

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der
Ligandenbindungsdomäne des humanen
GLP-1 Rezeptors**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich) der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Ariuna Bazarsuren

geb. am 24.05.1970 in Ulaanbaatar, Mongolei

Gutachterin bzw. Gutachter:

- 1. Prof. Dr. R. Rudolph**
- 2. Prof. Dr. M. Bienert**
- 3. Prof. Dr. A. Beck-Sickinger**

verteidigt am: 8. Mai 2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005355

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005355>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Vorwort.....	5
1.2	Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren.....	6
1.3	Familie B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren.....	10
1.4	GLP-1 Rezeptor	12
1.5	<i>Glucagon-like Peptide-1</i>	14
1.5.1	Synthese und Sekretion von GLP-1.....	14
1.5.2	Biologische Wirkung von GLP-1	16
1.5.3	GLP-1 Metabolismus und Pathophysiologie.....	18
1.6	Ligandenbindung des GLP-1 Rezeptors.....	20
1.7	Zielstellung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Chemikalien.....	22
2.1.2	Standards und Kits.....	22
2.1.3	Proteine, Peptide und Enzyme.....	23
2.1.4	Chromatographiematerial	23
2.1.5	Sonstiges Material	23
2.1.6	<i>E. coli</i> -Stämme	23
2.1.7	Plasmide	24
2.1.8	Oligonukleotide	24
2.1.9	Sequenzierungsprimer	24
2.1.10	Medien, Antibiotika und Puffer.....	25
2.1.11	Puffer	25
2.1.12	Geräte	26
2.2	Molekularbiologische Methoden:	27
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E-coli</i> -Stämmen.....	27
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	27
2.2.3	Schnelles Plasmid <i>Screening</i>	28
2.2.4	Plasmid-DNA-Präparation	28
2.2.5	Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen.	28
2.2.6	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	29
2.2.7	Dephosphorylierung von DNA-Enden	29
2.2.8	Ligierung von DNA-Fragmenten	29
2.2.9	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.10	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	30
2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis <i>et al.</i> , 1992)	30

2.2.12 Ortsgerichtete Mutagenese	31
2.2.13 Ligationsunabhängige Klonierung (LIC-PCR-Methode)	31
2.3 Expression, Reinigung und Analytik von Proteinen.....	33
2.3.1 Erstellung von Expressionsvektoren	33
2.3.1.1 N-terminale Domäne des GLP-1 Rezeptors.....	33
2.3.1.2 Fusionskonstrukt von GLP-1 (p(GLP-1))	33
2.3.1.3 Rezeptor-Ligand-Chimäre (p(RL))	33
2.3.2 Bakterienanzucht zur Expression von nGLP-1R- und GLP-1-Varianten.....	34
2.3.2.1 Anzucht in Schüttelkolben	34
2.3.2.2 <i>Fed Batch</i> -Fermentation	34
2.3.3 <i>Inclusion body</i> (IB) Isolierung.....	34
2.3.4 Solubilisierung von <i>Inclusion Bodies</i>	34
2.3.5 Renaturierung des nGLP-1R	35
2.3.6 Pulsrenaturierung von nGLP-1R	35
2.3.7 Renaturierung der Rezeptor-Ligand-Chimäre	35
2.3.8 Optimierung der Renaturierung des nGLP-1R	35
2.3.9 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	36
2.3.10 Dot-Blot des nGLP-1R	36
2.3.11 TCA-Präzipitation von Proteinen	37
2.3.12 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	37
2.3.13 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie	37
2.3.14 Bestimmung freier SH-Gruppen.....	37
2.3.15 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen.....	38
2.3.16 Bromcyanspaltung zur Herstellung von GLP-1 _{8His}	38
2.3.17 Biotinylierung des GLP-1.....	38
2.3.18 Kationenaustauschchromatographie.....	38
2.3.19 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	39
2.3.20 Gelfiltrationschromatographie.....	39
2.3.21 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)	39
2.3.22 Ligandensäule.....	40
2.3.23 Zirkulardichroismus (CD)	40
2.3.24 Guanidinium induzierte Denaturierungsübergänge	40
2.3.25 Fluoreszenzspektroskopie.....	40
2.3.26 <i>Differential Scanning-Calorimetrie</i> (DSC)	41
2.3.27 Quervernetzung von GLP-1 und nGLP-1R	41
2.3.28 Oberflächenplasmonresonanzmessungen	41
2.3.28.1 Peptidtitration	41
2.3.28.2 Rezeptorfragment-Titration	42
2.3.28.3 Konkurrenz der Bindung	42
2.3.28.4 Regenerationsprozedur der CM-5 Chip-Oberfläche	42
2.3.29 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	42
2.3.30 Analytische Ultrazentrifugation	43
2.3.31 N-terminale Proteinsequenzierung	43
2.3.32 Massenspektroskopie.....	44
2.3.33 Analyse der Disulfidverbrückung des nGLP-1R.....	44

3	Experimente und Ergebnisse	45
3.1	Herstellung der Expressionsklone	45
3.1.1	Klonierung des nGLP-1R	45
3.1.2	Klonierung des His-Liganden (p(GLP-1))	46
3.1.3	Klonierung der Rezeptor-Ligand-Chimäre (p(RL))	47
3.2	Proteinexpression	49
3.3	Renaturierung des nGLP-1R	50
3.3.1	Vorversuche	50
3.3.1.1	Auswahl der niedermolekularen Renaturierungspufferzusätze	50
3.3.1.2	Identifizierung der Elutionspeaks des denaturierten und nativen nGLP-1R mittels RP-HPLC	51
3.3.1.3	Quantifizierung der Renaturierungsausbeuten	52
3.3.2	Faltungsoptimierung der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors	53
3.3.2.1	Kinetik der Renaturierung des nGLP-1R	53
3.3.2.2	Einfluss von GSH und GSSG auf die Renaturierung des nGLP-1R	54
3.3.2.3	Einfluss von Arginin auf die Renaturierung des nGLP-1R	55
3.3.2.4	Abhängigkeit der Renaturierung des nGLP-1R vom pH-Wert	55
3.3.3	Renaturierung und Reinigung von nGLP-1R	56
3.4	Identität des rückgefalteten Proteins	58
3.5	Bestimmung der Disulfidverbrückung des nGLP-1R	59
3.6	Biophysikalische Charakterisierung des nGLP-1R	61
3.6.1	Sekundär- und Tertiärstruktur des nGLP-1R	61
3.6.2	Thermische Stabilität des nGLP-1R	64
3.6.3	Stabilität gegenüber Guanidinium	65
3.7	Zusammenfassung der Abschnitte 3.3-3.6	66
3.8	Untersuchungen der Ligandenbindungseigenschaften des nGLP-1R	66
3.8.1	Hinweise auf die Wechselwirkung zwischen der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors und seinem Liganden	66
3.8.1.1	Quervernetzungsexperimente zur Untersuchung der Wechselwirkung des nGLP-1R mit GLP-1	66
3.8.1.2	Bindungsnachweis mittels biotinyliertem Ligand	67
3.8.1.3	Ligandensäule	68
3.8.2	Quantitative Charakterisierung der Wechselwirkung der renaturierten Rezeptordomäne nGLP-1R mit GLP-1	69
3.8.2.1	Oberflächenplasmonresonanzmessungen	69
3.8.2.2	Bindung in Lösung	72
3.8.3	Salz-, Temperatur- und pH-Wert-Abhängigkeit der Wechselwirkung des nGLP-1R mit GLP-1	73
3.8.3.1	Argininabhängigkeit der Bindung	73
3.8.3.2	NaCl-Abhängigkeit der Bindung des nGLP-1R zu seinem Ligand	73
3.8.3.3	Temperatur-Abhängigkeit	74
3.8.3.4	pH-Wert Abhängigkeit der Interaktion des nGLP-1R mit seinem Ligand	75

3.8.4 Spektroskopische Charakterisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes aus nGLP-1R und GLP-1	75
3.8.5 Zusammenfassung des Abschnitts 3.8.....	77
3.9 Herstellung des GLP-1-8xHis	78
3.9.1 Spaltung des Peptids aus dem Fusionsprotein und anschließende Reinigung.....	78
3.9.2 Identität des hergestellten Peptids	79
3.9.3 Zusammenfassung des Abschnitts 3.9.....	79
3.10 Faltung, Reinigung und Charakterisierung des Fusionsproteins aus der N-terminalen Domäne des GLP-1 Rezeptors und dem GLP-1.....	80
3.10.1 Renaturierung und Reinigung der Rezeptor-Ligand-Chimäre	80
3.10.2 Identität und Homogenität der Rezeptor-Ligand-Chimäre.....	81
3.10.3 Biophysikalische Charakterisierung der Rezeptor-Ligand-Chimäre.....	82
3.10.4 Zusammenfassung des Abschnitts 3.10.....	84
4 Diskussion.....	85
4.1 Untersuchungen der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors	85
4.1.1 Expression und Renaturierung der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors	86
4.1.2 Ligandenbindung der isolierten N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors ...	91
4.2 Herstellung von rekombinantem GLP-1 und Untersuchungen am Fusionsprotein der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors mit GLP-1	96
4.2.1 Herstellung von rekombinantem GLP-1.....	96
4.2.2 Untersuchungen der Rezeptor-Ligand-Chimäre.....	97
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	100
6 Referenzen.....	101
7 Abkürzungen	116

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Die Existenz eines lebenden Organismus ist nur gewährleistet, wenn ein intensiver Austausch von Informationen von Zelle zu Zelle und von Zelle zu ihrer Umgebung gewährleistet ist. Im Laufe der Evolution entwickelte die Zelle komplexe Mechanismen für eine selektive Weiterleitung eines Signals wie Licht, Temperaturänderung, chemische oder elektrochemische Impulse ins Zellinnere. Diese Signalübertragung erfolgt in erster Linie über Rezeptormoleküle, die in die zellumgebende Membran eingebaut sind und nach Bindung extrazellulärer Signalmoleküle intrazelluläre Antwortreaktionen auslösen.

Die umfangreichste und weitverbreitete Klasse solcher Rezeptorproteine ist die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Sie umfasst mehr als 1000 integraler Membranproteine, die bei einer Vielzahl von Organismen, ausgehend von Einzellern wie *Saccharomyces cerevisiae* über einfache Mehrzeller wie *Dictyostelium discoideum* bis hin zu Säugern, eine essentielle Rolle bei wichtigen biologischen Prozessen spielen. Allein bei *Caenorhabditis elegans* kodieren 4 % aller Gene für GPCRs (Gershengorn & Osman, 2001). Als erster Vertreter dieser Klasse wurde der β -adrenerge Rezeptor in den siebziger Jahren entdeckt (Welton *et al.*, 1977; Insel *et al.*, 1976) und im Jahre 1983 wurde die erste Gensequenz eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, des Rinderopsins, bekannt gegeben (Nathans & Hogness, 1983). Seitdem wächst die Anzahl bekannter G-Protein gekoppelter Rezeptoren stetig.

Eine Vielzahl von Krankheiten wird mit Mutationen in Genen für GPCRs und damit verbundenen Funktionsstörungen dieser Rezeptoren assoziiert. Eine Mutation im Gen des Endothelin-B Rezeptors führt zu der sogenannten Hirschsprung Krankheit, die vor allem bei Jungen mit einer Dickdarterweiterung mit schweren Passagestörungen zusammenhängt (Puffenberger *et al.*, 1994). Eine Mutation im Rhodopsinogen verursacht die autosomal dominant vererbte Krankheit *Retinitis Pigmentosa* (Macke *et al.*, 1993). Konstitutiv aktive Mutanten des Thyrotropin-Rezeptors stehen im Zusammenhang mit einer weiteren vererbten Form von Hyperthyreose, der gesteigerten Produktion und Sekretion von Schilddrüsenhormonen (Duprez *et al.*, 1994; Kopp *et al.*, 1995). Bei Patienten mit *Chondrodysplasia metaphysaria* Typ Jansen, deren Symptome Knochendeformitäten und Minderwuchs sind, wurden ebenfalls konstitutiv aktive Mutanten des Parathormonrezeptors identifiziert (Schipani *et al.*, 1995). Mehr als 30 % der zur Zeit in der klinischen Medizin eingesetzten Wirkstoffe wirken auf G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder auf Signalkaskaden, in denen diese Rezeptoren involviert sind (Gershengorn & Osman, 2001).

Daher stellen die Untersuchungen zur Struktur und Funktion dieser Rezeptoren und deren Wechselwirkungen mit den natürlichen Liganden wichtige Angriffspunkte bei der Entwicklung neuer therapeutischen Arzneimittel dar.

1.2 Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Wie der Name schon voraussagt, erfolgt die Signalübertragung bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren über deren Kopplung an heterotrimeren G-Proteine, die aus α -, β - und γ -Untereinheiten bestehen, und im nicht aktivierten Zustand einen Komplex mit Guanosin-Triphosphat (GTP) bilden. Nach Bindung eines Rezeptoragonisten (Liganden) kommt es zu Konformationsänderungen innerhalb des G-Proteins und zur Hydrolyse des GTP zu GDP und P_i (freiem Phosphat) an der α -Untereinheit. Es resultiert eine Dissoziation dieser Untereinheit von dem Rezeptor, wodurch verschiedene Effektorsysteme als *second messenger* aktiviert werden können. Zu diesen Effektorsystemen zählt auch die für die Signaltransduktion des GLP-1 verantwortliche Adenylatcyclase. Prinzipiell können auch andere Mediatoren wie Phospholipasen, Phosphodiesterasen und Ionenkanäle, welche eine metabolische oder ionische Änderung im Zellinneren bewirken, beeinflusst werden. Nach Aktivierung des *second messenger* Systems wird GDP wieder abgespalten und GTP bindet erneut an die α -Untereinheit, die so wieder einen Komplex mit der β - und γ -Untereinheit eingeht (Abb. 1).

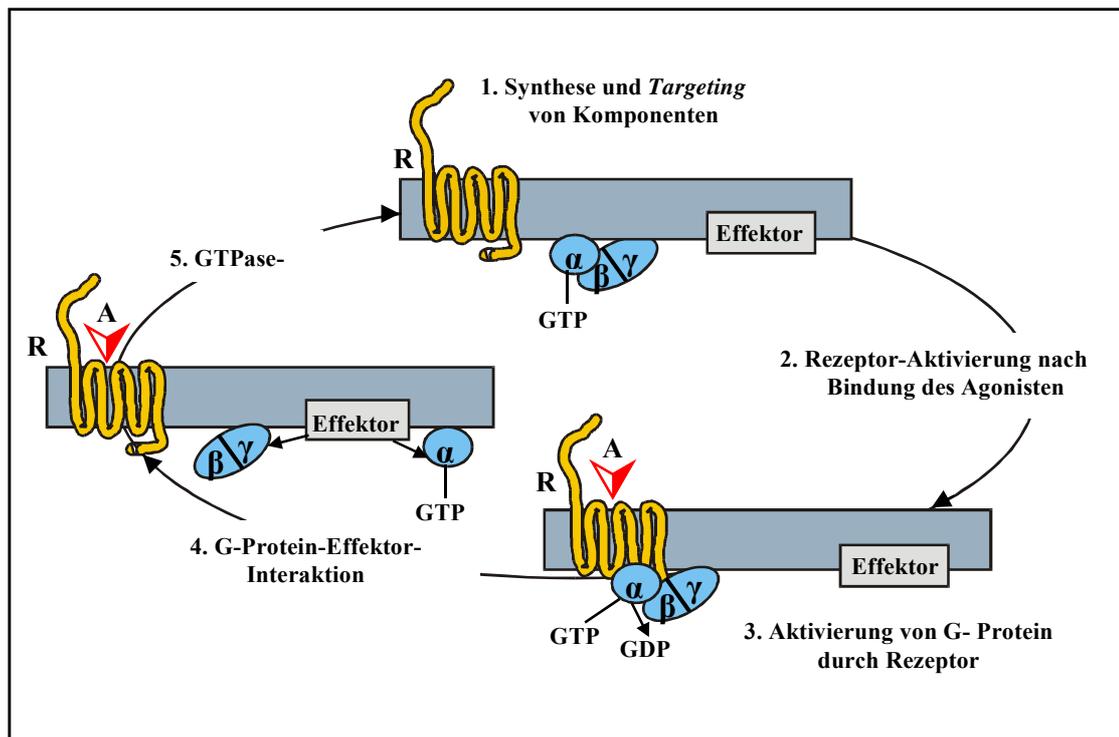


Abbildung 1. Signalübertragung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren. R: Rezeptor; A: Agonist (nach Spiegel, 2000)

Zusätzlich zu dieser Hauptform der Signalübertragung über G-Proteine wurden für einige Rezeptoren andere Kaskaden über alternative Signalmoleküle wie Jak2 Kinase (Ali *et al.*, 1997), Phospholipase C γ (Marrero, 1998), Arrestin (Lefkowitz, 1998) oder Protein-Kinase C (Minakami *et al.*, 1997) beschrieben.

Ungeachtet der Vielfältigkeit ihrer gebundenen Signalmoleküle (Liganden) weisen alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren (im weiteren als GPCRs bezeichnet) eine ähnliche strukturelle Architektur

auf. Die Rezeptoren setzen sich aus einer extrazellulären N-terminalen Domäne, sieben Transmembranhelizes, drei Exoloops, drei Cytoloops und einem C-terminalen intrazellulären Segment zusammen. Ein weiterer vierter Loop wird bei α - und β -adrenergen Rezeptoren durch Palmitoylierung einer Cysteinkette in der C-terminalen Domäne ausgebildet (Kennedy & Limbird, 1993; o'Dowd *et al.*, 1989). Die Gesamtgröße der Rezeptoren und die Längen der N-terminalen Segmente (7-595 Aminosäuren), der Loopbereiche (5-230 Aminosäuren) und der C-terminalen Domänen (12-359 Aminosäuren) sind sehr variabel. Im Gegensatz zu dieser Variabilität besteht jeder der sieben Transmembranhelizes aus 20-27 Aminosäuren.

Aufgrund der strukturellen Analogie der GPCRs besteht eine evolutionäre Verwandtschaft, die sich aus den sensorischen Rezeptoren einzelliger Vorfahren ableitet. Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren unterteilt man in 6 Hauptklassen (Kolakowski, 1994), wobei Gruppen A, B und C bei *Metazoa* vorkommen und die restlichen Rezeptoren bei Pilzen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Ustilgo maydis* und bei Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* zu finden sind (Abb. 2).

Die Gruppe A ist die umfangreichste Rezeptorfamilie und umfasst Rezeptoren wie Rhodopsin, Chemokin-Rezeptoren, Protease-Rezeptoren, Monoaminrezeptoren, usw. Charakteristisch für diese Rezeptoren sind eine hochglykolytierte N-terminale Domäne und eine Anzahl von konservierten polaren Aminosäureresten in den Transmembranbereichen, die höchstwahrscheinlich ein System von strukturstabilisierenden Wasserstoffbrücken ausbilden oder an der Signaltransduktion beteiligt sind (Beck-Sickinger, 1996; Gether *et al.*, 1997).

Die Gruppe C der G-Protein gekoppelten Rezeptoren umfasst eine geringe Anzahl von Mitglieder, unter anderem den metabotropen Glutamatrezeptor, GABA_B-Rezeptoren, das Humane RAI3-Gen Produkt und den Kalzium-Sensor des Parathormonrezeptors. Diese Rezeptoren besitzen eine extrem lange N-terminale Domäne bestehend aus 500-600 Aminosäureresten, die einer Familie bakterieller periplasmatischer Bindeproteine sehr ähneln (Beck-Sickinger, 1996; Narmar, 2001).

Die Familie B der GPCRs wird im folgenden ausführlicher vorgestellt.

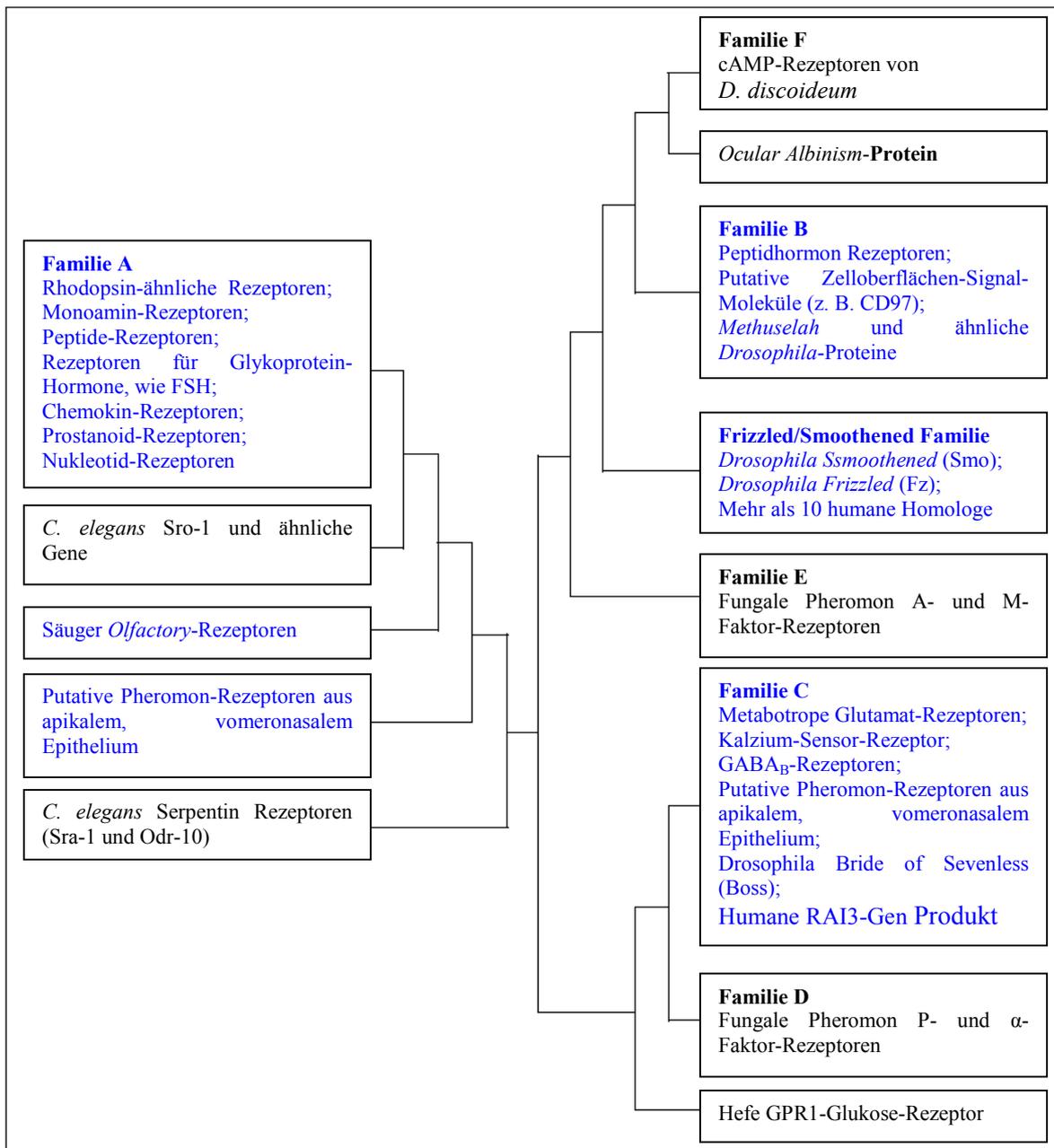


Abbildung 2: Verwandtschaftsverhältnis innerhalb der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, basierend auf den Analysen von Graul & Sadee. Die Familien mit Mitgliedern, die bei Säugertieren vorkommen, sind in **blau** dargestellt (entnommen aus Harmar, 2001; modifiziert).

Während für G-Proteine genügend Strukturdaten mit hoher Auflösung beschrieben sind (Lambright *et al.*, 1996; Sprang, 1997), waren für GPCRs bis vor kurzem keine hochauflösenden Strukturdaten zugänglich. Es gab Strukturen niedriger Auflösung des Rhodopsins, die mittels Elektronenmikroskopie ermittelt wurden (Schertler *et al.*, 1993; Unger *et al.*, 1997; Schertler, 1999), aus denen man die Anordnung der 7 Helizes ermitteln konnte. Die sieben Transmembranhelizes sind in Aufsicht zur Zelloberfläche entgegen dem Urzeigersinn gerichteter Orientierung angeordnet genauso wie die sieben Helizes der bakteriellen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin. Bakteriorhodopsin, dessen

hochauflösende Strukturaufklärung schon veröffentlicht wurde, diente als Vorlage für die meisten Strukturvorhersagen für GPCRs (Pebay-Peyrouda *et al.*, 1997). Erst im Jahre 2000 konnte die erste Kristallstruktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors Rhodopsins mit 2,8 Angstrom-Auflösung erhalten werden (Palczewski *et al.*, 2000) (Abb. 3)

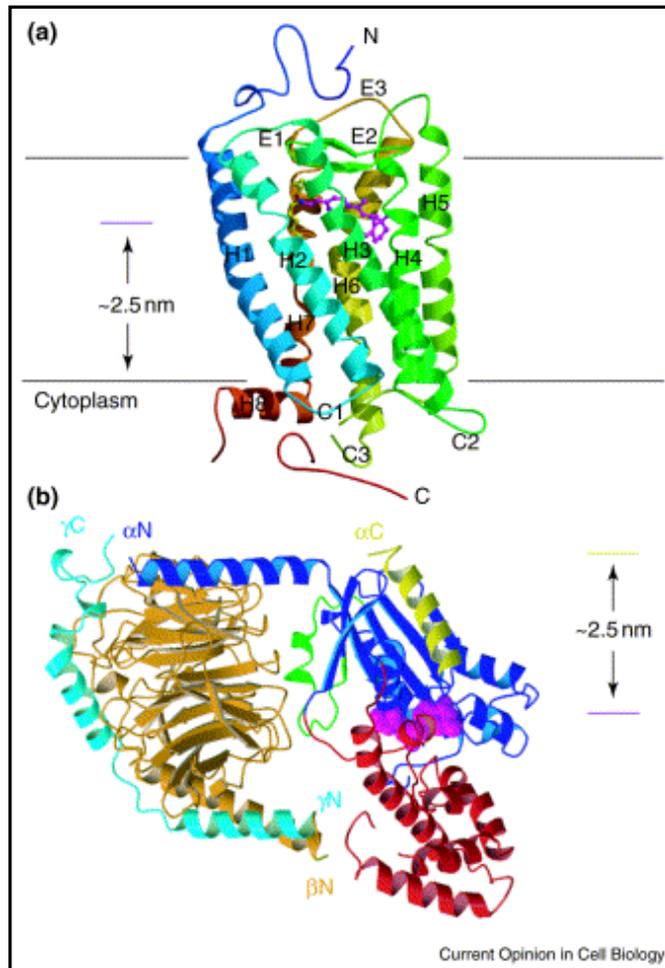


Abbildung 3. Interaktion von Rhodopsin mit Transducin auf der cytoplasmatischen Oberfläche der Membran.

(a) Strukturmodell des Rhodopsins nach der Kristallstruktur (PDB 1f88). H1-H7 sind die charakteristischen 7 Transmembranhelizes. Die Kristallstruktur konnte einen kleinen Bereich im cytoplasmatischen Loop 3, das die Helix 5 mit Helix 6 verbindet, und einen langen Segment im carboxyterminalen Bereich der Helix 8 nicht auflösen. Glykosylierungen und Palmitoylierungsgruppen wurden nicht dargestellt. Die Schiff'sche Base des Chromophors ist in einem Abstand von 2,5 nm von der cytoplasmatischen Membran entfernt.

(b) GDP-gebundene Form des Transducins (PDB 1got), mit der Oberfläche, die mit Rhodopsin interagiert, nach oben gerichtet. In **blau**: Ras-ähnliche Domäne der α-Untereinheit; in **rot**: helikale Domäne der α-Untereinheit; in **gelb**: α5-Helix; in **grün**: Switch II Region der α-Untereinheit; in **gold**: die β-Untereinheit; in **türkis**: die γ-Untereinheit; in **magenta**: das gebundene GDP-Molekül.

(entnommen aus Sakmar, 2002)

Eine der wichtigen Aussagen aus der Kristallstruktur des Rhodopsins war das Vorhandensein und die Position eines β-Stranges (Ser186-Cys187-Gly188-Ile189) innerhalb des extrazellulären Loops 2. Dieses Strukturelement läuft entlang der Polyen-Kette des gebundenen Chromophors (Ligand des Rhodopsins), was multiple Kontakte zwischen dem Rezeptor und Ligand ermöglichen würde. Und es wird vermutet, dass die Funktion dieses β-Stranges in der Stabilisierung des aktiven Zustands des Rezeptors liegen könnte (Sakmar, 2002). Wenn das der Fall wäre, könnte der extrazelluläre Loop 2 der anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren ebenfalls in der Vermittlung der Kontakte mit den Liganden beteiligt sein. Solche Interaktion der extrazellulären Loopbereiche wurden bis jetzt für Rhodopsin und Rhodopsin-ähnliche-Rezeptoren nicht detektiert. Lediglich für Neuropeptid- und Peptidhormon-Rezeptoren ist eine Wechselwirkung der extrazellulären Bereiche mit deren Liganden beschrieben (Bergwitz *et al.*, 1996; Perlman *et al.*, 1997; Cotte *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1997). Die Struktur auf der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins insbesondere im Bereich der cytoplasmatischen Loops 2 und 3 konnte nicht so gut aufgelöst werden. Die wichtigste Charakteristik

der Rhodopsin-Struktur in diesem Bereich ist das Vorhandensein einer apparenten, kationischen amphipatischen Helix 8 (H8), die am Ende der Transmembranhelix 7 am Asn310 beginnt und parallel zur Membranebene verläuft. Diese Helix 8 ermöglicht wahrscheinlich eine Interaktion des Rhodopsins mit spezifischen Phospholipidmolekülen der Membran (Beck *et al.*, 1998; Isele *et al.*, 2000). Ein anderer interessanter Punkt ist, dass die Disposition der Helix 8 zu einer Erweiterung der funktionellen Oberfläche des Rezeptors bei der Wechselwirkung mit seinem G-Protein, Transducin, führt. Transducin würde demnach in einem bimolekularen Komplex zwischen den cytoplasmatischen Loopbereichen 2 und 3 und der Helix 8 binden, wobei die carboxyterminale Bereiche seiner α - und γ -Untereinheit in der Interaktion beteiligt sind (Kisselev, 1999; Marin *et al.*, 2001).

1.3 Familie B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Die Familie B der GPCRs stellt eine relativ kleine, aber strukturell und funktionell vielfältige Gruppe von Proteinen dar, die Peptidhormon-Rezeptoren und Gruppe von *Drosophila* Proteinen, die Stressantwort und Lebensdauer regulieren, einschließt. Familie B Rezeptoren wurden bei Säugern, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* identifiziert (Harmar, 2001). Im Jahre 1991 wurde der Sekretin-Rezeptor kloniert und aufgrund der sieben Transmembranhelizes den GPCRs zugeordnet (Ishihara *et al.*, 1991). Allerdings wies die Aminosäuresequenz des Rezeptors sehr große Differenzen zu anderen zu der Zeit identifizierten G-Protein gekoppelten Rezeptoren auf. Aus diesem Grund wurde der Sekretin-Rezeptor als der Prototyp einer neuen Familie, Familie B, definiert (Kolakowski, 1994). Seit 1991 wurden 33 humane Gene, 18 *Drosophila*- und 6 *Caenorhabditis elegans*-Gene identifiziert, die für Klasse B G-Protein gekoppelte Rezeptoren kodieren. Gene für Familie B Rezeptoren liegen auf über 13 humanen Chromosomen verteilt vor. Manche Gene sind so nah beieinander angeordnet, was eine Entstehung dieser Proteine durch Gen-Duplikationen im Laufe der Evolution vermuten lässt. Beispielweise liegen Gene für CD97, EMR2, EMR3 und Latrotoxin-Rezeptor CL-1 innerhalb einer 700 kb-Region auf dem Chromosom 19p13.13, und die Gene für CRF2-Rezeptor, GHRH-Rezeptor und PAC1-Rezeptor innerhalb einer nur 450 kb-Region auf dem Chromosom 7p14.3.

Die Familie B wird in 3 Unterklassen B1, B2 und B3 unterteilt (Abb. 4).

Unterfamilie B1 Rezeptoren binden Peptidhormone von 27-141 Aminosäureresten. Zu denen gehören solche Rezeptoren wie Sekretin-Rezeptor, PTH-Rezeptor, GLP-1 Rezeptor, Glukagon-Rezeptor usw. Diese zeichnen sich durch eine große extrazelluläre N-terminale Domäne (100-170 Aminosäuren) aus, die eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung spielt und viele konservierte Reste besitzt, unter anderem sechs Cysteinreste, zwei hochkonservierte Tryptophanreste und ein höchstwahrscheinlich für die Ligandenbindung essentielles Asparaginrest (Harmar, 2001; Dautzenberg *et al.*, 1999). Neun von solchen Säuger-Rezeptoren binden Peptide (Glukagon, GLP-1, GLP-2, GIP, VIP, PACAP und CHRH), die sich strukturell ebenfalls sehr ähneln. Alle Vertreter dieser Unterklasse regulieren den intrazellulären cAMP-Spiegel durch Kopplung an G-Protein G_s . Manche sind aber in der Lage zur

Signalübertragung durch Aktivierung der Phospholipase C. Einige dieser Rezeptoren weisen eine Agonist-unabhängige (konstitutive) Aktivität in ihrer Wildtyp-Form auf. Dazu kommen auch die konstitutiv aktive Rezeptoren, die durch zufällige Mutationen in Genen entstehen, wie die konstitutiv aktive Mutanten des GIP-Rezeptors, die durch eine Punktmutation eines Threoninrestes in der Transmembranhelix 6 entstehen, oder des VPAC1-Rezeptors, die durch eine Punktmutation eines Histidinrestes im Bereich zwischen dem intrazellulären Loop 1 und der Transmembranhelix 2 entstehen (Tseng & Lin, 1997; Gaudin *et al.*, 1998).

Unterfamilie B2 Rezeptoren werden auch LNB-TM7-Proteine (*long amino terminus familie B*) genannt (Stacey *et al.*, 2000). Die ersten Vertreter dieser Unterfamilie sind EMR1 (*EGF-module-containing, mucin-like hormone receptor*), der aus einer humanen neuroektodermalen cDNA-Bibliothek isoliert wurde, und das Zelloberflächenantigen CD97 von Leukozyten (Baud *et al.*, 1995; Hamann *et al.*, 1995). All diese Proteine sind bei der Aktivierung des Immunsystems hochexprimiert. Weitere Vertreter dieser Unterklasse von Rezeptoren sind der kalziumunabhängige Latrotoxin-Rezeptor und gehirnspezifische Angiogenese-Inhibitoren 1, 2 und 3. Die meisten dieser Rezeptoren besitzen die sogenannte *Mucin*-ähnliche Region, die reich an Serin- und Threoninresten ist, und eine konservierte, cysteinreiche Proteolysis-Domäne (*Cys box*). Für Latrotoxin-CL1-Rezeptor und CD97 ist bekannt, dass über diese Proteolysis-Domäne eine Abspaltung der Proteine in zwei Untereinheiten erfolgt, die für die Funktion dieser Rezeptoren wichtig scheint. Die biologische Funktion der meisten Gruppe B2 Rezeptoren ist noch nicht aufgeklärt, nur deren Vorkommen lässt ihre Beteiligung im Nervensystem oder Immunsystem vermuten.

Der Prototyp der Unterfamilie B3 ist das sogenannte *Methuselah* (*mth*)-Gen, das bei der Suche nach einer Genmutation, die eine Verlängerung der Lebensdauer von *D. melanogaster* verursacht, identifiziert wurde (Lin *et al.*, 1998). Dieses Gen kodiert für einen Polypeptid, die Sequenzhomologie zu anderen Familie B Rezeptoren ausschließlich innerhalb der Transmembranhelizes aufweist. Es wurden bis jetzt keine *Methuselah*-Homologe bei Menschen oder bei *C. elegans* identifiziert.

Analog zu den Mitgliedern der Klasse A der G-Protein gekoppelten Rezeptoren besitzen Klasse B Rezeptoren zwei konservierte Cysteine in extrazellulären Loops 1 und 2 (Palczewski *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu vielen Familie A-Rezeptoren, die hydrophobe Sequenzen für eine Translokation in der Plasmamembran aufweisen, besitzen die meisten Klasse B Mitglieder eine N-terminale Signalsequenz. Die schon oben erwähnte Hormonbindungsdomäne von Gruppe B1-Rezeptoren ist bei ca. 50 % der Gruppe B2-Rezeptoren zu finden.

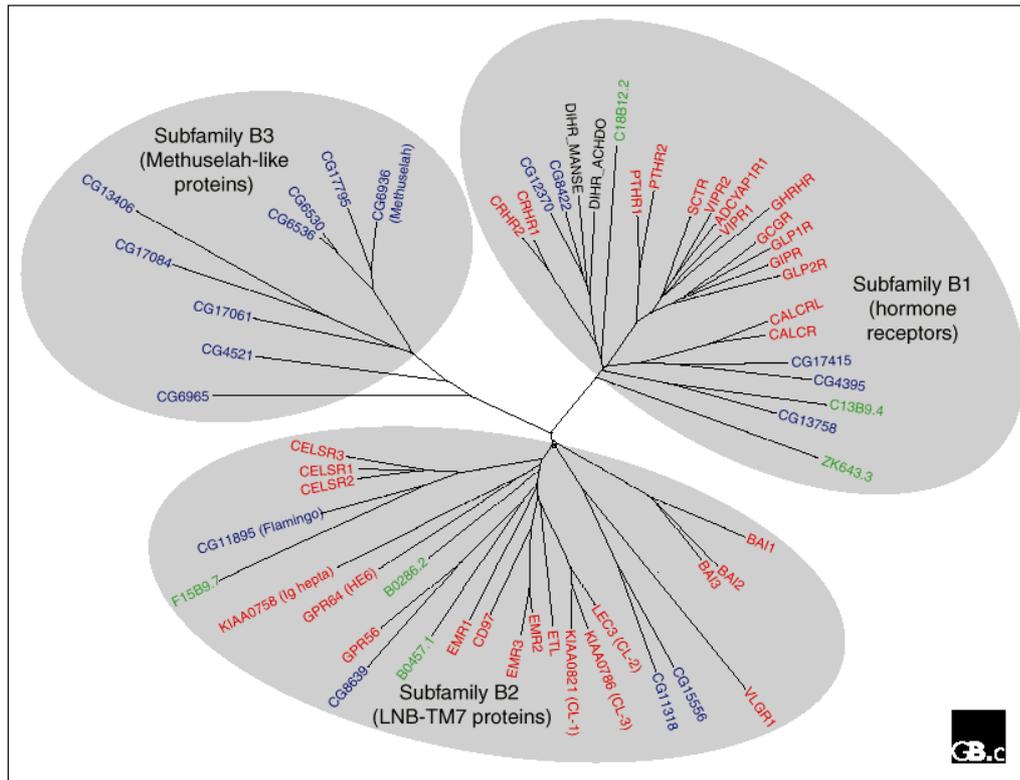


Abbildung 4. Phylogenetischer Stammbaum der Familie B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (entnommen aus Harmar, 2001). Humane Gene sind in **rot**, *Drosophila*-Gene in **blau** und *C. elegans*-Gene in **grün** dargestellt. Die Namen der Gene entsprechen der Nomenklatur von HUGO-Datenbank, *Celebra Publikation Site* und *WormBase*.

1.4 GLP-1 Rezeptor

Spezifische Rezeptoren für GLP-1 wurden erstmals 1988 auf RINm5F-Zellen gefunden und später auch auf weiteren Insulinom-Zelllinien und Plasmamembranen menschlicher Insulinomzellen nachgewiesen (Göke & Conlon, 1988; Gallwitz *et al.*, 1993; Lankat-Buttgereit *et al.*, 1994). Die Klonierung der cDNA des menschlichen GLP-1 Rezeptors zeigte, dass das für den Rezeptor kodierende Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert ist und aus mehreren Exons und Introns aufgebaut ist (Bell *et al.*, 1983; Stoffel *et al.*, 1993). Durch Northern-Blot Analysen mit GLP-1 Rezeptor cDNA ließen sich mehrere mRNA-Spezies nachweisen, die möglicherweise auf ein gewebsspezifisches RNA-*splicing* hinweisen (Lankat-Buttgereit *et al.*, 1994). Durch Translation der mRNA entsteht ein aus 463 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 63 kDa (Göke & Conlon, 1988; Thorens, 1992; Graziano *et al.*, 1993; Dillon *et al.*, 1993; Van Eyll *et al.*, 1994). Wie schon vorher erwähnt, gehört der GLP-1 Rezeptor zur Familie B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die GLP-1 Rezeptoren von Mensch und Ratte sind zu über 90 % homolog mit nur 44 Aminosäureaustauschen (Van Eyll *et al.*, 1994).

Die Expression des GLP-1 Rezeptors konnte in verschiedenen Geweben des Magen-Darm-Traktes und im Hypothalamus nachgewiesen werden (Thorens *et al.*, 1993; Alvarez *et al.*, 1996).

Ebenfalls wurden die mRNAs des Rezeptors in der Lunge, Leber, Muskelgewebe und in den Nieren detektiert (Göke *et al.*, 1996).

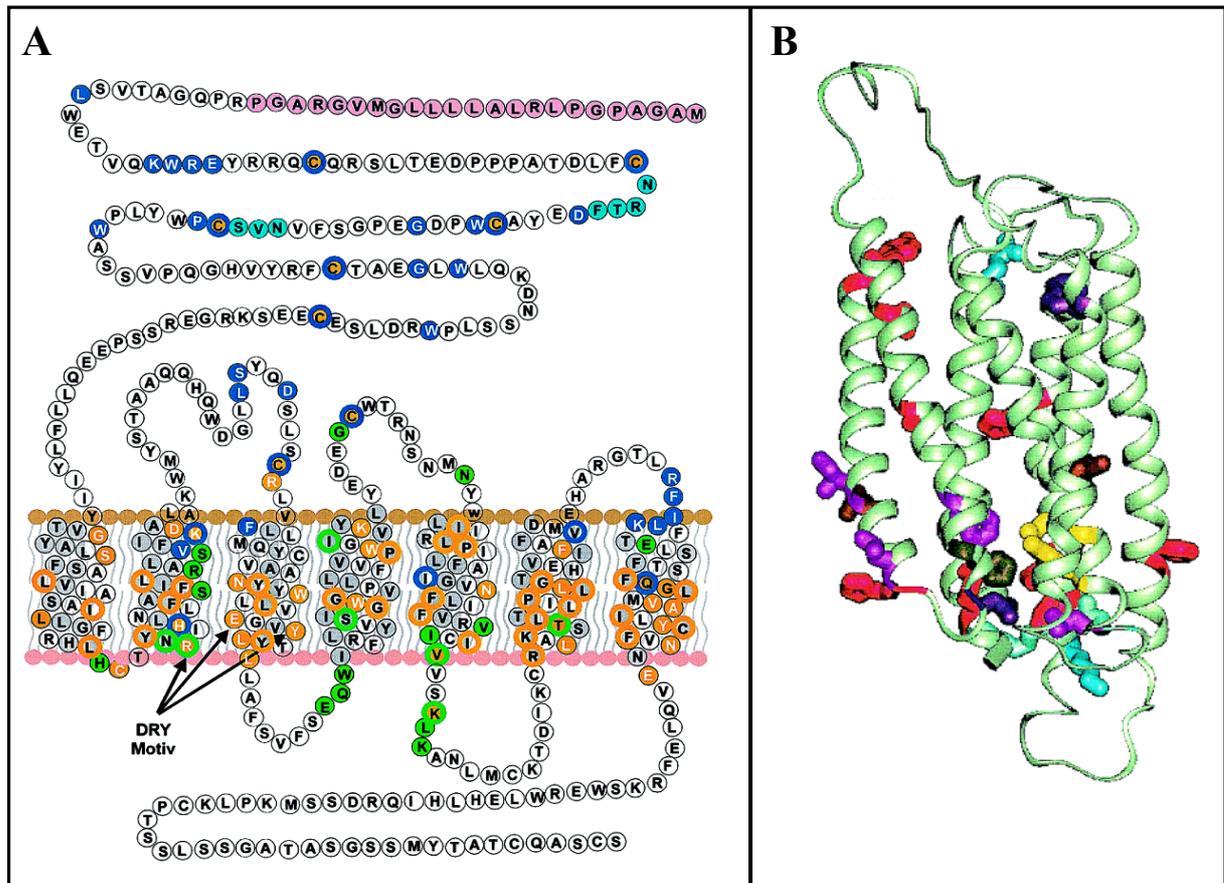


Abbildung: 5. (entnommen aus Frimurer & Bywater, 1999) **A**: Schematische Darstellung des GLP-1 Rezeptors. In **rosa**: Signal-Sequenz; in **orange**: konservierte Reste; in **blau**: möglicherweise in der Bindung beteiligte Reste; in **türkis**: Glykosylierungsstellen; in **grün**: in der Signalübertragung beteiligte Reste; in **grau**: Reste, die an die Lipidschicht der Membran angrenzen

B: Modell der strukturellen Anordnung von Transmembranhelices des GLP-1 Rezeptors ohne der N-terminalen Domäne. Das N-terminale Ende befindet sich oben, und das Molekül ist orthogonal zur Membran angeordnet.

Die gewebsspezifische Expression der GLP-1 Rezeptoren wird durch einen Promotor vermittelt, dessen Sequenz mittlerweile bekannt ist und dessen Feinregulierung durch spezifische Transkriptionsfaktoren erreicht wird (Lankat-Buttgereit *et al.*, 1997; Galeshahi *et al.*, 1998; Wildhage, 1999). Abrahamsen & Nishimura berichteten über eine Inhibierung der Expression des Rezeptors durch Dexamethason und eine leichte Erhöhung der Expression durch Glukose nach Untersuchungen an Ratten Insel-Zellen (Abrahamsen & Nishimura, 1995). Eine Erhöhung des cAMP zeigte in diesem Falle keinen Effekt auf das Expressionsniveau des Rezeptors. Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie an Insulin-produzierenden RINm5F-Zellen gezeigt werden, dass Agenzien, die eine Erhöhung des cAMP-Spiegels bewirken, eine Senkung der Expression des GLP-1 Rezeptors verursachten, was allerdings mit der Desensibilisierung des Rezeptors zusammenhängen könnte (Göke *et al.*, 1996). In der Regulierung der GLP-1-Rezeptor-Expression vermutet man eines der Mechanismen der Regulierung der biologischen Aktivität von GLP-1.

1.5 *Glucagon-like Peptide-1*

1.5.1 Synthese und Sekretion von GLP-1

Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) entsteht durch posttranslationale Prozessierung des Proglukagonmoleküls. Das menschliche Glukagon-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert. Dieses 9,4 kb lange Gen enthält 5 Introns und 6 Exons und wird im Pankreas, Darm und Gehirn exprimiert (Fehmann *et al.*, 1995; Orskov, 1992; Tang-Christensen, 2001) Die posttranslationale Prozessierung des Moleküls unterscheidet sich gewebsspezifisch (Conlon, 1988).

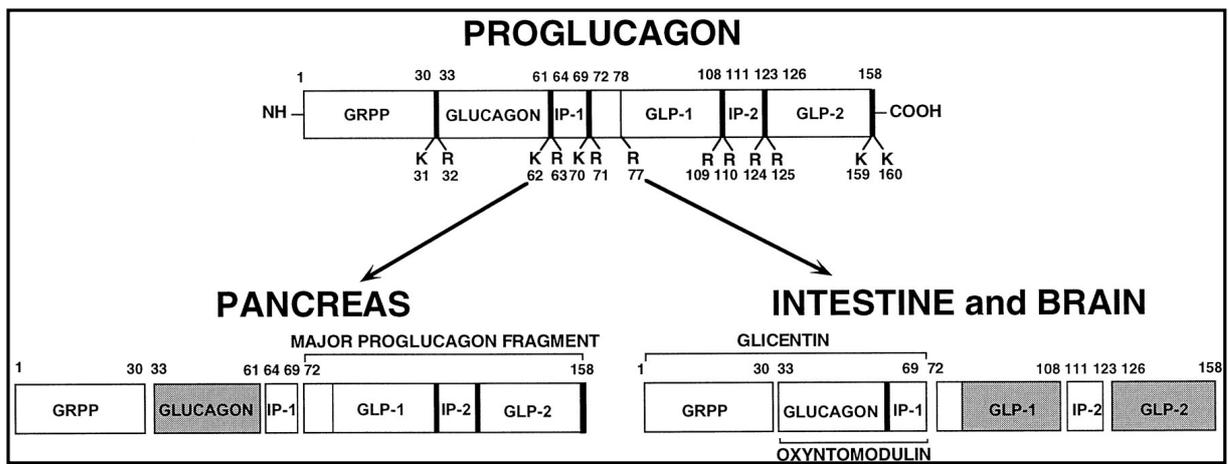


Abbildung 6: Gewebsspezifische Prozessierung des Proglukagonmoleküls (entnommen aus Kieffer & Habener, 1999)

So entstehen im Pankreas aus dem Prohormon *Glicentin-related Pancreatic Peptide* (1-30) (GRPP), Proglukagon (33-61), Proglukagon 64-69 und das Major Proglukagonfragment (72-158) (MPGF), welches die Sequenzen von GLP-1 und *Glucagon-like Peptide 2* (GLP-2) enthält. Das MPGF wird im Pankreas nicht weiter gespalten (Thim & Moody, 1982; Yanaihara *et al.*, 1985; Paetzelt & Schiltz, 1984). In den pankreatischen A-Zellen ist Glukagon das Hauptprodukt der Prozessierung des Proglukagonmoleküls, so dass das GLP-1 nur in minimalen Mengen freigesetzt wird (Holst, 1997).

Die Hauptmenge an GLP-1 wird von den L-Zellen des Dünndarms freigesetzt (Eissele *et al.*, 1992). In den L-Zellen des Darms und im Gehirn wird aus Proglukagon Glicentin (Proglukagon 1-69), GLP-1 (Proglukagon 72-108), *Intervening Peptide* (Proglukagon 111-123) und GLP-2 (Proglukagon 126-158) gebildet (Thim & Moody, 1981; Bataille *et al.*, 1982; Orskov *et al.*, 1986). Aus Glicentin entstehen später GRPP (Proglukagon 1-30) und Oxyntomodulin (Proglukagon 33-69). Die physiologische Funktion von Oxyntomodulin und Glicentin ist noch nicht aufgeklärt. Vom biologisch inaktiven GLP-1 (1-37) werden im weiteren Verlauf die 6 N-terminalen Aminosäuren abgespalten, so dass das biologisch aktive GLP-1(7-37) entsteht, das die prädominante Form im Darmgewebe darstellt (Orskov *et al.*, 1986). Zum Teil wird von diesem Molekül auch noch die C-terminale Aminosäure abgetrennt, und das entstandene GLP-1(7-36) wird am C-Terminus amidiert (Conlon, 1988).

