollte das SUMO-Fusionsprotein als künstlicher Faltungshelfer dienen, um ECD-PTHR2 aus *inclusion bodies* zu renaturieren. Die in den nachfolgenden Abschnitten beschriebene Methode führte zu funktionalem ECD-PTHR2, mit dem erste strukturelle Untersuchungen und Bindungsstudien durchgeführt werden konnten.

Klonierung

Die hier gewählte Strategie zur Gewinnung ausreichender Mengen an humanem ECD-PTHR2, die eine biochemische und biophysikalische Charakterisierung ermöglichen, beruht auf der Expression in *E. coli*. Dafür wurde die kodierende humane cDNA des ECD-PTHR2, ausgehend von der kodierenden Region der Aminosäuren Asp27-Gln138 und ohne die vermeintliche Signalsequenz, mittels PCR amplifiziert und anschließend mit Hilfe von *overlap extension* PCR in den pET-SUMOadapt-Vektor kloniert (Kapitel 2.4.7).

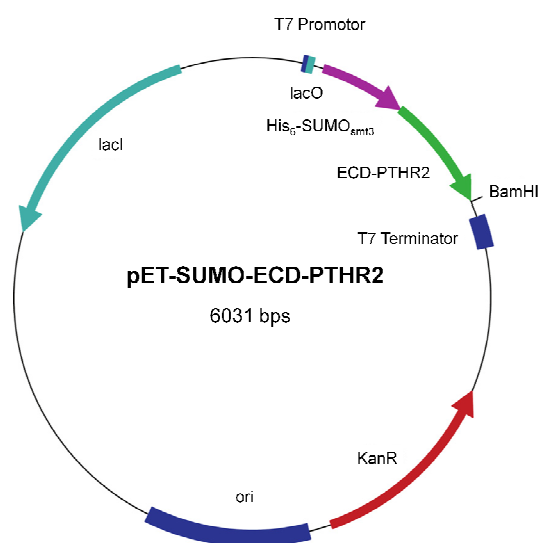


Abbildung 3.22: Schematische Darstellung des pET-SUMOadapt-ECD-PTHR2-Expressionsvektor
Die codierende Sequenz für humanes ECD-PTHR2 wurde mit Hilfe von *overlap extension* PCR^[192] in den pET-SUMOadapt-Vektor^[199] kloniert. Dadurch besitzt ECD-PTHR2, nach Abspaltung des SUMO-Fusionsproteins, einen natürlichen N-Terminus. Zur Kontrolle der Genexpression besitzt der Vektor zusätzlich einen T7-Promotor und lac-Operon. Außerdem besitzt er ein Resistenzgen für Kanamycin (KanR), ein lacI-Gen und einen Plasmidreplikationsursprung (pBR322 ori) zur Plasmidvervielfältigung.

Die für die Klonierungsreaktion verwendete cDNA wurde für eine Expression in *E. coli* optimiert. Der aus der Klonierung resultierende Expressionsvektor pET-SUMO-ECD-PTHR2₍₂₇₋₁₃₈₎ (Abb. 3.22) stand unter T7-Promotorkontrolle und kodierte für ein

Fusionsprotein, bestehend aus N-terminalem His₆-Tag, gefolgt von SUMO und der extrazellulären N-terminalen Domäne des PTH-Rezeptors 2. Die Integrität des hergestellten Fusionskonstruktes wurde mittels analytischem, enzymatischem Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung überprüft. Positive Konstrukte wurden zur heterologen Expression in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) CodonPlus[®] RIL transformiert.

Expression

Nachdem die Sequenzierung und Transformation des SUMO-ECD-PTH2-Konstrukts erfolgreich war, wurde die Überexpression des Konstrukts mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.23). Die Expression von SUMO-ECD-PTH2 konnte durch das Auftauchen einer sichtbaren Bande, bei einer Molekularmasse von ca. 29 kDa, nachgewiesen werden. Diese molekulare Masse steht annähernd in Übereinstimmung mit der theoretisch vorhergesagten von 25 kDa, abgeleitet aus der Gen- und Aminosäuresequenz von SUMO-ECD-PTH2 (ProtParam-Tool, ExPASy Proteomics Server). Zur Analyse der Expression wurde der Zellextrakt in eine lösliche und unlösliche Proteinfraction separiert und im gleichen Verhältnis auf das SDS-Gel aufgetragen. SUMO-ECD-PTH2 wurde in den unlöslichen Fraktionen als *inclusion bodies* exprimiert. Die Verwendung von SUMO als Fusionspartner hatte somit keinen Einfluss auf eine lösliche Expression. Auch weitere Versuche zur Produktion von SUMO-ECD-PTH2 in löslicher Form, durch Modifikation von Expressionsbedingungen, wie der Temperatur, IPTG-Konzentration, Medium^[235] oder der Induktionszeit, waren nicht erfolgreich.

Zur Herstellung von SUMO-ECD-PTH2 wurden die rekombinanten *E. coli*-Zellen in 4 l dYT-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 angezogen. Anschließend wurde die Proteinexpression für vier Stunden durch die Zugabe von IPTG mit einer finalen Konzentration von 1 mM induziert. Nach der Induktion konnten ca. 8 g Biofeuchtmasse pro Liter Bakterienkultur als Ausbeute gewonnen werden. Im Anschluss an die Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und bei -20 °C bis zum Zellaufschluss und der sich anschließenden Proteinreinigung gelagert.

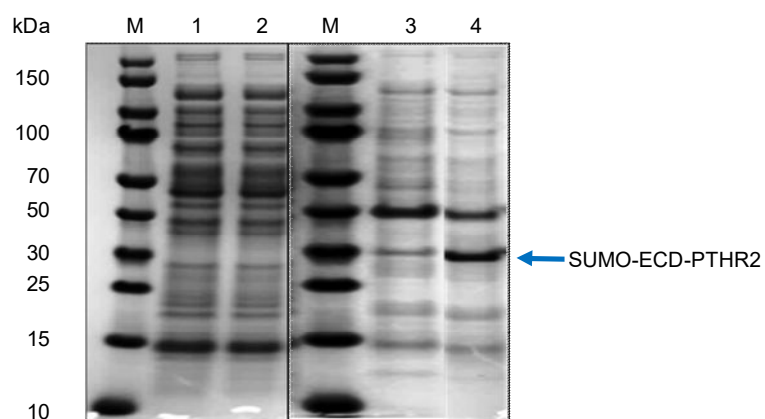


Abbildung 3.23: 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel: Expressionskontrolle von SUMO-ECD-PTH2 in BL21 (DE3) CodonPlus[®] RIL *E. coli*-Zellen. M: Proteinstandard, 1: löslicher Zellüberstand vor Induktion, 2: löslicher Zellüberstand nach 3 h Induktion mit 1 mM IPTG, 3: Zellpellet vor Induktion, 4: Zellpellet nach 3 h Induktion mit 1 mM IPTG. Die Expressionsbande des SUMO-ECD-PTH2-Fusionskonstruktes ist durch einen blauen Pfeil im Gel markiert.

Isolation von SUMO-ECD-PTHR2 inclusion bodies

Ein Grund für die Akkumulation von *IBs* bei der Überexpression von SUMO-ECD-PTHR2 ist das reduzierende Milieu im Zytoplasma von *E. coli*. Es verhindert die Ausbildung von oxydativen Disulfidbrücken und führt dadurch zu einem reduzierten, instabilen und zur Aggregation neigenden Zustand des Fusionsproteins. Die Expression von disulfidverbrückten Proteinen in *E. coli* bleibt bis jetzt die einzige Korrelation bei der Entstehung von *IBs*, während sich aus einer erhöhten Expressionsrate, Molekulargewicht, der Hydrophobizität oder dem Protein-Faltungsmechanismus die Neigung zur *IB*-Bildung nicht direkt ableiten lässt.^[236] Die Expression von ECD-PTHR2 als SUMO-Fusionspartner und in Form von *IBs* hat den Vorteil, dass es angereichert und geschützt vor proteolytischem Abbau in der *E. coli*-Zelle vorliegt^[202, 237, 238]. Ein wesentlicher Nachteil ist, dass dadurch biologisch inaktive Aggregate entstehen, die im Anschluss durch Rückfaltung in eine native und funktionale Proteinkonformation überführt werden müssen^[239]. Dafür müssen die *IBs*, wie schon zuvor beschrieben, unter Verwendung von chaotrophen und reduzierenden Reagenzien, wie Guanidiniumchlorid oder Harnstoff und Dithiothreitol oder β -Mercaptoethanol solubilisiert und anschließend *in vitro* renaturiert werden^[238-241]. Besitzt das zu renaturierende Protein Disulfidbrücken, müssen Redox-Bedingungen geschaffen werden, die eine native Formation erlauben. Durch die Prävention von hydrophoben intermolekularen Wechselwirkungen während des Renaturierungsprozesses ist eine erfolgreiche Rückfaltung mit hoher Proteinkonzentration möglich^[238]. Hierbei kann das SUMO-Fusionsprotein als Lösungsvermittler helfen und einen stabilisierenden Einfluss auf Faltungsintermediate bei der Renaturierung nehmen^[244], indem es sie in Lösung hält. Der erste wichtige Schritt auf dem Weg zur Etablierung der nativen Konformation von ECD-PTHR2 ist also die Isolation der *IBs* aus *E. coli*. Die Isolation und Reinigung der *inclusion bodies* von SUMO-ECD-PTHR2 erfolgte wie unter Kapitel 2.4.7 beschrieben. Der Verlauf der *IB*-Isolation wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert (Abb. 3.24). Im Vergleich zum Zellysate zeigen die *IBs* eine erste Aufreinigungsstufe. Neben einigen unspezifischen Verunreinigungen ist eine deutliche Proteinlaufbande von SUMO-ECD-PTHR2 mit einer apparenten Molekularmasse von 29 kDa zu erkennen. Sie fällt damit etwas größer aus, als es theoretisch für monomeres SUMO-ECD-PTHR2 mit 25 kDa erwartet wurde. Diese Beobachtung ergibt sich aus einem langsameren Laufverhalten von SUMO-ECD-PTHR2. Als mögliche Ursache für diese Massedifferenz kann ein basischer Charakter des Fusionsproteins ausgeschlossen werden, da der theoretische isoelektrische Punkt für reduziertes SUMO-ECD-PTHR2 bei 5,86 liegt. Im Allgemeinen ist es einem basischen Protein möglich, durchschnittlich mehr SDS-Moleküle pro Aminosäure zu binden als saure oder neutrale Proteine. Durch die resultierende Oberflächenvergrößerung verlangsamt sich das Laufverhalten der Proteine^[245]. Jedoch wird häufig im Zusammenhang mit der Expression von Membranproteinen oder ihrer Domänen beobachtet, dass ihr Laufverhalten nicht eindeutig mit dem theoretischen Molekulargewicht und der erwarteten Bandenhöhe im SDS-Gel korreliert. Die Differenz im SDS-Gel kann -10 % bis +30 % unter oder über der erwarteten Molekularmasse liegen. Diese Differenz wird als *gel shifting* bezeichnet und durch unterschiedliche SDS-Beladung des zu untersuchenden Proteins ausgelöst, wobei verschiedene Reststrukturen im SDS-behandelten Protein darauf Einfluss nehmen können^[246]. Auch SUMO oder SUMO-Fusionsproteine zeigen oft kein Laufverhalten entsprechend ihrer molekularen Größe^[285]. Zusammengefasst konnten für die Präparation

der SUMO-ECD-PTHR2 *inclusion bodies* ca. 0,6 g pro Liter Kulturmedium gewonnen werden. Das entsprach einer Ausbeute von 7,1 % in Bezug zur verwendeten Zellmasse und liegt damit in einer vergleichbaren Größenordnung von 5-10 %, die für *IB*-Präparationen anderer Klasse B GPCR-Ectodomänen erreicht wurden^[1, 67, 165].

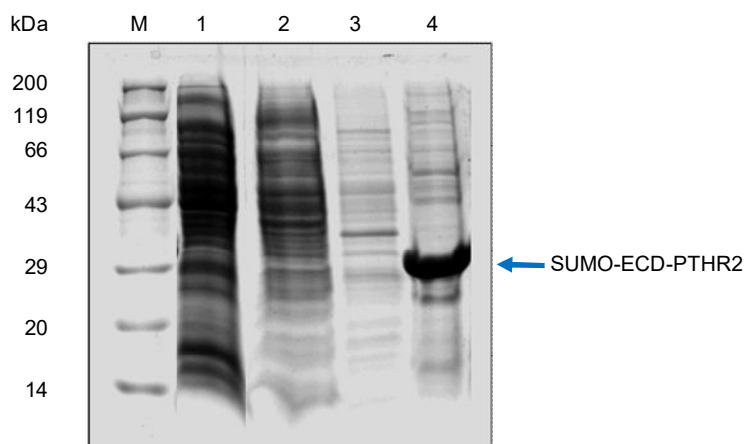


Abbildung 3.24: 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel: Präparation von SUMO-ECD-PTHR2 *inclusion bodies*. M: Proteinstandard, 1: Gesamtzellextrakt nach Zellaufschluss, 2: löslicher Überstand nach Zellaufschluss, 3: löslicher Überstand nach letztem Waschschritt und Isolation der *inclusion bodies*, 4: isolierte *inclusion bodies*. Die Laufhöhe der gelösten *IBs*, von SUMO-ECD-PTHR2, ist durch einen blauen Pfeil im Gel markiert.

Renaturierung, SUMO-Spaltung und Reinigung von ECD-PTHR2

Nach der Isolierung der *inclusion bodies* müssen diese eine Solubilisierung erfahren, bevor sie für die Rückfaltung verwendet werden können^[236-241]. Die Solubilisierung für SUMO-ECD-PTHR2 erfolgte in 8 M Harnstoffpuffer und in Gegenwart von 100 mM 1,4-Dithiothreitol über Nacht bei Raumtemperatur. Für die Solubilisierung wurden jeweils 1 g *IBs* in 20 ml Solubilisierungspuffer gelöst. DTT wurde dem Solubilisierungspuffer zugesetzt, um alle inter- und intramolekularen Disulfidbrücken aufzubrechen, die sich möglicherweise während der Expression oder durch Luftoxidation während des Zellaufschlusses gebildet hatten^[237]. Um den nachfolgenden Renaturierungsprozess nicht zu stören, wurde anschließend, zur vollständigen Entfernung von DTT, der Solubilisierungsansatz gegen 3 x 2 l Dialysepuffer (4 M GdmCl) dialysiert.

Die Renaturierung des Fusionsproteins SUMO-ECD-PTHR2 erfolgte im 1 l Maßstab in L-Arginin-Renaturierungspuffer (100 mM Tris, 0,8 M L-Arginin, 1 mM EDTA, 5 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 8,5 ^{4 °C}). Der Zusatz der solubilisierten *IBs* von SUMO-ECD-PTHR2 erfolgte durch Pulsrenaturierung im Abstand von sechs Stunden, mit maximal 50 µg/ml Proteinkonzentration im Renaturierungsansatz. Während einer Pulsrenaturierung wird das *IB*-Solubilisiert sukzessive nach einem definierten Zeitintervall in den Rückfaltungsansatz gegeben. Durch diesen Schritt wird eine schnelle Verdünnung der Proteinlösung erreicht und dadurch eine lokale Anreicherung von un- oder falschgefalteten Proteinspezies vermieden^[236, 238, 239, 242, 243]. Besitzt das zu renaturierende Protein Disulfidbrücken, müssen zusätzlich Redox-Bedingungen geschaffen werden, die eine native Formation erlauben^[237]. Zur Ausbildung korrekter Disulfidbrücken wurde dem Renaturierungspuffer zusätzlich ein *redox-shuffling*-System aus reduziertem und oxidiertem Glutathion zugesetzt^[237]. Während der Rückfaltung wurde nur eine marginale Aggregation beobachtet. Das Fusionsprotein

konnte während der Rückfaltung fast vollständig in Lösung gehalten werden (Abb. 3.25 B). Nach dem letzten Puls wurde die Lösung für weitere 72 h inkubiert und im Anschluss mit Hilfe des *VIVA-Flow*-Membransystems auf 100-150 ml konzentriert.

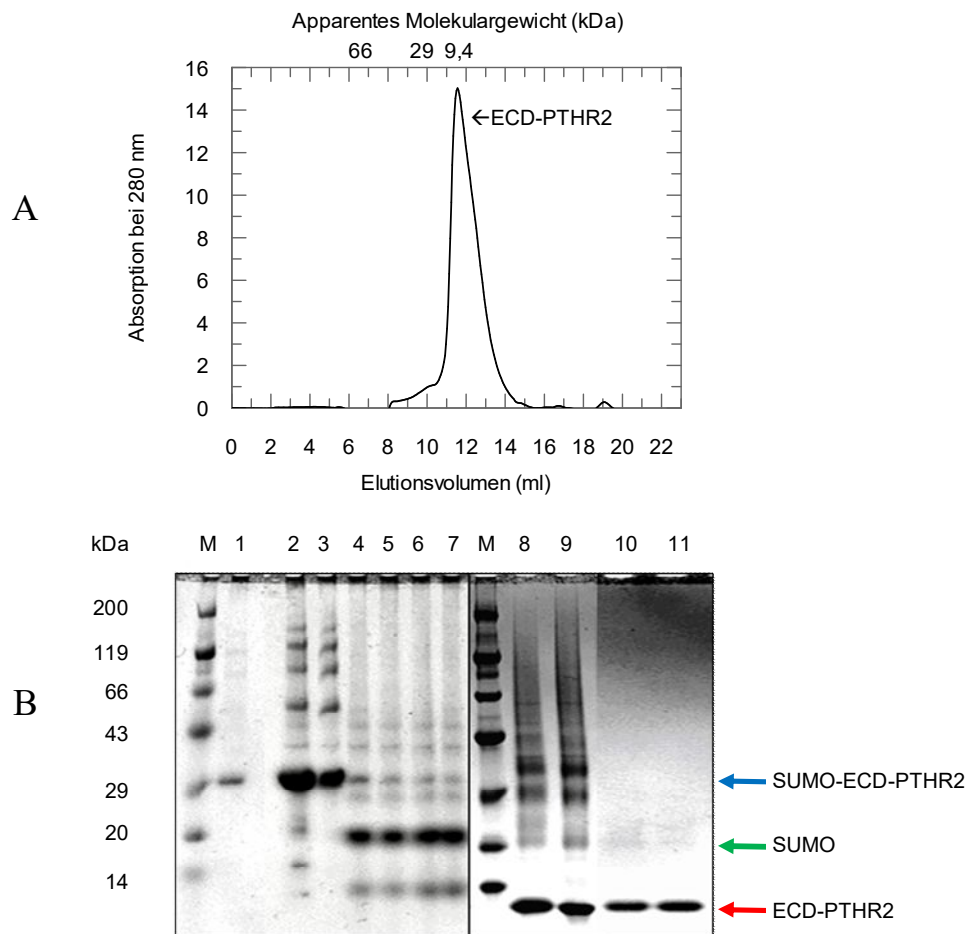


Abbildung 3.25 A: Elutionsprofil der analytischen Gelfiltration von ECD-PTHR2. Zur Bestimmung der apparenten Molekularmasse wurde die Säule mit Standardproteinen kalibriert. **B: SDS-Polyacrylamidgel: Renaturierung und Reinigung von ECD-PTHR2.** Proteinproben der Rückfaltung und der einzelnen Reinigungsschritte wurden durch ein 12,5%iges SDS-Gel analysiert. M: Proteinstandard, 1: Rückfaltungsansatz, 2: Elutionsfraktion des SUMO-ECD-PTHR2 nach Renaturierung und 1. IMAC-Reinigungsschritt, 3: ECD-PTHR2 vor SUMO-Spaltung, 4-7: SUMO-Spaltungskinetik für ECD-PTHR2, 4: 15 min SUMO-Spaltung, 5: 30 min. SUMO-Spaltung, 6: 1 h SUMO-Spaltung, 7: 2 h SUMO-Spaltung, 8: ECD-PTHR2-Durchlauf in reduziertem Zustand nach SUMO-Spaltung und 2. IMAC-Reinigung, 9: ECD-PTHR2-Durchlauf im oxidierten Zustand nach SUMO-Spaltung und 2. IMAC-Reinigung, 10: Präparative Gelfiltration von ECD-PTHR2, 11: analytische Gelfiltration. Die Laufhöhe von SUMO-ECD-PTHR2 ist durch einen **blauen**, SUMO durch einen **grünen** und ECD-PTHR2 durch einen **roten** Pfeil im Gel markiert.

Zur Entfernung von Verunreinigungen aus den renaturierten *IBs* wurde das Fusionsprotein auf einer IMAC-Säule immobilisiert. Zuvor wurde aber der aufkonzentrierte Rückfaltungsansatz, zur Entfernung von L-Arginin, gegen Phosphatpuffer dialysiert, anschließend auf die IMAC-Säule aufgetragen und mit 250 mM Imidazol eluiert. Arginin ist ein wertvolles Rückfaltungsadditiv, steht aber mit seiner Aminogruppe in direkter Konkurrenz mit dem Histidin-*Tag* um die Bindung von Metallionen am Affinitätschromatographiematerial^[203]. Auf diesem Weg wurden 44 mg Fusionsprotein pro Liter eingesetzter Expressionskultur

gereinigt. Im Anschluss an die IMAC-Reinigung wurde mittels SUMO-Spaltung von ECD-PTHR2 der His-SUMO-Fusionsanteil entfernt. Eine SDS-PAGE-Analyse zeigte eine effiziente Spaltung schon nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur (Abb. 3.23 B). Um SUMO, die SUMO-Protease und ungeschnittenes Fusionsprotein aus dem Spaltungsansatz zu entfernen, wurde der Spaltungsansatz erneut auf eine IMAC-Säule aufgetragen und der Durchlauf gesammelt, um die darin befindliche Ectodomäne aufzufangen. Aus einem Liter Rückfaltungsansatz konnten ca. 14 mg ECD-PTHR2 gewonnen werden. Um noch letzte vorhandene Verunreinigungen und Aggregate aus der Präparation zu entfernen, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Die finale Ausbeute betrug 0,85 mg ECD-PTHR2 pro Liter Expressionskultur. Durch SDS-PAGE wurde die Reinheit der Ectodomäne des PTHR2 über die einzelnen Reinigungsschritte untersucht und die Effizienz der SUMO-Spaltung überprüft. Das erscheinende Bandensignal, in Abbildung 3.25 B, Bahn 2, bei ca. 29 kDa, entspricht dem SUMO-ECD-PTHR2-Fusionsprotein nach der ersten IMAC-Reinigung. Neben dem Fusionsprotein sind zusätzlich leichte Verunreinigungen zu erkennen. Die Bahn 11 zeigt optisch reines ECD-PTHR2 nach einer analytischen Gelfiltration bei einer Laufhöhe von ca. 12,5 kDa (Abb. 3.25 B). Durch eine massenspektrometrisch unterstützte N-terminale Proteinsequenzierung wurde zusätzlich die Identität für ECD-PTHR2 bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Homogenität der Ectodomäne wurde mittels analytischer Gelfiltration überprüft (Abb. 3.25 A). Das bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm erhaltene Chromatogramm zeigt eine homogene und gut definierte Elutionsspitze, dessen Elutionsvolumen monomerem ECD-PTHR2 entsprach. Die Abwesenheit von Absorption im Ausschlussvolumen der Säule ist ebenfalls ein guter Hinweis auf das Fehlen höherer molekularer Spezies und Proteinaggregate. Die Rezeptordomäne wurde im Anschluss mit Natriumazid (NaN_3) und 1 mM EDTA versetzt und bei 4 °C gelagert.

3.4.3 Massenspektrometrische Analyse des ECD-PTHR2

Identifizierung von ECD-PTHR2

Um die Identität des rückgefalteten und gereinigten ECD-PTHR2 zu untermauern, wurde eine Elutionsfraktion der analytischen Größenausschlusschromatographie mittels Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) untersucht. Das theoretisch erwartete Molekulargewicht von 12382 Da, für oxidiertes und vollständig disulfidverbrücktes ECD-PTHR2, konnte experimentell detektiert werden (Abb. 3.26). Die massenspektrometrische Analyse bestätigte somit die Existenz von drei ausgebildeten Disulfidbrücken in ECD-PTHR2. Das gewonnene ECD-PTHR2 wurde somit weder intrazellulär noch während der aufeinander folgenden *inclusion body* Isolation, Solubilisierung, Renaturierung und der chromatographischen Reinigungsschritte durch Proteasen abgebaut. Die detektierte Masse entspricht monomerem und vollständig oxidiertem ECD-PTHR2, das als sauberes und homogenes Molekül vorlag. Eine Analyse zur Überprüfung freier, also reduzierter Cysteinreste, mittels Ellman's Test (Daten nicht gezeigt), bestätigte das Ergebnis der ESI-Massenspektrometrie. Es konnten keine freien Cysteinreste nachgewiesen werden. Alle sechs Cysteine von ECD-PTHR2 lagen in einer oxidierten und somit vollständig verbrückten Form vor.

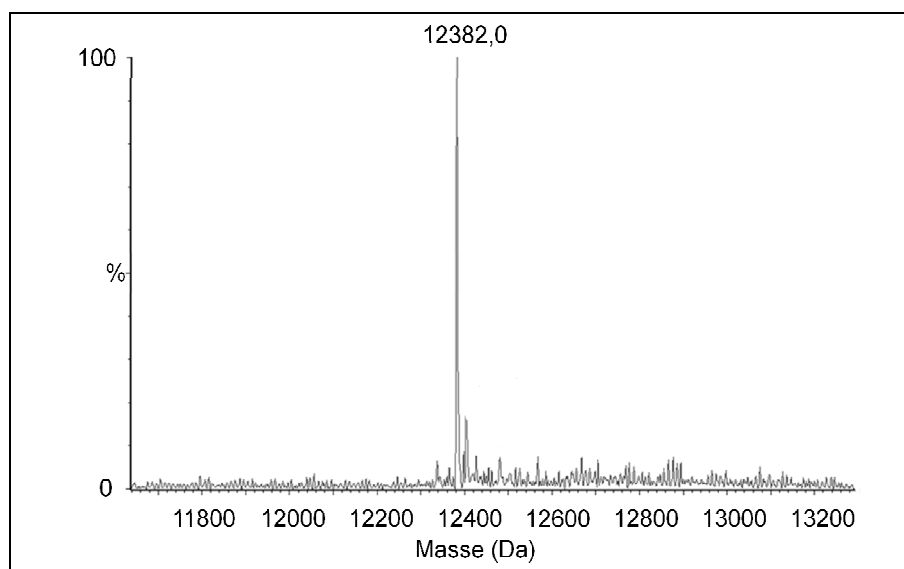


Abbildung 3.26: ESI-Massenspektrum des renaturierten und gereinigten ECD-PTHR2. Die theoretisch erwartete Molekularmasse von 12382 Da konnte für die Domäne detektiert werden. Die Masse entspricht damit dem ECD-PTHR2 im oxidierten Zustand mit drei Disulfidbrücken.

Analyse des Disulfidbrückenmusters von ECD-PTHR2

Um die erhaltenen Ergebnisse der SDS-PAGE und ESI-Massenspektrometrie zu stärken, wurde untersucht, ob das entwickelte Renaturierungsprotokoll zu einer korrekten Ausbildung der Disulfidbrücken innerhalb der N-terminalen Domäne des PTHR2 führte. Die extrazellulären N-terminalen Domänen der Klasse B GPCRs besitzen sechs Cysteine, welche im nativen Zustand ein konserviertes Disulfidbrückenmuster ausbilden. Dieses Muster besteht aus drei Disulfidbrücken und spielt eine wichtige Rolle für die strukturelle Integrität und Funktionalität des Proteins. Fehlen die Disulfidbrücken, verlieren die Ectodomänen ihre Funktionalität und sind nicht in der Lage ihre spezifischen Liganden zu binden und Rezeptoren zu aktivieren^[247]. Für fast alle bis jetzt rekombinant hergestellten und strukturell charakterisierten Ectodomänen der Klasse B GPCRs konnte dieses konservierte Disulfidbrückenmuster nachgewiesen werden. Typischerweise wird ein Brückenmuster zwischen dem sequenziellen Cys1 und Cys3, die zweite zwischen Cys2 und Cys5 und die dritte zwischen Cys4 und Cys6^[67-69, 72, 82, 248] in der Ectodomäne ausgebildet. Demzufolge sollten bei einer korrekten Ausbildung der Disulfidbrücken in ECD-PTHR2 Verbindungen zwischen Cys48 und Cys72, zwischen Cys63 und Cys103 und zwischen Cys86 und Cys125 nachgewiesen werden. Die Identifizierung eines korrekten und für die Rezeptorklasse konservierten Disulfidbrückenmusters ist ein Nachweis für die native Struktur von ECD-PTHR2.

Für die Charakterisierung des Disulfidbrückenmusters von renaturiertem und gereinigtem ECD-PTHR2 wurde für die Proteinlösung, wie unter 2.5.8 beschrieben, ein Pepsinverdau durchgeführt. Bei einer Pepsinspaltung von Proteinen entstehen grundsätzlich verschieden lange Peptidfragmente je Disulfidbrücke, weil Pepsin sehr vielseitig und häufig in einem Protein schneidet und dadurch eine Lösung aus heterogenen Peptidfragmentlängen bildet^[249]. Pepsin schneidet bevorzugt nach hydrophoben Aminosäuren wie Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp und Tyr. Durch die Analyse der Primärstruktur sind somit die potentiellen Spaltstellen bekannt, so dass definierte Peptidfragmente entstehen, deren Masse damit theoretisch ebenfalls bekannt ist. Sind nun zwei Peptidfragmente über eine Disulfidbrücke

miteinander verbunden, entstehen neue und deutlich größere Peptidfragmente, deren Molekulargewicht sich aus der Summe der beiden einzelnen Peptidfragmente zusammensetzt.

Die aus dem proteolytischen Pepsinverdau erhaltene Peptidlösung wurde zur Durchführung einer Tandem-Massenspektrometrie über eine nano-HPLC-Säule geführt, die eluierenden Peptidfragmente direkt ionisiert und ihr Molekulargewicht detektiert. Anschließend wurden die einzelnen Peptide mit Hilfe der massenspektrometrischen Methode *collision-induced dissociation* sequenziert und mit der bekannten Peptidsequenz von ECD-PTHR2 verglichen. Auf diese Weise konnte eine genaue Zuordnung der Signale und damit eine eindeutige Identifizierung von drei konservierten Disulfidbrücken in ECD-PTHR2 nachgewiesen werden. Die Abbildung 3.27 zeigt drei ESI-MS-Beispielspektren, die für eine sequenzielle Disulfidbrückenanalyse der konservierten Disulfidbrücken in ECD-PTHR2 erhalten wurden.

Die Gegenüberstellung der detektierten Molekulargewichte der analysierten, disulfidverbrückten Peptidfragmente mit den theoretisch bekannten Peptidsequenzen in Tabelle 3.2, die nach einem Pepsinverdau von ECD-PTHR2 auftraten, zeigen deutliche Unterschiede in der Häufigkeit der detektierten Moleküle. So wurden für das disulfidverbrückte Peptidfragment, das die Brücken zwischen Cys63 und Cys103 trägt, deutlich mehr Spezies beobachtet, als für die beiden anderen Disulfidbrücken zwischen Cys48 und Cys72, sowie zwischen Cys86 und Cys125. Da Pepsin häufig innerhalb der Proteinsequenz schneidet, konnten für das proteolytisch degradierte ECD-PTHR2 verschieden lange Peptidsequenzen detektiert werden, die über kovalente Disulfidbrücken miteinander verbunden waren. Bei dem Vergleich der detektierten und berechneten Molekulargewichte wurden Unterschiede mit bis zu 10 ppm toleriert. Im Zusammenhang mit der hier durchgeführten Methode ist jedoch keine quantitative Aussage über die Peptidfragmente möglich. Wahrscheinlich ist die unterschiedliche Häufigkeit der einzelnen detektierten, disulfidverbrückten Peptidfragmente auf eine unterschiedlich gute Ionisierbarkeit zurückzuführen. Außerdem kann bei der Pepsinspaltung nicht von einer vollständigen Spaltung aller potentiellen Spaltstellen ausgegangen werden, da diese eventuell aufgrund der Ausbildung von Strukturelementen in ECD-PTHR2 sterisch nicht zugänglich sind. Dadurch kann ein Peptidfragment der Peptidlösung entzogen werden. Durch die unvollständige Protolyse können auch sehr große, komplexe Peptidfragmente mit mindestens zwei Disulfidbrücken auftreten, die dann nur noch schwerer zu ionisieren sind. Wie Tabelle 3.2 zeigt, konnten alle drei konservierten Disulfidbrücken innerhalb von ECD-PTHR2 nachgewiesen werden. Das hier etablierte Renaturierungsprotokoll führt somit zur Ausbildung einer korrekten Disulfidverbrückung innerhalb der N-terminalen Domäne. Das Ergebnis bestärkt die Annahme, dass es ECD-PTHR2 möglich ist, in eine native Konformation zu falten. Die Identifizierung des konservierten Disulfidmusters bestätigt die native Struktur von ECD-PTHR2 und lässt eine definierte Sekundär- und Tertiärstruktur vermuten.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.2: Gegenüberstellung der theoretischen und detektierten Molekulargewichte der disulfidverbrückten Peptide in ECD-PTHR2.

Disulfidbrücke	Theoretisches Molekül in g/mol	Detektiertes Molekül in g/mol	Fehler in ppm	Peptid A	Peptid B
Cys48–Cys72	2231,155	2231,154	0,4	KAKVQC*EL NIT	IC*WPRGTVG
Cys63–Cys103	3676,564	3676,569	1,8	QEGEGNC*FP EWDGL	FNHKGVAFRH C*NPNGTWD
Cys63–Cys103	3710,548	3710,555	1,8	QEGEGNC*FP EWDG	FNHKGVAFRH C*NPNGTWDF
Cys63–Cys103	3823,632	3823,639	1,9	QEGEGNC*FP EWDGL	FNHKGVAFRH C*NPNGTWDF
Cys63–Cys103	3936,716	3936,719	0,7	LQEGEGNC*F PEWDGL	FNHKGVAFRH C*NPNGTWDF
Cys63–Cys103	3448,452	3448,458	1,4	QEGEGNC*FP EWDG	FNHKGVAFRH C*NPNGTW
Cys63–Cys103	3760,632	3760,634	0,4	AQLQEGEGN C*FPEWDG	FNHKGVAFRH C*NPNGTW
Cys63–Cys103	3391,431	3391,434	1,0	QEGEGNC*FP EW	FNHKGVAFRH C*NPNGTWD
Cys63–Cys103	3563,479	3563,484	1,3	QEGEGNC*FP EWDG	FNHKGVAFRH C*NPNGTWD
Cys63–Cys103	4635,033	4635,038	1,0	LQEGEGNC*F PEWDG	FNHKGVAFRH C*NPNGTWDF MHSLNKT
Cys63–Cys103	3561,536	3561,544	2,0	LQEGEGNC*F PEWDG	FNHKGVAFRH C*NPNGTW
Cys63–Cys103	3276,404	3276,405	0,3	QEGEGNC*FP EW	FNHKGVAFRH C*NPNGTW
Cys63–Cys103	3802,679	3802,681	0,5	QLQEGEGNC* FPEWDGL	FNHKGVAFRH C*NPNGTW
Cys86–Cys125	3025,493	3025,496	1,2	KISAVPC*PPY IYD	SDC*LRFLQPD ISIG
Cys86–Cys125	2855,387	2,855391	1,2	KISAVPC*PPY IYD	SDC*LRFLQPD IS
Cys86–Cys125	2626,245	2626,247	1,1	VPC*PPYIYD	SDC*LRFLQPD ISIG
Cys86–Cys125	2990,362	2990,365	1,1	VPC*PPYIYD	WANYSDC*LR FLQPDIS
Cys86–Cys125	2456,139	2456,141	0,8	VPC*PPYIYD	SDC*LRFLQPD IS
Cys86–Cys125	3389,611	3389,613	0,8	KISAVPC*PPY IYD	WANYSDC*LR FLQPDIS

C* = Cystein, was an der Ausbildung einer Disulfidbrücke beteiligt ist.

3 Ergebnisse

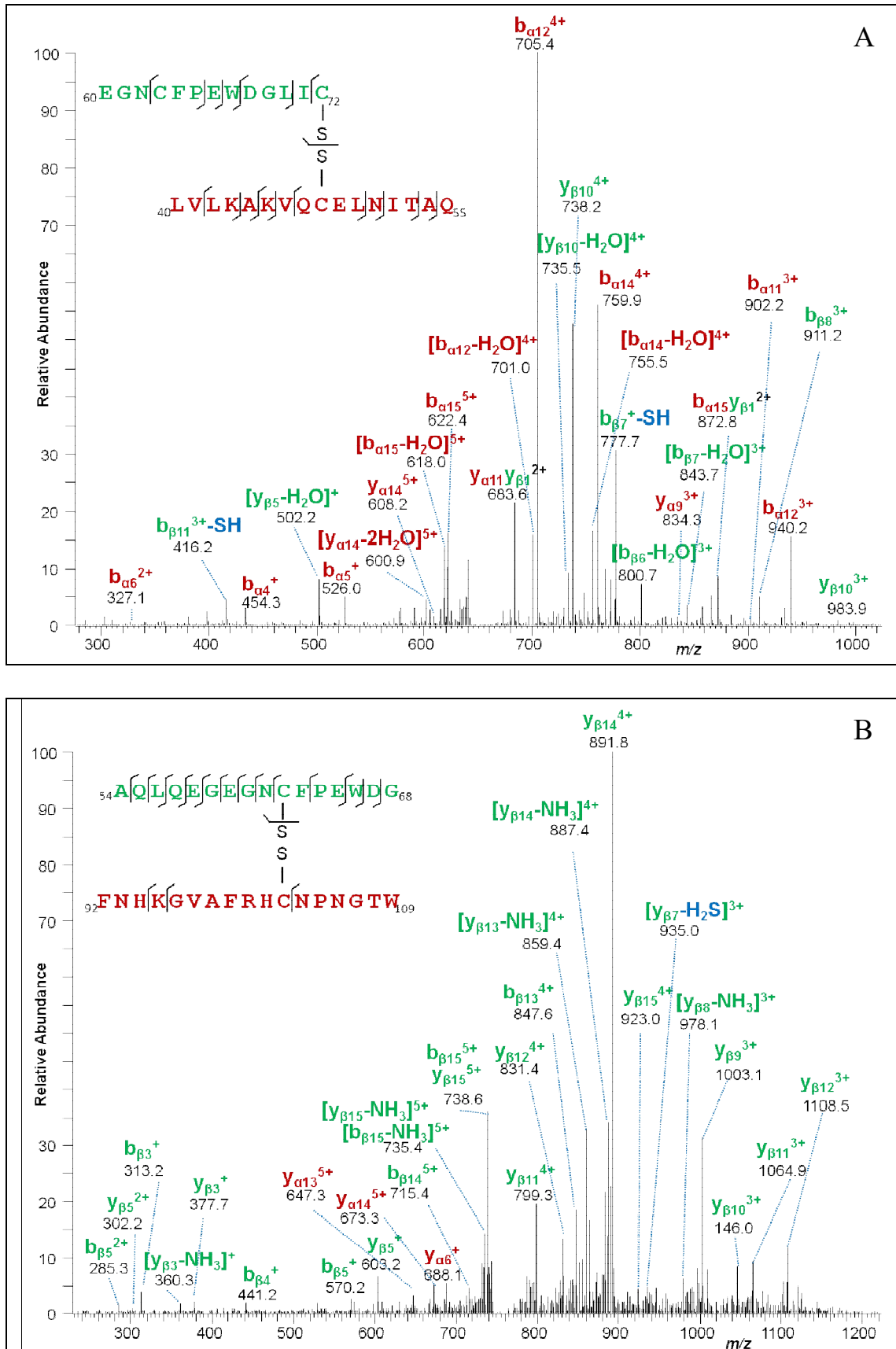
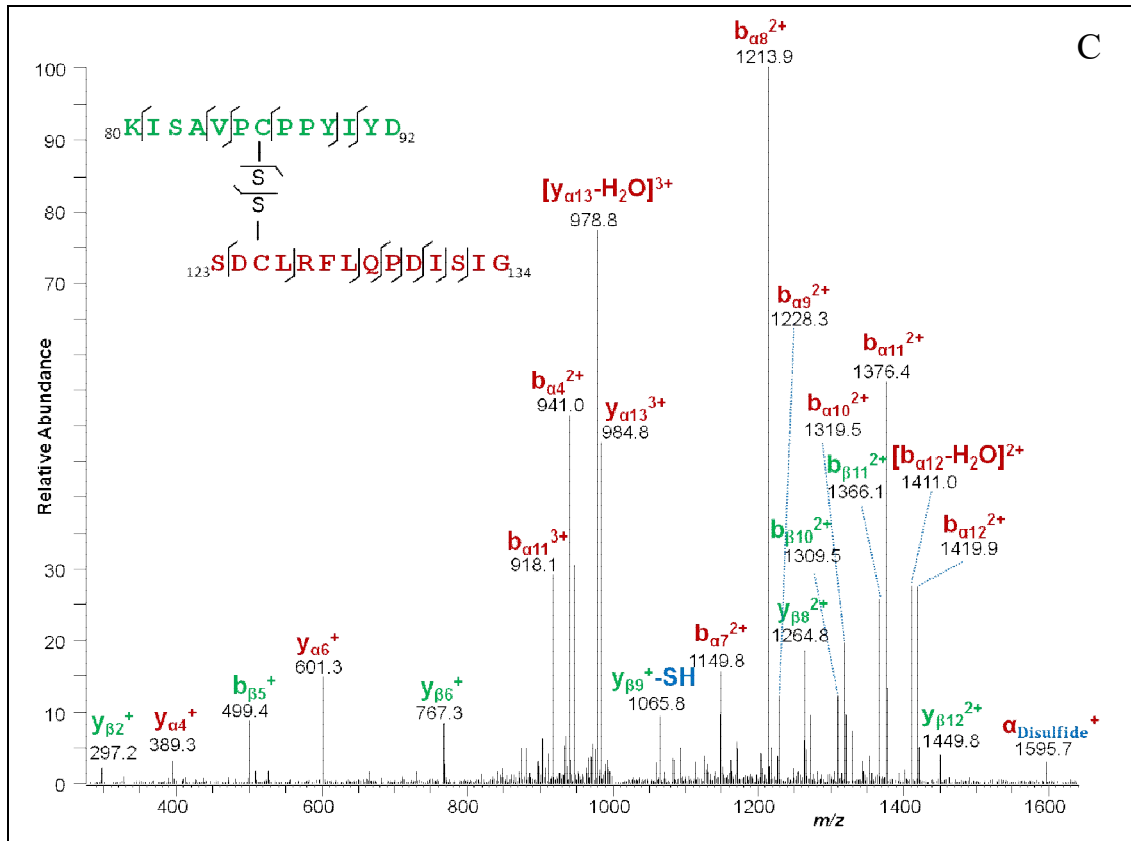


Abbildung 3.27: ESI-Massenspektren aus der Peptidsequenzierung durch *collision-induced dissociation*. **A:** Identifizierung der Disulfidbrücke 1 zwischen Cys48 und Cys72. **B:** Identifizierung der Disulfidbrücke 2 zwischen Cys63 und Cys103. **C:** Identifizierung der Disulfidbrücke 3 zwischen Cys86 und Cys125.



