



**„Strukturelle Untersuchungen an den extrazellulären  
Liganden-bindenden Domänen der Parathormon-  
Rezeptoren 1 und 2 sowie der L-Glutamin:Glykosyl-  
Paromamine-3''-Aminotransferase TobS2“**

**Dissertation**

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau **Julia Hennig**

geb. am: 24.08.1980 in: Schmölln

Gutachter:

1. Prof. Dr. M. T. Stubbs
2. Prof. Dr. J. Degenhardt
3. PD Dr. U. Wehmeier

Halle (Saale), 16.03.2010



# Teil 1: Strukturelle Untersuchungen an den extrazellulären Domänen der Parathormon-Rezeptoren 1 und 2

<b>I EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
<b>I.1 G-PROTEIN GEKOPPELTE REZEPTOREN (GPCR)</b> .....	<b>2</b>
<b>I.2 PTH- UND PTHRP-REZEPTOR 1 (PTHR1)</b> .....	<b>9</b>
<b>I.3 PTH-REZEPTOR 2 (PTHR2)</b> .....	<b>12</b>
<b>I.4 VORARBEITEN UND PROBLEMSTELLUNG</b> .....	<b>13</b>
<b>II MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>15</b>
<b>II.1 MATERIAL</b> .....	<b>15</b>
<b>II.1.1 CHEMIKALIEN</b> .....	<b>15</b>
<b>II.1.2 STANDARDS UND KITS</b> .....	<b>16</b>
<b>II.1.3 PROTEINE, PEPTIDE UND ENZYME</b> .....	<b>16</b>
<b>II.1.4 CHROMATOGRAPHIEMATERIAL UND SÄULEN</b> .....	<b>16</b>
<b>II.1.5 SONSTIGES MATERIAL</b> .....	<b>17</b>
<b>II.1.6 GERÄTE</b> .....	<b>17</b>
<b>II.1.7 ORGANISMEN / <i>E. COLI</i>-STÄMME</b> .....	<b>17</b>
<b>II.1.8 PLASMIDE UND OLIGODESOXYNUKLEOTIDE</b> .....	<b>18</b>
<b>II.1.9 MEDIEN, ANTIBIOTIKA UND PUFFER</b> .....	<b>20</b>
<b>II.1.10 PROGRAMME</b> .....	<b>21</b>
<b>II.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b> .....	<b>22</b>
<b>II.2.1 HERSTELLUNG UND LAGERUNG DER CHEMOKOMPETENTEN ZELLEN</b> .....	<b>22</b>
<b>II.2.2 TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> MIT PLASMID-DNA</b> .....	<b>22</b>
<b>II.2.3 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS <i>E. COLI</i></b> .....	<b>22</b>
<b>II.2.4 SPALTUNG DER DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN</b> .....	<b>22</b>
<b>II.2.5 ISOLIERUNG UND REINIGUNG DER DNA-FRAGMENTEN</b> .....	<b>23</b>
<b>II.2.6 GELELEKTROPHORESE VON DNA</b> .....	<b>23</b>
<b>II.2.7 LIGATION DER DNA-FRAGMENTEN</b> .....	<b>23</b>
<b>II.2.8 SEQUENZIERUNG DER PLASMID-DNA</b> .....	<b>23</b>
<b>II.2.9 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)</b> .....	<b>24</b>
<b>II.3 EXPRESSION, REINIGUNG</b> .....	<b>26</b>
<b>II.3.1 BAKTERIENANZUCHT IM SCHÜTTELKOLBEN</b> .....	<b>26</b>
<b>II.3.2 <i>FED-BATCH</i> FERMENTATION</b> .....	<b>27</b>
<b>II.3.3 PRÄPARATION UND REINIGUNG</b> .....	<b>27</b>
<b>II.4 BIOPHYSIKALISCHE UND STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG</b> .....	<b>32</b>
<b>II.4.1 ANALYTISCHE ULTRAZENTRIFUGATION</b> .....	<b>32</b>
<b>II.4.2 CIRCULARDICHROISMUS</b> .....	<b>32</b>
<b>II.4.3 <i>DIFFERENTIAL SCANNING</i>-KALORIMETRIE (DSC)</b> .....	<b>33</b>
<b>II.4.4 ISOTHERMALE TITRATIONSKALORIMETRIE (ITC)</b> .....	<b>34</b>
<b>II.4.5 ÜBERPRÜFUNG DER LÖSLICHKEIT VON PROTEINEN IN VERSCHIEDENEN PUFFERN</b> .....	<b>34</b>
<b>II.4.6 KRISTALLISATIONSEXPERIMENTE MIT NPTH1R UND NPTHR1-(GS)12-</b> .....	<b>35</b>
<b>II.4.7 RÖNTGENDIFFRAKTIONSANALYSE</b> .....	<b>36</b>

<b>III ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
III.1 DIE REZEPTORDOMÄNE NP <sub>THR1</sub> .....	37
III.1.1 EXPRESSION UND REINIGUNG DER N-TERMINALEN REZEPTORDOMÄNE NP <sub>THR1</sub> .....	37
III.1.2 BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG .....	38
III.1.3 OPTIMIERUNG DER LÖSLICHKEIT.....	40
III.1.4 KOKRISTALLISATIONSEXPERIMENTE VON NP <sub>THR1</sub> IN GEGENWART VON PTH(1-37) .....	42
III.1.5 LÖSUNG DER KRISTALLSTRUKTUR .....	43
III.2 DIE FUSIONSKONSTRUKTE NP <sub>THR1</sub> -(GS) <sub>12</sub> -PTH(1-34) UND NP <sub>THR1</sub> -(GS) <sub>14</sub> -PTH(1-34) .....	46
III.2.1 KLONIERUNG .....	47
III.2.2 EXPRESSION UND REINIGUNG .....	48
III.2.3 BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG.....	49
III.2.3.1 Analytische Ultrazentrifugation.....	49
III.2.3.2 Circular dichroismus zur Analyse der Sekundärstruktur.....	51
III.2.3.3 Bestimmung der thermischen Stabilität mittels DSC.....	53
III.2.3.4 Untersuchung der Interaktion der Fusionsproteine mit freiem Liganden PTH(1-37) mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) .....	55
III.2.4 KRISTALLISATIONS- <i>SCREENINGS</i> MIT NP <sub>THR1</sub> -(GS) <sub>12</sub> -PTH(1-34) .....	57
III.3 DIE REZEPTORDOMÄNE NP <sub>THR2</sub> .....	58
III.3.1 KLONIERUNG DES EXPRESSIONSVEKTORS PET <sub>15BNP</sub> THR <sub>2</sub> .....	59
III.3.2 EXPRESSION VON NP <sub>THR2</sub> .....	59
III.3.3 PRÄPARATION UND REINIGUNG VON NP <sub>THR2</sub> .....	61
III.3.4 CHARAKTERISIERUNG VON NP <sub>THR2</sub> .....	62
<b>IV DISKUSSION.....</b>	<b>63</b>
IV.1 STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG VON NP <sub>THR1</sub> .....	63
IV.2 DIE STRUKTUR VON PTH(1-37).....	65
IV.3 DARSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER FUSIONSPROTEINE .....	68
IV.3.1 DIE NATIVE STRUKTUR DER FUSIONSPROTEINE .....	68
IV.3.2 EIN FUSIONSPROTEIN ALS KANDIDAT FÜR KRISTALLISATIONSVERSUCHE .....	71
IV.4 HERSTELLUNG VON NP <sub>THR2</sub> .....	73
IV.5 AUSBLICK .....	74

## Teil 2: Strukturelle Untersuchungen an der L-Glutamin:Glykosyl-Paromamine-3"-Aminotransferase TobS2

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>78</b>
1.1 AMINOGLYCOSID-ANTIBIOTIKA.....	78
1.2 PRODUKTION VON 2-DOS-AGA IM WIRTSORGANISMUS.....	82
1.3 DIE S <sub>2</sub> - L-GLUTAMIN:GLYKOSYL-PAROMAMINE-3"-AMINOTRANFERASE TOBS <sub>2</sub> .....	84
1.4 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELE.....	85

<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>87</b>
2.1 MATERIAL .....	<b>87</b>
2.1.1 CHEMIKALIEN .....	87
2.1.2 KRISTALLISATION-KITS .....	87
2.1.3 GERÄTE .....	88
2.1.4 PROGRAMME .....	88
2.2 METHODEN .....	<b>89</b>
2.2.1 PROTEINEXPRESSION UND -REINIGUNG .....	89
2.2.2 PROTEINKRISTALLISATION.....	89
2.2.3 SOAKING-EXPERIMENTE .....	89
2.2.4 DATENSAMMLUNG UND STRUKTURAUSWERTUNG .....	90
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>91</b>
3.1 KRISTALLISATION UND <i>SOAKING</i> .....	<b>91</b>
3.2 STATISTIKEN ZUR DATENSAMMLUNG UND ZUM <i>REFINEMENT</i> .....	<b>92</b>
3.3 DIE DREIDIMENSIONALE STRUKTUR VON TOBS2.....	<b>97</b>
3.3.1 GESAMTSTRUKTUR DES APOENZYMS – TOBS2-SO <sub>4</sub> .....	98
3.3.2 BINDUNG DES KOFAKTORS PLP .....	104
3.3.3 BINDUNG VON PLP UND L-GLN .....	106
3.3.4 TOBS2 IN GEGENWART VON PLP UND TOBRAMYCIN.....	110
<b>4 DISKUSSION</b> .....	<b>114</b>
4.1 REAKTIONSMECHANISMUS VON TOBS2.....	<b>114</b>
4.1 CHARAKTERISIERUNG DES AKTIVEN ZENTRUMS.....	<b>115</b>
LITERATURVERZEICHNIS .....	125
ABKÜRZUNGEN .....	136
ANHANG.....	138



**Teil 1: Strukturelle Untersuchungen an den  
extrazellulären Domänen der Parathormon-  
Rezeptoren 1 und 2**

# I Einleitung

## I.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Um eine entsprechende Reaktion des Organismus auf seine Umwelt auszulösen, ist die Kommunikation und Interaktion einzelner Körperzellen essentiell. Im Laufe der Evolution entwickelte die Natur komplexe Mechanismen für eine selektive Weiterleitung externer Reize, wie etwa Licht, Temperaturveränderungen oder mechanische, chemische oder elektrische Impulse, durch die abgrenzende Zellmembran in das Innere von Zellen. Entscheidend dafür ist das Vorhandensein entsprechender selektiver Rezeptoren in der Zellmembran, welche in der Lage sind, extrazelluläre Signalmoleküle zu binden und daraufhin eine intrazelluläre Antwort auszulösen.

Eine der größten und aus pharmakologischer Sicht interessantesten Klassen dieser Rezeptoren sind die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Diese Rezeptoren konnten inzwischen in nahezu allen bekannten Organismen vom Einzeller, wie etwa *Saccharomyces cerevisiae*, bis hin zu Pflanzen und Säugetieren beschrieben werden. In den siebziger Jahren wurden als erste Vertreter dieser Klasse der  $\beta$ -adrenerge Rezeptor aus Maus (1) und der Glukagon-Rezeptor aus Rattenleber (2) beschrieben und auch ein Zusammenhang zur Aktivierung der intrazellulären Adenylat - Cyclase über das rezeptorgebundene Guanosinnukleotid-bindende Protein (G-Protein) wurde hergestellt. Die erste Gensequenz eines GPCRs wurde 1983 vom Rinderopsin veröffentlicht (3). Seither konnte eine Vielzahl von Sequenzen weiterer GPCRs aus den unterschiedlichsten Organismen identifiziert werden. Schätzungen zufolge kodieren etwa 3 % des humanen Genoms für ca. 850 GPCRs (4); ca. 80 % aller bekannten Hormone und Neurotransmitter aktivieren zelluläre Signaltransduktionsmechanismen über GPCRs (5). Daher ist es nicht verwunderlich, dass 30-50 % aller derzeit verwendeten Pharmaka auf GPCRs und deren Interaktionspartner gerichtet sind.

### ***Klassifizierung***

Basierend auf Sequenzhomologien und der chemischen Struktur der Liganden können GPCRs der Metazoen in drei Hauptklassen und mehrere Subklassen unterteilt werden (GPCR Datenbank, GPCRDB) (6, 7) (siehe Tabelle I.1). Zusätzlich zu diesen drei Klassen existieren noch drei weitere GPCR-Klassen (D, E und F), welche in Nicht-Metazoen, wie etwa in Pilzen und Schleimpilzen zu finden sind. Innerhalb jeder Klasse besteht eine Sequenzhomologie von ca. 20 % im Bereich der sieben Transmembran-Helices (TMH) (8). Neben den drei Hauptklassen der

## I Einleitung: Parathormon-Rezeptordomänen

Metazoen wurden in den letzten Jahren weitere Säuger-GPCR-Klassen identifiziert, z.B. *Large N-terminal class B-7 transmembrane helix*-Rezeptoren (LNB-7TM), *Frizzled/Smoothened* (F/S), Vomeronasal 1-Rezeptoren (V1R) und *taste 2*-Rezeptoren (T2R) (9).

Hauptklassen	Subklassen
<b>Klasse A</b> (Rhodopsin-ähnliche / β2 Adrenorezeptor-ähnliche)	biogene Aminrezeptoren (Adreno-, Serotonin-, Dopamin-, Muskarin-, Histamin-Rezeptoren)  CCK-, Endothelin-, Tachikinin-, Neuropeptid Y-, TRH-, Neurotensin-, Bombesin-, GHSR- und Wirbeltier-Opisin-Rezeptoren  Wirbellosen-Opisin- und Bradykinin-Rezeptoren  Adenosin-, Cannabinoid-, Melanokortin- und olfaktorische Rezeptoren  Chemokinin-, fMLP-, C5A-, GnRH-, Eikosanoid-, Leukotrien-, FSH-, LH-, TSH-, Galanin-, Nukleotid-, Opiod-, Oxytocin-, Vasopressin-, Somatostatin- und Protease-aktivierte-Rezeptoren, u.a.  Melatonin- u.a. nicht-klassifizierte Rezeptoren
<b>Klasse B</b> (Sekretin- /Glukagon-/VIP-/ Cacitonin-ähnliche Rezeptoren)	PTH und PTHrP-Rezeptoren  Glukagon-, GLP-, GIP-, GHRH-, PACAP-, VIP- und Secretin-Rezeptoren  Calcitonin-, CGRP- und CRF-Rezeptoren  Methuselah-Rezeptoren
<b>Klasse C</b> (metabotrope Glutamat-/ Pheromon-/Neurotrans- mitter-/Kalzium-Rezeptoren)	metabotrope Glutamat-Rezeptoren  metabotrope GABA-Rezeptoren  Kalzium-Rezeptoren  Vomeronasale-Pheromon-Rezeptoren  Geschmacksrezeptoren

Tab. I.1: Klassifizierung der Metazoen-GPCRs. Die drei Hauptklassen werden in mehrere Subklassen unterteilt.

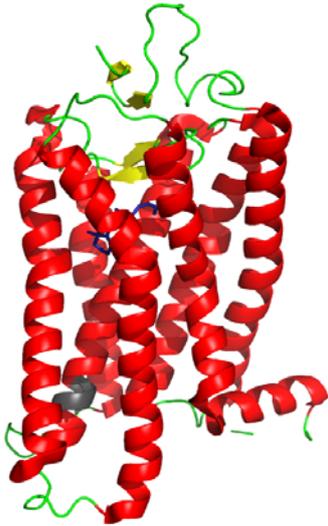
### ***Strukturelle Merkmale***

Alle Vertreter der Superfamilie der GPCRs weisen prinzipiell eine einheitliche Architektur auf. Strukturelle Informationen zur Familie der GPCRs wurden auf der Grundlage von biochemischen, immunologischen und biophysikalischen Untersuchungen erlangt. Alle GPCRs besitzen eine extrazelluläre N-terminale Domäne, eine C-terminale intrazelluläre Domäne und sieben Transmembran-Helices (TMHs), welche durch drei extrazelluläre (Exoloops) und drei intrazelluläre *loops* (Cytoloops) miteinander verbunden sind.

Hochaufgelöste Strukturen von GPCRs sind nur von wenigen Vertretern verfügbar. Die erste GPCR-Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins wurde im Jahr 2000 von Palczewski et al. (10) vorgestellt. Diese Struktur eines Klasse A-Gesamt Rezeptors bestätigte den bisher angenommenen allgemeinen Aufbau dieser Rezeptoren. In den letzten Jahren gelang es weitere dreidimensionale Strukturen der Rezeptoren dieser Klasse vorzustellen. Neben einigen Strukturen des Rhodopsins mit verschiedenen Mutationen und in unterschiedlichen Konformationen (11-17) konnten auch Kristallstrukturen des  $\beta$ 2-Adrenorezeptors ( $\beta$ 2AR) (18, 19) und des Adenosin(A2A)-Rezeptors (20) gelöst werden. Diese Strukturen erlauben einen genaueren Blick auf die Tertiärstruktur dieser wichtigen Rezeptorklasse und geben außerdem nähere Einblicke in mögliche Aktivierungsmechanismen sowohl auf der extra- als auch auf der intrazellulären Seite der Rezeptoren. Dreidimensionale Strukturen von GPCRs anderer Klassen konnten bisher nicht gezeigt werden, jedoch gelang es die extrazellulären Domänen einiger GPCRs, wie z.B. die des Klasse C metabotropen Glutamatrezeptors (21) oder des Klasse B Mth-Rezeptors aus *Drosophila* (22), zu isolieren und deren Kristallstruktur zu lösen. Der Umstand, dass die Strukturaufklärung der Gesamt Rezeptoren bisher nur selten Erfolg hatte, ist der besonderen Schwierigkeit des Umgangs und der Stabilisierung mit derart flexiblen Membranproteinen (23) und nicht zuletzt der großen Diversität dieser Rezeptoren zuzuschreiben. Die Gesamtgröße aller bekannten GPCRs variiert zwischen 297 (Melanokortin 2 Rezeptor, NCBI *accession*: NP\_000520) und ca. 1100 Aminosäuren (metabotrope Glutamatrezeptoren, z.B. mGluR1 1194 Aminosäuren NCBI *accession*: CAI20336). Die Länge der N-terminalen Domänen liegt zwischen 7 und 595, die der *loop*-Bereiche zwischen 5 und 230 und die der C-terminalen Domänen zwischen 12 und 359 Aminosäuren. Eine relativ konstante Größe bildet die Länge der transmembranen Helices, welche alle zwischen 20 und 27 Aminosäuren aufweisen.

Zwischen den Klassen A, B und C der GPCRs lassen sich charakteristische Strukturunterschiede feststellen, welche vielfach in der Literatur beschrieben und in den folgenden Abbildungen I.1, I.2 und I.3 dargestellt sind.

## I Einleitung: Parathormon-Rezeptordomänen

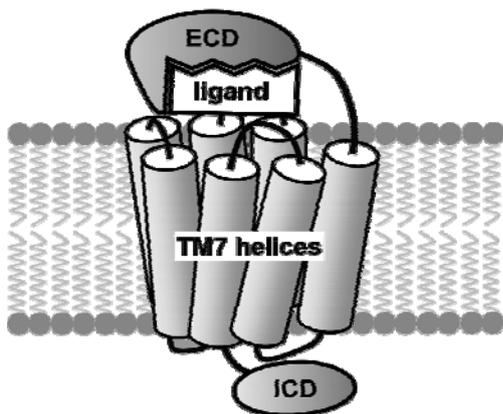


[PDB-Code: 3C9L, (24)]

**Klasse A** Die umfangreichste Klasse der GPCRs ist durch eine kleine, stark glykosilierte N-terminale Domäne und eine Anzahl hochkonservierter Aminosäurereste im Bereich der sieben TMHs charakterisiert. Viele Klasse A-Rezeptoren besitzen eine Disulfidbrücke zwischen dem ersten und zweiten Exoloop. Des Weiteren weisen einige der Rezeptoren ein palmitoyliertes Cystein am C-Terminus auf, welches zu einem putativen vierten Cytoloop oder wie im Fall des  $\beta$ 2AR zu einer zusätzlichen  $\alpha$ -Helix parallel zur Membran führt. Das hochkonservierte DRY- bzw. E/DRY-Motiv (grau) am Ende der TMH 3 ist involviert in die Steuerung der Rezeptorkonformation und G-Protein-Bindung/ Erkennung (25).

**Abb. I.1: Strukturelle Charakteristika der GPCR-Klasse A** gezeigt am Beispiel des bovinen Rhodopsins. Helices: rot,  $\beta$ -Stränge: gelb, loops: grün, Retinal: blau, konserviertes ERY-Motif: grau

**Klasse B**-Rezeptoren sind durch eine lange extrazelluläre Hormonbindedomäne (HBD) charakterisiert, welche durch drei konservierte Disulfidbrücken stabilisiert wird. Die Disulfidbrücke zwischen Exoloop 1 und 2 ist ebenfalls vorhanden. Ein konserviertes E/DRY-Motiv ist bei dieser Klasse nicht zu finden (7).



**Abb. I.2: Strukturelle Charakteristika der GPCR-Klasse B.** Schematische Darstellung eines Klasse B-GPCRs; ECD: extrazelluläre Domäne / N-Terminus, TM7 helices: TMHs, ICD: intrazelluläre Domäne / C-Terminus.

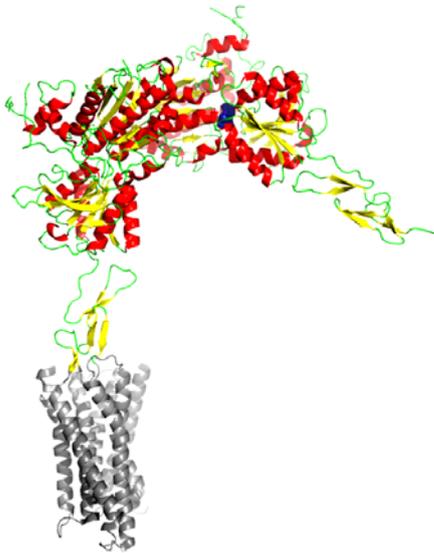
[Christoph Parthier, AG Stubbs, Institut für Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg]

**Klasse C** Diese Klasse besitzt eine sehr lange N-terminale Domäne (500-600 Aminosäuren), welche für die Ligandenbindung verantwortlich ist. Im Gegensatz zu Klasse A und B-Rezeptoren ist der dritte Cytoloop, welcher neben dem C-Terminus hauptsächlich für die Bindung an die  $\alpha$ -

## I Einleitung: Parathormon-Rezeptordomänen

---

Untereinheit des G-Proteins verantwortlich gemacht wird, bei Klasse C-Rezeptoren sehr kurz und hochkonserviert. Die konservierte Disulfidbrücke zwischen Exoloop 1 und 2 ist auch in dieser GPCR-Klasse zu finden (26).



**Abb. I.3: Strukturelle Charakteristika der GPCR-Klasse C.** Struktur der extrazellulären Domäne des metabotropen Glutamat-Rezeptors mit gebundenem Glutamat. Helices: rot,  $\beta$ -Stränge: gelb, loops: grün, Glutamat: blau). Um ein Modell der Gesamtrezeptor-Struktur zu vermitteln, wurden die TMHs des bovinen Rhodopsins aus Abb. I.1 (grau) an die entsprechende Stelle eingefügt.

[PDB-Code: 2E4U, (21)]

### ***Ligandenbindung und Signalweiterleitung***

GPCRs binden eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden, von Licht über Peptide und Proteine bis hin zu Geruchs- und Geschmacksstoffen, Lipiden, Nukleotiden und Nucleosiden. Je nach Art des Liganden finden sich unterschiedliche Bindungsbereichen am jeweiligen Rezeptor. Während die eher kleinen Liganden der Klasse A-Rezeptoren, wie z.B. Adrenalin oder der inverse Agonist Carazolol am Adrenorezeptor in einem tief im Inneren der TMHs gelegenen Spalt binden (18, 19, 27), ist für die Bindung und Koordination größerer Liganden, wie etwa den Peptidhormonen der Klasse B-Rezeptoren (z.B. Parathormon oder Glukagon) hauptsächlich die N-terminale hormonbindende Domäne verantwortlich (28-30). Zusätzlich finden sich bei den Klasse B-Rezeptoren, wie z.B. bei dem VPAC1-Rezeptor noch Ligandenbindungsstellen an den drei Exoloops (31). Die Hormonbindung der Klasse B-Rezeptoren wird als „Zwei-Domänen-Modell“ beschrieben: Während die C-terminalen Reste der Peptid-Liganden durch die N-terminale Rezeptordomäne gebunden werden, finden sich für die N-terminalen Reste des Liganden Interaktionspunkte mit den Exoloops und den TMHs der Rezeptoren (32). N-terminal verkürzte Peptide zeigen eine signifikant erniedrigte Bindungsaffinität zum Rezeptor. Diese Erkenntnisse führten zur Entwicklung eines sequentiellen Bindungsmodells, wonach die N-terminale Domäne zunächst den C-Terminus des Liganden mit niedriger Affinität bindet und damit die höher affine Koordinierung und Interaktion des Peptid-N-Terminus mit den Exoloops und den TMHs des Rezeptors ermöglicht (29).

## I Einleitung: Parathormon-Rezeptordomänen

---

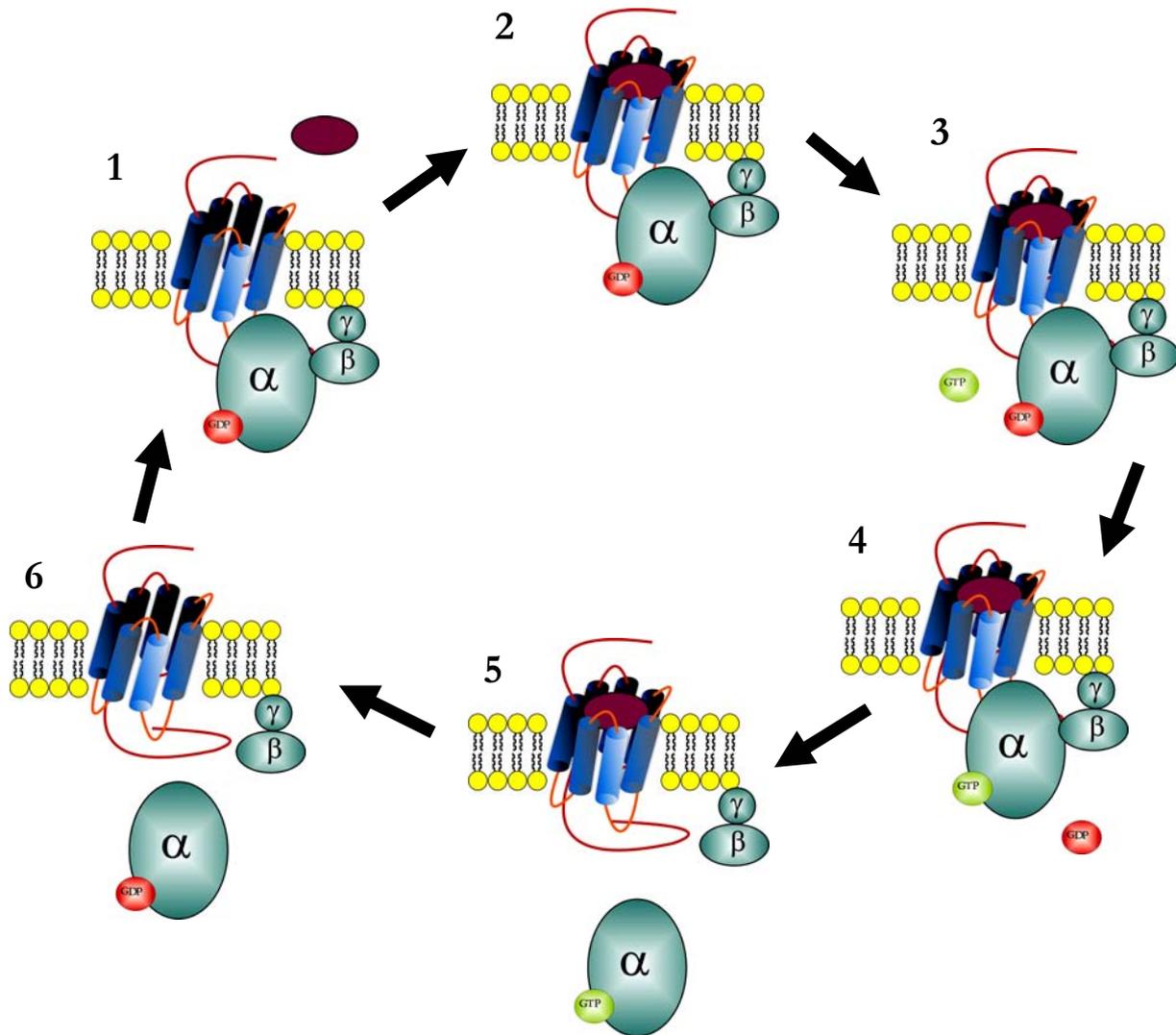
Bei den Klasse C-Rezeptoren wird ebenfalls der ausgeprägte N-Terminus für die Ligandenbindung verantwortlich gemacht (26), wie die Struktur der N-terminalen Domäne des metabotropen Glutamat-Rezeptors zeigt (21).

Nach der Bindung eines Liganden durchläuft der gesamte Rezeptor eine Konformationsänderung, was zu einem aktiven Zustand im Falle der Agonisten-Bindung bzw. zu einem inaktiven Zustand im Falle einer Antagonisten-Bindung führt. Die Mehrzahl aller GPCRs zeigt auch eine Basalaktivität, bei der es ohne Bindung eines Liganden zur intrazellulären Signaltransduktion kommen kann. Des Weiteren gibt es zahlreiche Daten, welche auf mehrere verschiedene Aktivierungszustände von GPCRs hinweisen, so dass nicht pauschal von *dem* aktivierten Zustand eines GPCRs gesprochen werden kann. Diese verschiedenen Zustände des GPCRs sind sehr komplex und bis heute wenig verstanden, da eine Fixierung der einzelnen Zustände und eine anschließende Charakterisierung nur schwer möglich ist. Nähere Einblicke in die Regulierung dieser Zustände bieten die bereits erwähnten Kristallstrukturen und die damit verbundenen Mutationsstudien (11-17).

Die Bindung des trimeren G-Proteins erfolgt intrazellulär am C-Terminus und einigen Bereichen der Cytoloops 2 und 3. G-Proteine bestehen aus je einer  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Untereinheit. Bei jeder Untereinheit sind verschiedene Subtypen bekannt. Eine grundlegende Einteilung der G-Proteine erfolgt nach ihrer 39-45 kD großen  $\alpha$ -Untereinheit. Im Wesentlichen unterscheidet man 4 Gruppen:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$ . Es existieren 5 verschiedene  $G\beta$ - und ca. 12 verschiedene  $G\gamma$ -Untereinheiten (33, 34).

GPCRs sind je nach Aktivierungszustand und dem Gewebe in dem sie exprimiert werden in der Lage verschiedene G-Proteine zu binden und somit auch unterschiedliche zelluläre Signaltransduktionswege anzuregen. Dieser Mechanismus wird durch die Dissoziation des G-Proteins in seine  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheit initiiert, nachdem es am aktivierten Rezeptor gebunden und ein GDP-GTP-Austausch am  $G\alpha$  stattgefunden hat, welches eine GTPase-Aktivität besitzt. Durch die Interaktion mit den G-Proteinuntereinheiten werden im Folgenden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, welche z.B. über die Adenylatcyclase, die Guanylatcyclase oder die Phospholipase A oder C weiter auf  $Ca^{2+}$ - oder  $K^+$ -Kanäle geleitet werden. Die Signaltransduktionskaskade wird dann durch die Umwandlung des GTPs am  $G\alpha$  zu GDP und die anschließende Reassemblierung des G-Proteins gestoppt (9, 33).

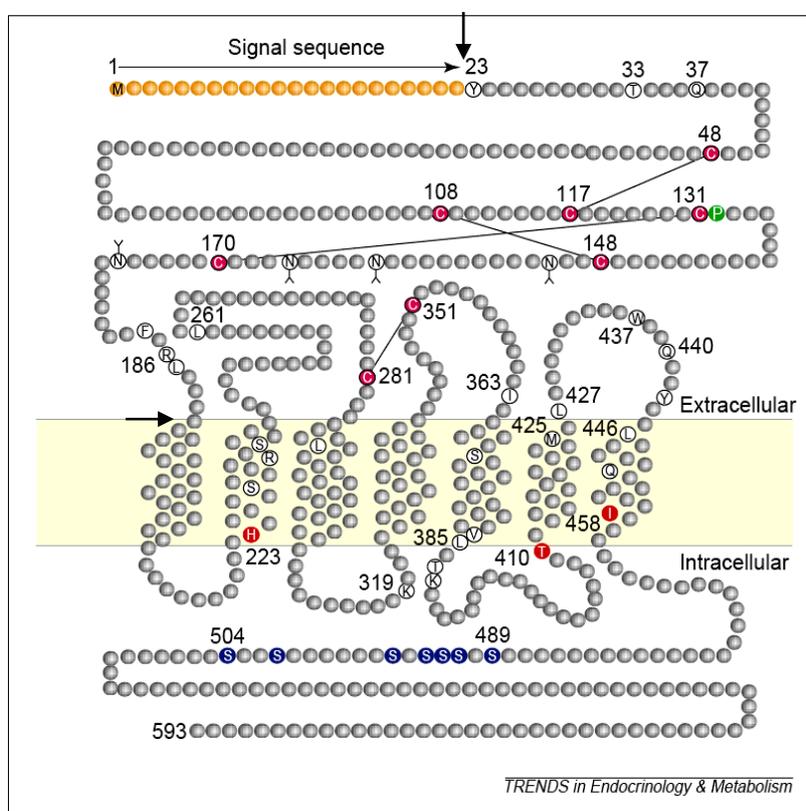
Abbildung I.4 zeigt schematisch die Aktivierung und Deaktivierung von GPCRs.



**Abb. I.4: GPCR-vermittelte G Protein-Aktivierung.** 1. Ein GPCR liegt in der Membran als Komplex mit dem GDP-gebundenen trimeren G-Protein vor. 2. Ein endogener Ligand wird gebunden. 3. Dies bewirkt eine Konformationsänderung und Aktivierung des Rezeptors, welche sich auf das G-Protein überträgt 4. Dies induziert einen GDP-GTP-Austausch an der G $\alpha$ -Untereinheit und 5. die Dissoziation des G-Proteins. Die G $\alpha$ - und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten interagieren nun mit einer Reihe intrazellulärer Effektoren. 6. Die Signalkaskade wird durch die Umsetzung des gebundenen GTP zu GDP durch die G $\alpha$ -Untereinheit unterbrochen. Dies führt zu einer Reassoziierung des trimeren G-Proteins und damit wieder zur Ausgangssituation.

## I.2 PTH- und PTHrP-Rezeptor 1 (PTHR1)

PTHR1 (Abb. I.5) gehört zur Klasse B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Der hauptsächlich im Knochengewebe und in den Nieren exprimierte Rezeptor bindet zwei Peptidhormone, das Parathormon (PTH) und das Parathormon-related peptide (PTHrP). Wie alle Klasse B GPCRs besitzt PTHR1 eine extrazelluläre N-terminale Hormon-Bindedomäne (HBD), welche durch drei konservierte Disulfidbrücken stabilisiert wird: Cys48 und Cys117, Cys108 und Cys148 und Cys170 und Cys131 (28).



**Abb. I.5: Schematische Darstellung des PTH/PTHrP-Rezeptors.** Die N-terminale Domäne besitzt eine 23-Aminosäure-Signalsequenz, drei stabilisierende Disulfidbrücken und mehrere Glykosylierungsstellen (Y). Die konservierte Disulfidbrücke zwischen Exoloop 1 und 2 wird dargestellt. Reste, welche für die Interaktion mit den Peptidliganden oder dem trimeren G-Protein wichtig sind, wurden hier gesondert hervorgehoben. Die grün und rot markierten Reste zeigen Mutationsstellen, welche zu verschiedenen Knochenkrankheiten führen. Die Pfeile markieren das in dieser Arbeit verwendete Rezeptorfragment nPTHR1.

[Abbildung entnommen aus Gardella, 2001 (35)]

### Die PTHR1-Liganden PTH und PTHrP

**PTH** ist ein endokrines Peptidhormon, welches bereits seit mehr als 80 Jahren als Regulator des Blutkalziumspiegels (36, 37), der Kalziumionen-Homöostase und des Knochenauf- und -abbaus bekannt ist (38, 39). Als Antwort auf einen geringen Kalzium- oder einen hohen Phosphat-Spiegel wird PTH als ein 84-Aminosäure-Peptid in den Epithelzellen der Nebenschilddrüse synthetisiert und in den Blutstrom abgegeben (40, 41). Über die Bindung an den PTHR1 in Niere

## I Einleitung: Parathormon-Rezeptordomänen

---

und Knochengewebe werden dann die regulierenden Signalkaskaden ausgelöst. In der Niere bewirkt PTH die vermehrte Resorption von Kalzium und eine verminderte Resorption von Phosphat am renalen Tubulus (42) indem zwei verschiedene Natrium-Phosphat-Kotransporter, NPT-2a und NPT2c, beeinflusst werden (43-45). Außerdem wird 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> synthetisiert, welches als aktive Form des Vitamin D nicht nur an der Regulation des Kalziumhaushaltes und der Knochenbildung beteiligt ist, sondern auch einen wichtigen Regulator des Immunsystems darstellt (46). Im Knochengewebe kommt es infolge der PTH-Bindung zur vermehrten Aktivität der Osteoklasten und somit zur Kalzium- und Phosphatabgabe aus der Knochenmatrix ins Blut, zugleich wird aber auch die Knochenneubildung durch Stimulierung der Osteoblasten angeregt (47).

PTH wird in der Nebenniere als Prä-Pro-Hormon synthetisiert. Die ersten 25 Aminosäuren der Prä-Sequenz bilden eine hydrophobe Domäne, welche die Passage durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gewährleistet (48). Die sechs Aminosäuren lange Pro-Sequenz endet mit einer zweibasigen Schnittstelle und wird entfernt, bevor das Hormon in die sekretorischen Vesikel geschleust wird (49). Für die vollständige Aktivierung des PTHR1 wird jedoch nicht das gesamte PTH-Peptid benötigt. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass lediglich PTH(1-34) für die Aktivierung des Rezeptors und das Auslösen der intrazellulären Signalkaskaden benötigt wird (35, 50). In den letzten Jahren gelang es einige NMR-Strukturen wie auch eine Kristallstruktur verschieden langer PTH-Peptide zu lösen (51-54) (siehe Diskussion).

***PTHrP*** ist ein parakriner oder autokriner Faktor, welcher ursprünglich in vielen Tumoren, die tumorinduzierte Hyperkalzämie verursachen, gefunden wurde (55-58). Beim Menschen wurde PTHrP in verschiedenen *splice*-Varianten mit 139, 141 oder 173 Aminosäuren gefunden (59). Das Peptid übernimmt vor allem in der embryonalen Entwicklung wichtige physiologische Funktionen. Es sorgt für die Regulation des Knorpelwachstums und für die Differenzierung der Wachstumsfuge bei sich entwickelnden langen Knochen (60). PTHrP wird auch im Brustgewebe stillender Frauen gebildet und kann in der Muttermilch nachgewiesen werden (61, 62). Des Weiteren wird das Hormon von der Plazenta produziert, um den Kalzium-Transport über die Plazentamembran zum Fetus zu regulieren (63, 64).

PTHrP zeigt speziesübergreifend im Bereich des N-Terminus eine signifikante Sequenzhomologie zu PTH, wie auch dem Sequenzvergleich in Abb. I.6 zu entnehmen ist.

## I Einleitung: Parathormon-Rezeptordomänen

hPTH	--S <b>V</b> SHI <b>L</b> LMENL <b>G</b> KHLNSMERVE <b>N</b> IRKKLQDV <b>N</b> -----F <b>V</b> AL <b>G</b> APL <b>A</b> PRDAGS <b>Q</b> R <b>R</b> - 52
bPTH	--A <b>V</b> SHI <b>L</b> FMENL <b>G</b> KHLSSMERVE <b>N</b> IRKKLQDV <b>N</b> -----F <b>V</b> AL <b>G</b> AS <b>I</b> AYRDGSS <b>Q</b> R <b>R</b> - 52
rPTH	--A <b>V</b> SHI <b>L</b> LMENL <b>G</b> KHLASVE <b>M</b> Q <b>M</b> IRKKLQDV <b>N</b> -----F <b>V</b> SL <b>G</b> VQ <b>M</b> AAREGS <b>Y</b> Q <b>R</b> <b>T</b> - 52
mPTH	--A <b>V</b> SHI <b>L</b> LMENL <b>G</b> KHLASMER <b>M</b> Q <b>M</b> IRKKLQD <b>M</b> <b>N</b> -----F <b>V</b> SL <b>G</b> VQ <b>M</b> AARDG <b>S</b> H <b>Q</b> K <b>T</b> - 52
TIP39	SL <b>L</b> ADDA <b>A</b> WRERAR <b>L</b> LA <b>L</b> ER <b>H</b> W <b>L</b> N---SY <b>M</b> H <b>K</b> -----L <b>L</b> V <b>L</b> D---A <b>F</b> ----- 39
hPTHrP	-- <b>A</b> VSE <b>H</b> Q <b>L</b> L <b>H</b> D <b>K</b> G <b>K</b> S <b>I</b> Q <b>D</b> L <b>R</b> R <b>F</b> F <b>L</b> H <b>H</b> L <b>I</b> A <b>E</b> I <b>H</b> T <b>A</b> E <b>I</b> R <b>A</b> T <b>S</b> E <b>V</b> S <b>P</b> N <b>S</b> K <b>F</b> <b>A</b> P <b>N</b> T <b>K</b> N <b>H</b> E <b>V</b> R 58
bPTHrP	-- <b>A</b> VSE <b>H</b> Q <b>L</b> L <b>H</b> D <b>K</b> G <b>K</b> S <b>I</b> Q <b>D</b> L <b>R</b> R <b>F</b> F <b>L</b> H <b>H</b> L <b>I</b> A <b>E</b> I <b>H</b> T <b>A</b> E <b>I</b> R <b>A</b> T <b>S</b> E <b>V</b> S <b>P</b> N <b>S</b> K <b>F</b> <b>A</b> P <b>N</b> T <b>K</b> N <b>H</b> E <b>V</b> R 58
rPTHrP	-- <b>A</b> VSE <b>H</b> Q <b>L</b> L <b>H</b> D <b>K</b> G <b>K</b> S <b>I</b> Q <b>D</b> L <b>R</b> R <b>F</b> F <b>L</b> H <b>H</b> L <b>I</b> A <b>E</b> I <b>H</b> T <b>A</b> E <b>I</b> R <b>A</b> T <b>S</b> E <b>V</b> S <b>P</b> N <b>S</b> K <b>F</b> <b>A</b> P <b>N</b> T <b>K</b> N <b>H</b> E <b>V</b> R 58
mPTHrP	-- <b>A</b> VSE <b>H</b> Q <b>L</b> L <b>H</b> D <b>K</b> G <b>K</b> S <b>I</b> Q <b>D</b> L <b>R</b> R <b>F</b> F <b>L</b> H <b>H</b> L <b>I</b> A <b>E</b> I <b>H</b> T <b>A</b> E <b>I</b> R <b>A</b> T <b>S</b> E <b>V</b> S <b>P</b> N <b>S</b> K <b>F</b> <b>A</b> P <b>N</b> T <b>K</b> N <b>H</b> E <b>V</b> R 58
hPTH	-- <b>K</b> K <b>E</b> D <b>N</b> V <b>L</b> V <b>E</b> S <b>H</b> E <b>K</b> S <b>L</b> G <b>E</b> A <b>D</b> K <b>A</b> D <b>V</b> <b>N</b> V <b>L</b> T <b>K</b> A <b>S</b> <b>Q</b> ----- 84
bPTH	-- <b>K</b> K <b>E</b> D <b>N</b> V <b>L</b> V <b>E</b> S <b>H</b> Q <b>S</b> L <b>G</b> E <b>A</b> D <b>K</b> A <b>D</b> V <b>D</b> V <b>L</b> I <b>K</b> A <b>P</b> <b>Q</b> ----- 84
rPTH	-- <b>K</b> K <b>E</b> <b>E</b> <b>N</b> V <b>L</b> V <b>D</b> G <b>N</b> S <b>K</b> S <b>L</b> G <b>E</b> G <b>D</b> K <b>A</b> D <b>V</b> <b>D</b> V <b>L</b> V <b>K</b> A <b>S</b> <b>Q</b> ----- 84
mPTH	-- <b>K</b> K <b>E</b> <b>E</b> <b>N</b> V <b>L</b> V <b>D</b> G <b>N</b> P <b>K</b> S <b>L</b> G <b>E</b> G <b>D</b> K <b>A</b> D <b>V</b> <b>D</b> V <b>L</b> V <b>K</b> A <b>S</b> <b>Q</b> ----- 84
TIP39	----- 39
hPTHrP	<b>F</b> G <b>S</b> D <b>D</b> E <b>G</b> R <b>Y</b> L <b>T</b> Q <b>E</b> T <b>N</b> K <b>V</b> E <b>T</b> Y <b>K</b> E <b>Q</b> P <b>L</b> K <b>T</b> P <b>G</b> K <b>K</b> K <b>G</b> K <b>P</b> G <b>K</b> R <b>R</b> E <b>Q</b> E <b>K</b> K <b>R</b> R <b>T</b> R <b>S</b> A <b>W</b> L <b>D</b> S <b>G</b> V <b>T</b> G 118
bPTHrP	<b>F</b> G <b>S</b> D <b>D</b> E <b>G</b> K <b>Y</b> L <b>T</b> Q <b>E</b> T <b>N</b> K <b>V</b> E <b>T</b> Y <b>K</b> E <b>Q</b> P <b>L</b> K <b>T</b> P <b>G</b> K <b>K</b> K <b>S</b> K <b>P</b> G <b>K</b> R <b>R</b> E <b>Q</b> E <b>K</b> K <b>R</b> R <b>T</b> R <b>S</b> A <b>W</b> L <b>T</b> S <b>Y</b> V <b>A</b> G 118
rPTHrP	<b>F</b> G <b>S</b> D <b>D</b> E <b>G</b> R <b>Y</b> L <b>T</b> Q <b>E</b> T <b>N</b> K <b>V</b> E <b>T</b> Y <b>K</b> E <b>Q</b> P <b>L</b> K <b>T</b> P <b>G</b> K <b>K</b> K <b>G</b> K <b>P</b> G <b>K</b> R <b>R</b> E <b>Q</b> E <b>K</b> K <b>R</b> R <b>T</b> R <b>S</b> A <b>W</b> P <b>G</b> -- <b>T</b> T <b>G</b> 116
mPTHrP	<b>F</b> G <b>S</b> D <b>D</b> E <b>G</b> R <b>Y</b> L <b>T</b> Q <b>E</b> T <b>N</b> K <b>V</b> E <b>T</b> Y <b>K</b> E <b>Q</b> P <b>L</b> K <b>T</b> P <b>G</b> K <b>K</b> K <b>G</b> K <b>P</b> G <b>K</b> R <b>R</b> E <b>Q</b> E <b>K</b> K <b>R</b> R <b>T</b> R <b>S</b> A <b>W</b> P <b>S</b> -- <b>T</b> A <b>S</b> 116
hPTH	-----
bPTH	-----
rPTH	-----
mPTH	-----
TIP39	-----
hPTHrP	<b>S</b> G <b>L</b> E <b>G</b> D <b>H</b> L <b>S</b> D <b>T</b> S-- <b>T</b> T <b>S</b> L <b>E</b> L <b>D</b> S <b>R</b> R <b>H</b> 141
bPTHrP	<b>T</b> G <b>L</b> E <b>E</b> D <b>Y</b> L <b>S</b> D <b>I</b> S-- <b>A</b> T <b>S</b> L <b>E</b> L <b>N</b> S <b>R</b> R <b>H</b> 141
rPTHrP	<b>S</b> G <b>L</b> L <b>E</b> D <b>P</b> Q <b>P</b> H <b>T</b> S <b>P</b> T <b>S</b> T <b>S</b> L <b>E</b> P <b>S</b> S <b>R</b> T <b>H</b> 141
mPTHrP	<b>S</b> G <b>L</b> L <b>D</b> Y <b>P</b> L <b>P</b> H <b>T</b> S-- <b>R</b> T <b>S</b> L <b>E</b> P <b>S</b> L <b>R</b> T <b>H</b> 139

Abb. I.6.: Sequenzalignment von PTH und PTHrP aus verschiedenen Organismen und dem humanen TIP39. Homologien der Sequenzen bestehen vor allem im N-terminalen Bereich der Peptide. Zwischen TIP39 und PTH bzw. PTHrP finden sich nur wenige homologe Aminosäuren. Abkürzungen: hPTH: humanes PTH; bPTH: bovines PTH; rPTH: Ratten-PTH; mPTH: Maus-PTH; bPTHrP: bovines PTHrP; hPTHrP: humanes PTHrP; rPTHrP: Ratten-PTHrP; mPTHrP: Maus-PTHrP. Das Alignment wurde mit ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2)) durchgeführt. **Pink**: identische Reste aller Peptide; **grün**: identische Reste von PTHrP und TIP39, **hellblau**: identische Reste von PTH und TIP39, **grau**: übereinstimmende Reste bei PTH und PTHrP; **blau**: identische Reste innerhalb der PTH-Spezies und **braun**: innerhalb der PTHrP-Spezies.

### *Bekannte Mutationen in nPTHR1 und damit verbundene Krankheitsbilder*

Die zentrale Bedeutung des PTH/PTHrP-Rezeptors und seiner Liganden bei der Steuerung der embryonalen Entwicklung und bei Knochen- und Knorpelauf- und -abbauenden Prozessen zeigt sich bei einigen erblichen Krankheiten, welche durch Mutationen am Rezeptor zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors oder zu einer Hemmung der Signalübertragung führen. Bei der Jansen Chondrodysplasie führen vier Punktmutationen im Bereich der TMHs zu einer konstitutiven rezeptor-abhängigen Aktivierung des cAMP-Signalwegs. Dies führt durch Störungen in der Wachstumsfuge langer Knochen zu Zwergenwuchs und gesteigertem Knochenauf- und -abbau (65-68). Die konstitutive Aktivierung äußert sich außerdem in einer Hyperkalzämie und einem erhöhten 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Spiegel.

Eine mutationsbedingte Inaktivierung des Rezeptors in der HBD (Pro132Leu), wie im Falle der Blomstrand Chondrodysplasie, führt zu einer perinatal letalen Störung, welche durch verkürzte Gliedmaßen, vermehrter Zahnbildung und Osteosklerose gekennzeichnet ist (69-72). Bei der Enchondromatose (Ollier`s Krankheit) wird durch die Mutation Arg150Cys nur ein kleiner Anstieg im basalen cAMP-*signaling* beobachtet. Die Patienten zeigen Enchondrome im Markraum langer Röhrenknochen, aber keine abnormalen Serum-Kalzium-Werte (73).

Da die knochenaufbauende Wirkung von PTH hinlänglich bekannt ist (74, 75), wurde darauf basierend der klinische Nutzen von PTH(1-34)-Gabe bei Osteoporose-Patienten untersucht (76, 77). Bei täglicher Injektion des Hormons zeigten sich eine Verbesserung der Knochensubstanz und ein geringeres Wirbelkörperfraktur-Risiko. Nach diesen viel versprechenden Ergebnissen wird nun nach kleineren PTH-basierten Peptiden oder auch nicht-peptidischen Verbindungen (Möglichkeit der oralen Gabe) gesucht, welche ebenfalls am PTHR1 binden und ähnliche Effekte auslösen können.

Für diese Anwendung wäre auch eine dreidimensionale Struktur der HBD oder des gesamten Rezeptors hilfreich, um so gezielt neue Wirkstoffe entwickeln zu können (*structure based drug design*).

### I.3 PTH-Rezeptor 2 (PTHR2)

Aufgrund der Sequenzhomologie zu anderen Peptid-bindenden Rezeptoren wurde der PTH-Rezeptor 2 (PTHR2) identifiziert und wie der PTHR1 der Klasse B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeteilt (78). PTHR2 bindet *in vitro* ebenfalls das Parathormon. Als endogener Ligand wurde das Tuberoinfundibular-Peptid mit 39 Aminosäuren (TIP39) zunächst im bovinen Hypothalamus identifiziert und daraus isoliert (79). Der humane PTHR2 besitzt 51 % Sequenz-Identität zum humanen PTHR1.

#### ***Vorkommen und Funktion***

PTHR2 wurde erst Anfang der 1990er Jahre zum ersten Mal beschrieben, daher ist über seine Funktion bei weitem nicht so viel bekannt wie über PTHR1. *In vitro* kann PTHR2 sowohl von PTH als auch von TIP39 aktiviert werden, PTHrP zeigt keinen Effekt an diesem Rezeptor (79, 80). *In vivo* spielt die Bindung an PTH wahrscheinlich keine oder nur eine untergeordnete Rolle, da alle bisherigen Studien darauf hinweisen, dass der PTH-Rezeptor 2 vorrangig im Gehirn (78) und in anderen Teilen des zentralen Nervensystems vorkommt, wo PTH höchstens in sehr geringen Mengen zu finden ist (81). Bisher wurden die meisten Studien in Nagern durchgeführt.

Diese belegen, dass TIP39 und PTHR2 als neuromodulares System interagieren, welches in endokrine und nozizeptive Regulationsmechanismen involviert ist (82). 2009 untersuchten Bago *et al.* (83) die Verteilung von PTHR2 und TIP39 im Menschen und in einigen nicht-humanen Primaten, um diese Daten mit den gewonnen Erkenntnissen aus Nagergewebeproben zu vergleichen. Sie legten ihre Aufmerksamkeit vor allem auf das Gehirn und fanden eine nahezu gleiche Verteilung von PTHR2 und seinem Liganden TIP39 in allen untersuchten Spezies. Diese Daten legen nahe, dass das TIP39-PTH2-Neuromodulator-System in Primaten und Menschen in genau den gleichen Regulationsmechanismen agieren wie in Nagern. Dieses schließt die Regulation von Angst und Angststörungen, dem Fortpflanzungsverhalten, der Abgabe von hypophysären Hormonen und nozizeptiver Informationsverarbeitung ein (84-92).

### I.4 Vorarbeiten und Problemstellung

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, und die damit verbundene Möglichkeit detaillierte Erkenntnisse über die molekularen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor zu erhalten, ist für die Entwicklung therapeutisch wirksamer Agonisten und Antagonisten von sehr großer Bedeutung.

Aufgrund der Schwierigkeit bei der heterologen Expression von Gesamtrezeptoren sind Struktur- und Funktionsanalysen bisher nur eingeschränkt möglich. Die Kristallisation und Strukturaufklärung von Gesamt-GPCRs in verschiedenen Aktivierungszuständen und in Gegenwart bestimmter Liganden gelang bisher nur bei drei Klasse A GPCRs (10-16, 18-20, 93). Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren der Klasse B und deren Peptid-Liganden wird deshalb statt dem Gesamtrezeptor in den meisten Fällen die isolierte N-terminale Domäne verwendet. Dass diese Strategie zu einer Kristallstruktur führen kann, wurde für die N-terminale Domäne des metabotropen Glutamaterezeptors, einem Klasse C-GPCR, bereits gezeigt (21). Während die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, wurden des Weiteren Kristall- und NMR-Strukturen einiger HBD von Klasse B-GPCRs gelöst und veröffentlicht (siehe Diskussion) (94-98).

Die N-terminale Domäne des PTH-Rezeptor 1 (nPTH1) wurde bereits von U. Grauschopf (28) dargestellt und die Interaktion mit dem Liganden PTH(1-34) biophysikalisch charakterisiert. Die in dieser Arbeit entwickelten Expressionsplasmide, Expressionsbedingungen, Renaturierungs- und Reinigungsprotokolle standen für die vorliegende Arbeit zur Verfügung und sollten bei Bedarf optimiert werden.

Als erstes Ziel dieser Arbeit stand die Herstellung von nativem Protein im Milligramm-Maßstab im Mittelpunkt, welches dann für erneute und detailliertere biophysikalische Charakterisierung

## **I Einleitung: Parathormon-Rezeptordomänen**

---

durch ITC-, CD- und DSC-Experimente und vor allem für Kristallisationsversuche in Gegenwart des Liganden PTH(1-37) genutzt werden sollte. Ein weiterer Ansatz zum Erhalt einer Kristallstruktur von nPTHR1 mit seinem Liganden sollte die Herstellung von Ligand-Rezeptor-Fusionsproteinen sein. Das Ziel dabei war es Konstrukte zu erhalten, welche eine erhöhte Stabilität und eine verbesserte Löslichkeit im Vergleich zu nPTHR1 aufwiesen, um so bessere Voraussetzungen für die Kristallisation zu erhalten. Weiterhin sollte der Einfluss verschiedener Linker-Längen auf die Stabilität der Fusionsproteine untersucht werden. Diese Vorgehensweise zur Verbesserung der Löslichkeit von Rezeptordomänen wurde bereits von Bazarsuren 2003 am Beispiel des GLP1-Rezeptors beschrieben (99).

Als weiteres Projekt sollte außerdem die N-terminale Domäne des PTH-Rezeptor 2 isoliert, exprimiert und gereinigt werden, um so über biophysikalische Untersuchungen und Strukturanalysen mittels Kristallographie und NMR detailliertere Aussagen über die unterschiedliche Spezifität dieser beiden Rezeptoren zu ihren Liganden und über strukturelle Unterschiede und Gemeinsamkeiten erhalten zu können. Hierzu sollten entsprechend die Renaturierungs- und Reinigungsprotokolle von nPTHR1 angepasst und optimiert werden, um natives nPTHR2 bis zur Homogenität zu reinigen.