Bei der Prozessierung in den L-Zellen wird über eine Beteiligung des Enzyms PC3 (*Proconvertase 3*) diskutiert. In den pankreatischen A-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass ein weiteres Enzym, die *Proconvertase 2* in dem Prozess involviert ist (Rouille *et al.*, 1995)

Die GLP-1 Freisetzung wird durch Nahrungsbestandteile stimuliert (Creutzfeldt & Nauck, 1992; Elliott *et al.*, 1993; Herrmann *et al.*, 1995; Rocca & Brubaker, 1999). Es wurde eine Zunahme der GLP-1 Konzentration in der Blutbahn nach der Nahrungszufuhr innerhalb von 15 Minuten beobachtet (Kreyman *et al.*, 1987). Bei näherer Untersuchung der Sekretion von GLP-1 durch Kohlenhydrate zeigte sich eine proportionale Abhängigkeit zur Zuckermenge. Eine orale Zugabe von Glukose führte direkt zur GLP-1 Freisetzung (Kreyman *et al.*, 1987; Miholic *et al.*, 1991; Ahren *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu konnte keine Stimulierung der GLP-1 Sekretion durch nicht absorbierende Zucker wie 2-Deoxy-Glukose erzielt werden (Sugiyama *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass die Nahrungsbestandteile die hormonalen und neuronalen Mediatoren der GLP-1 Sekretion stimulieren (Roberge & Brubaker, 1993; Roberge *et al.*, 1996). In den Ratten L-Zellen wurde eine Steigerung der GLP-1 Freisetzung durch Stimulierung mit GIP (*glucose-dependent-inhibitory polypeptide*), GRP (*gasrin-releasing peptide*) und Bethanechol und eine Inhibierung durch Somatostatin festgestellt (Brubaker, 1991). Ebenfalls ein positiver Einfluss von GRP und Neurokinin A auf die GLP-1 Sekretion wurde im Schweine-Ileum beobachtet (Holst, 1997). Außerdem wurde beschrieben, dass Galle, Gallensäuren im Ileum und intravenös appliziertes Arginin den messbaren GLP-1 Spiegel ebenfalls erhöhen (Ohneda *et al.*, 1991; Dumoulin *et al.*, 1995). Über die Unterregulierung der GLP-1 Freisetzung ist im Moment relativ wenig bekannt. So wurde nur Somatostatin-28 als inhibierend auf die GLP-1 Sekretion beschrieben (Hansen *et al.*, 2000). Es wird über eine potentielle Rolle von Insulin als Inhibitor der GLP-1 Synthese und Sekretion diskutiert. So zeigte sich eine Abnahme der in der Blutbahn zirkulierenden *Proglucagon-derived-Peptide* (GLP-1, GLP-2 und Glukagon) bei der Behandlung von Ratten mit Diabetes mit Insulin (Fischer *et al.*, 1997).

Die Plasmakonzentrationen von GLP-1, GLP-2 und den weiteren Spaltprodukten von Proglukagon unterscheiden sich aufgrund der verschiedenen Halbwertszeiten sehr stark. Der basale Plasmaspiegel von GLP-1 beträgt 1,4-2,2 pmol/L (Herrmann *et al.*, 1995). Dieser Wert steigt nach der Nahrungsaufnahme auf 20-30 pmol/L (Miholic *et al.*, 1991; Ahren *et al.*, 1997).

GLP-1 zeigt sehr hohe Homologie zu GLP-2 und Glukagon. Von den 30 Aminosäuren des GLP-1(7-37) sind 14 identisch mit der Sequenz des Glukagons. Die Aminosäuresequenz des GLP-1 ist in verschiedenen Säugertieren wie Mensch, Ratte, Schwein, Rind usw. zu 100% identisch und zeigt sehr hohe Homologie zu GLP-1 bei anderen niederen Vertebraten (Orskov, 1994). Diese strikte Konservierung einer Peptidsequenz im Verlauf der Evolution deutet auf eine wichtige biologische Funktion hin.

1.5.2 Biologische Wirkung von GLP-1

Die wichtigste Funktion von GLP-1, die Bewirkung der Insulinfreisetzung, und dass dieser Effekt glukoseabhängig ist, wurde bereits 1985 beschrieben (Schmidt *et al.*, 1985). Zwischenzeitlich konnte der insulinotrophe Effekt von GLP-1 in zahlreichen weiteren Versuchen bestätigt werden (Holst *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1989; Göke *et al.*, 1993) (Abb.8). Die Insulin-freisetzende Wirkung von GLP-1 ist von der Blutglukosekonzentration abhängig (Göke *et al.*, 1993), so dass die exogene Zufuhr von GLP-1 keine Hypoglykämie induzieren kann. Diese Tatsache zeichnet GLP-1 als einen potenziellen Einsatzstoff zur Behandlung von Typ-II-Diabetes (*Non-Insulin-Dependent-Diabetes-Mellitus* (NIDDM)) aus. Bei manchen Patienten mit Typ-II-Diabetes wurde eine verringerte Sekretion von GLP-1 als bei normalen Probanden beobachtet, was auch eine mögliche Rolle des Peptids in der Pathogenese der Krankheit vermuten lässt (Lugari *et al.*, 2000).

Neben der direkten Verstärkung der Insulin Freisetzung bewirkt GLP-1 eine Sensibilisierung der teilweise glukoseunsensitiv vorliegenden β -Zellen auf Glukose, so dass insgesamt mehr β -Zellen Insulin sezernieren (Fehmann *et al.*, 1991; Holz *et al.*, 1993). Außerdem fällt die Reaktion bereits Glukose-sensibler β -Zellen auf den Glukosereiz nach GLP-1-Exposition deutlich stärker aus (Göke *et al.*, 2002).

Durch eine direkte Erhöhung der Gentranskription des Proinsulins kommt es zu einer verstärkten Expression des Insulingens in β -Zellen (Fehmann *et al.*, 1994) (Abb. 8), was an isolierten Rattenpankreas und isolierten Inselzellen zudem zu einer Verminderung der Glukagonsekretion führte (Holst & Orskov, 1994).

Bei Ratten wurde eine Wirkung des GLP-1 gegen altersbedingte Senkung der β -Zellfunktionalität beobachtet (Wang *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999). Zusätzlich wird GLP-1 als ein Differenzierungsfaktor für pankreatische Gangzellen beschrieben, die sich in Insulin-produzierende Inselzellen verändern (Hui *et al.*, 2001). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass die Glukagon-produzierenden α -Zellen des menschlichen Pankreas unter einer tonisch-inhibitorischen Kontrolle von GLP-1 stehen (Schirra *et al.*, 1998). Am Schweine- und Rattenpankreas ist GLP-1 ein Stimulator der Somastatinfreisetzung (Fehmann & Habener, 1991b; Gros *et al.*, 1992; Schmid *et al.*, 1990; Orskov *et al.*, 1988). Somit beeinflusst GLP-1 zahlreiche Funktionen der β - und α -Zellen im Pankreas.

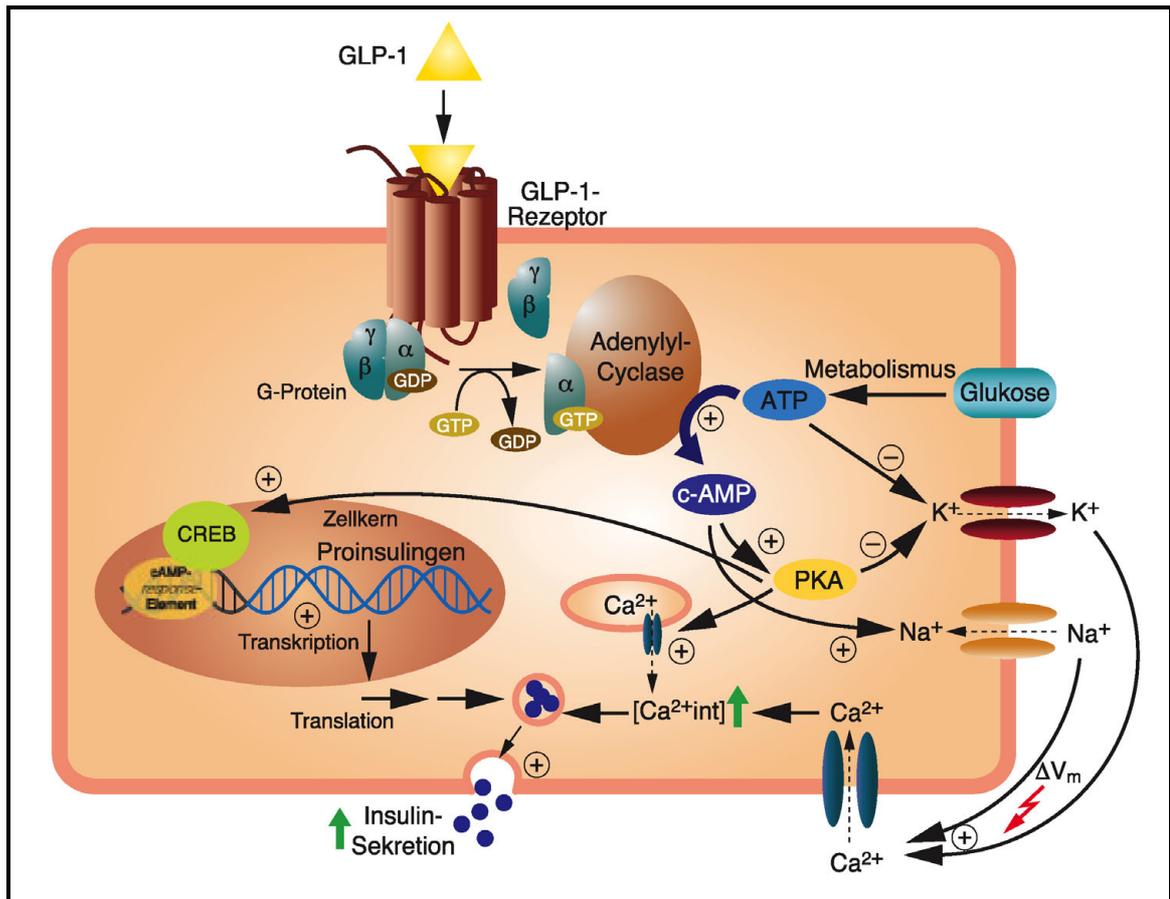


Abbildung 7. Signaltransduktion von GLP-1 zur Freisetzung von Insulin und zur Erhöhung der Expression des Proinsulins (entnommen aus Göke *et al.*, 2002). Der molekulare Mechanismus für die Insulin-Freisetzung besteht darin, dass durch Bindung von GLP-1 an seinen Rezeptor eine Interaktion des Rezeptors mit einem G-Protein und daraus folgende Aktivierung der Adenylat-Cyclase stattfindet. Gesteigerte Konzentrationen an cAMP verursachen eine Schließung der ATP-abhängigen Kalium-Kanäle und Aktivierung von unspezifischen Kationenkanälen, die zu einer Membrandepolarisation führen. Vermittelt wird diese Wirkung durch die Aktivierung der Proteinkinase A. Durch die Depolarisation erfolgt ein Kalzium-Einstrom in die Zellen, was die Exozytose von Insulingranula stimuliert.

Die Stimulierung der Genexpression von Proinsulin durch GLP-1 erfolgt wieder durch cAMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Die cAMP bindet zur regulatorischen Untereinheit R von PKA, was zu einer Freisetzung von der katalytischen Untereinheit C des PKA führt. Die aktive Kinase phosphoryliert und aktiviert dadurch den Transkriptionsaktivator CREB im Nucleus, der an CRE im Promotorbereich des Proinsulins gebunden vorliegt. Diese Kaskade resultiert in der Stimulierung der Transkription des Proinsulins (Habener, 1996).

Neben der Funktion des endokrinen Pankreas beeinflusst GLP-1 auch eine Magenentleerung und die Motilität des oberen Dünndarms (Schirra *et al.*, 1997; Schirra *et al.*, 2000). Die Magenentleerung und die Säuresekretion werden gehemmt. Die Ursache ist möglicherweise die durch GLP-1-induzierte vagale Hemmung. Die Rezeptoren von GLP-1 werden in den Membranen von Ratten-Lungen und in der vaskulären glatten Muskulatur stark exprimiert (Kieffer & Habener, 1999). Eine Behandlung von Ratten-Tracheen und *Pulmonary*-Arterien mit GLP-1 führte zur Inhibierung der Schleim-Sekretion und zur Relaxation der glatten Muskulatur (Richter *et al.*, 1993). Eine lokale Produktion von Proglukagon in der Lunge wurde bis jetzt nicht nachgewiesen und die Funktion von GLP-1 in diesem

Organ ist noch nicht aufgeklärt. Es wird eine Rolle von GLP-1 in der Glykogenese sowohl in der Lunge als auch im Muskelgewebe diskutiert.

Weiterhin wurde mehrmals über die sogenannte anabolische (glykogene und lipogene) Wirkung von GLP-1 in der Leber, Skelettmuskelgewebe und Fettzellen berichtet (Valverde *et al.*, 1994; Egan *et al.*, 1994; Perea *et al.*, 1995; Mizuno *et al.*, 1997; Morales *et al.*, 1997)

Die am meisten überraschende Funktion von GLP-1 ist eine beobachtete Inhibierung der Nahrungs- und Wasseraufnahme und Appetitminderung bei Säugern, wie Menschen, Ratten und Hunden (Toft-Nielsen *et al.*, 1999). Diese Funktion ist auf die Anwesenheit des GLP-1 Rezeptors im Hypothalamus und die lokale Produktion und Prozessierung von Proglukagon im Gehirn zurückzuführen (Turton *et al.*, 1996; Zander *et al.*, 2001; Kreymann *et al.*, 1989; Larsen *et al.*, 1997; Blanche *et al.*, 1988; Yoshimoto *et al.*, 1989). Der eigentliche Mechanismus dieser Wirkungen von GLP-1 ist noch nicht aufgeklärt.

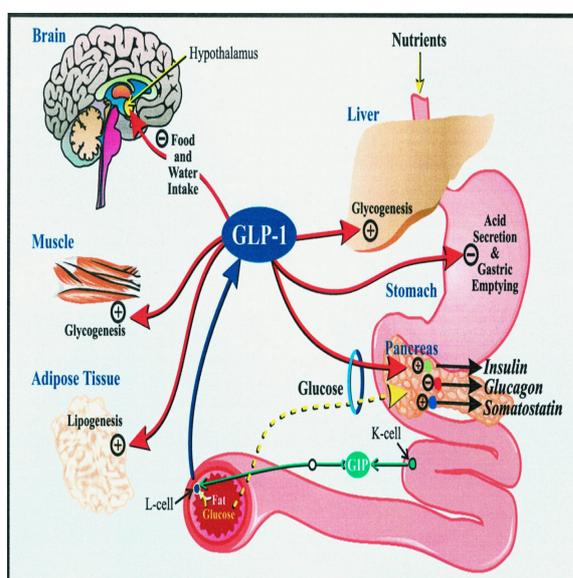


Abbildung 8: Zusammenfassung aller bis jetzt bekannten Funktionen des GLP-1 (entnommen aus Kieffer & Habener, 1999)

1.5.3 GLP-1 Metabolismus und Pathophysiologie

Die bisher verfügbaren Daten über die Halbwertszeit von GLP-1 zeigen eine relativ große Schwankungsbreite. Buckley und Lundquist (1992) berichteten von einer Halbwertszeit des 1 nM GLP-1(7-37) von weniger als 30 Minuten in frischem Humanplasma bei 37 °C. Demgegenüber wurden durch Orskov *et al.* (1993) Werte von $5,3 \pm 0,4$ Minuten für GLP-1(7-37) und $6,1 \pm 0,8$ Minuten für GLP-1(7-36amid) gemessen.

Das postsekretorische Schicksal von GLP-1 wird intensiv untersucht. Buckley und Lundquist (1992) berichteten als erste über einen Abbau von GLP-1(7-37) zu GLP-1(9-37) in frischem Humanplasma durch Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV). DPP IV spaltet Peptide, die an zweiter Stelle ein Prolin oder Alanin besitzen. Mentlein *et al.* konnten eine Abspaltung von GLP-1 von His-Ala durch eine aus

Plazenta aufgereinigte DPP IV beobachten (Mentlein *et al.*, 1993). Untersuchungen der letzten Jahre bestätigten, dass GLP-1 bevorzugt durch DPP IV gespalten wird. Als Spaltprodukte entstehen biologisch inaktive GLP-1(9-36amid) und GLP-1(9-37) (Kieffer *et al.*, 1995; Deacon *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1999). Die nachgewiesene Expression von DPP IV im Magen-Darm-Trakt und im vaskulären Endothelium erklärt die Tatsache, dass das meiste GLP-1, das in der Blutbahn zirkuliert, schon in der N-terminal-abgespaltenen, inaktiven Form vorliegt (Hansen *et al.*, 1999). Bei den Mäusen mit genetischem Defekt in der Expression von DPP IV konnten gesteigerte Konzentrationen an bioaktivem GLP-1 und erhöhter Glukose-Abbau beobachtet werden (Marguet *et al.*, 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Inaktivierung von GLP-1 ist der Abbau durch membrangebundene Ektopeptidasen, die nahezu alle regulatorischen Peptide abspalten und von denen die Endopeptidase 24.11 (NEP 24.11) am besten untersucht ist. Es wurde beschrieben, dass GLP-1(3-36amid) ein guter Substrat von NEP 24.11 darstellt (Hupe-Sodmann *et al.*, 1995).

Ein möglicher weiterer Weg der GLP-1 Eliminierung ist die Ausscheidung über Nieren-Extraktion. So wurden bei Patienten mit Nieren-Defekten erhöhte GLP-1-Werte im Plasma festgestellt werden (Nauck *et al.*, 1992).

Der letzte postulierte Mechanismus des GLP-1-Metabolismus ist die Inaktivierung nach der Bindung an der Seite des GLP-1 Rezeptors. Darüber wurden bis jetzt aber keine Untersuchungen durchgeführt. Es ist wenig bekannt, wie Störungen in der GLP-1 Sekretion sich pathologisch auswirken. Die Rolle einer erhöhten Sekretion von GLP-1 bei Patienten mit *Dumping*-Syndrom wird intensiv untersucht (Miholic *et al.*, 1991; Owada *et al.*, 1995). Bei solchen Patienten wurden 10-20fach erhöhte GLP-1-Werte im Blutplasma nach oraler Nahrungsaufnahme festgestellt, die oft zu einer Hyperinsulemie führt. Eine Auswirkung der Unter- oder Überregulierung der GLP-1-Sekretion auf Entstehungsprozesse der Fettleibigkeit und Diabetes mellitus wird noch kontrovers diskutiert. Es wurde über eine herabgesetzte Sekretion von GLP-1 nach oraler Nahrungsaufnahme bei fettleibigen und diabetischen Probanden berichtet (Ranganath *et al.*, 1996; Vaag *et al.*, 1996). Dagegen sind auch andere Beispiele bekannt, dass bei fettleibigen und diabetischen Patienten sogar erhöhte GLP-1-Plasmawerte festgestellt worden sind (Fukase *et al.*, 1995; Orskov *et al.*, 1991; Hirota *et al.*, 1990). Die Ursache dabei wird allerdings in einer Existenz von GLP-1 unsensiblen β -Zellen gesucht. Es bedarf noch weiterer Untersuchungen um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Dysregulation von GLP-1 und der Fettleibigkeit und Diabetes nachzuweisen.

1.6 Ligandenbindung des GLP-1 Rezeptors

Die Wechselwirkung eines Liganden mit seinem G-Protein gekoppelten Rezeptor wird über verschiedene Modelle der konformationellen Selektion beschrieben. Der einfachste Weg diese Interaktion zu beschreiben ist das sogenannte „*Extended Ternary Complex*“-Modell (Samama *et al.*, 1993). Demnach existieren Rezeptoren in zwei unterschiedlichen Zuständen, freier (inaktiver) Rezeptor (Rec) und G-Protein gebundener (aktiver) Rezeptor (GRec), die im Gleichgewicht zueinander stehen (Abb. 9A). Die Liganden, die eine hohe Affinität zum letzteren Zustand zeigen, werden als Agonisten bezeichnet. Die Liganden, die eine schwache Affinität zum GRec aufweisen werden als Antagonisten bezeichnet. Dieses Modell wird durch eine Reihe von Experimenten gestützt (Lefkowitz *et al.*, 1993; Spiegel *et al.*, 1996). Leider kann dieses Modell die Tatsache nicht erklären, dass manche Rezeptoren auch in Abwesenheit seiner Liganden eine G-Protein-Aktivierung bewirken. Dies wurde versucht mit einem weiteren „*Six State*“-Modell zu beschreiben, in dem der Rezeptor in sechs Zuständen vorliegt und in der Lage ist zur Signalübertragung in nur zwei Zuständen, in einem G-Protein gebundenen aktiven Zustand GRec* und in einem G-Protein und Ligand gebundenen aktiven Zustand GRec*Lig (Gurrath, 2001) (Abb.9B). Der Nachteil dieser Modellbeschreibung ist es, dass demnach das G-Protein nur an den aktiven Rezeptor bindet, während experimentelle Daten bezeugen, dass es in der Lage ist an einen Rezeptor zu binden ohne nachfolgende Aktivierung und Signalübertragung. Eine weitere Modelldarstellung basierend auf Prinzipien der mikroskopischen Reversibilität der Thermodynamik, das sogenannte „*Eight-State*“-Modell sollte das erklären (Gurrath, 2001). Nach diesem Modell kann der Rezeptor 3 unterschiedliche Prozesse durchlaufen: Ligandenbindung, Rezeptor-Isomerisierung und G-Protein-Bindung (Abb. 9C). Agonisten können zu vier unterschiedlichen Zuständen des Rezeptors binden, dabei aber den aktiven Zustand der Rezeptor-Isomerisierung (Rec*) oder den G-Protein gebundenen aktiven Zustand (GRec*) bevorzugen. Die inversen Agonisten würden den nicht aktivierten Rezeptor, Grundzustand (Rec), bevorzugen, wobei die partiellen Agonisten zu aktiven und nicht aktiven Zuständen eine Affinität zeigen. Nach diesem Modell würden die Antagonisten eher die Übergänge zwischen den Zuständen blockieren als an einen bevorzugten Zustand binden.

Trotz der hohen Homologie einiger Peptidliganden der Familie B1-Rezeptoren kann der GLP-1 Rezeptor nur seinen natürlichen Liganden, GLP-1 hochspezifisch binden. Die Ligandenbindungsaffinität des GLP-1 Rezeptors in der Membran von unterschiedlichen Zelllinien zeigte sich mit einer Dissoziationskonstante von 0.2 nM bis 3.5 nM als relativ einheitlich (Thorens *et al.*, 1993; Gromada *et al.*, 1995; Kieffer *et al.*, 1996). Überraschenderweise wurden im Venom von *Gila monster*, *Heloderma suspectum* 2 Peptide identifiziert, die sogenannten Exendin-4 und Exendin-(9-39), die eine spezifische Bindung zum GLP-1 Rezeptor aufweisen (Thorens *et al.*, 1993). Exendin-4 ist seitdem als ein starker Agonist und Exendin-(9-39) als ein Antagonist des Rezeptors bekannt. Mittlerweile wurde sogar ein niedermolekularer Ligand für GLP-1 Rezeptor

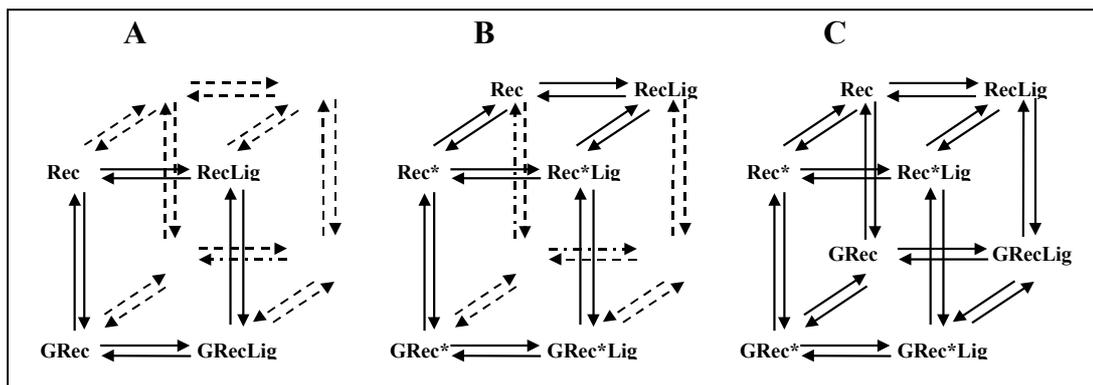


Abbildung 9. Modellvorstellungen der Interaktionen und Aktivierungen der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (nach Gurrath, 2001). A: „Ternary Complex“-Modell; B: „Six-State“-Modell; C: „Eight-State“-Modell.

identifiziert, der die durch GLP-1 induzierte cAMP-Produktion inhibiert, allerdings eine Bindungsaffinität zum Rezeptor im mikromolaren Bereich aufweist im Gegensatz zur nanomolaren Bindungsaffinität seines natürlichen Liganden GLP-1 (Tibaduiza *et al.*, 2001).

1.7 Zielstellung

Typ-II-Diabetes ist eine verbreitete Krankheit, die sich zu einer weltweiten Epidemie zuspitzt. Die Weltgesundheitsorganisation berichtet, dass zur Zeit weltweit ca. 135 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt sind, davon 90 % an Typ-II-Diabetes (WHO-Report, 1997). Man schätzt, dass es zum Jahre 2025 annähernd 300 Millionen Diabetes-II-Patienten geben könnte (WHO, 1999). Diabetes vom Typ II ist mit einem sehr hohen Risiko verbunden, sehr oft mit vorzeitigem Auftreten von Herz-Kreislaufbedingten Krankheits- und Todesfällen. GLP-1 wird zur Zeit intensiv als potentielles Therapeutikum für Diabetiker untersucht (Nauck *et al.*, 1997; Byrne *et al.*, 1996; Creutzfeldt *et al.*, 2001; Drucker, 2001). Aufgrund seiner Instabilität im Blutplasma ist die Synthese von stabilen GLP-1 analogen Peptiden wünschenswert. Ein synthetischer Analog von GLP-1 NN2211 (von NovoNordisk, Kopenhagen) ist bereits in der klinischen Prüfung und die klinische Anwendbarkeit der GLP-1 Analoga aus *Heloderma suspectum* wird ebenfalls untersucht (Göke *et al.*, 2002). Um noch bessere und wirksamere GLP-1-Analoga zu entwickeln, bedarf es nicht nur Untersuchungen auf der Peptidebene sondern auch einer genauen Charakterisierung der molekularen Wechselwirkung zwischen dem GLP-1 und seinem Rezeptor. Bislang beschränkten sich die meisten solcher Untersuchungen auf *in vivo*-Studien an rekombinanten, GLP-1 Rezeptor-exprimierenden Zelllinien.

Ziel der folgenden Arbeit ist es, die N-terminale Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors in *E. coli* zu exprimieren und diesen Rezeptorfragment bezüglich seiner Fähigkeit zur Ausbildung einer eigenständigen Proteindomäne zu untersuchen, und falls das der Fall ist bezüglich seiner Ligandenbindungseigenschaften hin zu charakterisieren. Neben der funktionellen Charakterisierung der Rezeptordomäne soll auch eine Basis für die Bereitstellung ausreichender Mengen an biophysikalisch charakterisiertem Material für strukturelle Analysen mittels NMR und Röntgen-Kristallographie geschaffen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Herkunft
Ampicillin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
L-Arginine Monohydrochlorid	Ajinomoto, Tokio, Japan
Bacto Agar	Difco/Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Bacto Trypton	Difco/Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
L-Cystein	ICN, Eschwege
Dimethylpimelidat	Sigma, St.Louis, MO, USA
2,2' Dithiopyridin	Sigma, St.Louis, MO, USA
1,4-Dithiothreitol	ICN, Eschwege
EZ-Link™ Iodoacetyl-LC-Biotin	Pierce, Rockford, USA
Gluthation, oxidiert	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Gluthation, reduziert	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Guanidiniumchlorid C-Grade	Nigu Chemie, Walskraiburg
Guanidiniumchlorid <i>utrapure</i>	ICN, Eschwege
Harnstoff	ICN, Eschwege
Hefe Extrakt	Difco/Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Mineralöl für die PCR	Sigma, St.Louis, MO, USA
2-2-Puridinyldithioetaneamin-Hydrochlorid (PDEA)	Biacore, Uppsala, Schweden
Triton X-100	ICN, Eschwege
Tween-20	ICN, Eschwege

2.1.2 Standards und Kits

Standards und Kits	Herkunft
1 kb DNA Längenstandard	New England Biolabs, Beverly, USA
Protein LMW Marker	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
10 kDa Protein Längenstandard	Roth, Karlsruhe
LMW Gel Filtration Calibration Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Protein Assay nach Bradford	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Thiol-Coupling Kit	Biacore, Uppsala, Schweden
Amine-Coupling Kit	Biacore, Uppsala, Schweden
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
WizardPCR-Purification Kit	Promega, Madison, WI, USA
Sequi Therm Excel II Long-Read DNA Sequencing Kit	Epicentre Technologies, Madison, USA
ECL Western Blotting analysis system; Sigma Fast DAB with metal enhancer	Sigma, St. Louis, U.S.A.

2.1.3 Proteine, Peptide und Enzyme

Enzym	Herkunft
Alkalische Phosphatase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DNase I	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Klenow DNA-Polymerase Fragment	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lysozym	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Beverly, USA
RNase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Beverly, USA
T4-DNA-Ligase	Gibco BRL, Paisley, UK
Anti-Chicken IgG	Sigma, st. Louis, U.S.A.

2.1.4 Chromatographiematerial

Säule	Herkunft
Hi-Trap SP-Sepharose, 1 ml Säulen	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
His-Bind-Resin	Novagen, Bad Soden
Phenylsepharose Fast Flow (low sub)	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
SulfoLink Coupling Gel	Pierce, Rockford, USA
Superdex 75 prepgrade	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Sephacryl ®S-100-Material	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
S-Sepharose	Roche Diagnostics, Mannheim
Poros 10 R1-Säule	Roche Diagnostics, Mannheim
C18 RP HPLC-Säule	Roche Diagnostics, Mannheim
PD-10 Säulen	Millipore, Eschborn

2.1.5 Sonstiges Material

Dialysemembran Spectra Por	Spectrum, Garden, USA
Sensor Chip CM5	Biacore, Uppsala, Schweden
PVDF-Membran	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Nitrozellulose-Membran	Biorad, Hercules, CA, USA
Sterilfilter (0,2 und 0,45 µm)	Renner, Darmstadt

2.1.6 *E. coli*-Stämme

Stamm	Eigenschaften
XI-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA)	<i>Rec A1 end A1 gyrA96 thi-1 bsdR17 supE44 relA1[F' proAB lac^qZAM15 Tn 10 (Tet^r)]</i>
M15 (Qiagen, Hilden)	<i>RecA⁺ nal^S str^S rif^S lac⁻ Ara⁻ gal⁻ Mit⁻ F- Uvr⁺ lon⁺</i>
BL21 (DE3) (Novagen, Madison, WI, USA)	<i>F- dcm ompT bsdS(r_B⁻m_B⁻) galλ(DE3)</i>

2.1.10 Medien, Antibiotika und Puffer

- LB-Medium: 10 g/l Bacto Trypton; 5 g/l Yeast Extract; 5 g/l NaCl, pH 7,0
- SOC-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Yeast Extract, 0,5 g/l NaCl mit H₂O auf 100 ml auffüllen und autoklavieren, + 1 ml 1M MgCl₂, + 1 ml 1 M MgSO₄, + 1 ml 20 % (w/v) Glucose
- Fermentationsmedium: 16,0 g Na₂SO₄, 19,74 g (NH₄)₂SO₄, 4,0 g NH₄Cl, 116,8 g K₂HPO₄, 32,0 g NaH₂PO₄·2 H₂O, 8,0 g (NH₄)₂-Citrat. Die Salze wurden in 8 Liter entionisiertem Wasser gelöst, und der pH-Wert mit 5 M NaOH auf pH 7.0 eingestellt.
- Feeding-Lösung: In 100 ml kochendes Wasser wurden 330 g Glucose gelöst. Die Lösung wurde daraufhin auf 400 ml mit H₂O aufgefüllt und autoklaviert.

Es wurden 50 ml einer Mineralsalzlösung (1 g Na₂SO₄, 1,246 g (NH₄)₂SO₄, 0,25 g NH₄Cl, 7,3 g K₂HPO₄, 1,8 g NaHPO₄·2H₂O, 0,5 g (NH₄)₂-Citrat/ 50 ml H₂O) angesetzt und autoklaviert.

Zur Herstellung der Feeding-Lösung wurde die Glucoselösung, die Mineralsalzlösung, 1 ml MgSO₄ und 5 ml Spurenelemente (CaCl₂·6 H₂O 0,74g/l; ZnSO₄·7 H₂O 0,18 g/l; MnSO₄·x H₂O 0,1 g/l; Na-EDTA 20,1 g/l; FeCl₃·6 H₂O 16,7 g/l; CuSO₄ 0,1 g/l; CoCl₂ 0,104 g/l) unter Sterilbedingungen zusammengegeben und vermischt.

Antibiotika-Stammlösungen:

Ampicillin 100 mg/ml in H₂O

Kanamycin 50 mg/ml in H₂O

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Zugabe zum Medium erfolgte im Verhältnis 1:1000 (v/v).

2.1.11 Puffer

- TAE-Puffer (50fach): 2 M Tris; 1M Essigsäure,; 100 mM EDTA, pH 8,5
- TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA
- Tris-Glycin-Puffer (10fach): 250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 1,87 M Glycin; 1 % (w/v) SDS
- DNA-Probenpuffer (5fach): 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM EDTA; 30 % (v/v) Glycerol; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
- DNA-Agarosegele: 0,8-1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer
- DNA-Sequenzierungsgel: (6 % (w/v) Acrylamid; 41 cm Länge; 0,25 mm Dicke): 30 ml SequaGel, XR Complete Buffer Reagent; 7,5 ml SequaGel Acrylamidlösung; 400 µl DMSC; 300 µl APS (10 % (w/v)).

SDS-Probenpuffer (2fach):	124 mM Tris, 100 mM DTT; 20 % (w/v) Glycerol; 2 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
Sammelgelpuffer für SDS-PAGE (4fach):	500 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer für SDS-PAGE (4fach):	3 M Tris-HCl, pH 8,85; 0,4 % (w/v) SDS
Färbelösung für Proteingele:	40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Eisessig; 0,1 % (w/v) Coomassie R250
Entfärber für Proteingele:	40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Eisessig
Trocknungslösung für Proteingele:	10 % (v/v) Methanol; 3 % (v/v) Glycerol
Western-Blotting-Puffer für Proteinsequenzierung:	50 mM Na-Borat, pH 9,0; 20 % (v/v) Methanol

2.1.12 Geräte

Absorptionsspektrophotometer:

- DU-7400 Beckmann Coulter (Fullerton, CA, USA)

Chromatographieeinheiten:

- ÄKTA Explorer mit UV-Detektor UV-900, Fraktionskollektor Frac-900, Pumpe P-900, pH und Leitfähigkeitsmonitor pH/C-900, Auswertungssoftware Unicorn Version 3.10.11 von Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.
- HiLoad mit UV-Monitor UV-MII, Fraktionekollektor Super Frac, Schreiber Rec 102, *Programmer* GP-250 Plus, Pumpe P-50, *Conductivity* Monitor von Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.
- P-1 Pumpe von Amersham Pharmacia Biotech, Uppsal, Schweden.
- Beckmann Gold HPLC-system mit Software „Gold“ V 8.10, Pumpe 125 NM, Autosampler 507 und Detektor 168 von Beckman Coulter, Fulerton, CA, USA.

DNA-Sequenzierer:

- 4000 mit Steuer- und Auswertungssoftware BaseImaqIR V.4 von Li-Cor, Lincoln, NE, USA.

Kryostaten:

- Wasserbad C25 und Thermostat F6 von Haake, Karlsruhe.

Pipetten

- Research 10, 20, 200, 1000 µl von Eppendorf, Hamburg.

Rührer:

- MR 1000 und 3001 von Heidolph, Kelheim.
- Ikamag RH von Janke & Kunkel, Staufen.

Schüttler und Thermomixer:

- Themomixer compact 5436 von Eppendorf, Hamburg
- Schüttelinkubatoren: VKS-75 Control und SM-30 von Edmunt Bühler, hechingen
- Schüttler Innove 4300 von New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
- Schüttler HT von Infors, Bottmingen, Schweiz

Speed Vac:

- Plus SC110A von Savant Instruments, Farmindale, NY, USA

Thermocycler:

- Omn-E von Hybaid, Heidelberg
- Personal Cycler von Biometra, Göttingen

Waagen:

- FA-1500-1 von Faust, Köln
- Analytical Standard A560 von Ohaus, Gießen

Western-Blot-Apparatur:

- Semi-Dry-Blotting-Apparatur: SEMI-PHOR von Hoefer, Netzteil: EPS-200 von Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden

2.2 Molekularbiologische Methoden:

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte bei 37 °C in LB-Medium, dem bei plasmidtragenden Stämmen das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Agar-Platten angeimpft. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt. Zur dauerhaften Lagerung der Stämme wurden 200 µl einer stationären Übernachtskultur mit 200 µl 20 % (w/v) Glycerinlösung versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die Einführung von Plasmiden in *E. coli* wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Die Überführung der *E. coli*-Stämme in eine transformationskompetente Form erfolgte nach Ausubel und Mitarbeitern (Ausubel *et al.*, 1987). Dabei wurden die Zellen nach Animpfung 1:100 mit einer Übernachtskultur in einem Verhältnis 1:100 bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0.5 - 0.6 bei 578 nm kultiviert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Zellen abzentrifugiert (15 min; 4000 x g; 4 °C), 3 x mit einer eiskalten 10 % (w/v) Glycerinlösung gewaschen und

anschließend in 1/1000 Volumen 10 % (w/v) Glycerin aufgenommen und in 40 µl Aliquots bei –80 °C zu weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die Elektroporation wurde mit 50-100 ng Plasmid-DNA unter Verwendung eines Gene-Pulser II Elektroporationsgerätes (Gene Pulser System, Bio Rad, Hercules, U.S.A.) bei 2,5 kV; 25 µF und 200 ... durchgeführt. Nach sofortiger Zugabe von 1 ml SOC-Medium zu den Zellen und einer einstündigen Inkubation bei 37 °C, wurden die Zellen zur Selektion auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.3 Schnelles Plasmid Screening

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

2.2.4 Plasmid-DNA-Präparation

Zur Plasmidpräparation wurde das QIAquick Spin Plasmid-Kit der Firma Qiagen verwendet, dem eine modifizierte Methode der alkalischen Lyse, sowie der Bindung von DNA an geeignete Säulenmaterialien zugrunde liegt (Birnboim & Doly, 1979). Aus 5 ml einer Übernachtskultur wurden nach der beiliegenden Anleitung des Herstellers bis zu 20 µg Plasmid-DNA isoliert. Die Plasmidlösung wurde bei –20 °C gelagert.

2.2.5 Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen.

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

2.2.6 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

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

DNA-Lösung	5 μl = 0.1-1 μg
10xPuffer	2 μl
(BSA-Lösung 10 mg/ml)	0.2 μl
Restriktionsenzym	1 μl = 5 - 20 Einheiten
deionisiertes Wasser	ad 20 μl

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

2.2.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden

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

DNA	15 - 20 μl
Puffer (10x)	3 μl
Alkalische Phosphatase	1 μl
deionisiertes Wasser	ad 30 μl

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

2.2.8 Ligierung von DNA-Fragmenten

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

5x Ligasepuffer (mit ATP)	4 μl
Vektorfragment	2 μl
Insertfragment	8 - 10 μl
T4-Ligase	1 μl = 1 Einheit
deionisiertes Wasser	ad 20 μl

Es wurde jeweils ein vierfacher molarer Überschuss des Insertfragmentes gegenüber dem Vektor eingesetzt. Inkubiert wurde über Nacht bei 16 °C.

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

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

2.2.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Bestimmung der Basenabfolge von Plasmid-DNA erfolgte gemäß der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) mit dem SequiTherm EXCELL II Kit der Firma Epicentre Technologies nach Vorschrift des Herstellers. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem 6 %-igen Polyacrylamidgel (Sequigel XR, Biozym) mit einer Trennstrecke von 44 cm. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde ein halbautomatisches Sequenziergerät (LI-COR DNA Sequencer 4000, MWG-Biotech) verwendet.

2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1992)

In der Arbeit wurde für Amplifikation von DNA <500 bp Taq-DNA-Polymerase und für größere DNA-Fragmente Pfu-Polymerase verwendet, die mit 1:767000 eine deutlich geringere Fehlerrate aufweist als die Taq-Polymerase. Das Temperaturprogramm für die PCR ist Tabelle 1 zu entnehmen. Ein typischer präparativer 100 µl-Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Themplat-DNA (20 ng/µl)	2 µl
Oligonukleotid 1	10 µl
Oligonukleotid 2	10 µl
10 x Polymerase-Puffer	10 µl
dNTP-Lösung (10 mM)	1 µl
Polymerase (5 Einheiten/µl)	1 µl
deionisiertes Wasser	ad 100 µl

Tabelle 1. Temperaturprogramm für die PCR

Vorgang	Zeit (s)	Temperatur (°C)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	300	94	1
Denaturierung	20	94	29
Annealing der Primer	15	Y*	
Extension	X*	72	
Denaturierung	20	94	1
Annealing der Primer	15	Y*	
Extension	600	72	

X* Die Extensionzeit sollte ca. 10 s pro 100 bp betragen

Y* Die Annealing-Temperatur sollte 4-10 °C unter dem T_m-Wert der beiden Primer liegen.

Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit WizardPCR-Purification Kit nach der Vorschrift des Herstellers.

2.2.12 Ortsgerichtete Mutagenese

Zum Einbringen von Punktmutationen in eine DNA-Sequenz wurde der QuikChange Kit von Stratagene verwendet.

Dabei wurde die Templat-DNA einer PCR-ähnlichen Reaktion mit 2 komplementären Oligonukleotiden, die veränderte Sequenz enthielten, unterzogen, so dass Plasmide mit der neuen Sequenz synthetisiert wurden. Die Templat-DNA wurde in einem 2. Schritt mit dem Enzym *Dpn I* verdaut, das nur an einer methylierten 4 bp-Sequenz spaltet. Das synthetisierte Plasmid liegt kreisförmig mit Strangbrüchen vor, die nach der Transformation in *E. coli* von den bakteriellen Enzymen repariert werden. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Tabelle 2. Temperaturprogramm für PCR

Vorgang	Zeit (s)	Temperatur (°C)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	30	95	1
Denaturierung	30	95	18
Annealing	60	55	
Extension	X*	68	

(*)Die Extensionszeit sollte 1 min/1kb betragen.

Ein typischer Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Templat-DNA	1 µl = 50-100 ng
Pfu-Polymerase Puffer (10x)	2.5 µl
dNTPs (10 mM)	0.5 µl
Oligonukleotid 1	1 µl = 20 pmol
Oligonukleotid 2	1 µl = 20 pmol
Pfu-Poymerase (5 Einheiten/µl)	1 µl
deionisiertes Wasser	ad 25 µl

Anschließend wurde 1µl *DpnI* (10 Einheiten/µl) zugegeben und bei 37 °C für 1 h und bei 65 °C für 10 min inkubiert. Mit 2-4 µl des Ansatzes wurden *E. coli*-Zellen transformiert.

2.2.13 Ligationsunabhängige Klonierung (LIC-PCR-Methode)

Die Methode beruht auf der 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der T4 DNA Polymerase (Aslanidis & de Jong, 1990) (Abbildung 10).

Mittels PCR wird die zu klonierende Sequenz mit spezifischen Fragmenten aus 12 Basenpaaren versehen. Diese zusätzlichen Enden bestehen aus den Basen A, G und C und enden mit einem T. Nach der PCR werden dann die Fragmente mit T4 DNA Polymerase mit Zusatz von dATP behandelt. Das Enzym arbeitet als 3'-5'-Exonuklease und generiert 5'-Einzelstrang-Überhänge bei den doppelsträngigen PCR-Produkten bis sie auf einen T trifft. Diese Überhänge sind zu 3'-Überhängen im LIC-Vektor komplementär, so dass die zu klonierende DNA-Fragment mit dem Plasmid gleich annealen kann ohne einen zusätzlichen Ligationsschritt vor der Transformation.

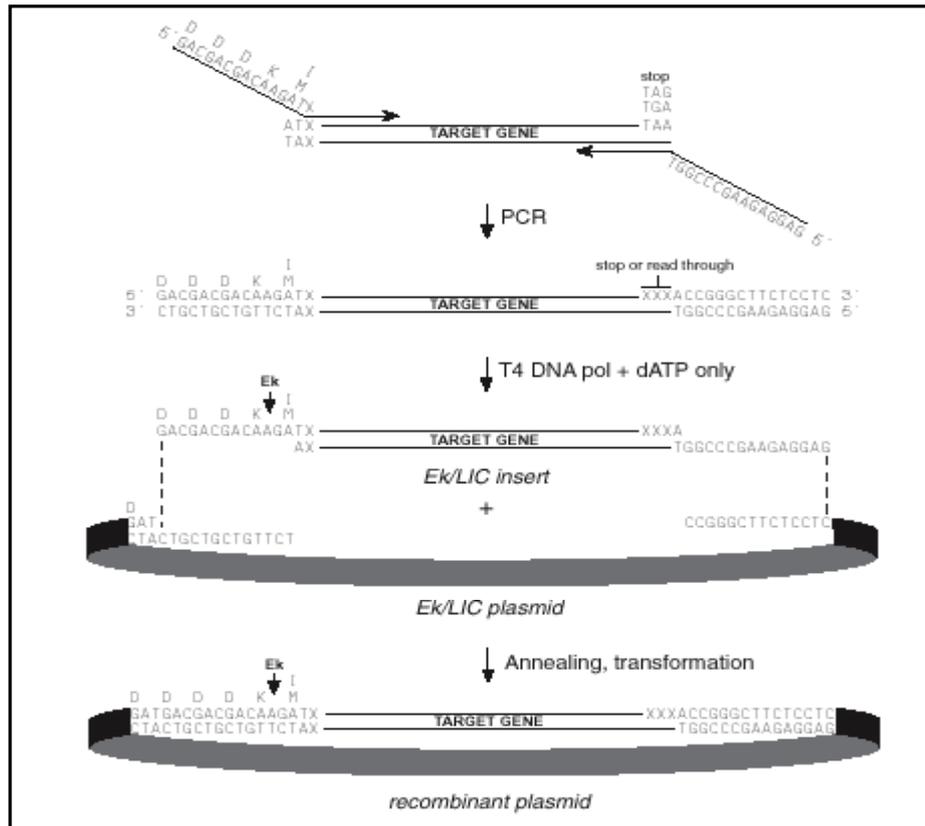


Abbildung 10. Ligationsunabhängige Klonierung (*EC/Lic Cloning Kits*, Novagen)

T4 DNA Polymerase-Behandlung:

Ansatz:	5 µl	aufgereinigtes PCR-Produkt
	2 µl	10x T 4 DNA Polymerase Puffer
	2 µl	25 mM dATP
	1 µl	100 mM DTT
	0,5 µl	2,5 U/µl T 4 DNA Polymerase
	9,5 µl	Aqua bidest

Prozedur:

Der Ansatz wurde zusammen pipettiert, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inaktivierung der Polymerase erfolgte bei 75 °C für 20 min. 2 µl von der mit T4 DNA Polymerase behandelten Probe wurden mit 1 µl LIC-Vektor gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem Ansatz wurde dann 1 µl von 25 mM EDTA-Lösung zupipettiert und wiederum 5 min bei 22 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in *E. coli* XL-1 Blue transformiert.

2.3 Expression, Reinigung und Analytik von Proteinen

2.3.1 Erstellung von Expressionsvektoren

2.3.1.1 N-terminale Domäne des GLP-1 Rezeptors

Für Klon I wurde die kodierende Sequenz der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors mittels PCR mit Oligonukleotiden 1 & 2 amplifiziert. Das Fragment wurde mit Restriktionsschnittstellen *SphI* und *HindIII* in pQE30 Vektor von Qiagen inkloniert. Im zweiten Schritt wurde mittels gerichteter Mutagenese mit dem Quikchange Kit (Stratagene) und dem Oligonukleotidenpaar 3 & 4 die vier Aminosäuren Alanin, Cystein, Glycin und Leucin zwischen dem 6-Histag und der kodierenden Sequenz des nGLP-1R deletiert. Das so entstandene Plasmid wurde als p(nGLP-1R) bezeichnet.

Die Klone zur Expression von nGLP-1R ohne den N-terminalen Histag (siehe Tabelle 5) wurden durch Amplifikation der kodierenden Sequenz mit den Primerpaaren 13 & 2 für Klon II und 13 & 14 für Klon III und anschließender Klonierung der PCR-Produkte über *SphI*- und *HindIII*-Schnittstellen in pQE70 Vektor von Qiagen hergestellt.

Für Klon IV bzw. V wurde Primerpaar 15 & 14 bzw. 16 & 14 zur Amplifikation des nGLP-1R-DNA verwendet. Zur Klonierung der Fragmente wurde pQE30 mit *BamHI* und *HindIII* gespalten und die PCR-Produkte mit *BglII* und *HindIII* gespalten. Die entstehenden Überhänge nach der Restriktionsverdau mit *BglII* und *BamHI* sind identisch, was die Ligierung der PCR-Produkte mit dem Expressionsplasmid ermöglichte.

2.3.1.2 Fusionskonstrukt von GLP-1 (p(GLP-1))

Die von der Datenbank bekannte Aminosäuresequenz des biologisch aktiven GLP-1 wurde in eine DNA-Sequenz übersetzt. Dabei wurde für jede Aminosäure das in *E. coli* meist vorkommende genetische Kodon-Triplett ausgewählt (Andersson & Kurland, 1990). Für die direkte Gensynthese wurden Oligonukleotide 5 & 6 synthetisiert, die eine 20 bp-Überlappung aufweisen. Mit diesen Primern wurde eine PCR durchgeführt. Die so entstandene doppelsträngige DNA diente als Template für die anschließenden Klonierungsschritte.

Für das Fusionsprotein-Konstrukt p(GLP-1) wurde das mit den Oligonukleotiden 7 & 8 amplifizierte Fragment in pET34b-Vektor über ligationsunabhängige Klonierung inseriert.