3.4.4 Spektroskopische Charakterisierung von ECD-PTHR2

Nachdem der native Zustand des ECD-PTHR2 belegt wurde, sollte im Folgenden die strukturelle Integrität und der Faltungszustand von ECD-PTHR2 untersucht werden. Die Ergebnisse können als Vergleichsdaten ECD-PTHR1 gegenüber gestellt werden. Dafür wurden Untersuchungen zur Charakterisierung der Sekundär- und Tertiärstruktur von ECD-PTHR2 durchgeführt.

UV-Absorption von ECD-PTHR2

Das UV-Absorptionsspektrum von renaturiertem und gereinigtem humanen ECD-PTHR2 zeigte ein charakteristisches Proteinspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 280 nm und einem Minimum bei 250 nm (Abb. 3.28 A). Das Maximum und die leichte Schulter bei 290 nm werden durch die Absorption der vier Tryptophane ausgelöst, die das Protein-UV-Absorptionsspektrum gegenüber den zwei Tyrosin- und fünf Phenylalaninresten dominieren.

Fern-UV-CD-spektroskopische Untersuchung von ECD-PTHR2

Zur Analyse der Sekundärstruktur von ECD-PTHR2 wurden fern-UV-CD-spektroskopische Untersuchungen für das native und das denaturierte Protein durchgeführt (Abb. 3.28 B). Das fern-UV-CD-Spektrum des rückgefalteten ECD-PTHR2 zeigte ein Hauptminimum bei 207 nm und ein leichtes Nebenminimum bei 230 nm. Die quantitative Abschätzung des Sekundärstrukturgehalts für natives ECD-PTHR2 erfolgte mit dem Programm CDPro/CONTINLL. Die Analyse über eine spektrale Breite von 200 nm bis 260 nm ergab einen α -helikalen Anteil von ca. 22 % und einen β -Faltblatt-Anteil von 24 %, sowie 33 % *random coil*. Die hier beobachtete Zusammensetzung der Sekundär-

strukturelemente von ECD-PTHR2 ist vergleichbar mit anderen Klasse B GPCR-Ectodomänen^[67, 68]. Fern-UV-CD-Spektren des denaturierten ECD-PTHR2 konnten wegen des starken Puffersignals von GdmHCl nur von 212 nm bis 260 nm aufgenommen werden. Dabei entsprach das Spektrum des entfalteten ECD-PTHR2 dem einer vollständig entfalteten Polypeptidkette^[250-252]. Vergleicht man die Spektren des nativen und des denaturierten ECD-PTHR2, ist ein deutlicher Unterschied in den Wellenlängenbereichen von 220 nm bis 240 nm zu erkennen.

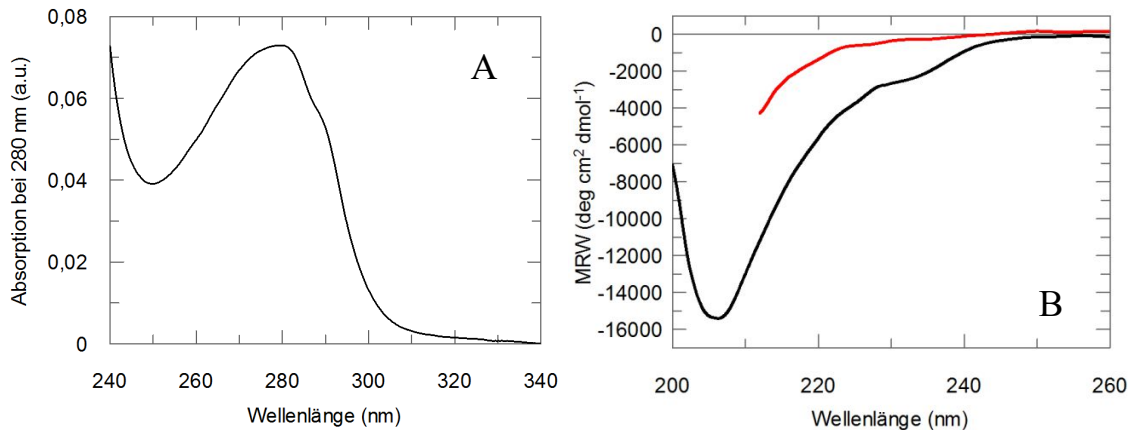


Abbildung 3.28: UV-Absorptions- und CD-Spektrum des gereinigten ECD-PTHR2. **A:** Das UV-Absorptionsspektrum wurde in 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5 gemessen. Die Messtemperatur lag bei 23 °C. Das Proteinspektrum wurde um den Beitrag des Pufferspektrums korrigiert. **B:** Sekundärstrukturanalyse des nativen und des denaturierten ECD-PTHR2 mittels fern-UV-CD-Spektroskopie. Spektren des nativen ECD-PTHR2 (schwarz) wurden in 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5 und Spektren für denaturiertes ECD-PTHR2 (rot) in 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 6 M GdmCl, pH 7,5 gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 25 µM. Die Messtemperatur lag bei 20 °C. Alle Spektren wurden 25fach akkumuliert und um den Beitrag des jeweiligen Pufferspektrums korrigiert. .

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von ECD-PTHR2

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von gefalteten Proteinen besteht in der Veränderung ihrer intrinsischen Tryptophanfluoreszenz, hinsichtlich Intensität und Wellenlänge des Emissionsmaximums, welche durch die Denaturierung ausgelöst wird. Um die Qualität und die Lösungsmittelexposition bzw. -umgebung der Fluorophore und der Tertiärstruktur von ECD-PTHR2 zu verifizieren, wurden Fluoreszenzemissionsspektren des nativen und denaturierten Proteins aufgenommen. Die N-terminale Domäne des PTH-Rezeptors 2 besitzt vier Tryptophan- und zwei Tyrosin-Aminosäurereste. Diese können genutzt werden, um konformationelle Informationen über ECD-PTHR2 bei Umgebungsänderungen zu gewinnen. Deshalb erfolgte eine Anregung von Tyrosin- und Tryptophanresten bei 280 nm (Abb. 3.29 A) und von Tryptophanresten alleine bei 295 nm (Abb. 3.29 B). Das Emissionsmaximum lag in beiden Fällen für das native ECD-PTHR2 bei 341 nm und zeigte eine Rotverschiebung von 9 nm für das denaturierte Protein bei 350 nm. Die Fluoreszenzintensität des denaturierten ECD-PTHR2 zeigte bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm eine 55%ige Zunahme im Vergleich zum nativen Zustand. Wenn die Tryptophanseitenketten eines Proteins im Lösungsmittel exponiert sind, liegt das Emissionsmaximum bei 350 nm, während eine hydrophobe Einbettung von Tryptophanresten zu Emissionsmaxima mit weitaus kürzeren Wellenlängen von 320 nm bis 340 nm führen^[250]. Das hier beobachtete Emissionsmaximum für natives ECD-PTHR2

von 341 nm liegt an der Grenze einer hydrophoben Einbettung von Tryptophan und weist auf eine partielle Exposition von aromatischen und hydrophoben Aminosäureseitenketten hin. Sie sind nicht vollständig im Inneren des Proteins verborgen. Die partielle Exposition kann aber mit dem fragmentarischen Charakter der renaturierten extrazellulären Domäne des PTHR2 erklärt werden, wie es schon für ECD-PTH1 beobachtet wurde^[67]. Aufgrund dieses Domänencharakters kann ECD-PTH2 wahrscheinlich nur eine partielle Strukturierung ausbilden.

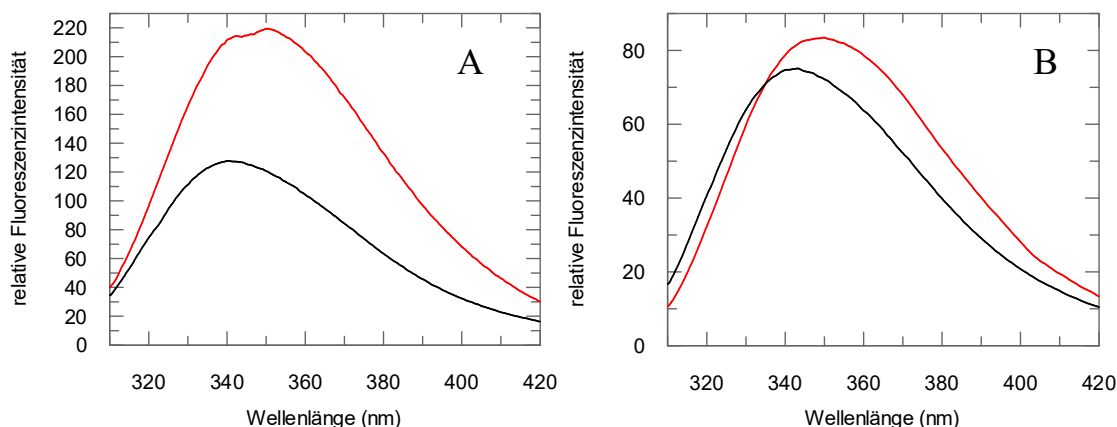


Abbildung 3.29: Fluoreszenzemissionsspektren von nativem und denaturiertem ECD-PTH2. Die Spektren des nativen ECD-PTH2 (schwarz) wurden in 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5 und die Spektren für denaturiertes ECD-PTH2 (rot) in 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 6 M GdmCl und pH 7,5 aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 1 µM. Die Messtemperatur lag bei 20 °C. Alle Spektren wurden 3fach akkumuliert. **A:** Fluoreszenzemissionsspektren von ECD-PTH2 bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm. **B:** Fluoreszenzemissionsspektren von ECD-PTH2 bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm.

ANS-Bindungsstudien an ECD-PTH2

Um in einem weiteren Schritt die partielle Exposition von hydrophoben Aminosäureseitenketten zu charakterisieren, wurde eine klassische Interaktion von ECD-PTH2 mit dem hydrophoben Farbstoff 8-Anilino-1-Naphtalensulfonat (ANS) untersucht. Durch die Bindung der unpolaren Anilino-Naphtalengruppe an hydrophobe Oberflächen von Proteinen ändert ANS seine Fluoreszenzeigenschaften^[254, 255]. Als Ergebnis der Bindung sind eine Verschiebung des Emissionsmaximums und ein Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten, sobald sich der Farbstoff in einer unpolaren Umgebung befindet. Diese Umgebung findet man vor allem in den hydrophoben Regionen, die in einem partiell strukturierten Protein wie ECD-PTH2 vorliegen. In wässriger und nicht proteingebundener Umgebung wird die Fluoreszenzemission des ANS-Moleküls wirkungsvoll durch die Lösungsmittelmoleküle gelöscht^[256]. Mit ANS-Bindungsstudien konnte auch der partiell hydrophobe Charakter von ECD-PTH1 nachgewiesen werden^[254].

In Abbildung 3.30 A und B sind die Fluoreszenzemissionsspektren des renaturierten und in Abbildung 3.30 C und D des denaturierten ECD-PTH2 in Gegenwart von ANS und als Referenz ANS in Abwesenheit von ECD-PTH2 gezeigt. ANS wurde in einem 100-fach molaren Überschuss, zum eingesetzten Protein gegeben. Die Anregung erfolgte bei 350 nm für ANS und 280 nm für das Protein. Die Fluoreszenzemissionsspektren von nativem ECD-PTH2 mit ANS und ANS allein zeigen deutliche Unterschiede.

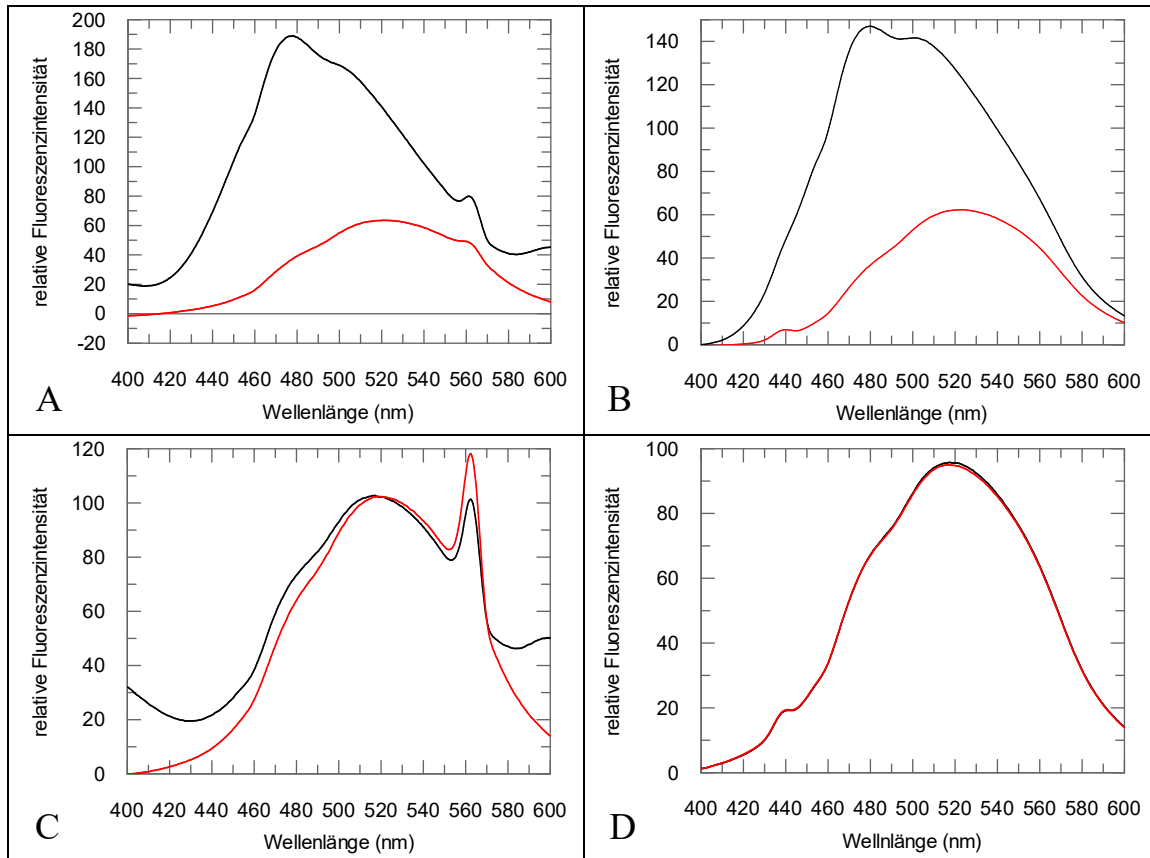


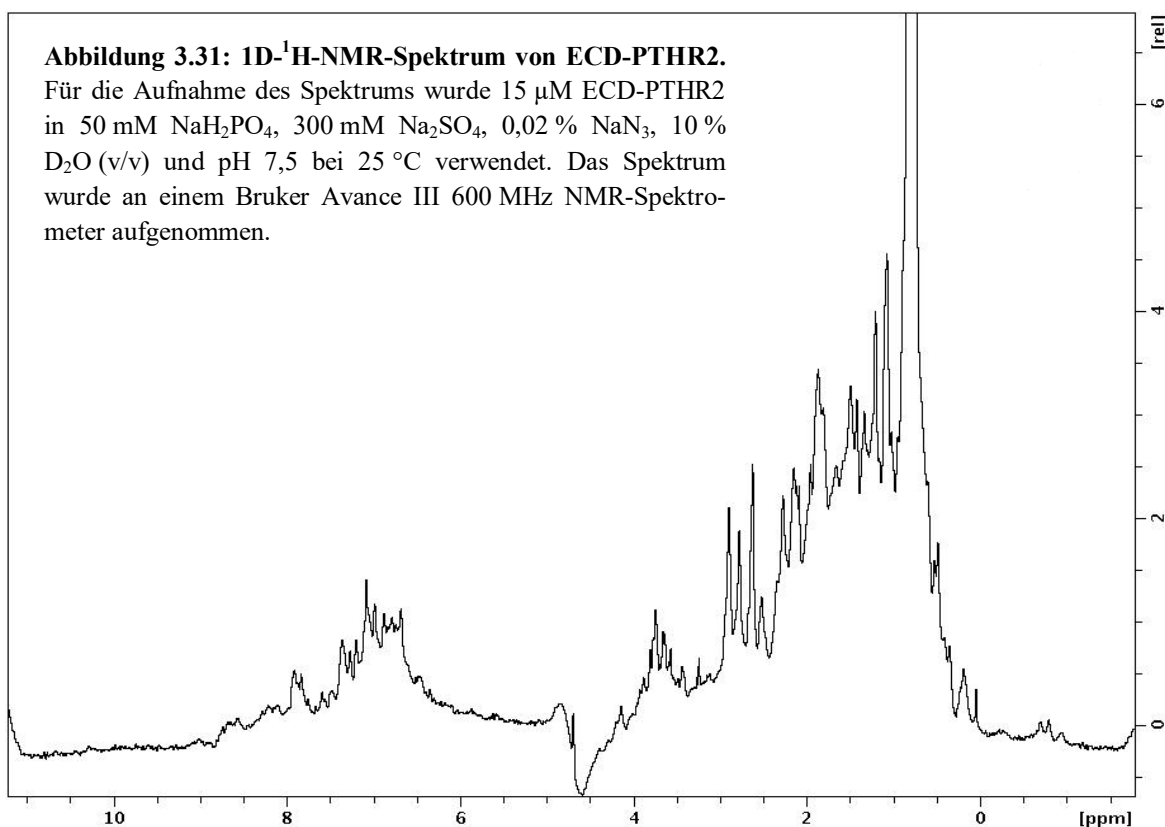
Abbildung 3.30: ANS-Bindungsstudien des nativen und denaturierten ECD-PTHR2. A und B: Fluoreszenzmissionsspektrum von 100 μM ANS in 50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,5 und Abwesenheit von nativem ECD-PTHR2 (rot). Fluoreszenzmissionsspektrum von ANS in 50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,5 und Gegenwart von 1 μM nativem ECD-PTHR2 (schwarz). **A:** Anregungswellenlänge 280 nm. **B:** Anregungswellenlänge 350 nm. **C und D:** Fluoreszenzmissionsspektren von 100 μM ANS in 6 M GdmCl, 50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,5 und Abwesenheit von ECD-PTHR2 (rot). Fluoreszenzmissionsspektrum von ANS in 6 M GdmCl, 50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,5 und Gegenwart von 1 μM denaturiertem ECD-PTHR2 (schwarz). **C:** Anregungswellenlänge 280 nm. **D:** Anregungswellenlänge 350 nm. Die Messtemperatur lag bei 20 $^\circ\text{C}$. Alle Spektren wurden 10fach akkumuliert.

Für beide Anregungswellenlängen (280 nm in Abb. 3.30 A und 350 nm in Abb. 3.30 B) zeigt das Emissionsmaximum von ANS, in Gegenwart von nativem ECD-PTHR2, eine Intensitätssteigerung und Verschiebung. Bei einer Anregung von 280 nm verschiebt sich das Maximum von 520 nm auf 477 nm und zeigt eine Intensitätssteigerung um den Faktor drei. Bei einer Anregung von 350 nm zeigt das Emissionsspektrum eine Intensitätssteigerung um den Faktor 2,5 und ein verschobenes Emissionsmaximum von 525 nm auf 483 nm. Diese Differenz zwischen Fluoreszenzintensität und Emissionsmaximum lässt darauf schließen, dass eine Bindung von ANS an hydrophobe Bereiche von ECD-PTHR2 und somit eine Interaktion stattgefunden hat. Der Vergleich der Emissionsspektren von ECD-PTHR2 mit ANS und ANS allein unter denaturierenden Bedingungen (6 M GdmCl) zeigt, dass die Interaktion mit ANS weitestgehend unterbunden wird. Bei einer Anregung mit 280 nm und 350 nm für ANS in An- und Abwesenheit von ECD-PTHR2 sind nur marginale Unterschiede für die Fluoreszenzintensität und das Emissionsmaximum, zu erkennen. Die gemessenen Fluoreszenzmissionsspektren deuten darauf hin, dass exponierte hydrophobe Bereiche in Form von Aminosäureseitenketten im renaturierten

ECD-PTH2 vorlagen und nicht alle im Inneren der Domäne eingebettet waren. Da mit ECD-PTH2 nur die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne des PTH-Rezeptors 2 hergestellt wurde, ist es wahrscheinlich, dass das Protein partielle Strukturierungen mit freiliegenden hydrophoben Bereichen und Aminosäureseitenketten zeigt. Die N-terminale Domäne des PTH-Rezeptors 2 zeigte in diesem Zusammenhang vergleichbare Eigenschaften hinsichtlich hydrophober Oberflächenstrukturen wie ECD-PTH1^[254].

Untersuchung des Faltungszustandes von ECD-PTH2 mittels 1D-¹H-NMR-Spektroskopie

Zur weiteren Charakterisierung der Tertiärstruktur und des Faltungszustandes von ECD-PTH2 wurde ein Protonen-NMR-Spektrum (1D-¹H-NMR-Spektrum) aufgenommen (Abb. 3.31). Das Spektrum zeigt eine gute Dispersion der Amidprotonen (6-10 ppm) und der aliphatischen Seitenketten (-1 bis 1 ppm). Ein oligomerer Zustand für ECD-PTH2 kann ausgeschlossen werden, denn dieser hätte eine stärkere Verbreiterung der Signale in diesen Bereichen zur Folge. Es kann auch davon ausgegangen werden, dass das Protein in einer gefalteten Struktur vorlag, in der die Methyl- und Amidprotonengruppen in eine definierte Tertiärstruktur eingebunden waren. Das Fehlen eines ausgeprägten Protonensignals der Tryptophanseitenketten, bei einer chemischen Verschiebung von ca. 10 ppm, ist ein guter Hinweis, dass die Tryptophane im Inneren des Proteins lokalisiert sind. Eine Lösungsmittelexposition des Amidprotons des Tryptophan-Indolrings hätte sonst ein deutliches Signal an dieser Stelle zur Folge. Das bestätigt auch die Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen Charakterisierung. Die Protonenresonanzen im Bereich von 0 ppm werden meist durch Methylprotonen im Inneren eines Proteins hervorgerufen und sind dadurch ein zusätzlicher Hinweis, dass EDC-PTH2 unter den gewählten Messbedingungen in einer gefalteten, strukturierten und kompakten Form vorlag.



3.4.5 Thermodynamische Stabilität von ECD-PTHR2

Zur Charakterisierung der thermodynamischen Eigenschaften von renaturiertem und nativem ECD-PTHR2 wurde die thermische Stabilität und die Stabilität gegenüber Guanidiniumchlorid untersucht. Auf diesem Weg sollte geklärt werden, ob ECD-PTHR2 eine vergleichbare Beschaffenheit gegenüber diesen Einflüssen besitzt, die auch für andere Klasse B GPCR Ectodomänen beschrieben wurden.

Thermische Stabilität von ECD-PTHR2

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität wurde der Temperaturübergang von nativem ECD-PTHR2 mit Hilfe von CD-Spektroskopie analysiert (Abb. 3.32). Die Messung erfolgte in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 85 °C. Die Änderung der Elliptizität wurde bei 210 nm beobachtet. Das renaturierte ECD-PTHR2 entfaltete zwischen 55 °C und 70 °C und zeigte einen Temperaturübergangsmittelpunkt T_m von $61,4 \pm 0,17$ °C. Erst oberhalb von 80 °C aggregierte das Protein quantitativ und irreversibel. Eine Aussage zur Änderung der freien Stabilisierungsenthalpie, Entropie und der Wärmekapazität (ΔC_p) des Proteins ist wegen der fehlenden Reversibilität nicht möglich^[206]. Dennoch liegt der ermittelte apparente Übergangsmittelpunkt T_m in einer vergleichbaren Größenordnung, die auch für die thermische Stabilität der Klasse B GPCR-Ectodomäne des PTHR1 bestimmt wurde^[67].

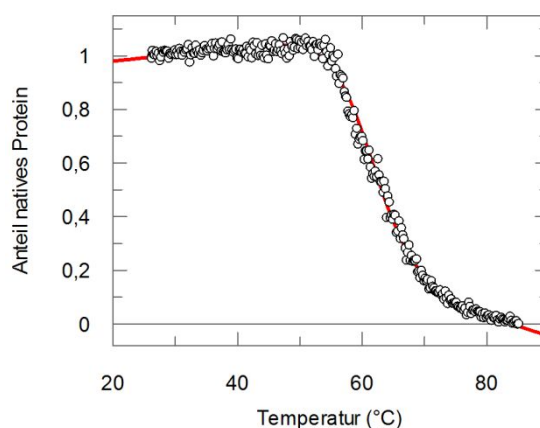


Abbildung 3.32: Analyse der thermischen Stabilität von ECD-PTHR2 mittels CD-Spektroskopie.

Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgte nach Pace und Scholz^[206]. Die rote durchgezogene Linie entspricht der Extrapolation, durch Anpassung an ein Zweizustandsmodell. Die Messung erfolgte in 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5. Die thermische Entfaltung wurde über ein Temperaturintervall von 25-85 °C beobachtet. Die Änderung des CD-Signals wurde bei 210 nm und einer Heizrate von 1 °C/min verfolgt. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 10 μM.

Chemische Stabilität von ECD-PTHR2

Die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen nativem und denaturiertem Zustand von ECD-PTHR2 in Abhängigkeit von einem chemischen Denaturierungsmittel wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Dafür wurde die Stabilität von ECD-PTHR2 gegenüber dem Denaturierungsmittel Guanidiniumchlorid in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 6 M analysiert. Die Änderung des Fluoreszenzsignals während der Guanidiniumchlorid induzierten Entfaltung wurde bei 335 nm und einer Messtemperatur von 20 °C verfolgt. Die erhaltene Kurve des Guanidiniumchlorid induzierten Gleichgewichtsübergangs

(Abb. 3.33) wurde anschließend auf eins für vollständig gefaltetes Protein normiert. Die chemische Entfaltung von ECD-PTH2 war reversibel. Die quantitative Auswertung nach einem Zweizustandsmodell ergab eine freie Stabilisierungsenergie $\Delta G_U(H_2O)$ von $6,1 \pm 1,4$ kJ/mol und einen Übergangsmittelpunkt bei 3,0 M GdmCl. Die Kurve zeigt mit $2,1 \pm 0,3$ kJ/(mol M) eine geringe Kooperativität für den Übergang vom gefalteten in den entfaltenen Zustand, wie es jedoch typisch für die GPCR-Ectodomänen der Klasse B ist^[253, 254]. ECD-PTH2 bildete folglich eine strukturierte Domäne mit einer geringen thermodynamischen Stabilität.

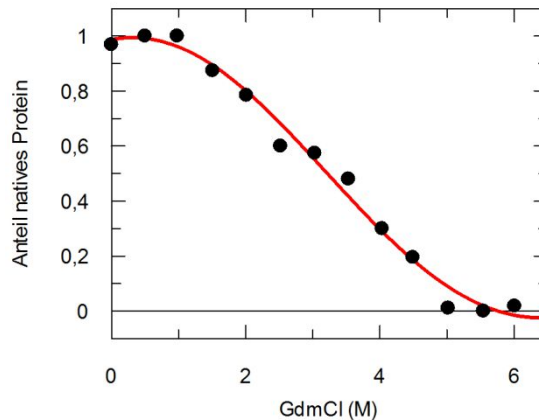


Abbildung 3.33: Analyse der chemischen Stabilität von ECD-PTH2 mittels Guanidiniumchlorid induzierter Denaturierung. Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgte nach Pace und Scholz^[206]. Die rote durchgezogene Linie entspricht der Extrapolation, durch Anpassung an ein Zweizustandsmodell. Für die Messung wurde das renaturierte und gereinigte Protein in 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5 und unterschiedlichen GdmHCl-Konzentrationen verdünnt, über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend die Änderung des Fluoreszenzsignals bei 335 nm detektiert. Die genaue Ermittlung der GdmCl-Konzentration erfolgte durch Refraktometrie und der Bestimmung der Brechungsindizes in den Messlösungen.

3.4.6 Untersuchung zur Wechselwirkung von ECD-PTH2 mit TIP 39 und PTH (1-84)

Nachdem durch spektroskopische und massenspektrometrische Analysen gezeigt wurde, dass ECD-PTH2 zu einer strukturierten und nativen Proteindomäne mit konservierten Disulfidbrücken renaturiert werden konnte, sollte anschließend, mit einem qualitativen Nachweis einer Interaktion zwischen Domäne und TIP 39 und PTH (1-84), die Bindungskompetenz von ECD-PTH2 untersucht werden. Die Liganden TIP 39 und PTH (1-84) sind spezifische Agonisten für den PTH-Rezeptor 2 und wurden als Interaktions- und Rezeptoraktivierungspartner bei der Aufklärung der physiologischen Funktion von PTHR2 identifiziert^[84, 185]. In PTHR2 exprimierenden HEK293-Zellsystemen werden die beiden Liganden am Rezeptor gebunden und dieser infolgedessen aktiviert^[84, 135, 139, 185]. Es wird angenommen, dass die renaturierte und funktionale N-terminale Domäne mit ihren Agonisten interagiert. Eine Wechselwirkung zwischen den Agonisten TIP 39 und PTH (1-84) und der renaturierten N-terminalen extrazellulären Domäne des PTH-Rezeptors 2 wurde durch Nativ-Gelelektrophorese überprüft. Hierfür wurden ECD-PTH2 und eine Mischung aus gleichen molaren Verhältnissen von ECD-PTH2 mit den jeweiligen Peptidhormonen auf das native Polyacrylamidgel aufgetragen (Abb. 3.34).

Die verwendeten Interaktionsansätze wurden vor der elektrophoretischen Trennung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von äquimolaren Mengen an TIP 39 (Bahn 2) und PTH (1-84) (Bahn 3) zu ECD-PTHR2 zeigte sich im Vergleich zur Laufbande von ECD-PTHR2 (Bahn 1) eine deutliche Verschiebung der Banden zu höheren Molekulargewichten. Es hatte also eine Komplexbildung zwischen den Interaktionspartnern stattgefunden. Die Tatsache, dass keine zusätzliche Bande auf der Höhe der verwendeten Peptide auftauchte, bestärkt die Annahme, dass eine vollständige Komplexierung von ECD-PTHR2 mit TIP 39 oder PTH (1-84) aufgetreten war. Die hier durchgeführte native PAGE war somit ein qualitativer Nachweis, dass eine Interaktion zwischen ECD-PTHR2 und den beiden Liganden stattgefunden hat.

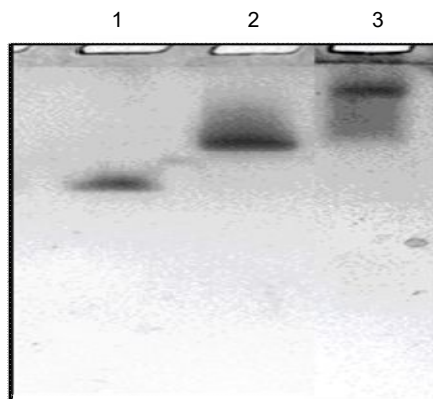


Abbildung 3.34: Native-Gelelektrophorese von ECD-PTHR2 mit TIP 39 und PTH (1-84). 12%iges (w/v) Acrylamidgel und Coomassie-Färbung. 1: ECD-PTHR2, 2: ECD-PTHR2 + TIP 39 im molaren Verhältnis von 1:1, 3: ECD-PTHR2 + PTH (1-84) im molaren Verhältnis von 1:1. Die Gemische von ECD-PTHR2 mit dem Peptid TIP 39 und PTH (1-84) wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung 1 h bei RT inkubiert.

3.4.7 Ligandenbindungseigenschaften von ECD-PTHR2

Nachdem eine qualitative Interaktion zwischen ECD-PTHR2 mit den Liganden TIP 39 und PTH (1-84) gezeigt werden konnte, wurde mit Hilfe der Fluoreszenztitration die konzentrationsabhängige Ligandenbindung an die N-terminale extrazelluläre Domäne des PTHR2 quali- und quantitativ analysiert. Die Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz von ECD-PTHR2 bei Ligandenzugabe ist in Abbildung 3.35 dargestellt. Für die Messungen wurde, wie unter 2.5.3 beschrieben, 1 μ M Proteinlösung ECD-PTHR2 in der Fluoreszenzküvette inkubiert. Nach Einstellung eines stabilen Fluoreszenzsignals wurde der gewählte Ligand schrittweise zur Rezeptordomäne titriert. Die Tryptophanfluoreszenz wurde bei 295 nm angeregt und die Emissionsspektren über einem spektralen Bereich von 320-400 nm aufgenommen. Zur Analyse der Änderung der intrinsischen Fluoreszenz während der Titration wurde die Wellenlänge bei 342 nm gewählt. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration wurde bis zur Sättigung der Rezeptordomäne beobachtet. Die Änderung des Fluoreszenzsignals ist ein deutlicher Hinweis auf eine Komplexbildung zwischen den Bindungspartnern. Nach weiterer Zugabe des Liganden über diesen Sättigungspunkt hinaus konnte eine lineare Zunahme des Fluoreszenzsignals verfolgt werden. Diese lineare Zunahme der Fluoreszenzintensität wurde durch die intrinsische Eigenfluoreszenz der verwendeten Liganden

ausgelöst. In Kontrollversuchen, konnte durch Liganden-Titrationsexperimente ohne ECD-PTHR2 ein durchgehend linearer Anstieg der intrinsischen Eigenfluoreszenz der Liganden nachgewiesen werden (Anhang 2, Abb. 2.1), was die Spezifität der Interaktion zwischen der Domäne und den Liganden bestätigte. Aus diesem Grund wurden zur Auswertung der Fluoreszenztitration die erhaltenen Messwerte um den Beitrag der intrinsischen Fluoreszenz der Liganden, mit Hilfe einer Ausgleichsgeraden, korrigiert und anschließend auf 100 % normiert (Abb. 3.35). Die Ermittlung der Dissoziationskonstanten für die Komplexbildung von ECD-PTHR2 mit den entsprechenden Liganden erfolgte nach Gleichung 2.10 und unter der Annahme eines stöchiometrischen Verhältnisses von 1:1. Die ermittelte Dissoziationskonstante K_D für die Bindung von TIP 39 an ECD-PTHR2 lag im unteren mikromolaren Bereich von $0,63 \pm 0,06 \mu\text{M}$, während PTH (1-84) eine ca. zweifach verminderte Affinität zeigte (K_D von $1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$).

Mit Hilfe der Fluoreszenztitrationen wurde die biochemische Funktionalität des heterolog produzierten ECD-PTHR2 gegenüber den spezifischen Agonisten TIP 39 und PTH (1-84) zumindest im Prinzip belegt. Die ermittelten Dissoziationskonstanten stellen meines Wissens die ersten in der Literatur beschriebenen *in vitro* Bindungsdaten dar.

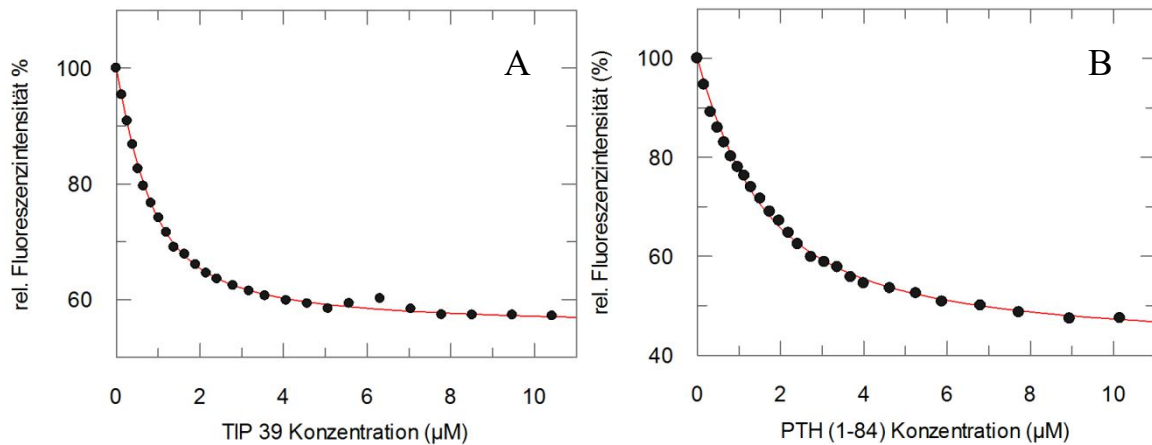


Abbildung 3.33: Gleichgewichts-Fluoreszenztitration von ECD-PTHR2 mit Agonisten PTH (1-84) und TIP 39. A: Titration von PTH (1-84), B: Titration von TIP 39. Jeweils eine $1 \mu\text{M}$ ECD-PTHR2-Proteinlösung wurde mit den Agonisten in $20 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, $300 \text{ mM Na}_2\text{SO}_4$, pH 6,0 bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ titriert. Die bei 295 nm angeregte Fluoreszenz von ECD-PTHR2 wurde bei 342 nm verfolgt. Die Messwerte wurden jeweils um die Pufferfluoreszenz und die intrinsische Fluoreszenz der Agonisten PTH (1-84) und TIP 39 in Abwesenheit des Proteins korrigiert. Anschließend wurden die Messwerte durch nichtlineare Regression gemäß der quadratischen Gleichung 2.10 angepasst und die Dissoziationskonstanten bestimmt.