# II Material und Methoden

## II.1 Material

### II.1.1 Chemikalien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
BRIJ-78	Sigma
Chloramphenicol	Roth
$\alpha$ -Cyclodextrin: • Cavasol W6 HP	Wacker Biotech GmbH
$\beta$ -Cyclodextrin: • Cavasol W7 HP Pharma	Wacker Biotech GmbH
• Cavamax W7 Pharma	Wacker Biotech GmbH
• Cavasol W7 M	Wacker Biotech GmbH
$\gamma$ -Cyclodextrin: • Cavamax W8 Pharma	Wacker Biotech GmbH
Glutathion, oxidiert	Fluka
Glutathion, reduziert	Fluka
Guanidiniumhydrochlorid, ultrapure	Bioselect NIGU Chemie GmbH
Hefeextrakt	Deutsche Hefewerke GmbH, Hamburg
Hefeextrakt (Pulver)	Roth
Kanamycin	Roth
L-Arginin-Hydrochlorid	AppliChem
Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin	Wacker Biotech GmbH
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Triton X-100	Merck
Trypton	Roth

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden bei den Firmen ICN, Sigma und Fluka bestellt und hatten den Reinheitsgrad p.a.. Zur Herstellung aller Puffern und Lösungen wurde doppeltdestilliertes Wasser verwendet.

### II.1.2 Standards und Kits

1 kb DNA Längenstandard	New England Biolabs (NEB)
100 bp DNA Längenstandard	New England Biolabs (NEB)
Protein Molekularmassenstandard	New England Biolabs (NEB)
Platinum PCR SuperMix High Fidelity	Invitrogen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

### II.1.3 Proteine, Peptide und Enzyme

Benzonase Nuklease	Sigma
DpnI	New England Biolabs (NEB)
Pfu Polymerase	Fermentas
BamHI	New England Biolabs (NEB)
NdeI	New England Biolabs (NEB)
NotI	New England Biolabs (NEB)
PTH(1-37), rekombinant	K. Sellinger, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs (NEB)
Bovines Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs (NEB)
Thrombin (bovin)	Sigma

### II.1.4 Chromatographiematerial und Säulen

Ni Sepharose High Performance-Material	GE Healthcare
HisTrap HP Columns 1 ml und 5 ml	GE Healthcare
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) 1 ml und 5 ml	GE Healthcare
SP Sepharose Fast Flow 1 ml und 5 ml	GE Healthcare
HiLoad 16/60 Superdex 75 pg	GE Healthcare
HiLoad 26/60 Superdex 75 pg	GE Healthcare
Jupiter 5u C4 300A (HPLC-Säule)	Phenomenex

### II.1.5 Sonstiges Material

Dialysemembranen Spectra Por MCWO 3500 und 6000-8000	Spectrum
Dialysemembranen 1 kD, V-serie	ZelluTrans, Roth
Rundfilter	Millipore
Sterilfilter	Millipore

### II.1.6 Geräte

Es wurde mit Geräten der Standardlaborausstattung gearbeitet. Spezielle Geräte werden an geeigneter Stelle gesondert aufgeführt.

### II.1.7 Organismen / *E. coli*-Stämme

XL1 blue	F <sup>-</sup> ::Tn10 pro A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ)M15 / recA andA1 gyrA96 (Nal <sup>r</sup> ) thi hsdR17 (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>-</sup> ) supE44 relA1 lac (Stratagene, La Jolla, U.S.A)
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ,sdS, gal::λ DE3 del (int) lacUV5PO T7RNAPol, rB <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> , lon, ompT <sup>-</sup> (Novagen, Darmstadt, Deutschland)
Rosetta (DE3)	BL21(DE3) mit ΔlacYZ, lon <sup>-</sup> , ompT <sup>-</sup> , (Novagen, Darmstadt, Deutschland)

Der *E. coli* Stamm XL1 blue wurde zur Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet.

*E. coli* BL21 (DE3) und Rosetta dienen zur Überexpression rekombinanter Gene und enthalten eine chromosomale Kopie des Gens für die T7-RNA-Polymerase, was die Induktion der Expression mit IPTG ermöglicht.

### II.1.8 Plasmide und Oligodesoxynukleotide

---

Plasmid	Hersteller
pET15bnPTHR1	Ulla Grauschopf, AG Rudolph, MLU Halle(28)
pET15bnPTHR1-(GS)12-PTH(1-34)	diese Arbeit
pET15bnPTHR1-(GS)14-PTH(1-34)	diese Arbeit
pET15bnPTHR2	diese Arbeit
pETSUMOPTH	Eva Bosse-Dönecke, AG Rudolph, MLU Halle
pUBS520	(Kurland & Gallant, 1996) (100)
pLysS	Novagen, Darmstadt, Deutschland

---

- Klonierungsprimer für pET15bnPTHR1-(GS)12-PTH(1-34)

NdeI-nPTHR1-(SG)8 forward: 5`-GGAATTCATATGTTACGCGCTGGTGGATGC-3`

NdeI-nPTHR1-(SG)8 reverse: 5`-TGAACCTGATCCAGATCCTGATCCAAATCATG  
CCCAGG-3`

(SG)8 -PTH-BamHI forward: 5`-GGATCAGGTTCAGGGTCCGGCTCATCTGTG  
AGTGAAATACAGC-3`

(SG)8-PTH-BamHI reverse: 5`-GCAGCCGGATCCTCAAAAAATGTGACACATC  
CTG-3`

Die unterstrichenen Regionen markieren die Überlappungsbereiche der Primer mit den Sequenzen der zu amplifizierenden cDNA.

- Quick change-Primer für pET15bnPTHR1-(GS)14-PTH(1-34)

QC12to14 forward: 5`-TCAGGGTCCGGCTCAGGGTCATCTGTGAGTGAAATA-3`

QC12to14 reverse: 5`-TATTTCACTCACAGATGACCCTGAGCCGGACCCTGA-3`

Die unterstrichenen Regionen markieren die *Annealing*-Bereiche der Primer mit dem *Template*-Plasmid pET15bnPTHR1-(GS)12-PTH(1-34).

## II Material und Methoden: Parathormon-Rezeptordomänen

---

- Klonierungsprimer für pET15bnPTH2: overlapping PCR

1\_5'-NdeI-N-term\_forw\_55bp: GGAATTCATATGGCGCAGCTGGATAGCGATGGCA  
CCATTACCATTGAAGAGCAG

2\_rev\_55bp: TCGCACITGCACITTCGCTTTCAGCACCAGCACAATCTGCTCTTCAATG  
GTAATGG

3\_forw\_55bp: AAAGCGAAAGTGCAGTGCAGGCTGAACATTACCGCGCAGCTGCAGG  
AAGGTGAGG

4\_rev\_55bp: CAGCAAATCAGGCCATCCCATTCGGAAAGCAATTGCCCTCACCTTCCT  
GCAGCT

5\_forw\_59bp: TGGGATGGCCTGATTTCGCTGGCCGCGTGGCACCGTGGGCAAAATTA  
GCGCGGTGCCGTG

6\_rev\_60bp: ACGCCACGCCTTTCGTGGTTAAAATCATAAATATACGGCGGGCACGGCA  
CCGCGCTAATTT

7\_forw\_60bp: TAACCACAAAGGCGTGGCGTTCGTCATTCGAATCCGAACGGCACCT  
GGGATTTTATGCA

8\_rev\_60bp: CAGGCAATCGCTATAGTTCGCCAGGTTTATTCAGGCTGTGCATAAA  
ATCCCAGGTGCC

9\_forw\_60bp: CGAACTATAGCGATTGCCTGCGTTTTCTGCAGCCGGATATTAGCATA  
GGGAAACAGGAAT

10\_3`\_C-term-BamH1\_rev\_63bp: CGCGGATCCTTATTAGTACATAACGTACAGGCGTTC  
GAAAAATTCCTGTTCCCTATGCTAAT

Die unterstrichenen Regionen markieren die Überlappungsbereiche der Primer.

Alle verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von MWG Biotech bezogen.

### II.1.9 Medien, Antibiotika und Puffer

#### LB-Medium

10 g/l Bacto Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

#### Fermentations-Medium

50 g/l Hefeextrakt

0,5 g/l Ammoniumchlorid

5 g/l Glucose

11 g/l di-Kaliumhydrogenphosphat

0,68 g/l Magnesiumsulfat

#### Feeding-Lösung

300 g/l Hefeextrakt

250 ml/l Glycerin

#### Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml in H<sub>2</sub>O. Die Zugabe zum Medium erfolgte nach Sterilfiltration im Verhältnis (v/v) 1:1000.

#### Kanamycin-Stammlösung

50 mg/ml in H<sub>2</sub>O. Die Zugabe zum Medium erfolgte nach Sterilfiltration im Verhältnis (v/v) 1:1000.

#### Chloramphenicol-Stammlösung

50 mg/ml in 100 % Ethanol. Die Zugabe zum Medium erfolgte nach Sterilfiltration im Verhältnis (v/v) 1:2000.

#### TAE-Puffer

40 mM Tris/Acetat pH 8,0

1 mM EDTA

## II Material und Methoden: Parathormon-Rezeptordomänen

---

### 5 x DNA-Auftagspuffer

50 % (v/v) Glycerin

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

Bei DNA-Fragmenten mit einer Größe von 200-500 kD wurde das Bromphenolblau im Puffer weggelassen, da die Bromphenolblau-Bande im Agarose-Gel die DNA-Bande überdecken könnte.

### 5 x SDS-PAGE-Laufpuffer

15,1 g/l Tris

5 g/l SDS

94 g/l Glycin

### 5 x SDS-Probenpuffer

5 % (w/v) SDS

0,1 % (w/v) Bromphenolblau

50 % (v/v) Glycerin

250 mM Tris/ HCl pH 8,0

10 mM EDTA

5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

### Lagerpuffer

50 mM Tris/HCl pH 8,0

300 mM Ammoniumsulfat

(bei längerer Lagerung wurden zur Proteinlösung 1 mM PMSF zugegeben)

Puffer welche zur Reinigung, Dialyse oder Charakterisierung der verwendeten Proteine verwendet wurden, werden an geeigneter Stelle aufgeführt.

### II.1.10 Programme

Die Daten der kalorimetrischen Experimente wurden mit Origin (Microcal Software Inc., Northampton, MA, U.S.A.) analysiert. Alle anderen Daten wurden mit SigmaPlot Version 8.0 (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, U.S.A.) bzw. Microsoft Excel (Microsoft Corporation) ausgewertet und dargestellt.

### II.2 Molekularbiologische Methoden

#### II.2.1 Herstellung und Lagerung der chemokompetenten Zellen

Zur Herstellung der chemokompetenten Zellen, wurde der gewünschte Stamm zunächst auf einer Agar-Platte kultiviert. Zum Animpfen einer 4 ml Vorkultur wurde eine einzelne Kolonie mit einem Zahnstocher gepickt und bei 37 °C, 15 h, über Nacht kultiviert. 50 ml LB-Medium wurden dann mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,3 - 0,5 wurden die Zellen 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend 15 min bei 4 °C und 5000 x g zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde mit 10 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in 1,5 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis von 1-2 h wurden noch 1,5 ml 50 % Glycerol hinzugefügt. Die Zellsuspensionen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### II.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Zunächst wurden die unter II.2.1 präparierten chemokompetenten *E. coli*-Zellen, genau wie die bei -20 °C gelagerte Plasmid-DNA auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 1-100 ng der Plasmid-DNA zu den Zellen hinzugefügt. Der Ansatz wurde nun 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock der Zellen bei 42 °C im Wasserbad. Danach wurden 800 µl LB-Medium zu den transformierten Zellen hinzugefügt. Die Zellen wurden dann 45 min bei 37 °C auf einem Thermoschüttler kultiviert. Um die positiven Transformanten zu selektieren, wurden 200 µl des Ansatzes auf einer LB-Agar-Platte, welche Ampicillin enthält, ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### II.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Mini Kit nach dem Protokoll des Herstellers. Das Plasmid wurde immer mit 30 µl autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O eluiert. Das so gewonnene Plasmid konnte direkt zur Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen oder zur Transformation von anderen *E. coli*-Zellen eingesetzt werden. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### II.2.4 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für den Verdau von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten in einem Volumen von 20 µl wurden jeweils ca. 1 µg DNA, 5 bis 10 Einheiten der entsprechenden Restriktionsendonuklease, sowie

## II Material und Methoden: Parathormon-Rezeptordomänen

---

2 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10-fach Reaktionspuffers zusammenpipettiert. Die Ansätze wurden nach den Vorgaben des Herstellers in Gegenwart von BSA bei 37 °C inkubiert. Bei größeren präparativen Ansätzen wurde die Menge an DNA, Enzym und Puffer entsprechend vergrößert. Das so erhaltene Produkt konnte zur Isolierung des Spaltungsproduktes mit 5-fach konzentriertem DNA-Auftragspuffer versetzt, auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt werden.

### II.2.5 Isolierung und Reinigung der DNA-Fragmenten

Nach elektrophoretischer Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem Agarose-Gel und Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid wurde die gewünschte Bande unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraktionkits nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die Elution des gereinigten Fragmentes erfolgte wie bei der Plasmid-DNA-Isolierung in 30 µl autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O.

### II.2.6 Gelelektrophorese von DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA mittels horizontaler Gelelektrophorese wurden Agarosegele (1-3 %) in TAE-Puffer verwendet. Die Agarosekonzentration richtete sich dabei nach der Größe des Ziel-DNA-Fragmentes. Den Gelen wurde vor dem Abkühlen Ethidiumbromid beigemischt, welches mit der DNA interkaliert und anschließend die Detektion ermöglichte. Zur Probenvorbereitung wurde die DNA-Lösung mit 1/5 – 1/3 ihres Volumens mit DNA-Auftragspuffer ( $\pm$  Bromphenolblau, siehe II.1.9) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 12 Volt/cm durchgeführt. Die DNA-Detektion erfolgte unter UV-Anregung.

### II.2.7 Ligation der DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden ca. 10 ng Vektor-DNA, ein 4- bis 10-facher Überschuß an Insert-DNA und 1 Einheit T4 DNA-Ligase in dem vom Hersteller mitgelieferten Ligasepuffer eingesetzt. Das Volumen eines Ligationsansatzes wurde zwischen 10 und 40 µl gewählt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C oder über 2-3 Tage bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 2-5 µl für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

### II.2.8 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Zur Bestimmung der Basenabfolge von Plasmid-DNA wurden zunächst 6-10 µl einer Plasmid-Präparation getrocknet (SpeedVac Plus, Savant). Die Plasmid-DNA wurde dann zur Analyse an

die Firma MWG Biotech, Eberberg, übersendet. Die Analyse erfolgte dort über die Kettenabbruchmethode von Sanger et al., 1977. Zur Sequenzierung wurden die Standardprimer T7 forward bzw. T7 term verwendet.

### II.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Polymerasekettenreaktionen wurden mit Hilfe des Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Ansätze der jeweiligen PCR werden im Folgenden näher erläutert. Alle lyophilisierten Primer wurden zunächst in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  in autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O gelöst und anschließend 1:10 verdünnt.

#### **overlapping PCR:**

Die *overlapping* PCR entspricht im Prinzip einer normalen PCR. Der Unterschied liegt im Design der Primer und darin, dass die Primer selbst als Template dienen. Diese Methode wurde zur Herstellung des DNA-Fragments von nPTH<sub>2</sub> und auch zur Produktion der cDNA für nPTH<sub>1</sub>-(GS)12-PTH(1-34) genutzt.

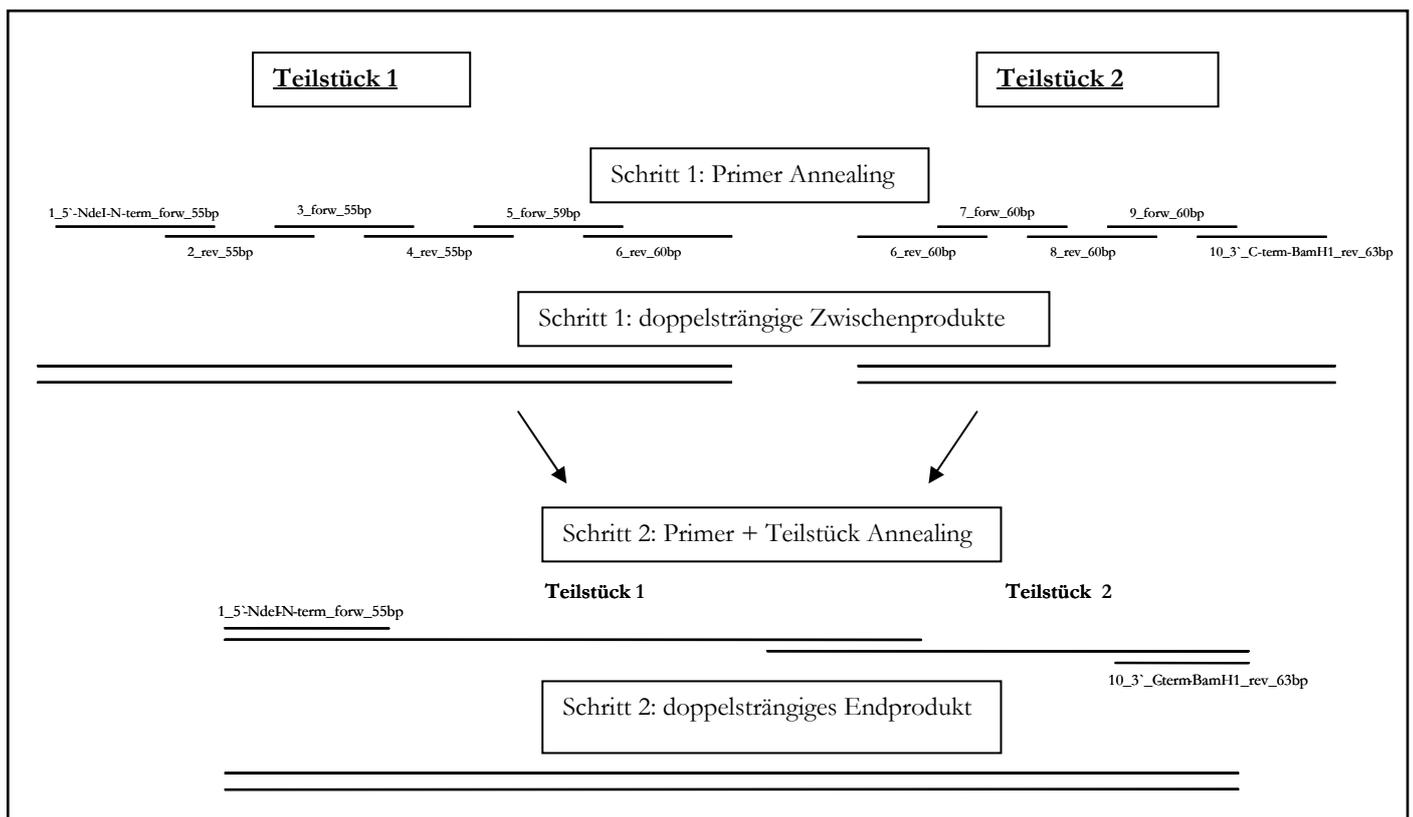
Die Primer für nPTH<sub>2</sub> (siehe II.1.8) wurden so gestaltet, dass jeweils 15-20 Basen mit dem vorhergehenden bzw. nachfolgenden Primer überlappen und somit ein *Annealing* möglich ist (siehe Abschnitt II.1.8, unterstrichene Bereiche). Während der PCR lagern sich die passenden Abschnitte der einzelnen Primer zusammen und bilden so das vollständige DNA-Fragment. Die fehlenden DNA-Stücke der nicht-überlappenden Bereiche der Primer werden durch die Polymerase aufgefüllt. Bei dieser hohen Anzahl an Primern gelang es nicht das gesamte DNA-Fragment in einem Schritt in zu produzieren. Daher wurden zwei Reaktionen durchgeführt. Um die Amplifikation des jeweiligen Endproduktes zu begünstigen, wurden im ersten Schritt die Primer 1-6 und in einem weiteren Ansatz die Primer 6-10 verwendet. Die flankierenden Primer wurden jeweils im Überschuss ( $c_{\text{end}}=0,3 \mu\text{M}$ ) zu den inneren Primern ( $c_{\text{end}}=0,1 \mu\text{M}$ ) zugegeben, Anschließend wurden die beiden Teilstücke, welche sich um die Länge des Primers 6 + 20 Basen überlappen, in einer weiteren PCR mit den flankierenden Primern 1 und 10 zur Gesamt-cDNA fusioniert (siehe Abb. II.1).

Zur Gewinnung des nPTH<sub>1</sub>-DNA-Stückes für nPTH<sub>1</sub>-(GS)12-PTH(1-34) wurde die nPTH<sub>1</sub>-cDNA aus dem Vektor pET15bnPTH<sub>1</sub> ( $c_{\text{end}}=100 \text{ ng}$ ) (hergestellt von Ulla Grauschopf, AG Rudolph, MLU Halle (28)) mit Hilfe der Primer NdeI-nPTH<sub>1</sub>-(SG)8 forward ( $c_{\text{end}}=0,1 \mu\text{M}$ ) und NdeI-nPTH<sub>1</sub>-(SG)8 reverse ( $c_{\text{end}}=0,1 \mu\text{M}$ ) gewonnen. Durch die PCR mit diesen Primern wurde an der nPTH<sub>1</sub>-cDNA am 5'-Ende eine NdeI-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende die kodierende Sequenz für die ersten acht Aminosäuren des Glycin-Serin-Linkers, G-S-G-S-G-S-G-S, angefügt.

## II Material und Methoden: Parathormon-Rezeptordomänen

Zur Gewinnung des PTH(1-34)-DNA-Stückes wurde die PTH(1-34)-cDNA aus dem Vektor pET SUMO-PTH ( $c_{\text{end}}=100$  ng) (hergestellt von Eva Bosse-Dönecke (101), AG Rudolph, MLU Halle) mit Hilfe der Primer (SG)8-PTH-BamHI forward ( $c_{\text{end}}=0,1$   $\mu\text{M}$ ) und (SG)8-PTH-BamHI reverse ( $c_{\text{end}}=0,1$   $\mu\text{M}$ ) gewonnen. Durch diese PCR wurde am 5`-Ende die kodierende Sequenz für die nächsten acht Aminosäuren des Glycin-Serin-Linkers, G-S-G-S-G-S-G-S, eingefügt und am 3`-Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle angefügt.

Die Sequenzen der Primer für den Glycin-Serin-Linker wurden so gewählt, dass sich diese jeweils an den Enden über einen Bereich von 12 Basen überlappen. Das hatte zum Vorteil, dass bei der darauf folgenden Kopplungs-PCR lediglich die beiden DNA-Teilstücke (jeweils  $c_{\text{end}}=0,4$   $\mu\text{M}$ ) eingesetzt werden mussten, denn sie dienten gleichzeitig als ihre eigenen Primer. Das Ergebnis dieser *overlapping*-PCR war dann die fertige cDNA für nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34), welches einen Glycin-Serin-Linker aus 12 Aminosäuren besitzt.



**Abb. II.1:** Schematische Darstellung der overlapping PCR zur Erzeugung der nPTHR2 kodierenden cDNA. Zunächst wurden in zwei PCR-Reaktionen (Schritt 1) zwei DNA-Teilstücke hergestellt. In einer zweiten PCR werden diese Teilstücke dann zum vollständigen DNA-Produkt zusammengefügt.

### **Quick change PCR:**

Diese Methode wurde bei der Herstellung der cDNA für das längere Linker-Konstrukt nPTH1-(GS)14-PTH(1-34) angewendet.

Hierfür wurden zunächst zwei Primer hergestellt, welche die zusätzlichen Basen enthielten, die in den Ausgangsvektor pET15bnPTH1-(GS)12-PTH1-34 eingefügt werden sollten. Das Annealing dieser Primer fand 15 Basen vor und nach dem einzufügenden DNA-Bereich statt.

Die PCR wurde nach einem Standard-PCR-Programm mit einer Annealing-Temperatur von 60,5 °C durchgeführt. Zu 400 ng des *templates* wurden jeweils 0,1 µM der beiden Primer eingesetzt.

Das Resultat der PCR war nun eine Mischpopulation aus dem neuen Zielvektor pET15bnPTH1-(GS)14-PTH1-34 und dem Ausgangsvektor. Der Ausgangsvektor liegt methyliert vor, da er zuvor aus *E. coli* präpariert wurde. So kann er durch die Zugabe der DNase DpnI verdaut werden, welche nur methylierte DNA prozessiert. Der DpnI-Verdau erfolgte unmittelbar nach der PCR durch die Zugabe von 1 µl DpnI (Stammlösung des Herstellers: 20.000 u/ml) zu einem 50 µl PCR-Ansatz. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 1 h bei 37 °C in einem Thermomixer (Eppendorf). Anschließend erfolgte sofort die Transformation von *E. coli* XLI mit 5 µl des PCR-Ansatzes.

## II.3 Expression, Reinigung

### II.3.1 Bakterienanzucht im Schüttelkolben

Die Hauptkultur wurde mit 1-2 % (v/v) aus einer Vorkultur inokuliert, zuvor wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Bei einer Expression in Gegenwart von Ampicillin empfiehlt es sich, die Über-Nacht-Vorkultur zunächst 15 min bei 5000 x g bei 4 °C zu zentrifugieren und das so gewonnene Zellpellet in frischem LB-Medium aufzunehmen. So kann man einen Eintrag von bereits gebildeter β-Lactamase in die Hauptkultur verhindern. Anschließend erfolgte dann das Animpfen der Hauptkultur wie beschrieben.

Die Hauptkultur wurde dann bei einer optischen Dichte 0,5 AU bis 1 AU bei 600 nm mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 h erfolgte die Zellernte mittels Zentrifugation, 15 min bei 5000 x g bei 4 °C.

### II.3.2 *Fed-batch* Fermentation

Die Fermentation der rekombinanten Proteine wurde in einem 10 Liter Biostat ED Bioreaktor nach Neubauer und Mitarbeiter (102) durchgeführt. Die Vorkultur wurde wie bei der Expression im Schüttelkolben in LB-Medium mit 2 x 100 ml hergestellt. Die Glycerinkultur für die Expression von nPTHr1 wurde von Dr. Ulla Grauschopf (28) angefertigt und mir für diese Arbeit von der AG Rudolph (Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt.

Die Fermentation erfolgte im 6 Liter Maßstab in Vollmedium bei 37 °C. Nach der Inokulation erfolgte die Kultivierung der entsprechenden *E. coli* Stämme mit Hilfe des Kaskaden-Modus des Fermenters.

Bei einer optischen Dichte von 10 – 15 AU bei 600 nm erfolgte der *feeding*-Start, da die Glukose aus dem vorgelegten Medium verbraucht war. Die Bakterien wurden bis zu einer optischen Dichte von 40 – 60 AU bei 600 nm kultiviert, danach erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG. 3 h nach der Induktion erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (20 min, 6000 x g, 4 °C).

### II.3.3 Präparation und Reinigung

Alle in dieser verwendeten Proteine wurden in *E. coli* unlöslich als *inclusion bodies* exprimiert. Die Präparation und Solubilisierung der Zielproteine erfolgte nach der Methode von Rudolph et al., (103). Die Reinigung aller hier beschriebenen GPCR-Domänen erfolgte nach einem Protokoll von Grauschopf et al. (28). Es wurden jedoch einige Anpassungen vorgenommen, welche im Ergebnisteil beschrieben werden. Die Abfolge der einzelnen Reinigungsschritte wurde jedoch immer beibehalten (siehe Abb.II.2).

Eine wesentliche Erweiterung des Protokolls bestand in der Einführung eines zusätzlichen Reinigungsschrittes zur Entfernung des His-tags. Zwischen dem His-tag und dem Zielprotein befindet sich im Vektor pET15b eine Thrombin-Schnittstelle. Der Thrombin-Verdau wurde nach der Reinigung des Proteins über hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) über einen Zeitraum von 16 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die

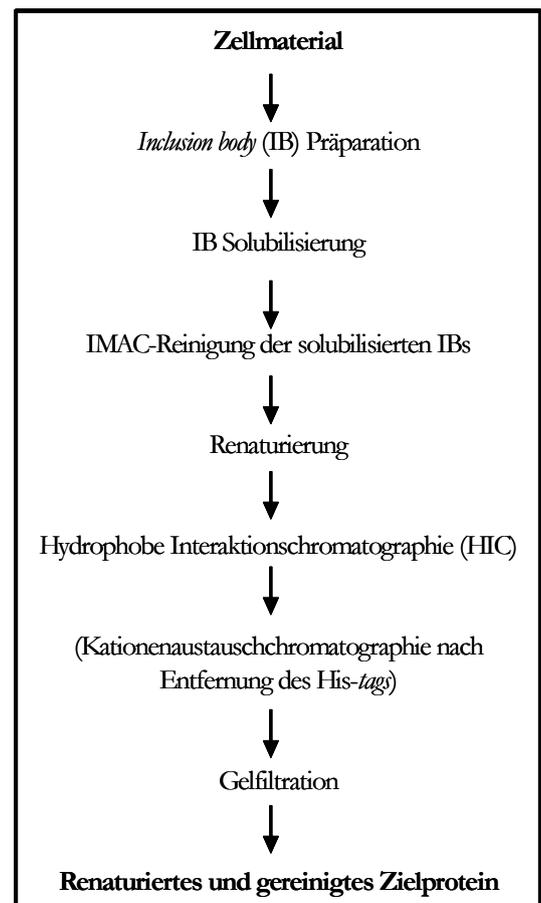


Abb. II.2: Schematische Darstellung der Präparation und Reinigung der N-terminalen GPCR-Domänen

## II Material und Methoden: Parathormon-Rezeptordomänen

---

Konzentration an Thrombin betrug dabei 0.1 unit pro mg Zielprotein. Der Verdau konnte anschließend durch die Zugabe von 1 mM PMSF gestoppt werden. Da der Protease-Verdau jedoch niemals vollständig ist, wurde im Anschluss eine Kationenaustausch-Chromatographie (SP Sepharose Fast Flow) durchgeführt, um so die Spezies zu trennen. Das Protein ohne His-tag befand sich bei den gewählten Pufferbedingungen im Durchlauf. Das Protein mit His-tag konnte, aufgrund der höheren positiven Ladung, welche durch den His-tag vermittelt wird, an der Säule gebunden werden. Nach dem Spülen der Säule zur Gewinnung des gespaltenen Proteins konnte das ungespaltene Protein mit einem Hochsalzpuffer eluiert werden, um so die Säule zu regenerieren.

### Inclusion body –Präparation:

Die Zellen wurden zunächst in Puffer I mit einem Ultraturax Homogenisator (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.) resuspendiert. Anschließend wurden pro Gramm Zellen 2 mg Lysozym unter starkem Rühren zugegeben. Als günstig erwies sich die Zugabe von etwa 5 µg Benzonase während dieses Schrittes, um die Zähigkeit der Lösung etwas zu verringern. Nach einer Inkubationszeit von 30 bis 40 Minuten erfolgt der Zellaufschluss mittels Hochdruckdispersion (großer Gaulin Homogenisator, APV Schröder). Zu den aufgeschlossenen Zellen wurden nun 3 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 - 20 µg Benzonase hinzugegeben. Der Ansatz wurde anschließend 40 - 60 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren inkubiert. Nach dem DNA-Verdau erfolgt die Zugabe von 0,5 Volumenanteilen Triton-Puffer, um Zellmembran-Bestandteile zu lösen. Die unlöslichen Inclusion bodies wurden anschließend durch Zentrifugation des Ansatzes bei maximal möglicher Drehzahl vom löslichen Anteil des Zellaufschlusses abgetrennt. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit einem 1:3 Gemisch aus Triton-Puffer und Waschpuffer. Danach folgten nochmals zwei Waschschrte mit Waschpuffer ohne Triton-Zugabe. Die so erhaltenen IBs konnten bei -20 °C gelagert werden. Das Pellet wurde bei den einzelnen Waschschrte wieder mit Hilfe des Ultraturax Homogenisators im jeweiligen Puffer resuspendiert.

### Puffer für die IB-Präparation aller hier verwendeten Rezeptordomänen und Linker-Konstrukte:

Puffer I: 0,1 M Tris/HCl pH 8,0  
1 mM EDTA

Triton-Puffer: 60 mM EDTA pH 7,0  
6 % Triton X-100  
1,5 M NaCl

## II Material und Methoden: Parathormon-Rezeptordomänen

---

Waschpuffer: 0,1 M Tris/HCl pH 7,0  
20 mM EDTA

### Solubilisierung von *Inclusion bodies*:

Zur Solubilisierung der IBs wurden diese zunächst in Solubilisierungs-Puffer mit Hilfe des Ultraturrax Homogenisators resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde der pH in einen sauren Bereich abgesenkt, um so das erneute oxidieren der Disulfidbrücken zu verhindern. Anschließend wurden die solubilisierten IBs gegen den IB-Dialysepuffer dialysiert, bis sämtliches DTT aus der Lösung entfernt wurde.

### Puffer zur Solubilisierung aller hier verwendeten Rezeptordomänen und Linker-Konstrukte:

IB-Solubilisierungs-Puffer 6 M Guanidiniumhydrochlorid  
0,1 M Tris/HCl pH 8,0  
1 mM EDTA  
100 mM DTT (frisch zugegeben)

IB-Dialysepuffer für nPTH1 und dessen Linker-Konstrukte: 4 M Guanidiniumhydrochlorid  
pH 2,5

IB-Dialysepuffer für nPTH2: 5 M Guanidiniumhydrochlorid pH 4,5

### Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC):

Zur Bindung des IB-Solubilisats an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose wurde dessen pH-Wert zunächst mit 10 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Das mit Ni-Auftragspuffer äquilibrierte Säulenmaterial wurde daraufhin mit der Proteinlösung bis zur Höchstgrenze der Bindekapazität beladen. Nach der Bindung des Proteins wurden unspezifisch gebundene Proteine mit dem Ni-Waschpuffer entfernt. Die Elution des Proteins erfolgte durch eine pH-Absenkung mit Ni-Elutionspuffer. Das Eluat wurde zur Vorbereitung der Rückfaltung mit 10 mM EDTA versetzt, um mit eluiertes Nickel zu komplexieren, und anschließend wurde der pH-Wert wieder in den sauren Bereich abgesenkt. Das Protein wurde dann gegen 500 Volumina des IB-Dialysepuffers dialysiert.

## II Material und Methoden: Parathormon-Rezeptordomänen

---

### Ni-Puffer für nPTHR1 und dessen Linker-Konstrukte:

Ni-Auftragspuffer	4 M Guanidinhydrochlorid 100 mM Tris/HCl pH 8,0
Ni-Waschpuffer	4 M Guanidinhydrochlorid 100 mM Tris/HCl pH 6,3
Ni-Elutionspuffer	4M Guanidinhydrochlorid 100 mM Tris / Acetat pH 4,5

### Ni-Puffer für nPTHR2:

Ni-Auftragspuffer	5 M Guanidinhydrochlorid 100 mM Tris/HCl pH 8,0
Ni-Waschpuffer	5 M Guanidinhydrochlorid 100 mM Tris/HCl pH 6,3
Ni-Elutionspuffer	5 M Guanidinhydrochlorid 100 mM Tris / Acetat pH 4,5

### Pulsrenaturierung durch schnelle Verdünnung:

Die solubilisierten und gereinigten IBs wurden in mehreren Pulsen sehr schnell im Renaturierungspuffer verdünnt. Die Rückfaltung wurde in einem 2 L Inkubator mit programmierbarer Rührung und Probenpumpe bei konstanten 4 °C durchgeführt. Dabei sollten pro Puls maximal 50 µg /ml Protein zugegeben werden. Die Pulse erfolgten alle 6 Stunden. Die Endkonzentration an Protein betrug maximal 0,2 mg / ml und die maximale Konzentration an Guanidinhydrochlorid 0,1 M. Der Rückfaltungsansatzes nach dem letzten Puls für weitere 4 Tage inkubiert.

<u>Renaturierungspuffer nPTHR1 und dessen Linker-Konstrukte:</u>	50 mM Tris/HCl pH 8,0 1 M L-Arginin 1 mM EDTA 5 mM GSH 1 mM GSSG
--	--

## II Material und Methoden: Parathormon-Rezeptordomänen

---

<u>Renaturierungspuffer nPTHr2:</u>	50 mM Tris/HCl	pH 8,0
	1 M L-Arginin	
	1 mM Brij-78	
	1 mM EDTA	
	5 mM GSH	
	1 mM GSSG	

Der Puffer wurde gründlich entgast. Das Redoxshuffling-System, bestehend aus GSH und GSSG, wurde stets kurz vor dem ersten Puls zu dem Renaturierungsansatz hinzugegeben. Die beiden Komponenten wurden vorher getrennt in Renaturierungspuffer gelöst, der korrekte pH-Wert wurde mit Hilfe von pH-Stäbchen mittels HCl und NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

### Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Zur Aufreinigung des renaturierten Proteins wurde der Rückfaltungsansatz zunächst auf 100 – 150 ml mit Hilfe einer ViVa-Flow-Anlage (Pumpe: Masterflex L/S<sup>TM</sup> und *easy-load*-Zubehör, Cole Parmer; Membran: VIVA FLOW 200, 5.000 MWCO, PES, VIVA Science) konzentriert. Anschließend erfolgte die schrittweise Zugabe von 1 M Ammoniumsulfat für die Bindung an das HIC-Säulenmaterial. Des Weiteren wurden durch diesen Schritt einige Verunreinigungen sowie fehlgefaltetes Protein ausgefällt. Nach 40 Minuten Inkubation auf Eis wurde ausgefallenes Protein mittels Zentrifugation (20 min; 30 000 x g; 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde bei einer Flussrate von 1 - 4 ml/min auf eine mit 10 Säulenvolumina des HIC-Auftragungspuffers äquilibrierte 10 ml Phenyl-Sepharose-Chromatographiesäule geladen. Nach dem Waschen der Säule mit HIC-Auftragungspuffer bis zum Absinken der UV-Absorption bei 280 nm auf ca. 0 - 1 mAU wurde das renaturierte Protein mit Hilfe des HIC-Elutionspuffers ohne Gradient in 5 ml Fraktionen eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und vor der weiteren Aufreinigung durch die Zugabe von 1 mM PMSF vor Proteasen geschützt. Das zumeist stark verdünnte Eluat wurde anschließend zur Stabilisierung mit 300 mM Ammoniumsulfat versetzt und je nach Volumen mit Hilfe der ViVa-Flow-Anlage (Masterflex L/S<sup>TM</sup> und *easy-load*-Zubehör, Cole Parmer; Membran: VIVA FLOW 200, 5.000 MWCO, PES, VIVA Science) oder mittels Amicons (Amicon Ultra-15, MWCO 5 kD, Millipore) auf 1 - 2 mg/ml konzentriert.

### HIC-Puffer:

HIC-Auftragungspuffer	50 mM Tris/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	pH 8,0
	1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	

## II Material und Methoden: Parathormon-Rezeptordomänen

---

HIC-Elutionspuffer 50 mM Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 8,0

### Präparative Gelfiltration

Letzte Verunreinigungen in der Proteinlösung wurden durch Größenausschlußchromatographie an einer Superdex 75 prep grade-Säule (je nach Proteinmenge 26/60 oder 16/60) entfernt. Dazu wurden 4 ml (Superdex 75 prep grade 16/60) bzw. 11 ml (Superdex 75 prep grade 26/60) des Eluats der HIC-Reinigung auf die in 2 Volumina Laufpuffer äquilibrierte Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min (Superdex 75 prep grade 16/60) bzw. 3,5 ml/min (Superdex 75 prep grade 26/60) aufgetragen. Der Säulendurchlauf wurde in 5 ml Fraktionen gesammelt. Die Proteinfractionen wurden vereinigt und wiederholt mit 1 mM PMSF versetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

### Gelfiltrations-Laufpuffer:

50 mM Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 8,0

300 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## II.4 Biophysikalische und strukturelle Charakterisierung

### II.4.1 Analytische Ultrazentrifugation

Sedimentationsgleichgewichtsläufe von nPTH1-GS12-PTH(1-34) und nPTH1-GS14-PTH(1-34) wurden in einer Optima XL-A Ultrazentrifuge (Beckman Instruments, USA) durchgeführt. Es wurden Doppelsektorzellen bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 20.000 rpm bei 20 °C in einem An60Ti-Rotor verwendet. Die verwendeten Proteinkonzentrationen und Pufferbedingungen sind im entsprechenden Abschnitt im Ergebnisteil angegeben. Die experimentellen Daten wurden mit Hilfe eines von A. Minton entwickelten Programms analysiert (104). Die Messungen und die Auswertung der Daten wurden von PD Dr. Hauke Lilie vom Institut für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

### II.4.2 Circular dichroismus

Die Fern-UV CD-Spektren wurden an einem Aviv 62A DS Spektropolarimeter (Aviv) in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,02 cm aufgenommen.

Die Proteinproben wurden zunächst im Lagerpuffer auf 0,5 mM konzentriert und anschließend entweder im Lagerpuffer oder einem denaturierenden Puffer bestehend aus 6 M Guanidinium-

## II Material und Methoden: Parathormon-Rezeptordomänen

---

chlorid; 0.1 M Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8.0 auf die im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen verdünnte. Für die Aufnahme der Spektren des denaturierten Proteins, wurde dieses jeweils 10 - 15 min nach der Verdünnung in dem denaturierenden Puffer bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Entfaltung zu erreichen.

Die Spektren wurden mit einer Integrationszeit von 1 s und 0,1 nm Bandbreite 10-fach akkumuliert und bei Raumtemperatur aufgenommen. Nach Abzug des Puffersignals wurde die gemessene Elliptizität  $\Theta$  in mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest  $\Theta_{\text{MRW}}$  mit Hilfe der folgenden Gleichung umgerechnet (105):

$$\Theta_{\text{MRW}} = \frac{(\Theta \cdot 100 \cdot M_{\text{W}})}{(d \cdot c \cdot n_{\text{AS}})}$$

- $\Theta$ : gemessene Elliptizität in Grad
- $M_{\text{W}}$ : Molekularmasse in Dalton
- $d$ : Schichtdicke der Küvette in cm
- $c$ : Konzentration des Proteins in mg / ml
- $n_{\text{AS}}$ : Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül

### II.4.3 *Differential Scanning-Kalorimetrie (DSC)*

Änderungen der Wärmekapazität von Proteinlösungen in Abhängigkeit der Temperatur wurden in einem VP-DSC Mikrokolorimeter (MicroCal, Inc.) gemessen. Die gereinigten und rückgefalteten Proteine wurden zunächst auf ca. 30  $\mu\text{M}$  verdünnt, gegen einen Puffer mit dem entsprechenden pH-Wert dialysiert und anschließend 30 min bei 60.000 rpm in einer Ultrazentrifuge (Optima TLX, Beckman, USA; Rotor: TLA 100.3) zentrifugiert, um sämtliche bei der Dialyse entstandenen Aggregate zu entfernen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration im Überstand spektrometrisch bestimmt.

Die Referenzzelle wurde luftblasenfrei mit Puffer befüllt. Die Proteinlösungen wurden entgast und für 15 min auf 10 °C bzw. 20 °C äquilibriert, die Aufheizrate betrug 90 °C/h. Die Messungen erfolgten in einem Temperaturbereich von 10 °C bzw. 20 °C bis 85 °C. Die Schmelzkurven wurden mit Hilfe der Programme MicroCal Origin für DSC für DSC Version 4.1 (MicroCal Software Incorporaton) und SigmaPlot Version 8.0 (Jandel Scientific Software) ausgewertet.

#### DSC-Puffer:

- pH 7,0: 0.05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  / NaOH
- 150 mM NaCl

pH 6,5: 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> /NaOH  
178 mM NaCl

pH 6,0: 0,05 M Na-Citrat / NaOH  
10 mM NaCl

pH 5,5: 0,05 M Na-Citrat / NaOH  
52 mM NaCl

pH 5,0: 0,05 M Acetat / NaOH  
228 mM NaCl

### II.4.4 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Kalorimetrische Titrations wurden an einem MicroCal MCS Titrationskalorimeter (MicroCal) durchgeführt. Die Datenauswertung fand mit Hilfe von MicroCal Origin für ITC Version 2.9 statt.

Das gereinigte und rückgefaltete Protein und auch das in Lagerpuffer gelöste PTH(1-37)-Peptid wurden zunächst auf die gewünschte Konzentration verdünnt und nochmals gegen Lagerpuffer dialysiert. So konnte sicher gestellt werden, dass das Protein und der Ligand PTH(1-37) unter exakt den selben Pufferbedingungen vorlagen. Anschließend wurden Protein und Ligand zur Entfernung entstandener Aggregate 30 min bei 60.000 rpm in einer Ultrazentrifuge (Optima TLX, Beckman, USA; Rotor: TLA 100.3) zentrifugiert und danach die Proteinkonzentration im Überstand spektrometrisch bestimmt.

### II.4.5 Überprüfung der Löslichkeit von Proteinen in verschiedenen Puffern

Um Pufferbedingungen zu ermitteln, in denen die verwendeten Proteine in hohen Konzentrationen löslich blieben, wurden die Proteine zunächst im Lagerpuffer bis zur Löslichkeitsgrenze konzentriert. Anschließend wurden die Proteine gegen verschiedene Puffer-Lösungen dialysiert, um so einen geeigneten Puffer zu ermitteln, in welchem die Proteine löslich bleiben und welcher für die Kristallisation verwendbar ist. Zur Bestimmung der Löslichkeit der Proteine in den entsprechenden Puffern wurde das Protein nach der Dialyse zunächst 20 Minuten bei 70.000 rpm in einer Ultrazentrifuge (Optima TLX, Beckman, USA; Rotor: TLA 100.3) zentrifugiert und anschließend die Proteinkonzentration im Überstand spektrometrisch ermittelt. Entsprach die Proteinkonzentration vor der Dialyse ca. der nach der Zentrifugation, so

## II Material und Methoden: Parathormon-Rezeptordomänen

---

wurde der Puffer als geeignet eingeschätzt und für die Kristallisationsexperimente verwendet. Die verwendeten Proteinkonzentrationen und Pufferbedingungen sind in den entsprechenden Abschnitten im Ergebnisteil angegeben.

### II.4.6 Kristallisationsexperimente mit nPTH1R und nPTH1R-(GS)12-PTH(1-34)

Die gereinigten und nach SDS-PAGE homogenen Proteine nPTH1R und nPTH1R-(GS)12-PTH(1-34) wurden für Kristallisationsversuche verwendet. Es wurden *sitting drop*-Experimente mit Hilfe eines Pipettier-Roboters (Cartesian Honeybee, Zinsser Analytic + Cartesian Software) mit 96 well plates (CrystalQuick™, Standard Profile, Flat Bottom, Greiner) bei 15 °C mit folgenden Screening-Kits durchgeführt.

nPTH1R wurde außerdem in Gegenwart des Liganden PTH1-37 in den molaren Verhältnissen 1:1 und 1:5 nPTH1R zu PTH(1-37) für Kokristallisationsexperimente eingesetzt. Hierfür wurde nPTH1R nach der Gelfiltration im entsprechenden molaren Verhältnis mit dem Liganden gemischt. Für den 1:1 Komplex wurden die Rezeptordomäne und der Ligand mit einer Konzentration von jeweils 15 mM eingesetzt. Für den 1:5 Komplex wurden 8,33 mM nPTH1R mit 41,66 mM PTH(1-37) gemischt. Anschließend wurden die Komplexe in einer Konzentrationszelle (Stirred cell Model 8003, 3 ml, Millipore) mit einer Membran mit 1 kd *cut-off* ca. 3-fach konzentriert. Danach wurden die Protein-Peptid-Gemische gegen den Kristallisationspuffer dialysiert und anschließend bei 70000 rpm in der Ultrazentrifuge (Optima TLX, Beckman, USA; Rotor: TLA 100.3) zentrifugiert. Die jeweiligen Überstände wurden dann für die Kristallisation verwendet.

Zwei Kristallisationsbedingungen konnten für den 1:5 Komplex Proteinkristalle ermittelt werden. Deshalb wurden von diesen Bedingungen *hanging drop*-Ansätze im 24 well Maßstab angesetzt. Hierzu wurden für jede Pufferbedingung jeweils 12 wells mit 500 µl Reservoir und einem 8 µl Tropfen (4 µl Proteingemisch + 4 µl Puffer) angesetzt.

Kristallisationspuffer :            50 mM Tris/HCl    pH 8.0  
    20% (w/v) D-Sorbitol  
    6% (w/v) Methyl-β-Cyclodextrin  
    50 mM Ammoniumsulfat

## II Material und Methoden: Parathormon-Rezeptordomänen

---

### Kristallisation-Kits:

Name des Kits	Hersteller
Factorial solutions 1-96	AG Stubbs, MLU, Halle(Saale)
Crystal Screen 1 + 2	Hampton Research, USA
Crystallization Basic Kit for Proteins	Sigma, Schweiz
Crystallization Extension Kit for Proteins	Sigma, Schweiz
Crystallization Low Ionic Kit for Proteins	Sigma, Schweiz
Crystallization Cryo Kit for Proteins	Sigma, Schweiz
Crystallization Basic Kit for Membrane Proteins	Sigma, Schweiz
JBScreen Bulk 1-10	Jena Bioscience GmbH, Deutschland

### II.4.7 Röntgendiffraktionsanalyse

Die Kristalle aus dem 1:5-Gemisch nPTH1 : PTH(1-37) wurden aus dem Kristallisationspuffer (100 mM Na-Citrat pH 5.6, 10% (v/v) Isopropanol, 10% (w/v) PEG-4000) geerntet und in einem Kryopuffer aus 100 mM Na-Citrat pH 5.6, 10% (v/v) Isopropanol, 10% (w/v) PEG-4000, 5% (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend wurde der Kristall in einem *loop* auf dem Goniometerkopf eines Röntgendrehanodengenerators (Rigaku Micromax 007, Rigaku R-axis IV++ detector, Varimax HR optics + CrystalClear software, Rigaku, Japan) montiert und analysiert. Dazu wurde der Kristall monochromatischer CuK<sub>α</sub>-Röntgenstrahlung ( $\lambda = 1,54179 \text{ \AA}$ ) ausgesetzt. Dabei wurde der Kristall in einem Kristall-Detektor-Abstand von 130 mm um einen Winkel von  $720^\circ$  (Winkelschritte  $0.5^\circ$ ) senkrecht zur Einfallsrichtung der Röntgenstrahlen rotiert.

Auf diese Weise wurden 1440 Diffraktionsbilder aufgezeichnet. Die so erhaltenen Diffraktionsdaten wurden mit dem Programmen MOSFLM (106) und XDS (107) prozessiert.

Die Lösung der Struktur erfolgte mittels *Rigid body refinement* mit Hilfe des Programms Refmac5 aus dem CCP4-Programmpaket (108). Dazu wurde die Struktur des PTH(1-34) von Jin *et al.* (PDB-code: 1ET1 (54)) genutzt. Die anschließende Verfeinerung der Daten erfolgte mit den Programmen Refmac5 und Phenix (109), sowie Coot (110).

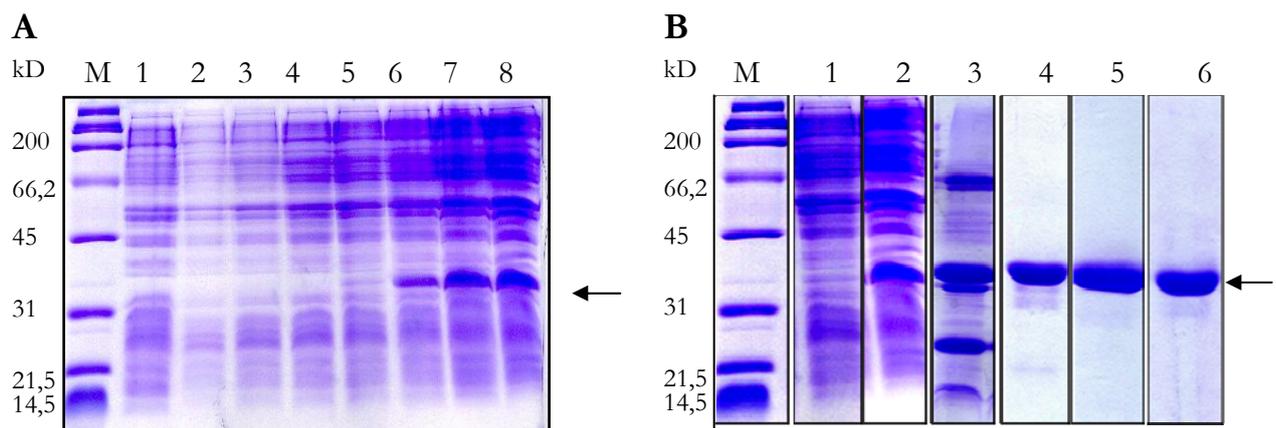
## III Ergebnisse

### III.1 Die Rezeptordomäne nPTHr1

#### III.1.1 Expression und Reinigung der N-terminalen Rezeptordomäne nPTHr1

Die N-terminale Domäne des PTHr1 wurde in einer 6 l *fed-batch* Fermentation exprimiert. Es konnten 780 g Zellen (Feuchtgewicht) geerntet werden. Die anschließende SDS-PAGE zeigt eine deutliche Überexpression eines Proteins mit dem erwarteten Molekulargewicht des nPTHr1.

Die Reinigung von nPTHr1 erfolgte nach dem Protokoll von Grauschopf et al. (28). Aus 1 l *E. coli*-Kultur konnten 45 mg zur Homogenität aufgereinigtes Protein gewonnen werden.



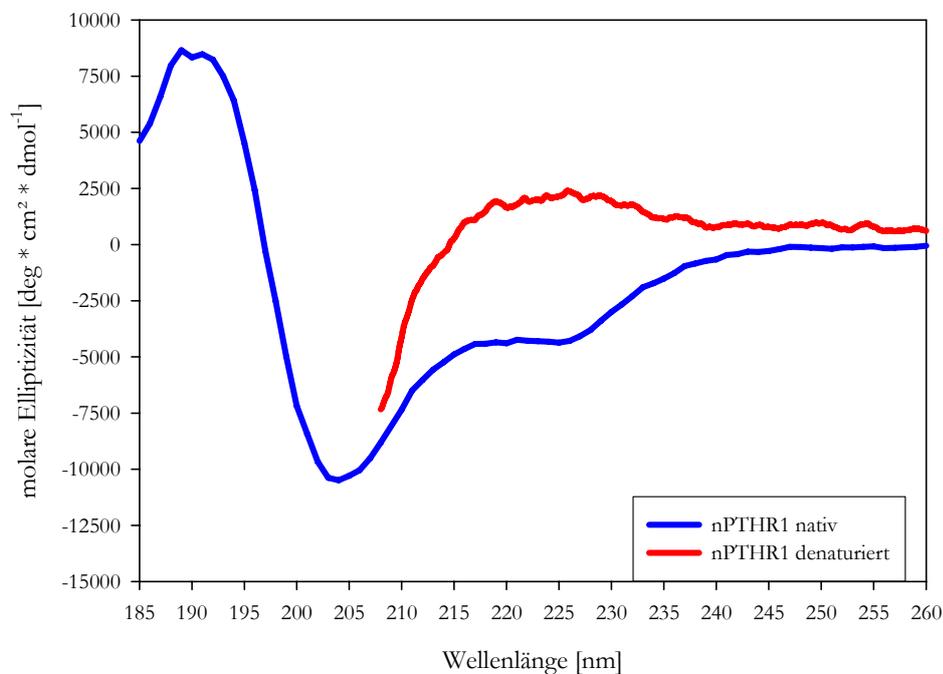
**Abb. III.1: Expression und Reinigung von nPTHr1.** **A Expression** 6 l Vollmedium wurden mit 400 ml Vorkultur von *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 pET15b nPTHr1 angeimpft und bei 35°C inkubiert. Vor und nach der Induktion mit 1 mM IPTG wurden zu den folgenden Zeitpunkten Proben entnommen: Bahnen 1-3: 1, 4 und 5 h vor Inokulation; Bahnen 4-8: 0, 15, 35, 70 und 90 min nach Induktion. **B Reinigung** Bahn 1 und 2 zeigen nochmals den Verlauf der Fermentation in *E. coli* BL21(DE3) Bahn 1: vor der Induktion mit IPTG und Bahn 2: 4 h nach Induktion, Bahn 3: Probe vom letzten Waschschrift der IB-Präparation; Bahn 4: Elution der Ni<sup>2+</sup>NTA der solubilisierten IBs; Bahn 5: Elutionsfraktion der Phenyl Sepharose nach der Renaturierung von nPTHr1; Bahn 6: Elutionsfraktion der Superdex 75 Gelfiltrationssäule. Das Protein konnte bis zur Homogenität gereinigt werden. M: Molekularmassenstandard. Der Pfeil markiert die erwartete Größe von nPTHr1.

#### III.1.2 Biophysikalische Charakterisierung

Zur näheren Charakterisierung des nPTHR1 wurden Circular dichroismus (CD), DSC- und ITC-Messungen durchgeführt. Die erhaltenen Daten bestätigten die Literaturdaten von nPTHR1 (28) und werden deshalb im Folgenden nur kurz zusammengefasst.

Zur Analyse der Sekundärstruktur von nPTHR1 wurden Fern-UV-Circular dichroismusspektren der rückgefalteten und gereinigten N-terminale Rezeptordomäne aufgenommen. Für beide Spektren, nativ und denaturiert, wurden 46  $\mu\text{M}$  Protein eingesetzt.