2.3.1.3 Rezeptor-Ligand-Chimäre (p(RL))

Für die Rezeptor-Ligand-Chimäre wurde im ersten Schritt mittels gerichteter Mutagenese mit den Primern 9 und 10 eine *SalI*-Schnittstelle im Klon p(nGLP-1R) eingeführt. Das entstandene Plasmid erhielt den Namen p(nGLP-1R-*SalI*). Im nächsten Schritt wurde die Peptidsequenz aus dem Klon p(GLP-1) mittels PCR mit den Oligonukleotiden 11 & 12 amplifiziert und in p(nGLP-1R-*SalI*) über *SalI* und *HindIII* inkloniert. Das so entstandene Plasmid wurde als p(RL) bezeichnet.

2.3.2 Bakterienanzucht zur Expression von nGLP-1R- und GLP-1-Varianten

2.3.2.1 Anzucht in Schüttelkolben

Die Expression rekombinanter Proteine im Kleinmaßstab erfolgte durch Animpfen einer 15-30 ml Vorkultur mit einer Kolonie von einer LB-Agar Platte oder einer Glycerinkultur. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Zum Animpfen der Hauptkultur wurde die Vorkultur 1:100 in frischem LB-Medium in 5 L Schüttelkolben (bis zu 1,5 L Medium) verdünnt. Die Kolben wurden bei 37 °C geschüttelt bis die Zellen eine optische Dichte von 0.5-0.6 bei 578 nm erreicht hatten. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nachdem die Zellen weitere 4 h bei 37 °C geschüttelt wurden, wurden sie durch Zentrifugation 15 min bei 5000 x g und 4 °C geerntet.

2.3.2.2 Fed Batch-Fermentation

Die Fermentation wurde in einem 10 l Biostat ED Bioreaktor (B- Braun, Deutschland) nach Neubauer *et. al* durchgeführt. Das Kulturvolumen entsprach 8 Litern. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von 60 bei 500 nm bei 35 °C kultiviert und die Expression von rekombinantem Protein wurde durch Zugabe von 0.4 mM IPTG induziert. Nach 3-4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 x g für 15-20 min bei 4 °C geerntet. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde das Zellmaterial bei -20 °C gelagert.

2.3.3 Inclusion body (IB) Isolierung.

Die Isolierung und Solubilisierung von *Inclusion Bodies* wurde nach Rudolph *et al* 1998 durchgeführt. Dazu wurden die Zellen im ersten Schritt mittels Hochdruckdispersion in einem Gaulin-Homogenisator (Gaulin Micron Lab 40; APV Homogenisator GmbH; Lübeck) bei einem Druck von 1200 bar und 0,25 g Zellmaterial/ml 0.1M Tris, 1 mM EDTA, pH 7,0 aufgeschlossen.

Die aufgeschlossenen Zellen wurden dann einer DNase-Behandlung (10 µg/ml) mit Zusatz von 3 mM MgCl₂ für 30 min bei Raumtemperatur unterzogen. Anschließend wurde der Ansatz mit 0,5 Volumina 60 mM EDTA, 1,5 M NaCl, 6 % (w/v) Triton X-100, pH 7,0 gemischt und bei 4 °C für 30 min inkubiert. Die Sedimentation von *Inclusion Bodies* erfolgte nach einer Zentrifugation bei 30000xg für 15 min und 4 °C. Danach wurde das Pellet 3fach mit 0,1 M Tris, 20 mM EDTA, pH 7,0 gewaschen und bei -20 °C gelagert.

2.3.4 Solubilisierung von Inclusion Bodies

Die Solubilisierung von isolierten *Inclusion Bodies* erfolgte in 6 M GdmHCl, 0.1 M Tris, 1mM EDTA, 100 mM DTT, pH 8.5 bei Raumtemperatur für 2 h bei einer Proteinkonzentration von 10-20 mg/ml. Unlösliches Zellmaterial wurde durch Zentrifugation (20 min, 20000 rpm, 4 °C) abgetrennt. Der Ansatz wurde mit HCl auf einen pH von 2,0-3,0 titriert und zur vollständigen

Entfernung von DTT mehrfach einer Dialyse gegen 4 M GdmHCl, pH 2,5 unterzogen. Die solubilisierten *Inclusion Bodies* wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.5 Renaturierung des nGLP-1R

Die Rückfaltung von nGLP-1R erfolgte durch 1 :100 Verdünnung in einen auf $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ vortemperierten Rückfaltungspuffer (0,5 M Arginin-HCl, 0,1 M Tris, 1 mM EDTA, 2 mM GSH/ 5 mM GSSG, pH 8,5) bei einer Ausgangsproteinkonzentration bis zu 10 mg/ml und anschließender Inkubation für $>5\text{-}6\text{ h}$ bei $15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.6 Pulsrenaturierung von nGLP-1R

Bei größeren Ansätzen wurde eine Pulsrenaturierung von nGLP-1R an einem Renaturierungsautomaten (FairMenTech, Göttingen). Dabei wurde zu auf $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühltes 0.5-1 l Renaturierungspuffer 6 Pulse mit je 5-10 ml solubilisierten IB-Material in einem Zeitintervall von 6 h unter Rühren (400 rpm) zugegeben. Nach 36 h wurde das lösliche Protein durch eine Zentrifugation für 20 min bei 10000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ von Aggregaten abgetrennt.

2.3.7 Renaturierung der Rezeptor-Ligand-Chimäre

Die Rückfaltung von nGLP-1R-GLP-1-Chimäre erfolgte während einer zweitägigen Dialyse gegen 0,5 M Arginin, 0,1 M Tris, 1 mM EDTA, pH 8,5 bei $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei einer Ausgangsproteinkonzentration von 1 mg/ml.

2.3.8 Optimierung der Renaturierung des nGLP-1R

Faltung des nGLP-1R wurde mittels *Reversed Phase* HPLC an einem Beckmann Gold HPLC-system (Beckman Coulter, Fulerton, CA, USA) durchgeführt. Je 900 μl Renaturierungsansatz wurden mit 100 μl 32 % (v/v) HCl gestoppt und davon 100 μl bei einem Fluss von 0,5 ml/min auf einen Poros 10 R1-Säule (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgetragen. Das gebundene Protein wurden mit einem nicht-linearen Gradienten (0-5 min: 0-20 % B; 5-25 min: 20-80 % B; 25-30 min: waschen mit 100 % B) eluiert. Elutionspeaks wurden bei 215 nm und 280 nm detektiert. Laufmittel A: 0,1 % (v/v) TFA in Wasser; Laufmittel B: 0,1 % (v/v) TFA in 80 % Acetonitril. Die Quantifizierung der Renaturierungsausbeuten erfolgte über die Größe der Peakfläche. Die Peakflächen wurden mit dem Programm „Peakfit“ V 2.01 integriert. Die Eichung der Säule wurde mit 0,5-10 μg von aufgereinigtem nGLP-1R durchgeführt.

2.3.9 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in denaturierter Form in einem Polyacrylamidgel im elektrischen Feld getrennt (Laemmli, 1970). Das anionische Detergens SDS bindet mit einem konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS pro 1 g Protein, sodass die elektrophoretische Beweglichkeit nur noch von der Molekularmasse der Proteine abhängt.

Es wurden Gele von der Größe 8x10 cm verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA bei 5 °C durchgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Gele (ausreichend für 2 Gele) ist in Tabelle 3 dargestellt:

Tabelle 3. Zusammensetzung der Gele

	Sammelgel (5%)	Trenngel (15 %)
Acrylamid/Bisacrylamid (0.8%) 37.5:1	2.37 ml	4.75 ml
Puffer (4x)	1 ml	2.5 ml
Temed	5 µl	5 µl
APS (10 % (w/v))	36 µl	75 µl
deion. Wasser	0.63 ml	2.75 ml

Die Proben wurden vor der Auftragung 1:2 mit 2x konzentriertem SDS-Probenpuffer (124 mM Tris, 100 mM DTT, 20 % Glycerin (w/v), 2 % SDS (w/v), 0,2 % Bromphenolblau (w/v) versetzt und für 5 min bei 98 °C erhitzt.

Die Anfärbung der Proteine erfolgte in einer Methanol: Eisessig:Wasser-Mischung (4:1:5) mit 0.15 % Coomassie R 250 (w/v). Die Entfernung des Hintergrundes erfolgte in gleicher Lösung ohne Zusatz von Farbstoff.

2.3.10 Dot-Blot des nGLP-1R

Hierzu wurde die zu analysierende Proteinprobe direkt auf die zurecht geschnittene Nitrozellulose-Membran getropft und bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBS und 0,2 % (v/v) Tween-20 bei Raumtemperatur 10 min gewaschen und für 1 h im Blockierungspuffer (TBS + 0,2 % (v/v) Tween-20 + 5 % (w/v) Mager-milchpulver) inkubiert. Danach erfolgte Bindung mit dem Erstantikörper (Anti-nGLP-1R 1:25000fach verdünnt im Blockierungspuffer) unter leichtem Schütteln für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach erneutem dreimaligen Waschen, und Bindung mit dem Zweitantikörper im Blockierungspuffer (Hühner IgG mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert, 5000fach verdünnt) für 2 h bei Raumtemperatur wurde die Detektion des Signals mit dem ECL-Detektionssystem durchgeführt. Dabei findet Oxidation von Luminol durch die Peroxidase, wodurch eine Chemilumineszenz ausgelöst wird. Hierzu wurde die Membran zunächst mit Wasser abgespült. Danach wurden 2 ml einer frisch zubereiteten ECL-Lösung gleichmäßig auf der Membran verteilt und für 2 min inkubiert. Die Peroxidaseaktivität wurde durch Exposition eines Röntgenfilms auf der Membran und anschließender Entwicklung des Films nachgewiesen. Die Expositionszeit lag bei ca. 1-5 min.

2.3.11 TCA-Präzipitation von Proteinen

Zur Fällung von Protein wurde die Lösung 1:1 mit 20 % (w/v) Trichloressigsäure versetzt, gut gemischt und bei 4 °C für 20 min inkubiert. Anschließend wurde das ausgefallene Protein bei 13000 rpm, 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit Aceton gewaschen.

2.3.12 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Das Prinzip der Methode (Bradford, 1976) beruht auf der Bildung eines Komplexes aus Coomassie Brilliant Blue G-250 und den hauptsächlich basischen Aminosäure-Resten von Proteinen (< 3000 Da) bei pH 0-1. Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des fertigen 5fachen *Protein Assay Reagent* (Bio-Rad), das den Farbstoff, Phosphorsäure und Methanol in Wasser enthält. Bei jeder Bestimmung wurde eine Eichgerade mit BSA erstellt. Die Proteinprobe wurde 1:1000-1:10000 verdünnt, mit dem *Protein Assay Reagent* versetzt, ca. 5-30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

2.3.13 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie

Die Konzentration von Proteinen wurde mittels UV-Spektroskopie nach Gill und von Hippel (Gill & Hippel, 1989) durchgeführt. Die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine sind in Tabelle 4 dargestellt. Es wurden stets UV-Absorptionsspektren im Bereich von 240-340 nm aufgenommen, um mögliche Verunreinigungen durch DNA oder Aggregate identifizieren zu können.

Tabelle 4. Extinktionskoeffizienten der Proteine

	Protein	$\epsilon_{280\text{nm}} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$
1	nGLP-1R	52365 red/ 52005 ox
2	RL	59250 red/58890 ox
3	GLP-1	6970
4	Cyst. GLP-1	52280

red: Extinktionskoeffizient des Proteins wenn alle Cysteine im reduzierten Zustand vorliegen.

ox: Extinktionskoeffizient des Proteins, wenn alle Cysteine im oxidierten Zustand bzw. in Disulfidbrücken verknüpft vorliegen.

2.3.14 Bestimmung freier SH-Gruppen

Zur Bestimmung der freien SH-Gruppen (Habeeb, 1972) von nGLP-1R wurden zu 1 ml Proteinlösung 30 μl DTNB-Lösung zugegeben. Als Leerwert diente 1 ml Probenpuffer mit gleicher Menge an DTNB. Die Ansätze wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 410 nm gemessen ($\epsilon_{410} = 13600 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$). Aus der korrigierten Absorption bei 410 nm wurde die molare Konzentration an freien SH-Gruppen berechnet und durch eingesetzte Proteinkonzentration dividiert, was der Anzahl der freien Thiolgruppen pro Proteinmolekül ergab.

2.3.15 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen bis zu 15 ml wurden mit Hilfe von Centriprep-10 (Pall Filtron, Northborough, MA, USA) durch Zentrifugation bei 4 °C und 2000 rpm aufkonzentriert. Bei größeren Volumina wurden die Proteinlösungen durch Einlegen in PEG 35000 in einem Dialyseschlauch (MWCO 6000-8000) eingeeengt. Proteinlösungen über 500 ml wurden mittels einer *Cross-Flow*-Filtrationsanlage mit Minisette-Filter (Pall Filtron, Northborough, MA, USA) aufkonzentriert.

2.3.16 Bromcyanspaltung zur Herstellung von GLP-1_{8His}

25 mg *Inclusion body* Material wurden in 6M GdmHCl, 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM DTT, pH 8,5 solubilisiert und reduziert. Anschließend wurde die Proteinlösung mit Hilfe einer PD-10-Säule in 6M Harnstoff umgepuffert.

2,5 ml der Lösung wurden der Proteinfällung mit TCA unterzogen. Im Anschluss daran wurde das Pellet 2x mit 20 % (w/v) TCA gewaschen und in 3 ml 70 % (v/v) HCOOH aufgenommen. 200 mg CNBr wurden in einem 15 ml Falcon Röhrchen abgewogen und in 7 ml 70 % HCOOH gelöst. Beide Lösungen wurden gemischt über Nacht bei 37 °C im dunklen Brutschrank inkubiert. Nach der Spaltung wurde zum Reaktionsgemisch 60 ml *Aqua bidest.* gegeben und das Protein wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt.

Das Proteinpellet wurde in 6 M Urea, 100 mM Na-Phosphat, pH 8,0 gelöst. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) abgetrennt und anschließend wurde das gespaltene Peptid mittels IMAC aufgereinigt.

2.3.17 Biotinylierung des GLP-1

Für die Biotinylierung von GLP-1 über einen C-terminalen Cystein wurden 2 mg Peptid in 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 20 mM DTT, pH 8,3 bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Peptid über eine PD-10 Säule in 50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8,3 umgepuffert.

Das reduzierte Peptid wurde in einem 1:1,2 molaren Verhältnis mit EZ-LinkTM Iodoacetyl-LC-Biotin versetzt (200 µg Peptid + 30 µg EZ-LinkTM Iodoacetyl-LC-Biotin) und 90 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das überschüssige Reagens wurde durch umpuffern über eine PD-10 Säule entfernt. Das biotinylierte GLP-1 wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Anwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.18 Kationenaustauschchromatographie

Der C-terminale polyionische *Tag* von nGLP-1R ermöglichte eine spezifische Aufreinigung des Proteins durch Kationenaustauschchromatographie.

Aufgrund der großen Volumina der Faltungsansätze wurde das rückgefaltete Protein zuerst in einem batch-Verfahren über S-Sepharose aufkonzentriert. Hierzu wurde der Faltungsansatz 1:3 mit Puffer A

(20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4) verdünnt, ausgefallenes Material wurde mittels Zentrifugation (1 h; 10000 rpm; 4°C) entfernt. Der Überstand wurde an 20 ml lose S-Sepharose (Roche Molecular Biochemicals) im *batch* durch vorsichtiges Rühren für 30 min bei 4 °C gebunden. Es folgte ein Waschschrift mit 200 ml Puffer A plus 150 mM NaCl. Das gebundene Protein wurde in einem Schritt mit 1 M NaCl eluiert. Das Eluat wurde wiederum 1: 10 mit Puffer A verdünnt, abzentrifugiert und anschließend bei einer Flussrate von 1 ml/min auf eine mit 10 Säulenvolumina des Puffer A äquilibrierte 5 ml HiTrap SP-Sepharose-Säule (Amersham Pharmacia) geladen. Nach einem Waschschrift mit 5 Säulenvolumina des Puffer A+150 mM NaCl erfolgte die Elution des Proteins mittels eines linearen Gradienten von 150 mM auf 1 M NaCl. nGLP-1R wurde bei einer NaCl-Konzentration von 550 mM von der Säule eluiert.

2.3.19 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die Rezeptor-Ligand-Chimäre wurde nach der Renaturierung mittels Hydrophober Interaktionschromatographie aufgereinigt. Hierzu wurde der Renaturierungsansatz gegen ein 50faches Volumen des HIC-Bindungspuffers (1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM Na-Phosphat, 1mM EDTA, pH 7,4) dialysiert. Nach der Dialyse wurde das ausgefallene Protein durch Zentrifugation (30 min; 20000rpm; 4 °C) entfernt und der Überstand auf eine mit dem gleichen Puffer voräquilibrierte 6 ml Phenylsepharose-Chromatographie-Säule (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, Amersham Pharmacia) bei einer Flussrate von 1 ml/min gebunden. Es folgte ein Waschschrift mit 5 Säulenvolumina des HIC-Bindungspuffers. Das gebundene Protein wurde mittels eines linearen Gradienten von 1.5 M Ammoniumsulfat auf 0 M Ammoniumsulfat. Die Rezeptor-Ligand-Chimäre wurde bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von ca. 250 mM von der Säule eluiert.

2.3.20 Gelfiltrationschromatographie

Als letzter Reinigungsschritt wurde für alle verwendeten Proteine eine präparative Gelfiltration durchgeführt. Dazu wurden 3 ml des Eluats der SP-Säule bzw. der HIC-Säule bei einer Flussrate von 0,5 ml/min auf eine mit 3 Säulenvolumina des Laufpuffers (20 mM Tris; 1 mM EDTA; 0,8 M NaCl, pH 7,4) äquilibrierte Sephacryl®S-100-Säule (Amersham Pharmacia; Säulenvolumen 75 ml) aufgetragen. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt.

2.3.21 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Das Auftrennen des GLP-1_{6His} von den anderen Bromcyan-Spaltprodukten des Fusionsproteins CBD-GLP-1 erfolgte über Ni-NTA-Agarose (His-Bind Resin; Novagen; Säulenvolumen 6 ml). Hierzu wurde der Spaltungsansatz über einen Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt und in Puffer 1 (6 M Harnstoff, 0,1 N NaH_2PO_4 , 0,01 M Tris, pH 8,0) aufgenommen. Die Bindung auf die mit Puffer 1 äquilibrierte Ni-NTA-Agarose-Säule erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Nach einem Waschschrift mit Puffer 2 (6M Harnstoff, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Tris, pH 6,3) wurde das gebundene

Peptid mit Puffer 3 (6 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris, pH 4,5) von der Säule eluiert.

2.3.22 Ligandensäule

2 mg cysteinyliertes GLP-1 wurden am 1 ml SulfoLink Gel (Pierce) kovalent nach der Anleitung des Herstellers gekoppelt. Das rückgefaltete Protein wurde gegen 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4 mit Zusatz von 0,25 M Arginin dialysiert und unter vorsichtigem Schütteln bei Raumtemperatur für 1 h an die Affinitätsmatrix gebunden. Anschließend wurde die Säule mit 5-fachem Säulenvolumen des gleichen Puffers gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 5 mg/ml freiem GLP-1 bei Raumtemperatur eluiert. Unspezifisch gebundenes Material wurde durch Regeneration der Säule mit 6 M Harnstoff, 100 mM Formiat, pH 2 entfernt. Alle Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

2.3.23 Zirkulardichroismus (CD)

CD-Spektren der aufgereinigten Proteine wurden an einem Aviv 62A DS Spektropolarimeter (Aviv, Lakewood; NJ; U. S. A.) in Quarzglasküvetten (106-QS, Hellma) mit Schichtdicken von 0,01 cm bis 0,5 cm aufgenommen. Um möglichst rauscharme Spektren zu erhalten, wurden von jeder Probe fünf Spektren mit einer Zeitkonstante von 5 s und Bandbreite von 1 nm bei einer Temperatur von 20-22 °C akkumuliert. Außerdem wurde auf die gleiche Weise der Puffer, gegen den die Probe zuvor dialysiert worden war, vermessen. Das daraus resultierende Spektrum wurde von dem Probenspektrum subtrahiert. Das korrigierte Probenspektrum (mdeg gegen Wellenlänge) wurde dann in ein normalisiertes Spektrum umgerechnet. Die Proteinkonzentrationen und Pufferbedingungen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben.

2.3.24 Guanidinium induzierte Denaturierungsübergänge

Stabilitätsmessungen in Gegenwart des Denaturierungsmittels Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl) wurden durchgeführt nach Rudolph (Rudolph, 1998). Dazu wurden die Proteinproben gegen 20 mM Tris-HCl, 0,6-0,8 M NaCl, pH 7,4. Die dialysierten Proben wurden in den gleichen Puffer mit steigenden Konzentrationen von GdmCl (von 0-6 M) verdünnt. Die Proben wurden für mindestens 24 h bei 15 °C inkubiert und dann die Elliptizität bei 222 nm aufgezeichnet.

2.3.25 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren der aufgereinigten Proteine wurden an einem Fluoromax-2 Spektrofluorimeter (SPEX Instruments S. A., Inc., Edison, NJ, U.S.A.) und einem Hitachi F-4500 Spektrofluorimeter (Hitachi, Tokyo, Japan) in 1 cm Quartzglasküvetten (Hellma, Müllheim) aufgenommen. Anregung der Tryptophane erfolgte bei 295 nm und für Tryptophane und Tyrosine bei 280 nm. Die Spektren wurden bei einer Zeitkonstante von 0,2 s und einer Spaltbreite bei Anregung von 1 nm und bei Emission von 5 nm aufgenommen. Proteinkonzentrationen und Pufferbedingungen sind in den Abbildungslegenden

angegeben.

Temperaturübergänge wurden an einem Hitachi F-4500 Spektrofluorimeter (Hitachi, Tokyo, Japan) mit einem Haake Thermostat F6 mit Hilfe des Programms FTLM.BAS (Waldmann, 1998) gemessen. Die Aufheizrate wurde in 1-Grad-Schritten, die Abkühlrate in 5-Grad-Schritten bemessen. Als Anregungswellenlänge wurde 280 nm gewählt und die Fluoreszenz wurde bei 342 nm gemessen. Vor jeder Messung wurde 120 s bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert.

2.3.26 Differential Scanning-Calorimetrie (DSC)

DSC-Messungen wurden an einem VP-DSC Micro Calorimeter (MicroCal, Northampton, MA) durchgeführt. Die Aufheizrate betrug 1 °C/min bei einer Proteinkonzentration von 0,2-0,4 mg/ml. Die Pufferbedingungen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Vor den Messungen wurden die Proben gründlich entgast. Die Reversibilität der thermischen Entfaltung der Proteine wurde durch Abkühlen und nochmaliges Aufheizen der Proben überprüft. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms MicroCal Origin 4.1 (Microcal Software, Northampton, MA).

2.3.27 Quervernetzung von GLP-1 und nGLP-1R

0,87 µM nGLP-1R in 100 mM Borat, 300 mM NaCl, pH 8,5 wurden mit GLP-1-[7-36]-NH₂ oder Insulin zusammen pipettiert und nach 20 minutiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 8 mM Dimethylpimelidat zu jedem Reaktionsansatz zugegeben. Nach einer Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 20 % TCA gefällt, mit Aceton gewaschen und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.3.28 Oberflächenplasmonresonanzmessungen

Die Kinetik der Wechselwirkung zwischen nGLP-1R und GLP-1 wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz an einem BiacoreX System (Biacore AB, Freiburg) untersucht. Eines der Reaktionspartner wurde an eine CM-5 Chip-Oberfläche gekoppelt und der andere Reaktionspartner wurde als Analyt in Lösung zugegeben.

2.3.28.1 Peptidtitration

In ersten Experimenten wurde nGLP-1R über Aminkopplung an Flusszelle 2 eines CM-5 Chips immobilisiert. Die unspezifische Bindung wurde an Flusszelle 1 beobachtet, die mit Ethanolamin blockiert wurde. Bindungsexperimente mit GLP-1[7-36]amide, Calcitonin und PTH wurden im Puffer B (10 mM HEPES, 3 mM EDTA, 0,005 % (v/v) Tween-20, pH 7,4) mit Zusatz von 150 mM NaCl durchgeführt. Die Regeneration der Oberfläche erfolgte mit 3 M KCl.

2.3.28.2 Rezeptorfragment-Titration

In zweiter Reihe von Experimenten wurde cysteinyliertes GLP-1 über C-terminale Thiolgruppe kovalent an die Flusszelle 2 eines CM5 Chips in Anlehnung an die Anleitung des Herstellers gekoppelt. Die Flusszelle 1 wurde mit L-Cystein blockiert. Routinemäßig wurden ca. 40-50 RU Peptid immobilisiert. Die Bindung wurde in Puffer B unter Zusatz von 0.25 M Arginin, 0,05 % Tween-20 mit einer Flussrate von 30 µl/min bei 20 °C gemessen. Die Regeneration der Oberfläche erfolgte durch einen 30 µl Puls mit 6 M Harnstoff, 100 mM Formiat, pH 2.0. Die Bindungskurven wurden mit der BIAevaluation 3.0 Software (BIACORE AB, Uppsala, Sweden) nach 1:1 Langmuir Bindungsmodell ausgewertet.

2.3.28.3 Konkurrenz der Bindung

Für Konkurrenzexperimente wurde nGLP-1R mit unterschiedlichen Konzentrationen an GLP-1[7-36]-NH₂ für 20 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurden diese Proben als Analyt an eine mit GLP-1-CM-5-Chip Oberfläche bei 30 µl/min injiziert. Die Ermittlung der Bindungskonstante erfolgte über lineare Regression unter Verwendung folgender Gleichungen (1) und (2):

$$S = S_0 + \Delta S_{\max} \times \frac{(RL)}{(R)_0} \quad (1)$$

$$(RL) = \frac{[(R)_0 + (L)_0 + K_d]}{2} - \sqrt{\left\{ \frac{[(R)_0 + (L)_0 + K_d]}{2} \right\}^2 - R_0 \times (L)_0} \quad (2)$$

mit:

S	Resonanzsignal im Gleichgewicht nach Injektion
S ₀	Resonanzsignal des Rezeptor-Ligand-Komplexes ohne Zugabe des Kompetitors
ΔS _{max}	Differenz zwischen S und S ₀
(RL)	Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes am Chip im Gleichgewicht
(R) ₀	Konzentration des eingesetzten Rezeptor Fragments
(L) ₀	Konzentration des zur Konkurrenz eingesetzten Peptides

2.3.28.4 Regenerationsprozedur der CM-5 Chip-Oberfläche

Vor jeder neuen Messreihe am BiacoreX System wurde routinemäßig eine Regenerationsprozedur der CM-5 Chip-Oberfläche mit anschließender Neukopplung des cysteinylierten GLP-1 durchgeführt (Bazarsuren & Panzner, 1999).

2.3.29 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Isothermale Titrationskalorimetrie Experimente wurden an einem MicroCal ITC *Titration Calorimeter* (MicroCal. Inc., Northampton, MA) gemessen. 26,3 µM GLP-1 wurden zu 2,04 µM nGLP-1R Lösung

bei 20 °C in 0,25 M L-Arginin, 50 mM Na-Phosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 gegeben. Die Messdaten wurden mit Hilfe des Programms ORIGIN Software (Microcal Software, Northampton, MA) ausgewertet.

2.3.30 Analytische Ultrazentrifugation

Das Molekulargewicht globulärer Proteine kann mittels Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation über die Abhängigkeit der Konzentration vom Abstand zur Rotorachse bestimmt werden (Harding, 1997).

$$(M_r) = \frac{d \ln A}{dr^2} \frac{2RT}{(1 - \bar{v}\rho) \cdot \omega^2} \quad (3)$$

mit:

M_r	molekulare Masse in g/mol
r	radialer Abstand von der Rotorachse in m
A	Absorption
T	Temperatur in K
R	molare Gaskonstante (8,314J/(K*mol))
\bar{v}	partielles spezifisches Volumen des Proteins in ml/g
ω	Winkelgeschwindigkeit in s ⁻²
ρ	Dichte des Lösungsmittels in g/ml

Sedimentationsgleichgewichtsläufe von nGLP-1R wurden freundlicherweise von Dr. Hauke Lilie (Institut für Biotechnologie, MLU Halle) in einer Optima XL-A analytischen Ultrazentrifuge (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, U.S.A.) durchgeführt. Die Messungen wurden bei einer Proteinkonzentration von ca. 100 µg/ml in Doppelsektor-Zellen bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 20000 rpm bei 20 °C in einem An60Ti-Rotor durchgeführt. Analyse der experimentellen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms von A. Milton (Rivas *et al.*, 1999). Das partielle spezifische Volumen des Proteins wurde aus dem durchschnittlichen partiellen Volumen der Aminosäuren errechnet und betrug 0,73 ml/g.

2.3.31 N-terminale Proteinsequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung wurde freundlicherweise von Dr. Peter Rücknagel (Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt. Die zu sequenzierende Proteinprobe wurde in dem Transferpuffer bestehend aus 50 mM Na-Borat, pH 9,0; 20 % (v/v) Methanol auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach dem Transfer wurde die Membran direkt mit 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig und 0,1 % (w/v) Coomassie R250 angefärbt. Die zu analysierende Proteinbande wurde aus der Membran ausgeschnitten, von der Membran abgelöst, mit einer Nucleosil 500-5 C3-PPn-Säule an einem LC-10A RP HPLC-System (Shimadzu, Kyoto, Japan) entsalzt. Die Bestimmung der Aminosäuresequenz nach Edman (Edman & Begg, 1967) erfolgte an einem 476 A Gasphasen-

Sequenzier von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

2.3.32 Massenspektroskopie

Die massenspektroskopischen Analysen wurden freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

Für die Massenbestimmung mittels Elektrospray Massenspektroskopie wurden die Proteinlösungen auf eine in mit 0,1 % (v/v) TFA äquilibrierte *Reversed Phase* HPLC-Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0 bis 80 % Acetonitril eluiert. Die so entsalzte Proteinlösung wurde direkt in die Elektrospray-Quelle bei 4 µl/min injiziert. Die ESI-Spektren wurden an einem Esquire-LC Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen) aufgenommen. Als Lösungsmittel diente ein Acetonitril-Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1 in 1 % Ameisensäure.

2.3.33 Analyse der Disulfidverbrückung des nGLP-1R

Die Bestimmung der Disulfidverbrückung des nGLP-1R erfolgte in Kooperation mit Dr. M. Wozny und D. Reusch (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg). Der rückgefaltete und aufgereinigte nGLP-1R wurde bei einer Konzentration von ca. 50 µg/ml in 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 7,8 einer chemotryptischen Verdau (6 µg Chymotrypsin, 16 h, 37 °C) unterzogen. Nach der Verdau wurden die Fragmente mittels *Reversed Phase* HPLC an einer YMC ODS-AQC 18 Säule (Porengröße 120 Å, Partikelgröße 5 µm, Säulenlänge 25 cm, innerer Durchmesser 1 mm) aufgetrennt. Die Elution erfolgte bei 35 °C mit einem linearen Gradienten von 0 bis 80 % Acetonitril (Laufmittel A: 0,1 % (v/v) TFA, Laufmittel B: 80 % Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA in Wasser, Steigung des Gradienten: 0,67 % B/min, Flussrate: 50 µl/min).

Die on-line-Detektion disulfidverbrückter Fragmente erfolgte nach Methode von Tannhauser und Mitarbeitern (Tannhauser *et al.*, 1987) mittels einer Nachsäulenderivatisierung. Dabei wurden im Reaktionsgemisch zuerst vorhandene Disulfidbrücken durch Sulfitolyse gespalten (Gleichung 4) und die entstandenen Thiolat-Anionen mit 2-Nitro-5-Thiosulfobenzoat (NTSB) umgesetzt (Gleichung 5).



Nach einer 1 minütigen Reaktionszeit wurde das Reaktionsprodukt 2-Nitro-5-Thiobenzoat (NTB) spektrophotometrisch bei 432 nm detektiert.

Zur Untersuchung und Identifikation der Fragmente wurde ein zweiter HPLC-Lauf mit dem Protease-Verdau-Ansatz durchgeführt, bei dem die disulfidverbrückten Fragmente gesammelt und der N-terminaler Sequenzierung unterzogen worden.

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Herstellung der Expressionsklone

3.1.1 Klonierung des nGLP-1R

Zu Beginn der Arbeiten an der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors waren einige Hinweise bekannt, dass die N-terminale extrazelluläre Domäne einiger Vertreter der Unterklasse B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wie PACAP-, PTH-, VIP-Rezeptoren, an der Ligandenbindung beteiligt sind (Gallwitz *et al.*, 1996; Graziano *et al.*, 1996; Van Eyll *et al.*, 1996). Im Falle des GLP-1 Rezeptors, gab es Daten zur Expression der isolierten N-terminalen Domäne des Ratten GLP-1 Rezeptors in *E. coli*, für die eine Ligandenbindung nachgewiesen werden konnte. Leider war bei diesem Ansatz aufgrund der geringen Ausbeute an nativem Protein eine biochemisch-biophysikalische Charakterisierung des Rezeptorfragmentes nur unzureichend möglich (Wilmen *et al.*, 1996).

Für die rekombinante Herstellung des nGLP-1R wurde das pQE-Expressionssystem von Qiagen gewählt, da eine Expression der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors in einem pET-Vektor mit T7-Promotor fehlgeschlagen war (persönliche Kommunikation mit Dr. Wilmen). Die Expression im pQE System erfolgt unter der Kontrolle des T5-Promotors, welcher im Vergleich zum T7-Promotor als schwächerer Promotor beschrieben wird. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Konstrukte zur Expression der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Klonierungskonstrukte des nGLP-1R

Nr.	Klon	Vektor	Expression
I	MRGSHHHHHHGSACEL-nGLP-1R(21-146 aa)-GRKRKRKRK	pQE30	+
II	MR-nGLP-1R(21-146 aa)-GRKRKRKRK	pQE70	-
III	MR-nGLP-1R(21-146 aa)	pQE70	-
IV	MRGSHHHHHHDDDDKGS-nGLP-1R(21-146 aa)	PQE30	+
V	MRGSHHHHHHGS-nGLP-1R(21-146 aa)-	PQE30	+

Zur Klonierung des nGLP-1R wurde die kodierende Sequenz des humanen GLP-1 Rezeptors von Ala21 bis Tyr146 mittels PCR amplifiziert und in das Plasmid pQE30 bzw. pQE70 inkloniert. Als N-terminale Aminosäure wurde Ala21 ausgewählt, da sie die erste Aminosäure nach der putativen Signalsequenz des GLP-1 Rezeptors darstellt (Kommunikation mit Dr. Wilmen und Datenbankrecherche zu Beginn der Arbeiten), und als C-terminale Aminosäure wurde Tyr146 in der Annahme ausgewählt, dass sie die Aminosäure darstellt, die sich direkt vor der ersten Transmembranhelix befindet.

Eine positive Expression im Molekulargewichtsbereich des Zielproteins konnte nur bei den Klonen I, IV und V mit N-terminalem 6xHistidin-*tag* auf einem SDS-Gel detektiert werden. Die Klone II und III ohne His-*tag* zeigten keine Expression des gewünschten Proteins. Somit erwies sich der N-terminale

His-tag erwies sich für die Überexpression der extrazellulären Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors als unerlässlich

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde mit Klon I gearbeitet. Daher wird im folgenden nur noch auf diesen Klon eingegangen. Dieses Konstrukt wurde als p(nGLP-1R-k1) bezeichnet und enthält die extrazelluläre Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors mit einem N-terminalen 6xHistidintag, der die Reinigung über Ni-NTA ermöglicht, und einem polyionischem Tag, bestehend aus 4 Argininen und 4 Lysin. Der C-terminale Tag war für eine Faltung des Zielproteins an einer Matrix vorgesehen. Durch die Klonierung in den pQE30-Vektor wurden am N-Terminus des Proteins 16 zusätzliche Aminosäuren eingeführt, unter anderem ein zusätzliches Cystein. Da der N-Terminus des GLP-1 Rezeptors 6 konservierte Cysteinreste enthält, und unklar war, wie sich ein zusätzliches Cystein auf die Faltung des Proteins auswirken könnte, wurde dieses Cystein mit seinen 3 benachbarten Aminosäuren mittels gerichteter Mutagenese deletiert. Die Proteinsequenz des endgültigen Konstrukts p(nGLP-1R) ist in der Abbildung 11 dargestellt. Die Plasmidkarte ist in der Abbildung 14A zu sehen.

```
MRGSHHHHHHGS-AGPRPQGATVSLWETVQKWREYRRQCQRLTED
PPARDLFCNRTFDEYACWPDGEPGSFVNVSCPWYLPWASSVPQGH
VYRFCTAEGWLQKDNSLPWRDLSECEESKRGERSWGEEQLFLY
-GRKRKRKRK
```

Abbildung 11. Die Aminosäuresequenz des nGLP-1R. Die kodierende Sequenz des GLP-1 Rezeptors ohne der putativen Signalsequenz ist in **fett** dargestellt; in *kursiv*: die eingefügten Tags

3.1.2 Klonierung des His-Liganden (p(GLP-1))

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der natürliche Ligand des GLP-1 Rezeptors, das *Glucagon-like Peptide-1*, in *E. coli* exprimiert. Dazu wurde im ersten Schritt die Aminosäuresequenz des Peptids in eine DNA-Sequenz umgeschrieben. Hierzu wurde die Aminosäuresequenz der *Codon Usage* von *E. coli* angepasst, d. h. für jede Aminosäure wurde ein in *E. coli* am häufigsten vorkommendes genetische Kodontriolett ausgesucht (Andersson & Kurland, 1990). Anschließend wurde dieses Gen aus 2 synthetischen Oligonukleotiden zusammengestellt, mittels PCR amplifiziert und in das Plasmid pET34b zur Zellulose-Bindungsdomäne (CBD) über die LIC-PCR-Methode anfusioniert (Aslanidis & de Jong, 1990). Das entstandene Fusionsprotein enthält einen C-terminalen 8xHistidintag, welcher über einen 26 Aminosäurenlinker mit dem Peptid verbunden ist. Dieser Linker enthält unter anderem ein zusätzliches Methionin. Für die Herstellung des Peptids war eine Bromcyanspaltung an einem Methionin am N-Terminus des Peptids vorgesehen. Das zusätzliche Methionin im Linker würde zur Wegspaltung des His-tags führen. Daher wurde der Linkerbereich auf 9 Aminosäuren verkürzt. Diese Verkürzung erfolgte durch eine Doppelverdau des Konstrukts im Linkerbereich mittels *NcoI*- und *XhoI*-Restriktionsendonukleasen. Die nach der Verdau neuentstandenen Überhänge wurden mit

Klenow DNA-Polymerase-Fragment auf glatte Enden aufgefüllt und diese wiederum zusammenligiert. Dieses Plasmid wurde in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und wurde als p(GLP-1) bezeichnet. Die Plasmidkarte des Konstrukts ist in der Abbildung 14B dargestellt.

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRPGLLLNHVEHHHHHHHH

Abbildung 12. Die Aminosäuresequenz des rekombinanten GLP-1-8His. Die kodierende Sequenz des Peptids ist in **rot** und die zusätzlichen Reste sind in **schwarz** dargestellt.

3.1.3 Klonierung der Rezeptor-Ligand-Chimäre (p(RL))

Um die Stabilität des Rezeptorfragments durch Ligandenbindung zu erhöhen, wurde in einem weiteren Konstrukt die extrazelluläre Domäne des GLP-1 Rezeptors mit dem natürlichen Ligand über einen Linker bestehend aus 12 Aminosäuren verknüpft (Abbildung 13).

MRGSHHHHHHGS - **AGPRPQGATVSLWETVQKWREYRRQCQRSLTED**
PPARDLFCNRTFDEYACWPDGEPGSFVNVSCPWYLPWASSVPQGH
VYRFCTAEGWLQKDNSSLPWRDLSECEESKRGERSWGEEQLLFLY
 - *VDSSSPSPSPSP* - **HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR**

Abbildung 13. Aminosäuresequenz der Rezeptor-Ligand-Chimäre. In **kursiv** sind His-tag und der Linker zwischen Rezeptor und Ligand, in **schwarz** die Rezeptorsequenz und in **rot** die kodierende Sequenz des Liganden dargestellt.

Für die Klonierung der Chimäre wurde zuerst in das Plasmid p(nGLP-1R) hinter der kodierenden Sequenz der N-terminalen Domäne des Rezeptors eine *SalI*-Restriktionschnittstelle mittels gerichteter Mutagenese eingeführt. Das so entstandene Zwischenkonstrukt wurde als p(nGLP-1R-*SalI*) bezeichnet (Plasmidkarte siehe Abbildung 14C). Die kodierende Sequenz des Peptids wurde mittels PCR aus dem Fusionskonstrukt p(GLP-1) amplifiziert und in das Plasmid p(nGLP-1R-*SalI*) über die Restriktionsschnittstellen *SalI* und *HindIII* kloniert (Plasmidkarte in der Abbildung 14D). Alle Klonierungsschritte von Abschnitten 3.1.1-3.1.3 sind in der Abbildung 14 zusammengefasst dargestellt. Die Richtigkeit aller Konstrukte wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

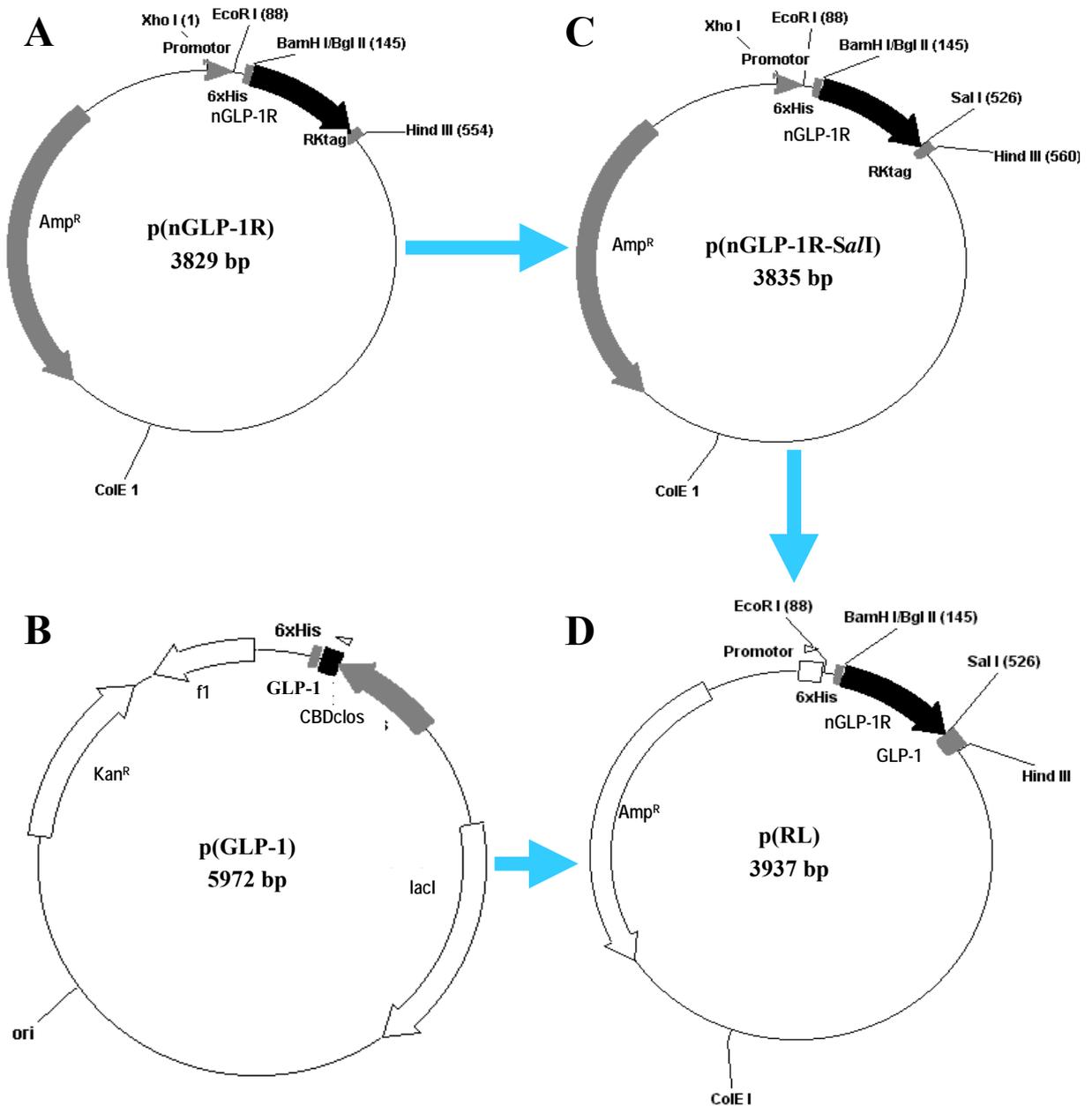


Abbildung 14. Klonierungsschritte der N-terminalen Domäne des GLP-1 Rezeptors, des Fusionsproteins CBD-GLP-1 und der Rezeptor-Ligand-Chimäre aus nGLP1 und GLP1.

A: p(nGLP-1R), Expressionsplasmid der N-terminalen Domäne des GLP-1 Rezeptors; B: p(GLP-1), Expressionsplasmid des Fusionsproteins CBD-GLP-1; C: p(nGLP-1R-SalI), Zwischenkonstrukt zur Expression der Rezeptor-Ligand-Chimäre, bestehend aus p(nGLP-1R) + SalI-Restriktionsschnittstelle; D: p(RL), Expressionsplasmid der Rezeptor-Ligand-Chimäre aus nGLP-1R und GLP-1.

3.2 Proteinexpression

Die Expression der N-terminalen extrazellulären Domäne des GLP-1 Rezeptors und der Rezeptor-Ligand-Chimäre erfolgte nach Transformation der entsprechenden Plasmide in *E. coli* M15 unter Kontrolle des T5-Promotors. Um ausreichende Mengen an Zielprotein zu erhalten, erfolgte die Expression mittels *fed-batch* Fermentation. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine starke Expression disulfidverbrückter Proteine im Cytoplasma von *E. coli* zur Ausbildung von unlöslichem Protein in Form von *Inclusion Bodies* (IBs) führt (Marston, 1986). Da die N-terminale Domäne des GLP-1 Rezeptors 6 konservierte Cysteine enthält wurden beide Proteine in unlöslicher Form exprimiert. In beiden Fällen konnte das rekombinante Protein stark überexprimiert werden. Bis zu 40 % der gesamten *E. coli* Zellproteine entfiel auf das entsprechende Zielprotein. Demnach konnten aus 700-800 g *E. coli* Zellen 10-15 g *Inclusion Body*-Protein isoliert werden. Die isolierten IBs wurden mit GdmHCl unter streng reduzierenden Bedingungen solubilisiert und im Anschluss daran renaturiert.

Das Fusionsprotein CBD-GLP1-8His wurde in *E. coli* BL21(DE3) ebenfalls in Form von *Inclusion Bodies* unter der Kontrolle des T7-Promotors exprimiert. Die Biomasse des exprimierenden Stammes wurde mittels *fed-batch* Fermentation hergestellt.

In Abbildung 15 ist die Expression der Proteine dargestellt.

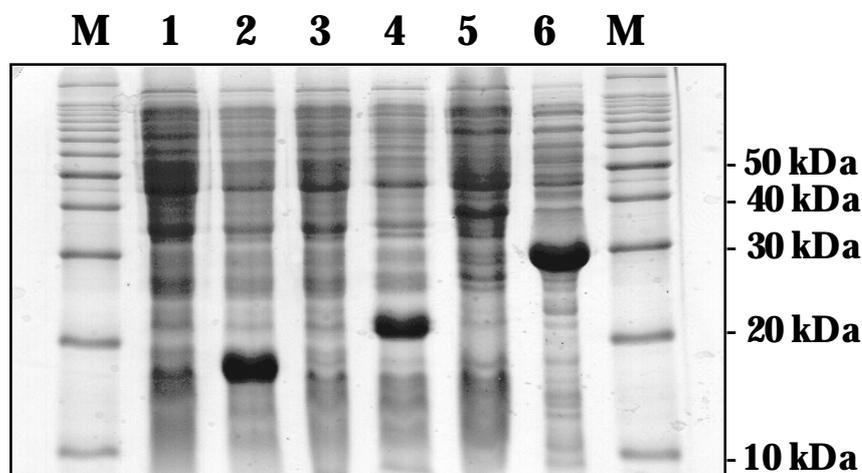


Abbildung 15. Expression von nGLP-1R, CBD-GLP-1-6His und RL. Die Proteinexpression erfolgte durch Induktion mit 1 mM IPTG 4h bei 37 °C. **M**: Molekulargewichtsmarker; **1, 3, 5**: nicht induzierte Zellen; **2**: M15 (p(nGLP-1R)) nach einer vierstündigen Induktion mit 1 mM IPTG; **4**: M15(p(RL)) nach der 4 h Induktion; **6**: BL21 (p(GLP-1)) nach einer 3stündigen Induktion mit 1 mM IPTG.

3.3 Renaturierung des nGLP-1R

3.3.1 Vorversuche

3.3.1.1 Auswahl der niedermolekularen Renaturierungspufferzusätze

Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, ob und bei welchen Bedingungen sich der nGLP-1R in eine native Struktur überführen lässt, wurde zunächst die Löslichkeit des nGLP-1R unter unterschiedlichen Pufferbedingungen getestet (Abbildung 16). Die Renaturierung des nGLP-1R erfolgte mittels 1:100 Verdünnung in einen Renaturierungspuffer mit unterschiedlichen niedermolekularen Zusätzen. Zur Ausbildung der korrekten Disulfidverbrückung wurde der Renaturierungspuffer mit einem *Redox-Shuffling*-System aus reduziertem und oxidiertem Gluthathion versetzt (Rudolph *et al.*, 1998).