4 Diskussion

4.1 Optimierte SUMO-Fusionsstrategie zur Produktion von humanem PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39

Hormonpeptide sind eine wertvolle Gruppe von Molekülen und sind von besonderem Interesse für Strukturbiologen und in der pharmazeutischen Industrie. Peptidhormone spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung, aber auch bei der Behandlung von gesellschaftsrelevanten Stoffwechselkrankheiten wie Osteoporose, Diabetes, Alzheimer oder Herzrhythmusstörungen^[257]. Die Herstellung von Peptidhormonen mit Hilfe rekombinanter Methoden ist eine leistungsfähige Möglichkeit, Peptide in ausreichenden Mengen zu gewinnen, um sie als Medizin oder für strukturelle Untersuchungen einzusetzen. Die rekombinanten Peptid-Technologien bieten, im Gegensatz zur chemischen Synthese oder natürlichen Extraktion von Peptiden aus Zellgewebe, eine schnelle und kostengünstige Alternative zur Gewinnung von Peptiden mit spezifisch, chemisch modifizierten Aminosäuren und zur Isotopenmarkierung für NMR-Proben^[199, 258-261]. Sie erlauben auch die Herstellung von Peptiden, die beim heutigen Stand für eine chemische Peptidsynthese unzugänglich sind^[260]. Für die rekombinante Expression von Peptiden wurden, mit unterschiedlichem Erfolg, in den letzten beiden Jahrzehnten einige Fusionsprotein-Systeme ausprobiert. Die Verwendung von Fusionsproteinen ist nötig, weil die rekombinante Expression von kurzen Peptidsequenzen in einer Zellkultur sehr mangelhaft verläuft. Aufgrund ihres unstrukturierten Zustands sind Peptide in Lösung sehr anfällig für zelluläre Proteasen^[265]. Zusätzlich kann eine rekombinante Peptidproduktion auch zu starken zellulären toxischen Effekten während der Expression führen^[259]. Durch den Einsatz eines Fusionspartners kann letztendlich die Peptidlöslichkeit und Stabilität während der Expression verbessert, aber auch ein Schutz vor proteolytischem Abbau ermöglicht werden. Als Fusions-Systeme werden unter anderem die Glutathion-S-Transferase (GST)^[262], das Maltose-Bindeprotein (MBD)^[263], das *Globular Protein 1* (GB-1)^[261] oder die SUMO-Fusion^[199] verwendet. Bei der Anwendung dieser Systeme werden die Zielpeptide durch eine chemische oder enzymatische Spaltung von ihrem tragenden Fusionspartner abgetrennt und anschließend mittels Flüssigchromatographie gereinigt^[199, 261-264].

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines leistungsstarken Protokolls zur Herstellung der Peptidhormone PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39 in unmarkierter und ¹⁵N- und/oder ¹³C- isotopenmarkierter Form. Sie sollen so für Ligandenbindungsstudien und NMR-Strukturuntersuchungen mit den humanen Parathormon-Rezeptoren 1 und 2 zur Verfügung stehen. Eine chemische Peptidsynthese der isotopenmarkierten Liganden zur Verwendung in, NMR-Studien ist möglich, aber sehr teuer. Eine rekombinante Produktion von Peptiden in Bakterien ist daher eine kostengünstige Alternative.

Die Peptidliganden PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39 wurden durch die Übertragung der von Bosse-Dönecke *et al.*^[199] entwickelten SUMO-Fusionsmethode hergestellt. Diese Strategie wurde gewählt, weil mit dieser Methode, unter Verwendung eines His₆-SUMO-Fusionspartners, eine spezifische und effiziente Reinigung von verschiedenen Peptidliganden für den PTH- und GLP1-Rezeptor gelungen war. Ein weiterer wichtiger Vorteil gegenüber anderen Fusionsmethoden ist die Erzeugung von Zielpeptiden mit einem

authentischen N-Terminus, durch eine spezifische Abspaltung des Zielpeptids, mittels SUMO-Protease Ulp1, direkt am C-Terminus des SUMO-Fusionsproteins. Im Vergleich zum Standardprotokoll^[199] wurde für die Expression der Fusionsproteine SUMO-PTH (1-84), SUMO-PTH (15-34) und SUMO-TIP 39 ebenfalls eine lösliche Expression beobachtet. Jedoch konnte mit den hier entwickelten und optimierten Protokollen eine deutlich schnellere Präparation und gesteigerte Ausbeute an Peptiden, die umgehend auch für NMR-Studien verwendet werden konnten, erreicht werden. Ein neues Schlüsselement in den hier durchgeführten Peptid-Präparationen ist die Reduzierung der SUMO-Spaltungsreaktion, von vormals zwölf auf zwei Stunden. Zusätzlich konnte im finalen Reinigungsschritt der Peptide die Reinigungszeit weiter verkürzt werden. Statt der HPLC-Reinigung und der Acetonitrileinengung, wie bei Bosse-Dönecke *et al.* beschrieben, wurde eine Gelfiltration durchgeführt, mit der eine gute Trennleistung und Isolierung der einzelnen Peptide gelungen war. Auf die verwendeten Säulen konnte deutlich mehr Probenvolumen aufgetragen und Peptid eluiert werden. Außerdem entfiel die aufwendige Entfernung von Acetonitril. Im Zusammenhang mit proteolytischem Abbau der Peptide, der für die Präparation von PTH (15-34), TIP 39 und auch schon im Standardprotokoll für die Herstellung weiterer PTH-Peptidvarianten wie PTH (1-34)^[199] beobachtet wurde, konnte so wertvolle Zeit gewonnen werden und die Reinigungszeit von typischerweise ca. drei Tagen auf ein bis eineinhalb Tage verringert werden. Um einen starken proteolytischen Abbau der Peptide schon während des Zellaufschlusses und der ersten Reinigungsschritte zu umgehen, wurde von Beginn an mit Proteaseinhibitoren gearbeitet. Während für die Reinigung von PTH (15-34) eine Unterbindung von Abbauprodukten erreicht wurde, war dies bei TIP 39 nicht möglich. Hier tauchte trotz zügigen Arbeitens und der Proteaseinhibitoren wiederholt das Fragment TIP 27 auf. Dies erfolgte sowohl bei der Expression von unmarkiertem Peptid, als auch bei der Expression von isotonenmarkiertem TIP 39. Möglicherweise wird das verkürzte TIP-Fragment schon während der Expression durch einen Kettenabbruch gebildet oder SUMO-TIP 39 wird direkt nach erfolgreicher Prozessierung wieder in der Zelle durch Proteasen abgebaut. Abhängig vom verwendeten Peptid-Konstrukt und den Expressionsbedingungen (unmarkiert und isotonenmarkiert), konnten für die Herstellung der Peptide Ausbeuten im unteren Milligrammbereich für TIP 39 und PTH (15-34) und deutlich größere Milligrammmengen für PTH (1-84) erreicht werden. Die hier erzielten Mengen lagen mindestens um den Faktor zwei über den bekannten Literaturwerten, die für die Herstellung von unmarkierten Peptidliganden des GLP1-Rezeptors und des PTHR1 erreicht wurden^[199].

Bedenken, dass eine saubere Isolierung der Zielpetide PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39 mit der hier durchgeführten Reinigungsprozedur nicht möglich ist, wurden durch massenspektrometrische Analysen widerlegt. Die für Bindungsanalysen und NMR-Experimente verwendeten Peptide konnten in ihrer Identität und Reinheit durch MALDI-TOF oder ESI-Massenspektrometrie bestätigt werden. Dass die hier rekombinant hergestellten Peptidliganden, in physiologischer Umgebung, weitestgehend ähnliche strukturelle Eigenschaften mit ihren synthetischen Verwandten PTH (1-34), PTH (1-37)^[109, 111] und TIP 39^[150] haben, zeigen fern-UV-CD-Spektren. Sie geben keine eindeutigen α -helikalen CD-Spektren wieder und indizieren damit geringe Anteile an Sekundärstrukturelementen. Die hier hergestellten Peptide besitzen somit eine sehr hohe Qualität.

Wichtig ist auch die multidimensionale NMR-Analyse der rekombinant hergestellten Peptide. Die hier angewendeten Protokolle belegen, dass die Herstellung von ^{15}N - und/oder ^{13}C -isotopenmarkierten Peptiden mit hoher Qualität möglich ist und diese für NMR-basierte strukturelle Analysen und Bindungsstudien mit den Ectodomänen der Parathormon-Rezeptoren zugänglich sind. Für PTH (1-84) und PTH (15-34) konnte erstmalig eine weitestgehend vollständige Zuordnung der Amidprotonenresonanzsignale des Peptidrückrats und der Aminosäureseitenketten im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum erreicht werden. Eine Zuordnung der Amidprotonenresonanzsignale im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum für TIP 39 steht noch aus und muss zukünftig erfolgen. Die Identifizierung und Zuordnung von Amidprotonenresonanzsignalen ist ein guter Nachweis für die hohe Reinheit und Konstitution der rekombinant hergestellten Peptide. Die Zuordnung der einzelnen Amidprotonenresonanzsignale im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum ist auch ein wichtiger Zwischenschritt zur strukturellen Aufklärung des Bindungs- und Selektionsvermögens der PTH-Rezeptoren 1 und 2. Durch nachfolgende NMR-Titrationsexperimente mit den N-terminalen Ectodomänen des PTHR1 (M. Gopalswamy, Dissertation in Vorbereitung, Arbeitsgruppe Biophysik, MLU Halle-Wittenberg) und PTHR2, sowie mit den Gesamtzeptoren, ist zukünftig eine hochaufgelöste Analyse und Identifikation einzelner Bindungs epitope in den Peptidliganden möglich. Die Ergebnisse können dann in einem Vergleich mit bekannten Literaturdaten gegenübergestellt und möglicherweise um zusätzliche Informationen ergänzt werden. Auf diesem Weg konnte bereits der Bindungsbereich des verkürzten und isotoopenmarkierten PTH (1-34) um weitere C-terminal lokalisierte Aminosäuren erweitert werden, die an der Bindung der Ectodomäne des PTHR1 beteiligt sind. Für PTH (1-34) wurde somit das von Gardella und Jüppner postulierte *two domain binding* Modell^[85, 98, 140, 155] bestätigt und das vorher beschriebene Rezeptor-Bindungs-Fragment des PTH-Liganden (Aminosäure Arg20-Val31), beginnend um den Bereich von Gly12 bis Phe34^[179], erweitert. Das ebenfalls vermutete Rezeptor-Aktivierungs-Fragment von PTH (1-34) (Aminosäure Ser1-Glu19), welches mit Transmembranbereichen und extrazellulären *Loop*-Strukturen des Gesamtzeptors interagiert, konnte in diesem Fall in einer verkürzten Form von Ser1 bis Asn10 eingegrenzt werden^[179]. Auch die bekannte Kristallstruktur des Rezeptor-Ligand-Komplexes, bestehend aus ECD-PTHR1 und PTH (15-34)^[78], wurde mit Hilfe dieser NMR-Experimente für den löslichen Zustand des Komplexes verifiziert. Die weitere Aufklärung des Interaktionsmechanismus und die Identifizierung von Bindungs epitopen für die Bindung bekannter und neuer Agonisten und Antagonisten an PTHR1 und PTHR2 ist hilfreich bei der Entwicklung neuer und affinerer Liganden zur Behandlung von Osteoporose oder Herzrhythmusstörungen. Mit der in dieser Arbeit weiterentwickelten SUMO-Fusionsmethode konnten die PTHR1- und PTHR2-Rezeptorliganden PTH (1-84), PTH (15-34) und TIP 39 in ausreichenden Mengen (Milligramm) hergestellt und somit ein wichtiger Schritt für eine weiterführende biophysikalische und hochaufgelöste Strukturuntersuchung der Peptidliganden allein und im Komplex mit ECD-PTHR1 und ECD-PTHR2 etabliert werden.

4.2 Ligandenphosphorylierung führt zur GPCR-Regulation

Die posttranslationale Modifikation eines Proteins oder Hormons kann dessen Aktivität und Funktion ändern. Die wohl am häufigsten vorkommende sind Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen^[266, 267]. Phosphoryliertes PTH (1-84) wurde schon in den Achtzigerjahren des letzten Jahrhunderts identifiziert^[190]. Welche Rolle es jedoch bei intrazellulären Signaltransduktionsprozessen und der Regulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren spielt, wurde bisher nicht untersucht. Aus diesem Grund wurde zusammen mit Amit Kumar (MLU), M. Gopalswamy (MLU) und einigen Mitarbeitern von Dan Donnelly (Universität Leeds) die Funktion und der Einfluss von phosphoryliertem humanen PTH (1-84) auf die humanen Parathormon-Rezeptoren 1 und 2 charakterisiert. Die *in vitro* Phosphorylierung des rekombinant hergestellten humanen PTH (1-84) wurde mit der Behandlung durch ein Zellysate aus HEK 293 oder mit einem Zellextrakt aus Nebenschilddrüsenzellen des Rindes erreicht. Die verwendeten Zellysate besaßen eine große Anzahl verschiedener Kinasen, von denen eine oder mehrere PTH (1-84) phosphorylieren konnten. Die Verwendung einer spezifischen oder mehrerer spezifischer Kinasen war nicht möglich, weil sie bis heute nicht identifiziert wurden. Die Identifizierung dieser Kinase(n) bleibt damit Gegenstand weiterer Forschung. Häufig dienen Serin- oder Threoninreste als Phosphorylierungsstellen in Proteinen^[266]. Bei früheren Untersuchungen konnten Phosphoserinreste in isoliertem PTH nachgewiesen werden^[190], um welche es sich dabei handelt, blieb aber unklar. Mit der Hilfe von MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnten, nach *in vitro* Phosphorylierung, quantitativ drei Phosphatgruppen pro Hormonpeptid detektiert werden. Humanes PTH (1-84) besteht aus drei spezifischen Bereichen. Der Aminosäurebereich Ser1 bis Arg20 spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion des Peptids mit Transmembran- und *Loop*-Bereichen, sowie bei der Aktivierung des PTH-Rezeptors, während der Bereich von Val21 bis Lys37 für die Rezeptorbindung verantwortlich gemacht wird (1.2.3, Abb. 1.9, *two-domain-binding* Modell)^[85, 98, 102, 179, 199]. Die Funktion des Aminosäurebereichs Gly38 bis Glu84 ist bis heute unklar. Es gibt jedoch einige Hinweise auf die Präsenz von Rezeptoren, die selektiv C-terminale PTH-Fragmente binden^[88, 89, 107, 108]. Die Phosphorylierung von Proteinen kann zu einer konformationellen Neuordnung und Änderung von strukturellen Eigenschaften führen^[267]. Eine Phosphorylgruppe fügt an das Protein eine negative Ladungen an. Infolge dieser Reaktion können bestehende elektrostatische Wechselwirkungen im Protein unterbrochen und möglicherweise an anderer Stelle neu gebildet werden. Freies und rezeptorgebundenes PTH zeigt α -helikale Strukturelemente. In der Kristallstruktur, zusammen mit der N-terminalen Domäne des PTHR1, werden diese ausgehend von Aminosäure Ser17 bis Val31 beschrieben^[78], wohingegen in Lösung α -helikale Strukturelemente im N-terminalen (Ser1-Lys13) und C-terminalen Bereichen (Met18-Phe34) des Peptids beobachtet werden^[109]. Zusätzlich wird angenommen, dass sich im Blutkreislauf befindliches *in vivo* PTH posttranslationale Modifikationen, sowie strukturelle Änderungen im N-terminalen Rezeptorbindungsbereich von Gly12-Arg20 besitzt^[190, 286, 287]. Darüber hinaus ist der Aminosäurebereich Ser1 bis Met8 essentiell für die Rezeptoraktivierung^[288] und Asn10 und Leu11 wichtig für die Stabilisierung α -helikaler Strukturelemente im Parathormon^[289]. PTH (1-84) besitzt sieben Serinreste in seiner Aminosäuresequenz. Es handelt sich hierbei um das im N-terminalen Bereich lokalisierte Ser1, Ser3 und Ser17, sowie um das C-terminal lokalisierte Ser48, Ser62, Ser66 und Ser83. Welche spezifischen

Aminosäurereste nun in PTH (1-84) phosphoryliert sind, wurde durch NMR-spektroskopische Experimente an unmarkiertem und ^{15}N -isotopenmarkiertem PTH (1-84) ermittelt. Mit der Aufnahme von ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren und 1D- ^{31}P -NMR-Spektren des phosphorylierten und dephosphorylierten Zustands von PTH (1-84)^[185] und einer Gegenüberstellung der massenspektrometrischen Ergebnisse wurden die N-terminal lokalisierten Aminosäuren Ser1, Ser3 und Ser17 eindeutig als Phosphorylierungsstellen identifiziert. Dass die drei Phosphatgruppen, mit ihren negativen Ladungen, eine strukturelle Veränderung in phosphoryliertem PTH (1-84) auslösen und α -helikale Strukturmerkmale verändern, zeigen NMR-spektroskopische Untersuchungen, bei denen eine Änderung der chemischen Verschiebung über den Aminosäurebereich Val2-Ala36 nachgewiesen wurde^[185]. Damit sind also Aminosäurebereiche des Parathormons von strukturellen Änderungen betroffen, die wichtig für die Erkennung von transmembranen Helices und *Loop*-Regionen des Rezeptors, sowie der Rezeptoraktivierung sind. Diese strukturellen Änderungen haben aber keinen Einfluss auf die Rezeptorbindung. NMR-Titrationsexperimente zeigen, dass phosphoryliertes PTH (1-84) auch weiterhin in der Lage ist die extrazelluläre N-terminale Domäne des PTHR1 zu binden^[185]. Die Phosphorylierung und damit verbundene strukturelle Modifikation von PTH (1-84) führt letztlich nicht zum Verlust von Bindungseigenschaften, aber zu veränderten Aktivierungseigenschaften gegenüber den PTH-Rezeptoren. Welchen biologischen Einfluss und Relevanz die durch Phosphorylierung ausgelösten strukturellen Veränderungen von PTH (1-84) im Bezug auf die Rezeptoraktivierung und der damit verbundenen Signaltransduktion haben, wurde hier mit dephosphoryliertem und phosphoryliertem PTH (1-84) an PTHR1- und PTHR2-exprimierenden Zellsystemen untersucht. In intrazellulären cAMP-Akkumulationsassays konnte einzig für nicht phosphoryliertes humanes PTH (1-84) eine biologische Aktivität gegenüber den Parathormon-Rezeptoren 1 und erstmalig auch für den Parathormon-Rezeptor 2 nachgewiesen werden. Ein vergleichbares Verhalten wurde auch schon für verkürztes PTH (1-34) beschrieben^[98] und konnte hier für C-terminal verlängertes PTH (1-84) bestätigt werden. Eine Gegenüberstellung der pEC_{50} -Werte, die aus der cAMP-Bildung ermittelt wurden, zeigt eine 25fache Differenz in der Potentialität von PTH (1-84) gegenüber den beiden Rezeptoren PTHR1 und PTHR2, wobei die Potentialität für PTHR1 höher ist.

Die durch die Phosphorylierung entstandenen zusätzlichen negativen Ladungen am N-terminalen Bereich des PTH (1-84) (Aminosäuren Ser1-Arg20) und die damit verbundene strukturelle Neuordnung α -helikaler Bereiche von Val2 bis Ala36, beeinflussen möglicherweise die Erkennung von Transmembran- und *Loop*-Bereichen der PTH-Rezeptoren 1 und 2, wodurch beide inaktiv bleiben (Abb. 4.2.1).

Der kombinierte Prozess einer posttranslationalen Modifikation und einer damit ausgelösten konformationellen und strukturellen Änderung ist für GPCRs hinreichend beschrieben. Durch eine ligandeninduzierte konformationelle Änderung werden spezifische Bereiche in den intrazellulären Domänen der GPCRs freigelegt, die anschließend durch Phosphorylierung modifiziert werden^[41]. Diese posttranslationalen Veränderungen erlauben dem Rezeptor mit intrazellulären Proteinen (z.B. Arrestin) in Wechselwirkung zu treten, mit den zuvor keine Interaktion möglich war^[16]. Die Phosphorylierung von GPCRs ist in diesem Fall eine wichtige Stufe zur Regulation der GPCR-vermittelten Signaltransduktion, die zur Inaktivierung der GPCRs durch

Internalisierung, Desensibilisierung oder Rezeptor-Recycling führt. Eine ständige Aktivierung von GPCRs würde sonst zu pathologischen Erkrankungen führen. Im Zusammenhang mit der hier untersuchten biologischen Funktion und Bedeutung von kovalent modifiziertem PTH (1-84), stellt die posttranslationale Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Peptidliganden möglicherweise einen zusätzlichen Weg zur Regulation der Aktivierung und Deaktivierung von GPCRs dar. So besteht die Möglichkeit, dass die Bindung von phosphoryliertem PTH (1-84), an PTHR1 und PTHR2, zu einem veränderten Internalisierungsverhalten führen kann, ohne jedoch dabei die PTH-Rezeptoren zu aktivieren. Auf diesem Weg könnten alternativ überflüssige Rezeptoren inaktiv gehalten und von der Zelloberfläche entfernt werden.

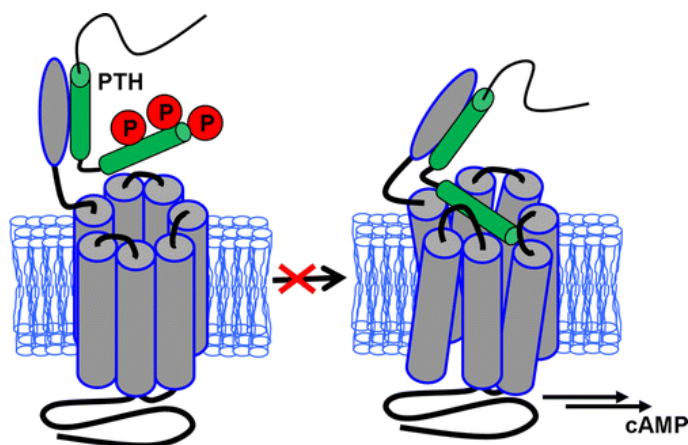


Abbildung 4.2.1: Modell zur Bindung von phosphoryliertem humanen PTH (1-84) an den Parathormon-Rezeptor. Ser1, Ser3 und Ser17 wurden als Phosphorylierungsstellen in PTH (1-84) identifiziert. Die Phosphorylierungsstellen befinden sich im N-terminalen Bereich des Parathormons, der eine essentielle Bedeutung für die Rezeptorerkennung und Aktivierung hat. Durch die Bindung von phosphoryliertem PTH an den Rezeptor wird die Signaltransduktion mit der verbundenen cAMP-Produktion unterbunden. Die Abbildung wurde aus [185] entnommen.

4.3 Ligandenwechselwirkungen an humanem ECD-PTH1

Zum heutigen Zeitpunkt stellt die N-terminale extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne des humanen PTH-Rezeptors 1, ein gut charakterisiertes Protein dar. Aus Strukturuntersuchungen mittels Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie konnten einige Informationen zur Bindung von PTH und PTHrP an ECD-PTH1 gewonnen werden^[75, 79, 85, 98, 174-180] (Abbildung 1.9). Dennoch bleiben die mechanistischen und strukturellen Voraussetzungen, die zum Selektionsvermögen des PTHR1 gegenüber seinen verschiedenen Liganden führen, unverstanden^[180]. Die weitere Aufklärung des Bindungsverhalten von humanem ECD-PTH1 gegenüber seiner Liganden besitzt eine große medizinische Bedeutung. Sie hilft bei der Entwicklung neuer Strategien, Agonisten und Antagonisten zur Behandlung gesellschaftsrelevanter Stoffwechselkrankheiten wie Osteoporose, Hyper- und Hypokalzämie zu finden.

Für eine weiterführende Charakterisierung der Ligandenbindung und eine NMR-spektroskopische Analyse sind Milligrammmengen an homogenem ECD-PTH1 in unmarkierter und isotope markierter Form nötig. ECD-PTH1 konnte hier erfolgreich, sowohl in nicht markierter und isotope markierter Form, gewonnen werden. Die

erhaltenen Ausbeuten lagen im mittleren Milligrammbereich und waren damit ausreichend für Ligandenbindungsstudien und NMR-spektroskopische Untersuchungen. Gleichwertige Proteinmengen, wurden auch für die rekombinante Herstellung der nativen und funktionalen extrazellulären N-terminalen Domäne des GLP1-Rezeptors^[68] beschrieben, einem weiteren Vertreter der Klasse B GPCR-Ectodomänen. Die Identität und native Konformation von ECD-PTH1 wurde durch massenspektrometrische Analyse und mittels CD- und Fluoreszenzspektroskopie im Prinzip belegt und damit bekannte Aussagen zur nativen Struktur von ECD-PTH1 bestätigt^[67].

Bisher wurde berichtet, dass ECD-PTH1 die verkürzten PTH-Peptide PTH (1-34) und PTH (1-37) bindet. Die ermittelten Affinitäten bewegen sich dabei im unteren mikromolaren Bereich von ca. 1 μM bis 22 μM (siehe Tabelle 4.3.1). Der natürliche PTHR1-Agonist PTH besteht jedoch aus 84 Aminosäuren. Welchen Einfluss die Aminosäuren Val35-Gln84 auf die Rezeptorbindung haben, ist bis heute weiterhin unklar. Um erstmalig quantitativ und *in vitro* die Bindung des natürlichen Agonisten PTH (1-84) an ECD-PTH1 zu untersuchen, wurden Ligandenbindungsstudien durchgeführt. Dabei wurden Dissoziationskonstanten von 1,0 μM bis 7,5 μM bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass PTH (1-84) die extrazelluläre Domäne des PTHR1 mit vergleichbarer Affinität binden kann wie die verkürzten PTH-Fragmente. Die C-terminalen Bereiche des PTH's über die Aminosäure 37 hinaus besitzen somit keine Relevanz bei der Bindung von ECD-PTH1. Ein Vergleich des Ergebnis mit der Röntgenkristallstruktur des ECD-PTH1/PTH (15-34)-Komplexes bestärkt die Annahme einer fehlenden Relevanz C-terminaler Bereiche (über die Aminosäure 34 hinaus) des PTH-Liganden bei der ECD-PTH1 Bindung, weil die Ligandenbindungsfurche von ECD-PTH1 schon weitestgehend vollständig mit PTH (15-34) besetzt ist^[78]. Im Gegensatz dazu zeigen N- und C-terminale Verkürzungen des PTH (1-37) eine deutliche Abnahme der Affinität gegenüber ECD-PTH1^[179]. Geht die Verkürzung über das Minimalfragment PTH (13-31) hinaus, wird keine Bindung mehr beobachtet^[179]. Eine Affinität, im unterem mikromolaren Bereich, scheint typisch für die Bindung von Peptidliganden an einige Klasse B GPCR-Ectodomänen zu sein. So werden z.B. Dissoziationskonstanten von 6-7 μM für die Bindung des Glukagon an die Ectodomäne des Glukagon-Rezeptor oder 0,3-1 μM für die Bindung spezifischer Peptidliganden an den PAC1-Rezeptor beobachtet^[80, 275], wohingegen für die Bindung des Glukagon-like-Peptids an die extrazellulären Domäne des GLP1-Rezeptors, Dissoziationskonstanten im mittleren nanomolaren Bereich (100-150 nM) und im unteren nanomolaren Bereich von 30 nM für die Bindung spezifischer Peptidliganden an die Ectodomäne des CRF-Rezeptor 1 beschrieben werden^[68, 83].

Bei genauerer Betrachtung dieser in der Literatur bekannten Dissoziationskonstanten von Peptidliganden gegenüber ihren Klasse B GPCR-Ectodomänen ist eines gleich: Die Affinität der Liganden gegenüber der Bindung des Gesamtrezeptors ist deutlich herabgesetzt. Das gilt auch für PTH (1-84) und PTH (1-34). Die Tabelle 4.3.1 zeigt eine Aufstellung bekannter Affinitäten für die Bindung von PTH-Peptidliganden an PTHR1 und 2, sowie ihrer jeweiligen extrazellulären N-terminalen Domänen. Im Vergleich zur Bindung der Ectodomäne liegen die Affinitäten für die Bindung des Agonisten PTH (1-34) an den membranständigen Gesamtrezeptor im nanomolaren Bereichen von 5 nM bis 7,5 nM^[147, 168]. Für diese Experimente bleibt festzuhalten, dass die in der Literatur beschriebenen Affinitäten mit radioaktiven Liganden an PTHR1 transfizierten Zellsystemen

bestimmt wurden und dadurch ein anderes Methodenspektrum repräsentieren, als die hier angewendeten.

Ein möglicher Grund für die verringerte Affinität liegt möglicherweise im Domänencharakter von ECD-PTHR1. In der Literatur werden die Transmembranbereiche und die extrazellulären Schleifen (*Loops*) des PTH-Rezeptors 1 als wichtige Elemente für die Bindung seiner Liganden beschrieben^[85, 98, 102, 104, 174, 175]. Für eine vollständige biologische Funktion sind bei einer Bindung des PTH-Liganden an PTHR1 die ersten 34 Aminosäuren ausreichend. Diese 34 Aminosäuren bestehen aus einem α -helikalen N-terminalen und C-terminalen Bereich, die verschiedene Aufgaben während der Bindung erfüllen. Die C-terminale α -Helix, ausgehend von Met20 bis Val31, bildet eine hydrophobe Oberfläche, die in der Bindungsfurche der extrazellulären N-terminalen Domäne des PTHR1 bindet^[78, 85, 102], während die N-terminale α -Helix, ausgehend von Val2 bis Ser19 des PTH-Liganden, an Transmembranbereiche und extrazelluläre *Loops* des Rezeptors bindet^[85, 98, 102] (1.2.3, Abb. 1.9, *two-domain-binding* Modell). Durch die Interaktion der N-terminalen Bereiche des Liganden mit dem Rezeptor wird eine konformationelle Änderung des Rezeptors ausgelöst und eine Signalkaskade aktiviert^[102, 191]. Vor dem geschildertem Hintergrund ist anzunehmen, dass durch die fehlenden Transmembran- und *Loop*-Bereiche des PTHR1 eine geringere Affinität für die Ectodomäne des Rezeptors gegenüber den verwendeten Liganden entstehen kann.

Tabelle 4.3.1: Vergleich Dissoziationskonstanten verschiedener Liganden gegenüber des PTH-Rezeptors 1 und 2, sowie ihrer Ectodomänen ECD-PTHR1 und ECD-PTHR2.

Ligand	PTHR1 K_D in nM	ECD-PTHR1 K_D in μ M	PTHR2 K_D in nM	ECD-PTHR2 K_D in μ M	Referenz
PTH (1-34)	5-7	1-22	--*	--*	[1], [102], [75], [147], [168]
PTH (1-37)	--*	3,5-9	--*	--*	[67], [179]
PTH (15-34)	--*	1-3	--*	--*	[78]
PTH (1-84)	--*	1,0-7,5	--*	1,2	[219], diese Arbeit
PTH (7-34)	45	117	--*	--*	[148]
TIP 39	200-240	0,5	4,2	0,7	[147], diese Arbeit
TIP (7-39)	1-6	0,18-0,37	---	--*	[147], diese Arbeit

*: nicht bekannt

Eine höhere Affinität als PTH (1-84) gegenüber ECD-PTHR1, zeigen die Antagonisten TIP 39 und eine verkürzte Variante, das TIP (7-39). TIP 39 und TIP (7-39) werden als neue selektivere Liganden mit hoher Affinität gegenüber den PTHR1 beschrieben^[147, 148]. TIP 39 und TIP (7-39) besitzen wahrscheinlich ein deutlich besseres pharmazeutisches Potential, zur Entwicklung neuer, potenterer und selektiver PTHR1-Antagonist-Liganden, im Vergleich zu den bisherigen PTH (7-34) oder PTHrP (7-34) basierten Peptidantagonisten und damit zur Behandlung von Stoffwechselkrankheiten, die den Kalziummetabolismus betreffen^[148, 149] eingesetzt werden. Eine strukturelle und funktionelle *in vitro* Charakterisierung der Interaktion der beiden Bindungspartner auf molekularer Ebene ist daher interessant. Die in dieser Arbeit durchgeführte quantitative Charakterisierung der Bindung von TIP 39 und TIP (7-39) an ECD-PTHR1 führte zu

Dissoziationskonstanten von 180 nM bis 260 nM für die Bindung von TIP (7-39) und 480 nM für die Bindung von TIP 39. Die ermittelten Affinitäten der TIP-Antagonisten liegen im mittleren nanomolaren Bereich und damit deutlich über den bekannten Affinitäten der PTH basierten Agonisten und Antagonisten (Tabelle 4.3.1). Alle bisherigen Studien, welche die selektive Bindung von TIP 39 und TIP (7-39) untersucht haben, beruhen auf der Durchführung von Radioligand-Bindungsstudien und cAMP-Akkumulationsassays an PTHR1 exprimierenden HEK293-, HKrk-B7- und COS-7-Zellsystemen. Während die beobachteten Affinitäten von TIP 39 gegenüber dem Gesamtrezeptor PTHR1, mit 200-240 nM, vergleichsweise moderat ausfallen^[147], ist die Affinität von TIP (7-39), mit 1 nM bis 6 nM, um ein vielfaches höher. Die Affinität von TIP (7-39) gegenüber PTHR1 liegt auch ca. zehnfach über den Affinitäten von 45-65 nM, die für die bekannten PTHR1-Antagonisten, bovines PTH (7-34) und PTHrP (7-34), bestimmt wurden^[148]. Außerdem wurde für die beiden TIP-Liganden nach Bindung an PTHR1 die Unterdrückung der basalen Rezeptoraktivität beobachtet, die sonst für die PTH- und PTHrP-basierten Antagonisten beobachtet wurde^[148]. In diesem Zusammenhang konnte die eben beschriebene höhere Affinität von TIP (7-39) gegenüber dem Gesamtrezeptor PTHR1, die sich im Vergleich mit den bekannten PTH-Antagonisten und Agonisten zeigt^[148, 168], auch für die Bindung an die Ectodomäne ECD-PTHr1 beobachtet werden. PTH und TIP besitzen eine äußerst geringe Sequenzhomologie. Einzig fünf identische Aminosäuren befinden sich in der Primärstruktur. Dennoch zeigen beide Liganden eine hohe strukturelle Homologie. NMR-Experimente induzieren für TIP 39 ebenfalls das Vorhandensein von zwei α -helikalen Strukturen zwischen Ala5 bis Ala19 und Asn27 bis Leu34^[150], wie sie vergleichsweise in PTH (1-34) auftreten. Aus diesem Grund wird für die Bindung von TIP 39 und TIP (7-39) an ECD-PTHr1 ein ähnlicher *two-domain-binding* Mechanismus vermutet wie für PTH^[149]. Möglicherweise binden TIP 39 oder TIP (7-39) über hydrophobe Kräfte, vermittelt durch ihre Aminosäuren Trp25, Leu26, Tyr29, Met30 und Leu33, in der dreilagigen Bindungsfurche von ECD-PTHr1. Ein *Alignment* der Primärstruktur von TIP 39 und PTH (1-34), zeigt eine hohe Ähnlichkeit der genannten Aminosäuren mit den fünf hydrophoben Aminosäuren Trp23, Leu24, Leu28, Val31 und Phe34 in PTH (1-34), die hauptsächlich für die Bindung an ECD-PTHr1 verantwortlich sind^[78]. Wodurch jedoch die verbesserte Rezeptorbindung und höhere Affinität von TIP (7-39) im Vergleich zu PTH ausgelöst oder unterstützt wird, ist gegenwärtig nicht bekannt. Vielleicht zeigen die beiden Liganden TIP 39 und TIP (7-39) ein verändertes Bindungsverhalten zum eben beschriebenen Bindungsmodell. Ein Hinweis dafür lieferte die thermodynamische Charakterisierung der Liganden-Bindung mittels ITC. Für beide Peptidhormone war wegen zu geringer Wärmetönung keine Aufnahme und Auswertung einer Titrationskurve möglich. Liganden, die untereinander nur geringe strukturelle Variationen aufweisen, so wie das für PTH und TIP 39 der Fall ist, zeigen häufig nur marginale Unterschiede in der freien Bindungsenthalpie ΔG , wohingegen Enthalpie ΔH und Entropie ΔS stark variieren können. Die verschiedenen Resultate der ITC-Analysen von ECD-PTHr1 mit PTH (1-84), TIP 39 und TIP (7-39) lassen große Unterschiede für enthalpie- und entropiegetriebenen Bindungsprozesse vermuten. Deutliche Änderungen von ΔH und ΔS können ein Hinweis auf einen veränderten Bindungsmodus sein, wobei dies häufig nicht aus den geringen Unterschieden der freien Bindungsenthalpie ersichtlich ist.

Durch eine erfolgreiche isotope-markierte Herstellung von ECD-PTH1 im Milligrammmaßstab ergab sich die Möglichkeit für eine NMR-spektroskopische Analyse von ECD-PTH1 im Komplex mit PTH (1-84). Auf diese Weise sollten, wie für den CRF-Rezeptor 1^[72] und den PAC1-Rezeptor^[80], Strukturinformationen gewonnen und Bindungs-epitope in der ECD-PTH1 identifiziert werden, die an der Erkennung und Bindung von PTH (1-84) beteiligt sind. Mit den gewonnenen Daten sollte eine Verifizierung bekannter Ergebnisse aus der Röntgenkristallstruktur von ECD-PTH1 im Komplex mit dem Peptidfragment PTH (15-34)^[78] und NMR-spektroskopischen Ligandenbindungsstudien^[179] durchgeführt und wenn möglich um zusätzliche Informationen erweitert werden. Die zur Charakterisierung der Ectodomäne aufgenommenen ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren, im ungebundenen und im komplexierten Zustand mit PTH (1-84), zeigten eine geringe Dispersion und starke Resonanzsignalüberlagerungen. Auch die Abwesenheit einiger Resonanzsignale wurde beobachtet. Eine sequentielle Zuordnung der einzelnen Amidprotonenresonanzsignale im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum, sowie die Determination einer NMR-Struktur für freies oder mit PTH (1-84) komplexiertes ECD-PTH1, ist mit den aufgenommenen Spektren daher nicht möglich. Auch die Änderung des pH-Werts und der Messtemperatur führten zu keiner nennenswerten Verbesserung der Spektren. Dennoch konnte mit den Spektren die Interaktion zwischen ECD-PTH1 und PTH (1-84) auf einem qualitativem Niveau nachgewiesen und bestätigt werden. Ein Hauptgrund für die geringe Dispersion und das Fehlen von Resonanzsignalen ist möglicherweise der *slow conformational exchange*, der auch schon bei der NMR-spektroskopischen Analyse der Klasse B GPCR-Ectodomänen, des CRF-Rezeptor 1 und des CRF-Rezeptor 2 beschrieben wurde^[72, 83]. Er wird durch die konformationelle Flexibilität des Proteins ausgelöst. Durch die Bindung affiner Liganden kann der langsame konformationelle Austausch teilweise vermindert und dadurch eine Verbesserung der Spektrumsqualität erreicht werden^[72]. Für die Bindung des PTH (1-84) an ECD-PTH1 wurde keine Unterdrückung des *slow conformational exchange* beobachtet. Möglicherweise ist zur Unterdrückung die Bindung eines Agonisten oder Antagonisten nötig, der mit einer Affinität im unteren nanomolaren Bereich ECD-PTH1 bindet und dadurch die konformationelle Dynamik von ECD-PTH1 reduziert. Über das Auftreten und die biologische Rolle von *slow conformational exchange* Dynamiken oder der konformationellen Flexibilität kann nur spekuliert werden. Wahrscheinlich zeigen beide Bindungspartner, ECD-PTH1 und PTH (1-84), eine konformationelle Heterogenität. Ein dynamischer Charakter von ECD-PTH1 ist möglicherweise der vielfältigen Erkennung und Bindung einer breiten Anzahl an Peptidhormonen zuzuschreiben. Möglicherweise unterliegt die Ectodomäne des PTH1 ebenfalls einem konformationellen Selektionsprozess, wie er für die Gesamtrezeptoren der Klasse B GPCRs vermutet wird^[85]. Die verschiedenen konformationellen Zustände der Ectodomäne führen möglicherweise zu unterschiedlichen Affinitäten gegenüber verschiedenen Agonisten und Antagonisten, die dadurch gebunden und selektiert werden können.

4.4 Rekombinante Herstellung von humanem ECD-PTH₂ in *E. coli*

Eine detaillierte biochemische und biophysikalische Charakterisierung der extrazellulären N-terminalen Domäne des PTH-Rezeptors 2 erfordert die Bereitstellung der Proteindomäne in ausreichenden Mengen, sowie in nativer und homogener Form. Die heterologe Produktion rekombinanter Proteine in verschiedenen Wirtsorganismen, insbesondere in *Escherichia coli*, bietet eine gute Möglichkeit, Proteine für molekulare Untersuchungen zu gewinnen^[279]. Eine rekombinante Herstellung und Charakterisierung des Gesamtrezeptors PTH₂ ist, wie für andere Membranproteine gezeigt, mit großer Wahrscheinlichkeit ein sehr langwieriger und zeitintensiver Prozess, der mit vielen Schwierigkeiten verbunden ist. Aus diesem Grund ist es nachvollziehbar, dass GPCRs, Ionenkanäle und andere Membranproteine, im Vergleich zu zytoplasmatischen Proteinen, nur als eine Minderheit in der Proteindatenbank vertreten sind^[248]. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist es nicht gelungen, den PTH-Rezeptor 2 oder auch nur definierte Domänen des humanen PTH₂ für *in vitro* Studien herzustellen. Zur besseren Handhabung und Kontrolle wurde als Alternative zum Gesamtrezeptor die extrazelluläre N-terminale Domäne des PTH₂ in *E. coli* exprimiert. Bei ECD-PTH₂ handelt es sich um einen wichtigen Bereich zur Analyse von Ligandenbindungsreaktionen. Im Zusammenhang mit GPCRs der Klasse B wird die lange extrazelluläre N-terminale Domäne hauptsächlich für die Ligandenbindung und Selektivität verantwortlich gemacht^[168, 179, 181, 183]. ECD-PTH₂ besitzt, wie andere GPCR-Ectodomänen der Klasse B, sechs konservierte Cysteinreste, die drei Disulfidbrücken ausbilden und damit die Struktur der N-terminalen Domäne stabilisieren. Eine Expression von ECD-PTH₂ im reduzierenden Milieu von *E. coli* forciert deshalb wahrscheinlich, wie schon für andere GPCR-Ectodomänen beobachtet, eine starke Bildung von *inclusion bodies*, in denen das heterologe Protein in sehr großen Mengen, aber in denaturierter Form angereichert wird^[67, 68]. Aus diesen *IBs* muss ECD-PTH₂ gegebenenfalls unter geeigneten Bedingungen renaturiert werden. Die Suche und Identifikation geeigneter Rückfaltungsparameter ist sehr arbeitsintensiv und muss für jedes Protein individuell durchgeführt werden. Ein Weg, die Bildung von *IBs* in *E. coli* zu umgehen, ist eine lösliche Expression, auch von disulfidhaltigen Proteinen, durch die Verwendung von Fusionsproteinen, wie Thioredoxin oder SUMO^[223-229, 232].