Eine quantitative Auswertung des Sekundärstrukturgehalts erfolgte mit dem Programm CDPro / CONTINLL. Durch Nutzung des Basissets contiLL SMP50 konnte ein  $\alpha$ -helikaler Anteil von ca. 20 % und ein  $\beta$ -sheet Anteil von ca. 24 % ermittelt werden.



**Abb. III.2: Fern-UV CD-Spektren von nPTHR1.** Die CD-Spektren von 46  $\mu\text{M}$  nPTHR1 jeweils in 50 mM Tris/HCl; 0,3 M Ammoniumsulfat; pH 8,0 (Spektrum des nativen nPTHR1, blau) oder 6 M Guanidiniumhydrochlorid; 0,1 M Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0 (Spektrum des denaturierten nPTHR1, rot) wurden in einer 0,02 cm Küvette, mit einer Integrationszeit von 1 s und einer Bandbreite von 0,1 nm bei 20 °C aufgenommen und jeweils 10-fach akkumuliert.

Mit Hilfe der isothermalen Titrationskalorimetrie wurde quantitativ die Bindung des freien Liganden PTH(1-37) an nPTHR1 gemessen werden.

27  $\mu\text{M}$  nPTHR1 wurden in der Messzelle vorgelegt und der Ligand PTH(1-37) ( $c = 348 \mu\text{M}$ ) wurde hinzutitriert. Die Auswertung der Messung ergab eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 3,8 \mu\text{M}$ , was den Literaturdaten sehr gut entspricht (28). Die Messung der ausgetauschten Wärmemenge erlaubt auch eine Bestimmung weiterer thermodynamischer Bindungsparameter

### III Ergebnisse: Parathormon-Rezeptordomänen

---

(111). So konnte die apparente Bindungsenthalpie  $\Delta H$  mit  $-17,86 \pm 0,2$  kJ/mol und die apparente Bindungsentropie  $\Delta S$  mit  $-36,2$  J/mol\*K bestimmt werden. Die Stöchiometrie der Bindung zeigte mit einem Wert von  $0,901 \pm 0,007$ , dass nahezu jedes Ligandenmolekül an ein Rezeptormolekül gebunden hat. Bei einer erwarteten 1:1 Stöchiometrie wurde somit gezeigt, dass das rückgefaltete nPTHR1 keine inaktiven Teilpopulationen enthält.

Um die thermische Stabilität und die Wärmekapazität der N-terminalen Domäne in Abhängigkeit von der Temperatur zu bestimmen, wurden kalorimetrische Untersuchungen mittels *Differential Scanning* Kalorimetrie (DSC) durchgeführt. Für die Bestimmung der Schmelztemperatur und weiterer thermodynamischer Daten, wie die Entfaltungsenthalpie  $\Delta H_U$  und die Wärmekapazitätsänderung  $\Delta C_p$ , wurde der Temperaturübergang des Proteins im Bereich 20 °C (293.15 K) bis 85 °C (358.15 K) bestimmt.

Zusätzlich zu den Versuchen von Grauschopf et al. (28), sollte außerdem untersucht werden, ob sich die Temperaturstabilität in Abhängigkeit vom pH-Wert ändert. Dafür wurden Messungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt.

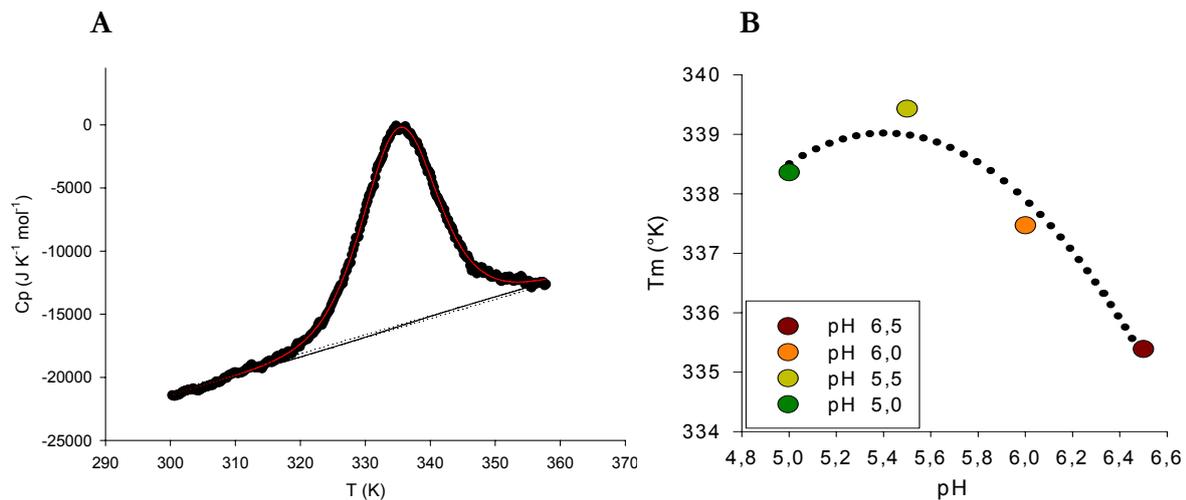
Die für die Messungen eingesetzten Proteinkonzentrationen für jeden pH-Wert sind in Tabelle III.1 aufgeführt.

Bei der Dialyse des Proteins gegen pH 7,0 wurden sehr viele Aggregate beobachtet, was sich auch in der geringen Konzentration nach der Ultrazentrifugation zeigt. Die DSC-Messung dieser Probe war daher sehr verrauscht und konnte deshalb nicht ausgewertet werden (Daten nicht gezeigt).

Bei den anderen pH-Werten waren alle Temperaturübergänge weitestgehend reversibel (Daten nicht gezeigt). Die Messung bei pH 6,5 hatte eine sehr gute Datenqualität (Abb. III.2 A). Die Auswertung dieser Messung ergab eine Entfaltungsenthalpie  $\Delta H_U$  von 242 kJ/mol und eine Wärmekapazitätsänderung  $\Delta C_p$  von 232 J/K\*mol bei einer Schmelztemperatur von 62,2 °C (335,4 K). Bei den pH-Werten 5,0 – 6,0 wurde ebenfalls die Schmelztemperaturen bestimmt und gegeneinander aufgetragen (Abb. III.3 B). Das Protein zeigte die höchste thermische Stabilität bei pH 5,5.

pH-Wert	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0
Proteinkonzentration	7,6 $\mu$ M	24,7 $\mu$ M	28,6 $\mu$ M	19,8 $\mu$ M	20,6 $\mu$ M

**Tab. III.1: Proteinkonzentration von nPTHR1** nach der Dialyse gegen den DSC-Puffer mit entsprechendem pH-Wert und Ultrazentrifugation (30 min, 60.000 rpm).



**Abb. III.3: Kalorimetrische Untersuchung der thermischen Stabilität von nPTHr1.** **A** Messung der molaren Wärmekapazität von nPTHr1 in 0,05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  /NaOH; 178 mM NaCl; pH 6,5 bei einer Aufheizrate von 90  $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ . Die Auswertung der Messung ergab ein  $\Delta H_U$  von 242 kJ/mol und ein  $\Delta C_p$  von 232  $\text{J}/\text{K}^*\text{mol}$  bei einer Schmelztemperatur von 62  $^{\circ}\text{C}$ . **B** Auftragung der Schmelztemperaturen ( $T_m$  in  $^{\circ}\text{C}$ ) von nPTHr1 in Abhängigkeit vom pH-Wert.

#### III.1.3 Optimierung der Löslichkeit

Die Kristallisationsansätze von nPTHr1 im Gelfiltrations-Laufpuffer ergaben unter allen zur Verfügung stehenden Kristallisationsbedingungen keine Proteinkristalle. Deshalb wurde nach anderen Pufferbedingungen gesucht, unter denen nPTHr1 stabil in hoher Konzentration löslich bleibt. Ziel war es außerdem eine möglichst geringe Salzkonzentration zu erreichen, um die Bildung von Salzkristallen zu verhindern. In Tabelle III.2 werden die verwendeten Pufferbedingungen, sowie die gemessenen Proteinkonzentrationen nach der Ultrazentrifugation aufgeführt.

Die Puffer Nr. 12 (20 mM Tris / HCl; 20 % D-Sorbitol; 6 % Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin; 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 8,0) und Nr. 13 (20 mM Tris / HCl; 20 % D-Sorbitol; 6 % Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin; 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 8,0) zeigten die besten Ergebnisse. Die Löslichkeit des Proteins ist mit der in dem Gelfiltration-Laufpuffer vergleichbar. Es konnte sogar während der Dialyse eine Konzentrierung des Proteins erreicht werden. Da einer der Gründe für die Suche eines neuen Puffers die Verringerung der Salzkonzentration in der Proteinlösung gewesen ist, wurde für alle weiteren Kristallisationsversuche Puffer Nr. 12 bei pH 8,0 verwendet.

### III Ergebnisse: Parathormon-Rezeptordomänen

	Puffer	C <sub>nPTHR1</sub> nach UZ-Lauf		Puffer	C <sub>nPTHR1</sub> nach UZ-Lauf	
1	20 mM Tris/HCl 5 % Glycerol	0,09 mg/ml	8	20 mM Tris / HCl 20 % D-Sorbitol 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,7 mg/ml	
2	20 mM Tris/HCl 10 % Glycerol	0,06 mg/ml	9	20 mM Tris / HCl 10 % D-Sorbitol 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4 mg/ml	
3	20 mM Tris/HCl 20 % Glycerol	0,21 mg/ml	10	20 mM Tris / HCl 6 % Methyl-β-Cyclodextrin	pH 7,0 0,73 mg/ml	pH 8,0 1 mg /ml
4	20 mM Tris/HCl 50 % Glycerol	0,41 mg/ml	11	20 mM Tris / HCl 20 % D-Sorbitol 6 % Methyl-β-Cyclodextrin	pH 7,0 1,83 mg/ml	pH 8,0 2,64 mg/ml
5	20 mM Tris/HCl 30 % D-Sorbitol	0,41 mg/ml	12	20 mM Tris / HCl 20 % D-Sorbitol 6 % Methyl-β-Cyclodextrin 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	pH 7,0 2,62 mg/ml	pH 8,0 5,82 mg/ml
6	20 mM Tris/HCl 30 % D-Sorbitol 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,13 mg/ml	13	20 mM Tris pH 7/8 20 % D-sorbitol 6 % Methyl-β-Cyclodextrin 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	pH 7,0 7,05 mg/ml	pH 8,0 5,68 mg/ml
7	20 mM Tris / HCl 30 % D-Sorbitol 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,5 mg/ml				

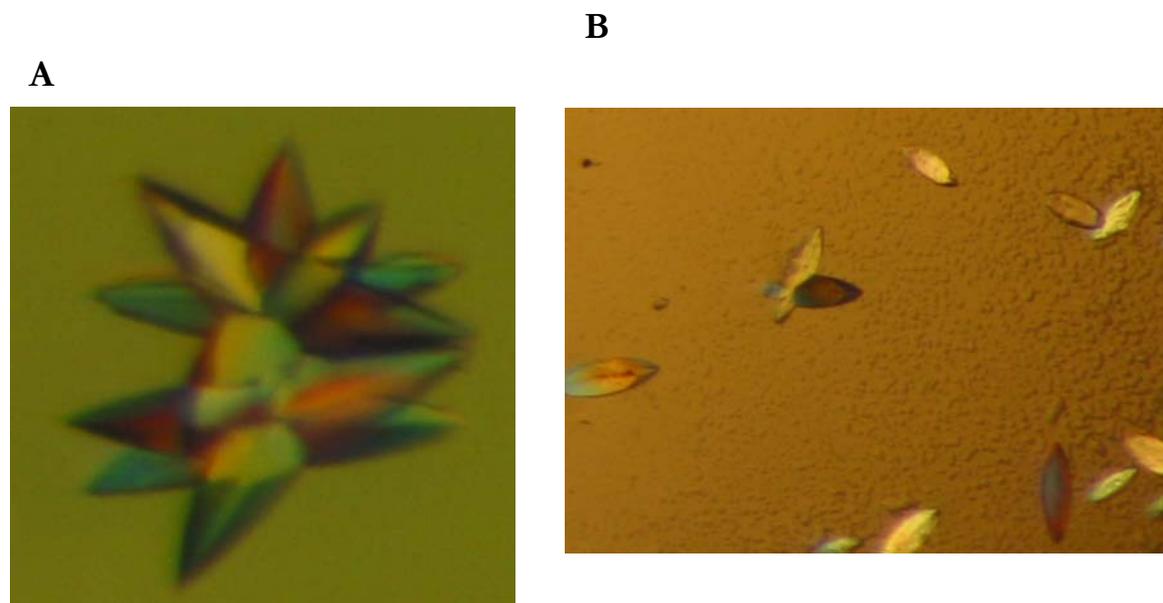
**Tab. III.2: Test von Pufferbedingungen zur Optimierung der Löslichkeit von nPTHR1.** nPTHR1 wurde zunächst im Gelfiltrations-Laufpuffer auf 5 mg/ml konzentriert und anschließend gegen die aufgeführten Puffer dialysiert. Vor der Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Dialyse wurden Aggregate mittels Ultrazentrifugation entfernt. Von einigen Pufferbedingungen wurden verschiedene pH-Werte getestet (geteilte Spalten).

#### III.1.4 Kokristallisationsexperimente von nPTH<sub>R1</sub> in Gegenwart von PTH(1-37)

Während des Kokristallisationsexperiment konnten unter zwei Kristallisationsbedingungen (100 mM Na-HEPES pH 7,5; 10 % (v/v) 2-Propanol; 20 % (w/v) PEG-4000 und 100 mM Na-Citrat pH 5,6; 10 % (v/v) 2-Propanol; 10 % (w/v) PEG-4000) für den 1:5 Komplex Proteinkristalle beobachtet werden. Deshalb wurden von diesen Bedingungen *hanging drop*-Ansätze im 24-well Maßstab angesetzt. Hierzu wurden für jede Pufferbedingung jeweils 12 wells mit 500 µl Reservoir und einem 8 µl Tropfen (4 µl Proteingemisch + 4 µl Puffer) angesetzt. In beiden Fällen konnten wiederum Kristalle erzeugt werden.

Abbildung III.4 zeigt die erhaltenen Kristalle. Zum Teil waren mehrere Kristalle miteinander zu sternartigen Gebilden verwachsen, wie in Abbildung III.4 A sehr gut zu sehen ist. Einer der Einzelkristalle von Abbildung III.4 B wurde für die Röntgendiffraktionsmessungen verwendet.

Nach einer ersten Messung wurde allerdings durch die ermittelte Größe der Einheitszelle festgestellt, dass die Kristalle lediglich den Liganden PTH(1-37) nicht aber die Rezeptordomäne nPTH<sub>R1</sub> enthielten. Auch die ermittelte Raumgruppe  $P6_3$  wies darauf hin, dass lediglich der Ligand im Kristall enthalten war, der Kristall von PTH(1-34) von Jin et al., 2000 (54) wies exakt die gleiche Raumgruppe und Kristallform auf.



**Abb. III.4: PTH(1-37) Kristalle.** Die abgebildeten Kristalle wurden in Gegenwart von 100 mM Na-Citrat pH 5,6; 10 % (v/v) 2-Propanol; 10 % (w/v) PEG-4000 im 24-well Maßstab mit einer Tropfengröße von 8 µl (4 µl Proteinlösung + 4 µl Puffer) erhalten. Die Proteinlösung bestand aus einem Gemisch aus nPTH<sub>R1</sub> und PTH(1-37) im molaren Verhältnis 1:5.

**A** verwachsene sternförmige Kristalle, ungeeignet für die Röntgendiffraktionsanalyse.

**B** Einzelkristalle, wovon ein Kristall für die Röntgendiffraktionsanalyse verwendet wurde.

#### III.1.5 Lösung der Kristallstruktur

Die Lösung der Struktur erfolgte mittels *rigid body refinement* mit Hilfe des Programms Refmac5 aus dem CCP4-Programmpaket (108). Dazu wurde die Struktur des PTH(1-34) (PDB-Code: 1ET1 (54)) genutzt, da die Kristalle isomorph dazu sind. Die anschließende Verfeinerung der Daten erfolgte mit den Programmen Refmac5 und Phenix (109), sowie Coot(110). Tabelle III.3 zeigt die wichtigsten Parameter der ausgewerteten Daten.

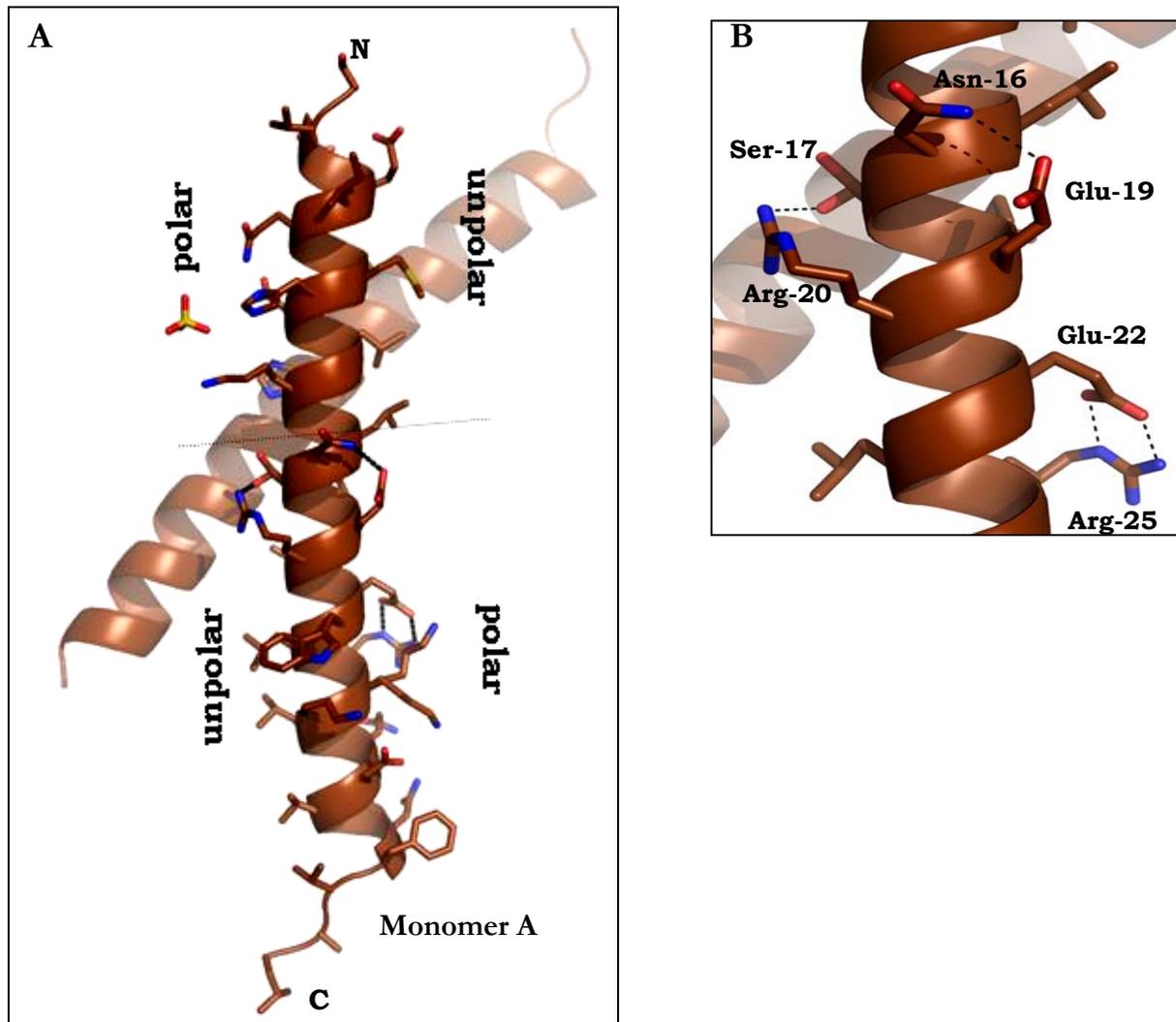
<b>Datensammlung</b>	
Raumgruppe	P6 <sub>5</sub>
Einheitszelle a, b, c (Å)	29,88 29,88 108,46
$\alpha, \beta, \gamma$	90°, 90°, 120°
Auflösung (Å)	30 – 2,2 (2,3 – 2,2)
Vollständigkeit/completeness (%)	99,6 (99,4)
Anzahl der Reflektionen	
gesamte Anzahl der Reflektionen	89821 (11375)
einmalige Reflektionen	2816 (351)
Redundanz	31 (32)
Rmerge	18,0 (46,8)
I / $\sigma$ I	21,0 (9,2)
Wilson B-Faktor	20,9
<b>Refinement</b>	
Auflösung (Å)	25,17 - 2,2
Rwork (%)	17,4
Rfree (%)	23,5
durchschnittlicher B-Faktor	30,7
RMS Abweichung vom Ideal	
Bindungslänge (Å)	0,018
Bindungswinkel (°)	1,65

**Tab. III.3: Datensammlungs- und Refinement-Statistiken des Kristalls von PTH(1-37):** Der Datensatz wurde mit einem Einzelkristall aufgenommen. In Klammern wurden die Werte der äußersten Auflösungsschale angegeben.

Das Peptid PTH1-37 kristallisierte mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit in der Raumgruppe P6<sub>5</sub>. Die Gesamtstruktur des Peptids zeigt, wie in der Literatur (54) beschrieben, eine leicht geknickte Helix, die Reste 35-37 liegen in keiner regelmäßigen Konformation vor. Der

### III Ergebnisse: Parathormon-Rezeptordomänen

Knick der Helix befindet sich zwischen den Resten Glycin 12 und Valin 21. Wie auch bei Jin et al. formen die Termini des Peptids zwei amphiphile Helices bei denen die polaren Seitenketten an der jeweils entgegengesetzten Seite der Helix lokalisiert sind. Die vorliegende Struktur und auch die Literaturdaten weisen auf eine Stabilisierung der Helix über die Ausbildung einer Salzbrücke und zweier Wasserstoffbrückenbindungen hin, wie in Abb. III.5 gezeigt.

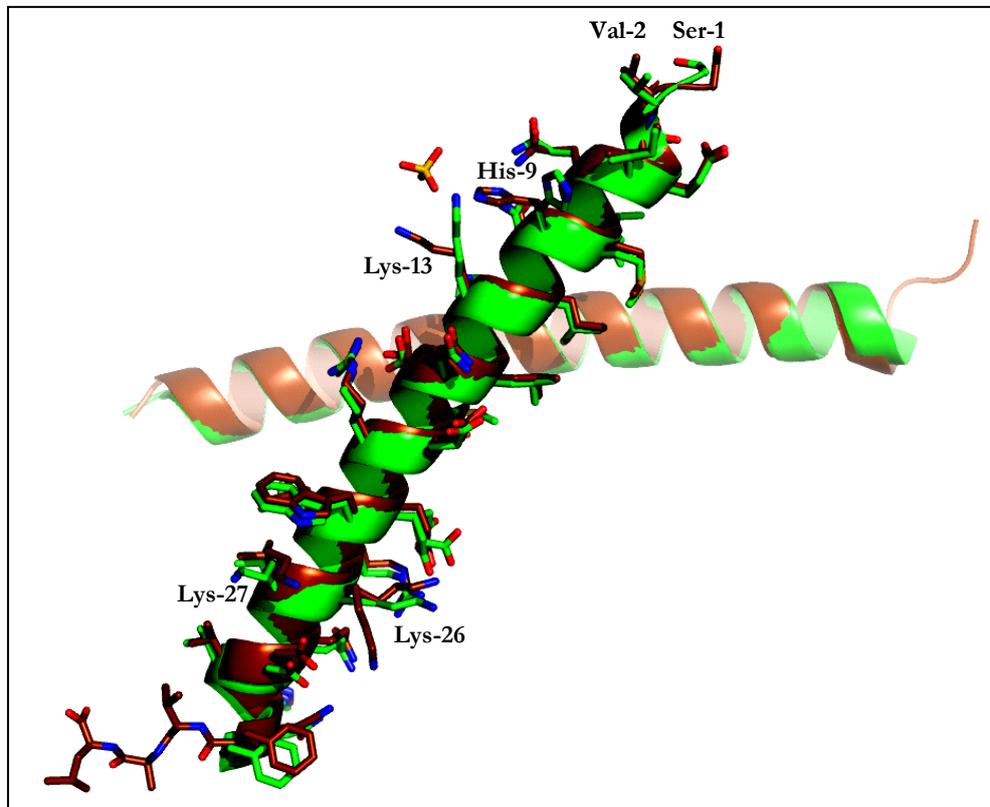


**Abb III.5: Kristallstruktur von PTH(1-37).** **A Überblick der Gesamtstruktur.** im Vordergrund: PTH(1-37) bildet eine geknickte Helix, welche aus zwei entgegengesetzt geladenen Teilhelices besteht. Die Trennung der beiden Teilbereiche ist mit der gestrichelten Linie gekennzeichnet. Im Hintergrund: PTH(1-37) kristallisierte mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit. **B Stabilisierung der Helix.** Die Helix des Peptids wird durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen Asn-16 und Glu-19, Ser-17 und Arg-20 und einer Salzbrücke zwischen Glu-22 und Arg-25 stabilisiert (gepunktete Linie). Ser-17 zeigt zwei alternative Konformationen.

Wie Abbildung III.6 zeigt, hatte das Peptidrückgrat der beiden Monomere A und B den exakt gleichen Verlauf wie PTH(1-34) bei Jin et al. (54). Ein Unterschied besteht lediglich in der Konformation einzelner Seitenketten. Die Seitenketten von Ser-1, Val-2, His-9, Lys-13, Lys-26

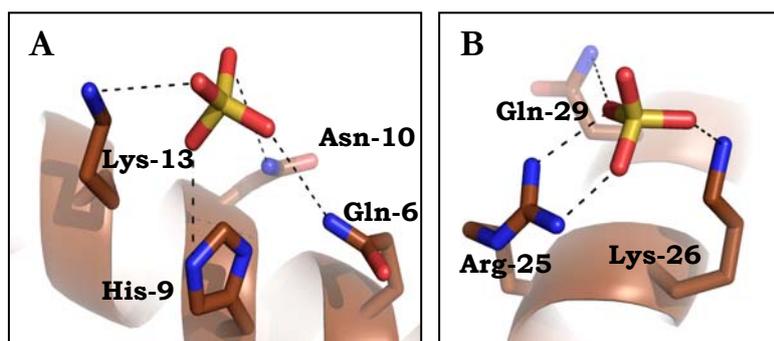
### III Ergebnisse: Parathormon-Rezeptordomänen

und Lys-27 weisen unterschiedliche Orientierungen auf. Für einige Aminosäuren wurden alternative Konformationen gefunden (Monomer A: Ser-3, Ser-17 und Lys-26; Monomer B: Ile-5 und Lys-27).



**Abb. III. 6: Alignment der Kristallstrukturen von PTH(1-37) und PTH(1-34) von Jin et al.** Die Kristalle beider Peptide waren isomorph und zeigten zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Das Peptidrückgrat nimmt denselben Verlauf, Aminosäuren mit unterschiedlicher Konformation wurden benannt. braun: PTH(1-37); grün: PTH(1-34) (PDB-Code: 1ET1, Jin et al.)

In beiden Peptiden der asymmetrischen Einheit der PTH(1-37)-Struktur ist jeweils ein Sulfation koordiniert, welches aus dem Kristallisations-Puffer stammt. In Monomer A wird das Ion durch die N-terminal gelegenen Aminosäuren Histidin-9, Glutamin-6, Asparagin-10 und Lysin-13 koordiniert. In Monomer B wird ein zweites Sulfation durch die C-terminal gelegenen Reste Arginin-25, Lysin-26 und Glutamin-29 koordiniert.



**Abb. III.7: Koordinierung zweier Sulfationen in beiden PTH(1-37)-Monomeren.** **A** Gln-6, His-9, Asn-10 und Lys-13 des Monomers A koordinieren ein Sulfation. **B** Arg-25, Lys-26 und Gln-29 des Monomers B koordinieren ein zweites Sulfation.

## III.2 Die Fusionskonstrukte nP<sup>THR</sup>1-(GS)<sub>12</sub>-PTH(1-34) und nP<sup>THR</sup>1-(GS)<sub>14</sub>-PTH(1-34)

Da in vorangegangenen Kristallisations- und Kokristallisationsversuchen lediglich der Ligand kristallisierte, wurde zum Erhalt der Kristallstruktur des Rezeptor-Ligand-Komplexes eine neue Strategie entwickelt. Nach dem Vorbild von Bazarsuren (99) wurden Rezeptor-Linker-Ligand-Konstrukte hergestellt, bei denen an den C-Terminus der Rezeptordomäne ein flexibler Glycin-Serin-Linker und anschließend der Ligand PTH(1-34) angefügt wurden. Auf diese Art und Weise sollten stabile 1:1 Rezeptor-Ligand-Komplexe entstehen, welche zur Kristallisation verwendet werden können. Da die Länge des verwendeten Linkers Einfluss auf die Stabilität des Konstruktes haben kann, wurden zwei verschiedene Linker-Längen verwendet und hinsichtlich ihrer Stabilität und somit Eignung für die Kristallisation verglichen. Abbildung III.8 zeigt die Sequenz des kürzeren Linker-Konstruktes nP<sup>THR</sup>1-(GS)<sub>12</sub>-PTH(1-34). Daraus wird die Beschaffenheit des Linkers ersichtlich. Um eine höchst mögliche Flexibilität zu erreichen, wurden immer abwechselnd Glycine und Serine aneinander gefügt. Bei dem längeren Linker-Konstrukt nP<sup>THR</sup>1-(GS)<sub>14</sub>-PTH(1-34) wurden jeweils ein zusätzliches Glycin und Serin eingefügt.

```
SHMYALVDADDVMTKEEQIFLLHRAQAQCEKRLKEVLQRPASIMESDKGWTSASTSGKPRKDK
ASGKLYPESEEDKEAPTGSRYRGRPCLPEDHILCWPLGAPGEVVAVPCPDYIYDFNHKGHAY
RRCDRNGSWELVPGHNRTWANYSECVKFLTNETREREREVFDRLGMI GSGSGSGSGSGSSVSEIQ
LMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF
```

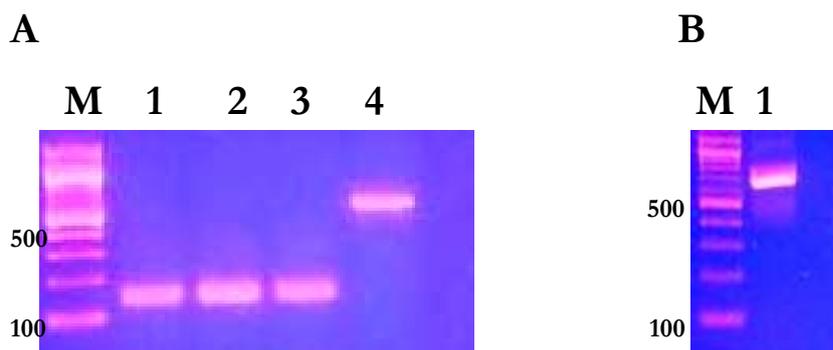
nP<sup>THR</sup>1R                      Linker                      PTH1-34



**Abb. III.8: Sequenz und schematische Darstellung des Konstruktes nP<sup>THR</sup>1-(GS)<sub>12</sub>-PTH(1-34).** An den C-Terminus von nP<sup>THR</sup>1 wurden ein flexibler Linker und der Ligand PTH(1-34) angefügt. Die Länge des Linkers betrug 12 Aminosäuren, 6 Glycine und 6 Serine. blau: nP<sup>THR</sup>1, rot: Glycin-Serin-Linker; grün: PTH(1-37)

#### III.2.1 Klonierung

Für die Herstellung des DNA-Konstrukts des Fusionsproteins nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) mussten zunächst die beiden Teile, nPTHR1 und PTH(1-34), aus den jeweiligen Expressionsvektoren amplifiziert werden. Wie bereits beschrieben wurde das DNA-Konstrukt in mehreren Teilschritten zum endgültigen Produkt zusammengefügt. Abbildung III.9 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Teilschritte und das erzeugte Endprodukt mit der erwarteten Größe von 651 Basenpaaren.



**Abb. III.9: Produktion der nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34)-cDNA.** **A** 2 %-Agarosegel: Produktion der Teilstücke, M: 100 bp-Marker (MWG); Bahnen 1 + 2: (GS)8-PTH(1-34) aus jeweils 50 µl PCR-Ansatz; Bahn 3: gereinigtes (GS)8-PTH(1-34)-Teilstück; Bahn 4: gereinigtes nPTHR1-(GS)8-Teilstück. **B** 1,5 %-Agarosegel: Ergebnis der Kopplungs-PCR. M: 100 bp-Marker (MWG); Bahn 1 Kopplungsprodukt nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34). Das Produkt entspricht der erwarteten Größe von 651 bp.

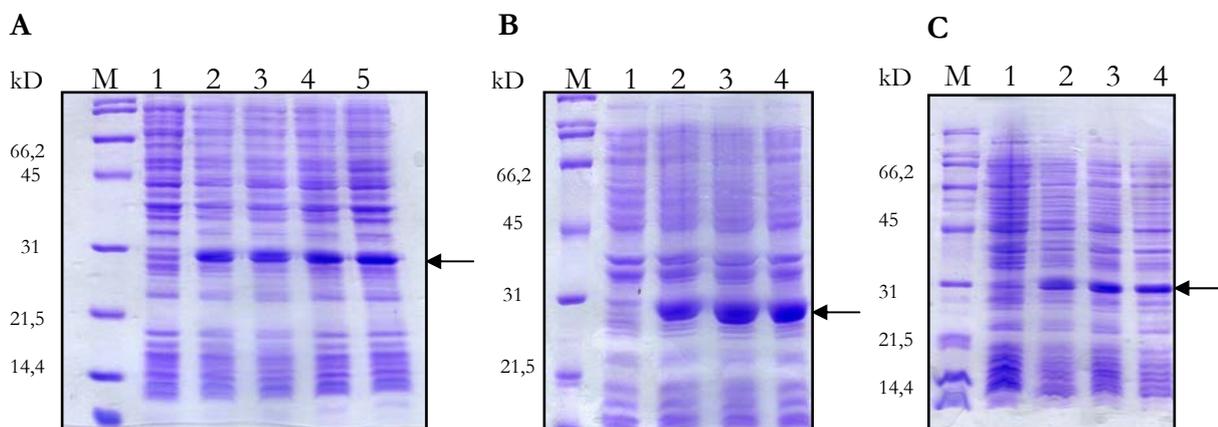
Nach der Reinigung des Kopplungsproduktes mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen) wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und NdeI durchgeführt und das Produkt anschließend in den Vektor pET15b ligiert. Zur Überprüfung der korrekten Sequenz wurde der fertige Vektor sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte, dass die erzeugte DNA-Sequenz mit der Erwarteten zu 100 % identisch war (Daten nicht gezeigt).

Für die Herstellung des Gens des nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34)-Konstruktes wurde eine Mutagenese-PCR unter Verwendung der Primer QC12to14 forward und QC12to14 revers durchgeführt. Als Template diente das Plasmid pET15b nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34). Durch die PCR wurden genau in der Mitte des Glycin-Serin-Linkers 6 Basen eingefügt, welche für ein weiteres Serin und ein weiteres Glycin kodieren. Auf diese Weise wurde der Linker von 12 auf 14 Aminosäuren verlängert.

## III.2.2 Expression und Reinigung

Um die optimalen Expressionsbedingungen für das Fusionsprotein nPTH1-(GS)12-PTH(1-34) zu ermitteln, wurden zunächst mehrere 50 ml-Testexpressionen im Schüttelkolben durchgeführt. Dabei zeigte nPTH1-(GS)12-PTH1-34 eine deutliche Überexpression in *E.coli* BL21(DE3) Zellen. Nach einigen Expressionen im Schüttelkolben mit steigenden Volumina von 100, 200, 400, 1000 und 1500 ml konnte gezeigt werden, dass die Überexpression auch im großen Maßstab erreicht werden kann.

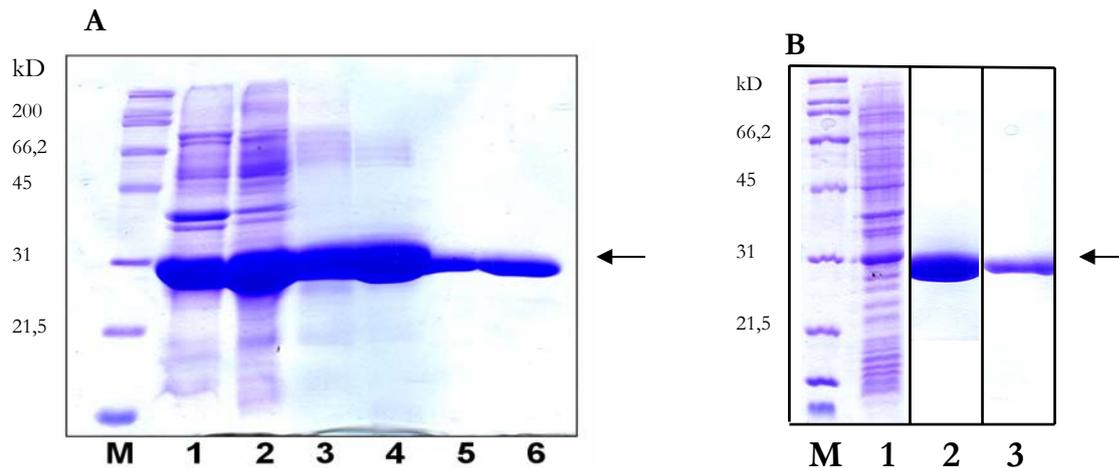
Anschließend erfolgte die Expression von nPTH1-(GS)12-PTH1-34 in einer 6 l *fed-batch* Fermentation. Nach 3 h Expression konnten 820 g Zellen (Feuchtgewicht) geerntet werden. Die anschließend angefertigte SDS-PAGE zeigt eine deutliche Überexpression.



**Abb. III.10: Expression der Fusions-Konstrukte in *E. coli* BL21(DE3).** **A** nPTH1-(GS)12-PTH1-34 Zunächst wurden Testexpressionen in verschiedenen Volumina durchgeführt, hier am Beispiel von 400 ml LB gezeigt. **B** nPTH1-(GS)12-PTH1-34. Nach erfolgreichen Testexpressionen wurde das Fusionsprotein im 6 l-Maßstab fermentiert. **C** nPTH1-(GS)14-PTH1-34. Die *fed-batch* Fermentation erfolgte im 6 l-Maßstab. Der Pfeil markiert die deutliche Überexpressionsbande. M entspricht dem Molekularmassenstandard, Bahnen 1: vor der Induktion mit 1 mM IPTG, Bahnen 2-5 bzw. 2-4: 1-4 h bzw. 1-3 h nach Induktion.

Das Fusionsprotein nPTH1-(GS)14-PTH(1-34) zeigte ebenfalls eine gute Überexpressionsbande in *E.coli* BL21(DE3), wie das SDS-Gel der 6 l *fed-batch* Fermentation (Abb. III.10 C) deutlich zeigt. Die Fermentation erfolgte entsprechend der von nPTH1-(GS)12-PTH1-34.

Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte in exakt gleicher Verfahrensweise wie die Reinigung von nPTH1. Aus 1 l *E.coli*-Kultur konnten ebenfalls ca. 45 mg reines Protein hergestellt werden. Abbildung III.11 zeigt, dass die Proteine bis zur Homogenität gereinigt werden konnten.

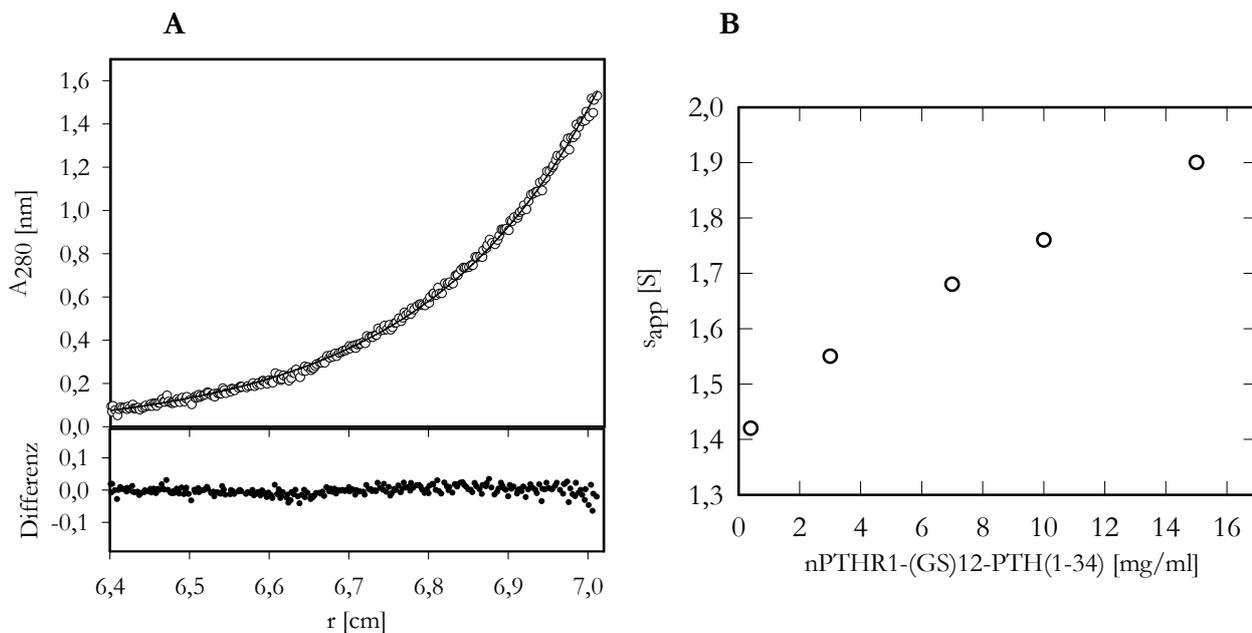


**Abb. III.11: Reinigung der Fusionsproteine. A nPTHr1-(GS)12-PTH(1-34):** M Molekularmassenstandard. Bahn 1: 3 h nach der Induktion bei der Fermentation in *E.coli* BL21(DE3); Bahn 2: Probe vom letzten Waschschritts der IB-Präparation; Bahn 3: Elution der Ni<sup>2+</sup>-NTA; Bahn 4: Elutionsfraktion der Phenyl-Sepharose nach der Renaturierung; Bahnen 5 + 6: Elutionsfraktionen der Superdex 75 Gelfiltrationssäule. **B nPTHr1-(GS)14-PTH(1-34):** M Molekularmassenstandard. Bahn 1: 3 h nach der Induktion bei der Fermentation in *E.coli* BL21(DE3); Bahn 2 und 3: Elutionsfraktionen der Phenyl-Sepharose bzw. der Superdex 75 Gelfiltrationssäule nach der Renaturierung. Der Pfeil markiert jeweils das gereinigte Protein.

## III.2.3 Biophysikalische Charakterisierung

### III.2.3.1 Analytische Ultrazentrifugation

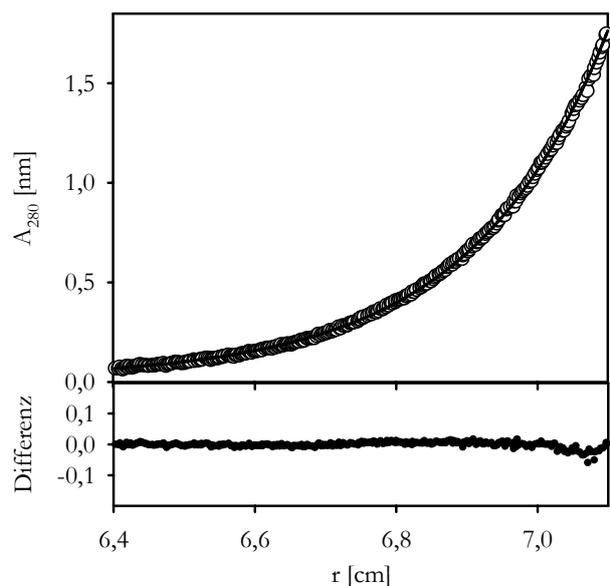
Zur Bestimmung des Molekulargewichts im nativen Zustand und des Oligomierisierungszustands wurden nPTHr1-(GS)12-PTH(1-34) und nPTHr1-(GS)14-PTH(1-34) mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Abbildung III.12 A zeigt den Sedimentations-Gleichgewichtslauf des gereinigten nPTHr1-(GS)12-PTH(1-34) in Lagerpuffer bei einer Proteinkonzentration von 0,4 mg/ml. Aus den erhaltenen Daten wurde ein Molekulargewicht von 25,1 kDa ermittelt, dies entspricht dem monomeren Zustand des Proteins. Abbildung III.12 B zeigt jedoch, dass die apparente Sedimentationskonstante mit steigender Proteinkonzentration ansteigt, was darauf hindeutet, dass nPTHr1-(GS)12-PTH(1-34) in höheren Konzentrationsbereichen, wie sie etwa für Kristallisationsversuche verwendet werden müssten, zu Oligomerisierung neigt. Der genaue Oligomerisierungszustand ist allerdings aus den gewonnenen Daten nicht zu bestimmen. Ein möglicher Grund für die Oligomerisierung bei höheren Konzentrationen könnte eine intermolekulare Interaktion des PTH(1-34)-Anteils eines Moleküls mit dem nPTHr1-Anteil eines Nachbarmoleküls sein.



**Abb. III.12: Analytische Ultrazentrifugation zur Ermittlung des Molekulargewichts und des Oligomerisierungszustands von nPTH1-(GS)12-PTH(1-34).** **A** Das Sedimentationsgleichgewicht wurde bei 20.000 rpm und 20 °C innerhalb von 60 h bei einer Proteinkonzentration von 0,4 mg/ml in Lagerpuffer gemessen. Oben: Kurvenangleich der experimentellen Daten liefert ein Molekulargewicht von 25,1 kDa. Unten: Abweichung des Kurvenangleichs von den experimentellen Daten. **B** Abhängigkeit der apparenten Sedimentationskonstante von der Proteinkonzentration.

Abbildung III.13 zeigt den Sedimentations-Gleichgewichtslauf des gereinigten nPTH1-(GS)14-PTH(1-34) in DSC-Puffer pH 6,5 bei einer Proteinkonzentration von 0,43 mg/ml. Aus den erhaltenen Daten wurde das Molekulargewicht des monomeren Zustandes von 26,9 kDa ermittelt. Eine Messung des Proteins im Lagerpuffer war nicht möglich, da das Protein während der Ultrazentrifugation aggregierte und die so erhaltenen Ergebnisse nicht auswertbar waren. Die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit wie bei nPTH1-(GS)12-PTH(1-34) war ebenfalls nicht möglich, da nPTH1-(GS)14-PTH(1-34) bereits während der Konzentrierung ab einer Konzentration von ca. 2 mg/ml aggregierte. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass nPTH1-(GS)14-PTH(1-34) weit weniger löslich ist als nPTH1-(GS)12-PTH(1-34). Dies könnte auf eine inkorrekte Faltung oder auf das Fehlen der stabilisierenden intramolekularen Bindung zum fusionierten Liganden zurückzuführen sein.

Um diese möglichen Probleme näher einzugrenzen, wurden mit beiden Proteinen im Folgenden CD-, DSC- und ITC-Messungen durchgeführt.



**Abb. III.13: Analytische Ultrazentrifugation von nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34).** Das Sedimentationsgleichgewicht wurde bei 20.000 rpm und 20 °C innerhalb von 60 h bei einer Proteinkonzentration von 0,43 mg/ml in DSC-Puffer pH 6,5 gemessen. Oben: Kurvenangleich der experimentellen Daten liefert ein Molekulargewicht von 26,9 kDa. Unten: Abweichung des Kurvenangleichs von den experimentellen Daten.

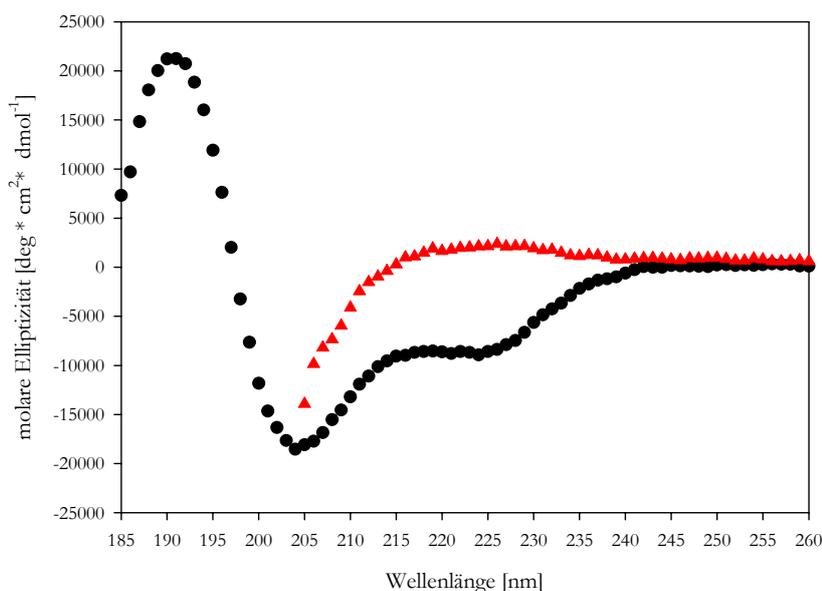
#### III.2.3.2 Circular dichroismus zur Analyse der Sekundärstruktur

Zur Analyse der Sekundärstruktur von nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) wurden Fern-UV-Circular dichroismusspektren des rückgefalteten und gereinigten Fusionsproteins aufgenommen. Für das Spektrum des nativen Proteins (Abb. III.14, schwarz) wurde dieses in Lagerpuffer mit einer Konzentration von 41  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Konzentration des denaturierten nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) (Abb. III.14, rot) betrug 37  $\mu\text{M}$ .

Der Vergleich der beiden Spektren zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen nativem und denaturiertem nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) im Wellenlängenbereich von 208 nm bis 250 nm. Das Spektrum des denaturierten Proteins ist charakteristisch für eine völlig entfaltete Polypeptidkette (105). Das Spektrum des nativen Proteins mit einem globalen Minimum bei 204 nm und einem lokalen Minimum bei ca. 225 nm zeigt sowohl  $\alpha$ -helikale Strukturen, als auch  $\beta$ -Faltblatt-Anteile im Protein auf.

Die quantitative Auswertung des Sekundärstrukturgehalts erfolgte mit dem Programm CDPro/CONTINLL. Durch Nutzung des Basissets contiLL Basis 3 konnten die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente bestimmt werden.

Tabelle III.4 zeigt den Vergleich der Sekundärstrukturanteile des nPTHR1 und des Fusionsproteins nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34). Im Vergleich zu nPTHR1 (siehe auch III.1.2) steigt der  $\alpha$ -helikale Anteil durch die Fusion mit dem helikalen Liganden PTH(1-34) deutlich an. Der  $\beta$ -Faltblatt-Anteil bleibt nahezu unverändert. Der Anteil an ungeordneten Proteinanteilen (Rest) steigt ebenfalls an, was durch die Anwesenheit des Glycin-Serin-Linkers zu erklären ist.

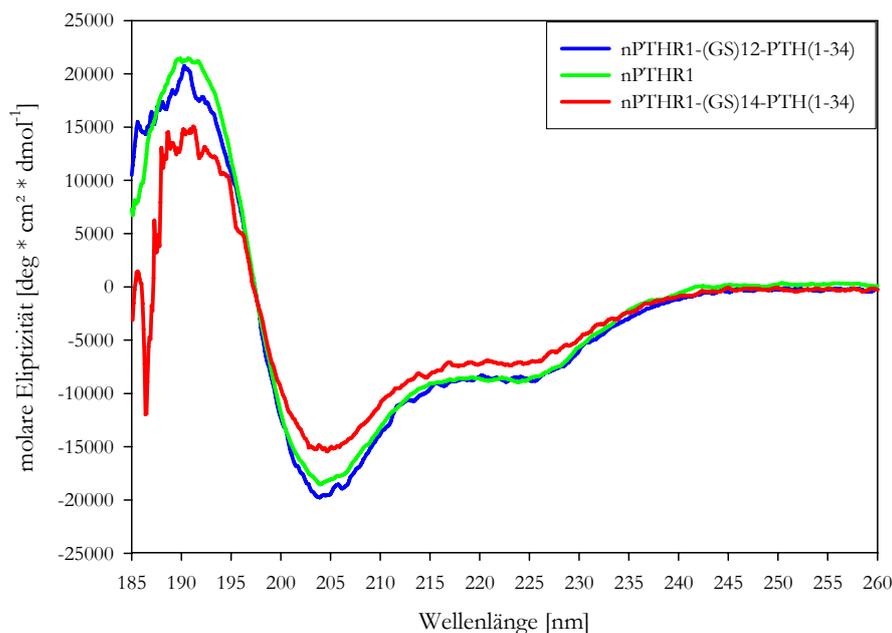


**Abb. III.14: Fern-UV CD-Spektren von nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34).** Die CD-Spektren des 41  $\mu\text{M}$  nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) in 50 mM Tris/HCl; 0,3 M Ammonium-sulfat; pH 8,0 (natives Spektrum,  $\bullet$ ) und 37  $\mu\text{M}$  nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) in 6 M Guanidinium-hydrochlorid; 0,1 M Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0 (denaturiertes Spektrum,  $\blacktriangle$ ) wurden in einer 0,02 cm Kuvette, mit einer Integrationszeit von 1 s und einer Bandbreite von 0,1 nm bei 20  $^{\circ}\text{C}$  aufgenommen und jeweils 10-fach akkumuliert.

Zur Analyse der Sekundärstruktur von nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) wurde ein natives Spektrum in DSC-Puffer pH 6,5 aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 27,3  $\mu\text{M}$ . Mit Hilfe des Programms CONTINLL konnte jedoch kein geeignetes Basisset zum sinnvollen Fitten der gemessenen Daten ermittelt werden. In Abbildung III.15 sind die normierten Daten des nPTHR1 denen von nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) und nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) gegenüber gestellt. Hier ist ebenfalls der geringere  $\alpha$ -helikale Anteil in nPTHR1 im Vergleich zu nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) zu erkennen. Es wird auch deutlich, dass nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) insgesamt einen geringeren Anteil an Sekundärstrukturelementen aufweist als die beiden anderen Proteine.

	Basisset	$\alpha$ -Helix %	$\beta$ -Sheet %	turn %	Rest %
<b>nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34)</b>	contiLL Basis 3	43,1	17,3	19,6	41,4
<b>nPTHR1</b>	contiLL SMP50	20,3	24,0	23,5	32,3

**Tab. III.4: Sekundärstrukturanteile des nPTHR1 und nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34).** Das Fusionsprotein zeigt einen signifikanten Anstieg des  $\alpha$ -helikalen Anteils aufgrund der Anwesenheit des Liganden PTH(1-34). Die restlichen Sekundärstrukturanteile zeigen eine nahezu gleiche Verteilung bei beiden Proteinen.



**Abb. III.15:** Vergleich der nativen Fern-UV-CD-Spektren von nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34), nPTHR1 und nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34). Alle Proteine weisen ein definiertes Spektrum mit charakteristischen Minima bei ca. 204 nm und ca. 225 nm auf. Dies weist auf eine korrekte Faltung der Proteine hin. Der  $\alpha$ -helikale Anteil ist bei nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) deutlich erhöht. nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) weist augenscheinlich einen geringeren Sekundärstrukturanteil auf.

Die erhaltenen Daten legen nahe, dass beide Fusionsproteine in einer Konformation vorliegen, die der von nPTHR1 sehr ähnelt. Es ist daher davon auszugehen, dass es gelang beide Fusionsproteine in die korrekte native Konformation zurückzufalten.