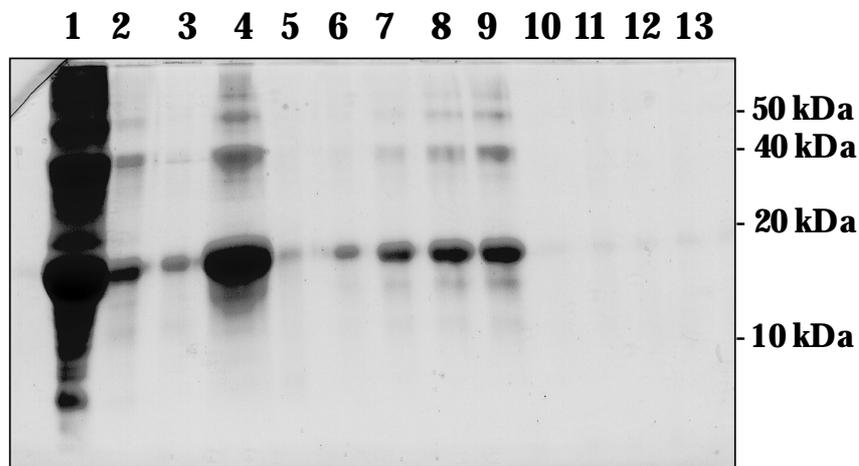


Abbildung 16. Analyse der Löslichkeit der nGLP-1R nach Renaturierung in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM GSH, 1 mM GSSG) unter Zusatz folgender Agenzien.: **2:** 1M NaCl; **3:** 0,5 M NaCl; **4:** 0,5 M L-Arginin; **5:** 20 % (w/v) Glycerol; **6:** 0,5 M Harnstoff; **7:** 0,5 M GdmHCl; **8:** 0,6 M Tris; **9:** 0,9 M Tris; **10:** ohne Zusätze; **11:** 0,5 M L-Arginin (ohne GSH/GSSG); **12:** 0,9 M Tris (ohne GSH/GSSG); **13:** 1 M NaCl (ohne GSH/GSSG); **1:** Ausgang der Renaturierung.

Die höchste Ausbeute an löslichem Protein wurde durch Zusatz von 0,5 M L-Arginin erreicht (Tabelle 6). Ohne Zusatz von niedermolekularen Faltungshelfern bzw. ohne *Redox-Shuffling*-System konnte kein Protein in Lösung erhalten werden.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen erfolgte eine Optimierung der Renaturierungsbedingungen für den nGLP-1R mittels *Reversed Phase* HPLC (RP-HPLC).

Tabelle 6: Untersuchung der Löslichkeit des nGLP-1R unter Zusatz von Faltungshelfern:

Renaturierungspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM GSH, 1 mM GSSG) mit Zusatz von	Lösliche Fraktion der Renaturierung
kein Additiv	<1 %
1 M NaCl	≈10 %
0,5 M NaCl	≈5 %
0,5 M L-Arginin	≈60 %
20 % (w/v) Glycerol	≈3 %
0,5 M Harnstoff	≈5 %
0,5 GdmHCl	≈10 %
0,6 M Tris	≈8 %
0,9 M Tris	≈15 %
Renaturierungspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, ohne GSH/GSSG) mit Zusatz von	Lösliche Fraktion der Renaturierung
0,5 M L-Arginin	<1%
0,9 Tris-HCl	<1%
1 M NaCl	<1%

3.3.1.2 Identifizierung der Elutionspeaks des denaturierten und nativen nGLP-1R mittels RP-HPLC

Als Standardprotein für denaturiertes Protein wurden die vollständig reduzierten *Inclusion Bodies* verwendet. Um die Retentionszeit der nativen Proteinspezies zu definieren wurde zunächst eine Reinigungsprozedur des Proteins (beschrieben in Abschnitt 3.3.3) mit RP-HPLC dokumentiert. Das Protein wurde in 0,5 M Arginin, 0,1 M Tris, 1 mM EDTA und 5 mM GSH/1 mM GSSG bei 15 °C 16 h renaturiert und anschließend aufgereinigt. Bei jedem Reinigungsschritt wurden Proben entnommen und mittels RP HPLC untersucht. Die Elutionspeaks des nativen und des denaturierten Proteins konnten eindeutig identifiziert werden (Abbildung 17). Das denaturierte Protein eluierte von der Säule ca. 15 min und das native Protein zeigte weniger hydrophobere Eigenschaft und eluierte bei ca. 13 min.

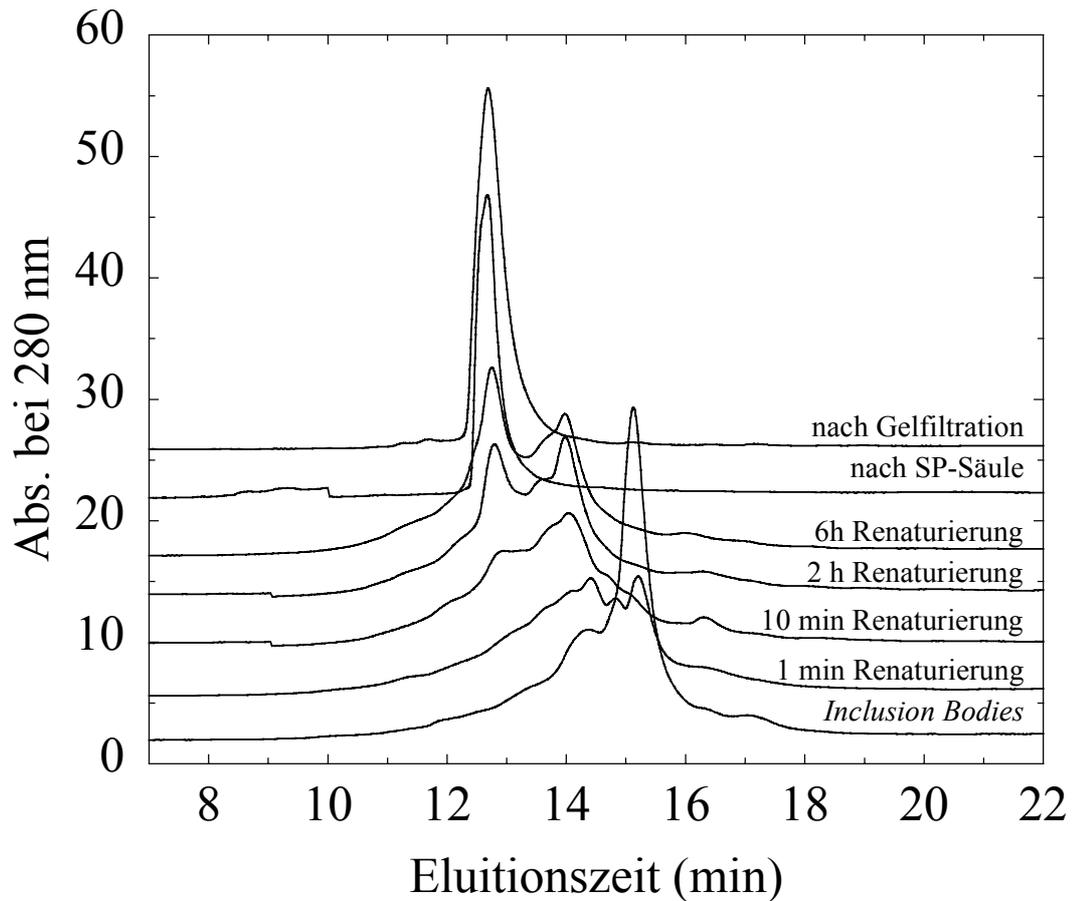


Abbildung 17. *Reversed Phase* HPLC-Chromatogramme von denaturiertem und renaturiertem nGLP-1R. Es wurden jeweils ca. 7 μg Protein auf eine Poros 10 R1-Säule aufgetragen und durch einen nicht linearen Gradienten (0-5 min: 0-20 % B; 5-25 min: 20-80 % B; 25-30 min: waschen mit 100 % B) eluiert (Puffer A: 0.1 % (v/v) TFA; Puffer B: 0.1 % (v/v) TFA und 80 % Acetonitril).

3.3.1.3 Quantifizierung der Renaturierungsausbeuten

Zur Quantifizierung der Renaturierungsausbeuten wurde eine Eichung der HPLC-Säule mit rückgefaltetem und aufgereinigtem nGLP-1R durchgeführt. Die Menge an nativem Protein wurde über die Größe der Peakfläche aus den HPLC-Chromatogrammen ermittelt. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit dem Programm PeakFit V 2.01. In der Abbildung 18 sind die Eichgerade und die entsprechenden Chromatogramme dargestellt. Der lineare Bereich der Eichgerade lag zwischen 1-7,5 μg nGLP-1R. Ab einer Proteinmenge über 7,5 μg wurde der Trennvermögen der Säule negativ beeinträchtigt und unter 1 μg wurde eine Verschiebung des Elutionspeaks beobachtet.

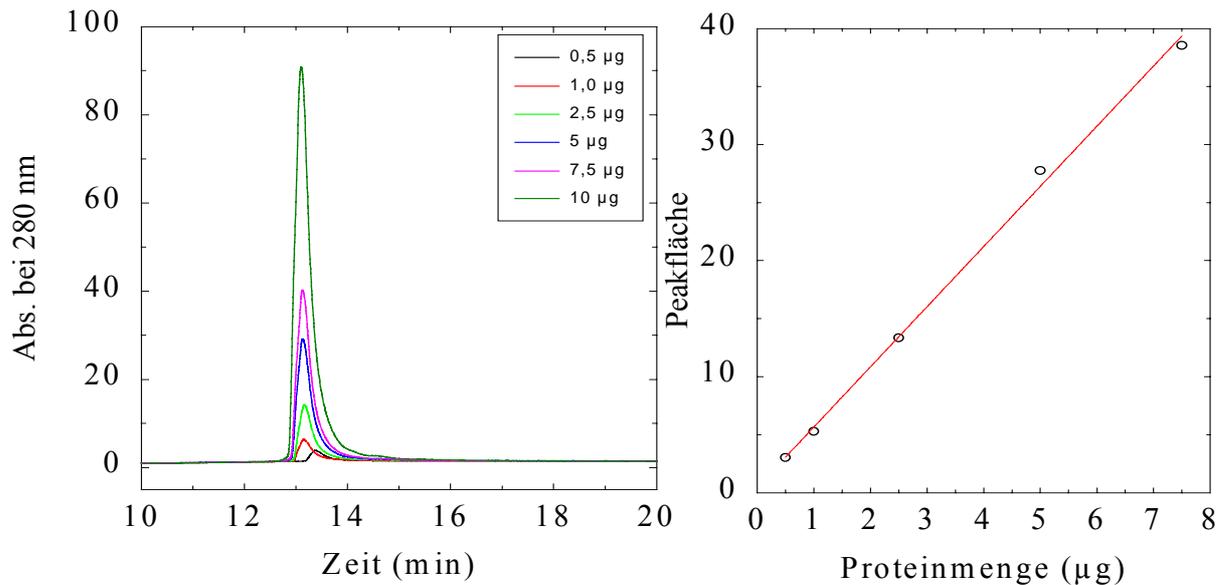


Abbildung 18. RP-HPLC-Chromatogramme und Eichgerade zur Quantifizierung der Renaturierungsausbeuten von nGLP-1R. Bekannte Mengen an rückgefaltetem und aufgereinigtem nGLP-1R wurden auf eine Poros 10 R1-Säule aufgetragen und durch nicht linearen Gradienten (0-5 min: 0-20 % B; 5-25 min: 20-80 % B; 25-30 min: waschen mit 100 % B) eluiert (Puffer A: 0.1 % (v/v) TFA; Puffer B: 0.1 % (v/v) TFA und 80 % Acetonitril).

3.3.2 Faltungsoptimierung der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors

Nach der eindeutigen Identifizierung der nativen und der denaturierten Spezies, konnte die Renaturierung des Proteins bezüglich der Temperatur, Inkubationszeit, pH-Wertes, der GSH-, GSSG-, sowie Argininkonzentration optimiert werden.

3.3.2.1 Kinetik der Renaturierung des nGLP-1R

Aus der Literatur ist bekannt, dass mit zunehmender Temperatur die Geschwindigkeit der Faltung aber auch die Hydrophobizität und damit verbundene Aggregation von Proteinen zunehmen. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Inkubationszeit und der Temperatur auf die Faltung des Rezeptorfragmentes untersucht. Das Ziel bestand darin maximale Renaturierungsausbeute bei minimaler Inkubationszeit zu erreichen. Die Untersuchungen zur Kinetik zeigten eine relativ schnelle Faltung des nGLP-1R (Abbildung 19). Bereits nach 4-5 h war die Faltung abgeschlossen. Eine Steigerung der Renaturierungstemperatur von 10 °C auf 20 °C resultierte in einer Reduktion der Faltungsausbeute auf fast 10 %. In nachfolgenden Renaturierungsversuchen wurde für kleinere Ansätze bei 15 °C und für Großpräparationen bei 10 °C gearbeitet.

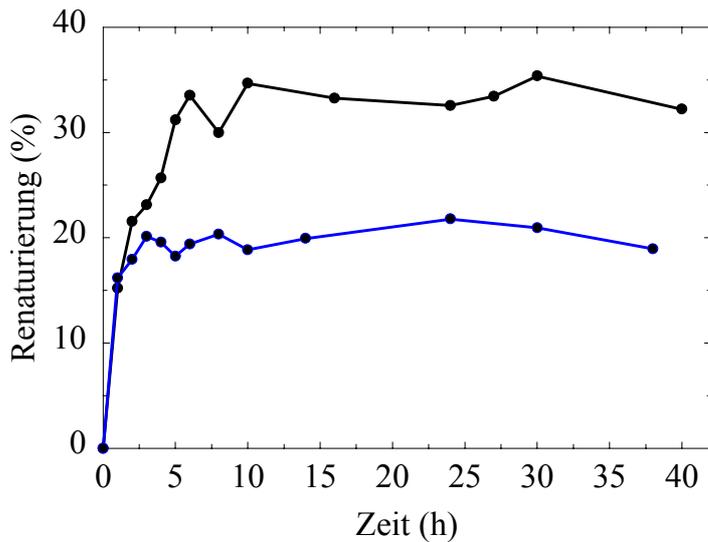


Abbildung 19. Kinetik der Renaturierung des nGLP-1R.

In **schwarz**: Renaturierung bei 10 °C;
in **blau**: Renaturierung bei 20 °C

3.3.2.2 Einfluss von GSH und GSSG auf die Renaturierung des nGLP-1R

Des Weiteren wurde die Rückfaltung bezüglich der Konzentration an oxidiertem und reduziertem Gluthathion im Faltungsansatz optimiert. Dazu wurde einmal der Einfluss ansteigender GSH-Konzentrationen bei konstanter GSSG-Konzentration auf die Renaturierungsausbeute bestimmt, sowie die Titration von GSSG zu einer konstanten Konzentration an GSH im Renaturierungspuffer durchgeführt (Abbildung 20).

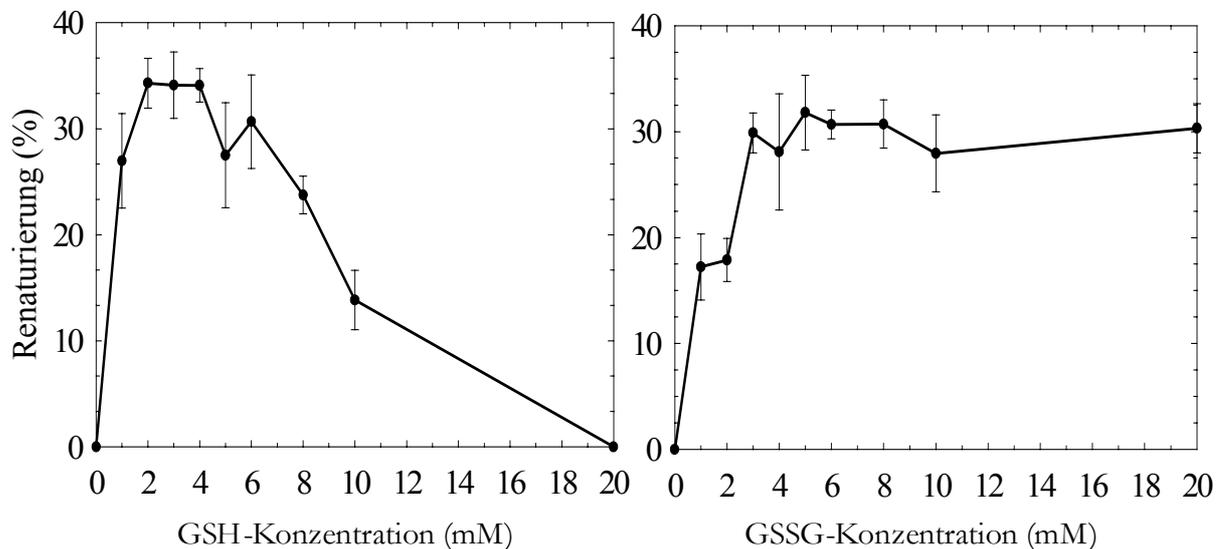


Abbildung 20. Renaturierungsausbeute an nGLP-1R bei unterschiedlichen GSH- bzw. GSSG-Konzentrationen. **A**: Faltung mit Zusatz von 5 mM GSSG und 0-20 mM GSH 20 h bei 15 °C. **B**: Faltung mit Zusatz 2 mM GSH und 0-20 mM GSSG 20 h bei 15 °C.

Diese Experimente haben gezeigt, dass für die Faltung des nGLP-1R mit korrekter und definierter Disulfidverbrückung der Zusatz von GSH und GSSG notwendig ist. Es wurden höhere Renaturierungsausbeuten bei einem Überschuss an GSSG zu GSH erreicht. Bereits bei einem 1:1 molaren Verhältnis von GSH zu GSSG sank die Renaturierungsausbeute um fast 0,8fache im

Vergleich zur maximalen Ausbeute. Ohne GSH bzw. GSSG und bei einem 10fachen molaren Überschuss von GSH zu GSSG konnte der Peak der nativen Spezies nicht detektiert werden.

3.3.2.3 Einfluss von Arginin auf die Renaturierung des nGLP-1R.

Der Einfluss von Arginin auf die Renaturierungsausbeute an nGLP-1R wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,1-1 M Arginin im Faltungspuffer bestimmt (Abbildung 21). Maximale Renaturierungsausbeute von ca. 35 % wurde bei Argininkonzentration zwischen 0,5 M und 0,7 M. Höhere Argininkonzentrationen führten sogar zu einer Senkung der Ausbeute an löslichem Protein.

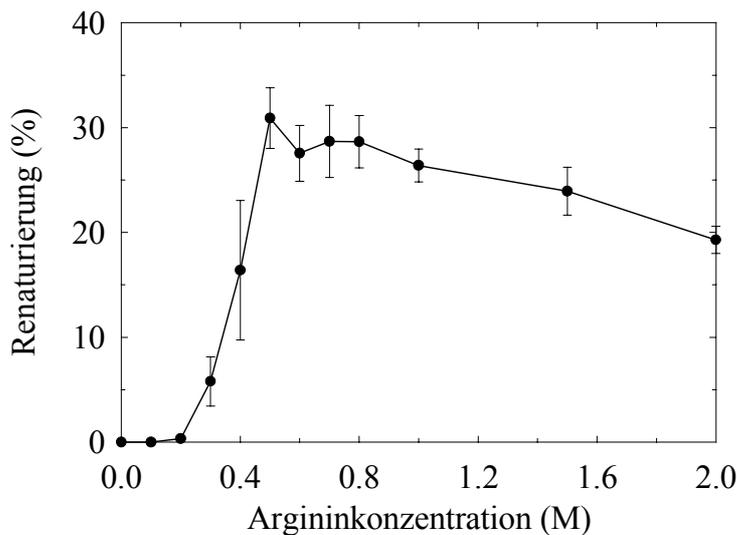


Abbildung 21.
Renaturierung des nGLP-1R mit Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen an Arginin mit einem Redox-System von 5 mM GSSG/2 mM GSH 20 h bei 15°C.

3.3.2.4 Abhängigkeit der Renaturierung des nGLP-1R vom pH-Wert

Bei der Variation des pH-Wertes des Faltungspuffers (Abbildung 22) zeigte sich ein pH-Optimum des Renaturierungspuffers zwischen 8 und 9.

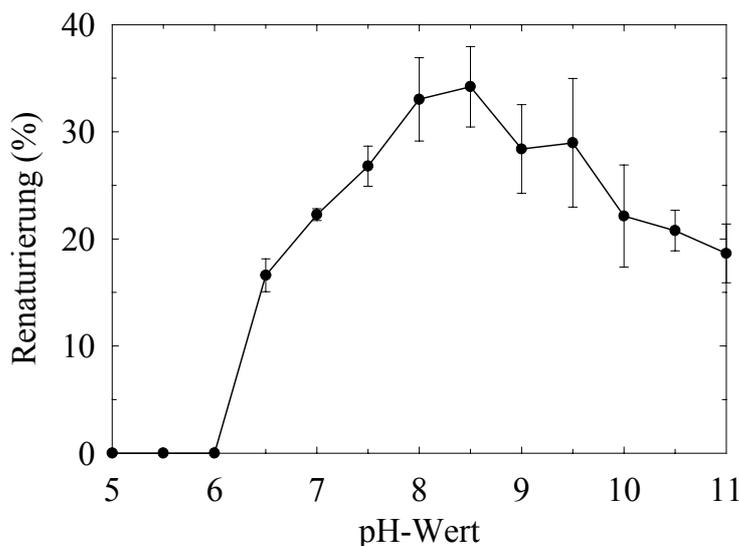


Abbildung 22.
Renaturierung des nGLP-1R bei unterschiedlichen pH-Werten in 0,5 M Arginin, 0,1 M Tris, 1 mM EDTA, 5 mM GSSG/2 mM GSH 20 h bei 15 °C.

Unter einem pH-Wert von 6,5 konnte kein natives Protein mehr detektiert werden. Die Ursache dafür ist darin zu suchen, dass bei niedrigen pH-Werten kein Disulfidaustausch stattfinden kann, wobei bei

der Renaturierung von disulfidverbrückten Proteinen die Ausbildung von korrekten Disulfidbrücken von ausschlaggebender Bedeutung ist.

3.3.3 Renaturierung und Reinigung von nGLP-1R

Ausgehend von den oben beschriebenen Optimierungsversuchen wurden folgende Faltungsbedingungen für den nGLP-1R definiert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Renaturierungsbedingungen des nGLP-1R

Renaturierungspuffer	0,5 M Arginin, 0,1 M Tris, 1 mM EDTA; pH 8.5
Redox-System	5 mM GSSG, 2 mM GSH
Inkubationstemperatur	10-15 °C
Renaturierungsdauer	> 4h

Die Renaturierung des nGLP-1R erfolgte durch Verdünnung der Proteinproben in den Renaturierungspuffer. Der Nachteil dieser Methode ist die niedrige Endkonzentration des Faltungsproduktes, was beim *up-scaling* in der Regel zu sehr großen Volumina der Renaturierungsansätze führt. Aus diesem Grund wurde für Großpräparationen von nGLP-1R eine Pulsrenaturierung des Proteins durchgeführt (Rudolph & Fischer, 1990). Bei dieser Methode wird das denaturierte Protein sukzessiv in den Rückfaltungsansatz zugesetzt. Die Zeitabstände zwischen 2 Pulsen sollten so gewählt werden, dass die Faltung des Proteins vom vorigen Puls möglichst vollständig abgeschlossen ist. Dadurch wird eine negative Beeinflussung der Faltung durch teilweise gefaltetes Protein vermieden. Die Anzahl der Pulse bei einer Pulsrenaturierung wird durch steigende Konzentration des Denaturierungsmittels im Ansatz limitiert. Zudem stellt die Proteinkonzentration im Faltungsansatz einen kritischen Punkt dar, bei welcher keine Steigerung der Renaturierungsausbeute mehr möglich ist. Unter Berücksichtigung der oben geschilderten Bedingungen wurde eine Pulsrenaturierung des nGLP-1R wie folgt durchgeführt (Abbildung 23). Insgesamt wurden 10 Pulse in Zeitabständen von 4 h gesetzt. Die Endkonzentration an GdmHCl betrug 400 mM. Die maximale Renaturierungsausbeute war unter den gewählten Bedingungen nach dem 6. Puls bei einer Proteinkonzentration von 180-200 µg/ml erreicht.

Ausgehend von den Ergebnissen aus diesem Vorversuch wurden in den folgenden Renaturierungsansätzen maximal 6 Pulse in Zeitabständen von 6 h gesetzt.

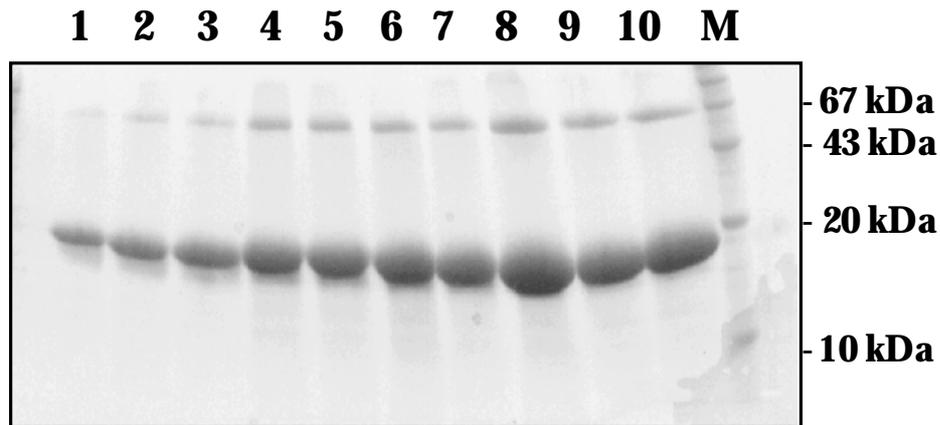


Abbildung 23. Pulsrenaturierung des nGLP-1R. Es wurde in 0,5 M Arginin, 0,1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5, 5 mM GSSG, 2 mM GSH bei 10 °C durch Zugabe von denaturiertem Protein (9 mg/ml) jede 4. Stunde renaturiert. Insgesamt wurden 10 Pulse zugegeben. Nach jedem Puls wurde eine Probe entnommen, bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wurde mittels SDS-PAGE analysiert. **M**: Molekulargewichtsmarker; **1-10**: Menge an löslichem Protein nach jedem Puls.

Nach einer 36-stündigen Renaturierung in einem Faltungsautomaten wurden ausgebildeten Aggregate durch Zentrifugation abgetrennt. Anschließend wurde der Renaturierungsansatz für die Bindung an S-Sepharose auf eine niedrige Salzkonzentration verdünnt. Die Bindung erfolgte hierbei im *batch*-Verfahren. Das Eluat wurde wiederum auf niedrige Salzkonzentration verdünnt und durch Verwendung einer SP-Sepharose-Säule weiter aufgereinigt. Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Das aufgereinigte Protein ist in der Abbildung 24B dargestellt. Es konnten ca. 15 % des Ausgangs-*Inclusion-Body*-Materials zu nativem Protein renaturiert und aufgereinigt werden

A

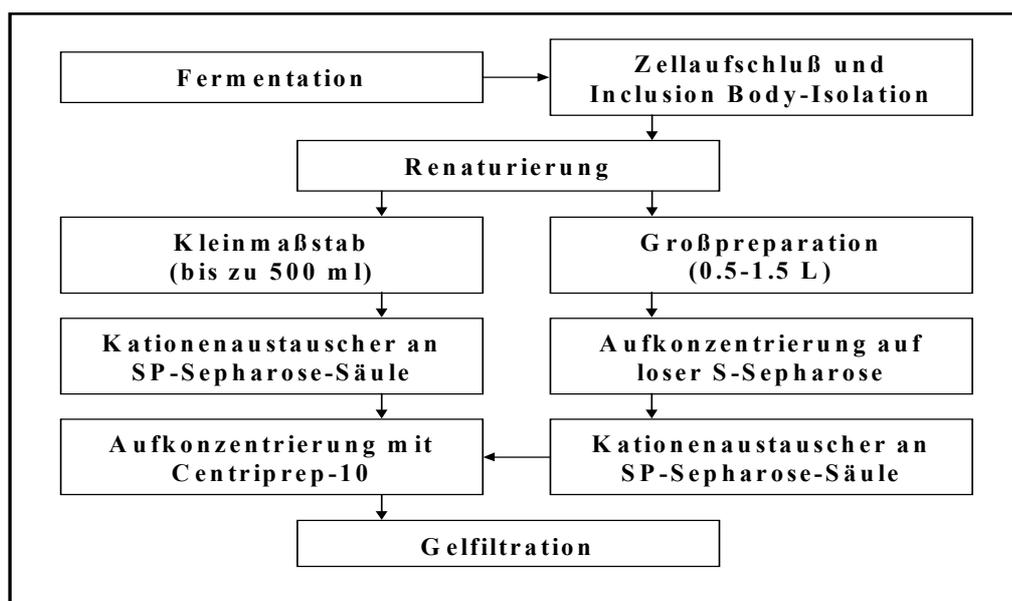


Abbildung 24A. Zusammenfassung der Aufarbeitungsschritte zur Herstellung des nGLP-1R

B

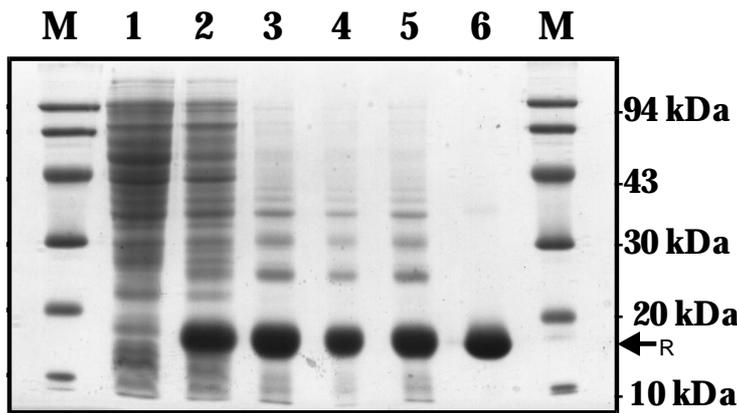


Abbildung 24B. Expression und Reinigung des nGLP-1R.

M: Molekulargewichtsmarker;

R: nGLP-1R;

1: nicht induzierte Zellen;

2: induzierte Zellen;

3: isolierte *Inclusion Bodies*;

4: lösliches Protein nach der Faltung;

5: unlösliche Fraktion der Faltung

6: aufgereinigtes Protein

(Eluat von der Gelfiltration)

3.4 Identität des rückgefalteten Proteins

Das rückgefaltete und aufgereinigte nGLP-1R wurde mittels Edman-Abbau einer N-terminalen Proteinsequenzierung unterzogen. Es konnten die ersten 14 Aminosäuren des rekombinanten Proteins identifiziert werden. Die Abfolge der identifizierten Aminosäuren lautete wie folgt: MRGSHHHHHGSAG. Damit stimmt die analysierte N-terminale Sequenz mit der des Zielproteins überein.

Zudem konnte die molekulare Masse des gereinigten Proteins wurde mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-Massenspektroskopie) eindeutig bestätigt werden (Abbildung 25). Das theoretische Molekulargewicht des nGLP-1R beträgt 17,132. Die Dekonvolution der ESI Massenspektren ergab die Existenz von dreier Spezies mit Molekulargewichten von 17,125 kDa, 17,143kDa und 17,158 kDa. Die gemessenen Werte stimmen somit mit dem theoretischen Wert im Rahmen der Messgenauigkeiten dieser Methode (Abweichung 0,03 % für Moleküle bis 150 kDa) überein. Eine mögliche Ursache in der Existenz von 3 unterschiedlichen Spezies könnte an der Anlagerung von Na⁺-Ionen an das Protein zu suchen sein.

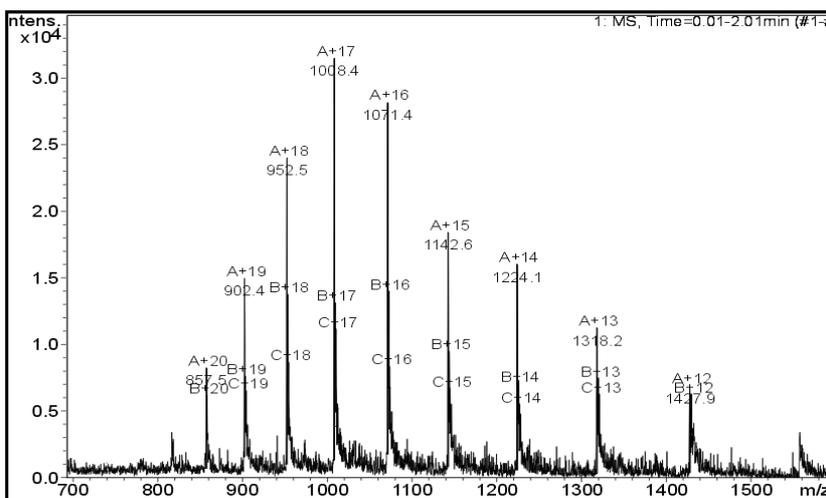


Abbildung 25. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrum des nGLP-1R.

Der Oligomerisierungszustand des renaturierten Proteins wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. In 10 mM Tris, 0,6 M NaCl, pH 7,5 wurde eine Neigung des Proteins zur Aggregation beobachtet, was bei einem Lauf von 41 h und dabei stattfindender Aufkonzentrierung des Proteins durchaus zu erwarten war. Aus diesem Grund wurde zur Stabilisierung des Proteins 0,25 M Arginin in den Laufpuffer gegeben und die Sedimentations-gleichgewichtsläufe des Proteins mit und ohne Zusatz von Arginin verglichen (Abbildung 26).

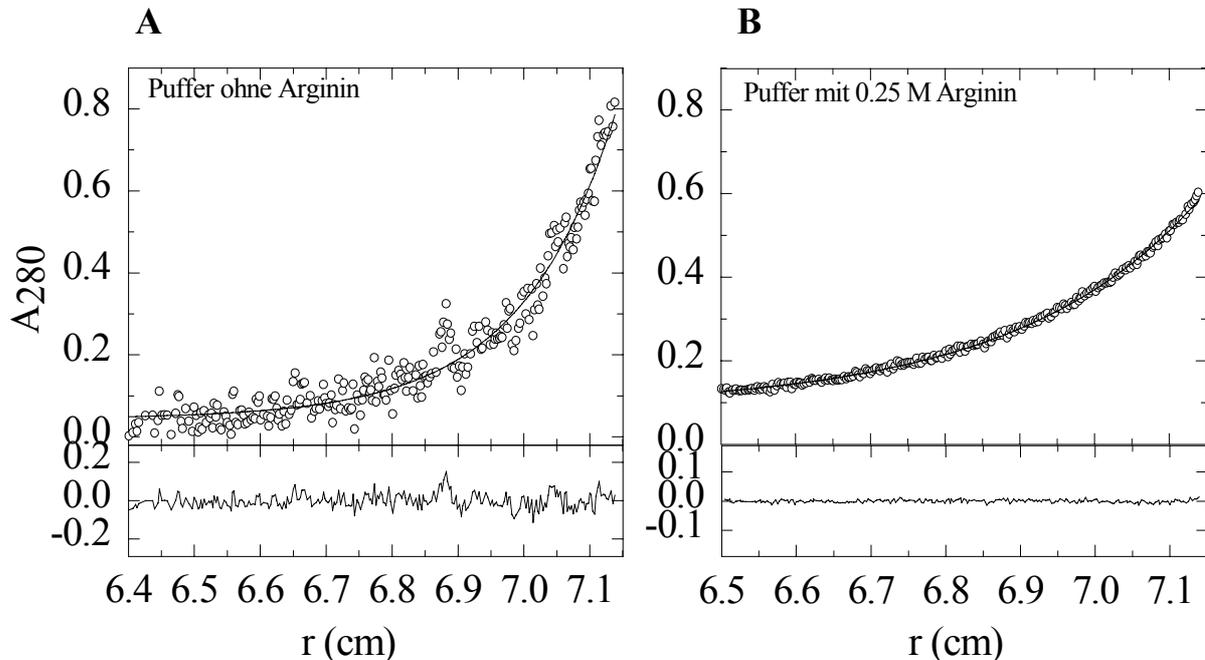


Abbildung 26. Analytische Ultrazentrifugation von renaturiertem und aufgereinigtem nGLP-1R. Das Sedimentationsgleichgewicht des nGLP-1R wurde bei 20000 rpm und 20 °C bei einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml in 10 mM Tris, 0,6 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 41 h (A) und in 10 mM Tris, 0,25 M L-Arginin-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 63 h (B) bestimmt.

Aus den Gleichgewichtsläufen bei 20000 rpm konnte der monomere Zustand des Proteins mit einem Molekulargewicht von 19,97 kDa in argininfreiem Puffer und 20,61 kDa im argininhaltigen Puffer ermittelt werden. Die gemessenen Molekularmassen weichen von dem theoretischen Molekulargewicht des Zielproteins von 17,1 kDa ab, liegen jedoch im Rahmen der Messgenauigkeit dieser Methode.

3.5 Bestimmung der Disulfidverbrückung des nGLP-1R

Die Verknüpfung der Cysteinseitenketten im renaturierten und gereinigten nGLP-1R wurden zunächst mittels Ellman's Test überprüft. Es konnten dabei keine freien Cysteinreste nachgewiesen werden, d. h. alle 6 Cysteine waren in Disulfidbrücken verknüpft. Die Homogenität dieser Disulfidverbrückung wurde mittels RP-HPLC nachgewiesen (siehe Abbildung 17). Die aufgereinigte N-terminale Domäne des GLP-1 Rezeptors konnte in einem homogenen Peak als nur eine Spezies von einer RP-HPLC-Säule eluiert werden.

Zur anschließenden Analyse der Disulfidverknüpfung wurde das Protein einem chymotryptischen Verdau unterzogen. Aus den entstandenen Fragmenten wurden die disulfidhaltigen identifiziert und mittels Edman-Abbau und Elektrospray-Massen-Spektroskopie analysiert. In Abbildung 27 sind die RP-HPLC-Chromatogramme der analytischen und präparativen Läufe des chymotryptischen Verdau des Proteins dargestellt.

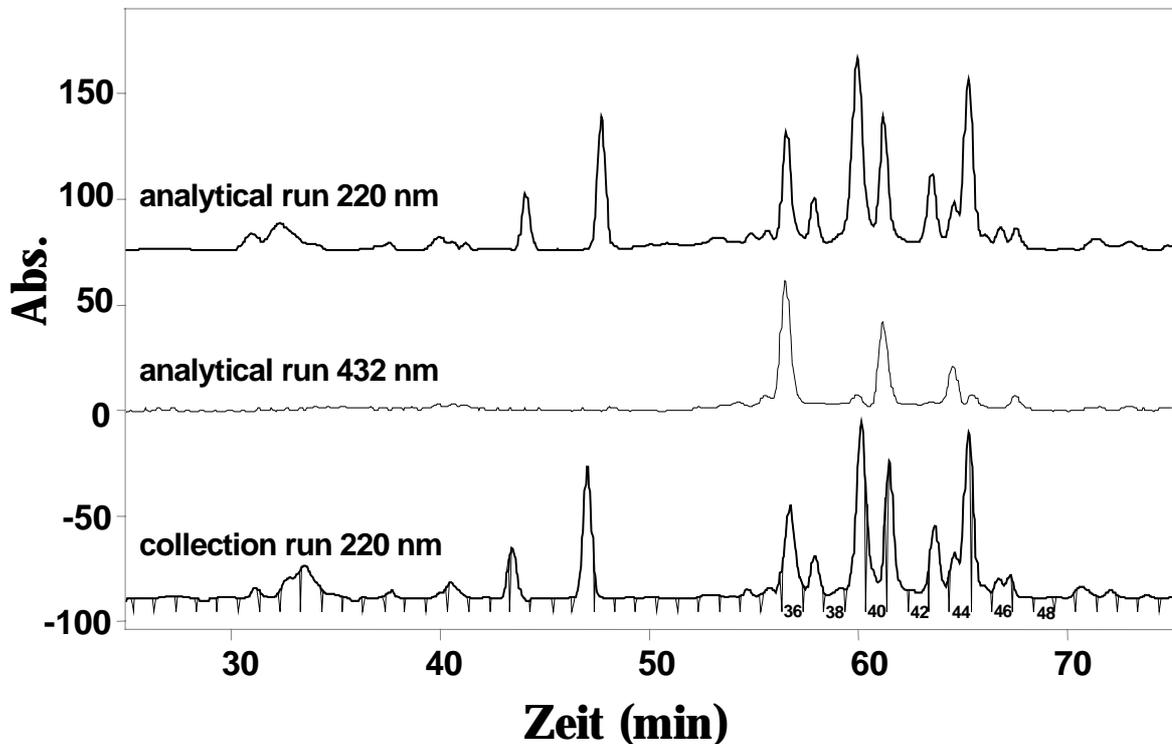


Abbildung 27. RP-HPLC-Chromatogramme der analytischen und präparativen Läufe der chymotryptischer Verdau des nGLP-1R.

Die disulfidhaltigen Fragmente wurden mittels einer Nachsäulenderivatisierung der Disulfidbrücken durch Sulfitolyse und Detektion der entstandenen Thiolatanionen durch Umsetzung mit DTNB identifiziert. Das Reaktionsprodukt dieser Umsetzung lässt sich bei 432 nm detektieren. Nach der Identifizierung wurden die disulfidhaltigen Peptide durch einen präparativen Lauf gesammelt und ansequenziert. In der Tabelle 8 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Fraktionen 36, 39, 41 und 44 von dem präparativen Lauf wurden jeweils 15 Abbauzyklen unterzogen und die erhaltenen Sequenzen konnten eindeutig der Sequenz des nGLP-1R zugeordnet werden. Alle 4 Fraktionen enthielten mehrere cyst(e)inhaltige Peptide, die sich zu einem einheitlichen Disulfidmuster zuordnen ließen. Es wurden 3 Disulfidbrücken im nGLP-1R identifiziert: Disulfidbrücken zwischen Cys46 und Cys71, zwischen Cys62 und Cys104 und zwischen Cys85 und Cys126.

Tabelle 8: N-terminale Sequenzierung der Cys(e)inhalteigenen Fraktionen des präparativen RP-HPLC-Laufes (siehe Abb. 27)

#	Anzahl der Abbauzyklen	nGLP-1R Sequenz ¹⁾	Menge ²⁾ (pmol)	Interpretation ³⁾
36	15	Y A-WPDGEPGSF	8	C ₄₆ -C ₇₁ Disulfidbrücke zwischen AC ₄₆ WPDGEPGSF und RRQC ₇₁ Q C ₆₂ -C ₁₀₄ Disulfidbrücke zwischen C ₆₂ NRTF und C ₁₀₄ TAEGLW
		Y RRQ-Q	8	
		F -N-TF	4	
		F -TAEGLW	4	
39	15	W LQKDNSLPW	20	LQKDNSLPW C ₄₆ -C ₇₁ Disulfidbrücke zwischen YAC ₄₆ WPDGEPGS... oder AC ₄₆ WPDGEPGSF und RRQC ₇₁ QR...
		E Y--WP-GE-GS	1	
		Y --WP-GE-GSF	1	
		Y RR--QR	2	
41	15	Y VNVS-PW	8	C ₈₅ -C ₁₂₆ Disulfidbrücke zwischen VNVSC ₈₅ PW und RDLSEEC ₁₂₆ EESKRGERS... TEDPPPATDLF
		W RDLSE-EESKRGERS	8	
		L TEDPPPATDLF	7	
44	15	F -N-TFDEY	6	C ₆₂ -C ₁₀₄ Disulfidbrücke zwischen C ₆₂ NRTFDEY und C ₁₀₂ TAEGLW YLPW
		F -TAEGLW	6	
		W YLPW	20	

- ¹⁾: Bestimmung der Aminosäure aufgrund des starken Hintergrundsignals nicht möglich; Übertragung von vorherigen Zyklen oder Anwesenheit einer Aminosäure mit niedriger Detektionseffizienz oder eines Cysteinrestes.
- X|: die der Sequenz vorangegangene Aminosäure
- ²⁾: abgeschätzt von der Ausbeute an korrespondierender Aminosäuresequenz; Ziffern in Fettdruck entsprechen den disulfidverbrückten Peptiden.
- ³⁾: kein definierter C-Terminus durch die Sequenzierungsergebnisse

Bei der Aufsummierung der zu den Disulfidbrücken zugehörigen Peptidmengen konnten keine Mengenunterschiede festgestellt werden, was eine Existenz von anderen alternativen Disulfidbrücken vollständig ausschließt.

Die gleiche Disulfidverbrückung konnte sogar im ursprünglichen Klon I (siehe Tabelle 5), welcher ein zusätzliches Cystein vor der kodierenden Sequenz des nGLP-1R enthielt, festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das deutet darauf hin, dass die Disulfidverbrückung der N-terminalen Domäne des GLP-1 Rezeptors kein statistischer Prozess war, sondern sogar bei Existenz eines zusätzlichen Cysteinrestes durch eine definierte Struktur determiniert wurde.

3.6 Biophysikalische Charakterisierung des nGLP-1R

3.6.1 Sekundär- und Tertiärstruktur des nGLP-1R

Das im Spektralbereich von 200 bis 260 nm durchgeführte Fern-UV-CD stellt eine gebräuchliche Methode zur Sekundärstrukturanalyse von Peptiden und Proteinen dar. Die Auswertung der gemessenen CD-Spektren hinsichtlich der Anteile an Sekundärstrukturelementen erfolgte mit dem

Programm CDNN (Böhm *et al.*, 1992). Das CD-Spektrum für den denaturierten nGLP-1R entsprach dem Spektrum einer vollständig entfalteten Polypeptidkette (Schmid, 1989). Spektren des Proteins unter denaturierten Bedingungen konnten aufgrund des starken Signals von GdmHCl nur von 211 nm bis 260 nm aufgenommen werden. Die Spektren von denaturiertem und nativem Protein zeigten große Differenzen in den Wellenlängenbereichen von 220 nm bis 240 nm, wobei der maximale Unterschied bei 222 nm lag. Das Spektrum für das native Protein weist ein Hauptminimum bei 210 nm auf (Abbildung 28). Aus dem CD-Spektrum für das native Protein konnten 30 % α -Helizes und 16 % β -Faltblattstruktur Anteile abgeschätzt werden.

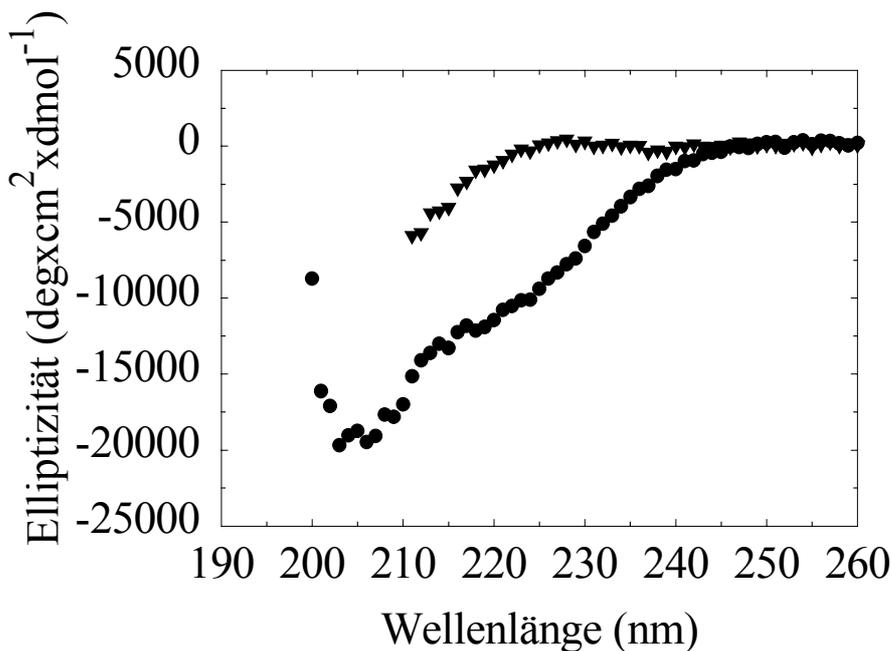


Abbildung 28. Fern-UV-CD-Spektrum des nGLP-1R. CD-Spektren von 5,8 μ M Protein in 0,7 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4 (●) und 7 μ M in 6 M GdmHCl, 20 mM Tris, pH 7,4 (►) wurden in einer 1 cm Küvette bei 1 nm Bandbreite und einer Integrationszeit von 5 s bei 22 °C gemessen.

Zur Untersuchung der Tertiärstruktur des Proteins wurden Nah-UV-CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 350 nm aufgenommen. Das Nah-UV-CD-Spektrum des nativen Proteins (Abbildung 29) zeigt deutliche Minima, was auf eine asymmetrische Umgebung von aromatischen Resten im Protein hinweist. Im Bereich von 270 nm bis 285 nm ist im Spektrum des Proteins eine Feinstruktur zu beobachten.

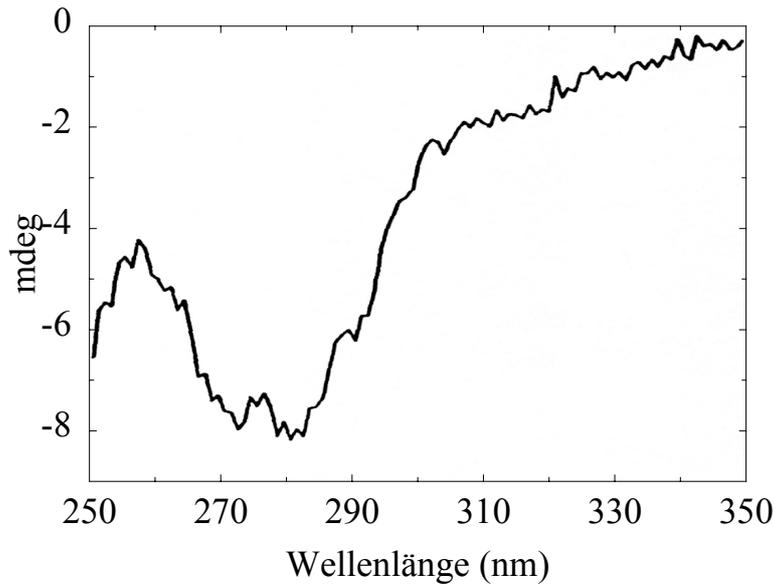


Abbildung 29. Nah-UV-CD-Spektrum des nGLP-1R.

CD-Spektrum einer 17,4 μM nGLP-1R-Lösung in 20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7,4 wurde in einer 5 cm Küvette mit einer Integrationszeit von 5 s und einer 1 nm Bandbreite bei 22 °C gemessen. Das Spektrum wurde siebenfach akkumuliert.

Zur weiteren Charakterisierung des nGLP-1R wurden Fluoreszenzspektren unter nativen und denaturierten Bedingungen aufgenommen (Abbildung 30).