Zur Herstellung von ECD-PTH₂ wurden einige Strategien verfolgt, von denen letztlich eine zur erfolgreichen Herstellung der Ectodomäne in strukturierter und funktionaler Form führte. In der vergangenen Dekade und in dieser Arbeit konnte die Ectodomäne des humanen Parathormon-Rezeptors 1 erfolgreich aus *inclusion bodies* renaturiert, bis zur Homogenität gereinigt und ihre Funktionalität gegenüber den Liganden PTH (1-37)^[67], PTH (1-84) und TIP (7-39) nachgewiesen werden. Aufgrund der entwicklungsphysiologischen Verwandtschaft des humanen PTH₂ zum PTH₁^[84, 139, 160] wurde unter anderem versucht, den von Grauschopf *et al.*^[67] entwickelten Ansatz, zur Herstellung von ECD-PTH₁ durch Renaturierung aus *IBs*, auf die Gewinnung von humanen ECD-PTH₂ zu übertragen. Im Vergleich zur erfolgreichen Renaturierung von ECD-PTH₁ führte die Rückfaltung von ECD-PTH₂ unter den gewählten Bedingungen zur vollständigen Aggregation des Proteins. Auch durch die Variation der Renaturierungsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, *redox-shuffling*-System und den Zusatz verschiedener niedermolekularer Substanzen) war es nicht möglich, einen brauchbaren Anteil von Protein während der Renaturierung in Lösung zu halten. Erst durch den Einsatz des Detergenz

Brij 78 konnte ein Teil des Proteins während der Rückfaltung in Lösung überführt und zur weiteren Reinigung verwendet werden. Detergenzien unterstützen die Renaturierung von Proteinen, weil sie die hydrophoben Interaktionen zwischen Faltungsintermediaten unterdrücken, indem sie eine unpolare Wechselwirkung zwischen den Proteinen und aus Detergenzien gebildeten Micellen fördern^[238]. Die Reinigung von ECD-PTHR2 konnte in diesem Fall bis zur Homogenität geführt werden. Eine massenspektrometrische Analyse der korrekten Disulfidverbrückung in ECD-PTHR2 führte jedoch nur zur Identifikation einer einzigen richtigen Disulfidbrücke zwischen Cys86 und Cys125, während die anderen beiden Brücken falsch oder gar nicht verknüpft waren. Die Ausbildung eines konservierten Disulfidbrückenmusters, wie es auch schon für andere Klasse B GPCR-Ectodomen nachgewiesen wurde, ist essentiell für die Funktionalität und Ligandenbindung des Rezeptors^[67-69, 71-73, 75-79, 82, 248]. Die fehlende Bindungskompetenz, die für ECD-PTHR2 gegenüber der bekannten Liganden PTH und TIP 39 beobachtet wurde, ist daher vermutlich direkt auf die inkorrekte Disulfidverbrückung im renaturierten und gereinigten ECD-PTHR2 zurückzuführen. Wegen der fehlenden Funktionalität wurde der hier erläuterte Ansatz zur Herstellung von ECD-PTHR2 nicht weiter verfolgt. Für einige Proteine, die als Einschlusskörper in *E. coli* vorlagen, wurde eine funktionale Reinigung und Renaturierung mit Hilfe von *on column refolding* gezeigt^[271-273]. Auch die Verwendung des *artificial caperon* Systems führt zur Gewinnung nativer Ectodomen^[1, 165] von GPCRs der Klasse B. Vor diesem Hintergrund wurde zur Gewinnung von ECD-PTHR2, neben den Renaturierungsbedingungen, auch das Renaturierungssystem modifiziert. Diese Versuche, ECD-PTHR2 in nativer Form zu erhalten, führten nicht zu einem positiven Ergebnis. Letztendlich konnten nur marginale Ausbeuten von bis zu 0,01 mg pro Liter Bakterienkulturmedium gewonnen werden, die keine weiterführende Charakterisierung von ECD-PTHR2 möglich machten.

In der Literatur wird Thioredoxin als effizienter Fusionspartner beschrieben, der eine lösliche Überexpression von disulfidhaltigen Proteinen erlaubt^[223-229]. Die Verwendung des SUMO-Fusionssystems ermöglicht verbesserte Expressionsraten und unterstützt eine lösliche Expression von unlöslichen Proteinen und führt zur Erzeugung von Proteinen mit nativem N-Terminus^[196-199, 230-234]. Liegt trotz der Verwendung des SUMO-Fusionsproteins keine lösliche Expression vor, kann das SUMO-System dennoch als Faltungshelfer während einer *in vitro* Renaturierung von Proteinen verwendet werden, weil es Faltungsintermediate in Lösung hält^[198]. Vor dem Hintergrund der geschilderten Fusionspartner wurde versucht, funktionales und natives ECD-PTHR2 durch die C-terminale Fusionierung an ein Thioredoxin-SUMO-Fusionsprotein (Trx-SUMO-ECD-PTHR2) löslich in *E. coli* zu exprimieren. Durch die Verwendung von Fusionspartnern an ECD-PTHR2 sollte eine Verminderung von Aggregationsprozessen und eine Stabilisierung von Faltungsintermediaten während der Expression und Faltung des Proteins erreicht werden. Zur Gewinnung von ECD-PTHR2 wurden elf verschiedene Varianten kloniert, die sich durch N- und C-terminale Aminosäureverkürzungen auszeichneten. Durch die Entfernung membranständiger und hydrophober Aminosäuren sollte ein Einfluss auf die lösliche Expression von Trx-SUMO-ECD-PTHR2 untersucht werden. Die Expression aller Konstrukte erfolgte ausschließlich in aggregierter Form als *IBs*. Die Variation der Expressionsbedingungen, wie Temperatur, Medium (dYT, Autoinduktionsmedium^[235]) und Expressionsstämme, führten zu keiner detektierbaren löslichen Expression der

Fusionsproteine. Die N- und C-terminale Aminosäureverkürzung hatte somit keinen Einfluss auf eine lösliche Expression. Dennoch wurden die *IBs* der Fusionsproteine isoliert^[202] und unter Verwendung der Trx-SUMO-Fusion als Faltungshelfer, eine *in vitro* Renaturierung durchgeführt. Interessanterweise wurde trotz weitestgehend aggregatfreier Rückfaltung aller Fusionsproteine und anschließender Reinigung eine massive Präzipitation von ECD-PTHR2 während der Trx-SUMO-Spaltreaktion beobachtet. Eine finale Reinigung der nach diesem Spaltungsschritt erhaltenen ECD-PTHR2 Proteinlösungen identifizierte das Vorhandensein von Aggregaten, die im Ausschlussvolumen einer Gelfiltrationssäule eluiert wurden. Einzig für das Aminosäurekonstrukt ECD-PTHR2 Tyr27-Ala138 konnte neben der Elution von Aggregaten auch homogenes ECD-PTHR2 beobachtet werden. Die finale Ausbeute war aber sehr gering und lag bei 0,015 mg/l Expressionskultur. Eine initiale Charakterisierung von ECD-PTHR2 wurde damit nicht durchgeführt. Die Verwendung des Trx-SUMO-Fusionskonstrukts hat wahrscheinlich zur Stabilisierung von un- und falsch gefalteten Protein geführt, wobei Thioredoxin möglicherweise einen negativen Einfluss auf das *redox-shuffling* im Rückfaltungsansatz ausgeübt hat. Eine Herstellung von nativem und funktionalem ECD-PTHR2 konnte durch die Verwendung eines Trx-SUMO-Fusionskonstrukts nicht erreicht werden. Die hier verfolgte Strategie erschien nicht sehr erfolgsversprechend und wurde deshalb nicht weiter optimiert. Die hier geschilderte rekombinante Produktion mit Hilfe des Thioredoxin-SUMO-Fusionsystems wurde auch auf andere Klasse B GPCR-Ectodomänen übertragen^[274]. Auch in diesem Fall führte die Expression der Ectodomänen des Calcitonin-, Secretin-, des VIP- und des Glucagon-like-Peptid-Rezeptors 1 und 2 zu einem vergleichbaren Ergebnis. Alle N-terminalen Domänen wurden in Form unlöslicher *inclusion bodies* exprimiert und besaßen keine Funktionalität gegenüber ihren Liganden. Bis heute konnte einzig die Ectodomäne des PAC-1-Rezeptor erfolgreich auf diese Weise nativ und funktional hergestellt werden^[275].

Trotz der zuvor beschriebenen wenig erfolgsversprechenden Versuche ist es in der hier vorliegenden Arbeit gelungen, die Ectodomäne des humanen PTHR2 heterolog als ein SUMO-Fusionsprotein (His₆-SUMO-ECD-PTHR2) erfolgreich zu exprimieren und zu renaturieren. Zur Klonierung der Expressionskonstrukte von His₆-SUMO-ECD-PTHR2 wurde eine auf die Expression in *E. coli* abgestimmte, *codon usage* optimierte, cDNA verwendet. Weil die ersten 26 Aminosäuren die Signalsequenz codieren, welche die Translokation des Rezeptors durch Membranbereiche des endoplasmatischen Retikulums steuern und anschließend abgespalten werden, beginnt die hier klonierte Variante von ECD-PTHR2 N-terminal mit Asp27. Die Expression des Fusionsproteins SUMO-ECD-PTHR2 in *E. coli* führte, wie bei den vorangegangenen Versuchen, auch zu einer Produktion von *inclusion bodies*. Diese wurden isoliert^[202], in Gegenwart stark denaturierender und reduzierender Agenzien solubilisiert und anschließend unter Verwendung eines *redox-shuffling*-Systems und dem Rückfaltungsadditiv L-Arginin^[238] durch Pulsrenaturierung in Lösung überführt. Eine Ausbildung von Aggregaten konnte unter den gewählten Bedingungen weitestgehend unterdrückt werden. Die Verwendung des SUMO-Fusionsproteins war somit gut geeignet, um als Partner die *IBs* von SUMO-ECD-PTHR2 während der Renaturierung in Lösung zu stabilisieren. Die Verwendung des *redox-shuffling*-Systems sollte eine korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken in ECD-PTHR2 ermöglichen. GSH/GSSG katalysiert den Thiol-Disulfid-Austausch und führt

damit zur Bildung von nativen Disulfidbrücken im Protein^[202, 237, 268-270]. Um den Renaturierungsprozess gegenüber dem Aggregationsprozess zu unterstützen, wurde die Rückfaltung bei 4 °C durchgeführt und die finale Proteinkonzentration im Rückfaltungsansatz von 0,1 mg/ml nicht überschritten. Da für die Renaturierung direkt die solubilisierten *IBs* verwendet wurden, musste der Rückfaltungsansatz anschließend von Inhomogenitäten befreit und das Fusionsprotein gereinigt werden. Ähnlich wie bei der Trx-SUMO-Fusion wurde trotz aggregatfreier Rückfaltung eine partielle Präzipitation von ECD-PTHR2 während der sich an die Reinigung anschließenden SUMO-Spaltreaktion beobachtet. Die Aggregation war möglicherweise eine Folge von falsch gefalteten Renaturierungsprodukten, die durch Hilfe des SUMO-Fusionspartners während der Renaturierung in Lösung gehalten wurden^[198]. Dennoch konnte nach Abtrennung der Aggregate, mittels Zentrifugation und Gelfiltration, eine finale Ausbeute von 0,85 mg ECD-PTHR2 pro verwendetem Liter Expressionsmedium gewonnen werden. Diese Mengen sind ausreichend, um eine weitere initiale strukturelle und biophysikalische Charakterisierung durchzuführen. Mit der vorliegenden Ausbeute konnte in den Milligrammbereich vorgestoßen werden, die jetzt und bei einer weiteren Optimierung zukünftige eine hochaufgelöste NMR-spektroskopische Charakterisierung von ECD-PTHR2 erlauben. Die hier entwickelte SUMO-Fusionsmethode scheint generell für die Herstellung von ECD-PTHR2, aber auch für andere Ectodomänen G-Protein gekoppelter Rezeptoren der Klasse B geeignet zu sein.

Vergleicht man abschließend noch einmal das Renaturierungsverhalten von ECD-PTHR1 und ECD-PTHR2, zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Trotz bestehender familiärer und struktureller Homologien zwischen beiden Ectodomänen^[136] ist die Übertragung des erfolgreichen Renaturierungssystems von ECD-PTHR1 für die Herstellung von ECD-PTHR2 nicht möglich. ECD-PTHR1 kann aus seinen *IBs* direkt in eine native Domäne überführt werden, wohingegen für ECD-PTHR2 die Verwendung eines Fusionsproteins nötig ist. Das unterschiedliche Verhalten beider Proteine betont das Vorhandensein unterschiedlicher Faltungsprozesse und die Vermutung, dass eventuell bestehende strukturelle Unterschiede einen Einfluss auf die Faltung nehmen. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Rückfaltung von ECD-PTHR1 und ECD-PTHR2 über wenig vergleichbare Zwischenformen abläuft. Möglicherweise könnten die bei der Faltung von ECD-PTHR2 auftretenden Intermediate andere Anforderungen an das verwendete Puffersystem stellen, um in Lösung zu bleiben, als diejenigen von ECD-PTHR1. Vielleicht ist auch die Bindung eines unbekanntes Co-Faktors oder hier nicht identifizierten Faltungsadditiv nötig, um ECD-PTHR2 eine stabilere Konformation zu geben. Es ist auch möglich, dass unterschiedliche Bereiche von ECD-PTHR2 an unterschiedlichen Zeitpunkten falten und dadurch eine verzögerte Ausbildung der Disulfidbrücken und damit eine zur Aggregation neigende destabilisierte Konformation auslösen, während dieser Prozess für ECD-PTHR1 vielleicht deutlich geordneter verläuft und es dadurch eine stabilere Konformation einnimmt. Solche instabilen Konformationen könnten durch die Verwendung von Fusionsprotein länger in Lösung gehalten werden und bekommen dadurch mehr Zeit zur Renaturierung^[224]. Es besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass ECD-PTHR1 wegen seiner verlängerten *Loop*-Region zwischen Cys48 und Cys108 eine deutlich flexiblere Struktur besitzt als ECD-PTHR2 und dadurch schneller eine native Struktur einnehmen kann. Bei der Rückfaltung von Proteinen aus *inclusion bodies* spielt zusätzlich

die Hydrophobizität des Proteins eine wichtige Rolle^[238]. Der korrekte Faltungsweg eines Proteins steht hier in direkter Konkurrenz zur Falschfaltung und Aggregation des Proteins, wobei die Aggregation entweder durch unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen ungefalteter Polypeptidketten oder durch die Interaktion von Faltungsintermediaten, mit exponierten hydrophoben Seitenketten, ausgelöst wird. Vergleicht man die Primärsequenz beider extrazellulärer Domänen, zeigt ECD-PTH2 (*grand average of hydrophobicity*, GRAVY: -0,297) einen deutlich hydrophoberen Charakter als die Ectodomäne des PTHR1 (GRAVY: -0,938). Auch konnte für ECD-PTH2 eine partielle Exposition hydrophober Bereiche beobachtet werden, die vielleicht unter den verwendeten Pufferbedingungen eher eine Aggregationsanfälligkeit zeigen als in ECD-PTH1, was ebenfalls teilweise exponierte hydrophobe Aminosäureseitenketten besitzt^[254]. Möglicherweise ist es dadurch schwieriger, ECD-PTH2 ohne einen lösungsvermittelnden Fusionspartner, während der Renaturierung in Lösung zu halten. Bis heute ist nicht viel über die Faltungswege oder bestehende Intermediate von GPCRs oder ihrer einzelnen Domänen bekannt. Die Frage, warum sich die Renaturierung von ECD-PTH1 und ECD-PTH2 so unterscheiden, kann deshalb in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden.

4.5 Biophysikalische Charakterisierung von ECD-PTH2

Nachdem eine erfolgreiche Expression für das Fusionsprotein SUMO-ECD-PTH2 beobachtet wurde und eine Renaturierung, Reinigung und Isolierung der Ectodomäne gelungen war, wurde anschließend der strukturelle Aufbau überprüft. Wie andere GPCRs der Klasse B besitzt die N-terminale extrazelluläre Domäne des PTH-Rezeptors 2 sechs Cysteinreste, die möglicherweise ein konserviertes Disulfidmuster innerhalb der Ectodomäne ausbilden, das aus drei Disulfidbrücken besteht. Dieses Disulfidmuster scheint charakteristisch für GPCR-Ectodomänen der Klasse B zu sein und führt zu einer nativen Konformation des Rezeptors mit funktionellen Eigenschaften^[67, 68, 72, 78, 164, 248]. Durch eine Charakterisierung mittels Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS/MS-Charakterisierung) konnte die korrekte Ausbildung des Disulfidmusters aufgeklärt werden. So wurde eine kovalente Disulfidverknüpfung für die Cystein-Paare Cys48 und Cys72, zwischen Cys63 und Cys103 und für Cys86 und Cys125 identifiziert. Das Muster der Disulfidverbrückung in ECD-PTH2 entspricht damit dem für GPCRs der Klasse B bekannten. Das Ergebnis indiziert, dass renaturiertes ECD-PTH2 mit großer Wahrscheinlichkeit eine native Konformation besaß. Um den nativen Zustand von ECD-PTH2 zu stützen, wurden die strukturelle Integrität und der Faltungszustand von ECD-PTH2 mittels spektroskopischer Methoden untersucht. Die Aufnahme eines UV-Absorptionsspektrums zeigte ein deutliches Proteinspektrum mit einer leichten Absorptionsschulter bei 290 nm, ausgelöst durch die vier Tryptophane in ECD-PTH2. Für das native und renaturierte ECD-PTH2 wurden fern-UV-CD-Spektren aufgenommen. Die quantitative Abschätzung von Sekundärstrukturelementen in ECD-PTH2, lieferte einen Anteil von 22 % α -Helices und 24 % β -Faltblattstrukturen und liegt damit in einer ähnlichen Größenordnung, wie es auch schon für ECD-PTH1 bestimmt werden konnte^[67]. Bei anderen GPCR-Ectodomänen der Klasse B wie ECD-GLP-1R konnten aber auch größere Anteile an Sekundärstrukturelementen von bis zu 30 % α -Helices ermittelt werden^[68]. ECD-PTH2 zeigt somit weitestgehend eine strukturelle Uniformität im Vergleich zu anderen Klasse B GPCR-Ectodomänen und bestätigt somit, dass die N-terminalen extrazellulären Domänen der

GPCRs der Klasse B ähnliche strukturelle Eigenschaften besitzen. Zur Analyse der Tertiärstruktur der gereinigten und renaturierten Rezeptordomäne wurden intrinsische Fluoreszenzeigenschaften des nativen und denaturierten Zustands von ECD-PTH2 untersucht. In beiden Fällen konnte für die Denaturierung des Proteins, im Vergleich zum nativen Zustand, eine Rotverschiebung der Wellenlängen von 341 nm hin zu 350 nm beobachtet werden. Die hydrophobe Einbettung von Tryptophanresten in nativen Proteinen führt zu Fluoreszenzemissionsmaxima von 320 nm bis 340 nm, wobei die Obergrenze von 340 nm deutlich auf eine partielle Exposition aromatischer Aminosäureketten hinweisen^[250, 251]. Somit konnte für ECD-PTH2 ebenfalls eine teilweise Exposition der aromatischen Seitenketten wie Tryptophan und Tyrosin gezeigt werden, wie es auch in ECD-PTH1 und ECD-GLP-1R gefunden wurde^[67, 68]. Die teilweise vorliegende Exposition von Aminosäureseitenketten kann durch den fragmentarischen Charakter der N-terminalen Domäne erklärt werden^[67, 70]. Bei der Expression einer Proteindomäne wie ECD-PTH2 ist anzunehmen, dass diese im nativen Zustand eine partielle Strukturierung einnimmt, bei der hydrophobe Bereiche frei liegen. Wegen fehlender Rezeptorbestandteile können diese möglicherweise nicht verborgen werden. Durch die Bindung von Anilino-Naphtalensulfonat (ANS) konnten für ECD-PTH1 partiell exponierte hydrophobe Oberflächenstrukturen nachgewiesen werden^[254]. Mit der Durchführung von ANS-Bindungsstudien konnte auch für gereinigtes und renaturiertes ECD-PTH2 die teilweise Strukturierung und partielle Exposition hydrophober Bereiche innerhalb der Ectodomäne beobachtet werden. Die hier mittels Fluoreszenzspektroskopie beobachteten Änderungen der spektralen Eigenschaften von ECD-PTH2 während der Denaturierung und in Gegenwart von ANS sind ein deutlicher Hinweis, dass die Rezeptordomäne ausgeprägte Tertiärstrukturelemente besitzt. Mit Hilfe von Protonen-NMR-Spektroskopie konnte zusätzlich ECD-PTH2 als ein kompaktes, strukturiertes und gefaltetes Protein bestätigt werden. Die gute Dispersion und Aufspaltung der Signale im 1D-¹H-Spektrum, vor allem im Bereich der Amidprotonen und Methylgruppen, indizieren, dass diese in einer definierten Tertiärstruktur eingebettet sind und die Anwesenheit einer oligomeren Spezies ausgeschlossen werden kann. Zur Analyse der thermodynamischen Eigenschaften von ECD-PTH2 wurde die Stabilität gegenüber Temperatur und Guanidiniumchlorid charakterisiert. Die thermische Entfaltung der Rezeptordomäne von PTHR2 zeigte einen Übergangsmittelpunkt von 61,4 °C und war irreversibel. Dagegen zeigten die charakterisierten N-terminalen Ectodomänen des PTHR1 und GLP-1R einen partiell reversiblen Verlauf der thermischen Denaturierung und ihre Temperaturübergangsmittelpunkte bewegten sich zwischen 44 °C und 61 °C^[67, 68]. Die Entfaltung von ECD-PTH2 durch Guanidiniumchlorid war reversibel, zeigte aber eine geringe Kooperativität. Die hier beobachtete geringe Kooperativität und die ermittelte freie Stabilisierungsenthalpie von 6,1 kJ/mol, sowie der Übergangsmittelpunkt von 3,0 M GdmCl befinden sich in einer Größenordnung, die typisch für Klasse B GPCR-Ectodomänen sind. ECD-PTH2 besitzt damit eine vergleichbare Stabilität gegenüber Guanidiniumchlorid wie ECD-PTH1 und ECD-GLP-1R^[253, 254]. ECD-PTH2 bildete somit eine strukturierte Domäne, wenn auch mit geringer thermodynamischer Stabilität.

4.6 Analyse der Ligandenwechselwirkungen von ECD-PTH_{R2}

Nach erfolgreicher Reinigung und Renaturierung von ECD-PTH_{R2} mit Hilfe der SUMO-Fusionsmethode konnte durch die Analyse der Bindungskompetenz gegenüber bekannter Liganden die Funktionalität untersucht und damit die Annahme einer nativen Konformation für die Rezeptordomäne nachgewiesen werden. Die Ligandenbindungsfähigkeit von ECD-PTH_{R2} wurde mit den rekombinant hergestellten Agonist-Liganden TIP 39 und PTH (1-84) untersucht. TIP 39 ist der natürliche und gut charakterisierte physiologische Ligand des humanen PTH_{R2}^[84, 135, 139, 142, 150]. Auch durch humanes PTH (1-84) konnte eine Aktivierung des PTH_{R2} nachgewiesen werden^[185]. Beide Liganden werden spezifisch gebunden und zeigten ein agonistisches Verhalten an PTH_{R2} exprimierenden COS-7-, LLC_{PK}₁ und HEK 293-Zellsystemen^[84, 137, 139, 161, 166, 185]. Eine bestätigte Funktionalität von ECD-PTH_{R2} ist auch ein indirekter Nachweis, dass eine korrekte Disulfidverbrückung in der Rezeptordomäne vorgelegen hat. Die Ausbildung eines konservierten Disulfidbrückennetzwerks ist essentiell für die Rezeptorfunktion. Ein Aminosäureaustausch oder die Reduktion von Cysteinresten führt zum Verlust der Ligandenbindungsfähigkeit^[268, 276]. Eine qualitative Wechselwirkung der gereinigten und renaturierten N-terminalen Ligandenbindungsdomäne des PTH_{R2} mit den genannten Agonisten konnte mit nativer Gelelektrophorese erstmals *in vitro* nachgewiesen werden. Ein quantitativer Nachweis der Bindung des natürlichen Liganden TIP 39 und des PTH (1-84) an ECD-PTH_{R2} wurde in Fluoreszenzbindungsstudien beobachtet. Dafür wurde die statische Fluoreszenzlöschung der intrinsischen Fluoreszenz der Rezeptordomäne im Komplex mit den Liganden in Titrationsexperimenten untersucht. Die Auswertung der erhaltenen Bindungskurven zeigt, dass ECD-PTH_{R2} TIP 39 mit Affinitäten im unteren mikromolaren Bereich bindet ($K_D = 0,63 \mu\text{M}$), während die Affinität von ECD-PTH_{R2} gegenüber PTH (1-84) um das Zweifache vermindert ist ($K_D = 1,2 \mu\text{M}$), (Tabelle 4.3.1). Die hier bestimmten Dissoziationskonstanten stellen die vorläufig ersten, unter *in vitro* Bedingungen ermittelten, Affinitäten von ECD-PTH_{R2} gegenüber TIP 39 und PTH (1-84) dar. Die für die extrazelluläre Domäne des PTH_{R2} bestimmten Affinitäten sind vergleichbar mit den Affinitäten anderer Peptidhormone gegenüber ihren familiären GPCR-Ectodomänen der Klasse B^[67, 70, 78, 82, 83, 102, 188, 275]. In früheren und auf Rezeptor exprimierenden Zellsystem beruhenden Studien wurde die Ligandenbindungsaffinität des rekombinanten PTH_{R2}-Gesamt Rezeptors gegenüber TIP 39 und PTH untersucht. In diesen Studien wurden die Affinitäten des Parathormon-Rezeptor 2 als apparente Dissoziationskonstante IC_{50} angegeben. Die Darstellung des IC_{50} beschreibt dabei die Konzentration an nicht markiertem Ligand, die nötig ist, um 50 % rezeptorgebundenen radioaktiv markierten (¹²⁵I) Liganden zu verdrängen. Für den PTH_{R2} der Rate, der auf Oberflächen von COS-7-Zellen exprimiert wurde, variierten die ermittelten IC_{50} -Werte zwischen 7,5 nM, für die Bindung des aus der Maus gewonnenen mTIP 39 und 91 nM für die Bindung des humanen TIP 39^[161]. In diesem Fall wurde auch die Bindung des C-terminal verkürzten PTH (1-34) am Gesamt Rezeptor untersucht. Hier zeigte PTH (1-34) eine geringere Affinität gegenüber PTH_{R2}. Die bestimmten IC_{50} -Werte lagen im Bereich von 450 nM für die Bindung des humanen PTH (1-34) und bei 160 nM für die Bindung des aus der Ratte gewonnenen rPTH (1-34)^[161]. Für die Expression des humanen PTH_{R2} auf der Membranoberfläche von HEK293 und COS-7-Zellen lagen die IC_{50} -Werte bei ca. 0,6 nM bis 26 nM für die Bindung von TIP 39 und bei ca. 0,8 nM bis 18 nM für die Bindung von humanem PTH (1-

34)^[139, 161]. Zusammenfassend und in Übereinstimmung mit der Literatur zeigt der Gesamtrezeptor PTHR2 generell nanomolare Affinitäten für die Bindung von TIP 39 und PTH (1-34).

Die hier beobachtete und verminderte Affinität der rekombinant gewonnenen PTHR2-Ectodomäne gegenüber TIP 39 und PTH (1-84) im Vergleich zum Gesamtrezeptor ist wahrscheinlich wie bei ECD-PTH1^[67] durch den Domänencharakter von ECD-PTH2 begründet. Als gesichert gilt, dass die N-terminale extrazelluläre Domäne der GPCRs der Klasse B eine essentielle Rolle bei der Ligandenbindung spielt^[183]. Aus der zurückliegenden strukturellen Analyse der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung zwischen PTHR1 und PTH wird ein *two-domain-binding* Modell (1.2.3 Abbildung 1.9) für die Ligandenbindung postuliert, welches auch auf andere Klasse B GPCRs übertragen werden kann^[177, 180]. In diesem Modell bindet, wie wiederholt beschrieben, der C-terminale Bereich des Liganden die N-terminale extrazelluläre Domäne des Rezeptors, während anschließend der N-terminale Bereich des Liganden in Wechselwirkung mit Transmembranbereichen und extrazellulären *Loops* des Rezeptors tritt. Durch die vollständige Bindung des Liganden wird eine Konformationsänderung und Aktivierung des Rezeptors ausgelöst. Aus den Untersuchungen geht auch hervor, dass Transmembranbereiche und extrazelluläre *Loop*-Strukturen von Klasse B GPCRs wichtig für die Affinität der Ligandenbindung sind^[281]. Bei dem heterolog hergestellten ECD-PTH2 fehlen, ähnlich wie bei ECD-PTH1, diese Transmembranbereiche und extrazelluläre *Loop*-Strukturen. Eine verringerte Affinität der Ectodomäne gegenüber den genannten Liganden im Vergleich zum Gesamtrezeptor ist daher sehr wahrscheinlich. Eine verminderte Affinität der extrazellulären Domänen der Klasse B GPCRs gegenüber ihren spezifischen Liganden scheint charakteristisch zu sein. Bei der Analyse der Affinitäten spezifischer Liganden gegenüber den isolierten humanen Ectodomänen des PTH-Rezeptors 1, des GLP1-Rezeptors, des CRF-1-Rezeptors, des humanen PAC1-Rezeptors oder des GCG-Rezeptors konnte ebenfalls eine deutliche Abnahme der Bindungsaffinität im Vergleich zu den Gesamtrezeptoren beobachtet werden. Auch in diesen Fällen lag die Affinität im unteren mikromolaren Bereich^[67, 70, 102, 165, 248, 275]. Im Zusammenhang mit der Expression eines eukaryotischen Proteins in einem prokaryotischen System, wie *E. coli*, wird immer wieder eine fehlende Glykosylierung der Proteine diskutiert, die möglicherweise zum Verlust funktioneller Eigenschaften oder einer konformationellen Änderung im Protein und damit auch zum Verlust oder Verminderung der Bindungsaffinität führt. Die hier exprimierte Ectodomäne des PTHR2 besitzt sechs Asparagine, vier Serine und sechs Threonine, an die potentiell Kohlenhydrate N-glykosidisch oder O-glykosidisch gebunden werden können. In einem Protein werden allerdings nicht alle potentiellen Bindungsstellen glykolisiert. Die Glykolisierung ist abhängig von Faktoren wie der Proteinstruktur und der damit verbundenen Zugänglichkeit und vom Zelltyp, indem das Protein exprimiert wird. Das Ausbleiben einer Glykolisierung in *E. coli* kann durchaus zur Verminderung der Bindungsaffinität von Rezeptoren gegenüber spezifischer Liganden beitragen. So konnte für den CRL-Rezeptor (*Calcitonin-receptor-like-Rezeptor*) gezeigt werden, dass eine Glykosylierung wichtig für die biologische Funktionalität ist^[277]. Im Gegensatz dazu zeigen einige Rezeptoren, wie z.B. der Glukagonrezeptor (GCGR) und der β_2 -adrenergen-Rezeptor, keinen nennenswerten Einfluss auf die Ligandenbindung und Affinität beim Fehlen einer Glykolisierung^[70, 278]. In der Literatur wurde bis heute kein eindeutiges

Glykolisierungsmuster für den humanen PTHR2 oder die Ectodomäne beschrieben. Dennoch besitzt humanes ECD-PTH2 mit großer Wahrscheinlichkeit ein konserviertes Glykolisierungsmuster an N51, N106, N116 und N121, wie es auch im C-terminalen Bereich der N-terminalen Domäne des PTHR1 beobachtet wurde^[155]. Neben den sechs konservierten Cysteinresten sind möglicherweise die mutmaßlichen Glykosylierungen an der Ausbildung und Stabilisierung der Ligand-Bindungstasche beteiligt. Ob jedoch eine fehlende Glykosylierung von ECD-PTH2 zur Verminderung der Ligandenaffinität beiträgt, kann nur durch Glykolisierungsstudien untersucht werden. Wegen der durchgeführten Renaturierung von ECD-PTH2 aus *inclusion bodies* besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass ECD-PTH2 in eine strukturierte, native und funktionelle Proteindomäne überführt wurde, die aber nicht die biologisch relevante Konformation besaß, die eine hochaffine Bindung von Liganden erlaubt hätte. Ein konformationelles Problem könnte auch auf Seiten der Peptidliganden liegen. Für einige Peptidliganden wird eine membranunterstützte α -helikale Strukturierung beschrieben^[290]. Demzufolge assoziiert das Peptidhormon zuerst an die Zellmembran, was zu einer Strukturinduktion im Peptid führt, bevor es an den Rezeptor bindet. Aufgrund der fehlenden Membranbestandteile, im untersuchten System, können die Liganden möglicherweise nicht die Konformation einnehmen, die sie für eine hochaffine Bindung (nM) an die Ectodomäne brauchen.

Vor dem Hintergrund der durchgeführten Expression und der biophysikalischen, sowie funktionellen Charakterisierung von ECD-PTH2 kann davon ausgegangen werden, dass es gelungen ist, die Domäne nach Reinigung und Renaturierung in ausreichenden Mengen herzustellen und in ein eigenständiges, strukturiertes, stabiles und natives Protein zu überführen. Außerdem zeigt die N-terminale Domäne eine Ligandenbindungskompetenz. Mit der Aufklärung eines konservierten Disulfidmusters in ECD-PTH2 konnte für ein weiteres Mitglied der GPCR-Familie der Klasse B eine definierte Verknüpfung der Cysteinreste festgestellt werden. Damit bekräftigt sich die Annahme, dass renaturiertes humanes ECD-PTH2 zur Ausbildung einer nativen Struktur fähig ist. Die hier geschilderte Methode, zur Gewinnung von nativem ECD-PTH2, ist eine wichtige Grundlage für weiterführende *in vitro* Untersuchungen zur strukturellen Beschaffenheit und molekularen Wechselwirkung des Parathormon-Rezeptors 2 und seiner Liganden.

5 Ausblick

Die humanen Parathormon-Rezeptoren 1 und 2 und ihre Liganden PTH, PTHrP und TIP 39 besitzen derzeit ein bedeutendes Interesse in der Pharmazeutischen Industrie, weil sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Osteoporose, sowie Schmerz- und Entzündungsprozessen spielen. Eine weiterführende hochaufgelöste Charakterisierung molekularer Wechselwirkungen zwischen TIP 39 und PTHR2, sowie die Verwendung von TIP 39 zur Entwicklung neuer antagonistischer Peptide für den PTHR1 sind daher interessant^[149]. Die in dieser Arbeit etablierte heterologe Expression und Reinigung der Peptidliganden TIP 39, PTH (1-84) und PTH (15-34), sowie die Renaturierung einer ligandenbindungsfähigen Ectodomäne des PTHR2 bilden dafür eine wichtige Grundlage. In fortführenden Experimenten sollte eine weitere Optimierung der Ausbeute an ECD-PTHR2 erfolgen. Zusätzlich sollte die Bindungsreaktion von ECD-PTHR2 gegenüber TIP 39 und PTH thermodynamisch untersucht werden, um die hier beobachteten Ergebnisse zu verifizieren. Eventuell ergeben sich daraus Hinweise zu einem vergleichbaren oder abweichenden Bindungsverhalten von ECD-PTHR2 und seinen Liganden, als es für ECD-PTHR1 beschrieben wird. Weiterhin bleiben Fragen zum Diskriminierungsvermögen der Rezeptoren gegenüber ihren Liganden und zur Dynamik der extrazellulären Domänen und ob diese bei der Ligandenbindung eine Rolle spielen. Durch hochaufgelöste NMR- und Kristallisationsexperimente kann hier ein Einblick gewonnen werden. Mit diesen Methoden besteht auch die Möglichkeit zur Identifikation von Interaktionsflächen von PTH und TIP 39 mit ECD-PTHR2, die zu einem besseren Verständnis der molekularen Interaktion und der Funktion des Rezeptors führen. Für die Familie der humanen Parathormon-Rezeptoren konnte bisher die Kristallisation von ECD-PTHR1 erreicht werden, aber nur unter Einsatz des Maltose-*Binding*-Protein^[78]. Die Verwendung von MBP sollte zu einer löslichen Expression und zur Stabilisierung flexibler Bereiche in ECD-PTHR1 beitragen, die für die Ausbildung gut streuender Proteinkristalle nötig sind^[76, 78]. ECD-PTHR1 besitzt eine deutlich verlängerte und flexiblere *Loop*-Region zwischen Cys48 und Cys108, die ECD-PTHR2 fehlt. Aufgrund seiner kompakteren Beschaffenheit ist ECD-PTHR2 möglicherweise ein guter Kandidat für Kristallisationsversuche ohne artifizielle Modifikationen durch Fusionsproteine. Einige GPCR-Ectodomänen zeigen jedoch starke Löslichkeitsprobleme bei Konzentrationen, die für NMR- oder Kristallisationsexperimente nötig sind^[253]. In diesem Zusammenhang sollte für ECD-PTHR2 die Löslichkeit bei hohen Konzentrationen untersucht werden.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass der Signaltransduktionsweg, der zur Internalisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren führt, ein durch Regulationsebenen kontrollierter Prozess ist^[85, 155, 294]. Bisher spielt dafür die Phosphorylierung der GPCRs eine wichtige Rolle^[9, 41]. Darüber hinaus zeigen Liganden, die an GPCRs binden, die Eigenschaft bevorzugt einen von mehreren möglichen Signaltransduktionswegen zu aktivieren^[155]. In diesem Fall spricht man von einer funktionellen Selektivität der Liganden^[293] oder nennt sie *biased ligands*^[294, 295]. So können funktionell selektive Liganden z.B. die G-Protein-Kopplung oder die Bindung von β -Arrestin an GPCRs auslösen^[41] und dadurch eine spezifische Rezeptorkonformation, die für den selektiven Signaltransduktionsweg verantwortlich ist, stabilisieren^[291, 293, 294]. Darüberhinaus wird angenommen, dass *biased ligands* auch eine Internalisierung des Rezeptors auslösen,

jedoch ohne ihn zu aktivieren^[295]. Die Vorliebe eines Liganden einen bestimmten Signaltransduktionsweg zu aktivieren, kann dabei durch eine unterschiedlich starke Expression, posttranslationale Modifikation, Aktivität oder Konformation des Rezeptors ausgelöst werden^[292]. In jüngerer Zeit befinden sich jedoch zunehmend die Liganden im Fokus. Es wird vermutet, dass die funktionelle Selektivität auf die spezifischen Eigenschaften der Liganden selbst zurückzuführen ist^[292]. Über chemische Modifikationen von Peptidliganden des Neuropeptide Y Rezeptors (GPCR der Klasse A) kann die Einleitung eines spezifischen Signaltransduktionsweges, wie z.B. die Bindung von β -Arrestin und die damit verbundene Internalisierung des Rezeptors, sowie die G-Protein-Kopplung gesteuert werden^[296]. Zusätzlich führen die Modifikationen zu verlängerten Halbwertszeiten, die möglicherweise neben den bekannten Funktionen der Peptide neue zusätzliche Funktionen unterstützen^[296]. In diesem Zusammenhang wird klar, dass die Internalisierung und somit Entfernung von Rezeptoren von Zelloberflächen noch nicht vollständig verstanden ist und weiter untersucht werden sollte. Die hier beobachtete Phosphorylierung von PTH (1-84) und die damit verbundene Rezeptorinaktivierung von PTHR1 und PTHR2, ist möglicherweise eine Modifikation des Peptidliganden, die eine Internalisierung der Rezeptoren auslösen können, ohne sie jedoch dabei zu aktivieren. Phosphoryliertes PTH wäre in diesem Fall ein funktioneller Antagonist^[295]. Dieser Signaltransduktionsweg wäre eine Alternative zum bisher bekannten, der zur Entfernung von PTH-Rezeptormolekülen von der Zelloberfläche dient. Um diesen Mechanismus oder ein therapeutisches Potential für phosphoryliertes PTH besser zu verstehen, sollte weiterführend eine Rezeptorinternalisierung der PTH-Rezeptoren 1 und 2 in Gegenwart von phosphoryliertem PTH untersucht werden. Eine Möglichkeit dafür bietet die Verwendung fluoreszenzmarkierter Liganden, um gewebespezifische Internalisierungsmechanismen und -kinetiken mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie zu verfolgen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Henze, M., Magg, C., Rudolph, R. (2006). Rekombinante Expression und funktionale Renaturierung von Klasse B GPCR-Ectodomänen unter Einsatz des *artificial chaperon systems* (acs). Forschungsarbeit, *Naturwissenschaftliche Fakultät I, Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [2] Ritter, S. L., Hall, R. A. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 819-30.
- [3] Rana, B. K., Shiina, T., Insel, P. A. (2001). Genetic variation and polymorphisms of G-protein-coupled receptors: functional and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 593-624.
- [4] Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- [5] Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., Fitz Hugh, W. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- [6] Hopkins, A. L., Groom, C. R. (2002). The druggable genome. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **1**, 727-730.
- [7] Wise, A., Gearing, K., Rees, S. (2002). Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug. Discov. Today* **7**, 235-246.
- [8] Wess, J. (1998). Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol. Ther.* **80**, 231-264.
- [9] Pierce, K. L., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 639-650.
- [10] Bridges, T. M. & Lindsley, C. W. (2008). G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. *ACS Chem. Biol.* **3**, 530-541.
- [11] Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G., 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.
- [12] Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., Brown, A., Rodriguez, S. S., Weller, J. R., Wright, A. C. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4903-4908.
- [13] Eglen, R. M., Bosse, R., Reisine, T. (2007). Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay Drug Dev. Technol.* **5**, 425-451.
- [14] Lagerström, M. C., Schiöth, H. B. (2008). Structural diversity of G protein coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 339-357.
- [15] Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., Seuwen, K. (2006). The 7 TM G-protein coupled receptor target family. *Chem. Med. Chem.* **1**, 761-782.
- [16] Fredholm, B. B., Hokfelt, T., Milligan, G. (2007). G-protein-coupled receptors: an update. *Acta. Physiol. (Oxf)* **190**, 3-7.
- [17] Fredriksson, R., Schioth, H. B. (2005). The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1414-1425.
- [18] Kolakowski, L. F., Jr. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **2**, 1-7.
- [19] Attwood, T. K., Findlay, J. B. (1994). Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* **7**, 195-203.