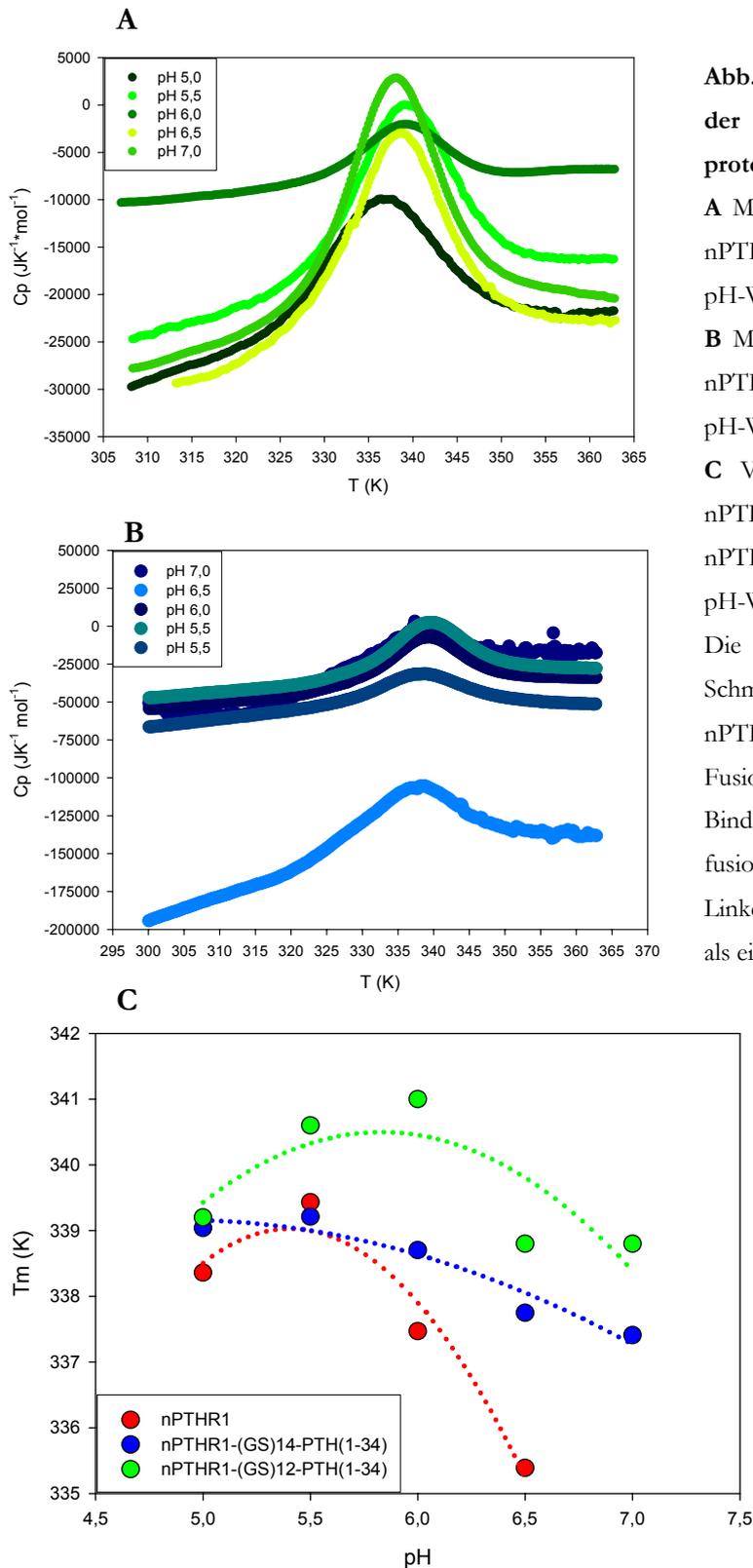
#### III.2.3.3 Bestimmung der thermischen Stabilität mittels DSC

Um die thermische Stabilität und die Wärmekapazität der Fusionsproteine in Abhängigkeit von der Temperatur zu bestimmen, wurden kalorimetrische Untersuchungen mittels *Differential Scanning*-Kalorimetrie (DSC) durchgeführt. Die Messbedingungen und Geräteeinstellungen entsprechen denen der nPTHR1-DSC-Messungen. Die für die Messung eingesetzten Proteinkonzentrationen für jeden pH-Wert sind in Tabelle III.5 aufgeführt.

Anders als bei nPTHR1 ergaben die Messungen der Fusionsproteine keine gut auswertbaren Daten, die erhaltenen Messkurven waren zu breit und zeigten zum Teil eine mehr oder weniger ausgeprägte Schulter vor dem eigentlichen Schmelzpunkt (Abb. III.16), so dass ein Fitten der Kurven bzw. eine Basislinien-Korrektur unmöglich war. Es konnte jedoch für jeden pH-Wert die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) bestimmt werden.

### III Ergebnisse: Parathormon-Rezeptordomänen

In den Abbildungen III.16 A und B sind die Messkurven von nPTHR-(GS)12-PTH(1-34) und nPTHR-(GS)14-PTH(1-34) dargestellt. Alle Temperaturübergänge waren weitestgehend reversibel (Daten nicht gezeigt), in Abbildung III.16 C wurden die entsprechenden Schmelztemperaturen in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt und mit der freien N-terminalen Domäne verglichen.



**Abb. III.16: Kalorimetrische Untersuchung der thermischen Stabilität der Fusionsproteine im Vergleich zu nPTHR1.**

**A** Messung der molaren Wärmekapazität von nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) bei verschiedenen pH-Werten bei einer Aufheizrate von  $90\text{ }^\circ\text{C/h}$ .

**B** Messung der molaren Wärmekapazität von nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) bei verschiedenen pH-Werten bei einer Aufheizrate von  $90\text{ }^\circ\text{C/h}$ .

**C** Vergleich der Schmelztemperaturen von nPTHR1, nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) und nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) bei verschiedenen pH-Werten.

Die mit Hilfe von DSC bestimmten Schmelztemperaturen zeigen im Vergleich zu nPTHR1 eine Stabilisierung der Fusionsproteine, infolge der intra-molekularen Bindung zwischen Rezeptor-domäne und fusioniertem Ligand. Dabei zeigt sich, dass ein Linker mit 12 Aminosäuren Länge günstiger ist als ein Linker mit 14 Aminosäuren.

### III Ergebnisse: Parathormon-Rezeptordomänen

---

pH-Wert	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0
nPTHR1	7,6 $\mu\text{M}$	24,7 $\mu\text{M}$	28,6 $\mu\text{M}$	19,8 $\mu\text{M}$	20,6 $\mu\text{M}$
nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34)	10,4 $\mu\text{M}$	21,1 $\mu\text{M}$	32,3 $\mu\text{M}$	23,9 $\mu\text{M}$	21,0 $\mu\text{M}$
nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34)	4,9 $\mu\text{M}$	11,0 $\mu\text{M}$	34,0 $\mu\text{M}$	29,5 $\mu\text{M}$	28,4 $\mu\text{M}$

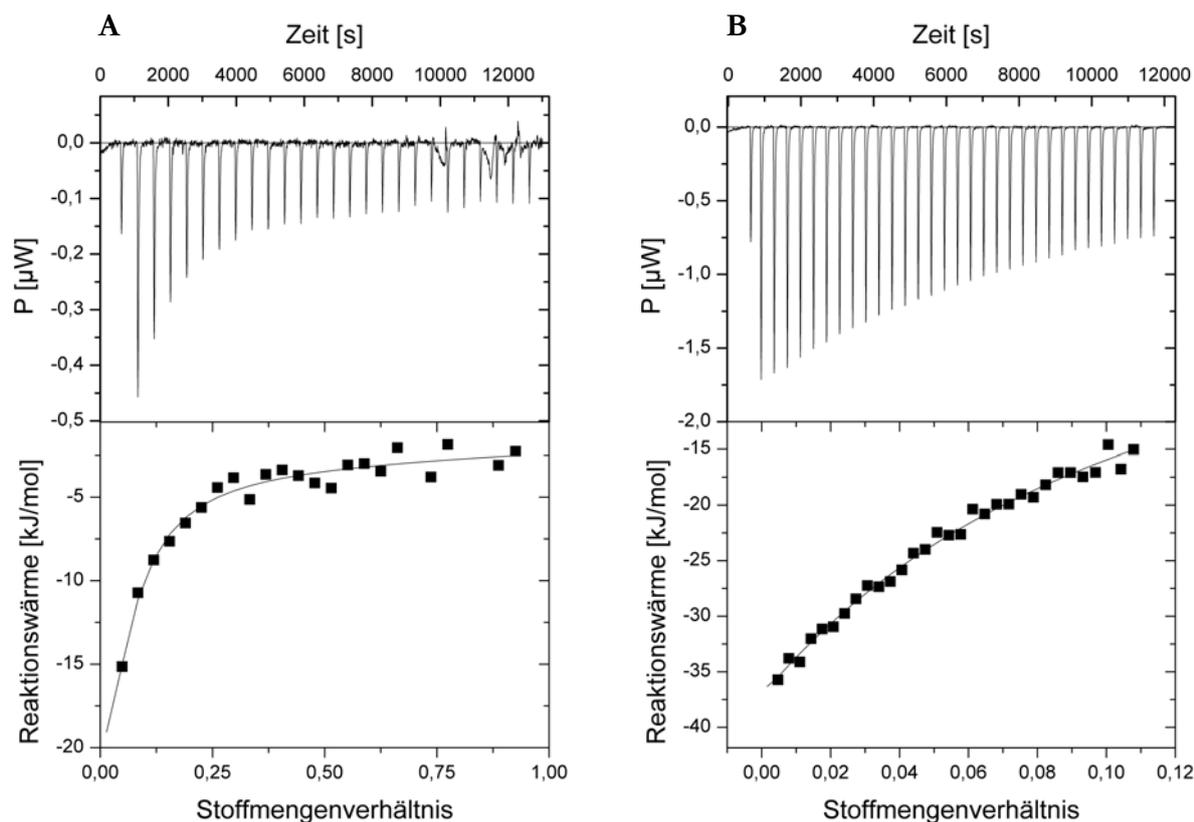
Tab. III.5: Proteinkonzentration von nPTHR1, nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) und nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) nach der Dialyse gegen den DSC-Puffer mit entsprechendem pH-Wert und Ultrazentrifugation (30 min, 60.000 rpm).

Die erhaltenen Daten lassen darauf schließen, dass die Fusionsproteine nicht als einheitliche Spezies vorliegen. Die vorherrschende Spezies zeigte eine höhere Wärme- und pH-Stabilität im Vergleich zu nPTHR1. Die zweite Spezies, welche sich in einer Schulter bzw. der Breite der Kurven zeigte, denaturierte bereits bei geringeren Temperaturen. Da das Protein laut SDS-PAGE und UZ-Untersuchungen keine Verunreinigungen aufwies, ist es denkbar, dass diese instabilere Spezies eine Teilpopulation darstellt, welche keine intramolekulare Bindung mit dem fusionierten Liganden eingeht. Der Anteil dieser Spezies war in jeder Proteincharge unterschiedlich und konnte nicht genauer bestimmt werden. Es gelang nicht die Schulter durch geeignete Fits eines 2-Phasen-Modells, von der Schmelzkurve der Hauptspezies zu trennen. Diese zweite Spezies wurde auch bei ITC-Messung sichtbar (siehe III.2.3.4).

Im Vergleich zu nPTHR1 weisen die beiden Fusionsproteine höhere  $T_m$ -Werte bei den entsprechenden pH-Werten auf, was auf eine verbesserte thermische Stabilität durch die Fusion mit dem Liganden hindeutet.

#### III.2.3.4 Untersuchung der Interaktion der Fusionsproteine mit freiem Liganden PTH(1-37) mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC)

Mit Hilfe isothermaler Titrationskalorimetrie sollte quantitativ die Bindung der Fusionsproteine an freien Liganden PTH(1-37) gemessen werden, um so indirekt die intramolekulare Bindung des Rezeptoranteils an den fusionierten Liganden zu zeigen. Sollte der Ligand intramolekular an die fusionierte Rezeptordomäne binden, so wäre im ITC keine Bindung eines freien Liganden messbar. In der Annahme, dass der freie Ligand an nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) mit der selben Affinität wie an die freie N-terminale Domäne bindet, wurde zunächst im gleichen Konzentrationsbereich wie bei der ITC-Messung von nPTHR1 gemessen. Die Konzentration des Fusionsproteins betrug 26  $\mu\text{M}$ , die des freien Liganden 252  $\mu\text{M}$ .



**Abb. III.17: Isothermale Titrationskalorimetrie von PTH (1-37) zu nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34).** **A** Es wurden 26  $\mu\text{M}$  nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) in 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 300 mM Ammoniumsulfat vorgelegt und mit einer 252  $\mu\text{M}$  PTH (1-37) in der Titrationsspritze in 10  $\mu\text{l}$ -Titrationsschritten alle 20 s bei 20 °C bis zur Sättigung titriert. **B** PTH(1-37) wurde aus einer 199  $\mu\text{M}$  Stammlösung in gleicher Weise wie in Experiment A zu 360  $\mu\text{M}$  nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) titriert.

Die Auswertung der Daten ergab eine unklare Stöchiometrie mit einem Schätzwert zwischen 0,001 - 0,006, somit war keine quantitative Auswertung der Daten möglich. **A+B** Oben: basislinienkorrigierter Wärmeumsatz der Titrationsschritte; Unten: flächenintegrierte und konzentrationsnormalisierte Enthalpieänderung bei den einzelnen Titrationsschritten.

Die Messungen zeigten eine schwache Bindung (Abb. III.17 A). Die Daten konnten jedoch nicht quantitativ ausgewertet werden, da es nicht möglich war die genaue Stöchiometrie der Bindung zu bestimmen. Da die erhaltenen Daten aber darauf hinwiesen, dass ein sehr kleiner Wert für N (zwischen 0,001 und 0,006) vorliegt, wurde in einer weiteren Messung im starken Überschuss nPTHR1R-(GS)12-PTH(1-34) (360  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt und der freie Ligand aus einer 199  $\mu\text{M}$  Lösung hinzu titriert, um so evtl. die genaue Stöchiometrie ermitteln zu können. Diese Messung lieferte aber nahezu identische Ergebnisse wie die erste Messung (Abb. III.17 B).

Der angegebene Bereich für N ist ein Schätzwert, der sich aus den durchgeführten Auswerterversuchen ergibt. Nur wenn man N in diesem Bereich festsetzt, ergeben sich für  $\Delta S$ ,  $\Delta H$  und den  $K_D$ -Wert sinnvolle Parameter, welche hier nicht aufgeführt werden, da sie lediglich auf einer Schätzung beruhen. Trotz der schlechten Auswertbarkeit zeigen die Daten deutlich,

### III Ergebnisse: Parathormon-Rezeptordomänen

---

dass der Hauptanteil der Probe, nämlich 90-99 %, keine Bindung zu freiem Peptid eingeht, sondern vermutlich in intra- oder intermolekularen Bindungen saturiert ist.

Um eine exakte Aussage über die thermodynamischen Parameter treffen zu können, müsste die Stöchiometrie der Bindung über eine unabhängige Methode gemessen bzw. der Anteil der Spezies in der Probe bestimmt werden, welcher keine intramolekulare Bindung eingeht. Dies war allerdings unmöglich, da dieser Anteil nicht konstant war und sich je nach Proteincharge und Lagerungszeit veränderte.

ITC-Messungen mit nPTHr1-(GS)14-PTH(1-34) ergaben bei vergleichbaren Konzentrationsverhältnissen ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt), welche sich ebenfalls auf eine Heterogenität der Protein-Probe zurückführen lassen.

Diese zweite Spezies in den Proteinproben zeigt sich auch im DSC (siehe III.2.3.3).

#### III.2.4 Kristallisations-*Screenings* mit nPTHr1-(GS)12-PTH(1-34)

Nach der erfolgreichen Rückfaltung und Reinigung des Fusionsproteins im größeren Maßstab sollten auch röntgenkristallographische Untersuchungen vorgenommen werden.

Es wurden diverse *sitting drop*-Kristallisationsansätze in allen zur Verfügung stehenden Kristallisations-Kits (siehe II.4.6) angesetzt. Das Protein wurde dabei zum Einen in Lagerpuffer als auch dem Kristallisationspuffer des PTH(1-37)-Peptids vorgelegt. nPTHr1-(GS)12-PTH(1-34) zeigte unter diesen Pufferbedingungen eine deutlich bessere Löslichkeit als die N-terminale Domäne allein, was den Einsatz in höheren Konzentrationsbereichen ermöglichte. Dies sollte für die Kristallisation von Vorteil sein. Das Protein wurde in verschiedenen Konzentrationen (2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 8 mg/ml, 12 mg/ml) eingesetzt.

Bisher konnte unter keiner der getesteten Kristallisationsbedingungen ein Proteinkristallwachstum beobachtet werden.

### III.3 Die Rezeptordomäne nPTHR2

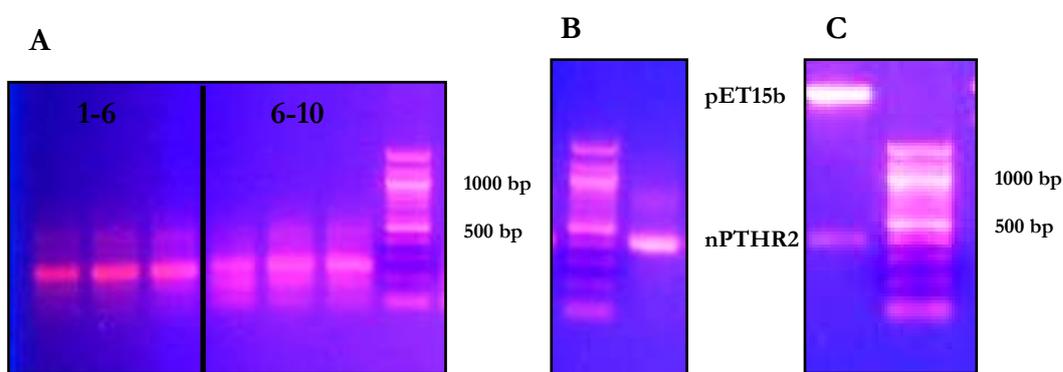
Aufgrund der Probleme bei der Kristallisation des nPTHR1 und des Fusionskonstruktes nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34), der hohen Sequenzhomologie von ca. 51 % und der ähnlichen Bindungseigenschaften zu PTH, wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit mit der Herstellung der extrazellulären Domäne des humanen PTH-Rezeptors 2 begonnen. Das Sequenzalignment der Hormonbindedomänen in Abbildung III.18 zeigt auf, dass zwischen nPTHR1 und nPTHR2 eine hohe Sequenzidentität von ca. 36 % besteht und das Disulfidmuster bei allen N-terminalen Domänen nahezu identisch ist. Allerdings weist nPTHR1 eine signifikant verlängerte *loop*-Region zwischen Cys48 und Cys108 auf. NPTHR2 könnte daher aufgrund seiner kompakteren Beschaffenheit ein geeigneter Kandidat für Kristallisationsversuche sein.

nPTHR1	-----YALVDADDMVTKEEQIFLLHRAQAQCEKRLKEVLQRPAST	40
nPTHR2	-----AQLSDGTITIEEQIVLVLKAKVQCELNITAQLQ-----	34
GIPR	----PILQLLLRRLSLCGLLLQRAETGSKGQTAGELYQRWERYRREQETLAAAEPSPG--	54
GLPR1	MAGAPGPLRLALLLLGMVGRAGPRPQGATVSLWETVQKWREYRRCQQRSLTEDPPPATD-	59
PACAPR	-----MHSDC----IFKKEQAMCLQRANELMDSSPG-	27
VIPR1	-SPLPARWLCVLAGALAWAGPAGGQAARLQEECDYVQMIEVQHKKCLEEA-QLENETIG-	57
nPTHR1	MESDKGWSASTSGKPRKDKASGKLYPESEEDKEAPTGSRYRGRPCLPEWDHILCWPLGA	100
nPTHR2	-----CFPEWDGLICWPRGT	49
GIPR	-----LACNGSFDMYVCWDYAA	71
GLPR1	-----LFCNRTFDEYACWPDGE	76
PACAPR	-----CPGMWDNITCWKPAH	42
VIPR1	-----CSKMWDNLTWCPATP	72
nPTHR1	PGEVVAVPCPDYIYDFN--HKGHAYRRCDRNGSWELVPGHNRTWANYSECVKFLTNET--	156
nPTHR2	VGKISAVPCPPYIYDFN--HKGVAFRHCNPNGTWDFMHSLNKTWANYSDCLRFLQPDISI	107
GIPR	PNATARASCPWYLPWHHHVAAGFVLRQCGSDGQWGLWR-----DHTQCENPEKNEAFL	124
GLPR1	PGSFVNVS CPWYLPWASSVPQGHVYRFCTAEGWLQKDNSSLPWRDLSECEESKRGERS	136
PACAPR	VGEMVLVSCPELFRIFNSDMG-VVSRNCTEDG-WSEFPF-----HYFDACGFDEYES---	92
VIPR1	RGQVVVLACPLIFKLFSSIQGRNVSRSCTDEG-WTHLEPG----PYPIACGLDDKAASL-	126
nPTHR1	REREVFDRLGMIY	169
nPTHR2	GKQEFFERLYVMY	120
GIPR	DQRLILERLQ---	134
GLPR1	P-----	137
PACAPR	-----	92
VIPR1	D-----	127

Abb. III.18: Sequenzalignment der HBD Klasse B GPCRs. nPTHR1 besitzt eine verlängerte *Loop*-Region zwischen Cys48 und Cys108. Die identischen Aminosäuren aller HBD wurden gelb, die von nPTHR1 und nPTHR2 hellblau hervorgehoben, Cysteine sind rot markiert.

#### III.3.1 Klonierung des Expressionsvektors pET15bnPTHHR2

Um nPTHHR2 exprimieren zu können, musste zunächst die entsprechende cDNA hergestellt und in den Vektor pET15b eingeführt werden. Die cDNA-Sequenz wurde basierend auf der Sequenz des humanen nPTHHR2 (NCBI-*accession*: NP\_005039.1) entworfen. Zur Herstellung der cDNA wurde eine overlapping-PCR in zwei Teilschritten durchgeführt. Abbildung III.19 zeigt die Ergebnisse der einzelnen PCR-Schritte. Das erhaltene DNA-Stück wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und NdeI in den Zielvektor legiert. Die korrekte Sequenz der nPTHHR2-cDNA wurde mittels Sequenzierung (Daten nicht gezeigt) bestätigt.



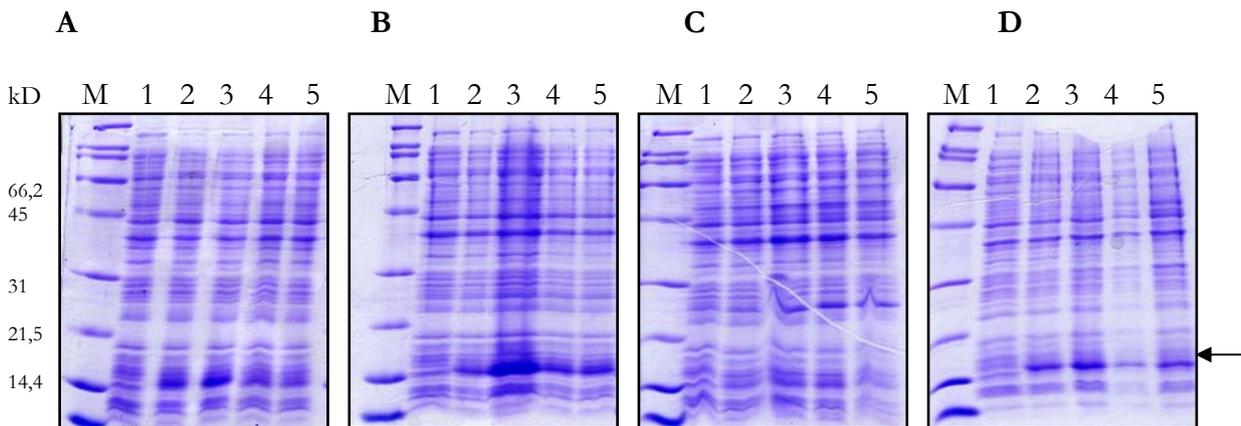
**Abb. III.19: Herstellung des Expressionsvektors pET15bnPTHHR2.** **A** Produktion der beiden Teilstücke in jeweils drei PCR-Ansätzen. links: Primer 1-6; rechts: Primer 6-10; in beiden Fällen ergaben die drei PCR-Ansätze das gleiche Produkt mit der erwarteten Größe, jeweils gleiche PCR-Ansätze wurden vereint. **B** Ergebnis der Kopplungs-PCR. Die beiden Teilstücke wurden im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Das Endprodukt hat die erwartete Größe von 403 bp. **C** Kontrollverdau des Plasmids eines positiven Klon. oben: das linearisierte Plasmid pET15b; unten: die nPTHHR2-cDNA in der richtigen Größe.

#### III.3.2 Expression von nPTHHR2

Zum Ermitteln der optimalen Expressionsbedingungen wurden zunächst einige Testexpressionen im Schüttelkolben im 50 ml-Maßstab durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Bakterienstämme mit dem Zielvektor pET15bnPTHHR2 transformiert. Bei den verwendeten *E. coli*-Stämmen handelt es sich um: BL21(DE3), BL21(DE3)pUBS, BL21(DE3)pLysS und Rosetta. Die verschiedenen Bakterienstämme zeigten ein unterschiedliches Expressionsverhalten. Anhand der vorliegenden SDS-Gele wurde der Expressionsstamm BL21(DE3)pUBS für alle weiteren Expressionen ausgewählt. Er zeigte eine gute Überexpression des Proteins, welche über die 4 h der Expressionsdauer konstant zu bleiben schien. Die bessere Expression ist auf das zusätzliche pUBS520-Plasmid dieses *E. coli*-Stammes zurückzuführen. Es erhöht die Produktion

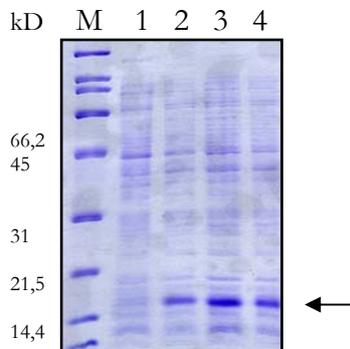
### III Ergebnisse: Parathormon-Rezeptordomänen

der tRNA<sup>Arg</sup>, die für die Triplets AGA und AGG codiert. Dies könnte, angesichts der Tatsache, dass die nPTH2-cDNA nicht für *E. coli* codon-optimiert war, von Vorteil sein.



**Abb. III.20: Testexpressionen von nPTH2 in unterschiedlichen Expressionsstämmen.** **A** *E. coli* BL21(DE3), **B** *E. coli* BL21(DE3)pUBS, **C** *E. coli* BL21(DE3)pLysS, **D** *E. coli* Rosetta. M entspricht dem Molekularmassenstandard, Bahn 1: vor der Induktion mit 1 mM IPTG, Bahnen 2-5 1-4 h nach Induktion. Der Pfeil markiert in allen Abbildungen die Laufhöhe des 16 kD Proteins nPTH2. Außer in *E. coli* BL21(DE3)pLysS, ist in allen Expressionsstämmen eine Überexpression von nPTH2 zu erkennen. *E. coli* BL21(DE3)pUBS zeigte das beste Ergebnis mit einer stabilen Überexpression im Verlauf der 4 Stunden nach der Induktion mit 1 mM IPTG.

Im Folgenden wurde nPTH2 im 6 l-Maßstab im ausgewählten *E. coli*-Stamm im *fed-batch*-Verfahren bei 37 °C fermentiert (Abb. III.21). Bei einer optischen Dichte von 12,5 AU bei 600 nm erfolgte der Feeding-Start. Bei einer optischen Dichte von 57,5 AU bei 600 nm wurde mit 1 mM IPTG induziert. 3 h nach der Induktion wurden die Zellen geerntet. Es konnten 1100 g Zellen (Feuchtgewicht) geerntet werden. Die anschließend angefertigte SDS-PAGE zeigt eine deutliche Überexpression.

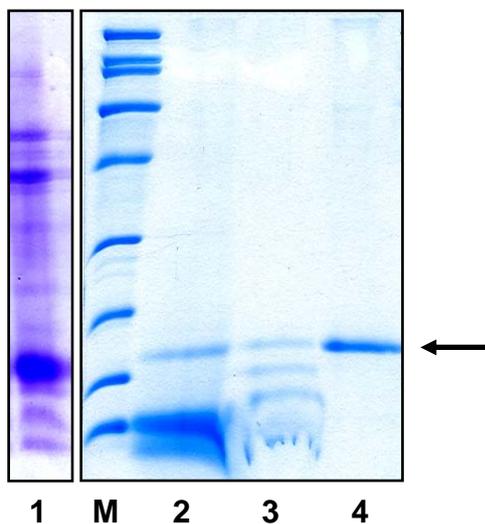


**Abb. III.21: 6 l *fed-batch* Fermentation des nPTH2 in *E. coli* BL21(DE3)pUBS.** M: Molekularmassenstandard, Bahn 1: vor der Induktion mit 1 mM IPTG, Bahnen 2-4: 1-3 h nach Induktion. Der Pfeil markiert die Laufhöhe des 16 kD Proteins nPTH2. Es ist eine deutliche Überexpression von nPTH2 zu erkennen.

#### III.3.3 Präparation und Reinigung von nPTHR2

Die Präparation der IBs aus *E. coli* BL21(DE3)pUBS erfolgte entsprechend dem Protokoll für nPTHR1. Für die Solubilisierung der IBs wurde ebenfalls zunächst das nPTHR1-Protokoll getestet, allerdings führte dies nicht zum gewünschten Erfolg. Nach der Dialyse der solubilisierten IBs gegen 4 M Guanidinhydrochlorid pH 2,5 bildete die Proteinlösung eine gallertartige Masse, welche nicht für die anschließende Reinigung eingesetzt werden konnte. Durch Erhöhung der Guanidiniumchlorid-Konzentration auf 5 M und des pH-Wertes auf 4,5 konnte schließlich eine klare Proteinlösung erhalten werden. Die so solubilisierten IBs wurden dann in gleicher Weise wie nPTHR1 über eine Ni<sup>2+</sup>-Sephrose-Säule gereinigt. Hierzu wurde die Guanidiniumchlorid-Konzentration wie bei der Solubilisierung auf 5 M erhöht, um die IBs in Lösung zu halten.

Die Renaturierung war unter den Bedingungen von nPTHR1 nicht erfolgreich und führte zur kompletten Präzipitation des Proteins während der anschließenden Ammoniumsulfatfällung. Erst die Zugabe von 1 mM Brij-78, einem Detergenz, führte zu löslichem renaturiertem Protein, welches auch während der Ammoniumsulfatfällung in Lösung blieb. Die weiteren Reinigungsschritte wurden analog zur nPTHR1-Reinigung durchgeführt. Wie in Abbildung III.22 gezeigt wird, konnte nPTHR2 bis zur Homogenität gereinigt werden.



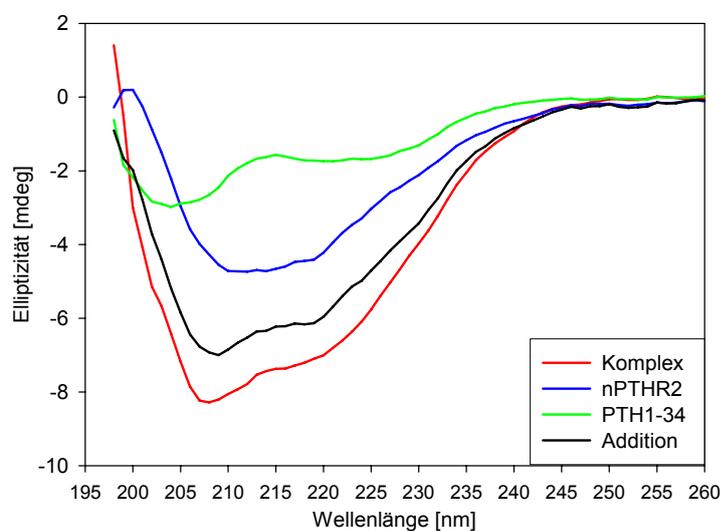
**Abb. III.22: Präparation und Reinigung von nPTHR2.** M entspricht dem Molekularmassenstandard. Der Pfeil markiert nPTHR2. Bahn 1: Probe vom letzten Waschschrift der IB-Präparation; Bahn 2: Elution der IMAC der solubilisierten IBs; Bahn 3: Elutionsfraktion der Phenyl-Sepharose nach der Renaturierung von nPTHR2; Bahn 4: Elutionsfraktion der Superdex 75 Gelfiltrationssäule. Das Protein konnte bis zur Homogenität gereinigt werden.

#### III.3.4 Charakterisierung von nPTHR2

Nach der erfolgreichen Reinigung sollte nPTHR2 anschließend im Hinblick auf seine korrekte Faltung und Ligandenbindung untersucht werden.

Erste CD-Messungen in Anwesenheit und Abwesenheit des *in-vitro*-Liganden PTH(1-37) wurden in Zusammenarbeit mit M. Gopalswamy, AG Balbach, Institut für Physik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Abbildung III.23 zeigt die Ergebnisse dieser CD-Messungen. Der Ligand PTH(1-37) und nPTHR2 wurden jeweils in einem Puffer aus 20 mM Natriumphosphat und 300 mM Natriumsulfat bei pH 6,00 mit einer Konzentration von 1,117  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Für die CD-Messung des Komplexes (rot) wurden beide Komponenten 1:1 gemischt. Die Messungen erfolgten in einer 1 cm Küvette. Man erkennt deutlich, dass die bloße Addition der beiden Einzelspektren von PTH(1-37) und nPTHR2 (schwarz) nicht mit den Messdaten des Komplexes vergleichbar ist. Dies weist darauf hin, dass eine Bindung des Peptids an die Rezeptordomäne und eine damit verbundene Konformationsänderung stattfindet. Dies legt nahe, dass es gelang nPTHR2 in seiner native Konformation zu reinigen.



**Abb. III.23: CD-Messungen von nPTHR2 und PTH(1-37) einzeln und im Komplex.** Die Messungen wurden in einer 1 cm Küvette durchgeführt. NPTHR2 und PTH(1-37) lagen in einer Konzentration von 1,117  $\mu\text{M}$  in 20 mM Natriumphosphat und 300 mM Natriumsulfat bei pH 6,00 vor. Man erkennt deutlich die Konformationsänderung bei Bindung des Peptids an nPTHR2. grün: Einzelspektrum PTH(1-37), blau: Einzelspektrum nPTHR2, schwarz: Addition der beiden Einzelspektren, rot: Komplex aus PTH(1-37) und nPTHR2

Um diese Vermutung zu belegen würden noch weitere Messungen, wie z.B. ein CD-Spektrum des denaturierten Proteins und Messungen zur Stabilität und zur Ligandenbindung, wie DSC und ITC, notwendig sein, welche aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt wurden. Das Projekt wird von M. Gopalswamy, AG Balbach, Institut für Physik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg weitergeführt.

# IV Diskussion

## IV.1 Strukturelle Charakterisierung von nPTHR1

Die N-terminale Domäne des Klasse B GPCRs PTHR1 stellt ein gut charakterisiertes Protein dar, welches durch die Bindung der Liganden PTH und PTHrP im Hinblick auf deren Rolle im Kalzium- und Phosphathaushalt und damit verbundene Krankheiten wie Osteoporose und das Auslösen der Tumor-assoziierten Hyperkalzämie, eine hohe medizinische Relevanz erlangte. Cross-linking und Mutationsstudien haben gezeigt, dass lediglich die N-terminalen Aminosäuren 1-34 des Peptidliganden PTH an der Rezeptorbindung beteiligt sind (50). Aus diesem Grund sollte auch in dieser Arbeit eine C-terminal verkürzte Form des Peptids PTH(1-37) als Ligand für Interaktionsstudien und Kristallisationsversuche eingesetzt werden.

Die N-terminale Domäne konnte nach dem Protokoll von Grauschopf *et al.* (28) mit einer Ausbeute von ca. 45 mg gereinigtem Protein aus 1 Liter *E. coli*-Kultur gewonnen werden. Die ermittelten Daten, die Sekundärstruktur, thermische Stabilität und Bindungsaffinität zu PTH(1-37) betreffend, entsprachen den Literaturdaten (28). Das Protein zeigte unter den verwendeten Messbedingungen im DSC ein Optimum der thermischen Stabilität bei pH 5,5.

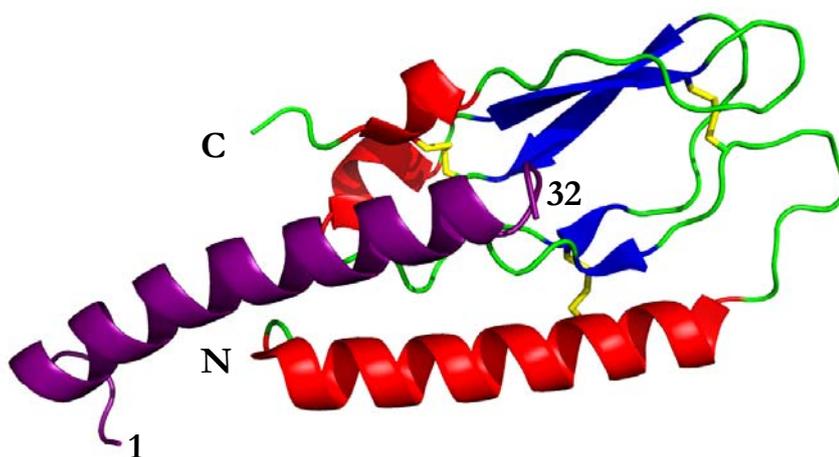
Kristallisationsansätze von nPTHR1 im Lagerpuffer ergaben unter allen zur Verfügung stehenden Kristallisationsbedingungen keine Proteinkristalle. Ein Grund dafür könnte das im Lagerpuffer enthaltene Ammoniumsulfat sein, welches sehr schnell unter sehr vielen Bedingungen der Kristallisations-Kits Salzkristalle ausbildet. Deshalb wurde versucht andere Pufferbedingungen mit geringerer Salzkonzentration zu ermitteln, unter denen nPTHR1 stabil in hoher Konzentration löslich bleibt. Ein Puffer bestehend aus 20 mM Tris / HCl, 20 % D-Sorbitol, 6 % Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin und 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  erschien als geeigneter Kristallisationspuffer, da das Protein auch bei hohen Konzentrationen in Lösung gehalten werden konnte.

Für die Kristallisation wurde der Ligand PTH(1-37) in einem molaren Verhältnis von 1:1 und 1:5 nPTHR1:PTH(1-37) zugegeben. Bei einem *Screening* im 96 well-Maßstab unter Verwendung aller zur Verfügung stehenden Kristallisationskits bildeten sich bei 5-fachem molaren Überschuss an Ligand unter einer Bedingung (100 mM Na-Citrat pH 5,6; 10 % (v/v) 2-Propanol; 10 % (w/v) PEG-4000) Kristalle, welche auch im 24 well-Maßstab reproduzierbar waren. Der im hauseigenen Röntgengenerator vermessene Kristall streute bis 1,85 Å. Aufgrund der ermittelten Raumgruppe

## IV Diskussion: Parathormon-Rezeptordomänen

(P<sub>6</sub>) und der kleinen Zellkonstanten ( $a=29,88 \text{ \AA}$ ;  $b=29,88 \text{ \AA}$ ;  $c=108,46 \text{ \AA}$ ) und nicht zuletzt durch den Vergleich der erhaltenen Daten mit der aufgeklärten PTH(1-34)-Struktur von Jin *et al.* (54) wurde schnell deutlich, dass dieser Kristall lediglich den Liganden enthalten konnte. Weitere Proteinkristalle konnten nicht erzeugt werden.

Die Kristallisation der Hormonbindedomänen der Klasse B GPCRs des Secretin-Typ stellt sich nicht zuletzt aufgrund der hohen Flexibilität und des relativ geringen Sekundärstrukturgehalts als schwierig dar. Im Verlauf der vorgelegten Arbeit wurden sowohl Kristall- als auch NMR-Strukturen von HBDs einiger Secretin-Typ Klasse B GPCRs veröffentlicht, unter anderem auch die Kristallstruktur von nPTHR1 mit dem Liganden PTH(15-34) (97). Des Weiteren wurden Kristallstrukturen der extrazellulären Domänen des humanen GIP-Rezeptors in Anwesenheit des Liganden GIP(1-42) (94) und des humanen GLP-1-Rezeptors in Gegenwart des Inhibitors Exendin-4(9-39) (96) und NMR-Strukturen des humanen PACAP-Rezeptors (PAC1-R<sub>h</sub>) mit dem Inhibitor PACAP(6-38) (112), des murinen CRF-Rezeptors 2 $\beta$  mit und ohne den Antagonisten Astressin (95, 98) und des humanen CRF-Rezeptors 1 mit und ohne den Peptidliganden CRF (113) aufgeklärt. Alle diese Strukturen zeigen eine einheitliche Konformation, welche auch als *secretin family recognition fold* bezeichnet wird (114). Abbildung IV.1 zeigt, dass dieser *fold* durch eine  $\beta$ -Faltblatt-Kernregion und eine N-terminale  $\alpha$ -helikale Region geprägt ist. Die  $\beta$ -Faltblatt-Kernregion wird dabei von zwei der drei konservierten Disulfidbrücken stabilisiert, während die dritte Disulfidbrücke die Kernregion mit der N-terminalen  $\alpha$ -Helix verbindet.



**Abb. IV.1: *secretin family recognition fold*.** Die gemeinsamen Tertiärstrukturmerkmale aller Secretin-Typ GPCRs werden hier am Beispiel der HBD des GIP-Rezeptors dargestellt. Die  $\beta$ -Faltblatt-Kernregion wird durch zwei konservierte Disulfidbrücken stabilisiert. Die dritte konservierte Disulfidbrücke verbindet die Kernregion mit der N-terminalen  $\alpha$ -Helix-Region.

rot:  $\alpha$ -Helices, grün: *loops*, blau:  $\beta$ -Stränge,  
gelb: Disulfidbrücken, lila GIP(1-32)  
[PDB-Code: 2QKH, (94)]

Im Falle des GIP- (94) und des GLP1-Rezeptors (96) gelang es die Liganden-bindenden Domänen in Gegenwart des jeweiligen Peptidliganden ohne weitere stabilisierende Maßnahmen zu kristallisieren. Jedoch wiesen diese Rezeptordomänen eine wesentlich höhere Löslichkeit und

Stabilität auf als nPTHr1. Dieser Umstand lässt sich auf die kompaktere Tertiärstruktur zurückführen. NPTHr1 besitzt im Bereich der Aminosäuren 60 bis 105 einen großen, flexiblen *loop*, welcher bei keinem anderen Klasse B GPCR des Secretin-Types gefunden wurde (siehe Abbildung III.18) (97). Dieser *loop* könnte für die Instabilität der Domäne und somit auch für die fehlgeschlagenen Kristallisationsversuche verantwortlich sein. Pioszak *et al.* (97, 113) gelang die Kristallisation von nPTHr1 und nCRFR1 nur durch die Fusion der Proteine mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP) am N-Terminus. So gelang es nPTHr1 bereits während der Expression und Reinigung zu stabilisieren und anschließend für die Kristallisation auf 20 mg/ml zu konzentrieren. Diese Konzentration konnten im Rahmen dieser Arbeit mit der freien N-terminalen Domäne auch in Gegenwart des stabilisierenden Liganden PTH(1-37) nie erreicht werden. Die Fusion mit MBP wirkte sich außerdem positiv auf die Packung des Kristalls aus, da es dadurch zu ausgedehnten Interaktionen mit nPTHr1 oder mit MBP selbst kam, was eine verbesserte Kristallqualität nach sich zog (97). Doch trotz dieser signifikanten Stabilisierung von nPTHr1 konnte die Struktur des langen und flexiblen 60-105-*loops* nicht aufgeklärt werden.

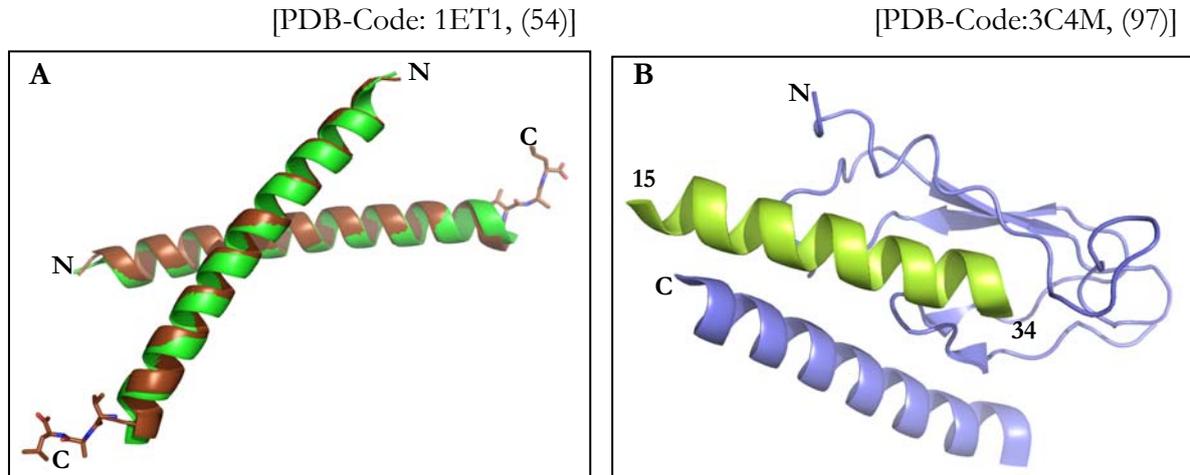
Anhand der nun bekannten Strukturen von HBDs der genannten Klasse B GPCRs konnten detailliertere Einblicke in die Prinzipien der Ligandenbindung dieser wichtigen Rezeptorklasse gewonnen werden (114).

### IV.2 Die Struktur von PTH(1-37)

Im Rahmen dieser Arbeit kristallisierte das C-terminal verkürzte Peptidhormon PTH(1-37) aus einem Gemisch aus der N-terminalen Domäne des Parathormon-Rezeptors (nPTHr1) und des Peptids. Die Strukturauswertung ergab, dass das Peptid im Kristall in exakt der selben Symmetrie und Konformation vorlag, wie es bereits für das verkürzte PTH(1-34) (54) beschrieben wurde. Jin *et al.* gelang es im Jahr 2000 die Struktur des humanen PTH(1-34) mit einer atomaren Auflösung von 0,9 Å darzustellen (PDB-code: 1ET1 (54)). Das Peptid kristallisierte ebenfalls als X-förmiges Dimer in einer geknickten Helix, deshalb konnte diese Struktur für das *rigid body refinement* genutzt werden. Der Verlauf des Peptidrückgrates von PTH(1-37) entspricht bis auf die unterschiedliche Konformation einzelner Aminosäuren dem von PTH(1-34) (siehe III.1.5). Die drei zusätzlich kristallisierten Reste Valin-35, Alanin-36 und Leucin-37 liegen nicht helikal vor. Abbildung IV.2 A zeigt eine Überlagerung der beiden PTH-Strukturen, der Verlauf der Helices und auch die X-förmige Anordnung der zwei Monomere in der asymmetrischen Einheit sind

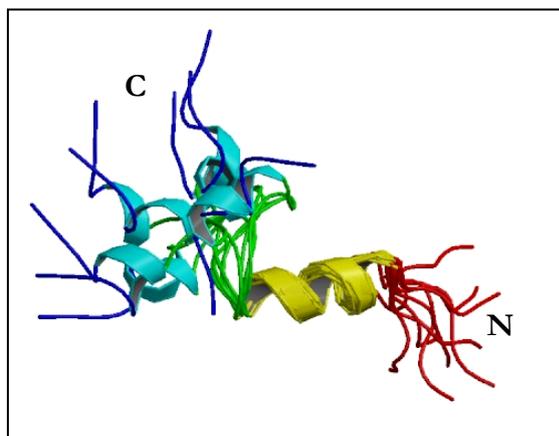
## IV Diskussion: Parathormon-Rezeptordomänen

identisch. Es ist deutlich zu erkennen, dass die C-terminalen Reste 35-37 keine helikale Sekundärstruktur aufweisen.



**Abb. IV.2: Helikale Struktur des PTH-Peptids im Kristall.** **A** Alignment von PTH(1-37) (braun) mit PTH(1-34) (grün). Beide Peptide bilden ein X-förmiges Dimer in der asymmetrischen Einheit. Der Verlauf des Peptidrückgrats ist nahezu identisch. Die drei Reste Val-35, Ala-36 und Leu-37 liegen nicht helikal vor. **B** Kristallstruktur von nPTHR1 (hellblau) in Gegenwart des Liganden PTH(15-34) (hellgrün). Der Ligand weist hier ebenfalls eine durchgängig helikale Struktur auf.

Diese durchgängig helikale Struktur des verkürzten PTH-Peptidhormons wird in allen bisher vorliegenden Kristallstrukturen mit und ohne nPTHR1 (54, 97) beschrieben. Alle bekannten NMR-Strukturen von PTH(1-34) (PDB-code: 1BZG; 1HPY; 1ZWA) (51, 52), PTH(1-37) (PDB-code: 1HPH; 1ZWC) (52, 53) und PTH(1-39) (PDB-code: 1BWX) (52) zeigen jedoch unter bestimmten Bedingungen eine flexible Region im Bereich der Aminosäuren 10-20 des Peptids. Dieses Verhalten konnte auch bei anderen Peptid-Liganden von Klasse B GPCRs, wie GLP-1 (115, 116) und Glukagon (117, 118), beobachtet werden.



**Abb. IV.3: NMR-Struktur von PTH(1-34).** Das Peptid liegt in Lösung ohne den Rezeptor oder die Anwesenheit von Lipiden oder organischer Substanzen, welche eine membranähnliche Umgebung simulieren, nicht als durchgängige Helix vor. Die Struktur zeigt einen flexiblen Bereich zwischen den Resten 10 bis 20 (grün), welcher zwei helikale Bereiche (gelb, hellblau) trennt. Der N- (rot) und C-Terminus (blau) liegt ebenfalls ungeordnet vor.

[PDB-Code: 1ZWC, (52)]

Für diese Ergebnisse werden die unterschiedlichen Vermessungs- bzw. Kristallisationsbedingungen angeführt. Offensichtlich lässt sich die  $\alpha$ -helikale Struktur der Peptide durch die

## IV Diskussion: Parathormon-Rezeptordomänen

---

Zugabe von Lipiden oder organischer Lösungen wie Trifluorethanol (119) induzieren, da diese Substanzen die Anwesenheit einer Membran imitieren. Die durchgängige  $\alpha$ -Helix wird außerdem bei der Bindung der Hormone an ihren Rezeptor beobachtet (94-97). Somit lässt sich die Konformation des PTH(1-37)-Peptids im Kristall mit der Anwesenheit der N-terminalen Rezeptordomäne und den Kristallisationsbedingungen erklären, da sich während der Kristallisation, wie Jin *et al.* argumentieren, die Lösungsmittelexposition des Peptids vermindert und somit eine membranähnliche Umgebung geschaffen wird (54). Möglich ist auch, dass die entstandenen Kristallkontakte zwischen den Peptidmolekülen eine Rolle bei der Ausbildung der durchgängig helikalen Struktur spielen.

Zusammen mit den Daten von Jin *et al.* (54) und Pioszak *et al.* (97) können mit der hier gelösten Kristallstruktur Aussagen über den Bindungsmodus und die Konformation des Liganden bei der Bindung an den Rezeptor getroffen werden. Das Modell der „*bent helix*“, welches nach der Aufklärung der NMR-Struktur von Marx *et al.* (52) aufgestellt wurde, wurde durch die Kristallstruktur von nPTHR1 in Anwesenheit von PTH(15-34) relativiert, da das Peptid als durchgängige Helix am Rezeptor gebunden vorliegt.

In der hier vorgestellten Struktur wurden zusätzlich zur Struktur von Jin *et al.* die drei C-terminalen Reste 35-37 kristallisiert, welche nicht Teil der Helix sind. Aus Literaturdaten wird ersichtlich, dass PTH(1-34) mit derselben Affinität an den PTH-Rezeptor bindet wie das Gesamt-Hormon PTH(1-84) (50). Dieses C-terminal verkürzte Peptid vermittelt auch die volle Aktivierung des Rezeptors (120). Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die Aminosäuren 35-84 des Peptids keine Rolle bei der Bindung an PTHR1 und der Aktivierung des Rezeptors spielen. Es gibt Literaturdaten, welche einen weiteren Rezeptor, den C-PTH-Rezeptor (121, 122), beschreiben, der ausschließlich den C-Terminus des PTH-Peptids bindet und ebenfalls an der Regulation des Kalzium- und Phosphathaushaltes beteiligt ist. Dieses könnte die nicht helikalen Reste 35-37 der hier präsentierten Struktur erklären. Da diese Reste nicht an der Bindung zum PTH-Rezeptor 1 beteiligt sind, könnten sie somit eine Gelenkregion zwischen der PTHR1- und der C-PTH-Rezeptor-Bindungsstelle darstellen, bzw. könnte die Tertiärstruktur dieses Peptidabschnittes erst durch die Anwesenheit des C-PTH-Rezeptors induziert werden.

### IV.3 Darstellung und Charakterisierung der Fusionsproteine

Mit der Herstellung eines Fusionsproteins aus nPTH1R1 und dem Liganden PTH(1-34) sollte ein stabiler 1:1 Rezeptordomäne-Ligand-Komplex gebildet werden, welcher dann für Kristallisationsversuche eingesetzt werden kann. Die Herstellung einer Rezeptor-Ligand-Chimere einer Klasse B GPCRs mit seinem Peptidliganden wurde bereits in der Dissertation von A. Bazasuren 2003 (99) beschrieben. Hier wurde ein Fusionsprotein aus der Liganden-bindenden Domäne des GLP1-Rezeptors und dem C-Terminalen Fragment des GLP-1 hergestellt, um eine verbesserte Löslichkeit des Proteins zu erhalten. Fusionsproteine, bei denen die Interaktionspartner mit unterschiedlichen Linkern verbunden sind, wurden auch von Robinson *et al.* 1998 (123) beschrieben. In diesem Fall wurden *Single-Chain*-Varianten des *Arv* Repressors im Hinblick auf eine Fusion mittels verschiedener Linker in verschiedenen Längen näher untersucht.

Idealerweise sollte ein Komplex aus Rezeptor und Ligand eine höhere thermodynamische Stabilität aufweisen, des Weiteren sollte das Fusionsprotein in höheren Konzentrationsbereichen stabil bleiben und weniger Aggregation zeigen als die N-terminale Domäne ohne Ligand. Die Variation der Linker-Länge um zwei Aminosäuren sollte zeigen, ob ein längerer oder kürzerer Linker zu besseren Ergebnissen und somit zu einem stabileren Komplex führt.

#### IV.3.1 Die native Struktur der Fusionsproteine

Nach der erfolgreichen Produktion der gereinigten Fusionsproteine im großen Maßstab war es von grundlegender Bedeutung, die native Konformation dieser Proteine nachzuweisen, da nur diese Konformation für die Strukturaufklärung der Proteine relevant ist. Um die korrekte Faltung der Fusionsproteine nachzuweisen, wurden zur näheren Untersuchung der Sekundärstruktur der rückgefalteten Proteine Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen. Durch den fusionierten Liganden PTH(1-34), welcher als  $\alpha$ -Helix vorliegt, sind für die Fusionsproteine größere  $\alpha$ -helikale Anteile zu erwarten. Ein Vergleich der CD-Spektren des nativen nPTH1R1 und der beiden renaturierten Fusionsproteine nPTH1R1-(GS)12-PTH(1-34) und nPTH1R1-(GS)14-PTH(1-34) machte deutlich, dass die Fusionsproteine eine unterschiedliche Ausprägung an Sekundärstrukturelementen aufweisen.

## IV Diskussion: Parathormon-Rezeptordomänen

---

NPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) wies einen 22,8 %ig größeren  $\alpha$ -helikalen Anteil auf, was den Erwartungen durch die Fusion mit dem Liganden entsprach. Der etwas erhöhte Anteil an ungefaltetem Protein kann auf die Anwesenheit des flexiblen Glycin-Serin-Linken zurückgeführt werden. Der Anteil von  $\beta$ -Faltblattbereichen und *loop*-Regionen blieb nahezu konstant.

Aufgrund der schlechten Auswertbarkeit der Daten von nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) konnte hier lediglich eine Überlagerung der Spektren von nPTHR1, nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) und nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) für strukturelle Aussagen herangezogen werden. NPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) scheint einen etwas geringeren Anteil an Sekundärstrukturelementen aufzuweisen als nPTHR1 oder auch nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34), dies kann auf den verlängerten Glycin-Serin-Linker und die damit verbundene erhöhte Flexibilität des Proteins zurückgeführt werden. Es ist denkbar, dass durch den längeren Linker die intramolekulare Bindung des Liganden zum Rezeptoranteil nicht so ausgeprägt ist und deshalb die gesamte Proteinstruktur destabilisiert wird. Zusammenfassend weisen alle drei untersuchten Proteine einen deutlichen Unterschied zwischen den Spektren der nativen und denaturierten Zustände auf. Das zeigt, dass sich Sekundärstrukturen während der Renaturierung ausgebildet haben. Da das Spektrum von nPTHR1 den Literaturdaten entsprach, kann aufgrund der Ähnlichkeit des Spektrums zu denen der Fusionsproteine davon ausgegangen werden, dass die Fusionsproteine genau wie nPTHR1 in ihrer nativen Konformation vorliegen.

Zum Nachweis einer nativen Konformation und einer erhöhten Stabilität im Vergleich zur freien Rezeptordomäne wurde die thermische Stabilität der Proteine mittels DSC-Messungen bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Ein Vergleich der Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der Proteine bei den gemessenen pH-Werten zeigte, dass das Fusionsprotein nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34) höhere  $T_m$ -Werte unter verschiedenen pH-Werten aufweist als nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34). Die Schmelztemperaturen von nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) liegen zwischen denen von nPTHR1 und dem Fusionsprotein mit dem 12-Aminosäure-Linker. Eine Ausnahme bildet pH 5,5. Dort sind die Schmelztemperaturen von nPTHR1 und nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) nahezu identisch. Dieser Wert entspricht gleichzeitig dem pH-Wert, bei dem nPTHR1 sein Optimum an thermischer Stabilität unter den gewählten Messbedingungen erreicht.

Die DSC-Messungen zeigen, dass durch die Fusion der Rezeptordomäne mit dem Peptidliganden eine Verbesserung der thermischen Stabilität des Proteins erreicht werden konnte. Dabei spielt die Länge des Linkers eine Rolle. Das Fusionsprotein mit dem kürzeren Linker (12 Aminosäuren) weist die höchste thermische Stabilität unter den vermessenen Puffer- bzw. pH-Bedingungen auf. NPTHR1-(GS)14-PTH(1-34) scheint durch den längeren 14-Aminosäure-Linker etwas destabilisiert zu werden, was auch die CD-Ergebnisse nochmals verdeutlichen.