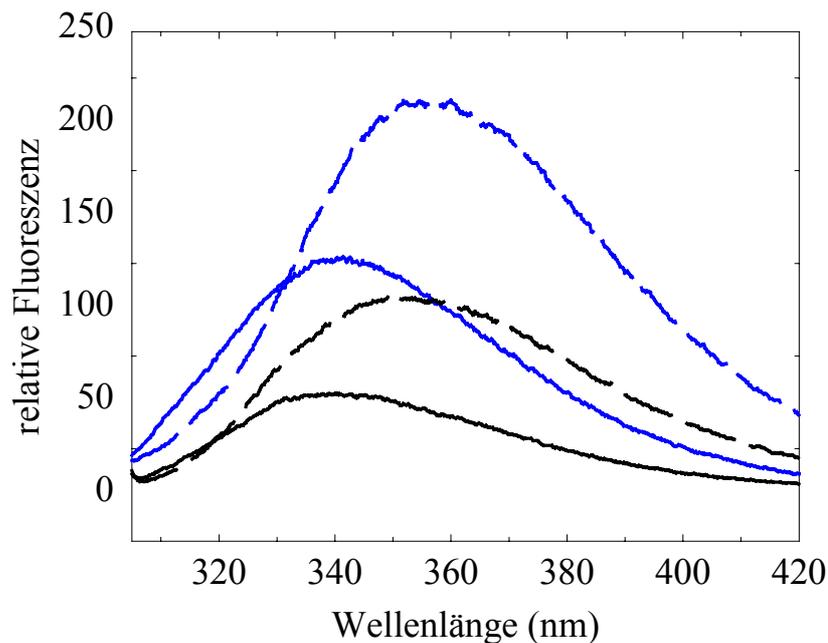


Abbildung 30. Fluoreszenzspektren von nGLP-1R im nativen und denaturierten Zustand. Spektren von 30 $\mu\text{g/ml}$ nGLP-1R in 50 mM Na-Phosphat, 0,5 M NaCl, pH 7,4 und in 6 M GdmHCl, 50 mM Na-Phosphat, pH 7,4 wurden an einem Hitachi F-4500 Spektrofluorimeter (Hitachi, Tokyo, Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und 295 nm mit einer Zeitkonstante von 0,2 s gemessen. (—): natives Protein nach Anregung bei 295 nm;

(---): denaturiertes Protein nach Anregung bei 295 nm; (—): natives Protein nach Anregung bei 280 nm; (---) denaturiertes Protein nach Anregung bei 280 nm.

Die Fluoreszenzspektroskopie an Proteinen gibt Aussagen über die Lösungsmittelexposition von Aromaten wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Es wurden Fluoreszenzspektren des nGLP-1R sowohl nach der Anregung von Tryptophanresten bei 295 nm als auch nach Anregung von allen 7 Tryptophan- und 5 Tyrosinenresten bei 280 nm aufgenommen.

Es konnten in beiden Fällen Emissionsmaxima für das native Protein bei 342 nm und für das denaturierte Protein bei 355 nm detektiert werden. Das Messsignal des Proteins unter denaturierenden

Bedingungen war deutlich stärker als das von nativem Protein. Diese Unterschiede in Emissionsmaxima und Fluoreszenzstärke deuten auf unterschiedliche Lösungsmittlexposition der Aromaten im Protein bei unterschiedlichen Bedingungen hin und somit auf eine ausgeprägte Tertiärstruktur des renaturierten Proteins.

3.6.2 Thermische Stabilität des nGLP-1R

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität des Proteins wurden *DSC-* (*Differential Scanning Calorimetry*) und Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Bei der Messung der Fluoreszenz bei 342 nm von 10 °C bis 85 °C konnte keine thermische Entfaltung des Proteins beobachtet werden. Es zeigte sich eine fast lineare Abnahme des Fluoreszenzsignals mit steigender Temperatur (Abbildung 31).

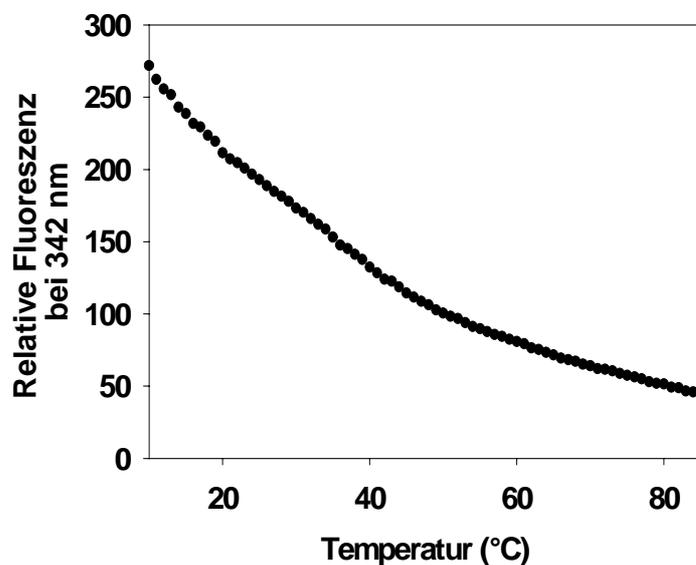


Abbildung 31. Abhängigkeit der Fluoreszenzemission des nGLP-1R von der Temperatur. 20 µg/ml Protein in 0,25 M Arginin, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4 wurde in einer 1 cm Küvette von 10 °C auf 80 °C erhitzt und dabei die Fluoreszenzemission bei 342 nm nach einer Anregung bei 280 nm gemessen.

Da die Fluoreszenzspektren über die thermische Entfaltung des Proteins keine Aussagen lieferten, wurden *Differential-Scanning-Calorimetry*-Messungen durchgeführt (Abbildung 32). Mittels DSC-Messungen konnte eine thermische Entfaltung des Proteins mit einer Schmelztemperatur von 44 °C und einer $\Delta H_{\text{Entfaltung}} = 74$ kcal/mol beobachtet werden. Die thermische Entfaltung des Proteins war teilweise reversibel. Die Ausgangsamplitude bei 44 °C von der 1. Messung wurde in der 2. Messung zu 72 % und in der 3. Messung zu 63 % erreicht.

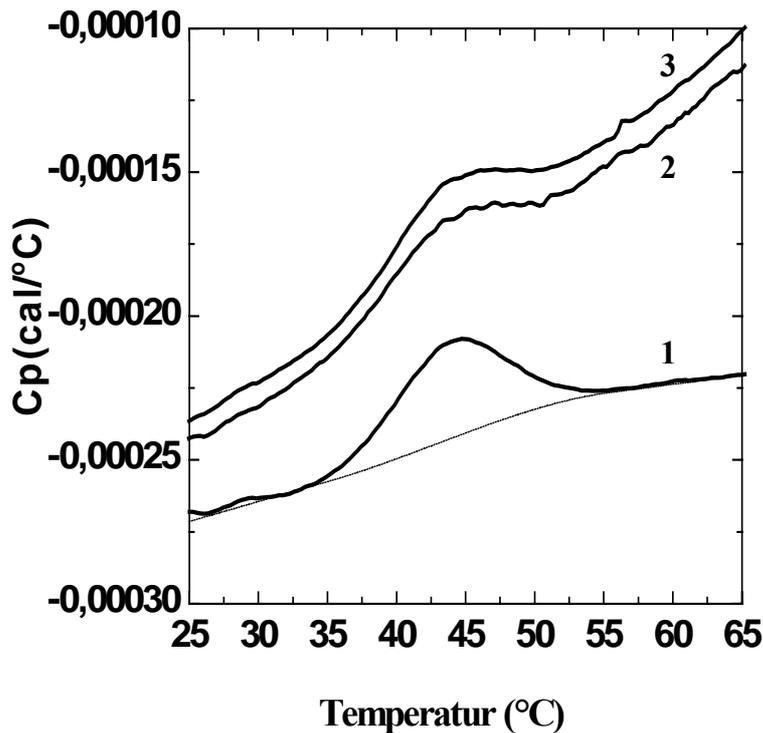


Abbildung 32. DSC-Spektrum des rückgefalteten und aufgereinigten nGLP-1R. Die thermische Entfaltung einer 0,3 mg/ml Proteinlösung in 0,6 M NaCl, 50 mM Na-Phosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 wurde in einem VP-DSC Mikrokalorimeter (Micro Cal, Inc., Northampton, USA) gemessen. Die Probe wurde mit einer Aufheizrate von 1 C/min von 15 °C auf 85 °C erhitzt. 1: erste Messung; 2: zweite Messung; 3: dritte Messung

3.6.3 Stabilität gegenüber Guanidinium

Die Stabilität des nGLP-1R gegen Denaturierung durch Guanidiniumchlorid in einem Konzentrationsbereich von 0 und 6 M wurde mittels CD-Spektroskopie bestimmt (Abbildung 33).

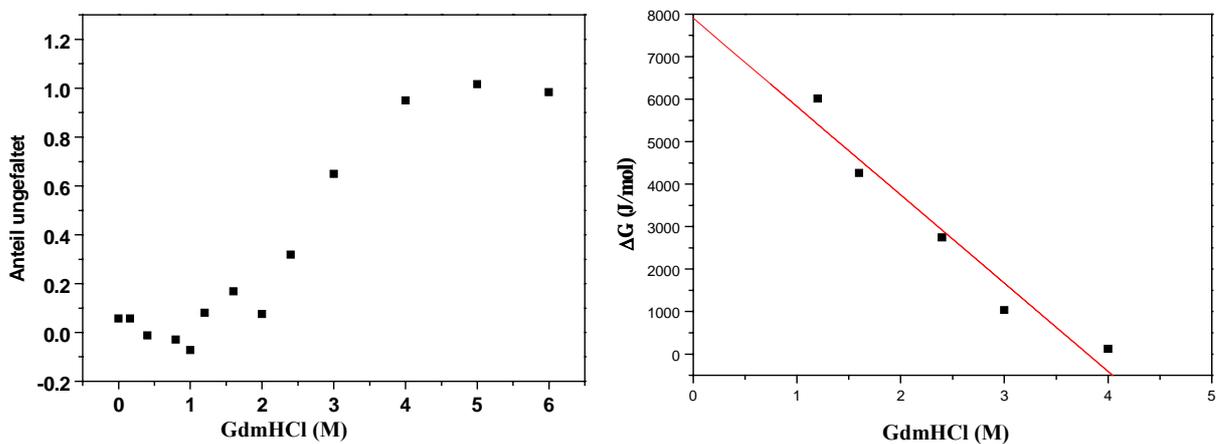


Abbildung 33. Guanidinium induzierte Entfaltung des nGLP-1R im Fern-UV-CD. Zur Messung der Entfaltung des Proteins mit Guanidinium wurde das rückgefaltete und aufgereinigte Protein in ein Puffer, bestehend aus 20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,4 mit Zusatz von unterschiedliche Guanidiniumkonzentrationen verdünnt, über Nacht bei 15 °C inkubiert und anschließend auf die Signalintensität bei 220 nm im CD-Spektrometer vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der linearen Extrapolationsmethode (Pace & Scholz, 1997).

Unter Annahme eines Zwei-Zustands-Modells ergab die Auswertung der Denaturierungskurve einen Übergangsmittelpunkt von 2,4 M Guanidiniumchlorid und eine Freie Stabilisierungsenthalpie $\Delta G_{N \rightarrow U}$ von 7,8 kJ/mol.

3.7 Zusammenfassung der Abschnitte 3.3-3.6

Die N-terminale extrazelluläre Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors konnte in großen Mengen unter Zusatz des Faltungshelfers L-Arginin renaturiert werden. Die renaturierte Proteindomäne war in einem monomeren und homogenen Zustand. Die biophysikalische Charakterisierung des Proteins zeigte, dass das rückgefaltete Protein definierte Sekundär- und Tertiärstruktur aufweist. Die Annahme des Vorliegens einer nativen Struktur des nGLP-1R wurde zudem durch die Ausbildung einer distinkten Disulfidverbrückung der konservierten Cysteinreste der isolierten Rezeptordomäne unterstützt. Die thermische Stabilität des Proteins bei 44 °C ist niedriger als bei in der Natur vorkommenden Proteinen und die Stabilität gegenüber dem Guanidiniumchlorid ist ebenfalls herabgesetzt.

3.8 Untersuchungen der Ligandenbindungseigenschaften des nGLP-1R

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass die N-terminale Domäne des GLP-1 Rezeptors sich zu einem homogenen, einheitlich disulfidverbrückten sowie gut strukturierten Proteinspezies rückfalten ließ, war immer noch unklar, ob das Protein in der Lage war seinen Liganden zu binden.

3.8.1 Hinweise auf die Wechselwirkung zwischen der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors und seinem Liganden.

3.8.1.1 Quervernetzungsexperimente zur Untersuchung der Wechselwirkung des nGLP-1R mit GLP-1

Um die Funktionalität des rückgefalteten Rezeptorfragmentes zu überprüfen wurden als erstes Quervernetzungsexperimente durchgeführt. Der Rezeptor wurde mit GLP-1 und mit dem Kontrollpeptid Insulin in *Crosslinking*-Reaktionen eingesetzt. Als Quervernetzer wurde die bifunktionelle, aminreaktive Chemikalie Dimethylpimelidat (DMP) ausgewählt. Die Fraktionen von der Quervernetzung wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 34).

Wie aus der Abbildung 34 zu sehen ist, ist nur in der Probe, wo Rezeptorfragment mit seinem Ligand unter Zusatz von DMP in die Quervernetzungsreaktion eingesetzt wurde (Spur 2), eine neue Bande mit apparentem Molekulargewicht, das dem Rezeptor-Ligand-Komplex entspricht, zu beobachten. Bei Kontrollreaktionen mit dem Peptidhormon Insulin (Spur 5) oder im Falle, wenn das Rezeptorfragment vor der *Crosslinking*-Reaktion mit DTT und SDS denaturiert wurde (Spur 4), konnte keine zusätzliche Bande mit dem entsprechenden Molekulargewicht des Rezeptor-Ligand-Komplexes beobachtet werden. Diese *Crosslinking*-Experimente waren die ersten Hinweise darauf, dass das Rezeptorfragment in der Lage war mit seinem Liganden zu interagieren.

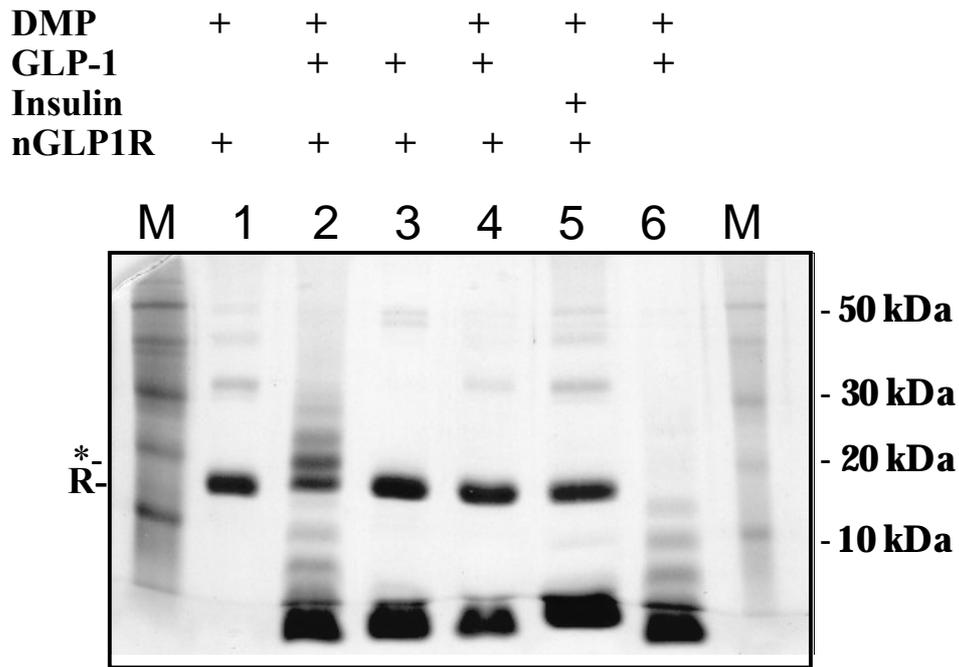


Abbildung 34. Quervernetzungsreaktion. 0,87 μ M Rezeptorfragment wurden mit 4,3 μ M GLP-1[7-36]-NH₂ und mit 4,3 μ M Insulin in 0,1 M Na-Borat, 300 mM NaCl, pH 8,5 für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde jede Probe mit 8 mM Dimethylpimelidat versetzt. Nach 1 h wurde die Reaktion mit 20% TCA gestoppt und die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert. **R**: nGLP-1R;

*: Rezeptor-Ligand-Crosslinking-Produkt; **M**: Molekulargewichtsmarker.

3.8.1.2 Bindungsnachweis mittels biotinyliertem Ligand

Die Wechselwirkung zwischen dem rückgefalteten nGLP-1R und seinem Ligand konnte im Anschluss daran unter Verwendung einer weiteren Methode nachgewiesen werden. Hierzu wurde das synthetische GLP-1 über ein zusätzliches C-terminalen Cystein mit Hilfe von EZ-Link™ Iodoacetyl-LC-Biotin (Pierce, USA) biotinyliert. Das biotinylierte Peptid wurde in einer Bindungsreaktion mit dem nGLP1-R eingesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation der beiden Reaktionspartner bei Raumtemperatur wurde der Ansatz an eine Streptavidin beschichtete Oberfläche (SA-Oberfläche) gebunden, mehrmals gewaschen und das gebundene Komplex wurde unter denaturierenden Bedingungen direkt mit dem SDS-Probenpuffer von der SA-Oberfläche eluiert. Die Analyse der Bindungsreaktion erfolgte mittels SDS-PAGE. Wie aus Abbildung 35 in den Spuren 3 & 4 zu sehen ist, konnte eine Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung detektiert werden. Die Bande in der Spur 2 ist der Anteil der unspezifischen Bindung der Probe an die SA-Oberfläche. In der Kontrollreaktion, in der das Rezeptorfragment vor der Bindung 10 min bei 50 °C unter Zusatz von 2 % (w/v) SDS denaturiert wurde, konnte keine Bande im SDS-Gel beobachtet werden.

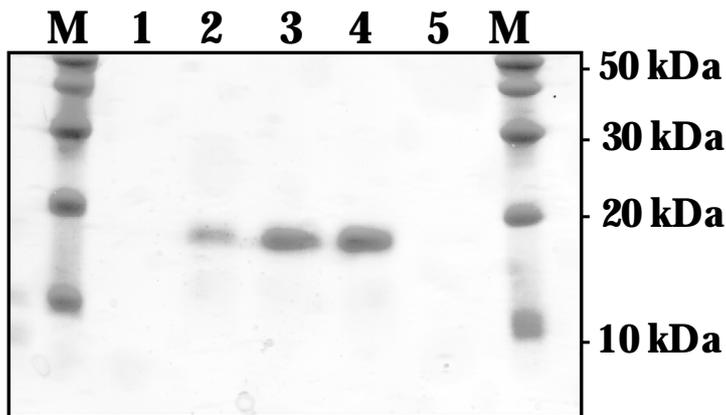


Abbildung 35. Bindung von nGLP-1R an den biotinyliertem Ligand. Der renaturierte und aufgereinigte nGLP-1R wurde mit biotinyliertem Ligand in einem molaren Verhältnis 1:3 für 30 min bei 15 °C gebunden. Anschliessend wurde der Ansatz an eine Streptavidin-Oberfläche gebunden, mehrmals gewaschen, mit SDS-Probenpuffer von der letzteren eluiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

M: Molekulargewichtsmarker; 1: Ligand; 2: Rezeptorfragment (2 % (w/v) SDS, 10 min bei 50 °C)+Ligand (1:3 molares Verhältnis); 3: Rezeptorfragment+Ligand (1:1 molares Verhältnis); 4: Rezeptorfragment+Ligand (1:3 molares Verhältnis); 5: Rezeptorfragment

Ausgehend aus diesen Ergebnissen wurde versucht einen ELISA-Funktionalitätstest für den nGLP1-R aufzubauen. Als erster Nachweisantikörper war ein Anti-nGLP-1R-Antikörper vorgesehen, der durch Immunisierung von Hühnern produziert wurde. Zur Immunisierung wurde das *Inclusion Body* Material des nGLP1-R verwendet. Leider erwies sich dieser Antikörper als ungeeignet für den Aktivitätstest, denn er konnte nur das denaturierte Protein und nicht das native Protein erkennen (Abbildung 36). Zu diesem Zeitpunkt waren keine weiteren Antikörper zum Nachweis des nGLP-1R verfügbar, sodass der Versuch nicht weiter verfolgt wurde.

nGLP-1R 60 ng 150 ng 300 ng 1,2 µg

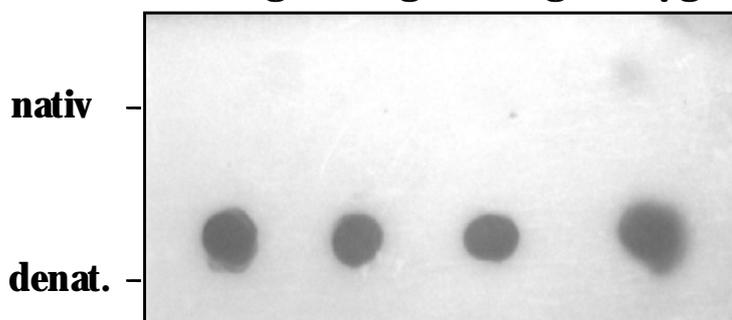


Abbildung 36. Dot-Blot des nGLP-1R. Gleiche Mengen an renaturierten bzw. denaturierten nGLP-1R wurden auf eine Nitrozellulosemembran gebunden, mit TBT-Puffer mit 0,5 % (w/v) Milchpulver geblockt, 3x gewaschen und mit Anti-GLP-1-R-Antikörper 2 h bei RT gebunden.

Nach anschliessenden Waschschritten und Bindung an den 2. Antikörper (Anti-Huhn-IGg-POD gekoppelt) 1h bei RT erfolgte die Detektion über POD-Nachweis. (**denat.**: denaturierter nGLP-1R)

3.8.1.3 Ligandensäule

Als eine weitere Methode zum Nachweis der Funktionalität des nGLP1-R wurde eine Ligandensäule angefertigt. Hierzu wurde das synthetische GLP-1 über sein zusätzliches C-terminales Cystein am Säulenmaterial kovalent gekoppelt (nach Anleitung des Herstellers) und die renaturierte Rezeptordomäne im Anschluss daran auf ihre Bindungseigenschaften an diese Säule untersucht. Die Fraktionen dieser Affinitätschromatographie wurden über SDS-PAGE analysiert (Abbildung 37I). Der gebundene Rezeptor konnte mit 1 M Arginin eluiert werden. Ein großer Teil des gebundenen Proteins

konnte jedoch nur unter denaturierenden Bedingungen von der Säule eluiert werden. Um die Spezifität der Bindung nachzuweisen wurde eine Kompetition mit freiem Ligand ohne C-terminalen Cystein durchgeführt. Wie aus Abbildung 37II zu sehen ist, konnten fast 80 % des eingesetzten Rezeptorfragments an die Ligandensäule binden und spezifisch mit freiem Ligand eluiert werden.

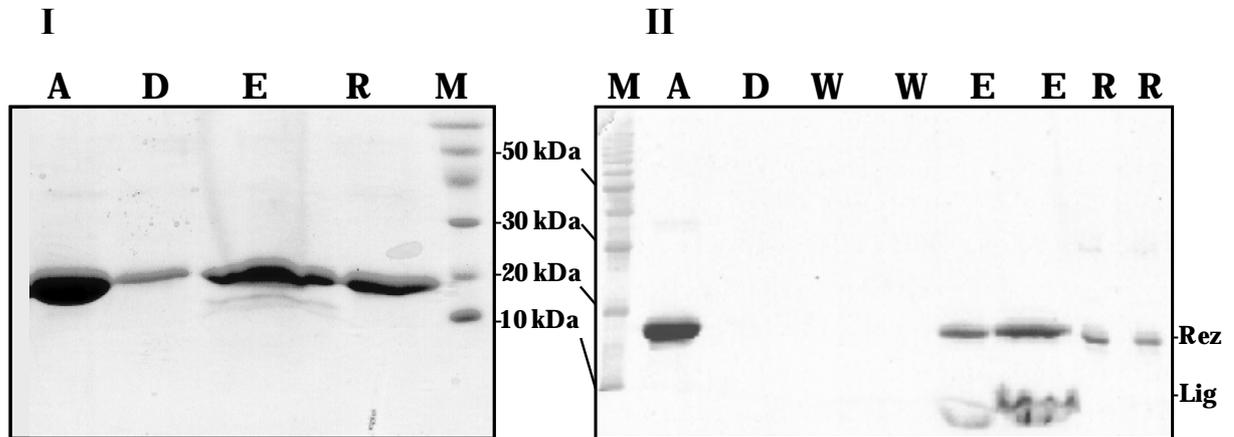


Abbildung 37. Affinitätschromatographie von nGLP-1R an der Ligandensäule. **I**: Renaturierter nGLP-1R wurde in 20 mM Tris, 0,3 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4 an die Säule gebunden und mit 1 M Arginin-HCl eluiert. **M**: Molekulargewichtsmarker; **A**: Ausgangsprotein; **D**: Durchlauf; **E**: Eluat mit 1 M Arginin; **R**: Regeneration mit 6 M Harnstoff.

II: Renaturierter nGLP-1R wurde in 0,25 M Arginin-HCl, 20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4 an die Säule gebunden und mit 5 mg/ml freiem GLP1(7-36)-NH₂ eluiert. **M**: Molekulargewichtsmarker; **A**: Ausgangsprotein; **D**: Durchlauf; **W**: Waschschritte; **E**: Eluat; **R**: Regeneration mit 6 M Harnstoff; **Rez**: Rezeptorfragment; **Lig**: Peptidligand GLP-1.

3.8.2 Quantitative Charakterisierung der Wechselwirkung der renaturierten Rezeptordomäne nGLP-1R mit GLP-1

Nachdem die oben beschriebenen Experimente darauf hinwiesen, dass der rückgefaltete N-Terminus des GLP-1 Rezeptors durchaus in der Lage war mit seinem Ligand zu interagieren, sollte diese Bindung genauer charakterisiert werden.

3.8.2.1 Oberflächenplasmonresonanzmessungen

Um quantitative Aussagen über die Bindung zwischen renaturiertem nGLP-1R und seinem Liganden zu erhalten, wurden als erstes Oberflächenplasmonresonanzmessungen in einem BiacoreX-System (Biacore AB, Freiburg) durchgeführt. Für Oberflächenplasmonresonanzmessungen wurde zunächst das Rezeptorfragment auf die CM-5 Chip-Oberfläche gekoppelt und auf seine Bindungseigenschaften zu GLP-1 und den Kontrollpeptiden PTH und Calcitonin hin untersucht (Abbildung 38). Es zeigte sich, dass nGLP-1R nur seinen eigenen Liganden spezifisch binden kann. Es konnte keine Wechselwirkung

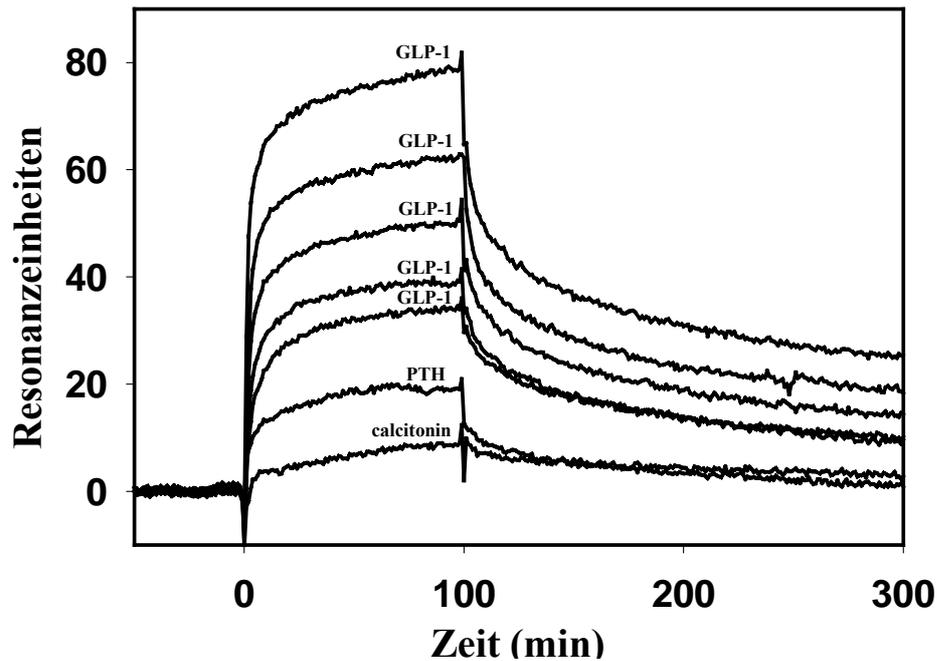


Abbildung 38. Rückgefaltetes und aufgereinigtes Rezeptorfragment wurde über Aminokopplung auf einer CM-5-Chip Oberfläche immobilisiert und die Bindung unterschiedlicher Peptide an gekoppelten Rezeptor untersucht, (von oben nach unten): 28 μM GLP-1; 14 μM GLP-1; 3,5 μM GLP-1; 1,75 μM GLP-1; 28 μM PTH; 28 μM Calcitonin.

der Rezeptordomäne mit Calcitonin beobachtet werden. Im Falle des PTHs wurde eine geringfügige unspezifische Bindung beobachtet. Das gemessene Signal der Wechselwirkung zwischen nGLP-1R und GLP-1 war niedriger als das theoretische, welches bei einer 1:1 Bindung zu erwarten wäre. Aufgrund dieser Tatsache und der unspezifischen Bindung an PTH wurde bei dieser Reihe von Experimenten keine Bindungskonstanten ermittelt.

In einer zweiten Reihe von Experimenten wurde cysteinyliertes GLP-1 kovalent an die CM-5 Chip-Oberfläche gekoppelt und das aufgereinigte Rezeptorfragment als Analyt auf die Oberfläche gegeben. Die Bindung wurde in einem Puffer unter Zusatz von 0,25 M Arginin, als stabilisierendes Agens, untersucht. Arginin war nicht in der Lage die Bindung zwischen nGLP-1R und GLP-1 bis zu einer Konzentration von 0,25 M Arginin zu beeinträchtigen (folglich in Abb. 42). Zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten wurde das aufgereinigte Rezeptorfragment über Nacht gegen Bindungspuffer dialysiert. Anschließend wurde die Bindung unterschiedlicher Proteinkonzentrationen an Rezeptorfragment an der Ligand-Chip-Oberfläche überprüft (Abbildung 39). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Affinität der Rezeptordomäne zu seinem Ligand. Die Auswertung der Daten nach dem 1:1 Langmuir-Bindungsmodell lieferte eine Dissoziationskonstante von 46 ± 17 nM. Zur Kontrolle der Bindung wurde das Rezeptorfragment mit DTT und SDS denaturiert. Unter Verwendung dieses denaturierten Proteins konnte keine Wechselwirkung mit der Chip-Oberfläche beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

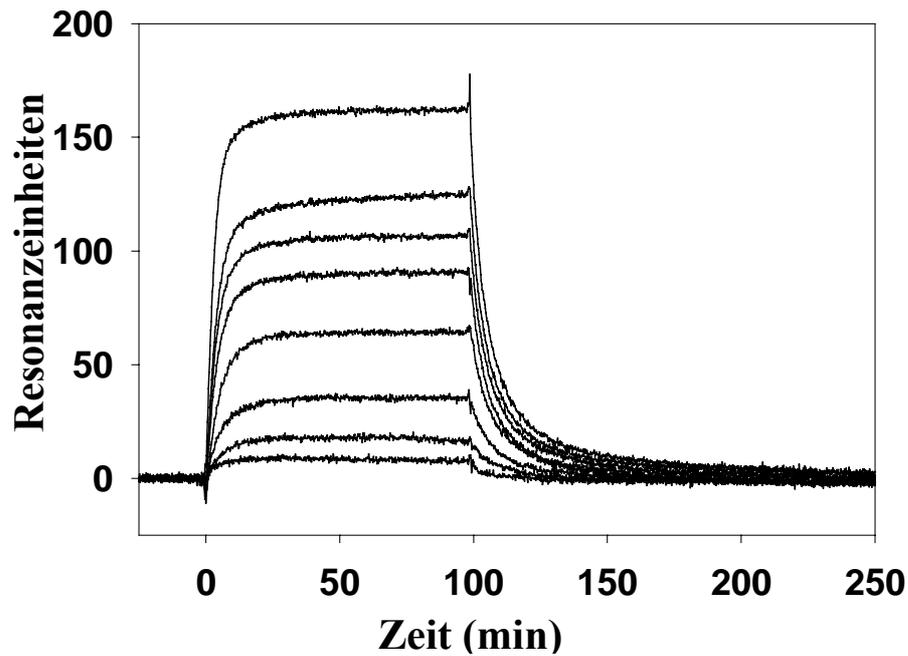


Abbildung 39. Bindung von nGLP-1R an eine GLP-1-CM5-Chip Oberfläche. Cysteinyliertes GLP-1 wurde kovalent an einer CM-5 Chip Oberfläche immobilisiert und aufgereinigtes Rezeptorfragment als Analyt auf seine Bindungseigenschaften untersucht, (von oben nach unten nGLP-1R): 200 nM; 100 nM; 80 nM; 60 nM; 40 nM; 20 nM; 10 nM; 5 nM

Um die Spezifität der Wechselwirkung des nGLP-1R mit dem GLP-1 auf der Chip-Oberfläche zu belegen wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt (Abbildung 40). Hierzu wurde das Rezeptorfragment mit unterschiedlichen Konzentrationen an freiem Peptid vorinkubiert und diese Ansätze im Anschluss daran auf ihr Bindungsverhalten an der GLP-1-Chip-Oberfläche untersucht. Die Menge an Rezeptorfragment, welches noch frei in der Lösung war und in der Lage war an das Peptid auf der Chip-Oberfläche zu binden, nahm mit steigender Menge an Peptid in der Vorinkubationsmischung ab.

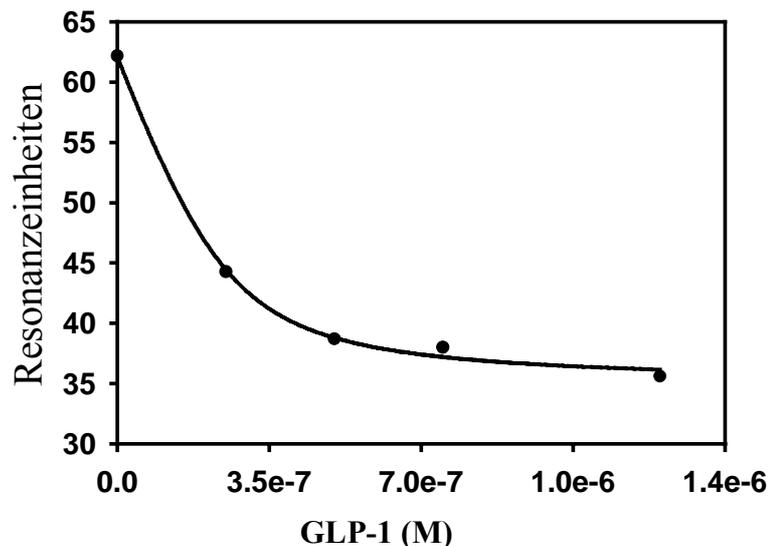


Abbildung 40. Konkurrenzexperiment. 0,25 μ M Rezeptorfragment in 0,25 M Arginin, 10 mM HEPES, 3 mM EDTA, 0,005 % Tween-20, pH 7,4 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen GLP-1 für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Bindung an einem GLP-1-Sensor-Chip untersucht.

Eine Auswertung der gegen die Konzentration an freiem Peptidligand aufgetragenen Resonanzsignale im Bindungsgleichgewicht mittels nichtlinearer Regression ergab eine Dissoziationskonstante von $47 \pm 0,79$ nM. Diese Dissoziationskonstante stimmt sehr gut mit der zuvor aus der Konzentrationsabhängigkeit ermittelten Bindungskonstante überein.

3.8.2.2 Bindung in Lösung

Als weitere Methode zur quantitativen Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen dem nGLP-1R und seinem Liganden wurden Isothermale Titrationskalorimetrische Messungen (ITC-Messungen) in einem Microcal MCS Titrationskalorimeter (MicroCal, Nothhampton, USA) durchgeführt (Abbildung 41). Während bei Biacore-Messungen einer der Reaktionspartner an einer Festphase gekoppelt ist und der andere in Lösung zugegeben wird, erfolgt bei der ITC-Messung die Bestimmung der Wechselwirkung indem beide Reaktionspartner in Lösung vorliegen.

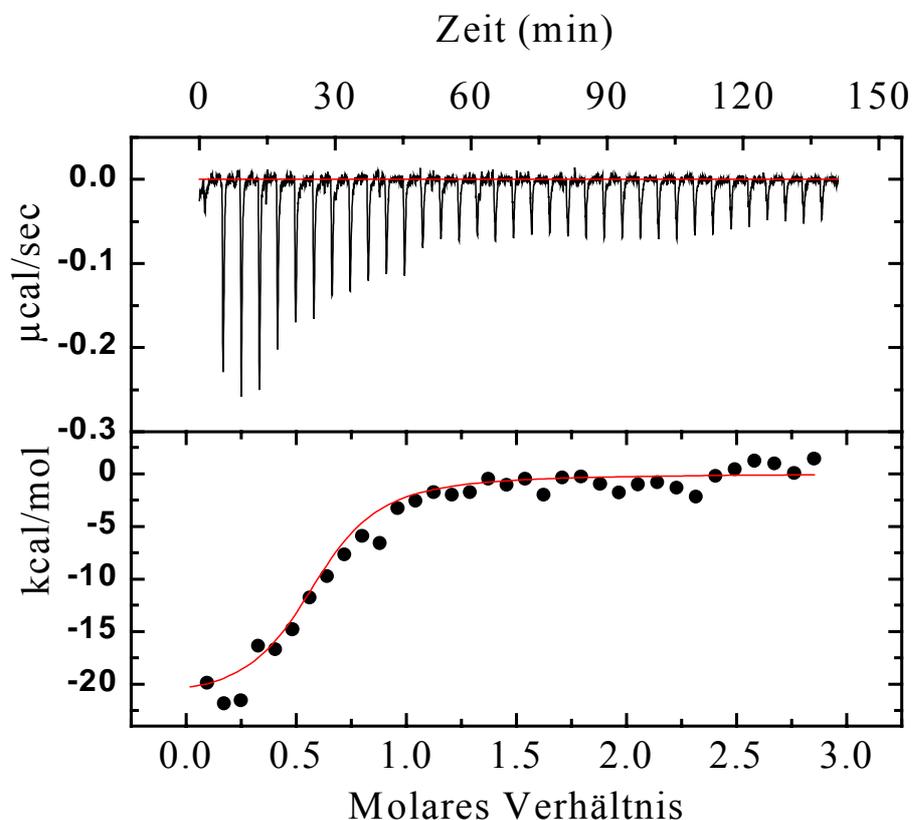


Abbildung 41: Isothermale Titrationskalorimetrie der Wechselwirkung von nGLP-1R mit GLP-1. $2,04 \mu\text{M}$ nGLP-1R in $0,25$ M Arginin, 50 mM Na-Phosphat, 1 mM EDTA, pH $7,4$ wurde vorgelegt und mit einer $26,3 \mu\text{M}$ GLP-1-Lösung im gleichen Puffer in $6 \mu\text{l}$ Titrationsschritten bei 20 °C zur Sättigung titriert. **Oben:** basislinienkorrigierter Wärmeumsatz der Titrationsschritte in $\mu\text{cal/s}$; **unten:** flächenintegrierte und konzentrationsnormalisierte Enthalpieänderung in Abhängigkeit der molaren Verhältnisse des GLP-1 zu nGLP-1R. Die **durchgezogene Linie** ist der Kurvenausgleich an die experimentellen Daten.

Die Bindung von GLP-1 zum nGLP-1R führte zur Freisetzung von Wärme. Die Analyse der Daten zeigte eine 1:1 Stöchiometrie der beiden Reaktionspartner mit einer Dissoziationskonstante von 144 nM und ΔH_{ITC} von $-24,49$ kcal/mol.

3.8.3 Salz-, Temperatur- und pH-Wert-Abhängigkeit der Wechselwirkung des nGLP-1R mit GLP-1

Nachdem gezeigt wurde, dass das renaturierte Rezeptorfragment seinen Liganden spezifisch binden kann, wurde diese Wechselwirkung genauer untersucht. Mittels Biacore-Messungen wurde die NaCl-, Argininkonzentrations-, Temperatur-, und pH-Wert-Abhängigkeit der Bindung vom nGLP-1R an einer GLP-1-Chip Oberfläche untersucht. Hierzu wurde das Rezeptorfragment in unterschiedliche Bindungspuffer über Nacht bei 15 °C dialysiert und durch Zentrifugation bei 70000 rpm von Aggregaten abgetrennt. Nach anschließender Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektroskopie wurden Biacore-Messungen bei einheitlichen Proteinkonzentrationen durchgeführt.

3.8.3.1 Argininabhängigkeit der Bindung

Die Bindung von nGLP-1R an GLP-1 in Abhängigkeit von Arginin wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 1 M Arginin untersucht. Wie aus Abbildung 42 ersichtlich ist, wird die Bindung bis zu einer Argininkonzentration von 250 mM nicht beeinträchtigt. Bei höheren Konzentrationen wurde die Bindung jedoch vollständig unterdrückt.

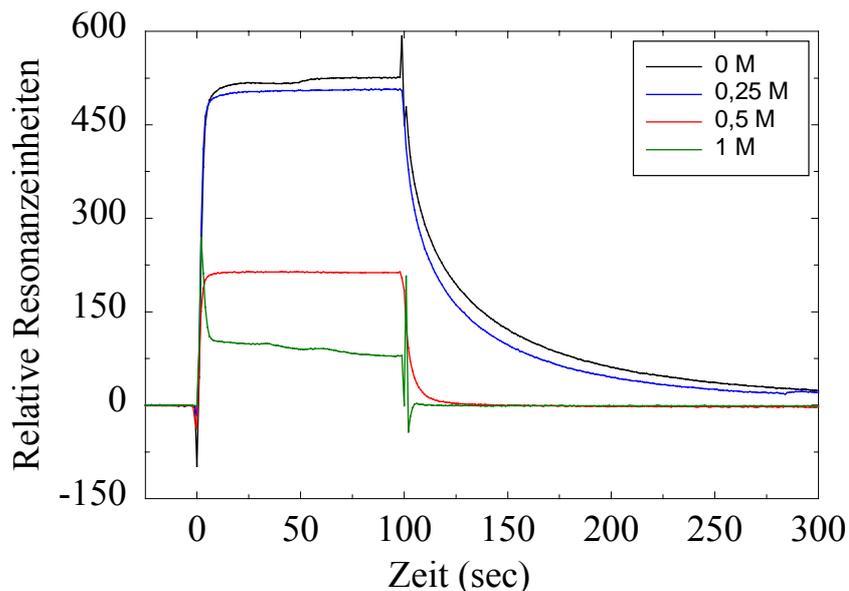


Abbildung 42. Bindung von nGLP-1R am GLP-1-Sensorchip in Abhängigkeit von der Argininkonzentration im Bindungspuffer.

3.8.3.2 NaCl-Abhängigkeit der Bindung des nGLP-1R zu seinem Ligand

Der Einfluss der Salzkonzentration auf die Wechselwirkung zwischen dem nGLP-1R und GLP-1 wurde im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 2 M NaCl untersucht. Hier konnte keine signifikante Beeinflussung der Bindung durch NaCl bis 400 mM (Abbildung 43).

Die gemessenen Resonanzsignale änderten sich in dem Bereich von 100-400 mM NaCl geringfügig. Die Bindungsaffinität änderte sich jedoch nicht. Erst ab 500 mM NaCl sank die Bindungsaffinität um das dreifache (Tabelle 9). Bei 2 M NaCl im Messpuffer wurden vernachlässigbar geringere

Resonanzeinheiten im Vergleich zu Messsignalen unter Zusatz von 0-400 mM NaCl detektiert.

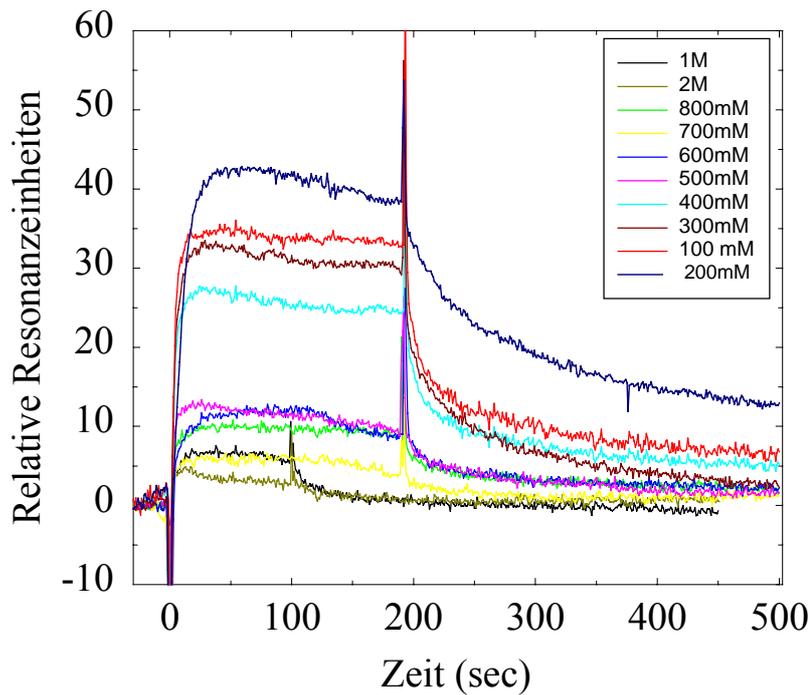


Tabelle 9.

NaCl (M)	Kd (nM)
0,1	22,8
0,2	31,0
0,3	33,4
0,4	23,2
0,5	72,3
0,6	79,6
0,7	83,4
0,8	69,1

Abbildung 43. Abhängigkeit der Interaktion der renaturierten N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors mit seinem Ligand von NaCl-Konzentration des Bindungspuffers.

3.8.3.3 Temperatur-Abhängigkeit

Der Einfluss der Temperatur auf die Wechselwirkung des nGLP-1R mit seinem Ligand wurde in einem Temperaturbereich von 10 °C bis 30 °C untersucht (Abbildung 44). Die Bindungsaffinität des Proteins bei unterschiedlichen Temperaturen ist in Tabelle 10 dargestellt.

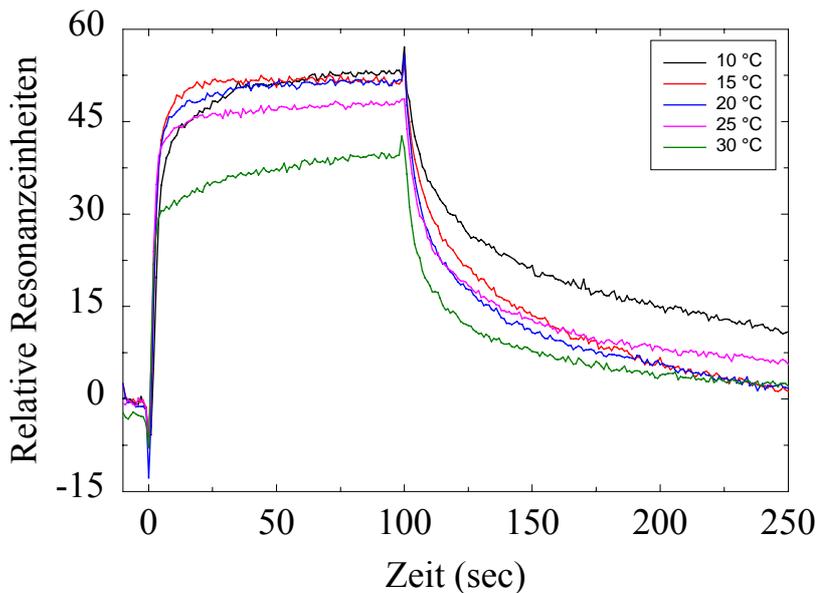


Tabelle 10.

Temp. (°C)	Kd (nM)
10	23,0
15	23,9
20	30,1
25	16,8
30	42,4

Abbildung 44. Temperaturabhängigkeit der Wechselwirkung des nGLP-1R mit GLP-1.

Es konnte keine signifikante Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen dem Rezeptorfragment und

seinem Liganden bis 25 °C festgestellt werden. Erst ab 30 °C wurde eine Abschwächung der Affinität der Bindung des nGLP-1R zu GLP-1 beobachtet. Die Bindung bei 30 °C verlief deutlich schneller als bei niedrigeren Temperaturen, was durch die Steilheit der Assoziations- und Dissoziationsphasenkurven zu beurteilen war. Die Bindungskurve bei 10 °C zeigte dagegen entgegengesetzte Effekte aufgrund der langsameren Kinetik der Interaktion.

3.8.3.4 pH-Wert Abhängigkeit der Interaktion des nGLP-1R mit seinem Ligand

Die Wechselwirkung zwischen nGLP-1R und GLP-1 zeigte eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert des Bindungspuffers (Abbildung 45). Bei pH-Werten unterhalb von 4 und oberhalb von 10 konnten nur sehr geringe Resonanzsignale detektiert werden. Der Optimum der Bindung lag in einem pH-Wertbereich zwischen 6 und 8. Bei einem pH-Wert von 4 wurde ein Bindungsereignis mit fast gleicher Resonanzsignalthöhe wie bei pH 5 und 9 gemessen, allerdings aufgrund des ungewöhnlichen Kurvenverlaufs der Assoziations- und Dissoziationsphasen war eine Auswertung der Daten nicht möglich. Die Dissoziationskonstanten der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung bei pH-Werten zwischen 5 und 9 sind in Tabelle 11 dargestellt.

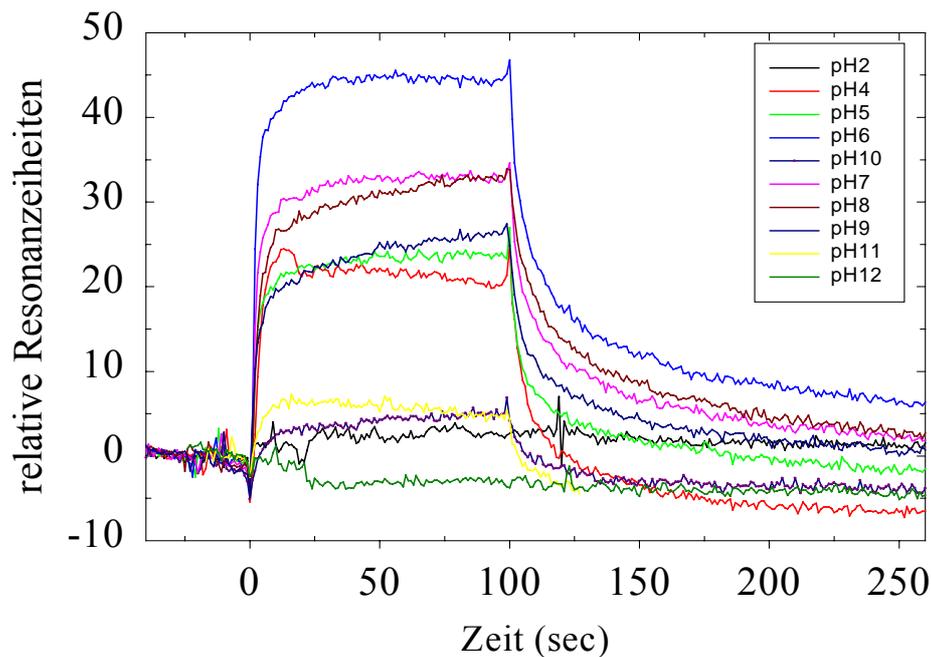


Tabelle 11.

pH	K _d (nM)
5	45,8
6	18,5
7	33,9
8	26,1
9	40,3

Abbildung 45. pH-Wert-Abhängigkeit der Wechselwirkung der renaturierten und aufgereinigten N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors mit seinem Ligand GLP-1.