- [20] Clare, E., and Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants. (2004). The state of GPCR research in 2004 *Nat. Rev. Drug. Discov.* **3**, 575, 577-626.
- [21] Davies, M. H., Glöriam, D. E., Secher, A., Freitas, A. A. Mendao, M., Timmis, J., Flower, D. R. (2007). Protonomic applications of automated GPCR classification. *Proteomics* **7**, 2800-2814.
- [22] Horn, F., Bettler, E., Oliveira, L., Campagne, F., Cohen, F. E., Vriend, G. (2003). GPCR DB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic. Acids Res.* **31**, 294-297.
- [23] Gether, U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **21**, 90-113.
- [24] Kristiansen, K. (2004). Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol. Ther.* **103**, 21-80.
- [25] Schiöth, H. B., Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp. Endocrinol.* **142**, 94-101.
- [26] Bjarnadóttir, T. K., Gloriam, D. E., Hellstrand, S. H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., Schiöth, H. B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* **88**, 263-273.
- [27] Stacey, M., Lin, H. H., Gordon, S., McKnight, A. J. (2000). LNB-TM7, a group of seven-transmembrane proteins related to family-B G-protein-coupled receptors. *Trends. Biochem. Sci.* **25**, 284-289.
- [28] Pin, J. P., Galvez, T. and Prezeau, L. (2003). Evolution, structure and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **98**, 325-354.
- [29] Pin, J. P., Kniazeff, J., Liu, J., Binet, V., Goudet, C., Rondard, P. and Prezeau, L. (2005). Allosteric functioning of dimeric class C G-protein-coupled receptors. *FEBS J.* **272**, 2947-2955.
- [30] Dong, M., Koole, C., Wootten, D., Sexton, P. M., Miller, L. J. (2014). Structural and functional insights into the juxtamembranous amino-terminal tail and extracellular loop regions of class B GPCRs. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 1085-1101.
- [31] Filmore, D. (2004). It's a GPCR world. *Modern Drug Discovery*, **7**, 24-28.
- [32] Corin, K., Tegler, L.T., Koutsopoulos S. (2014). G-protein-coupled receptor expression and purification. *Methods Mol. Biol.* **1129**, 461-86.
- [33] Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D., Dixon, R. A. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 101-132.
- [34] Rubenstein, L. A. (1998). Activation of G protein-coupled receptors entails cysteine modulation of agonist binding. *Journal of molecular Structure* **430**, 57-71.
- [35] Narendra T. (2009). Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav.* **4**, 942-947.
- [36] Vilardaga, J. P., Agnati, L.F., Fuxe, K., Ciruela, F. (2010). G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *J. Cell Sci.* **123**, 4215-4220.
- [37] Wieland, T., Michel, M. C. (2005). Can a GDP-liganded G-protein be active? *Mol. Pharmacol.* **68**, 559-562.
- [38] Gurevich V.V., Gurevich E.V. (2008). How and why do GPCRs dimerize. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 234-340.
- [39] Birnbaumer, L. (2007). Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 α subunits plus $\beta\gamma$ dimers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1768**, 772-793.

- [40] Hall, R. A., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J. (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J. Cell Biol.* **145**, 927-932.
- [41] Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **53**, 1-24.
- [42] Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745.
- [43] Okada, T., M. Sugihara, A.-N. Bondar, M. Elstner, P. Entel and V. Buss (2004). The Retinal Conformation and its Environment in Rhodopsin in Light of a New 2.2 Å Crystal Structure. *J. Mol. Biol.* **342**, 571-583.
- [44] Li, J., P. C. Edwards, M. Burghammer, C. Villa and G. F. X. Schertler (2004). Structure of Bovine Rhodopsin in a Trigonal Crystal Form. *J. Mol. Biol.* **343**, 1409-1438.
- [45] Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I., Kobilka, B. K. (2007). Crystal structure of the human beta-2-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383-387.
- [46] Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K., et al. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-1265.
- [47] Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., Leslie, A. G., Tate, C. G., Schertler, G. F. (2008). Structure of a β_1 -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**, 486-91.
- [48] Day, P. W., Rasmussen, S. G., Parnot, C., Fung, J. J., Masood, A., Kobilka, T. S., Yao, X. J., Choi, H. J., Weis, W. I., Rohrer, D. K., et al. (2007). A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography. *Nat. Methods* **4**, 927-929.
- [49] Kobilka, B., Schertler, G. F. (2008). New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 79-83.
- [50] Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Yao, X. J., Weis, W. I., Stevens, R. C. (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β_2 -adrenergic receptor function. *Science* **318**, 1266-1273.
- [51] Hanson, M. A., Cherezov, V., Griffith, M. T., Roth, C. B., Jaakola, V. P., Chien, E. Y., Velasquez, J., Kuhn, P., Stevens, R. C. (2008). A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human β_2 -adrenergic receptor. *Structure* **16**, 897-905.
- [52] Rasmussen, S. G., Devree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Kobilka, B. K., et al. (2011). Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549-55.
- [53] Hanson, M. A., Stevens, R. C. (2009). Discovery of new GPCR biology: one receptor structure at a time. *Structure* **17**, 8-14.
- [54] Roth, C. B., Hanson, M. A., Stevens, R. C. (2008). Stabilization of the human β_2 -adrenergic receptor TM4-TM3-TM5 helix interface by mutagenesis of Glu1223.41, a critical residue in GPCR structure. *J. Mol. Biol.* **376**, 1305-1319.
- [55] Bokoch, M. P., Zou, Y., Rasmussen, S. G., Liu, C. W., Nygaard, R., Rosenbaum, D. M., Fung, J. J., Choi, H. J., Thian, F. S., Kobilka, T. S., et al. (2010). Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G protein coupled receptor. *Nature* **463**, 108-112.

- [56] Weis, W. I., Kobilka, B. K. (2008). Structural insights into G-protein-coupled receptor activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 734-740.
- [57] Mustafi, D., Palczewski, K. (2009). Topology of class A G protein-coupled receptors: insights gained from crystal structures of rhodopsins, adrenergic and adenosine receptors. *Mol. Pharmacol.* **75**, 1-12.
- [58] Okada, T., Ernst, O. P., Palczewski, K., Hofmann, K. P. (2001). Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 318-324.
- [59] Jaakola, V. P., Ijzerman, A. P. (2010). The crystallographic structure of the human adenosine A2A receptor in a high-affinity antagonist-bound state: implications for GPCR drug screening and design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 401-414.
- [60] Piirainen, H., Ashok, Y., Nanekar, R. T., Jaakola, V. P. (2011). Structural features of adenosine receptors: from crystal to function. *Biochim. Biophys. Acta.* **1808**, 1233-1244.
- [61] Xu, F., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Jacobson, K. A., Gao, Z. G., Cherezov, V., Stevens, R. C. (2011). Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* **332**, 322-327.
- [62] Lebon, G., Warne, T., Edwards, P. C., Bennett, K., Langmead, C. J., Leslie, A. G., Tate, C. G. (2011). Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* **474**, 521-525.
- [63] Angel, T. E., Chance, M. R., Palczewski, K. (2009). Conserved waters mediate structural and functional activation of family A (rhodopsin-like) G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8555-8560.
- [64] Hollenstein K., Kean, J., Bortolato, A., Cheng, R. K. Y., Dore, A. S., Jazayeri, A., Cooke, R. M., Weir M., Marshall F. H. (2013). Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* **499**, 438-443.
- [65] Siu Yiu, F., He, M., de Graaf, C., Han, G. W., Yang, D., Zhang, Z., Zhou, C., Xu, Q., Wacker, D., Joseph, S. J., Liu, W., Lau, J., Cherezov, V., Katritch, V., Wang, M.-W. and Stevens, R. C. (2013). Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* **499**, 444-449.
- [66] Wettschureck, N., Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* **85**, 1159-1204.
- [67] Grauschopf, U., Lilie, H., Honold, K., Wozny, M., Reusch, D., Esswein, A., Schafer, W., Rucknagel, K.P., 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.
- [68] Bazarsuren, A., Grauschopf, U., Wozny, M., Reusch, D., Hoffmann, E., Schaefer, W., Panzner, S., 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.
- [69] Parthier, C., Reedtz-Runge, S., Rudolph, R., Stubbs, M.T. (2009). Passing the baton in class B GPCRs: peptide hormone activation via helix induction? *Trends. Biochem. Sci.* **34**, 303-310.
- [70] Wu, L., Zhai, Y., Lu, J., Wang, Q., Sun, F. (2013). Expression, purification and preliminary characterization of glucagon receptor extracellular domain. *Protein Expr. Purif.* **89**, 232-240.
- [71] Kumar, S., Pioszak, A. A., Zhang, C., Swaminathan, K., Xu, H. E. (2011). Crystal structure of the PAC1R extracellular domain unifies a consensus fold for hormone recognition by class B G-protein coupled receptors. *PLoS One.* **6**, e19682.

- [72] Grace, C. R. R., Perrin, M. H., Gulyas, J., Rivier, J. E., Vale, W. W. and Riek, R. (2010). NMR structure of the first extracellular domain of corticotropin-releasing complexed with a high affinity agonist receptor 1 (ECD1-CRF-R1) factor. *J. Biol. Chem.* **285**, 38580-38589.
- [73] Pal, K., Swaminathan, K., Xu, H. E., Pioszak, A. A. (2010). Structural basis for hormone recognition by the Human CRFR2{ α } G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **285**, 40351-40361.
- [74] Pioszak, A. A., Harikumar, K. G., Parker, N. R., Miller L. J. and Xu., E. H. (2010). Dimeric arrangement of the parathyroid hormone receptor and a structural mechanism for ligand-induced dissociation. *J. Biol. Chem.* **285**, 12435-12444.
- [75] Pioszak, A. A, Parker, N. R., Gardella, T. J., Xu, H. E. (2009). Structural basis for parathyroid hormone-related protein binding to the parathyroid hormone receptor and design of conformation-selective peptides. *J. Biol. Chem.* **284**, 28382-28391.
- [76] Pioszak, A. A., Parker, N. R., Suino-Powell, K., Xu, H. E. (2008). Molecular recognition of corticotrophin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *J. Biol. Chem.* **283**, 32900-32912.
- [77] Klose, J., Wendt, N., Kubald, S., Krause, E., Fechner, K., Beyermann, M., Bienert, M., Rudolph, R., Rothmund, S. (2004). Hexa-histidin tag position influences disulfide structure but not binding behavior of in vitro folded N-terminal domain of rat corticotropin-releasing factor receptor type 2a. *Protein Science* **13**, 2470-2475.
- [78] Pioszak, A. A., Xu, H.E. (2008). Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5034-5039.
- [79] Runge, S., Thøgersen, H., Madsen, K., Lau, J., Rudolph, R. (2008). Crystal structure of the ligand-bound glucagonlike peptide-1 receptor extracellular domain. *J. Biol.Chem.* **283**, 11340-11347.
- [80] Sun, C., Song, D., Davis-Taber, R. A., Barrett, L. W., Scott, V. E., Richardson, P. L., Pereda-Lopez, A., Uchic, M. E., Solomon, L. R., Lake, M. R., Walter, K. A., Hajduk, P. J., Olejniczak, E. T. (2007). Solution structure and mutational analysis of pituitaryadenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-RS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7875-7880.
- [81] Runge, S., Schimmer, S., Oschmann, J., Schiødt, C.B., Knudsen, S.M., Jeppesen, C.B., Madsen, K., Lau, J., Thøgersen, H., Rudolph, R. (2007). Differential structural properties of GLP-1 and exendin-4 determine their relative affinity for the GLP-1 receptor N-terminal extracellular domain. *Biochemistry.* **46**, 5830-5840.
- [82] Parthier, C., Kleinschmidt, M., Neumann, P., Rudolph, R., Manhart, S., Schlenzig, D., Fanghänel, J., Rahfeld, J. U., Demuth, H. U., Stubbs, M. T. (2007). Crystal structure of the incretin-bound extracellular domain of a G protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 13942-13947.
- [83] Grace, C.R., Perrin, M.H., Gulyas, J., Digruccio, M.R., Cantle, J.P., Rivier, J.E., Vale, W.W., Riek, R. (2007). Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4858-4863.
- [84] Usdin, T. B., Wang, T., Hoare, S. R., Mezey, E., Palkovits, M. (2000). New members of the parathyroid hormone/parathyroid hormone receptor family: the parathyroid hormone 2 receptor and tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Front Neuroendocrinol* **21**, 349-383.
- [85] Vilardaga, J. P., Romero, G. Friedman, P. A. Gardella, T. J. (2011). Molecular basis of parathyroid hormone receptor signaling and trafficking: a family B GPCR paradigm. *Cell Mol. Life Sci.* **68**, 1-13.

- [86] Datta, N. S., Abou-Samra, A. B. (2009). PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal*. **21**, 1245-1254.
- [87] Potts, J. T. Jr, Bringham, F. R., Gardella, T., Nussbaum, S., Segre, G., Kronenberg, H. (1995). Parathyroid hormone: physiology, chemistry, biosynthesis, secretion, metabolism and mode of action. *In* William's Textbook of Endocrinology Edited by Williams RH, Wilson JD, Foster DN Saunders. 920-966, ISBN: 0721642640.
- [88] Murray, T. M., Rao, L. G., Divieti, P., Bringham, F. R. (2005). Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxylterminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocr Rev* **26**, 78-113.
- [89] Divieti, P., Geller A. I., Suliman G., Jüppner H., Bringham, F. R. (2005). Receptors Specific for the Carboxyl-Terminal Region of Parathyroid Hormone on Bone Derived Cells: Determinants of Ligand Binding and Bioactivity. *Endocr*. **46**, 1863-1870.
- [90] Martin, K. J., Akhtar, I., Gonzalez, E. A. (2004). Parathyroid Hormone: New Assays, New Receptors. *Semin. Nephrol*. **24**, 3-9.
- [91] Agus, Z. S., Gardner, L. B., Beck, L. H., Goldberg, M. (1973). Effects of parathyroid hormone on renal tubular reabsorption of calcium, sodium, and phosphate. *Am J Physiol* **224**, 1143-1148.
- [92] Raisz, L. G. (1963). Stimulation of bone resorption by parathyroid hormone in tissue culture. *Nature* **197**, 1015-1016.
- [93] Habener, J. F., Rosenblatt, M., Kemper, B., Kronenberg, H. M., Rich, A., Potts, J. T Jr. (1978). Pre-parathyroid hormone, amino acid sequence, chemical synthesis, and some biological studies of the precursor region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 2616-2620.
- [94] Habener, J. F., Rosenblatt, M., Potts, J. T Jr. (1984). Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol. Rev.* **64**, 985-1053.
- [95] Lorraine, A. F., Bilezikian, J. P., Seibel, M. J., Robins, S. P., Bilezikian, J. P. (1999). Parathyroid Hormone: Structure, Function and Dynamic Actions. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism.*, Academic Press, pp 187-202.
- [96] Kronenberg, H. M., Bringham, F. R., Segre, G. V., Potts, J. T. Jr. (1994). Parathyroid hormone biosynthesis and metabolism. *The Parathyroids: Basics and Clinical Concepts* 125-137.
- [97] Murer, H., Forster, I., Biber, J. (2004). The sodium phosphate cotransporter family SLC34, *Pflugers Arch.* **447**, 763-767.
- [98] Gensure, R. C., Gardella, T. J., Jüppner, H. (2005). Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **328**, 666-678.
- [99] Cantorna, M. T., Zhu, Y., Froicu, M., Wittke, A. (2004). Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 1717-1720.
- [100] Morley, P., Whitfield, J. F., Willick, G. E. (1997). Anabolic effects of parathyroid hormone on bone. *Trends Endocrinol. Metabol.* **8**, 225-231.
- [101] Saag, K. G., Shane, E., Boonen, S., Marin, F., Donley, D. W., Taylor, K. A., Dalsky, G. P., Marcus, R. (2007). Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2028-2039.
- [102] Moanaghan, P., Woznica, I., Moza, B., Sundberg, E. J., Rosenblatt, M. (2007). Recombinant expression and purification of the N-terminal extracellular domain of the parathyroid hormone receptor. *Prot. Expr. Purif.* **54** 87-93.
- [103] Hausch, F. (2013). Structures of Class B G Protein-Coupled Receptors: Prospects for Drug Discovery. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 12783-12785.

- [104] Mannstadt, M., Luck, M. D., Gardella, T. J., Jüppner, 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.
- [105] Bringhurst, F. R., Stern, A. M., Yotts, M., Mizrahi, N., Segre, G. V., Potts, J. T. Jr. (1988). Peripheral metabolism of PTH: fate of biologically active amino terminus in vivo. *Am. J. Physiol.* **255**, 886-893.
- [106] MacGregor, R. R., Jilka, R. L., Hamilton, J. W. (1986). Formation and secretion of fragments of parathormone. Identification of cleavage sites. *J. Biol. Chem.* **261**, 1929-1934.
- [107] Inomata, N., Akiyama, M., Kubota, N., Jüppner, H. (1995). Characterization of a novel parathyroid hormone (PTH) receptor with specificity for the carboxylterminal region of PTH-(1-84). *Endocrinology* **136**, 4732-4740.
- [108] Kaji, H., Sugimoto, T., Kanatani, M. (1994). Carboxyl-terminal PTH fragments stimulate osteoclast-like cell formation and osteoclastic activity. *Endocrinology* **134**, 1897-1904.
- [109] Marx, U. C., Adermann, K., Bayer, P., Forssmann, W. G., Rosch, P. (2000). Solution structures of human parathyroid hormone fragments hPTH(1-34) and hPTH(1-39) and bovine parathyroid hormone fragment bPTH(1-37). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 213-220.
- [110] Marx, U. C., Austermann, S., Bayer, P., Adermann, K., Ejchart, A., Sticht, H., Walter, S., Schmid, F. X., Jaenicke, R., Forssmann, W. G., et al. (1995). Structure of human parathyroid hormone 1-37 in solution. *J. Biol. Chem.* **270**, 15194-15202.
- [111] Weidler, M., Marx, U. C., Seidel, G., Schafer, W., Hoffmann, E., Esswein, A., Rosch, P. (1999). The structure of human parathyroid hormone-related protein(1-34) in near-physiological solution. *FEBS Lett.* **444**, 239-244.
- [112] Jin, L., Briggs, S. L., Chandrasekhar, S., Chirgadze, N. Y., Clawson, D. K., Schevitz, R. W., Smiley, D. L., Tashjian, A. H., Zhang, F. (2000). Crystal structure of human parathyroid hormone 1-34 at 0.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **275**, 27238-27244.
- [113] McCauley, L. K., Martin, T. J. (2012). Twenty-five years of PTHrP progress: from cancer hormone to multifunctional cytokine. *J. Bone. Miner. Res.* **27**, 1231-1239.
- [114] Moseley, J. M., Kubota, M., Diefenbach-Jagger, H., Wettenhall, R. E., Kemp, B. E., Suva, L. J., Rodda, C. P., Ebeling, P. R., Hudson, P. J., Zajac, J. D., Martin, T. J. (1987). Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5048-5052.
- [115] Strewler, G. J. (2000). The physiology of parathyroid hormone-related protein. *N. Engl. J. Med.* **342**, 177-185.
- [116] Broadus, A. E., Mangin, M., Ikeda, K., Insogna, K. L., Weir, E. C., Burtis, W. J., Stewart, A. F. (1988). Humoral hypercalcemia of cancer. Identification of a novel parathyroid hormone-like peptide. *N. Engl. J. Med.* **319**, 556-563.
- [117] 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., et al. (1987). A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* **237**, 893-896.
- [118] Ogata, E. (2000). Parathyroid hormone-related protein as a potential target of therapy for cancer-associated morbidity. *Cancer* **88**, 2909-2911.
- [119] Guise, T. A., Yin, J. J., Taylor, S. D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B. F., Yoneda, T., Mundy, G.R (1996). Evidence for a causal role of parathyroid hormone related protein in breast cancer mediated osteolysis. *J. Clin. Invest.* **98**, 1544-1548.

- [120] Bundred, N. J., Ratcliffe, W. A., Walker, R. A., Coley, S., Morrison, J. M., Ratcliffe, J. G. (1991). Parathyroid hormone related protein and hypercalcaemia in breast cancer. *Br. Med. J.* **303**, 1506-1509.
- [121] Guise, T. A., Mundy, G. R. (1996). Physiological and pathological roles of parathyroid hormone-related peptide. *Curr Opin. Nephrol. Hypertens.* **5**, 307-315.
- [122] Kovacs, C. S., Lanske, B., Hunzelman, J. L., Guo, J., Karaplis, A. C., Kronenberg, H. M. (1996). Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 15233-15238.
- [123] Chevalley, T., Rizzoli, R. (1999). Bone and hormones. [Effects of parathyroid hormone on the bone] *Presse Med.* **28**, 547-553.
- [124] Dempster, D. W., Cosman, F., Parisien, M., Shen, V., Lindsay, R. (1993). Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr. Rev.* **14**, 690-709.
- [125] Care, A. D., Abbas, S. K., Harnmeyer, J., Boivin, R. (1999). The relaxant effects of parathyroid hormone-related protein (1-34) on ovine reticulo-ruminal smooth muscle in vivo. *Exp. Physiol.* **84**, 665-675.
- [126] Brandt, D. W., Wachsman, W., Deftos, L. J. (1994). Parathyroid hormone-like protein: alternative messenger RNA splicing pathways in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **54**, 850-853.
- [127] Yasuda, T., Banville, D., Hendy, G. N. and Goltzman, D. (1989). Characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. Functional and evolutionary aspects. *J. Biol. Chem.* **264**, 7720-7725.
- [128] Mangin, M., Ikeda, K., Dreyer, B. E., Milstone, L. and Broadus, A. E., (1988). Two distinct tumor-derived, parathyroid hormone-like peptides result from alternative ribonucleic acid splicing. *Mol. Endocrinol.* **2**, 1049-1055.
- [129] Karaplis, A. C., Goltzmann, D. (1999). PTHrP: Of Molecules, Mice, and Men. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism, Academic Press*, pp 203-213.
- [130] Lanske, B., Divieti, P., Kovacs, C. S., Pirro, A., Landis, W. J., Krane, S. M., Bringhurst, F. R., Kronenberg, H. M. (1998). The parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mediates actions of both ligands in murine bone. *Endocrinology.* **139**, 5194-5204.
- [131] Luparello, C. (2010). Midregion PTHrP and human breast cancer cells. *Scientific World Journal.* **10**, 1016-1028.
- [132] Burtis, W. J. (1992). Parathyroid hormone-related protein: structure, function, and measurement. *Clin. Chem.* **38**, 2171-2183.
- [133] Gardella, T. J., Luck, M. D., Jensen, G. S., Usdin, T. B., Jüppner, H., (1996). Converting parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) into a potent PTH-2 receptor agonist. *J. Biol. Chem.* **271**, 19888-19893.
- [134] Pellegrini, M., Royo, M., Rosenblatt, M., Chorev, M., Mierke, D. F. (1998). Addressing the Tertiary Structure of Humane Parathyroid Hormone (1-34). *J. Biol. Chem.* **273**, 10420-10427.
- [135] Usdin, T. B., Hoare, S. R., Wang, T., Mezey, E., Kowalak, J. A. (1999). TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus. *Nat. Neurosci.* **2**, 941-943.
- [136] Usdin, T. B. (1997). Evidence for a parathyroid hormone-2 receptor selective ligand in hypothalamus. *Endocrinology* **138**, 831-834.
- [137] John, M.R., Arai, M., Rubin, D. A., Jonsson, K. B., Jüppner, H. (2002). Identification and characterization of the murine and human gene encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Endocrinol.* **143**, 1047-1057.

- [138] Della Penna, K., Kinose, F., Sun, H., Koblan, K. S., Wang, H. (2003). Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39): molecular structure and activity for parathyroid hormone 2 receptor. *Neuropharmacology* **44**, 141-153.
- [139] Hoare, S. R., Clark, J. A., Usdin, T. B. (2000). Molecular determinants of tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) selectivity for the parathyroid hormone-2 (PTH2) receptor: N-terminal truncation of TIP39 reverses PTH2 receptor / PTH1 receptor binding selectivity. *J. Biol. Chem.* **275**, 27274-27283.
- [140] Panda, D., Goltzman D., Jüppner, H., Karaplis A. C. (2009). TIP39/parathyroid hormone type 2 receptor signaling is a potent inhibitor of chondrocyte proliferation and differentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**, 1125–1136.
- [141] Hansen, I. A., Jakob, O., Wortmann, S., Arzberger, T., Allolio, B. and Blind, E. (2002). Characterization of the human and mouse genes encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues, a ligand of the parathyroid hormone receptor family. *J. Endocrinol.* **174**, 95-102.
- [142] Usdin, T. B. (2000). The PTH2 receptor and TIP39: a new peptide-receptor system. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 128-130.
- [143] Usdin, T. B., A. Dobolyi, *et al.* (2003). Emerging functions for tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Trends Endocrinol. Metab.* **14**, 14-19.
- [144] Dobolyi, A., Ueda, H., Uchida, H., Palkovits, M. and Usdin, T. B. (2002). Anatomical and physiological evidence for involvement of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in nociception. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 1651-1656.
- [145] Ward, H. L., Small, C. J., Murphy, K. G., Kennedy, A. R., Ghatei, M. A. and Bloom, S. R. (2001). The actions of tuberoinfundibular peptide on the hypothalamo-pituitary axes. *Endocrinology* **142**, 3451-3456.
- [146] Faber, C. A., A. Dobolyi, *et al.* (2007). Distribution of tuberoinfundibular peptide of 39 residues and its receptor, parathyroid hormone 2 receptor, in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **502**, 563-583.
- [147] Jonsson, K. B., John, M. R., Gensure, R. C., Gardella, T. J., Jüppner, H. (2001). Tuberoinfundibular peptide 39 binds to the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor, but functions as an antagonist. *Endocrinology.* **142**, 704-709.
- [148] Hoare, S. R., Usdin, T. B. (2000). Tuberoinfundibular peptide (7-39) [TIP(7-39)], a novel, selective, high-affinity antagonist for the parathyroid hormone-1 receptor with no detectable agonist activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 761-70.
- [149] Abraham-Nordling, M., Persson, B., Nordling, E. (2010). Model of the complex of Parathyroid hormone-2 receptor and Tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *BMC Res. Notes.* **3**, 270.
- [150] Piserchio, A., Usdin, T., Mierke, D. F. (2000). Structure of tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *J. Biol. Chem.* **275**, 27284-27290.
- [151] Jüppner, H., Abou-Samra, A. B., Freeman, M., Kong, X. F., Schipani, E., Richards, J., Kolakowski, L. F., Jr., Hock, J., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M. (1991). A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* **254**, 1024-1026.
- [152] Schipani, E., Karga, H., Karaplis, A. C., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M., Segre, G. V., Abou-Samra, A. B., Jüppner, H., (1993). Identical complementary deoxyribonucleic acids encode a human renal and bone parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *Endocrinology* **132**, 2157-2165.
- [153] McCuaig, K. A., Clarke, J. C. and White, J. H., (1994). Molecular cloning of the gene encoding the mouse parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5051-5055.

- [154] Smith, D. P., Zhang, X. Y., Frolik, C. A., Harvey, A., Chandrasekhar, S., Black, E. C., Hsiung, H. M. (1996). Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Biochem. Biophys. Acta.* **1307**, 339-347.
- [155] Gardella, T. J., Jüppner, H. (2001). Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **12**, 210-217.
- [156] Nutt, R. F., Caulfield, M. P., Levy, J. J., Gibbons, S. W., Rosenblatt, M. and McKee, R. L. (1990). Removal of partial agonism from parathyroid hormone (PTH)-related protein-(7-34)NH₂ by substitution of PTH amino acids at positions 10 and 11. *Endocrinology* **127**, 491-493.
- [157] Kronenberg, H. M., Lanske, B., Kovacs, C. S., Chung, U. I., Lee, K., Segre, G. V., Schipani, E., Jüppner H. (1998). Functional analysis of the PTH/PTHrP network of ligands and receptors. *Recent. Prog. Horm. Res.* **53**, 283-301.
- [158] Urena, P., Kong, X. F., Abou-Samra, A. B., Jüppner, H., Kronenberg, H. M., Potts, J. T. Jr., Segre, G. V. (1993). Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology* **133**, 617-623.
- [159] Usdin, T. B., Gruber, C., Bonner, T. I. (1995). Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 15455-15458.
- [160] Usdin, T. B., Bonner T. I., Hoare, S. R. (2002). The parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor. *Receptor Channels* **8**, 211-218.
- [161] Goold, C. P., Usdin, T. B., Hoare, S. R. (2001). Regions in rat and human parathyroid hormone (PTH) 2 receptors controlling receptor interaction with PTH and with antagonist ligands. *JPET* **299**, 678-690.
- [162] Usdin, T. B., Modi, W., Bonner, T. I. (1996). Assignment of the human PTH2 receptor gene (PTHR2) to chromosome 2q33 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **37**, 140-141.
- [163] Behar, V., Pines, M., Nakamoto, C., Greenberg, Z., Bisello, A., Stueckle, S. M., Bessalle, R., Usdin, T. B., Chorev, M., Rosenblatt, M., Suva, L. J. (1996). The human PTH2 receptor: binding and signal transduction properties of the stably expressed recombinant receptor. *Endocrinology* **137**, 2748-2757.
- [164] Klose, J., Wendt, N., Bubald, S., Krause, E., Fechner, K., Beyerman, M., Bienert, M., Rudolph, R., Rothmund, S. (2004). Hexa-histidin tag position influences disulfide structure but not binding behavior of in vitro folded N-terminal domain of rat corticotrophin-releasing factor receptor type 2a. *Protein Science* **13**, 2470-2475.
- [165] Schröder-Tittmann, K., Bosse-Doenecke, E., Reedtz-Runge, S., Ihling, C., Sinz, A., Tittmann, K., Rudolph, R. (2010). Recombinant Expression, in Vitro Refolding, and Biophysical Characterization of the Human Glucagon-like Peptide-1 Receptor. *Biochemistry* **49**, 7956-7965.
- [166] Bisello, A., Manen, D., Pierroz, D. D., Usdin, T. B. Rizzoli, R., Ferrari, S. L. (2004). Agonist-specific Regulation of Parathyroid Hormone (PTH) Receptor Type 2 Activity: Structural and Functional Analysis of PTH- and Tuberoinfundibular Peptide (TIP) 39-Stimulated Desensitization and Internalization. *Mol. Endocrinol.* **18**, 1486-1498.
- [167] Usdin, T. B., Bonner, T. I., Harta, G., Mezey, E. (1996). Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat. *Endocrinology* **137**, 4285-4297.

- [168] Gardella, T. J., Wilson, A. K., Keutmann, H. T., Oberstein, R., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, M., Nussbaum, S. R. (1993). Analysis of parathyroid hormone's principal receptor-binding region by site-directed mutagenesis and analog design. *Endocrinology* **132**, 2024-2030.
- [169] Hoare, S. R., Usdin, T. B. (2001). Molecular mechanisms of ligand recognition by parathyroid hormone 1 (PTH1) and PTH2 receptors. *Curr. Pharm. Des.* **7**, 689-713.
- [170] Dobolyi, A. (2009). Parathyroid hormone 2 receptor and its endogenous ligand tuberoinfundibular peptide of 39 residues are concentrated in endocrine, viscerosensory and auditory brain regions in macaque and human. *Neuroscience* **162**, 128-147.
- [171] Fegley, D. B., Holmes, A., Riordan, T., Faber, C. A., Weiss, J. R., Ma, S., Batkai, S., Pacher, P., Dobolyi, A., Murphy, A., Sleeman, M. W., Usdin, T. B. (2008). Increased fear- and stress-related anxiety-like behavior in mice lacking tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Genes. Brain. Behav.* **7**, 933-942.
- [172] LaBuda, C. J., Usdin, T. B. (2004). Tuberoinfundibular peptide of 39 residues decreases pain related affective behavior. *Neuroreport* **15**, 1779-1782.
- [173] LaBuda, C. J., Dobolyi, A., Usdin, T. B. (2004). Tuberoinfundibular peptide of 39 residues produces anxiolytic and antidepressant actions. *Neuroreport* **15**, 881-885.
- [174] Grennberg, Z., Bisello, A., Mierke, D. F., Rosenblatt, M., Chorev, M. (2000). Mapping the biomolecular interface of the parathyroid hormone (PTH) PTH1 receptor complex. *Biochemistry* **39**, 8153-8160.
- [175] Jüppner, H., Schipani, E., Bringhurst, F. R., McClure, I., Keutmann, H. T., Potts, J. T. Jr., Kronenberg, H. M., Abou-Samra, A. B., Segre, G. V., Gardella, T. J. (1994). The extracellular, amino-terminal region of the PTH/PTHrP receptor determines the binding affinity for carboxyl terminal fragments of PTH (1-34). *Endocrinology* **134**, 879-884.
- [176] Bergwitz, C., Gardella, T. J., Flannery, M. R., Potts, J. T. Jr., Kronenberg, H. M., Goldring, S. R., Jüppner, H. (1996). Full activation of chimeric receptors by hybrids between parathyroid hormone and calcitonin: evidence for a common pattern of ligand-receptor interaction. *J. Biol. Chem.* **271**, 26469-26472.
- [177] Castro, M., Nikolaev, V. O., Palm, D., Lohse, M. J., Vilardaga, J. P. (2005). Turn on switch in parathyroid hormone receptor by a two step parathyroid hormone binding mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5034-5039.
- [178] Mierke, D.F., Mao, J., Pelligrini, M., Piserchio, A., Plati, J. and Tsomaia, N. (2007). Structural characterization of the parathyroid hormone receptor domains determinant for Ligand binding. *Biochemical Society Transaction* **35**, 721-723.
- [179] Drechsler, N., Fröbel, J., Jahreis, G., Gopalswamy, M., Balbach J., Bosse-Doenecke E., Rudolph R. (2011). Binding specificity of the ectodomain of the parathyroid hormone receptor. *Biophysical Chemistry* **154**, 66-72.
- [180] Pal, K., Melcher, K., Xu, H. E. (2012). Structure and mechanism for recognition of peptide hormones by Class B G-protein-coupled receptors. *ACTA Pharmacologica Sinica* **33**, 300-311.
- [181] Runge, S., Wulff, B.S., Madsen, K., Brauner-Osborne, H., Knudsen, L.B. (2003). Three distinct epitopes on the extracellular face of the glucagon receptor determine specificity for glucagon amino terminus. *L. Biol. Chem.* **278**, 28005-28010.
- [182] Stroop, S. D., Kuestner, R. E., Serwold, T. F., Chen, L., Moore, E. E. (1999). Chimeric human calcitonin and glucagon receptor sites reveal two distinct calcitonin interaction sites. *Biochemistry* **34**, 1050-1057.
- [183] Behar, V., Bisello, A., Rosenblatt, M. and Chorev, M., (1999). Direct identification of two contact sites for parathyroid hormone (PTH) in the novel PTH-2 receptor using photoaffinity cross-linking. *Endocrinology* **140**, 4251-4261.

- [184] Lagerstorm, M. C., Schioth, H. B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **7**, 339-357.
- [185] Kumar, A., Gopalswamy, M., Wishart, C., Henze, M., Eschen-Lippold, L., Donnelly, D., Balbach, J. (2014). N-terminal Phosphorylation of Parathyroid Hormone (PTH) Abolishes its Receptor Activity. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2465-2470.
- [186] Runge, S., Wulff, B. S., Madsen, K., Bräunert-Osborne, H., Knudsen, L. B. (2003). Different domains of the glucagon and glucagon-like peptide-1 receptors provide the critical determinants of ligand selectivity. *British Journal of Pharmacology* **138**, 787-794.
- [187] Kenakin, T. (2001). Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J.* **15**, 598-611.
- [188] Schröder-Tittmann, K. (2009). Rekombinante Herstellung, Renaturierung und biophysikalische Charakterisierung des humanen *Glucagon-like Peptid-1* Rezeptors. Dissertation, *Naturwissenschaftliche Fakultät I, Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [189] Christopoulos, A., El-Fakahany, E. E. (1999). Qualitative and quantitative assessment of relative agonist efficacy. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 735-748.
- [190] Rabbani, S. A., Kremer, R., Bennet, H. P., Goltzman, D. (1984). Phosphorylation of parathyroid hormone by human and bovine parathyroid glands. *J. Biol. Chem.* **259**, 2949-2955.
- [191] Dean, T., Vilardaga, J. P., Poots, J. T., Gardelle, T. J. (2008). Altered selectivity of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) for distinct conformations of the PTH/PTHrP receptor. *Mol. Endocrinol.* **22**, 16-166.
- [192] Bryksin, A. V., Matsumura, I. (2010). Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques* **48**, 463-465.
- [193] Cohen, S., Chang, A., Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 2110-2114.
- [194] Schägger, H. and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
- [195] Mossessova, E., Lima, C. D. (2000). Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol. Cell* **5**, 865-876.
- [196] Malakhov, M. P., Mattern, M. R., Malakhova, O. A., Drinker, M., Weeks, S. D., Butt, T. R. (2004). SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genomics* **5**, 75-86.
- [197] Marblestone JG, Edavettal SC, Lim Y, Lim P, Zuo X, Butt TR. (2006). Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci.* **15**, 182-189.
- [198] Kong, B., Guo, G. L. (2011). Enhanced in vitro refolding of fibroblast growth factor 15 with the assistance of SUMO fusion partner. *PLoS One* **6**, e20307.
- [199] Bosse-Doenecke, E., Weininger, U., Gopalswamy, M., Balbach, J., Knudsen, S. M., Rudolph, R. (2008). High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors. *Protein Expression Purif.* **58**, 114-121.
- [200] Hochstrasser, A. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1695**, 189-207.