## IV Diskussion: Parathormon-Rezeptordomänen

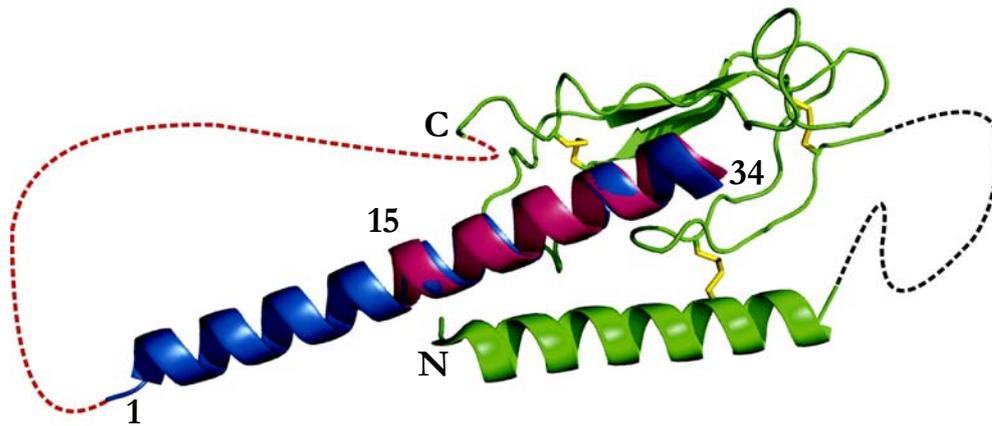
---

Die Erhöhung der thermischen Stabilität der Fusionsproteine bei gleichzeitiger Ausbildung der charakteristischen Sekundärstruktur von nPTH1 kann auf die Ausbildung von intra- bzw. intermolekularen Bindungen zurückgeführt werden. Dass in diesem Fall die intramolekulare Bindung wahrscheinlicher ist, zeigen die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation. Diese ergaben für die gewählten Proteinkonzentrationen eine monomere Spezies. Eine intramolekulare Bindung des fusionierten Liganden ist nur dann möglich, wenn die Rezeptordomäne in ihrer nativen Struktur vorliegt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Fusionsproteine in ihrer nativen Konformation vorliegen.

Mit Hilfe der ITC-Messungen sollte die intramolekulare Bindung des Liganden PTH(1-34) an die fusionierte Rezeptordomäne nPTH1 der Fusionsproteine nachgewiesen werden. Bei der freien N-terminalen Domäne ergibt eine Titration mit freiem Liganden eine 1:1-Stöchiometrie bei einem  $K_D$ -Wert von  $\sim 3-4 \mu\text{M}$ . Für die Fusionsproteine sollte aufgrund der intramolekularen Bindung idealerweise keine Bindung an freien Liganden nachzuweisen sein.

Die entsprechenden ITC-Messungen ergaben, dass nur ein geringer Teil (1 - 6 %) des Fusionsproteins noch in der Lage ist freien Liganden zu binden. Dies weist darauf hin, dass der Großteil des Proteins eine stabile intra- oder intermolekulare Bindung eingeht und lediglich ein geringer Prozentsatz der Bindestellen in einer ungebundenen Konformation vorliegt. Die Ausbildung einer intramolekularen Bindung ist hierbei am wahrscheinlichsten, da die Fusionsproteine, wie auch die Daten der analytischen Ultrazentrifugation gezeigt haben, in dem Konzentrationsbereich als monomere Spezies vorliegen. Somit ist die lokale Konzentration an fusioniertem Ligand höher und eine intramolekulare Bindung ist begünstigt.

Anhand der nPTH1-Kristallstruktur (97) lässt sich durch eine Überlagerung des gebundenen PTH(15-34) mit PTH(1-34) die Struktur des Linker-Konstruktes simulieren. In der in Abbildung IV.4 dargestellten Simulation kann man die nötige Länge eines Linkers zwischen dem C-Terminus der HBD und dem N-Terminus des Peptides abschätzen. Der direkte Abstand des C-Terminus von nPTH1 aus der Kristallstruktur und dem N-Terminus des Peptids beträgt ca. 35 Å. Die Länge des ausgestreckten 12-Aminosäurelinkers allein beträgt ca. 28,8 Å. In der publizierten Kristallstruktur fehlen allerdings 17 C-terminale Reste der HBD, welche im Fusionsprotein nPTH1-(GS)12-PTH(1-34) vorhanden sind. Nimmt man nun die Länge dieses 17-Aminosäure-Peptides zu der Länge des 12-Aminosäurelinkers hinzu, kommt man auf eine Gesamtlänge von ca. 69 Å. Das Peptid hat also im Fusionskonstrukt ausreichend Spielraum, um eine intramolekulare Bindung mit der Rezeptordomäne einzugehen.



[PDB-Code: 3C4M, (97)]

**Abb. IV.4: Modell des Fusionskonstruktes nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34).** Die Kristallstruktur von PTH(1-34) (blau) wurde über die Struktur des an nPTHR1 (grün) gebundenen PTH(15-34) (rosa) gelegt. Der in der vorliegenden Kristallstruktur fehlende flexible *loop* zwischen den Aminosäuren 57 und 105 von nPTHR1 wurde mit einer schwarzen Strichlinie angedeutet. Die Position des Glycin-Serin-Linkers zusammen mit den zusätzlichen Resten des C-Terminus von nPTHR1 im Linkerkonstrukt wurde mit der roten Strichlinie simuliert. Die Länge dieser Verbindung beträgt bei einer unstrukturierten Anordnung der betreffenden Reste ca. 69 Å, während der direkte Abstand des N-Terminus des Peptides zum C-Terminus von nPTHR1 der Kristallstruktur lediglich 35 Å beträgt. Das Peptid kann also in der korrekten Orientierung an der fusionierten Rezeptordomäne binden. Gelb: Disulfidbrücken

### IV.3.2 Ein Fusionsprotein als Kandidat für Kristallisationsversuche

In allen vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die bis zur Homogenität gereinigten Fusionsproteine mit großer Wahrscheinlichkeit in ihrer nativen Konformation vorliegen. Des Weiteren zeigten die Proteine eine erhöhte thermische Stabilität bei verschiedenen pH-Werten und wiesen eine intramolekulare Bindung auf. Bei der Stabilität der hier verwendeten Proteine spielt jedoch die Länge des Linker eine Rolle, wie bereits von Robinson *et al.* (123) für die *Single-Chain*-Varianten des *Arv* Repressors beschrieben. Doch während bei Robinson *et al.* die Verwendung längerer Linker von bis zu 19 Aminosäuren als günstig erschienen, stellte sich in der hier vorliegenden Arbeit der kürzere Linker als der Bessere heraus, da hier mit dem Linker aus 12 Aminosäuren die höchste thermische Stabilität erreicht werden konnte. Dass auch die Beschaffenheit des Linkers gut gewählt wurde, zeigt ein Vergleich mit den Ergebnissen von Bazarsuren 2003 (99). Hier wurde bei der Fusion des GLP1-Rezeptors mit seinem Liganden ebenfalls ein 12 Aminosäure langer Linker verwendet, welcher aus einer Kombination von Serinen und Prolinen bestand. Für dieses Fusionskonstrukt konnte keine Verbesserung der Stabilität und Löslichkeit erreicht werden, da der Linker durch die eingeführten Proline

## IV Diskussion: Parathormon-Rezeptordomänen

---

augenscheinlich zu unflexibel war, um intramolekulare Wechselwirkungen der Fusionspartner zu erlauben. Der hier verwendete Glycin-Serin-Linker weist eine wesentlich höhere Flexibilität auf und auch bei Robinson *et al.* erwies sich der flexiblere Glycin-Serin-Linker als geeigneter.

Die erhöhte Proteinstabilität und die verbesserte Löslichkeit von nPTHr1-(GS)12-PTH(1-34), welche sich auch im Erreichen höherer Proteinkonzentrationen zeigten, lassen das Protein als geeigneten Kandidaten für die Kristallisation erscheinen.

Leider waren alle durchgeführten Kristallisationsversuche mit dem Fusionsprotein nPTHr1-(GS)12-PTH(1-34) bisher erfolglos. Für dieses Ergebnis können verschiedene Gründe in Frage kommen. Zum Einen könnte die Heterogenität der vorliegenden Probe ein mögliches Problem sein, was sich im Vorhandensein eines geringen Anteils einer Spezies zeigt, welche offensichtlich keine Bindung zwischen der Rezeptordomäne und fusioniertem Liganden aufweist. Diese Spezies zeigt eine geringere thermische Stabilität bei niedrigen Konzentrationen, ist aber in der Lage freien Liganden zu binden. Dies weist darauf hin, dass der Rezeptoranteil dieser Spezies trotzdem in einer nativen Konformation vorliegt. Der Peptidanteil scheint aber, evtl. verursacht durch C-terminalen Abbau, nicht intakt zu sein. Dieser Anteil der Probe könnte unter Umständen ein gleichmäßiges Kristallwachstum verhindern. Zum Anderen zeigen die Daten der analytischen Ultrazentrifugation, dass sich bei den für die Kristallisation benötigten Konzentrationen zunehmend Multimere ausbilden. Dies kann durch die Ausbildung inter-molekularer Bindungen erklärt werden, da bei höheren Konzentrationen auch die lokale Konzentration des fusionierten Liganden von Nachbarmolekülen ansteigt. Somit nimmt die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von intermolekularen Bindungen zu. Für die Ausbildung derartiger Wechselwirkungen sind nun diverse Kombinationen im Bereich von Dimeren bis längeren, fast kettenartigen Gebilden möglich, was zu einer sehr hohen Heterogenität führt. Andererseits könnten derartige Bindungen auch zur Ausbildung von Kristallisationskeimen führen, was hier aber leider nicht der Fall war.

Des Weiteren spielt bei der Kristallisation von Proteinen immer die Flexibilität des Proteins eine kritische Rolle. Die N-terminale Domäne allein besitzt bereits sehr viele flexible Bereiche, welche hauptsächlich durch die drei konservierten Disulfidbrücken stabilisiert werden. Besonders hervorzuheben sei hier die bereits erwähnte *loop*-Region zwischen Q57 und E105. Durch die Fusion des Proteins mit dem Peptid-Liganden konnte zwar eine Stabilisierung des Proteins und auch eine verbesserte Löslichkeit erreicht werden, dennoch wurde mit dem Glycin-Serin-Linker noch zusätzlich ein weiterer flexibler Bereich eingefügt, welcher bei der Kristallisation störend sein könnte.

Dass die Flexibilität der *loop*-Regionen eine große Rolle bei der Kristallisation spielt, wurde auch in der Struktur von Pioszak *et al.* 2008 (97) deutlich (siehe auch IV.1). Hier konnte nPTHr1 zwar kristallisiert werden, dafür war aber ebenfalls die Herstellung eines Fusionsproteins nötig. In

diesem Fall wurde das stabile und globuläre Maltosebindeprotein (MBP) als Fusionspartner genutzt. Durch die Anwesenheit des MBP konnte eine stabile und homogene Packung des Kristalls erreicht werden. Allerdings weist selbst diese Struktur undefinierte Bereiche auf, da die flexible *loop*-Region zwischen Q57 und E105 auch hier nicht aufgelöst werden konnte.

### IV.4 Herstellung von nPTHR2

Durch die Probleme bei der Kristallisation von nPTHR1 und des Fusionsproteins, wurde als weiteres Projekt basierend auf der hohen Sequenzhomologie die zweite humane Parathormon-Rezeptordomäne bearbeitet. Diese Domäne ist kleiner und kompakter als nPTHR1. Ihr fehlt außerdem die für nPTHR1 beschriebene lange und flexible *loop*-Region (siehe auch Abb. III.18).

Die Renaturierung und Reinigung von nPTHR2 konnte nicht analog zu nPTHR1 gestaltet werden, da das Protein in nPTHR1 analogen Puffern nicht in Lösung gehalten werden konnte. Durch die Erhöhung der Guanidinhydrochlorid-Konzentration während der Solubilisierung der *inclusion bodies* und durch Zugabe des Detergenz Brij-78 während der Renaturierung konnte eine lösliche Proteinspezies erhalten werden, welche sich bis zur Homogenität reinigen lies.

Das Projekt wurde nach der Entwicklung des beschriebenen Renaturierungs- und Reinigungsprotokolls an Mohanraj Gopalswamy, AG Prof. Balbach, MLU Halle übertragen. Dort zeigten sich nach ersten CD-Messungen Hinweise auf die Ausbildung einer Sekundärstruktur und die Bindung an den *in-vitro*-Liganden PTH(1-37). Allerdings konnten die Daten auf Grund sehr schlechter Datenqualität nicht weiter ausgewertet werden. Diese ist wahrscheinlich auf die Anwesenheit des Detergenz zurück zu führen, welches während der Reinigungsschritte nicht zu entfernen gewesen ist.

### IV.5 Ausblick

In dieser Arbeit gelang es ein stabiles Rezeptor-Liganden-Fusionsprotein zu erzeugen, welches für Kristallisationsversuche zum Einsatz kommen kann. In letzter Zeit konnten einige Erfolge auf dem Gebiet der Strukturaufklärung von Hormonbindedomänen der Klasse B GPCRs verzeichnet werden (94-98, 112, 113). Aus den erhaltenen Daten konnten wichtige Einblicke in die Bindung und Orientierung der Peptidhormone an ihren Rezeptoren gewonnen werden (114). Von Interesse bleiben aber weiterhin Fragen zur Spezifität der Rezeptoren zu ihren Liganden und zur Dynamik der extrazellulären Domänen bzw. der Gesamtrezeptor während der Ligandenbindung und Signalweiterleitung. Daher stellt sich als neues Ziel die Aufklärung der Strukturen von Gesamtrezeptoren der Klasse B GPCRs in den Fokus der Forschung. Als möglichen Ansatz zum Erreichen dieses Ziels könnten die Strategien, welche bei der Kristallisation von Klasse A GPCRs verwendet wurden, zugrunde gelegt werden. Hier stellte sich z.B. ebenfalls die Herstellung von Fusionsproteinen, in dem Fall mit T4-Lysozym, als günstig heraus (19, 124). Die Fusion diente, genau wie in der vorliegenden Arbeit und den Veröffentlichungen von Pioszak *et al.* (97, 113), der Stabilisierung der flexiblen Proteinstruktur und führte durch vermehrte Kristallkontakte zu besser streuenden Proteinkristallen. Einen weiteren Ansatz liefern Kristallstrukturen der Klasse A GPCRs bei denen Fab5-Antikörperfragmente zur Stabilisierung des Rezeptors verwendet wurden (18, 125). Auch die Kristallisation von Komplexen bestehend aus Rezeptor und G-Protein wären denkbar, um die Signalweiterleitung nach Ligandenbindung darzustellen. Kürzlich wurde die Struktur des Rhodopsins in Anwesenheit des mit dem Rezeptor interagierenden Peptids eines  $G\alpha$ -Proteins veröffentlicht (17), welche als erste GPCR-Struktur die G-Protein gebundene Konformation repräsentiert. Nach dem Vorbild der Klasse A Rezeptoren sollte nun auch die Aufklärung der Strukturen der Klasse B Gesamtrezeptoren möglich sein.





**Teil 2: Strukturelle Untersuchungen der**  
**L-Glutamin:Glykosyl-Paromamine-3''-**  
**Aminotransferase TobS2**

# 1 Einleitung

## 1.1 Aminoglycosid-Antibiotika

Aminoglykosid-Antibiotika (AGA) wirken *in vitro* gegen eine Reihe medizinisch und pathophysiologisch bedeutsamer gram-negativer Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., und *Pseudomonas* spp., sowie gegen *Staphylococcus aureus* und einige Streptokokken-Arten (126). Als erstes AGA wurde 1944 das Streptomycin (127) als Mittel gegen Tuberkulose (*Mycobacterium tuberculosis*) entdeckt. Es stellt auch heute noch in Kombination mit anderen Arzneimitteln ein Mittel der ersten Wahl bei der Bekämpfung resistenter Tuberkulose-Stämme dar (126). AGA zeigen außerdem Wirkung gegen lebensbedrohliche Erreger, wie *Yersinia pestis*, dem Erreger der Lungen- und Beulenpest, *Francisella tularensis*, welches die tödlich verlaufende Tularämie bei Nagern auslöst, und *Brucella* spp., dem Erreger der Brucellose (z.B. Maltafieber) bei Nutztieren und beim Menschen (126).

Wie bei allen bekannten Antibiotika ist auch das Wirkungsspektrum der AGA recht unterschiedlich. Generell haben neuere AGA wie Gentamicin, Tobramycin, Amikacin, Netilmicin, Dibekazin und Arbekazin ein breiteres Wirkungsspektrum als ältere Vertreter, wie Streptomycin oder Kanamycin. Aber auch innerhalb der neueren AGA gibt es Unterschiede. Gentamicin ist beispielsweise wesentlich wirksamer gegen *Serratia*-Bakterien als Tobramycin, welches hingegen eine überlegene Wirkung gegen *Pseudomonas aeruginosa* aufweist (126). Das größte bekannte antibakterielle Wirkungsspektrum weist Arbekacin auf, welches z.B. gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme zum Einsatz kommt (128). Am häufigsten erfolgt die Gabe von AGA parenteral über Injektionen. Es existieren aber auch alternative Darreichungsformen, wie z.B. Tobramycin oder Gentamicin als Inhalat, was als Alternative zur traditionellen Therapie und zur Prophylaxe bei Infektionen des respiratorischen Trakts, z.B. bei Mukoviszidose-Patienten zum Einsatz kommt (126). Weitere Alternativen findet man mit der Entwicklung Liposom-verkapselter AGAs, welche sowohl in der lokalen Anwendung als auch bei der intravenösen Gabe eine Rolle spielen (126).

# 1 Einleitung: Struktur der Aminotransferase TobS2

## Strukturelle Klassifizierung:

Aminoglycosid-Antibiotika bestehen aus einem Zuckeranteil (Glycon) und einem Nicht-Zuckeranteil (Aglycon). Sie können aufgrund der Beschaffenheit ihres Aglycons in zwei Klassen unterteilt werden: Der rote Kreis in den folgenden Abbildungen markiert jeweils die Position 2 des Aglycons, anhand derer die beiden Klassen unterschieden werden.

### 1. voll substituierte Aminocyclitol-Streptamin-Familie

Das Aglycon weist an jedem Kohlenstoff eine OH-Gruppe oder einen anderen Rest auf.

z.B.: Streptomycin, Fortimicin

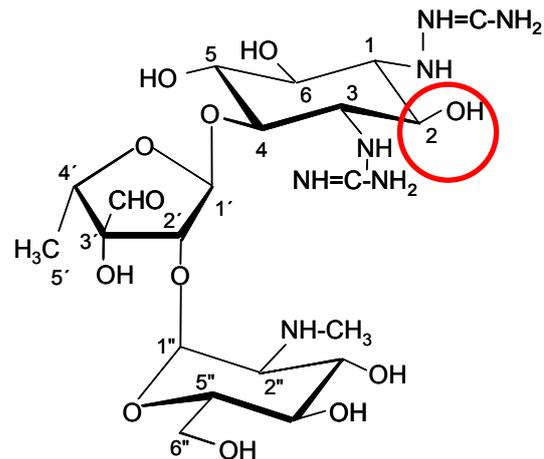


Abb. 1.1: Streptomycin ist eine Vertreter der voll substituierten AGA.

### 2. 2-Deoxystreptamin-Familie (2-DOS-AGA)

Das Aglycon ist an Position 2 deoxygeniert. Diese Familie kann wiederum je nach den Positionen der o-glycosidischen Bindungen zwischen dem Aglycon und den Glyconen in mehrere Subklassen unterteilt werden:

- 4,5-disubstituierte 2-DOS-Subklasse: z.B.: Butirosin, Neomycin, Paromomycin

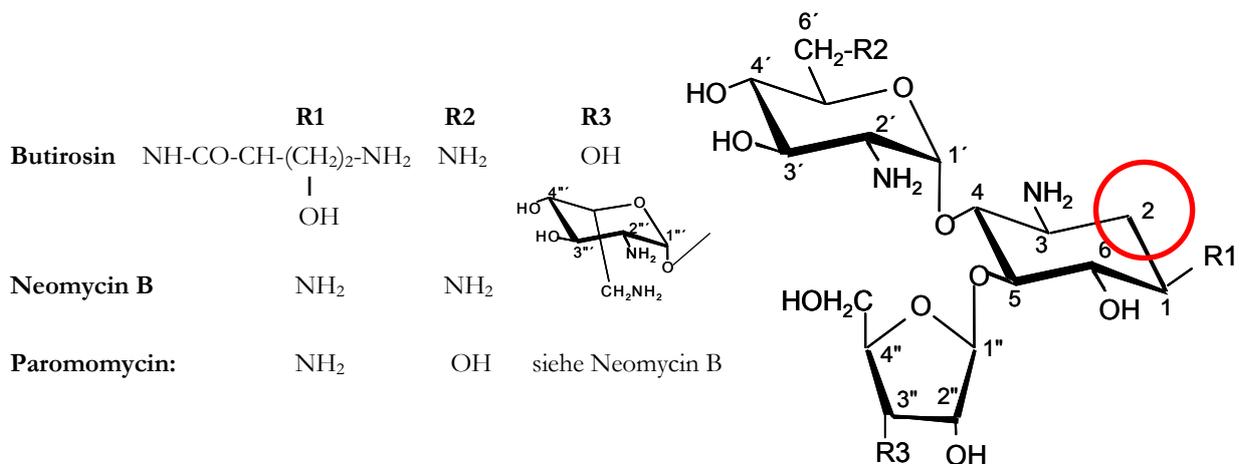


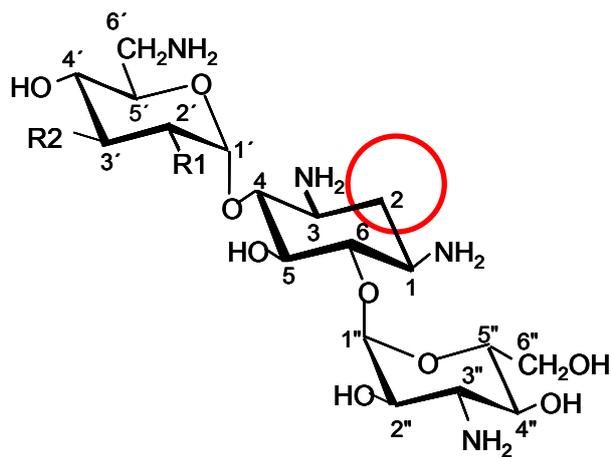
Abb. 1.2: 4,5-disubstituierte AGA besitzen an Position 4 und 5 des Aglycons 2-Deoxystreptamin O-glycosidische Bindungen zu zwei Glyconen, typische Vertreter sind Butirosin, Neomycin B und Paromomycin.

## 1 Einleitung: Struktur der Aminotransferase TobS2

- 4,6-disubstituierte 2-DOS –Subklasse: z.B.: Tobramycin, Kanamycin sowie Gentamycin

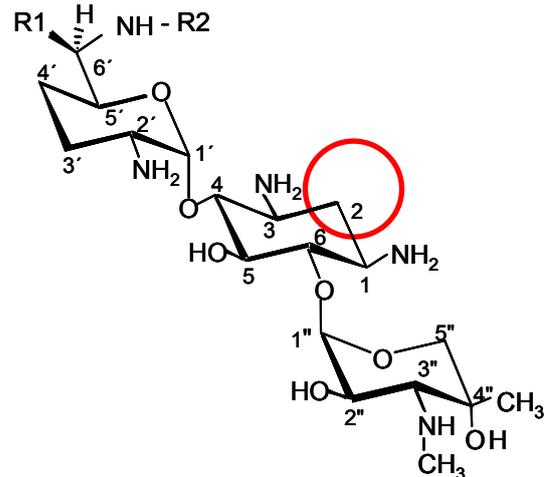
Die Kanamycin- und Gentamycin-produzierenden Biosynthesewege stellen zwei eng verwandte Gencluster dar, unter deren Vertretern eine hohe Sequenz- und funktionelle Homologie vorliegt. Der Tobramycin-produzierende Biosyntheseweg wird zur Familie der Kanamycin-Synthesewege gezählt, da die meisten enzymatischen Schritte, die Enzyme und Zwischenprodukte nahezu identisch sind.

Kanamycin-Familie



	R1	R2
Kanamycin A	OH	OH
Kanamycin B	NH <sub>2</sub>	OH
Tobramycin	NH <sub>2</sub>	H

Gentamycin-Familie



	R1	R2
Gentamycin C1	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Gentamycin C1a	H	H

**Abb. 1.3:** 4,6-disubstituierte AGA besitzen an Position 4 und 6 des Aglycons 2-Deoxystreptamin O-glycosidische Bindungen zu zwei Glyconen. Sie werden aufgrund der unterschiedlichen Substituierung der Glycone an den Positionen 3', 4', 6', 3'', 4'' und 5'' in die Kanamycin- und Gentamycin-Klasse unterteilt. Ein Vertreter der Kanamycin-Klasse ist Tobramycin.

- andere: z.B. 4-monosubstituierte 2-DOS-AGAs, wie z.B.: Apramycin

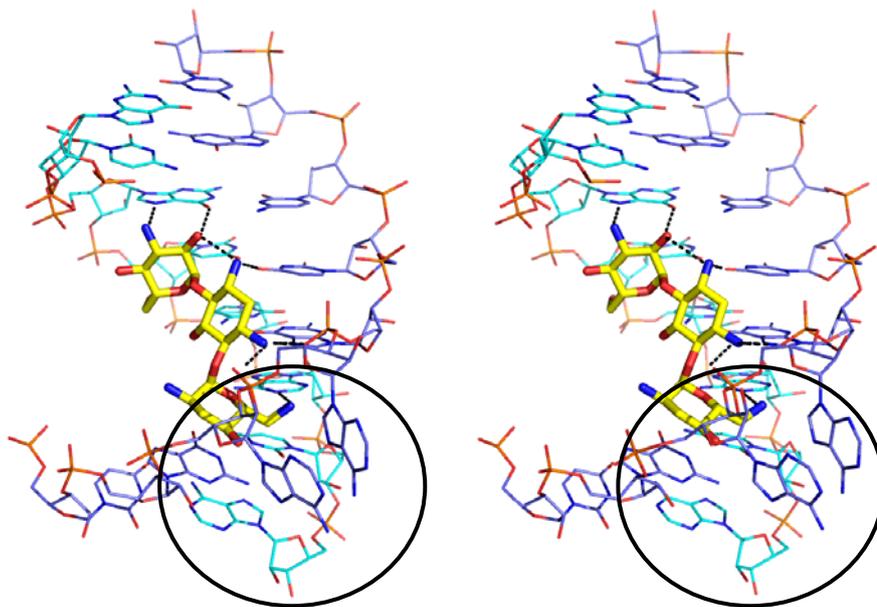
### **Wirkmechanismus:**

Die prinzipielle Wirkung der AGA beruht auf ihrer Bindung an das Bakterien-Ribosom und eine damit verbundene Inhibition der Proteinsynthese. Dank der Verfügbarkeit dreidimensionaler Strukturen der großen und kleinen ribosomalen Untereinheit und hochauflösenden Kristallstrukturen der 30S-Untereinheit des Bakterien-Ribosoms in Gegenwart verschiedener Aminoglycoside, wie Streptomycin, Spectinomycin, Paromomycin, Hygromycin B und Tobramycin (129-137) konnte der Wirkmechanismus näher beschrieben werden. Das bakterielle Ribosom besitzt drei funktionell wichtige tRNA-Bindestellen: die A- (Aminoacyl), P- (Peptidyl-)

## 1 Einleitung: Struktur der Aminotransferase TobS2

---

und E- (Exit-) Bindestelle (138). AGA binden und stabilisieren das dekodierende „on“-Stadium der A-Bindestelle (134, 136, 139-141), dabei interagiert das AGA vor allem durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen über seine Amino- und Hydroxylgruppen mit der Bakterien-RNA (136), wie Abbildung 1.4 am Beispiel des Tobramycin zeigt. Diese Bindestelle bildet einen molekularen Schalter zur Überwachung der korrekten Watson-Crick-Basenpaarung zwischen dem mRNA-Codon und dem tRNA-Anticodon. Wenn diese „Schalter“ nun durch die Bindung eines AGA permanent aktiviert bleibt („on“-Stadium) kann es zu Translationsfehlern kommen (142-145), was letztendlich zum Tod des Bakteriums führt.



[PDB-Code: 1LC4, (136)]

**Abb. 1.4: Stereobild der Bindung von Tobramycin an der A-Bindestelle ribosomaler RNA.** Die Bindung des AGA erfolgt hauptsächlich über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Amino- und Hydroxylgruppen des Tobramycins und des RNA-Stranges, angedeutet durch schwarze Strichlinien. Durch die Bindung des AGA ändert sich die Konformation einiger Basen (schwarzer Kreis), was das „on“-Stadium repräsentiert. Die Kohlenstoffatome der beiden RNA-Stränge sind in hellblau (Strang A) und mittelblau (Strang B) gekennzeichnet, Sauerstoffe werden rot, Stickstoffe dunkelblau und Phosphate orange dargestellt. Die Kohlenstoffatome von Tobramycin sind gelb eingefärbt.

### ***Resistenzentwicklung und Lösungsansätze***

Trotz ihrer hervorragenden antibakteriellen Wirkung muss der Gebrauch herkömmlicher AGA, wie auch der anderer Antibiotika, in der klinischen Praxis zunehmend eingeschränkt werden, da sich immer mehr und immer schneller resistente Bakterienstämme bilden. Für die Entwicklung von Resistenzen haben Bakterien verschiedene Möglichkeiten (126):

- Verringerung der Aufnahme und Akkumulation von AGA

## 1 Einleitung: Struktur der Aminotransferase TobS2

---

- chemische Modifikationen und Punktmutationen an der A-Bindestelle des Ribosoms können die Bindung von AGA verhindern
- einige Bakterienstämme entwickeln Enzyme, welche die AGA modifizieren und damit unwirksam machen
- Mechanismen werden entwickelt, welche ein schnelleres Ausschleusen von AGA ermöglichen.

Um dieses Problem zu umgehen, können Kombinationen verschiedener Wirkstoffe zum Einsatz kommen, welche an unterschiedlichen Bereichen in die Funktion der Bakterienzelle eingreifen oder modifizierende Enzyme hemmen. Dieser Ansatz war z.B. bei  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-resistenten Stämmen erfolgreich. Hier konnte ein Inhibitor gegen  $\beta$ -Lactamase, die Clavulansäure, entwickelt werden, welcher in Verbindung mit der Gabe von Amoxicillin gute Ergebnisse bei der Bekämpfung der resistenten Stämme erzielte (146, 147). Diese Methode erwies sich allerdings bei der Inhibition AGA-modifizierender Enzyme bisher als erfolglos (126). Im Falle der AGA wäre eine andere Herangehensweise, z.B. die Entwicklung und Verwendung modifizierter Aminoglycoside, eine Lösung (148-151). Die Entwicklung dieser Präparate basierte auf den zuvor gewonnenen Strukturinformationen (129-137). Durch die erlangten Kenntnisse über die mit der RNA interagierenden Gruppen der AGA können gezielt Mutationen eingeführt werden, welche zu einer höher affinen Bindung und einem neuen Bindungsmuster führen (149).

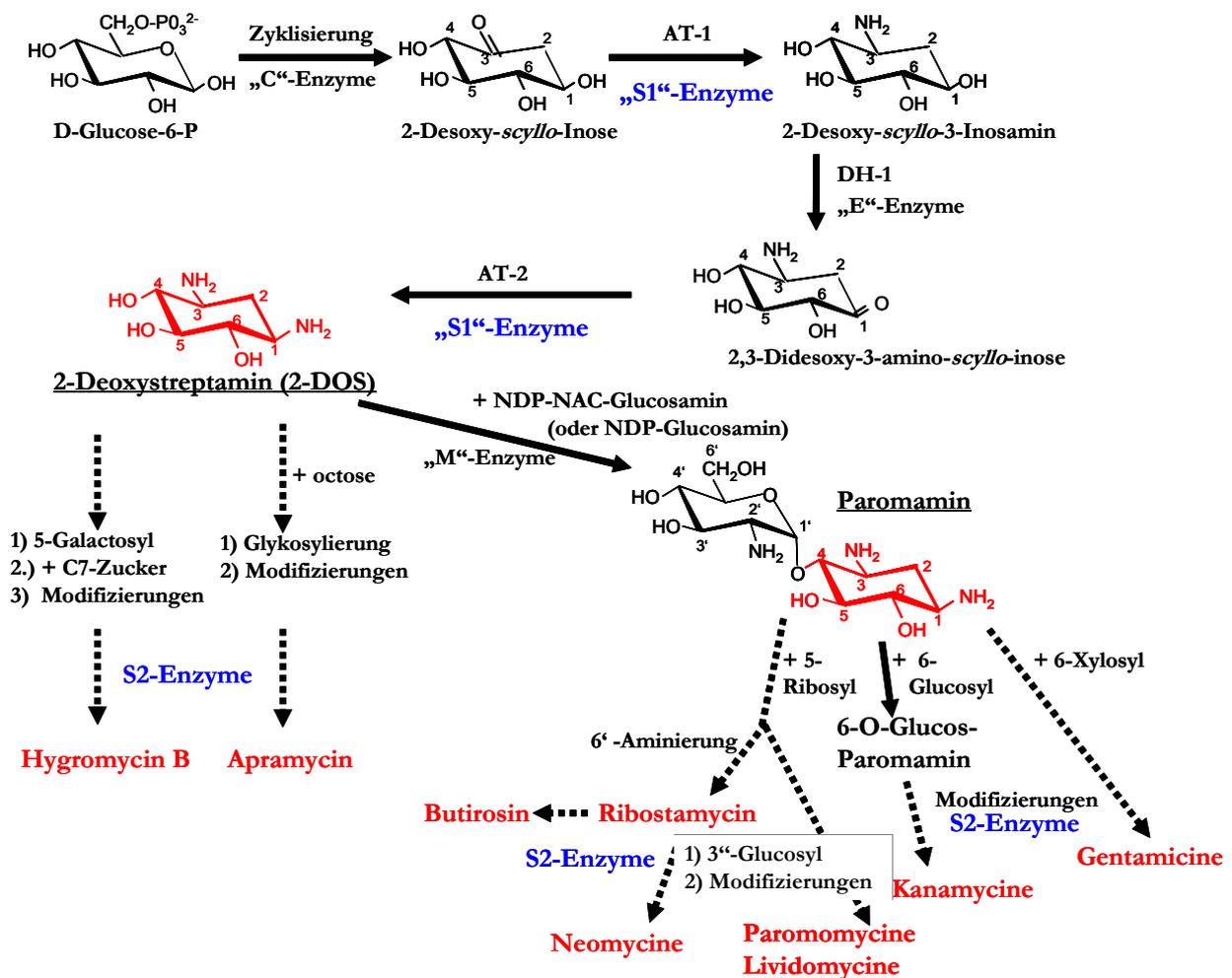
## 1.2 Produktion von 2-DOS-AGA im Wirtsorganismus

Hilfreich bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe können nicht nur detaillierte Kenntnisse über die Zielorganismen sein, sondern auch Informationen darüber, wie AGAs in den Wirtszellen produziert werden. Bis jetzt wurden ca. 15 AGA-produzierende Gen-Cluster verschiedener Bakterien, wie das Butirosin-produzierende Gen-Cluster aus *Bacillus circulans* oder das Apramycin, Tobramycin und Kanamycin B-produzierende Gen-Cluster aus *Streptomyces tenebrarius* identifiziert und sequenziert (152-155). Kanamycin produziert von *S. kanamyceticus* ist eines der meist verwendeten und am besten untersuchten AGA.

An der Produktion von Aminoglycosid-Antibiotika sind eine Reihe verschiedener Enzyme beteiligt. Den Hauptanteil bilden dabei Dehydratasen und Aminotransferasen. Zwei Klassen von Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP)-abhängigen Aminotransferasen, bezeichnet als „S1“- und „S2“-Enzyme, repräsentieren dabei eine wichtige Klasse von Enzymen der AGA-produzierenden Stoffwechselwege.

## 1 Einleitung: Struktur der Aminotransferase TobS2

S1-Aminotransferasen sind bifunktionell und verantwortlich für die Produktion des Aglycons 2-DOS. Dabei wird zunächst 2-Desoxy-*scyllo*-Inose zu 2-Desoxy-*scyllo*-3-Inosamin umgesetzt. Nach einem Dehydratase-Schritt setzt dasselbe S1-Enzym dann das erhaltene Produkt 2,3-Didesoxy-3-amino-*scyllo*-inosose zu 2-Desoxystreptamin (2-DOS) um (155). Ein Mitglied dieser großen Klasse von Aminotransferasen, BTrR, welches Teil des Butirosin-produzierenden Gen-Clusters in *Bacillus circulans* ist, wurde kürzlich im Komplex mit seinem Kofaktor PLP bzw. der Aminogruppen-gebundenen Form PMP kristallisiert (156).



[Abbildung modifiziert nach Piepersberg W. *et al*, 2007 (155)]

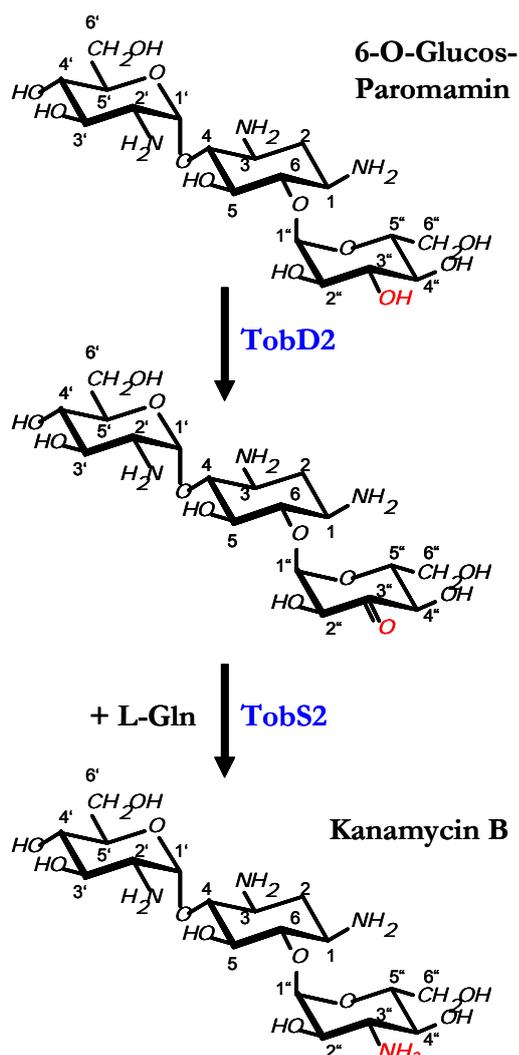
**Abb. 15: Vereinfachte Biosynthesewege ausgewählter AGAs.** Aus Glucose-6-Phosphat wird zunächst mit Hilfe der S1-Aminotransferasen 2-DOS gebildet. Daraus oder nach der Bildung der zweiten Vorstufe Paromamin wird dann mit Hilfe der S2-Aminotransferasen und anderen modifizierenden Enzymen das entsprechende AGA gebildet. Durchgehende Pfeile markieren eine Reaktion, gestrichelte Pfeile stehen für mehrere Reaktionsschritte verschiedener Enzyme. Das Aglycon 2-DOS und die produzierten AGA sind rot und die S1- und S2-Enzyme blau hervorgehoben.

## 1 Einleitung: Struktur der Aminotransferase TobS2

S2-Aminotransferasen sind eine kleinere monofunktionale Gruppe PLP-abhängiger Aminotransferasen, welche größere Substrate bestehend aus dem Aglycon 2-DOS und einem oder mehreren Zuckerresten umsetzen. Von dieser Klasse von Enzymen sind bis zum jetzigen Zeitpunkt keine dreidimensionalen Strukturen bekannt.

Abbildung 1.5 zeigt einen Überblick über einige Biosynthesewege ausgewählter AGA. Daraus wird deutlich, dass im Grunde zwei Wege zur Produktion von AGA führen. Zum einen wird das Antibiotikum direkt aus dem Aglycon durch Anfügen eines Zuckerrestes und Modifizierung gebildet. Zum anderen wird zunächst durch Anfügen eines NDP-Glukosamins eine zweite Vorstufe, das Paromamin, gebildet, welches dann zum eigentlichen Endprodukt umgesetzt wird.

### 1.3 Die S2- L-Glutamin:Glykosyl-Paromamine-3''-Aminotranferase TobS2



TobS2 ist eine S2-Aminotransferase aus *Streptomyces tenebrarius*, welche an der Produktion des 4,6-disubstituierte 2-DOS-AGA Tobramycin beteiligt ist. TobS2 selbst bildet eine wichtige Vorstufe des Tobramycin, das Kanamycin B, welches ebenfalls als AGA wirkt. In Abbildung 1.6 ist die Reaktion von TobS2 abgebildet. 6-O-Glucosparomamin wird zunächst an der 3''-Position durch die TobD2-Dehydratase dehydratisiert und anschließend findet die Aminierung der entstandenen Ketogruppe durch TobS2 statt.

**Abb. 1.6: Reaktionsschema von TobS2.** Nach einem Dehydratase-Schritt wird 6-O-Glucosparomamin durch die Aminotransferase TobS2 zu Kanamycin B umgesetzt. Dabei nutzt das PLP-abhängige Enzym L-Gln als Aminodonor. Die modifizierte 3''-Position ist rot markiert.

## 1 Einleitung: Struktur der Aminotransferase TobS2

Das PLP-abhängige Enzym nutzt dabei L-Glutamin (L-Gln) als Aminodonor. Als Endprodukte der Reaktion entstehen das bereits erwähnte Kanamycin B und  $\alpha$ -Ketoglutaramat aus L-Gln, welches spontan zu 2-Pyrrolidon-5-Hydroxy-5-Carboxylsäure zyklisieren kann. Die durch TobS2 angefügte Aminogruppe spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bei der Bindung des AGA an bakterieller ribosomaler RNA (136).

### 1.4 Problemstellung und Ziele

Die Sequenzidentität zwischen S1- und S2-Aminotransferasen ist sehr gering. TobS2 und TobS1 besitzen z.B. nur 41,4 % Sequenzidentität, während innerhalb der beiden Enzymklassen, wie Tabelle 1.1 zeigt, wesentlich höhere Sequenzidentitäten bestimmt werden können (siehe auch Abbildung 3.9). Trotz dieser deutlichen Sequenzunterschiede katalysieren beide Enzymklassen dieselbe Reaktion, nutzen aber dabei unterschiedliche Substrate. Die Struktur der S1-Aminotransferase BTrR wurde bereits gelöst (156). Diese Aminotransferase weist aber sowohl zu den S1- als auch den S2-Enzymen des Kanamycin-, Tobramycin- und Gentamycin-Genclusters, welche eng miteinander verwandt sind, nur geringe Sequenzhomologien zwischen 30 und 40 % auf. Dies lässt auf eine entferntere Verwandtschaft der Aminotransferasen des Buirosin-Genclusters zu den Aminotransferasen des Kanamycin-, Tobramycin- und Gentamycin-Genclusters schließen.

	TobS2	KanS2	GenS2	TobS1	KanS1	GenS1	BtrR
TobS2	100%	71,4%	64%	41,4%	38,3%	39,5%	31,7%
KanS2	71,4%	100%	60,6%	39,8%	36,5%	37,7%	30,1%
GenS2	64%	60,6%	100%	39,4%	35,9%	37%	32%
TobS1	41,4%	39,8%	39,4%	100%	75,4%	61,9%	40,2%
KanS1	38,3%	36,5%	35,9%	75,4%	100%	59,3%	39,3%
GenS1	39,5%	37,7%	37%	61,9%	59,3%	100%	38,6%
BtrR	31,7%	30,1%	32%	40,2%	39,3%	38,6%	100%

**Tab. 1.1: Vergleich der Sequenzidentitäten von S1- und S2-Aminotransferasen.** Innerhalb der beiden Klassen existieren für die Vertreter des Kanamycin-, Gentamycin- und Tobramycin produzierenden-Biosyntheseweges große Sequenzhomologien, während zwischen den beiden Klassen große Unterschiede bestehen. Die S1-Aminotransferase BtrR, deren Struktur bereits gelöst wurde, weist gegenüber allen aufgeführten Aminotransferasen des Kanamycin-, Tobramycin- und Gentamycin-Genclusters nur Homologien zwischen 30 und 40 % auf. Die Sequenzhomologien wurden mit Hilfe des LALIGN-Servers ([www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)) durchgeführt.

## 1 Einleitung: Struktur der Aminotransferase TobS2

---

Die Struktur des BTrR lieferte erste Einblicke in den Aufbau der Aminotransferasen der AGA-produzierenden Biosynthesewege. Allerdings gelang es lediglich Strukturen in Anwesenheit der Kofaktoren PLP und PMP zu lösen. Die Reste, welche im aktiven Zentrum an der Bindung der Substrate beteiligt sind, konnten nur postuliert werden.

Ziel dieses Abschnitts der vorliegenden Arbeit soll nun die Kristallisation des S2-Enzyms TobS2 in der Apo-Form und in Gegenwart des Kofaktors PLP sowie des Aminodonors L-Gln sein. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Dr. U. Wehmeier, Abteilung chemische Mikrobiologie, Uni Wuppertal ist bekannt, dass das Endprodukt des Biosyntheseweges aus *Streptomyces tenebrarius*, Tobramycin, als Inhibitor für TobS2 wirkt. Deshalb sollte TobS2 zusätzlich in Gegenwart von Tobramycin kristallisiert werden, um so die Bindungsmodalitäten des eigentlichen Substrates 6-O-Glucos-Paromamin genauer zu bestimmen und den Reaktionsmechanismus dieser Aminotransferasen besser verstehen zu können. Des Weiteren sollen die Unterschiede in der Substratspezifität von S1- und S2-Enzymen genauer beleuchtet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

L-Glutamin (L-Gln)	Sigma
Pyridoxal 5`-Phosphat Hydrat (PLP)	Sigma
Tobramycin Sulfatsalz (TM)	Sigma

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden bei den Firmen ICN, Sigma und Fluka bestellt und hatten den Reinheitsgrad p.a.. Zur Herstellung von allen Puffern und Lösungen wurde doppeltdestilliertes Wasser verwendet.

#### 2.1.2 Kristallisation-Kits:

<b>Name des Kits</b>	<b>Hersteller</b>
Factorial solutions 1-96	AG Stubbs, MLU, Halle (Saale)
Crystal Screen 1 + 2	Hampton Research, USA
Crystallization Basic Kit for Proteins	Sigma, Schweiz
Crystallization Extension Kit for Proteins	Sigma, Schweiz
Crystallization Low Ionic Kit for Proteins	Sigma, Schweiz
Crystallization Cryo Kit for Proteins	Sigma, Schweiz
Crystallization Basic Kit for Membrane Proteins	Sigma, Schweiz
JBScreen Bulk 1-10	Jena Bioscience GmbH, Deutschland

### 2.1.3 Geräte

Pipettier-Roboter (Cartesian Honeybee + Cartesian Software) Zinsser Analytic

Röntgendrehanodengenerator  
(Rigaku Micromax 007, Rigaku R-axis IV++ detector,  
Varimax HR optics + CrystalClear software) Rigaku

Alle weiteren verwendeten Geräte zählen zur Standardlaborausstattung oder werden an entsprechender Stelle erwähnt.

### 2.1.4 Programme

Cartesian Software (Zinsser Analytic)

CrystalClear software (Rigaku)

HKL2000 (157)

Mosflm (106)

XDS (158-160)

PHASER (161)

COOT (110)

CNS (162)

Refmac (108)

PHENIX (109)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Proteinexpression und -reinigung

TobS2 wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. U. Wehmeier, Abteilung chemische Mikrobiologie, Uni Wuppertal in *E. coli* DH5 $\alpha$  im Expressionsvektor pJoe2775TobS2 mit einem C-terminalen His-tag exprimiert. Nach dem Zellaufschluss wurde das Protein über eine NiNTA Agarose (Sigma) im *Batch*-Verfahren gereinigt. Das Protein wurde in einem Lagerpuffer bestehend aus 20 mM Tris/HCL pH 8,0 und 150 mM NaCl auf 50 mg/ml konzentriert und bei -20°C gelagert. Im gefrorenen Zustand wurde das Protein für Kristallisationsversuche für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### 2.2.2 Proteinkristallisation

Erste *Sitting drop*-Kristallisationsansätze wurden mit Hilfe des Pipettier-Roboters Cartesian Honeybee mit einer Tropfengröße von 200 nl im 96 *well*-Maßstab durchgeführt. Hierfür wurde das Protein sowohl in der gelieferten Konzentration von 50 mg/ml und in Lagerpuffer verdünnt mit 25 mg/ml eingesetzt. Für diese Versuche wurden alle oben genannten Kristallisations-Kits verwendet.

Die erhaltenen Kristalle konnten in 24 *well*-Platten in *hanging drop*-Kristallisationsansätzen mit einer Tropfengröße von 2  $\mu$ l bei einer Proteinkonzentration von 25 mg/ml reproduziert und verbessert werden.

Die Bedingungen, unter denen Proteinkristalle erhalten wurden, sind im Ergebnisteil aufgeführt.

### 2.2.3 Soaking-Experimente

Um Strukturen der Komplexe von TobS2 mit seinem Kofaktor PLP, dem Aminodonor L-Glutamin und/oder dem Endprodukt Tobramycin zu erhalten, wurden die TobS2-Kristalle in verschiedenen Lösungen dieser Interaktionspartner inkubiert. So sollte erreicht werden, dass die Kristalle diese Substanzen aufnehmen (*soaken*) und diese dann in Interaktion mit den TobS2-Molekülen im Kristall treten.

PLP und Tobramycin wurden in einer Konzentration von 250 mM eingesetzt, L-Glutamin in einer Konzentration von 500 mM. Sollten zwei oder gar alle drei Komponenten zum *soaken* verwendet werden, wurden diese aus den genannten Lösungen immer im Verhältnis 1:1 bzw. 1:1:1 gemischt. Die Interaktionspartner wurden alle im Reserviorpuffer des verwendeten Kristalls gelöst. Für jeden *soaking*-Versuch wurde immer ein TobS2-Kristall in einen 3 µl-Tropfen mit Kofaktor bzw. Substrat oder Endprodukt überführt. Die Kristalle wurden zwischen 30 s und 4 d im Tropfen inkubiert und anschließend vermessen oder im flüssigen Stickstoff gelagert.

### 2.2.4 Datensammlung und Strukturauswertung

Die erhaltenen Kristalle wurden ohne die Zugabe eines Kryoschutzes mit einem *loop* aufgenommen und anschließend auf dem Goniometerkopf eines Röntgendrehanodengenerators montiert und analysiert. Neben dem genannten Röntgengenerator wurde als weitere Röntgenquelle zur Analyse einiger Kristalle das Synchrotron in Berlin, BESSY-2, mit dessen *beamline* 14.1 genutzt, welches mit einem Mosaic MARCCD 225 mm-Detektor ausgestattet war. Alle Datensätze wurden durch die Vermessung eines Einzelkristalls erhalten. Es wurden kleine Oszillationsschritte zwischen 0,2 ° und 0,5 ° verwendet.

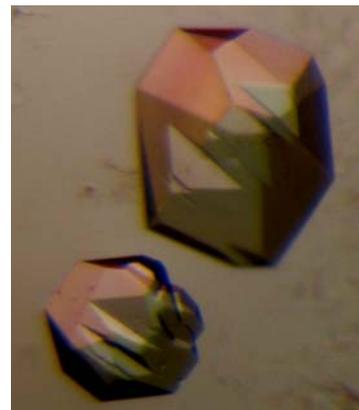
Die so erhaltenen Diffraktionsdatensätze wiesen alle unterschiedlich starke Anteile an verschiedenen, sich überlagernden Kristallschichten auf, was die Auswertung der Daten erschwerte. Deshalb wurden für die Indizierung, Integration, Skalierung und Reduktion der im Folgenden vorgestellten Datensätze unterschiedliche Programme, entweder HKL2000, Mosflm oder XDS verwendet. Die erste Kristallstruktur von TobS2-SO<sub>4</sub>, der Apo-Form von TobS2 mit einem Sulfation im aktiven Zentrum, wurde mittels *molecular replacement* durch Nutzung des Programms PHASER mit der PMP-gebundenen Form des Proteins BtrR (PDB-code: 2c81) (156) als Model gelöst. Da alle weiteren Strukturen isomorph zu TobS2-SO<sub>4</sub> waren, wurden diese mittels *Rigid body refinement* mit Hilfe des Programms Refmac5 aus dem CCP4-Programmpaket (108) unter Verwendung von TobS2-SO<sub>4</sub> gelöst. Die Strukturen wurden manuell im Programm COOT bearbeitet und gegen *simulated annealing (SA) omit maps* wie auch gegen SIGMAA *weighted difference Fourier maps*, welche mit CNS und später mit Refmac oder PHENIX erzeugt wurden, verifiziert. Als Arbeitsset (*working set*), aus welchem die späteren Modelle entstanden und sich Rwork aus Tabelle 3.2 ergab, wurden stets 95 % aller erhaltenen Daten eines Datensatzes verwendet. Als Testset, zur Überprüfung der Korrektheit des Modells, wurden 5 % der erhaltenen Daten verwendet. Diese Daten wurden bei den *refinement*-Schritten außen vor gelassen und werden durch Rfree in Tabelle 3.2 repräsentiert.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Kristallisation und *soaking*

Aus 672 verschiedenen Pufferbedingungen konnten in drei Fällen reproduzierbare Proteinkristalle erzeugt werden (Abb.3.1). TobS2 kristallisierte unter folgenden Bedingungen des Sigma *Crystallization Cryo Kit for Proteins*:

- #17: 170 mM Lithiumsulfat  
85 mM Tris-HCl (pH 8,5)  
25,5 % PEG 4000  
15 % Glycerol
- #15: 170 mM Ammoniumsulfat  
85 mM Na-Kakodylat (pH 6,5)  
25,5 % PEG 8000  
15 % Glycerol
- #30: 50 mM Imidazol-HCl (pH 7,0)  
20 % PEG 3350



**Abb. 3.1: TobS2-SO<sub>4</sub>-Kristalle.** TobS2 wurde mit 25 mg/ml eingesetzt. Die monoklinen Kristalle wuchsen im 96-well-Maßstab bei 200 nl Tropfengröße unter 170 mM Lithiumsulfat; 85 mM Tris-HCl (pH 8,5); 25,5 % PEG 4000; 15 % Glycerol und konnten im 24 Well-Maßstab bei 3 µl Tropfen-größe reproduziert werden.

Alle Kristalle konnten in den 24 Well-Maßstab reproduziert werden. Die am besten streuenden Kristalle zeigten eine monokline Form und wuchsen unter der Bedingung #17.

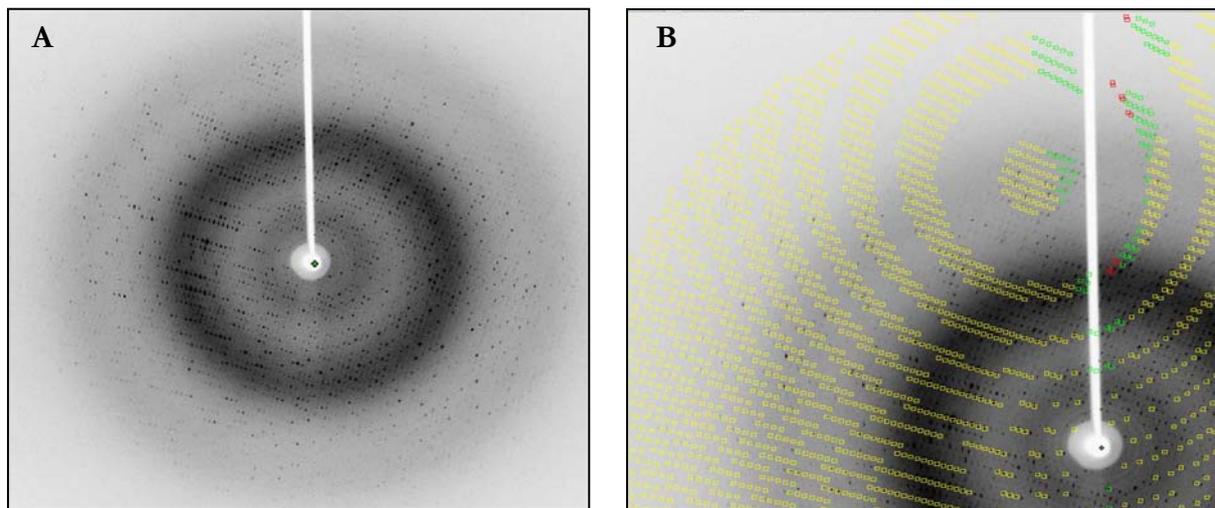
Diese Kristalle wurden auch für die *soaking*-Versuche verwendet. Beim *soaking* wurden die Kristalle in verschiedenen Lösungen, welche nur PLP oder eine Mischung aus PLP und L-Gln, PLP und Tobramycin oder allen drei Stoffen enthielten, inkubiert. Dabei spielte die Inkubationszeit in den einzelnen Lösungen (30 s - 4 d) keine Rolle für das spätere Ergebnis. Kristalle welche nur mit PLP oder PLP und L-Gln inkubiert wurden, wiesen z.T. kovalent gebundenes PLP oder nicht gebundenes PLP bzw. PMP auf. In einem Fall konnte der Aminodonor  $\alpha$ -Ketoglutaramat bzw. die zyklisierte Form des Reaktionsproduktes 2-Pyrrolidon-5-Hydroxy-5-Carboxylsäure (zyklGln) nachgewiesen werden. In Kristallen, welche mit PLP,

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

---

L-Gln und Tobramycin inkubiert wurden, konnte PLP und Tobramycin als Komplex nachgewiesen werden.