3.8.4 Spektroskopische Charakterisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes aus nGLP-1R und GLP-1

Bei der Ausbildung eines Komplexes der Protein-Peptid-Interaktionen können sehr oft Strukturänderungen eines oder beider Reaktionspartner beobachtet werden, die man spektroskopisch detektieren kann. Aus diesem Grund wurden Fern-UV-CD- und Fluoreszenzspektroskopiemessungen

des nGLP-1R unter Zusatz von GLP-1 durchgeführt. Für diese Messungen wurde der Ligand im Überschuss zugesetzt um bei einer 1:1 Bindung eine 100%ige Absättigung des Rezeptors zu garantieren.

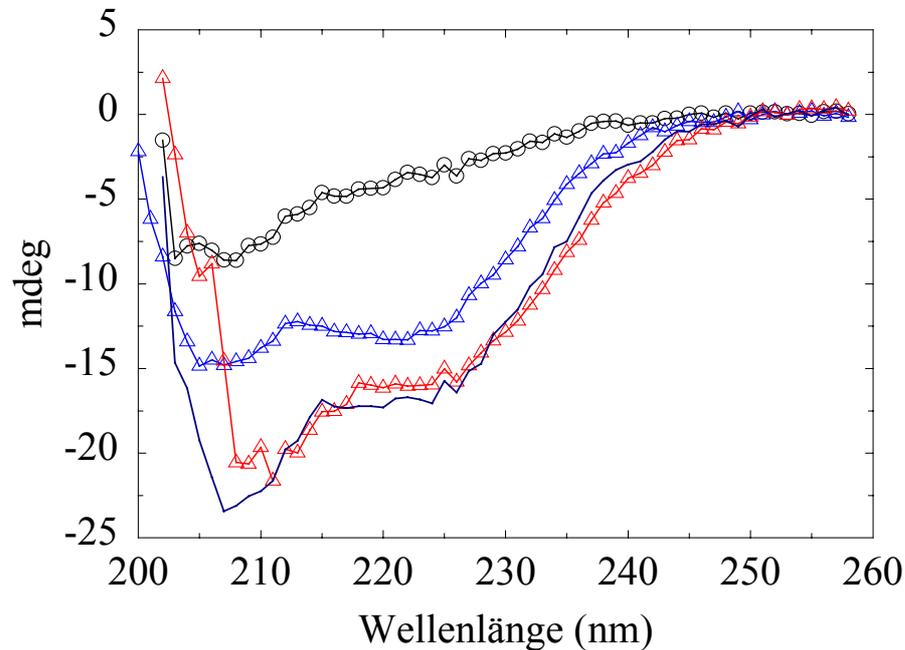


Abbildung 46: Fern-UV CD Spektren des nGLP-1R-GLP1-Komplexes. CD-Spektren des nGLP-1R ($4,6 \mu\text{M}$; in **schwarz**), GLP-1 ($30 \mu\text{M}$; in **blau**) und nGLP-1R-GLP-1-Komplexes (in **rot**) wurden bei 20°C in 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7.4 in einer 1 cm Küvette bei einer Integrationszeit von 5 s und Bandbreite von 1 nm gemessen. Die Spektren wurden 7-fach akkumuliert und pufferkorrigiert. Die **durchgezogene Linie** ist die rechnerische Aufsummierung der einzelnen Spektren des nGLP-1R und GLP-1.

In der Abbildung 46 sind die Fern-UV CD-Spektren des nGLP-1R, von GLP-1 und die des nGLP-1R-GLP-1-Komplexes dargestellt. Das Fern-UV CD-Spektrum des GLP-1 einen Kurvenverlauf auf, welcher dem des nGLP-1R ähnelt. Das Spektrum besitzt ein Hauptminimum bei 203 nm mit einem Nebenminimum bei 222 nm . Im Falle des Rezeptor-Ligand-Komplexes weist das gemessene CD-Spektrum geringe Unterschiede zum theoretisch aufsummierten Spektrum der beiden Partner im Bereich zwischen $215\text{-}225 \text{ nm}$ auf. Im Bereich von $203\text{-}212 \text{ nm}$ wurden massive Unterschiede der beiden Spektren detektiert.

Bei Fluoreszenzmessungen (Abbildung 47) konnten ebenfalls geringe Unterschiede im Spektrum des Komplexes im Vergleich zum theoretisch aufsummierten Spektrum der Emissionsspektren des Rezeptorfragments und seines Liganden allein beobachtet werden. Das Emissionsspektrum des Peptids, das einen Tryptophan- und einen Tyrosinrest besitzt, weist ein Maximum bei 345 nm auf.

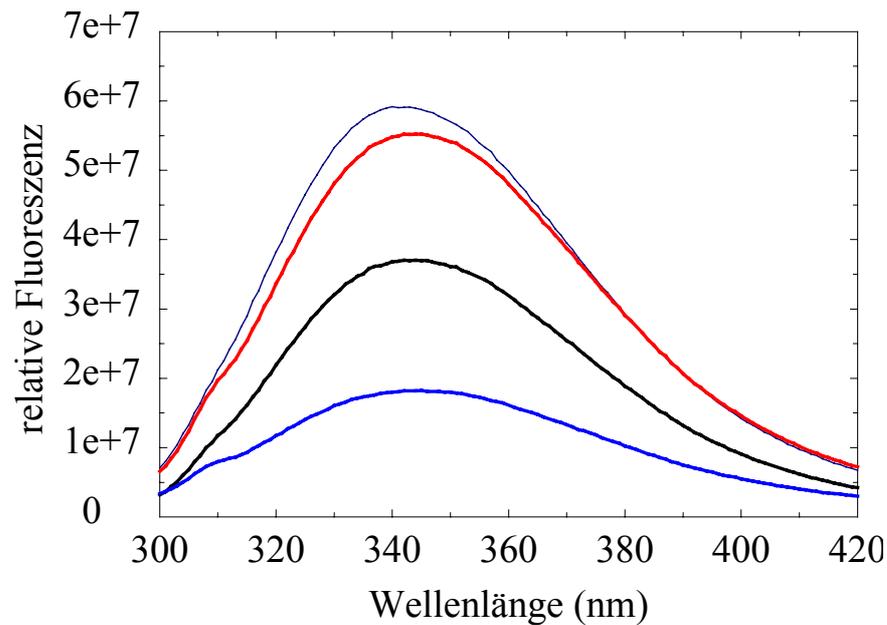


Abbildung 47. Fluoreszenzspektren des nGLP-1R-GLP-1-Komplexes. Emissionsspektren des nGLP-1R (1.16 μM), GLP-1 (10 μM) und des Komplexes wurden in 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7,4 in einer 1 cm Küvette bei 20 °C mit einer Zeitkonstante von 0,2 s gemessen. Die Anregungswellenlänge war 280 nm. Die Spektren wurden 5fach akkumuliert. In blau: GLP-1; in **schwarz**: nGLP-1R; in **rot**: nGLP-1R+GLP-1; in **grau**: die rechnerische Aufsummierung der einzelnen Spektren des nGLP-1R und GLP-1.

Das Spektrum des Komplexes zeigt ein Emissionsmaximum bei 343 nm, was dem Maximum des theoretisch aufsummierten Spektrums bei 344 nm relativ gut entspricht. Allerdings ist die Signalintensität des gemessenen Spektrums niedriger. Dieser Signalunterschied deutet darauf hin, dass bei der Komplexbildung ein oder mehrere Tryptophan- oder Tyrosinseitenketten eine Umgebungsänderung aufweisen.

3.8.5 Zusammenfassung des Abschnitts 3.8

Die oben beschriebenen Daten zeigten eindeutig, dass der renaturierte Rezeptorfragment seinen Liganden spezifisch binden kann mit einer Bindungskonstante, die 100-200fach höher ist als die Dissoziationskonstanten, die für den Gesamtrezeptor in der Plasmamembran gemessen wurden (Gromada, *et al.*, 1995; Kieffer, *et al.*, 1996; Thorens, *et al.*, 1993). Mittels spektroskopischer Messmethoden konnten geringe Änderungen der Sekundärstruktur des nGLP-1R unter Zusatz von GLP-1 detektiert werden, was auf eine Strukturinduktion während der Bindung hindeuten könnte.

3.9 Herstellung des GLP-1-8xHis

3.9.1 Spaltung des Peptids aus dem Fusionsprotein und anschließende Reinigung

Aus 100 g Zellen wurden ca. 5 g *Inclusion Bodies* isoliert. Die isolierten und solubilisierten *Inclusion Bodies* des Fusionsproteins CBD-GLP-1-8xHis wurden mit Bromcyan gespalten und das Spaltprodukt, das einen C-terminalen His-tag aufweist, wurde mittels IMAC auf einer Ni-NTA-Säule von restlichen Spaltprodukten abgetrennt (Abbildung 48).

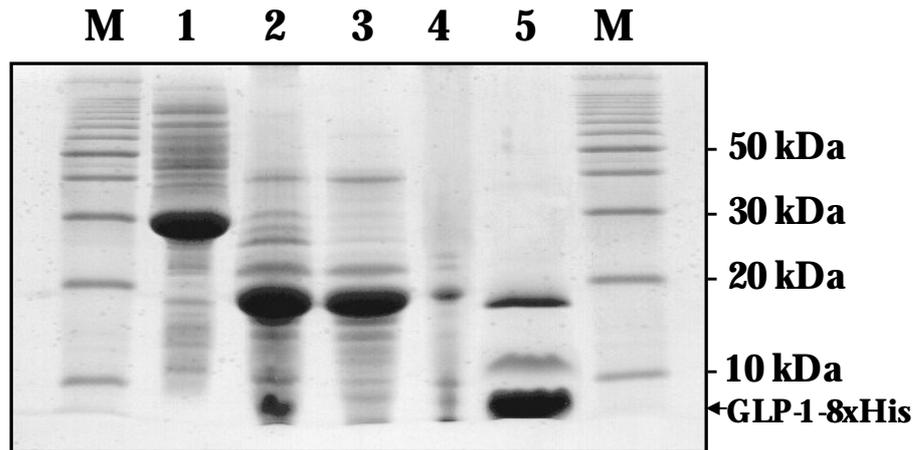


Abbildung 48. Aufreinigung des gespaltenen Peptids mittels IMAC. **1:** *Inclusion Bodies* Präparation von dem Fusionsprotein CBD-GLP-1-8xHis; **2:** Fusionsprotein nach der Spaltung mit Bromcyan als Ausgang für die Ni-NTA-Säule; **3:** Durchlauf der Ni-NTA-Säule; **4:** Waschschrift; **5:** Eluat; **M:** Molekulargewichtsmarker.

Das Eluat der Ni-NTA-Säule wurde im einem anschließenden Schritt mittels RP-HPLC aufgereinigt. In Abbildung 49 ist die Elution des Peptids durch einen linearen Gradienten von 0 bis 80 % Acetonitril dargestellt. Der Elutionspeak besitzt einen kleinen Schulterpeak, was auf eine geringe Inhomogenität des Spaltproduktes hinweist.

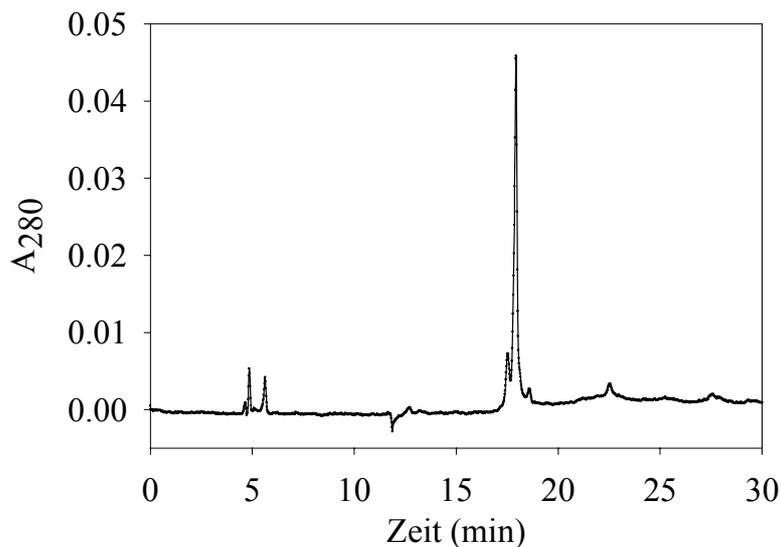
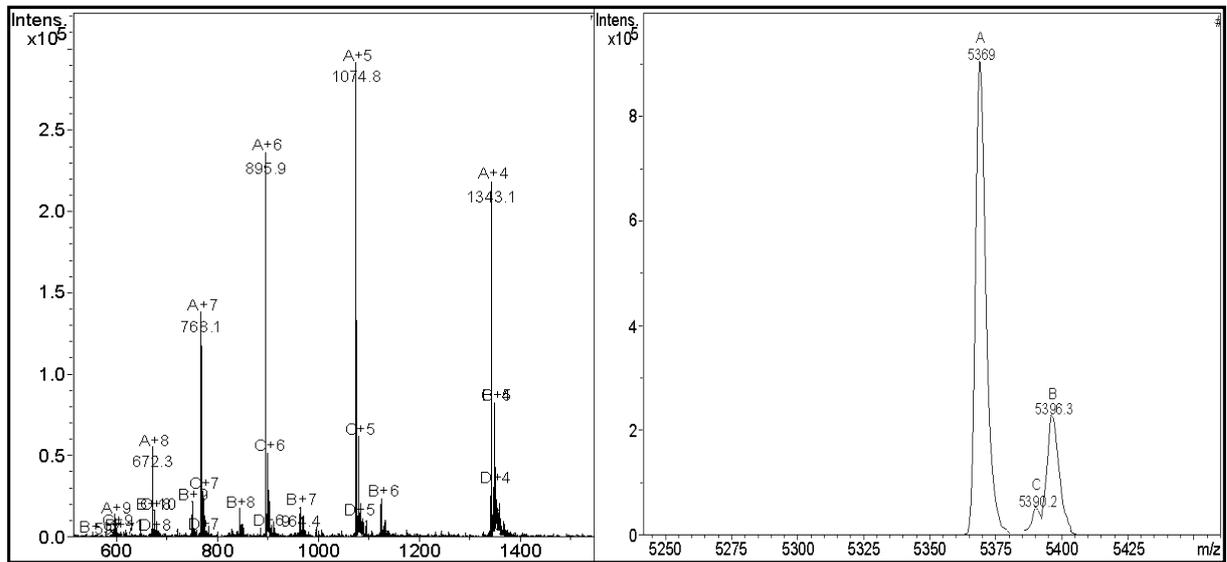


Abbildung 49. RP-HPLC-Lauf mit dem gespaltenem Peptid. Ca. 3 μg des aufgereinigten His-GLP-1 wurden auf eine C18-Säule aufgetragen und durch einen linearen Gradienten von 0 auf 80 % Acetonitril eluiert (Puffer A: 0.1 % (v/v) TFA; Puffer B: 0.1 % (v/v) TFA und 80 % Acetonitril).

3.9.2 Identität des hergestellten Peptids

Nach der RP HPLC wurde die Identität des Peptids mittels Elektrospray-Ionisations-Massen-



spektrometrieanalysen bestätigt (Abbildung 50).

Abbildung 50: ESI-Massenspektren des GLP-1-8xHis.

Die ESI-Massenspektren zeigten die Existenz von 3 Spezies mit Molekularmassen 5369 Da (zu 80 %), 5396,3 (zu 15 %) und 5390,2 (zu 5%). Die Hauptpopulation an Peptid mit der Masse 5369 Da entspricht der erwarteten Masse von 5370 Da. Die Ursache der Existenz von Spezies mit den Molekulargewichten von 5396,3 Da und 5390,2 Da könnte in der Modifikation des N-terminalen Methionins durch Ameisensäure oder durch Harnstoff zu suchen sein.

3.9.3 Zusammenfassung des Abschnitts 3.9

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Prozedur zu einer rekombinanten Herstellung des Peptidhormons GLP-1 mit einem C-terminalen 8xHistidintag entwickelt. GLP-1 konnte nach der Überexpression eines Fusionsproteins CBD-GLP-1 mittels Bromcyan von dem Fusionspartner abgetrennt und in hohen Ausbeuten mittels IMAC aufgereinigt werden. Das aufgereinigte Peptid war bis zu 80 % homogen und konnte mittels ESI-Massenspektroskopie eindeutig identifiziert werden.

3.10 Faltung, Reinigung und Charakterisierung des Fusionsproteins aus der N-terminalen Domäne des GLP-1 Rezeptors und dem GLP-1

3.10.1 Renaturierung und Reinigung der Rezeptor-Ligand-Chimäre

Die Faltungsbedingungen des Rezeptorfragments wurden auf die Renaturierungsprozedur der Rezeptor-Ligand-Chimäre übertragen. Die Renaturierung erfolgte hier jedoch nicht durch Verdünnung sondern durch 2-tägige Dialyse gegen den Faltungspuffer. Da bei der Dialyse das Protein längere Zeit der Oxidation durch Luftsauerstoff ausgesetzt wird, wurde mit einem Überschuss an GSH (5mM) zu GSSG (1mM) gearbeitet. Nach einer 48-stündigen Renaturierung bei 15 °C befanden sich nur noch 20 % des Ausgangsproteins in Lösung.

Als erster Reinigungsschritt für die Rezeptor-Ligand-Chimäre wurde eine hydrophobe Interaktionschromatographie durchgeführt. Hierzu wurde der Renaturierungsansatz gegen den Äquilibriumspuffer (1,2 M Ammoniumsulfat, 50 mM Na-Phosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4) dialysiert und anschließend durch Zentrifugation ausgebildete Aggregate abgetrennt. Das Protein im Überstand wurde auf eine Phenylsepharose-Säule aufgetragen und durch einen linearen Gradienten von 1 M zu 0 M Ammoniumsulfat eluiert. Das Protein konnte bei 0,25 M Ammoniumsulfat von der Säule eluiert werden. Als abschließender Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltration an einer Sephacryl-100-Säule durchgeführt (Abbildung 51). Es konnten ca. 5% des *Inclusion Body* Materials zu nativen Protein rückgefaltet und aufgereinigt werden.

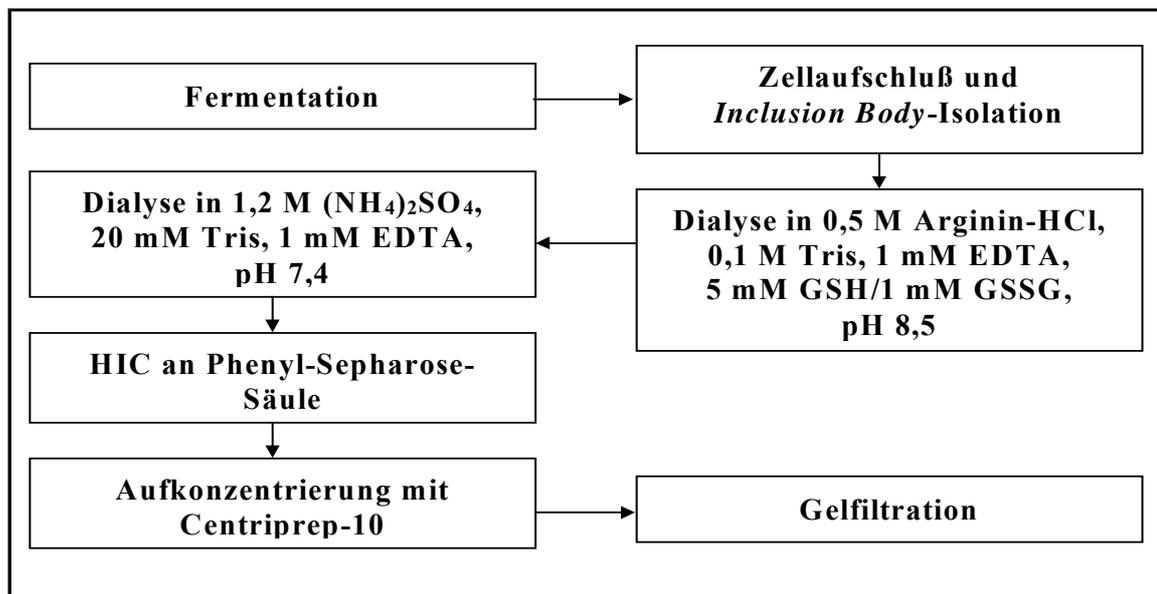
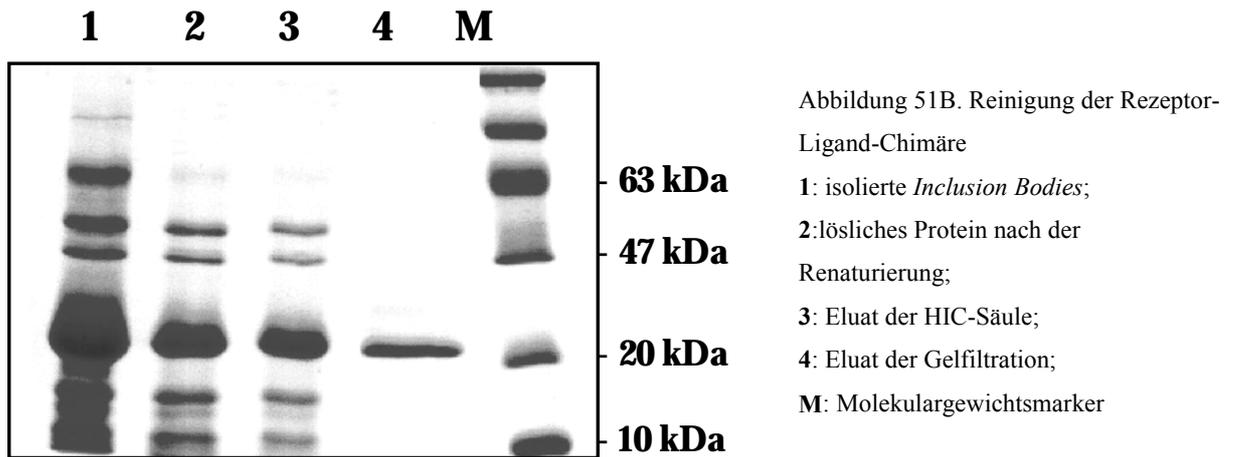


Abbildung 51A. Aufarbeitungsschritte für die Faltung und Reinigung der Rezeptor-Ligand-Chimäre



3.10.2 Identität und Homogenität der Rezeptor-Ligand-Chimäre.

Nach der Renaturierung und der Aufreinigung wurde das Protein mittels N-terminaler Proteinsequenzierung untersucht. Es wurden die ersten 8 Aminosäuren des rekombinanten Proteins eindeutig identifiziert: MRGSHHHH.

Die Molekularmasse sowie der Oligomerisierungszustand des Proteins wurden mittels analytischer Ultrazentrifugation (UZ) bestimmt. Bei der ersten UZ-Messung in 50 mM Na-Phosphat, 250 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konnte keine Molekularmasse des Proteins bestimmt werden. Fast das ganze eingesetzte Protein (ca. 100 $\mu\text{g/ml}$) war im Verlauf der Messung aggregiert.

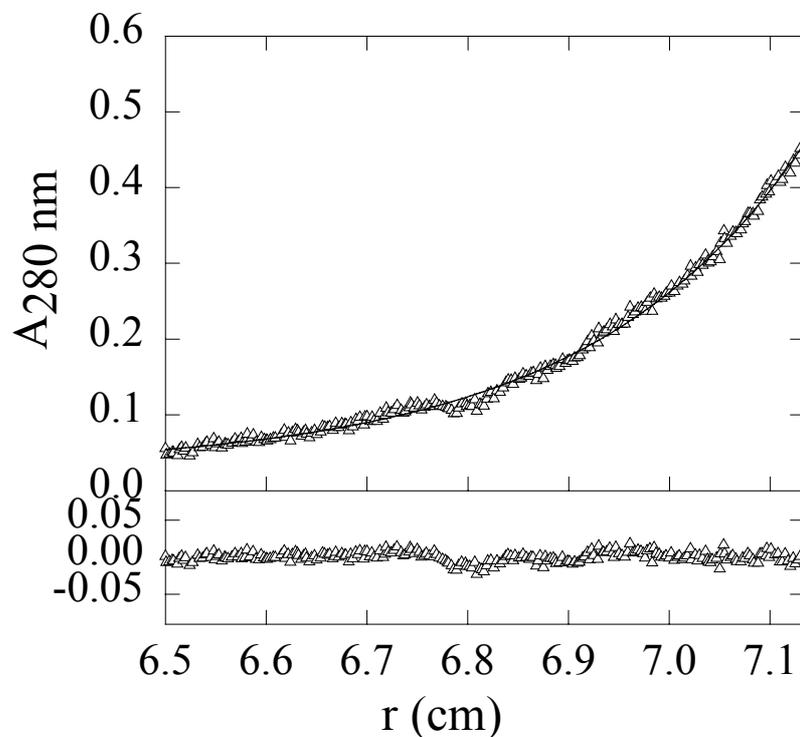


Abbildung 52. Das Sedimentationsgleichgewicht der Rezeptor-Ligand-Chimäre wurde bei 20000 rpm und 20 °C bei einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml in 10 mM Tris, 0,25 M L-Arginin-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 63 h bestimmt

Erst nach Zugabe von L-Arginin in den Messpuffer konnte der Sedimentationsgleichgewicht des Proteins bestimmt werden (Abbildung 52). Aus den Gleichgewichtsläufen bei 20000 rpm konnte der monomere Zustand des Proteins mit einem Molekulargewicht von 23,4 kDa ermittelt werden. Dieser Wert weicht vom erwarteten Molekulargewicht von 21 kDa ab, liegt jedoch im Rahmen der Messgenauigkeit dieser Methode.

3.10.3 Biophysikalische Charakterisierung der Rezeptor-Ligand-Chimäre

Um die Sekundärstruktur des Proteins zu untersuchen, wurden Fern-UV-CD-Spektren des Proteins unter nativen und denaturierenden Bedingungen aufgenommen (Abbildung 53). Das Fern-UV-CD-Spektrum des Proteins unter nativen Bedingungen konnte erst in einem Puffer unter Zusatz von 0,5 M Ammoniumsulfat gemessen werden. Spektren des Proteins unter denaturierenden Bedingungen wurden von 211 nm bis 250 nm aufgenommen. Für das native Protein wurden im Wellenlängenbereich von 200 nm bis 260 nm gemessen. Das CD-Spektrum des denaturierten Proteins entsprach dem Spektrum einer vollständig entfalteten Polypeptidkette (Schmid, 1989). Die Auswertung der gemessenen Spektren bezüglich deren Anteile an Sekundärstrukturelementen erfolgte wie beim nGLP-1R mit dem Programm CDNN (Böhm *et al.*, 1992).

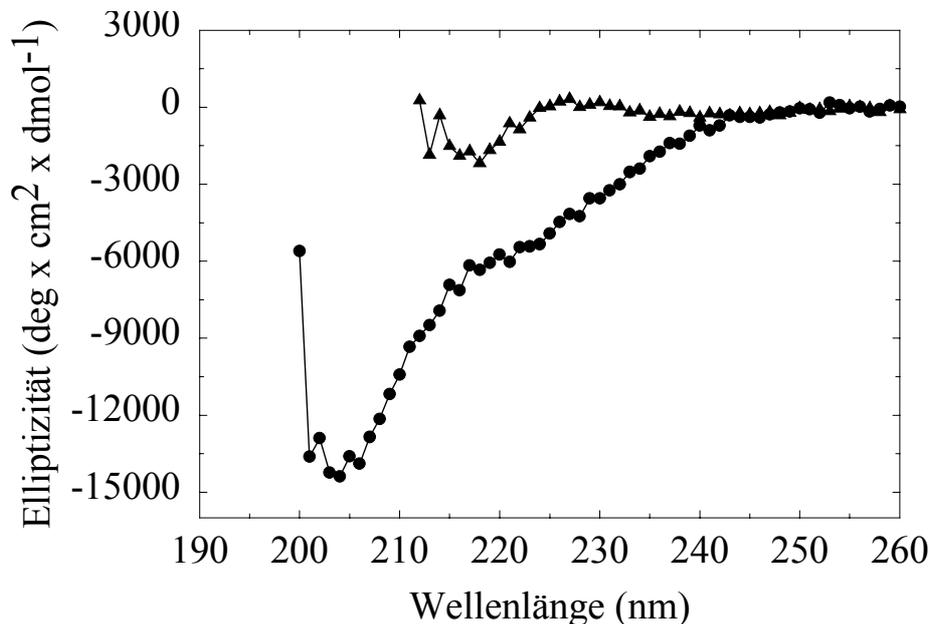


Abbildung 53. Fern-UV-CD-Spektren der renaturierten und aufgereinigten Rezeptor-Ligand-Chimäre. CD Spektren von 6,5 μ M Protein in 0,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris, pH 7,4 (■) und 7 μ M in 6 M GdmHCl, 20 mM Tris, pH 7,4 (▲) wurden in einer 1 cm Küvette bei 1 nm Bandbreite und einer Integrationszeit von 5 s bei 22 °C gemessen.

Es wurden 27 % α -Helix und 20 % β -sheet Anteile bestimmt. Die größten Differenzen zwischen den Spektren von nativen zu denaturierten Protein waren im Wellenlängenbereich von 220 bis 240 nm zu beobachten, wobei der maximale Unterschied bei 224 nm lag. Der Spektrum von der Chimäre mit

einem Hauptminimum bei 204 nm weist den gleichen Kurvenverlauf auf wie das Fern-UV-CD-Spektrum vom reinen Rezeptorfragment. Allerdings war die Signalintensität des CD-Spektrums der Chimäre viel niedriger.

Die gemessenen Fern-UV-CD-Spektren zeigen, dass die renaturierte Rezeptor-Ligand-Chimäre eine definierte Sekundärstruktur aufweist. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Stabilität des Proteins gegenüber Denaturierung durch Temperatur und Guanidiniumchlorid untersucht.

Bei der Messung der Fluoreszenz im Bereich des Emissionsmaximums des nativen Proteins zwischen 15 und 85 °C konnte keine kooperative Entfaltung des Proteins detektiert werden. Es zeigte sich genauso wie im Falle der reinen Rezeptordomäne eine fast lineare Abnahme des Fluoreszenzsignals mit steigender Temperatur (Abbildung 54A).

Aus diesem Grund wurden DSC-Messungen durchgeführt. Bei Messung der thermischen Entfaltung des Proteins im gleichen Puffer wie bei der Vermessung des nGLP-1R konnten keine eindeutigen Peaks detektiert werden.

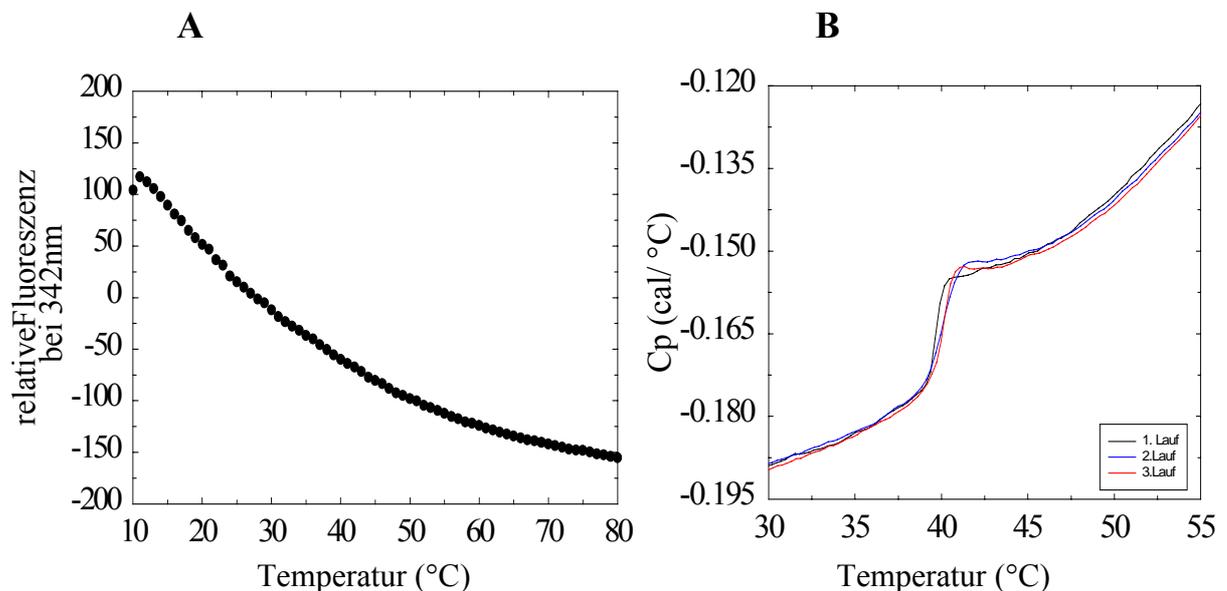


Abbildung 54. **A:** Abhängigkeit der Fluoreszenzemission der Rezeptor-Ligand-Chimäre von der Temperatur. 15 µg/ml Protein in 50 mM Na-Phosphat, 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM EDTA, pH 7,4 wurden in einer 1 cm Küvette von 10 °C auf 80 °C erhitzt und dabei die Fluoreszenzemission bei 342 nm nach einer Anregung bei 280 nm gemessen.

B: DSC-Spektren der rückgefalteten und aufgereinigten RL-Chimäre. Die thermische Entfaltung einer 0,3 mg/ml Proteinlösung in 50 mM Na-Phosphat, 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM EDTA, pH 7,4 wurde in einem VP-DSC Mikrokalorimeter (Micro Cal, Inc., Northampton, USA) mit einer Aufheizrate von 1 C/min zwischen 15 °C und 85 °C gemessen.

Erst mit Zugabe von 0,5 M Ammoniumsulfat in den Messpuffer konnte eine thermische Entfaltung des Proteins bei 44 °C detektiert werden (Abbildung 54B).

Im weiteren Verlauf wurde die Stabilität der Rezeptor-Ligand-Chimäre gegenüber Guanidiniumhydrochlorid mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie untersucht. In Abbildung 55 ist die Änderung des CD-Signals bei 222 nm in Abhängigkeit von der GdmHCl-Konzentration zu sehen. Der

Übergang von nativen in den denaturierten Zustand war irreversibel mit sehr geringer Kooperativität. Aufgrund der irreversiblen und unkooperativen GdmHCl-Entfaltung des Proteins konnten weder der Übergangsmittelpunkt noch die Freie Stabilisierungsenthalpie ermittelt werden.

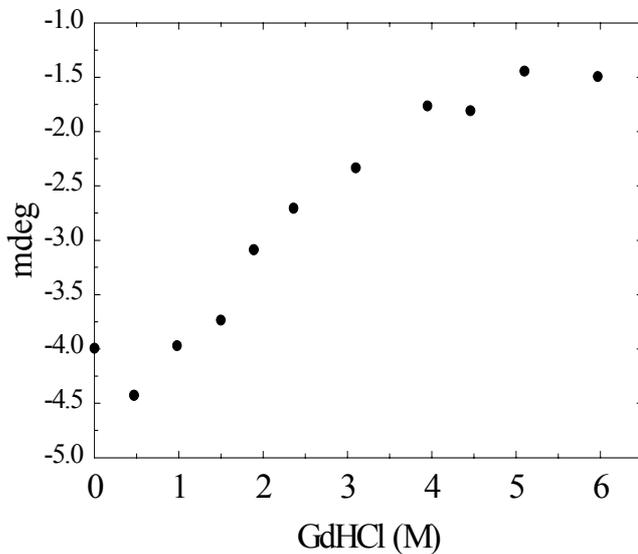


Abbildung 55. Guanidinium induzierte Entfaltung der Rezeptor-Ligand-Chimäre. Zur Messung der Entfaltung des Proteins mit Guanidinium wurde das aufgereinigte Protein in ein Puffer, bestehend aus 50 mM Na-Phosphat, 0.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,4 mit unterschiedlichen GdmHCl-Konzentrationen, verdünnt, über Nacht bei 15 °C inkubiert und anschliessend auf die Signalintensität bei 220 nm im CD-Spektrometer vermessen.

3.10.4 Zusammenfassung des Abschnitts 3.10

Die Messungen der analytischen Ultrazentrifugation der Rezeptor-Ligand-Chimäre und deren Stabilität gegenüber Temperatur und Guanidiniumhydrochlorid zeigten, dass das Protein eine instabile Struktur aufweist. Bezüglich der Temperaturdenaturierung zeigte das Protein keine Unterschiede zur reinen Rezeptordomäne. Die chemisch induzierte Denaturierung mit GdmHCl wies jedoch eine noch geringere Kooperativität im Vergleich zur isolierten Rezeptordomäne auf. Analytische UZ-Messungen zeigten eine zunehmende Aggregation, eventuell Oligomerisierung des Proteins während der Messung, das nur mit Zusatz von Arginin unterdrückt werden konnte. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Anfusionieren des Liganden zu keiner Stabilisierung des Rezeptorfragments führte, sondern dass die Rezeptordomäne im Kontext dieses Fusionsproteins sogar eine Destabilisierung erfuhr.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors

Struktur- und Funktionsuntersuchungen des humanen GLP-1 Rezeptors, die bisher durchgeführt wurden, beruhen auf Mutagenesestudien, Einsatz von chimären Rezeptoren oder *Cross-linking*-Experimenten (Heller *et al.*, 1996; Van Eyll *et al.*, 1996; Wilmen *et al.*, 1997; Graziano *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 2000). In eukaryontischen Systemen konnte der humane GLP-1 Rezeptor bisher nur mit sehr geringer Ausbeute exprimiert werden (Graziano *et al.*, 1993; Gromada *et al.*, 1995; Widmann *et al.*, 1996), was eine detaillierte Charakterisierung des Rezeptors erschwerte. Über eine Expression des gesamten GLP-1 Rezeptors in *E. coli* sind bis jetzt keine Daten veröffentlicht wurden. Die Expression von GPCRs in *E. coli* in funktioneller, membraninserierter Form scheint genauso wie bei der eukaryontischen Expression aufgrund der oft auftretenden hohen Cytotoxizität limitiert zu sein (Grisshammer & Tate, 1995). Insertion der Rezeptoren in die Zellmembran erschwert dazu deren Isolierung. So wurden bis jetzt nur wenige Rezeptoren der Klasse B der GPCRs beschrieben, wie VIP (*vasoactive intestinal peptide*) Rezeptor und PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) Rezeptor, die in Milligramm-Mengen aus eukaryontischen Zellmembranen isoliert werden konnten (Couvineau *et al.*, 1990; Schafer *et al.*, 1993). Insgesamt wurden nur 11 G-Protein gekoppelte Rezeptoren in *E. coli* mit N-terminalem Fusionsprotein GST exprimiert (Kiefer *et al.*, 2000). Die Expressionsmengen variierten zwischen 0,1 bis 10 % des gesamten Zellproteins. Eine Expression als *Inclusion Bodies* im Cytoplasma von *E. coli* ist nicht unbedingt mengenlimitiert. Allerdings sind die Rückfaltungsmethoden von Membranproteinen aus *Inclusion Bodies* noch nicht etabliert.

Die strukturelle Charakteristik der Mitglieder der Klasse B G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist ihre große N-terminale Domäne (ca. 100-170 Aminosäuren) mit 6 hochkonservierten Cysteinresten. Diese Domäne spielt eine essentielle Rolle bei der selektiven Ligandenbindung und darauf folgenden Signalübertragung (Carruthers *et al.*, 1994; Buggy *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1995; Bergwitz *et al.*, 1996; Kronenberg *et al.*, 1997; Ji *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 1999). Wilmen *et al.* haben die N-terminale Domäne des Ratten GLP-1 Rezeptors in *E. coli* exprimiert und Ligandenbindung für dieses Konstrukt nachgewiesen (Wilmen *et al.*, 1996). Willshaw and Donnelly berichteten über Expression der gleichen Domäne in *E. coli*, haben aber keinerlei Daten bezüglich des Expressionslevels oder der Bindungsaktivität gezeigt (Willshaw & Donnelly, 1998). Xiao *et al.* konnten ebenfalls Ligandenbindung an der isolierten N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors (Aminosäuren 1-143 & 24-143) nach der Expression in Insektenzellen Sf9 und eukaryontischer Zelllinie COS-7 nachweisen (Xiao *et al.*, 2000). Bei all diesen Ansätzen wurden keine biochemisch-biophysikalische Charakterisierung dieses Rezeptorfragments durchgeführt. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Expression der N-terminalen Domäne des GLP-1 Rezeptors in unlöslicher Form im Cytoplasma von *E. coli* und die Renaturierung aus *Inclusion Bodies* zu einer eigenständigen Protein-

domäne mit definierter Sekundär- und Tertiärstruktur und Ligandenbindungseigenschaften.

4.1.1 Expression und Renaturierung der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors

Der nGLP1-R wurde im *E. coli* Stamm M15 in unlöslicher Form als *Inclusion Bodies* überexprimiert. Dabei erwies sich der N-terminale 6Histidintag als unbedingt erforderlich für die Expression des Proteins. Bei Klonen ohne His-tag konnte keine Expressionsbande mittels SDS-PAGE detektiert werden. Mögliche Ursache dafür könnte eine herabgesetzte Initiation der Translation durch Ausbildung von stabilen Sekundärstrukturen auf der mRNA-Ebene (Liebhaber *et al.*, 1992; Malmgren *et al.*, 1996) sein. Solche Sekundärstrukturen in der mRNA sind häufig bei GC-reichen Sequenzen zu beobachten (Looman *et al.*, 1986). Im Falle des nGLP-1R bestehen die ersten 16 Basen nur aus G und C. Untersuchungen der mRNA der hergestellten Konstrukte mittels des Programms *mfold* Version 3.0 (*mfold server* : 1995-2002, Michael Zuker, Rensselaer Polytechnic Institute, USA) deuten auf die Ausbildung von einigen Haarnadelschleifen bei den Sequenzen ohne N-terminalen His-tag hin. Möglichkeiten zur Vermeidung von mRNA-Sekundärstrukturen wären das Einfügen von weiteren Aminosäureresten am N-Terminus, deren Kodons die Ausbildung von stabilen Loops in der mRNA verringern würden oder Verwendung von einem *two-cistron*-Plasmid (Schoner *et al.*, 1997). Im Fall von nGLP-1R konnte die Einführung von einem 6xHistidintag die Überexpression des Proteins ermöglichen. Solche expressionssteigernde Wirkung eines N-terminalen His-tags wurde auch im Falle des Ratten Neurotensin-Rezeptors berichtet (Grishammer *et al.*, 1993).

Es ist nicht zu vernachlässigen, dass als N-terminale Aminosäure Ala21 der kodierenden Sequenz des GLP1-Rezeptors ausgewählt wurde, da sie die erste Aminosäure nach der putativen Signalsequenz des GLP-1 Rezeptors ist (Kommunikation mit Dr. Wilmen und Datenbankrecherche zu Beginn der Arbeiten). Allerdings gibt es in den letzten Jahren einige Hinweise darauf, dass die Signalsequenz nicht bei Aminosäure 20 sondern mit Aminosäure Pro23 endet (aktueller Stand der SwissProt Datenbank). In diesem Fall wäre bei der Expression der N-terminalen Domäne beginnend mit Arg23 statt Ala21 die schon erwähnte Anhäufung von CG-Basen deutlich verringert. Diese Hypothese sollte durch die Expression eines solchen Konstrukts überprüft werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass in sehr vielen Fällen ein Zusammenhang zwischen der *in vivo*-Stabilität und dem damit verbundenen Expressionsniveau eines Proteins und der N-terminalen Aminosäure besteht (Bachmair *et al.*, 1986). Dabei erwiesen sich Aminosäuren Isoleucin, Asparaginsäure, Methionin und Serin als stabilisierend, dagegen wurden Arginin und Lysin eher als ungünstig festgestellt (Tobias *et al.*, 1991)

Der C-Terminus des nGP1R wurde mit einem polyionischen Tag bestehend aus 4 Argininen und 4 Lysinen versehen. Dieser Tag war zu einer möglichen Renaturierung des Proteins auf einer Matrix vorgesehen, falls die Faltung der Rezeptordomäne in Lösung fehlschlagen würde. Nach der Expression des Proteins und erfolgreicher Renaturierung in Lösung wurde der polyionische Tag zu einer spezifischen Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie benutzt. Solche polyionische Fusionspeptide werden sehr oft für die Reinigung von Proteinen verwendet (Ford *et al.*, 1991;

Stubenrauch *et al.*, 2000). So wurde ein C-terminaler 6xArginintag für die Isolierung von beta-Urogastron von Smith *et al.* eingesetzt (Smith *et al.*, 1984)

Die isolierten IBs des nGLP-1R wurden bei stark denaturierenden und reduzierenden Bedingungen solubilisiert und anschließend danach in einen GdmHCl-Puffer mit niedrigem pH-Wert (<4) umgepuffert, um eine unerwünschte Autoxidierung der Cysteine vor dem Start der Rückfaltungsexperimente zu vermeiden. Damit wurde die Renaturierung jedes Mal bei gleichen definierten Bedingungen gestartet, bei denen das Protein als vollständig entfaltete Polypeptidkette mit reduzierten Cysteinenseitenketten vorlag. Da das isolierte *Inclusion Body*-Material den nGLP-1R in weitgehend homogener Form enthielt (70-80 %), und bei vergleichenden Faltungsansätzen ausgehend aus IBs, die direkt nach der Isolierung eingesetzt wurden oder vorher über IMAC aufgereinigt wurden, keine Unterschiede in der Renaturierungsausbeute beobachtet werden konnten (Daten nicht dargestellt), wurde keine weitere Aufreinigung der solubilisierten IBs vor der Renaturierung durchgeführt.

In der Regel erfolgt die Renaturierung von Proteinen durch Entfernung des Denaturierungsmittels durch Dialyse oder Verdünnung. Bei der Faltung von nGLP-1R durch Dialyse wurde jedoch eine starke Ausbildung von Aggregaten beobachtet, was die Ursache darin haben könnte, dass bei der Dialyse das renaturierende Protein längere Zeit schwach denaturierenden Bedingungen ausgesetzt war, so dass die Faltungsintermediate genügend Zeit hatten zu präzipitieren. Aus dem Grund wurde die Renaturierung vom Protein durch schnelle Verdünnung in den argininhaltigen Faltungspuffer durchgeführt. L-Arginin erwies sich als das am besten geeignete niedermolekulare Additiv für die Renaturierung der Rezeptordomäne. Die löslichkeitsvermittelnde Wirkung von Arginin ist im Moment nicht vollständig geklärt. Die Ursache liegt sicherlich in der Struktur von L-Arginin, das eine Guanidinogruppe und eine Aminogruppe besitzt. Die Guanidinogruppe gilt als schwach denaturierend. Die Überlegungen gehen in die Richtung, dass Arginin durch präferentielle Hydratation die Löslichkeit von hydrophoben, aggregationsanfälligen Faltungsintermediaten erhöht (Buchner & Rudolph, 1991; Rudolph *et al.*, 1998). Die optimale Argininkonzentration für die Faltung des nGLP-1R lag bei 0,5 M. Ein höherer Gehalt an L-Arginin führte zu keiner Steigerung der Renaturierungsausbeute, im Gegensatz zu anderen renaturierten Proteinen wie nPTHr (Grauschopf *et al.*, 2000) oder rh-Pro-NGF (Rattenholl *et al.*, 2001), für die eine drastische Erhöhung der Renaturierungsausbeute mit Zusatz von 1 M bzw. 0,75 M Arginin erzielt wurden.

Da der nGLP-1R 6 Cysteine enthält, wurde unter Zusatz eines *Oxido-Shuffling*-Systems aus oxidiertem und reduziertem Gluthathion renaturiert. Diese niedermolekularen Reagenzien dienen der Katalyse von Thiol-Disulfidaustauschreaktionen zur Ausbildung des nativen Disulfidmusters eines Proteins (Ahmed *et al.*, 1975). Für die Faltung des nGLP-1R mit korrekter und definierter Disulfidverbrückung war Zusatz von GSH und GSSG zwingend notwendig und nGLP-1R ließ sich bei einem Überschuss an GSSG zu GSH mit größerer Ausbeute renaturieren.

Der optimale pH-Wert des Renaturierungspuffers lag zwischen 8 und 9. Unter einem pH-Wert von 6,5

wurde kein natives Protein detektiert. Die Ursache ist sicherlich darin zu suchen, dass bei der Ausbildung von S-S-Brücken die Thiolat-Anionen die reagierende Spezies sind. Diese Anionen können aufgrund des pKa von SH-Gruppen von Cysteinen bei 8,6 erst bei höheren pH-Werten ausgebildet werden. D.h. bei niedrigen pH-Werten kann kein Disulfidaustausch stattfinden.

Bei der *in vitro* Faltung von Proteinen beobachtet man eine kinetische Konkurrenz zwischen der korrekten Faltung und der Aggregation und Fehlfaltung (Kiefhaber *et al.*, 1991). Die Aggregationsprozesse beruhen meist auf hydrophoben Wechselwirkungen partiell gefalteter Intermediate oder der entfalteten Polypeptidketten und sind Reaktionen höherer Ordnung (Zettlmeissl *et al.*, 1979), wobei die korrekte Faltungsprozesse meist durch Reaktionen erster Ordnung bestimmt werden. Dementsprechend erhöht sich die Ausbildung von Aggregaten bei der Erhöhung der Konzentration der entfalteten Polypeptidkette. Proteinaggregation erhöht sich auch mit der Erhöhung der Renaturierungstemperatur, da mit zunehmender Temperatur hydrophobe Wechselwirkungen zunehmen. Aus diesem Grund werden die Renaturierungsreaktionen bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen und niedrigen Temperaturen durchgeführt. Im Falle des nGLP-1R sank die Renaturierungsausbeute bei der Erhöhung der Renaturierungstemperatur von 15 °C auf 20 °C, um das fast 1,5fache ab.