- [201] Reverter, D., Lima, C. D. (2004). A basis for SUMO protease specificity provided by analysis of human Senp2 and a Senp2-SUMO complex. *Structure* **12(8)**, 1519-1531.
- [202] Rudolph, R., Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**, 49-56.
- [203] Abe, R., Kudou, M., Tanaka, Y., Arakawa, T., Tsumoto, K. (2009). Immobilized metal affinity chromatography in the presence of arginin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 306-310.
- [204] Gill, S. C., von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- [205] Shaw, K. L., Scholtz, J. M., Pace, C. N., Grimsley, G. R. (2009). Determining the conformational stability of a protein using urea denaturation curves. *Methods Mol. Biol.* **490**, 41-55.
- [206] Pace, C. N., Scholtz, J. M. (2002). Measuring the comformational stability of a protein. *Protein Structure: A Practical Approach*, Oxford University Press, Second edition.
- [207] Myers, J. K., Pace, C. N., Scholtz, J. M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* **4**, 2138-2148.
- [208] Gerrit J. K. Praefcke, G. J. K., Herrmann C. (2005). Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen. *BIOspectrum* **1/05**, 11. Jahrgang.
- [209] Jelesarov, I. und Bosshard, H. R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **12(1)**, 3-18.
- [210] Vuister, G. W. and A. Bax (1992). Resolution Enhancement and Spectral Editing of Uniformly C-13 Enriched Proteins by Homonuclear Broad-Band C-13 Decoupling. *Journal of Magnetic Resonance* **98**, 428-435.
- [211] Mori, S., Abeygunawardana, C., Johnson, M. O., van Zijl, P. C. (1995). Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation. *J. Magn. Reson. B* **108**, 94-98.
- [212] Ikura, M., Kay, L. E., Bax, A., (1990). A Novel-Approach for Sequential Assignment of H1, C-13, and N-15 Spectra of Larger Proteins – Heteronuclear Tripel-Resonance 3-Dimensional NMR-Spectroscopy – Application to Calmodulin. *Biochemistry* **29**, 4659-4667.
- [213] Kay, L. E., Ikura, M., Tschudin, R., Bax, A. (1990). 3-Dimensional Triple-Resonance Nmr-Spectroscopy of Isotopically Enriched Proteins., *Journal of Magnetic Resonance* **89**, 496-514.
- [214] Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., Bax, A. (1995). Nmrpipe-a multidimensional spectral processing system based on Unix pipes. *Journal of Biomolecular Nmr* **6**, 277-293.
- [215] Johnson, B. A., Blevins, R. A. (1994). Nmr View - a Computer-Program for the Visualization and Analysis of Nmr Data." *Journal of Biomolecular Nmr* **4**, 603-614.
- [216] Mannstadt, M., Jüppner, H., Gardella, T. J. (1999). Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am. J. Physiol.* **277**, 665-675.
- [217] Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G. J. (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 7342-7372.

- [218] Mann, R., Wigglesworth, Mj., Donnelly, D. (2008). Ligand-Receptor Interactions at the Parathyroid Hormone Receptors: Subtype Binding Selectivity Is Mediated via an Interaction between Residue 23 on the Ligand and Residue 41 on the Receptor. *Mol. Pharmacol.* **74**, 605-613.
- [219] Zhang, Q. (2013). Selection of an artificial binding protein against the ectodomain of PTH1R. Dissertation, *Naturwissenschaftliche Fakultät I, Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [220] Okazaki, M., Ferrandon, S., Vilaradaga, J. P., Bouxsein, M. L, Potts, J. T. Jr., Gardella, T. J. (2008). Prolonged signaling at the parathyroid hormone receptor by peptide ligands targeted to a specific receptor conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 16525-16530.
- [221] Urban, J. D., Clarke, W. P., von Zastrow, M., Nichols, D. E., Kobilka, B., Weinstein, H., Javitch, J. A., Roth, B. L., Christopoulos, A., Sexton, P. M., Miller, K. J., Spedding, M., Mailman, R. B. (2007). Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**, 1-13.
- [222] Rozema, D., Gellman, S. H. (1996). Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme: modulation of the competition between renaturation and aggregation. *Biochemistry* **35**, 15760-15771.
- [223] Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T., Ishii, S. (1995). Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **270**, 25328-25331.
- [224] de Marco A. (2009). Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 1475-2859-8-26.
- [225] Bogomolovas, J., Simon, B., Sattler, M., Stier, G. (2008). Screening of fusionpartners for high yield expression and purification of bioactive viscotoxins. *Protein Expr. Purif.*, **64**, 16-23.
- [226] Gasparian, M. E., Ostapchenk, V. G., Yagolovich, A. V., Tsygannik, I. N., Chernyak, B. V., Dolgikh, D. A., Kirpichnikov, M. P. (2007). Overexpression and refolding of thioredoxin/TRAIL fusion from inclusion bodies and further purification of TRAIL after cleavage by enteropeptidase. *Biotechnol. Lett.* **29**, 1567-1573.
- [227] LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F., McCoy, J. M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N Y)*. **11**, 187-193.
- [228] Jurado, P., de Lorenzo, V., Fernandez, L. A. (2006). Thioredoxin fusions increase folding of single chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*: evidence that chaperone activity is the prime effect of thioredoxin. *J. Mol. Biol.* **357**, 49-61.
- [229] Pigiet, V. P., Schuster, B. J. (1986). Thioredoxin-catalyzed refolding of disulfide-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 7643-7647.
- [230] Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P., Mattern, M. R. (2005). SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* **43**: 1-9.
- [231] Wang, H., Xiao, Y., Fu, L., Zhao, H., Zhang, Y., Wan, X., Qin, Y., Huang, Y., Gao, H., Li, X. (2010). High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology* **10**, 1472-6750.
- [232] Hoffmann, A., Müller, M. Q., Gloser, M., Sinz, A., Rudolph, R., Peifer, S. (2010). Recombinant production of bioactive human TNF- α by SUMO-fusion system-High yields from shake-flask culture. *Protein Expr. Purif.* **72**, 238-243.
- [233] Lu, W. G., Cao, P., Cai, X. T., Yu, J. M., Hu, C. P., Cao, M. (2009). Molecular cloning, expression, and bioactivity of dove B lymphocyte stimulator (doBAFF). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **128**, 5374-5380.

- [234] Lee, C. D., Sun, H. C., Hu, S. M., Chiu, C. F., Homhuan, A., Liang S. M. (2008). An improved SUMO fusion protein system for effective production of native proteins. *Protein Science* **17**, 1241-1248.
- [235] Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207-234.
- [236] Lilie H., Schwarz E., Rudolph R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 497-501.
- [237] De Bernardez Clark, E. (2001). Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 202-207.
- [238] Vallejo, L. F., Rians, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories* **3**(11), 1475-2859-3-11.
- [239] Buchner, J., Kiefhaber, T. (2005). Protein Folding Handbook, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, 1245-1280. ISBN: 9783527307845.
- [240] Buchfink, R., Tischer, A., Patial, G., Rudolph, R., Lange, C. (2010). Ionic liquids as refolding additives: Variation of the anion. *J. Biotech.* **150**, 64-72.
- [241] Jungbauer, A., Kaar, W. (2007). Current status of technical protein refolding. *J. Biotech.* **128**, 587-596.
- [242] De Bernardez Clark, E., Hevehan, D., Szela, S., Maachupalli-Reddy, J. (1998). Oxidative renaturation of hen egg-white lysozyme. *Biotechnol. Prog.* **14**, 47-54.
- [243] Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H., H., Buchner, J. (1991). Protein aggregation in vivo and in vitro: A quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology* **9**, 825-829.
- [244] Kong, B., Guo, G.,L. (2011). Enhanced in vitro refolding of fibroblast growth factor 15 with the assistance of SUMO fusion partner. *PLoS One.* **6**(5), e20307.
- [245] Rehm, H. (2009). Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*. ISBN: 3827417260.
- [246] Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V., G., Chen, G., Deber, C., M. (2008). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1760-1765.
- [247] Knudsen, S. M., Tams, J. W., Wulff, B. S., Fahrenkrug, J. (1997). A disulfide bond between conserved cysteines in the extracellular loops of the human VIP receptor is required for binding and activation, *FEBS Letters* **412**, 141-143.
- [248] Perrin, M.H., Fischer, W.H., Kunitake, K.S., Graug, A.G., Koerbert, S.C., Cervini, L.A., Rivier, J.E., Groppe, J.C., Greenwald, J., Nielsen, S.M. and Vale, W.W. (2001). Expression, purification, and characterization of a soluble form of the first extracellular domain of the human type 1 corticotropin releasing factor receptor. *J. Biol. Chem.*, **276**, 31528-34.
- [249] Liu, F., van Breukelen, B., Heck, A. J. R. (2014). Facilitating Protein Disulfide Mapping by a Combination of Pepsin Digestion, Electron Transfer Higher Energy Dissociation (ETHcD), and a Dedicated Search Algorithm SlinkS. *MCP* **13**, 2776-2786.
- [250] Creighton, T. E. (2002). Protein Structure: A Practical Approach, *Oxford University Press*, Second Edition.
- [251] Schmid, F.X. (1989). Protein Structure: A Practical Approach (ed Greighton, T.E.), *Oxford University Press*, 251-285.
- [252] Cooper, A. (2004). Biophysical Chemistry. Tutorial Chemistry Texts. *The Royal Society of Chemistry*, 40-43. ISBN: 0854044809.

- [253] Bazarsuren, A. (2003). Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Ligandenbindungsdomäne des humanen GLP-1-Rezeptors. Dissertation, *Naturwissenschaftliche Fakultät I, Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [254] Grauschopf, U. (2000). Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am humanen Parathormon-Rezeptor. Dissertation, *Naturwissenschaftliche Fakultät I, Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [255] Slavik, J. (1982). Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* **694**, 1-25.
- [256] Kirk, W. R., Kurian E., Prendergast F. G. (1996). Characterization of the sources of protein ligand affinity: 1-sulfonato-8-(1')anilinonaphthalene binding to intestinal fatty acid binding protein. *Biophys. J.* **70**, 69-83.
- [257] Marx, V. (2005). Watching peptide drugs grow up. *C&EN News*, **83**, 17-24.
- [258] Makino, T., Matsumoto, M., Suzuki, Y., Kitajima, Y., Yamamoto, K., Kuramoto, M., Minamitake, Y., Kangawa, K., Yabuta, M. (2005). Semisynthesis of human ghrelin: condensation of a Boc-protected recombinant peptide with a synthetic *O*-acylated fragment. *Biopolymers* **79**, 238-247.
- [259] Majerle, A., Kidric, J., Jerala, R. (2000). Production of stable isotope enriched antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: an application to the production of a ¹⁵N-enriched fragment of lactoferrin. *J. Biomol. NMR*, **18** 145-151.
- [260] Sharpe, S., Yau, W. M., Tycko, R. (2005). Expression and purification of a recombinant peptide from the Alzheimer's beta-amyloid protein for solid-state NMR. *Protein Expr. Purif.* **42**, 200-210.
- [261] Lindhout, D. A., Thiessen, A., Schieve, D., Sykes, B. D. (2003). High-yield expression of isotopically labeled peptides for use in NMR studies. *Protein Science* **12**, 1786-1791.
- [262] Smith, D. B., Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase *Gene* **67**, 31-40.
- [263] Guan, C., Li, P., Riggs, P. D., Inouye, H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein *Gene* **67**, 21-30.
- [264] Kuliopulos, A., Walsh, C.T. (1994). Production, purification, and cleavage of tandem repeats of recombinant peptides *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 4599-4607.
- [265] Marston, F. A. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **240**, 1-12.
- [266] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2007). Stryer Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*. Sechste Auflage. 316-322, ISBN: 3827418003.
- [267] Meijberg, W., Schuurman-Wolters, G. K., Robillard, G. T. (1996). Interdomain interactions between the hydrophilic domains of the mannitol transporter of *Escherichia coli* in the unphosphorylated and phosphorylated states. *Biochemistry* **35**, 2759-2766.
- [268] Gaudin, P., Couvineau, A., Maoret, J. J., Rouyer-Fessard, C., Laburthe, M. (1995). Mutational analysis of cysteine residues within the extracellular domains of the human vasoactive intestinal peptide (VIP) 1 receptor identifies seven mutants that are defective in VIP binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 901-908.
- [269] Misawa, S., Kumagai, I. (1999). Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers* **51**, 297-307.
- [270] Gough, J. D., Williams, R. H. jr., Donofrio, A. E., Lees, W. J. (2002). Folding disulfide-containing proteins faster with an aromatic thiol. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3885-3892.

- [271] Negro, A., Onisto, M., Grassato, L., Caenazzo, C., Garbisa, S. (1997). Recombinant human TIMP-3 from *Escherichia coli*: Synthesis, refolding physico-chemical and functional insights. *Protein Eng.* **10**, 593-599.
- [272] Cho, T. H., Ahn, S. J., Lee, E. K. (2001). Refolding of protein inclusion bodies directly from *E. coli* homogenate using expanded bed adsorption chromatography. *Bioseparation* **10**, 189-196.
- [273] Rehm, B. H. A., Qi, Q., Beermann, B. B. Hinz, H-J., Steinbüchel, A. (2001). Matrix assisted in vitro refolding of *Pseudomonas aeruginosa* class II polyhydroxyalkanoate synthase from inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **358**, 263-268.
- [274] Rahfeld P. (2011). Lösliche Herstellung von N-terminalen G-Protein gekoppelten Rezeptor-Domänen der Klasse B in *E. coli*. Diplomarbeit, *Naturwissenschaftliche Fakultät I, Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [275] Song, B. (2012). Affilin® binding proteins selected against a class B GPCR ectodomain. Dissertation, *Naturwissenschaftliche Fakultät I, Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [276] Asmann, Y. W., Dong, M., Ganguli, S., Hadac, E. M., Miller, L. J. (2000). Structural insights into the aminoterminal of the secretin receptor: I. Status of cysteine and cystine residues. *Mol. Pharmacol.*, **58**, 911-919.
- [277] Kamitani, S. Sakata, T. (2001). Glycosylation of human CRLR at Asn123 is required for ligand binding and signaling, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1539**, 131-139.
- [278] George S. T., Ruoho A. E., Malbon C. C. (1986). N-glycosylation in expression and function of beta-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **261**, 16559-16564.
- [279] Baneyx, F., Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1399-1408.
- [280] Tapaneyakorn, S., Goddard, A. D., Oates, J., Willis, C. L., Watts, A. (2010). Solution- and solid-state NMR studies of GPCRs and their ligands. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 1462-1475.
- [281] Koole, C., Wootten, D., Simmes, J., Miller, L. J., Christopoulos, A., Sexton, P. M. (2012). Second extracellular loop of human glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) has a critical role in GLP-1 peptide binding and receptor activation. *J. Biol. Chem.* **287**, 3642-3658.
- [282] Rigaud, J. L., Mosser, G., Lacapere, J. J., Anders-Olofsson, A., Levy, D., Ranck, J. L. (1997). Bio-Beads: An efficient strategy for two dimensional crystallization of membrane proteins. *J. Struct. Biol.* **118**, 226-235.
- [283] Dong, M., Lam, P.C., Pinon, D. I., Hosohata, K., Orry, A., Sexton, P. M., Abagyan, R., Miller, L. J. (2011). Molecular basis of secretin docking to its intact receptor using multiple photolabile probes distributed throughout the pharmacophore. *J. Biol. Chem.* **286**, 23888-23899.
- [284] Antharavally, B. S., Mallia, K. A., Rosenblatt, M. M., Salunkhe, A. M., Rogers, J. C., Haney, P., Haghdoost, N. (2011). Efficient removal of detergents from proteins and peptides in a spin column format. *Anal. Biochem.* **416**, 39-44.
- [285] Lu, W., Cao, P., Lei, H., Zhang, S. (2010). High-level Expression and purification of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) with SUMO-Fusion. *Mol. Biotechnol.* **44**, 198-203.

- [286] D'Amour, P., Brossard, J. H., Rousseau, L., Roy, L., Gao, P., Cantor, T. (2003). Amino-terminal form of parathyroid hormone (PTH) with immunologic similarities to hPTH(1-84) is overproduced in primary and secondary hyperparathyroidism. *Clin. Chem.* **49**, 2037-2044.
- [287] Rubin, M. R., Silverberg, S. J., D'Amour, P., Brossard, J. H., Rousseau, L., Sliney, J., Jr., Cantor, T., Bilezikian, J. P. (2007). An N-terminal molecular form of parathyroid hormone (PTH) distinct from hPTH (1-84) is overproduced in parathyroid carcinoma. *Clin. Chem.* **53**, 1470-1476.
- [288] Monticelli, L., Mammi, S., and Mierke, D. F. (2002). Molecular characterization of a ligand-tethered parathyroid hormone receptor. *Biophys. Chem.* **95**, 165-172.
- [289] Lim, S. K., Lee, E. J., Kim, H. Y., and Lee, W. (2004). The 10th and 11th residues of short length N-terminal PTH(1-12) analogue are important for its optimum potency. *J. Pept. Res.* **64**, 25-32.
- [290] Inooka, H., Ohtaki, T., Kitahara, O., Ikegami, T., Endo, S., Kitada, C., Ogi, K., Onda, H., Fujino, M., Shirakawa, M. (2001). Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 161-165.
- [291] Knospe M. (2012). Molekularbiologie und Pharmakologie neuer G-Protein-gekoppelter Purin-Rezeptoren. Dissertation, *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn*.
- [292] Kenakin, T. (2007). Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol. Pharmacol.* **72**, 1393-1401.
- [293] Kenakin, T. (2010). Functional selectivity and biased receptor signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **336**, 296-302.
- [294] Violin, J. D., Lefkowitz, R. J. (2007). β -arrestin-biased ligands at seven transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 416-422.
- [295] Schulz, A., Beck-Sickinger, A. G. (2015). Bedeutung der Neuropeptid Y Rezeptoren in der Regulation der Nahrungsaufnahme. SFB 1052, Projektbeschreibung, Projektbereich A/ A3, *Integriertes Forschungs- und Behandlungszentrum Adipositas Erkrankungen und Medizinische Fakultät, Institut für Biochemie und Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Institut für Biochemie, Universität Leipzig*, <http://www.sfb1052.de/index.php/de/projektbereich-a/a3>.
- [296] Mäde, V., Babilon, S., Jolly, N., Wanka, L., Bellmann-Sickert, K., Diaz Gimenez, L. E., Mörl, K., Cox, H. M., Gurevich, V. V., Beck-Sickinger A. G. (2014). Peptide modifications differentially alter G protein-coupled receptor internalization and signaling bias. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**(38), 10067-10071.

Anhang/ Anhangsverzeichnis

Anhang 1	135
Weitere wissenschaftliche Ergebnisse	135
1.1 Plasmidkonstruktion, bakterielle Expression, Rückfaltung, Reinigung und Charakterisierung von ECD-PTHR2 aus inclusion bodies	135
1.2 Rückfaltung von ECD-PTHR2 mit Hilfe des <i>artificial chaperon</i> <i>system (acs)</i>	139
1.3 Konstruktion, bakterielle Expression, Rückfaltung und Reinigung von ECD-PTHR2 mit Hilfe einer Thioredoxin-SUMO-Fusion	140
Anhang 2	145
Abbildungen	145
2.1 Lineare Abhängigkeit der intrinsischen Ligandenfluoreszenz	145
2.2 Emissionsfluoreszenzspektren von ECD-PTHR1	146
2.3 Isotherme Titrationskalorimetrie von ECD-PTHR1 und TIP (7-39)	146
Anhang 3	147
Materialien	147
3.1 Chemikalien	147
3.2 Oligodesoxynucleotide	144
3.3 Enzyme	149
3.4 Peptide und Proteine	149
3.5 Plasmide	149
3.6 Mikroorganismen	150
3.7 Nährmedien	150
3.8 Standards, Kits und sonstige Verbrauchsmaterialien	151
3.9 Geräte und Zubehör	152
3.10 <i>Software</i> und Programme	153
3.11 Pufferlösungen	153
Anhang 4	155
Vektorkarten, Aminosäuresequenzen und <i>Alignment</i>	155
4.1 pETSUMOadapt	155
4.2 pET-SUMOadapt-PTH (1-84)	155
4.3 pET-SUMOadapt-PTH (15-34)	156
4.4 pET-SUMOadapt-TIP 39	157
4.5 pET15b	158
4.6 pTSnG	158
4.7 Aminosäuresequenz von PTH (1-84) und TIP 39	158
4.8 Aminosäuresequenz für Trx-SUMO-ECD-PTHR2- Fusionskonstrukte	158
4.9 Aminosäuresequenz- <i>Alignment</i> bekannter Klasse B GPCR-Ectodomänen	160

Anhang 1

Weitere wissenschaftliche Ergebnisse

1.1 Plasmidkonstruktion, Expression, Rückfaltung, Reinigung und Charakterisierung von ECD-PTHR2 aus inclusion bodies

Die Klonierung, Expression und Renaturierung von ECD-PTHR1 aus *inclusion bodies* ist eine gute Plattform für die Herstellung von Klasse B GPCR-Ectodomänen und liefert ausreichende Mengen für biophysikalische Strukturuntersuchungen^[67]. Vor diesem Hintergrund und der Verwandtschaft von ECD-PTHR2 zur N-terminalen Domäne des PTHR1^[84, 139, 142, 160] sollte eine Expression in *E. coli* erfolgen und damit die beschriebene Methode zur Herstellung von ECD-PTHR1 auf die Gewinnung von ECD-PTHR2 übertragen werden. Trotz der vorhandenen Gemeinsamkeiten hinsichtlich einer hohen Sequenzhomologie und eines wahrscheinlich identischen Disulfidmusters zeigt ein Sequenz-*Alignment* für die beiden Rezeptoren eine deutlich kürzere Aminosäuresequenz für PTHR2, während PTHR1 einen stark verlängerten Bereich zwischen Cys48 und Cys108 besitzt^[78, 180] (Anhang 4, 4.9).

Für die Klonierung des pET15b-ECD-PTHR2 Vektors wurde die entsprechende cDNA für ECD-PTHR2 (Aminosäure Ala22-Tyr141, ohne Signalsequenz) freundlicherweise von Frau Dr. Julia Hennig zur Verfügung gestellt. Die Integration der durch PCR amplifizierten DNA erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Nde*I in den pET15b-Vektor (Anhang 4, 4.5). N-terminal ist dem Insert von ECD-PTHR2 ein His₆-Tag für die nachfolgende Reinigung vorangestellt. Die korrekte Nukleotidsequenz des Inserts wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft. Da die verwendete cDNA von ECD-PTHR2 nicht für die *codon usage* von *E. coli* optimiert war, wurde der nach der Klonierung erhaltene Zielvektor in BL21(DE3) CodonPlus[®] RIL Zellen transformiert. Dieser optimierte Zellstamm ermöglicht eine verbesserte Expression von humanen Proteinen, indem er die sonst in *E. coli* selten vorkommenden tRNAs für Arg, Ile und Leu zur Verfügung stellt. Durch eine Testexpression und eine SDS-PAGE-Analyse konnte eine erfolgreiche und deutliche Überexpression des Konstrukts nur in unlöslichen Fraktionen, als *inclusion bodies* (IBs), nachgewiesen werden. Das SDS-Gel (Anhang 1, 1.1, Abb. 1.1.1) zeigt eine Expressionsbande bei einer Laufhöhe von ca. 16 kDa und steht damit in guter Übereinstimmung mit dem theoretisch vorhergesagten Molekulargewicht für ECD-PTHR2 (ProtParam-Tool, ExPASy Proteomics Server) von 16,1 kDa. Die Hauptexpression erfolgte im Bioreaktor in einem 3 L Ansatz dYT-Medium. Die Ausbeute an Zellmasse lag bei ca. 32 g Feuchtwicht pro eingesetztem Liter Kulturvolumen. Die erfolgreiche Präparation und Reinigung der IBs für ECD-PTHR2 aus den BL21(DE3) CodonPlus[®] RIL *E. coli*-Zellen erfolgte analog zum Protokoll, wie für ECD-PTHR1 beschrieben. Hier konnte eine Ausbeute von 6,4 g pro Liter Kulturvolumen erreicht werden, was in einer vergleichbaren Größenordnung zur IB-Präparation von ECD-PTHR1 stand. Die anschließende Solubilisierung der IBs von ECD-PTHR2 in 4 M GdmCl, analog zu ECD-PTHR1, war aber nicht möglich. Unter den gewählten Bedingungen wurde nur eine visköse Suspension erhalten, die für eine weitere Reinigung und Rückfaltung ungeeignet schien. Durch den

Einsatz einer höheren Konzentration an GdmCl (5,5 M) konnte die zähflüssige Suspension jedoch aufgelöst und ECD-PTHR2 somit in Lösung überführt werden. Der erste Reinigungsschritt der in 5,5 M GdmCl solubilisierten ECD-PTHR2 *IBs* erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe eines fusionierten His₆-Tags durch Immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie. Das so erhaltene denaturierte ECD-PTHR2 (Anhang 1, Abb. 1.1.1) sollte anschließend, durch Rückfaltung in Renaturierungspuffer, in eine strukturierte und native Form überführt werden. Eine Übertragung der bekannten Renaturierungsbedingungen von ECD-PTHR1 zur Rückfaltung von ECD-PTHR2 war jedoch nicht möglich. Die durchgeführte Pulsrenaturierung in einem Liter Renaturierungspuffer führte unmittelbar zur vollständigen Präzipitation des Proteins. Im löslichen Teil des Rückfaltungsansatzes konnten vor und nach einer anschließenden Ammoniumsulfatfällung keine verbliebenen Mengen an ECD-PTHR2 beobachtet werden. Aufgrund des starken Präzipitationsverhaltens wurden zusätzlich einige Rückfaltungsbedingungen untersucht, die zu einem nutzbaren Anteil an löslichem Protein im Rückfaltungsansatz führen sollten. Dazu wurde der herkömmlich verwendete Renaturierungspuffer (50 mM Tris, 1 M L-Arginin, 1 mM EDTA) mit niedermolekularen Zusätzen (Anhang 1, Tabelle 1) ergänzt oder seine Komponenten in ihrer Konzentration variiert. Alle Rückfaltungspuffer wurden mit einem *redox-shuffling*-System, bestehend aus reduziertem und oxidiertem Gluthation (GSH und GSSG)^[237] versetzt, um eine korrekte Ausbildung der drei Disulfidbrücken in ECD-PTHR2 zu ermöglichen.

Zusätzlich zur Variation der Pufferzusammensetzung wurde auch untersucht, ob die Änderung des pH-Werts und der Temperatur einen Einfluss auf die Rückfaltungsausbeute haben. Dafür wurden die in Tabelle 3.3 angegebenen Bedingungen für die pH-Werte von 7,0; 8,0; 8,5 und 9,0 bei 4 °C und RT überprüft. Auch der Einfluss der Gesamtkonzentration von Protein im Rückfaltungsansatz auf den Rückfaltungserfolg wurde untersucht. Es wurden Renaturierungen mit 25, 50, 100 und 200 µg/ml durchgeführt. Für die hier durchgeführten Analysen bleibt festzuhalten, dass es unter den gewählten Bedingungen nicht möglich war die Präzipitatbildung zu unterbinden. Einzig durch den Zusatz von Detergenzien, vor allem Brij 78, war es möglich Protein in Lösung zu halten. In diesem Fall kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass auch falsch gefaltete Proteine in Lösung verblieben sind. Aufbauend auf diesen Ergebnissen erfolgte die Rückfaltung von ECD-PTHR2 durch Pulsrenaturierung. Dafür wurden je vier Pulse Proteinlösung in Rückfaltungspuffer mit 50 mM Tris, 1 M L-Arginin, 1 mM EDTA, 5 mM GSH, 1 mM GSSG, 0,8 mM Brij 78, pH 8,0 bei 4 °C tropfenweise pipettiert. Die Inkubationszeit zwischen den einzelnen Pulsen betrug 6 h. Natürlich wurden auch hier die für die Rückfaltung limitierenden Konzentrationen des Denaturierungsmittel und der Proteinkonzentration im Rückfaltungsansatz berücksichtigt. Nach der Renaturierung wurden alle sichtbaren Aggregate durch Zentrifugation abgetrennt und der lösliche Überstand unter Verwendung einer *VivaFlow* Membran (MWCO 5000 Da) bis zu einem Volumen von 150 ml oder einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml konzentriert. Zur Abtrennung falschgefalteter Proteinspezies wurde für den aufkonzentrierten Rückfaltungsansatz eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Auch nach diesem Reinigungsschritt konnte Protein in Lösung gehalten und anschließend mit Hilfe von Größenausschlusschromatographie bis zur optischen Homogenität gereinigt (Anhang 1, Abb. 1.1.1) werden. Die Ausbeute betrug 8 mg pro Liter Kulturmedium.

Die Identität des rückgefalteten und gereinigten ECD-PTHR2 konnte durch eine Kombination aus enzymatischem Verdau mit Chymotrypsin und anschließender Tandemmassenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF) für die verdauten Fragmente bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Eine Analyse der Sekundärstruktur mittels fern-UV-CD- und Fluoreszenzspektroskopie belegte die Ausbildung von Strukturelementen (Anhang 1, Abb. 1.1.2). Dennoch konnte durch die Anwendung von analytischer Gelfiltration oder die Durchführung von CD-, und Fluoreszenzbindungsstudien, sowie durch Isotherme-Titrationskalorimetrie (ITC) keine Bindungskompetenz, also Funktionalität für ECD-PTHR2 gegenüber des natürlichen Liganden TIP 39, dem verkürzten TIP (7-39) und dem selektiv bindenden PTH (1-84) Liganden nachgewiesen werden. Für die Ectodomäne des PTHR2 wird angenommen, dass diese ebenfalls ein konserviertes Disulfidbrücken-Netzwerk aus drei Brücken zwischen den sechs Cysteinresten bildet, wie es für andere Klasse B GPCR-Ectodomänen schon nachgewiesen werden konnte^[67-69, 71-73, 75-79, 82, 164, 165]. Der Nachweis dieses konservierten Disulfidbrückenmusters hätte die native Konformation von ECD-PTHR2 bestätigt. Durch eine massenspektrometrisch unterstützte Analyse der Disulfidverbrückung konnte aber nur eine korrekte Disulfidbrücke zwischen dem Cys86 und Cys125 identifiziert werden, während die anderen beiden falsch oder gar nicht verknüpft waren. Das Fehlen eines konservierten Disulfidbrückenmusters in ECD-PTHR2 könnte eine Hauptursache für die fehlende Bindungskompetenz gegenüber den postulierten Liganden sein. Eine weitere Ursache für die fehlende Bindungskompetenz von ECD-PTHR2 kann aber auch am Protein verbliebenes Detergens sein, welches über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Protein interagiert und durch die chromatographische Reinigung nicht vollständig entfernt werden konnte. Dadurch können eventuell spezifische Bindungs epitope in ECD-PTHR2 blockiert werden. Experimente zur Entfernung von Detergenzien über Dialyse, mittels *biobeads*^[282, 283] und/ oder *detergent removal columns*^[284] zeigten zwar einige Änderungen in der Struktur (Sekundärstruktur, CD-Messungen), führten aber nicht zur Entstehung von funktionalen Eigenschaften in ECD-PTHR2.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass das hier entwickelte und verwendete Protokoll zur Herstellung von ECD-PTHR2 zu einer strukturierten, aber nicht funktionalen und somit bindungskompetenten, extrazellulären, N-terminalen Domäne des humanen PTH-Rezeptors 2 geführt hat. Da für nachfolgende Bindungsstudien eine funktionale Rezeptorproteindomäne gegeben sein soll, wurde der hier geschilderte Ansatz nicht weiter verfolgt. Die von Grauschopf *et al.*^[67] entwickelte Strategie konnte nicht auf die Gewinnung von ECD-PTHR2 übertragen werden.

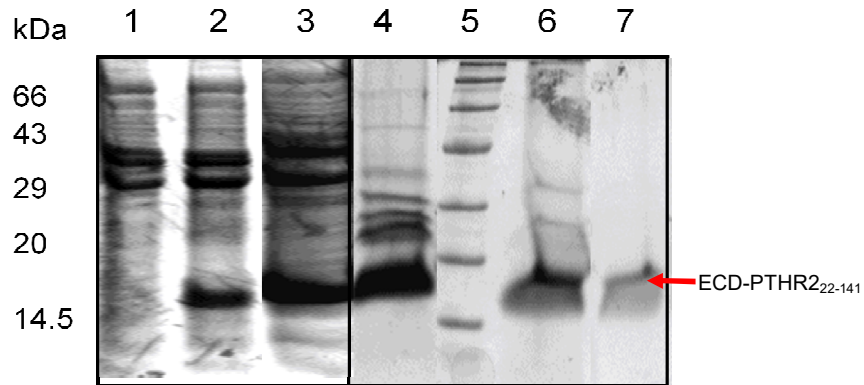


Abbildung 1.1.1: Reinigung der extrazellulären, N-terminalen Domäne des PTHR 2 (Ala22-Tyr141), (ECD-PTHR₂₂₂₋₁₄₁). **A:** SDS-PAGE-Analyse der ECD-PTHR₂₂₂₋₁₄₁ Expression, *inclusion body* Isolation und Reinigung. Von jedem Schritt wurden Proteinproben auf ein 4-12,5 %igem Gradientengel aufgetragen und anschließend durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. 1: Zellpellet vor Induktion, 2: Zellpellet nach 2 h Induktion, im Überstand konnte keine sichtbare Expression beobachtet werden, 3: isolierte und gereinigte *inclusion bodies*, 4: unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe von IMAC gereinigtes ECD-PTHR₂, 5: Marker. ECD-PTHR₂ nach Proteinreinigung durch HIC, 7: Proteinreinigung durch Gelfiltration mittels selbst gepackten Superdex S 75 *prep grade* Chromatographiesäule, die Laufhöhe von ECD-PTHR₂ ist im Gel durch einen roten Pfeil markiert, die ECD-PTHR₂ Gelfiltrationsreinigung zeigt eine optisch homogene Proteinbande, bei ca. 16 kDa.

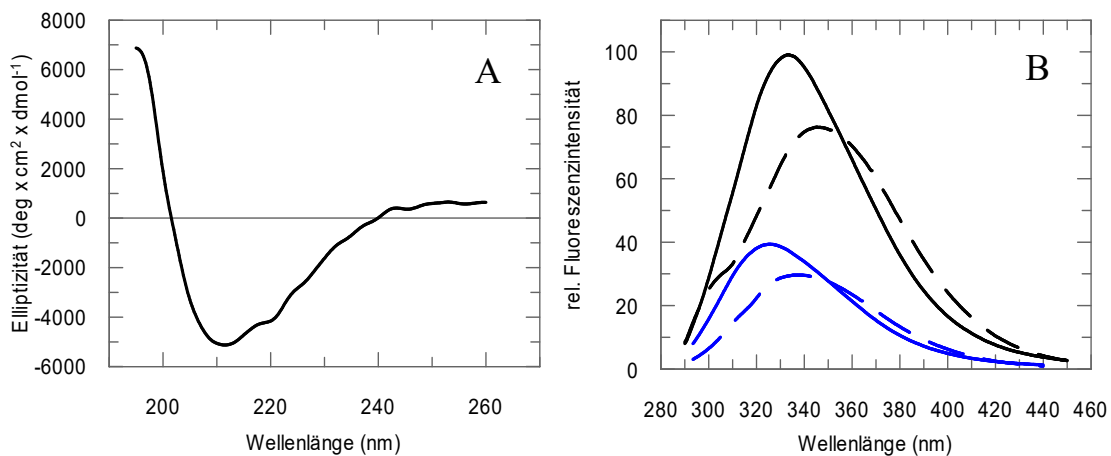


Abbildung 1.1.2: Spektroskopische Charakterisierung von ECD-PTHR₂ (Ala22-Tyr141). **A:** Fern-UV CD-Spektrum von ECD-PTHR₂ (Ala22-Tyr141). Das CD-Spektrum von 6,5 μM ECD-PTHR₂ in 0,05 M Tris, 0,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8,0 wurde in einer 0,1 cm Küvette mit einer Integrationszeit von 1 s und 1 nm Bandbreite bei 20°C aufgenommen und 12fach akkumuliert. **B:** Fluoreszenzemissionsspektren des nativen und denaturierten ECD-PTHR₂. Die Messtemperatur betrug 20°C, und die Proteinkonzentration 1,3 μM . Das durchgängige, blaue Spektrum entspricht nativem ECD-PTHR₂ und das blau-gestrichelte Spektrum entspricht denaturiertem ECD-PTHR₂. Die beiden blauen Spektren wurden bei 295 nm angeregt. Das durchgängige, schwarze Spektrum entspricht nativem ECD-PTHR₂ und das schwarz-gestrichelte Spektrum entspricht denaturiertem ECD-PTHR₂. Die beiden schwarzen Spektren wurden bei 280 nm angeregt. Messpuffer: 0,05 M Tris, 0,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8,0 und für die Denaturierung wurde dem Puffer 5 M Guanidiumchlorid zugesetzt. Die Messtemperatur lag bei 20 °C. Es wurde an einem Fluoromax-Spektralphotometer, mit einer Zeitkonstante von 0,2 s in einer 1 cm Küvette gemessen (Spaltbreite bei Anregung 5 nm, Spaltbreite bei Emission 5 nm). Die Spektren wurden 4fach akkumuliert.

Tabelle 1: Auflistung der zugesetzten Additive zum Renaturierungspuffer.

Additive	GSH/GSSG Verhältnis	Präzipitatbildung
kein Additiv	5:1 und 1:5	+++
0,5 M L-Arginin	5:1	+++
0,8 M L-Arginin	5:1	+++
1 M L-Arginin	5:1	+++
50 mM Tris	5:1 und 1:5 und 3:1	+++
0,1 M Tris	5:1 und 1:5 und 3:1	+++
0,5 M NaCl	5:1 und 1:5	+++
0,3 M (NH ₄) ₂ SO ₄	5:1 und 1:5	+++
10 % (v/v) Glycerin	5:1 und 1:5	+++
0,5 M Harnstoff	5:1 und 1:5	+++
0,5 GdmCl	5:1 und 1:5	+++
10 % Glukose	5:1 und 1:5 und 3:1	+++
SDS	5:1	++
5 mM CHAPS	5:1	++
0,8 mM Brij 78	5:1	+

Präzipitatbildung: +++ sehr stark; ++ stark; + schwach; - keine

1.2 Rückfaltung von ECD-PTHR2 mit Hilfe des *artificial chaperon system* (acs)

Für einige Klasse B GPCR-Ectodomänen konnte gezeigt werden, dass die Rückfaltung aus *inclusion bodies* mit Hilfe eines künstlichen Faltungshelfer, einem *artificial chaperon system* (acs), möglich ist^[1, 165] und zu funktionalem Protein führt. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die aus *E. coli* gewonnenen IBs von ECD-PTHR2 durch den Einsatz von *acs* zu renaturieren sind. Zusammengefasst besteht das *artificial chaperon system*, wie im schematischen Überblick in Abbildung 1.2.1 dargestellt, aus den drei Hauptkomponenten Detergens, Methyl- β -Cyclodextrin und einem *redox-shuffling*-System. In einem ersten Schritt erfolgte die Solubilisierung der IBs in SDS-Solubilisierungspuffer (0,1 M Tris, 20 mM SDS, 1 mM EDTA, pH 8,0^{25 °C}) und nicht in Guanidiniumchlorid oder Harnstoff. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine und verhindert dadurch Aggregation, indem es Faltungsintermediate und partiell ungefaltetes Protein in Lösung hält^[238]. Nach der Solubilisierung wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Im zweiten Schritt wurden die in SDS solubilisierten IBs mit Hilfe von Gelfiltration (PD 10 Säule, Gelfiltrationspuffer (100 mM NaH₂PO₄, 15 mM SDS, pH 8,0^{25 °C})) gereinigt. Die durch die Gelfiltration erhaltenen Elutionsfraktionen von ECD-PTHR2 wurden zur weiteren und spezifischen Reinigung auf eine Immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographiesäule (HisTrap HP 5 ml) aufgetragen und mit Elutionspuffer (50 mM Tris, 15 mM SDS, pH 4,5^{20 °C}) eluiert. In einen dritten Schritt wurde, nach der Konzentrationsbestimmung von ECD-PTHR2, die Rückfaltung durch Pulsrenaturierung, bei Raumtemperatur und 4 °C in filtriertem und entgastem Rückfaltungspuffer (100 mM Tris, 1 M L-Arginin, 1 mM EDTA, 1,5 mM Cyclohexyl-n-hexyl- β -D-Maltosid, 1,5 mM n-Dodecyl- β -D-Maltosid, 20 mM Methyl- β -Cyclodextrin, pH 8,0^{4 °C}, 5 mM GSH und 1 mM GSSG) durchgeführt. Durch das im Rückfaltungspuffer enthaltene Methyl- β -Cyclodextrin wurde das zur Solubilisierung verwendete SDS wieder vom Protein entfernt, was eine kontrollierte Renaturierung ermöglichen soll^[222]. Außerdem wurde GSH/ GSSG wieder als

redox-shuffling-System eingesetzt, um eine Ausbildung von Disulfidbrücken^[202] zu ermöglichen, die sich in der Ectodomäne von ECD-PTHR2 befinden.

Als Ergebnis, für den Versuch ECD-PTHR2 mit Hilfe des *acs* zu renaturieren, bleibt festzuhalten, dass die Entfernung des Detergens vom Protein-SDS-Komplex, mit Hilfe von Cyclodextrin, ein massives Präzipitationsverhalten im Rückfaltungsansatz auslöste. Nach Zentrifugation des Rückfaltungsansatzes wurden im löslichen Teil nur marginale Mengen an ECD-PTHR2 gefunden. Die Ausbeute lag bei ca. 0,01 mg pro einem Liter verwendeten Kulturvolumen. Eine initiale biophysikalische Charakterisierung war mit dem minimal isolierten ECD-PTHR2 nicht möglich. Wegen der schlechten Ausbeute an ECD-PTHR2 wurde auch dieser Ansatz zur Herstellung von ECD-PTHR2 verworfen.

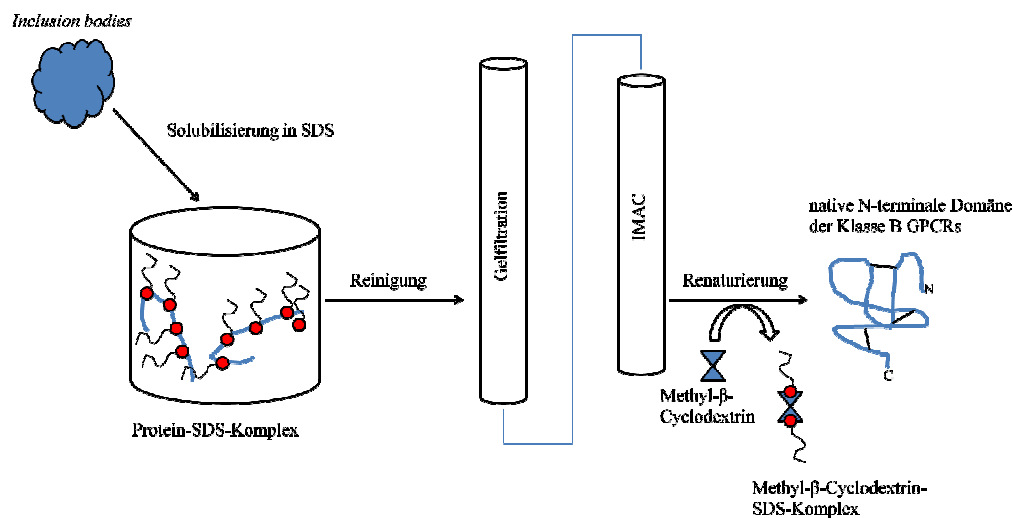


Abbildung 1.2.1: Schematischer Überblick zur Gewinnung von ECD-PTHR2 (Aminosäure Ala22-Tyr141) unter Einsatz des *artificial chaperon systems*. Die isolierten und gereinigten *inclusion bodies* wurden in SDS solubilisiert. Aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen komplexiert SDS entfaltetes ECD-PTHR2 und stabilisiert dadurch Faltungsintermediate. Der so entstandene SDS-Protein-Komplex kann dadurch länger in Lösung gehalten werden, was die Wahrscheinlichkeit einer potentiell nativen Renaturierung von ECD-PTHR2 im Rückfaltungspuffer erhöht. Vor der Renaturierung wurde der SDS-Proteinkomplex durch Gelfiltration und IMAC gereinigt und anschließend unter Berücksichtigung limitierender Rückfaltungsparameter für die Renaturierung verwendet. Das im Rückfaltungspuffer zugesetzte Methyl- β -Cyclodextrin wurde verwendet, um das SDS, durch stärkere hydrophobe Wechselwirkungen mit Cyclodextrin, wieder vom nun nativen Protein zu entfernen. Die Abbildung basiert auf Gellman *et al.*^[222] und wurde modifiziert.

1.3 Konstruktion, Expression, Rückfaltung und Reinigung von ECD-PTHR2 mit Hilfe einer Thioredoxin-SUMO-Fusion

Aus den vorangegangenen Versuchen wurde deutlich, dass eine Stabilisierung der Faltungsintermediate für ECD-PTHR2 erreicht werden musste, um die starken Aggregationsprozesse während der Expression und/ oder Rückfaltung zu minimieren. Eine wichtige Möglichkeit die Rückfaltungsausbeute zu erhöhen, ist die Expression des Zielproteins als Fusionskonstrukt. In den zurückliegenden Jahren wurden verschiedene Proteinfusionstechnologien entwickelt, um eine verbesserte Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen in Bakterien zu erreichen. Eine Möglichkeit ist das Thioredoxingensystem. Die zytoplasmatische Co-Expression von Thioredoxin (Trx)

führt zu einer gesteigerten Ausbeute von eukaryotischen Proteinen mit und ohne Disulfidbrücken in *E. coli*^[223-226]. Außerdem vermindert es die Bildung von *inclusion bodies*^[227]. Die Überexpression von Thioredoxin in *E. coli* unterstützt und katalysiert die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken und erhält damit die Funktionalität des Zielproteins^[228, 229]. Warum Thioredoxin einen positiven Einfluss auf die Expression von eukaryotischen Proteinen in bakteriellen Expressionssystemen nimmt, wird aktuell vielfach untersucht. Vermutlich besitzt Thioredoxin aktive Chaperoneigenschaften^[228].

Die Verwendung des *Small ubiquitin-like Modifier* (SUMO) Proteins als Fusionspartner für eine verbesserte lösliche Expression mit höheren Expressionsraten, ist eine weitere anerkannte Strategie, ein schwierig zu exprimierendes Zielprotein herzustellen^[196, 197, 230, 231]. Die SUMO-Fusionstechnologie ist außerdem geeignet die Proteinrenaturierung als Faltungshelfer zu unterstützen, indem es Faltungsintermediate in Lösung hält^[232]. Die Verwendung von SUMO-Fusionskonstrukten führt zu einer leichten Abspaltung des SUMO-Fusionsfragments durch die SUMO-Protease Ulp1 und zur Generierung von rekombinanten Proteinen mit nativer N-terminaler Peptidsequenz^[196, 233, 234].

Aufgrund der Tatsache, dass es bis jetzt noch nicht gelungen war, die N-terminale Domäne des PTHR2 in einer strukturierten und vor allem funktionalen Form zu gewinnen, wurde versucht ECD-PTHR2 als Fusionkonstrukt zu exprimieren. Dafür wurden das Thioredoxin- und das SUMO-Gen mit dem Gen von ECD-PTHR2 und einem His₆-Tag fusioniert (Ergebnisse, Abb. 3.19). Für die Herstellung des Fusionskonstrukts wurden zwölf verschiedene Varianten in den pTsnG-Vektor (Anhang 4, 4.6) kloniert. Das pTsnG-Plasmid enthält eine codierende Sequenz für Trx, einen His₆-Tag zur spezifischen Reinigung und die SUMO-Gensequenz. Die durch die Klonierungen entstandenen zwölf verschiedenen Konstrukte besaßen Unterschiede in der N- und C-terminalen Länge für die ECD-PTHR2 Aminosäuresequenz (Anhang 4, 4.8). Mit Hilfe der unterschiedlichen Fusionskonstrukte sollte eine lösliche oder unlösliche Expression überprüft werden. Zusätzlich wurde untersucht, welchen Einfluss eine N- oder C-terminale Aminosäureverkürzung von ECD-PTHR2 auf die Expression hat. Die Verkürzung der N-terminalen Domäne geschah zur Erhöhung ihrer Löslichkeit während der Expression. C-terminal wurde versucht die Hydrophobizität der Ectodomäne zu verringern, indem Aminosäuren, die der ersten Transmembranhelix nahestehen entfernt wurden. Da eine Expression in *E. coli* erfolgen sollte, wurden auch alle Konstrukte ohne die Signalpeptidsequenz von ECD-PTHR2 generiert.

Für die Herstellung der verschieden langen Fusionskonstrukte wurde als erstes die cDNA von ECD-PTHR2, unter Verwendung von spezifisch designten chimären *Primern*, durch PCR amplifiziert. Das dadurch entstandene PCR-Produkt wird als *Mega-Primer* bezeichnet. Diese *Mega-Primer* sind Nukleotidsequenzen, die einen spezifischen Anteil der DNA-Sequenz von ECD-PTHR2 und des pTsnG-Vektor trugen. Über eine *overlap-extension* PCR wurden die Konstrukte in den Vektor einkloniert^[192] und anschließend nach *DpnI* Verdau, in *E. coli*-Zellen transformiert und auf Agarplatten ausplattiert. Der Erfolg der *overlap extension* PCR konnte durch einen analytischen Restriktionsverdau mit *BsaI* und *SmaI* (Anhang 1, 1.3, Abb. 1.3.1) und durch DNA-Sequenzierung für elf der zwölf hergestellten Konstrukte bestätigt werden.

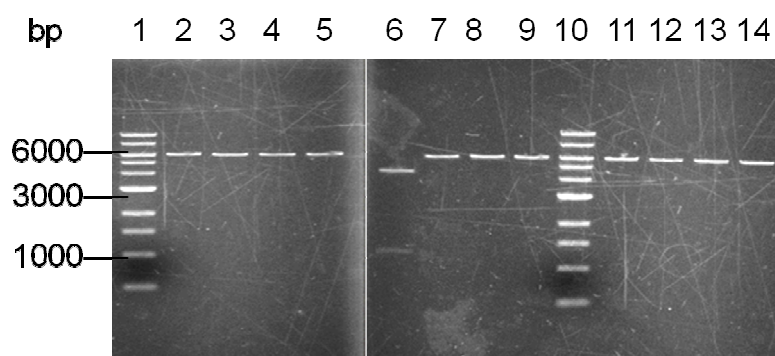


Abbildung 1.3.1: Analytischer Restriktionsverdau. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Klonierung der unterschiedlich langen ECD-PTHR2-Konstrukte wurde nach Abschluss einer analytischen Restriktion der erhaltenen pTSnG-Vektoren durchgeführt. Nach einer durchgeführten Plasmidpräparation wurden die einzelnen Konstrukte auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Durch die Integration der ECD-PTHR2 DNA-Fragmente in das pTSnG-Plasmid wurde die *SmaI* Restriktionsschnittstelle im Vektor ausgeschaltet. Deshalb wurde für einen Restriktionsverdau der Plasmide mit den Enzymen *BsaI* und *SmaI* nur ein lineares DNA-Fragment mit einer Länge von ca. 6300 bp erwartet. Wurde die DNA nicht inseriert, sollten in diesem Fall zwei Banden, eine bei ca. 4700 bp und eine weiter bei ca. 1300 bp auftreten. Für 11 der 12 hergestellten Trx-SUMO-ECD-PTHR2-Konstrukte konnte eine erfolgreiche Klonierung beobachtet werden. 1: DNA-Marker, 2: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₇₋₁₄₀, 3: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₇₋₁₃₄, 4: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₇₋₁₃₆, 5: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₇₋₁₃₈, 6: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₉₋₁₃₆, 7: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₉₋₁₃₈, 8: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₉₋₁₄₀, 9: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₉₋₁₃₄, 10: DNA-Marker, 11: Trx-SUMO-ECD-PTHR₃₁₋₁₃₈, 12: Trx-SUMO-ECD-PTHR₃₁₋₁₃₆, 13: Trx-SUMO-ECD-PTHR₃₁₋₁₃₄, 14: Trx-SUMO-ECD-PTHR₃₁₋₁₄₀.

Für die elf erfolgreichen Konstrukte wurde anschließend eine starke Expression in Autoinduktionsmedium^[235] (Anhang 1, 1.3, Abb. 1.3.2) und dYT-Medium beobachtet, aber ausschließlich in Form von unlöslichen *inclusion bodies*.

Um schließlich auch eine lösliche Expression, wenigstens für eins der elf Konstrukte zu forcieren, wurden die Expressionsbedingungen variiert. Eine lösliche Expression würde die Reinigung und Gewinnung von funktionalem ECD-PTHR2 erleichtern. So wurde die Expressionstemperatur von 37 °C auf 29 °C, 25 °C und 18 °C herabgesetzt und verschiedene *E. coli*-Stämme (BL 21(DE3), BL 21 Gold, BL 21 *Shuffle* K 3026, BL 21 *Shuffle* B3029) auf ihr Expressionsverhalten in Autoinduktionsmedium und dYT-Medium getestet. Dennoch führten alle diese Untersuchungen zu keiner sichtbaren löslichen Expression der Trx-SUMO-ECD-PTHR2 Fusionskonstrukte. Die Variation der Expressionsbedingungen und die N- oder C-terminale Verkürzung von ECD-PTHR2 hatten somit keinen Einfluss auf eine lösliche Expression von Trx-SUMO-ECD-PTHR2.

Um die Trx- und SUMO-Fusion als möglichen Faltungshelfer zu benutzen, wurde dennoch eine Expression der elf Konstrukte im 0,1 l Maßstab durchgeführt und anschließend die *IBs* gereinigt. Die Isolierung, Reinigung und Solubilisierung der *IBs* erfolgte wie unter 2.4.7 beschrieben. Die Ausbeute an *IBs* lag zwischen 0,3 mg und 0,8 mg. Die Renaturierung der Fusionskonstrukte erfolgte durch Pulsrenaturierung in Rückfaltungspuffer (0,1 M Tris, 0,8 M L-Arginin, 1 mM EDTA, 5 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 8,5^{4 °C}). Das Volumen des Rückfaltungspuffers wurde in Bezug zur Konzentration der solubilisierten *IBs* und der entsprechenden limitierenden Faktoren hergestellt. Es wurden 0,5 l Rückfaltungsansätze verwendet. Die Menge an eingesetztem Fusionsprotein für die Renaturierung lag, abhängig

vom Fusionskonstrukt, bei 22-45 mg. Während der Pulssetzung und anschließenden Inkubation zur Renaturierung des Proteins konnte augenscheinlich keine oder nur marginale Proteinpräzipitation für die Konstrukte beobachtet werden. Das heißt, die generierten Fusionsproteine wurden gut in Lösung gehalten. Nach dem letzten Puls und einer anschließenden Inkubation von 72 h wurden die Rückfaltungsansätze auf 50 ml konzentriert. Für eine nachfolgende Reinigung und Gewinnung von anhangsfreiem ECD-PTH₂ wurden die aufkonzentrierten Renaturierungsansätze gegen Phosphatpuffer (15 mM Imidazol, 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 8,0 ^{25 °C}) dialysiert. Die Dialyse erfolgte zur Entfernung von L-Arginin aus den Rückfaltungsansätzen. Die Aminogruppe des Arginins steht in direkter Konkurrenz zu den Aminogruppen im His₆-Tag und verhindert dadurch die Reinigung des Fusionsproteins, indem die Bindungsaffinität zum Ni²⁺-Säulenmaterial stark verringert wird^[203]. Zur Reinigung der Fusionsproteine wurden die dialysierten Rückfaltungsansätze auf eine Affinitätschromatographiesäule aufgetragen (IMAC, HisTrap HP 5 ml) und über einen Imidazolgradienten eluiert. Nach der chromatographischen Reinigung erfolgte die Abspaltung des Trx-SUMO-Fusionsproteins von den unterschiedlich langen Ectodomänen des PTH₂ durch die spezifische SUMO-Protease Ulp1. Während der Spaltungsreaktion konnte unmittelbar nach Zugabe von Ulp1 für alle Ansätze eine massive Proteinpräzipitation beobachtet werden. Die Ansätze wurden deshalb zentrifugiert und der lösliche Überstand zur Abtrennung von Trx-SUMO, Ulp1 und ungespaltenem Fusionsprotein wiederholt auf eine zweite Ni²⁺ Säule aufgetragen und gebunden. Die jeweiligen ECD-PTH₂-Proteinfragmente wurden im Durchlauf erwartet. Bei diesem zweiten IMAC-Reinigungsschritt konnte jedoch nur für zwei Ansätze ECD-PTH₂ im Durchlauf der Säule beobachtet werden. Bei den ECD-PTH₂-Fragmenten handelte es sich um ECD-PTH₂ ausgehend von der Aminosäure Tyr27-Gln138 und um ECD-PTH₂ ausgehend von der Aminosäure Tyr27-Phe140. Es waren das Fragment, an dem eine C-terminale Verkürzung um zwei Aminosäuren vorgenommen wurde und das Maximalkonstrukt. Die beiden erfolgversprechenden Ansätze wurden mit *Amicon*-Konzentratoren konzentriert und zur finalen Reinigung einer Gelfiltration (*HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade*) zugeführt. Nur bei einem der letzten zwei Ansätze konnte während der Elution, neben einem großen Hauptpeak im Totvolumen der Säule (ca. 40 ml Retentionsvolumen), ein minimaler zweiter Absorptionspeak bei 68 ml Retentionsvolumen detektiert werden. Es handelte sich hierbei um das ECD-PTH₂-Fragment, ausgehend von der Aminosäure Tyr27-Gln138. Der große Elutionspeak im Totvolumen der Säule zeigte, dass nach der SUMO-Spaltungsreaktion weitestgehend nur ECD-PTH₂-Aggregate in Lösung verblieben sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Trx-SUMO-Fusion nur ungefaltetes, falsch gefaltetes und unfunktionales Protein in Lösung gehalten hatte. Die Aufkonzentrierung der Proteinlösung unter dem Minimalpeak bei 68 ml Retentionsvolumen lieferte 0,015 mg. Das entspricht einer sehr geringen Ausbeute von 0,075 % entsprechend zur Proteinmenge, die für die Rückfaltung eingesetzt wurde. Das hier entwickelte System erwies sich für die Anreicherung von ECD-PTH₂ als ungeeignet. Eine initiale Proteincharakterisierung konnte damit nicht erreicht werden. Deshalb wurde der geschilderte Ansatz, zur Gewinnung von nativen und funktionalem ECD-PTH₂ mit Hilfe einer Trx-SUMO-Fusion, nicht weiter verfolgt.

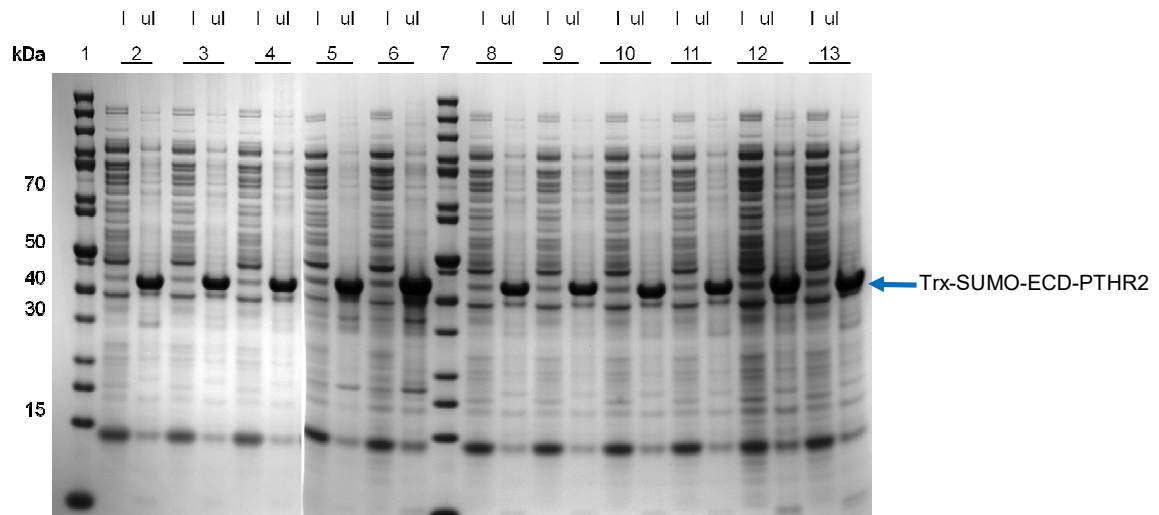


Abbildung 1.3.2: SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der unterschiedlich langen Trx-SUMO-ECD-PTHR2-Fusionskonstrukte. Aufgetragen wurde jeweils die löslichen (l) und unlöslichen (ul) Fraktionen der aus dem Zellaufschluss erhaltenen Proteinfractionen und zwar jeweils im gleichen Verhältnis. 1: Proteinmarker, 2: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₉₋₁₄₀, 3: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₉₋₁₃₈, 4: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₉₋₁₃₄, 5: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₇₋₁₄₀, 6: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₇₋₁₃₈, 7: Proteinmarker, 8: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₇₋₁₃₆, 9: Trx-SUMO-ECD-PTHR₂₇₋₁₃₄, 10: Trx-SUMO-ECD-PTHR₃₁₋₁₃₄, 11: Trx-SUMO-ECD-PTHR₃₁₋₁₃₆, 12: Trx-SUMO-ECD-PTHR₃₁₋₁₃₈, 13: Trx-SUMO-ECD-PTHR₃₁₋₁₄₀. Die Expression wurde in Autoinduktionsmedium^[235] bei 29 °C in BL 21 (DE3) CodonPlus® RIL *E. coli*-Zellen durchgeführt. Die Trx-SUMO-ECD-PTHR2-Fusionsproteine besaßen eine Größe von ca. 40 kDa und konnten dadurch als erwartete Banden für eine erfolgreiche Überexpression identifiziert werden. Die längeren ECD-PTHR2-Konstrukte sind an einem minimal verzögerten Laufverhalten gegenüber den stark verkürzten Varianten zu erkennen.

Anhang 2

Abbildungen

2.1 Lineare Abhängigkeit der intrinsischen Ligandenfluoreszenz

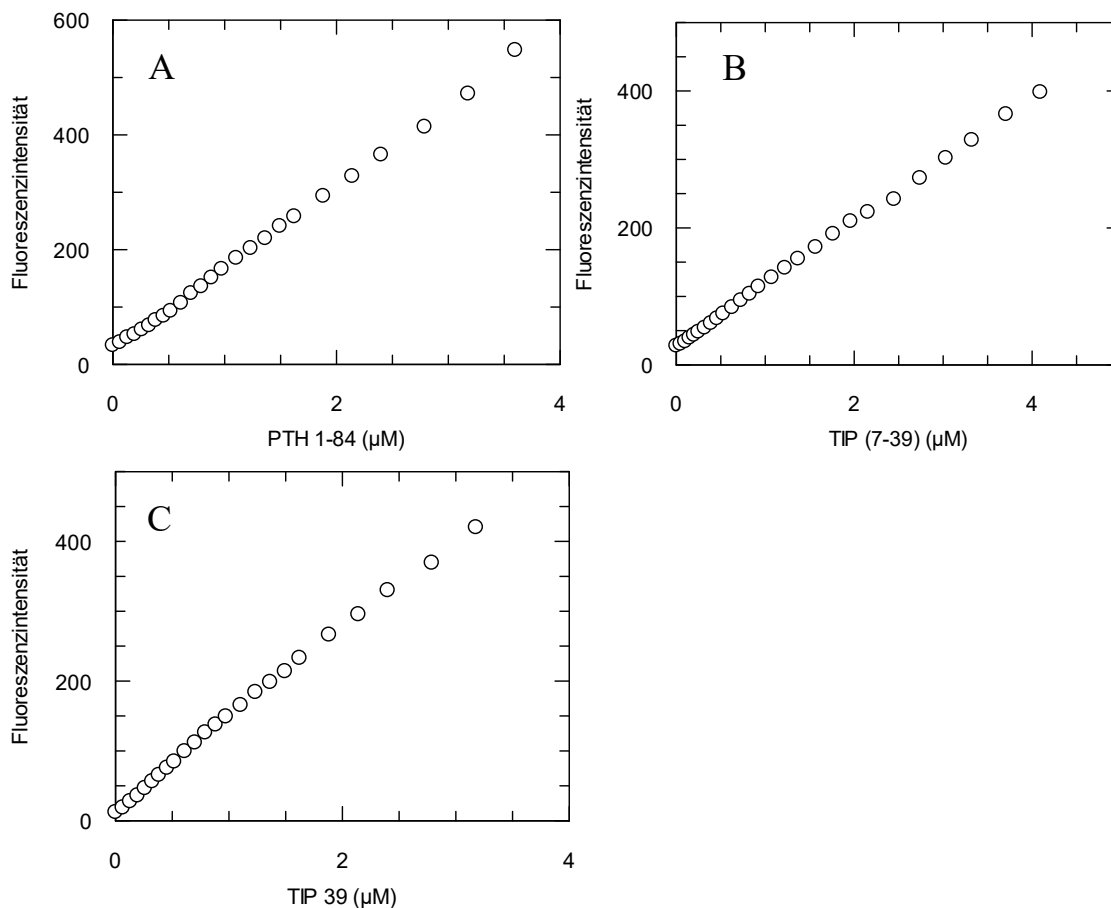


Abbildung 2.1: Pufferfluoreszenztitration der Liganden PTH (1-84), TIP (7-39) und TIP 39. A: Zeigt die in unabhängigen Versuchen bestimmte, konzentrationsabhängige Eigenfluoreszenz des isolierten Liganden PTH (1-84) in dem zur Titration eingesetzten Messpuffer (20 mM NaH_2PO_4 , 300 mM Na_2SO_4 , pH 6,0) **B:** Zeigt eine vergleichbare linear ansteigende Eigenfluoreszenz wie PTH (1-84) und TIP 39 in **C**. Die Messungen wurden jeweils bei 20 °C durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm.

2.2 Emissionsfluoreszenzspektren von ECD-PTHR1

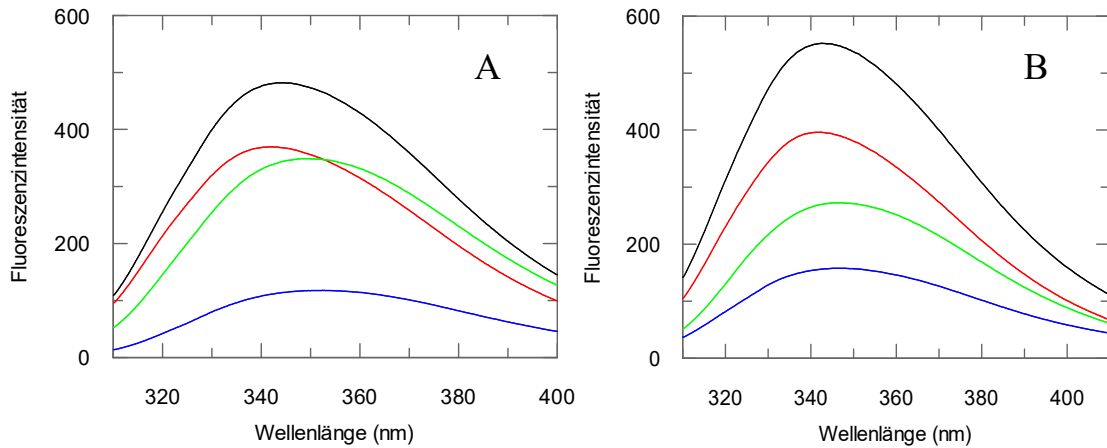


Abbildung 2.2: Emissionsfluoreszenzspektren von ECD-PTHR1 in Gegenwart von PTH (1-84) und TIP 39. **A:** Emissionsspektren von ECD-PTHR1 (rot) 1 μM , PTH (1-84) (blau) 1 μM und des Komplexes (grün) 1:1 ECD-PTHR2 und PTH (1-84) in 0,05 M Tris, 0,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8,0. Das schwarze Spektrum stellt die rechnerische Aufsummierung des ECD-PTHR1 und des PTH (1-84) Spektrums dar. **B:** Emissionsspektren von ECD-PTHR1 (rot) 1 μM , TIP 39 (blau) 1 μM und des Komplexes (grün) 1:1 ECD-PTHR2 und TIP 39 in 0,05 M Tris, 0,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8,0. Das schwarze Spektrum stellt auch in diesem Fall die rechnerische Aufsummierung des ECD-PTHR1 und des TIP 39 Spektrums dar. Es wurde in einer 1 cm Quarzglasküvette gemessen und die Spektren wurden 3fach akkumuliert. Die Messtemperatur betrug 20°C. Die Anregungswellenlänge war 295 nm.

2.3 Isotherme Titrationskalorimetrie von ECD-PTHR1 und TIP (7-39)

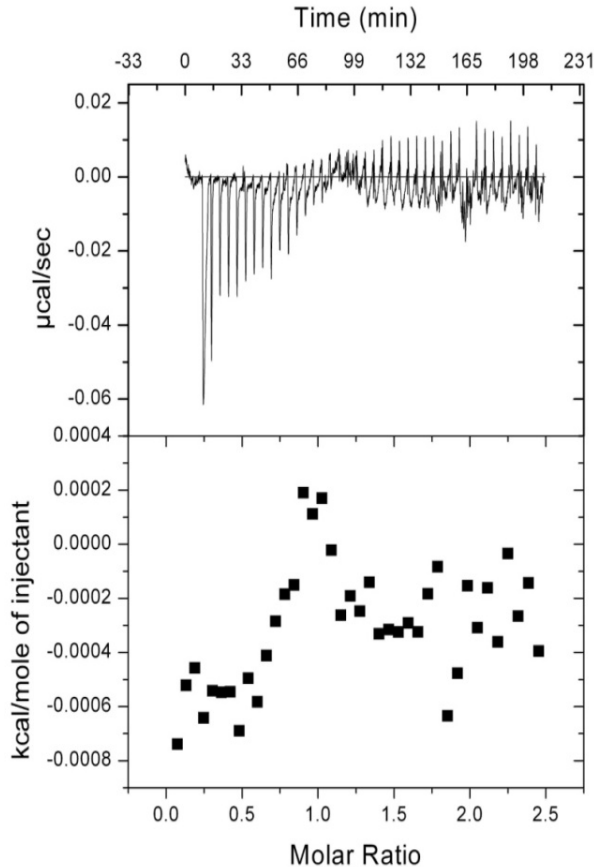


Abbildung 2.3: Isotherme Titrationskalorimetrie von ECD-PTHR1 und TIP (7-39). Das TIP (7-39) wurde stufenweise über 28 Injektionen zu je 10 μl in die 25 μM ECD-PTHR1 Proteinlösung titriert. Das Protein und der TIP-Ligand wurden vor der Messung im selben Messpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 8,0) dialysiert, um Verdünnungswärmeeffekte während der Messung zu minimieren. Die ITC-Titration wurde bei 20 °C durchgeführt. **A:** Zeigt die elektronische Kompensationsleistung $\mu\text{cal/s}$ in Abhängigkeit von der Zeit in min. Es ist die Heizleistung, die benötigt wird, um die Temperatur zwischen Referenzzelle und Messzelle des ITC-Geräts nach jeder erfolgten Injektion des TIP (7-39) Liganden konstant zu halten. **B:** Hier ist auf der Ordinate die integrierte und um die Verdünnungswärme korrigierte Wärmemenge Q in kcal/ml Ligand in Abhängigkeit vom molaren Rezeptor/Ligand Verhältnis aufgetragen.

Anhang 3

Materialien

3.1 Chemikalien

Die in Tabelle A1 aufgeführten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tabelle A1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	VWR (Darmstadt, D)
Acetonitril	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Adenosintriphosphat ATP	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Agarose GTQ	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Agarose GTG	Cambrex Bio Science (Rockland, ME, USA)
Agar-Agar	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Alpha-Laktose-Monohydrat	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ammoniumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, D)
¹⁵ N Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ammoniumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ampicillin	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Borsäure	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Brij 35	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Brij 78	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Bromphenolblau	Applichem (Darmstadt, D)
3-[3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Chloramphenicol	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Coomassie Brilliant Blau G250	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem (Darmstadt, D)
Desoxynukleotid-Mix (dNTPs, dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol	VWR (Darmstadt, D)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Extran	Merck (Darmstadt, D)
D(+) Glukose	Carl Roth (Karlsruhe, D)
¹³ C D(+) Glukose	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glutation, oxidiert (GSSG)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Glutation, reduziert (GSH)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Glycerin	Applichem (Darmstadt, D)

Guanidinhydrochlorid	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Hefeextrakt	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Harnstoff	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Imidazol	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Isopropyl- β -galaktopyranosid (IPTG)	Gerbu (Gaiberg, D)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	Applichem (Darmstadt, D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Kanamycinsulfat	Gerbu (Gaiberg, D)
L-Arginin	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Applichem (Darmstadt, D)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Applichem (Darmstadt, D)
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Applichem (Darmstadt, D)
β -2-Mercaptoethanol	Applichem (Darmstadt, D)
Natriumazid	Fluka (Buchs, CH)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka (Buchs, CH)
Natriumhydroxid	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriummolybdat-Dihydrat	Applichem (Darmstadt, D)
Natriumselenit	Applichem (Darmstadt, D)
Natriumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Nickel (II)-chlorid-Hexahydrat	Applichem (Darmstadt, D)
Pepton	Merck (Darmstadt, D)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Applichem (Darmstadt, D)
Proteaseinhibitor	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Roti-Load-Proteinauftragungspuffer	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Salzsäure (37 %)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Silbernitrat	Applichem (Darmstadt, D)
N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka (Buchs, CH)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Wasser, Nuklease-frei	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Zinksulfat-Heptahydrat	Applichem (Darmstadt, D)

3.2 Oligodesoxynucleotide

Die zur Klonierung von ECD-PTH₂ verwendeten Oligodesoxynucleotide sind in Tabelle A2 aufgeführt.

Tabelle: A2 Verwendete Oligodesoxynucleotide zur Klonierung von ECD-PTH₂

<i>Primer</i>	<i>Sequenz von 5' nach 3'</i>
fw_0	GCTCACAGAGAACAGATTGGTGGT GATGGCACGATTACCATTGAAG
fw_2	GCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTGATAGCGATGGCACGATTACCATTGAAG

```

fw_4    GCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTCAGCTGGATAGCGATGGCAGATTACCA
        TTGAAG
rv_0    CCGCAAGATTTCGATCCGTTA GCTAATATCCGGCTGCAGAAAAC
rv_2    CCGCAAGATTTCGATCCGTTA CCCTATGCTAATATCCGGCTGCAGAAAAC
rv_4    CCGCAAGATTTCGATCCGTTA
        CTGTTTCCCTATGCTAATATCCGGCTGCAGAAAAC
rv_6    CCGCAAGATTTCGATCCGTTAAAATTCCTGTTTCCCTATGCTAATATCCGGCTGC
        AGAAAAC
    
```

3.3 Enzyme

Die in Tabelle A3 aufgeführten Enzyme wurden für Klonierungen von DNA-Fragmenten und zur Proteinspaltung verwendet.

Tabelle A3: Übersicht der verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>FastDigest BamHI</i>	Fermentas(St. Leon-Roth, D)
Benzonase	Novagen (Darmstadt, D)
Deoxyribonuklease I (DNase I)	Novagen (Darmstadt, D)
<i>Eco RI</i>	NEB (Frankfurt/M, D)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Promega (Mannheim, D)
Lysozym	Applichem (Darmstadt, D)
<i>Phusion</i> -DNA-Polymerase	Promega (Mannheim, D)
<i>Shrimp</i> -Alkalische Phosphatase (SAP)	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
SUMO-Protease	Mathias Henze (MLU, Halle-Wittenberg, D)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Roth, D)

3.4 Peptide und Proteine

Tabelle A4 zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide und Proteine. Sie wurden für strukturelle und funktionelle Charakterisierungen verwendet.

Tabelle A4: Verwendete Peptide und Proteine

Peptide/Protein	Hersteller
TIP 7-39	AG Beck-Sickinger (Universität Leipzig, D)
TIP 39	Mathias Henze (MLU, Halle-Wittenberg, D)
PTH (15-34)	Mathias Henze (MLU, Halle-Wittenberg, D)
PTH (1-84)	Mathias Henze (MLU, Halle-Wittenberg, D)
ECD-PTHR1	Mathias Henze (MLU, Halle-Wittenberg, D)
ECD-PTHR2	Mathias Henze (MLU, Halle-Wittenberg, D)

3.5 Plasmide

Für die Klonierung und Expression der in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden die in Tabelle A5 aufgeführten Vektoren verwendet.

Tabelle A5: Übersicht der verwendeten Plasmide und Vektoren

Plasmid	Resistenz	Bezugsquelle
pET-SUMOadapt	Kanamycin	Invitrogen (Darmstadt, D)
pTSnG	Kanamycin	Inno Profile (MLU, Halle-Wittenberg, D)
pET-15b-ECD-PTHR1	Ampicillin	Institut für Biochemie und Biotechnologie (MLU, Halle-Wittenberg, D)
pET-15b-ECD-PTHR2	Ampicillin	Eigene Herstellung Institut für Biochemie und Biotechnologie (MLU, Halle, D)
pTSnG-ECD-PTHR2	Kanamycin	Eigene Herstellung Institut für Biophysik (MLU, Halle-Wittenberg, D)
pET-SUMO-ECD-PTHR2	Kanamycin	Eigene Herstellung, Institut für Biophysik (MLU, Halle-Wittenberg, D)
pET-SUMOadapt-PTH (1-84)	Kanamycin	Institut für Biochemie und Biotechnologie (MLU, Halle-Wittenberg, D)
pET-SUMOadapt-PTH (15-34)	Kanamycin	Institut für Biochemie und Biotechnologie (MLU, Halle-Wittenberg, D)
pET-SUMOadapt-TIP 39	Kanamycin	Institut für Biochemie und Biotechnologie (MLU, Halle-Wittenberg, D)
pET-28b-Ulp1	Kanamycin	Eigene Herstellung, Institut für Biophysik (MLU, Halle-Wittenberg, D)

3.6 Mikroorganismen

Die in Tabelle A6 aufgeführten Mikroorganismen wurden zur Amplifikation von Plasmid-DNA oder zur rekombinanten Proteinexpression verwendet.

Tabelle A6: Übersicht der verwendeten *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp
TOP 10	F-mcrA Δ (<i>mr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galK rpsL(StrR) endA1 nupG</i>
DH5 α	<i>E. coil</i> DH5 α <i>endA1 F⁻ gyrA96 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) lacZ</i> Δ M15 <i>recA1 supE44 λ⁻ deoR thi-1 ϕ80d</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169
BL21(DE3)	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁺) gal γ</i> (DE3)
BL21(DE3) CodonPlus® RIL	F- <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺Tet^r gal λ</i> (DE3) <i>endA The [argU ileY leuW Cam^r]</i>

3.7 Nährmedien

Alle Medien und Lösungen für molekularbiologische Anwendungen wurden vor dem Gebrauch, wenn nicht anders beschrieben, autoklaviert (20 min, 121 °C und 1 bar) und nach dem Abkühlen mit dem entsprechenden steril filtriertem Antibiotikum (50 μ g/ml Ampicillin, 25 μ g/ml Chloramphenicol oder 50 μ g/ml Kanamycin) versetzt. In Tabelle A7 ist die Zusammensetzung der verwendeten Medien pro einem Liter Wasser angegeben.

Tabelle A7: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Medium/Lösung	Zusammensetzung
dYT	5 g/l NaCl, 10 /l Hefeextrakt, 16 g/l Pepton
feste Nährböden	dYT-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar
5x M9	85g/l Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O, 15 g/l KH ₂ PO ₄ , 2,5 g/l NaCl, 5 g/l NH ₄ Cl*
TS2	100 mg/l ZnSO ₄ ·7 H ₂ O, 30 mg/l MnCl ₂ · 4 H ₂ O, 300 mg/l H ₃ BO ₃ , 200 mg/l CoCl ₂ · 6 H ₂ O, 20 mg/l NiCl ₂ · 6 H ₂ O, 10 mg/l CuCl ₂ 2 H ₂ O, 900 mg/l Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O, 20 mg/l Na ₂ SeO ₃ , steril filtrieren
Minimalmedium	200 ml/l 5xM9, 2 ml/l TS2-Lösung, 2 ml/l 1 M MgSO ₄ , 1 ml/l 0,1 M CaCl ₂ , 1 ml/l 10 mM Fe(III)-citrat, 20 ml/l 30 % (w/v) Glukose*, steril filtrieren

*Zur Expression von isotopenmarkierten Proteinen für NMR-spektroskopische Untersuchungen wurde 5 g/l ¹⁵NH₄Cl und 10 % (w/v) ¹³C-Glukose im Medium eingesetzt.

3.8 Standards, Kits und sonstige Verbrauchsmaterialien

Die Tabelle A8 enthält eine Auflistung der verwendeten Standards, Kits, sowie weitere Verbrauchsmaterialien.

Tabelle A8: Übersicht der verwendete Standards, Kits und Verbrauchsmaterialien

Standards	Hersteller
Protein-Leiter Roti®-Mark Standard	Carl Roth (Karlsruhe, D)
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Lambda DNA / <i>Eco</i> 130I (<i>Sty</i> I)-Marker	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
pUC 19 DNA / <i>MSPI</i> (<i>Hpa</i> II)-Marker	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
1 kba DNA-Leiter	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
100 bp-DNA-Leiter	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Kits	Hersteller
Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System	Promega (Mannheim, D)
Wizard plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega (Mannheim, D)
PCR Purification Kit DNA Cleanup	Jena Bioscience (Jena, D)
Roti®-Prep Plasmid MINI	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Verbrauchsmaterialien	Hersteller
BIAcore Sensor Chip CM5	Biacore AB (Freiburg, D)
Konzentratoren VivaSpin 6 (MWCO 3,0 kDa)	Sartorius (Göttingen, D)
Konzentratoren VivaSpin 15R (MWCO 5,0: 10,0 kDa)	Sartorius (Göttingen, D)
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg, D)
Schott-Flaschen (diverse Größen, 50 ml -2 l)	Schott (Mainz, D)
Spectro/Por-Dialyseschläuche (MWCO 3,5 kDa, 1kDa)	Spectrum (L.A., CA, USA)
Spritzenfilter (0,22 µm und 0,45 µm)	TPP® (Trasadingen, CH)
NMR-Röhrchen (5 mm)	New Era (Vineland, NY, USA)
Parafilm	Pechiney plastic Packaging (Chicago, IL, USA)
pH-Indikatorstäbchen und Papier	Merck (Darmstadt, D)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, D)

Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil®
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)

Hellma (Mühlheim, D)
TPP® (Trasadingen, CH)

3.9 Geräte und Zubehör

Zur Anfertigung dieser Arbeit wurden neben der Standardlaborausstattung auch die in Tabelle A9 aufgeführten Geräte und weiteres Zubehör verwendet.

Tabelle A9: Verwendeten Geräte und Zubehör

Geräte und Zubehör	Hersteller
Affinitätschromatographiesäule HisTrap HP 5 ml	GE-Healthcare (Freiburg, D)
Äkta, FPLC und Purifier	GE-Healthcare (München, D)
Autoklav VX-95	Systec (Wettenberg, D)
Biacore	Biacore AB (Freiburg, D)
Bioreaktor (5 l Fermenter)	New Brunswick Scientific (Nürtingen, D)
Brutschrank	Heraeus, Thermo Scientific (Hanau, D)
CD-Spektrometer	Jasco (Groß-Umstadt, D)
Dispergierwerkzeug S18N-19G	Ika (Staufen, D)
Eppendorf-Tischkühlzentrifuge 4515D und 5804R	Eppendorf, New Brunswick (Hamburg, D)
Exsikkator	Duran Group (Wertheim, D)
Filtersystem Express™ Plus	MilliPORE, Merck (Darmstadt, D)
Fluoreszenzspektralphotometer FP-6500	Jasco (Groß-Umstadt, D)
Gefriertrocknungsanlage (Lyophilie) Christ Alpha 1-4 LSC	Christ (Osterode, D)
Geldokumentationsanlage	
Gelelektrophoresegeräte (SDS-PAGE; SE 250)	Hofer, Thermo Scientific (Schwerte, D)
Größenausschlusschromatographiesäulen, HiLoad 16/60 Superdex 75 <i>prep grade</i> , HiLoad 26/600 Superdex 30 <i>prep grade</i> , HiLoad Superdex 75 10/300 GL	GE-Healthcare (Freiburg, D)
HLPC-System Gynotec	
HPLC-Säule, SP 250/10 Nucleosil 500-5 C18	Macherey-Nagel (Düren, D)
Hydrophobe Interaktionschromatographiesäule, 5 ml FF high sub Phenyl-Sepharose	GE-Healthcare (Freiburg, D)
Kleinschüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Kühlzentrifuge Sorvall RC5B Plus	Thermo Scientific (Schwert, D)
Laminarflowbox Hera <i>Safe</i>	Thermo Scientific (Langenselbold, D)
Mikrofluidizer Emulsi Flex-05	Avestin (Mannheim, D)
NMR-Spektrometer Avance III 600 MHz, 800 MHz	Bruker (Karlsruhe, D)
OD ₆₀₀ -Messgerät	ImpLen (München, D)
Peltierelement PTC-423S/15	Jasco (Groß-Umstadt, D)
pH-Messgerät InoLab Level 1	WTW (Weilheim, D)
Quarzglaspräzisionsküvetten	Hellman (Mühlheim, D)
Refraktometer	Krüß (Hamburg, D)
Reinstwasseranlage GenPure (UF)	TKA Reinstwassersysteme (Niederelbert, D)
Rotationsverdampfer LABROTA 4011	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
Rotoren SLA-3000 und SS-34	Thermo Scientific (Schwert, D)
Säulenkörper (Chromatographiesäulen)	GE-Healthcare (Glattbrugg, CH)

Schüttelkolbeninkubator Innova 40 und 43	New Brunswick Scientific (Nürtingen, D)
Sensor Chip CM 5	Biacore AB (Freiburg, D)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
Thermocycler	Eppendorf (Hamburg, D)
Mastercycler	New Brunswick Scientific (Hamburg, D)
LabCycler gradient 96	Sensoquest (Göttingen, D)
Ultraschallaufschlussgerät Sonifier W250 D	Branson (Dietzenbach, D)
Ultraschalbad <i>Power Sonic</i> 405	Martin Walter Ultraschalltech. (Straubenhardt, D)
Ultraturax T18	Ika (Staufen, D)
UV/VIS-Absorptionsspektrometer V-650	Jasco (Groß-Umstadt, D)
VIVA Flow Membran	Sartorius (Göttingen, D)
VP-ITC Titrationskalorimeter	Microcal LLC (Northampton, USA)
Waage TE 1502 S	Sartorius (Göttingen, D)

3.10 Software und Programme

Die in dieser Arbeit verwendeten Programme sind in Tabelle A10 aufgelistet.

Tabelle A10: Verwendete Software

Software/Programm	Hersteller
Chromas	Technelysium (South Brisbane, AUS)
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software (Cary, NC, USA)
Graf-Fit 5.0	Erithacus Software Limited
Multalin interface page	http://www.multalin.toulouse.inra.fr/multalin/
NMRViewJ	http://www.onemoonscientific.com/
ProtParam	http://www.expasy.org

3.11 Pufferlösungen

Tabelle A11 zeigt die Zusammensetzung des verwendeten TAE- und DNA-Lader-Puffers

Tabelle A11: Zusammensetzung des TAE- und DNA-Lader-Puffers

1 x TAE-Puffer:	20 mM Tris/HCl, 10 mM Essigsäure, 0,5 mM EDTA, pH 8,0 ^{20 °C}
Probenpuffer:	4 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

In Tabelle A12 ist die Zusammensetzung der für die SDS-PAGE verwendeten Pufferlösungen angegeben.

Tabelle A12: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele und der verwendeten Pufferlösungen

Chemikalien	Sammelgel 6 %	Trenngel 12,5 %	Trenngel 15 %
Gelpuffer	1,5 ml	3,3 ml	3,3 ml
Acrylamidlösung	1,2 ml	4,2 ml	5,0 ml
ddH ₂ O	3,3 ml	2,9 ml	1,7 ml
TEMED	4,0 µl	4,5 µl	4,5 µl
10 % APS	50,0 µl	83,0 µl	83,0 µl
Gelpuffer:	3 M Tris/HCl, 0,3 % (w/v) SDS, pH 8,45 ^{25 °C}		
4 x RotiLoad-Probenpuffer:	200 mM Tris/HCl, 120 mM DTE, 40 mM EDTA, 48 % (w/v)		

Anhang

Anodenpuffer:	Glycerin, 15 % (w/v) SDS, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7,0 ^{25 °C} 200 mM Tris/HCl, pH 8,9 ^{25 °C}
Kathodenpuffer:	100 mM Tris/HCl, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,2 ^{25 °C}
Fixierlösung:	10 % (w/v) Trichlooessigsäure
Färbelösung	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant <i>Blue</i> G
Entfärberlösung:	10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol

Anhang 4

Vektorkarten, Aminosäuresequenzen und *Alignment*

4.1 pETSUMOadapt

Das Plasmid **pETSUMOadapt** wurde durch Einfügen einer DNA Sequenz (blau) aus zwei synthetischen Oligonukleotiden in den Vektor pETSUMO der Firma Invitrogen wie unten angegeben durch Eva Bosse-Dönecke (Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) hergestellt. Die in schwarz dargestellten Nukleotide gehören zum pETSUMO-Vektor.

```
GGTGGT AGAGACCTCAGGATCCAAGCTTGCGGCCGCCTCGAGA GACAAG
CCACC ATCTCTGGAGTCCTAGGTTCGAACGCCGCGGAGCTC TCTGTTC
```

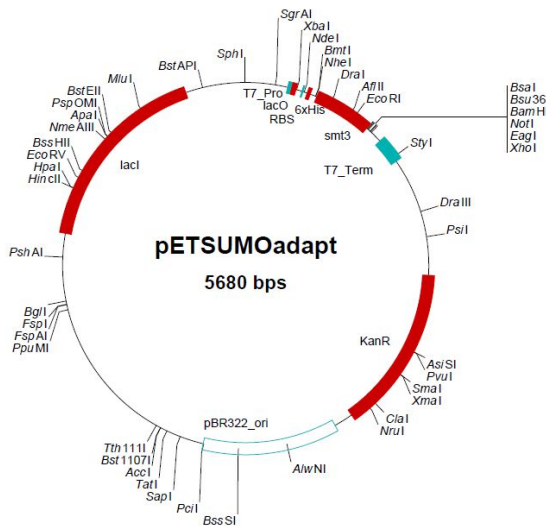


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des pET-SUMOadapt-Vektors für die Expression von SUMO-Fusionsproteinen in *E. coli*. Die codierende Sequenz für relevante Peptide kann mit Hilfe verschiedener Restriktionsenzyme in den pETSUMOadapt-Vektor^[199] kloniert werden. Dadurch besitzen die Peptide nach Abspaltung des SUMO-Fusionsprotein einen natürlichen N-Terminus. Der pET-SUMOadapt-Vektor kodiert für eine His₆-Tag, der N-terminal an das SUMO-Fusionsprotein (smt3) gekoppelt ist. Zur Kontrolle der Genexpression besitzt der Vektor zusätzlich einen T7-Promotor und lac-Operon. Außerdem besitzt er ein Resistenzgen für Kanamycin (KanR), ein lacI-Gen und einen Plasmid-Replikationsursprung (pBR322 ori) zur Plasmidvervielfältigung.

4.2 pET-SUMOadapt-PTH(1-84)

Das in dieser Arbeit verwendete Plasmid **pET-SUMOadapt-PTH(1-84)** enthält die codierende Nukleotidsequenz für humanes PTH(1-84) (rot). Diese wurde durch Klonierung mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BsaI* und *BamHI* in den Vektor pETSUMOadapt einkloniert.

```
GGTGGT
TCTGTGAGTGAAATACAGCTTATGCATAACCTGGGAAAACATCTGAACTCGAT
GGAGAGAGTAGAATGGCTGCGTAAGAAGCTGCAGGATGTGCACAATTTTGTTC
CCCTTGGAGCTCCTCTAGCTCCAGAGATGCTGGTTCCAGAGGCCCGAAAA
AAGGAAGACAATGTCTTGGTTGAGAGCCATGAAAAAAGTCTTGGAGAGGCAG
ACAAAGCTGATGTGAATGTATTAATAAGCTAAATCCCAGGGATCC
GATCC
```

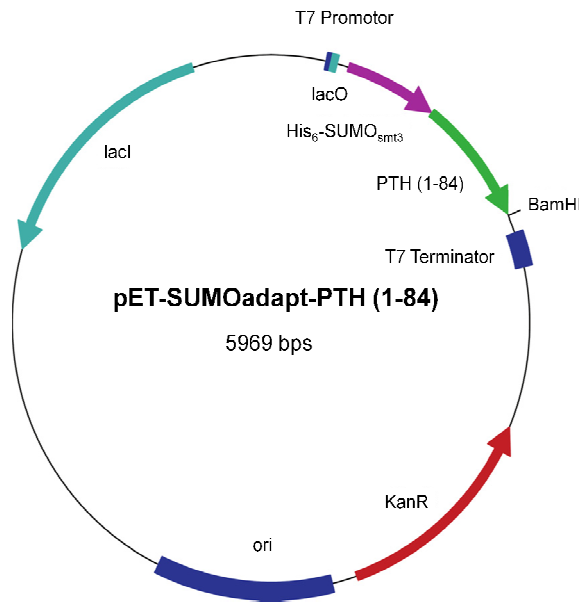


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des pET-SUMOadapt-PTH (1-84)-Vektors für die Expression von humanen PTH (1-84) als SUMO-Fusionsprotein in *E.coli*. Die codierende Sequenz für humanes PTH (1-84) wurde mit Hilfe von der Restriktionsenzyme *BsaI* und *BamHI* in den pETSUMOadapt-Vektor^[199] kloniert. Dadurch besitzt PTH (1-84) nach Abspaltung des SUMO-Fusionsprotein einen natürlichen N-Terminus. Der pET-SUMOadapt-Vektor trägt ein Gen für einen His₆-Tag, der N-terminal an das SUMO-Fusionsprotein (smt3) gekoppelt ist. Zur Kontrolle der Genexpression besitzt der Vektor zusätzlich einen T7-Promotor und lac-Operon. Außerdem besitzt er ein Resistenzgen für Kanamycin (KanR), ein lacI-Gen und einen Plasmid-Replikations-ursprung (pBR322 ori) zur Plasmidvervielfältigung.

4.3 pET-SUMOadaptPTH-(15-34)

Das verwendete Plasmid **pET-SUMOadapt-PTH(15-34)** enthält die codierende Sequenz für humanes PTH (15-34) (rot). Diese wurde durch Klonierung mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BsaI* und *BamHI* in den Vektor pETSUMOadapt einkloniert.

GGTGGTCTGAACTCGATGGAGAGAGTAGAATGGCTGCGTAAGAAGCTGCAGGATGTG
CACAATTTTAAATAGGATCC

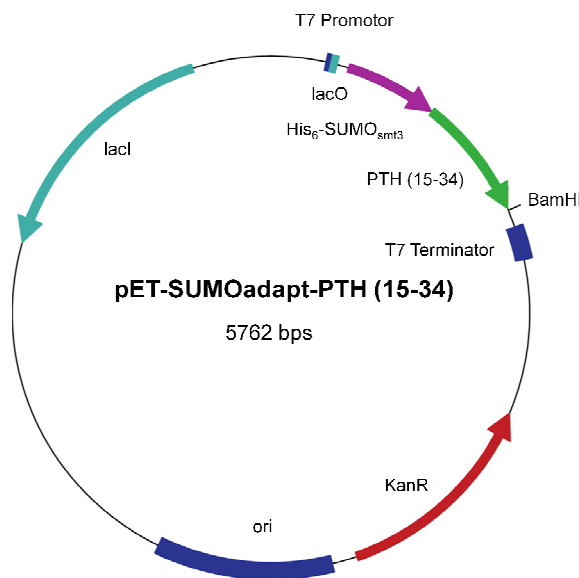


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des pET-SUMOadapt-PTH (15-34)-Vektors für die Expression von humanen PTH (15-34) als SUMO-Fusionsprotein in *E.coli*. Die DNA-Sequenz für humanes PTH (15-34) wurde mit Hilfe von der Restriktionsenzyme *BsaI* und *BamHI* in den pETSUMOadapt-Vektor^[199] kloniert. Dadurch besitzt PTH (15-34) nach Abspaltung des SUMO-Fusionsproteins einen natürlichen N-Terminus. Der pET-SUMOadapt-Vektor trägt ein Gen für einen His₆-Tag, der N-terminal an das SUMO-Fusionsprotein (smt3) gekoppelt ist. Zur Kontrolle der Genexpression besitzt der Vektor zusätzlich einen T7-Promotor und lac-Operon. Außerdem besitzt er ein Resistenzgen für Kanamycin (KanR), ein lacI-Gen und einen Plasmid-Replikations-ursprung (pBR322 ori) zur Plasmidvervielfältigung.

4.4 pET-SUMOadapt-TIP 39

Das verwendete Plasmid **pET-SUMOadapt-TIP 39** enthält die codierende Sequenz für humanes *Tuberoinfundibular Peptide 39* (rot). Diese wurde durch Klonierung mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BsaI* und *BamHI* in den Vektor pETSUMOadapt einkloniert.

GGTGGT

AGCCTGGCCCTGGCCGATGATGCAGCATTTCGTGAACGTGCACAGTCTGCTGGCTGCA
CTGGAACGTCGTCATTGGCTGAATAGCTATATGCATAAACTGCTGGTTCTGGATGCAC
CG GATCC

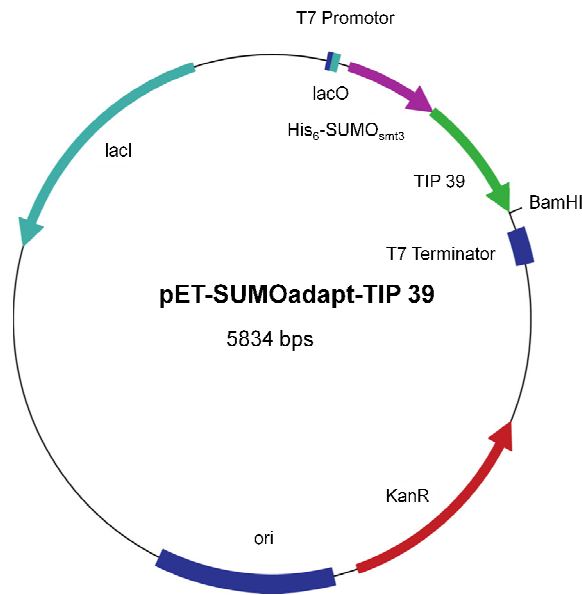


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des pET-SUMOadapt-TIP 39-Vektors für die Expression von humanen TIP 39 als SUMO-Fusionsprotein in *E. coli*. Die codierende Sequenz für humanes TIP 39 wurde mit Hilfe von der Restriktionsenzyme *BsaI* und *BamHI* in den pETSUMOadapt-Vektor^[199] kloniert. Dadurch besitzt TIP 39 nach Abspaltung des SUMO-Fusionsprotein einen natürlichen N-Terminus. Der pET-SUMOadapt-Vektor trägt ein Gen für einen His₆-Tag, der N-terminal an das SUMO-Fusionsprotein (smt3) gekoppelt ist. Zur Kontrolle der Genexpression besitzt der Vektor zusätzlich einen T7-Promotor und lac-Operon. Außerdem besitzt er ein Resistenzgen für Kanamycin (KanR), ein lacI-Gen und einen Plasmid-Replikationsursprung (pBR322 ori) zur Plasmidvervielfältigung.

4.5 pET15b

Der Vektor **pET15b** wurde für die Klonierung von ECD-PTHR2 verwendet. Es handelte sich hierbei um eine Variante ausgehend von Ala22-Tyr141 und ohne Signalsequenz. Die Klonierung erfolgte mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamHI* und *NdeI*.

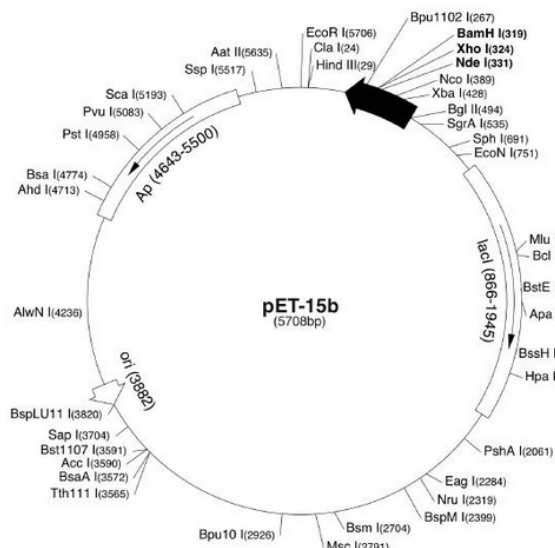


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des pET-15b-Expressionsvektors zur Expression von humanen von ECD-PTHR2 in *E. coli*. Die codierende Sequenz für humanes ECD-PTHR2 (Ala22-Tyr141) wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamHI* und *NdeI* in Vektor kloniert. Der Vektor vermittelt dem zu exprimierenden Protein einen N-terminalen His₆-Tag. Zur Kontrolle der Genexpression steht der Vektor unter T7-Promotor-kontrolle und wird durch ein lac-Operon reguliert. Außerdem besitzt er ein Resistenzgen für Ampicillin. Das lacI-Gen und der Plasmid-Replikationsursprung (ori 3882) dienen der Plasmidvervielfältigung.

4.6 pTSnG

Der Vektor **pTSnG** wurde für die Klonierung unterschiedlich langer ECD-PTHR2-Fragmente verwendet. Das Einfügen der spezifischen Gensequenzen erfolgte durch *overlap extension* PCR nach der Methode von Bryksin und Matsumura^[192].

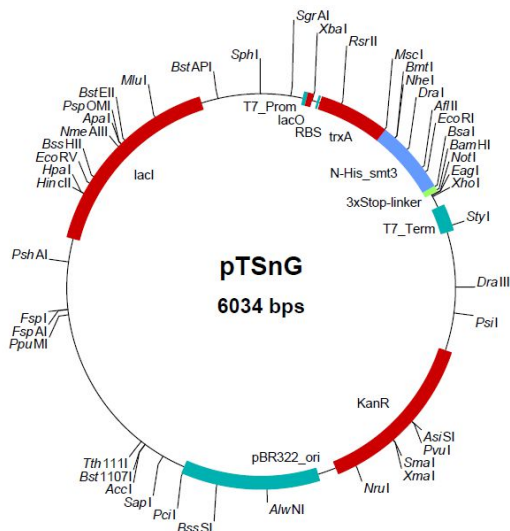


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des pTSnG-Vektors für die Expression von Thioredoxin-SUMO-Fusionsproteinen in *E. coli*. Die codierende Gensequenz für die unterschiedlichen ECD-PTHR2-Fragmente wurde durch *overlap extension* PCR nach der Methode von Bryksin und Matsumura^[192] durch die Erzeugung von *Megaprimern* in den Vektor kloniert. Der pTSnG-Vektor trägt ein Gen für das Thioredoxin A (*trxA*) und kodiert für einen His₆-Tag, der N-terminal an das SUMO-Fusionsprotein (*smt3*) gekoppelt ist. Die Regulation der Expression wurde über den T7-Promotor und das lac-Operon realisiert. Außerdem besitzt der Vektor ein Resistenzgen für Kanamycin (KanR), ein lacI-Gen und einen Plasmid-Replikationsursprung (pBR322 ori) zur Plasmidvervielfältigung.

4.7 Aminosäuresequenz von PTH (1-84) und TIP 39

Aminosäuresequenz des humanen PTH (1-84) nach rekombinanter Expression in *E. coli*:

SVSEIQLMH NLGKHLNSME RVEWLRKKLQ DVHNFVALGA PLAPRDAGSQ
RPRKKEDNVL VESHEKSLGE ADKADVNVLT KAKSQ

Aminosäuresequenz des humanen TIP 39 nach rekombinanter Expression in *E. coli*:

SLALA DDAAF RERAR LLAAL ERRHW LNSYM HKLLV LDAP

4.8 Aminosäuresequenz für Trx-SUMO-ECD-PTHR2-Fusionskonstrukte

Nachfolgend werden in Abbildung 4.8 die Aminosäuresequenz für die konstruierten ECD-PTHR2-Fragmente aufgeführt, die mittels Klonierung der Thioredoxin-SUMO-Fusionskonstrukte im pTSnG hergestellt wurden. Sie zeigen ausgehend vom Maximal-konstrukt eine N- und C-terminale Aminosäureverkürzung.

1. ECD-PTHR2, Maximal-konstrukt:

N-t₂₇-DSDG TITIEEQIVL VLKAKVQCEL NITAQLQEGE GNCFPWDGL ICWPRGTVGK ISAVPCPPYI YDFNHKGVAF RHCNPNGTWD FMHSLNKTWA NYSDCLRFLQ PDISIGKQEF-C-t₁₄₀

2. ECD-PTHR2, C-terminal-6:

N-t₂₇-DSDG TITIEEQIVL VLKAKVQCEL NITAQLQEGE GNCFPEWDGL ICWPRGTVGK
ISAVPCPPYI YDFNHKGVAF RHCNPNGTWD FMHSLNKTWA NYSDCLRFLQ PDIS-**C-t₁₃₄**

3. ECD-PTHR2, C-terminal-4:

N-t₂₇-DSDG TITIEEQIVL VLKAKVQCEL NITAQLQEGE GNCFPEWDGL ICWPRGTVGK
ISAVPCPPYI YDFNHKGVAF RHCNPNGTWD FMHSLNKTWA NYSDCLRFLQ PDISIG-**C-t₁₃₆**

4. ECD-PTHR2, C-terminal-2:

N-t₂₇-DSDG TITIEEQIVL VLKAKVQCEL NITAQLQEGE GNCFPEWDGL ICWPRGTVGK
ISAVPCPPYI YDFNHKGVAF RHCNPNGTWD FMHSLNKTWA NYSDCLRFLQ PDISIGKQ-**C-t₁₃₈**

5. ECD-PTHR2, N-terminal-2, C-terminal-6:

N-t₂₉-DG TITIEEQIVL VLKAKVQCEL NITAQLQEGE GNCFPEWDGL ICWPRGTVGK
ISAVPCPPYI YDFNHKGVAF RHCNPNGTWD FMHSLNKTWA NYSDCLRFLQ PDIS-**C-t₁₃₄**

6. ECD-PTHR2, N-terminal-2, C-terminal-4:

N-t₂₉-DG TITIEEQIVL VLKAKVQCEL NITAQLQEGE GNCFPEWDGL ICWPRGTVGK
ISAVPCPPYI YDFNHKGVAF RHCNPNGTWD FMHSLNKTWA NYSDCLRFLQ PDISIG-**C-t₁₃₆**

7. ECD-PTHR2, N-terminal-2, C-terminal-2:

N-t₂₉-DG TITIEEQIVL VLKAKVQCEL NITAQLQEGE GNCFPEWDGL ICWPRGTVGK
ISAVPCPPYI YDFNHKGVAF RHCNPNGTWD FMHSLNKTWA NYSDCLRFLQ PDISIGKQ-**C-t₁₃₈**

8. ECD-PTHR2, N-terminal-2:

N-t₂₉-DG TITIEEQIVL VLKAKVQCEL NITAQLQEGE GNCFPEWDGL ICWPRGTVGK
ISAVPCPPYI YDFNHKGVAF RHCNPNGTWD FMHSLNKTWA NYSDCLRFLQ PDISIGKQEF-**C-t₁₄₀**

9. ECD-PTHR2, N-terminal-4, C-terminal-6:

N-t₃₁-TITIEEQIVL VLKAKVQCEL NITAQLQEGE GNCFPEWDGL ICWPRGTVGK
ISAVPCPPYI YDFNHKGVAF RHCNPNGTWD FMHSLNKTWA NYSDCLRFLQ PDIS-**C-t₁₃₄**

10. ECD-PTHR2, N-terminal-4, C-terminal-4:

N-t₃₁-TITIEEQIVL VLKAKVQCEL NITAQLQEGE GNCFPEWDGL ICWPRGTVGK
ISAVPCPPYI YDFNHKGVAF RHCNPNGTWD FMHSLNKTWA NYSDCLRFLQ PDISIG-**C-t₁₃₆**

11. ECD-PTHR2, N-terminal-4, C-terminal-2:

N-t₃₁-TITIEEQIVL VLKAKVQCEL NITAQLQEGE GNCFPEWDGL ICWPRGTVGK
ISAVPCPPYI YDFNHKGVAF RHCNPNGTWD FMHSLNKTWA NYSDCLRFLQ PDISIGKQ-**C-t₁₃₈**

12. ECD-PTHR2, N-terminal-4:

N-t₃₁-TITIEEQIVL VLKAKVQCEL NITAQLQEGE GNCFPEWDGL ICWPRGTVGK
ISAVPCPPYI YDFNHKGVAF RHCNPNGTWD FMHSLNKTWA NYSDCLRFLQ PDISIGKQEF-**C-t₁₄₀**

Abbildung 4.8: Aminosäuresequenz der für die Herstellung der unterschiedlich langen ECD-PTHR2-Konstrukte. Den dargestellten Aminosäuresequenzen sind die blauen Markierungen **N-t_i** voran und **C-t_i** nachgestellt. **N-t_i** bedeutet N-terminalständige und **C-t_i** C-terminalständige Aminosäure. Das verwendete Maximalkonstrukt ging von Aminosäure D27 bis F140. Die anderen Konstrukte zeigen N und C-terminale Aminosäureverkürzungen.

4.9 Aminosäuresequenz-Alignment bekannter Klasse B GPCR-Ectodomänen

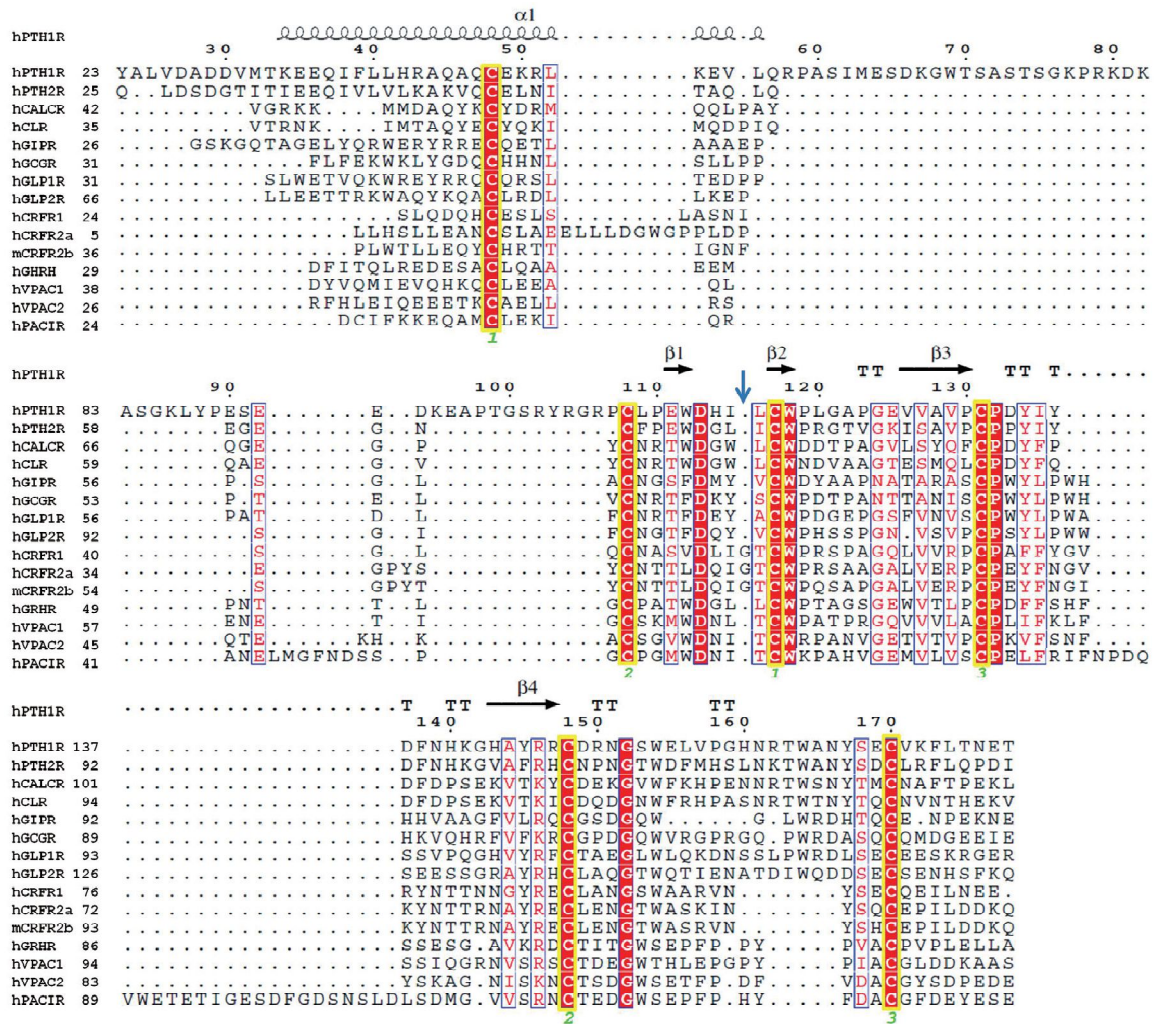


Abbildung 4.9: Aminosäuresequenz-Alignment bekannter Klasse B GPCR-Ectodomänen. Gleichbleibende und konservierte Reste sind markiert. Die für die CRFR Unterfamilie typischen Glycinreste sind durch einen blauen Pfeil angezeigt. Gleichbleibende Cysteinreste sind durch eine gelbe Einrahmung hervorgehoben. Identische Reste sind durch weiße Buchstaben auf roten Hintergrund dargestellt. Partiiell konservierte Reste sind wiederum als rote Buchstaben auf weißem Hintergrund abgebildet. Cystein-Paare, die zur Ausbildung von Disulfidbrücken beitragen sind durch einen gelben Umriss und durch eine grüne Nummer am unteren Rand abgebildet. Die Nummerierung der Aminosäurereste entspricht der des humanen PTHR1. Die Abbildung wurde aus [180] entnommen und modifiziert.

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Biophysik (Institut für Physik, MLU) unter der Leitung von Prof. Dr. Jochen Balbach angefertigt. Er gab mir in den zurückliegenden Jahren die Möglichkeit beharrlich an der Thematik von GPCR-Proteindomänen und ihren Liganden zu arbeiten. Ich möchte mich ganz besonders für seine fachliche Unterstützung, seine Diskussionsbereitschaft, seine unkomplizierte Art und seine Geduld während der Betreuung bedanken. Durch ihn habe ich auch die Möglichkeit bekommen meine Fühler auf dem Gebiet der NMR-Spektroskopie auszustrecken. Außerdem möchte ich die sehr guten biologischen, biochemischen und spektroskopischen Arbeitsbedingungen in seinem Labor erwähnen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Großer Dank gilt natürlich auch den gesamten „Bios“. Rica Patzschke, Tobias Gruber, Heike Böcker, Andi Klamt, Amit Kumar, Stefan Gröger, Susanne Link, Monika Baumann, Constanze Westphal, Matthias Altenstein, Caroline Haupt, Prof. Dr. Detlef Reichert und insbesondere Katrin Waldheim, ihr wart so hilfsbereit und wichtig für das sehr angenehme Klima im Laboralltag und darüber hinaus. Ihr habt mich auch bei Misserfolgen durch euren Zuspruch zum Weitermachen motiviert. Vor allem Rica, Tobias, Katrin und Amit möchte ich für ihre freundschaftliche Unterstützung, auch in schweren Lebenslagen, danken. Darüberhinaus bedanke ich mich herzlich bei Heike Böcker. Ihr starkes Interesse am Verlauf und das Korrekturlesen meiner Arbeit haben erheblich zur Fertigstellung beigetragen.

Mein Dank gilt auch PD Dr. habil. Hauke Lilie. Durch sein kritisches Interesse und seine Diskussionsbereitschaft gab er Hilfestellungen, vor allem bei Irrwegen wieder die richtige Bahn zu finden.

Den beiden Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Andrea Sinz und Dr. Angelika Schierhorn danke ich für die Betreuung und Durchführung von massenspektrometrischen Experimenten. Besonders hervorheben möchte ich dabei die tatkräftige Unterstützung von Dr. Christian Ihling bei der massenspektrometrischen Analyse und Aufklärung des Disulfidbrückenmusters von ECD-PTHR2.

Ich möchte mich auch bei Dr. Andreas Hoffmann und Dr. Sven Pfeifer bedanken. Durch ihre Expertise und technische Ausstattung im Labor konnte ich mir in zahlreichen Klonierungsexperimenten ein sehr gutes Wissen bei ausdauernden molekularbiologischen Arbeiten aneignen.

Bei Dr. Amit Kumar, Prof. Dr. Dan Donnelly und Dr. Clara Wishart bedanke ich mich sehr für die hervorragende Zusammenarbeit bei den Phosphorylierungsexperimenten.

Qi Zang danke ich für die Einführung in die Oberflächenplasmonresonanz und bei Rica Patzschke möchte ich mich für die Unterstützung, Durchführung und Auswertung von

NMR-Experimenten bedanken. Verschiedene NMR-spektroskopische Forschungsprojekte wurden auch gemeinsam mit Mohanraj Gopalswamy (Biophysik, MLU) bearbeitet.

Bei den Verantwortlichen und Mitgliedern des SFB 610 (Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz) möchte ich mich für die Aufnahme als assoziiertes Mitglied bedanken. Dadurch hatte ich die Möglichkeit, mich durch attraktive Veranstaltungen der Graduiertenschule weiter zu bilden und an internationalen Konferenzen teilzunehmen.

Meiner Familie, im besonderen Ralf S. und meinen Freunden Thomas S., Matthias K., Karsten H., Andrea S., Stefanie T. *, Michael T. * möchte ich für die zeitweilige Ablenkung von naturwissenschaftlichen Fragestellungen und für die vielen schönen Momente danken. Auch durch eure Unterstützung war diese Arbeit möglich.

Letztlich möchte ich diese Arbeit meiner Frau Annika* und meinem Sohn Mika widmen. Ihre Liebe und Geduld, ihr großes Verständnis und ihre Unterstützung haben mir viel Kraft gegeben und sehr dabei geholfen, diese Dissertation fertig zu stellen.

* Ein extra großer Dank gilt euch Lieben für eure Zeit und Leseleistung!

Publikationen und Poster

Publikationen

Gopalswamy, M., Kumar, A., Adler, J., Baumann, M., Henze, M., Kumar, S. T., Fändrich, M., Scheidt, H. A., Huster, D., Balbach, J. (2015). Structural characterization of amyloid fibrils from the human parathyroid hormone. *Biochim. Biophys. Acta.* **1854**, 249-257.

Kumar, A., Gopalswamy, M., Wishart, C., Henze, M., Lippold, L. E., Donnelly, D., Balbach, J. (2014). N-terminal phosphorylation of parathyroid hormone (PTH) abolishes its receptor activity. *ACS Chem. Biol.* *ACS Chem. Biol.* **9**, 2465-2470.

Publikation in Vorbereitung

Henze, M., Ihling, C., Hoffmann, A., Pfeiffer, S., Sinz, A., Balbach J. Expression, refolding and disulfide bond analysis of the N-terminal extracellular domain of the parathyroid hormone receptor 2. (Manuskript vorhanden)

Zhang Q., Yuan L., Gopalswamy., Henze M., Lilie H., Rudolph R., Balbach J., Pfeiffer S. Selection of an artificial binding protein against the ectodomain of PTH receptor 1. (Manuskript vorhanden)

Poster

Henze M., Hoffmann A., Ihling C., Pfeifer S., Rudolph R. und Balbach J. Structural and functional characterization of PTHR2. Molecular Life Sciences, International Symposium of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology, Frankfurt (2013)

Henze M., Mohanraj Gopalswamy M., Bosse-Doenecke E. und Balbach J. Antagonist recognition of a G protein-coupled receptor. Annual Meeting of the German Biophysical Society, Göttingen (2012)

Henze M., Mohanraj Gopalswamy M., Bosse-Doenecke E. und Balbach J. Antagonist recognition of a G protein coupled receptor domain. Molecular Life Sciences, International Symposium of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology, Frankfurt (2011)

Henze M., Mohanraj Gopalswamy M., Bosse-Doenecke E. und Balbach J. Antagonist recognition of a G protein-coupled receptor. 2nd International Meeting Conformational Transitions in Macromolecular Interactions DFG Graduiertenkolleg 1026, Halle (2011)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst habe. Es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Aus der Literatur wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht versucht habe, diese Dissertation an einer anderen Hochschule mit oder ohne Erfolg einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Halle (Saale),

Mathias, Henze

Angaben zur Person

Persönliches

Name Mathias Henze
Zivilstand: verheiratet und ein Kind
Geburtsort: Halle (Saale)
Geburtsstag: 19. November 1981
Adresse: Emil-Abderhalden-Straße 24, 06108 Halle (Saale)
Tel.-Nr. / (0163) 152 66 83
E-Mail: mathias.henze@physik.uni-halle.de

Studium und Schule

06/2014 – 03/2015 Elternzeit

seit 03/2009 – heute Promotion zum Thema: *Die humanen Parathormonrezeptoren 1 und 2: Heterologe Expression und Charakterisierung von Peptidliganden und ihrer extrazellulären Bindungsdomänen*,
Betreuer: Prof. Dr. Jochen Balbach, Institut für Physik,
Fachgruppe Biophysik, Martin-Luther-Universität Halle
Wittenberg

03/2009 – 06/2013 Assoziiertes Mitglied im SFB 610, Forschungsprojekt: Protein-
Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz

09/2008 – 02/2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Physik, Fachgruppe
Biophysik, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

02/2008 – 04/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Biochemie und
Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

05/2007 – 01/2008 Diplomarbeit, Institut für Biochemie und Biotechnologie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss:
Diplom-Biochemiker, Abschlussnote: gut

10/2001 – 02/2007 Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg, Wahlfächer: Technische Biochemie, Genetik,
Organische Chemie, Enzymkinetik Abschluss: Diplom-
Biochemiker, Abschlussnote: gut

08/1992 – 06/2000 Christian-Wolff-Gymnasium Halle (Saale),
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

08/1989 – 06/2005 Konservatorium Georg-Friedrich-Händel Halle (Saale),
Instrumente: Altflöte und Fagott