Alle untersuchten Kristalle wuchsen in der Raumgruppe P21 mit sehr ähnlichen Dimensionen der Einheitszelle. Sie wiesen durchweg mehrere überlagerte Kristallschichten auf, was in einigen Fällen dazu führte, dass der erhaltene Datensatz nicht ausgewertet werden konnte, da eine Indizierung, Integration, Skalierung und Reduktion der Daten trotz mehreren Versuchen mit unterschiedlichen Programmen nicht möglich war (Abbildung 3.2). Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der besten und aussagekräftigsten Datensätze näher erläutert.



**Abb. 3.2: Beispiel zur Indizierung eines typischen Diffractionsbildes.** **A** Hier wird ein nicht indiziertes Diffractionsbild eines Datensatzes gezeigt, welcher viele überlappende Kristallschichten aufweist. Die einzelnen Spots scheinen unscharf und teilweise vergrößert. **B** Die Indizierung der Daten mit dem Programm MOSFLM zeigte, dass ein sehr großer Anteil der erhaltenen Spots nicht zur gleichen Kristallebene gehörte und somit nicht Teil der verwendeten Daten war.

### 3.2 Statistiken zur Datensammlung und zum *Refinement*

In den folgenden Tabellen 3.1 und 3.2 werden alle wichtigen Parameter der einzelnen Datensätze aufgeführt. In allen Strukturen konnten einige Glycerolmoleküle aus dem Kristallisationspuffer gefunden werden. Des Weiteren wurden in zwei Strukturen Sulfationen und in einer Struktur (TobS2-PLP) 1,2-Ethandiol- und Ethanol-Moleküle identifiziert und dargestellt. Die Anzahl der Atome und die entsprechenden B-Faktoren dieser Moleküle sind ebenfalls in Tabelle 3.2 aufgeführt.

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

Datensatz	TobS2-SO <sub>4</sub>	TobS2-PLPg	TobS2-PLPGln	TobS2-PLPTM
soaking mit ...	-	PLP	PLP, L-Gln	PLP, TM
Röntgenquelle	BESSY	BESSY	Kupferanode	Kupferanode
<b>Datensammlung</b>				
Einheitszelle				
a, b, c (Å)	60,83; 100,85; 69,46	61,06; 101,01; 69,79	60,83; 100,68; 69,57	65,59; 100,89; 67,65
α, β, γ (°)	90; 92,65; 90	90; 92,882; 90	90; 92,79; 90	90; 94,13; 90
Bereich der Auflösung (Å)	29,41 - 1,70	30,0 - 1,5	30,0 - 1,73	30,0 - 1,38
I/σ(I)	18,44 (10,34)	10,14 (3,09)	17,97 (4,19)	12,16 (2,45)
Vollständigkeit (%)	96,2 (79,8)	93,4 (62,0)	98,1 (88,4)	93,9 (73,2)
Anzahl der Reflektionen				
gesamte Reflektionen	406938	578255	610990	747156
einmalige Reflektionen	88326	126021	85555	168650
Rmerge	6,1 (10,7)	8,5 (37,4)	7,8 (43,1)	6,1 (46,3)
Redundanz	4,61	4,59	7,14	4,43

**Tab. 3.1: Auswertestatistiken der TobS2-Datensätzen.** Alle Datensätze wurden mit einem Einzelkristall aufgenommen. Abkürzungen: TobS2-SO<sub>4</sub>: TobS2 mit SO<sub>4</sub>-Ion im aktiven Zentrum, TobS2-PLPg: TobS2 mit kovalenter Bindung zu PLP, TobS2-PLPGln: TobS2 mit ungebundenem PLP und L-Gln, TobS2-PLP-TM: TobS2 mit PLP gebunden an Tobramycin. In Klammern wurden die Werte der äußersten Auflösungsschale angegeben.

Datensatz	TobS2-SO <sub>4</sub>	TobS2-PLPg	TobS2-PLPGln	TobS2-PLPTM
Anzahl der Reflektionen (work/test)	81411 / 4523	119717 / 6301	81231 / 4276	151774 / 8433
Anzahl der Atome				
TobS2 (Molekül A / B)	3319 / 3319	3313 / 3302	3278 / 3237	3331 / 3363
PLP/PMP	-	30	31	30
Alanin / zyklGln (PHC)	-	-	15	-
Tobramycin	-	-	-	64
SO <sub>4</sub>	10	-	-	5
Glycerol	42	18	12	12
1,2-Ethandiol	-	12	-	-
Ethanol	-	15	-	-
Wasser	996	799	837	1083
<b>B-Faktoren</b>				
TobS2 (Molekül A / B)	14,56 / 16,57	17,37 / 18,2	15,99 / 15,77	16,56 / 18,58
PLP / PMP	-	16,1	16,54	12,35
Alanin / zyklGln (PHC)	-	-	29,94	-
Tobramycin	-	-	-	22,8
SO <sub>4</sub>	14,21	-	-	19,55
Glycerol	21,63	22,16	20,82	18,55
1,2-Ethandiol	-	25,97	-	-
Ethanol	-	28,18	-	-

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

Wasser	29,88	28,17	28,43	33,67
Durchschnittlicher B-Faktor	16,1	18,23	15,77	18,192
Rwork /Rfree (%)	17,3 / 21,6	25,6 / 28,9	18,96 / 24,35	16,26 / 19,66
RMS-Abweichung vom Ideal				
Bindungslänge (Å)	0,013	0,011	0,022	0,013
Bindungswinkel (°)	1,352	1,284	2,004	1,392

**Tab. 3.2: Refinement-Statistiken zu den TobS2-Datensätzen.** Es werden die Anzahl der Atome sowie die B-Faktoren für alle modellierten Moleküle jedes Datensatzes angegeben. Die erhaltenen Rwork- und Rfree-Faktoren weisen darauf hin, dass die erhaltenen Modelle gut die gemessenen Daten widerspiegeln. Abkürzungen: wie Tab. 3.1

Als weiteres Mittel zur Überprüfung der Datenqualität wurden von allen verwendeten Datensätzen Ramachandran-Plots mit dem Programm ProCheck aus der CCP4-Programmsammlung (108) erstellt. Die Ergebnisse werden in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Es befinden sich keine Reste in unerlaubten Regionen.

Datensatz	Aminosäuren in der Kernregion	Aminosäuren in erlaubten Regionen	Aminosäuren in generell erlaubten Regionen	Aminosäuren in verbotenen Regionen
TobS2-SO <sub>4</sub>	639	70	2	0
TobS2-PLPGln	630	78	2	0
TobS2-PLPg	637	71	2	0
TobS2-PLP-TM	637	71	3	0

**Tab. 3.3: Ergebnisse der Ramachandran-Analyse.** Die Analyse wurde mit dem Programm Procheck durchgeführt. Hier wurde die Anzahl der Aminosäuren, welche sich in den entsprechenden Regionen befinden für jeden Datensatz dokumentiert. Die Konformationen aller Aminosäuren befinden sich in erlaubten Regionen.

Eine Analyse der B-Faktoren für jede Aminosäure gibt Aufschluss über die Qualität der hier präsentierten Struktur von TobS2 und darüber wie gut die erhaltene Dichte für jede einzelne Aminosäure definiert ist, bzw. wie flexibel eine Aminosäure oder ein bestimmter Bereich des Proteins ist. Diese Analyse wurde mit dem Programm B-average (Bestimmung der B-Faktoren für jede Aminosäure) aus der CCP4-Programmsammlung durchgeführt. Um zu bestimmen, ob TobS2 bei der Bindung der unterschiedlichen Substrate bzw. des Kofaktors unterschiedliche oder alternative Konformationen einnehmen kann, bzw. ob bestimmte Bereiche des Proteins stabilisiert oder destabilisiert werden, wurden die B-Faktoren für die Hauptkettenanteile jeder Aminosäure ermittelt. Diese wurden in den Abbildungen 3.3 - 3.6 gegen den entsprechenden Aminosäurerest aufgetragen.

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

Abb. 3.3

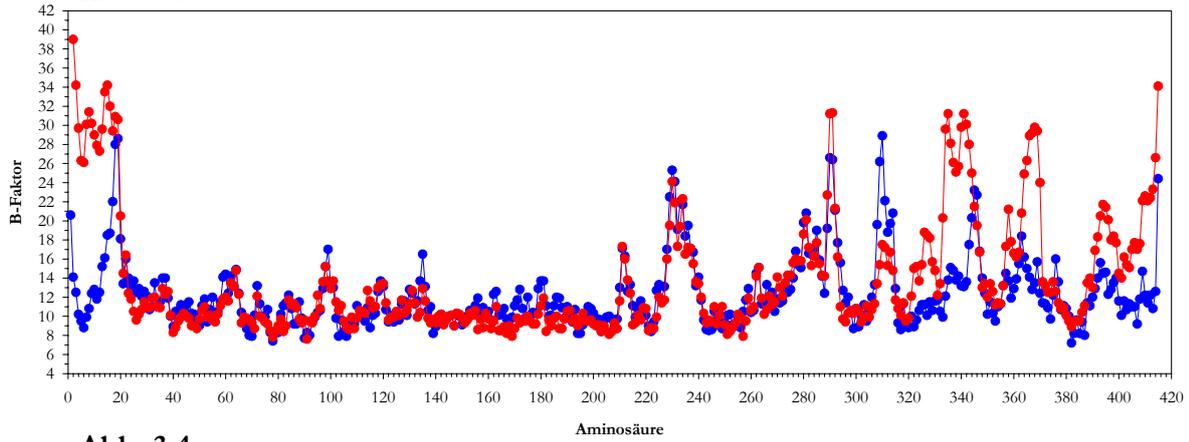


Abb. 3.4

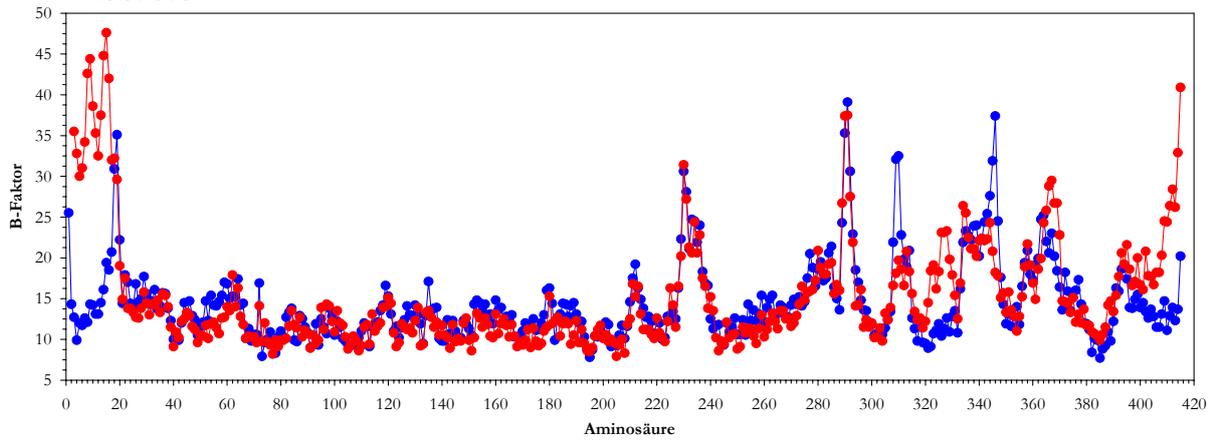


Abb. 3.5

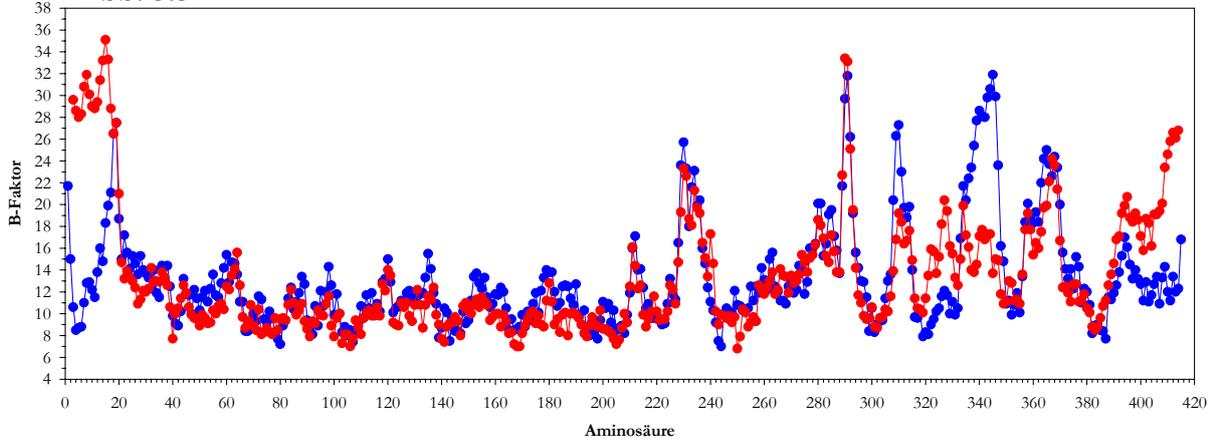
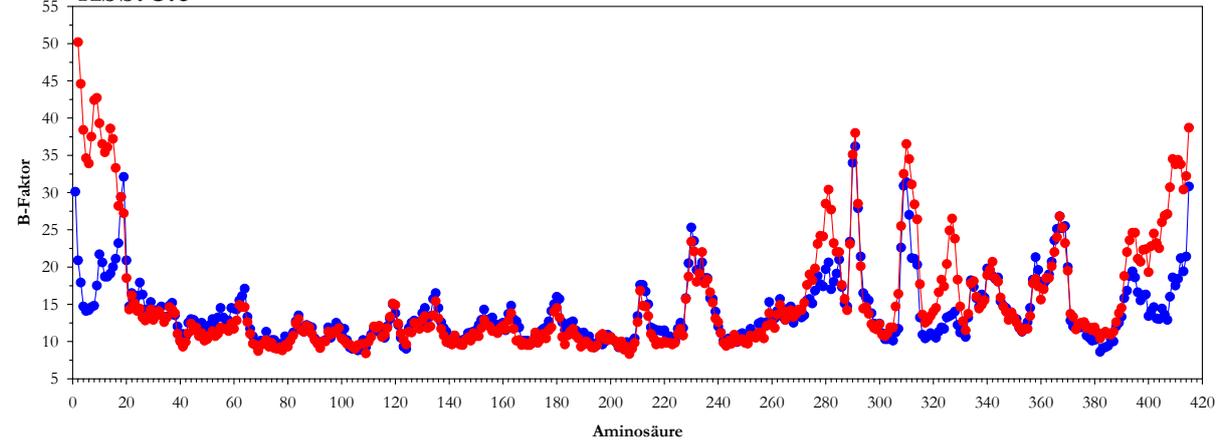


Abb. 3.6



### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

---

**Abb. 3.3-3.6: B-average-Ergebnisse für die Hauptkettenanteile der Aminosäuren der TobS2-Datensätze.** 3.3 TobS2-SO<sub>4</sub>; 3.4 TobS2-PLPg; 3.5 TobS2-PLPGln; 3.6 TobS2-PLPTM. Die B-Faktoren der Aminosäuren der Monomere A und B der TobS2-Strukturen weisen vor allem im C-terminalen Bereich eine hohe Flexibilität auf, dabei unterscheiden sich die beiden Monomere eines Datensatzes im Bereich zwischen den Aminosäuren 320 und 370. Blau: Monomer A; Rot: Monomer B

Folgende Aminosäuren der Monomere A und B wurden in den vier TobS2-Datensätzen eindeutig durch die ermittelte Elektronendichte beschrieben: TobS2-SO<sub>4</sub>-Monomer A: 1-415, TobS2-SO<sub>4</sub>-Monomer B: 2-415, TobS2-PLPg-Monomer A: 1-415, TobS2-PLPg-Monomer B: 3-415, TobS2-PLPGln-Monomer A: 1-415, TobS2-PLPGln-Monomer B: 4-415, TobS2-PLPTM-Monomer A: 1-415 und TobS2-PLPTM-Monomer B: 2-415.

Vergleicht man die B-Faktoren aller Datensätze lassen sich folgende Zusammenhänge erkennen: Prinzipiell weisen alle Monomere B im N-terminalen Bereich eine höhere Flexibilität auf, die Elektronendichte dieser Aminosäuren ist in allen Datensätzen nicht gut definiert, deshalb konnten hier die ersten ein bis drei Aminosäuren nicht dargestellt werden. Der Bereich zwischen den Aminosäuren 20 und 224 zeigt in allen Monomeren niedrige B-Faktoren und stellt damit einen sehr stabilen, gut definierten Bereich des Proteins dar. Der C-terminale Bereich des Proteins weist hingegen eine hohe Flexibilität auf. Hier ist festzustellen, dass die einzelnen Monomere sich vor allem im Bereich ab Aminosäure 290 stark in ihrer Flexibilität unterscheiden. Dies ist ein Hinweis auf konformationelle Änderungen, welche die Aminotransferase durch die Bindung der Substrate und Kofaktoren durchläuft. Außerdem sind hohe B-Faktoren ein Anzeichen für schlechter definierte Bereiche im Protein, in denen evtl. alternative Konformationen vorhanden sind. Die einzelnen Monomere zeigen dabei ein jeweils unterschiedliches Verhalten, in keinem Fall entsprechen die B-Faktoren des Monomers A eines Dimers exakt denen des Nachbarmonomers. Im Datensatz TobS2-PLPTM (Abb. 3.6) nähern sich die B-Faktoren der beiden Monomere jedoch stark an.

Die B-Faktoren des Monomers B der TobS2-SO<sub>4</sub>-Struktur unterscheiden sich im Bereich der Aminosäuren 330-348 und 368-372 signifikant von denen der anderen Datensätze. Dies kann ein Hinweis auf das Vorhandensein einer alternativen Konformation in diesem Bereich des TobS2-SO<sub>4</sub>-Datensatzes sein. In den Datensätzen TobS2-PLPg (Abb. 3.4) und TobS2-PLPGln (Abb. 3.5) zeigt das Monomer B sehr ähnliche B-Faktoren, was auf eine ähnliche Konformation hindeutet. Die B-Faktoren der Monomere A der Datensätze TobS2-SO<sub>4</sub>, TobS2-PLPg und TobS2-PLPGln unterscheiden sich jedoch sowohl von denen der Monomere B als auch untereinander in den Bereichen der Aminosäuren 308-312 und 332-348. Dies weist auf eine Konformationsänderung dieser Bereiche bei der Bindung des Kofaktors und der anschließenden Bindung des Aminodonors hin. Nach der Bindung von Tobramycin scheinen sich diese

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

Konformationsänderung fortzusetzen und die Konformation des Monomers A nähert sich dann der Konformation des Monomers B an.

Die Abweichungen in den Strukturen der einzelnen Monomere (RMSD) wurden mit dem Programm lsqman (163) ermittelt und in Tabelle 3.4 aufgetragen. Auch hier ist zu erkennen, dass sich die Monomere A und B eines jeden Dimers in ihrer Struktur unterscheiden und eventuell verschiedene Konformationen bei der Bindung des Kofaktors oder der Substrate annehmen können. Die größten strukturellen Unterschiede zeigen die Monomere A im Vergleich zu den Monomeren B der einzelnen Datensätze, während innerhalb eines Monomers von Datensatz zu Datensatz geringere Änderungen zu beobachten sind. Die größte konformationelle Änderung erfährt das Monomer A des TobS2-PLPTM-Datensatzes im Vergleich zu allen anderen Monomeren A. Die Monomere B unterscheiden sich untereinander kaum, jedoch wurde auch hier die größte Abweichung zu allen anderen Datensätzen im TobS2-PLPTM-Datensatz festgestellt.

	TobS2-SO4_A	TobS2-SO4_B	TobS2-PLPg_A	TobS2-PLPg_B	TobS2-PLPGln_A	TobS2-PLPGln_B	TobS2-PLPTM_A	TobS2-PLPTM_B
TobS2-SO4_A	0	0,702	0,129	0,684	0,192	0,702	0,556	0,68
TobS2-SO4_B	0,702	0	0,695	0,162	0,687	0,131	0,442	0,22
TobS2-PLPg_A	0,129	0,695	0	0,672	0,178	0,692	0,553	0,666
TobS2-PLPg_B	0,684	0,162	0,672	0	0,668	0,158	0,41	0,197
TobS2-PLPGln_A	0,192	0,687	0,178	0,668	0	0,66	0,494	0,637
TobS2-PLPGln_B	0,702	0,131	0,692	0,158	0,66	0	0,424	0,209
TobS2-PLPTM_A	0,556	0,442	0,553	0,41	0,494	0,424	0	0,36
TobS2-PLPTM_B	0,68	0,22	0,666	0,197	0,637	0,209	0,36	0

**Tab. 3.4: RMSD der Monomere eines jeden Datensatzes.** Die RMSD in Å für jedes Monomer im Vergleich zu allen anderen Monomeren wurde mit dem Programm lsqman ermittelt. Die Monomere A und B eines jeden Dimers unterscheiden sich teilweise stärker als die Monomere A bzw. B der einzelnen Datensätze untereinander. Die größte konformationelle Änderung konnte für den Datensatz TobS2-PLPTM ermittelt werden.

### 3.3 Die dreidimensionale Struktur von TobS2

Alle Strukturen der folgenden Abbildungen folgen einer einheitlichen Farbgebung (pymol-Farbbezeichnung), wonach die vier präsentierten Datensätze unterschieden werden können:

TobS2-SO<sub>4</sub>: Monomer A: gelb, Monomer B: sandfarben

TobS2-PLPg: Monomer A: dunkelviolet, Monomer B: violett

TobS2-PLPGln: Monomer A: hellgrün, Monomer B: dunkelgrün

TobS2-PLP-TM: Monomer A: mittelblau, Monomer B: dunkeltürkis

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

Alle anderen Farben und speziell hervorgehobene Reste werden an entsprechender Stelle beschrieben. Die Nummerierung von PLP und Tobramycin wird in Abbildung 3.7 dargestellt.

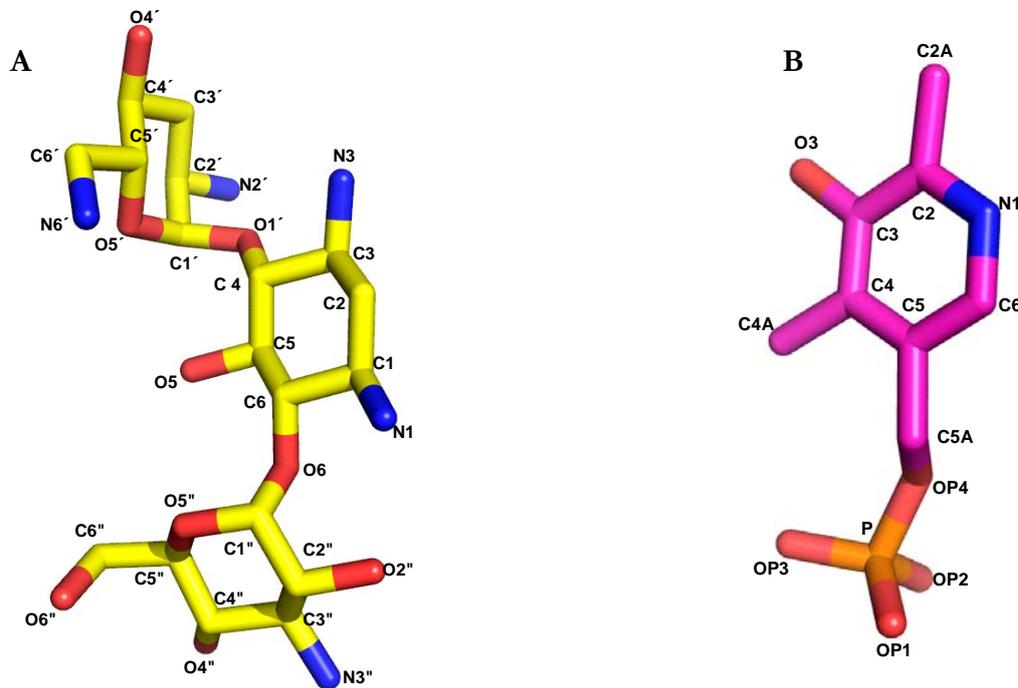


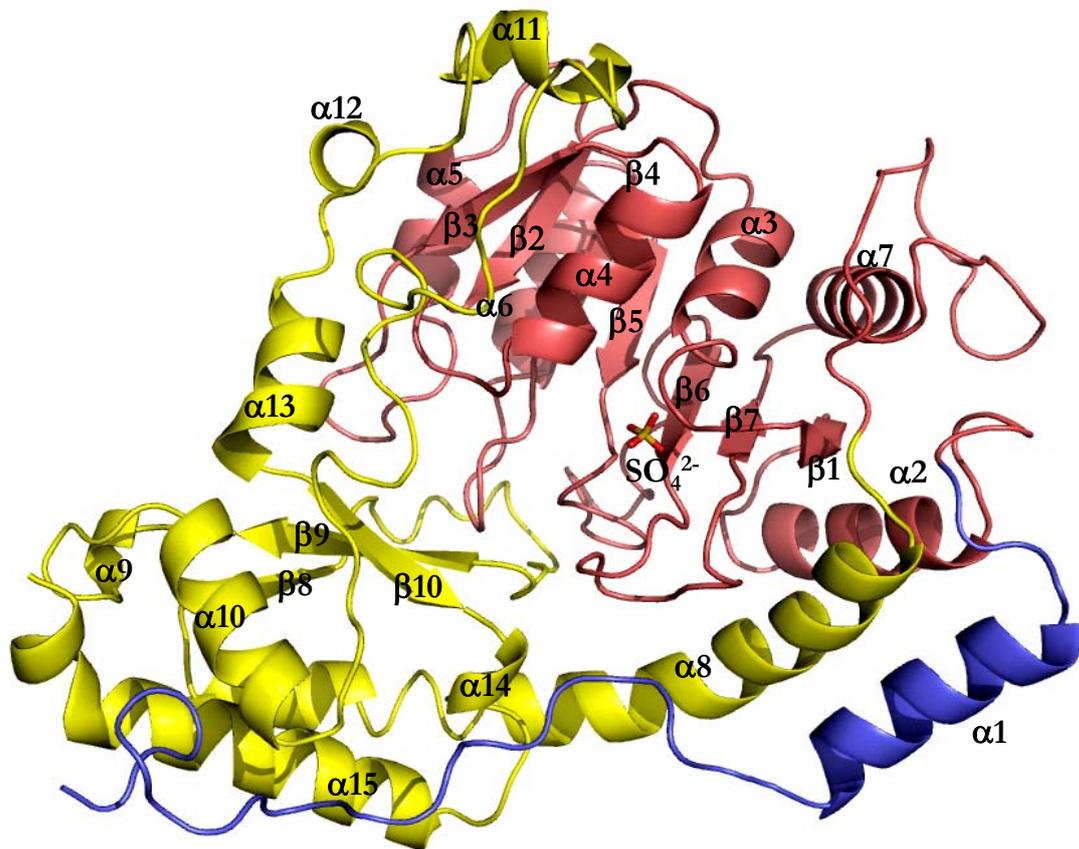
Abb. 3.7: Nummerierung von PLP und Tobramycin. **A** Kristallstruktur von Tobramycin, die Kohlenstoffatome wurden in Gelb, die Sauerstoffatome in rot und die Stickstoffatome in Blau dargestellt. **B** Kristallstruktur von PLP, die Kohlenstoffatome wurden in Magenta, die Sauerstoffatome in Rot, die Stickstoffatome in Blau und das Phosphat in Orange dargestellt. Wasserstoffatome wurden nicht abgebildet. Die beiden Strukturen stammen aus dem Datensatz TobS2-PLPTM.

#### 3.3.1 Gesamtstruktur des Apoenzyms – TobS2-SO<sub>4</sub>

TobS2 zeigt die charakteristische Tertiärstruktur einer Aspartat-Aminotransferase, bestehend aus drei verschiedenen Regionen, einer N-terminalen Domäne, einer zentralen Kofaktor-bindenden Domäne und einer C-terminalen Domäne (164). Diese Faltung weisen auch viele andere PLP-abhängige Enzyme wie BTRr (156) und AHBA (165) auf. Abbildung 3.8 zeigt die drei Domänen und die Anordnung der  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter im Protein. Die N-terminale Domäne (Ser2 - Gly41, blau) beginnt mit einer langen ungeordneten Aminosäurekette und endet mit einer  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ 1). Die große Kofaktor-bindende Domäne (Gly42 - Arg245, rot) enthält ein siebensträngiges  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ 1- $\beta$ 7) mit der Orientierung + + + + + - +. Das  $\beta$ -Faltblatt wird von insgesamt sechs  $\alpha$ -Helices umgeben, wobei drei ( $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 7) auf der einen Seite und drei weitere

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

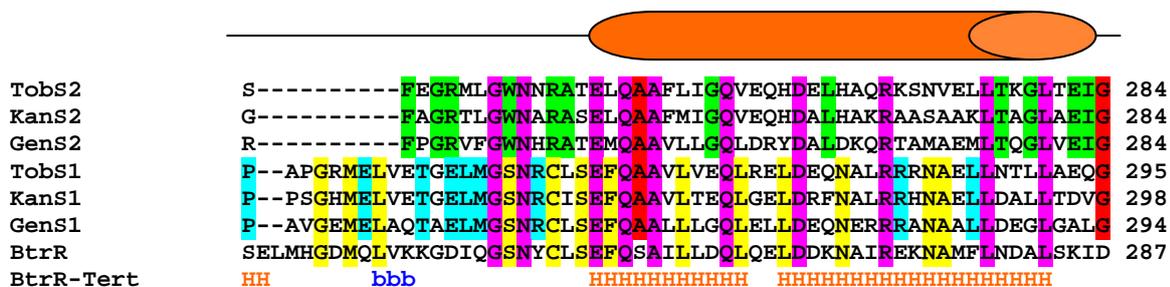
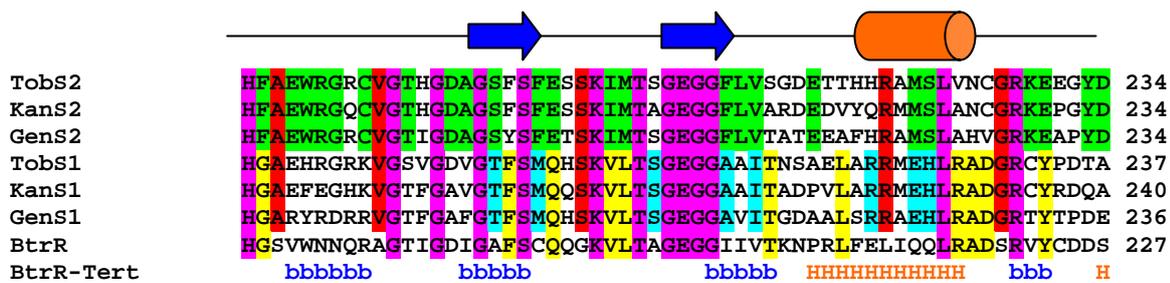
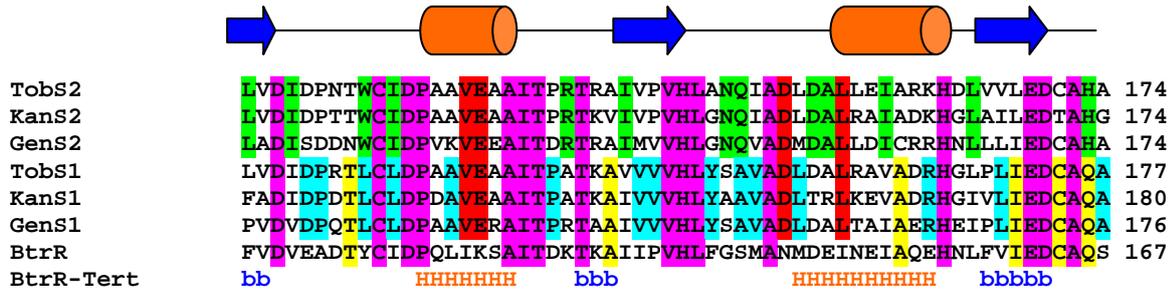
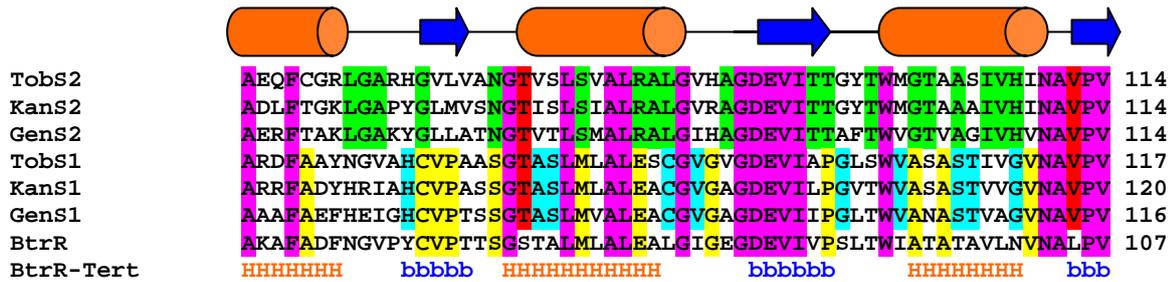
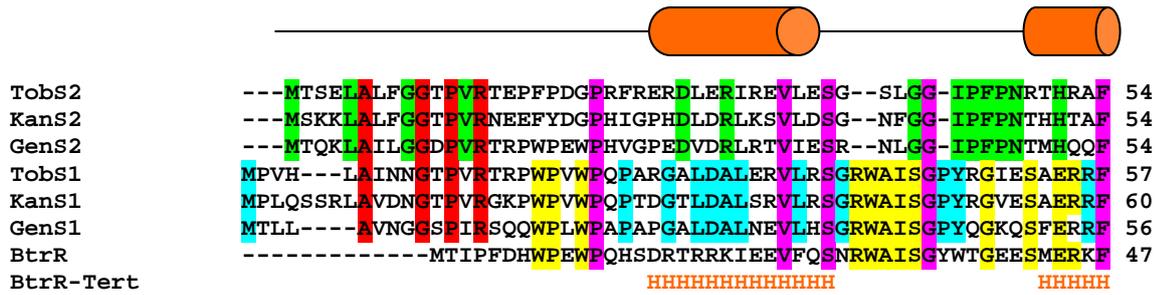
( $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ) auf der anderen Seite des  $\beta$ -Faltblattes liegen. Die kleinere C-terminale Domäne (L249-R415, gelb) startet mit einer langen  $\alpha$ -Helix ( $\alpha 8$ ) und enthält ein drei-strängiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta 8$ ,  $\beta 9$ ,  $\beta 10$ ) mit der Orientierung  $+ - +$ , welches von vier  $\alpha$ -Helices ( $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 14$ ) umrundet wird.



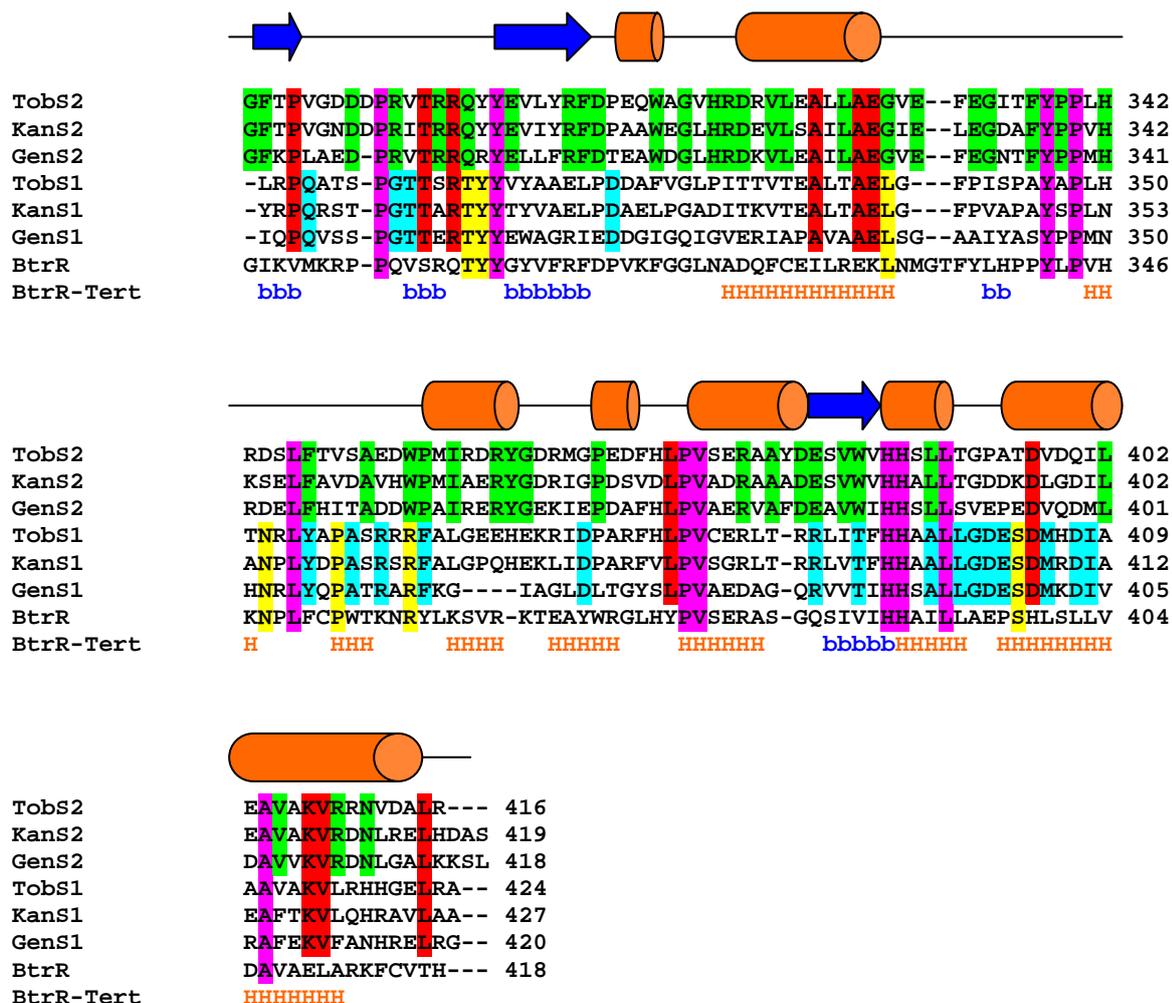
**Abb. 3.8:** Übersicht über die Tertiärstruktur von TobS2. In der *Cartoon*-Darstellung werden die drei Untereinheiten von TobS2 gezeigt. Die Aminotransferase weist eine N-terminale Domäne (blau), eine große Kofaktor-bindende Domäne (lachsrot) und eine C-terminale Domäne (gelb) auf. Im aktiven Zentrum ist ein Sulfation ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) koordiniert.

Die einzelnen Sekundärstrukturelemente werden zusammen mit der Sequenz von TobS2 im Vergleich zu den Sequenzen der verwandten Aminotransferasen KanS2, GenS2, TobS1, KanS1, GenS1 und BtrR in Abbildung 3.9 dargestellt. Ein Vergleich der Position der Sekundärstrukturelemente von TobS2 und BtrR (156) zeigt, dass der prinzipielle Aufbau der beiden Enzyme sehr ähnlich ist (siehe 4.2). Alle dargestellten Aminotransferasen weisen einige identische Reste auf, welche zum Teil an der Bindung des Kofaktors und des Substrates beteiligt sind.

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2



### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2



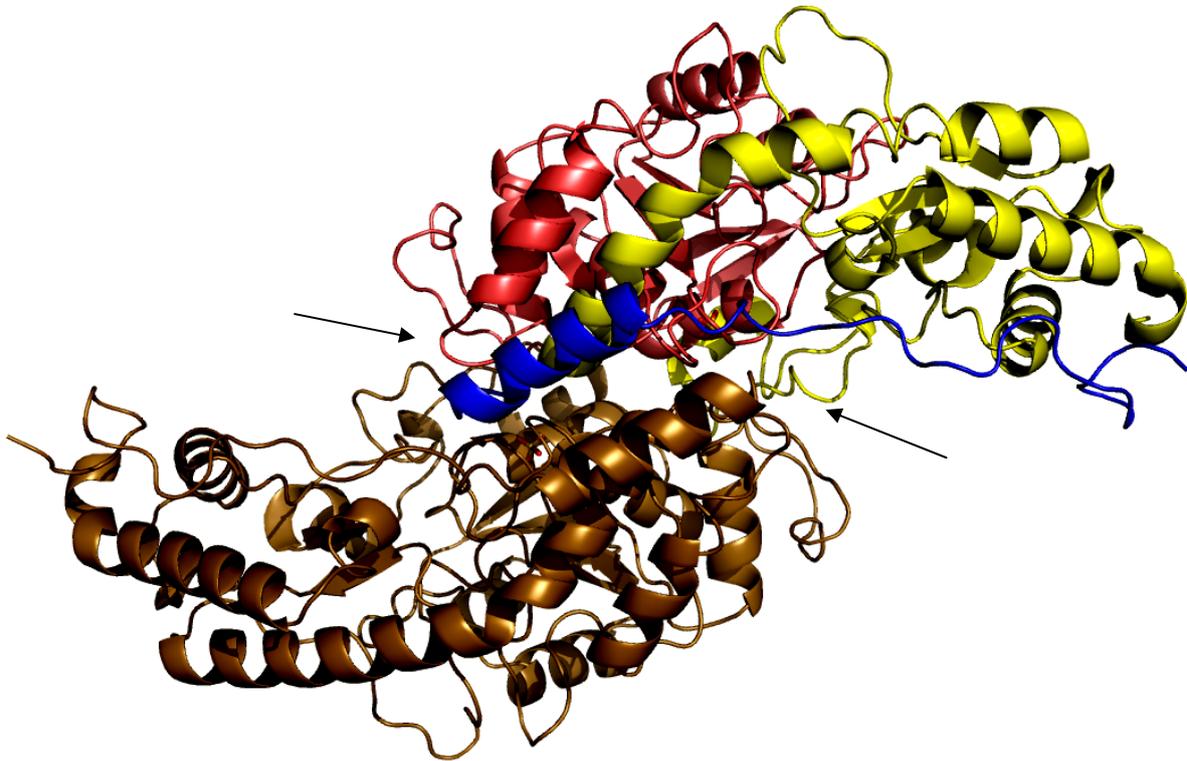
**Abb. 3.9: Sequenzalignment ausgewählter S1- und S2-Aminotransferasen mit TobS2.** Farbig markiert wurden jeweils die identischen Aminosäuren von: allen gezeigten Enzymen (lila), den S1- und S2-Aminotransferasen den Kanamycin und Gentamycin-Genclustern (TobS, KanS, GenS) (rot), den S2-Enzymen (grün), den S1-Enzymen einschließlich BtrR (gelb) und den S1-Enzymen des Kanamycin- und Gentamycin-Genclusters (hellblau). Oberhalb der TobS2-Sequenz werden die Sekundärstrukturelemente von TobS2 für die entsprechenden Aminosäuren dargestellt (cylinder  $\alpha$ -Helix; — *loops* und Bereiche ohne Sekundärstruktur; Pfeil  $\beta$ -Strang), unterhalb der BtrR-Sequenz die Sekundärstrukturelemente der BtrR-Struktur (HHHH Helix; bbbb  $\beta$ -Strang).

Wie nahezu alle bekannten Aminotransferasen bildet TobS2 in Lösung ein funktionelles Dimer, welches im Kristall in der asymmetrischen Einheit zu finden war. Die Kontaktfläche der beiden Monomere umfasst vor allem die N-terminalen Helices  $\alpha_1$ , welche sich parallel zueinander anordnen und große Teile der Kofaktor-bindenden Domäne.

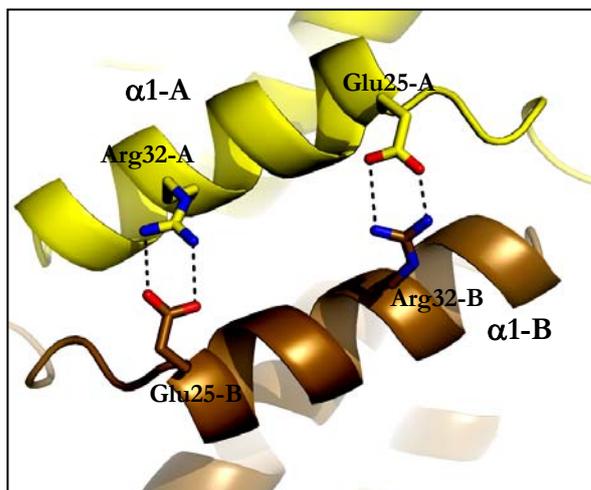
Die wichtigsten Interaktionspunkte liegen dabei im Bereich des *loops*, welcher nach  $\alpha_1$  folgt und in das Nachbarmonomer hineinragt. Weiter Dimer-Kontakte bilden sich im Bereich der Helices  $\alpha_3$  und  $\alpha_4$  und deren benachbarten *loops* aus, welche Interaktionen mit den Helices  $\alpha_3$  und  $\alpha_4$  des Nachbarmonomers eingehen. Die Interaktionen beruhen hauptsächlich auf hydrophoben

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen, außerdem bilden sich ca. acht Salzbrücken aus. Diese liegen zwischen den Resten Glu25 und Arg32, Arg81 und Asp352, His86 und Glu351 sowie Glu204 und Arg245 der jeweils benachbarten Monomere. In Abbildung 3.11 werden zwei Beispiele dieser Salzbrücken gezeigt. Die Ausbildung der Salzbrücken zwischen Glu25 und Arg32 führen zur stabilen Anordnung der beiden  $\alpha$ 1-Helices.



**Abb. 3.10: TobS2-Dimer.** *Cartoon*-Ansicht des TobS2-Dimers entlang der 2-fachen Symmetrieachse. Die Kontaktfläche der beiden Monomere umfasst die N-terminale Domäne ( $\alpha$ 1, blau im Monomer A) und große Teile der Kofaktor-bindenden Domäne (rot im Monomer A). Die Pfeile zeigen auf die zwei aktiven Zentren, welche sich durch die Zusammenlagerung zum Dimer ausbilden, in dieser Struktur wird jeweils ein Sulfation koordiniert. Monomer A wurde entsprechend Abb. 3.8 eingefärbt. Braun: Monomer B

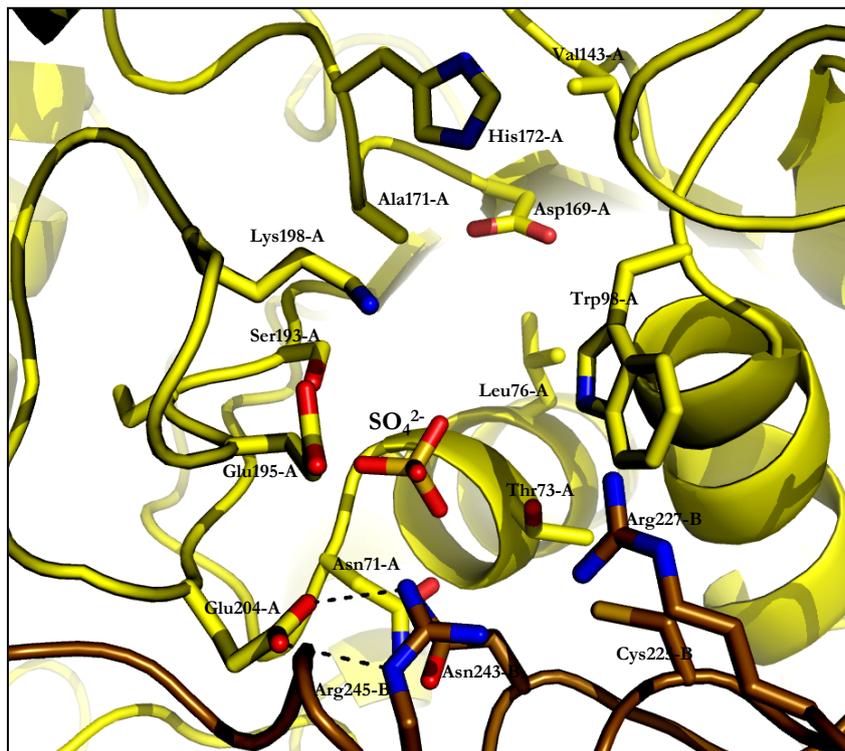


**Abb. 3.11: Das TobS2-Dimer wird durch Salzbrücken stabilisiert.** Neben hydrophoben Interaktionen und Wasserstoffbrücken bilden sich zwischen den Monomeren auch ca. acht Salzbrücken aus. Hier werden die beiden Salzbrücken zwischen Glu25 und Arg32 der beiden Monomere in den antiparallelen  $\alpha$ 1-Helices dargestellt. Die Salzbrücken werden durch schwarz gestrichelte Linien angedeutet.

Abkürzungen:  $\alpha$ 1-A:  $\alpha$ -Helix 1 des Monomers A;  $\alpha$ 1-B:  $\alpha$ -Helix 1 des Monomers B.

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

Im Bereich zwischen den beiden Monomeren bilden sich zwei große Kavitäten, in denen ein Sulfation koordiniert ist, welches aus dem Kristallisationspuffer stammt. Diese Kavitäten stellen die zwei aktiven Zentren des Dimers dar und liegen ca. 20 Å voneinander entfernt. Die aktiven Zentren werden jeweils aus Anteilen beider Monomere gebildet und unter anderem durch die intermolekulare Salzbrücke zwischen Glu204 und Arg245 stabilisiert. Abbildung 3.12 zeigt einen detaillierten Blick in das aktive Zentrum des Monomer A, welches durch den *loop* zwischen  $\alpha 7$  und  $\alpha 8$  des Monomer B ergänzt wird. Die gezeigten Aminosäuren sind auch an der Bindung des Kofaktors PLP beteiligt.



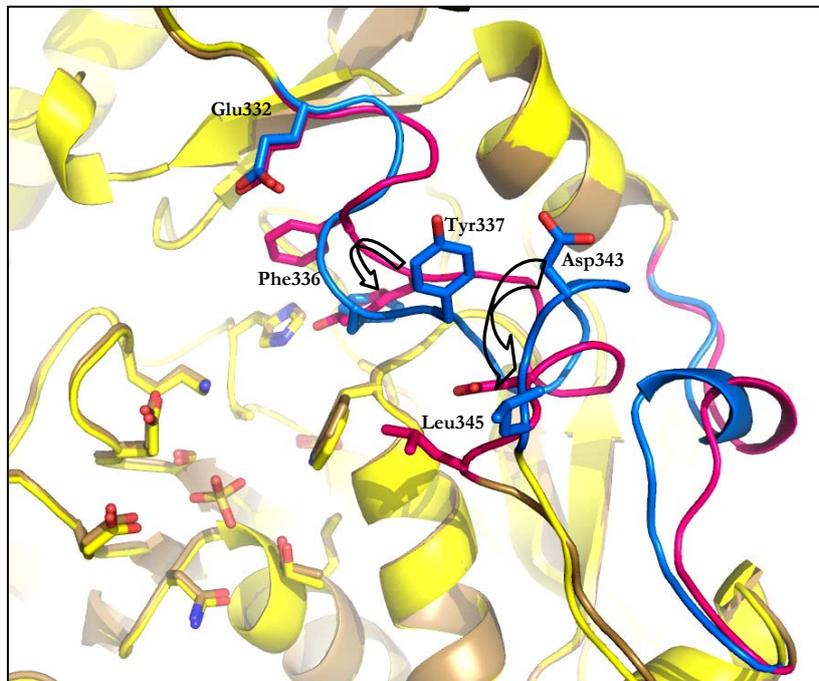
**Abb. 3.12:  $\text{SO}_4^{2-}$  im aktiven Zentrum des Monomer A.** Das aktive Zentrum wird aus der Kofaktor-bindenden Domäne des Monomers A und dem *loop* zwischen  $\alpha 7$  und  $\alpha 8$  des Monomers B gebildet. Die positiven Ladungen der Reste 71, 98, 172, 198, 243, 245 und 227 koordinieren das Sulfation. Die Salzbrücke zwischen Glu204 und Arg245 ist mit schwarzen Strichen angedeutet.

Die Aminosäuren Thr73, Leu76, Trp98, Val143, Asp169, Ala171, Ser193, Lys198, Glu204, Arg227 und Asn243 sind konserviert unter den in Abb. 3.9 gezeigten Aminotransferasen. Glu195 und Arg245 sind innerhalb der gezeigten S2-Enzyme und Cys225 ist innerhalb des Kanamycin-Genclusters konserviert. Dies lässt auf ein einheitliches PLP-Bindefzentrum aller S1- und S2-Aminotransferasen schließen.

Anhand der ermittelten B-Faktoren pro Aminosäure in Abschnitt 3.2 kann nun ein Zusammenhang zur Tertiärstruktur von TobS2 hergestellt werden. Der N-Terminus des Proteins liegt unstrukturiert vor und weist deshalb eine hohe Flexibilität auf, wodurch einige N-terminale Aminosäuren zum Teil nicht durch die ermittelte Elektronendichte beschrieben werden konnte. Im Bereich der Kofaktor-bindenden Domäne weist TobS2 niedrige und auch konstante B-Faktoren für alle untersuchten Monomere auf, was für eine einheitlich Konformation in diesem Bereich spricht. Die C-terminale Domäne weist die höchsten B-Faktoren und auch die

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

größten Unterschiede zwischen den einzelnen Monomeren der verschiedenen Datensätze auf. Dies spricht dafür, dass diese Domäne während der enzymatischen Aktivität von TobS2 konformationelle Änderungen durchläuft. Diese Änderungen scheinen in den beiden Monomeren unabhängig voneinander zu erfolgen. Darauf weist auch der RMSD von 0,702 Å zwischen den Monomeren A und B aus Tabelle 3.4 hin. Die größten Abweichungen liegen dabei in der C-terminalen Domäne, wie bereits der Vergleich der B-Faktoren für jede Aminosäure aus Abbildung 3.3 zeigt. Überlagert man die Strukturen der beiden Monomere, so wird deutlich, dass genau die Bereiche, welche die größten Abweichungen der B-Faktoren aufweisen auch unterschiedliche Konformationen annehmen. Bei diesen Bereichen handelt es sich vor allem um zwei *loop*-Regionen der C-terminalen Domäne, welche die Aminosäuren 332-346 und 362-371 umfassen (Abbildung 3.13). Die Konformationen der Aminosäuren des aktiven Zentrums sind identisch.



**Abb. 3.13: Konformationelle Unterschiede der Monomere A und B der TobS2-SO<sub>4</sub>-Struktur.**

Die beiden Monomere wurden im Programm pymol überlagert. Die beiden Monomere zeigen eine Abweichung in ihrer Struktur von 0,702 Å. Die größten Unterschiede finden sich in den beiden *loop*-Regionen 332-346 und 362-371 in der Nähe des aktiven Zentrums. Es wurden einzelne Aminosäuren in stick-Darstellung hervorgehoben, welche besonders signifikante Konformationsänderungen voll-

ziehen (für Tyr337 und Asp343 mit schwarzen Pfeilen angedeutet). Monomer A wird in gelb und die veränderlichen loops in blau dargestellt. Monomer B wird in braun und veränderlichen loops in pink dargestellt. Die in sticks-Darstellung gezeigten Aminosäuren des aktiven Zentrums wurden bereits in Abb. 3.2 näher beschrieben.

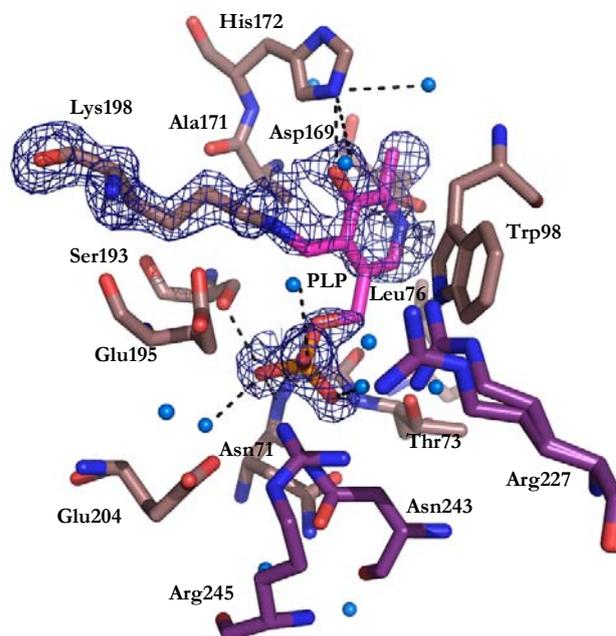
#### 3.3.2 Bindung des Kofaktors PLP

Bei den durchgeführten *Soaking*-Experimenten konnte bei mehreren Datensätzen PLP im aktiven Zentrum ermittelt werden. Der Datensatz TobS2-PLPg enthält ein kovalent an Lys198 gebundenes PLP in jedem Monomer und wurde mit einem Kristall erzeugt, welcher 10 min mit

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

PLP inkubiert wurde. Die Ausbildung eines Aldimins zwischen dem Kofaktor und einem Lysin ist typisch für PLP-abhängige Enzyme. PLP liegt in beiden aktiven Zentren des Dimers in kovalent gebundener Form vor. Dort wird es durch die Interaktion mit einigen Aminosäuren, einem Netzwerk aus Wasserstoffbrücken und vor allem die kovalente Bindung an Lys198 koordiniert. Der Pyridin-Ring des PLP ragt ins Innere des aktiven Zentrums. Die  $\delta\text{OH}$  von Asp169 interagieren mit N1 des PLP,  $\epsilon\text{NH}_2$  des His172 mit O3 des PLP und zwei Wassermolekülen. Die Phosphatgruppe des PLP zeigt in Richtung Enzym-Oberfläche. Hier koordinieren die NH-Gruppen von Gly72 und Thr73 das PLP durch Bindung der OP2- und OP1-Sauerstoffe. OP1, OP2 und OP3 gehen außerdem Wasserstoffbrückenbindungen mit je einem Wassermolekül ein. OP2 wird weiterhin durch das  $\gamma\text{OH}$  von Ser193 koordiniert. Des Weiteren finden hydrophobe Interaktionen mit den Resten Leu76, Trp98, Val143, Ala171, Glu195 und Glu204 des Moleküls A und Arg227, Asn243 und Arg245 des Nachbarmoleküls statt. Die Phosphatgruppe des PLP nimmt im aktiven Zentrum die Position des Sulfations der TobS2-SO<sub>4</sub>-Struktur ein.