Da die korrekt gefalteten Proteine nicht durch teilweise gefaltete Polypeptidketten ausgefällt werden, können hohe Konzentrationen an nativem Protein durch sukzessive Zugabe des denaturierten Proteins erzielt werden (Rudolph & Fischer, 1990). So konnte durch eine Pulsrenaturierung des nGLP-1Rs die Endkonzentration an rückgefaltetem Protein 5-6fach gesteigert werden. Ab einer Proteinkonzentration des nGLP-1R von maximal 0,2 mg/ml konnte keine Steigerung in der Renaturierungsausbeute beobachtet werden.

Ausgehend von der in den Faltungsansatz eingesetzten Proteinmenge und nach der anschließenden Reinigung des Zielproteins mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration wurde eine Renaturierungsausbeute von ca. 15 % des Ausgangsproteins erreicht.

Die Identität und Homogenität der renaturierten Rezeptordomäne konnten mittels N-terminaler Proteinsequenzierung, ESI-Massenspektroskopie sowie der analytischen Ultrazentrifugation nachgewiesen werden.

Das rückgefaltete und aufgereinigte Protein zeigte eine definierte Sekundär- und Tertiärstruktur auf. Die Auswertung der gemessenen Fern-UV-CD-Spektren des nGLP-1R bezüglich deren Anteile an Sekundärstrukturelementen erfolgte mit dem Programm CDNN (Böhm *et al.*, 1992). Für das native Protein konnten 30 % α -Helizes- und 16 % β -Faltblattstruktur-Anteile abgeschätzt werden. Der Vergleich mit dem Fern-UV CD-Spektrum des N-terminalen Rezeptoranteils des humanen PTH-Rezeptors ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung in der Sekundärstruktur, was die Annahme ähnlicher struktureller Eigenschaften der N-terminalen Domänen der Klasse B G-Protein gekoppelten Rezeptoren unterstützt (Grauschopf *et al.*, 2000). Sekundärstrukturmessungen an der N-terminalen Domäne des humanen CFR-Rezeptors zeigten ebenfalls einen ähnlichen Kurvenverlauf wie beim

nGLP-1R und dem nPTHr, waren allerdings sehr stark von Pufferbedingungen abhängig. So zeigten sich geringere Sekundärstrukturanteile in wässrigen Puffern wie beispielweise Phosphatpuffern und ein stärker ausgeprägter helikaler Kurvenverlauf in TFE (Perrin *et al.*, 2001). Nah-UV-CD- und Fluoreszenzspektren des renaturierten nGLP-1R zeigten eine definierte Tertiärstruktur des nativen Proteins. Das Emissionsmaximum des nativen Proteins lag bei 342 nm im Gegensatz zum denaturierten Protein mit einem Emissionsmaximum bei höherer Wellenlänge. Diese Tatsache zeigt, dass verschiedene Bereiche des Proteins in Tertiärkontakte involviert sind. Die thermische Entfaltung des Rezeptorfragmentes erfolgte bei einer Schmelztemperatur von 44 °C und war zu 70 % reversibel. Eine ähnliche thermische Instabilität wurde im Falle der ebenfalls in *E. coli* exprimierten und renaturierten Domäne des humanen Interleukin-11 Rezeptors berichtet, die trotz der hochaffinen Ligandenbindungseigenschaften eine thermische Denaturierung schon bei 30 °C erfuhr (Schleinkofer *et al.*, 2001). Im Vergleich dazu findet die thermische Denaturierung in der Natur vorkommender Proteine erst bei 50-60 °C statt. All diese Daten weisen darauf hin, dass die Rezeptordomäne zwar eine definierte aber eine relativ instabile Struktur aufweist. Die Tatsache könnte durch den fragmentarischen Charakter des Proteins erklärt werden, dem die N-terminale Verankerung in der Lipidmembran fehlt. Außerdem könnten Tertiärkontakte mit den *loop*-Regionen des Gesamtrezeptors, die im Falle des nGLP-1Rs fehlen, zur Stabilisierung der N-terminalen Domäne beitragen. Eine weitere zusätzliche Erklärung für die instabile Natur der isolierten Rezeptordomäne ist im Vorhandensein des stark positiv geladenen C-terminalen polyionischen *Tags* zu suchen. Im Gegensatz zu diesem *Tag* ist die reine N-terminale Domäne mit einem isoelektrischen Punkt von 4,88 ein eher „saurer Protein“. Allerdings verringert sich die Möglichkeit der Aggregationsanfälligkeit des nGLP-1R infolge der ionischen Wechselwirkungen zwischen dem N-terminalen Teil des Proteins und dem C-terminalen Ende aufgrund der Tatsache, dass am N-terminalen Ende des nGLP-1R der 6xHistidintag vorhanden ist. Bei dieser Anhäufung von basischen Resten am N-Terminus des Proteins wäre eine intramolekulare ionische Wechselwirkung zu dem ebenfalls basischen Poly-Arginin-Lysin-*Tag* nicht möglich. Eine intermolekulare ionische Wechselwirkung wäre allerdings nicht ausgeschlossen. Diese Tatsache wird von der Beobachtung unterstützt, dass der nGLP-1R in Puffern ohne NaCl oder L-Arginin schon bei niedriger Konzentration (<150 µg/ml) zur Aggregation neigt. Aus diesem Grund wurden alle spektroskopischen Messungen des Proteins unter Zusatz von 0,3-1 M NaCl oder 0,25 M L-Arginin durchgeführt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ein anderer Expressionsklon der N-terminalen Domäne des GLP-1 Rezeptors hergestellt, der keinen polyionischen Tag besitzt. Stabilitätsuntersuchungen von diesem Klon sollen in weiteren Arbeiten durchgeführt werden und mit denen des nGLP-1R verglichen werden.

Als erster Ansatz zur strukturellen Charakterisierung der isolierten Rezeptordomäne wurde die Verknüpfung der 6 konservierten Cysteine in Disulfidbrücken nachgewiesen. Die strikte Konservierung dieser Cysteinreste innerhalb der Klasse B G-Protein gekoppelter Rezeptoren deutet auf ihre wichtige strukturelle Rolle hin (Knudsen *et al.*, 1997; Knudsen *et al.*, 1998). So führte die

Reduktion der Cysteinreste des Sekretin-Rezeptors zu Verlust der Bindungsaktivität (Asmann *et al.*, 2000). Nach Austausch der Cysteinreste der N-terminalen Domäne des humanen VIP Rezeptors gegen Glycinreste konnte ebenfalls keine Ligandenbindungsaktivität mehr detektiert werden (Gaudin *et al.*, 1995). Die Disulfidbrückenanalyse des nGLP-1R zeigte die Existenz von 3 Disulfidbrücken: zwischen Cys46 und Cys71, zwischen Cys62 und Cys104 sowie zwischen Cys85 und Cys126. Die Ergebnisse schließen eine Existenz von anderen alternativen Disulfidbrücken vollständig aus. Die gleiche Disulfidverbrückung konnte sogar im ursprünglichen Klon I (siehe Tab. 5), der ein zusätzliches Cystein vor der kodierenden Sequenz des nGLP-1R enthielt, festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung zeigt, dass die Disulfidverbrückung der N-terminalen Domäne des GLP-1 Rezeptors sogar bei Existenz eines zusätzlichen Cysteinrestes durch ihre definierte Struktur determiniert wird. Die N-terminalen Domänen des humanen PTH-Rezeptors und des humanen Typ I GRF (*corticotropin releasing factor*) Rezeptors, beide Vertreter der Klasse B G-Protein gekoppelter Rezeptoren, weisen dasselbe Disulfidmuster auf (Grauschopf *et al.*, 2000; Perrin *et al.*, 2001). Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, dass die 6 konservierten Cysteine der N-terminalen Domänen dieser Klasse von Rezeptoren mit einer einheitlichen Disulfidverbrückung verknüpft sind (Abbildung 56).

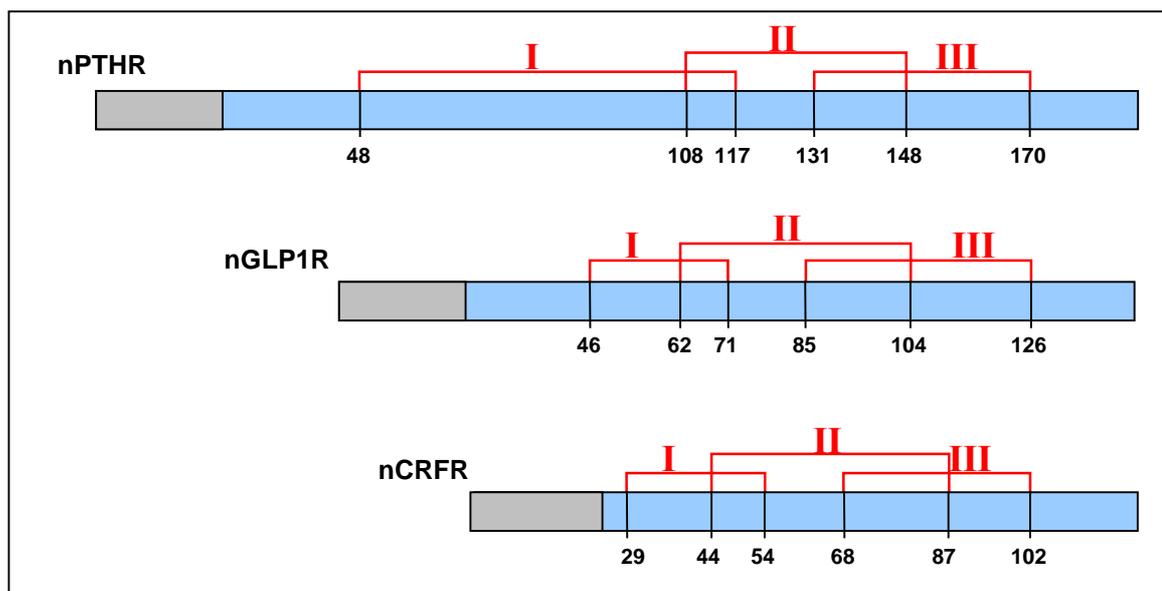


Abbildung 56. Disulfidverbrückung der N-terminalen Domänen der humanen Rezeptoren für GLP-1, PTH und Type I CRF, Vertreter der Klasse B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Dargestellt sind in **grau** Signalsequenzbereiche, in **hellblau**: die N-terminalen Domänen bis zur 1. Transmembranhelix; in **schwarz**: konservierte Cysteine; in **rot**: Disulfidbrücken. Die Disulfidverbrückungen des nPTH- und des nGRF-Rezeptors wurden aus Grauschopf *et al.* (2000) und Perrin *et al.* (2001) entnommen.

4.1.2 Ligandenbindung der isolierten N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors

Die Wechselwirkung der renaturierten Rezeptordomäne mit dem Peptidliganden GLP-1 wurde mittels Bindung zum biotinylierten Ligand und durch Quervernetzungsexperimente nachgewiesen. Die Quervernetzung von nGLP-1R mit GLP-1 lieferte ein *Cross-Linking*-Produkt mit einem apparenten Molekulargewicht, welches dem Rezeptor-Ligand-Komplex entsprechen würde. Xiao *et al.* konnten ebenfalls ein spezifisches *Cross-linking*-Produkt aus der isolierten N-terminalen Domäne und dem ^{(125)I}-GLP-1 identifizieren (Xiao *et al.*, 2000).

Eine quantitative Charakterisierung der Bindung erfolgte mittels Oberflächenplasmonresonanzmessungen (BIAcore) und Isothermaler Titrationskalorimetrie. Die Auswertung der BIAcore-Messungen ergab eine Bindungskonstante von 46 ± 17 nM. Mittels ITC-Messungen konnte eine 1:1 Bindung der Reaktionspartner mit einer Dissoziationskonstante von 144 nM bestimmt werden. Im Vergleich dazu liegen die Bindungskonstanten, die für den Gesamtrezeptor in der Plasmamembran gemessen wurden, im Bereich von 0,2 nM bis 3,5 nM (Thorens *et al.*, 1993; Gromada *et al.*, 1995; Kieffer *et al.*, 1996). Die gleiche trunkierte Proteindomäne des GLP-1 Rezeptors, die in eukaryontischen COS-7-Zelllinien exprimiert wurde, zeigte ebenfalls eine um das 100fach herabgesetzte Affinität zu GLP-1 (Xiao *et al.*, 2000). Eine ähnliche Abnahme der Bindungsaffinität wurde auch bei der isolierten N-terminalen Domänen der Rezeptoren für PACAP, PTH und GRF-1 festgestellt (Cao *et al.*, 1995; Grauschopf *et al.*, 2000; Perrin *et al.*, 2001).

Eine mögliche Ursache der Verschlechterung der Bindungsaktivität des nGLP-1R könnte im Vorhandensein mehrerer Spezies des renaturierten Proteins mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten liegen. Diese Hypothese scheint allerdings aufgrund der definierten Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins mit homogener Disulfidverbrückung, der 1:1 Bindungsstöchiometrie, die mittels ITC festgestellt wurde, und der Homogenität des Proteins, die mittels RP-HPLC nachgewiesen wurde, wenig wahrscheinlich. Mittels einer Ligandenaffinitätssäule konnte gezeigt werden, dass über 80 % des eingesetzten Rezeptorfragmentes an die Ligandensäule binden konnten. Diese Bindung konnte spezifisch mit freiem Ligand kompetitiert werden. Bei Berechnungen der Bindungsaffinität unter Annahme, dass nur 80 % des eingesetzten Proteins eine hochaffinbindende Spezies darstellt, kommt man auf eine Verbesserung der Bindungskonstante um den Faktor von 1,3. Das würde bedeuten das die Dissoziationskonstante immer noch im nanomolaren Bereich liegt. Am Beispiel einer Messung wurde statt 56,7 nM eine Dissoziationskonstante von 45,4 nM berechnet. Die Differenz beider Werte liegt im Bereich der Standardabweichung der Dissoziationskonstante des nGLP-1R. Eine solche geringe Verbesserung der Bindungsaffinität würde immer noch nicht die 100-200fach höhere Bindungsaffinität des Gesamt-GLP-1-Rezeptors im Vergleich zu nGLP-1R erklären.

In diesem Kontext sollte ein möglicher Einfluss des N-terminalen His-tags und des C-terminalen polyionischer Tags im nGLP-1R diskutiert werden. Im Falle des His-tags konnte am Beispiel des nPTHR bewiesen werden, dass sich die Bindungsaffinität des Konstrukts vor und nach einer Abspaltung desselben nicht verändert (persönliche Mitteilung von Dr. Grauschopf). Auch bei

Expressionsklonen des Ratten Neurotensin-Rezeptors (NTR) konnte gezeigt werden, dass ein N-terminaler His-tag oder sogar ein N-terminal anfusioniertes MBP (*maltose binding protein*) keine Beeinträchtigung der Ligandenbindungsaffinität verursachte (Grishammer *et al.*, 1993; Tucker & Grishammer, 1996). Es wurden die gleichen Bindungskonstanten wie bei in eukaryontischen COS und LTK-Zelllinien ohne zusätzliche tags exprimiertem NTR gemessen. Tucker & Grishammer haben weiterhin bei der Expression des gleichen Proteins (NTR) unterschiedliche C-terminale Tags (His-tag, Flagtag, Strep-tag und Biotag) und ein C-terminales Fusionsprotein (*E.coli* Thioredoxin) näher untersucht. Dabei zeigte sich ebenfalls kein Einfluss dieser Tags bzw. des Fusionsproteins auf die Bindung des Rezeptors. Es wurden lediglich unterschiedliche Wirkungen auf die lösliche Expression des Proteins festgestellt. Aufgrund der oben geschilderten Beispiele ist es wenig wahrscheinlich, dass die Bindungsaffinität des nGLP-1R durch eingefügte Tags negativ beeinflusst wird. Dennoch ist eine Beeinflussung der Bindung nicht vollständig auszuschließen. Es sollten daher weitere Expressionsklone der Rezeptordomäne ohne Tags hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften untersucht werden.

Die tatsächliche Ursache für die schwächere Affinität der isolierten Domäne ist sehr wahrscheinlich darin zu suchen, dass bei der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung neben der N-terminalen extrazellulären Domäne auch die Exoloops und sogar die Transmembranbereiche eine Rolle spielen. Diese Vermutung wird mittlerweile von zahlreichen experimentellen Daten gestützt (Gardella *et al.*, 1993; Stroop *et al.*, 1996; Couvineau *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1997; Du *et al.*, 1997; Bisello *et al.*, 1998; Vilardaga *et al.*, 2001). So wurde durch Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen die Aminosäurereste 206-219 des ersten extrazellulären Loops des Glukagon-Rezeptors, eine starke Abnahme der Bindungsaktivität des Liganden an den Gesamtrezeptor festgestellt (Unson *et al.*, 1996). Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Untersuchungen mit chimären Sekretin-VIP-Rezeptoren beschrieben (Holtmann *et al.*, 1995). Dabei erwiesen sich die Aminosäuren His189-Lys190 am C-Terminus des ersten extrazellulären Loops und 4 Aminosäurereste am N-terminalen Teil des zweiten extrazellulären Loops des Sekretin-Rezeptors als essentiell für die Bindungsaffinität. Im Falle des GLP-1 Rezeptors wurde eine Beteiligung der geladenen Aminosäurereste K197, D198, K202 im Bereich des Übergangs der Transmembranhelix 2 zum ersten extrazellulären Loop (EC1) sowie der Reste D215 und R227 des EC1 an der Ligandenbindung nachgewiesen (Xiao *et al.*, 2000). Die Reste K197, D198, K202 sind konserviert bei den Rezeptoren der Klasse B. Ein Austausch der Aminosäurereste R166, K173 und D174 vom Sekretin-Rezeptor (entsprechen R190, K197 und D198 im GLP-1 Rezeptor) und D196 vom VIP-1 Rezeptor (entspricht D198 des GLP-1 Rezeptors) gegen Alanin führte zu einer starken Beeinträchtigung der Ligandenbindung (Du *et al.*, 1997; Di Paolo *et al.*, 1998, Di Paolo *et al.*, 1999). Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob die hochaffine Bindung der Liganden durch eine zusätzliche Beteiligung dieser Bereiche zustande kommt oder eher durch deren Beitrag zur Stabilisierung der N-terminalen Domäne oder des N-Terminus-Ligand-Komplexes. Letztere Hypothese wird von Ji *et al.* vermutet

(Ji *et al.*, 1998). Sie postulieren eine 2-Stufen-Interaktion zwischen PTH und seinem Rezeptor, in dem als erstes ein hochaffiner Komplex zwischen den beiden Reaktionspartnern entsteht und dann dieser Komplex durch Wechselwirkung mit membranassoziierten Bereichen des Rezeptors stabilisiert wird. Die komplexe Natur der Interaktion zwischen Rezeptor und Peptidliganden wird von der Beobachtung unterstützt, dass ein niedermolekularer Ligand des GLP-1 Rezeptors (T-0632, Struktur in der Abbildung 57 dargestellt) identifiziert wurde, welcher die durch GLP-1 induzierte cAMP-Produktion inhibieren kann, allerdings eine Bindungsaffinität zum Rezeptor im mikromolaren Bereich aufweist (Tibaduiza *et al.*, 2001).

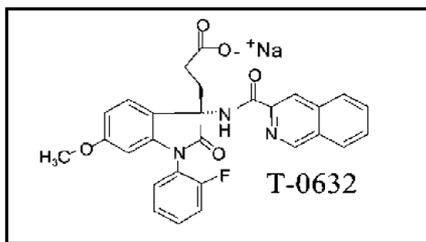


Abbildung 57. Struktur des niedermolekularen Liganden (T-0632) des humanen GLP-1 Rezeptors (Tibaduiza *et al.*, 2001)

Am Beispiel des humanen PTH-Rezeptors konnte die wichtige Rolle der Aminosäurereste im Übergangsbereich der N-terminalen Domäne zur 1. TM auf die Rezeptoraffinität nachgewiesen werden (Carter *et al.*, 1999). Dieses Ergebnis lässt einen Einfluss der Membranverankerung auf die Struktur der N-terminalen Domäne vermuten. Eine Überprüfung dieser Hypothese könnte durch Expression und Charakterisierung eines Konstrukts, bestehend aus der N-terminalen Domäne zusammen mit der 1.TM-Helix erfolgen. Eine weitere Möglichkeit wäre den isolierten nGLP-1R C-terminal beispielsweise an einem Biacore-Chip zu koppeln, was den Freiheitsgrad eines membranverankerten N-Terminus simulieren würde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden solche Experimente nicht durchgeführt. Die Rezeptordomäne wurde lediglich unspezifisch über Aminogruppen auf eine Biacore-CM5-Chip-Oberfläche gekoppelt und auf ihre Bindungseigenschaften zu GLP-1 und den Kontrollpeptiden PTH und Calcitonin hin untersucht. Es konnte eine spezifische Interaktion mit GLP-1 festgestellt werden, allerdings wurde eine geringfügige unspezifische Bindung zu PTH beobachtet. Da das gemessene Signal der Wechselwirkung mit GLP-1 niedriger lag als das theoretische, bei einer 1:1 Bindung zu erwartende Signal, konnten keine Bindungskonstanten für einen Vergleich mit der Bindungsaffinität des Rezeptorfragmentes in Lösung ermittelt werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass bei der unspezifischen Kopplung des Rezeptorfragments an die Chip-Oberfläche eine teilweise Denaturierung des eingesetzten Proteins stattgefunden hat und das Protein so immobilisiert wurde, dass es sterisch an der Ligandenbindung gehindert wurde. Insofern wären Bindungsstudien nach Einfügen eines Cysteins am C-terminalen Ende des nGLP-1R und spezifischer Kopplung über dieses zusätzliche Cystein sehr interessant und einfach durchzuführen. Das zusätzliche Cystein sollte sich nach Erfahrungen mit dem nGLP-1R und dem ursprünglichen Klon I, der ein zusätzliches N-terminales Cystein und die gleiche Disulfidverbrückung besitzt, nicht negativ auf die Struktur der Rezeptordomäne auswirken.

In der Literatur wurde für einige G-Protein gekoppelte Rezeptoren gezeigt, dass deren Bindungsaffinität von der Kopplung zu trimeren G-Proteinen stark abhängig ist (Bertin *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993; Lelianova *et al.*, 1997; Stanasila *et al.*, 1999). Zu diesen Rezeptoren zählen der Somastostatin-, der Latrotoxin-, der Opioid- und der Serotonin_{5-HT}-Rezeptor. Eine Kopplung des nGLP-1R an ein G-Protein ist nicht möglich, da die Interaktion der GPCRs an G-Proteine über cytoplasmatische Bereiche dieser Rezeptoren erfolgt. Mittels Mutationsanalysen an humanen GLP-1 Rezeptoren und Untersuchungen an isolierten Fragmenten der cytoplasmatischen Loopbereiche konnte für den GLP-1 Rezeptor gezeigt werden, dass bestimmte Aminosäurereste der ersten und dritten cytoplasmatischen Loopbereiche für die Interaktion mit G-Proteinen verantwortlich sind (Heller *et al.*, 1996; Takhar *et al.*, 1996; Mathi *et al.*, 1997; Montrose-Raczadeh *et al.*, 1999). Im Falle des trunkierten nGLP-1R fehlen die Rezeptordomänen, die mit den G-Proteinen interagieren. Diese fehlende Kopplung an ein G-Protein des nGLP-1R könnte wiederum zur beobachteten Senkung der Affinität zum Liganden geführt haben.

Eine Expression in *E. coli* hat denn Nachteile, dass die posttranslationale Modifizierung von Proteinen, die in eukaryontischen Zellen stattfindet, nicht durchgeführt wird. Der GLP-1 Rezeptor besitzt in seinem N-Terminus 3 potentielle Glykosylierungsstellen an den Resten Asn63, Asn82 und Asn115. Die fehlende Glykosylierung des in *E. coli* exprimierten nGLP-1R wäre eine weitere Erklärung der schwachen Bindungsaffinität. Die Rolle der Glykosylierung von GPCRs für die Ligandenbindung ist allerdings noch umstritten. So berichten Kamitani & Sakata von der Notwendigkeit der Glykosylierung von Asn123 in der N-terminalen Domäne des humanen CRLRs (*calcitonin receptor-like receptor*) für die Ligandenbindung und Signalübertragung (Kamitani & Sakata, 2001). Dementgegen berichten Hilairett *et al.*, dass die Glykosylierung von GRLR nicht die Ligandenselektivität beeinflusst (Hilairett *et al.*, 2001). Eine ähnliche Beobachtung wurde schon viel früher bei β_2 -adrenergem Rezeptor von George *et al.* beschrieben, wobei eine Inhibierung der Glykosylierung keine Änderung der Ligandenbindungsaffinität bewirkte (George *et al.*, 1986).

Eine weitere Ursache der relativ schwachen Interaktion des nGLP-1R mit seinem Liganden wäre in der sogenannten Theorie des *membrane-bound-pathway* zu suchen (Sargent & Schwyzer 1986; Schwyzer 1991; Inooka *et al.*, 2001). Demnach erfolgt zuerst eine Assoziation des Peptidhormons mit der Zell-Membran, was zu einer Strukturinduzierung des Peptids führt. Im Anschluss daran findet ein Bindungsereignis zwischen Rezeptor und Ligand statt. Längere Peptidhormone wie PTH weisen auch im nicht gebundenen Zustand eine definierte Struktur auf (Barden & Kemp, 1994; Marx *et al.*, 1995; Marx *et al.*, 1998). Im Vergleich zu PTH ist GLP-1 ein kurzes Peptid, wodurch eine Strukturinduzierung durchaus vorstellbar erscheint. Bis jetzt sind nur wenige Daten über die Struktur von GLP-1 veröffentlicht wurden. Für das Peptid wurde eine sehr starke Abhängigkeit der Löslichkeit und der Sekundärstruktur von Herstellungsverfahren und Pufferbedingungen beschrieben (Senderoff *et al.*, 1998; Andersen *et al.*, 2002). Andersen *et al.* zeigten Fern-UV-CD-Spektren des Peptids, die einen großen Anteil an helikalen Strukturelementen aufweisen, wobei die Struktur in

DPC-Mizellen oder wässrigen TFE-Lösungen stärker ausgeprägt war als in wässrigen Puffern. So war das CD-Signal bei 221 nm bei einer Peptidkonzentration von 50 μM in einem 15 mM Phosphatpuffer, pH 5,9 bei 9980 mdeg und in Mizellen oder TFE-Lösungen zwischen 20000-30000 mdeg. Der Zustand des Peptids in DPC-Mizellen würde der Struktur des Peptids während der Membranassoziation am ehesten entsprechen. NMR-Strukturuntersuchungen des GLP-1 in DPC-Mizellen zeigten die Struktur des Peptids mit zwei helikalen Segmenten (Aminosäuren 6-13 & 19-29), mit einem *random coil* Bereich bei Resten 1-6 und einem Linkerbereich (Reste 14-17). Der flexible Gly16 ermöglicht höchstwahrscheinlich eine Verdrehung des Peptidrückrats und führt zum Aufreihen aller hydrophoben Reste des Peptids auf einer Seite der Helix, was eine eventuelle Membranassoziation oder Interaktion mit dem Rezeptor unterstützen könnte (Thornton & Gorenstein, 1994; Neidigh *et al.*, 2001). Die NMR-Messungen des Peptids in wässrigen Lösungen zeigten dagegen die Ausbildung von hochmolekularen Aggregaten, die wiederum durch Umpuffern in TFE-Lösung eine geordnete symmetrische Dimerstruktur ausbildeten (Chang *et al.*, 2002).

Außer der Strukturinduzierung durch Membranassoziation wäre auch eine Strukturinduzierung durch Rezeptorbindung denkbar. Die Fern-UV-CD- und Fluoreszenzuntersuchungen am nGLP-1R mit Zusatz von GLP-1 zeigten geringe Signaländerungen. Die selben Signaländerungen konnten am nPTHr beobachtet werden (Dr. Grauschopf, persönliche Mitteilung). Dies könnte ein Anzeichen einer Strukturänderung eines oder beider Reaktionspartner bei Ausbildung des Komplexes sein. Im Falle des humanen nGRF-Rezeptors wurde ebenfalls über eine Strukturänderung, die mittels Fern-UV-CD-Messungen detektiert wurde, berichtet (Perrin *et al.*, 2001).

Mittels Biacore-Messungen wurde die Salz-, pH-Wert- und Temperaturabhängigkeit der Bindung des nGLP-1R zum GLP-1 untersucht. Diese Messungen zeigten eine starke Salzabhängigkeit der Bindung des nGLP-1R zu GLP-1 und einen geringen Einfluss der Temperatur auf die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung. Die Abnahme der Bindungsaffinität ab 0,5 M NaCl, 0,5 M Arginin-HCl und ab 30 °C schließt eine überwiegend auf hydrophoben Wechselwirkungen basierende Interaktion des nGLP-1R zu seinem Ligand aus. Das pH-Optimum der Wechselwirkung wurde im Bereich von pH 6-8 detektiert. Bei niedrigen (≤ 5) und höheren (≥ 9) pH-Werten wurde eine Abnahme der Bindungsaffinität beobachtet, was auf eine Strukturänderung des Peptids, der Rezeptordomäne oder auf Protonierung/Deprotonierung geladener Aminosäurereste zurückzuführen ist. Andersen *et al.* hatten über eine starke pH-Abhängigkeit der Sekundärstruktur des GLP-1 berichtet. Dabei wurde eine höhere Stabilität und mehr Sekundärstrukturanteile des Peptids bei pH 3,5 im Vergleich zu 5,9 detektiert. Beispielweise wurde die relative Elliptizität von 3,15 μM GLP-1 bei einer Wellenlänge von 221 nm und bei einem pH-Wert von 3,5 bei 5700 mdeg und bei pH 5,9 bei 3670 mdeg gemessen (Andersen *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass bei höheren pH-Werten eine Schwächung der Bindung durch Destabilisierung des Liganden zustande kommen könnte. Generell sind die meisten Proteine bei höheren pH-Werten instabil. Insofern ist eine Denaturierung der Rezeptordomäne bei pH-Werten von 10-12 ebenfalls nicht auszuschließen. Mittels Fern-UV-CD-Messungen konnten keine

signifikanten strukturellen Unterschiede des nGLP-1R im Bereich von pH 5-9 festgestellt werden. Eine Säuredenaturierung des Proteins bei pH 3-4 könnte durchaus möglich sein und zur Absenkung des Resonanzsignals bei den Bindungsmessungen geführt haben.

Die oben geschilderten Daten zeigen eine effiziente Methode zur Herstellung größerer Mengen der N-terminalen extrazellulären Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors mit Fähigkeit zur Ligandenbindung.

4.2 Herstellung von rekombinantem GLP-1 und Untersuchungen am Fusionsprotein der N-terminalen Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors mit GLP-1

Die renaturierte N-terminale extrazelluläre Domäne des GLP-1 Rezeptors zeigte eine limitierte Löslichkeit und eine relativ niedrige Thermostabilität. Die Löslichkeit des Proteins war unter Standardbedingungen limitiert auf eine Proteinkonzentration von ≤ 1 mg/ml. Diese Beobachtungen führten zu Überlegungen für eine mögliche Stabilisierung dieser Proteindomäne. Dazu sollte der Peptidligand an das Rezeptorfragment anfusioniert werden, in der Hoffnung, dass das Peptidhormon durch intramolekulare Interaktion die Rezeptordomäne strukturell stabilisiert.

Für diesen Zweck wurde das Gen, das für den Peptidliganden GLP-1 kodiert, aus synthetischen Oligonukleotiden hergestellt. Dieses Gen wurde anschließend für die Klonierung der Rezeptor-Ligand-Chimäre eingesetzt. In einem weiteren Ansatz wurde dieses Gen zur Herstellung von rekombinanten GLP-1 im Kontext eines Fusionsproteins verwendet.

4.2.1 Herstellung von rekombinantem GLP-1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine schnelle und effiziente Prozedur zur rekombinanten Herstellung des Hormonpeptids GLP-1 mit einem C-terminalen 8xHistag entwickelt. Hierzu wurde das synthetische Gen des GLP-1, das mittels zweier Oligonukleotide zusammengestellt wurde, in einen Expressionsvektor zur Zellulose-Bindungsdomäne C-terminal anfusioniert. Das Fusionsgen wurde in *E. coli* als *Inclusion Bodies* überexprimiert. Das Peptid wurde aus dem Fusionsprotein mit Bromcyan abgespalten und unter denaturierenden Bedingungen über IMAC und RP-HPLC aufgereinigt. Die Korrektheit der Bromcyanspaltung und die Identität des Peptids wurden mittels Massenspektroskopie nachgewiesen. Aus 20 mg *Inclusion Body*-Material vom Fusionsprotein wurden ca. 2 mg Peptid isoliert.

Diese Methode stellt eine Alternative zur chemischen Synthese des Peptids dar und hat den Vorteil, dass durch *up-scaling* große Mengen an Peptid mit einer Präparation hergestellt werden können. Dieser rekombinant hergestellte Peptidligand kann für Bindungsstudien mit dem Rezeptorfragment, für Konkurrenzexperimente sowie für Strukturuntersuchungen am Peptid eingesetzt werden.

Eine ebenfalls rekombinante Herstellung von GLP-1 wurde von Senderoff *et al.* beschrieben

(Senderoff *et al.*, 1998). Die Expression erfolgte in Hefe *Yarrowia lipolytica*. Das in der Hefe exprimierte Peptid zeigte die gleiche Bindungsaktivität wie ein synthetisch hergestellte GLP-1, hatte aber eine begrenzte Löslichkeit in einem Phosphatpuffer im pH-Wert-Bereich zwischen 4,5 und 7,0 (<1,7 mg) im Gegensatz zum synthetischen Peptid (>10 mg/ml). Senderoff *et al.* zeigten, dass die Löslichkeit und der Sekundäranteil des hergestellten Peptids stark von der Aufarbeitungsprozedur abhängig war.

4.2.2 Untersuchungen der Rezeptor-Ligand-Chimäre

Zahlreiche Alanin-Scanning- und Aminosäureaustauschansätze identifizierten die Aminosäurereste H1, G4, F6; T7, Y13, E15; F22, I23 und L26 des GLP-1 als die für die Interaktion mit dem Rezeptor relevanten Reste des Peptids (Adelhorst *et al.*, 1994; Gallwitz *et al.*, 1993; Gallwitz *et al.*, 1994; Hjorth *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1994; Parker *et al.*, 1998). Beim Exendin (9-39), einem starken Agonisten des GLP-1 Rezeptors, fehlen jedoch in seiner Sequenz die korrespondierenden Reste H1, F6 und T7 des GLP-1 am relativen N-terminalen Teil. Zudem besitzt Exendin (9-39) statt dem Y13 des GLP-1 ein Glutamat an dieser Stelle. Somit scheint eine Bindung zum GLP-1 Rezeptor auch ohne diese Reste möglich zu sein, was wiederum bedeutet, dass der Cluster von Aminosäureresten am C-terminalen Teil des GLP-1 (F22, I23 und L26) von größerer Bedeutung für die Wechselwirkung ist. Die N-terminalen Bereiche spielen eventuell bei der Aktivierung des Rezeptors eine Rolle (Parker *et al.*, 1998). Auch für andere Peptidhormone wie GIP, Glukagon und PTH wurde beschrieben, dass der N-terminale Teil der Peptide für die Rezeptoraktivierung wichtig ist (Brown *et al.*, 1981; Andreu *et al.*, 1987; Rosenblatt *et al.*, 1977; Rosenblatt *et al.*, 1980). Die Vermutung, dass der C-terminale Teil des GLP-1 stärker an der Bindung zum Rezeptor beteiligt ist, wurde von Hjorth *et al.* nach Bindungsuntersuchungen mit chimären GLP-1-Glukagon-Peptiden bestätigt (Hjorth *et al.*, 1994). Dabei zeigte sich eine 500-800fache Abnahme der Rezeptor-Affinität des GLP-1 nach Austausch der letzten 4 Aminosäurereste durch korrespondierende 3 Reste des Glukagons oder des ganzen C-terminalen Teils des GLP-1 ab Aminosäure L14 mit dem Glukagon-C-Terminus. Im Vergleich dazu beeinträchtigte das Ersetzen des N-terminalen Bereiches von GLP-1 (H1-L14) durch den N-Terminus des Glukagons die Bindung nur geringfügig (K_d -Änderung: $1,7 \pm 0,8$ nM statt $0,4 \pm 0,1$ nM).

Aus den oben genannten Gründen und der Überlegung, dass ein freies C-terminales Ende des Peptids eine bessere intramolekulare Ligand-Rezeptor-Interaktion ermöglichen würde, wurde das Peptid mit einem Linker bestehend aus 12 Aminosäureresten hinter der kodierenden Sequenz des nGLP-1R anfunktioniert. Der Linker beginnt mit einem flexiblen Glycin und besteht aus den abwechselnden ungeladenen Aminosäuren Serin und Prolin.

Das Fusionsprotein wurde in *E. coli* in Form von *Inclusion Bodies* überexprimiert. Im Anschluss daran wurde die Renaturierung des Proteins und Reinigung mittels HIC sowie Gelfiltration durchgeführt. Die Renaturierung erfolgte entsprechend den Bedingungen der Rückfaltung des nGLP-1R unter

Zusatz von L-Arginin und einem Redox-System bestehend aus GSH und GSSG. Im Unterschied zur reinen Rezeptordomäne wurde die Chimäre mittels Dialyse bei einem Überschuss an reduziertem Gluthathion rückgefaltet. Es konnten ca. 5 % des Ausgangsmaterials renaturiert und aufgereinigt werden.

Die Identität der renaturierten Rezeptor-Ligand-Chimäre wurde mittels N-terminaler Proteinsequenzanalyse nachgewiesen. Mittels analytischer Ultrazentrifugation konnte die Homogenität des Proteins in einem argininhaltigen Puffer festgestellt werden. Bei Messungen in einem Puffer ohne Zusatz von L-Arginin wurde eine während der Messzeit zunehmende Oligomerisierung und anschließende Aggregation des Proteins beobachtet.

Die rückgefaltete und aufgereinigte Rezeptor-Ligand-Chimäre zeigte eine definierte Sekundärstruktur bei Fern-UV-CD-Messungen und es konnten mit dem Programm CDNN (Böhm *et al.*, 1992) für das Protein 27 % α -Helizes und 20 % β -Faltblattstrukturanteile abgeschätzt werden. Der Kurvenverlauf des CD-Spektrums des Proteins war identisch mit dem Fern-UV-CD-Spektrum des nGLP-1R. Mittels eines Ellmann-Tests wurde kein freies Cystein detektiert, d.h. alle Cysteine des Proteins liegen in Disulfidbrücken verknüpft vor.

Durch Anfusionieren des Liganden konnte keine Verbesserung der thermischen Stabilität des Rezeptorfragments erreicht werden. Die Rezeptor-Ligand-Chimäre entfaltete genauso wie die reine Rezeptordomäne bereits bei niedrigen Temperaturen zwischen 40°C und 50 °C. Die CD- und ITC-Messungen konnten nur unter Zusatz von stabilisierenden Agenzien wie beispielsweise Ammoniumsulfat durchgeführt werden. Ohne Pufferzusätze wie L-Arginin oder Ammoniumsulfat wurde eine zunehmende Aggregation des Proteins schon bei Konzentration ≤ 100 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der fusionierte Peptidligand den nGLP-1R nicht stabilisieren konnte. Im Gegenteil die Handhabung des Proteins gestaltete sich als deutlich schwieriger als die des nGLP-1R.

Eine mögliche Erklärung für die Aggregationsanfälligkeit des Proteins könnte in der Länge und der Flexibilität des Linkers zwischen dem Peptid und dem Rezeptorfragment zu finden sein. Die schon erwähnte steigende Oligomerisierung des Proteins während der analytischen Ultrazentrifugation deutet auf eine intermolekulare Interaktion des GLP-1 mit seinem Rezeptor statt der erwünschten intramolekularen Wechselwirkung aufgrund sterischer Hinderung hin. Diese sterische Hinderung könnte zum einen durch den zu kleinen räumlichen Abstand von 12 Aminosäureresten, die in einem unstrukturierten Linker max. 35-40 Å beträgt, hervorgerufen werden und zum anderen durch unzureichende Flexibilität des Linkers zustande kommen. Eine starke Abhängigkeit der Stabilität der verknüpften Proteindomänen oder Untereinheiten von der Länge und der Aminosäurekomposition des Linkers wurde von Robinson & Sauer am Beispiel von *Single-Chain*-Varianten des *Arc* Repressors eingehend untersucht (Robinson & Sauer, 1998). Dabei zeigte sich ein Optimum der Länge des Linkers im Bereich von 19-20 Aminosäuren. Kürzere und längere Linker beeinträchtigten die Faltungs- und Entfaltungskinetik der Proteine negativ. Bei der Aminosäurekomposition wurden Linker

aus Ala/Gly und Ser/Gly verglichen und es zeigte sich, dass ein Linker aus 11 Alaninen und 5 Glycinen sowie 7 Serinen und 9 Glycinen die besten Stabilitäten des untersuchten Proteins bewirkten. Im Vergleich zu diesen Linkern ist die Flexibilität des Linkers zwischen nGLP-1R und GLP-1 stark herabgesetzt und dadurch könnte möglicherweise die Oligomerisierung des Fusionsproteins zustande gekommen sein.

Diese Vermutung wird durch Untersuchungen von Katja Wenig unterstützt, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit ein weiteres Fusionsprotein bestehend aus nGLP-1R und GLP-1 hergestellt hatte (Wenig, 2001). Das Rezeptorfragment und das Peptid waren über einen 27 Aminosäurenlinker bestehend aus Glycinen und Serinen miteinander fusioniert. Dieser Expressionsklon konnte in größerer Ausbeute (20-25 % des Ausgangs-*Inclusion Body*-Materials) renaturiert werden. Analytische Ultrazentrifugationsmessungen konnten mit diesem Konstrukt in einem argininfreiem Puffer durchgeführt werden. Diese Messungen zeigten, dass das Protein in homogener und monomerer Form vorliegt. Noch dazu wurde eine thermische Entfaltung des Proteins bei ca. 52 °C festgestellt. Allerdings wurde diese Messung mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt wobei die thermische Denaturierung des nGLP-1R und der Rezeptor-Ligand-Chimäre mit 12 Aminosäurenlinker mittels DSC-Messungen detektiert wurde. Das Fusionsprotein mit 27 Aminosäurenlinker erwies sich jedoch als immer noch zu instabil um die spektroskopischen Messungen ohne Stabilisatoren wie Ammoniumsulfat oder Glycerol durchführen zu können. Ursache dafür könnte sein, dass der Linker in diesem Fusionsprotein eventuell zu lang oder auch zu flexibel ist. Eine Optimierung der Linkerlänge und der Aminosäurezusammensetzung des Linkers würde möglicherweise zu einer besseren intramolekularen Wechselwirkung zwischen Rezeptorfragment und Ligand mit höherer Stabilisierung der N-terminalen Domäne des GLP-1 Rezeptors führen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Für Untersuchungen von GLP-1 als potentielles Therapeutikum in Typ-II-Diabetes und für die Entwicklung von besseren und wirksameren GLP-1-Analoga ist eine genaue Kenntnis der molekularen Wechselwirkung zwischen dem GLP-1 und seinem Rezeptor erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde das N-terminale extrazelluläre Fragment des humanen GLP-1 Rezeptors in *E. coli* überexprimiert, als eine eigenständige Proteindomäne aus *Inclusion Bodies* renaturiert und hinsichtlich seiner strukturellen und funktionellen Eigenschaften untersucht. Die Proteindomäne konnte in größeren Mengen hergestellt werden und zeigte Fähigkeit zur Ligandenbindung. Es kann als Modellsystem der Untersuchungen der molekularen Interaktion zwischen GLP-1 Rezeptor und seinem Ligand eingesetzt werden.

Weitere Ansätze zur Strukturaufklärung der N-terminalen Domäne des GLP-1 Rezeptors wären Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Messungen. Allerdings erwies sich die Löslichkeit der isolierten Proteindomäne unter Standardbedingungen als limitiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht durch Anfusionieren des Peptidliganden an das Rezeptorfragment die Stabilität der Rezeptordomäne positiv zu beeinflussen. Aufgrund sterischer Hinderung konnte jedoch der fusionierte Ligand den nGLP-1R nicht stabilisieren. Es sollten daher weitere Konstrukte mit optimierter Linkerlänge zwischen dem Rezeptorfragment und Ligand hergestellt und untersucht werden. Zum anderen könnten stabilisierende Pufferbedingungen für die Rezeptordomäne entwickelt werden. Darüber hinaus kann die Entwicklung weiterer Konstrukte der N-terminalen Domäne des GLP-1 Rezeptors mit extrazellulären Loopbereichen oder mit einzelnen Transmembranhelizes zum besseren Verständnis der Rolle bestimmter Proteinbereiche an der Wechselwirkung mit Liganden und zur Gewinnung weiterer Daten über Struktur und Funktion des GLP-1 Rezeptors führen.

6 Referenzen

- Abrahamsen, N. and Nishimura, E. (1995) Regulation of glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger ribonucleic acid expression in cultured rat pancreatic islets by glucose, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glucocorticoids. *Endocrinology*, **136**, 1572-8.
- Adelhorst, K., Hedegaard, B.B., Knudsen, L.B. and Kirk, O. (1994) Structure-activity studies of glucagon-like peptide-1. *J Biol Chem*, **269**, 6275-8.
- Ahmed, A.K., Schaffer, S.W. and Wetlaufer, D.B. (1975) Nonenzymic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers. *J Biol Chem*, **250**, 8477-82.
- Ahren, B., Larsson, H. and Holst, J.J. (1997) Effects of glucagon-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, 473-8.
- Ali, M.S., Sayeski, P.P., Dirksen, L.B., Hayzer, D.J., Marrero, M.B. and Bernstein, K.E. (1997) Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem*, **272**, 23382-8.
- Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J.A., Thorens, B. and Blazquez, E. (1996) Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J Neurochem*, **66**, 920-7.
- Andersen, N.H., Brodsky, Y., Neidigh, J.W. and Prickett, K.S. (2002) Medium-dependence of the secondary structure of exendin-4 and glucagon-like-peptide-1. *Bioorg Med Chem*, **10**, 79-85.
- Andersson, S.G.E. and Kurland, C.G. (1990) Codon Preferences in free-living microorganisms. *Microbiol Rev*, **54**, 198-210.
- Andreu, D. and Merrifield, R.B. (1987) Glucagon antagonists. Synthesis and inhibitory properties of Asp3-containing glucagon analogs. *Eur J Biochem*, **164**, 585-90.
- Aslanidis, C. and de Jong, P.J. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res*, **18**, 6069-74.
- Asmann, Y.W., Dong, M., Ganguli, S., Hadac, E.M. and Miller, L.J. (2000) Structural insights into the amino-terminus of the secretin receptor: I. Status of cysteine and cystine residues. *Mol Pharmacol*, **58**, 911-9.
- Ausubel, F.M., Brent, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Bachmair, A., Finley, D. and Varshavsky, A. (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, **234**, 179-86.
- Barden, J.A. and Kemp, B.E. (1994) Stabilized NMR structure of the hypercalcemia of malignancy peptide PTHrP[Ala-26](1-34)amide. *Biochim Biophys Acta*, **1208**, 256-62.
- Bataille, D., Coudray, A.M., Carlqvist, M., Rosselin, G. and Mutt, V. (1982) Isolation of glucagon-37 (bioactive enteroglucagon/oxyntomodulin) from porcine jejunum-ileum. Isolation of the peptide. *FEBS Lett*, **146**, 73-8.
- Baud, V., Chisoe, S.L., Viegas-Pequignot, E., Diriong, S., N'Guyen, V.C., Roe, B.A. and Lipinski, M. (1995) EMR1, an unusual member in the family of hormone receptors with seven transmembrane segments. *Genomics*, **26**, 334-44.
- Bazarsuren, A. and Panzner, S. (1999) Re-use of thiol coupled surfaces. *BiaJournal*, **6**, 25-26.
- Beck, M., Siebert, F. and Sakmar, T.P. (1998) Evidence for the specific interaction of a lipid molecule with rhodopsin which is altered in the transition to the active state metarhodopsin II. *FEBS Lett*, **436**, 304-8.
- Beck-Sickinger, A. G. (1996) Structural characterization and binding sites of G-protein-coupled receptors. *DTT*, **1**, 502-513.
- Bell, G.I., Sanchez-Pescador, R., Laybourn, P.J. and Najarian, R.C. (1983) Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature*, **304**, 368-71.

- Bergwitz, C., Gardella, T.J., Flannery, M.R., Potts, J.T., Jr., Kronenberg, H.M., Goldring, S.R. and Juppner, 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**, 26469-72.
- Bertin, B., Freissmuth, M., Breyer, R.M., Schutz, W., Strosberg, A.D. and Marullo, S. (1992) Functional expression of the human serotonin 5-HT_{1A} receptor in *Escherichia coli*. Ligand binding properties and interaction with recombinant G protein alpha-subunits. *J Biol Chem*, **267**, 8200-6.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-23.
- Bisello, A., Adams, A.E., Mierke, D.F., Pellegrini, M., Rosenblatt, M., Suva, L.J. and Chorev, M. (1998) Parathyroid hormone-receptor interactions identified directly by photocross-linking and molecular modeling studies. *J Biol Chem*, **273**, 22498-505.
- Blache, P., Kervran, A. and Bataille, D. (1988) Oxyntomodulin and glicentin: brain-gut peptides in the rat. *Endocrinology*, **123**, 2782-7.
- Bohm, G., Muhr, R. and Jaenicke, R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng*, **5**, 191-5.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Brown, E.M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M.A., Lytton, J. and Hebert, S.C. (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, **366**, 575-580.
- Brown, J.C., Dahl, M., Kwauk, S., McIntosh, C.H., Otte, S.C. and Pederson, R.A. (1981) Actions of GIP. *Peptides*, **2 Suppl 2**, 241-5.
- Brown, P.J. and Schonbrunn, A. (1993) Affinity purification of a somatostatin receptor-G-protein complex demonstrates specificity in receptor-G-protein coupling. *J Biol Chem*, **268**, 6668-76.
- Brubaker, P.L. (1991) Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by intestinal regulatory peptides. *Endocrinology*, **128**, 3175-82.
- Buchner, J. and Rudolph, R. (1991) Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Bio/ Technology*, **9**, 157-6.
- Buckley, D.I. and Lindquist, P. (1992) Analysis of the degradation of insulinotropin (GLP-1(7-37)) in human plasma and production of degradation resistant analogs. *Regul Pep*, **40**, 117.
- Buggy, J.J., Livingston, J.N., Rabin, D.U. and Yoo-Warren, H. (1995) Glucagon-glucagon-like peptide I receptor chimeras reveal domains that determine specificity of glucagon binding. *J Biol Chem*, **270**, 7474-8.
- Byrne, M.M. and Goke, B. (1996) Human studies with glucagon-like-peptide-1: potential of the gut hormone for clinical use. *Diabet Med*, **13**, 854-60.
- Cao, Y.J., Gimpl, G. and Fahrenholz, F. (1995) The amino-terminal fragment of the adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptor functions as a high affinity PACAP binding domain. *Biochem Biophys Res Commun*, **212**, 673-80.
- Carruthers, C.J., Unson, C.G., Kim, H.N. and Sakmar, T.P. (1994) Synthesis and expression of a gene for the rat glucagon receptor. Replacement of an aspartic acid in the extracellular domain prevents glucagon binding. *J Biol Chem*, **269**, 29321-8.
- Carter, P.H., Shimizu, M., Luck, M.D. and Gardella, T.J. (1999) The hydrophobic residues phenylalanine 184 and leucine 187 in the type-1 parathyroid hormone (PTH) receptor functionally interact with the amino-terminal portion of PTH-(1-34). *J Biol Chem*, **274**, 31955-60.
- Chang, X., Keller, D., O'Donoghue, S.I. and Led, J.J. (2002) NMR studies of the aggregation of glucagon-like peptide-1: formation of a symmetric helical dimer. *FEBS Lett*, **515**, 165-70.
- Clark, S.A., Burnham, B.L. and Chick, W.L. (1990) Modulation of glucose-induced insulin secretion from a rat

- clonal beta-cell line. *Endocrinology*, **127**, 2779-88.
- Conlon, J.M. (1988) Proglucagon-derived peptides: nomenclature, biosynthetic relationships and physiological roles. *Diabetologia*, **31**, 563-6.
- Cotte, N., Balestre, M.N., Phalipou, S., Hibert, M., Manning, M., Barberis, C. and Mouillac, B. (1998) Identification of residues responsible for the selective binding of peptide antagonists and agonists in the V2 vasopressin receptor. *J Biol Chem*, **273**, 29462-8.
- Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Maoret, J.J., Gaudin, P., Nicole, P. and Laburthe, M. (1996) Vasoactive intestinal peptide (VIP)1 receptor. Three nonadjacent amino acids are responsible for species selectivity with respect to recognition of peptide histidine isoleucineamide. *J Biol Chem*, **271**, 12795-800.
- Couvineau, A., Voisin, T., Guijarro, L. and Laburthe, M. (1990) Purification of vasoactive intestinal peptide receptor from porcine liver by a newly designed one-step affinity chromatography. *J Biol Chem*, **265**, 13386-90.
- Creutzfeldt, W. (2001) The entero-insular axis in type 2 diabetes - incretins as therapeutic agents. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **109**, S288-S303.
- Creutzfeldt, W. and Nauck, M. (1992) Gut hormones and diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*, **8**, 149-77.
- Dautzenberg, F.M., Mevenkamp, G., Wille, S. and Hauger, R.L. (1999) N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. *J Neuroendocrinol*, **11**, 941-9.
- Davidson, J.S., Assefa, D., Pawson, A., Davies, P., Hapgood, J., Becker, I., Flanagan, C., Roeske, R. and Millar, R. (1997) Irreversible activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor by photoaffinity cross-linking: localization of attachment site to Cys residue in N-terminal segment. *Biochemistry*, **36**, 12881-9.
- Deacon, C.F., Johnsen, A.H. and Holst, J.J. (1995) Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, **80**, 952-7.
- Di Paolo, E., De Neef, P., Moguilevsky, N., Petry, H., Bollen, A., Waelbroeck, M. and Robberecht, P. (1998) Contribution of the second transmembrane helix of the secretin receptor to the positioning of secretin. *FEBS Lett*, **424**, 207-10.
- Di Paolo, E., Petry, H., Moguilevsky, N., Bollen, A., De Neef, P., Waelbroeck, M. and Robberecht, P. (1999) Mutations of aromatic residues in the first transmembrane helix impair signalling by the secretin receptor. *Receptors Channels*, **6**, 309-15.
- Dillon, J.S., Tanizawa, Y., Wheeler, M.B., Leng, X.H., Ligon, B.B., Rabin, D.U., Yoo-Warren, H., Permutt, M.A. and Boyd, A.E., 3rd. (1993) Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. *Endocrinology*, **133**, 1907-10.
- Dong, M., Wang, Y., Hadac, E.M., Pinon, D.I., Holicky, E. and Miller, L.J. (1999) Identification of an interaction between residue 6 of the natural peptide ligand and a distinct residue within the amino-terminal tail of the secretin receptor. *J Biol Chem*, **274**, 19161-7.
- Drucker, D.J. (2001) Development of glucagon-like peptide-1-based pharmaceuticals as therapeutic agents for the treatment of diabetes. *Curr Pharm Des*, **7**, 1399-412.
- Du, K., Nicole, P., Couvineau, A. and Laburthe, M. (1997) Aspartate 196 in the first extracellular loop of the human VIP1 receptor is essential for VIP binding and VIP-stimulated cAMP production. *Biochem Biophys Res Commun*, **230**, 289-92.
- Dumoulin, V., Dakka, T., Plaisancie, P., Chayvialle, J.A. and Cuber, J.C. (1995) Regulation of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide, peptide YY, and neurotensin secretion by neurotransmitters and gut hormones in the isolated vascularly perfused rat ileum. *Endocrinology*, **136**, 5182-8.
- Dumoulin, V., Dakka, T., Plaisancie, P., Chayvialle, J.A. and Cuber, J.C. (1995) Regulation of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide, peptide YY, and neurotensin secretion by neurotransmitters and gut hormones in

- the isolated vascularly perfused rat ileum. *Endocrinology*, **136**, 5182-8.
- Duprez, L., Parma, J., Van Sande, J., Allgeier, A., Leclere, J., Schwartz, C., Delisle, M.J., Decoulx, M., Orgiazzi, J., Dumont, J. and *et al.* (1994) Germline mutations in the thyrotropin receptor gene cause non-autoimmune autosomal dominant hyperthyroidism. *Nat Genet*, **7**, 396-401.
- Edman, P. and Begg, G. (1967) A protein sequenator. *Eur j Biochem*, **1**,80-91.
- Egan, J.M., Montrose-Rafizadeh, C., Wang, Y., Bernier, M. and Roth, J. (1994) Glucagon-like peptide-1(7-36) amide (GLP-1) enhances insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes: one of several potential extrapancreatic sites of GLP-1 action. *Endocrinology*, **135**, 2070-5.
- Eissele, R., Goke, R., Willemer, S., Harthus, H.P., Vermeer, H., Arnold, R. and Goke, B. (1992) Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest*, **22**, 283-91.
- Elliott, R.M., Morgan, L.M., Tredger, J.A., Deacon, S., Wright, J. and Marks, V. (1993) Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol*, **138**, 159-66.
- Fehmann, H.C. and Habener, J.F. (1991) Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) on a somatostatin secreting cell line. *FEBS Lett*, **279**, 335-40.
- Fehmann, H.C., Goke, R. and Goke, B. (1995) Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr Rev*, **16**, 390-410.
- Fehmann, H.C., Goke, R., Goke, B., Bachle, R., Wagner, B. and Arnold, R. (1991) Priming effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide, glucose-dependent insulinotropic polypeptide and cholecystokinin-8 at the isolated perfused rat pancreas. *Biochim Biophys Acta*, **1091**, 356-63.
- Fehmann, H.C., Strowski, M. and Goke, B. (1994) Interaction of glucagon-like peptide-I (7-37) and somatostatin-14 on signal transduction and proinsulin gene expression in beta TC-1 cells. *Metabolism*, **43**, 787-92.
- Fischer, K.D., Dhanvantari, S., Drucker, D.J. and Brubaker, P.L. (1997) Intestinal growth is associated with elevated levels of glucagon-like peptide 2 in diabetic rats. *Am J Physiol*, **273**, E815-20.
- Ford, C.F., Suominen, I. and Glatz, C.E. (1991) Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*, **2**, 95-107.
- Frimurer, T.M. and Bywater, R.P. (1999) Structure of the integral membrane domain of the GLP1 receptor. *Proteins*, **35**, 375-86.
- Fukase, N., Manaka, H., Sugiyama, K., Takahashi, H., Igarashi, M., Daimon, M., Yamatani, K., Tominaga, M. and Sasaki, H. (1995) Response of truncated glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide to glucose ingestion in non-insulin dependent diabetes mellitus. Effect of sulfonylurea therapy. *Acta Diabetol*, **32**, 165-9.
- Galehshahi, F.S., Goke, B. and Lankat-Buttgereit, B. (1998) Contribution of a PS1-like element to the tissue- and cell-specific expression of the human GLP-1 receptor gene. *FEBS Lett*, **436**, 163-8.
- Gallwitz, B., Witt, M., Folsch, U.R., Creutzfeldt, W. and Schmidt, W.E. (1993) Binding specificity and signal transduction of receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide and gastric inhibitory polypeptide on RINm5F insulinoma cells. *J Mol Endocrinol*, **10**, 259-68.
- Gallwitz, B., Witt, M., Paetzold, G., Morys-Wortmann, C., Zimmermann, B., Eckart, K., Folsch, U.R. and Schmidt, W.E. (1994) Structure/activity characterization of glucagon-like peptide-1. *Eur J Biochem*, **225**, 1151-6.
- Gardella, T.J., Wilson, A.K., Keutmann, H.T., Oberstein, R., Potts, J.T., Jr., Kronenberg, M. and Nussbaum, S.R. (1993) Analysis of parathyroid hormone's principal receptor-binding region by site-directed mutagenesis and analog design. *Endocrinology*, **132**, 2024-30.
- Gaudin, P., Couvineau, A., Maoret, J.J., Rouyer-Fessard, C. and 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**, 901-8.
- Gaudin, P., Maoret, J.J., Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C. and Laburthe, M. (1998) Constitutive activation of the human vasoactive intestinal peptide 1 receptor, a member of the new class II family of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, **273**, 4990-6.
- George, S.T., Ruoho, A.E. and Malbon, C.C. (1986) N-glycosylation in expression and function of beta-adrenergic receptors. *J Biol Chem*, **261**, 16559-64.
- Gershengorn, M.C. and Osman, R. (2001) Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology*, **142**, 2-10.
- Gether, U., Ballesteros, J.A., Seifert, R., Sanders-Bush, E., Weinstein, H. and Kobilka, B.K. (1997a) Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility. *J Biol Chem*, **272**, 2587-90.
- Gether, U., Lin, S., Ghanouni, P., Ballesteros, J.A., Weinstein, H. and Kobilka, B.K. (1997b) Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *Embo J*, **16**, 6737-47.
- Gill, S.C. and Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, **182**, 319-326.
- Goke, B., Hoppe, B., Konrad, A. and Schirra, J. (2002) [A therapeutic option for type-2 diabetes. The incretion hormone GLP-1]. *Pharm Unserer Zeit*, **31**, 294-9.
- Goke, B., Steffen, H. and Goke, R. (1996) The signal transduction of the glucagon-like peptide 1 receptor: fishing beyond the protein kinase level. *Acta Physiol Scand*, **157**, 321-8.
- Goke, R. and Conlon, J.M. (1988) Receptors for glucagon-like peptide-1(7-36) amide on rat insulinoma-derived cells. *J Endocrinol*, **116**, 357-62.
- Goke, R., Goke, B., Richter, G. and Arnold, R. (1988) [The entero-insular axis: the new incretin candidate glucagon-like peptide-1(7-36)amide (GLP-1(7-36))amide]. *Z Gastroenterol*, **26**, 715-9.
- Goke, R., Wagner, B., Fehmann, H.C. and Goke, B. (1993) Glucose-dependency of the insulin stimulatory effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on the rat pancreas. *Res Exp Med (Berl)*, **193**, 97-103.
- Grauschopf, U., Lilie, H., Honold, K., Wozny, M., Reusch, D., Esswein, A., Schafer, W., Rucknagel, K.P. and Rudolph, R. (2000) The N-terminal fragment of human parathyroid hormone receptor 1 constitutes a hormone binding domain and reveals a distinct disulfide pattern. *Biochemistry*, **39**, 8878-87.
- Graziano, M.P., Hey, P.J. and Strader, C.D. (1996) The amino terminal domain of the glucagon-like peptide-1 receptor is a critical determinant of subtype specificity. *Receptors Channels*, **4**, 9-17.
- Graziano, M.P., Hey, P.J., Borkowski, D., Chicchi, G.G. and Strader, C.D. (1993) Cloning and functional expression of a human glucagon-like peptide-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **196**, 141-6.
- Grisshammer, R. and Tate, C.G. (1995) Overexpression of integral membrane proteins für structural studies. *Q Rev Biophys*, **28**, 315-422.
- Grisshammer, R., Duckworth, R. and Henderson, R. (1993) Expression of a rat neurotensin receptor in Escherichia coli. *Biochem J*, **295**, 571-6.
- Gromada, J., Rorsman, P., Dissing, S. and Wulff, B.S. (1995) Stimulation of cloned human glucagon-like peptide 1 receptor expressed in HEK 293 cells induces cAMP-dependent activation of calcium-induced calcium release. *FEBS Lett*, **373**, 182-6.
- Gros, L., Demirpence, E., Jarrousse, C., Kervran, A. and Bataille, D. (1992) Characterization of binding sites for oxyntomodulin on a somatostatin-secreting cell line (RIN T3). *Endocrinology*, **130**, 1263-70.
- Gurrath, M. (2001) Peptide-binding G protein-coupled receptors: new opportunities for drug design. *Curr Med Chem*, **8**, 1605-48.
- Habeeb, A.F.S.A. (1972) Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Meth Enzymol*, **25**, 457-

64.

- Habener, J.F. (1996) Insulinotropic glucagon-like peptides. In: LeRoith, D., Taylor, S.I. and Olefsky, J.M. (eds) *Diabetes Mellitus*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 68-78 .
- Hamann, J., Eichler, W., Hamann, D., Kerstens, H.M., Poddighe, P.J., Hoovers, J.M., Hartmann, E., Strauss, M. and van Lier, R.A. (1995) Expression cloning and chromosomal mapping of the leukocyte activation antigen CD97, a new seven-span transmembrane molecule of the secretion receptor superfamily with an unusual extracellular domain. *J Immunol*, **155**, 1942-50.
- Hansen, L., Deacon, C.F., Orskov, C. and Holst, J.J. (1999) Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology*, **140**, 5356-63.
- Hansen, L., Hartmann, B., Bisgaard, T., Mineo, H., Jorgensen, P.N. and Holst, J.J. (2000) Somatostatin restrains the secretion of glucagon-like peptide-1 and -2 from isolated perfused porcine ileum. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **278**, E1010-8.
- Harding, S.E. (1997) Hydrodynamic properties of proteins. In: *Protein Structure: A Practical Approach* (2nd edn, Greighton, T.E., ed), IRL-Press, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 219-51.
- Harmar, A.J. (2001) Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS3013.
- Hashimoto, H., Ogawa, N., Hagihara, N., Yamamoto, K., Imanishi, K., Nogi, H., Nishino, A., Fujita, T., Matsuda, T., Nagata, S. and Baba, A. (1997) Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor chimeras reveal domains that determine specificity of vasoactive intestinal polypeptide binding and activation. *Mol Pharmacol*, **52**, 128-35.
- Heller, R.S., Kieffer, T.J. and Habener, J.F. (1996) Point mutations in the first and third intracellular loops of the glucagon-like peptide-1 receptor alter intracellular signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, **223**, 624-32.
- Herrmann, C., Goke, R., Richter, G., Fehmann, H.C., Arnold, R. and Goke, B. (1995) Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion*, **56**, 117-26.
- Hilairret, S., Foord, S.M., Marshall, F.H. and Bouvier, M. (2001) Protein-protein interaction and not glycosylation determines the binding selectivity of heterodimers between the calcitonin receptor-like receptor and the receptor activity-modifying proteins. *J Biol Chem*, **276**, 29575-81.
- Hirota, M., Hashimoto, M., Hiratsuka, M., Ohboshi, C., Yoshimoto, S., Yano, M., Mizuno, A. and Shima, K. (1990) Alterations of plasma immunoreactive glucagon-like peptide-1 behavior in non-insulin-dependent diabetics. *Diabetes Res Clin Pract*, **9**, 179-85.
- Hjorth, S.A., Adelhorst, K., Pedersen, B.B., Kirk, O. and Schwartz, T.W. (1994) Glucagon and glucagon-like peptide 1: selective receptor recognition via distinct peptide epitopes. *J Biol Chem*, **269**, 30121-4.
- Holst, J.J. (1997) Enteroglucagon. *Annu Rev Physiol*, **59**, 257-71.
- Holst, J.J. and Orskov, C. (1994) Glucagon and other proglucagon-derived peptides. In: Walsh, J.H. and Dockray, G.J. *Gut Peptides: Biochemistry and Physiology*, Raven, New York, 305-40.
- Holst, J.J., Orskov, C., Nielsen, O.V. and Schwartz, T.W. (1987) Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS Lett*, **211**, 169-74.
- Holz, G.G.t., Kuhlreiber, W.M. and Habener, J.F. (1993) Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature*, **361**, 362-5.
- Hui, H., Wright, C. and Perfetti, R. (2001) Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes*, **50**, 785-96.
- Hupe-Sodmann, K., McGregor, G.P., Bridenbaugh, R., Goke, R., Goke, B., Thole, H., Zimmermann, B. and Voigt, K. (1995) Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides.

Regul Pept, **58**, 149-56.

- Inooka, H., Ohtaki, T., Kitahara, O., Ikegami, T., Endo, S., Kitada, C., Ogi, K., Onda, H., Fujino, M. and Shirakawa, M. (2001) Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nat Struct Biol*, **8**, 161-5.
- Insel, P.A., Maguire, M.E., Gilman, A.G., Bourne, H.R., Coffino, P. and Melmon, K.L. (1976) Beta adrenergic receptors and adenylate cyclase: products of separate genes? *Mol Pharmacol*, **12**, 1062-9.
- Isele, J., Sakmar, T.P. and Siebert, F. (2000) Rhodopsin activation affects the environment of specific neighboring phospholipids: an FTIR spectroscopic study. *Biophys J*, **79**, 3063-71.
- Ishihara, T., Nakamura, S., Kaziro, Y., Takahashi, T., Takahashi, K. and Nagata, S. (1991) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *Embo J*, **10**, 1635-41.
- Ji, T.H., Grossmann, M. and Ji, I. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand-interactions. *J Biol Chem*, **273**, 17299-302.
- Kamitani, S. and Sakata, T. (2001) Glycosylation of human CRLR at Asn123 is required for ligand binding and signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1539**, 131-9.
- Kennedy, M.E. and Limbird, L.E. (1993) Mutations of the alpha 2A-adrenergic receptor that eliminate detectable palmitoylation do not perturb receptor-G-protein coupling. *J Biol Chem*, **268**, 8003-11.
- Kiefer, H., Vogel, R. and Maier, K. (2000) Bacterial expression of G protein-coupled receptors: Prediction of expression levels from sequence. *Receptors Channels* (im Druck).
- Kieffer, T.J. and Habener, J.F. (1999) The glucagon-like peptides. *Endocr Rev*, **20**, 876-913.
- Kieffer, T.J., Heller, R.S., Unson, C.G., Weir, G.C. and Habener, J.F. (1996) Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology*, **137**, 5119-25.
- Kieffer, T.J., McIntosh, C.H. and Pederson, R.A. (1995) Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*, **136**, 3585-96.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.H. and Buchner, J. (1991) Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N Y)*, **9**, 825-9.
- Kisselev, O.G., Meyer, C.K., Heck, M., Ernst, O.P. and Hofmann, K.P. (1999) Signal transfer from rhodopsin to the G-protein: evidence for a two-site sequential fit mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4898-903.
- Knudsen, S.M., Tams, J.W., Wulff, B.S. and 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 Lett*, **412**, 141-3.
- Knudsen, S.M., Tams, J.W., Wulff, B.S. and Fahrenkrug, J. (1998) Importance of conserved cysteines in the extracellular loops of human PACAP/VIP1 receptor for ligand binding and stimulation of cAMP production. *Ann NY Acad Sci*, **865**, 259-65.
- Kolakowski, L.F., Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels*, **2**, 1-7.
- Kopp, P., van Sande, J., Parma, J., Duprez, L., Gerber, H., Joss, E., Jameson, J.L., Dumont, J.E. and Vassart, G. (1995) Brief report: congenital hyperthyroidism caused by a mutation in the thyrotropin-receptor gene. *N Engl J Med*, **332**, 150-4.
- Kreymann, B., Ghatei, M.A., Burnet, P., Williams, G., Kanse, S., Diani, A.R. and Bloom, S.R. (1989) Characterization of glucagon-like peptide-1-(7-36)amide in the hypothalamus. *Brain Res*, **502**, 325-31.
- Kreymann, B., Williams, G., Ghatei, M.A. and Bloom, S.R. (1987) Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*, **2**, 1300-4.
- Kronenberg, H.M., Abou-Samra, A., Bringham, F.R., Gardelle, T.J., Juppner, H. and Segre, G.V. (1997) In: *Molecular Genetics in Endocrine Disorders* (ed Thakker, R.V.) Chapman and Hall, London.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, **227**,680-5.

- Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature*, **379**, 311-9.
- Lankat-Buttgereit, B. and Goke, B. (1997) Cloning and characterization of the 5' flanking sequences (promoter region) of the human GLP-1 receptor gene. *Peptides*, **18**, 617-24.
- Lankat-Buttgereit, B., Goke, R., Stockmann, F., Jiang, J., Fehmann, H.C. and Goke, B. (1994) Detection of the human glucagon-like peptide 1(7-36) amide receptor on insulinoma-derived cell membranes. *Digestion*, **55**, 29-33.
- Larsen, P.J., Tang-Christensen, M., Holst, J.J. and Orskov, C. (1997a) Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience*, **77**, 257-70.
- Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*, **273**, 18677-80.
- Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S., Samama, P. and Costa, T. (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci*, **14**, 303-7.
- Lelianova, V.G., Davletov, B.A., Sterling, A., Rahman, M.A., Grishin, E.V., Totty, N.F. and Ushkaryov, Y.A. (1997) Alpha-latrotoxin receptor, latrophilin, is a novel member of the secretin family of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, **272**, 21504-8.
- Liebhaber, S.A., Cash, F. and Eshleman, S.S. (1992) Translation inhibition by an mRNA coding region secondary structure is determined by its proximity to the AUG initiation codon. *J Mol Biol*, **226**, 609-21.
- Lin, Y.J., Seroude, L. and Benzer, S. (1998) Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science*, **282**, 943-6.
- Looman, A.C., Bodlaender, J., de Gruyter, M., Vogelaar, A. and van Knippenberg, P.H. (1986) Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, **14**, 5481-97.
- Lugari, R., Dell'Anna, C., Ugolotti, D., Dei Cas, A., Barilli, A.L., Zandomenighi, R., Marani, B., Iotti, M., Orlandini, A. and Gnudi, A. (2000) Effect of nutrient ingestion on glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) secretion in human type 1 and type 2 diabetes. *Horm Metab Res*, **32**, 424-8.
- Macke, J.P., Davenport, C.M., Jacobson, S.G., Hennessey, J.C., Gonzalez-Fernandez, F., Conway, B.P., Heckenlively, J., Palmer, R., Maumenee, I.H., Sieving, P. and *et al.* (1993) Identification of novel rhodopsin mutations responsible for retinitis pigmentosa: implications for the structure and function of rhodopsin. *Am J Hum Genet*, **53**, 80-9.
- Malmgren, C., Engdahl, H.M., Romby, P. and Wagner, E.G. (1996) An antisense/target RNA duplex or a strong intramolecular RNA structure 5' of a translation initiation signal blocks ribosome binding: the case of plasmid R1. *Rna*, **2**, 1022-32.
- Marguet, D., Baggio, L., Kobayashi, T., Bernard, A.M., Pierres, M., Nielsen, P.F., Ribet, U., Watanabe, T., Drucker, D.J. and Wagtman, N. (2000) Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6874-9.
- Marin, E.P., Krishna, A.G., Archambault, V., Simuni, E., Fu, W.Y. and Sakmar, T.P. (2001) The function of interdomain interactions in controlling nucleotide exchange rates in transducin. *J Biol Chem*, **276**, 23873-80.
- Marrero, M.B., Venema, R.C., Ma, H., Ling, B.N. and Eaton, D.C. (1998) Erythropoietin receptor-operated Ca²⁺ channels: activation by phospholipase C-gamma 1. *Kidney Int*, **53**, 1259-68.
- Marston, F.A. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J*, **240**, 1-12.
- Marx, U.C., Adermann, K., Bayer, P., Meyer, M., Forssmann, W.G. and Rosch, P. (1998) Structure-activity

- relation of NH₂-terminal human parathyroid hormone fragments. *J Biol Chem*, **273**, 4308-16.
- Marx, U.C., Austermann, S., Bayer, P., Adermann, K., Ejchart, A., Sticht, H., Walter, S., Schmid, F.X., Jaenicke, R., Forssmann, W.G. and *et al.* (1995) Structure of human parathyroid hormone 1-37 in solution. *J Biol Chem*, **270**, 15194-202.
- Mathi, S.K., Chan, Y., Li, X. and Wheeler, M.B. (1997) Scanning of the glucagon-like peptide-1 receptor localizes G protein-activating determinants primarily to the N terminus of the third intracellular loop. *Mol Endocrinol*, **11**, 424-32.
- McClarín, J.A., Frederick, C.A., Wang, B.C., Greene, P., Boyer, H.W., Grable, J. and Rosenberg, J.M. (1986) Structure of the DNA-Eco RI endonuclease recognition complex at 3 Å resolution. *Science*, **234**, 1526-41.
- Mentlein, R., Gallwitz, B. and Schmidt, W.E. (1993) Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem*, **214**, 829-35.
- Miholic, J., Orskov, C., Holst, J.J., Kotzerke, J. and Meyer, H.J. (1991) Emptying of the gastric substitute, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), and reactive hypoglycemia after total gastrectomy. *Dig Dis Sci*, **36**, 1361-70.
- Minakami, R., Jinnai, N. and Sugiyama, H. (1997) Phosphorylation and calmodulin binding of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) are antagonistic in vitro. *J Biol Chem*, **272**, 20291-8.
- Mizuno, A., Kuwajima, M., Ishida, K., Noma, Y., Murakami, T., Tateishi, K., Sato, I. and Shima, K. (1997) Extraparacrine action of truncated glucagon-like peptide-I in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, an animal model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, **46**, 745-9.
- Montrose-Rafizadeh, C., Avdonin, P., Garant, M.J., Rodgers, B.D., Kole, S., Yang, H., Levine, M.A., Schwindinger, W. and Bernier, M. (1999) Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology*, **140**, 1132-40.
- Morales, M., Lopez-Delgado, M.I., Alcantara, A., Luque, M.A., Clemente, F., Marquez, L., Puente, J., Vinambres, C., Malaisse, W.J., Villanueva-Penacarrillo, M.L. and Valverde, I. (1997) Preserved GLP-I effects on glycogen synthase activity and glucose metabolism in isolated hepatocytes and skeletal muscle from diabetic rats. *Diabetes*, **46**, 1264-9.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, **24**, 17-27.
- Nathans, J. and Hogness, D.S. (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell*, **34**, 807-14.
- Nauck, M.A., Busing, M., Orskov, C., Siegel, E.G., Talartschik, J., Baartz, A., Baartz, T., Holzer, H., Hopt, U.T., Ebert, R. and *et al.* (1992) Basal and nutrient-stimulated pancreatic and gastrointestinal hormone concentrations in type-1-diabetic patients after successful combined pancreas and kidney transplantation. *Clin Invest*, **70**, 40-8.
- Nauck, M.A., Holst, J.J. and Willms, B. (1997) Glucagon-like peptide 1 and its potential in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res*, **29**, 411-6.
- Neidigh, J.W., Fesinmeyer, R.M., Prickett, K.S. and Andersen, N.H. (2001) Exendin-4 and glucagon-like-peptide-1: NMR structural comparisons in the solution and micelle-associated states. *Biochemistry*, **40**, 13188-200.
- O'Dowd, B.F., Hnatowich, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. and Bouvier, M. (1989) Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem*, **264**, 7564-9.
- Ohneda, A., Ohneda, K., Ohneda, M., Koizumi, F., Ohashi, S., Kawai, K. and Suzuki, S. (1991) The structure-function relationship of GLP-1 related peptides in the endocrine function of the canine pancreas. *Tohoku J Exp Med*, **165**, 209-21.

- Orskov, C. (1992) Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the entero-insular axis. *Diabetologia*, **35**, 701-11.
- Orskov, C., Holst, J.J. and Nielsen, O.V. (1988) Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. *Endocrinology*, **123**, 2009-13.
- Orskov, C., Holst, J.J., Knuhtsen, S., Baldissera, F.G., Poulsen, S.S. and Nielsen, O.V. (1986) Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas. *Endocrinology*, **119**, 1467-75.
- Orskov, C., Jeppesen, J., Madsbad, S. and Holst, J.J. (1991) Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine. *J Clin Invest*, **87**, 415-23.
- Orskov, C., Rabenhøj, L., Wettergren, A., Kofod, H. and Holst, J.J. (1994) Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes*, **43**, 535-9.
- Orskov, C., Wettergren, A. and Holst, J.J. (1993) Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes*, **42**, 658-61.
- Owada, K., Wasada, T., Miyazono, Y., Yoshino, H., Hasumi, S., Kuroki, H., Yano, K., Maruyama, A., Kawai, K. and Omori, Y. (1995) Highly increased insulin secretion in a patient with postprandial hypoglycemia: role of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide. *Endocr J*, **42**, 147-51.
- Pace, N.C. and Scholtz, M.J. (1997) Measuring the conformational stability of a protein. In: *Protein Structure: A Practical Approach* (ed Greighton, T.), IRL Press, Oxford, 299-322.
- 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. and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, **289**, 739-45.
- Parker, J.C., Andrews, K.M., Rescek, D.M., Masefski, W., Jr., Andrews, G.C., Contillo, L.G., Stevenson, R.W., Singleton, D.H. and Suleske, R.T. (1998) Structure-function analysis of a series of glucagon-like peptide-1 analogs. *J Pept Res*, **52**, 398-409.
- Patzelt, C. and Schiltz, E. (1984) Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 5007-11.
- Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J.P. and Landau, E.M. (1997) X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science*, **277**, 1676-1681.
- Perea, A., Clemente, F., Martinell, J., Villanueva-Penacarrillo, M.L. and Valverde, I. (1995) Physiological effect of glucagon in human isolated adipocytes. *Horm Metab Res*, **27**, 372-5.
- Perlman, J.H., Colson, A.O., Jain, R., Czyzewski, B., Cohen, L.A., Osman, R. and Gershengorn, M.C. (1997) Role of the extracellular loops of the thyrotropin-releasing hormone receptor: evidence for an initial interaction with thyrotropin-releasing hormone. *Biochemistry*, **36**, 15670-6.
- 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.
- Puffenberger, E.G., Hosoda, K., Washington, S.S., Nakao, K., deWit, D., Yanagisawa, M. and Chakravart, A. (1994) A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell*, **79**, 1257-66.
- Ranganath, L.R., Beety, J.M., Morgan, L.M., Wright, J.W., Howland, R. and Marks, V. (1996) Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? *Gut*, **38**, 916-9.
- Rattenholl, A., Lilie, H., Grossmann, A., Stern, A., Schwarz, E. and Rudolph, R. (2001) The pro-sequence

- facilitates folding of human nerve growth factor from Escherichia coli inclusion bodies. *Eur J Biochem*, **268**, 3296-303.
- Richter, G., Feddersen, O., Wagner, U., Barth, P., Goke, R. and Goke, B. (1993) GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery. *Am J Physiol*, **265**, L374-81.
- Rivas, G., Stafford, W. and Minton, A.P. (1999) Characterization of heterologous protein-protein interactions using analytical ultracentrifugation. *Methods*, **19**, 194-212.
- Roberge, J.N. and Brubaker, P.L. (1993) Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology*, **133**, 233-40.
- Roberge, J.N., Gronau, K.A. and Brubaker, P.L. (1996) Gastrin-releasing peptide is a novel mediator of proximal nutrient-induced proglucagon-derived peptide secretion from the distal gut. *Endocrinology*, **137**, 2383-8.
- Robinson, C.R. and Sauer, R.T. (1998) Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5929-34.
- Rocca, A.S. and Brubaker, P.L. (1999) Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology*, **140**, 1687-94.
- Rosenblatt, M. and Potts, J.T., Jr. (1977) Design and synthesis of parathyroid hormone analogues of enhanced biological activity. *Endocr Res Commun*, **4**, 115-33.
- Rosenblatt, M., Tregear, G.W., Shepard, G.L., Tyler, G.A., Veroni, M. and Potts, J.T., Jr. (1980) Comparison of two solid-phase peptide syntheses of a 32-amino acid carboxyl-terminal fragment of human parathyroid hormone, hPTH-(53-84). *Arch Biochem Biophys*, **199**, 286-96.
- Rouille, Y., Martin, S. and Steiner, D.F. (1995) Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J Biol Chem*, **270**, 26488-96.
- Rudolph, R. and Fischer, S. (1990) Process for obtaining renatured proteins. *US-Pat.* 4,933,434.
- Rudolph, R., Bohm, G., Lilie, H. and Jaenicke, R. (1998) In: *Protein Function: A Practical Approach* (ed T.E. Greighton), 57-99. IRL Press at Oxford University, Oxford.
- Sakmar, T.P. (2002) Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 189-95.
- Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T. and Lefkowitz, R.J. (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem*, **268**, 4625-36.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Sargent, D.F. and Schwyzer, R. (1986) Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 5774-8.
- Schafer, H. and Schmidt, W.E. (1993) Characterization and purification of the solubilized pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide-1 receptor from porcine brain using a biotinylated ligand. *Eur J Biochem*, **217**, 823-30.
- Schertler, G.F. (1999) Structure of rhodopsin. *Novartis Found Symp*, **224**, 54-66; discussion 66-9.
- Schertler, G.F., Villa, C. and Henderson, R. (1993) Projection structure of rhodopsin. *Nature*, **362**, 770-2.
- Schipani, E., Kruse, K. and Juppner, H. (1995) A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science*, **268**, 98-100.
- Schirra, J., Houck, P., Wank, U., Arnold, R., Goke, B. and Katschinski, M. (2000) Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on antro-pyloro-duodenal motility in the interdigestive state and with duodenal lipid perfusion in humans. *Gut*, **46**, 622-31.
- Schirra, J., Kuwert, P., Wank, U., Leicht, P., Arnold, R., Goke, B. and Katschinski, M. (1997) Differential effects of subcutaneous GLP-1 on gastric emptying, antroduodenal motility, and pancreatic function in men. *Proc Assoc Am Physicians*, **109**, 84-97.

- Schirra, J., Leicht, P., Hildebrand, P., Beglinger, C., Arnold, R., Goke, B. and Katschinski, M. (1998) Mechanisms of the antidiabetic action of subcutaneous glucagon-like peptide-1(7-36)amide in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Endocrinol*, **156**, 177-86.
- Schleinkofer, K., Dingley, A., Tacke, I., Federwisch, M., Müller-Newen, G., Heinrich, P.C., Vusio, P., Jacques, Y. and Grotzinger, J. (2001) Identification of the domain in the human interleukin-11 receptor that mediates ligand binding. *J Mol Biol*, **306**, 263-74.
- Schmid, F.X. (1989) In: *Protein Structure: A Practical Approach* (ed Greighton, T.E.), IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 251-285.
- Schmid, R., Schusdziarra, V., Aulehner, R., Weigert, N. and Classen, M. (1990) Comparison of GLP-1 (7-36amide) and GIP on release of somatostatin-like immunoreactivity and insulin from the isolated rat pancreas. *Z Gastroenterol*, **28**, 280-4.
- Schmidt, W.E., Siegel, E.G. and Creutzfeldt, W. (1985) Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia*, **28**, 704-7.
- Schoner, B.E. (1997) Synthetic two-cistron expression system. *Methods Mol Biol*, **62**, 89-97.
- Schwyzler, R. (1991) Peptide-membrane interactions and a new principle in quantitative structure-activity relationships. *Biopolymers*, **31**, 785-92.
- Senderoff, R.I., Kontor, K.M., Kreilgaard, L., Chang, J.J., Patel, S., Krakover, J., Heffernan, J.K., Snell, L.B. and Rosenberg, G.B. (1998) Consideration of conformational transitions and racemization during process development of recombinant glucagon-like peptide-1. *J Pharm Sci*, **87**, 183-9.
- Smith, J.C., Derbyshire, R.B., Cook, E., Dunthorne, L., Viney, J., Brewer, S.J., Sassenfeld, H.M. and Bell, L.D. (1984) Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification. *Gene*, **32**, 321-7.
- Spiegel, A.M. (1996) Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annu Rev Physiol*, **58**, 143-70.
- Spiegel, A.M. (2000) G protein defects in signal transduction. *Horm Res*, **53 Suppl 3**, 17-22.
- Sprang, S.R. (1997) G proteins, effectors and GAPs: structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 849-56.
- Stacey, M., Lin, H.H., Gordon, S. and McKnight, A.J. (2000) LNB-TM7, a group of seven-transmembrane proteins related to family-B G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem Sci*, **25**, 284-9.
- Stanasila, L., Massotte, D., Kieffer, B.L. and Pattus, F. (1999) Expression of delta, kappa and mu human opioid receptors in *Escherichia coli* and reconstitution of the high-affinity state for agonist with heterotrimeric G proteins. *Eur J Biochem*, **260**, 430-8.
- Stoffel, M., Espinosa, R., 3rd, Le Beau, M.M. and Bell, G.I. (1993) Human glucagon-like peptide-1 receptor gene. Localization to chromosome band 6p21 by fluorescence in situ hybridization and linkage of a highly polymorphic simple tandem repeat DNA polymorphism to other markers on chromosome 6. *Diabetes*, **42**, 1215-8.
- Stroop, S.D., Nakamuta, H., Kuestner, R.E., Moore, E.E. and Eband, R.M. (1996) Determinants for calcitonin analog interaction with the calcitonin receptor N-terminus and transmembrane-loop regions. *Endocrinology*, **137**, 4752-6.
- Stubenrauch, K., Bachmann, A., Rudolph, R. and Lilie, H. (2000) Purification of a viral coat protein by an engineered polyionic sequence. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **737**, 77-84.
- Sugiyama, K., Manaka, H., Kato, T., Yamatani, K., Tominaga, M. and Sasaki, H. (1994) Stimulation of truncated glucagon-like peptide-1 release from the isolated perfused canine ileum by glucose absorption. *Digestion*, **55**, 24-8.
- Suzuki, S., Kawai, K., Ohashi, S., Mukai, H. and Yamashita, K. (1989) Comparison of the effects of various C-terminal and N-terminal fragment peptides of glucagon-like peptide-1 on insulin and glucagon release from the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology*, **125**, 3109-14.

- Takhar, S., Gyomory, S., Su, R.C., Mathi, S.K., Li, X. and Wheeler, M.B. (1996) The third cytoplasmic domain of the GLP-1[7-36 amide] receptor is required for coupling to the adenylyl cyclase system. *Endocrinology*, **137**, 2175-8.
- Tang-Christensen, M., Vrang, N. and Larsen, P.J. (2001) Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **25 Suppl 5**, S42-7.
- Tannhauser, T.W., Konishis, Y. and Scheraga, H.S. (1987) In: *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 115-119.
- Thim, L. and Moody, A.J. (1981) The primary structure of porcine glicentin (proglucagon). *Regul Pept*, **2**, 139-50.
- Thim, L. and Moody, A.J. (1982) Purification and chemical characterization of a glicentin-related pancreatic peptide (proglucagon fragment) from porcine pancreas. *Biochim Biophys Acta*, **703**, 134-41.
- Thorens, B. (1992) Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8641-5.
- Thorens, B., Porret, A., Buhler, L., Deng, S.P., Morel, P. and Widmann, C. (1993) Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes*, **42**, 1678-82.
- Thornton, K. and Gorenstein, D.G. (1994) Structure of glucagon-like peptide (7-36) amide in a dodecylphosphocholine micelle as determined by 2D NMR. *Biochemistry*, **33**, 3532-9.
- Tibaduiza, E.C., Chen, C. and Beinborn, M. (2001) A small molecule ligand of the glucagon-like peptide 1 receptor targets its amino-terminal hormone binding domain. *J Biol Chem*, **276**, 37787-93.
- Tobias, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G. and Varshavsky, A. (1991) The N-end rule in bacteria. *Science*, **254**, 1374-7.
- Toft-Nielsen, M.B., Madsbad, S. and Holst, J.J. (1999) Continuous subcutaneous infusion of glucagon-like peptide 1 lowers plasma glucose and reduces appetite in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, **22**, 1137-43.
- Tseng, C.C. and Lin, L. (1997) A point mutation in the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor confers constitutive activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **232**, 96-100.
- Tucker, J. and Grisshammer, R. (1996) Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J*, **317**, 891-9.
- Turton, M.D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., Wilding, J.P., Smith, D.M., Ghatge, M.A., Herbert, J. and Bloom, S.R. (1996) A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, **379**, 69-72.
- Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M. and Schertler, G.F. (1997) Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature*, **389**, 203-6.
- Unson, C.G., Cypess, A.M., Wu, C.R., Goldsmith, P.K., Merrifield, R.B. and Sakmar, T.P. (1996) Antibodies against specific extracellular epitopes of the glucagon receptor block glucagon binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 310-5.
- Vaag, A.A., Holst, J.J., Volund, A. and Beck-Nielsen, H.B. (1996) Gut incretin hormones in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM)--evidence for decreased glucagon-like peptide 1 secretion during oral glucose ingestion in NIDDM twins. *Eur J Endocrinol*, **135**, 425-32.
- Van Eyll, B., Goke, B., Wilmen, A. and Goke, R. (1996) Exchange of W39 by A within the N-terminal extracellular domain of the GLP-1 receptor results in a loss of receptor function. *Peptides*, **17**, 565-70.
- van Eyll, B., Lankat-Buttgereit, B., Bode, H.P., Goke, R. and Goke, B. (1994) Signal transduction of the GLP-1-receptor cloned from a human insulinoma. *FEBS Lett*, **348**, 7-13.
- Vilardaga, J.P., Lin, I. and Nissenson, R.A. (2001) Analysis of parathyroid hormone (PTH)/secretin receptor chimeras differentiates the role of functional domains in the pth/ pth-related peptide (PTHrP) receptor on

- hormone binding and receptor activation. *Mol Endocrinol*, **15**, 1186-99.
- Waldmann, L. (1998) Spektroskopische Charakterisierung von Proteinen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität.
- Wang, Y., Perfetti, R., Greig, N.H., Holloway, H.W., DeOre, K.A., Montrose-Rafizadeh, C., Elahi, D. and Egan, J.M. (1997) Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats. *J Clin Invest*, **99**, 2883-9.
- Watanabe, Y., Kawai, K., Ohashi, S., Yokota, C., Suzuki, S. and Yamashita, K. (1994) Structure-activity relationships of glucagon-like peptide-1(7-36)amide: insulinotropic activities in perfused rat pancreases, and receptor binding and cyclic AMP production in RINm5F cells. *J Endocrinol*, **140**, 45-52.
- Welton, A.F., Lad, P.M., Newby, A.C., Yamamura, H., Nicosia, S. and Rodbell, M. (1977) Solubilization and separation of the glucagon receptor and adenylate cyclase in guanine nucleotide-sensitive states. *J Biol Chem*, **252**, 5947-50.
- Wenig, K. (2001) Die Hormon-Bindungsdomäne des humanen *Glucagon-like peptide-1* Rezeptors: Expression, Reinigung und Charakterisierung. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität.
- Wenkert, D., Schoneberg, T., Merendino, J.J., Jr., Rodriguez Pena, M.S., Vinitsky, R., Goldsmith, P.K., Wess, J. and Spiegel, A.M. (1996) Functional characterization of five V2 vasopressin receptor gene mutations. *Mol Cell Endocrinol*, **124**, 43-50.
- Widmann, C., Dolci, W. and Thorens, B. (1996a) Desensitization and phosphorylation of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor by GLP-1 and 4-phorbol 12-myristate 13-acetate. *Mol Endocrinol*, **10**, 62-75.
- Widmann, C., Dolci, W. and Thorens, B. (1996b) Heterologous desensitization of the glucagon-like peptide-1 receptor by phorbol esters requires phosphorylation of the cytoplasmic tail at four different sites. *J Biol Chem*, **271**, 19957-63.
- Wildhage, I., Trusheim, H., Goke, B. and Lankat-Buttgereit, B. (1999) Gene expression of the human glucagon-like peptide-1 receptor is regulated by Sp1 and Sp3. *Endocrinology*, **140**, 624-31
- Willshaw, A. and Donnelly, D. (1998) Over-expression of the N-terminal domain of the glucagon-like peptide-1 receptor in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans*, **26**, S288.
- Wilmen, A., Goke, B. and Goke, R. (1996) The isolated N-terminal extracellular domain of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor has intrinsic binding activity. *FEBS Lett*, **398**, 43-7.
- Wilmen, A., Van Eyll, B., Goke, B. and Goke, R. (1997) Five out of six tryptophan residues in the N-terminal extracellular domain of the rat GLP-1 receptor are essential for its ability to bind GLP-1. *Peptides*, **18**, 301-5.
- World Health Organization. (1997) Conquering suffering, enriching humanity. The World Health Report. Geneva, WHO.
- World Health Organization/International Diabetes Federation. (1999) The economics of diabetes and diabetes care. A report of the Diabetes Health Economics Study Group. Geneva, WHO.
- Xiao, Q., Jeng, W. and Wheeler, M.B. (2000) Characterization of glucagon-like peptide-1 receptor-binding determinants. *J Mol Endocrinol*, **25**, 321-35.
- Xu, G., Stoffers, D.A., Habener, J.F. and Bonner-Weir, S. (1999) Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*, **48**, 2270-6.
- Yanaihara, C., Matsumoto, T., Hong, Y.M. and Yanaihara, N. (1985) Isolation and chemical characterization of glicentin C-terminal hexapeptide in porcine pancreas. *FEBS Lett*, **189**, 50-6.
- Yoshimoto, S., Hirota, M., Ohboshi, C. and Shima, K. (1989) Identification of glucagon-like peptide-1(7-36) amide in rat brain. *Ann Clin Biochem*, **26**, 169-71.
- Zander, M., Taskiran, M., Toft-Nielsen, M.B., Madsbad, S. and Holst, J.J. (2001) Additive glucose-lowering effects of glucagon-like peptide-1 and metformin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **24**, 720-5.

Zettlmeissl, G., Rudolph, R. and Jaenicke, R. (1979) Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation. *Biochemistry*, **18**, 5567-71.

7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
CBD	Zellulosebindungsdomäne
CD	Zirkulardichroismus
CNBr	Bromcyan
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC	Dodecylphosphocholin
DSC	<i>Differential Scanning</i> Kalorimetrie
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide-1</i>
GSH	reduziertes Gluthathion
GSSG	oxidiertes Gluthathion
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	<i>High Performance Liquid</i> Chromatographie
IB	<i>Inclusion Bodies</i>
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobaasen
K_d	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MBP	Maltosebindungsprotein
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
nGRFR	N-terminale Domäne des <i>Corticotropin Releasing Factor</i> -Rezeptors
nGLP-1R	N-terminale Domäne des humanen GLP-1 Rezeptors
nPTHrP	N-terminale Domäne des humanen PTH-Rezeptors
NTR	Neurotensin-Rezeptor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PTH	Parathormon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RH-HPLC	<i>Reversed Phase</i> HPLC
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluoethanol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ariuna Bazarsuren
Geburtsdatum: 24.05.1970
Geburtsort: Ulaanbaatar, Mongolei
eine Tochter geboren am 27.12.1994

Schulbildung:

1978-1986 Allgemeinbildende Schule in Ulaanbaatar, Mongolei
1986-1988 Schulabschluss in Moskau, Russland

Berufsausbildung:

1988-1989 Studium "Deutsch als Fremdsprache" an der Mongolischen Staatsuniversität, Ulaanbaatar, Mongolei
1989-1990 Studienvorbereitende Sprachausbildung an der Universität Leipzig
1990-1996 **Biologie-Studium** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg / Diplomarbeit: "**Expression der Cadmium-Efflux-ATPase von *Staphylococcus aureus* in *Saccharomyces cerevisiae* und Untersuchungen zum Nachweis des Vorhandenseins von CDF-Proteinen bei Pflanzen**" am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
13.06.1996 **Diplom.** Gesamtnote "gut"
01.08.1996-31.01.2001 **Promotionsarbeit** am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur "**Strukturellen und funktionellen Charakterisierung der Ligandenbindungsdomäne des humanen GLP-1 Rezeptors**".
01.02.2001-30.09.02 Postdoc bei Roche Diagnostics GmbH, Department Centralized Diagnostics in Penzberg mit Tätigkeitsgebiet zur **rekombinanten Herstellung der HIV-1 Antigene für deren Einsatz zu diagnostischen Zwecken** und Mitarbeit im **LightCycler Multiplex Master** Projekt.
seit 01.10.02 Postdoc bei Roche Diagnostics GmbH, Department Biotechnological Operations in Penzberg mit Tätigkeitsgebiet zur **Optimierung und Entwicklung der Herstellverfahren von Enzymen und deren Etablierung in Produktion.**

Penzberg, den 04.10.02

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.08.96 bis 31.01.2001 an Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle angefertigt.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion, für intensive Betreuung der Arbeit und für wertvolle Ratschläge und Unterstützung.

Beim Herrn Dr. Steffen Panzner möchte ich mich herzlich bedanken für die Einführung in die Proteinchemie und die aufmunternden Worte und Unterstützung während der Durststrecken dieser Arbeit.

Einen herzlichen Dank an meine Ex-Laborkolleginnen und Freundinnen Dr. Ulla Grauschopf und Dr. Antje Kuntzsch, die sehr großen Beitrag zur Anfertigung meiner Promotionsarbeit beigetragen haben, nicht nur durch geduldiges Korrekturlesen der Promotionsschrift, sondern auch durch ihren Ansporn für die Fertigstellung der Arbeit.

Allen Mitgliedern des Bereiches Proteintechnologie, insbesondere Dr. Hauke Lilie, Dr. Sabine Meyenburg, Dr. Dirk Esser, Christoph Parthier, Christiane Jäger und Constanze Günther danke ich für die herzliche Arbeitsatmosphäre, für den ganzen zusammengetrunkenen Kaffee und all die großen und kleinen Hilfen im Laboralltag.

Meinen Hiwis Jana, Ida, Jan und Alfred danke ich für die fleißige Mitarbeit und unermüdliche Motivation, ganz besonders bei Jan Oschmann für die Sonntagsfermentationen und bei Alfred Lammens für die Frühschichten am Biacoregerät.

Bei Malte Weber bedanke ich mich für die geduldige Hilfe bei Computerarbeiten.

Meiner Familie und meinen Freunden, allen voran Geli, Dawaana, Otgoo, Chris und Ines, danke ich für den moralischen Beistand und Unterstützung.

Der kleinen Misheel danke ich für ihr Verständnis und Geduld.