Die omit-Elektronendichtekarte von PLP und Lys198 zeigt deutlich die kovalente Bindung zwischen dem Kohlenstoff C4a des PLP und dem Stickstoff N $\zeta$  des Lys198.



**Abb. 3.14: PLP-Bindestelle des aktiven Zentrums.** Die Koordinierung des PLP beruht auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem PLP, umliegenden Wassermolekülen und den Aminosäuren Thr73, His172, Ser193 und Asp169 (als schwarze Striche angedeutet) und hydrophoben Interaktionen mit den umliegenden Aminosäureresten. Die omit-Elektronendichte (blau, Level 2,0) zeigt deutlich die Ausbildung des Aldimins zwischen PLP und Lys198. Arg227 weist eine alternative Konformation auf. PLP: magenta, Wasser: marineblau, Sauerstoffe: rot, Stickstoffe: blau.

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

---

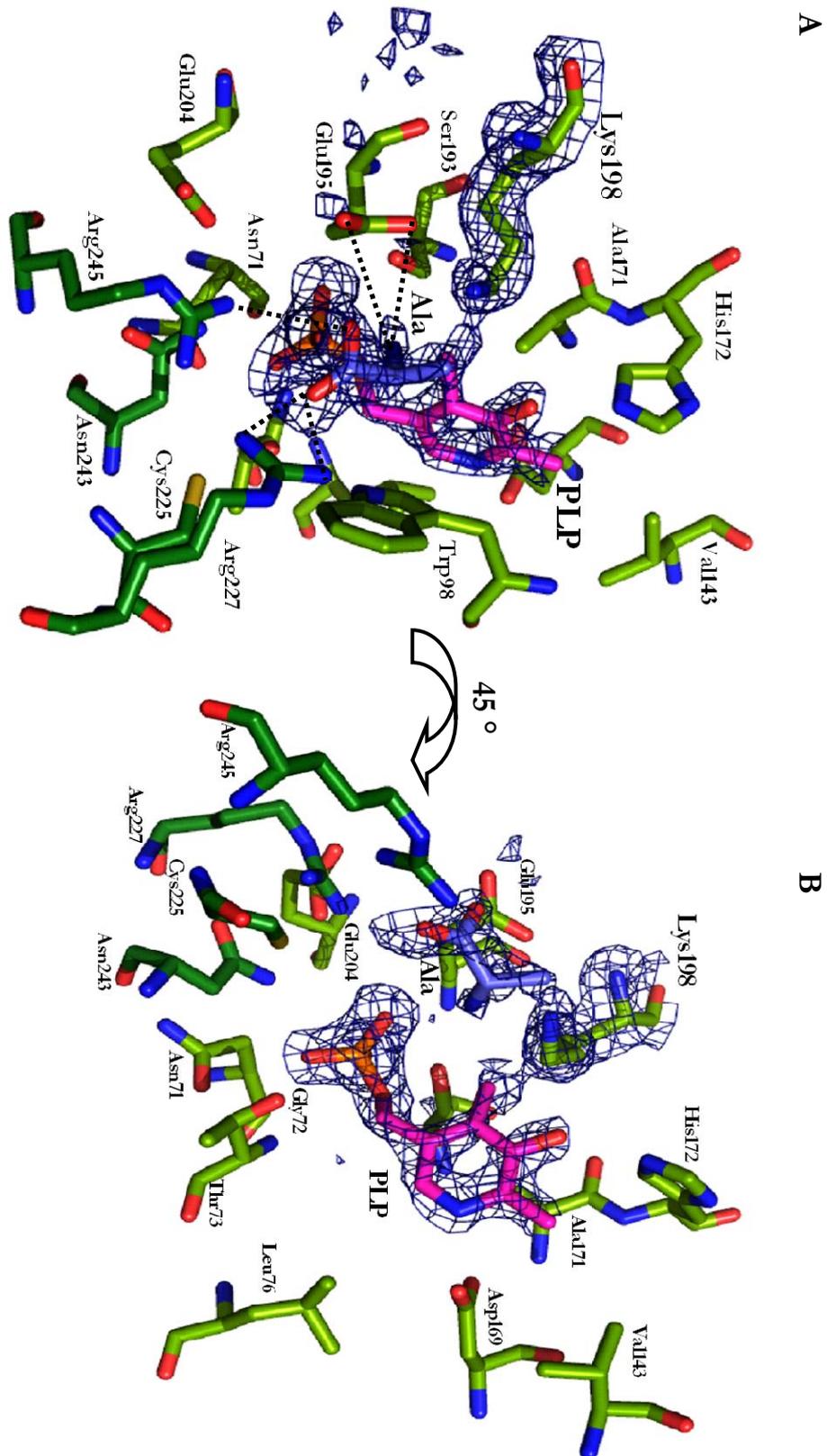
#### Konformationsänderungen des Enzyms bei der Bindung von PLP:

Die RMSD zwischen den beiden Monomeren der TobS2-PLPg-Struktur beträgt 0,672 Å. Auch hier weisen die Monomere A und B unterschiedliche Konformationen der beiden *loop*-Regionen auf, welche bereits für die TobS2-SO<sub>4</sub>-Struktur beschrieben wurden. Die Konformationen der *loops* der Monomere A, wie auch die der Monomere B, der beiden Strukturen ist dabei identisch, was sich auch in den niedrigen RMSD-Werten der Monomere der beiden Strukturen widerspiegelt. Ein Vergleich der beiden Dimere ergab eine Gesamt-RMSD von 0,15 Å.

Die Konformation der Reste im aktiven Zentrum bei Bindung des Kofaktors entspricht der der TobS2-SO<sub>4</sub>-Struktur. Die omit-Elektronendichte in Abbildung 3.14 zeigt in beiden TobS2-PLPg-Monomeren am Stickstoff N $\zeta$  des Lys198 eine zusätzliche Ausprägung, welche der Position des ungebundenen Lysins aus der TobS2-SO<sub>4</sub>-Struktur zuzuordnen ist. Dies weist auf eine alternative Konformation des Enzyms im Kristall hin, bei der PLP nicht in gebundener Form vorliegt. Die gebundene Konformation stellt jedoch die vorherrschende Spezies dar.

#### 3.3.3 Bindung von PLP und L-Gln

Die Daten für TobS2-PLPGln wurden mit einem Kristall gewonnen, welcher mit PLP und dem Aminodonor L-Gln über vier Tage inkubiert wurde. L-Gln konnte in der Struktur nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich im Bereich des aktiven Zentrums nahe dem Kofaktor jedes Monomers eine positive fofc-Differenzdichte, welche auf ein zusätzliches Molekül hinwies. Im Monomer A weist die fofc-Differenzdichte auf eine Aminosäure an dieser Position hin. Die omit-Elektronendichte des aktiven Zentrums zeigt ebenfalls deutlich die Elektronendichte einer Aminosäure, allerdings ist nur die Hauptkette gut definiert, die Beschaffenheit der Seitenkette ist nicht klar zu erkennen, daher wurde hier nicht der beim *soaking* eingesetzte Aminodonor L-Gln, sondern lediglich ein Alanin eingefügt. Die omit-Elektronendichte für Lys198 und PLP weist auf eine kovalente Bindung des PLP hin, allerdings zeigt die errechnete 2fofc-Elektronendichte diese Bindung nicht und es wurde während des *refinements* auch keine positive Differenzelektronendichte erzeugt, wenn Lys198 in der nicht gebundenen Konformation modelliert wurde (nicht gezeigt). Daher ist davon auszugehen, dass die vorherrschende Spezies im Monomer A die des nicht gebundenen PLPs ist, welche auch in Abbildung 3.15 dargestellt wird.



**Abb. 3.15:** Aktives Zentrum des Monomers A von TobS2-PLPGln. PLP (magenta) geht keine kovalente Bindung mit Lys198 ein. Die omit-Elektronendichte (blau, Level 2,0) zeigt die Anwesenheit einer Aminosäure im aktiven Zentrum, bei der es sich höchst wahrscheinlich um den Aminodonor L-Gln handelt. Die Dichte der Seitenkette ist allerdings nicht definiert, daher wurde ein Alanin (mittelblau) an dieser Stelle eingefügt. Die Abbildungen A und B zeigen das aktive Zentrum des Monomer A jeweils um 45° um die y-Achse gedreht. --- ionische Wechselwirkungen des Alanins mit den umliegenden Aminosäuren

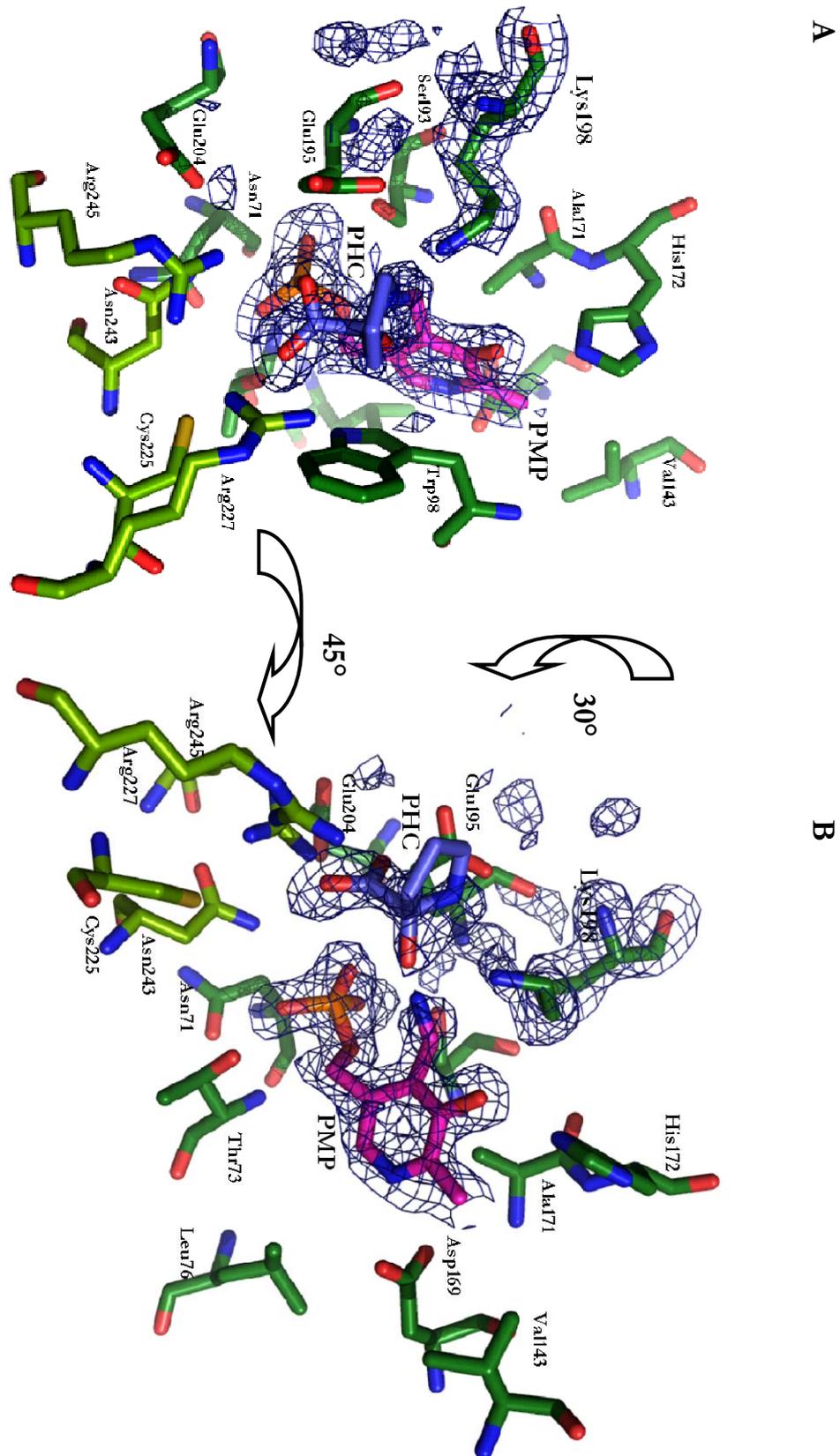
### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

---

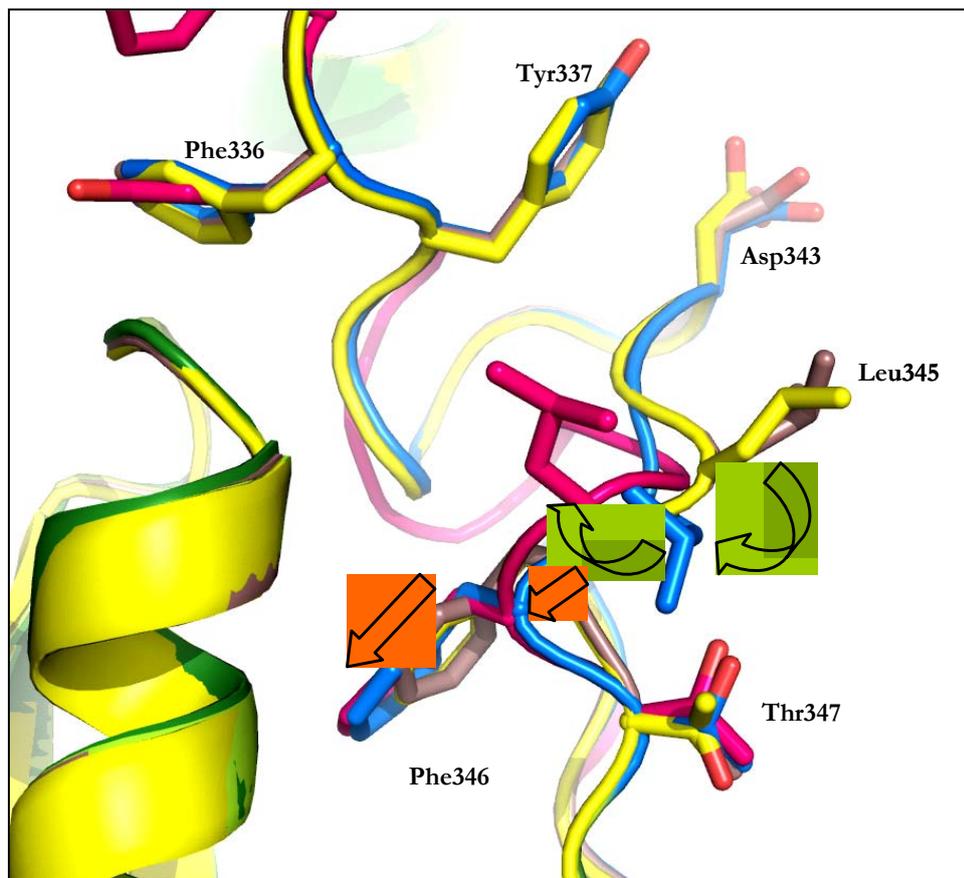
Die Aminosäure Alanin wird im aktiven Zentrum über ionische Wechselwirkungen zwischen den OH-Gruppen des Glu195 und dem Stickstoff des Alanins und zwischen den NH<sub>2</sub>-Gruppen der Arginine 245 und 227, sowie über hydrophobe Wechselwirkungen z.B. mit Trp98 und Wasserstoffbrückenbindungen koordiniert. Die zusätzliche Differenzelektronendichte im Monomer B war ausgeprägter und wies eher auf die Anwesenheit des umgesetzten cyclisierten Aminodonors, 2-Pyrrolidon-5-Hydroxy-5-Carboxylsäure als auf L-Gln selbst hin. Diese Vermutung wurde durch die Beobachtung von positiver Differenzelektronendichte am Kohlenstoff 4A des Kofaktors untermauert, denn diese Dichte legt nahe, dass sich im aktiven Zentrum ein PMP- statt ein PLP-Molekül befindet. Die Aminogruppe wurde also bereits vom Donor auf den Kofaktor übertragen, was zum in Abbildung 3.16 gezeigten PMP und zur Bildung von 2-Pyrrolidon-5-Hydroxy-5-Carboxylsäure (PHC) führt. Die gezeigte omit-Elektronendichte für den cyclisierten Aminodonor ist nicht für den gesamten Ring ausgeprägt. Dies liegt an der Flexibilität dieser Ringstruktur, da diese sowohl in einer trans- als auch in einer cis-Konformation vorliegen kann. Die Koordinierung des PHC-Moleküls erfolgt ebenfalls durch die bei den S2-Enzymen konservierten Aminosäuren Glu195 und Arg245, wie auch durch die, bei den S1- und S2-Enzymen konservierten, Aminosäuren Trp98 und Arg245 (Abb. 3.9). Die Koordination des Kofaktors erfolgt in beiden Monomeren adäquat zu TobS2-PLPg, die Kofaktor-Moleküle in beiden Strukturen liegen exakt an derselben Position.

#### Konformationsänderungen des Enzyms bei der Bindung von PLP und L-Gln:

Wie bei allen anderen bisher gezeigten Strukturen unterscheidet sich auch in der TobS2-PLPGln-Struktur der Verlauf der beiden *loop*-Regionen 332-346 und 362-371. Doch während der Verlauf der *loops* des Monomer B exakt dem der Monomere B aus TobS2-SO<sub>4</sub> und TobS2-PLPg entspricht, ändert sich der Verlauf des *loop* 332-346 im Monomer A der TobS2-PLPGln-Struktur etwas. Die Konformationen der Aminosäuren 332-344 entsprechen denen aus den Monomeren A der TobS2-SO<sub>4</sub> und TobS2-PLPg-Strukturen, die Konformation der Aminosäure Leu345 ist jedoch nicht konform mit den anderen Monomeren A. Die Konformation der Aminosäure Phe346 des Monomer A der TobS2-PLPGln-Struktur entspricht der des Phe346 der Monomere B aller bisher gezeigt Strukturen (Abbildung 3.17). Dies zeigt, dass die beiden Monomere der TobS2-Aminotransferase keine starren unveränderlichen Konformationen bei der Bildung des Dimers annehmen, sondern sich während der Reaktion des Enzyms verschieben können. Die Konformation des *loops* 332-346 des Monomers A der TobS2-PLPGln-Struktur kann als Zwischenschritt zwischen den beiden bisher beschriebenen Konformationen der einzelnen Monomere gedeutet werden. Die Konformationen der Aminosäuren des PLP-Bindezentrums bleiben in allen Strukturen unverändert.



**Abb. 3.16:** Aktives Zentrum des Monomers B von TobS2-PLPGln. Der Aminodonor L-Gln wurde umgesetzt zu 2-Pyrrolidon-5-Hydroxy-5-Carboxylsäure (PHC, mittelblau), somit befindet sich nun PMP (magenta) im aktiven Zentrum. Die omit-Elektronendichte (blau, Level 2,0) zeigt deutlich die Ringstruktur des PHC und die zusätzliche Aminogruppe am Kofaktor. Die Abbildungen A und B zeigen das aktive Zentrum des Monomers B jeweils um 45° um die y-Achse und 30° und die x-Achse gedreht.



**Abb. 3.17: Konformationsänderung des 332-346-loops des Monomers A in TobS2-PLPGln.** Bis zur Aminosäure Ser344 entspricht die Konformation des *loops* der der Monomere A aus den Strukturen TobS2-SO<sub>4</sub> und TobS2-PLPg, Die Konformation von Leu345 und Phe346 ist jedoch verändert. Die Konformation des Phe346 entspricht der aller bisher gezeigten Monomere B. Die grünen Pfeile symbolisieren die Konformationsänderung von Leu345, die orangen Pfeile die Konformationsänderung von Phe346 ausgehend von der Konformation der Monomere A zur Konformation der Monomere B. gelb: Monomer A TobS2-SO<sub>4</sub>; dunkelviolett: Monomer A TobS2-PLPg; blau: Monomer A TobS2-PLPGln; pink: Monomer B TobS2-PLPGln

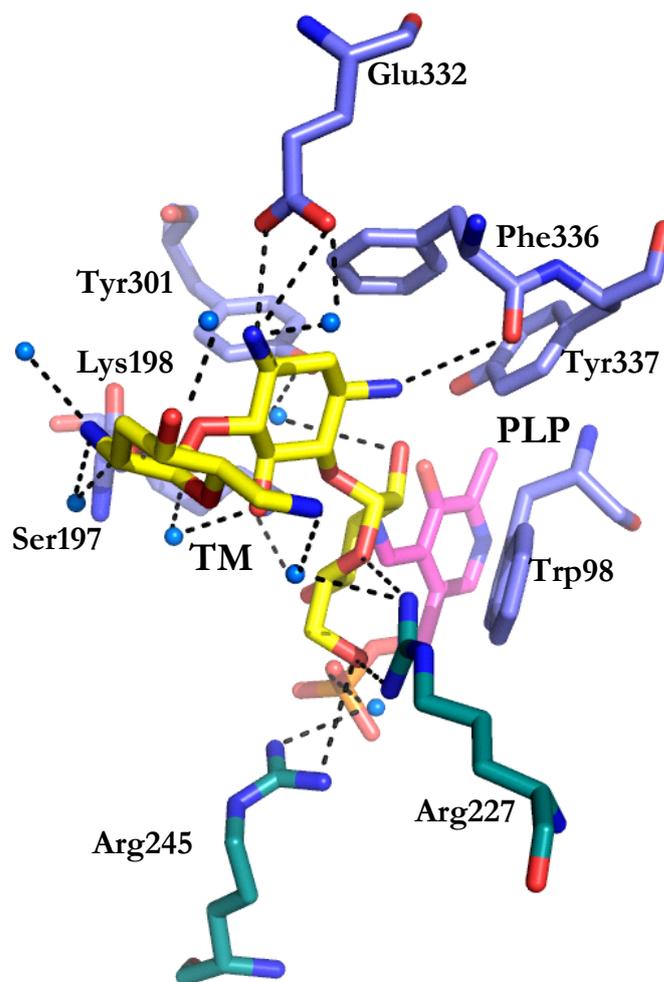
#### 3.3.4 TobS2 in Gegenwart von PLP und Tobramycin

Der Datensatz TobS2-PLPTM wurde mit einem Kristall aufgenommen, welcher 24 h mit PLP, L-Gln und Tobramycin (TM) inkubiert wurde.

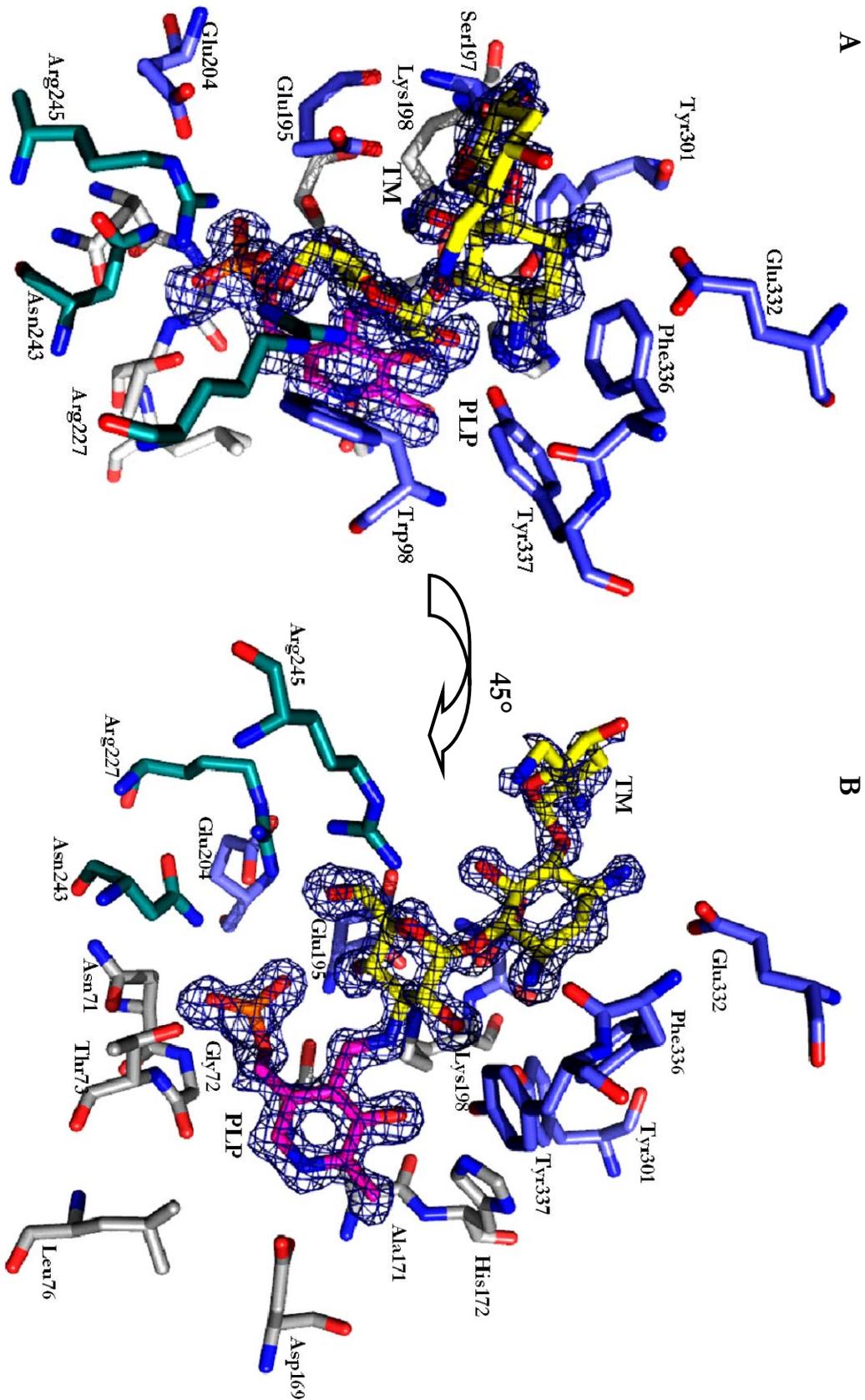
Im vorliegenden Modell dieses Datensatzes liegen PLP und TM im aktiven Zentrum vor. Hinweise auf die Anwesenheit eines L-Gln-Moleküls konnten nicht gefunden werden. PLP und TM bilden ein Aldimin zwischen dem C4a des PLP, welches auch für die Ausbildung des Aldimins am Lys198 des Enzyms verantwortlich ist, und dem Stickstoffatom N3'' des Tobramycin. Genau an dieser 3''-Position findet auch die eigentliche Reaktion von TobS2, die Übertragung der Aminogruppe von PMP auf das dehydratisierte 6-O-Glucos-Paromamin, statt.

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

Tobramycin wird genau wie PLP über ein Geflecht aus Wasserstoff- und Salzbrücken, sowie über hydrophobe Wechselwirkungen koordiniert. So interagieren z.B. die NH<sub>2</sub>-Gruppe N1 des Tobramycins mit dem Sauerstoff Phe336, die NH<sub>2</sub>-Gruppe N1 des Tobramycins mit den ε-Sauerstoffen des Glu332, der Sauerstoff O5'' des Tobramycins mit NH<sub>2</sub> des Arg227 und der Sauerstoff O6'' mit NH<sub>1</sub> des Arg227 und NH<sub>1</sub> des Arg245. Tyr301 interagiert über ein Wassermolekül mit dem O2'' von Tobramycin. Die NH<sub>2</sub>-Gruppen N3 und N2', sowie die Sauerstoffe O2'', O4' und O5 gehen Wasserstoffbrücken mit umliegenden Wassermolekülen ein. Der aromatische Ring von Trp98 und Tyr337 orientiert den mit PLP verbundenen Zuckerring ('-Ring) des Tobramycins ebenfalls über die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung und hydrophoben Wechselwirkungen. Die Tobramycin koordinierenden Aminosäuren Glu332 und Phe 336 sind innerhalb der in Abbildung 3.9 gezeigten S2-Enzyme konserviert. Tyr301 und Tyr337 kommen sowohl in S1- als auch in S2-Enzymen vor. Ser197 ist innerhalb der S1- und S2-Enzyme den Kanamycin- und Gentamycin-Genclustern konserviert.



**Abb. 3.18: Stereobild der Koordinierung des Tobramycins in der Substratbindetasche der TobS2-PLPTM-Struktur.** PLP behält seine Orientierung bei und bildet ein Aldimin mit dem Inhibitor Tobramycin, welcher ebenfalls durch ein Geflecht aus Wasserstoff- und Salzbrücken koordiniert wird. Farbgebung: mittelblau: Monomer A, dunkeltürkis: Monomer B; magenta: PLP; gelb: Tobramycin

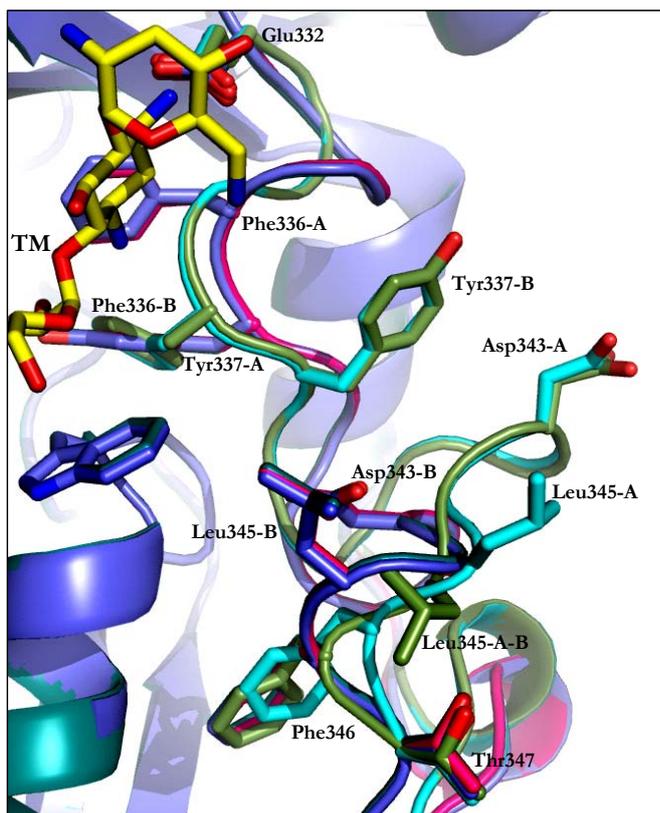


**Abb. 3.19: Aktives Zentrum von TobS2-PLPTM.** Die omit-Elektronendichte (blau, Level 2,0) zeigt eine klare Verbindung zwischen PLP und Tobramycin. Die kovalente Bindung zwischen Lys198 und PLP besteht nicht mehr. PLP: magenta; Tobramycin (TM): gelb; TM-Bindetasche des Monomers A: mittelblau und des Monomers B dunkeltürkis; PLP-Bindetasche: hellgrau; Sauerstoffe: rot; Stickstoffe: blau

### 3 Ergebnisse: Struktur der Aminotransferase TobS2

#### Konformationsänderungen des Enzyms bei der Bindung von PLP und Tobramycin:

Die Struktur TobS2-PLPTM weist die höchsten RMSD-Werte im Vergleich zu allen anderen vorgestellten Strukturen auf. Die beiden Monomere dieser Struktur sind sich laut der RMSD-Werte am ähnlichsten von allen verglichenen Monomeren eines Dimers. Diese Tatsache und auch ein Vergleich der B-Faktoren der Aminosäuren lässt darauf schließen, dass das Enzym bei der Bindung von Tobramycin eine Konformationsänderung vollzogen hat und dass sich die Konformationen der beiden Monomere angenähert haben. Legt man die beiden Monomere der TobS2-PLPTM-Struktur übereinander und vergleicht diese mit den bereits beschriebenen Strukturen TobS2-SO<sub>4</sub>, TobS2-PLPg und TobS2-PLPGln so ist zu erkennen, dass das Enzym bei der Bindung des Tobramycins in beiden Monomeren die Konformation der Monomere B der anderen Strukturen angenommen hat (Abbildung 3.20). Diese Tatsache ist nicht verwunderlich, da die Aminosäuren Glu332, Phe336 und Tyr337 zur Substratbindetasche gehören und mit dem gebundenen Tobramycin interagieren, dies verursacht höchstwahrscheinlich die Konformationsänderung der beiden *loops* 332-346 und 362-371 im Monomer A. Die Konformation der Aminosäuren der PLP-Bindetasche bleibt auch hier wieder unverändert, wie es die Vergleiche der B-Faktoren der einzelnen Monomere in den Abbildungen 3.3 - 3.6 bereits vermuten ließen. Die beobachtete Konformationsänderung der *loops* bei Bindung von Tobramycin legt nahe, dass diese Änderung auch bei der Bindung des eigentlichen Substrates 6-O-Glucos-Inosamin stattfindet, da auch hier wahrscheinlich die Reste Glu332, Phe336 und Tyr337 für die Bindung des Substrates benötigt werden.



**Abb. 3.20: Konformationsänderung bei der Bindung von Tobramycin.** Die beiden Monomere, TobS2-PLPTM-Monomer A in mittelblau und -Monomer B in dunkelblau, zeigen die gleiche Konformation. Zum Vergleich wurden die *loops* 332-346 des Monomers A aus TobS2-PLPg in cyan, des Monomers A aus TobS2-PLPGln in dunkelgrün und des Monomers B aus TobS2-PLPGln in pink dargestellt. Das Monomer A von TobS2-PLPTM nimmt die Konformation der Monomere B aller vorgestellten TobS2-Strukturen an. Die Konformation des Monomer A-*loops* von TobS2-PLPGln kann als Zwischenschritt der Konformationsänderung interpretiert werden. Aminosäuren mit der Konformation der Monomere A: z.B. Tyr337-A und mit der Konformation der Monomere B z.B. Tyr337-B, Zwischenschritt: Leu345-A-B; Tobramycin: gelb

# 4 Diskussion

## 4.1 Reaktionsmechanismus von TobS2

Durch die in dieser Arbeit erhaltenen Strukturen kann man nun einen genaueren Blick auf einige Teilreaktionsschritte der Übertragung eines Aminorestes von L-Gln über PLP auf 6-O-Glucos-Inosamin durch die Amintransferase TobS2 werfen. Die enzymatische Reaktion von TobS2 umfasste die folgenden Teilreaktionen, welche in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt sind:

### *Teilreaktion 1: Bindung des Kofaktors:*

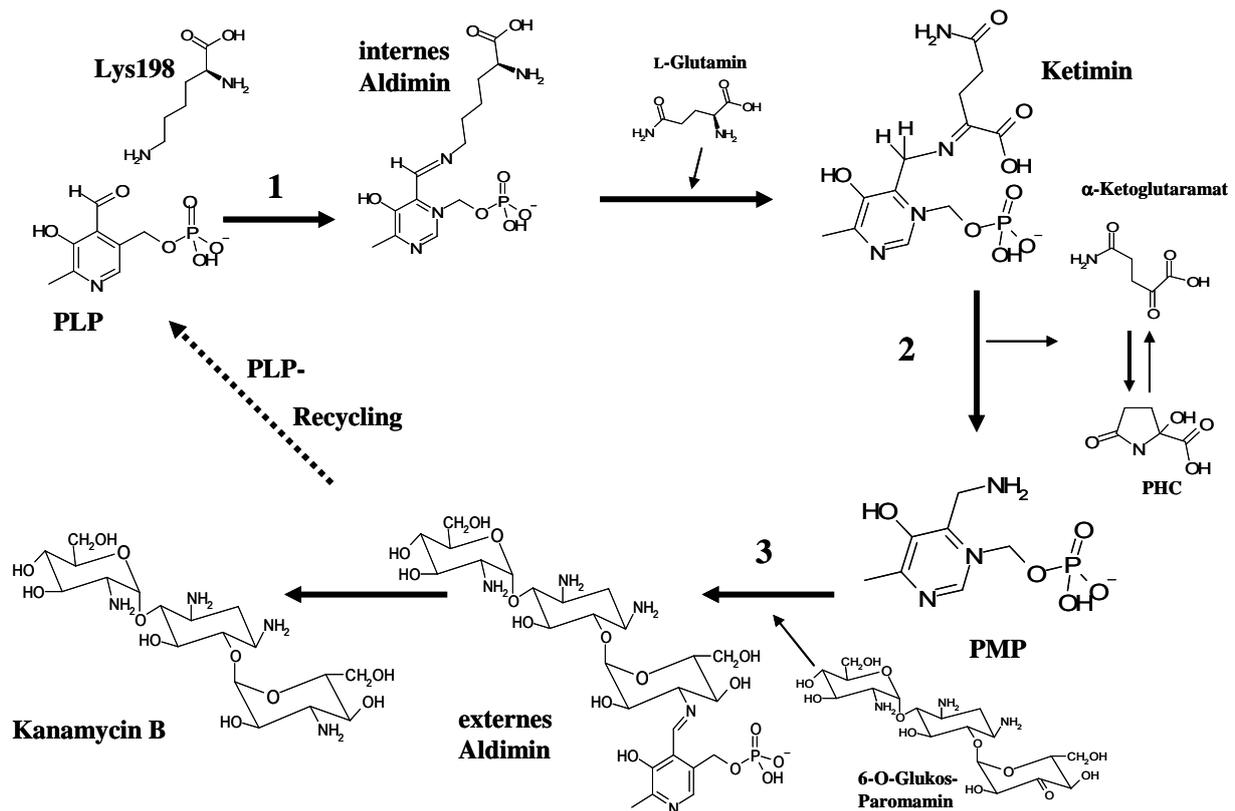
Die Struktur TobS2-PLPg zeigt wie Lysin198 ein Aldimin mit dem Kofaktor PLP bildet. Die PLP-Bindetasche umfasste eine Reihe konservierter Aminosäuren und behält während der katalytischen Reaktion eine konstante Konformation bei.

### *Teilreaktion 2: Übertragung einer Aminogruppe von L-Gln auf PLP*

In der TobS2-PLPGln-Struktur ist im Monomer A die Annäherung des Aminodonors L-Gln an den Kofaktor zu beobachten. Im Monomer B sind das Endprodukt dieses Teilschrittes 2-Pyrrolidon-5-Hydroxy-5-Carboxylsäure und der aminierte Kofaktor PMP zu erkennen. Das Aldimin zwischen Lys198 und PLP wurde durch die Anwesenheit des L-Gln gelöst. Das Ketiminintermediat, welches sich bei der Bindung des L-Gln an das C4a des PLP bildet, konnte jedoch nicht beobachtet werden.

### *Teilreaktion 3: Übertragung der Aminogruppe auf das Substrat*

TobS2-PLPTM zeigt wie das Substrat in der Substratbindetasche koordiniert wird. Da Tobramycin an der 3" bereits eine Aminogruppe besitzt, kann es nicht wie das Substrat 6-O-Glucos-Inosamin aminiert werden, sondern bleibt kovalent an PLP gebunden. Das ermöglichte eine Momentaufnahme dieser Reaktion und einen genaueren Blick auf die Konformation des Substrat-gebundenen Enzyms, bei dem im Monomer A eine Konformationsänderung zur Ausbildung der Substratbindetasche führte. Dies ist die erste Beschreibung eines AGAs, welches im aktiven Zentrum einer S2-Aminotransferase gebunden vorliegt.



**Abb. 4.1: Schema der TobS2-Reaktion.** Das interne Aldimin (Schritt 1) zwischen PLP und Lys198 wird in Gegenwart des Aminodonors L-Glutamin gelöst und ein Ketiminintermediat zwischen PLP und L-Gln wird gebildet (Schritt 2), woraus dann PMP und  $\alpha$ -Ketoglutaramat bzw. 2-Pyrrolidon-5-Hydroxy-5-Carboxylsäure (PHC) entstehen. Das PMP bildet im Schritt 3 ein externes Aldimin mit dem dehydratisierten 6-O-Glucos-Paromamin. Dadurch wird die Aminogruppe auf die 3"-Position des AGA übertragen und es entsteht das Produkt Kanamycin B und PLP, welches nun für die nächste Transaminierung zur Verfügung steht.

## 4.2 Charakterisierung des aktiven Zentrums und Vergleich der TobS2-Struktur und anderen Aminotransferase-Strukturen

In den letzten Jahren wurden einige Strukturen von Enzymen des Aspartat-Typs veröffentlicht, welche ebenfalls aus dem bakteriellen Antibiotika-Stoffwechsel stammen bzw. ähnliche Substrate wie TobS2 prozessieren. Besonders hervorzuheben sind dabei die Strukturen des PLP- und PMP-gebundenen S1-Enzyms BtrR (156), der aus dem Ansamycin-Antibiotika-Stoffwechsel stammenden PLP- und Gabaculin-gebundenen AHBA-Synthase (165), des PLP- und PMP-UDP-L-AltNAc-gebundenen PseC aus dem Pseudaminsäure-Stoffwechselweg des *Helicobacter pylori* (166) und der GDP-4-Keto-Deoxy-D-Mannose-3-Dehydratase ColD in Gegenwart verschiedener

## 4 Diskussion: Struktur der Aminotransferase TobS2

Zuckersubstrate (167-169). Die Struktur von BtrR (156) stellte die bisher einzige Struktur einer Aminotransferase aus einem AGA-produzierenden Biosyntheseweg dar. Ein Sequenzalignment der vier genannten Enzyme mit TobS2 wird in Abbildung 4.2 gezeigt.

TobS2	MTSELALFCGTFVTRTEFPFDGPRFRERDLEIRREVLESGLS---CGIPFPNRTHRAFAEQ	57
BtrR	-----MTIPFDHWPEWFOHSDRTRRKIEEVFQSNRWAISSGYWTGEESMERKFAKA	50
AHBA	-----MNARKAPEFPAPWQYDDAERNGLVRALEQG-----QWWRMGGDEVNSFERE	46
PseC	-----MKEFAYSEPCLDKEDKKAVLEVLNSKQLTQG-----KRSLLFEEA	40
ColD	-----GHMINYPLASSTWDDLEYKAIQSVLDSK-----MFTMGEYVKQYETQ	41
TobS2	FCGRLGARHGVLVANGTVLSVALRALGVHA-----GDEVITTYGYTWMGTAASIVHINA	111
BtrR	FADFNGVPYCVPTTSGSTALMLALEALGIGE-----GDEVIVPSLTWIAATATAVLNVNA	104
AHBA	FAAHGCAHALAVTNGTHALELALQVMGVGP-----GTEVIVPAFTFISSSQAAQRLGA	100
PseC	LCEFLGVKHALVFNSATSALLTLYRNFESEFSADR-----EITTPISFVAANMLLESGY	96
ColD	FAKTFGSKYAVMVSSGSTANLLMIAALFFTKKPRKKGDEIIVPAVSWSTTYPLQOYGL	101
TobS2	VPVLDIDPNTWCIDPAAVEAATPRTRATVPVHLANQIADLDALLEIARKHDIIVVEDC	171
BtrR	LPVFDVDEADTYCIDPQLIKSAITDKTKALIPVHLFGSMANMDEINETAQEHNFVIEDC	164
AHBA	VTVPDVDVDAAYNLDPEAVAAAVTPRTKVIIMPVHAGLMADMDALAKISADTGVFLLQDA	160
PseC	TPVFAGIKNDG-NIDELALEKLINERTKATVSVDYAGKSVESVQKLCCKHSLSFLSDS	155
ColD	RVKFDIDINLNLIDIESLKEAVTDSITKAILTVNLLGNPNNFDEINKIIGGRDIILEDN	161
TobS2	AHAHFAEWRGRCVGTHTGDAGSFSFHSKIMTSGRGGFLVS--GDETTHHRAMSLVNCGRK	229
BtrR	AQSHGSVMNNQRAGTIGDIGAFSSCQQGVLTAGEGGIIIVTKNPRLFELIQQLRADSRVYC	224
AHBA	AHAHGARWQKRVGELDSIATFSFQNGKLMTAGEGGAVVFPDGETEKYETAFLRHSCGRP	220
PseC	SHALGSEYQNKVGGFALASVFSFHAIKPIITAEAGGAVVTNDS---ELHEKMKLFRSHG	209
ColD	CESMGATFNKCACTFGLMCTFSFYSHHIATMEGGCIVTDEEYHILLCIRAHGWTRN	221
TobS2	BEGYDSFEG-----RMLGWNNATELQAAFLIGVEQHQDELHAQRKSNVELL	276
BtrR	DDSSSELMHGD-----MQLVKKGDIIQGSNYCLSEFQSAILLDQLQELDDKNAREKNAMFL	279
AHBA	RDDRR-----YFHKIAGSNMLNEFSASVLRALQARLDEQIAVRDERWTLL	266
PseC	MLKKDFFEG-----EVKSIHNFILNEIQSALGLSOLKKAPFLMQKREAAALTY	260
ColD	LPKKNKVTGVKSDDQFEESFKFVLPGYNVPLEMSGAIIGIEQLKKLPRFISVRRKNAEYF	281
TobS2	TKGLTEIGGTFVGDGDDPRVTRRQYVEVLYRFD--PEQWAGVHRDRVLEALLAEGVVFEG	334
BtrR	NDALSKIDGKVMKRP-PQVSRQTYGYVFRFDVVKFGGLNADQFCEILREKLNMGTFYL	338
AHBA	SRLLGAIIDEVVPQGGD-VRADRNSHYMAMFRIPG--LTEERNALVDRLEAG----LPA	319
PseC	DRIFKDNPYFTPLHPLLKDKSSN--HLYPILMHQFFTCCKLILESLSLHKG-----ILA	312
ColD	LDKFKDHPYLDVQQET----GESSWFGFSFIKKD--SGVIRKQLVENLNSAG-----	329
TobS2	ITFYPPPLRDSLFTVSAEDNEMIRDRYGD RMGPEDFHLPVSEFAAYDESVMVHHSLLTGP	394
BtrR	HPPYLPVHKNPFLCPWTKNRYLKSVRKTEAYWRG-LHYPVSER-ASGQSIVIHHAILLAE	396
AHBA	FAAFRAIYRTDAFWELGAP-----DESVDAIARR---CPNTDAIS-SDCVLHHRVLLAG	370
PseC	QVHYKPIYQYQLYQQLFNTAF---LKSAEDFYHAEISLPCANLNLESVQNIASHSVLKT	369
ColD	IECR-PIVTGNFLKNTDVLKY-----FDYTVHNNVDNAEYLDKNGLFVGNH	374
TobS2	ATDVDQILEAVAKVRRNVDAIR	416
BtrR	PSHLSLLVDAVAELARKFCVTH	418
AHBA	EPELHATAEIIADAVARA----	388
PseC	ESFKIE-----	375
ColD	QIELFDEIDYLREVLK-----	389

Abb. 4.2: Sequenzalignment von TobS2, AHBA-Synthase, PseC und ColD. Das Alignment wurde ebenfalls mit dem Programm ClustalW erstellt. Die Unterteilung der identischen Aminosäuren nach stark konserviert und weitestgehend konserviert, sowie die Farbgebung einiger Reste beruht auf einem Vergleich dieses Alignments mit Abb. 3.9. **lila** stark konserviert; **rot** weitestgehend konserviert; **hellblau** konserviert innerhalb der S1- und S2-Enzyme des Kan- und Gen-Genclusters; **grün** konserviert innerhalb der S2-Enzyme des Kan- und Gen-Genclusters; **blau** Aminosäuren der PLP-Bindetasche; **rot** Aminosäuren der Substratbindetasche (soweit in den entsprechenden Veröffentlichungen beschrieben); **grau** vermutlich an Substratbindung beteiligt

## 4 Diskussion: Struktur der Aminotransferase TobS2

---

BtrR ist eine S1-Aminotransferase aus *Bacillus circulans*. Es stammt aus dem Butirosin-produzierenden Stoffwechselweg und setzt 2-Deoxy-*scyllo*-Inose zu 2-Deoxy-*scyllo*-Inosamin und Aminodideoxy-*scyllo*-Inose zu 2-DOS um (Abb. 1.5) (156). Die AHBA-Synthase aus *Amycolatopsis mediterranei* ist an der Produktion des Ansamycinantibiotikums Rifamycin B beteiligt. Es katalysiert die  $\alpha,\beta$ -Dehydratisierung und stereospezifische 1,4-Enolisierung von Amino-DHS zu dem Precursor AHBA (165). Die aus *Helicobacter pylori* stammende Aminotransferase PseC ist Teil des Pseudaminsäure-Biosyntheseweges, welcher für die Glycosylierung von Flagellenfilamenten verantwortlich ist. PseC überträgt dabei eine Aminogruppe auf UDP- $\alpha$ -D-GlcNac, was somit zu UDP-4-Amino-4,6-Dideoxy- $\beta$ -L-AltNac umgesetzt wird (166). ColD ist beteiligt an der Produktion von GDP-L-Collitose, einem Dideoxyzucker, welcher sich in den Lipopolysacchariden der äußeren Membran einiger gram-negativer Bakterien findet. Es sorgt dabei für die Abspaltung der C3'-Hydroxylgruppe der GDP-4-Keto-6-Deoxymannose, wodurch GDP-4-Keto-3,6-Dideoxymannose entsteht (167). Alle genannten Enzyme nutzen, wie TobS2, PLP als Kofaktor. Als Aminodonor nutzen die Aminotransferasen BtrR, PseC und ColD L-Glutamat, während TobS2 L-Glutamin verwendet (155).

### **Koordinierung des Kofaktors**

Aus dem Sequenzalignment (Abb. 4.2) sind einige Gemeinsamkeiten der Enzyme abzuleiten, so bestehen die PLP-Bindezentren aus den nahezu gleichen Aminosäuren, wovon die Aminosäuren Gly72, Val143, Ser193 und Asn243 (Nummerierung TobS2) stark konserviert vorliegen. Alle Enzyme bilden über ein Lysin im aktiven Zentrum ein internes Aldimin zu PLP aus, ausser ColD, welches an dieser Position ein Histidin aufweist. Wird aber dieses Histidin zu einem Lysin mutiert, bildet sich auch hier das interne Aldimin (167-169).

Weitere wichtige Aminosäuren zur Koordinierung des Kofaktors sind z.B. Ala171, welches für die Aspartat-Aminotransferasen der Antibiotika-produzierenden Synthesewege konserviert ist und auch His172, welches sich, neben den in Abb. 3.9 gezeigten S2-Enzymen, auch in PseC und der AHBA-Synthase an dieser Position befindet. BtrR besitzt an dieser Position ein Glutamin und ColD ein Glutamat. Zum Vergleich wurden alle PLP-Bindezentren in Abbildung 4.3 dargestellt. Für Trp92 des BtrR, welches innerhalb der S1- und S2-Aminotransferase aus Abbildung 3.9 konserviert ist, wird eine 45°-Konformationsänderung während der Aminierung des Kofaktors beschrieben. Für TobS2 konnte dies nicht beobachtet werden, hier nimmt der entsprechende Tryptophanrest von vornherein die vom Kofaktor abgewandte Position ein, in der ColD-Struktur hingegen die dem Kofaktor zugewandte. PseC und AHBA-Synthase besitzen an dieser Position ein Phenylalanin, welches das PLP koordiniert.

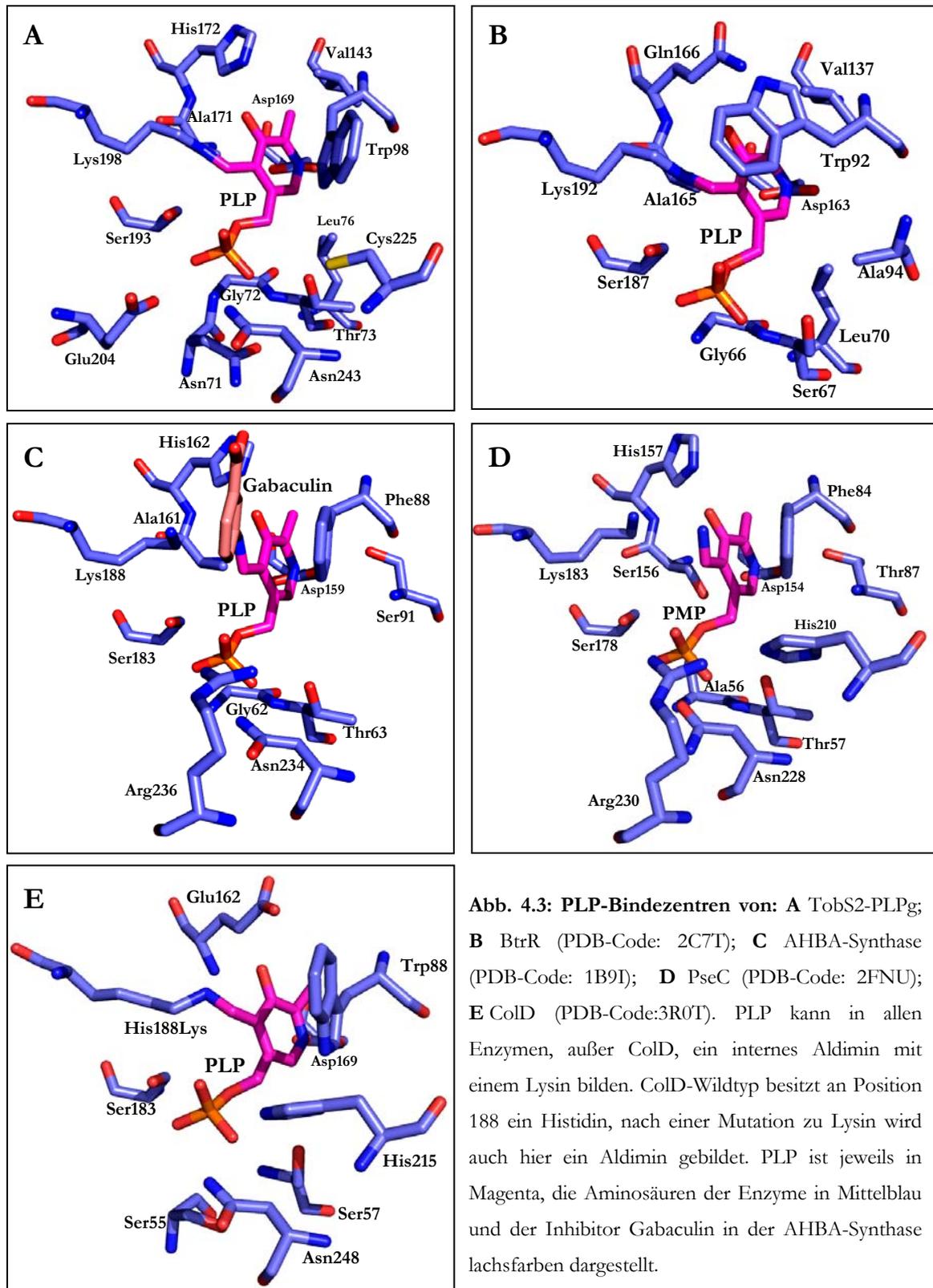
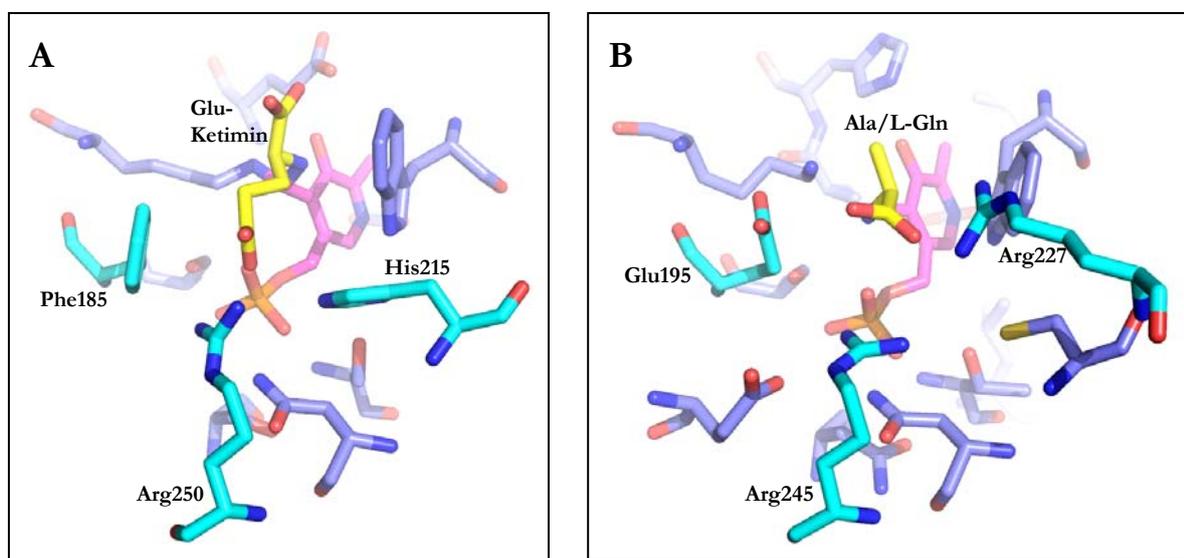


Abb. 4.3: PLP-Bindezentren von: **A** TobS2-PLPg; **B** BtrR (PDB-Code: 2C7T); **C** AHBA-Synthase (PDB-Code: 1B9I); **D** PseC (PDB-Code: 2FNU); **E** ColD (PDB-Code:3R0T). PLP kann in allen Enzymen, außer ColD, ein internes Aldimin mit einem Lysin bilden. ColD-Wildtyp besitzt an Position 188 ein Histidin, nach einer Mutation zu Lysin wird auch hier ein Aldimin gebildet. PLP ist jeweils in Magenta, die Aminosäuren der Enzyme in Mittelblau und der Inhibitor Gabaculin in der AHBA-Synthase lachsfarben dargestellt.

### *Substratbindetasche und Substratspezifität*

Nicht bei allen hier vorgestellten Enzymen gelang es Kristallstrukturen in Gegenwart ihrer Substrate zu erhalten. Der Aminodonor Glutamat, bzw. das mit PLP gebildete Ketimin, konnte nur für ColD beobachtet werden, in dem PLP zunächst durch L-Glutamat-Bindung zu PMP umgewandelt wird, um anschließend die Dehydratase-Reaktion auszuführen. In Abbildung 4.4 wird die Bindung des Aminodonors L-Glu des ColD mit der des L-Gln (Alanin in Monomer A) in TobS2-PLPGln verglichen. Die Position des Aminodonors im aktiven Zentrum stimmt überein. In der TobS2-PLPGln-Struktur ist die Seitenkette des L-Gln nicht definiert, der tatsächliche Verlauf wird aber höchst wahrscheinlich dem des L-Glu in der ColD-Struktur entsprechen.



**Abb. 4.4: Aminodonor-Bindezentren von: A ColD (PDB-Code:3R0T) und B TobS2-PLPGln.** Die L-Glu bzw. L-Gln (gelb) koordinierenden Aminosäuren (cyan) sind gesondert beschriftet, alle anderen Aminosäuren und Farbgebungen entsprechen Abb. 4.3 A und E.

In ColD wird L-Glu durch Phe185 und die beiden basischen Aminosäuren His215 und Arg250 koordiniert. L-Gln wird in TobS2 ebenfalls durch die beiden basischen Aminosäuren Arg227 und Arg245 koordiniert, allerdings ist die dritte beteiligte Aminosäure das saure Glu195. Diese Aminosäure ist sehr wahrscheinlich für die Spezifität der einzelnen Enzyme zu ihrem Aminodonor verantwortlich. Alle L-Glutamin nutzenden Enzyme, wie ColD, BtrR, PseC und auch die in Abb. 3.6 gezeigten S1-Enzyme der Kanamycin- und Gentamycin-Gencluster, weisen an dieser Position eine neutrale oder basische Aminosäure auf. Im Falle des ColD ist dies, wie bereits erwähnt, ein Phenylalanin. Bei den S1-Aminotransferasen, einschließlich BtrR, und bei der AHBA-Synthase befindet sich an dieser Position ein Glutamin und bei PseC ein Histidin. Bei allen in Abbildung 3.6 gezeigten S2-Aminotransferasen befindet sich ein Glutamat an dieser Position. So wird über ionische Wechselwirkungen der entsprechende Aminodonor selektiert und

#### 4 Diskussion: Struktur der Aminotransferase TobS2

---

gebunden. Die Positionen der beiden basischen Aminosäuren in ColD und TobS2 sind in allen anderen vorgestellten Enzymen ebenfalls durch Arginine und Histidine besetzt (Abb. 4.5, cyanfarbene Aminosäuren). Dies spricht für eine konservierte Aminodonor-Bindetasche innerhalb der Enzyme vom Aspartat-Aminotransferase-Typ.

Für die Bindetaschen der Substrate können zwischen den einzelnen Aminosäuren nur sehr wenige Parallelen gezogen werden, da sich die Substrate in ihrer Beschaffenheit und Größe stark unterscheiden. Bei den vorgestellten Strukturen gelang es die AHBA-Synthase in Gegenwart des Inhibitors Gabaculin (165), PseC in Gegenwart des Substrates UDP-L-AltNac (166) und ColD in Gegenwart von GDP-Perosamin in der PLP-gebundenen Form (167-169) zu kristallisieren. Abbildung 4.5 zeigt diese Strukturen im Vergleich zu TobS2-PLPTM. Für BtrR werden auf Grundlage der AHBA-Synthase-Struktur und wegen ihrer Nähe zur PLP-Bindetasche die Aminosäuren Trp92 und Gln189 als Teil der Substratbindung vermutet. Des Weiteren sollen die Aminosäuren Phe140, Tyr304 und His339 an der Substratbindung beteiligt sein (156). Vergleicht man nun die in den Veröffentlichungen beschriebenen Aminosäuren der Substratbindetasche mit denen, welche bei TobS2 und ColD, und wahrscheinlich den meisten Aspartat-Aminotransferase-verwandten Enzymen, für die Bindung und Selektion des Aminodonors verantwortlich sind, so stellt man fest, dass die Aminosäuren, welche den Aminodonor binden, auch an der Bindung des Substrates beteiligt sind. Diese Annahme liegt aufgrund der gleichen Lokalisation der Substrate und des Aminodonors im aktiven Zentrum sehr nahe. So könnte auch bei der Selektivität für die Substrate die Aminosäure an der Position des Glu185 (TobS2) eine entscheidende Rolle spielen. Für BtrR wurden an den Positionen von Arg227 und Arg245 der TobS2-Struktur keine Aminosäuren beschrieben, welche an der Bindung des Aminodonors und des Substrates teilhaben. Auf Grundlage des Sequenzalignments (Abb. 4.2) und der ähnlichen Position zu den beiden basischen Aminosäuren der Aminodonorbindetasche von TobS2, AHBA, PseC und ColD könnten aber bei BtrR die Aminosäuren Arg221 und Tyr223 zusätzlich an der Aminodonor- und Substratbindung beteiligt sein.

Neben den drei Aminosäuren der Aminodonor-Bindetasche finden sich noch einige weitere übereinstimmende Aminosäure-Positionen für die Substratbindung. So finden sich bei BtrR und der AHBA-Synthase an der Position des Tyr301 des TobS2 ebenfalls Tyrosine. Tyrosin ist an dieser Position für alle S1- und S2-Aminotransferasen aus Abb. 3.9 konserviert. Bei PseC befindet sich an dieser Position His248, welches zwar nicht als Teil der Bindetasche beschrieben wurde, aber höchstwahrscheinlich zur Koordinierung des Substrates beiträgt.

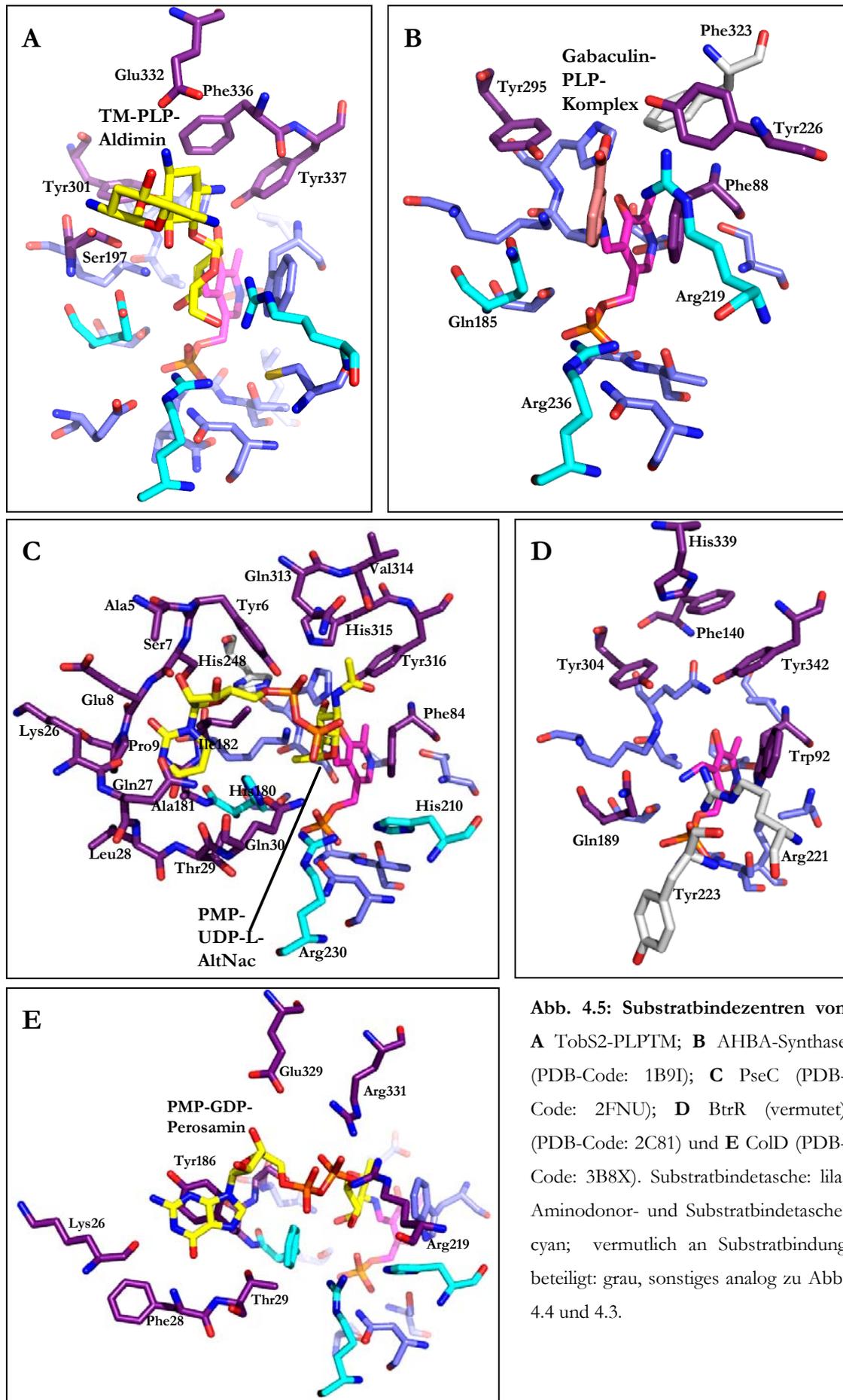


Abb. 4.5: Substratbindezentren von **A** TobS2-PLPTM; **B** AHBA-Synthase (PDB-Code: 1B9I); **C** PscC (PDB-Code: 2FNU); **D** BtrR (vermutet) (PDB-Code: 2C81) und **E** ColD (PDB-Code: 3B8X). Substratbindetasche: lila; Aminodonor- und Substratbindetasche: cyan; vermutlich an Substratbindung beteiligt: grau, sonstiges analog zu Abb. 4.4 und 4.3.

## 4 Diskussion: Struktur der Aminotransferase TobS2

---

Aus dieser Tatsache lässt sich ebenfalls ein Rückschluss auf die Substratspezifität der Enzyme ziehen, denn das Tyrosin koordiniert bei TobS2 das Aglycon des gebundenen AGA. Im Falle der AHBA-Synthase wird der Inhibitor koordiniert. Gabaculin befindet sich an der Position des eigentlichen Substrates AminoDHS, welches der Struktur des Aglycon 2-DOS und dessen Vorstufen sehr ähnlich ist. Da das aktive Zentrum von AHBA, TobS2 und BtrR nahezu identisch aufgebaut ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass die BtrR-Substrate 2-Deoxy-*scyllo*-Inose und Aminodideoxy-*scyllo*-Inose, sowie die Substrate aller S1- und S2-Aminotransferasen ebenfalls an dieser Position koordiniert werden.

Ein weiteres Tyrosin befindet sich an Position 337 des TobS2. An dieser Position befindet sich auch bei allen Aminotransferasen aus Abb. 3.6 und bei PseC ein Tyrosin. Die AHBA-Synthase weist an dieser Position ein Phenylalanin und ColD ein Arginin auf. Das Tyrosin337 von TobS2 koordiniert den Sauerstoff 2'' am PLP gebundenen Zuckerring des Tobramycins, direkt neben der 3''-Position an welcher die Aminogruppe angehängt wird. Bei PseC koordiniert Tyr316 ebenfalls den Sauerstoff neben der zu modifizierenden Position am Zuckerring des UDP-L-AltNacs. Es ist also zu vermuten, dass bei den S1-Enzymen an dieser Position die OH-Gruppe an Position 4 des Aglykons koordiniert wird. Bei der AHBA-Synthase befindet sich am AminoDHS eine COOH-Gruppe, welche etwas mehr Platz im aktiven Zentrum benötigt und daher eher von der etwas weiter entfernten neutralen Aminosäure Phe323 koordiniert wird. Bei ColD werden die negativen Phosphatgruppen durch Arg331 koordiniert.

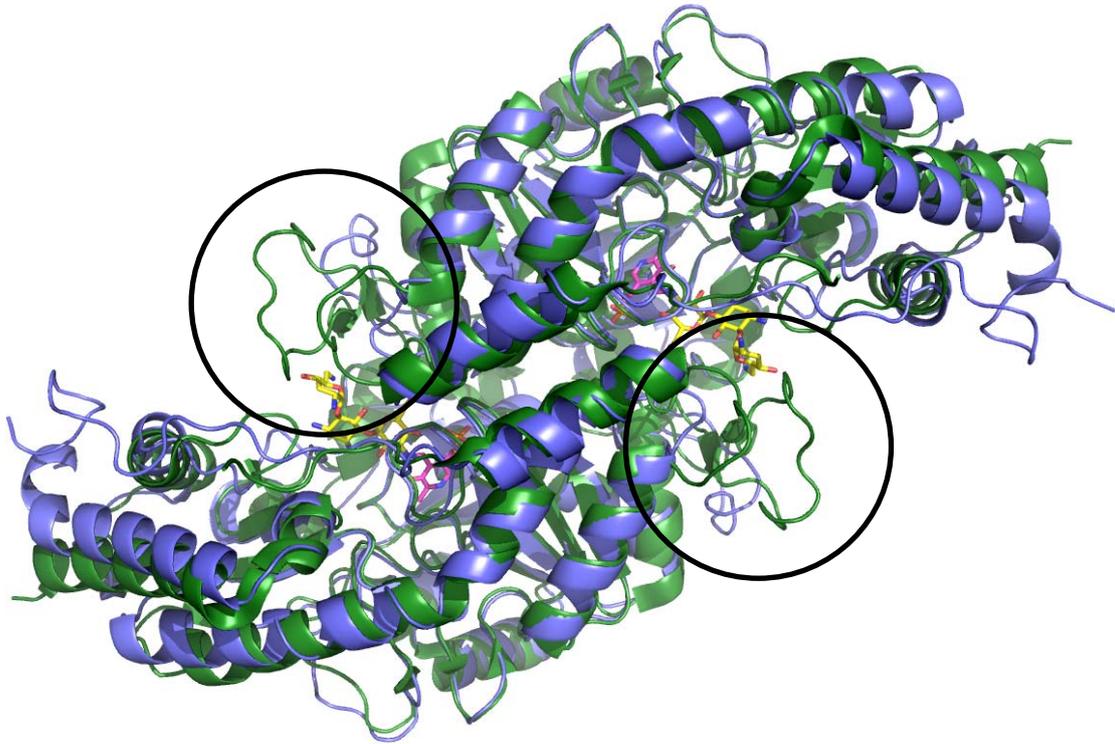
### ***Substratspezifität der S1- und S2-Aminotransferasen***

Die Beschaffenheit der aktiven Zentren gibt Aufschluss über die Substratspezifitäten der hier vorgestellten Enzyme. Die Substratbindetaschen der Aminotransferasen des AGA-Stoffwechsels BtrR und TobS2 sind jedoch nahezu identisch. Aus den an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren allein lässt sich also nicht die Selektivität der S1- und S2-Aminotransferasen für ihre doch sehr unterschiedlichen Substrate ausmachen. Unter anderem könnte die unterschiedliche Größe der *loop*-Regionen, welche den aktiven Zentren vorgelagert sind, ein Grund für die Bindung unterschiedlich großer Substrate sein. Abbildung 4.6 zeigt die Überlagerung der TobS2-PLPTM-Struktur mit der BtrR-PLP-Struktur (PDB-Code: 2C7T). Hier ist deutlich eine vergrößerte *loop*-Region bei BtrR zu erkennen, welche relative weit in die aktiven Zentren hineinragt. TobS2, welches genau wie alle anderen S2-Enzyme ein wesentlich größeres AGA bzw. dessen Vorstufen als Substrat bindet, besitzen kleinere *loop*-Regionen, womit die Bindung des größeren Substrates sterisch nicht behindert werden kann. Die beiden betreffenden *loop*-Regionen umfassen bei BtrR die Aminosäuren 28-45 und 219-247. Es fällt auf, dass in diesen Bereichen viele Aminosäuren innerhalb der S1-Enzyme konserviert vorliegen (Abb. 3.9). Die

#### 4 Diskussion: Struktur der Aminotransferase TobS2

---

entsprechenden *loops* bei TobS2 umfassen die Aminosäuren 38-50 und 225-242, hier finden sich ebenfalls viele ausschließlich unter den S2-Enzymen konservierte Aminosäuren. Somit stellen diese beiden *loops* also charakteristische Regionen der S1- bzw. S2-Enzyme dar, welche mit sehr großer Wahrscheinlichkeit eine entscheidende Rolle bei der Selektion der jeweiligen Substrate spielen.



**Abb. 4.6:** Überlagerung von BtrR (PDB-Code: 2C7T) mit TobS2-PLPTM. Die S1-Enzyme weisen große konservierte *loop*-Regionen (Kreise) im Bereich der aktiven Zentren auf, welche für die Substratspezifität entscheidend sind. Die S2-Enzyme haben kleinere, ebenfalls konservierte *loops*, welche die Bindung wesentlich größerer Substrate zulassen. Grün: BtrR; mittelblau: TobS2-PLPTM; gelb: Tobramycin; magenta: PLP

Aus den erhaltenen Strukturen der S2-Aminotransferase TobS2 in Gegenwart des Kofaktors PLP, des Aminodonors L-Gln und des Substratanalogs Tobramycin konnten in der vorliegenden Arbeit durch den Vergleich zu anderen Aminotransferasen wichtige Rückschlüsse auf die Substratspezifität und -selektivität der Aminotransferasen der pharmakologisch wichtigen AGA-Biosynthesewege gezogen werden.



## Literaturverzeichnis

1. 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**, 1062-1069
2. 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**, 5947-5950
3. Nathans, J., and Hogness, D. S. (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* **34**, 807-814
4. Fredriksson, R., and Schioth, H. B. (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* **67**, 1414-1425
5. Birnbaumer, L., Abramowitz, J., and Brown, A. M. (1990) Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta* **1031**, 163-224
6. Horn, F., Bettler, E., Oliveira, L., Campagne, F., Cohen, F. E., and Vriend, G. (2003) GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res* **31**, 294-297
7. Gether, U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **21**, 90-113
8. Kolakowski, L. F., Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **2**, 1-7
9. Kristiansen, K. (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* **103**, 21-80
10. 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**, 739-745
11. Okada, T., Le Trong, I., Fox, B. A., Behnke, C. A., Stenkamp, R. E., and Palczewski, K. (2000) X-Ray diffraction analysis of three-dimensional crystals of bovine rhodopsin obtained from mixed micelles. *J Struct Biol* **130**, 73-80
12. Teller, D. C., Okada, T., Behnke, C. A., Palczewski, K., and Stenkamp, R. E. (2001) Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Biochemistry* **40**, 7761-7772
13. Standfuss, J., Xie, G., Edwards, P. C., Burghammer, M., Oprian, D. D., and Schertler, G. F. (2007) Crystal structure of a thermally stable rhodopsin mutant. *J Mol Biol* **372**, 1179-1188
14. Li, J., Edwards, P. C., Burghammer, M., Villa, C., and Schertler, G. F. (2004) Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *J Mol Biol* **343**, 1409-1438
15. Park, J. H., Scheerer, P., Hofmann, K. P., Choe, H. W., and Ernst, O. P. (2008) Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* **454**, 183-187
16. Salom, D., Lodowski, D. T., Stenkamp, R. E., Le Trong, I., Golczak, M., Jastrzebska, B., Harris, T., Ballesteros, J. A., and Palczewski, K. (2006) Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16123-16128
17. Scheerer, P., Park, J. H., Hildebrand, P. W., Kim, Y. J., Krauss, N., Choe, H. W., Hofmann, K. P., and Ernst, O. P. (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**, 497-502

18. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383-387
19. Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K., and Stevens, R. C. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-1265
20. Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., Ijzerman, A. P., and Stevens, R. C. (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **322**, 1211-1217
21. Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K., and Jingami, H. (2007) Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3759-3764
22. West, A. P., Jr., Llamas, L. L., Snow, P. M., Benzer, S., and Bjorkman, P. J. (2001) Crystal structure of the ectodomain of Methuselah, a Drosophila G protein-coupled receptor associated with extended lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3744-3749
23. Kobilka, B., and Schertler, G. F. (2008) New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 79-83
24. Stenkamp, R. E. (2008) Alternative models for two crystal structures of bovine rhodopsin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **D64**, 902-904
25. Rovati, G. E., Capra, V., and Neubig, R. R. (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* **71**, 959-964
26. Pin, J. P., Galvez, T., and Prezeau, L. (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **98**, 325-354
27. Tota, M. R., and Strader, C. D. (1990) Characterization of the binding domain of the beta-adrenergic receptor with the fluorescent antagonist carazolol. Evidence for a buried ligand binding site. *J Biol Chem* **265**, 16891-16897
28. Grauschopf, U., Lilie, H., Honold, K., Wozny, M., Reusch, D., Esswein, A., Schafer, W., Rucknagel, K. P., and Rudolph, R. (2000) The N-terminal fragment of human parathyroid hormone receptor 1 constitutes a hormone binding domain and reveals a distinct disulfide pattern. *Biochemistry* **39**, 8878-8887
29. Unson, C. G. (2002) Molecular determinants of glucagon receptor signaling. *Biopolymers* **66**, 218-235
30. Gensure, R. C., Gardella, T. J., and Juppner, H. (2005) Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 666-678
31. Langer, I., Vertongen, P., Perret, J., Waelbroeck, M., and Robberecht, P. (2003) Lysine 195 and aspartate 196 in the first extracellular loop of the VPAC1 receptor are essential for high affinity binding of agonists but not of antagonists. *Neuropharmacology* **44**, 125-131
32. Hoare, S. R. (2005) Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discov Today* **10**, 417-427
33. Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., and Hamm, H. E. (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* **24**, 765-781
34. Slessareva, J. E., Ma, H., Depree, K. M., Flood, L. A., Bae, H., Cabrera-Vera, T. M., Hamm, H. E., and Graber, S. G. (2003) Closely related G-protein-coupled receptors use multiple and distinct domains on G-protein alpha-subunits for selective coupling. *J Biol Chem* **278**, 50530-50536

35. Gardella, T. J., and Juppner, H. (2001) Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 210-217
36. Collip, J. B. (1925) The Internal Secretion of the Parathyroid Glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **11**, 484-485
37. Murray, T. M., Rao, L. G., Divieti, P., and Bringhurst, F. R. (2005) Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocr Rev* **26**, 78-113
38. Agus, Z. S., Gardner, L. B., Beck, L. H., and Goldberg, M. (1973) Effects of parathyroid hormone on renal tubular reabsorption of calcium, sodium, and phosphate. *Am J Physiol* **224**, 1143-1148
39. Raisz, L. G. (1963) Stimulation of bone resorption by parathyroid hormone in tissue culture. *Nature* **197**, 1015-1016
40. Niall, H. D., Keutmann, H., Sauer, R., Hogan, M., Dawson, B., Aurbach, G., and Potts, J., Jr. (1970) The amino acid sequence of bovine parathyroid hormone I. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **351**, 1586-1588
41. Brewer, H. B., Jr., and Ronan, R. (1970) Bovine parathyroid hormone: amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**, 1862-1869
42. Pullman, T. N., Lavender, A. R., Aho, I., and Rasmussen, H. (1960) Direct renal action of a purified parathyroid extract. *Endocrinology* **67**, 570-582
43. Murer, H., Forster, I., and Biber, J. (2004) The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Arch* **447**, 763-767
44. Pfister, M. F., Ruf, I., Stange, G., Ziegler, U., Lederer, E., Biber, J., and Murer, H. (1998) Parathyroid hormone leads to the lysosomal degradation of the renal type II Na/Pi cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1909-1914
45. Segawa, H., Kaneko, I., Takahashi, A., Kuwahata, M., Ito, M., Ohkido, I., Tatsumi, S., and Miyamoto, K. (2002) Growth-related renal type II Na/Pi cotransporter. *J Biol Chem* **277**, 19665-19672
46. Cantorna, M. T., Zhu, Y., Froicu, M., and Wittke, A. (2004) Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, and the immune system. *Am J Clin Nutr* **80**, 1717S-1720S
47. Barnicot, N. A. (1948) The local action of the parathyroid and other tissues on bone in intracerebral grafts. *J Anat* **82**, 233-248
48. Habener, J. F., Potts, J. T., Jr., and Rich, A. (1976) Pre-proparathyroid hormone. Evidence for an early biosynthetic precursor of parathyroid hormone. *J Biol Chem* **251**, 3893-3899
49. Kemper, B., Habener, J. F., Rich, A., and Potts, J. T., Jr. (1975) Microtubules and the intracellular conversion of parathyroid hormone to parathyroid hormone. *Endocrinology* **96**, 903-912
50. Mannstadt, M., Luck, M. D., Gardella, T. J., and Juppner, H. (1998) Evidence for a ligand interaction site at the amino-terminus of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor from cross-linking and mutational studies. *J Biol Chem* **273**, 16890-16896
51. Weidler, M., Marx, U. C., Seidel, G., Schafer, W., Hoffmann, E., Esswein, A., and Rosch, P. (1999) The structure of human parathyroid hormone-related protein(1-34) in near-physiological solution. *FEBS Lett* **444**, 239-244
52. Marx, U. C., Adermann, K., Bayer, P., Forssmann, W. G., and Rosch, P. (2000) Solution structures of human parathyroid hormone fragments hPTH(1-34) and hPTH(1-39) and bovine parathyroid hormone fragment bPTH(1-37). *Biochem Biophys Res Commun* **267**, 213-220

53. Marx, U. C., Austermann, S., Bayer, P., Adermann, K., Ejchart, A., Sticht, H., Walter, S., Schmid, F. X., Jaenicke, R., Forssmann, W. G., and et al. (1995) Structure of human parathyroid hormone 1-37 in solution. *J Biol Chem* **270**, 15194-15202
54. Jin, L., Briggs, S. L., Chandrasekhar, S., Chirgadze, N. Y., Clawson, D. K., Schevitz, R. W., Smiley, D. L., Tashjian, A. H., and Zhang, F. (2000) Crystal structure of human parathyroid hormone 1-34 at 0.9-Å resolution. *J Biol Chem* **275**, 27238-27244
55. Moseley, J. M., Kubota, M., Diefenbach-Jagger, H., Wettenhall, R. E., Kemp, B. E., Suva, L. J., Rodda, C. P., Ebeling, P. R., Hudson, P. J., Zajac, J. D., and et al. (1987) Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5048-5052
56. Burtis, W. J., Wu, T., Bunch, C., Wysolmerski, J. J., Insogna, K. L., Weir, E. C., Broadus, A. E., and Stewart, A. F. (1987) Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem* **262**, 7151-7156
57. Strewler, G. J., Stern, P. H., Jacobs, J. W., Eveloff, J., Klein, R. F., Leung, S. C., Rosenblatt, M., and Nissenson, R. A. (1987) Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin Invest* **80**, 1803-1807
58. Suva, L. J., Winslow, G. A., Wettenhall, R. E., Hammonds, R. G., Moseley, J. M., Diefenbach-Jagger, H., Rodda, C. P., Kemp, B. E., Rodriguez, H., Chen, E. Y., and et al. (1987) A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* **237**, 893-896
59. Brandt, D. W., Wachsman, W., and Deftos, L. J. (1994) Parathyroid hormone-like protein: alternative messenger RNA splicing pathways in human cancer cell lines. *Cancer Res* **54**, 850-853
60. Kronenberg, H. M. (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332-336
61. Neville, M. C., McFadden, T. B., and Forsyth, I. (2002) Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**, 49-66
62. VanHouten, J., Dann, P., McGeoch, G., Brown, E. M., Krapcho, K., Neville, M., and Wysolmerski, J. J. (2004) The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone-related protein production and calcium transport. *J Clin Invest* **113**, 598-608
63. Rodda, C. P., Kubota, M., Heath, J. A., Ebeling, P. R., Moseley, J. M., Care, A. D., Caple, I. W., and Martin, T. J. (1988) Evidence for a novel parathyroid hormone-related protein in fetal lamb parathyroid glands and sheep placenta: comparisons with a similar protein implicated in humoral hypercalcaemia of malignancy. *J Endocrinol* **117**, 261-271
64. Kovacs, C. S., Lanske, B., Hunzelman, J. L., Guo, J., Karaplis, A. C., and Kronenberg, H. M. (1996) Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15233-15238
65. Schipani, E., Kruse, K., and Juppner, H. (1995) A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science* **268**, 98-100
66. Schipani, E., Langman, C. B., Parfitt, A. M., Jensen, G. S., Kikuchi, S., Kooh, S. W., Cole, W. G., and Juppner, H. (1996) Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *N Engl J Med* **335**, 708-714
67. Schipani, E., Langman, C., Hunzelman, J., Le Merrer, M., Loke, K. Y., Dillon, M. J., Silve, C., and Juppner, H. (1999) A novel parathyroid hormone (PTH)/PTH-related

- peptide receptor mutation in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 3052-3057
68. Bastepe, M., Raas-Rothschild, A., Silver, J., Weissman, I., Wientroub, S., Juppner, H., and Gillis, D. (2004) A form of Jansen's metaphyseal chondrodysplasia with limited metabolic and skeletal abnormalities is caused by a novel activating parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mutation. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3595-3600
  69. Jobert, A. S., Zhang, P., Couvineau, A., Bonaventure, J., Roume, J., Le Merrer, M., and Silve, C. (1998) Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Invest* **102**, 34-40
  70. Zhang, P., Jobert, A. S., Couvineau, A., and Silve, C. (1998) A homozygous inactivating mutation in the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor causing Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3365-3368
  71. Karaplis, A. C., He, B., Nguyen, M. T., Young, I. D., Semeraro, D., Ozawa, H., and Amizuka, N. (1998) Inactivating mutation in the human parathyroid hormone receptor type 1 gene in Blomstrand chondrodysplasia. *Endocrinology* **139**, 5255-5258
  72. Karperien, M., van der Harten, H. J., van Schooten, R., Farih-Sips, H., den Hollander, N. S., Kneppers, S. L., Nijweide, P., Papapoulos, S. E., and Lowik, C. W. (1999) A frame-shift mutation in the type I parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor causing Blomstrand lethal osteochondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 3713-3720
  73. Hopyan, S., Gokgoz, N., Poon, R., Gensure, R. C., Yu, C., Cole, W. G., Bell, R. S., Juppner, H., Andrulis, I. L., Wunder, J. S., and Alman, B. A. (2002) A mutant PTH/PTHrP type I receptor in enchondromatosis. *Nat Genet* **30**, 306-310
  74. Dempster, D. W., Cosman, F., Parisien, M., Shen, V., and Lindsay, R. (1993) Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev* **14**, 690-709
  75. Reeve, J., Meunier, P. J., Parsons, J. A., Bernat, M., Bijvoet, O. L., Courpron, P., Edouard, C., Klenerman, L., Neer, R. M., Renier, J. C., Slovik, D., Vismans, F. J., and Potts, J. T., Jr. (1980) Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. *Br Med J* **280**, 1340-1344
  76. Neer, R. M., Arnaud, C. D., Zanchetta, J. R., Prince, R., Gaich, G. A., Reginster, J. Y., Hodsmann, A. B., Eriksen, E. F., Ish-Shalom, S., Genant, H. K., Wang, O., and Mitlak, B. H. (2001) Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* **344**, 1434-1441
  77. Orwoll, E. S., Scheele, W. H., Paul, S., Adami, S., Syversen, U., Diez-Perez, A., Kaufman, J. M., Clancy, A. D., and Gaich, G. A. (2003) The effect of teriparatide [human parathyroid hormone (1-34)] therapy on bone density in men with osteoporosis. *J Bone Miner Res* **18**, 9-17
  78. Usdin, T. B., Gruber, C., and Bonner, T. I. (1995) Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem* **270**, 15455-15458
  79. Usdin, T. B., Hoare, S. R., Wang, T., Mezey, E., and Kowalak, J. A. (1999) TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus. *Nat Neurosci* **2**, 941-943
  80. Hoare, S. R., and Usdin, T. B. (2001) Molecular mechanisms of ligand recognition by parathyroid hormone 1 (PTH1) and PTH2 receptors. *Curr Pharm Des* **7**, 689-713
  81. Usdin, T. B. (1997) Evidence for a parathyroid hormone-2 receptor selective ligand in the hypothalamus. *Endocrinology* **138**, 831-834

82. Hoare, S. R., Bonner, T. I., and Usdin, T. B. (1999) Comparison of rat and human parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor activation: PTH is a low potency partial agonist at the rat PTH2 receptor. *Endocrinology* **140**, 4419-4425
83. Bago, A. G., Dimitrov, E., Saunders, R., Seress, L., Palkovits, M., Usdin, T. B., and Dobolyi, A. (2009) Parathyroid hormone 2 receptor and its endogenous ligand tuberoinfundibular peptide of 39 residues are concentrated in endocrine, viscerosensory and auditory brain regions in macaque and human. *Neuroscience* **162**, 128-147
84. Ward, H. L., Small, C. J., Murphy, K. G., Kennedy, A. R., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2001) The actions of tuberoinfundibular peptide on the hypothalamo-pituitary axes. *Endocrinology* **142**, 3451-3456
85. Dobolyi, A., Ueda, H., Uchida, H., Palkovits, M., and Usdin, T. B. (2002) Anatomical and physiological evidence for involvement of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in nociception. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1651-1656
86. Sugimura, Y., Murase, T., Ishizaki, S., Tachikawa, K., Arima, H., Miura, Y., Usdin, T. B., and Oiso, Y. (2003) Centrally administered tuberoinfundibular peptide of 39 residues inhibits arginine vasopressin release in conscious rats. *Endocrinology* **144**, 2791-2796
87. Usdin, T. B., Dobolyi, A., Ueda, H., and Palkovits, M. (2003) Emerging functions for tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Trends Endocrinol Metab* **14**, 14-19
88. LaBuda, C. J., Dobolyi, A., and Usdin, T. B. (2004) Tuberoinfundibular peptide of 39 residues produces anxiolytic and antidepressant actions. *Neuroreport* **15**, 881-885
89. LaBuda, C. J., and Usdin, T. B. (2004) Tuberoinfundibular peptide of 39 residues decreases pain-related affective behavior. *Neuroreport* **15**, 1779-1782
90. Palkovits, M., Harvey-White, J., Liu, J., Kovacs, Z. S., Bobest, M., Lovas, G., Bago, A. G., and Kunos, G. (2008) Regional distribution and effects of postmortal delay on endocannabinoid content of the human brain. *Neuroscience* **152**, 1032-1039
91. Wang, J., Coolen, L. M., Brown, J. L., and Usdin, T. B. (2006) Neurons containing tuberoinfundibular peptide of 39 residues are activated following male sexual behavior. *Neuropeptides* **40**, 403-408
92. Fegley, D. B., Holmes, A., Riordan, T., Faber, C. A., Weiss, J. R., Ma, S., Batkai, S., Pacher, P., Dobolyi, A., Murphy, A., Sleeman, M. W., and Usdin, T. B. (2008) Increased fear- and stress-related anxiety-like behavior in mice lacking tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Genes Brain Behav* **7**, 933-942
93. Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E., and Downing, K. H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* **213**, 899-929
94. Parthier, C., Kleinschmidt, M., Neumann, P., Rudolph, R., Manhart, S., Schlenzig, D., Fanghanel, J., Rahfeld, J. U., Demuth, H. U., and Stubbs, M. T. (2007) Crystal structure of the incretin-bound extracellular domain of a G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13942-13947
95. Grace, C. R., Perrin, M. H., Gulyas, J., Digruccio, M. R., Cantle, J. P., Rivier, J. E., Vale, W. W., and Riek, R. (2007) Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4858-4863
96. Runge, S., Thogersen, H., Madsen, K., Lau, J., and Rudolph, R. (2008) Crystal structure of the ligand-bound glucagon-like peptide-1 receptor extracellular domain. *J Biol Chem* **283**, 11340-11347
97. Pioszak, A. A., and Xu, H. E. (2008) Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5034-5039

98. Grace, C. R., Perrin, M. H., DiGrucchio, M. R., Miller, C. L., Rivier, J. E., Vale, W. W., and Riek, R. (2004) NMR structure and peptide hormone binding site of the first extracellular domain of a type B1 G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12836-12841
99. Bazarsuren, A. (2003) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Ligandenbindungsdomäne des humanen GLP-1 Rezeptors. In *Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät (mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
100. Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130
101. Bosse-Doenecke, E., Weininger, U., Gopalswamy, M., Balbach, J., Knudsen, S. M., and Rudolph, R. (2008) High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors. *Protein Expr Purif* **58**, 114-121
102. Teich, A., Meyer, S., Lin, H. Y., Andersson, L., Enfors, S., and Neubauer, P. (1999) Growth rate related concentration changes of the starvation response regulators sigmaS and ppGpp in glucose-limited fed-batch and continuous cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **15**, 123-129
103. Rudolph, R., and Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J* **10**, 49-56
104. Rivas, G., Stafford, W., and Minton, A. P. (1999) Characterization of heterologous protein-protein interactions using analytical ultracentrifugation. *Methods* **19**, 194-212
105. Schmid, F. X. (1989) *IRL Press at Oxford University Press, Oxford*, 251-285
106. Leslie, A. G. W. (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* **26**
107. Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Applied Crystallography* **26**, 795-800
108. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Lebedev, A., Wilson, K. S., and Dodson, E. J. (1999) Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**, 247-255
109. Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K., and Terwilliger, T. C. (2002) PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 1948-1954
110. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132
111. Jelesarov, I., and Bosshard, H. R. (1999) Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Recognit* **12**, 3-18
112. Sun, C., Song, D., Davis-Taber, R. A., Barrett, L. W., Scott, V. E., Richardson, P. L., Pereda-Lopez, A., Uchic, M. E., Solomon, L. R., Lake, M. R., Walter, K. A., Hajduk, P. J., and Olejniczak, E. T. (2007) Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-RS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7875-7880
113. Pioszak, A. A., Parker, N. R., Suino-Powell, K., and Xu, H. E. (2008) Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *J Biol Chem* **283**, 32900-32912
114. Parthier, C., Reedtz-Runge, S., Rudolph, R., and Stubbs, M. T. (2009) Passing the baton in class B GPCRs: peptide hormone activation via helix induction? *Trends Biochem Sci* **34**, 303-310

115. 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**, 3532-3539
116. 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**, 13188-13200
117. Sasaki, K., Dockerill, S., Adamiak, D. A., Tickle, I. J., and Blundell, T. (1975) X-ray analysis of glucagon and its relationship to receptor binding. *Nature* **257**, 751-757
118. Braun, W., Wider, G., Lee, K. H., and Wuthrich, K. (1983) Conformation of glucagon in a lipid-water interphase by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance. *J Mol Biol* **169**, 921-948
119. Wray, V., Federau, T., Gronwald, W., Mayer, H., Schomburg, D., Tegge, W., and Wingender, E. (1994) The structure of human parathyroid hormone from a study of fragments in solution using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and its biological implications. *Biochemistry* **33**, 1684-1693
120. Blind, E., Raue, F., Knappe, V., Schroth, J., and Ziegler, R. (1993) Cyclic AMP formation in rat bone and kidney cells is stimulated equally by parathyroid hormone-related protein (PTHrP) 1-34 and PTH 1-34. *Exp Clin Endocrinol* **101**, 150-155
121. Slatopolsky, E., Finch, J., Clay, P., Martin, D., Sicard, G., Singer, G., Gao, P., Cantor, T., and Dusso, A. (2000) A novel mechanism for skeletal resistance in uremia. *Kidney Int* **58**, 753-761
122. Nguyen-Yamamoto, L., Rousseau, L., Brossard, J. H., Lepage, R., and D'Amour, P. (2001) Synthetic carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone (PTH) decrease ionized calcium concentration in rats by acting on a receptor different from the PTH/PTH-related peptide receptor. *Endocrinology* **142**, 1386-1392
123. 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**, 5929-5934
124. Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Yao, X. J., Weis, W. I., Stevens, R. C., and Kobilka, B. K. (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* **318**, 1266-1273
125. Day, P. W., Rasmussen, S. G., Parnot, C., Fung, J. J., Masood, A., Kobilka, T. S., Yao, X. J., Choi, H. J., Weis, W. I., Rohrer, D. K., and Kobilka, B. K. (2007) A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography. *Nat Methods* **4**, 927-929
126. Vakulenko, S. B., and Mobashery, S. (2003) Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* **16**, 430-450
127. Schatz, A., and Waksman, S. A. (1944) Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **57**, 244-248
128. Aoki, Y. (1994) Bactericidal activity of arbekacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Comparison with that of vancomycin. *Jpn J Antibiot* **47**, 640-646
129. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920
130. Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000) The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **103**, 1143-1154

131. Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**, 340-348
132. Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., and Yonath, A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**, 679-688
133. Schluenzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., and Yonath, A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* **102**, 615-623
134. Vicens, Q., and Westhof, E. (2001) Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure* **9**, 647-658
135. Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., and Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**, 327-339
136. Vicens, Q., and Westhof, E. (2002) Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding a site. *Chem Biol* **9**, 747-755
137. Kondo, J., Pachamuthu, K., Francois, B., Szychowski, J., Hanessian, S., and Westhof, E. (2007) Crystal structure of the bacterial ribosomal decoding site complexed with a synthetic doubly functionalized paromomycin derivative: a new specific binding mode to an a-minor motif enhances in vitro antibacterial activity. *ChemMedChem* **2**, 1631-1638
138. Green, R., and Noller, H. F. (1997) Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* **66**, 679-716
139. Vicens, Q., and Westhof, E. (2003) Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide. *J Mol Biol* **326**, 1175-1188
140. Francois, B., Russell, R. J., Murray, J. B., Aboul-ela, F., Masquida, B., Vicens, Q., and Westhof, E. (2005) Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. *Nucleic Acids Res* **33**, 5677-5690
141. Zhao, F., Zhao, Q., Blount, K. F., Han, Q., Tor, Y., and Hermann, T. (2005) Molecular recognition of RNA by neomycin and a restricted neomycin derivative. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 5329-5334
142. Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Tarry, M. J., Carter, A. P., and Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**, 897-902
143. Ogle, J. M., Carter, A. P., and Ramakrishnan, V. (2003) Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem Sci* **28**, 259-266
144. Ogle, J. M., Murphy, F. V., Tarry, M. J., and Ramakrishnan, V. (2002) Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* **111**, 721-732
145. Ogle, J. M., and Ramakrishnan, V. (2005) Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* **74**, 129-177
146. Leigh, D. A., Bradnock, K., and Marriner, J. M. (1981) Augmentin (amoxycillin and clavulanic acid) therapy in complicated infections due to beta-lactamase producing bacteria. *J Antimicrob Chemother* **7**, 229-236
147. Roselle, G. A., Bode, R., Hamilton, B., Bibler, M., Sullivan, R., Douce, R., Staneck, J. L., and Bullock, W. E. (1985) Clinical trial of the efficacy and safety of ticarcillin and clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother* **27**, 291-296

148. Francois, B., Szychowski, J., Adhikari, S. S., Pachamuthu, K., Swayze, E. E., Griffey, R. H., Migawa, M. T., Westhof, E., and Hanessian, S. (2004) Antibacterial aminoglycosides with a modified mode of binding to the ribosomal-RNA decoding site. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 6735-6738
149. Hanessian, S., Szychowski, J., Adhikari, S. S., Vasquez, G., Kandasamy, P., Swayze, E. E., Migawa, M. T., Ranken, R., Francois, B., Wirmer-Bartoschek, J., Kondo, J., and Westhof, E. (2007) Structure-based design, synthesis, and A-site rRNA cocrystal complexes of functionally novel aminoglycoside antibiotics: C2" ether analogues of paromomycin. *J Med Chem* **50**, 2352-2369
150. Russell, R. J., Murray, J. B., Lentzen, G., Haddad, J., and Mobashery, S. (2003) The complex of a designer antibiotic with a model aminoacyl site of the 30S ribosomal subunit revealed by X-ray crystallography. *J Am Chem Soc* **125**, 3410-3411
151. Kondo, J., Francois, B., Russell, R. J., Murray, J. B., and Westhof, E. (2006) Crystal structure of the bacterial ribosomal decoding site complexed with amikacin containing the gamma-amino-alpha-hydroxybutyryl (haba) group. *Biochimie* **88**, 1027-1031
152. Ota, Y., Tamegai, H., Kudo, F., Kuriki, H., Koike-Takeshita, A., Eguchi, T., and Kakinuma, K. (2000) Butirosin-biosynthetic gene cluster from *Bacillus circulans*. *J Antibiot (Tokyo)* **53**, 1158-1167
153. Du, Y., Li, T., Wang, Y. G., and Xia, H. (2004) Identification and functional analysis of dTDP-glucose-4,6-dehydratase gene and its linked gene cluster in an aminoglycoside antibiotics producer of *Streptomyces tenebrarius* H6. *Curr Microbiol* **49**, 99-107
154. Cong, L., and Piepersberg, W. (2007) Cloning and characterization of genes encoded in dTDP-D-mycaminose biosynthetic pathway from a midecamycin-producing strain, *Streptomyces mycarofaciens*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **39**, 187-193
155. Arya, D. P. (2007) *Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Inc.
156. Popovic, B., Tang, X., Chirgadze, D. Y., Huang, F., Blundell, T. L., and Spencer, J. B. (2006) Crystal structures of the PLP- and PMP-bound forms of BtrR, a dual functional aminotransferase involved in butirosin biosynthesis. *Proteins* **65**, 220-230
157. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods in Enzymology* (Carter, C. W., Jr., and Sweet, R. M., eds) Vol. 276 pp. 307-326, Academic Press New York
158. Kabsch, W. (1988) Evaluation of Single Crystal X-ray Diffraction Data From A Position Sensitive Detector. *J Appl Cryst* **21**, 916-924
159. Kabsch, W. (1988) Automatic indexing of rotation diffraction patterns. *J Appl Cryst* **21**, 67-71
160. Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotating diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst* **26**, 795-800
161. Storoni, L. C., McCoy, A. J., and Read, R. J. (2004) Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 432-438
162. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**, 905-921
163. Kleywegt, G. J. (1996) Use of non-crystallographic symmetry in protein structure refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**, 842-857
164. Ford, G. C., Eichele, G., and Jansonius, J. N. (1980) Three-dimensional structure of a pyridoxal-phosphate-dependent enzyme, mitochondrial aspartate aminotransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 2559-2563

165. Eads, J. C., Beeby, M., Scapin, G., Yu, T. W., and Floss, H. G. (1999) Crystal structure of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) synthase. *Biochemistry* **38**, 9840-9849
166. Schoenhofen, I. C., Lunin, V. V., Julien, J. P., Li, Y., Ajamian, E., Matte, A., Cygler, M., Brisson, J. R., Aubry, A., Logan, S. M., Bhatia, S., Wakarchuk, W. W., and Young, N. M. (2006) Structural and functional characterization of PseC, an aminotransferase involved in the biosynthesis of pseudaminic acid, an essential flagellar modification in *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* **281**, 8907-8916
167. Cook, P. D., and Holden, H. M. (2007) A structural study of GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose-3-dehydratase: caught in the act of geminal diamine formation. *Biochemistry* **46**, 14215-14224
168. Cook, P. D., and Holden, H. M. (2008) GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose 3-dehydratase, accommodating a sugar substrate in the active site. *J Biol Chem* **283**, 4295-4303
169. Cook, P. D., and Holden, H. M. (2008) GDP-perosamine synthase: structural analysis and production of a novel trideoxysugar. *Biochemistry* **47**, 2833-2840

### Abkürzungen

2-DOS	2-Deoxystreptamin
AGA	Aminoglykosid-Antibiotikum
AU	Absorptionseinheiten
C5A	<i>complement component 5a</i>
ca.	circa
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
CRF	<i>corticotropin releasing factor</i>
fMLP	N-formyl Methionin-Leucin-Phenylalanin
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GHRH	<i>growth hormone releasing hormone</i>
GHS	<i>growth hormone secretagogue</i>
GIP	glukoseabhängiges insulinotropes Peptid
GLP	<i>glucagon-like peptide</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
kD	Kilodalton
LH	Luteinisierendes Hormon
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
nPTHR1	N-terminale Domäne des PTHR1
nPTHR2	N-terminale Domäne des PTHR2
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase activating peptide</i>
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
PMP	Pyridoxamin-5'-Phosphat
PTH	Parathormon
PTHr1	Parathormon-Rezeptor 1
PTHr2	Parathormon-Rezeptor 2
PTHrP	<i>Parathormon-related peptide</i>
RMSD	<i>root means squared distance</i> , Standardabweichung
spp.	spezies pluralis
TM	Tobramycin
TMH	Transmembran-Helix
TOBS2	L-Glutamin:Glykosyl-Paromamine-3"-Aminotransferase
TRH	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
TSH	thyreotropes Hormon/Thyreotropin

## Abkürzungen

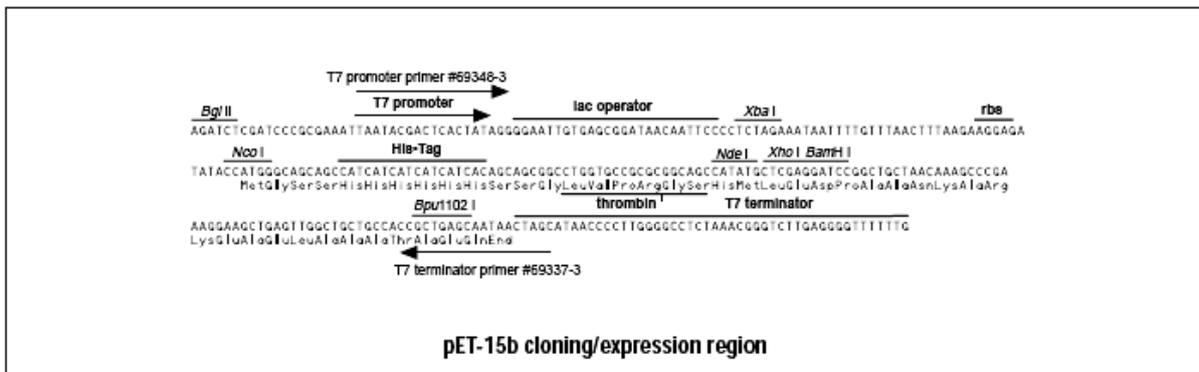
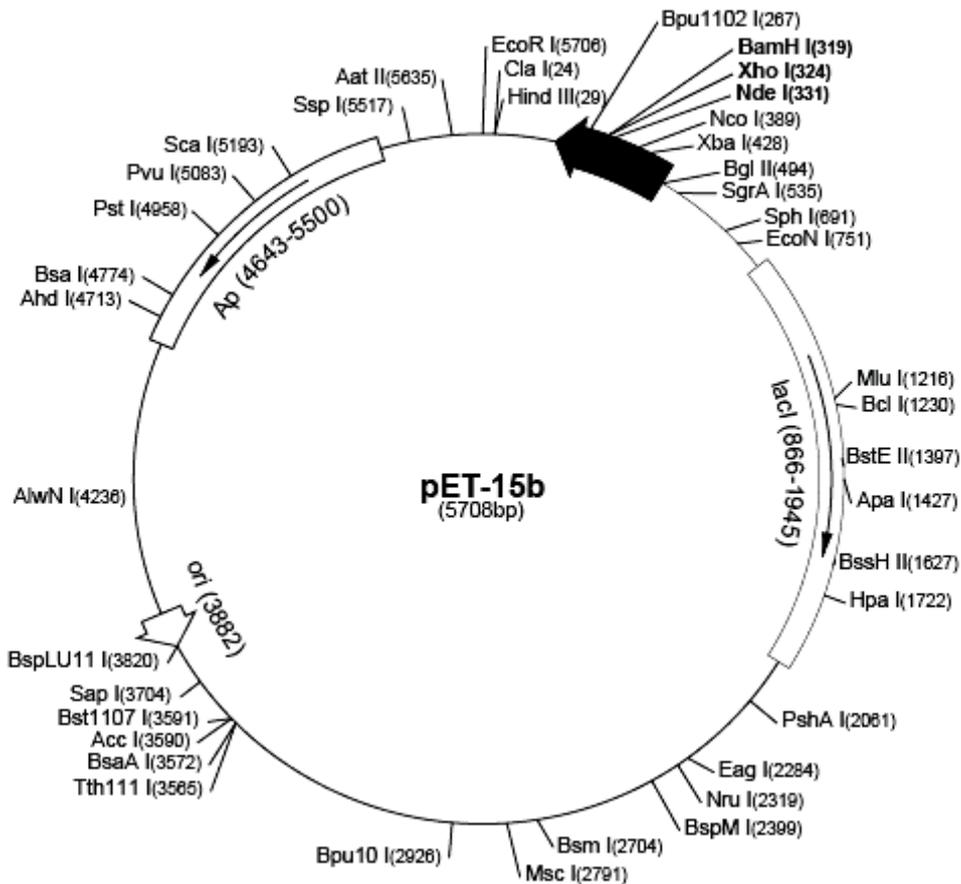
---

u.a.	und andere
VIP	<i>vasoactive intestinal peptide</i>
z.B.	zum Beispiel

# Anhang

## Zu Teil 1: Strukturelle Untersuchungen an den extrazellulären Domänen der Parathormon-Rezeptoren 1 und 2

Expressionsvektor pET15b: Novagen



**Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten:**

nPTHR1: M=21627,2 Da  $\epsilon_{280}=37930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

nPTHR2: M=16094,2 Da  $\epsilon_{280}=28335 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

PTH(1-37): M=4117,7 Da  $\epsilon_{280}=5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

nPTHR1-(GS)12-PTH(1-34): M=26591,8 Da  $\epsilon_{280}=43805 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

nPTHR1-(GS)14-PTH(1-34): M=26735,9 Da  $\epsilon_{280}=43430 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Alle Extinktionskoeffizienten wurden für das native Protein angegeben

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass diese Arbeit selbstständig und unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Ich versichere weiterhin, dass allen anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Halle, August 2009

*Der praktische Teil zur vorliegenden Arbeit wurde von September 2004 bis Juli 2008 am Institut für Biotechnologie, Abteilung physikalische Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bei Prof. Milton T. Stubbs angefertigt.*

*Herrn Prof. Stubbs möchte ich sehr herzlich für die Überlassung der Dissertationsthemen und für die Unterstützung in allen Lebenslagen und Arbeitssituationen danken. Besonders danke ich Prof. Stubbs und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, vor allem Piotr Neumann, Anita Hoffmann, Ulrike Bräuer, Christoph Parthier und Beatrice Eppler, für das herzliche und familiäre Arbeitsklima und für die diversen Hilfestellungen im praktischen und theoretischen Bereich. Piotr Neumann und Christoph Parthier danke ich im Besonderen für die Hilfestellungen bei der Auswertung der Strukturdaten von TobS2 und PTH(1-37) und die fruchtbaren Diskussionen zu beiden Themen meiner Arbeit.*

*Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rainer Rudolph danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit, Kommunikation und einen konstruktiven Informationsaustausch. Besonders danke ich hier Hauke Lilie und Christian Lange für die Unterstützung bei der biophysikalischen Charakterisierung der N-terminalen Rezeptordomänen und deren Fusionsproteinen und für einige sehr hilfreiche Tips.*

*Herrn Udo Wehmeier der Universität Wuppertal danke ich für die Bereitstellung der Aminotransferase TobS2 und für die Einführung in Sachen Aminotransferasen der AGA-Biosynthesewege.*

*Des Weiteren danke ich meinen studentischen Hilfskräften Christina Kießling, Stephan Fleischer und Gerda Hübner für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag.*

# Lebenslauf



Name: Julia Hennig

Geburtsdatum: 24.08.1980

Geburtsort: Schmölln (Thüringen)

Eltern: Andrea Johanna Hennig, geb. Böhme und Frank Michael Hennig

## Ausbildung

- Juli 1999                      Abitur, Staatliches Gymnasium Schmölln, Hauptfächer: Deutsch, Biologie, Mathematik
- September 1999              Aufnahme des Biochemiestudiums an der MLU in Halle (Saale)
- September 2001              Vordiplom in Biochemie, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Juli 2004                      Diplomprüfung in Biochemie, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Betreuer: PD Dr. Hauke Lilie, AG Prof. Rudolph
- Virusanaloge Partikel des Polyomahüllproteins VP1 als Carrier-System für Proteine*
- September 2004              Doktorarbeit, Physikalische Biotechnologie, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- Juli 2008
- Betreuer: Prof. Dr. Milton T. Stubbs
- September 2008              Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Biophysik
- März 2009                      Frankfurt am Main, AG Prof. Dr. H. Michel
- April 2009                      Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Leipzig, AG Prof. Dr. M. Schäfer
- Oktober 2009
- seit November 2009        Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Physikalische Biotechnologie, ZIK HALOmem, AG Tanabe, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg