

**Rekonstitution des  
humanen Parathormon Rezeptors (PTHr1)  
in Liposomen**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des wissenschaftlichen Grades

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftliche Fakultät I

Institut für Biochemie und Biotechnologie

der

**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von

Herr Diplom Biochemiker

**Nils Drechsler**

geboren am 24.07.1979 in Oldenburg (Oldb.)

Gutachter:

1. PD Dr. Hauke Lilie
2. Prof. Dr. Dieter Oesterhelt
3. Prof. Dr. Jochen Balbach

Verteidigung am 8.4.2013 in Halle (Saale)



# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis .....	1
2	Abkürzungsverzeichnis.....	4
3	Zusammenfassung .....	7
4	Einleitung.....	9
4.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR).....	9
4.1.1	Aufbau und Klassifizierung.....	9
4.1.2	Aktivierung, Signaltransduktion und Dimerisierung von GPCR.....	11
4.1.3	Phosphorylierung, Desensitisierung und Internalisierung.....	14
4.1.4	Strukturelle Untersuchung und Funktionsweisen von GPCR .....	16
4.2	Humane Parathormon-Rezeptor (PTHr1).....	20
4.2.1	Strukturelle Untersuchung am Parathormon-Rezeptor .....	24
4.2.2	Charakterisierung signifikanter Bindungsstellen zwischen PTH und PTHR1.....	26
4.3	Rekonstitution in künstliche Membransysteme .....	28
4.3.1	Herstellung von Proteoliposomen.....	30
4.4	Problemstellung .....	32
5	Material und Methoden.....	35
5.1	Material .....	35
5.1.1	Chemikalien.....	35
5.1.2	Trägermaterialien und Reagenzien .....	37
5.1.3	Bakterienstamm und Plasmid .....	38
5.1.4	Medien und Lösungen für eine Bakterienkultivierung .....	38
5.1.5	Verwendete Puffer und Lösungen .....	39
5.1.6	Technische Geräte und Anlagen.....	42
5.2	Methoden.....	44
5.2.1	Allgemeine proteinchemische Methoden.....	44
5.2.2	Herstellung von Fusionsproteinen .....	47
5.2.3	Herstellung des Parathormon-Rezeptor (PTHr1) .....	49
5.2.4	Allgemeine Reinigungsmethoden von Proteinen als <i>inclusion bodies</i> aus <i>E.coli</i> .....	53

5.2.5	Renaturierung von rekombinanten Proteinen aus <i>inclusion bodies</i> .....	55	
5.3	Methoden zur proteinchemischen Charakterisierung .....	56	
5.3.1	Ankonzentrierung des renaturierten PTHR1 .....	56	
5.3.2	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	57	
5.3.3	Circulardichroismus .....	57	
5.3.4	Fluoreszenzspektroskopie .....	58	
5.4	Rekonstitution von Membranproteinen in künstliche Membransysteme .....	59	
5.4.1	Rekonstitution in Liposomen .....	59	
5.5	Ligandenbindungsexperimente .....	63	
5.5.1	<i>Pulldown</i> -Assay.....	63	
5.5.2	Radioliganden Bindungsassay.....	63	
5.5.3	Komplexisolierung der PTHR1-Proteoliposomen/ PTH-ECFP .....	mittels Gelfiltration..... 66	
5.5.4	Bildung des Komplexes aus PTHR1-Proteoliposomen/ PTH-ECFP.....	67	
5.5.5	Analyse des isolierten Komplexes aus .....	PTHR1-Proteoliposomen/ PTH-ECFP..... 68	
6	Ergebnisse.....	69	
6.1	Parathormon-Rezeptor (PTHR1) .....	69	
6.1.1	Fermentation des Parathormon-Rezeptors .....	69	
6.1.2	Reinigung des Parathormon-Rezeptors.....	74	
6.1.3	Renaturierung des Parathormon-Rezeptors mittels .....	<i>artificial-chaperone</i> -System..... 76	
6.1.4	Biophysikalische Charakterisierung des .....	renaturierten, mizellären PTHR1 .....	82
6.2	Rekonstitution des Parathormon-Rezeptors in Liposomen .....	90	
6.2.1	Herstellung von Liposomen .....	91	
6.2.2	Herstellung von PTHR1-Proteoliposomen.....	92	
6.2.3	Nachweis der Rekonstitution des PTHR1 in Liposomen .....	95	
6.3	Analyse der Ligandenbindung des rekonstituierten .....	Parathormon-Rezeptors in Liposomen .....	98
6.3.1	<i>Pulldown</i> -Assay.....	99	
6.3.2	Ligandenbindungsexperimente mit radioaktivem Parathormon.....	100	
6.3.3	Filterbindungs-Assay mit PTHR1-Proteoliposomen .....	101	
6.3.4	Ko-Elutionsexperimente mit PTH gekoppelt an .....	das <i>enhanced cyan flourescence protein</i> (ECFP) .....	102

---

7	Diskussion.....	111	
7.1	Produktion, Renaturierung und biophysikalische Charakterisierung ..... des mizellären PTHR1.....	112	
7.2	Rekonstitution des PTHR1 in Membran-Mimetika .....	116	
7.3	Funktionelle Analyse des rekontituierten PTHR1 .....	118	
8	Ausblick .....	121	
9	Literaturverzeichnis .....	123	
10	Anhang .....	135	
10.1	Produktion von PTH- und GLP1-ECFP Fusionsproteinen.....	135	
10.1.1	Fermentation der SUMO-ECFP Fusionsproteine .....	136	
10.1.2	GLP-ECFP Produktion .....	138	
10.1.3	Reinigung der SUMO-ECFP Fusionsproteine.....	138	
10.1.4	Massenspektrometrische Analyse der gereinigten Fusionsproteine .....	139	
10.1.5	Analyse der Ligandenbindung von PTH-ECFP zu nPTHR1 .....	140	
10.2	Basen- und Aminosäuresequenz des Parathormon Rezeptor 1.....	141	
10.2.1	Basensequenz des humanen PTHR1 .....	141	
10.2.2	Entfernung des C-terminalen Stop-Codons.....	142	
10.2.3	Proteinsequenz.....	142	
10.3	Herstellung von PTHR1-Varianten.....	143	
10.3.1	Basensequenz des PTHR1 mit eingefügter Schnittstelle .....	für die TEV-Protease .....	143
10.3.2	Aminosäuresequenz des PTHR1-TEV-Konstrukts.....	144	
10.4	Detergens-Optimierung zur Renaturierung des PTHR1 .....	144	
10.5	Rekonstitution in riesigen unilamellaren Vesikeln (GUVs) .....	146	
10.6	Rekonstitution des PTHR1 in Nanodiscs .....	149	
11	Eidesstadliche Erklärung .....	152	
12	Danksagung .....	153	
13	Lebenslauf.....	154	
14	Publikation.....	155	

## 2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABC-Transporter	<i>ATP-binding-cassette</i> -Transporter
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AEDANS	5-Acetylethylendiamin-naphthalin-1-sulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AZ	Adenylatzyklase
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHAPS	3-[3-(Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
CMC	<i>critical micellar concentration</i> – kritische Mizellenbildungskonzentration
COS	<i>Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40</i>
DAG	Diazyglyzerol
DDM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GEF	Guanosin-Nukleotid-Austauschfaktor
GLP	<i>glucagon-like-peptide</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen
GSH	Glutathion, reduziert ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglyzin)
GSSG	Glutathion, oxidiert
GTP	Guanosintriphosphat
GUV	große unilamellare Vesikel

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HR	<i>high resolution</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> - Meerrettichperoxidase
IB	<i>inclusion bodies</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-galaktopyranosid
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
kDa	Kilodalton
L	Liter (cm <sup>3</sup> )
LB	<i>lysogeny broth</i>
LH	Luteinisierende Hormon
LPA	Lysophosphatidsäure
M	Molar (g/l)
mAK	monoklonaler Antikörper
MAP-Kinasen	mitogenaktivierte Proteinkinasen
MBP	Maltose-Bindeprotein
min	Minute
MSP	<i>membrane scaffold protein</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> - Molekulare Ausschlußgröße
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NTA	Nitrilotriessigsäure
nGLPR	N-terminale Domäne <i>glucagon-like-peptide</i> -Rezeptor
n-OG	n-Oktyl-β-D-glucoopyranoside
nPTHr1	N-terminale Domäne des Parathormon Rezeptor
NPY	Neuropeptid Y
P	Phosphat
PAF	<i>platelet activating factor</i> - Blutplättchen aktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PCR	Polymerasekettenreaktion

Abkürzung	Bedeutung
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PI3K	Phosphoinositid- 3-Kinasen
PLC	Phospholipase C
POPC	Palmitoyl-oleoyl-glycero-phosphatidylcholin
PTHr1	Parathormon Rezeptor
rpm	<i>revolution per minute</i> - Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> - Natriumlaurylsulfat
slpm	<i>slope per minute</i> – Anstieg pro Minute
SGF	Saccharose-Gradienten-Flotation
SOC	<i>super optimal broth</i>
SUMO	<i>small ubiquitin like modifier</i>
TBT	Tris-gepuffertes Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin-hydrochlorid
TFA	Trifluoressigsäure
TIP	Tuberindfulares Protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TSH	Thyreozyten-stimulierendes Hormon

Englische Worte, die über keine äquivalente deutsche Übersetzung verfügen, wurden übernommen und sind kursiv gedruckt. Ausnahmen im Bezug zur GPCR-Terminologie bilden die Begriffe Loops, ECL und ICL und der Begriff Peak im Zusammenhang mit der Größenausschlußchromatographie. Die Aminosäuren sind durch einen drei Buchstaben Code abgekürzt. Allgemeine biochemische oder proteinchemische Begriffe wurden gemäß der Literatur aus Lottspeich & Engels (Bioanalytik) verwendet.

### 3 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die funktionelle Rekonstitution des humanen Parathormon-Rezeptors (PTHr1) in Liposomen. Bei PTHr1 handelt es sich um ein Membranprotein aus der Sekretin-Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die Grundlage bildete dabei die rekombinante Produktion des PTHr1 in *E.coli* in Form von *inclusion bodies*. Die Auswahl eines prokaryotischen Expressionssystems ermöglichte die Produktion von ausreichend hohen Mengen an PTHr1 für eine nachfolgende funktionelle Untersuchung. Im *fed-batch*-Verfahren konnte durchschnittlich 1,7 kg Biofeuchtmasse produziert werden. Aus diesem Zellmaterial wurden 170 g *inclusion bodies* isoliert, woraus wiederum in einem einzigen Affinitätschromatographie-Schritt ca. 2,5 g PTHr1 gereinigt werden konnten. Dieses Vorgehen erforderte jedoch eine Renaturierung des unter denaturierenden Bedingungen gereinigten PTHr1. In dieser Arbeit wurde auf Basis des *artificial-chaperone*-Systems ein Verfahren entwickelt, das die korrekte Faltung der N-terminalen Domäne ermöglichte und auch den Transmembranbereich des PTHr1 stabilisierte. Mit dieser Methode konnte 90% des PTHr1 solubilisiert in einer DDM-Mizelle präpariert werden.

Ein weiterer Aspekt war die biophysikalische Untersuchung des mizellären PTHr1 nach der Renaturierung. Die Analyse der sekundären Strukturelemente mittels Circular dichroismus bestätigte, dass PTHr1 die charakteristischen  $\alpha$ -Helices des Transmembranbereichs ausbildete. Der Anteil des Transmembranbereichs an der Gesamtstruktur konnte mit 33% bestimmt werden. Durch Fluoreszenzspektroskopie wurde eine geringe thermische Stabilität des PTHr1 in einer DDM-Mizelle nachgewiesen. Der Entfaltungsprozess wurde anhand der intrinsischen Fluoreszenz der Tryptophanseitenkette verfolgt. Die thermische Entfaltung war irreversibel und begann bereits bei einer Temperatur von 30 °C.

Eine Verbesserung der nachweislich geringen Stabilität bestand in der Rekonstitution des PTHr1 in Liposomen, die gleichzeitig eine *in vitro* Untersuchung des Rezeptors ermöglichte. Generell besitzen Membranproteine außerhalb ihrer natürlichen Umgebung eine geringe Stabilität und eine Charakterisierung kann nur in Systemen erfolgen, die eine biologische Membran simulieren. Die eingesetzten Liposomen gehören zu diesen Membranmimetika und stabilisieren Membranproteine *in vitro*. Den Ausgangspunkt dafür bildeten durch Extrusion hergestellte, unilamellare Liposomen, die eine durchschnittliche Größe von 400 nm besaßen. Diese Liposomen wurden mit dem Detergens Triton X-100 solubilisiert und mit dem renaturierten PTHr1 inkubiert. Durch Zugabe von BioBeads wurden die eingesetzten Detergenzien entfernt und PTHr1-Proteoliposomen hergestellt.

Die qualitative und quantitative Analyse der PTHR1-Proteoliposomen wurde mittels elektronenmikroskopischer Gefrierbruch-Aufnahmen und Saccharose-Gradienten-Flotation vorgenommen. Mit der Hilfe von Gefrierbrüchen konnte eine erfolgreiche Rekonstitution des PTHR1 bestätigt werden. Bei diesen Untersuchungen wurde deutlich, dass nur eine langsame Eliminierung des Detergens zur Integration des PTHR1 in die Liposomen führte. Eine Berechnung der Ausbeute an rekonstituierten Rezeptor in Bezug zur eingesetzten Proteinmenge erfolgte nach einer Saccharose-Gradienten-Flotation. Diese Analyse ergab, dass die höchste Rezeptorkonzentration in den Proteoliposomen erzielt wurde, wenn die Liposomen 25% solubilisiert wurden. Bei dem Einsatz von 1 mg/ml des renaturierten PTHR1 und einem Lipid-Protein-Verhältnis von 20:1, konnten 530 µg des Rezeptors erfolgreich in Liposomen rekonstituiert werden.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildete der Nachweis einer funktionellen Rekonstitution des PTHR1 nach der Integration in den Liposomen. Die Aktivität des rekonstituierten PTHR1 sollte über die Bindung des Liganden PTH nachgewiesen werden. Allerdings wurde die Bindung durch starke unspezifische Wechselwirkungen des Liganden PTH erschwert. Die Lösung dieses Problems bestand in der Fusion des PTH an das *enhanced fluorescent cyan protein* (ECFP). Diese PTH-ECFP-Fusion zeigte deutlich weniger unspezifische Wechselwirkungen. Des Weiteren konnte durch die Verwendung des *fed-batch*-Verfahren das Fusionsprotein im großen Maßstab und ausreichender Menge präpariert werden. Die biologische Aktivität des PTH-ECFP konnte mit der isolierten N-terminalen Domäne (nPTHR1) mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) nachgewiesen werden. Diese Bindung wurde mit einer Dissoziationskonstante von 27 µM charakterisiert. So konnte sichergestellt werden, dass die Fusion von ECFP an PTH die Bindungseigenschaften des Liganden nicht veränderte.

Das so präparierte Fusionsprotein wurde als Ligand für den rekonstituierten PTHR1-Rezeptor in den Proteoliposomen eingesetzt. Der gebildete Komplex aus PTH-ECFP/PTHR1-Proteoliposomen konnte durch Gelfiltration isoliert werden. Die Ausbeute des funktionell rekonstituierten PTHR1 in Liposomen konnte auf 22% quantifiziert werden. Die Analyse dieser Interaktion ergab, dass die Bindung des PTHR1 an den Liganden PTH-ECFP spezifisch erfolgte. Die Bildung des Komplexes aus PTH-ECFP/PTHR1-Proteoliposomen konnte durch eine Verdrängung mit PTH (1-37) inhibiert werden. Ebenfalls bewirkte die Reduktion der Disulfidbrücken in PTHR1 eine Auflösung der nativen Struktur und inhibierte die Ligandenbindung. Zusammengefasst wurden insgesamt 260 mg PTHR1 aus 8 L Kulturmedium in einer ligandenbindenden Konformation in Liposomen rekonstituiert.

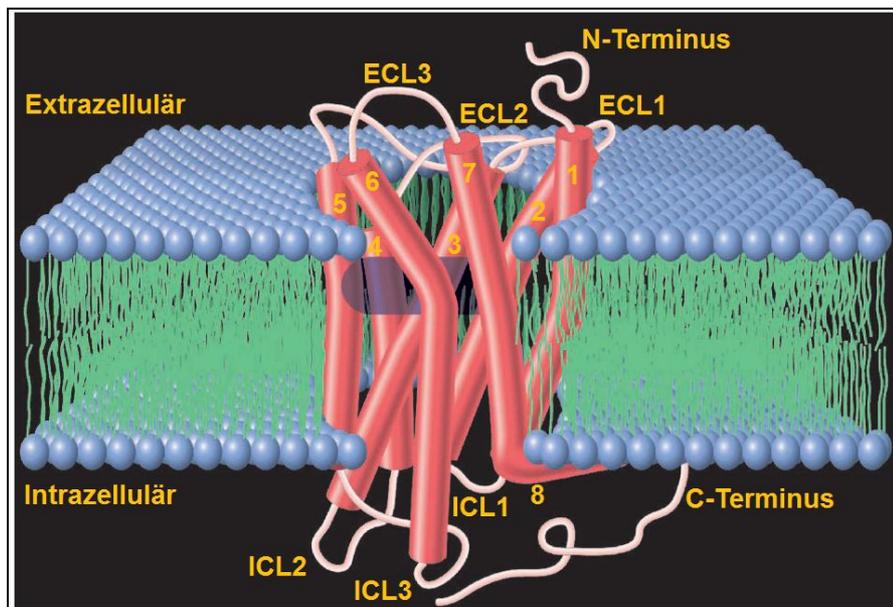
## 4 Einleitung

### 4.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

#### 4.1.1 Aufbau und Klassifizierung

Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) rücken immer mehr in den Fokus der Forschung und gewinnen an medizinischer Relevanz. Vor knapp dreißig Jahren waren gerade erste Indizien für das Vorkommen einer Gruppe von Zelloberflächen-Rezeptoren vorhanden, die über ein ausgeklügeltes Informationstransfersystem funktionieren. Diese Gruppe von biologischen Sensoren ist beteiligt am Sehvorgang, an der Geruchs- und Geschmackswahrnehmung und der Schmerzempfindung im Organismus. Zudem steuern diese Rezeptoren die Mehrheit der zellulären Antworten auf Hormone und Neurotransmitter. Eine Vielzahl von Arzneistoffen wirken auf GPCR ohne dass die Mechanismen dafür vollständig verstanden sind. Aus diesem Grund sind GPCR ein wichtiger Ansatzpunkt für die Erforschung von Wirkstoffen und verfügen über ein außergewöhnliches therapeutisches Potential.

Eine erste primäre Struktur konnten von dem bekannten GPCR, dem Rhodopsin, aufgeklärt werden (Unger und Schertler, 1995). Bei diesem Rezeptor handelt es sich um ein Transmembranprotein, das die Energie des Lichts in eine intrazelluläre Signalkaskade umwandeln kann. Rhodopsin liegt in hohen Konzentrationen in der Retina vor und konnte schon frühzeitig in einem aktiven Zustand aus Rinderaugen isoliert werden. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche Proteine mit großer struktureller Homologie zu Rhodopsin identifiziert und es entstand das Konzept der GPCR-Superfamilien. Diese Membranproteine werden durch sieben entgegen dem Uhrzeigersinn Transmembranhelices charakterisiert. Die einzelnen Helices werden intra- und extrazellulär von jeweils drei Loops verbunden (**Abbildung 4-1**). Findlay und Attwood analysierten und klassifizierten beobachtete Strukturen von Proteinsequenzen, die sieben hydrophobe Helices ausbilden und nachweislich ein G-Protein binden und aktivieren können. Sie prägten dabei den Terminus der unterschiedlichen GPCR-Stämme und führten die A – F Klassifizierung ein (Attwood und Findlay, 1994; Findlay *et al.*, 1993).

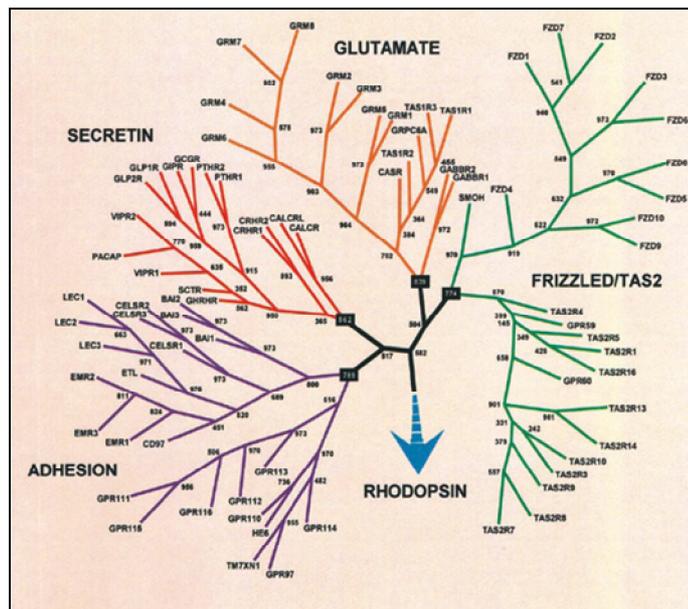


**Abbildung 4-1: Schematischer Aufbau eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR).** Dargestellt ist der Aufbau eines GPCR mit einem extrazellulären N-Terminus, sieben transmembranen Helices und einem intrazellulären C-Terminus. Die Länge des N-Terminus variiert stark zwischen den unterschiedlichen Familien. Die charakteristischen sieben transmembranen Helices sind im Rezeptor gegen den Uhrzeigersinn angeordnet. Die einzelnen Helices werden extra- und intrazellulär durch jeweils drei Loops (ECL1-3 und ICL1-3) verbunden. Der Aufbau und die Länge des C-Terminus sind stark von der jeweiligen Rezeptorklasse abhängig.

Dabei sind die Klassen A bis C auf Metazoen beschränkt<sup>1</sup>, die Klassen D und E enthalten GPCR aus Pilzen und Hefen und in Klasse F sind ausschließlich GPCR von Schleimpilzen enthalten. Die Homologie zwischen den GPCR liegt zwischen 20 bis 35% unter den Familien und bei Rezeptoren der gleichen Familie zwischen 50 bis 80%. Trotzdem sind GPCR divers in ihrem Vorkommen und ihrer Funktionsweise. Trotz intensiver Forschung sind die natürlichen Liganden bei einer Vielzahl von GPCR weitgehend unbekannt. Diese Rezeptoren sind in der Lage ein G-Protein zu binden oder zu aktivieren und werden aus diesem Grund zur Klasse der *orphan* (Waisen)-Rezeptoren zusammengefasst.

Die Veröffentlichung des ersten humanen Genoms forcierte die Analyse von signifikanten GPCR-Sequenzen. Über 800 identifizierte humane GPCR der Klassen A bis C wurden aufgrund phylogenetischer Untersuchungen in fünf Hauptfamilien kategorisiert und bezüglich ihrer Liganden zusammengefasst (Fredriksson *et al.*, 2003). Die fünf Hauptfamilien sind die **Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsion-, *frizzled/taste2-* und Sekretin-Rezeptoren**, abgekürzt zum Akronym **GRAFTS** (Abbildung 4-2).

<sup>1</sup> Die Einteilung und Aufklärung neuer humaner GPCR sowie möglicher Liganden ist auf der Homepage der Internationalen Vereinigung der Pharmakologie, Komitee zur Einteilung und Klassifizierung von GPCR zu verfolgen (<http://www.iuphar-db.org/>).



**Abbildung 4-2: Phylogenetische Verwandtschaft von G-Protein gekoppelten Rezeptoren im humanen Genom.** Basis für die Berechnung des Stammbaums bildete die Maximum-Parsimony-Methode. Die zahlreichen Vertreter der Rhodopsin-Familie wurden aus Übersichtsgründen ausgegliedert und nur durch einen Pfeil dargestellt (Fredriksson *et al.*, 2003).

Die phylogenetische Analyse veranlasste eine weitere Unterteilung der zahlreichen Rhodopsin-Rezeptoren hinsichtlich ihrer spezifischen Liganden in die  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Gruppen (Fredriksson *et al.*, 2003). Die Rezeptoren der Rhodopsin- und Sekretin-Familie sind pharmakologisch und strukturell die am besten charakterisierten GPCR und dienen dem Verständnis von grundlegenden Mechanismen der Aktivierung des Rezeptors und den sich daran anschließenden intrazellulären Signaltransduktionswege.

Die Vertreter der Glutamat-, Adhäsion- und *frizzled/taste2*-Familien wurden vorher, aufgrund ihrer konservierten N-terminalen Domänen, überwiegend zur Sekretin-Familie (ehemals Klasse B) zugeordnet. Eine Differenzierung und Etablierung von eigenen Familien dieser GPCR erfolgte aufgrund der Identifikation und strukturellen Charakterisierung der individuell verlängerten N-Termini, die teilweise proteolytische Domänen tragen. Der zweite Aspekt bei dieser Unterteilung war eine Kategorisierung aufgrund der Liganden die zur Aktivierung der entsprechenden GPCR führte.

#### 4.1.2 Aktivierung, Signaltransduktion und Dimerisierung von GPCR

Die Aktivierung von GPCR entsteht durch eine Konformationsänderung des Rezeptors nach Bindung des Liganden im interhelikalen Netzwerk. Für die aktive und inaktive Konformation

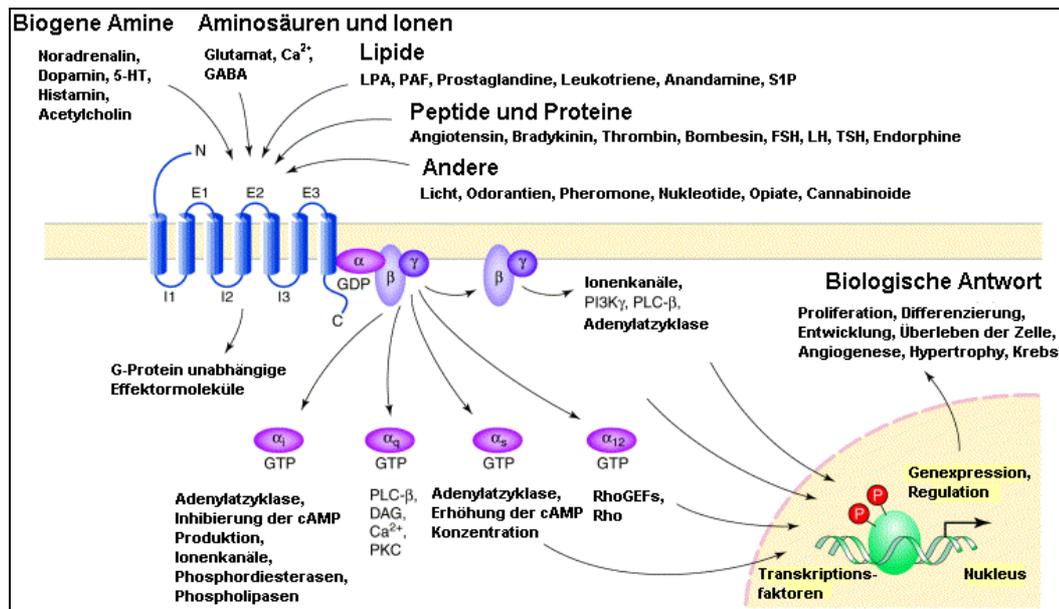
der GPCR wird vereinfacht ein Zwei-Zustand-Modell angenommen. Grundsätzlich ruht der Rezeptor in der Membran in einem inaktiven Zustand. Der natürliche endogene Ligand bindet an den Rezeptor und das vorherrschende Gleichgewicht wird durch die Wechselwirkung zum aktiven Zustand verschoben. Aufgrund einer strukturellen Barriere kann nur die aktive Konformation mit dem G-Protein in Kontakt treten und eine maximale Systemantwort, vermittelt durch ein heterotrimeres G-Protein, auslösen (Delean *et al.*, 1980). Das G-Protein besteht aus den drei Untereinheiten  $G\alpha$ ,  $G\beta$  und  $G\gamma$ , wobei die beiden letztgenannten Untereinheiten permanent miteinander verbunden sind.

Die  $G\alpha$ -Untereinheit und die  $G\beta\gamma$ -Untereinheit bilden einen Komplex, der intrazellulär an den inaktiven Rezeptor bindet. Die  $G\alpha$ -Untereinheit konnte basierend auf Sequenzhomologie und Funktionsweise in vier Klassen eingeteilt werden (Tabelle 4-1) (Neubig und Siderovski, 2002).

Tabelle 4-1: Klassifizierung der vier Familien der heterotrimeren G-Proteine.

G-Protein-Klasse	G-Protein-Untereinheit	Wirkung
$G_s$	$G_{s\alpha}$ , $G_{olf\alpha}$	Aktivierung der Adenylatzyklase
$G_i$	$G_{i1\alpha}$ , $G_{i2\alpha}$ , $G_{i3\alpha}$ , $G_{o\alpha}$ , $G_{z\alpha}$ , $G_{t\alpha}$	Hemmung der Adenylatzyklase Aktivierung der cGMP Phosphodiesterase
$G_q$	$G_{q\alpha}$ , $G_{11\alpha}$ , $G_{14\alpha}$ , $G_{16\alpha}$	Aktivierung der Phospholipase C $\beta$ (PLC $\beta$ )
$G_{12}$	$G_{12\alpha}$ , $G_{13\alpha}$	Aktivierung der Rho-Kaskade, Aktivierung der Phospholipase C $\epsilon$

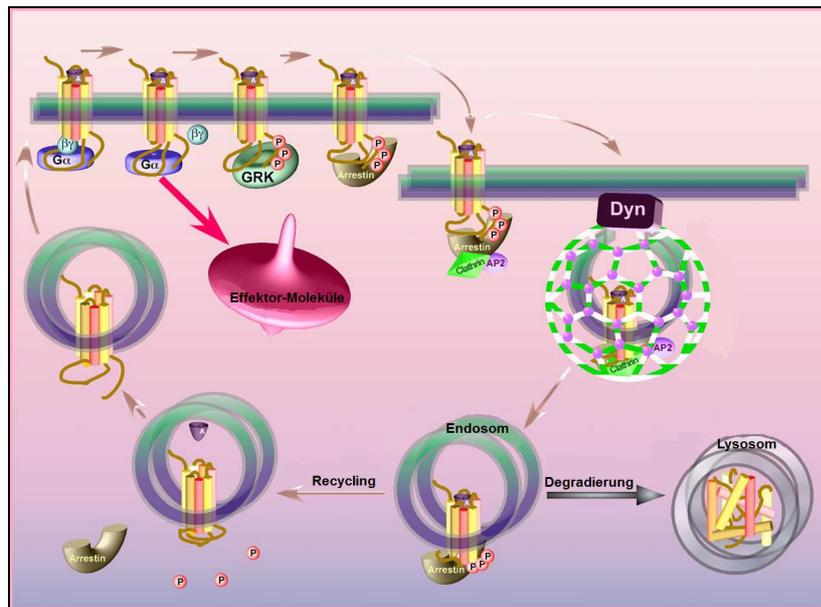
Nach Aktivierung dissoziiert das heterotrimere G-Protein in zwei Untereinheiten und diese entstehenden  $G\alpha$ - und  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten können unabhängig voneinander, synergetisch und antagonistisch intrazelluläre Effektorproteine oder Ionenkanäle stimulieren oder inhibieren. Das Ergebnis der Stimulation durch die jeweilige Untereinheit ist entweder eine Produktion, eine Freisetzung oder ein Abbau von *second messenger*, wie Inositol-1,4,5-triphosphat, cAMP oder Kalzium, die zur Übertragung des extrazellulären Signals ins Zellinnere dienen (**Abbildung 4-3**) (Clapham und Neer, 1997; Hamm, 1998). So wird eine Vielzahl an biologischen Antworten innerhalb der Zelle, durch Stimulation gezielter Signalkaskaden im Zellkern gesteuert.



**Abbildung 4-3: Schematische Darstellung der Aktivierung von GPCR und den intrazellulär stimulierten Signalkaskaden.** Bindung der unterschiedlichsten Liganden aktiviert den GPCR. Dadurch können entweder G-Protein unabhängige Effektormoleküle oder ein intrazellulär gebundenes heterotrimeres G-Protein stimuliert werden. Das heterotrimeres G-Protein dissoziiert in zwei Untereinheiten, die eine stimulierende Wirkung auf intrazelluläre Effektormoleküle oder -enzyme besitzen. Die aktivierten Signalkaskaden lösen eine spezifische biologische Antwort aus. DAG: Diacylglycerol, FSH: Follikelstimulierendes Hormon, GEF: Guanosin-Nukleotid-Austauschfaktor, LH: luteinisierendes Hormon, LPA: Lysophosphatidsäure, PAF: Blutplättchen-aktivierender Faktor, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen, PKC: Proteinkinase C, PLC: Phospholipase C, S1P: Sphingosin-1-Phosphat, TSH: Thyreozyten-stimulierendes Hormon (Marinissen und Gutkind, 2001).

Ein weiterer Aspekt in der Aktivierung der GPCR ist die Organisation zu Di- bzw. Oligomeren in lebenden Zellen. Baneres und Parello bewiesen, dass nur das Homodimer des Leukotrien B-4 Rezeptor mit dem heterotrimeren G-Protein interagiert und eine Weiterleitung des Signals eintritt (Baneres und Parello, 2003). Bei Mitgliedern der Glutamat-, *taste*- und *frizzled*-Rezeptorfamilien wurde gezeigt, dass die Dimerisierung ebenfalls grundlegend für eine korrekte Signaltransduktion ist. Dabei liegen überwiegend Heterodimere vor, die gezielt Signalkaskaden stimulieren und somit spezielle Geschmacksempfindungen hervorrufen (Kunishima *et al.*, 2000; Urwyler, 2011). Im Gegensatz dazu aktivieren Rhodopsin und der  $\beta_2$ Adrenerge-Rezeptor ( $\beta_2$ AR) als Monomere die entsprechenden G-Proteine (Bayburt *et al.*, 2007; Ernst *et al.*, 2007). In Abhängigkeit des eingesetzten Agonisten konnte die Ausbildung von höher organisierten Strukturen des  $\beta_2$ AR nachgewiesen werden (Bokoch *et al.*, 2010). Die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren spielt vermutlich eine übergeordnete physiologische Rolle. Möglicherweise werden auch onkologische oder anabole Funktionen durch die Oligomerisierung reguliert (Terrillon und Bouvier, 2004).

### 4.1.3 Phosphorylierung, Desensibilisierung und Internalisierung



**Abbildung 4-4: Schematische Darstellung der Aktivierung von GPCR und die involvierten intrazellulären Prozesse.** Nach extrazellulärer Bindung des Agonisten erfolgt intrazellulär eine heterotrimere G-Protein Aktivierung. Das G-Protein dissoziiert in die  $G\alpha$ -Untereinheit und dem Komplex aus den  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die entstehenden Untereinheiten wirken auf zellinterne Effektormoleküle. Diese übertragen, durch die Bildung von *second messenger*, eine biologische Antwort in die Zelle. Der aktivierte Rezeptor dient als Substrat für G-Protein abhängige Rezeptorkinasen (GRK) und wird phosphoryliert. Die Phosphorylierung dient der Erkennung und Bindung von Arrestin. Es kommt zur Rekrutierung von Clathrin und zur Endozytose des Rezeptors. Der internalisierte Rezeptor-Arrestin-Komplex im Endosom wird aufgelöst. Der Rezeptor wird entweder im Lysosom degradiert oder durch einen Recycling-Zyklus erfolgte der Rücktransport zur Zelloberfläche (Gurevich und Gurevich, 2006).

Ein signifikantes Merkmal von GPCR ist, dass diese sehr fein reguliert sind und direkt auf Veränderungen in der Konzentration der Liganden reagieren können. Dieses wird durch ein streng reguliertes und kontrolliertes intrazelluläres System gewährleistet. Nach erfolgreicher Übertragung des Signals von der Zelloberfläche ins Zellinnere, stimulieren die aktivierten Rezeptoren die G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) und dienen diesen gleichzeitig als Substrat. Die Serin- oder Threonin-Resten der GPCR werden durch die GRK phosphoryliert und somit werden die Rezeptoren für  $\beta$ -Arrestin markiert und von diesem gebunden (**Abbildung 4-4**). Bei Säugetieren unterscheidet man vier Typen: Arrestin 1-3 und visuelles Arrestin (Gurevich und Gurevich, 2006). Die Bindung an den Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung des Arrestins. Das gebundene Arrestin verhindert sterisch eine kontinuierliche G-Protein-Signalgebung und dieser Inhibierung der Signalweiterleitung wird als Desensibilisierung bezeichnet (Violin und Lefkowitz, 2007). Der C-Terminus von Arrestin wird freigelegt und die Affinität des Arrestins zu Clathrin zehnfach erhöht (Xiao *et al.*, 2004). Der

Komplex aus phosphorylierten Rezeptor und Arrestin wird, durch eine Clathrin vermittelte Endozytose, internalisiert. Innerhalb dieser Clathrin umhüllten Vesikel kommt es zur Freisetzung und Abbau des Liganden und zur Fusion mit den Endosomen.

Im Endosom entscheidet sich, ob eine Degradation des Rezeptors im Lysosom vorgenommen wird oder ob ein Recycling des GPCR zurück zur Zelloberfläche erfolgt. Im Recycling-Zyklus kommt es zur Dephosphorylierung des internalisierten GPCR durch Proteasen des Endosoms. In diesem Vorgang der Resensibilisierung wird der GPCR zurück zur Zelloberfläche transportiert (Lefkowitz, 1998). Die Entscheidung über eine Degradation oder ein Recycling wird vom C-Terminus des Rezeptors reguliert. Die ersten Hinweise zeigen deutlich, dass spezifische Sequenzmotive erforderlich sind damit Recycling generell erfolgt und dieser Prozess ebenfalls von den umgebenden Aminosäureresten beeinflusst wird (Walther *et al.*, 2010; Kohout und Lefkowitz, 2003).

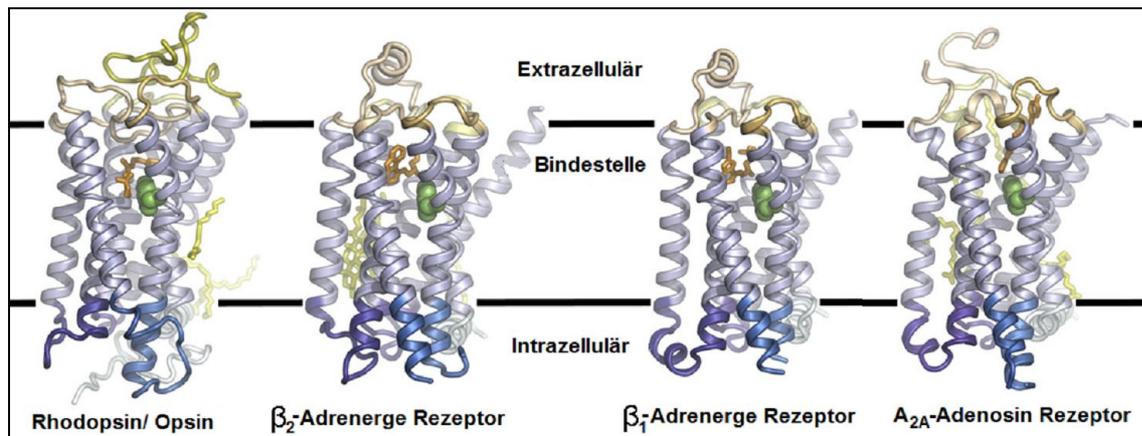
Ein weiterer Aspekt nach Internalisierung des GPCR ist, dass diese einen Einfluss auf zellinterne Mechanismen besitzen. Zahlreiche Ergebnisse belegen, dass der Rezeptor im Komplex mit Arrestin G-Protein unabhängige Signalkaskaden aktivieren kann (Shenoy und Lefkowitz, 2003). Untersuchungen am Chemokin-Rezeptor zeigten, dass der G-Protein-Rezeptor-Komplex Transkriptionsfaktoren, der extrazellulären signalabhängigen Kinase (ERK), in den Zellkern transportiert und so die Proliferation stimuliert (Tohgo *et al.*, 2003; Goetzl, 2007). In diesem Zusammenhang mehrten sich die Indizien, dass die Mitglieder der vier Arrestin-Familien jeweils spezifische Signalkaskaden aktivieren (Violin und Lefkowitz, 2007).

Ebenfalls konnte bei internalisierten GPCR ohne gebundenes Arrestin bestätigt werden, dass diese ebenfalls Signalkaskaden stimulieren. Für den  $\beta_2$ AR konnte die Wirkung des internalisierten Rezeptors auf den MAP-Kinase Signalweg nachgewiesen werden (Rosenbaum *et al.*, 2009).

Obwohl grundlegende Prinzipien der Aktivierung von GPCR geklärt sind, zeigen diese Untersuchungen, dass involvierte zellinterne Mechanismen nur im Ansatz verstanden sind und für biologische Antworten komplexere Systeme verantwortlich sind. Die Signalweiterleitung ist nicht zwangsläufig an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt.

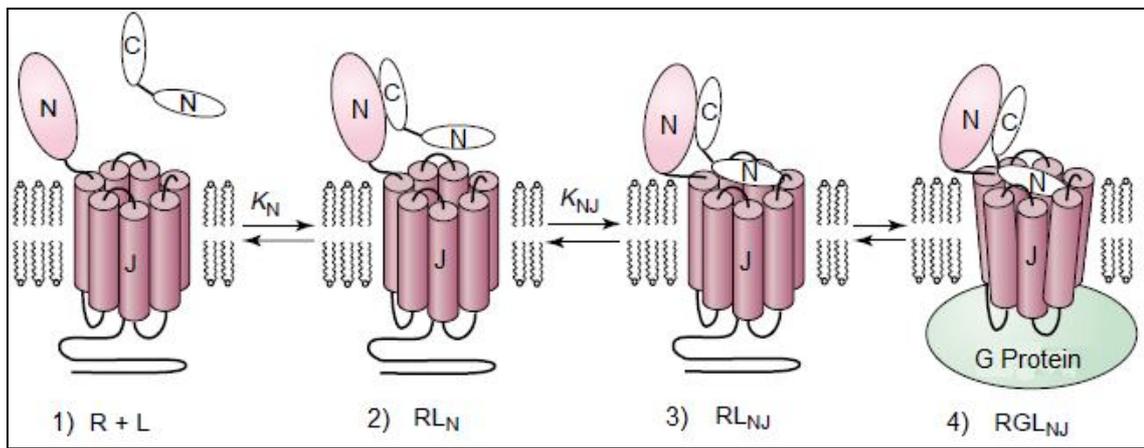
Dem universellen Mechanismus der Signalübertragung über eine Zellmembran, folgen komplexe Regulationen die spezifisch für die jeweiligen Rezeptoren sind und individuell charakterisiert werden müssen.

#### 4.1.4 Strukturelle Untersuchung und Funktionsweisen von GPCR



**Abbildung 4-5: Übersicht von GPCR-Strukturen der Rhodopsin-Familie.** Die vier Strukturen sind in einem einheitlichen Farbschema dargestellt. Die transmembranen Helices sind hellblau, intrazelluläre Regionen dunkelblau und die extrazelluläre Region braun eingefärbt. Die Liganden sind in den jeweiligen Strukturen orange eingezeichnet und der konservierte Tryptophan-Schalter grün. [(1u19, 3CAP, 3DQB); (2RH1, 2R4R, 3D4S); 2VT4; 3EML] (Hanson und Stevens, 2009).

Die Vertreter der Rhodopsin-Familie bilden mit 700 Mitgliedern die größte Familie innerhalb der GPCR, weswegen viele Arzneistoffe auf Mitglieder der Rhodopsin-Familie wirken. Dennoch sind die Mechanismen zur Aktivierung auf molekularer Ebene nicht eindeutig verstanden. Bis heute sind lediglich vier Kristallstrukturen von GPCR gelöst, dabei stammen diese alle aus der Rhodopsin-Familie. Diese Strukturen wurden jeweils im Komplex mit dem entsprechenden Ligand aufgeklärt. Ausgenommen davon ist der Rhodopsin-Rezeptor, dieser konnte ebenfalls ohne den kovalent gebundenen Liganden kristallisiert werden (Cherezov *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2007; Jaakola *et al.*, 2008). Die Annahme einer einheitlichen Topologie aus sieben gegen den Uhrzeigersinn angeordneten Helices konnte bestätigt werden und darüber hinaus C-terminal eine weitere intrazelluläre achte Helix identifiziert werden. Die Position des gebundenen Liganden ist bei den Vertretern der Rhodopsin-Familie einheitlich im interhelikalen Netzwerk (**Abbildung 4-5, orange**). Einzig die Orientierung des Liganden im A<sub>2A</sub>-Adenosin Rezeptor weicht von der, der anderen Liganden ab. Bei allen Rezeptoren befindet sich der Ligand in unmittelbarer Nähe zu einer hoch konservierten Tryptophanseitenkette, der als Tryptophan-Schalter (**Abbildung 4-5, grün**) bezeichnet wird. Zurzeit wird vermutet, dass dieser Tryptophan-Schalter, bei allen Mitgliedern der Rhodopsin-Familie, maßgeblich an der Signalweiterleitung beteiligt ist (Hanson und Stevens, 2009).



**Abbildung 4-6: Modell der Rezeptoraktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors der Sekretin-Familie.** Der Ligand (L) trifft auf den Rezeptor (R). Die Bindung und Aktivierung des Rezeptors erfolgt in zwei Schritten. Dazu wird der Rezeptor in die N-terminale Domäne und die Juxtamembrandomäne (J-Domäne) unterteilt. Zur J-Domäne werden die extrazellulären Loops, der Transmembranbereich und die intrazellulären Regionen gezählt. Der C-Terminus des Liganden (L) bindet an den N-Terminus des Rezeptors (R) und formt einen Komplex (RL<sub>N</sub>). Der N-Terminus des Liganden interagiert mit der J-Domäne des Rezeptors. Der Ligand ist zweifach an den Rezeptor gebunden (bi-tethered) und bildet einen stabilen Liganden-Rezeptor-Komplex (RL<sub>NJ</sub>) aus. Eine Konformationsänderung am Rezeptor verstärkt intrazellulär die Wechselwirkung mit einem G-Protein (RGL<sub>NJ</sub>).

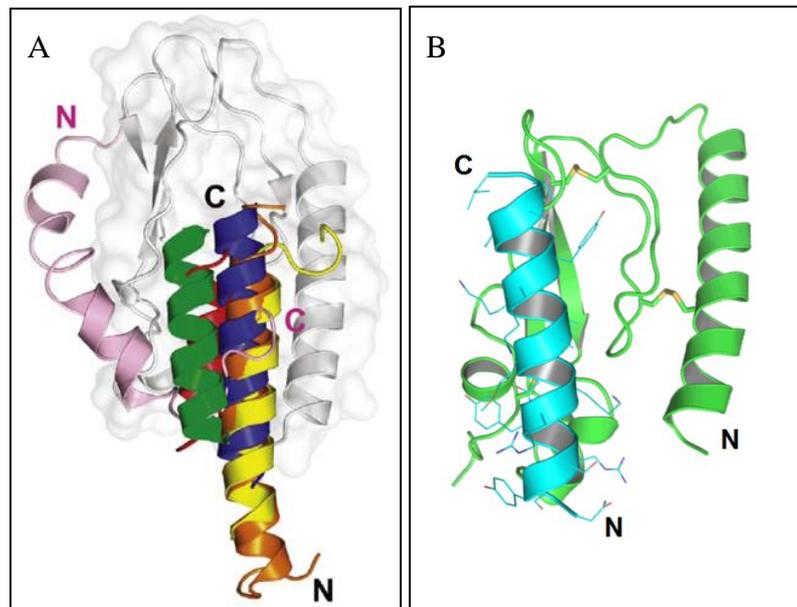
Bei einem Vergleich der vier vorhandenen Kristallstrukturen wurde die Annahme widerlegt, dass innerhalb der Rezeptoren ein ubiquitäres DRY-Motiv (Aspartat, Arginin, Tyrosin) den inaktiven Rezeptor durch eine Salzbrücke zu einem Glutamat stabilisiert (Palczewski K. *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 1998; Rasmussen *et al.*, 2007; Warne *et al.*, 2008; Rovati *et al.*, 2007). Zusätzlich wurden bei dem A<sub>2A</sub>-Adenosin Rezeptor abweichende interagierende Kontaktstellen zwischen dem Liganden und den Transmembranbereichen identifiziert. So konnte die Strukturanalyse ubiquitär vorkommende konservierte 7TM-Sequenzmotive identifizieren, ergab aber ebenfalls, dass sich die GPCR in kurzen Rezeptortyp-spezifischen Sequenzen voneinander unterscheiden. Dieser Sachverhalt erklärt die hochspezifische Affinität der GPCR zu ihrem Liganden und verdeutlicht, dass die Identifizierung von individuellen Motiven, receptorspezifischen Sequenzen und strukturellen Charakteristika von G-Protein gekoppelten Rezeptoren von immenser Bedeutung ist.

Die zweite Gruppe von pharmakologisch gut untersuchten GPCR bildet die Sekretin-Familie, deren Aufbau sich von Rezeptoren der Rhodopsin-Familie durch eine große extrazelluläre N-terminale Domäne unterscheidet. Die Sekretin-Familie besteht aus 15 unterschiedlichen Rezeptoren, die ausschließlich Peptidhormone binden. Der Name dieser Familie stammt von dem ersten identifizierten Rezeptor dieser Klasse, dem Sekretinrezeptor (SCTR), ab (Ishihara *et al.*, 1991). Ihnen und ihren Liganden wird eine große therapeutische Bedeutung zugesprochen. An der Regulation des Glukosespiegels im Organismus sind drei Rezeptoren aus dieser Familie beteiligt. Die drei Liganden der entsprechenden Rezeptoren der Sekretin-Familie der Glukagon-

Rezeptor, der *GLP*-Rezeptor und der *GIP*-Rezeptor stimulieren die Insulin Sekretion (Gaede *et al.*, 1950; Tager *et al.*, 1980; Knigge *et al.*, 1984). Auch die Regulation des Kalziumhaushalts erfolgt unter der Beteiligung von Peptidhormonen, wie das Parathormon und das Calcitonin die über Rezeptoren dieser Proteinfamilie gebunden werden. Diese Peptidhormone werden zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt (Kapitel 4.2) (Copp und Cameron, 1961). Zudem werden Erkrankungen des Nervensystems (*PACAP*), die Beteiligung an Entzündungsprozessen (*VIP*), Kleinwüchsigkeit (*GRF*) und Symptome des Stresses (*CRF*) dieser GPCR Familie zugeordnet (Sherwood *et al.*, 2000; Barbezat und Grossman, 1971; Campbell *et al.*, 1995; Dautzenberg und Hauger, 2002).

Die Rezeptoren der Sekretin-Familie besitzen zusätzlich zum charakteristischen Transmembranbereich eine große extrazelluläre N-terminale Domäne und ebenfalls einen großen intrazellulären Bereich. Bei Rezeptoren der Sekretin-Familie wird der Transmembranbereich mit den extra- und intrazellulären Loops zur Juxtamembrandomäne (*J*-Domäne) zusammengefasst. Innerhalb der Sekretin-Familie liegt ein sequentieller Mechanismus für die Bindung des Liganden vor (**Abbildung 4-6**). Im ersten Schritt trifft der Ligand auf den Rezeptor und die C-terminale Region des Liganden interagiert mit der N-terminalen Domäne und es wird ein Rezeptor-Ligand-Komplex ( $RL_N$ ) ausgebildet. Die räumliche Nähe zum Transmembranbereich begünstigt die Interaktion des N-terminalen Bereiches des Liganden mit der Juxtamembrandomäne (*J*-Domäne) des Rezeptors. Der gebildete Rezeptor-Liganden-Komplex ( $RL_{NJ}$ ) fixiert den Liganden über zwei Kontaktflächen und wird ebenfalls als aktive Konformation bezeichnet. Diese zweite Kontaktfläche liegt, wie bei Mitgliedern der Rhodopsin-Familie, innerhalb des interhelikalen transmembranen Netzwerks (7TM). Diese aktive Konformation interagiert intrazellulär mit einem G-Protein und bildet den ternären Komplex ( $RGL_{NJ}$ ) bestehend aus Rezeptor, Ligand und heterotrimeren G-Protein. Die Wechselwirkung des Liganden mit dem 7TM bewirkt eine Konformationsänderung am Rezeptor und führt zur intrazellulären Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins (Villardaga *et al.*, 2011).

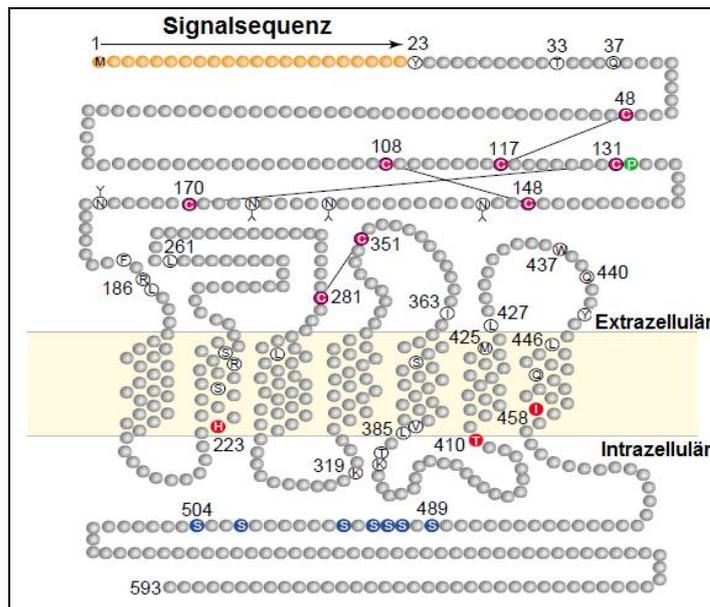
Die biophysikalische und strukturelle Charakterisierung von Mitgliedern der Sekretin-Familie gelang von den isolierten N-terminalen Domänen der Rezeptoren. Als wichtiges Strukturelement besitzen diese sechs konservierte Cysteinreste, die drei Disulfidbrücken ausbilden und (Grauschopf *et al.*, 2000; Bazarsuren *et al.*, 2002). Bis heute sind sechs Kristallstrukturen der isolierten N-terminalen Domänen im Komplex mit dem entsprechenden Liganden gelöst worden. Davon wurde die Struktur der *PACAP*-Domäne ebenfalls auch mittels NMR-Spektroskopie bestimmt (**Abbildung 4-7, A**). Die Strukturen der N-terminalen Domänen weisen bei allen eine große Homologie zueinander auf.



**Abbildung 4-7: Kristallstrukturen der isolierten N-terminalen Domänen von Rezeptoren aus der Sekretin-Familie.** Dargestellt sind die Komplexe der N-terminalen Domänen mit ihren Liganden. Die farbige dargestellten Liganden repräsentieren die entsprechenden Peptidhormone (Astressin (2JND, rot), PACAP (2JOD, rosa), GIP (2QKH, orange), Exendin (3C5T, gelb), PTH (3C4M, blau), CRF (3EHU, grün)). Alle Liganden bilden eine  $\alpha$ -helikale Struktur aus. Sie liegen innerhalb der hydrophoben Bindungstasche der Domäne. Der rosafarbige Ligand ist die NMR-Struktur der N-terminalen Domäne des PACAP-Rezeptors. Diese weicht in der Abbildung (A) von der Orientierung der andern Liganden ab. In Abbildung (B) ist die Kristallstruktur derselben Domäne dargestellt, diese zeigt die gleiche Orientierung des Liganden (Parthier *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011).

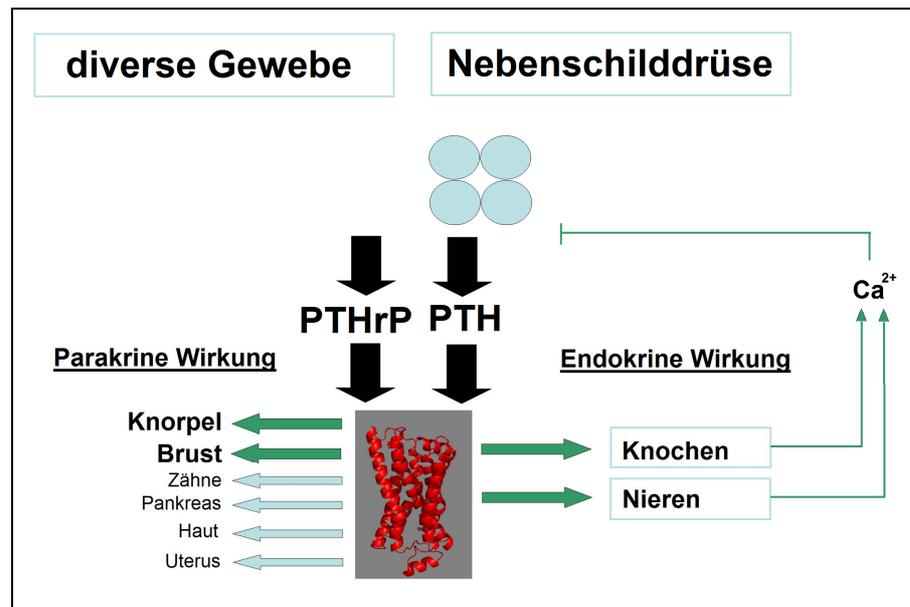
Sie besitzen am N-Terminus eine  $\alpha$ -Helix die mit dem Liganden einen ersten Kontaktpunkt ausbildet. Der C-Terminus formt eine hydrophobe Tasche die den Liganden umschließen kann. Der Ligand, gebunden in der Domäne, besitzt eine einheitliche Orientierung. Der N-Terminus des Liganden ist frei beweglich und kann mit der J-Domäne des Rezeptors interagieren. Die **Abbildung 4-7** (A) zeigt die überlagerten Strukturen der N-terminalen Domänen. Die NMR-Struktur des PACAP-Rezeptors im Komplex mit dem Liganden Astressin (rosa) besitzt eine entgegengesetzte Orientierung des Liganden. Diese abweichende Ligandenbindung konnte durch die Kristallstruktur jedoch nicht bestätigt werden (**Abbildung 4-7, B**) (Parthier *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wird eine allgemeine Orientierung des Liganden, wie es in den Kristallstrukturen gelöst wurde, für alle Mitglieder der Sekretin-Familie angenommen. Obwohl es mittlerweile von beinahe der Hälfte aller Mitglieder der Sekretin-Familie Kristallstrukturen von N-terminalen Domänen gibt, sind bis heute keine Kristallstrukturen eines Gesamt-Rezeptors vorhanden. Dabei liegen gerade in der Interaktion des Liganden mit der N-terminalen Domäne und der J-Domäne viele Informationen verborgen, die zum Verständnis von gezielt gesteuerten intrazellulären Signalkaskaden beitragen. Aus diesem Grund liegen besonders GPCRs der Sekretin-Familie im Fokus der aktuellen Forschung.

## 4.2 Humane Parathormon-Rezeptor (PTH1R)



**Abbildung 4-8: Übersicht des humanen Parathormon-(PTH)-Rezeptor 1.** Der PTHR1 besteht aus 593 Aminosäuren. Der Rezeptor wird in die drei Domänen bestehend aus der extrazellulären N-terminalen Domäne, dem Transmembranbereich und der intrazellulären C-terminalen Domäne unterteilt. Die N-terminale Domäne besteht aus 165 Aminosäuren ohne die Signalsequenz und enthält drei konservierte Disulfidbrücken, die aus den Cysteinpaaren (Cys 48-117, Cys 108-148 und Cys 131-170) gebildet werden. Der Transmembranbereich ist aus 275 Aminosäuren aufgebaut, wobei 152 Aminosäuren auf die Bildung der sieben  $\alpha$ -Helices verwendet werden. Die C-terminale Domäne besteht aus 130 Aminosäuren und trägt die Bindestelle für das G-Protein, weitere Regulationsproteine und Arrestin, sowie eine Phosphorylierungsstelle (Gardella und Jüppner, 2001).

Der Parathormon-Rezeptor gehört zur Sekretin-Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Nach der Entdeckung der Nebenschilddrüse folgte die Identifizierung eines Hormons, das an der Kalziumregulation beteiligt ist (Collip, 1925). Im Jahr 1991 gelang die Klonierung des ersten PTHR1 mit Hilfe einer cDNA *library* aus Opposum Nierenzellen und aus Knochengewebe von Ratten (AbouSamra *et al.*, 1992; Jüppner *et al.*, 1991). Im folgenden Jahr konnte der humane PTH-Rezeptor aus einer cDNA *library* von Nierenzellen kloniert und in einer COS-Zelllinie in funktioneller Form isoliert werden (Schneider *et al.*, 1993). Sein Gen ist auf dem humanen Chromosom 3 lokalisiert und wird in beinahe allen Gewebetypen, jedoch überwiegend auf Knochen- und Nierenzellen, exprimiert (Gelbert *et al.*, 1994).



**Abbildung 4-9: Darstellung der Stimulierung des PTHR1.** PTH und PTHrP binden und stimulieren beide den PTHR1, steuern aber unterschiedliche Prozesse. PTH besitzt eine endokrine Wirkung und wird durch Abfall des Kalziumspiegels im Blut von der Nebenschilddrüse sezerniert. Dies bewirkt eine Freisetzung von Kalzium aus den Knochen und gleichzeitig eine Resorption von Kalzium in der Niere. Im Gegensatz wird PTHrP von zahlreichen Geweben produziert und besitzt eine parakrine Wirkung. Es ist entscheidend an der Differenzierung von Knorpel- und Brustdrüsen-Gewebe beteiligt (Vilardaga *et al.*, 2011).

Der Parathormon-Rezeptor besteht aus 593 Aminosäuren, wobei die ersten 23 Aminosäuren<sup>2</sup> eine gewebespezifische Signalsequenz darstellen und sind beim membranständigen Rezeptor nicht mehr vorhanden sind (Lee *et al.*, 1994; Usdin *et al.*, 1995). Die verbleibenden N-terminalen 165 Aminosäuren bilden die extrazelluläre Domäne des Rezeptors. In dieser N-terminalen Domäne sind drei konservierte Disulfidbrücken vorhanden (Grauschopf *et al.*, 2000). Der Transmembranbereich besteht aus 275 Aminosäuren, die in sieben Helices unterteilt und jeweils über drei extra- und intrazelluläre Loops verbunden sind. Für die extrazellulären Loops wird eine Disulfidbrücke zwischen dem ersten und zweiten Loop angenommen. Der C-Terminus besteht aus 130 Aminosäuren mit den Bindestellen für die Untereinheiten des G-Proteins, Erkennungssequenzen für die Phosphorylierung und Sequenzmotiv für eine Bindestelle des Arrestins (**Abbildung 4-8**) (Rey *et al.*, 2006; Vilardaga *et al.*, 2011). Aufgrund der sequentiellen Ligandenbindung wird der PTHR1 in die N-terminale Domäne (nPTHR1) und die Juxtamembrandomäne (J-Domäne) unterteilt. Zur J-Domäne sind der Transmembranbereich mit den intra- und extrazellulären Loops zusammengefasst (**Abbildung 4-6**). Der endogene Ligand des PTHR1 wird als Pro-Prä-Peptid (25 aa/ 6 aa/ 84 aa) synthetisiert. PTH besteht aus 84 Aminosäuren und wird aus den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse in den Blutkreislauf

sezerniert. Die Synthese und Sekretion ist vom Kalziumspiegel im Blutplasma abhängig und wird durch einen Kalziumsensor in der Nebenschilddrüse kontrolliert (**Abbildung 4-9**) (Brown *et al.*, 1993). Das Hormon wird in den Blutkreislauf sezerniert und wirkt in Geweben, die den Rezeptor auf der Oberfläche präsentieren. In der Niere stimuliert PTH die Resorption von Kalzium im distalen Tubulus. Des Weiteren stimuliert PTH die Synthese des Schlüsselenzyms der Calcitriol-Synthese, der  $1\alpha$ -Hydroxylase. Dessen Synthese resultiert in einer  $1,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$ -abhängigen Absorption von Kalzium im terminalen Ileum (Bhatia *et al.*, ). PTH wirkt unterstützend auf den Blut-Phosphat-Gehalt durch Inhibierung der Phosphatresorption im proximalen Tubulus. Phosphat wird in erster Linie über einen Natrium-abhängigen Ko-Transporter (NPT2) resorbiert. Die Stimulation durch PTH verringert das Expressionslevel und fördert den lysosomalen Abbau von NPT2 und eine Ausscheidung von Phosphat über den Urin (Segawa *et al.*, 2002; Bringhurst *et al.*, 1989).

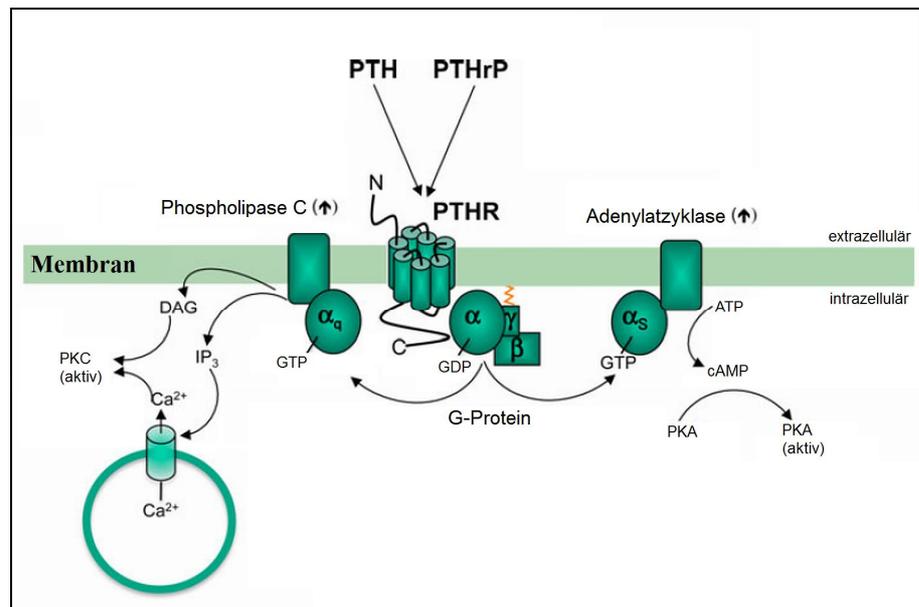
Im Knochen präsentieren die Osteoblasten ausschließlich PTHR1 auf der Zelloberfläche. Diese Zellen werden direkt von PTH stimuliert. Im Knochen erfolgt eine Freisetzung von Kalzium aus der Knochenmatrix. Allerdings beeinflusst PTH die Kalzium-Metabolisierung nachhaltig und wirkt dadurch indirekt auf Osteoklasten.

Durch eine Regulationsstörung der PTH-Sekretion in der Nebenschilddrüse kommt es zur Kalzium-unabhängigen Freisetzung von PTH. Die Folgen des veränderten PTH-Spiegels im Blut werden als Hyper- bzw. Hypoparathyreoidismus bezeichnet und sind verantwortlich für den Abbau der Knochensubstanz bzw. der Ausbildung einer hypokalzämische Tetanie.

Bei Tumor-Patienten konnte schon frühzeitig neben PTH ein PTH-verwandtes Peptid (PTHrP) identifiziert werden, dass den PTHR1 stimuliert. Diese Tumorzellen produzieren übermäßig viel PTHrP und bewirken einen erhöhten Kalziumspiegel im Serum und eine vermehrte cAMP Ausscheidung über den Urin. Diese Beobachtung wird als humorales malignes Hyperkalzämie-Syndrom bezeichnet. Das humane PTHrP besteht aus 141 Aminosäuren. Durch alternatives mRNA *splicing* können Varianten mit 139 bzw. 173 Aminosäuren generiert werden. PTHrP wirkt ausschließlich parakrin auf PTHR1 präsentierende Gewebstypen (Brandt *et al.*, 1994). Das Hormon PTHrP teilt eine hohe Sequenzhomologie zu PTH, besonders innerhalb der ersten 13 Aminosäurenreste. Die Aktivierung des PTHR1 erfolgt bereits durch die ersten 11 Aminosäuren von PTH. Beide Liganden sind in der Lage PTHR1 zu stimulieren. Aus diesem Grund wird PTHR1 als Synonym für den PTH/PTHrP-Rezeptor verwendet.

---

<sup>2</sup> Es wird eine Länge von 23 bzw. 26 Aminosäuren für die Signalsequenz diskutiert. Dabei wird die Signalsequenz bestehend aus 23 Aminosäuren favorisiert. (Usdin *et al.*, 1995; Grauschopf, 2000).



**Abbildung 4-10: Signalkaskaden unter der Kontrolle des PTHR1.** Die Bindung der Liganden PTH oder PTHrP bewirken eine Konformationsänderung des PTHR1, welche eine Interaktion mit einem heterotrimeren G-Protein fördert. Dadurch wird der Austausch von GDP durch GTP katalysiert. Dieses Ereignis löst eine Konformationsänderung und Dissoziation der Untereinheiten des G-Proteins aus.  $G\alpha_s$  aktiviert die Adenylatzyklase und bildet cAMP, welches die Proteinkinase A (PKA) stimuliert.  $G\alpha_s$  aktiviert die Phospholipase C, diese spaltet intrazelluläres Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diazylglyzerol (DAG) und Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> diffundiert durch das Cytosol und aktiviert Kalziumkanäle im Endoplasmatischen Retikulum, dadurch wird Kalzium ins Cytosol freigesetzt. Der Anstieg des Kalziumspiegels fördert die Translokation der Proteinkinase C (PKC) und Aktivierung durch DAG (Vilardaga *et al.*, 2011).

Der Unterschied der Liganden liegt in der physiologischen Wirkung in den Ziel-Geweben (**Abbildung 4-9**). PTHrP steuert in der fetalen Entwicklung das Chondrozyten-Wachstum und Differenzierung in den Wachstumsfugen von Knochen (Brandt *et al.*, 1994). Zudem wird im Serum von Müttern ein erhöhter PTHrP-Spiegel gefunden, der zu einer vermehrten Freisetzung von Kalzium aus den Knochen in die Muttermilch führt. Dabei stimuliert PTHrP auch den Transport des maternalen Kalziums über die Plazenta zum Fötus (VanHouten *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang ist das Expressionslevel des PTHrP in den Geweben abhängig von der Entwicklung der Organismen. Dieser Aspekt verdeutlicht die kontrollierte Stimulation des PTHR1 über die Expressionslevel von PTH und PTHrP obwohl dieser ubiquitär in den Geweben vorkommt (Jüppner, 1994).

Ein weiterer identifizierter PTHR-Subtyp (PTHR2) ist hauptsächlich im Hypothalamus zu finden, für den eine physiologische Wirkung, abseits der Kalziumregulation gefunden wurde (Usdin *et al.*, 1995). Dieser PTHR2 bindet trotz 51% Sequenzhomologie zu PTHR1 nur PTH mit hoher Affinität, PTHrP hingegen mit geringer Affinität. Tatsächlich wurde ein entsprechender Ligand entdeckt, der ein neues Liganden-Rezeptor-Paar darstellt. Dieser Ligand

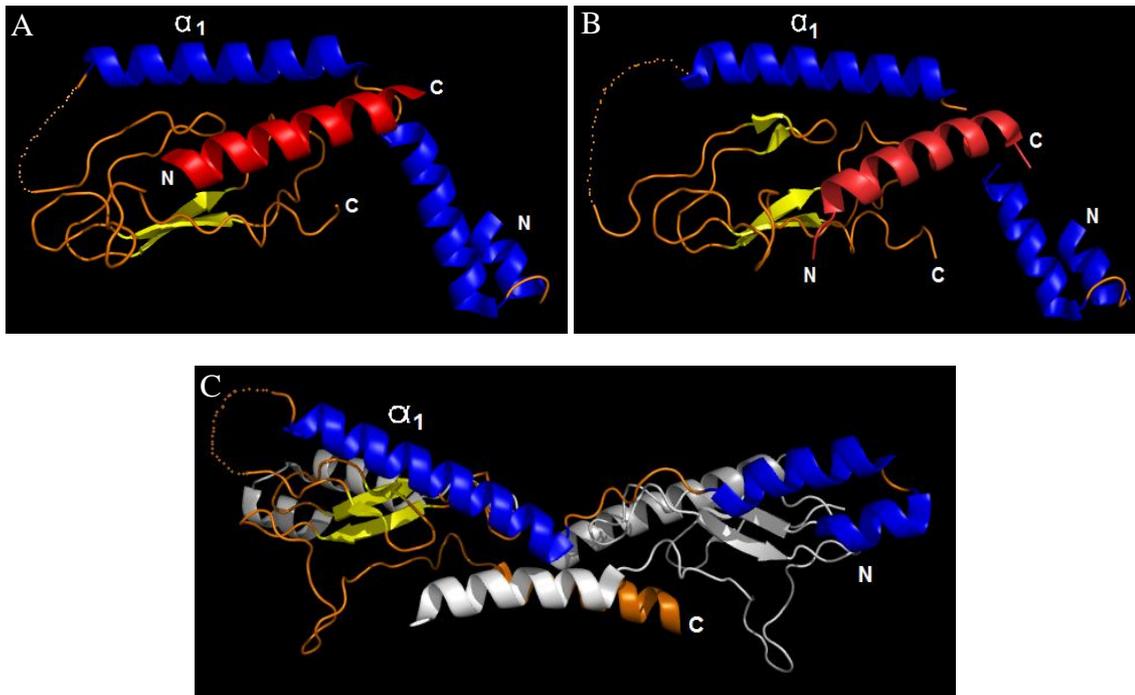
heißt Tip 39 und besteht aus 39 Aminosäuren und wirkt auf PTHR1 wie ein Antagonist (Usdin *et al.*, 1999; Jonsson *et al.*, 2001). Die biologische Funktion dieses Liganden-Rezeptor-Paares ist das Schmerzempfinden und die Regulation der Hypophysenhormon Sekretion (Hoare, 2005).

Die Bindung eines Liganden löst eine Konformationsänderung am PTHR1 aus. In Analogie zu Mitgliedern der Rhodopsin-Familie erfolgt eine relative Verschiebung der Helices 3 und 6 zueinander und erhöht die Affinität und ermöglicht die Bindung des heterotrimeren G-Proteins. Dieser molekulare Schalter ist essentiell zur Kopplung der G-Proteine. In der aktiven Konformation stimuliert PTHR1, hauptsächlich vermittelt durch die  $G\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins, intrazelluläre Signalkaskaden (**Abbildung 4-10**). PTHR1 ist in der Lage mit jeder Klasse von G-Proteinen zu interagieren. Hauptsächlich werden die  $G_{s\alpha}$ - oder  $G_{q\alpha}$ -Signalwege aktiviert. Die Aktivierung des  $G_{s\alpha}$ -Signalwegs führt zur Freisetzung von cAMP und Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Nach Aktivierung des  $G_{q\alpha}$ -Signalwegs erfolgt eine Stimulation der Phospholipase C (PLC) und es kommt zur Erhöhung der intrazellulären Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) und Kalziumkonzentration (Tabelle 4-1, **Abbildung 4-4**).

Der PTHR1 reguliert den gesamten Kalziumhaushalt und die Differenzierung der Chondrozyten in Säugetieren und wird gleichsam von PTH und PTHrP stimuliert. Der Ligand PTH (1-34) besitzt anabole Effekte auf die Knochenmatrix und wird zur Therapie von Osteoporose eingesetzt. Im Gegensatz dazu versagten Therapieversuche mit PTHrP, obwohl die N-Termini beider Liganden über eine hohe Sequenzhomologie verfügen. Die Aminosäuren von PTH (1-11) und PTHrP (1-11) sind ausreichend zur Aktivierung von PTHR1. Mögliche Gründe hierfür sind strukturelle Unterschiede der Liganden bzw. unterschiedliche Bindungsorte innerhalb des PTHR1.

#### 4.2.1 Strukturelle Untersuchung am Parathormon-Rezeptor

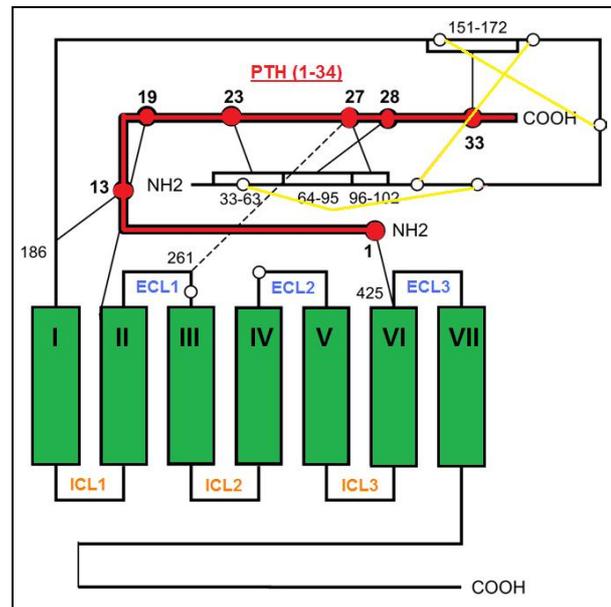
Derzeit sind nur der isolierte N-Terminus und der intrazelluläre C-terminale Bereich strukturell aufgeklärt. Eine Struktur des Gesamt Rezeptors liegt bis heute nicht vor. Die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne zeigt, dass sowohl PTH als auch PTHrP als amphipatische Helix in der hydrophoben Spalte der N-terminalen Domäne umschlossen werden. Beide Liganden haben eine hohe Sequenzhomologie innerhalb der ersten 34 Aminosäuren, die einen ersten Kontakt zur N-terminalen Domäne ausbilden.



**Abbildung 4-11: Kristallstrukturen der isolierten N-terminalen Domäne des PTHR1.** In den Abbildungen sind der  $\alpha$ -helikalen Bereich der Domäne (blau) und die  $\beta$ -Faltblattstrukturen (gelb) dargestellt. Die  $\alpha_1$ -Einheit bezeichnet die Helix, die direkt an der Bindung zum Liganden beteiligt ist. In Abbildung A ist der Komplex aus nPTHR1 und PTH (15-34) gezeigt. Der Ligand (rot) formt eine durchgängige  $\alpha$ -Helix. In Abbildung B ist der Komplex aus nPTHR1 und dem PTHrP (rosa) gezeigt. In Abbildung C ist die Kristallstruktur der liganden-freien Domäne dargestellt, welche ein Dimer ausbildet. Zur Übersicht wurde ein Monomer nicht eingefärbt. Es ist ersichtlich, dass die Orientierung in den Strukturen identisch zueinander ist. Im Dimer wird die Ligandenfurche vom freien C-Terminus des jeweiligen Monomers ausgefüllt.

Die Struktur der N-terminalen Domäne besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices und vier kurzen  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Insgesamt wirkt die Domäne sehr instabil, so dass als stabilisierende Einheit die drei Disulfidbrücken angenommen werden (Pioszak und Xu, 2008; Pioszak *et al.*, 2009). Diese Strukturen erwiesen, dass PTH und PTHrP die nPTHR1 auf die gleiche Art und Weise binden. Sie besitzen eine einheitliche Orientierung in nPTHR1 und interagieren mit denselben Aminosäuren im Kernbereich. Der Kernbereich beschränkt sich im Liganden auf die Aminosäuren 12-34 (Drechsler *et al.*, 2011). Vergleichende Studien beider Liganden bestätigten eine geringere Affinität von PTHrP als PTH zu nPTHR1. Bei der Kristallisation und strukturellen Untersuchung von nPTHR1 ohne Liganden zeigte sich, dass in Abwesenheit des Liganden die Domänen ein Dimer ausbilden. Dieses Dimer dissoziiert durch Zugabe des Liganden PTH in seine Monomere. Die Gründe hierfür liegen in einer Sequenzhomologie zwischen dem Liganden PTH und der C-terminalen Verbindung der N-terminalen Domäne zum Transmembranbereich (Pioszak *et al.*, 2010).

#### 4.2.2 Charakterisierung signifikanter Bindungsstellen zwischen PTH und PTHR1



**Abbildung 4-12: Darstellung der Interaktionsstellen zwischen PTH und seinem Rezeptor.** Durch Photoaffinitäts-Quervernetzung (*cross-linking*) konnten Segmente identifiziert werden, die direkt mit dem Liganden interagieren. In den Experimenten wurde PTH 1-34 (rot) eingesetzt und mit dem Rezeptor quervernetzt. Die N-terminalen 19 Aminosäuren haben Kontaktstellen in der J-Domäne (grün) des Rezeptors. Die C-terminalen Aminosäuren des Liganden interagieren überwiegend mit der N-terminalen Domäne des PTHR1 (Gensure *et al.*, 2005).

Die aktive Konformation des PTHR1 wird durch die Bindung des Liganden an die N-terminale Domäne und einer Interaktion mit der J-Domäne gebildet. Dieser Komplex wird intrazellulär vom heterotrimeren G-Protein mit hoher Affinität gebunden. Neben der strukturellen Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen PTH und PTHrP zu nPTHR1 wurden zur biochemischen Untersuchung zahlreiche Bindungsstudien durchgeführt. Diese dienten der Identifizierung von essentiellen Kontaktstellen zwischen Ligand und Rezeptor. Mutagenese-Studien zeigten, dass die helikalen Transmembranbereiche TM2, TM3 und TM6 an der extrazellulären Seite direkt an der Wechselwirkung zum Liganden beteiligt sind (Thomas *et al.*, 2008; Gensure *et al.*, 2003). So konnte die Interaktion der ersten beiden Aminosäuren des Liganden PTH mit dem extrazellulären Ende von TM6 und des extrazellulären Loop 3 zu den Aminosäuren Met425 und Thr427 des Rezeptors mittels *Photo-cross linking* nachgewiesen werden (**Abbildung 4-12**). Die Aminosäure Lys13 in PTH (1-34) bindet an Arg186 innerhalb des Übergangs zwischen N-terminaler Region und dem Transmembranbereich des PTHR1. Jede Veränderung in der Aminosäuresequenz dieses Bereiches beeinflusste sowohl die Bindung zu PTH (1-34), als auch die Signalantwort zu PTH (1-14) negativ (Gensure *et al.*, 2005). In Verbindung mit der Struktur der isolierten N-terminalen Domäne konnten im Liganden die

Aminosäurereste Arg20 und Trp23 und in PTHR1 Lys41 als wichtige Verbindungspunkte identifiziert werden (Mann *et al.*, 2008). Bei PTH (1-34) liegen im C-terminalen Bereich (20-34) die Aminosäuren, die die Bindung zu nPTHR1 ausbilden. Im N-terminalen Bereich (1-19) liegen die Aminosäuren, die in Wechselwirkung mit der J-Domäne des Rezeptors treten. Eine exakte Zuordnung der Aminosäuren des Liganden die entweder mit der N-terminalen Domäne oder mit der J-Domäne des PTHR1 interagieren ist nicht möglich. Bei Untersuchungen an der isolierten Domäne des PTHR1 konnte mittels NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass die Aminosäuren 12-34 des PTH mit dieser interagierten (Drechsler *et al.*, 2011). Die Ligandenbindung bewirkt am PTHR1 eine Änderung der Rezeptorkonformation, die gleichzeitig die Interaktion des Liganden sowohl mit der N-terminalen Domäne, als auch mit der J-Domäne ermöglicht.

Interessanterweise aktivieren modifizierte oder verkürzte Varianten von PTH spezifische Signalkaskaden. So verhindert die Bindung von PTH (7-34) die Aktivierung der  $G_s$ - und  $G_q$ -abhängigen Signalkaskaden, ermöglicht aber eine Internalisierung des PTHR1. Ebenfalls aktiviert die verkürzte Variante von PTH (13-34) die Proteinkinase C (PKC), allerdings nicht über die PLC-abhängige Signalkaskade. Mutationen im zweiten intrazellulären Loop am PTHR1 verursachten eine Entkopplung der  $G_q$ -Signalkaskade, ohne dass diese Mutationen die  $G_s$ -Signalkaskade beeinflussten. Im Gegensatz dazu verhindern Mutationen im dritten intrazellulären Loop eine generelle Bindung des G-Proteins. Die Differenzierung der intrazellulären Signalkaskade steht im Zusammenhang mit ausgebildeten Rezeptorkonformation. Man vermutet hier eine spezielle Konformation des PTHR1, die auf der Struktur des gebundenen Liganden basiert (Heilker *et al.*, 2009).

Des Weiteren unterscheidet sich die Stabilität des ternären Komplexes in Abhängigkeit des Liganden. In Gegenwart eines unhydrolysierbaren G-Proteins ( $GTP_{\gamma}S$ ) konnte eine hohe Beständigkeit des Komplexes aus PTHR1 und dem Parathormon nachgewiesen werden. Der ausgebildete ternäre Komplex aus PTH (1-34), PTHR1 und G-Protein bleibt während der Internalisierung im frühen Endosom bestehen. Im Gegensatz dazu dissoziiert das hoch aktivierende PTH (1-14), welches hauptsächlich mit der J-Domäne interagiert, sofort vom Rezeptor ab. Das PTHrP zeigt ein ähnliches Verhalten wie PTH (1-14). Interessanterweise bewirkt eine Verlängerung des C-terminalen Endes des PTH, über die 34 Aminosäuren hinaus, eine rasche Auslösung des ternären Komplexes (Villardaga *et al.*, 2011). Die Hormone PTH und PTHrP unterscheiden sich signifikant in der Länge des C-Terminus. PTH und PTHrP aktivieren denselben Rezeptor. Lediglich die Stabilität des ausgebildeten Komplexes ist unterschiedlich und in diesem Zusammenhang das damit verbundene Signal. Diese Tatsache ist höchst interessant für eine gezielte Therapie von Osteoporose und Hyperkalzämie, da möglicherweise kleine C-terminale Veränderungen am Liganden die Stabilität des Liganden-Rezeptor-

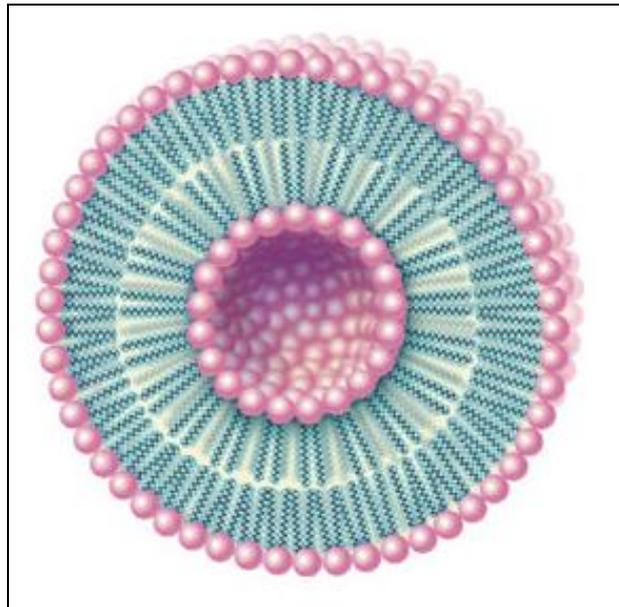
Komplexes beeinflussen. Damit könne unterschiedliche biologische Antworten ausgelöst werden (Potts und Gardella, 2007).

Derzeit wird der endogene Ligand PTH (1-34) zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt (Ashworth, 2002). PTH besitzt nur eine geringe therapeutische Breite. Einerseits werden in geringen Dosen die anabolen Effekte auf die Knochenmatrix therapeutisch genutzt (Gardella *et al.*, 1995). Andererseits führt eine ständige Applikation von PTH problematischerweise zu einer verringerten Sekretion durch die Nebenschilddrüse. Daraus resultiert eine Hyperkalzämie. Ziel ist die Stabilisierung einer Konformation des PTHR1, der die anabolen Effekte auslöst, jedoch die Entstehung einer Hyperkalzämie unterdrückt.

### 4.3 Rekonstitution in künstliche Membransysteme

Die funktionelle Charakterisierung von Membranproteinen ist im Vergleich zu löslichen Proteinen mit einem erhöhten Aufwand verbunden. Isoliert aus einer biologischen Membran in wässrige- oder detergentshaltige Umgebungen sind Membranproteine instabil, so wurde am mizellären  $\beta_2$ -Adrenergen-Rezeptor innerhalb der ersten Stunde ein Verlust der Ligandenbindung von 65% gemessen (AbouSamra *et al.*, 1992). Aus diesem Grund werden zur *in vitro* Charakterisierung von GPCR Techniken eingesetzt, die eine biologische Membran simulieren. Zu diesen Membranmimetika gehören Liposomen, Bizellen oder Nanodiscs. Jedes System besteht aus der notwendigen doppelschichtigen Lipidmembran. Die Bizellen bestehen aus einem Gemisch von Lipid und Detergens und formen keine Vesikel sondern bilden eine diskoidale Struktur aus. Membranproteine können darin eingebaut und mittels *solution-state*-NMR untersucht werden (Wu *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2008). Die Nanodiscs stellen eine Verbesserung des diskoidalen Systems dar. Hierbei werden die Lipide der Lipiddoppelschicht durch ein Derivat des Apolipoprotein I gürtelartig umgeben. Der Vorteil der Verwendung von Nanodiscs liegt darin, dass diskoidale Scheiben einer definierten Größe entstehen. Diese erlauben nur den Einbau von einem monomeren Membranprotein, die durch chromatographische Techniken isoliert werden können. Ein weiterer wichtiger Vorzug ist, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus des Rezeptors frei zugänglich sind. Nanodiscs mit eingebautem Membranprotein werden *in vitro* zur Untersuchung der biologischen Aktivität eingesetzt. So kann bei den GPCR in Nanodiscs eine Signalweiterleitung vom Liganden zum G-Protein zur funktionellen Charakterisierung ermöglicht werden (Rasmussen *et al.*, 2011).

Die Grundlage für die vorher genannten Systeme bilden Liposomen, deren stabilisierende Wirkung auf Membranproteine unumstritten ist. Die Aktivität der ersten isolierten Transportkanäle konnte erst nach der Rekonstitution in eine Vesikeldoppelschicht gezeigt werden (Eytan, 1982).



**Abbildung 4-13: Schematische Darstellung eines Liposoms.** Liposomen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht. Diese entstehen aufgrund der Abgrenzung des hydrophoben Fettsäurerestes (blau) und der Ausrichtung der polaren Kopfgruppe (rosa) zum Lösungsmittel. Bei der Produktion von Liposomen entsteht ein äußeres und inneres Kompartiment (<http://www.britannica.com/EBchecked/media/92244/Phospholipids-can-be-used-to-form-artificial-structures-called-liposomes>).

Kleinschmidt konnte für die humanen spannungsabhängigen, anionenselektiven Kanäle (VDAC) zeigen, dass die Renaturierung erst in Gegenwart von Liposomen vollständig erfolgte (Shanmugavadivu *et al.*, 2007). Im Gegenzug konnte bei einem rekombinant produzierten Glutamat-Transporter (GLT-1) gezeigt werden, dass für die Transportaktivität Lipide zum Zellextrakt zugesetzt werden mussten (Raunser *et al.*, 2005). Kühlbrandt konnte am gleichen Transporter die Struktur mittels 2D-Kristallisation aufklären. Dabei stellt die Herstellung von Proteoliposomen durch die Fusion von Membranproteinen und Liposomen den ersten Schritt zu einem möglichen Einsatz von strukturellen biologischen Methoden dar (Raunser *et al.*, 2005; Engel und Gaub, 2008).

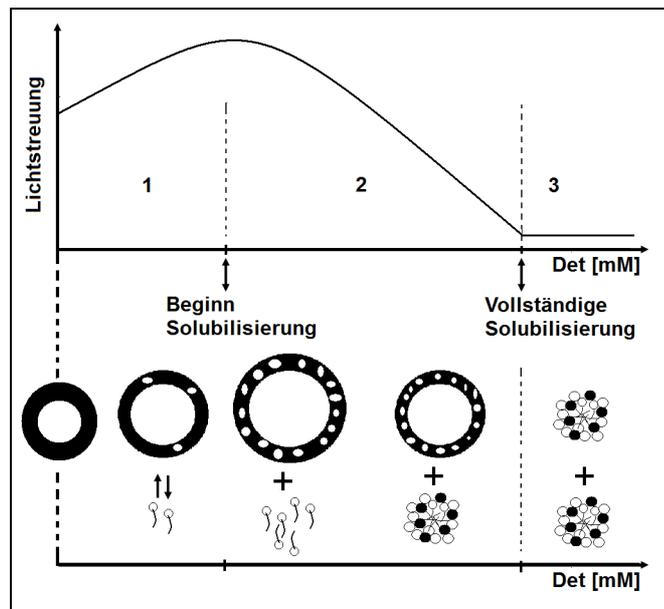
Aufgrund der komplexen Zusammensetzung von biologischen Membranen werden zur Rekonstitution von Membranproteinen Liposomen eingesetzt. Dieses reduzierte System kann sehr gut *in vitro* produziert und charakterisiert werden. Lipide bestehen aus langen Fettsäureresten, die mit Glycerin verestert sind und eine polare Kopfgruppe tragen. Für ein Membranprotein kann im Idealfall die Zusammensetzung der verwendeten Lipide individuell angepasst werden. Die Notwendigkeit des Einsatzes spezifischer Lipide, um die volle biologische Aktivität der eingebauten Membranproteine zu erhalten, belegten die Arbeiten von Latruffe und Mitarbeitern bereits Mitte der achtziger Jahre (Latruffe *et al.*, 1986). Die Schichtdicke des Bilayers ist entscheidend vom verwendeten Lipid abhängig. Kleine, gesättigte Fettsäuren produzieren eine kompaktere Membranschicht als ungesättigte langkettige

Fettsäuren. Ein weiterer natürlicher Bestandteil von biologischen Membranen ist Cholesterin. Ein Zusatz von Cholesterin zu den Liposomen erhöht die Impermeabilität und Festigkeit der Lipiddoppelschicht. Der Einfluss von Cholesterin auf Membranproteine wurde bei einigen Vertretern untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei einigen Membranproteine die Ausbeute an funktionsfähigen Rezeptoren durch die Interaktion mit Cholesterin erhöht wurde (Pucadyil und Chattopadhyay, 2006).

#### 4.3.1 Herstellung von Proteoliposomen

Liposomen werden durch Ultraschall oder Extrusion produziert. Diese werden aufgrund ihrer Größe in *small* unilamellare Vesikel (SUV), *large* unilamellare Vesikel (LUV) und *giant* unilamellare Vesikel (GUV) eingeteilt (Mayer *et al.*, 1986; Macdonald *et al.*, 1991). Zur Herstellung von Proteoliposomen werden überwiegend unilamellare Vesikel benötigt. Als Vorbereitung für die Rekonstitution von Membranproteinen wird die Lipiddoppelschicht der Liposomen, durch Zugabe von Detergens, aufgeweicht (solubilisiert). Ein wichtiger Aspekt hierbei ist, dass die überwiegend nicht-ionischen Detergenzien in die Vesikelmembran eindringen können und das diese zwischen Unter- und Oberseite der Lipiddoppelschicht wechseln können (*flip-flop*) (Helenius und Simons, 1975). Dieser Prozess ermöglicht die vollständige Solubilisierung der Liposomen und die Integration des Membranproteins.

Der Einfluss des Detergens auf die Vesikel wird in drei Phasen eingeteilt. In Phase 1 wird das Detergens in die Membran eingebaut und die Liposomen schwellen an (**Abbildung 4-14**) (Alonso *et al.*, 1982). Diese Zunahme kann durch Partikelgrößenbestimmung oder durch die Messung eines Streulichtsignals ermittelt werden (Delamaza und Parra, 1994). Nachdem die Liposomen mit Detergens gesättigt sind, setzt Phase 2, die Solubilisierung der Liposomen, ein. Dabei werden Lipidmonomere aus dem Vesikel entfernt und bilden mit dem Detergens in der Lösung Misch-Mizellen aus. Das Streulichtsignal erreicht beim Übergang zur Solubilisierung sein Maximum. Es nimmt im weiteren Verlauf der Solubilisierung durch Zugabe von Detergens wieder ab (Paternostre *et al.*, 1988; Heerklotz und Seelig, 2000). Phase 3 charakterisiert eine vollständige Solubilisierung der Liposomen durch Detergens. In Lösung liegen in dieser Phase nur Misch-Mizellen aus Lipid und Detergens vor (**Abbildung 4-14**). Das Signal der Lichtstreuung reduziert sich dabei auf ein Minimum.



**Abbildung 4-14: Solubilisierung von Liposomen durch Detergenzien.** Schematische Darstellung der Solubilisierung von Liposomen durch den Einbau des Detergens in die Lipiddoppelschicht. Die Solubilisierung der Liposomen kann mittels Lichtstreuung gemessen werden. Durch den Einbau des Detergens schwillt das Liposom an, bis die Lipiddoppelschicht mit Detergenen gesättigt ist. Durch Zugabe von weiteren Detergenzmolekülen werden die Lipide aus dem Liposom entfernt und in Detergenzmizellen aufgenommen. Nach der vollständigen Solubilisierung der Liposomen liegen gemischte Mizellen (*mixed-micelles*) vor. Diese bestehen aus Lipid und Detergenen (Rigaud *et al.*, 1995; Seddon *et al.*, 2004).

Der Fokus bei einer Detergenz vermittelten Rekonstitution liegt in der Phase 2 (**Abbildung 4-14**). Die Liposomen werden durch das zugesetzte Detergenz bis zu einem definierten Punkt solubilisiert. Danach erfolgt die Zugabe des Membranproteins zu den vorbereiteten Liposomen. Es entsteht eine homogene Lösung aus Membranprotein-Detergenz-Mizellen und Lipid-Detergenz-Mizellen. Zur erfolgreichen Integration des Membranproteins in die Liposomen muss das Detergenz entfernt werden. Für diesen Prozess eignen sich Dialyse<sup>3</sup>, Größenausschlusschromatographie, die Zugabe von Cyclodextrin oder BioBeads (Rigaud *et al.*, 1995; Degrip *et al.*, 1998). Die Geschwindigkeit der Detergenzentfernung ist für die Ausbeute an aktivem rekonstituierten Membranprotein maßgeblich. Die Reduzierung des Detergens setzt die Löslichkeit der Protein-Detergenz-Mizellen herab. Diese lagern sich daraufhin an die Liposomen. Das verbleibende Detergenz katalysiert die Fusion zwischen Liposomen und den Protein-Detergenz-Mizellen. Durch die kontinuierliche Entfernung des Detergens wachsen die Lipid-Protein-Detergenz-Misch-Mizellen wieder zu rigiden Liposomen zusammen, so dass Proteoliposomen gebildet werden. Eine langsame Prozessführung begünstigt einen überwiegend

<sup>3</sup> Die Dialyse zur Entfernung des Detergens während der Rekonstitution eignet sich nur für Detergenzien, die eine hohe CMC besitzen. Es bedeutet, dass das Detergenz bei hohen Konzentrationen erst Mizellen ausbildet, ansonsten liegt es als Monomer vor. Die Monomere des Detergens können eine Dialysemembran schnell überwinden.

unidirektionalen Einbau der Proteine in die Liposomen analog der Orientierung in biologischen Membranen (Eytan, 1982). Wird das Detergens schnell entzogen, findet keine geordnete Fusion zwischen den Lipid-Detergens-Mizellen und den Protein-Detergens-Mizellen statt. Dadurch ist die Orientierung der rekonstituierten Proteine in den Liposomen willkürlich. Die Parameter für den Solubilisierungsgrad der Liposomen und die Methode zur Detergensentfernung müssen individuell auf das jeweilige Membranprotein abgestimmt werden.

Ein grundlegendes Protokoll zur Rekonstitution wurde für die ABC-Transporter angefertigt (Geertsma *et al.*, 2008). Die Autoren behandeln die Durchführung und Optimierung der Rekonstitution für Membranproteine. Die Ausbeute und die biologische Aktivität des rekonstituierten Proteins ist von zwei maßgeblichen Parametern abhängig: von der Zusammensetzung der Lipide und von dem Lipid-zu-Protein-Verhältnis (LPR).

Die volle Funktionsfähigkeit von Membranproteinen ist nach der Rekonstitution oftmals abhängig von spezifischen Lipiden (Knowles *et al.*, 1976; Vik *et al.*, 1981). Die Verwendung von Lipidextrakten bietet eine Möglichkeit allgemein vorkommende und geeignete Lipide zur Rekonstitution einzusetzen.

Obwohl in biologischen Membranen die LPR kleiner als 1 ist, wird bei der Rekonstitution von gereinigten Membranproteinen ein wesentlich höheres Verhältnis von normalerweise 20 benötigt. Ein Extremfall stellt die Nikotinamid Nukleotid Transhydrogenase dar, bei der ein Lipid-Protein-Verhältnis von über 200 zur erfolgreichen Rekonstitution eingesetzt werden musste (Persson *et al.*, 1984). Die Ursache könnte in der eingesetzten Reinheit des Membranproteins liegen. Aufgrund dessen muss zur erfolgreichen Rekonstitution das LPR an das jeweilige Protein angepasst werden (Eytan, 1982).

## 4.4 Problemstellung

Der in der vorliegenden Arbeit behandelte PTHR1 ist an der Regulation des Kalziumhaushalts im Säugetierorganismus beteiligt. Die Regulation erfolgt durch die Sekretion des Liganden PTH aus der Nebenschilddrüse. Eine Fehlfunktion innerhalb dieser Regulationseinheit führt zur Induktion der Osteolyse. Auch durch entartete Epithelzellen (überwiegend Adenome) kann es zur unkontrollierten Sekretion von PTHrP im Organismus und zur Stimulation des PTHR1 kommen. Die Folge einer unkontrollierten Aktivierung des PTHR1 ist die Entstehung einer Hyperkalzämie. PTHR1 stellt aufgrund seiner Beteiligung an der Kalziumregulation einen Angriffspunkt zur Optimierung und Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung von der Osteoporose oder Hyperkalzämie dar. Detaillierte strukturelle Informationen zur

Ligandenbindung und Aktivierung des Rezeptors würden die Entwicklung neuer Therapeutika erleichtern.

Für das PTH/PTHrP Ligandenpaar konnte gezeigt werden, dass eine endo- und parakrine Wirkung durch die Liganden vermittelt wird. Obwohl beide N-terminalen Bereiche von PTH (1-11) und PTHrP (1-11) eine Aktivierung des gleichen Rezeptors bewirken, erfolgt eine differenzierte, gewebsspezifische Zellantwort. Auf molekularer Ebene müssen daher die Prozesse verstanden werden, die bei Bindung, Aktivierung des Liganden und der Signaltransduktion ablaufen.

Obwohl der grundlegende Mechanismus der Ligandenbindung für Mitglieder der Sekretin-Familie aufgeklärt werden konnte, fehlen immer noch Informationen über die spezifische intermolekulare Interaktion des Liganden-Rezeptor-Paares. Dabei sind die Möglichkeiten einer konformationellen Variation im Hinblick auf die Modulation der intrazellulären Signalweiterleitung nach Aktivierung des PTHR1 entscheidend. Aus diesem Grund sind eine strukturelle Charakterisierung des Mechanismus und die Identifizierung von Kontaktstellen zwischen PTHR1 und PTH bzw. PTHrP von großem Interesse. Eine strukturelle Analyse dieser Rezeptoren kann *in vitro* erfolgen, dabei werden rekombinant die erforderlichen Proteinmengen produziert. Die Stabilität der produzierten membranständigen Rezeptoren ist gewährleistet, so lange diese in einer Membran eingebettet bleiben. Eine Extraktion und Reinigung führt zwangsläufig zum Verlust der biologischen Aktivität (Rosenbaum *et al.*, 2007). Des Weiteren sind die Proteinausbeuten von eukaryotischen Expressionssystemen für GPCR mit den gängigen Methoden bislang zu gering und falls überhaupt nur bei Mitgliedern der Rhodopsin-Familie erfolgreich.

Einen Lösungsansatz bietet die rekombinante Produktion des humanen PTHR1 in Form von *inclusion bodies* in *E.coli*. Auf der Basis vorheriger Arbeiten sollte die Fermentation hinsichtlich der Ausbeute optimiert werden und die Übertragung des Prozesses auf Mineralsalzmedium vorgenommen werden. Im gleichen Schritt sollte ein Protokoll zur Markierung des PTHR1 mit  $^{15}\text{N}$  etabliert werden.

Aufgrund der Produktion des PTHR1 in *inclusion bodies* sollte nach Solubilisierung und Reinigung des PTHR1, eine reproduzierbare Renaturierungsstrategie in einem Mizellen-System entwickelt werden. Diese Strategie sollte hinsichtlich der Proteinausbeute und Stabilität des PTHR1 untersucht und optimiert werden. Der, in dem etablierten mizellären System renaturierte PTHR1, sollte auf Sekundär- und Tertiärstrukturelemente mittels Circular dichroismus- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden. Die thermische Stabilität des renaturierten PTHR1 sollte durch eine Temperatur induzierte Entfaltung untersucht werden. Dabei sollte die intrinsische Fluoreszenz der Aminosäure Tryptophan im PTHR1 verwendet werden.

Zur Stabilisierung des PTHR1 *in vitro* sollten geeignete Membranmimetika eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurden hier Strategien zur Rekonstitution des PTHR1 in Proteoliposomen

aufgegriffen. Die Herstellung von PTHR1-Proteoliposomen sollte eindeutig mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gefrierbrüchen nachgewiesen werden. Zusätzlich sollte eine Methode eingesetzt werden, die eine Optimierung der Rekonstitution und eine Quantifizierung des PTHR1 in Proteoliposomen ermöglicht.

Abschließend sollte die biologische Aktivität des PTHR1 in Proteoliposomen untersucht werden. Hierfür sollten Strategien entwickelt werden, die die hohe unspezifische Wechselwirkung des Liganden PTH reduzieren. Das würde eine Bestimmung der aktiven rekonstituierten PTHR1-Spezies in Liposomen gewährleisten.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Chemikalien

Tabelle 5-1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und dem jeweiligen Hersteller

Chemikalie	Hersteller
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	Genzyme, Schweiz
Lissamine <sup>TM</sup> rhodamin B 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin, triethylammonium salz (rhodamin DHPE)	Invitrogen, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol	Applichem, Darmstadt
3-[3-(Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat	Anatrace, Maumee, Ohio, USA
5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)	Invitrogen, Karlsruhe
5-Acetyلهthylendiamin-naphthalin-1-sulfonsäure	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampizillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Cholesterinhemisuccinat	Anatrace, Maumee, Ohio, USA
Coomassie Brilliant Blau G250	Roth, Karlsruhe
<i>E. coli</i> polar Lipidextrakt	Avanti Polar Lipids Inc, Alabaster, Alabama, USA

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Ethylendiamintetraacetat	Sigma, Steinheim
Exendin (9-39)-Cys	Novo Nordisk, Kopenhagen
Extran MA 02 neutral	Merck, Darmstadt
<i>Glucagon-like-peptide</i> -Cys	Novo Nordisk, Kopenhagen
Glukose	CVH Chemie-Vertrieb GmbH & Co Hannover Kg
Glutathion oxidiert	Applichem, Darmstadt
Glutathion reduziert	Applichem, Darmstadt
Glyzerol	Merck, Darmstadt
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumhydrochloridchlorid	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt für LB-Medium	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt KAV Fermentation	Deutsche Hefewerke, Berlin
Imidazol	Applichem, Darmstadt
Isopropyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid	Applichem, Darmstadt
L-Arginin	Ajimoto, Japan
L-Cystein	Fluka, Neu-Ulm
Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin	Wacker, Jena
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylenbisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfatpellets	Serva, Heidelberg
Natriumperborat	Sigma, Steinheim
n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid	Anatrace, Maumee, Ohio, USA
n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid	Glykon Chemikalien, Luckenwalde
n-Oktyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	Fluka, Neu-Ulm
Parathormon (1-37)	Roche, Penzberg
Parathormon (1-37)-Cys	Novo Nordisk, Kopenhagen
Sorbitol	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris(2-carboxyethyl)phosphin-hydrochlorid	Invitrogen, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan	MP Biomedicals, Eschwege
Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	MP Biomedicals, Eschwege

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Sigma oder Roth bezogen. Alle Lösung und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser (Pure Lab Plus, USF Serveral bzw. Millipore) verwendet.

### 5.1.2 Trägermaterialien und Reagenzien

Tabelle 5-2: Trägermaterialien und Reagenzien

Material	Hersteller
Anti-Maus-Antikörper (Ziege, polyklonal, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase Bestell-Nr. SC 2005	Santa Cruz, Heidelberg
Dialyseschläuche (MWCO 6-8000 Da)	Spectrum, LA
Dialyseschläuche (MWCO 1000 Da)	Spectrum, LA
Ni-NTA-Sepharose	Novagen, Darmstadt
PTH/PTHrP-R-Antikörper (Maus, monoklonal), Bestell-Nr. SC 12722	Santa Cruz, Heidelberg
Sephacryl S-200 HR	GE Healthcare, München
Nitrozellulosemembran, Bestellnr. 66485	VWR International, Darmstadt
Whatmanpapier, Bestellnr. 110405	Whatman, Dassel
Multiscreen 96-well plate, 0.45 µm Porengröße, hydrophile PVDF Filter, Fisher cat. Nr. FDR-547-035L	Millipore, UK

Die Dialyseschläuche wurden vor der Verwendung 2-fach in 50 mM NaCO<sub>3</sub> und 10 mM EDTA bei 60°C für 4 h gereinigt. Anschließend wurden diese in 20% EtOH bei 4 °C gelagert. Die

Dialyse mit einem MWCO von 1000 Da wurden vor dem Einsatz in 10 ml destilliertem Wasser für 30 °C eingeweicht.

### 5.1.3 Bakterienstamm und Plasmid

Für die Fermentation des PTHR1 wurden die *E.coli*-Stämme BL21c<sup>+</sup> (Genotyp: BF<sup>-</sup>, *dcm*, *ompT*, *hdsS* (r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal λ(DE3)), Rosetta 3(DE) pLys (Abkömmling von BL21) und BL21 zur Fermentation mit Mineralsalzmedium verwendet. Die Vektoren waren pET15b und pET41b von Novagen mit dem Gen des humanen PTHR1 ohne Signalsequenz.

Tabelle 5-3: *E.coli* Expressionsstamm mit einem zusätzlichen Plasmid, das für seltene in *E.coli* verwendete tRNAs kodiert.

<i>E.coli</i> -Stamm	zusätzliche tRNAs
BL 21 c <sup>+</sup> RIL	AGG/ AGA (Arginin) AUA (Isoleucin) CUA (Leucin)

### 5.1.4 Medien und Lösungen für eine Bakterienkultivierung

Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Tabelle 5-4: Zusammensetzung LB-Medium

Konzentration	Substanz
10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl

Die Antibiotika wurden dem Medium nach Autoklavieren zugesetzt.

Tabelle 5-5: IPTG und Antibiotika

Stoff	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung
IPTG	Wasser	1,0 M
Ampizillin	Wasser	100 mg/ml
Chloramphenicol	Ethanol	30 mg/ml

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

Tabelle 5-6 Enzyme für Zellaufschluss

Stoff	Hersteller
Desoxyribonuklease I (DNaseI)	Sigma, Steinheim
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma, Steinheim

### 5.1.5 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 5-7: Übersicht der verwendeten Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Laufpuffer (SDS-PAGE, 5-fach)	15,1 g/l Tris/HCl, 72 g/l Glyzin, 5 g/l SDS, pH 8,3
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE, 4-fach)	60,0 g/l Tris/HCl, 4 g/l SDS, pH 6,8
Trenngelpuffer (SDS-PAGE, 4-fach)	181,7 g/l Tris/HCl, 20 g/l SDS, pH 8,8
Probenpuffer (SDS-PAGE, 2-fach)	124 mM Tris/HCl, 100 mM DTT, 20% (w/v) Glyzerin, 2% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8

Bezeichnung	Zusammensetzung
Gelfixier-Lösung (SDS-PAGE)	25% (v/v) 2-Propanol, 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Lösung (SDS-PAGE)	10% (v/v) Essigsäure, 10 mg/ml Coomassie G250 Brilliant Blau
Entfärber-Lösung (SDS-PAGE)	10% (v/v) Essigsäure
Geltrocknungs-Lösung (SDS-PAGE)	45% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Glycerin
TBT-Puffer (Western-Blotting)	10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,2% (v/v) TWEEN 20, pH 7,4
Ponceau-Lösung (Western-Blotting)	0,2% Ponceau S, 3% TFA-Lösung
<i>enhanced</i> Chemolumineszenz-Lösung (ECL1)	0,44 ml Cumarinsäure, 10 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5, <i>ad</i> 100 ml H <sub>2</sub> O (bidest)
<i>enhanced</i> Chemolumineszenz-Lösung (ECL2)	64 µl 30% Wasserstoffperoxid, 10 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5, <i>ad</i> 100 ml H <sub>2</sub> O (bidest)
Solubilisierungspuffer	100 mM Tris/HCl, 20 mM SDS, 100 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8,0
Entsalzungspuffer	100 mM NaP, 10 mM SDS, pH 4,5
Äquilibrierungspuffer (Ni-NTA)	100 mM NaP, 15 mM SDS, pH 8,3
Elutionspuffer (Ni-NTA)	100 mM NaP, 15 mM SDS, pH 4,5
Renaturierungspuffer	100 mM Tris/HCl, 20 mM Cyclodextrin, 1 M L-Arginin, 0,1% DDM, 5 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 8,5 <sup>@10 °C</sup>
Dialyse-, Gelfiltrations-, Messpuffer (PTHR1)	100 mM NaP, 150 mM NaCl, 0,1% DDM, pH 7,4
Rekonstitutions-, Gelfiltrations-, Bindungspufferpuffer (PTHR1-Proteoliposomen)	100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4

Bezeichnung	Zusammensetzung
Dialysepuffer (ITC)	100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 <sup>@4 °C</sup>
Waschpuffer ( <i>pull-down</i> -Assay)	100 mM NaP, 150 mM NaCl, 0,005% TWEEN 20, pH 7,4
Bindungspuffer (Radioliganden-Assay)	20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7,5, 0,3% Milchpulver, 0,005% Bazitrazin
Waschpuffer (Radioliganden-Assay)	20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7,5, 0,3% Milchpulver
Lysispuffer (Fusionsproteine)	50 mM NaP, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH-Wert 8,0
SUMO-Spaltungspuffer (Fusionsproteine)	20 mM Tris/ HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0 <sup>@ 4 °C</sup>
Waschpuffer (Fusionsproteine)	50 mM NaP, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH-Wert 8,0
Elutionspuffer (Fusionsproteine)	50 mM NaP, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH-Wert 8,0
10-fach SUMO-Protease Puffer (Fusionsproteine)	500 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,0 <sup>@ 4 °C</sup> , 2% Igepal (NP-40), 10 mM DTT
Aufschlusspuffer ( <i>inclusion bodies</i> )	100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4 <sup>4°C</sup>
Resuspendierungspuffer ( <i>inclusion bodies</i> )	100 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA, 2% Triton X-100, pH 7,4 <sup>4°C</sup>
Waschpuffer ( <i>inclusion bodies</i> )	100 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA, pH 7,4 <sup>4°C</sup>

Die Lösungen ECL 1 und ECL 2 wurden zur Analyse mittels Western-Blotting im Verhältnis 1 : 1 frisch in der Dunkelkammer zusammen gemischt. Alle verwendeten Pufferlösungen wurden steril filtriert.

### 5.1.6 Technische Geräte und Anlagen

Tabelle 5-8: Standardlaborausstattung

Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
8-fach Pipette	Eppendorf	20 – 300 µl
Absorptionsspektrophotometer	Beckman	Beckman DU 7400
	GE Healthcare (Pharmacia)	Ultraspec 3000
Magnetrührer	Heidolph	MR 3000; MR 3001
Mixer	ScientificIndustries	Vortex-Genie 2
Orbitalshaker	Heidolph	Polymax 1040
Pumpen	GE Healthcare (Pharmacia)	P-1
Quarzglasküvetten	Hellma (Müllheim)	Hellma 104-QS(d=1cm)
Spannungsquelle	GE Healthcare (Pharmacia)	EPS 300; EPS 600
Thermomixer	Eppendorf	5436
Ultrazentrifuge	Beckman	Ultrafuge L8-60M
Waagen	Sartorius	BP 4100; KB BA 100
Western-Blotting Apparatur	Hoefer	Semi-Phor
Zentrifugen	Heraeus Instruments	Biofuge pico
	Beckman	Beckmann Avanti J-25
	Heraeus Instruments	Biofuge fresco

Tabelle 5-9: Molekularbiologie, Bakterienkultivierung und Fermentation

Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
Bioreaktor	B.Braun	Biostat ED
Brutschrank	Heraeus Instruments	B 6030
Dampfsterilisator	H und P Labortechnik	Varioklav
Elektrophoreseapparatur	GE Healthcare (Pharmacia) Biotech	EPS 300
Elektroporationsgerät	Hercules, U.S.A	Gene-Pulser System
Laminarflowbox	Heraeus Instruments	Hera Safe

Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
Schüttelinkubatoren	Edmund Bühler	SM 30
	Infors AG	Hat Multitron
Thermocycler	Eppendorf	Mastercycler
UV-Transilluminator	Raiser	RS 1

Tabelle 5-10: Isolierung und Reinigung von Proteinen

Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
Chromatographiesystem	GE Healthcare (GE Healthcare (Pharmacia))	Äkta Explorer
	s.o.	Äkta Express
	s.o.	Äkta Purifier
	s.o.	FPLC
Homogenisator	APV-Schröder	Micron Lab 40
Gaulin Homogenisator	APV-Schröder	LAB60/60-10TBS
	Janke & Kunkel	Ultra Turrax T 25

Tabelle 5-11: Liposomenherstellung

Gerät	Hersteller	Typenbezeichnung
Ultrazentrifuge	Beckman	Ultrafuge L8-60M
Schüttelwasserbad	Julabo	SW 22
Extruder	Northern Lipids INC.	10 mL Lipex <sup>TM</sup> Extruder
Extruder	Avestin, Europe GmbH	1 mL Extruder
Mixer	ScientificIndustries	Vortex-Genie 2

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Allgemeine proteinchemische Methoden

#### 5.2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Das anionische Detergens SDS maskiert die Eigenladung von Proteinen und verleiht ihnen eine negative Gesamtladung. Die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine hängt so nur von ihrer Molekularmasse und ihrer Form, aber nicht von ihrer Nettoladung ab. Wird eine Spannung angelegt, so entsteht ein elektrisches Feld und die Proteine wandern in Richtung der Anode. Zur Erhöhung der Bandenschärfe wird das Trenngel mit einem großporigen Sammelgel überschichtet, in diesem wird das Proteingemisch fokussiert.

Das Gießen der Gele erfolgte mit Midget-Gelplatten (10 x 8 x 0,15 cm). Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 30 mA und einer Spannung von 200 V bei RT durchgeführt.

Die Proteinproben wurden vor der Auftragung 1:2 mit 2-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und bei 40 °C für 30 min inkubiert. Nach der elektrophoretischen Trennung wurde das Gel zunächst für 10 min mit Gelfixierungslösung behandelt. Dadurch werden insbesondere kleinere Proteine im Gel fixiert. Anschließend erfolgte die Anfärbung der aufgetrennten Proteine in Coomassie-Lösung für 2-3 h. Durch eine dreißigminütige Inkubation in Entfärberlösung wurde der Gelhintergrund entfärbt. Zur Konservierung wurde das Gel mit der Gel Trocknungslösung getränkt und 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel zwischen Cellophanfolie in einen Trocknungsrahmen gespannt und bei RT getrocknet.

#### 5.2.1.2 Silberfärbung von SDS-PAGE

Die Silberfärbung ist eine Methode zur Anfärbung von Protein nach einer SDS-PAGE. Der Vorteil gegenüber einer Färbung mit Coomassie Brilliant blau G 250, ist die geringere Nachweisgrenze im Bereich von 0,1 – 1 ng Protein pro Bande (Oakley *et al.*, 1980). Die Silberfärbung erfolgte innerhalb von dreißig Minuten nach Nesterenko *et al.* (Nesterenko *et al.*, 1994).

### 5.2.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen wurden spektrophotometrisch an einem DU-7400 Diodenarray-Spektrophotometer in Quarzglasküvetten mit 1 cm Schichtdicke durchgeführt. Alle Spektren wurden im Wellenlängenbereich von 240 bis 340 nm aufgenommen, wobei der entsprechende Puffer als Referenz diente. Die Berechnung der molaren Proteinkonzentration erfolgte aus der Absorption bei 280 nm mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes Formel 1.

Formel 1: *Lambert-Beersches Gesetz*

$$A = \varepsilon * c * d$$

A: Absorption bei 280 nm

$\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient bei 280 nm in  $M^{-1} cm^{-1}$

c: Proteinkonzentration in M

d: Schichtdicke der Küvette in cm

Die für die jeweiligen Proteine und Peptide benutzten Extinktionskoeffizienten wurden anhand des ProtParam Programms der SwissProt Datenbank (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>), basierend auf der Methode von Gill und von Hippel, aus den Werten für Tryptophan, Tyrosin und Cystin ermittelt (Gill & von Hippel, 1989),(Tabelle 5-12).

Tabelle 5-12: Extinktionskoeffizienten der Rezeptoren und Peptide

Protein	$E_{280} (M^{-1} cm^{-1})$
PTHR1	119700
N-terminale Domäne PTHR1	37770
Parathormon (1-37)	5690
PTH-ECFP	33000
GLP-ECFP	33000

#### 5.2.1.4 Western-Blotting

Beim Western-Blotting werden Proteine aus einem SDS-Acrylamidgel elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Nach Inkubation der Membran mit proteinspezifischen Antikörpern wird mit enzymgekoppelten sekundären Antikörpern ein spezifischer Proteinnachweis durchgeführt.

Das Übertragen der Proteine aus einem SDS-Gel auf eine in SDS-PAGE-Laufpuffer getränkte Nitrozellulose-Membran (Blotten), zwischen drei SDS-PAGE-Laufpuffer getränkten Filterpapieren, erfolgte in einer Semi-Phor Blotting Apparatur bei einer Stromstärke von 100 mA für 150 min. Durch anschließendes Färben der Membran mit 0,2% Ponceau S-Lösung und Markierung des mitgeführten Molekularmassenstandards ist eine spätere Größenordnung der Banden möglich. Reduzierung von unspezifischen Wechselwirkungen erfolgte durch einstündige Inkubation in TBT-Puffer mit 5% (w/v) Milchpulver (Blocken). Die Antikörper wurden entsprechend einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt und die Membran für 1 h bei 4° C und leichtem schütteln inkubiert. Zwischen dem Wechsel des Antikörpers wurde die Membran dreimal in TBT-Puffer gespült. Der Nachweis der spezifisch markierten Banden erfolgte mittels frisch hergestellter ECL-Lösung. Diese enthält das Substrat für die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase. Die Oxidation, des in der Lösung enthaltenen Luminols durch die Peroxidase, führt zu einer Chemolumineszenz. Auf einem aufgelegten Röntgenfilm wurden nach der Entwicklung Bereiche sichtbar, die wenn möglich im Vergleich mit dem SDS-Gel, die Identität der untersuchten Proteine nachwies.

#### 5.2.1.5 Pierce Protein Assay

Detergentshaltige Puffersysteme stabilisieren Membranproteine, verhindern jedoch eine exakte Bestimmung der Konzentration durch spektroskopische Methoden. Detergentsmizellen produzieren in Lösung Streulicht und erschweren eine Bestimmung der Proteinkonzentration. Der Pierce Protein Assay wurde eigens für den Einsatz in detergentshaltigen Lösungen entwickelt. Die Reaktion basiert auf der Bildung eines Metall-Farbstoff-Komplexes an Proteine. Es erfolgt eine Farbänderung von braun hin zu grün nach erfolgter Proteinbindung. Der Farbstoff wird im sauren Milieu von den basischen Aminosäuren deprotoniert. Ein möglicher Einfluss der Detergenzien und Lipiden auf die Analyse wurde getestet. Hierzu wurden BSA-Standardkurven generiert und mit BSA-Standards in Gegenwart der verwendeten Detergenzien und Lipide verglichen. Dabei wurde eine Diskrepanz in der Proteinkonzentration zwischen den verschiedenen BSA-Standards festgestellt, so dass ein Einfluss der verwendeten Detergenzien

oder Lipide auf die Proteinkonzentration besteht. Aus diesem Grund wurden alle Messungen unter äquivalenten Bedingungen zur der zu messenden Probe angefertigt.

Die Zusammensetzung der relevanten Aminosäuren für eine Reaktion mit dem Farbstoff unterscheiden sich zwischen BSA und PTHR1 (BSA: Arg 26, Lys 60, His 17; PTHR1: Arg 33, Lys 27, His 22). Aus diesem Grund wurde die PTHR1-Proteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie und im Anschluss die Proteinkonzentration dieser Probe mit dem Pierce Protein Assay bestimmt. Beide Methoden lieferten die gleiche Proteinkonzentration für PTHR1. Aus diesem Grund wurden BSA-Standardkurven eingesetzt, um die Proteinkonzentration von PTHR1 in der Gegenwart von Detergenzien und von Lipiden zu bestimmen. Zur Messung der Konzentration des PTHR1 in den Liposomen wurde die Proteoliposomen vorher mit Triton X-100 vollständig zerstört.

## 5.2.2 Herstellung von Fusionsproteinen

### 5.2.2.1 Produktion der Fusionsproteine PTH- und GLP-ECFP

Die Vorbereitung erfolgte in gleichem Maße wie unter 5.2.3.1 beschrieben. Die Fusionsproteine wurden der Zellreihe BL 21 c<sup>+</sup>, Genotyp DE 3 mittels eines pET 19 Vektors produziert. Aufgrund des Einsatzes des SUMO-Expressionssystem sollte eine lösliche Produktion und Akkumulation des Zielproteins in *E.coli*-Zellen erreicht werden.

Tabelle 5-13: Aufbau der verwendeten Fusionskonstrukte

Protein	Konstrukt	Molekulargewicht [Da]
GLP-ECFP	His – SUMO – GLP – (GS) <sub>6</sub> – ECFP	31369,2 (ohne His-SUMO)
PTH-ECFP	His - SUMO – PTH (1-84) – ECFP	36456,2 (ohne His-SUMO)

Nach dem die Zellen eine optische Dichte von ca. 60 erreicht hatten, wurde der gesamte Fermenter schrittweise um drei Grad Celsius auf 25 °C abgekühlt. Danach erfolgte die Induktion der Proteinsynthese durch die Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM im Fermenter. Dadurch sollten die Fusionsproteine überwiegend löslich exprimiert werden. Die Zellen wurden 4 h nach Induktion durch Zentrifugation bei 4000 rpm (JLA-8.1000, 4 °C, 20 min) geerntet. Die Zellmasse wurde aufgeteilt, bei -80 °C eingefroren und danach bei -20 °C gelagert.

### 5.2.2.2 Zellaufschluß und Reinigung der Fusionsproteine

Der Zellaufschluß erfolgte an einer French-Press. Dazu wurden 10 mg des Zellpellet in Lysispuffer (50 mM NaP, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH-Wert 8,0) resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde Lysozym mit einer Endkonzentration von 1 mg/mL gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Daran schlossen sich drei Passagen an der French-Press bei maximal 800 MPa an. Dem aufgeschlossenen Material wurde MgCl bis zu einer Endkonzentration von 3 mM zugegeben, damit die DNase I (5 µg/mL) während der Inkubationszeit (15 min, RT) die DNA verdauen konnte. Die Zell- und DNA-Fragmente wurden bei 10.000g bei einer Temperatur von 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde im *batch*-Verfahren mit 3 mL Ni-NTA-Sepharose für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Ni-NTA-Sepharose wurde vorher dreimal mit 10 ml destilliertem Wasser und dreimal mit 10 ml Lysispuffer gewaschen bzw. äquilibriert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde die Ni-NTA-Sepharose in einen leeren PD-10 Säulenkörper eingefüllt. Eine Probe des erhaltenen Durchlaufs wurde auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Die Ni-NTA-Sepharose wurde mit 30 ml eines Waschpuffers (50 mM NaP, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH-Wert 8,0) gewaschen. Vom Waschschrift wurde ebenfalls eine Probe auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Die Fusionsproteine wurden mit einem Elutionspuffer (50 mM NaP, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH-Wert 8,0) eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt und auf Eis gekühlt. Von den Fraktionen wurde die Konzentration mittels UV-Absorption bestimmt. Die Proteinfractionen wurden vereinigt und gegen den SUMO-Spaltungspuffer (20 mM Tris/ HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0<sup>@ 4 °C</sup>) dialysiert. Die Spaltung mit der SUMO-Protease erfolgte je nach Konstrukt mit einer Inkubationszeit von ca. 1-5 h. Die Inkubation wurde mit einem SUMO-Proteasepuffer durchgeführt. Dazu wurde das entsprechende Volumen aus einer zehnfach konzentrierten Stammlösung des SUMO-Proteasepuffers (500 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,0<sup>@ 4 °C</sup>, 2% Igepal (NP-40), 10 mM DTT) zu der dialysierten Probe pipettiert. Die SUMO-Protease hat ein Temperaturoptimum bei 30 °C, dennoch erfolgte die Spaltung, zum Schutz der Fusionsproteine, bei 4 – 7 °C im Kühlschrank. Fakultativ wurde eine weitere Ni-NTA-Sepharose zum Entfernen des SUMO-Proteins und der SUMO-Protease durchgeführt. Dazu wurde der Ansatz erneut gegen den Lysispuffer dialysiert. Im Durchlauf befand sich das jeweilige Fusionsprotein. Die SUMO-Protease und das SUMO-Protein blieben auf der Ni-NTA-Sepharose gebunden. Zur Regeneration wurde das Material der Ni-NTA-Sepharose mit Elutionspuffer gewaschen.

### 5.2.3 Herstellung des Parathormon-Rezeptor (PTHr1)

Die allgemeinen Parameter bei jeder Fermentation waren eine automatisierte Regulation des Sauerstoffpartialdrucks auf 30%. Diese Steuerung erfolgte über eine eingestellte Kaskade die erstens die Sauerstoffzufuhr regelte und zweitens die Rührerdrehzahl kontrollierte. Die Rührerdrehzahl betrug jedoch mindestens 300 rpm.

#### 5.2.3.1 Fermentation mit Hefeextrakt (Vollmedium)

Die rekombinante Produktion des Rezeptors erfolgte mittels *fed-batch*-Fermentation. Diese fand in einem 6 Liter-Maßstab auf Hefeextraktvollmedium statt. Als Selektionsantibiotika wurden Kanamycin (30 µg/ml) und Chloramphenicol (30 µg/ml) zugesetzt. Der Hefeextrakt und das Ammoniumchlorid wurden direkt im Fermenter sterilisiert. Die anderen Bestandteile wurden separat gelöst und autoklaviert. Als primäre Kohlenstoffquelle diente Glukose. Der Prozessstart erfolgte durch Inokulation mit 200 ml einer stationären Übernachtkultur. Diese wurde ausgehend von einer Einzelkolonie des plasmidtragenden (PTHr1-pET41b) *E.coli*-Stammes BL21c<sup>+</sup> angeimpft. Um das Wachstum der Bakterien zu verfolgen, wurde die optische Dichte OD<sub>600</sub> regelmäßig während der Fermentation bestimmt. Nachdem die Glukose im Startmedium verbraucht war, wurde als Kohlenstoffquelle eine *feeding*-Lösung zugesetzt. Bei einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 70 erfolgte die Induktion der Proteinproduktion mit 1 mM IPTG. In regelmäßigen Abständen wurden nach der Induktion Proben entnommen, die mittels SDS-PAGE auf den Gehalt an PTHr1 untersucht wurden. Die Zellen wurden 4 h nach Induktion durch Zentrifugation bei 4000 rpm (JLA-8.1000, 4 °C, 20 min) geerntet. Die Zellmasse wurde aufgeteilt, bei -80 °C eingefroren und danach bei -20 °C gelagert.

Tabelle 5-14: Fermentation auf Vollmedium

Konzentration	Substanz
50 g/l	Hefeextrakt KAV
5 g/l	Glukose
11 g/l	di-Kaliumhydrogenphosphat
0,5 g/l	Ammoniumchlorid
0,68 g/l	Magnesiumsulfat

Tabelle 5-15: Zusammensetzung der *feeding*-Lösung

Konzentration	Substanz
300 g/l	Hefeextrakt
25% (v/v)	Glycerin

### 5.2.3.2 Fermentation auf Mineralsalzmedium

Die Fermentation erfolgte nach dem etablierten Protokoll. Dazu wurden 11 Rundkolben mit je 100 ml Mineralsalzmedium (MS-Medium) befüllt. Die Zusammensetzung ist der Tabelle 5-16 und der Tabelle 5-18 zu entnehmen.

Tabelle 5-16: Zusammensetzung des Mineralsalzmediums (10-fach konzentriert)

Komponente	Konzentration [g/l]
$K_2HPO_4$	146
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	36
$(NH_4)_2SO_4$	24,6
$Na_2SO_4$	20
$(NH_4)_2H$ -Citrat	10
$NH_4Cl$	5
Spurenelemente-Lösung.	20 ml

Die Kolben wurden mit Wattestopfen verschlossen und Aluminiumfolie abgedeckt. Nach dem Autoklavieren wurde in diese Kolben die Vorkultur angesetzt. Den Rundkolben wurden 2 ml einer Glukoselösung (500 g/kg), 500 µl einer  $MgSO_4$ -Lösung (240 g/l), 50 µl von Kanamycin und 50 µl einer Thiamin Lösung (1 mg/ml) zugesetzt. Die Zusammensetzung dieser Lösungen sind der Tabelle 5-17 zu entnehmen.

Tabelle 5-17: Verwendeten sterile Stammlösungen

Komponente	Konzentration
MgSO <sub>4</sub> - Lösung	1 M
CaCl <sub>2</sub> – Lösung	1 M
Thiamin/HCl	1 mg/ml
Biotin	0,1 mg/ml
Glukose	40%
Kanamyzin-Lösung	100 mg/ml
NH <sub>4</sub> Cl	250 g/l

Den vorbereiteten Rundkolben wurden 150 µl einer Übernachtskultur zugesetzt, die Aluminiumfolie entfernt und bei 37 °C und 170 rpm für 9 h kultiviert. Anschließend wurden die Rundkolben im Zentrifugenbecher vereinigt und bei 4000 rpm, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Abfallgefäß gesammelt und autoklaviert.

Tabelle 5-18: Zusammensetzung der Spurenelemente-Lösung

Komponente	Konzentration [g/l]
Na <sub>2</sub> -EDTA	20,1
FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	16,7
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,74
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,21
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,18
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,1
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,1

Das Pellet wurde in 50 ml sterilem Leitungswasser resuspendiert und in die Inokulumflasche überführt. Bis zum Startpunkt der Fermentation wurde das Pellet auf Eis gelagert. Alle beschriebenen Prozesse wurden unter einer Laminar-Flow-Box durchgeführt.

Der Fermenter wurde während der Kultivierung der Vorkulturen zusammengebaut. Die pH-Elektrode wurde mit den entsprechenden Eichlösungen geeicht und in den Fermenter zusammen mit der Sauerstoff-Elektrode eingeschraubt. Es wurden 500 ml 10-fach MS-Medium (Tabelle

5-16) in einen 5 L Maßkolben gefüllt und mit destilliertem H<sub>2</sub>O aufgefüllt und in den Fermenter gegeben. Als Kondensationsverlust wurden dem Fermenter 100 ml destilliertes H<sub>2</sub>O zugesetzt. Alle Einfüllöffnungen wurden mit Septen verschlossen und der Fermenter bei 121 °C für 30 min autoklaviert. Anschließend wurde der Fermenter auf 37 °C abgekühlt.

Nach der Sterilisation wurden zu 100 ml einer autoklavierten MgSO<sub>4</sub>-Lösung (120 g/l) jeweils 2,5 ml Thiamin, 2,5 ml des entsprechenden Antibiotikums und 1,5 ml Antischaummittel zugegeben und diese über die Anstechgarnitur in den Fermenter gefüllt. 34 g steriles Wasser wurden zu 10 g des abgewogenen Antischaummittels Struktol J673 in einer 50 ml Flasche zugegeben. Im nächsten Schritt wurden die Schläuche für Säure (20% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), Base (25% NH<sub>3</sub>) und der Antischaumlösung an die Peristaltikpumpen angeschlossen. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 erfolgte im Fermenter. Zur Kalibrierung des pO<sub>2</sub>-Werts wurde die Begasungsrate auf 20 slpm für 10 min eingestellt. Dieser Wert entspricht einer Sauerstoffsättigung von 100% im Fermenter. Die Steuerung aller Prozesse während der Fermentation erfolgte mittels einer definierten Kaskade, die einen pO<sub>2</sub>-Wert von 30% einstellte. Diese steuerte automatisch die Rühr- und Sauerstoffbegasungs-Funktionen.

Als *feeding*-Lösung wurden 1650 g Glukosemonohydrat in einer 5 l Flasche mit einem Rührstein gefüllt und mit 560 g destilliertem Wasser versetzt. Nachdem Autoklavieren war die Glukose vollständig gelöst. Die Zugabe von 1250 µl Thiamin, 1250 µl Kanamycin, 12,5 ml MgSO<sub>4</sub>-Lösung und 250 ml des 10-fachen MS-Mediums erfolgte zur abgekühlten Lösung. Die *feeding*-Lösung wurde dann bei 4 °C bis zur Fermentation gelagert. Zum Starten der Fermentation wurde die Zellsuspension über die Anstechgarnitur in den Fermenter gefüllt. Anschließend wurde die *feeding*-Lösung auf die Waage gestellt und die *feed*-Pumpe äquilibriert, so dass die *feed*-Geschwindigkeit über ein computergesteuertes *feed*-Profil kontrolliert werden konnte.

### 5.2.3.3 Fermentation auf Mineralsalzmedium mit limitierter Stickstoffquelle

Die Vorbereitung der Vorkulturen und des Fermenter erfolgte genau wie unter 5.2.3.2 beschrieben. Jedoch wurde die Zusammensetzung des Mineralsalz-Mediums und der Spurenelemente-Lösung modifiziert (Tabelle 5-19 und Tabelle 5-20). Außerdem wurde eine Glukoselösung separat autoklaviert und dann über die Anstechgarnitur steril in den Fermenter überführt. Die Konzentration der Glukose im Fermenter betrug 15 g/l. Als *feeding*-Lösung wurde eine Ammoniumchloridlösung mit einer Konzentration von 10 g/l hergestellt. Die Steuerung des Wachstums der Zellen konnte direkt durch die Stickstoffzugabe gesteuert werden.

Tabelle 5-19: Modifiziertes Mineralsalz-Medium (10-fach konzentriert)

Komponente	Konzentration [g/l]
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	80
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20
NaCl	5

Die Zellen wurden über 15 h mit einem linear ansteigenden Gradienten der *feed*-Geschwindigkeit angezogen. Zum Startpunkt der Induktion wurde die *feed*-Geschwindigkeit gedrosselt. Dadurch sollte ein Überschuss an Ammoniumchlorid im Fermenter verhindert werden. Im Anschluss wurde wieder ein linear ansteigender Gradient eingesetzt, um den Nachschub an Ammoniumchlorid im Fermenter zu gewährleisten.

Tabelle 5-20: Modifizierte Spurenelemente-Lösung

Komponente	Konzentration
EDTA	5
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5
ZnCl <sub>2</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,05
CuSO <sub>4</sub>	0,01
pH-Wert	7,7

## 5.2.4 Allgemeine Reinigungsmethoden von Proteinen als *inclusion bodies* aus *E.coli*

### 5.2.4.1.1 *inclusion body* Präparation

Für die *inclusion body* Präparation wurden 300 g Zellmasse aus der Fermentation in 1200 ml Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4<sup>4°C</sup>) am Ultraturrax resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 300 mg Lysozym versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Zellen am Hochdruckhomogenisator in zwei Passagen á 150 sek. Es wurde darauf geachtet, dass das Homogenisat sich nicht stark erwärmte. Im Anschluss wurden den aufgeschlossenen Zellen 731 mg MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O und 10 mg DNase I,

entsprechend einer Konzentration von 3 mM MgCl<sub>2</sub> bezogen auf 1200 ml, zugesetzt, und die Mischung für 30 min bei RT inkubiert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden im Rotor JA-10 bei 10 000 rpm und 4 °C für 30 min in einer Beckman Zentrifuge zentrifugiert. Die erhaltenen Sedimente wurden im Resuspendierungspuffer bestehend aus zwei Teilen des Waschpuffers (100 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA, pH 7,4<sup>4°C</sup>) und einem Teil einer 6% Triton X-100 Lösung resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde im Rotor JLA-16.250 bei 20 000 rpm für 30 min zentrifugiert. Daran schlossen sich mindestens zwei weitere Waschschriffe mit dem Waschpuffer ohne Triton X-100 an. Die *inclusion bodies* sind im Sediment des letzten Waschschriffs enthalten und wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 5.2.4.1.2 Solubilisierung der *inclusion bodies*

Zur Solubilisierung wurden über Nacht 500 mg *inclusion bodies* in 50 ml Solubilisierungspuffer (100 mM Tris/HCl, 20 mM SDS, 1 mM EDTA, 100 mM DTT, pH 8,0<sup>20°C</sup>) gelöst. Die Solubilisierung, die Zentrifugation und die Dialyse wurden bei 20 °C durchgeführt, da sonst das in den verwendeten Puffern enthaltene SDS ausfällt. Die solubilisierten *inclusion bodies* wurden für 30 min im Rotor JA-20 in einer Beckman Zentrifuge zentrifugiert, um Aggregate und Zelltrümmer abzutrennen. Anschließend erfolgte die Abtrennung des Dithiothreitol (DTT) über eine Entsalzungssäule von GE Healthcare. Dabei wurde gleichzeitig in einen Entsalzungspuffer (50 mM Natriumphosphat, 10 mM SDS, pH 4,5) umpuffert.

#### 5.2.4.1.3 Reinigung des PTHR1 mittels Nickel-NTA-Säule

Die solubilisierten *inclusion bodies* wurden nach der Dialyse im Rotor JA-20 bei 20 °C für 30 min zentrifugiert. Beim Überstand wurde der pH-Wert auf 8,0 eingestellt. Eine Nickel-NTA-Sepharose wurde zur Vorbereitung mit Äquilibrierungs- und Waschpuffer (100 mM Natriumphosphat, 8,0 mM SDS, pH 8,0) äquilibriert. Jeweils 150 ml des Überstands wurden auf eine Ni-NTA-Sepharose HiPrep Säule von GE Healthcare aufgetragen. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Säule mit 3 Säulenvolumen des Waschpuffers, zur Abtrennung unspezifisch gebundener Proteine, gespült. Anschließend wurde PTHR1 mit Elutionspuffer (100 mM NaP, 15 mM SDS, pH 4,5) eluiert und in Fraktionen á 4 ml gesammelt. Proben des Durchlaufs, der Waschfraktion und der Elutionsfraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die einzelnen Fraktionen wurden mit einer Endkonzentration von 10 mM DTT und 50 mM Iodacetamid inkubiert. Damit wurden alle Cysteine und Disulfidbrücken reduziert und

durch das Iodacetamid alkyliert und somit blockiert. Im letzten Schritt erfolgte die Konzentrationsbestimmung durch Messung der Absorptionsspektren.

## 5.2.5 Renaturierung von rekombinanten Proteinen aus *inclusion bodies*

### 5.2.5.1 Renaturierung des PTHR1

Die Rückfaltung des PTHR1 erfolgte *in vitro* durch eine pulsartige Verdünnung in den Rückfaltungspuffer pH 8,5<sup>20°C</sup> (Tabelle 5-21). Bei der Rückfaltung wurde im Abstand von jeweils 6 h 4-mal ein definiertes Volumen der gereinigten PTHR1 Fraktion in den Rückfaltungspuffer getropft (Pulsmethode). Die Proteinendkonzentration von 100 µg/ml nicht durfte nicht überschritten werden. Pro Puls erfolgte die Zugabe von maximal 25 µg/ml PTHR1-Lösung. Das β-Methyl-Cyclodextrin wurde verwendet, um das SDS im Rückfaltungsansatz zu binden. Zur Stabilisierung des PTHR1 wurde ein Gemisch der Detergenzien (Tabelle 5-22) zugesetzt. Diese Substanzen wurden von Anatrace (USA) bezogen.

Tabelle 5-21: Zusammensetzung des Rückfaltungspuffers

Substanz	Konzentration
Tris/HCl	100 mM
L-Argininhydrochlorid	1 M
EDTA	1 mM
Methyl-β-Cyclodextrin	20 mM
Glutathion reduziert	5 mM
Glutathion oxidiert	1 mM

Die Zugabe von reduziertem und oxidiertem Glutathion gewährleistet, dass alle vorhandenen Cysteine des Rezeptors reduziert vorliegen, und dass eine Isomerisierung der Disulfidbrücken während der Faltung stattfinden kann. Die Faltung erfolgte bei RT, da sonst das SDS unterhalb von 10 °C ausfällt. Nach dem vierten Puls wurde der Rückfaltungsansatz für weitere 24 h bei RT inkubiert.

Tabelle 5-22: Zusammensetzung des *triple-detergent*-Mix

Detergens	Konzentration	Molare Konzentration (mM)
DDM	0,1% (w/v)	2
Cholesterinhemisuccinat	0,1% (w/v)	1,6
CHAPS	0,5% (w/v)	8

Anschließend wurde für 24 h gegen den Dialysepuffer (100 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) DDM, 0,1% (w/v) Cholesterinhemisuccinat und 0,5% (w/v) CHAPS, pH 7,4) dialysiert. Nach der Detergens-Optimierung wurde einzig 0,1% DDM zur Rückfaltung und zur anschließenden Dialyse verwendet, um den PTHR1 zu stabilisieren.

### 5.2.5.2 Detergens-Optimierung

Aufgrund von Problemen mit der Stabilität des PTHR1 wurde eine Detergens-Optimierung durchgeführt. Dabei wurde das Eluat des PTHR1 von der Ni-NTA-Sepharose in einen Puffer (NaP, pH 7,4) in Kristallisationsplatten pipettiert. In dem entsprechenden Reservoir befand sich jeweils ein Detergens aus dem Hampton Membranprotein Detergensscreen. Durch verdünnen in das Reservoir wird die CMC des SDS unterschritten und der Rezeptor präzipitiert. Dies kann sehr leicht mittels eines Lichtmikroskops beobachtet werden. Ein geeignetes Detergens verhindert diesen Vorgang und stabilisiert den Rezeptor in Lösung. Getestet wurden 75 Detergenzien, die besonders für Membranproteine geeignet sind.

## 5.3 Methoden zur proteinchemischen Charakterisierung

### 5.3.1 Ankonzentrierung des renaturierten PTHR1

Die Ankonzentrierung erfolgte in den Zentrifugationsröhrchen von Amicon. Die Zentrifugation wurde bei den zulässigen Geschwindigkeiten jeweils für 1 min durchgeführt. Im nächsten Arbeitsschritt wurde das Konzentrat vorsichtig mit einer Glaspipette durchmischt und die Membran im Zentrifugationsröhrchen umspült. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt bis das Konzentrat ein Volumen von 1,0 ml hatte.

### 5.3.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Titrationskalorimetrie ist eine Methode zur Bestimmung der Wärmemenge, die bei der Interaktion von Molekülen absorbiert oder freigesetzt wird. Die isotherme Titrationskalorimetrie wird besonders zur Bindungsstudie von RNA-Protein, Protein-Protein, Substrat-Protein oder Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen verwendet. Für die ITC-Messungen wurde ein MicroCal Titrationskalorimeter (MicroCal, Inc, Northampton, MA, USA) verwendet. Zu jeder Einzelmessung wurde eine Titration des Liganden in den verwendeten Puffer als Referenzmessung abgezogen. Zur Reduktion von Pufferinterferenzen wurden alle Proteine in ITC-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0<sup>@ 4°C</sup>, 100 mM NaCl) für mindestens 12 h dialysiert. Die Messzelle (V = 1,4436 ml) enthielt eine entgaste Lösung von 30 µM nPTHr1 (10-fach oberhalb der Dissoziationskonstante). Dazu erfolgten 28 Einzelinjektion á 10 µl einer 300 µM PTH Lösung in einem Zeitintervall von 5 min durch eine computergesteuerte 300 µl Spritze. Die Titration erfolgte bei einer konstanten Rührgeschwindigkeit von 305 rpm und einer Messtemperatur von 20°C. Die erhaltenen Flächenintegrale wurden mit der zugehörigen ORIGIN Software (MicroCal Software, Northampton, MA, USA) analysiert. Die Daten wurden einem *one set of sites* Bindungsmodell angepasst. Aus den erhalten Werten konnte die Assoziationskonstante (K<sub>A</sub>), die Enthalpie (H) und die Stöchiometrie (N) der Bindung errechnet werden. Abschließend wurde das Gerät mit 0,5% Extranlösung und einem Liter destilliertem Wasser gespült.

### 5.3.3 Circular dichroismus

Circular dichroismus nutzt die Wechselwirkung optisch aktiver Substanzen mit polarisiertem Licht. Die Lichtgeschwindigkeit ist dabei für links- oder rechtsgerichtetes zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich, so dass eine Polarisationskomponente beim Durchlaufen der Probe verzögert auftritt. Somit wird die Polarisationssebene bei linear polarisiertem Licht durch eine optisch aktive Substanz gedreht. Bei der CD-Spektroskopie wird zusätzlich die unterschiedliche Absorption der links- und rechts-zirkular polarisierten Komponente ausgenutzt und in Abhängigkeit von der Wellenlänge analysiert.

Formel 2

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$$

Die Differenz der unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten (Formel 2) wird gemessen und als Ellipzität (Θ) (Formel 3) angegeben.

Formel 3 Ellipzität

$$\Theta(\lambda) = \text{const.}(\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d$$

Der mizelläre PTHR1 wurde über eine Superdex S-200 Säule in den Messpuffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, 0,1% DDM, pH 7,4) umgepuffert. Die Parameter zu Aufnahmen der Spektren sind in Tabelle 5-23 aufgeführt.

Tabelle 5-23: Parameter für die CD-Spektroskopie Messung

<i>sensitivity</i>	<b>Standard (100 mdeg)</b>
<i>start</i>	260 nm
<i>end</i>	190 nm
<i>data pitch</i>	1 nm
<i>scanning mode</i>	<i>continuous</i>
<i>scanning speed</i>	50 nm/min
<i>response</i>	1 sek
<i>band width</i>	1 nm
<i>accumulation</i>	20

Der PTHR1-SDS-Komplex konnte im Elutionspuffer der Ni-NTA-Sepharose 5.2.4.1.3 vermessen werden. Die Probe wurde für 1 h bei 10.400 g und 10 °C zentrifugiert und die Konzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Anschließend wurden die Spektren mit folgenden Parametern (Tabelle 5-23) in einer 1 cm<sup>2</sup> Quarzküvette aufgezeichnet. Die Spektren wurden dreifach akkumuliert.

### 5.3.4 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopie ist eine hochempfindliche Methode und eignet sich hervorragend zum Studium von Proteinen. Die intrinsische Fluoreszenz ist eine sensitive Sonde für konformationelle Änderungen im Protein. Meistens wird diese Technik jedoch verwendet, um thermodynamische und kinetische Daten von Proteinen zu erhalten. Die Anforderungen an das Protein zur Betrachtung von Fluoreszenz ist das Vorkommen von Fluorophoren. Bei Proteinen sind dies überwiegend die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin.

Fluoreszenz entsteht durch Anregung von Fluorophoren einer Protein-Probe mit einer definierten Wellenlänge. Durch Absorption gehen die Elektronen von einem Singulett Grundzustand auf einen angeregten Singulett Zustand über. Die freiwerdende Energie bei der Relaxation auf den Singulett Grundzustand wird als Fluoreszenz beobachtet.

Die Fluoreszenzmessungen wurden am Fluoromax-3 Spektrofluorimeter mit Spaltbreiten von 1 nm des Anregungsstrahls bzw. 5 nm des Emissionsstrahls durchgeführt. Die Zeitkonstante bei den Messungen betrug 0,2 sek. Die verwendete Proteinkonzentration ist in den entsprechenden Legenden angegeben. Bei allen Messungen wurde ein Puffer bestehend aus 100 mM NaP, 0,1% DDM, 1 M L-Arginin, pH 7,4 verwendet. Die erhaltenen Emissionsspektren sind um den Pufferbeitrag korrigiert.

#### 5.3.4.1 Thermische Entfaltung des PTHR1

Die Spektren wurden in einer 300 µl Quarzküvette aufgenommen. Dabei wurde eine Temperaturrampe von 15 bis 80 °C in 0,5 °C Schritten gefahren. Eingangs erfolgte die Bestimmung der größten Amplitude. Dazu wurden Einzelspektren bei 15 °C und 80 °C aufgenommen. Im nächsten Schritt erfolgte die Messung bei einer Anregungswellenlänge von 275 nm und die Detektion erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 328 nm. Bei jedem Temperaturschritt wurden 60 Einzelspektren aufgenommen. Bei allen Messungen wurde ein Puffer bestehend aus 100 mM NaP, 0,1% DDM, 1 M L-Arginin, pH 7,4 verwendet. Die erhaltenen Emissionsspektren sind um den Pufferbeitrag korrigiert.

## 5.4 Rekonstitution von Membranproteinen in künstliche Membransysteme

### 5.4.1 Rekonstitution in Liposomen

#### 5.4.1.1 Liposomen-Präparation

Die Liposomen-Präparation erfolgte durch Extrusion in einem Handextruder. Dabei wurden Volumina von 1 ml durch eine Polycarbonat-Membran mit unterschiedlichen Porengrößen gepresst. Eine Äquilibrierung des Extruders erfolgte mit 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4. Das Lipid-Puffer-Gemisch wurde zehnmal durch die Polycarbonat-Membranen gepresst

und wieder aufgefangen. Die Lipidkonzentration betrug 20 mg/ml und wurde im Anschluss daran auf 5 mg/ml verdünnt.

#### 5.4.1.2 Probenvorbereitung für das Elektronenmikroskop

Zur Bestimmung und Charakterisierung der hergestellten Liposomen wurden Proben für das Elektronenmikroskop präpariert. Hierfür wurden Kupferplättchen (*grids*) mit den Porengrößen von 200 und 400 *mesh* verwendet. Die verwendeten *grids* waren mit einem Kohlefilm beschichtet. 1 µl der Liposomensuspension wurde auf ein *grid* aufgetragen und für 1 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe seitlich mit Filterpapier abgesaugt ohne das *grid* dabei direkt zu berühren. Nach einer kurzen Trocknungsphase wurde auf das *grid* 2 µl einer 0,1% Uranylazetatlösung pipettiert und für 3 min inkubiert. Abschließend wurde das *grid* dreimal mit 5 µl destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet.

#### 5.4.1.3 Partikelgrößenbestimmung durch Zetasizer

Die Photonenkorrelationsspektroskopie wird zur Partikelgrößenbestimmung verwendet. Partikel besitzen aufgrund ihrer Größe und in Abhängigkeit von der Brownschen Molekularbewegung eine bestimmte Sedimentationsgeschwindigkeit. Im Zetasizer wird Licht in eine Probe und eine Referenzzelle gestrahlt. Trifft eingestrahktes Licht auf einen Partikel wird es gestreut. Wird die Probe vom Licht eines Lasers durchstrahlt, streuen die in der Lösung befindlichen Partikel das Licht unterschiedlich stark und in unterschiedliche Richtungen. Diese Streuung wird von einem Photomultiplier, der sich in einem bestimmten Winkel zum eingestrahkten Licht befindet, in sehr kurzer Zeit immer wieder detektiert. Durch die Veränderung in der Lichtintensität ist eine Aussage über die Partikelgrößenverteilung in der Lösung möglich. Große Partikel bewegen sich langsam, somit bleibt die Lichtintensität über einen längeren Zeitraum konstant. Kleine Partikel bewegen sich schneller, somit wird eine ständige Änderung der Lichtintensität detektiert. Bei bekannter Viskosität der Lösung kann eine Aussage über die Größe eines Partikels, aufgrund seiner Diffusionsgeschwindigkeit und Verweildauer im Lichtstrahl getroffen werden. Hergestellte Liposomen wurden auf 2,5 mg/ml verdünnt bzw. bis die Absorption  $A_{280\text{ nm}} < 0,7$  war. Die Lösung zeigte eine leichte Opaleszenz. Im nächsten Schritt folgte die Messung am Zetasizer in einer 4 ml Quarzküvette. Die gemessenen Werte wurden vom Zetasizer automatisch graphisch dargestellt und zeigten eine Gauß-Verteilung der Partikelgröße.

#### 5.4.1.4 Herstellung von Proteoliposomen

Zur Herstellung von großen unilamellaren Liposomen (LUV) wurde ein manueller Extruder der Firma Avensis mit zwei 1 ml Hamiltonspritzen verwendet. Zwischen zwei Plastikhülsen wurde eine Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von 400 nm eingespannt. Anschließend wurde der gesamte Extruder mit 1 ml Rekonstitutionspuffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4) äquilibriert und der Puffer verworfen. Im nächsten Arbeitsschritt wurde 1 ml eines Lipid-Gemischs mit einer Lipidkonzentration von 20 mg/ml in zwanzig Passagen durch die Membran gepresst, dadurch entstanden einheitliche Vesikel. Die Lipidlösung wurde im Verhältnis 1:4 mit Rekonstitutionspuffer verdünnt.

Diese Vesikellösung wurde mit dem Detergens Triton X-100 zur Rekonstitution vorbereitet. Dabei wurde die Absorption bei 540 nm detektiert. Durch die Zugabe von Triton X-100, das in die Liposomen eingebaut wurde, stieg die Absorption an, bis eine Sättigung der Liposomen erreicht wurde. Dieser Wert der Lichtstreuung wurde gleich 100% gesetzt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von Detergens zur Solubilisierung des Liposomen. Es wurde soviel Detergens zugegeben bis ein Absorptionswert erreicht wurde, der 65 bis 85% des ursprünglichen Lichtstreusignals entsprach. Im Umkehrschluss entsprach dies einer Solubilisierung der Liposomen von 45 bis 15%.

Im Anschluss wurde 1 ml der Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml tropfenweise, unter schütteln dazu gegeben und für 15 min bei RT inkubiert.

Währendessen wurden die BioBeads auf ein Filterpapier gegeben, um den Überschuss an Wasser zu entfernen. Eine definierte Menge wurde davon in ein Reaktionsgefäß abgewogen. Insgesamt wurden, wenn anders nicht vermerkt, 1080 mg BioBeads pro Ansatz dazu gegeben. Dabei wurde folgendes Inkubationsmuster dargestellt in Tabelle 6-5 streng eingehalten.

Durch die BioBeads wurde sowohl das Detergens Triton X-100, als auch das sich im Renaturierungspuffer befindende Detergens DDM spezifisch adsorbiert und entfernt. Ein wichtiges Kriterium dabei war, dass die Trübung der Lösung wieder zunahm und die Opaleszenz der enthaltenen Proteoliposomen zu sehen war. Die komplette Lösung wurde in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert wodurch die Proteoliposomen sedimentieren. Das erhaltene Pellet wurde dreimal mit dem Rekonstitutionspuffer gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in Rekonstitutionspuffer aufgenommen, so dass eine finale theoretische Lipidkonzentration von 60 mg/ml entstand. Diese Proteoliposomen wurden bei 4 °C maximal eine Woche gelagert.

#### 5.4.1.5 Gefrierbruchaufnahmen von Proteoliposomen

Die Gefrierbruchtechnik wird genutzt, um Transmembranproteine in Zellen oder jeglicher Art von Lipiddoppelschichten nachzuweisen. Dazu wurde 1 µl einer Rekonstitutionsprobe zwischen zwei Kupferplatten aufgetragen. Dieses entstehende Sandwich wurde dann in einem flüssigen Ethanbad bei  $-183\text{ °C}$  schockgefroren. Das Ethanbad befand sich wiederum in einer Stickstoffgekühlten Wanne, so dass das Ethan nahe seiner Schmelztemperatur gehalten wurde. Durch das Verwenden von Ethan wurde ebenfalls die Eiskristallbildung des Pufferwassers minimiert. Die Proben wurden in einem Gefrierbruchgerät platziert und in ein Hochvakuum ( $1,0 \times 10^{-7} - 10^{-8}$ ) überführt. Eine vorgespannte Feder riss die beiden Kupferplatten auseinander. Sofort wurde auf die Probe in einem  $45^\circ$  Winkel eine 3 mm dünne Platinschicht aufgetragen. Die Platinkathodenspannung betrug dabei 1,58 kV bei 58 mA. Zur Stabilisierung der Proben wurde nachträglich in einem  $90^\circ$  Winkel zusätzlich eine 20 mm dicke Kohlenstoffschicht aufgetragen. Die Kohlenstoffkathodenspannung betrug dabei 1,89 kV bei 89 mA. Jegliches organische Material der Proben wurde durch  $\text{CrH}_2\text{SO}_4$  über Nacht abgebaut. Da Chrom aber im Elektronenmikroskop ein Signal produziert, wurden die Proben fünfmal in destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend erfolgte die Aufnahme der elektronenmikroskopischen Bilder.

#### 5.4.1.6 Saccharose-Gradienten-Flotation (SGF)

Die SGF wurde in einer Tischzentrifuge von Eppendorf durchgeführt. Die Saccharose wurde in unterschiedlichen Konzentrationen einem 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4 zugesetzt. 100 µl der Rekonstitutionsprobe wurden mit 100 µl einer 2,5 M Saccharose-Lösung gemischt. Dieses Gemisch wurde mit 800 µl 1 M Saccharose-Lösung und abschließend mit 100 µl 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4 überschichtet. Die Flotationsansätze wurden für 1 h bei 16 000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Aufgrund der geringeren Dichte der Liposomen, im Vergleich zur Saccharose, flotierten diese in die Pufferschicht. Ein rhodamin-markiertes Lipid diente zum optischen Nachweis der Flotation der Liposomen in die Pufferschicht. Im Anschluss erfolgte das stufenweise Abtragen des Saccharose-Gradienten in vier Fraktionen. In der obersten Schicht (Natriumphosphatpuffer) waren die Liposomen enthalten. Die Pufferschicht grenzte sich deutlich gegen die Saccharose-Gradientenschicht ab, so dass diese Schicht einfach abgenommen werden konnte. Von der nächsten Schicht im Saccharose-Gradienten wurden 500 µl abgenommen. Die verbleibende Lösung des Gradienten wurde in 2 Fraktionen á 500 µl aufgeteilt und gesammelt.

## 5.5 Ligandenbindungsexperimente

### 5.5.1 *Pulldown*-Assay

Eine spezifische Interaktion zwischen Proteinen kann mit Hilfe der *pulldown*-Methode nachgewiesen werden. Basierend auf einer spezifischen Affinität eines Zielmoleküls zu seinem Interaktionspartner erfolgt seine Isolierung und Reinigung. Der Ligand PTH (1-37) verfügt am C-terminalen Ende über ein Cystein. Darüber erfolgte die Kopplung an Maleimid-PEG<sub>11</sub>-Biotin. Das Biotin besitzt einen PEG<sub>11</sub>-linker damit eine räumliche Beweglichkeit des Liganden erhalten bleibt. Das Biotin Reagenz wurde im Überschuss zum Liganden zugesetzt und für 1 h inkubiert. Danach erfolgte eine Dialyse über Nacht in einen Dialysepuffer (100 mM NaP, pH 7.4, 150 mM NaCl). Die Dialysemembran hatte eine Ausschlussgröße von 1000 Dalton. Das Molekulargewicht des freien Biotins ist ca. 840 Dalton und kann dadurch die Dialysemembran passieren, das PTH-Biotin mit einer Größe von ca. 5000 Da hingegen nicht. Nach der Dialyse wurde ein Verhältnis von PTH-Biotin von 1:1 gemessen. Im Anschluss erfolgte die Kopplung an *magnetic beads*, die mit einer Streptavidin-Matrix überzogenen waren. Die *magnetic beads* waren zuvor dreimal in einem Äquilibrierungspuffer (100 mM NaP, pH 7.4, 150 mM NaCl) gewaschen worden. Nach einer 30 min Inkubation mit dem PTH-Biotin wurde erneut mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde PTHR1 sowohl im mizellären Zustand, als auch rekonstituiert in Liposomen für 1 h bei RT inkubiert. Die *magnetic beads* wurden mit einem Magneten an den Seitenrand der Reaktionsgefäße gezogen. Der Überstand wurde abgenommen und eine Probe für eine SDS-PAGE entnommen. Die *magnetic beads* wurden insgesamt 10-mal mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen und Proben vom ersten, fünften und zehnten Waschschrift entnommen. Die gewaschenen *magnetic beads* wurden dann komplett, wie die anderen Proben in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen und bei RT über Nacht inkubiert. Von allen Proben wurden 20 µl auf eine SDS-PAGE aufgetragen und mittels Silberfärbung analysiert (5.2.1.2). Der verwendete Proteinmarker (PM) war von Fermentas, Katalog Nr. 25514.

### 5.5.2 Radioliganden Bindungsassay

Im ersten Schritt erfolgte die Berechnung des benötigten Liganden in Abhängigkeit zum Referenztag und der benötigten Konzentration

### 5.5.2.1 Berechnung des eingesetzten Liganden

Tabelle 5-24: Zerfallsfaktor des radioaktiven Elements Iod-125 zu einem Referenztag.

Tage	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
0	1,000	0,977	0,955	0,933	0,912	0,891	0,871	0,851	0,831	0,812
20	0,794	0,776	<b>0,758</b>	0,741	0,724	0,707	0,691	0,675	0,660	0,645
40	0,630	0,616	0,602	0,588	0,574	0,561	0,548	0,536	0,524	0,512
60	0,500	0,489	0,477	0,467	0,456	0,445	0,435	0,425	0,416	0,406

Die korrekte radioaktive Konzentration wurde zum Referenztag ermittelt. Erfolgte die Verwendung vor dem Referenztag wurde durch den Zerfallsfaktor dividiert. Erfolgte die Verwendung nach dem Referenztag wurde mit dem Zerfallsfaktor multipliziert.

Beispielrechnung des markierten Liganden zur Verwendung im Radioliganden Bindungstest:

$$\begin{aligned} \text{Molarität des I}^{125} \text{ markierten Liganden} &= \frac{\text{Radiochemische Konzentration}}{\text{spezifische Aktivität}} = \frac{50 \mu\text{Ci/ml}}{2.2 \mu\text{Ci/pmol}} \\ &= 22,72 \text{ nM} \end{aligned}$$

$$X = \text{Molarität des I}^{125} \text{ markierten Liganden:Zerfallsfaktor}_{(\text{Tag} - 24)} = \frac{22,72 \text{ nM}}{0,758} = 29,97 \text{ nM}$$

$$\text{Benötigte Verdünnung} = \frac{X}{\text{Radioliganden Konzentration}} = \frac{29,97 \text{ nM}}{1,5 \text{ nM}} = 19,98$$

Anzahl der Probenröhrchen im Versuch: z.B. 12

50 µl einer 4-fachen Molarität (1,5 nM) des I<sup>125</sup> markierten Liganden wurden in die Probenröhrchen pipettiert, um eine Endkonzentration von 375 pM in einem Endvolumen von 200 µl zu erreichen.

Endvolumen von 1,5 nM  
I<sup>125</sup> markierten Liganden = 50 µl multipliziert mit der  
Anzahl der Proben z.B. 12

Endvolumen von 1,5 nM  
I<sup>125</sup> markierten Liganden = 600 (ohne Pipettierfehler)

Endvolumen von 1,5 nM  
I<sup>125</sup> markierten Liganden = 800 (inklusive Pipettierfehler)

$$\text{Menge des I}^{125} \text{ markierten Ligand} = \frac{\text{Benötigte Menge an 1,5 nM I}^{125} \text{ markierten Ligand}}{\text{Benötigte Verdünnung}} = \frac{800 \mu\text{l}}{19,98 \text{ nM}}$$

$$\text{Menge des I}^{125} \text{ markierten Ligand} = 40 \mu\text{l (gerundeter voller Wert)}$$

Volumen an Puffer = Endvolumen für Versuch – Menge des Liganden

$$\text{Volumen an Puffer} = 800 \mu\text{l} - 40 \mu\text{l} = 760 \mu\text{l}$$

Am Tag 24 vor dem Referenztag, mussten 40 µl des Radioliganden zu 760 µl Puffer pipettiert werden, um eine radiochemische Konzentration von 1,5 nM zu erhalten.

### 5.5.2.2 Durchführung des radioliganden Bindungsassay

Bei den Messungen wurde der unmarkierte Ligand PTH mit einer Konzentration von 1 µM im Bindungspuffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,3% Milchpulver, 0,005% Bazitrazin, pH 7,5) gelöst. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden 50 µl des unmarkierten Liganden im Bindungspuffer in jeweils drei Proberöhrchen pipettiert. Die Gesamtbindung wurde ermittelt, indem anstelle von Ligand nur Puffer in den Proberöhrchen vorgelegt wurde. Da der Ligand, hier das Parathormon, sehr unspezifisch an alle Plastikoberflächen bindet, wurden die verwendeten Röhrchen und Pipettenspitzen vorher silikonisiert.

Im Radioaktiv-Labor wurde zum Schutz hinter einer Pyrexschirm gearbeitet und alle Gefäße mit Blei abgeschirmt. Die berechnete Menge an radioaktiven PTH wurde in ein Greinerröhrchen mit Bindungspuffer verdünnt und davon direkt 50 µl in jedes Proberöhrchen pipettiert. Anschließend wurden 100 µl der Proteoliposomen jedem Proberöhrchen zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Im Konkurrenzexperiment wurde dieser inkubierte Ansatz aus PTHR1-Proteoliposomen und radioaktiven PTH im Anschluss zu 100 µl einer HEK293-Zellsuspension gegeben und inkubiert. Gleichzeitig wurden 200 µl einer 1% Milchpulverlösung (100 mM NaP, pH 7,5) in eine 96-Loch-Filterplatte (Millipore Multiscreen 96-well plate, 0,45 µm Porengröße, hydrophile PVDF Filter, Fisher cat. Nr. FDR-547-035L) gegeben, um die unspezifischen Wechselwirkung zu minimieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Blockierungspuffer mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Danach wurden die Proben aus der 96-Lochplatte auf die vorbereitete 96-Filter-Lochplatte übertragen und der Überstand durch die Filter nach unten abgesaugt. Anschließend wurde dreimal mit kaltem Bindungspuffer gewaschen. Nach dem Abtrennen der Plastikhülsen wurden die 96-Filter-Lochplatten 10 min getrocknet. Die ca. 2-3 cm großen Filter wurden mit einem Spritzenstempel aus der 96-Filter-Lochplatte direkt in Szintillationsröhrchen gestanzt und unmittelbar im  $\gamma$ -Zähler die cpm bestimmt.

### **5.5.3 Komplexisolierung der PTHR1-Proteoliposomen/ PTH-ECFP mittels Gelfiltration**

Bei der Gelfiltrationschromatographie werden Moleküle aufgrund ihrer Größe beim Durchfließen eines porösen Mediums aufgetrennt. Dabei ist das Medium so beschaffen, dass keine spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Medium und den Molekülen auftreten, die das Laufverhalten der Moleküle beeinflussen.

Die Säule (16 mm x 20 cm) wurde mit Sephacryl S-200 HR gepackt. Die Trennleistung der Säule wurde mit Aceton überprüft. Auf diese Weise kann die theoretische Bodenzahl (N) und der Symmetriefaktor ( $A_s$ ) berechnet werden. Für die Säule, die globuläre Proteine mit einer relativen Molekülmasse von  $5 \cdot 10^3$ -  $2,5 \cdot 10^5$  Da trennen kann, wurde vom Hersteller mit einer theoretischen Bodenzahl von  $N = 5000/m$  und ein Symmetriefaktor von 0,8-1,5 angegeben. Für die verwendete Säule wurde eine theoretische Bodenzahl von  $N = 5780/m$  und ein Symmetriefaktor von  $A_s = 1$  bestimmt.

### 5.5.4 Bildung des Komplexes aus PTHR1-Proteoliposomen/ PTH-ECFP

Die Isolierung eines Komplexes zwischen zwei Proteinen mit hoher Affinität kann mittels Gelfiltration vorgenommen werden. Die PTHR1-Proteoliposomen wurden mit PTH-ECFP für 10 min bei 4° C inkubiert und auf eine Gelfiltrationssäule (Sephacryl S-200 HR) aufgetragen. Die Zusammensetzung ist der Tabelle 5-25 zu entnehmen. Das aufgetragene Probevolumen betrug 800 µl in einem Gelfiltrationspuffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die Absorption wurde bei den entsprechenden analytischen Wellenlängen detektiert. Das Streulichtsignal der eingesetzten Liposomen konnte bei 280 nm detektiert werden und nimmt mit ansteigender Wellenlänge ab. PTH-ECFP absorbiert spezifisch bei einer Wellenlängen von 280 und 439 nm. Die beobachteten Peaks wurden in Fraktionen á 1 ml gesammelt und am Beckman Spektrometer DU 540 analysiert.

Tabelle 5-25: Bildung des Komplexes aus PTHR1-Proteoliposomen und PTH-ECFP

Substanz	Konzentration
PTH-ECFP	1 µM
PTHR1-Proteoliposomen	3,8 µM
Puffer	<i>ad.</i> 800 µl

Zur Bestätigung einer spezifischen Wechselwirkung von PTH-ECFP mit den PTHR1-Proteoliposomen wurde GLP-ECFP in der gleichen Konzentration wie das PTH-ECFP als Negativkontrolle eingesetzt. Die Analyse erfolgte genau auf die gleiche Weise wie unter 5.5.4 beschrieben. Des Weiteren wurde dem PTHR1-Proteoliposomen und PTH-ECFP Ansatz TCEP zugesetzt und der entsprechende Ansatz auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen (Tabelle 5-26).

Tabelle 5-26: Inhibierung des Komplexes aus PTHR1-Proteoliposomen und PTH-ECFP

Substanz	Endkonzentration
PTH-ECFP (GLP-ECFP)	1 µM
PTHR1-Proteoliposomen	3,8 µM
TCEP	10 mM
Puffer	<i>ad.</i> 800 µl

### **5.5.5 Analyse des isolierten Komplexes aus PTHR1-Proteoliposomen/ PTH-ECFP**

Die Analyse der gesammelten Fraktion wurde an einem Beckman Spektrometer DU 540 durchgeführt. Dazu wurden Spektren über den Wellenlängenbereich von 250 – 500 nm von den mittels Gelfiltration isolierten Fraktionen aufgezeichnet. Zur Verbesserung der spektralen Analyse wurde der enthaltene Streulichtanteil mit Messwerten im Bereich von 360 bis 380 nm und 480 bis 500 nm, somit außerhalb der spezifischen Absorptionswellenlänge von ECFP, linear extrapoliert. Ein Vergleich der Spektren des berechneten Signals mit dem Streulichtsignal von Liposomen ergab keine Unterschiede, so dass dieses Vorgehen auf die Messungen mit den PTHR1-Proteoliposomen übertragen wurde. Die erhaltene Gerade und die kalkulierten Zahlenwerte im Bereich von 360 bis 500 nm wurden von der in diesem Bereich gemessenen Absorption subtrahiert. Auf diese Weise konnte die spezifische Absorption des PTH-ECFP in einem Wellenlängenbereich zwischen 430 und 450 nm ermittelt werden. Aus der spezifischen Absorption des ECFP bei 433 nm wurde die PTH-ECFP Konzentration berechnet, die im Komplex mit den PTHR1-Proteoliposomen eluiert. Die Bestimmung der PTH-ECFP Konzentration wurde aus vier unabhängigen Experimenten vorgenommen.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Parathormon-Rezeptor (PTHR1)

#### 6.1.1 Fermentation des Parathormon-Rezeptors

Zur Fermentation des PTHR1 im Vollmedium wurde das Konstrukt des PTHR1 in pET 41b Vektor kloniert und im *E.coli*-Stamm BL21c<sup>+</sup> RIL transformiert. Der pET 41b Vektor addiert C-terminal acht Histidine an die klonierte Sequenz des PTHR1. Der verwendete *E.coli*-Stamm ist Träger eines Zusatzplasmids. Auf diesem Plasmid sind tRNAs kodiert, die in *E.coli* selten verwendet werden (Tabelle 5-3). Damit wird das Problem eines *codon usage*<sup>4</sup> minimiert, dass durch prokaryotische Expression eines eukaryotischen, hier humanen Proteins entsteht.

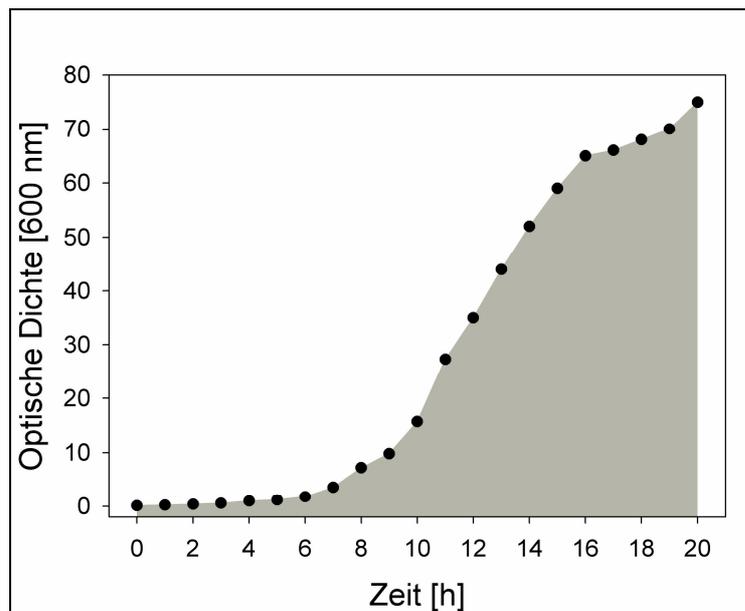
Bei den Fermentationen auf Mineralsalzmedium wurde der *E.coli*-Stamm BL21 verwendet, da dessen Adaption auf ein Mineralsalzmedium ist weitaus unproblematischer als vergleichsweise BL21c<sup>+</sup>. Allerdings könnte das Fehlen des Zusatzplasmids, eine reduzierte Proteinproduktion bewirken. Die Folgen sind, dass die Ausbeute an Protein bei gleicher Prozessdauer geringer ausfallen. Die unterschiedlichen Ausbeuten des jeweiligen Fermentationsprozesses sind in Tabelle 6-1 gegenübergestellt.

Tabelle 6-1: Übersicht der unterschiedlichen Prozessführungen.

Fermentationsart	Prozessdauer	Biofeuchtmasse	Stamm	Adaptation Vorkulturen
Hefeextrakt	13 h	1,6 kg	BL 21 c <sup>+</sup> RIL	nein
Mineralsalzmedium	19 h	1,7 kg	BL 21	ja
<sup>15</sup> N-Markierung	20 h	98,8 g	BL 21	ja

<sup>4</sup> 64 Triplets kodieren für 20 Aminosäuren. In der Regel kodieren mehrere Basen-Triplets für gleiche Aminosäuren. Codon usage ist eine artspezifische bevorzugte Verwendung bestimmter Basen-Triplets für eine Aminosäure.

## 6.1.1.1 Fermentation auf Vollmedium mit Hefeextrakt

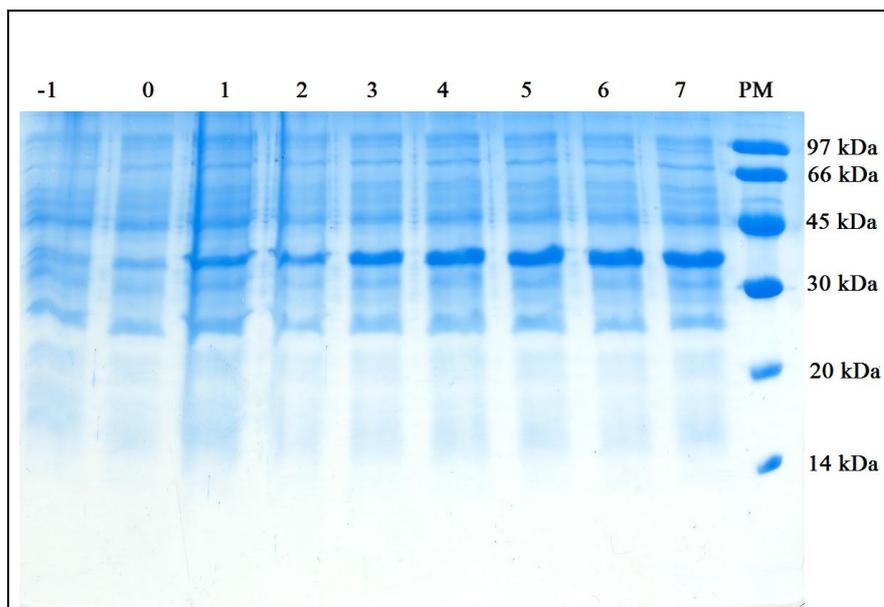


**Abbildung 6-1: Schematischer Fermentationsverlauf des PTHR1 auf Vollmedium.** Dokumentation des Zellwachstums bei einer optischen Dichte von 600 nm ( $OD_{600}$ ) aufgetragen gegen die Zeit. Die Fermentation erfolgte auf Vollmedium im *fed-batch*-Verfahren. Im Startmedium war eine Glukosekonzentration von 5 g/l vorhanden. Der Verbrauch an Glukose wurde mit einer Glukoselösung (10 g/l) kompensiert. Im Fermenter betrug der Sauerstoffpartialdruck 30%, reguliert durch die Luftzufuhr und der Rührerdrehzahl. Nach 15 h wurde eine  $OD_{600}$  von 70 erreicht und es erfolgte die Induktion der Proteinproduktion durch die Zugabe von 1 mM IPTG. Nach fünfständiger Induktion wurde der Fermentationsprozess beendet.

Die Fermentation des PTHR1 startete bei niedriger optischer Dichte ( $OD_{600}$ ) aus einer Übernachtskultur. In **Abbildung 6-1** ist der Fermentationsverlauf schematisch dargestellt. Die Zellen wuchsen sichtbar nach ca. 8 h an.

Die Glukosekonzentration im Fermenter wurde mit einem Farbindikator in den stündlich entnommenen Fermentationsproben bestimmt. Fiel die Glukosekonzentration unter 1 mM wurde mit einer *feeding*-Lösung wieder Glukose zugeführt. Glukose wurde durch eine *feeding*-Lösung mit einer Fütterungsgeschwindigkeit (*feed-rate*) von 80 g/h zugeführt. Ab einer  $OD_{600}$  größer 70 wurde die rekombinante Proteinproduktion durch die Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert und nach 4 h wurde der Fermentationsprozess beendet. Abschließend wurden die Zellen im Rotor JLA-8.1000 Beckman bei 4000 rpm, 4°C, 20 min geerntet.

Die Gesamtzellausbeute betrug durchschnittlich 1,6 kg Zellmasse (Feuchtgewicht) nach 13 h Fermentationsprozess.

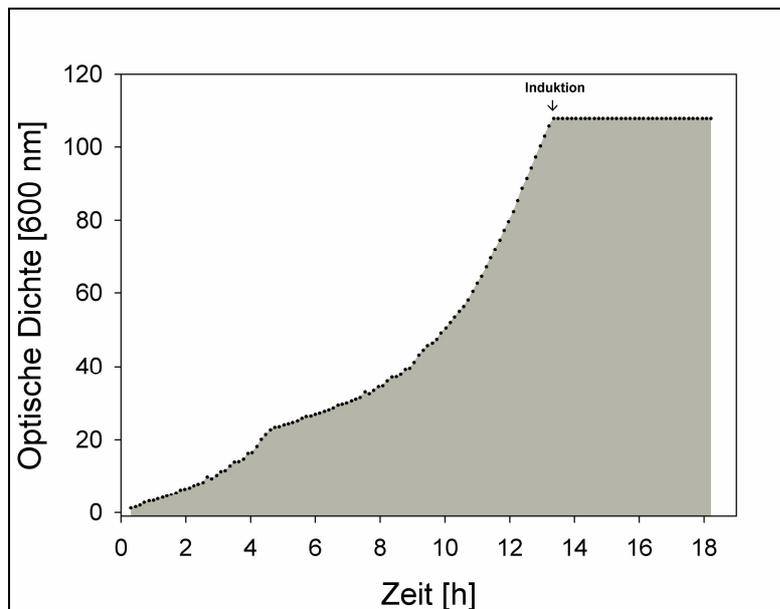


**Abbildung 6-2: Ein Coomassie gefärbtes Gel einer SDS-PAGE von Proben der Fermentation des PTHR1 im Vollmedium.** Während der Fermentation wurden Proben zur Analyse mittels SDS-PAGE 1 h vor der Induktion (-1), zum Zeitpunkt der Induktion (0) und jede weitere Stunde nach der Induktion (1-7) entnommen. Die zentrifugierten Zellpellets wurden in SDS-Probenpuffer (124 mM Tris/HCl, 100 mM DTT, 20% Glycerin, 2% SDS, 0,2% Bromphenolblau, pH 6,8) resuspendiert und für 30 min bei 40° C inkubiert. In den Proben des Zellrohextrakts konnte PTHR1 (66 kDa) nicht durch eine Coomassie-Färbung nachgewiesen werden.

Vor der Induktion, zum Zeitpunkt der Induktion und stündlich nach der Induktion wurden Proben entnommen und auf einer SDS-PAGE aufgetragen (**Abbildung 6-2**). PTHR1 wandert im Gel mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 70 kDa und wäre somit theoretisch oberhalb der Markerbande von 66 kDa zu sehen. Allerdings ist die Proteinkonzentration des PTHR1 im Vergleich zum Gesamtproteingehalt von *E. coli*-Zellen sehr gering und der Rezeptor wurde erst nach der Reinigung über eine Ni-NTA-Sepharose (**Abbildung 6-5**) in der SDS-PAGE sichtbar.

#### 6.1.1.2 Modifizierung des Fermentationsprozesses auf Mineralsalzmedium

Neben einer biochemischen Charakterisierung sollte PTHR auch für strukturelle Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie präpariert werden. Die NMR-Spektroskopie gewinnt immer größere Bedeutung zur dynamischen Untersuchung von Proteinen und Protein-Protein-Wechselwirkungen. Eine gezielte Markierung der Stickstoff- und Kohlenstoffatome des PTHR1 wurde benötigt. Aus diesem Grund wurde der Fermentationsprozess auf Mineralsalzmedium umgestellt.



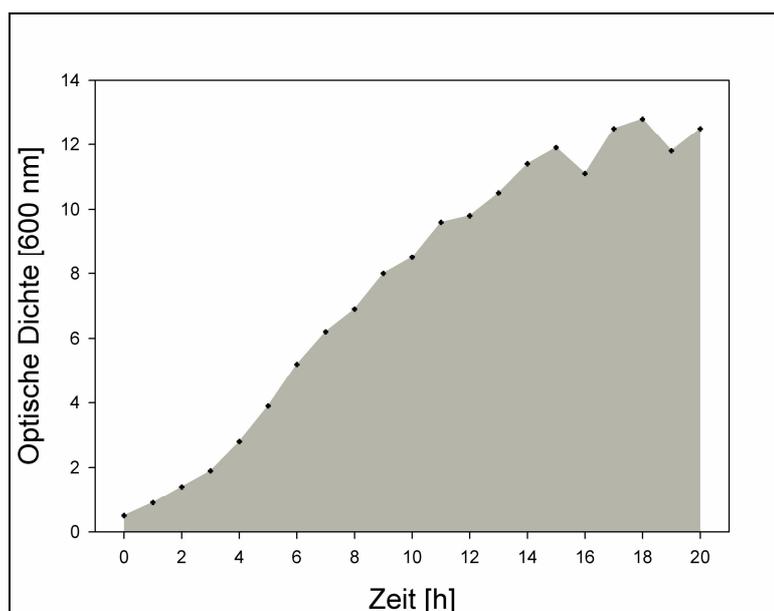
**Abbildung 6-3: Schematische Darstellung des Fermentationsverlaufes des PTHR1 auf Mineralsalzmedium.** Dokumentation des Zellwachstums anhand der Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm aufgetragen gegen die Zeit. Die Fermentation erfolgte auf Mineralsalzmedium im *fed-batch*-Verfahren. Im Startmedium war eine Glukosekonzentration von 5 g/l vorhanden. Der Verbrauch an Glukose wurde mit einer Glukoselösung (5 g/l) kompensiert. Im Fermenter betrug der Sauerstoffpartialdruck 30%, reguliert durch die Luftzufuhr und der Rührerdrehzahl. Nach dem eine  $OD_{600}$  von 100 überschritten wurde, erfolgte die Induktion der Proteinproduktion in den Zellen durch 1 mM IPTG. Dies erfolgte ungefähr 13 h nach Beginn des Fermentationsprozesses. Nach insgesamt 19 h wurde die Fermentation beendet.

Die Verwendung von Mineralsalzmedium schaffte reproduzierbare und vergleichbare Fermentationsbedingungen, die eine  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Markierung von PTHR1 ermöglichten und hinsichtlich ihrer Proteinausbeute optimiert werden konnten. Die Vorkulturen mussten zur Fermentation in Mineralsalzmedium adaptiert werden. Ausgangspunkt für die Vorkulturen war der *E.coli*-Stamm BL21 mit dem PTHR1 kodierenden pET 41b Plasmid. Ein Klon wurde von einer Antibiotika-selektiven LB-Platte in einer 5 ml Vorkultur, bestehend aus Mineralsalz und dem entsprechenden zugesetzten Antibiotika, inkubiert. Zur Adaption der Zellen wurde dem Mineralsalzmedium anfangs 10% LB-Medium zugesetzt. Dieses Medium wurde nach 12 h durch Zentrifugation der Zellen (4000 rpm, 10 min, 4 °C) und Resuspension des Pellets in reinem Mineralsalzmedium gewechselt. Das Wachstum wurde nach 12 h anhand der  $OD_{600}$  bestimmt. Der Klon mit der höchsten Zelldichte ( $OD_{600} = 1,2$ ) aus 20 parallelen Ansätzen wurde zur Fermentation eingesetzt. Der Fermentationsprozess wurde analog zu 6.1.1.1 durchgeführt. Die Zellen wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 110 angezogen. Der Start der Proteinsynthese erfolgte durch Induktion mit 1 mM IPTG. Nach vierstündiger Induktionsphase wurden die Zellen im Rotor JLA 8.1000 Beckman bei 4000 rpm, 20 min, 4 °C geerntet. Es wurde eine Biofeuchtmasse von 1,7 kg in einem neunzehnstündigen Fermentationsprozess gewonnen (**Abbildung 6-3**). Die erhaltene Biofeuchtmasse wurde bei -20 °C gelagert. Trotz einer höheren

Zell-dichte ( $OD > 110$ ) konnte nur die gleiche Ausbeute an PTHR1, wie unter der Verwendung des Komplexmediums, erzielt werden.

### 6.1.1.3 Fermentationsprozess zur $^{15}\text{N}$ -Markierung des Parathormon-Rezeptors

Für die strukturelle Untersuchung des Rezeptors mittels NMR war eine Markierung des PTHR1 mit  $^{15}\text{N}$  nötig. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit keine Ergebnisse mit dem  $^{15}\text{N}$  markierten PTHR1 erzielt wurden, ist der durchgeführte Fermentationsprozess aus Gründen der Vollständigkeit aufgeführt. Hierbei wurde keine Glukose als *feeding*-Lösung verwendet, sondern Glukose im Fermenter als *batch* (15 g/l) vorgelegt. Die *feeding*-Lösung bestand in vorliegenden Fall aus 10 g Ammoniumchlorid mit  $^{15}\text{N}$  als einzige Stickstoffquelle. Damit war die Stickstoffquelle der limitierende Faktor für das Zellwachstum. Über ein *feeding*-Profil konnte das Wachstum der Zellen im Fermenter gesteuert werden.



**Abbildung 6-4: Grafik zur Fermentation mit limitierter Stickstoffquelle und kontrollierter Zugabe von Ammoniumchlorid.** Eine optimale Prozessführung wurde durch die kontrollierte Zugabe von Ammoniumchlorid gewährleistet. Zur Induktion der Proteinproduktion durch 1 mM IPTG wird die Zugabe von Ammoniumchlorid kurzzeitig gedrosselt. Dies erfolgte ungefähr 14 h nach Beginn des Fermentationsprozesses. Nach einstündiger Umstellung des *E.coli*-Zellstoffwechsels wurde die Zugabe wieder mit einem linearen Gradienten erhöht. Nach 20 h wurde die Fermentation beendet.

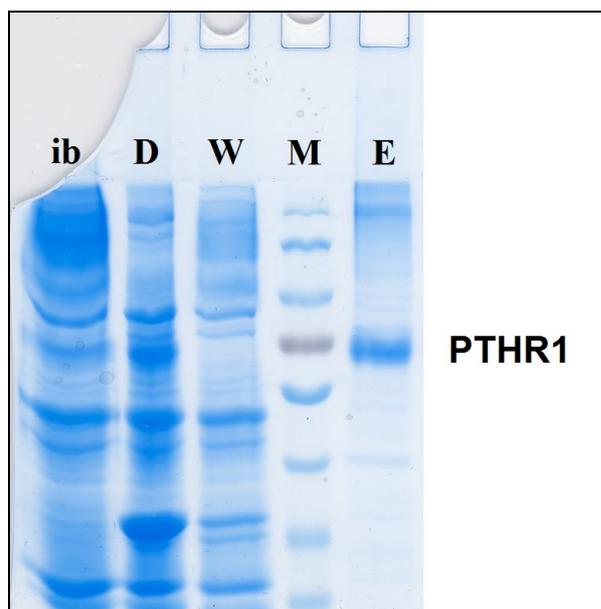
Das *feeding*-Profil war so angelegt, dass nach zwanzigstündiger Prozessdauer exakt ein Liter *feeding*-Lösung verbraucht wurde. Die Zuführung von Stickstoff erfolgte über 15 h mit einem linearen Gradienten. Im nächsten Schritt wurde die *feed-rate* auf 66% gedrosselt und es erfolgte

die Induktion mit 1 mM IPTG. Die Zellen sollten zu jedem Zeitpunkt unter limitierenden Stickstoffbedingungen wachsen. Durch die Drosselung der Zugabe von der *feeding*-Lösung wurde verhindert, dass ein Überschuss an Stickstoff im Fermenter entsteht. Durch die Induktion veränderte *E.coli* seinen Stoffwechsel und verringerte seinen Stoffumsatz. Nach einer Stunde sollte die Umstellung der Zellen auf die Proteinbiosynthese erfolgt sein. Daher wurde die *feed-rate* für die restliche Dauer des Fermentationsprozesses linear erhöht. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Zellen im Rotor JLA 8.1000 Beckman bei 4000 rpm, für 20 min, bei 4 °C) geerntet und es wurde eine Biofeuchtmasse von 98,8 g Zellen gewonnen.

Im Vergleich dazu wurde bei einer Fermentation auf Mineralsalzmedium eine Biofeuchtmasse von 1,7 kg erzielt. Die erhaltene Ausbeute an <sup>15</sup>N-markierter Biofeuchtmasse betrug 5,8% der vorherigen erzielten Biofeuchtmasse. Durch die Prozessführung mit einer regulierten und limitierten *feeding*-Lösung, sollte ein vollständiger Umsatz des <sup>15</sup>N in den Stoffwechsel und in die Proteinsynthese erreicht werden. Die erfolgreiche Substitution mit <sup>15</sup>N im PTHR1 konnte mit Massenspektrometrie nicht analysiert werden. Jedoch betrug die theoretische Konzentration an Stickstoff weniger als 5% im Fermenter, bezogen auf die vorhandene Stickstoffmenge im Mineralsalzmedium.

### 6.1.2 Reinigung des Parathormon-Rezeptors

Somit entspricht die Ausbeute an Biofeuchtmasse von 5,8% genau dem zu erwarteten Wert und zeigte, dass der zugesetzte Stickstoff quantitativ von den Zellen umgesetzt wurde. Aus 1 g Biofeuchtmasse wurden nach einer Fermentation auf Vollmedium bzw. auf Mineralsalz-Medium 100 mg *inclusion bodies* (IBs) isoliert werden. Dies entsprach einer Ausbeute von insgesamt 10%. Zur Reinigung wurden 1 g isolierte IBs in 100 ml Solubilisierungspuffer (100 mM Tris/HCl, 20 mM SDS, 100 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8,0) solubilisiert. Die IBs des PTHR1 konnten durch 6 M Guanidiniumchlorid nicht solubilisiert werden, aufgrund dessen wurde das Detergens SDS eingesetzt. Beim ersten Reinigungsschritt wurde das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) von den solubilisierten IBs entfernt und diese gleichzeitig in den Entsalzungspuffer (100 mM NaP, 10 mM SDS, pH 4,5) überführt. Bei niedrigen pH-Werten liegen die freien Cysteine weiterhin protoniert vor und können keine Disulfidbrücken bilden. Der pH-Wert wurde mit 1 M Natronlauge (NaOH) auf einen pH-Wert von 8,0 erhöht, um so eine anschließende Reinigung des PTHR1 über eine Ni-NTA-Sepharose mittels des C-terminalen His-tag zu ermöglichen (Hengen, 1995). Die **Abbildung 6-5** zeigt ein mit Coomassie gefärbtes 15% Acrylamid-Gel einer SDS-PAGE mit Proben der Reinigung von PTHR1 aus IBs unter denaturierenden Bedingungen. Mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen die N-terminale Domäne des PTHR1 gerichtet war, wurde der Durchlauf der Ni-NTA-Sepharose untersucht.



**Abbildung 6-5: Dokumentation der Reinigung des PTHR1 über Ni-NTA-Sepharose.** Analyse eines mit Coomassie gefärbten Gels einer SDS-PAGE (15% Acrylamid). Aufgetragen sind Probenmarker<sup>5</sup> (M) und Proben des löslichen Anteils von *inclusion bodies* (IBs), Durchlauf- (D), Waschschriffs- (W), und Elutionsfraktion (E) nach Reinigung über Ni-NTA-Sepharose. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (2-fach) (124 mM Tris/HCl, 100 mM DTT, 20% Glycerin, 2% SDS, 0,2% Bromphenolblau, pH 6,8) für 30 min bei 40° C inkubiert.

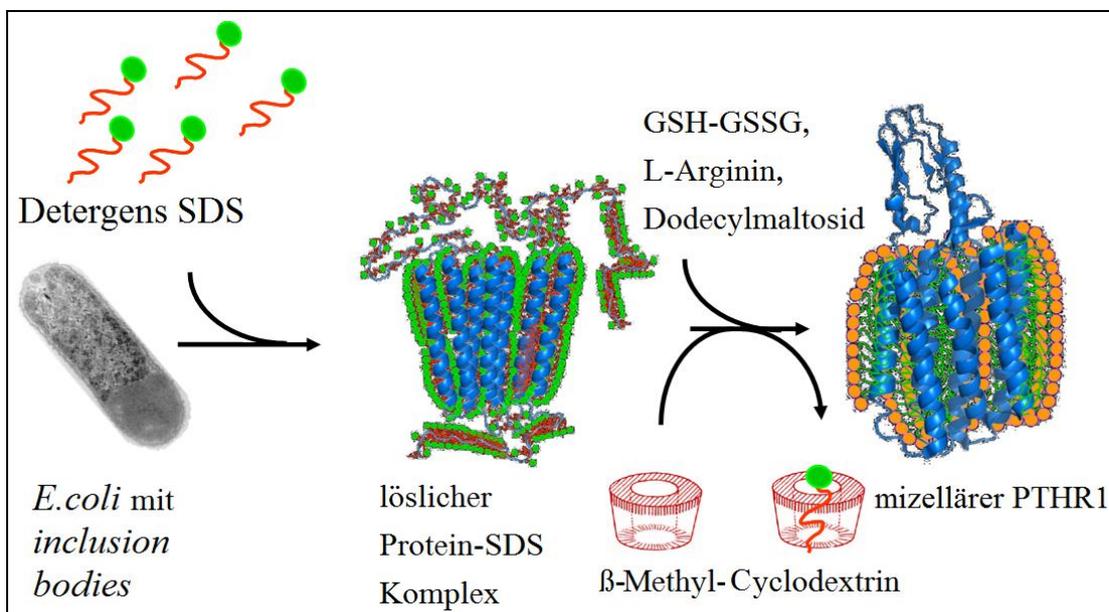
Diese Analyse mittels Western-Blotting war negativ. Im Waschschriffs wurde weiter mit einem Äquilibriumspuffer (100 mM NaP, 15 mM SDS, pH 8,3) gespült und alle unspezifisch gebundenen Proteine abgewaschen. Generell wird für Ni-NTA-Sepharose ein Waschschriffs mit einem pH-Wert von ca. 6,3 empfohlen. Dies führte jedoch bei der Verwendung von SDS, als solubilisierendes Detergens, zur sofortigen Elution des PTHR1. Die gezielte Elution erfolgte durch einen pH-Wert Sprung auf einen pH-Wert von 4,5. An der FPLC konnten drei Fraktionen mit einem Volumen von je 4 ml und einer durchschnittlichen Konzentration von 1,8 mg/ml bezogen auf 1 g IBs gewonnen werden. Die erhaltene Reinheit von PTHR1 (**Abbildung 6-5**) war bereits zufriedenstellend. Die zusätzliche Proteinbande bei 170 kDa wurde mittels Massenspektrometrie als Oligomer von PTHR1 identifiziert.

Die gereinigte Proteinmenge von insgesamt 21,6 mg PTHR1 isoliert aus 1 g IBs entspricht einer Ausbeute von 4,6%. Die gereinigten Fraktionen des PTHR1 wurden vollständig zur Renaturierung eingesetzt (Kapitel 6.1.3).

<sup>5</sup> (<http://www.fermentas.com/en/products/all/protein-electrophoresis/prestained-ladders/sm067-pageruler-prestained-protein>)

### 6.1.3 Renaturierung des Parathormon-Rezeptors mittels *artificial-chaperone*-System

Die Renaturierung des PTHR1 erfolgte durch Verdünnung des solubilisierten Proteins in einen Renaturierungspuffer 5.2.5.1. Dabei wird das Agens, welches das Protein in einen denaturierten Zustand in Lösung gehalten hatte, entsprechend verdünnt und die denaturierende Wirkung auf das Protein minimiert (Buchner und Rudolph, 1991). Die schrittweise Renaturierung bestand aus 4 Pulsen á 2,5 ml in 90 ml Renaturierungspuffer und einen Zeitabstand von 6 h. Dabei wurde eine Proteinkonzentration von 25 µg/ml pro Puls nicht überschritten. Diese Verdünnung führte zu einer sehr niedrigen Proteinkonzentration während der Renaturierung.



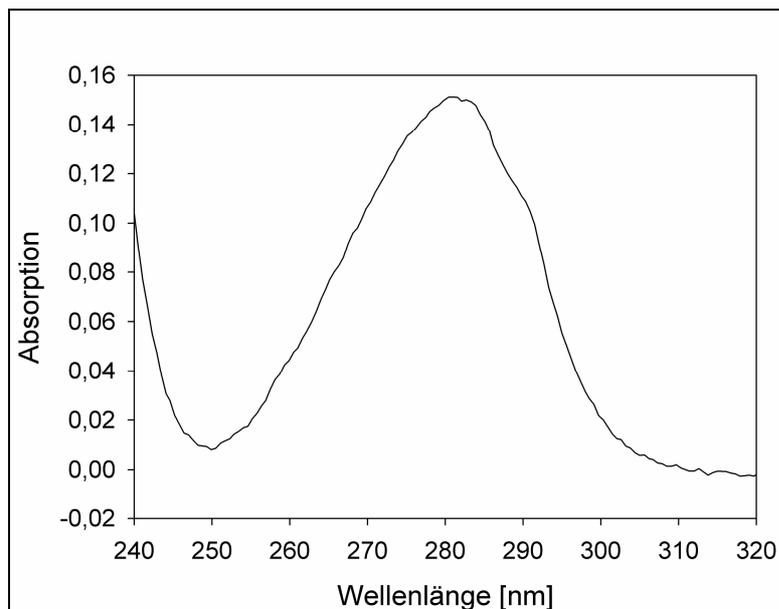
**Abbildung 6-6: Modell der Renaturierung unter der Verwendung des *artificial-chaperone*-Systems.** Die *inclusion bodies* (IBs) aus *E. coli* wurden unter denaturierenden Bedingungen durch das Detergens SDS solubilisiert und ein löslicher Protein-SDS Komplex entstand. Dieses denaturierende Detergens SDS wurde spezifisch durch β-Methyl-Cyclodextrin eliminiert. Zur Stabilisierung des solubilisierten PTHR1 wurde dem Renaturierungspuffer L-Arginin und das milde Detergens Dodecylmaltosid (DDM) zugesetzt. Ein Redox-*shuffling*-System, bestehend aus reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH/GSSG), half die korrekten Disulfidbrücken in der N-terminalen Domäne des PTHR1 und zwischen dem extrazellulären Loops 1 und 2 auszubilden.

Dieses Verfahren ergab trotz initial niedriger Proteinkonzentration eine vergleichsweise hohe Volumenausbeute an renaturiertem Protein. Die Renaturierung wurde auf der Basis eines modifizierten *artificial-chaperone*-System durchgeführt (Rozema und Gellman, 1996; Daugherty *et al.*, 1998). Das denaturierende Detergens SDS wurde durch β-Methyl-Cyclodextrin (schematische Darstellung, **Abbildung 6-6**) gebunden und vom Protein entfernt und ermöglichte dessen Renaturierung. Die Aggregation während der Renaturierung wurde

durch Zusatz von 1 M L-Arginin verringert (Baynes *et al.*, 2005; Grauschopf, 2000). Die Renaturierung erfolgte oberhalb des isoelektrischen Punkts von 7,9 bei einem pH-Wert von 8,5. Der Zusatz von oxidiertem und reduziertem Glutathion bewirkte eine Ausbildung und Isomerisierung der Disulfidbrücken.

Zur Stabilisierung des PTHR1 musste ein mildes Detergens zugesetzt werden. Ein Detergens wird als mild bezeichnet, wenn dessen denaturierende Wirkung nur bei hohen Konzentrationen eintritt. Anfangs wurde ein Detergensgemisch aus 2 mM DDM, 1,6 mM Cholesterinhemisuccinat und 8 mM CHAPS für PTHR1 verwendet. Dieser *triple-detergent-Mix* (TDM) konnte bereits erfolgreich für andere Membranproteine angewendet werden (Yeliseev *et al.*, 2005; Drechsler, 2006). Die Stabilisierung des PTHR1 durch TDM war ein erster Schritt zur löslichen Präparation des PTHR1. Doch erschwerte das Gemisch von Detergenzien die anschließende Rekonstitution des Rezeptors in Liposomen (Kaufmann *et al.*, 2006; Remigy *et al.*, 2003). Die Detergenzien werden während des Prozesses unterschiedlich schnell vom Rezeptor entfernt. Damit war ein Anstieg der Aggregation des PTHR1 und letztendlich eine Verringerung der Ausbeute des rekonstituierten PTHR1 in Liposomen verbunden. Zur Renaturierung des PTHR1 wurden diverse Detergenzien zur Kristallisation von Membranproteinen getestet. Die Wirkung dieser Detergenzien wurde hinsichtlich ihrer löslichkeitsvermittelnden Eigenschaften auf PTHR1 untersucht. Nach Zentrifugation der Proben für 30 min, 4 °C bei 100.000 g wurde bei der Analyse des Überstands und des Pellet mittels SDS-PAGE aggregierter PTHR1 im Pellet nachgewiesen werden. Mit dem *screening* dieser stabilisierenden Detergenzien konnten über 40 Detergenzien identifiziert werden, die den PTHR1 über sechs Monate in Lösung hielten (Tabelle 10-5). Es zeigte sich, dass sowohl CHAPS, als auch Cholesterinhemisuccinat eine Aggregation des PTHR1 bewirkten und die stabilisierenden Effekte des TDM offensichtlich nur auf DDM beruhten. Aus diesem Grund wurde nur DDM als stabilisierendes Detergens zur Renaturierung des PTHR1 verwendet.

Eine Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Renaturierung mittels Absorptionsspektroskopie ergab eine Proteinkonzentration zwischen 75 bis 95 µg/ml. Die **Abbildung 6-7** zeigt ein Proteinspektrum des löslichen Anteils des renaturierten PTHR1. Der Renaturierungsansatz streute das Messlicht in Abhängigkeit von der Größe der Partikel. Die Streuung des Messlichts, welches durch Proteinaggregate und Detergensmizellen verursacht wurde, ist wellenlängenabhängig und erzeugte eine Streukurve, die die Absorptionskurve überlagerte. Aus Punkten, die außerhalb der Absorptionsbande liegen wurde eine Streulichtkurve extrapoliert und die Absorptionskurve um diesen Streulichtanteil korrigiert.

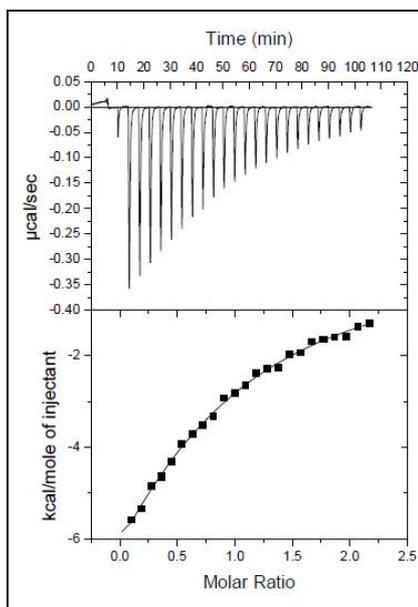


**Abbildung 6-7: Absorptionsspektrum des renaturierten PTHR1.** Die Spektren wurden im Wellenlängenbereich von 240 nm bis 400 nm aufgenommen. Der enthaltene Streulichtanteil im Absorptionsspektrum wurde mit Messpunkten außerhalb der Absorption des Tryptophans extrapoliert. Nach Renaturierung und Zentrifugation betrug die Absorption des löslichen Proteins von 100 µg/ml bei 280 nm 0,1512 nach Subtraktion des Streulichtanteils. Die Messung erfolgte in einer 1 cm x 1 cm Quarzküvette in 100 mM NaP, 150 mM NaCl, 0,1% DDM, pH 7,4.

Die Ausbeute an löslichem PTHR1 nach der Renaturierung betrug durchschnittlich 75 bis 95%. Bindungsstudien mit dem renaturierten PTHR1 in einer DDM-Mizelle mit dem Liganden PTH waren negativ. Möglicherweise verhindert das Detergens die Bindung des Liganden an den Rezeptor. Aus diesem Grund konnte keine Aussage über die Ausbeute an funktionellen renaturierten PTHR1 in diesem Stadium getroffen werden.

#### 6.1.3.1 Renaturierung der nPTHR1

Nachdem eine Strategie zur Renaturierung des PTHR1 entwickelt und hinreichend untersucht worden war, wurde die N-terminale Domäne unter exakt denselben Pufferbedingungen renaturiert. Auf diese Weise konnte überprüft werden, ob nicht nur der Transmembranbereich des Rezeptors, sondern auch die lösliche, Liganden bindende Domäne unter diesen Bedingungen die native, funktionelle Struktur ausbildete. Die Isolierung, Solubilisierung und Reinigung der IBs erfolgte wie in Kapitel 5.2.4.1.1 und 5.2.4.1.2 beschrieben. Die isolierte N-terminale Domäne konnte in hoher Reinheit und Konzentration gewonnen werden. Die Renaturierung erfolgte in einem Maßstab von 2 L.



**Abbildung 6-8: Charakterisierung der *artificial-chaperone*-System renaturierten N-terminalen Domäne des PTHR1 mittels isothermer Titrationskalorimetrie.** 29 Injektionen á 10 µl einer 300 µM PTH (1-37) Lösung wurden zu 30 µM nPTHR1 bei 20 °C titriert. Die Bindungsstärke konnte mit einer Dissoziationskonstante von 14 µM und einem stöchiometrischen Verhältnis von 0,7 charakterisiert werden. Die Probenvorbereitung und die Messungen erfolgten in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 bei 20° C.

Die Bindungsfähigkeit der gereinigten nPTHR1 wurde anhand isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) und dem Liganden PTH (1-37) überprüft. Durch die ITC-Messung konnte die Affinität von nPTHR1 mit PTH (1-37) anhand der freien Enthalpie und Dissoziationskonstante charakterisiert werden. In der vorliegenden Messung wurde 30 µM, der durch *artificial-chaperone*-Systems renaturierten nPTHR1, in 23 Injektionen á 12 µl, bei 20 °C mit 300 µM PTH (1-37) titriert. Die Bindung konnte mit einer Dissoziationskonstante von 27 µM charakterisiert werden. Im Vergleich zur Renaturierung der mit Guanidiniumchlorid solubilisierten isolierten N-terminalen Domäne wurde eine Dissoziationskonstante von 3,4 µM unter gleichen Messbedingungen ermittelt.

Trotz der geringfügig abweichenden Dissoziationskonstanten wurde die erfolgreiche Renaturierung der N-terminalen Domäne unter der Verwendung des *artificial-chaperone*-Systems nachgewiesen. Diese Strategie ermöglichte die Ausbildung der nativen Struktur der N-terminale Domäne und stabilisierte gleichermaßen den Transmembranbereich des PTHR1.

### 6.1.3.2 Konzentrierung des PTHR1 nach der Renaturierung

Zur Charakterisierung des PTHR1 war eine Konzentrierung des Proteins erforderlich. Die PTHR1-Lösung wurde im Amicon mit einer Membranausschlußgröße von 100 kDa konzentriert. Die Aggregationszahl von DDM ist 98 und das Molekulargewicht beträgt 510,6 kDa. Daraus ergibt sich eine Masse der DDM<sup>6</sup>-Mizellen von 50038,8 Da. Zusammen wird vom PTHR1 (ca. 66 kDa) in einer DDM-Mizelle eine Gesamtmasse von ca. 116 kDa erreicht. Aufgrund seiner Masse und dem hydrodynamischen Durchmesser ist PTHR1 in einer DDM-Mizelle nicht in der Lage die Membran zu passieren. Ein Vergleich von UV-Spektren der Proben des Durchlaufs und des Konzentrats von reinen DDM-Mizellen zeigte, dass die Mizellen die Membran problemlos passieren konnten. Anders verhielt es sich in Gegenwart des PTHR1. Dort entstand während der Konzentrierung ein Unterschied in der Detergengkonzentration zwischen Durchlauf und Konzentrat. Dieses konnte durch einen Anstieg des Streulichtsignals im gesamten Wellenlängenbereich detektiert werden. Dieser Bereich zeigte einen Absorptionsanstieg, wenn der Referenzpuffer gegen DDM-haltigen Puffer gemessen wurde. Im Gegensatz dazu konnte bei der Konzentrierung der renaturierten Probe beobachtet werden, dass die Permeation der DDM-Mizellen durch die Membran eingeschränkt wurde.

Tabelle 6-2: Vergleich unterschiedlicher Konzentrierungstechniken für PTHR1.

<b>Methode</b>	<b>Amicon</b>			<b><i>speed vac</i>-System</b>
<b>Volumen [ml]</b>	12	15	20	10
<b>Eingesetzte Konzentration [mg/ml]</b>	0,090	0,090	0,090	0,090
<b>Erhaltene Konzentration [mg/ml]</b>	1,045	1,155	1,375	0,650
<b>Ausbeute [in Prozent]</b>	98%	86%	77%	72%

Es kann dadurch zu Konzentrationsunterschieden zwischen dem Durchfluss und der konzentrierten Probe des PTHR1 kommen. Das Proteinsignal setzte sich aus einem

Streulichtanteil aus Detergens und dem darin enthaltenen Proteinspektrum zusammen. Die Korrektur der UV-Spektren erfolgte bei der Verwendung der Amicon-Zellen gegen den Durchlauf aus der Amicon-Zelle. Zur Konzentrierung wurden 12 ml des Renaturierungsansatzes auf 1 ml eingeeengt. Im Anschluss konnte die Ausbeute durch einen Vergleich der eingesetzten Proteinmenge berechnet werden (**Tabelle 6-2**).

Bei der Konzentrierung mittels *speed vac* System wurde für den Referenzpuffer das gleiche Volumen des Renaturierungspuffers ohne Protein gleichzeitig eingeeengt. Die Referenzprobe hatte nach der Behandlung das gleiche Volumen wie die Probe des Renaturierungsansatzes. Es konnte eine Proteinkonzentration von 650 µg/ml mit der *speed vac*-Methode erzielt werden. In Relation zur eingesetzten Proteinmenge entspricht dies einer Proteinausbeute von 72%. Kritisch im Hinblick auf die denaturierende Wirkung des Detergens war die Verringerung des Puffervolumens und dadurch eine vollständige Konzentrierung des Detergens. Der Einsatz von hohen Detergensenkonzentration verringert die stabilisierende Wirkung des Detergens und fördert die denaturierende Wirkung auf Proteine. Das Amicon-System lieferte Proteinkonzentration von 1 mg/ml mit einer prozentualen Ausbeute bis zu 98% des eingesetzten renaturierten Proteins (**Tabelle 6-2**). Die höchste Ausbeute an eingesetzten Protein konnte erzielt werden, wenn die Amicon-Zentrifugationsröhrchen einfach befüllt wurden. Obwohl ein Nachfüllen des Konzentrators höhere Ausbeuten an PTHR1 (1,375 mg/ml) erzielte, verringerte sich die prozentuale Ausbeute.

Diese Daten favorisieren die Konzentrierung des mizellären PTHR1 mit dem Amicon-System und belegen, dass mehrfaches Verwenden der Konzentratoren die Ausbeute im vorliegenden Fall verringert. Dennoch können durch Nachfüllen hohe Proteinkonzentrationen erzielt werden.

### 6.1.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die UV-Spektren von BSA zeigten eine Beeinflussung der gemessenen Absorption durch Detergens bzw. Lipid. Dieses Problem einer eventuell fehlerhaften spektroskopischen Konzentrationsbestimmung in der Gegenwart von Detergenzien sollte durch die Verwendung des Pierce Protein Assay gelöst werden. Damit sollte ebenfalls eine Grundlage geschaffen werden die Proteinkonzentration vor und nach der Rückfaltung und nach der Rekonstitution in der Gegenwart von Lipiden ermitteln zu können.

**Tabelle 6-3: Vergleich einer UV-spektrometrischen versus Pierce Protein Assay Bestimmung der Proteinkonzentration.**

Detergens	SDS	DDM	Lipid/Triton
Spektrum	16 $\mu\text{M}$	1,3 $\mu\text{M}$	nicht möglich
Pierce Assay	15,8 $\mu\text{M}$	1,28 $\mu\text{M}$	70 $\mu\text{M}$

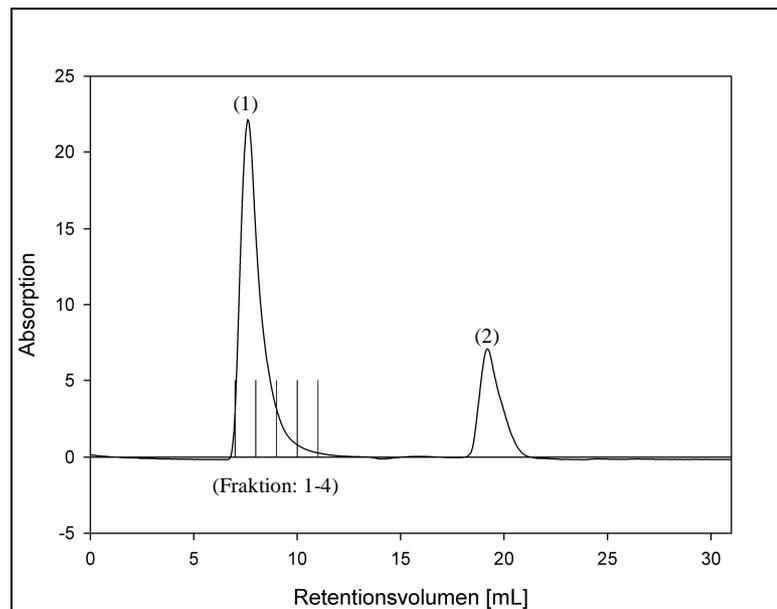
Aus diesem Grund wurden BSA-Eichkurven in Gegenwart von Lipid bzw. Detergens hergestellt, um die PTHR1-Konzentration unter den gleichen Pufferbedingungen zu messen. Unter diesen Voraussetzungen ergab die Bestimmung der PTHR1-Konzentration in SDS mittels UV-Spektroskopie und dem Pierce Protein Assay keinen Unterschied. Ebenfalls stimmte die Proteinkonzentration für PTHR1 in DDM mit beiden Methoden überein (**Tabelle 6-3**). Aus diesem Grund wurde der Pierce Protein Assay zur Konzentrationsbestimmung des PTHR1 in den Liposomen angewendet.

Diese Ergebnisse bestätigten, dass der Einfluss der Detergenskonzentration im Amicon-System die spektroskopische Proteinbestimmung nicht nachweisbar beeinträchtigt. Des Weiteren konnte eine Quantifizierung der PTHR1-Konzentration in den Proteoliposomen durchgeführt werden, wenn die Eichkurve in Gegenwart der eingesetzten Komponenten erstellt wurde.

## 6.1.4 Biophysikalische Charakterisierung des renaturierten, mizellären PTHR1

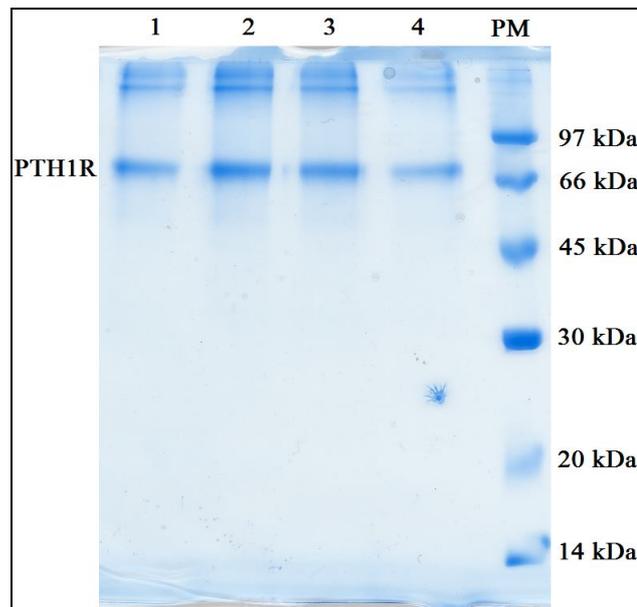
### 6.1.4.1 Größenausschlusschromatographie des mizellären PTHR1

Eine Größenausschlusschromatographie dient zur Auftrennung von Spezies mit unterschiedlichem Oligomerisierungsgrad nach der Renaturierung. Die verwendete Superdex S-200 HR 3,6/30 eignet sich für Proteine mit einem Molekulargewicht von  $10^4$  bis  $6,6 \cdot 10^6$  Dalton. Es wurde 100  $\mu\text{l}$  des renaturierten mizellären PTHR1 nach Zentrifugation im Rotor TLA 100.4 Beckman bei 60.000 rpm, 4 °C, 20 min auf eine Superdex S-200 HR-Säule aufgetragen. Im Chromatogramm (**Abbildung 6-9**) wurden zwei Absorptionspeaks erhalten.



**Abbildung 6-9: Größenausschlusschromatographie des renaturierten, mizellären PTHR1.** 100  $\mu$ l des renaturierten und konzentrierten PTHR1 wurden auf einer Superdex S200 HR-Säule bei einer Flussgeschwindigkeit von 300  $\mu$ l/ min im Gelfiltrationspuffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, 0,1% DDM, pH 7,4) aufgetragen. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Fraktionen in den Absorptionspeaks wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Durch die Analyse mittels SDS-PAGE konnte PTHR1 in den Fraktionen 1-4 des ersten Absorptionspeaks nachgewiesen werden (**Abbildung 6-10**). Der zweite Peak enthielt kein Protein und resultiert aus Pufferartefakten. Die Elution des mizellären PTHR1 im Ausschlussvolumen deutete auf ein oligomeres Vorliegen des renaturierten PTHR1 hin. Mizellärer PTHR1 eluierte nicht im Ausschlussvolumen, wenn die PTHR1-Konzentration von 100  $\mu$ g/ml auf 25  $\mu$ g/ml verringert wurde. Im Gegensatz dazu war das Laufverhalten bis zu maximal 1% DDM unabhängig von der Detergenkonzentration. Eine Veränderung des Laufverhaltens in Abhängigkeit der Detergenkonzentration wäre ein Hinweis auf Aggregation des renaturierten PTHR1. Eine Schlussfolgerung aus dem Laufverhalten des Proteins auf das Molekulargewicht oder den Oligomerisierungsgrad ist in diesem Fall aus folgenden Gründen nur eingeschränkt zulässig. In der Gelmatrix erfolgt die Auftrennung der Proteine aufgrund des hydrodynamischen Durchmessers. Alle Chromatographieläufe wurden in Gegenwart des Detergens DDM durchgeführt. Diese Detergenzien bilden oberhalb ihrer kritischen Mizellenkonzentration (CMC) eine Mizelle aus. Der renaturierte PTHR1 befindet sich in einer Detergenmizelle. Der hydrodynamische Durchmesser setzt sich folglich aus dem PTHR1 und den daran bindenden Detergenmolekülen zusammen.



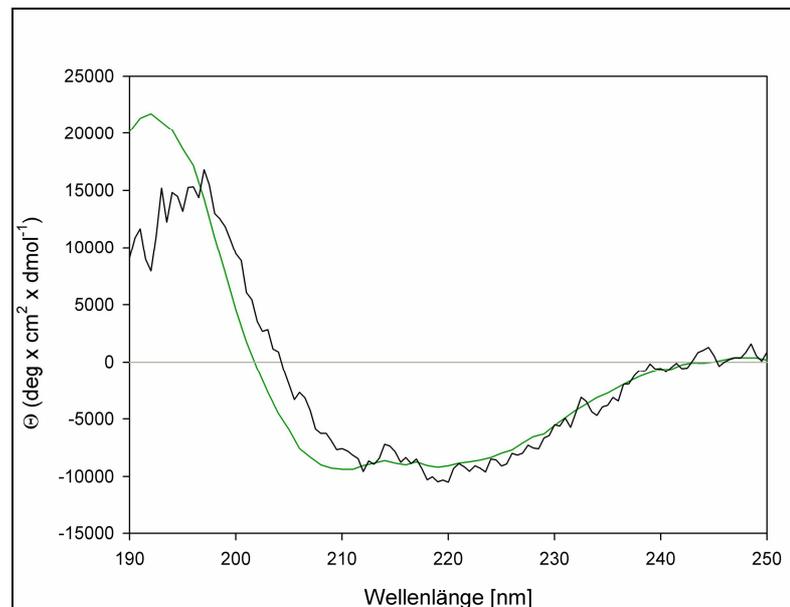
**Abbildung 6-10: Coomassie gefärbtes Gel einer SDS-PAGE der Chromatografiefraktionen (1-4).**  
 Analyse der Fraktionen des Chromatographielaufs des mizellären PTHR1 mittels eines Coomassie gefärbten Gels einer SDS-PAGE (15% Acrylamid). Die vier isolierten Fraktionen wurden nach Reinigung über Superdex 200 HR 3,6/30 aufgetragen. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (2-fach) (124 mM Tris/HCl, 100 mM DTT, 20% Glycerin, 2% SDS, 0,2% Bromphenolblau, pH 6,8) für 30 min bei 40° C inkubiert.

Die zugesetzten Cyclodextrin-Moleküle können ebenfalls an PTHR1 binden und würden eine Elution im Ausschlußvolumen erklären.

Zur eindeutigen Bestimmung des Oligomerisierungsgrads des PTHR1 muss eine Analyse durch analytische Ultrazentrifugation erfolgen. Doch dafür lag zum einen eine zu geringe Proteinkonzentration vor und zum zweiten wirkte sich die Gegenwart des Detergens DDM negativ aus, so dass der Oligomerisierungsgrad des mizellären PTHR1 im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden konnte.

#### 6.1.4.1 Circular dichroismus des mizellären PTHR1

Eine wichtige Information über dieses Strukturmerkmal wird im Fern-UV Bereich der CD-Spektroskopie erhalten. Proteine mit einem hohen Gehalt an  $\alpha$ -helikalen Strukturen weisen dabei ein Maximum bei 190 nm und zwei charakteristische Minima bei 208 und 220 nm auf (Quadrifo und Urry, 1968). Zur Ermittlung von Sekundärstrukturanteilen des SDS-solubilisierten und des renaturierten PTHR1 wurde der Circular dichroismus im Fern-UV eingesetzt. Für den SDS-solubilisierten PTHR1 (**Abbildung 6-11, grün**) ergab sich ein charakteristisches CD-Spektrum eines  $\alpha$ -helikalen Proteins mit einem Maximum bei 190 nm und zwei Minima bei 210 und 220 nm (Greenfie und Fasman, 1969).



**Abbildung 6-11: Fern-UV CD-Spektrum des mizellären PTHR1.** Die Spektren wurden von 190-250 nm aufgenommen und 20-fach akkumuliert. Die Proteinkonzentration für den renaturierten PTHR1 (schwarz) beträgt 100 µg/ml aufgenommen in Messpuffer 100 mM NaP, 150 mM NaCl, 0,1% DDM, pH 7,4 in einer 2 mm \* 1 cm Küvette. Für das Spektrum des denaturierten PTHR1 (grün) wurde eine Proteinkonzentration von 400 µg/ml in 100 mM NaP, 10 mM SDS, pH 4,5 eingesetzt. Für beide Proteinspezies wurde ein hoher  $\alpha$ -helikale Anteil mit zwei Minima bei 210 und 220 nm für das Spektrum in SDS bzw. 212 und 220 nm für das renaturierte Spektrum des PTHR1 gemessen.

Der Transmembranbereich des PTHR1 bildete bereits nach der Solubilisierung durch das stark denaturierende Detergens SDS  $\alpha$ -helikale Strukturen aus. Nach der Renaturierung des PTHR1 wurde ein CD-Spektrum eines  $\alpha$ -helikalen Proteins, mit einem Maximum bei 200 nm und zwei Minima bei 212 und 220 nm, erhalten (**Abbildung 6-11, schwarz**).

Zur Bewertung der CD-Spektren wurde der  $\alpha$ -helikale Anteil mit dem Algorithmus K2d berechnet (Compton und Johnson, 1986; Andrade *et al.*, 1993; Sreerama und Woody, 1993). Beim SDS-solubilisierten und beim renaturierten PTHR1 ergab sich ein  $\alpha$ -helikaler Anteil des Proteins von ca. 30% (Tabelle 6-4). Die berechneten Sekundärstrukturelemente der jeweiligen PTHR1-Spezies unterschieden sich untereinander um maximal 1% bei PTHR1. Dieser ermittelte  $\alpha$ -helikale Anteil des PTHR1 entspricht den theoretischen Überlegungen eines Rezeptors der Sekretin-Familie. Diese Proteine zeichnen sich durch eine große N-terminale Domäne und einen relativ großen C-Terminus aus. Auf den Transmembranbereich und zur Ausbildung der  $\alpha$ -Helices entfallen 25% der gesamten Aminosäuren. Des Weiteren enthält die isolierte N-terminale Domäne eine  $\alpha$ -Helix, die im renaturierten Zustand nachgewiesen werden konnte (Grauschopf, 2000; Pioszak und Xu, 2008).

Tabelle 6-4: Analyse der sekundären Strukturelemente des denaturierten PTHR1<sup>7</sup>.

Algorithmus K2d		
PTHR1	SDS	DDM
<b>Strukturanteil [%]</b>		
<b><math>\alpha</math>-Helix</b>	30	31
<b><math>\beta</math>-Faltblatt</b>	15	14
<b>unstrukturiert</b>	55	55

Die Daten der isolierten N-terminalen Domäne allein wiesen ein Spektrum für ein partiell  $\alpha$ -helikales Protein auf (Grauschopf, 2000). Die berechneten Werte für enthaltene  $\beta$ -Faltblattstrukturen von 15%, passen nicht in das Bild eines überwiegend  $\alpha$ -helikalen Membranproteins. Die Kristallstruktur zeigte für nPTHR1 kleine  $\beta$ -Faltblattstrukturen innerhalb der Domäne (Pioszak und Xu, 2008). Deren Einfluss sollte im Vergleich zum dominanten Signal, verursacht durch den Transmembranbereich, gering sein. Daher ist dieser berechnete Anteil eher als Fehler im Algorithmus zu bewerten.

Die geringe Zunahme des  $\alpha$ -helikalen Signals nach der Renaturierung bestätigt, dass die Helices durch SDS nicht in ihrer Integrität gestört werden. Das maßgebliche Signal wurde durch den Transmembranbereich des PTHR1 erhalten. Aufgrund dessen konnte nur schwer eine Aussage über die erhaltene Gesamtstruktur nach der Renaturierung getroffen werden, da das  $\alpha$ -helikale Signal lediglich um 1% zunimmt.

#### 6.1.4.2 Fluoreszenzeigenschaften des mizellären PTHR1

Die Fluoreszenzspektroskopie kann bei Proteinen mit aromatischen Seitenketten genutzt werden, um Informationen über die Tertiärstruktur zu erhalten. In Proteinen wird spezifisch die Tryptophanseitenkette angeregt, deren Fluoreszenz in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge zwischen 320 bis 360 nm detektiert werden kann. Im nativen Protein sind die aromatischen Seitenketten in eine hydrophobe Umgebung im inneren des Proteins verborgen. Während des Entfaltungsprozesses des Proteins kommen die Fluorophore in Kontakt mit dem umgebenden Lösungsmittel.

<sup>7</sup> PTHR1 SDS wird als denaturierte Struktur angenommen

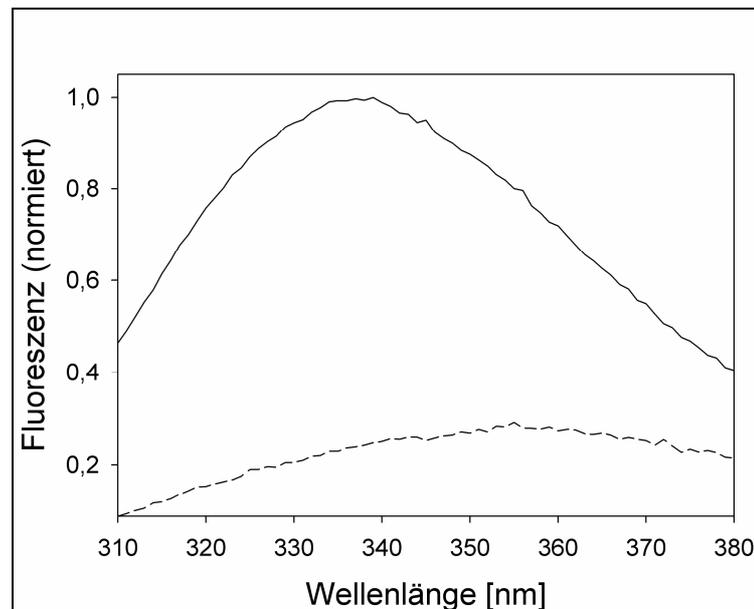
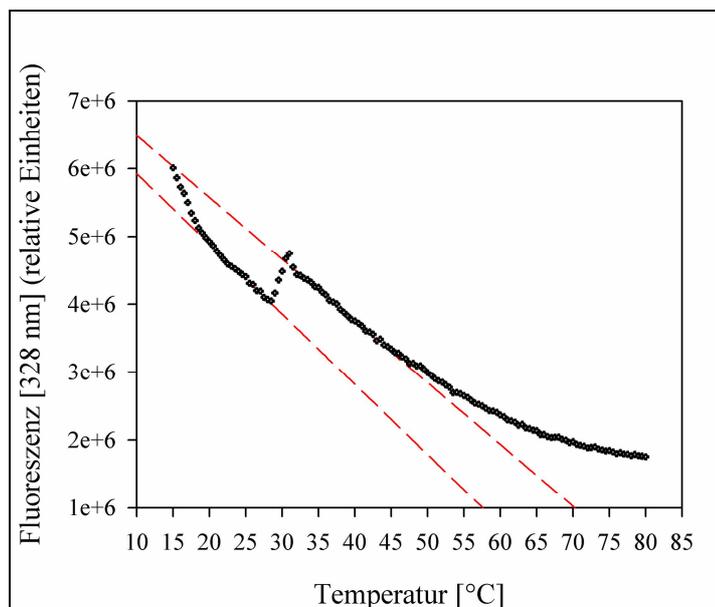


Abbildung 6-12: **Fluoreszenzemissionsspektren des nativen und denaturierten PTHR1.** Emissionsspektrum des nativen PTHR1 (—) gemessen in 100 mM NaP, 150 mM NaCl, 0,1% DDM, 1 M L-Arginin, pH 7,4 in einer 1 cm x 1 cm Küvette und des denaturierten PTHR1 (- -) in zusätzlich 2 M Guanidiniumchlorid bei einer Anregungswellenlänge von 275 nm. Die Messung erfolgte bei 15 °C und einer Proteinkonzentration von 1  $\mu$ M. Die Spektren wurden auf die Intensität des nativen PTHR1-Spektrums normiert.

Die Fluoreszenzspektroskopie als Charakterisierungsmethode eignete sich hervorragend für den PTHR1, da dieser über insgesamt fünfzehn Tryptophane verfügt. Aufgrund der hohen Sensitivität wurde somit ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erhalten. Die **Abbildung 6-12** zeigt normierte Fluoreszenzemissionsspektren des renaturierten PTHR1 und denaturierten PTHR1 in 2 M Guanidiniumchlorid. Die Fluoreszenzintensität konnte als Sonde zur Unterscheidung der nativen und denaturierten Konformation herangezogen werden, da sich die Fluoreszenzspektren deutlich unterscheiden. Das erhaltene Maximum des Emissionsspektrums des denaturierten PTHR1 war bathochrom im Verhältnis zum Emissionsspektrum des nativen Proteins verschoben. Das Emissionsmaximum des nativen Proteins liegt bei 335 nm, das des denaturierten Rezeptors weist mit 355 nm eine Rotverschiebung um 20 nm auf. Der größte Unterschied in der Fluoreszenz des nativen und denaturierten PTHR1 lag jedoch bei einer Emissionswellenlänge von 328 nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm wird im Emissionsspektrum der Raman-Peak des Wassers bei 330 nm detektiert. Aufgrund möglicher Interferenzen mit dem Proteinspektrum wurde deshalb eine Anregungswellenlänge von 275 nm für alle Fluoreszenzspektren gewählt. Dadurch wurde der Raman-Peak des Wassers zu kleineren Wellenlängen verschoben (305 nm) und störte nicht im Fluoreszenzspektrum (Schmid, 1997).

Mittels CD-Spektroskopie konnte für nPTHR1 eine Entfaltungskurve in Gegenwart von Guanidiniumchlorid aufgenommen werden. Dabei wurde bei der Denaturierung nPTHR1 eine Rotverschiebung der Fluoreszenz von von 344 nm auf 354 nm beobachtet. Unter der Annahme eines Zwei-Zustand-Modells ergab die quantitative Auswertung einen Übergangsmittelpunkt bei 2,5 M Guanidiniumchlorid (Grauschopf, 2000). Eine Guanidiniumchlorid induzierte Denaturierung von PTHR1 wurde dementsprechend analysiert und ebenfalls eine Rotverschiebung der Fluoreszenz beobachtet. Im Vergleich zur isolierten Domäne ist die Stabilität des Gesamtrezeptors deutlich herabgesetzt (Daten nicht gezeigt). Daher wurde Harnstoff als weniger starkes Denaturierungsmittel eingesetzt. Harnstoff lieferte eine bessere Übergangskurve, jedoch konnte ein kooperativer Übergang nicht eindeutig bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der PTHR1 in der Detergensmizelle gegenüber denaturierenden Agenzien instabil ist.

Die geringe Stabilität des PTHR1 in Detergensmizellen konnte mittels einer thermisch induzierten Entfaltung beobachtet werden (**Abbildung 6-13**). Bei einer thermischen Entfaltung wurde für PTHR1 ebenfalls eine bathochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums nachgewiesen. Es wurde eine sprunghafte Zunahme der Intensität der Fluoreszenz bei einer Übergangstemperatur von 30 °C beobachtet. Da der Entfaltungsprozess irreversibel war, können keine Aussagen zur Änderung der freien Enthalpie, Entropie bzw. Wärmekapazität des Rezeptors gemacht werden. Die Tertiärstruktur des PTHR1 wurde durch die Erhöhung der Temperatur geändert und es ist erkennbar, dass das Protein von seiner nativen in die denaturierte Form übergeht.

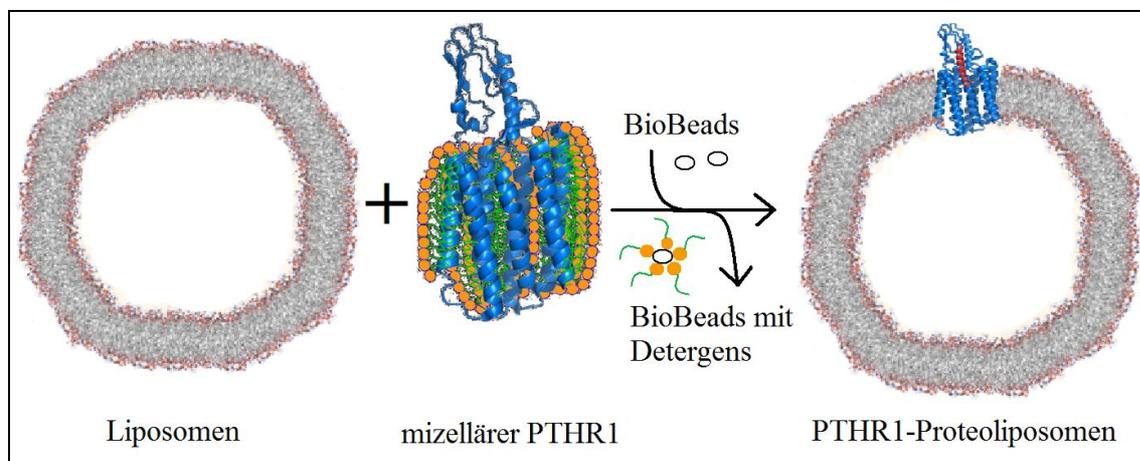


**Abbildung 6-13: Thermische Denaturierung des PTHR1 gemessen über die intrinsische Tryptophanfluoreszenz.** Die Anregungswellenlänge betrug 275 nm, die Emissionsspektren wurden im Bereich von 310 – 400 nm aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte bei einer analytischen Wellenlänge von 328 nm bei einer Rezeptorkonzentration von 1,3  $\mu\text{M}$ . Gemessen wurde mit dem Messpuffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, 0,1% DDM, 1 M L-Arginin, pH 7,4) in einer 1 cm x 1 cm Fluoreszenzküvette.

Auch eine Zugabe des Liganden PTH (1-37) zu PTHR1 erhöhte die thermische Stabilität nicht (Daten nicht gezeigt). Dabei wiesen die isolierten N-terminalen Domänen von Mitgliedern der Sekretin-Familie und Rezeptoren der Rhodopsin-Familien eine höhere Stabilität nach Bindung des Liganden auf (Runge *et al.*, 2007; Kobilka und Gether, 2002). Ein vergleichbarer Effekt konnte für PTHR1 nicht gezeigt werden. Vermutlich unterdrückt DDM die Bindung des Liganden an PTHR1 (Drechsler, 2006). Detailliertere Untersuchungen der Stabilität von PTHR1 mittels DSC waren nicht möglich, da das DSC-Signal von der Änderung der Wärmekapazität des Detergens DDM dominiert wurde. Die vorhergehende biophysikalische Charakterisierung und die Untersuchungen des PTHR1 ergaben, dass der mizelläre PTHR1 nach der Renaturierung höchstwahrscheinlich in seiner nativen Konformation vorlag. Eine Bestimmung der Aktivität wurde jedoch durch die Gegenwart des Detergens erschwert. Folglich wurde eine Entfernung des Detergens zur Bestimmung der biologischen Aktivität notwendig. Zur Stabilisierung des Rezeptors wurde eine Rekonstitution in Liposomen durchgeführt.

## 6.2 Rekonstitution des Parathormon-Rezeptors in Liposomen

Zur Stabilisierung des PTHR1 wurde der Rezeptor in künstliche Membransysteme eingebaut. Durch die Rekonstitution des PTHR1 in Liposomen sollte seine natürliche Membran-Umgebung simuliert werden. Die Gegenwart von Lipiden wirkt sich positiv auf die Stabilität und biologische Aktivität von Membranproteinen aus. Der störende Einfluss der Detergenzien auf den PTHR1 konnte durch deren Entfernung unterbunden werden. Im Einzelnen wurden Liposomen produziert, charakterisiert und mit dem renaturierten PTHR1 in DDM-Mizellen inkubiert und zu Proteoliposomen fusioniert (**Abbildung 6-14**).

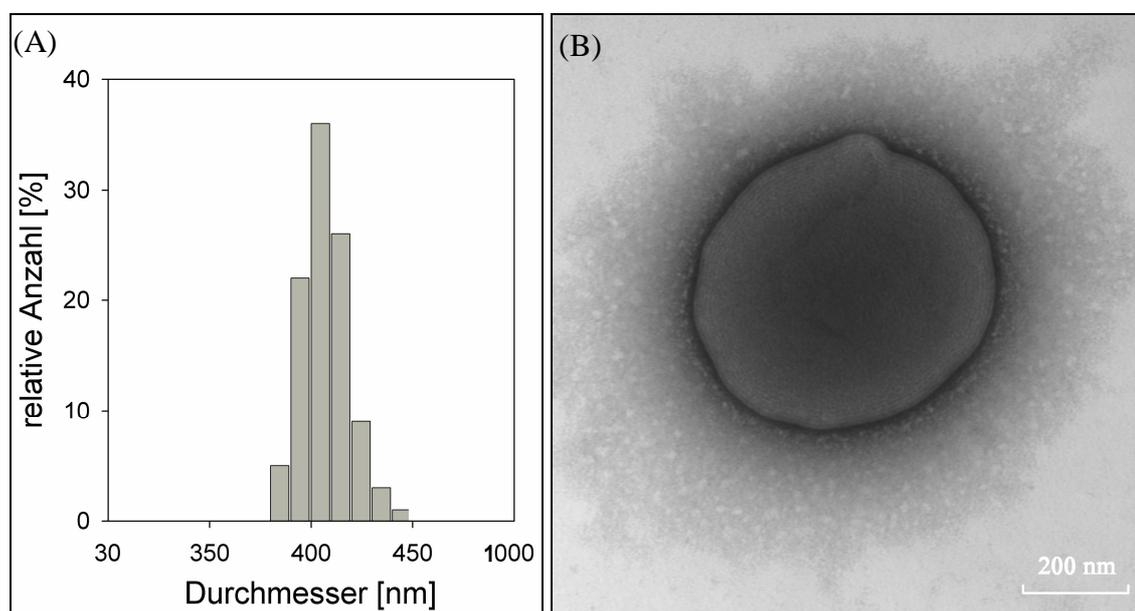


**Abbildung 6-14: Modell der Rekonstitution des renaturierten PTHR1 in Liposomen.** Die Liposomen wurden durch Extrusion produziert und mit dem renaturierten PTHR1 inkubiert. Durch Zugabe von BioBeads wurde das stabilisierende Detergens DDM entfernt und die Fusion des PTHR1 in die Liposomen katalysiert.

Zur Produktion von Liposomen wurde sowohl ein Gemisch von Lipiden aus einem *E.coli* polar Lipidextrakt, als auch aus reinem POPC eingesetzt. Die POPC-Liposomen stellen ein stark vereinfachtes, gut charakterisiertes und reproduzierbares System dar. Zahlreiche Indizien belegen, dass zur biologischen Aktivität oft spezifische Lipide notwendig sind, die bestimmte Anforderungen an die Kettenlänge erfüllen müssen. Aus diesem Grund wurde zur Etablierung des Rekonstitutionsprotokolls hauptsächlich ein *E.coli* polar Lipidextrakt eingesetzt. Die Rekonstitution in POPC-Liposomen diente als alternative Methode, um in anschließenden Experimenten gezielt den eventuellen Einfluss von Lipiden mit unterschiedlichen Kettenlängen oder Kopfgruppen zu ermöglichen. Die PTHR1-Proteoliposomen aus *E.coli* wurden für alle Experimente verwendet, falls nicht anders gekennzeichnet.

### 6.2.1 Herstellung von Liposomen

Die Liposomen wurden durch Extrusion eines wässrigen Lipidgemischs mit einer Konzentration von 20 mg/ml durch eine Polycarbonat-Membran produziert. Die Größe der Vesikel wurde durch eine definierte Porengröße der Membran von 400 nm festgelegt. Die Suspension wurde 20-fach durch die Membran gepresst und die Größe der entstandenen Vesikel wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie überprüft. Dafür wurden 200  $\mu$ l Vesikellösung mit Puffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4) auf 2,5 mg/ml verdünnt. Nach Befüllen der Küvette wurde die Messung am Zetasizer im *counts*-abhängigen Modus gestartet.

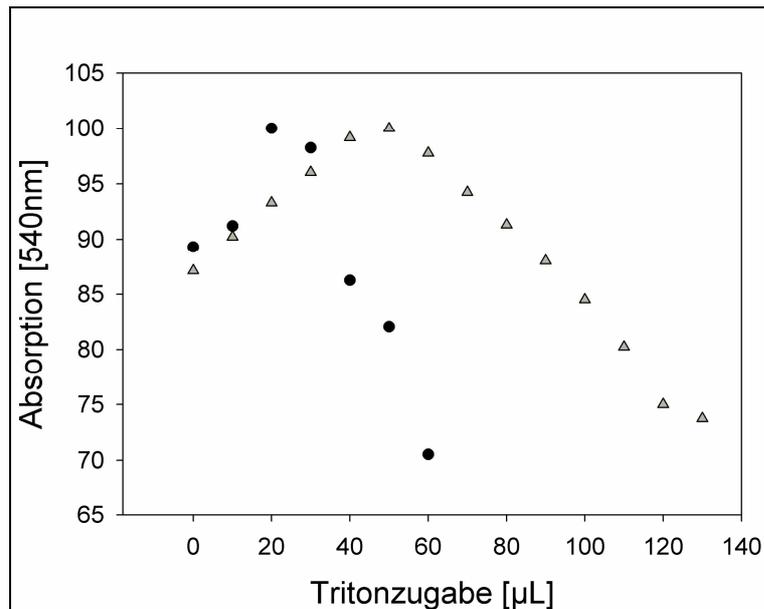


**Abbildung 6-15: Analyse der hergestellten Liposomen mit Photonenkorrelationsspektroskopie und negativ kontrastierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen.** (A) Darstellung der Partikelgrößenbestimmung am Zetasizer. Die Vesikel wurden bei einer Lipidkonzentration von 2,5 mg/ml in 100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4 gemessen. Die Messung bestätigte eine durchschnittliche Größe von 400 nm, bei einer kCounts-Zahl von 152,3 und einem Poly-Index von 0,167. (B) Aufnahme der produzierten Liposomen aus *E.coli* polar Lipidextrakt. Ein elektronenmikroskopisches Bild wurde von negativ kontrastierten Liposomen hergestellt. 1  $\mu$ l der Liposomen-Suspension wurde auf ein Kupfer-*grid* aufgetragen und mit mit 0,1% Uranylazetat kontrastiert.

Die Photonenkorrelationsspektroskopie und elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten eine durchschnittliche Größe der Vesikel von 400 nm (**Abbildung 6-15**). Diese Liposomen wurden zur Rekonstitution des PTHR1 eingesetzt. Eine Untersuchung der PTHR1-Proteoliposomen mittels Zetasizer bestätigte, dass die Vesikelgröße unverändert blieb und die hergestellte Liposomenstruktur nicht durch die Solubilisierung mit Detergens und Fusion mit PTHR1 nicht beeinflusst wurde.

## 6.2.2 Herstellung von PTHR1-Proteoliposomen

Zur Herstellung von Proteoliposomen wurden die produzierten Liposomen mit Detergens Triton X-100 solubilisiert. Die Solubilisierung kann durch die Änderung der Absorption verfolgt werden. Reine Liposomen geben bei 540 nm ein entsprechendes Streulichtsignal. Bei Zugabe und Einbau des Detergens in die Lipiddoppelschicht wird ein Anstieg der Absorption beobachtet.



**Abbildung 6-16: Solubilisierung von Liposomen durch das Detergens Triton X-100.** Die Inkorporation des Detergens Triton X-100 in Liposomen kann spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 540 nm detektiert werden. Das eingesetzte Detergensvolumen ist gegen die normierte Absorption wurde aufgetragen. Die Solubilisierung von 4 ml einer 5 mg/ml Liposomen-Suspension bestehend aus einem *E.coli polar* Lipidextraktes (schwarze Punkte) in 100 mM NaP, pH 7,4 erfolgte durch schrittweise Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  einer 0,1% Triton Tx-100-Lösung. Während der Solubilisierung der Liposomen änderte sich das Streulichtsignal. Der Beginn und der Grad der Solubilisierung der Liposomen korreliert mit dem gemessenen Streulichtsignal. Enthalten Liposomen 30% Cholesterin, so wurde eine erhöhte Menge an Detergens zur Solubilisierung benötigt (graue Dreiecke).

Sobald die Liposomen mit Detergens gesättigt waren, erfolgte kein Anstieg der Absorption. Dieser empirische Wert wurde als 100%-Wert angenommen. Durch weitere Zugabe des Detergens wurden die Liposomen solubilisiert und die Absorption sank. Die Zugabe von Detergens erfolgte bis ein Wert erreicht wurde, der einer Absorption von 75% des ursprünglichen Maximalwerts entsprach (**Abbildung 6-16**). Dieser Absorptionswert entsprach einem Solubilierungsgrad von 25% der Liposomen. Bei dem verwendeten Solubilierungsgrad von 25% erfolgte die Zugabe von 1 mg/ml des renaturierten PTHR1.

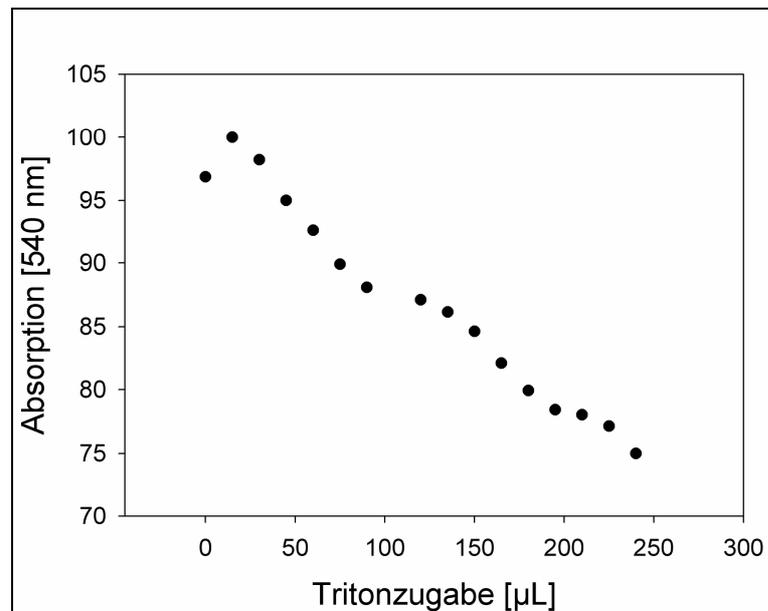
Dieser Ansatz wurde für 15 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde zur Entfernung des Detergens in einem Abstand von je einer Stunde, 3-mal 120 mg BioBeads zum Ansatz gegeben und bei RT inkubiert (Tabelle 6-5). BioBeads sind Polystyren Beads, die gezielt lipophile Stoffe absorbieren. Anschließend wurden 360 mg BioBeads dem Ansatz zugefügt und über Nacht bei 4 °C und unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte wieder in einem Abstand von einer Stunde die Zugabe von jeweils 180 mg BioBeads zu dem Rekonstitutionsansatz (Tabelle 6-5). Durch die Entfernung des Detergens wurde wieder eine charakteristische Opaleszenz der Proteoliposomen-Lösung beobachtet.

Tabelle 6-5: Menge und Inkubationsschritte von zugegebenen BioBeads zum Rekonstitutionsansatz von Liposomen aus E.coli polar Lipidextrakt.

Schritt	Menge an BioBeads (mg)	Anzahl	Inkubationszeit (h)	Temperatur (°C)
1	120	3	1	20
2	360	1	Über Nacht	4
3	180	2	1	4

Der essentielle Schritt für eine erfolgreiche Rekonstitution ist die langsame Entfernung des Detergens am Beginn der Prozedur. Je langsamer beim PTHR1 das Detergens entfernt wurde, desto höher war die Ausbeute an rekonstituiertem PTHR1 in den Liposomen.

Die biologischen Membranen sind grundsätzlich aus Lipiden aufgebaut, in denen unterschiedliche Konzentrationen von Cholesterin eingelagert sein können. Bei der Rhodopsin-Familie konnte unmittelbar am  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor assoziiertes Cholesterin nachgewiesen werden. Dieses war nach der Isolierung des Rezeptors aus der natürlichen Membran gebunden und es wurde eine stabilisierende Wirkung vermutet. Aus diesem Grund sollte den PTHR1-Proteoliposomen ebenfalls Cholesterin zugesetzt werden. Bei Zusatz von Cholesterin zu den Vesikeln änderte sich die benötigte Menge an Triton X-100 (**Abbildung 6-16**). Der gleiche Solubilisierungsgrad der Liposomenmembran bei der Verwendung von 30% Cholesterin wurde erreicht, indem mehr Detergens eingesetzt wurde. Aus diesem Grund musste im nächsten Arbeitsschritt zum Rekonstitutionsansatz eine größere Menge an BioBeads zur Entfernung des Detergens zugegeben werden. Die Vorgehensweise im Rekonstitutionsprozess war analog der Tabelle 6-5. Nach Schritt 2 (Tabelle 6-5) folgten bis zu 8 Zugaben von 180 mg BioBeads zum Rekonstitutionsansatz.



**Abbildung 6-17: Solubilisierung von POPC-Liposomen durch Detergens Triton X-100.** Dokumentation der Änderung des Streulichtsignals bei Zugabe des Detergens Triton X-100. Die Änderung konnte spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 540 nm detektiert werden. Das eingesetzte Detergensvolumen wurde gegen die normierte Absorption aufgetragen. Die Solubilisierung von 4 ml einer 5 mg/ml POPC-Liposomen-Suspension in 100 mM NaP, pH 7,4 erfolgte durch schrittweise Zugabe von 10 µl einer 0,1% Triton X-100-Lösung.

Die Rekonstitution des PTHR1 wurde auch in Vesikel vorgenommen, die nur aus dem Lipid POPC bestanden. Die Durchführung zur Herstellung von POPC-Vesikeln erfolgte analog zu dem entwickelten Protokoll für Liposomen aus einem *E.coli* polar Lipidextrakt. Der Einsatz von POPC-Liposomen zeigte ein anderes Solubilisierungsverhalten als Liposomen aus dem *E.coli* polar Lipidextrakt. Zur Solubilisierung der POPC-Liposomen musste 4-mal mehr Detergens eingesetzt werden (**Abbildung 6-17**).

Tabelle 6-6: Menge und Inkubationsschritte der zum Rekonstitutionsansatz zugegebene BioBeads bei POPC-Liposomen.

Menge an BioBeads (mg)	Anzahl	Inkubationszeit (h)	Temperatur (°C)
360	3	1	20
1440	1	über Nacht	4
360	5	1	4

Eine vollständige Entfernung des Detergens konnte nur durch eine erhöhte Menge an BioBeads erreicht werden. Die BioBeads Konzentration betrug 4 g BioBeads, 4-mal so hoch, als bei der Rekonstitution in *E.coli* polar Lipidextrakt (Tabelle 6-6).

Nach der letzten Zugabe wurde der Überstand mit einer 5 ml Luerlock-Spritze und einer Kanüle von den BioBeads abgetrennt. Die Proteoliposomen-Lösung konnte vollständig zurückgewonnen werden, da BioBeads nicht durch die Kanüle passten. Die Proteoliposomen-Lösung wurde für 15 min, bei 10 °C und 60.000 rpm im Rotor TLA-100.4 zentrifugiert.

Das Proteoliposomen Pellet wurde 3-mal im Rekonstitutionspuffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen und das Pellet bei 4 °C gelagert.

Nachdem das Rekonstitutionsprotokoll auf die eingesetzten Lipide angepasst wurde, konnten sowohl Liposomen aus einem *E.coli* polar Lipidextrakt, als auch aus reinem POPC zur Rekonstitution eingesetzt werden. Die PTHR1-POPC-Proteoliposomen wurden erfolgreich zu *giant* unilamellaren Vesikel (GUV) fusioniert. Die GUV-Proteoliposomen wurden produziert, um diese in einem Bindungsassay einzusetzen. Die GUV-Proteoliposomen haben eine durchschnittliche Größe von 3 – 8 µm und ähneln aufgrund ihrer Größe dem von Membranfraktionen von Zellen.

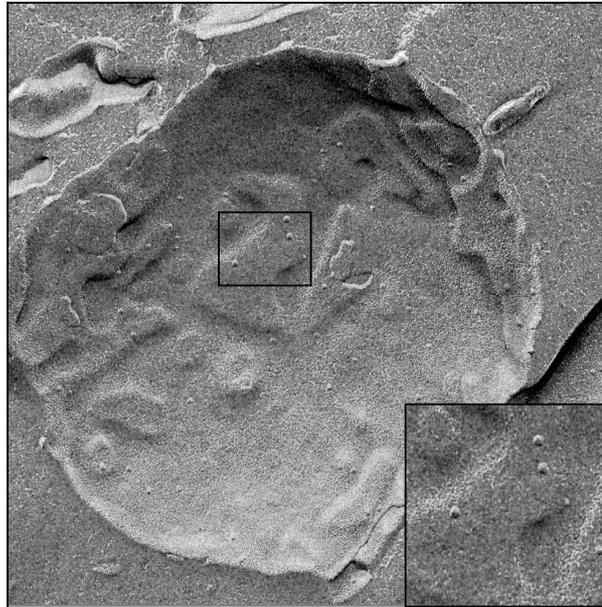
### 6.2.3 Nachweis der Rekonstitution des PTHR1 in Liposomen

#### 6.2.3.1 Gefrierbruchaufnahmen

Die Gefrierbruchtechnik liefert Informationen über eine erfolgreiche Rekonstitution von Membranproteinen. Bei diesem Vorgang wird die Liposomendoppelschicht auseinandergerissen und eingebaute Membranproteine werden in einer der entstehenden Mono-Lipidschichten zurückgehalten und ragen aus dieser Schicht heraus. Das Auftragen einer Platinschicht dient der Kontrastierung im Elektronenmikroskop. Da dieses in einem 45° Winkel zur Probe erfolgte, wurde auf die Mono-Lipidschicht hinter dem Membranprotein relativ zur Platinelektrode kein Platin aufgetragen. Das fehlende Kontrastmittel bewirkte im Elektronenmikroskop eine Schattierung eines Punkts neben dem rekonstituierten PTHR1 und dieser wird als Punkt innerhalb des Vesikels dargestellt (**Abbildung 6-18**). In mehreren betrachteten Vesikeln konnte der Einbau des PTHR1 bestätigt werden.

Für die Gefrierbruchaufnahmen wurden 400 µg/ml PTHR1 in Liposomen aus *E.coli* polar Lipidextrakt rekonstituiert (6.2.2). Das eingesetzte Lipid-zu-Protein-Verhältnis (LPR) betrug 30:1. Nach Entfernung des Detergens durch BioBeads und dem Waschen des PTHR1-

Proteoliposomenpellet wurden 2  $\mu\text{l}$  der PTHR1-Proteoliposomen zwischen zwei Kupferplatten aufgetragen. Die erhaltene Probe wurde umgehend in flüssigem Ethan eingefroren und die Gefrierbrüche produziert. Nach Abbau der organischen Materialien durch Chromschwefelsäure und dem Waschen der Bruchstücke in destilliertem Wasser, wurden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erstellt.



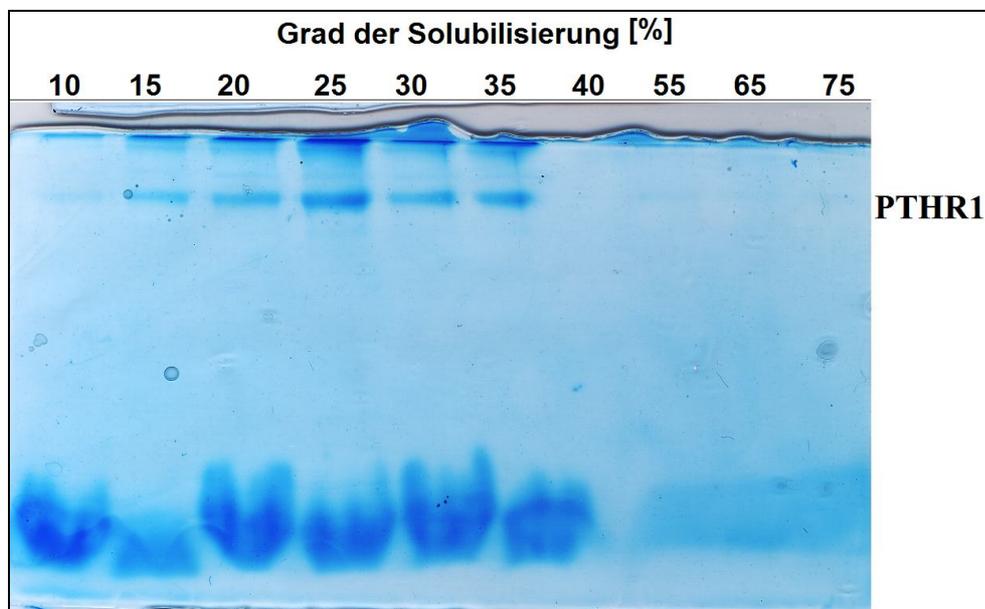
**Abbildung 6-18: Gefrierbruch-Aufnahmen der PTHR1-Proteoliposomen aus *E.coli* polar Lipidextrakt.** Zur Anfertigung von Gefrierbruch-Aufnahmen wurden 2  $\mu\text{l}$  des Rekonstitutionsansatzes zwischen zwei Kupferplatten in flüssigem Ethan eingefroren. Zur Rekonstitution wurden 400  $\mu\text{g/ml}$  PTHR1 mit 12  $\text{mg/ml}$  Liposomen aus *E.coli* polar Lipidextrakt (LPR 30:1) eingesetzt. Das Sandwich aus den Kupferplatten wurde in eine vorgespannte Gefrierbruch-Apparatur eingelegt. Zeitgleich zum Auslösen der Gefrierbruchapparat wurde eine 3 nm Platinschicht in einem  $45^\circ$  Winkel auf die Rekonstitutionsprobe aufgetragen (Die Platinkathodenspannung betrug 1,58 kV, 58 mA). Die produzierten Brüche wurden durch eine 20 nm Kohlenstoffschicht stabilisiert (Die Kohlenstoffkathodenspannung betrug 1,89 kV bei 89 mA). Die gewaschenen Fragmente wurden auf elektronmikroskopische *grids* übertragen und eine Analyse im Elektronenmikroskop konnte vorgenommen werden.

Für Funktionsstudien mussten die PTHR1-Proteoliposomen unilamellar vorliegen. Bei unilamellaren Vesikeln ist die Mehrheit des rekonstituierten PTHR1 an der Oberfläche lokalisiert. Im Gegensatz dazu tragen multilamellare Vesikel eine verminderte Anzahl Rezeptoren auf der Oberfläche. Eine Lagerung der PTHR1-Proteoliposomen bei einer Temperatur unter  $4^\circ\text{C}$  bewirkt die Ausbildung von multilamellaren Strukturen. Die gefrorene Probe wurde zur Analyse mittels elektronenmikroskopischer Gefrierbruch-Aufnahmen erneut mit dem Extruder behandelt, um überwiegend unilamellare Vesikel zu erhalten.

Die Gefrierbruch-Aufnahmen bildeten die Basis für weitergehende Untersuchungen des rekonstituierten PTHR1 und diese zeigte qualitativ eine erfolgreiche Rekonstitution des PTHR1

in Liposomen. Im nächsten Schritt sollte die Konzentration an PTHR1 in den Liposomen bestimmt werden. PTHR1 aggregiert während der Rekonstitution, sobald das stabilisierende Detergens DDM entfernt und der Rezeptor nicht in die Liposomen eingebaut wird. Zwar stört der nicht inkorporierte Anteil des PTHR1 nicht bei der Analyse der Gefrierbrüche, bei einer Messung der Proteinkonzentration ausgehend von dem Pellet, würde die Konzentration an unlöslichen PTHR1 in die Messung mit einfließen. Aufgrund dessen sollten die Proteoliposomen vom unlöslichen PTHR1 abgetrennt werden. Die Abtrennung der Proteoliposomen von mizellären PTHR1 kann durch Flotation in einer Lösung mit höherer Viskosität erreicht werden.

### 6.2.3.2 Saccharose-Gradienten-Flotation



**Abbildung 6-19: Coomassie gefärbtes Gel des Rekonstitutionsansatzes nach der Saccharose-Gradienten-Flotation.** 100  $\mu$ l der PTHR1-Proteoliposomen wurden mit 100  $\mu$ l einer 2,5 M Saccharose-Lösung im Flotationspuffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4) gemischt. Diese wurde dann mit 800  $\mu$ l einer 1 M Saccharose-Lösung im Flotationspuffer überschichtet. Diese Lösung wurde 100  $\mu$ l des Flotationspuffers überschichtet. Die Flotation erfolgte für 1 h, bei 13000 rpm und 4 °C in einer Tischzentrifuge. Nach der Flotation wurde die oberste Schicht mit den PTHR1-Proteoliposomen abgenommen und mittels SDS-PAGE (15% Acrylamid) analysiert. Die Zahlenwerte geben an, bei welchem Grad der Solubilisierung die jeweilige Probe entnommen wurde.

Die Saccharose-Gradienten-Flotation (SGF) diente der Abtrennung des mizellären PTHR1 von den PTHR1-Proteoliposomen. Durch einen Entzug des Detergens Triton X-100 und des PTHR1 stabilisierenden Detergens DDM aggregierte der nicht rekonstituierte PTHR1. 100  $\mu$ l der PTHR1-Proteoliposomen wurden mit einer 2,5 M Saccharoselösung im Verhältnis 1:1

gemischt. 800 µl einer 1 M Saccharoselösung überschichtete diese Schicht der PTHR1-Proteoliposomen. Im nächsten Schritt wurde diese mit 100 µl Flotationspuffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4) überschichtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation in einer Tischzentrifuge für mindestens 1 h bei 4 °C. Nicht eingebauter PTHR1 sedimentierte im Saccharosekissen, während die Proteoliposomen in die Pufferschicht flotierte (Kühlbrandt, 2003; Meyenburg, 2000).

Nach einer Analyse mittels einer SDS-PAGE konnten Aussagen über die Effizienz der Rekonstitution getroffen werden. Eine schnelle Prozessführung während der Rekonstitution bedingte, dass der Einbau des PTHR1 in die Liposomen nicht quantitativ erfolgte. Die Analyse der Pellets nach der SGF zeigte, dass die Rekonstitution des PTHR1 qualitativ erfolgreich war (Anhang). Eine Variation der eingesetzten Menge an Triton X-100 im Solubilisierungsprozess und dessen Einfluss auf die Rekonstitution konnte direkt nach einer SGF analysiert werden. In der Flotationsfraktion der Proteoliposomen (Abbildung 6-19) wurde PTHR1 nur in den Spuren nachgewiesen, die dem jeweiligen Solubilisierungsgrad der Liposomen von 10 bis 75% PTHR1 entsprachen. Für den PTHR1 ergab sich ein Rekonstitutionsfenster bei einem Solubilisierungsgrad von 10 – 75%.

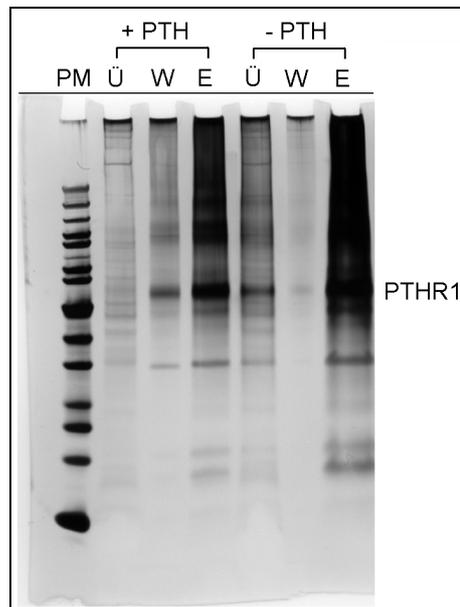
Die optimierte Rekonstitution führte bei 25% Solubilisierung der Liposomen zur höchsten Ausbeute an rekonstituiertem PTHR1. Die quantitative Analyse ergab in der Probe, die einem Solubilisierungsgrad von 25% entsprach, eine Proteinkonzentration von 524 µg/ml. Die Ausbeute an rekonstituiertem PTHR1 liegt bei 53% bezogen auf die eingesetzte Proteingesamtmenge.

### **6.3 Analyse der Ligandenbindung des rekonstituierten Parathormon-Rezeptors in Liposomen**

Die Analyse der biologischen Aktivität des rekonstituierten PTHR1 wurde durch die Bindung des Liganden PTH untersucht. Dabei sollte eine Quantifizierung der funktionellen PTHR1-Spezies, rekonstituiert in Liposomen, vorgenommen werden. Die Ligandenbindung des PTH an den rekonstituierten PTHR1 würde eine erfolgreiche Renaturierungsstrategie und eine funktionelle Rekonstitution bestätigen. Bei Liganden der Sekretin-Familie erfolgt die Bindung in zwei Schritten (**Abbildung 4-6**). Aus diesem Grund muss der N-Terminus des Liganden, zur Bindung an PTHR1, frei zugänglich sein. Alle Modifizierungen durften nur am C-Terminus des Liganden vorgenommen werden.

### 6.3.1 Pulldown-Assay

Der eingesetzte *pulldown*-Assay sollte eine qualitative Analyse aktiver PTHR1-Spezies in den Proteoliposomen ermöglichen. Eine PTH-Variante (1-37) wurde mit einem C-terminalen Cystein von NovoNordisk zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 6-20: Silbergefärbtes Gel einer SDS-PAGE des *pulldown*-Assays.** Streptavidin *magnetic beads* wurden mit C-terminal biotinylierten PTH (1-37) gekoppelt. Die Inkubation von 20  $\mu$ l PTHR1-Proteoliposomen mit den gekoppelten PTH-*magnetic beads* erfolgte für 1 h auf einem Orbitalshaker bei RT. Zur Feststellung der unspezifischen Wechselwirkungen wurden unmodifizierte *magnetic beads* ebenfalls mit 20  $\mu$ l PTHR1-Proteoliposomen inkubiert. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die *magnetic beads* in 100 mM NaP, 150 mM NaCl, 0,005% TWEEN 20, pH 7,4 gewaschen. Die Elution der gebundenen PTHR1-Proteoliposomen erfolgte durch zwölfstündige Inkubation der *magnetic beads* mit 2-fach SDS-PAGE Probenpuffer (124 mM Tris/HCl, 100 mM DTT, 20% Glycerin, 0,2% Bromphenolblau, pH 6,8) bei RT. Die Analyse der Proben des Überstands, des Wasch- und Elutionschritts erfolgte durch eine Silberfärbung einer SDS-PAGE (12% Acrylamid).

Zur optimalen Zugänglichkeit des Liganden für den Rezeptor nach der Kopplung an eine Oberfläche, wurde das Cystein des Liganden mit einem PEGylierten-Biotin modifiziert. Auf diese Weise konnte PTH über einen langen flexiblen *linker* an eine mit Streptavidin beschichtete Matrix gekoppelt werden. Die Bindung von PTH-Biotin zu nPTHR1 konnte mittels Biacore und einer Dissoziationskonstante von 12  $\mu$ M charakterisiert werden. Die Kopplung von Biotin an PTH veränderte die Eigenschaften des Liganden nicht.

PTH-Biotin wurde mit Streptavidin beschichteten *magnetic beads* für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die *magnetic beads* mit Bindungspuffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen. Im Anschluss wurden diese mit 20 µl PTHR1-Proteoliposomen für 1 h bei RT auf einem Orbitalshaker inkubiert. Die Negativkontrolle bestand aus ungekoppelten *magnetic beads*. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die *magnetic beads* erneut mit 50 µl Waschpuffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, 0,005% TWEEN 20, pH 7,4) gewaschen. Zur Analyse wurden die gewaschenen *magnetic beads* im SDS-Probenpuffer aufgenommen und über Nacht inkubiert.

Die Analyse des Assays zeigte, dass für die PTHR1-Proteoliposomen kein signifikanter Unterschied zwischen dem Bindungsexperiment und der Negativkontrolle besteht (**Abbildung 6-20**). Somit konnte mit diesem Assay keine Bindung des PTHR1 an den Liganden nachgewiesen werden. Die unspezifischen Wechselwirkungen des in den Liposomen eingebauten Rezeptors mit den *magnetic beads* waren zu dominant. In weiteren Versuchen wurden die Waschschrte mit höheren Detergenkonzentrationen wiederholt, jedoch ohne sichtbare Verbesserung des Ergebnisses. Das Problem bei diesen Experimenten war eine unspezifische Interaktion der PTHR1-Proteoliposomen mit den *magnetic beads*. Unspezifisch gebundene PTHR1-Proteoliposomen ergeben in der Analyse der SDS-PAGE ein PTHR1-Signal, da dieser in den Liposomen eingebaut sind. Aus diesem Grund wurde PTHR1-Signal erhalten, unabhängig davon ob der Rezeptor oder die Liposomen mit den *magnetic beads* unspezifisch interagierten. Aufgrund dessen war eine Auswertung der Signale nicht möglich, da bereits geringe unspezifische Wechselwirkungen der PTHR1-Proteoliposomen starke PTHR1-Signale ergaben.

### **6.3.2 Ligandenbindungsexperimente mit radioaktivem Parathormon**

Der Nachweis der Ligandenbindung der PTHR1-Proteoliposomen wurde entweder durch hohe unspezifische Wechselwirkungen der Liposomen oder durch den rekonstituierten PTHR1 erschwert. Die Lösung dieses Problems erforderte eine sensitivere Methode als einen *pull-down*-Assay.

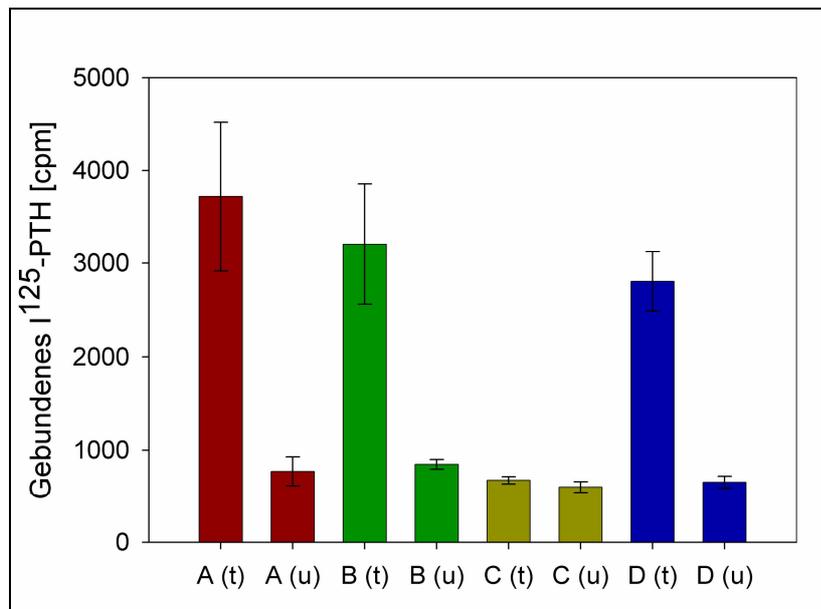
Die sensitivste Methode stellt ein Filterbindungs-Assay unter Einsatz von Radioliganden dar. Für den Filterbindungs-Assay wurde ein PTH-Derivat (PTH 1-34, Tyr 34 Iod) mit radioaktivem Iod eingesetzt. Der radioaktive Ligand wurde konzentrationsabhängig mit einem unmarkierten PTH (1-37) in Kompetitions-Experimenten vom PTHR1 verdrängt. Dabei wurde die totale und unspezifische Bindung des radioaktiven Parathormons gemessen. Eine spezifische Aktivität wurde aus der Differenz zwischen totaler und unspezifischer Bindung des radioaktiven Parathormons berechnet. Dieser Filterbindungs-Assay wurde bei Membranpräparationen einer

HEK293-Zelllinie eingesetzt. Diese HEK293-Zelllinie exprimiert den PTHR1 an ihrer Zelloberfläche. Dieses System sollte auf die PTHR1-Proteoliposomen übertragen werden. Die Funktion einer biologischen Membran sollte hierbei von Liposomen übernommen werden.

### 6.3.3 Filterbindungs-Assay mit PTHR1-Proteoliposomen

Angelegte Verdünnungsreihen und eine Analyse der Filter bewiesen, dass eine direkte Übertragung des zellulären Assays auf die PTHR1-Proteoliposomen nicht möglich ist. Die PTHR1-Proteoliposomen waren zu flexibel und wurden von den Filterporen nicht zurückgehalten. Der Einsatz von Cholesterin zu den PTHR1-Proteoliposomen und die Verwendung von PTHR1-GUV führten ebenfalls zu einem nicht auswertbaren Ergebnis. Daher wurde ein Experiment angesetzt, welches sich von dem etablierten Filterbindungs-Assay unterscheidet.

Die PTHR1-Proteoliposomen wurden mit dem radioaktiven Liganden für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden diese Ansätze mit den HEK293-Zellen für 1 h inkubiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die inkubierten Ansätze über Filterporen abgesaugt. Im Anschluss erfolgten das Waschen und die Analyse der Filter. Die eingesetzten Filter hatten dabei eine Porengröße von 400 nm, so dass die Proteoliposomen durchgesaugt werden konnten und die Filterporen nicht verstopften. Wenn die PTHR1-Proteoliposomen in der Lage wären den radioaktiven Liganden zu binden, würde dieser Komplex über die Filter abgetrennt werden. Die Analyse der HEK293-Zellen auf dem Filter bestätigte dies. In Abhängigkeit der eingesetzten PTHR1-Proteoliposomen nahm das Signal des radioaktiven Liganden ab. In der **Abbildung 6-21** sind die korrespondierenden Säulenpaare aus totaler (t) und unspezifischer (u) Bindung dargestellt. Als direkte Positivkontrolle wurden die totale und unspezifische Bindung der HEK293-Zellen bestimmt. Es wurde gezeigt werden, dass leere Liposomen keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit der HEK293-Zellen nahmen (**Abbildung 6-21**, A). Leere Liposomen binden den Liganden PTH nicht (**Abbildung 6-21**, B). Es ist ersichtlich, dass in Anwesenheit von PTHR1-Proteoliposomen das gemessene Signal beeinflusst wird. Bei einer PTHR1-Proteoliposomen Konzentration von 200 nM wurde kein Unterschied zwischen der totalen und unspezifischen Bindung detektiert (**Abbildung 6-21**, C).



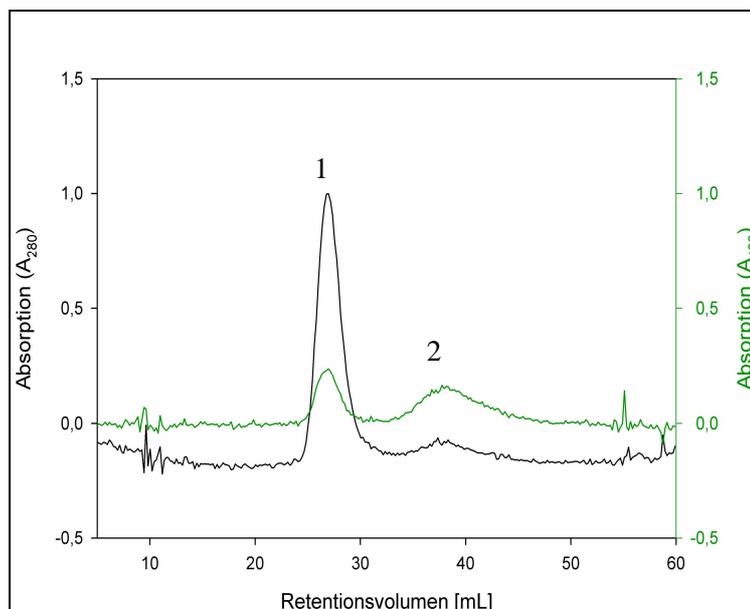
**Abbildung 6-21: Kompetitiver Radioligandenbindungs-Assay mit HEK293-Zelllinie und PTHR1-Proteoliposomen.** Gleichfarbige Säulen entsprechen jeweils der totalen (t) und der unspezifischen (u) Bindung. Als Positivkontrolle wurde die totale und unspezifische Bindung von HEK293-Zellen (A) und in Gegenwart von leeren Liposomen (B) bestimmt. Die Inkubation des radioaktiven PTH mit PTHR1-Proteoliposomen erfolgte bei einer Konzentration von 200 nM (C) und 2 pM (D). Diese Ansätze wurden anschließend mit 100 µl der HEK293-Zellen inkubiert. Die PTHR1-Proteoliposomen und der radioaktive Ligand wurden durch die Filterporen abgetrennt. Abschließend wurden die Filter dreimal in 100 mM NaP, 150 mM NaCl, 0,005 TWEEN 20, pH 7,4 gewaschen und im  $\gamma$ -Strahlenszähler analysiert.

Bei PTHR1-Proteoliposomen Konzentration von 2 pM konnte ein signifikantes Signal der Membranfragmente auf den Filtern detektiert werden (**Abbildung 6-21, D**). Das Signal für eine unspezifische Bindung befand sich bei allen Ansätzen auf einem gleichbleibenden niedrigen Niveau.

Diese Daten belegten qualitativ die Bindungsfähigkeit der PTHR1-Proteoliposomen. Eine quantitative Auswertung über den wirklichen Anteil funktionell, rekonstituierter Rezeptoren und deren Affinität konnte anhand dieser Daten nicht vorgenommen werden.

#### 6.3.4 Ko-Elutionsexperimente mit PTH gekoppelt an das *enhanced cyan fluorescence protein* (ECFP)

Die Ko-Elutionsexperimente wurden mit dem PTHR1-Proteoliposomen und einem Fusionsprotein aus PTH-ECFP durchgeführt. Die Fusion des PTH mit dem ECFP erhöhte die Löslichkeit des Liganden deutlich und reduzierte die Neigung des Liganden zur Aggregation.



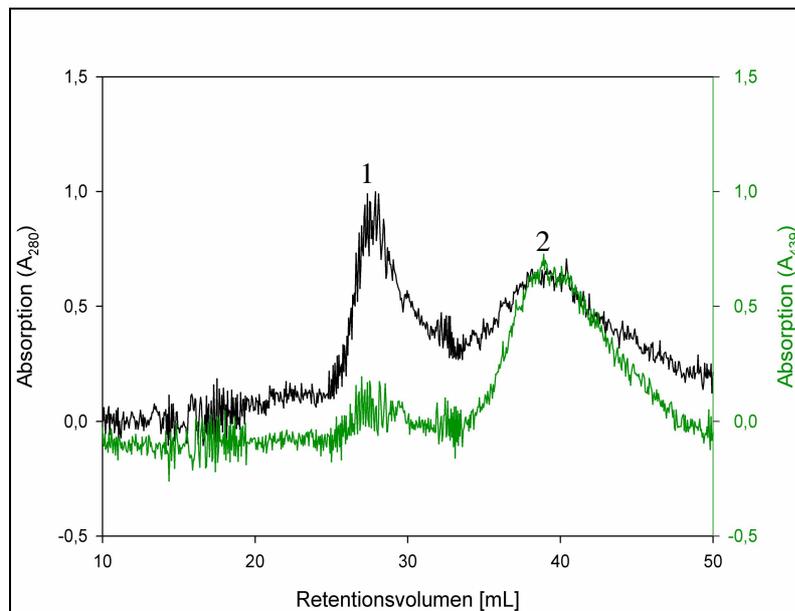
**Abbildung 6-22: Ko-Elutionsexperimente mit einer Sephacryl S-200 HR Chromatographiesäule.**

Darstellung des normierten Chromatographielaufs von PTHR1-Proteoliposomen inkubiert mit PTH-ECFP. Die Absorptionsänderung der Wellenlänge ( $A_{280}$  und  $A_{439}$ ) wurde gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. Proben der PTHR1-Proteoliposomen wurden mit einem Überschuss an PTH-ECFP für 15 min bei 4 °C inkubiert. Von den inkubierten Proben wurden 500  $\mu$ l in Gelfiltrationspuffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min aufgetragen. Die PTHR1-Proteoliposomen eluierten bei einem Retentionsvolumen von 28 ml (Peak 1, schwarze Linie). Dabei eluierte gleichzeitig das gebundene PTH-ECFP (Peak 1, grüne Linie). Bei einem Retentionsvolumen von 38 ml eluierte das nicht gebundene PTH-ECFP von der Chromatographiesäule (Peak 2, grüne Linie).

Die Produktion des PTH-ECFP erfolgte im *fed-batch*-Verfahren als SUMO-Fusionsprotein und konnte in hoher Reinheit isoliert werden (10.1.1, 10.1.3). Die Analyse der Ligandenbindung von PTH-ECFP an nPTHR1 mittels isothermer Titrationskalorimetrie bestätigte, dass die Bindung nicht beeinflusst wurde (10.1.5).

Die rekonstituierten PTHR1 Proben wurden jeweils mit dem Fusionsprotein aus PTH- oder GLP-ECFP<sup>8</sup> als Negativkontrolle inkubiert. GLP ist ebenfalls ein Peptidligand. Mit diesem Peptid konnte eine unspezifische Bindung an den rekonstituierten PTHR1 überprüft werden. Die Ko-Elutionsexperimente wurden auf einer selbstgepackten Sephacryl S-200 HR durchgeführt. In **Abbildung 6-22** ist ein normiertes Chromatogramm eines Gelfiltrationslaufs von PTHR1-Proteoliposomen inkubiert mit PTH-ECFP gezeigt. Die analytischen Wellenlängen lagen für Liposomen bei 280 nm und für PTH-ECFP bei 439 nm.

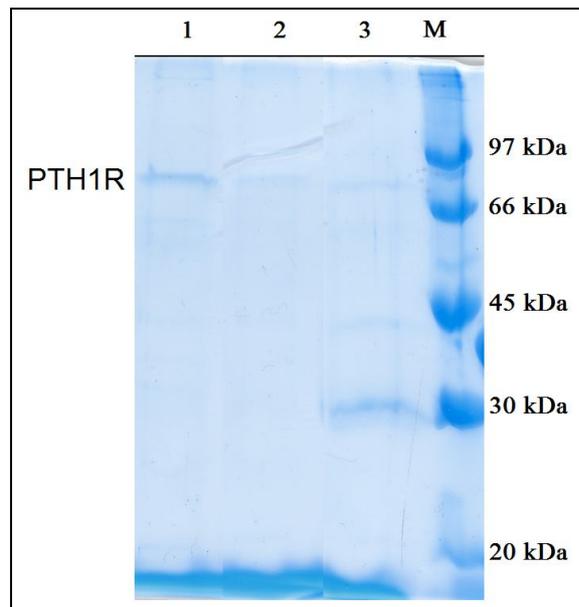
<sup>8</sup> Bei GLP handelt es sich um den natürlichen Liganden für den *Glucagon-like-peptide-1* Rezeptor. Dieser gehört ebenfalls zur Sekretin-Familie der GPCR.



**Abbildung 6-23: Ko-Elutionsexperimente mit einer Sephacryl S-200 HR.** Darstellung des normierten Chromatographielaufs von leeren Liposomen inkubiert mit PTH-ECFP. Die Absorptionsänderung der Wellenlänge ( $A_{280}$  und  $A_{439}$ ) wurde gegen das Retentionsvolumen aufgetragen. 500  $\mu$ l der Liposomensuspension inkubiert mit PTH-ECFP im Gelfiltrationspuffer (100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4) wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min aufgetragen. Liposomen eluierten bei einem Retentionsvolumen von 28 ml (Peak 1, schwarze Linie). Bei einem Retentionsvolumen von 38 ml eluierte das nicht gebundene PTH-ECFP von der Chromatographiesäule (Peak 2, grüne Linie). Eine geringe Absorptionsänderung wurde bei der Wellenlänge 439 nm zu beobachten. Dieser Signalanstieg wurde vom Streulichtanteil von leeren Liposomen verursacht. Der Hauptanteil des PTH-ECFP eluierte bei 39 ml.

Im ersten Peak, bei einem Retentionsvolumen von 28 ml, wurden spezifische Absorptionen beider Wellenlängen detektiert. Der erste Peak enthielt einen Komplex aus PTHR1-Proteoliposomen und PTH-ECFP (Peak 1). Der zweite Peak zeigte eine deutliche Absorption bei der ECFP-spezifischen Wellenlänge von 439 nm. Daraus folgte, dass ungebundenes PTH-ECFP bei einem Retentionsvolumen von 39 ml von der Chromatographiesäule eluiert wurde (Peak 2, grüne Linie).

Unspezifische Wechselwirkungen des Fusionsproteins PTH-ECFP mit Liposomen wurden getestet, indem diese mit PTH-ECFP inkubiert und im Anschluss durch Gelfiltration analysiert wurden. Das Chromatogramm in **Abbildung 6-23** zeigt einen normierten Gelfiltrationslauf von leeren Liposomen inkubiert mit PTH-ECFP. Dabei wurde gezeigt, dass PTH-ECFP nicht unspezifisch mit leeren Liposomen interagiert. Daraus folgt, dass der isolierte Komplex aus PTH-ECFP und PTHR1-Proteoliposomen nicht auf einer unspezifischen Wechselwirkung beruhte sondern auf Interaktionen des Liganden mit dem renaturierten, rekonstituierten Rezeptor. Die Ergebnisse zeigten einen Anstieg der Absorption bei der Wellenlänge von 439 nm. Dieser Anstieg wurde durch den Streulichtanteil von Liposomen verursacht.



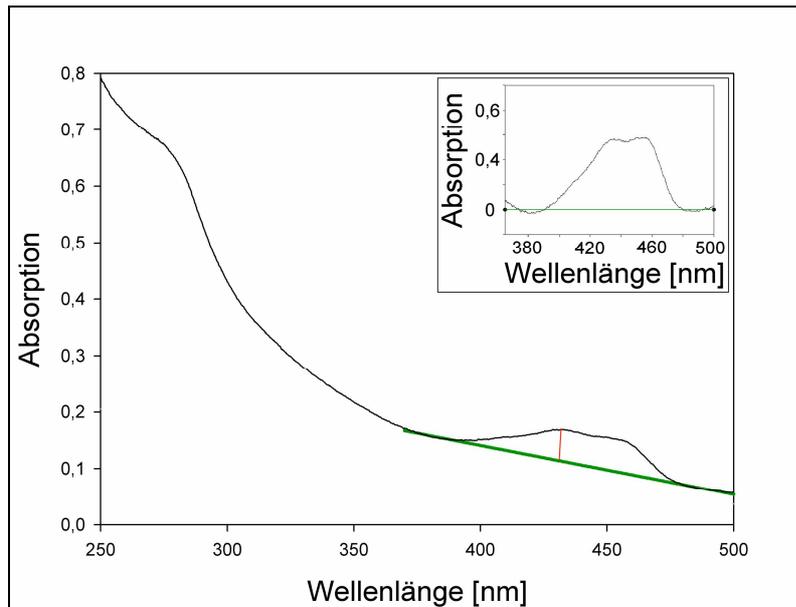
**Abbildung 6-24: Analyse des Peak 1 der PTHR1-Proteoliposomen.** Darstellung eines Coomassie gefärbten Gels einer SDS-PAGE (15% Acrylamid) von Proben aus Peak 1 der PTHR1-Proteoliposomen nach Gelfiltration. Die Analyse erfolgte von fraktionierten Proben aus dem Peak 1 nach einer Größenausschlusschromatographie. Die Spur 1 zeigt eine Probe des erhaltenen PTHR1-Proteoliposomen. In Spur 2 wurde eine Probe der PTHR1-Proteoliposomen inkubiert mit GLP-ECFP aufgetragen. In Spur 3 wurde eine Probe der PTHR1-Proteoliposomen inkubiert mit PTH-ECFP aufgetragen. Zur Probenvorbereitung wurden 20  $\mu$ l der fraktionierten Proben mit 2-fach SDS-PAGE Probenpuffer (124 mM Tris/HCl, 100 mM DTT, 20% Glycerin, 2% SDS, 0,2% Bromphenolblau, pH 6,8) wurden für 30 min bei 40° C inkubiert.

Diese Absorption beruhte nicht auf einer unspezifischen Wechselwirkung der Fusionsproteine mit den Liposomen. Das ungebundene PTH-ECFP wurde mit einem Retentionsvolumen von 39 ml eluiert (Peak 2, grüne Linie). Als Protein absorbierte PTH-ECFP ebenfalls bei einer Wellenlänge von 280 nm. Das zusätzlich erhaltene Signal wurde nicht durch Liposomen verursacht. Ein Nachweis von unspezifischen Wechselwirkungen von PTHR1-Proteoliposomen konnte durch den Einsatz von GLP-ECFP erbracht werden.

Bei einer unspezifischen Wechselwirkung wäre zu erwarten, dass ein gebildeter Komplex aus PTHR1-Proteoliposomen und GLP-ECFP nach der Gelfiltration nachgewiesen werden könnte. Die Analyse der Fraktion 1 nach der Gelfiltration zeigte keine spezifische Absorption für GLP-ECFP. Die Analyse von Proben aus Peak 1 von PTHR1-Proteoliposomen, PTHR1-Proteoliposomen inkubiert mit PTH-ECFP und PTHR1-Proteoliposomen inkubiert mit GLP-ECFP erfolgte mittels SDS-PAGE. Die Analyse der Fraktionen aus Peak 1 (nach der Gelfiltration) sind in der **Abbildung 6-24** dargestellt. In Spur 1 wurde PTHR1 identifiziert, enthalten in den PTHR1-Proteoliposomen in Peak 1 nach dem Gelfiltrationslauf. Die Probe in Spur 2 bestand die Probe aus PTHR1-Proteoliposomen inkubiert mit GLP-ECFP. Es wurde keine GLP-ECFP Bande bei einer Höhe von 30 kDa in dem Coomassie gefärbten Gel einer SDS-PAGE nachgewiesen, was zeigte, dass zwischen GLP-ECFP und PTHR1-Proteoliposomen

kein Komplex durch unspezifische Wechselwirkung ausgebildet wurde. Im Gegensatz dazu konnte ein Komplex aus PTHR1-Proteoliposomen und PTH-ECFP in der Spur 3 nachgewiesen werden. In dem analysierten SDS-Gel war in Höhe von 30 kDa eine PTH-ECFP-Proteinbande und in der Höhe von 66 kDa eine PTHR1-Proteinbande aus den Proteoliposomen festzustellen.

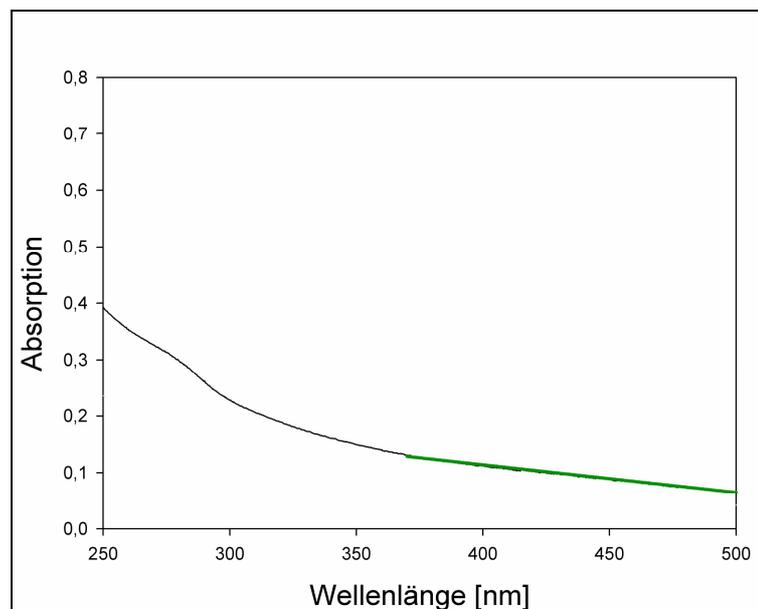
Eine quantitative Analyse des Komplexes aus PTHR1 und PTH-ECFP erfolgte durch Aufnahme von Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 250 bis 500 nm.



**Abbildung 6-25: Absorptionsspektrum der PTHR1-Proteoliposomen in Komplex mit PTH-ECFP.**

Darstellung des Absorptionsspektrums im Wellenlängenbereich von 250 bis 500 nm. Ein Absorptionsspektrum der ersten Absorptionspeaks von den isolierten PTHR1-Proteoliposomen wurde nach der Größenausschlusschromatographie aufgenommen. Die Messung erfolgte in 100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4 in einer 1 cm \* 1 cm Küvette. Die spezifischen Absorptionsmaxima des ECFP liegen bei 439 und 453 nm. Der enthaltene Streulichtanteil wurde aus Messpunkten außerhalb der ECFP Absorption extrapoliert (grüne Linie). Nach Subtraktion wurde die theoretische spezifische Absorption bei 439 nm (rote Linie) ermittelt. Das Inset zeigt das um die Lichtstreuung korrigierte Spektrum des ECFP im Peak der Proteoliposomen.

Das ECFP besitzt eine spezifische Absorption bei 439 und 453 nm. PTHR1-Proteoliposomen wurden mit einer Konzentration von 5  $\mu$ M eingesetzt. Diese wurden mit den PTH-/ GLP-ECFP und einer Konzentration von jeweils 20  $\mu$ M inkubiert und mittels Gelfiltration fraktioniert. Die Analyse der Fraktionen aus Peak 1 erfolgte am Spektrometer. Die **Abbildung 6-25** zeigt das Spektrum der PTHR1-Proteoliposomen inkubiert mit PTH-ECFP. Die **Abbildung 6-26** zeigt das Spektrum der PTHR1-Proteoliposomen inkubiert mit GLP-ECFP. Das erhaltene Spektrum setzte sich aus PTHR1-Proteoliposomen und PTH-ECFP zusammen.



**Abbildung 6-26: Absorptionsspektrum der PTHR1-Proteoliposomen inkubiert mit GLP-ECFP.**

Darstellung des Absorptionsspektrums im Wellenlängenbereich von 250 bis 500 nm. Ein Absorptionsspektrum des Peak 1 der isolierten PTHR1-Proteoliposomen nach der Größenausschlusschromatographie. Die Messung erfolgte in 100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4 in einer 1 cm \* 1 cm Küvette. Es wurde keine ECFP-Absorption beobachtet. Dennoch wurde der enthaltene Streulichtanteil aus Messpunkten außerhalb der ECFP-Absorption extrapoliert (grüne Linie). Es bestand kein Unterschied bei einer Inkubation mit GLP-ECFP zwischen der ermittelten Gerade und dem extrapolierten Anteil des Streulichtsignals.

Die spezifische Absorption des PTH-ECFP ist von einem Streulichtsignal der Liposomen überlagert. Im Wellenlängenbereich von 400 bis 500 nm ändert sich dieses Lichtstreusignal linear und konnte entsprechend korrigiert werden. Dazu wurden Messpunkte außerhalb der spezifischen ECFP-Absorption verwendet und der enthaltene Streulichtanteil extrapoliert. Die Differenz der beobachteten absoluten Absorption bei 439 nm und dem Wert aus der extrapolierten Gerade wurde als relative Absorption bei 439 nm des ECFP angenommen. Die Tabelle 6-7 enthält die berechneten Absorptionswerte der spektralen Analyse des Peak1 nach der Gelfiltration. Zur Berechnung wurde ein Extinktionskoeffizient von 33.000 für ECFP eingesetzt. Daraus ergab sich eine PTH-ECFP Konzentration von 1,7  $\mu$ M enthalten in Peak 1. Bei einer für das Bindungsexperiment eingesetzten Konzentration des PTHR1 von 5  $\mu$ M bedeutete dies, dass 34% des Rezeptors den Liganden gebunden haben und funktionell rekonstituiert in den Liposomen vorlagen.

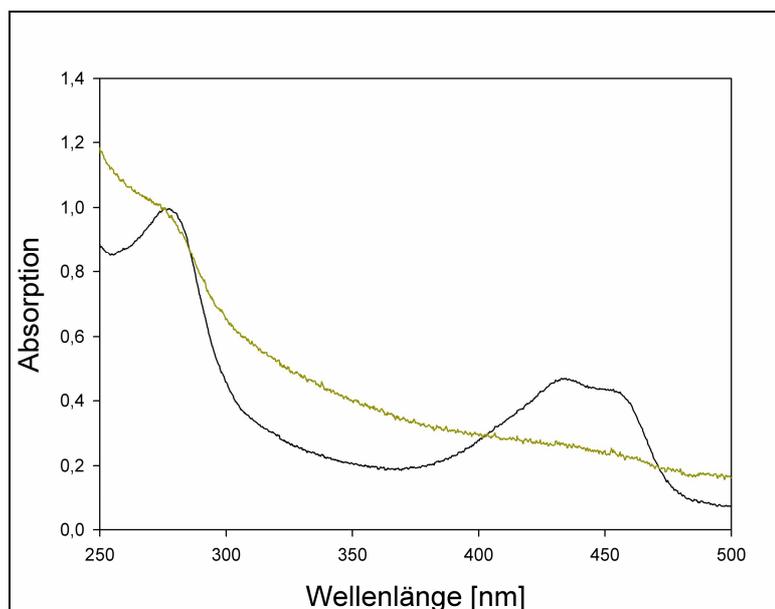
Die Resultate zeigten eine spezifische Bindung zwischen dem PTHR1 und PTH-ECFP, da sie im Komplex vorlagen (Peak 1). Eine unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkung konnte aufgrund der Ergebnisse mit PTHR1 und GLP-ECFP ausgeschlossen werden (**Abbildung 6-26**). Das Spektrum des isolierten Peak 1 nach der Gelfiltration zeigte keine spezifische Absorption für ECFP.

Tabelle 6-7: Auswertung der Ko-Elutionsexperimente von PTHR1-Proteoliposomen und 20  $\mu\text{M}$  PTH-/ GLP-ECFP.

Parameter	PTH-ECFP	GLP-ECFP
Absorption 439	0,1638	0,0934
Lichtstreusignal $A_{439}$	0,107234168	0,095169979
ECFP Absorption	0,056565832	-0,001769979

Nach Berechnung und Subtraktion des enthaltenen Streulichtsignals konnte keine Absorption erhalten werden (Tabelle 6-7). In diesem Experiment konnte GLP-ECFP nicht im Komplex mit den PTHR1-Proteoliposomen nachgewiesen werden. Die Bildung des Komplexes aus PTHR1 und PTH-ECFP konnte durch eine vorherige Inkubation der PTHR1-Proteoliposomen mit 5  $\mu\text{M}$  PTH (1-37) inhibiert werden. Bei einer PTHR1-Konzentration in den Proteoliposomen von 5  $\mu\text{M}$  wurden die Bindungsstellen durch den zugesetzten Liganden gesättigt. Aufgrund der niedrigen Dissoziationskonstante von PTH (1-37) zu PTHR1 wird ein stabiler Ligand-Rezeptor-Komplex ausgebildet. Eine anschließende Inkubation mit PTH-ECFP konnte den Liganden nicht verdrängen und es wurde kein Komplex aus PTHR1-Proteoliposomen und PTH-ECFP gebildet. Das bedeutet, dass die Analyse des Peak 1 der Gelfiltration nachweislich kein PTH-ECFP enthielt.

Das normierte Absorptionsspektrum eines Ko-Elutionsexperiments aus PTHR1-Proteoliposomen und PTH-ECFP ist in **Abbildung 6-27** dargestellt. Die Auswertung ergab eine PTH-ECFP Konzentration von 2,16  $\mu\text{M}$  in der Elutionsfraktion. Es war möglich die Bindung zum Liganden PTH-ECFP durch Inkubation des PTHR1 mit TCEP aufzuheben. Das TCEP reduziert die Disulfidbrücken der N-terminalen Domäne des nativen PTHR1. Diese konservierten Disulfidbrücken sind ein grundlegendes Element der nativen Struktur der extrazellulären Domäne des PTHR1.



**Abbildung 6-27: Vergleich der auf eine Wellenlänge bei 280 nm normierten Absorptionsspektren.**

Darstellung der Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 250 bis 500 nm vom PTHR1-Proteoliposomen/ PTH-ECFP Komplex (schwarz). Absorptionsspektrum nach Inkubation der PTHR1-Proteoliposomen mit PTH-ECFP und Zugabe von 10 mM TCEP (dunkelgelb). Die Spektren wurden vom Peak 1 nach der Gelfiltration aufgenommen. Die Messung erfolgte in 100 mM NaP, 150 mM NaCl, pH 7,4 in einer 1 cm \* 1 cm Küvette. Die Spektren wurden auf eine Wellenlänge bei 280 nm normiert.

Ohne Disulfidbrücken ist die native Struktur zerstört und der Ligand kann nicht von der N-terminalen Domäne gebunden werden. Das normierte Absorptionsspektrum eines Ko-Elutionsexperiments aus PTHR1-Proteoliposomen und PTH-ECFP, inkubiert mit 10 mM TCEP ist in **Abbildung 6-27** gezeigt. Die Bildung des Komplexes aus PTHR1/ PTH-ECFP konnte vollständig durch eine Inkubation mit 10 mM TCEP unterdrückt werden.

Die Resultate zeigen, dass bei den eingesetzten Proteinkonzentrationen ein Komplex aus PTHR1, rekonstituiert in Liposomen, und PTH-ECFP gebildet wurde. Die Tatsache, dass die Bindung des Liganden bei Mitgliedern der Sekretin-Familie in zwei Schritten erfolgt, benötigte eine differenzierte Analyse der gefundenen Bindungseigenschaften. Die Dissoziationskonstanten der Ligandenbindung von PTH (1-37) an nPTHR1 von 3  $\mu$ M unterscheiden sich deutlich von der von PTH (1-37) an PTHR1 von 3 nM. Dieser Unterschied in den Dissoziationskonstanten sollte per se die Isolierung eines Komplexes mittels Gelfiltration, der auf der schwächeren Interaktion der N-terminalen Domäne zu PTH-ECFP beruht, nicht ermöglichen. Ein experimenteller Ansatz zur Unterdrückung einer Komplexbildung ist die Reduzierung der eingesetzten Liganden Konzentration, unter die Dissoziationskonstante von nPTHR1. Daher wurden PTHR1-Proteoliposomen mit dem Liganden PTH-ECFP und einer Konzentration von 1  $\mu$ M inkubiert. Die Analyse des Peak 1

nach Gelfiltration erfolgte mittels Absorptionsspektroskopie. Die Bestimmung der Konzentration von PTH-ECFP, bei einem Absorptionsmaximum von 439 nm, ergab eine Konzentration von 0,9  $\mu\text{M}$ . Die Proteinkonzentration des PTHR1-Proteoliposomen wurde auf 3,97  $\mu\text{M}$  bestimmt. Daraus folgte, dass im vorliegenden Fall ein Komplex aus PTHR1-Proteoliposomen und PTH-ECFP gebildet wurde. In diesem Komplex zeigten 22% des rekonstituierten PTHR1 eine Bindung zum Liganden. Diese Daten bestätigten, dass der Komplex aus PTHR1-Proteoliposomen und PTH-ECFP gebildet wurde. Das bedeutet, dass die Interaktion von PTH-ECFP nicht auf einer Bindung der N-terminalen Domäne des PTHR1 beruhte. Dieser Bindung lag eine Interaktion von PTH-ECFP mit dem gesamten PTHR1 zugrunde. Folglich wurde ein Protein-Protein-Komplex isoliert der auf der hochaffinen Bindung des gesamten PTHR1 zu PTH-ECFP resultiert.

## 7 Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand der Parathormon-Rezeptor (PTHrP), ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) der Sekretin-Familie (Jüppner, 1994). GPCR besitzen überwiegend regulierende Funktionen im Organismus und werden von Liganden spezifisch aktiviert. Die Liganden für PTHrP sind das Parathormon (PTH) und ein dem Parathormon verwandtes Peptid (PTHrP). Das Parathormon reguliert hauptsächlich den Kalziumhaushalt in Organismen und steht aufgrund dessen in einem engen Zusammenhang mit der Erkrankung Osteoporose. Das PTHrP besitzt eine parakrine Wirkung auf den zellulären Kalziumhaushalt, wird aber bei malignen Zellen übermäßig sezerniert und bewirkt eine Freisetzung von Kalzium im Gewebe. Daher repräsentiert PTHrP einen wichtigen Ansatzpunkt zur Arzneistoffentwicklung und Therapie von Osteoporose und einer malignen Hyperkalzämie (Mulder *et al.*, 2006). Die grundlegende Aktivierung des PTHrP beruht auf einer Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne (nPTHrP) und an die Juxtamembranregion (J-Domäne). Unter der J-Domäne werden die extra- und intrazellulären Loops sowie der Transmembranbereich zusammengefasst (Potts, 2005). Eine Rezeptoraktivierung erfolgt durch den N-terminalen Bereich der endogenen Peptidliganden PTH und PTHrP. Die verkürzte PTH-Variante (1-34) besitzt einen anabolen Effekt auf die Knochenmatrix und wird zur Therapie von Osteoporose eingesetzt. Die Applikation von PTH (1-34) in hohen Dosen bewirkt jedoch eine gesteigerte Kalzium-Freisetzung (Villardaga *et al.*, 2011). Dieses paradoxe Verhalten des PTHrP lässt auf eine enge therapeutische Breite schließen und erschwert eine gezielte Wirkstoffentwicklung auf der Basis von Peptidanaloga.

Dennoch basiert im Gegensatz zu Vertretern der Rhodopsin-Familie ein rationales Wirkstoff-Design bei Mitgliedern der Sekretin-Familie auf den endogenen Peptidliganden (Hoare, 2005). Obwohl zur Behandlung von Diabetes Typ II chemische Wirkstoffe für den GLP-Rezeptor identifiziert werden konnten, wurde die Bindung jedoch nur mit moderaten Affinitäten charakterisiert (Moon *et al.*, 2011). Ein Problem der endogenen Peptidliganden ist der rasche Abbau durch Proteasen, sobald diese appliziert sind. Lösungsansätze bilden die Modifizierung der bekannten Liganden mit Polyethylenglykolen, wodurch die Plasmahalbwertszeit deutlich erhöht wird. Allerdings birgt es die Gefahr, dass die Modifizierung die Bindung des Liganden zum Rezeptor beeinflusst (Runge *et al.*, 2008). Daher ist eine grundlegende Kenntnis der bindungsrelevanten Aminosäuren im Liganden, der N-terminalen Domäne und der J-Domäne der Rezeptoren notwendig. Bei PTHrP gelang Gensure, Gardella und Jüppner durch Experimente mittels *Photo-crosslinking*, Kernregionen der Interaktion im Liganden, in der N-terminalen Domäne und der J-Domäne einzugrenzen (Gensure *et al.*, 2001). Pioszak klärte

die Struktur der N-terminalen Domäne mittels Röntgenkristallographie im Komplex mit den verkürzten Liganden von PTH und PTHrP. Weiterhin sind die strukturellen Besonderheiten der beiden natürlichen Liganden im Komplex mit PTHR1 von großem Interesse. Neben einer pharmakologischen Charakterisierung dieser Wechselwirkung durch Zellkultur-Studien, werden strukturelle Informationen über PTHR1 benötigt. Diese können allerdings nur *in vitro* erfolgen (Mann *et al.*, 2008).

## **7.1 Produktion, Renaturierung und biophysikalische Charakterisierung des mizellären PTHR1**

Die Expression von humanen Membranproteinen erfolgt überwiegend in eukaryotischen Systemen mit einer anschließenden Isolierung und Reinigung (Rosenbaum *et al.*, 2007; Sen *et al.*, 2003). Die Stabilisierung dieser isolierten Membranproteine in einer funktionellen Form erweist sich weiterhin als problematisch (Rasmussen *et al.*, 2007). Einen Lösungsansatz bildet die Verwendung von Insektenzellen zur Produktion von GPCR. Auf diese Weise konnten ausreichende Mengen nativer GPCR der Rhodopsin-Familie gewonnen werden. So war es unter anderem möglich eine stabilisierende Modifikationen durch Co-Expression mit einem trimeren G-Proteinen vorzunehmen und auf diese Weise eine Aktivierung über den Transmembranbereich untersucht werden (Rosenbaum *et al.*, 2007; Chillakuri *et al.*, 2007). Diese Herangehensweise blieb jedoch bisher ohne Erfolg bei GPCR der Sekretin-Familie.

Eine alternative Herangehensweise verwenden Klammt und Mitarbeiter zur Expression, Reinigung und Stabilisierung von Membranproteinen (Klammt *et al.*, 2006). Diese Methode der zellfreien-Proteinexpression produzierte Membranproteine durch einen Zellextrakt aus *E.coli*. Damit war eine parallele Zugabe von stabilisierenden Detergenzien möglich, ohne die Proteinproduktion zu stören. Mit dieser Methode konnte ein Peptidtransporter erfolgreich produziert werden, dessen Ausbeute in *E.coli*-Zellen als IB sehr gering ausfiel (Dorn, 2009). Angewendet auf Mitglieder der Sekretin-Familie führte diese Methode jedoch nicht zu einer gesteigerten Proteinausbeute.

In der vorliegenden Arbeit wurde PTHR1 rekombinant in *E.coli* in Form von IB hergestellt. Die vorherigen Arbeiten am PTHR1, GLP1R und anderen GPCR bildeten die Grundlage zur Produktion des PTHR1 in *E.coli* (Grauschopf, 2000; Schröder-Tittmann *et al.*, 2010; Oschmann, 2008; Baneyx, 1999; Bane *et al.*, 2007). Die Fermentation erbrachte eine Ausbeute von 1,7 kg Biofeuchtmasse aus 8 L Kultur. Das Protokoll einer *fed-batch*-Fermentation auf Vollmedium, wurde zur Produktion des PTHR1 auf einem Mineralsalzmedium erweitert. Dabei erforderte die Umstellung des Fermentationsprozesses auf Mineralsalz eine Optimierung der Prozessparameter. Als entscheidender Prozessparameter konnte die Fütterungsgeschwindigkeit

identifiziert werden. Eine zu hohe Zufuhr der Nährlösung hemmte das Zellwachstum und im weiteren Verlauf der Fermentation stagnierte dieses vollständig. Die Anzucht musste an der Grenze zum Nährstoffmangel durchgeführt werden. So gelang es nach kurzer Zeit äquivalente Ausbeuten an Biomasse zu erzielen. Im Hinblick auf NMR-spektroskopische Untersuchungen bildete die Fermentation auf Mineralsalzmedium die Basis für eine  $^{15}\text{N}$ -Markierung des PTHR1. Berger entwickelte für den Cannabinoid-Rezeptor bereits grundlegendes Protokoll mit dem eine  $^{15}\text{N}$ -Markierung ermöglicht wurde (Berger *et al.*, 2010). Die Herangehensweise bei PTHR1 unterschied sich jedoch von der beschriebenen Methode. Der Rezeptor wurde in einem Mineralsalzmedium exprimiert, das frei von Stickstoffquellen war. Das Wachstum der Zellen wurde durch eine kontrollierte Zugabe von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Ammoniumchlorid gesteuert. Dieses Prinzip führte zu einer kompletten Umsetzung des zugesetzten Stickstoffs im Zellstoffwechsel und somit zu einem vollständigen Einbau des markierten Stickstoffs. Der Einsatz des  $^{15}\text{N}$ -PTHR1 zur NMR-Spektroskopischen Untersuchung konnte noch nicht erfolgen, da nur eine Affinitätsreinigung des PTHR1 eine aussagekräftige Aussage ermöglicht.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem unmarkierten PTHR1 gearbeitet. Im nächsten Arbeitsschritt konnten 170 g IB aus den Zellen isoliert werden und diese IB durch das stark denaturierende Detergens SDS solubilisiert werden. Aus diesem solubilisierten Protein-SDS-Komplex konnte PTHR1 bis zur Homogenität durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Sepharose gereinigt werden. Bei PTHR1 wurde ein C-terminaler His-tag eingesetzt, der eine erfolgreiche Reinigung des PTHR1 ohne mögliche C-terminal verkürzte Fragmente ermöglichte. Nach der Reinigung aus den IB betrug die PTHR1-Ausbeute ca. 0,15%, das entspricht 2,5 g PTHR1 aus einer 8 L Fermentationskultur. Andere rekombinant produzierte GPCR aus der Sekretin-Familie erzielen mit diesem Verfahren geringere Ausbeuten (Michalke *et al.*, 2010).

Im Anschluss an die Reinigung des PTHR1 unter denaturierenden Bedingungen musste eine Renaturierung des Rezeptors durchgeführt werden. Die Renaturierung des PTHR1 erfolgte unter Verwendung des *artificial-chaperone*-System, dessen Basis das eingesetzte Cyclodextrin bildete. In diesem zweistufigen Protokoll solubilisierte das Detergens SDS den PTHR1 aus den IB. Das SDS interkaliert ins Cyclodextrin und wurde so vom PTHR1 entfernt (Rozema und Gellman, 1996). Dadurch wurde die denaturierende Wirkung auf PTHR1 verringert, schließlich aufgehoben und erlaubte dessen Renaturierung. Beispielhaft konnten Rozema und Gellman die Renaturierung von Zitratsynthase und Lysozym mit diesem System erfolgreich durchführen (Daugherty *et al.*, 1998).

Kombiniert wurde das *artificial-chaperone*-System mit anderen Renaturierungsstrategien. Oftmals bewirkte bereits eine Verdünnung der hochkonzentrierten Proteinlösung in den Renaturierungspuffer die Ausbildung der nativen Struktur (Rudolph und Lilie, 1997). Im

vorliegenden Prozess wurde dem Renaturierungsansatz zusätzlich L-Arginin und milde Detergenzien zugesetzt. Die Wirkung von L-Arginin auf die Proteine beruht im Wesentlichen auf thermodynamischen und kinetischen Effekten. Als Zusatz erhöht L-Arginin die Löslichkeit von ungefalteten Proteinen und Intermediaten und verhindert ihre Aggregation (Schneider *et al.*, 2008). Die *GAP*-Theorie besagt, dass L-Arginin selektiv die Energiebarriere für Protein-Protein-Wechselwirkungen erhöht und somit die Assoziation und Aggregation unterdrückt. Die Autoren bestätigten diesen Effekt bei der Renaturierung der Carboanhydrase (Baynes *et al.*, 2005).

Im Renaturierungsprozess wurde beobachtet, dass L-Arginin ausreichte, um PTHR1 zu stabilisieren (Grauschopf, 2000). Ohne den weiteren Zusatz von Detergenzien konnte L-Arginin die Aggregation von PTHR1 über einen Zeitraum von einer Woche allerdings nicht verhindern. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zur Stabilisierung während der Renaturierung Detergenzien eingesetzt. Ein Zusatz von milden Detergenzien nutzten Engelhardt und Mitarbeiter, um die Renaturierung des humanen spannungsabhängigen Anionenkanals aus IB zu unterstützen (Engelhardt *et al.*, 2007). Bei PTHR1 wurde ein Detergensgemisch aus DDM, CHAPS und Cholesterinhemisuccinat eingesetzt, dessen stabilisierende Effekte bereits bei anderen Membranproteinen bekannt waren (Yeliseev *et al.*, 2005). Im Hinblick auf die Rekonstitution des PTHR1 sollte das Gemisch durch ein einzelnes Detergens ersetzt werden. Im Detergensscreen offenbarte sich, dass die stabilisierenden und löslichkeitsvermittelnden Eigenschaften allein auf die Anwesenheit von DDM zurück zu führen waren. Daher wurde zur Renaturierung ausschließlich DDM als stabilisierendes Detergens verwendet.

Dieses modifizierte Renaturierungsprotokoll wurde erfolgreich auf die isolierte N-terminale Domäne übertragen. Die Bindungseigenschaften konnten mit einer Affinität von nPTHR1 zu PTH (1-37) von 12  $\mu$ M charakterisiert werden. Das *artificial-chaperone*-System erlaubt die native Faltung von nPTHR1 und wurde aus diesem Grund aus den gesamten PTHR1 übertragen. Im Gegensatz konnten für den renaturierten PTHR1 in der DDM-Mizelle keine Bindungsstudien vorgenommen werden. Eine Analyse mittels ELISA zeigte, dass die Bindung zwischen nPTHR1 zum Liganden durch Spuren des Detergens DDM empfindlich gestört wurde (Drechsler, 2006). Die Ursache könnte möglicherweise die sequentielle Bindung des Liganden der Sekretin-Familie sein. Die Interaktion zwischen N-terminaler Domäne und Liganden wird möglicherweise durch DDM verhindert.

Der renaturierte, mizelläre PTHR1 wurde mittels CD-, Fluoreszenzspektroskopie und Gelfiltration charakterisiert. Michalke und Mitarbeiter hatten für den renaturierten PTHR1 in einem Detergensgemisch aus DDM und Cymal-6 eine Analyse mittels Größenausschlusschromatographie vorgenommen. Dabei konnte PTHR1 überwiegend im Ausschlussvolumen identifiziert werden (Michalke *et al.*, 2010). Dieses Verhalten konnte für den PTHR1 in einer

reinen DDM-Mizelle bestätigt werden. Im vorliegenden Fall hatte eine Erhöhung der Detergengkonzentration keinen Einfluss auf das Elutionsverhalten. Eine Verringerung der Proteinkonzentration änderte das Elutionsverhalten und der Anteil an vermeintlich monomeren PTHR1 stieg an. Engel und Mitarbeiter bestimmten die Molekulargewichte von Membranproteinen in Detergensemizellen mittels analytischer Ultrazentrifugation (Lustig *et al.*, 1991). Vergleichbare Messungen in der vorliegenden Arbeit lieferten bei PTHR1, bedingt durch geringe Proteinkonzentration, keine eindeutige Aussage.

Eine Erklärung für den beobachteten Sachverhalt von oligomeren PTHR1 gibt es offensichtlich nicht. In der Literatur wird von vielen Autoren eine Di- oder Oligomerisierung von GPCR in Detergenzien vermutet. Die Daten lassen zum jetzigen Zeitpunkt keine Interpretation in diese Richtung zu (Baneres und Parello, 2003; Pioszak *et al.*, 2010; Bayburt *et al.*, 2006).

Zur weiteren Charakterisierung der Sekundär- und Tertiärstrukturelemente wurden Messungen mittels Circular dichroismus und Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Die CD-Spektren wurden im Fern-UV des denaturierten und des renaturierten PTHR1 aufgenommen und die Sekundärstrukturelemente quantitativ analysiert. Ein Vergleich der CD-Spektren von PTHR1 in SDS- und DDM-Mizellen zeigte, dass das Hauptstrukturelement mit 30% die  $\alpha$ -helikalen Transmembranbereiche sind. Deren Ausprägung wurde durch eine Solubilisierung der IB durch SDS erhalten. Die Renaturierung bewirkte nur eine geringe strukturelle Veränderung des Transmembranbereichs. Schmidt und Mitarbeiter konnten für den SDS solubilisierten Neuropeptid Y-(NPY)-Rezeptor (NPY), ein Vertreter der Rhodopsin-Familie, einen  $\alpha$ -helikalen Anteil von ca. 50% nachweisen (Schmidt *et al.*, 2010). Für andere Rezeptoren der Rhodopsin-Familie konnte ein  $\alpha$ -Helixanteil von über 70% nach Solubilisierung in Detergenzien berechnet werden (Bane *et al.*, 2007). Im Fall des PTHR1 bildeten die großen N- und C-terminalen Domänen den Hauptanteil der Gesamtstruktur. Die stellt keinen Widerspruch zu den erhaltenen Daten für PTHR1 dar. An der Ausbildung des  $\alpha$ -helikalen Transmembranbereichs sind insgesamt nur 30% der Aminosäuren bei PTHR1 beteiligt.

Zur Untersuchung der Tertiärstruktur wurde die intrinsische Fluoreszenz der Aminosäure Tryptophan des PTHR1 analysiert. Die Fluoreszenzspektren wurden im denaturierten und renaturierten Zustand aufgenommen. Nach selektiver Anregung bei 275 nm konnte eine Rotverschiebung der Fluoreszenz-Emissionsmaxima, vom renaturierten Zustand (336 nm) zum denaturierten Zustand (358 nm), beobachtet werden. Dieses Resultat lieferte Indizien für einen definiert gefalteten Zustand nach der Renaturierung des PTHR1.

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen des PTHR1 zeigten eine irreversible thermische Entfaltung. Dieses Experiment erbrachte den Beweis, dass der mizelläre PTHR1 keine thermodynamische Stabilität im Mizellen-System besitzt. Eine Übergangstemperatur von 30 °C konnte für PTHR1 gemessen werden. Im Vergleich dazu hatte die isolierte N-terminale

Domäne bei einer thermischen Denaturierung keinen nachweisbaren Übergang (Grauschopf, 2000). Die thermische Entfaltung lieferte keine Indizien, dass diese in mehreren Schritten erfolgte. Folglich ist nur die Aussage zulässig, dass PTHR1 in der DDM-Mizelle eine geringe thermische Stabilität aufweist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Literaturdaten die zeigen, dass native GPCR, isoliert aus Membranfragmenten, verhältnismäßig schnell denaturieren (Rasmussen *et al.*, 2007).

Zusammengefasst zeigten die erhaltenen Daten, dass die Renaturierung mittels eines *artificial-chaperone*-Systems für den mizellären PTHR1 erfolgreich war. Dieses System stabilisierte den Transmembranbereich von PTHR1 ausreichend und bildet die native Struktur der isolierten Domänen aus. Ein großes Problem stellte jedoch die geringe thermische Stabilität des mizellären PTHR1 dar und das möglicherweise das stabilisierende Detergens DDM die hydrophobe Bindungstasche des Liganden blockierte. Dies Problem sollte durch die Rekonstitution des PTHR1 aus der Detergensemizelle in Liposomen gelöst werden.

## 7.2 Rekonstitution des PTHR1 in Membranimetika

Generell stellte eine Stabilisierung von isolierten Membranproteinen die größte Schwierigkeit dar und bei isolierten GPCR wurde ein rascher Verlust der biologischen Aktivität beobachtet (Rosenbaum *et al.*, 2007). Von Beginn an erforderte die biologische Aktivität von Membranproteinen Strategien, die es erlauben diese Proteine in einer möglichst naturgetreuen Umgebung zu studieren (Eytan, 1982). Aufgrund dessen wurden Rekonstitutionstechniken zur Produktion von Proteoliposomen etabliert. Racker und Mitarbeiter entwickelten schon frühzeitig Methoden zur Rekonstitution von mitochondrialen oder chloroplastidären Protonenpumpen in Liposomen (Racker *et al.*, 1979; Racker, 1979). Diese Protokolle wurden erfolgreich auf eine Vielzahl von membranständigen Transportern, Kanälen und Rezeptoren übertragen (Crane *et al.*, 1976; Huang *et al.*, 1981).

Die Basis bildeten uniforme, unilamellare, durch Extrusion hergestellte Liposomen (Macdonald *et al.*, 1991). In diese Liposomen sollte der renaturierte PTHR1 aus seinem Mizellen-System rekonstituiert werden. Ein wichtiger Aspekt war dabei die Charakterisierung der produzierten Liposomen und der Einfluss des Detergens auf diese Liposomen. Die Analyse der produzierten Liposomen mittels Zetasizer sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten eine durchschnittliche Größe von 400 nm. Diese konnten mit Detergens solubilisiert werden und nach Inkubation mit renaturiertem PTHR1 zu PTHR1-Proteoliposomen fusioniert werden. Die höchste Ausbeute wurde erzielt, wenn die Liposomen 25% mit Triton X-100 solubilisiert wurden. Die eingesetzte Detergensenmenge variierte, für Liposomen bestehend aus einem *E.coli*

polar Lipidextrakt, aus dem Lipid POPC und bei Zusatz von 30% Cholesterin. Der entscheidende Schritt zum Einbau der Membranproteine in die Liposomen, war die Entfernung des Detergens aus dem Rekonstitutionsansatz, damit die Fusion mit den Liposomen erfolgreich abläuft. Die Basis bildeten die etablierten Techniken von Rigaud und Mitarbeiter, die von solubilisierten Liposomen nach der Inkubation mit einem Membranprotein quantitativ das Detergens eliminierten und ausschließlich BioBeads dafür verwendeten (Paternostre *et al.*, 1988; Rigaud *et al.*, 1998; Degrip *et al.*, 1998). Diese Methoden wurden auf die Rekonstitution des PTHR1 übertragen.

Dabei zeigte die Analyse der produzierten Proteoliposomen mit elektronenmikroskopischen Gefrierbruch-Aufnahmen eine verbesserte Rekonstitutionsausbeute und zwar je langsamer das Detergens entfernt wurde. Die Gefrierbruch-Aufnahmen von PTHR1-Proteoliposomen zeigten keine homogene Verteilung des PTHR1. Dennoch konnte PTHR1 bei einem Lipid-zu-Protein-Verhältnis (LPR) von 30:1 in einer Vielzahl von Liposomen nachgewiesen werden. Eine Ursache für die inhomogene Verteilung könnte in der Wahl des LPR liegen. Dabei könnte sowohl eine Verringerung, als auch eine Erhöhung der Lipidkonzentration die Ausbeute positiv beeinflussen (Hellmich *et al.*, 2008). Ein weiterer Aspekt war eine zu geringe oder zu starke Solubilisierung der Liposomen während der Rekonstitution. Eine differenzierte Quantifizierung war direkt durch elektronenmikroskopische Gefrierbruch-Aufnahmen nicht möglich, aber dieses Ergebnis erforderte eine Optimierung des Protokolls spezifisch für PTHR1. Der Einsatz einer Sacchrose-Gradienten-Flotation (SGF) erlaubte die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proteoliposomen. Diese Methode verknüpfte den verwendeten Solubilisierungsgrad der Liposomen und das LPR zur Rekonstitution direkt mit der inkorporierten Proteinmenge. Die quantitative Analyse des PTHR1 nach der SGF zeigte, dass bei einem LPR von 30:1 und einem Solubilisierungsgrad von 25% eine Ausbeute der Rekonstitution von maximal 53% erreicht werden konnte. Diese Proteinausbeute in den PTHR1-Proteoliposomen war wiederum ungeachtet der Orientierung des PTHR1 in den Liposomen.

Dieses entwickelte Protokoll konnte auf die Rekonstitution des PTHR1 in POPC-Liposomen übertragen werden. Aus diesen hergestellten PTHR1-POPC-Proteoliposomen wurden in einer Kooperation mit Christian Carnarius an der Georg-August-Universität Göttingen zu PTHR1-GUVs fusioniert. Der Nachweis mit einem Antikörper, gerichtet gegen den C-terminalen His-tag des PTHR1, bestätigte die erfolgreiche Rekonstitution. Dadurch wurde erneut festgestellt, dass die Orientierung von PTHR1-GUVs ebenfalls nicht der optimalen Orientierung in biologischen Membranen entsprach (10.5). Möglicherweise ist die Prozessführung zu schnell für eine geordnete Fusion der Liposomen und dem Einbau von PTHR1. Die Lösung könnte in einer verringerten Geschwindigkeit der Eliminierung des Detergens oder in einer geringeren Proteinkonzentration liegen. Die Prozessführung der Rekonstitution könnte durch isotherme Titrationskalorimetrie optimiert werden. Geringe Volumina einer PTHR1-Lösung würden bei konstanter Temperatur zu Liposomen titriert (Krylova *et al.*, 2010). Keller und Mitarbeiter

bewiesen, dass die Ausbeute durch die Anwendung mehrerer Rekonstitutionszyklen auf die gleichen Proteoliposomen signifikant erhöht werden konnte. Ein weiterer Lösungsansatz bietet die Rekonstitution des PTHR1 in Nanodiscs. Dieses diskoidale System bietet zahlreiche Vorteile. Der wichtigste Aspekt ist, dass in Nanodiscs sowohl der N- als auch der C-Terminus frei zugänglich sind. Das grundlegende Prinzip zur Rekonstitution des PTHR1 in Nanodiscs konnte erfolgreich erarbeitet werden. Allerdings konnte die Ligandenbindung noch nicht hinreichend charakterisiert werden (10.6).

### **7.3 Funktionelle Analyse des rekonstituierten PTHR1**

Mit dieser Arbeit konnten grundlegende Prinzipien etabliert werden, die eine funktionelle Charakterisierung des renaturierten und rekonstituierten PTHR1 ermöglichen. Die Lipiddoppelschichten garantieren eine hohe Stabilität des PTHR1 *in vitro* und ermöglichen eine Vielzahl von Methoden zur Charakterisierung der Funktionalität (Geertsma *et al.*, 2008). Die klassischen Methoden versagten bei der Übertragung auf die produzierten PTHR1-Proteoliposomen. So wurde das Signal einer Bindung von biotinylierten PTH an PTHR1-Proteoliposomen von unspezifischen Wechselwirkungen dominiert.

Eine klassische Bestimmung der Ligandenbindung mittels radioaktiv markierten PTH zeigte im Gegensatz zu Membranpräparationen von HEK293-Zellen ein hohes unspezifisches Signal. Das PTH neigte zur Interaktion mit hydrophoben Oberflächen, obwohl es keinen ausgeprägten hydrophoben Charakter besitzt (Mann *et al.*, 2008; Mann *et al.*, 2007; Hoare und Usdin, 1999). Im Filterbindungs-Assay konnte bei eingesetzten Liposomen ohne PTHR1 jedoch keine unspezifische Wechselwirkung des PTH detektiert werden. Das lässt die Vermutung zu, dass eine Wechselwirkung zwischen PTHR1-Proteoliposomen und PTH erfolgte. Diese Bindung von PTH an PTHR1-Proteoliposomen konnte in einem Konkurrenzexperiment an HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Dabei wurde der gebildete Komplex aus PTHR1-Proteoliposomen und radioaktiven PTH über Filter abgetrennt. Bei einer hohen Konzentration an PTHR1-Proteoliposomen in Gegenwart der HEK293-Zellen wurde ein geringes Signal bei der Analyse der Filter erhalten. Befanden sich keine PTHR1-Proteoliposomen in der Gegenwart von HEK293-Zellen wurde ein Signal auf dem Filter detektiert. Hiermit konnte ein qualitativer Nachweis der Bindung von radioaktiven PTH an PTHR1-Proteoliposomen erzielt werden.

Zur Charakterisierung einer Bindung des PTH an die PTHR-Proteoliposomen wurde eine Methode eingesetzt, welche es ermöglichen sollte schwache und unspezifische von einer spezifischen Wechselwirkung zu unterscheiden. Mittels Gelfiltration sollte ein gebildeter Komplex aus PTH und PTHR-Proteoliposomen isoliert werden. Die rasche Dimerisierung und mögliche Aggregation des Liganden PTH sollte durch eine Fusion mit ECFP unterbunden

werden. In vorherigen Experimenten konnte bereits ausgeschlossen werden, dass die Fusion zwischen PTH und ECFP die Bindung zwischen PTH und PTHR1 generell beeinflusst (10.1.5). Die Grundlage zur Produktion von PTH-ECFP bildete das SUMO-Fusions-System (Bosse-Doenecke *et al.*, 2008). Mit diesem PTH-ECFP konnten Bindungsstudien von PTHR1-Proteoliposomen durchgeführt werden. Die Reinigung des Protein-Protein-Komplexes konnte mittels Gelfiltration erfolgen, sobald der gebildete Komplex durch eine hochaffine Bindung charakterisiert wurde (Nimmo und Bauermeister, 1978). Im vorliegenden Fall konnte dies von PTHR1 auf der Grundlage der Ergebnisse von Gardella angenommen werden (Gardella *et al.*, 1995). Ebenfalls wurde bereits bei Untersuchungen an Membranproteinen bestätigt, dass eine Lipidumgebung eine vollständige biologische Aktivität gewährleistet (Seddon *et al.*, 2008). Diese biologische Aktivität bedeutet bei PTHR1, dass eine deutlich höhere Affinität zum Liganden nachgewiesen werden kann, als mit der isolierten N-terminalen Domäne.

Die Experimente bestätigen die Bildung eines Komplexes aus PTHR1-Proteoliposomen und dem Liganden PTH-ECFP. Dieser Komplex konnte durch Gelfiltration von ungebundenen PTH-ECFP isoliert und mittels Absorptionsspektroskopie analysiert werden. Die PTHR1-Konzentration in den eingesetzten Proteoliposomen betrug 5  $\mu\text{M}$ . Die Konzentration des komplexierten Liganden PTH-ECFP konnte spektroskopisch mit 1,7  $\mu\text{M}$  ermittelt werden. Dies entspricht einer Ausbeute 34% funktionellen PTHR1 rekonstituiert in Liposomen. Mit leeren Liposomen wurde bestätigt, weder PTH-ECFP noch GLP-ECFP unspezifisch an Liposomen banden. Zusätzlich wurde mit dem Einsatz von GLP-ECFP ausgeschlossen, dass die Interaktion von PTHR1-Proteoliposomen mit PTH-ECFP lediglich durch eine Protein-Protein-Assoziation hervorgerufen wurde. Vielmehr bestätigte die Analyse der Elutionsproben mittels einer SDS-PAGE, dass eine spezifische Bindung von PTH-ECFP an PTHR1-Proteoliposomen vorlag.

Diese spezifische Bindung wurde mit drei weiteren Experimenten analysiert. Dabei wurde einmal die Ausbildung des Komplexes aus PTH-ECFP/ PTHR1-Proteoliposomen durch eine vorherige Inkubation von 5  $\mu\text{M}$  PTH mit den PTHR1-Proteoliposomen inhibiert. Das eingesetzte PTH (1-37) bindet an den rekonstituierten PTHR1 und blockiert die Bindung zum PTH-ECFP. Folglich konnte kein Komplex mittels Gelfiltration isoliert werden. In einer zweiten Untersuchung wurde durch eine Inkubation mit TCEP die native Struktur durch Spaltung der Disulfidbrücken der N-terminalen Domäne zerstört. Die Konsequenz war, dass das PTH-ECFP nicht an die Domäne binden konnte und somit wiederum kein Komplex aus PTH-ECFP/ PTHR1-Proteoliposomen isoliert wurde. Dieses Ergebnis erlaubte die Schlussfolgerung, dass der Komplex in Abhängigkeit von der nativen Struktur der N-terminalen Domäne des PTHR1 gebildet wurde. Die Differenzierung der nachgewiesenen Ligandenbindung zwischen der N-terminalen Domäne und dem Gesamt-PTHR1 erfolgte durch Herabsetzen der PTH-ECFP Konzentration. In früheren Arbeiten konnte für die N-terminalen Domäne eine Dissoziationskonstante von 3  $\mu\text{M}$  bestimmt werden (Grauschopf *et al.*, 2000). Würde PTH-ECFP in einer submikromolaren Konzentration zu den PTHR1-Proteoliposomen

zugesetzt, könnte nur dann ein Komplex nachgewiesen werden, wenn die Bindung zwischen PTH-ECFP und dem vollständigen PTHR1 basiert. Die Analyse mittels Absorptions-Spektroskopie ergab, dass im isolierten Komplex eine PTH-ECFP Konzentration von 0,9  $\mu\text{M}$  vorlag. Das Resultat des dritten Experiments bestätigt, dass ein Komplex isoliert werden konnte, welcher auf der Wechselwirkung des Liganden mit dem gesamten PTHR1 beruht.

In diesem Zusammenhang bleibt jedoch kritisch, dass die Affinität der Bindung zwischen PTH-ECFP und dem rekonstituierten PTHR1 nicht mit einer nanomolaren Dissoziationskonstante bestimmt werden konnte. Eine Serie von Konkurrenzexperimenten könnte klären, ob die gefundene Interaktion darauf beruht, dass der PTHR1 in seiner nativen Konformation vorliegt. Folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein PTHR1-Intermediat in den Liposomen stabilisiert worden ist, dass eine höhere Affinität zum Liganden besitzt als die N-terminale Domäne. Der Grund könnte im Einsatz des gesamten PTHR1 liegen. Durch die Anwesenheit des Transmembranbereichs wird die Affinität zwischen dem Liganden und N-terminaler Domäne des PTHR1 positiv beeinflusst. Der Ligand interagiert mit der korrekt gefalteten N-terminalen Domäne und zusätzlich bildet der Transmembranbereich weitere Kontaktpunkte zum Liganden aus. Dadurch könnte die im Komplex nachgewiesene höhere Affinität zwischen dem Rezeptor und dem Ligand im Vergleich zur isolierten Domäne begründet werden. Dennoch weisen die Ergebnisse darauf hin, dass an der Bindung zum Liganden die N-terminale Domäne und der Transmembranbereich des PTHR1 beteiligt sind. Die gefundene höhere Affinität zwischen Ligand und Gesamtrezeptor bestätigt, dass die Rekonstitution des PTHR1 in Liposomen einen Lösungsansatz bietet, PTHR1 weiterführend in einem künstlichen System und *in vitro* zu charakterisieren.

## 8 Ausblick

Die Kombination einer prokaryotische Proteinexpression mit einer Renaturierungsstrategie und der Rekonstitution in Membranimetika ermöglichte die funktionelle Analyse des PTHR1 ein GPCR der Sekretin-Familie. Mit der beschriebenen Methode konnte ein Ansatz entwickelt werden, der es ermöglicht andere GPCR in ausreichender Form zu produzieren und zu charakterisieren. Die notwendigen Voraussetzung für weiterführende Arbeiten sind Optimierungen an der Renaturierung und Rekonstitution zur Verbesserung der Ausbeute. Wie beschrieben konnte von dem eingesetzten PTHR1 ca. 53% in Liposomen eingebaut werden. Allerdings waren davon nur knapp 22 – 30% in der Lage den Liganden zu binden.

Anschließende Arbeiten sollten gewährleisten, dass die Bindung, mit einer gefundenen zellulären Dissoziationskonstante im einstelligen nanomolaren Bereich, gleichzusetzen ist. Die beschriebenen Grundlagen müssen durch Sättigungs-, und Konkurrenzexperimente bestätigt werden. Diese Ergebnisse dienen dann als Basis zur Optimierung der Rekonstitution des PTHR1 in Liposomen. Hierfür müssen die Lipidzusammensetzungen sowie die Geschwindigkeit der Detergens-Eliminierung detailliert untersucht werden. Möglicherweise beruht die 30% funktionelle Rekonstitutionsausbeute auf einer falschen Orientierung des PTHR1 in den Liposomen. Diese Orientierung könnte durch eine spezifische Protease-Schnittstelle im C-terminalen Bereich des PTHR1 quantifiziert werden.

Ein weiterentwickeltes System zur Rekonstitution des PTHR1 stellt das System der Nanodiscs dar. Sligar und Mitarbeiter entwickelten auf der Basis des Cholesterinstoffwechsel für Membranproteine ein System, welches reproduzierbare, uniforme, doppelschichtige Lipidvesikel erzeugte (Denisov *et al.*, 2006). Mit dem System könnte ein grundlegender Schritt in Richtung Charakterisierung und Strukturbildung erreicht werden. Nanodiscs eignen sich für ein breites Spektrum an Methoden, dass den PTHR1-Proteoliposomen aufgrund ihrer Größe vorenthalten bleibt (Raschle *et al.*, 2009; Nath *et al.*, 2007). Für andere Membranproteine konnte das System bereits erfolgreich eingesetzt werden, um eine Charakterisierung mittels Biacore vorzunehmen (Liebold, 2010; Nath *et al.*, 2007; Raschle *et al.*, 2009). Angewendet auf PTHR1-Nanodiscs wurde ein Protokoll zur Produktion des MSP1D1 in entsprechender Konzentration und Reinheit etabliert werden (Böcker, 2011). Für die hergestellten PTHR1-Nanodiscs konnte gezeigt werden, dass eine Größe von 10 nm mittels Transmissionselektronen-Mikroskopie erhalten wurde. Erste Bindungsstudien mit einem radioaktiven Liganden oder am Biacore-System von PTHR1-Nanodiscs blieben ohne zufriedenstellendes Ergebnis.

Weiterführende Untersuchungen sollten mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) vorgenommen werden. Dazu sind bereits alle Voraussetzungen in dieser Arbeit erfüllt worden. Der Ligand PTH-ECFP eignet sich für die Analyse mittels FCS. Der Einsatz dieser Methode könnte herangezogen werden, die Dissoziationskonstanten von PTHR1-Proteoliposomen und der PTHR1-Nanodiscs mit dem Liganden PTH-ECFP zu ermitteln.

## 9 Literaturverzeichnis

1. AbouSamra, A.B., Jüppner, H., Force, T., Freeman, M.W., Kong, X.F., Schipani, E., Urena, P., Richards, J., Bonventre, J.V., Potts, J.T., Kronenberg, H.M., and Segre, G.V. (1992) Expression Cloning of A Common Receptor for Parathyroid-Hormone and Parathyroid Hormone-Related Peptide from Rat Osteoblast-Like Cells - A Single Receptor Stimulates Intracellular Accumulation of Both Camp and Inositol Trisphosphates and Increases Intracellular Free Calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 2732-2736.
2. Alonso, A., Saez, R., Villena, A., and Goni, F.M. (1982) Increase in Size of Sonicated Phospholipid-Vesicles in the Presence of Detergents. *Journal of Membrane Biology* 67, 55-62.
3. Andrade, M.A., Chacon, P., Merelo, J.J., and Moran, F. (1993) Evaluation of Secondary Structure of Proteins from Uv Circular-Dichroism Spectra Using An Unsupervised Learning Neural-Network. *Protein Engineering* 6, 383-390.
4. Ashworth, L.E. (2002) Teriparatide (hPTH-[1-34]) - A recombinant human parathyroid hormone fragment with anabolic actions for the treatment of osteoporosis. *Formulary* 37, 129-+.
5. Attwood, T.K., and Findlay, J.B.C. (1994) Fingerprinting G-Protein-Coupled Receptors. *Protein Engineering* 7, 195-203.
6. Bane, S.E., Velasquez, J.E., and Robinson, A.S. (2007) Expression and purification of milligram levels of inactive G-protein coupled receptors in E-coli. *Protein Expression and Purification* 52, 348-355.
7. Baneres, J.L., and Parello, J. (2003) Structure-based analysis of GPCR function: Evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B-4 receptor BLT1 and the G-protein. *Journal of Molecular Biology* 329, 815-829.
8. Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 411-421.
9. Barbezat, G.O., and Grossman, M.I. (1971) Intestinal Secretion - Stimulation by Peptides. *Science* 174, 422-&.
10. Bayburt, T.H., Grinkova, Y.V., and Sligar, S.G. (2006) Assembly of single bacteriorhodopsin trimers in bilayer nanodiscs. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 450, 215-222.
11. Bayburt, T.H., Leitz, A.J., Xie, G.F., Oprian, D.D., and Sligar, S.G. (2007) Transducin activation by nanoscale lipid bilayers containing one and two rhodopsins. *Journal of Biological Chemistry* 282, 14875-14881.
12. Baynes, B.M., Wang, D.I.C., and Trout, B.L. (2005) Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry* 44, 4919-4925.
13. Bazarsuren, A., Grauschopf, U., Wozny, M., Reusch, D., Hoffmann, E., Schaefer, W., Panzner, S., and Rudolph, R. (2002) In vitro folding, functional characterization, and

disulfide pattern of the extracellular domain of human GLP-1 receptor. *Biophys.Chem.* **96**, 305-318.

14. Beck, M., Siebert, F., and Sakmar, T.P. (1998) Evidence for the specific interaction of a lipid molecule with rhodopsin which is altered in the transition to the active state metarhodopsin II. *Febs Letters* **436**, 304-308.
15. Berger, C., Ho, J.T., Kimura, T., Hess, S., Gawrisch, K., and Yeliseev, A. (2010) Preparation of stable isotope-labeled peripheral cannabinoid receptor CB2 by bacterial fermentation. *Protein Expression and Purification* **70**, 236-247.
16. Bhatia, V., Mula, R.V., and Falzon, M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates PTHrP expression via transcriptional, post-transcriptional and post-translational pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology In Press, Uncorrected Proof*.
17. Böcker, H. Entwicklung einer Methode zum Bindungsnachweis von in Nanodiscs rekonstituierten Parathormonrezeptor-1. 2011.

Ref Type: Patent

18. Bokoch, M.P., Zou, Y.Z., Rasmussen, S.G.F., Liu, C.W., Nygaard, R., Rosenbaum, D.M., Fung, J.J., Choi, H.J., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Puglisi, J.D., Weis, W.I., Pardo, L., Prosser, R.S., Mueller, L., and Kobilka, B.K. (2010) Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **463**, 108-U121.
19. 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 Expression and Purification* **58**, 114-121.
20. Brandt, D.W., Wachsmann, W., and Deftos, L.J. (1994) Parathyroid Hormone-like Protein: Alternative Messenger RNA Splicing Pathways in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Research* **54**, 850-853.
21. Bringhurst, F.R., Stern, A.M., Yotts, M., Mizrahi, N., Segre, G.V., and Potts, J.T., Jr. (1989) Peripheral metabolism of [<sup>35</sup>S]parathyroid hormone in vivo: influence of alterations in calcium availability and parathyroid status. *J.Endocrinol.* **122**, 237-245.
22. Brown, E.M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M.A., Lytton, J., and Hebert, S.C. (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature.* **366**, 575-580.
23. Buchner, J., and Rudolph, R. (1991) Renaturation, Purification and Characterization of Recombinant Fab-Fragments Produced in Escherichia-Coli. *Bio-Technology* **9**, 157-162.
24. Campbell, R.M., Bongers, J., and Felix, A.M. (1995) Rational Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Growth-Hormone Releasing-Factor Analogs. *Biopolymers* **37**, 67-88.
25. Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., 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 beta(2)-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-1265.
26. Chillakuri, C.R., Reinhart, C., and Michel, H. (2007) C-terminal truncated cannabinoid receptor 1 coexpressed with G protein trimer in Sf9 cells exists in a precoupled state and shows constitutive activity. *FEBS J* **274**, 6106-6115.

27. Clapham, D.E., and Neer, E.J. (1997) G PROTEIN  $\alpha$  SUBUNITS. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 37, 167-203.
28. Collip, J.B. (1925) THE EXTRACTION OF A PARATHYROID HORMONE WHICH WILL PREVENT OR CONTROL PARATHYROID TETANY AND WHICH REGULATES THE LEVEL OF BLOOD CALCIUM. *Journal of Biological Chemistry* 63, 395-438.
29. Compton, L.A., and Johnson, W.C. (1986) Analysis of Protein Circular-Dichroism Spectra for Secondary Structure Using A Simple Matrix Multiplication. *Analytical Biochemistry* 155, 155-167.
30. Copp, D.H., and Cameron, E.C. (1961) Demonstration of A Hypocalcemic Factor (Calcitonin) in Commercial Parathyroid Extract. *Science* 134, 2038-&.
31. Crane, R.K., Malathi, P., and Preiser, H. (1976) Reconstitution of Specific Na<sup>+</sup>-Dependent D-Glucose Transport in Liposomes by Triton-X-100 Extracted Proteins from Purified Brush-Border Membranes of Hamster Small-Intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71, 1010-1016.
32. Daugherty, D.L., Rozema, D., Hanson, P.E., and Gellman, S.H. (1998) Artificial chaperone-assisted refolding of citrate synthase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33961-33971.
33. Dautzenberg, F.M., and Hauger, R.L. (2002) The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends in Pharmacological Sciences* 23, 71-77.
34. Degrip, W.J., VanOostrum, J., and Bovee-Geurts, P.H.M. (1998) Selective detergent-extraction from mixed detergent/lipid/protein micelles, using cyclodextrin inclusion compounds: a novel generic approach for the preparation of proteoliposomes. *Biochemical Journal* 330, 667-674.
35. Delamaza, A., and Parra, J.L. (1994) Solubilization of Unilamellar Phospholipid-Bilayers by Nonionic Surfactants. *Colloid and Polymer Science* 272, 721-730.
36. Delean, A., Stadel, J.M., and Lefkowitz, R.J. (1980) A Ternary Complex Model Explains the Agonist-Specific Binding-Properties of the Adenylate Cyclase-Coupled Beta-Adrenergic-Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 255, 7108-7117.
37. Denisov, I.G., Grinkova, Y.V., Civjan, N.R., Schuler, M.A., Bayburt, T.H., and Sligar, S.G. Membrane Scaffold Proteins. The Board of Trustees of the University of Illinois. 10/465,789(US 7,083,958 B2). 2006.  
Ref Type: Patent
38. Dorn, M. 2009 Rekombinante Expression und Identifizierung essentieller Strukturelemente des humanen H<sup>+</sup>-Aminosäure-Cotransporters hPAT1. 2009.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
39. Drechsler, N. Herstellung von Liposomen und Rekonstitution eines G-Protein gekoppelten Rezeptors in Liposomen. 1-12-2006.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
40. Drechsler, N., Fröbel, J., Jahreis, G., Gopalswamy, M., Balbach, J., Bosse-Doenecke, E., and Rudolph, R. (2011) Binding specificity of the ectodomain of the parathyroid hormone receptor. *Biophysical Chemistry* *In Press, Corrected Proof*.
41. Engel, A., and Gaub, H.E. (2008) Structure and mechanics of membrane proteins. *Annual Review of Biochemistry* 77, 127-148.

42. Engelhardt, H., Meins, T., Poynor, M., Adams, V., Nussberger, S., Welte, W., and Zeth, K. (2007) High-level expression, refolding and probing the natural fold of the human voltage-dependent anion channel isoforms I and II. *Journal of Membrane Biology* 216, 93-105.
43. Ernst, O.P., Gramse, V., Kolbe, M., Hofmann, K.P., and Heck, M. (2007) Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10859-10864.
44. Eytan, G.D. (1982) Use of liposomes for reconstitution of biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 694, 185-202.
45. Findlay, J.B.C., Donnelly, D., Bhogal, N., Hurrell, C., and Attwood, T.K. (1993) Structure of G-Protein-Linked Receptors. *Biochemical Society Transactions* 21, 869-873.
46. Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., and Schioth, H.B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272.
47. Gaede, K., Ferner, H., and Kastrup, H. (1950) Uber Das Zweite Kohlenhydratstoffwechselhormon der Bauchspeicheldruse (Glucagon) und Seine Herkunft aus dem Alpha-Zellensystem. *Klinische Wochenschrift* 28, 388-393.
48. Gardella, T.J., and Jüppner, H. (2001) Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. *Trends Endocrinol.Metab.* 12, 210-217.
49. Gardella, T.J., Luck, M.D., Wilson, A.K., Keutmann, H.T., Nussbaum, S.R., Potts, J.T., and Kronenberg, H.M. (1995) Parathyroid-Hormone (Pth)-Pth-Related Peptide Hybrid Peptides Reveal Functional Interactions Between the 1-14 and 15-34 Domains of the Ligand. *Journal of Biological Chemistry* 270, 6584-6588.
50. Geertsma, E.R., Mahmood, N.A.B.N., Schuurman-Wolters, G.K., and Poolman, B. (2008) Membrane reconstitution of ABC transporters and assays of translocator function. *Nature Protocols* 3, 256-266.
51. Gelbert, L., Schipani, E., Jüppner, H., AbouSamra, A.B., Segre, G.V., Naylor, S., Drabkin, H., and Heath, H. (1994) Chromosomal Localization of the Parathyroid-Hormone Parathyroid Hormone-Related Protein-Receptor Gene to Human-Chromosome 3P21.1-P24.2. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 79, 1046-1048.
52. Gensure, R.C., Gardella, T.J., and Jüppner, H. (2001) Multiple sites of contact between the carboxyl-terminal binding domain of PTHrP-(1-36) analogs and the amino-terminal extracellular domain of the PTH/PTHrP receptor identified by photoaffinity cross-linking. *Journal of Biological Chemistry* 276, 28650-28658.
53. Gensure, R.C., Gardella, T.J., and Jüppner, H. (2005) Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328, 666-678.
54. Gensure, R.C., Shimizu, N., Tsang, J., and Gardella, T.J. (2003) Identification of a contact site for residue 19 of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein analogs in transmembrane domain two of the type 1 PTH receptor. *Molecular Endocrinology* 17, 2647-2658.

55. Girard, P., Pecreaux, J., Lenoir, G., Falson, P., Rigaud, J.L., and Bassereau, P. (2004) A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *Biophysical Journal* 87, 419-429.
56. Goetzl, E.J. (2007) Diverse pathways for nuclear signaling by G protein-coupled receptors and their ligands. *Faseb Journal* 21, 638-642.
57. Grauschopf, U. Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am humanen Parathormon-Rezeptor. 13-9-2000. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Ref Type: Thesis/Dissertation

58. Grauschopf, U., Lilie, H., Honold, K., Wozny, M., Reusch, D., Esswein, A., Schäfer, W., Rücknagel, 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.
59. Greenfie, N., and Fasman, G.D. (1969) Computed Circular Dichroism Spectra for Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry* 8, 4108-&.
60. Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2006) The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics* 110, 465-502.
61. Hamm, H.E. (1998) The Many Faces of G Protein Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 273, 669-672.
62. Hanson, M.A., and Stevens, R.C. (2009) Discovery of New GPCR Biology: One Receptor Structure at a Time. *Structure* 17, 8-14.
63. Heerklotz, H., and Seelig, J. (2000) Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochim.Biophys.Acta*. 1508, 69-85.
64. Heilker, R., Wolff, M., Tautermann, C.S., and Bieler, M. (2009) G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach. *Drug Discovery Today* 14, 231-240.
65. Helenius, A., and Simons, K. (1975) Solubilization of Membranes by Detergents. *Biochimica et Biophysica Acta* 415, 29-79.
66. Hellmich, U.A., Haase, W., Velamakanni, S., van Veen, H.W., and Glaubitz, C. (2008) Caught in the Act: ATP hydrolysis of an ABC-multidrug transporter followed by real-time magic angle spinning NMR. *Febs Letters* 582, 3557-3562.
67. Hengen, P.N. (1995) Methods and Reagents - Purification of His-Tag Fusion Proteins from Escherichia-Coli. *Trends in Biochemical Sciences* 20, 285-286.
68. Hoare, S.R.J. (2005) Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to class B G-protein coupled receptors. *Drug Discovery Today* 10, 417-427.
69. Hoare, S.R.J., and Usdin, T.B. (1999) Quantitative cell membrane-based radioligand binding assays for parathyroid hormone receptors. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 41, 83-90.
70. Huang, K.S., Bayley, H., Liao, M.J., London, E., and Khorana, H.G. (1981) Refolding of An Integral Membrane-Protein - Denaturation, Renaturation, and Reconstitution of Intact Bacteriorhodopsin and 2 Proteolytic Fragments. *Journal of Biological Chemistry* 256, 3802-3809.

71. Ishihara, T., Nakamura, S., Kaziro, Y., Takahashi, T., Takahashi, K., and Nagata, S. (1991) Molecular-Cloning and Expression of A Cdna-Encoding the Secretin Receptor. *Embo Journal* *10*, 1635-1641.
72. Jaakola, V.P., Griffith, M.T., Hanson, M.A., Cherezov, V., Chien, E.Y.T., 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* *317*, 1164-1172.
73. Jonsson, K.B., John, M.R., Gensure, R.C., Gardella, T.J., and Jüppner, H. (2001) Tuberoinfundibular peptide 39 binds to the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor, but functions as an antagonist. *Endocrinology* *142*, 704-709.
74. Jüppner, H. (1994) Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient family of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens* *3*, 371-378.
75. Jüppner, H., AbouSamra, A.B., Freeman, M., Kong, X.F., Schipani, E., Richards, J., Kolakowski, L.F., Hock, J., Potts, J.T., Kronenberg, H.M., and Segre, G.V. (1991) A G-Protein Linked Receptor for Parathyroid-Hormone and Parathyroid-Hormone Related Peptide. *Science* *254*, 1024-1026.
76. Kaufmann, T.C., Engel, A., and Remigy, H.W. (2006) A novel method for detergent concentration determination. *Biophysical Journal* *90*, 310-317.
77. Klammt, C., Schwarz, D., Lohr, F., Schneider, B., Dotsch, V., and Bernhard, F. (2006) Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein. *FEBS J* *273*, 4141-4153.
78. Knigge, U., Holst, J.J., Knuhtsen, S., Petersen, B., Krarup, T., Holstpedersen, J., and Christiansen, P.M. (1984) Gastrin-Releasing Peptide - Pharmacokinetics and Effects on Gastroenteropancreatic Hormones and Gastric-Secretion in Normal Men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* *59*, 310-315.
79. Knowles, A.F., Eytan, E., and Racker, E. (1976) Phospholipid-protein interactions in the Ca<sup>2+</sup>-adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* *251*, 5161-5165.
80. Kobilka, B.K., and Gether, U. (2002) Use of fluorescence spectroscopy to study conformational changes in the beta 2-adrenoceptor. *Methods Enzymol.* *343*:170-82., 170-182.
81. Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2003) Regulation of g protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* *63*, 9-18.
82. Krylova, O.O., Jahnke, N., and Keller, S. (2010) Membrane solubilisation and reconstitution by octylglucoside: Comparison of synthetic lipid and natural lipid extract by isothermal titration calorimetry. *Biophysical Chemistry* *150*, 105-111.
83. Kühlbrandt, W. (2003) Two-Dimensional Crystallization of Membrane Proteins: A Practical Guide. *Methods Enzymol.* *253*-284.
84. Kumar, S., Pioszak, A., Zhang, C.H., Swaminathan, K., and Xu, H.E. (2011) Crystal Structure of the PAC1R Extracellular Domain Unifies a Consensus Fold for Hormone Recognition by Class B G-Protein Coupled Receptors. *Plos One* *6*.
85. Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* *407*, 971-977.

- 
86. Latruffe, N., Berrez, J.M., and El Kebbj, M.S. (1986) Lipid-protein interactions in biomembranes studied through the phospholipid specificity of d-[beta]-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Biochimie* 68, 481-491.
87. Lee, C.W., Gardella, T.J., AbouSamra, A.B., Nussbaum, S.R., Segre, G.V., Potts, J.T., Kronenberg, H.M., and Jüppner, H. (1994) Role of the Extracellular Regions of the Parathyroid-Hormone (Pth) Pth-Related Peptide Receptor in Hormone-Binding. *Endocrinology* 135, 1488-1495.
88. Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptors III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *Journal of Biological Chemistry* 273, 18677-18680.
89. Liebold, J. Rekonstitution des humanen Parathormon Rezeptors 1 in Nanodiscs. 2010.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
90. Lustig, A., Engel, A., and Zulauf, M. (1991) Density Determination by Analytical Ultracentrifugation in A Rapid Dynamic Gradient - Application to Lipid and Detergent Aggregates Containing Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1115, 89-95.
91. Macdonald, R.C., Macdonald, R.I., Menco, B.P.M., Takeshita, K., Subbarao, N.K., and Hu, L.R. (1991) Small-Volume Extrusion Apparatus for Preparation of Large, Unilamellar Vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1061, 297-303.
92. Mann, R., Nasr, N., Hadden, D., Sinfield, J., Abidi, F., Al-Sabah, S., de Maturana, R.L., Treece-Birch, J., Willshaw, A., and Donnelly, D. (2007) Peptide binding at the GLP-1 receptor. *Biochemical Society Transactions* 35, 713-716.
93. Mann, R., Wigglesworth, M.J., and Donnelly, D. (2008) Ligand-receptor interactions at the parathyroid hormone receptors: Subtype binding selectivity is mediated via an interaction between residue 23 on the ligand and residue 41 on the receptor. *Mol Pharmacol* 74, 605-613.
94. Marinissen, M.J., and Gutkind, J.S. (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 368-376.
95. Mayer, L.D., Hope, M.J., and Cullis, P.R. (1986) Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim.Biophys.Acta.* 858, 161-168.
96. Meyenburg, S. Entwicklung von *delivery* Systemen zur kontinuierlichen Abgabe therapeutischer Proteine im Organismus. 2000.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
97. Michalke, K., Huyghe, C., Lichiere, J., Graviere, M.E., Siponen, M., Sciara, G., Lepaul, I., Wagner, R., Magg, C., Rudolph, R., Cambillau, C., and Desmyter, A. (2010) Mammalian G protein-coupled receptor expression in *Escherichia coli*: II. Refolding and biophysical characterization of mouse cannabinoid receptor 1 and human parathyroid hormone receptor 1. *Analytical Biochemistry* 401, 74-80.
98. Moon, H.S., Kim, M.K., and Son, M.H. (2011) The development of non-peptide glucagon-like peptide-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Archives of pharmacal research* 34, 1041-1043.
99. Mulder, J.E., Kolatkar, N.S., and Leboff, M.S. (2006) Drug insight: Existing and emerging therapies for osteoporosis. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* 2, 670-680.

100. Nath, A., Atkins, W.M., and Sligar, S.G. (2007) Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. *Biochemistry* *46*, 2059-2069.
101. Nesterenko, M.V., Tilley, M., and Upton, S.J. (1994) A Simple Modification of Blums Silver Stain Method Allows for 30 Minute Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* *28*, 239-242.
102. Neubig, R.R., and Siderovski, D.R. (2002) Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* *1*, 187-197.
103. Nimmo, I.A., and Bauermeister, A. (1978) Theoretical-Analysis of Use of Zonal Gel-Filtration in Detection and Purification of Protein-Ligand Complexes. *Biochemical Journal* *169*, 437-440.
104. Oakley, B.R., Kirsch, D.R., and Morris, N.R. (1980) A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* *105*, 361-363.
105. Oschmann, J. *Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung des humanen Parathormon-Rezeptors*. 2008.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
106. Palczewski K., kumasaka T., hori T., behnke C.A., motoshima H., fox B.A., trong I.L., 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.
107. 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 in Biochemical Sciences* *34*, 303-310.
108. Paternostre, M.T., ROUX, M., and Rigaud, J.L. (1988) Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry* *27*, 2668-2677.
109. Persson, B., Enander, K., Tang, H.L., and Rydstrom, J. (1984) Energy-Linked Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase - Properties of Proton-Translocating Mitochondrial Transhydrogenase from Beef-Heart Purified by Fast Protein Liquid-Chromatography. *Journal of Biological Chemistry* *259*, 8626-8632.
110. Pioszak, A.A., and Xu, H.E. (2008) Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 5034-5039.
111. Pioszak, A.A., Harikumar, K.G., Parker, N.R., Miller, L.J., and Xu, H.E. (2010) Dimeric arrangement of the parathyroid hormone receptor and a structural mechanism for ligand-induced dissociation. *Journal of Biological Chemistry*.
112. Pioszak, A.A., Parker, N.R., Gardella, T.J., and Xu, H.E. (2009) Structural basis for parathyroid hormone-related protein binding to the parathyroid hormone receptor and design of conformation-selective peptides. *Journal of Biological Chemistry* *M109*.
113. Potts, J.T. (2005) Parathyroid hormone: past and present. *J.Endocrinol.* *187*, 311-325.

114. Potts, J.T., and Gardella, T.J. (2007) Progress, paradox, and potential - Parathyroid hormone research over five decades. *Skeletal Biology and Medicine, Pt B - Disease Mechanisms and Therapeutic Challenges 1117*, 196-208.
115. Pucadyil, T.J., and Chattopadhyay, A. (2006) Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Prog.Lipid Res.* 45, 295-333.
116. Quadrifo, F., and Urry, D.W. (1968) Ultraviolet Rotatory Properties of Polypeptides in Solution .I. Helical Poly-L-Alanine. *Journal of the American Chemical Society* 90, 2755-&.
117. Racker, E. (1979) Reconstitution of membrane processes. *Methods Enzymol.* 55:699-711., 699-711.
118. Racker, E., Violand, B., Oneal, S., Alfonzo, M., and Telford, J. (1979) Reconstitution, A Way of Biochemical-Research - Some New Approaches to Membrane-Bound Enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 198, 470-477.
119. Raschle, T., Hiller, S., Yu, T.Y., Rice, A.J., Walz, T., and Wagner, G. (2009) Structural and Functional Characterization of the Integral Membrane Protein VDAC-1 in Lipid Bilayer Nanodiscs. *Journal of the American Chemical Society*.
120. Rasmussen, S.G.F., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R.P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F.X., Weis, W.I., and Kobilka, B.K. (2007) Crystal structure of the human beta(2) adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-3U4.
121. Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T.A., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skinnotis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K., and Kobilka, B.K. (2011) Crystal structure of the [bgr]2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature advance online publication*.
122. Raunser, S., Haase, W., Bostina, M., Parcej, D.N., and Kuhlbrandt, W. (2005) High-yield expression, reconstitution and structure of the recombinant, fully functional glutamate transporter GLT-1 from *Rattus norvegicus*. *Journal of Molecular Biology* 351, 598-613.
123. Remigy, H.W., Caujolle-Bert, D., Suda, K., Schenk, A., Chami, M., and Engel, A. (2003) Membrane protein reconstitution and crystallization by controlled dilution. *Febs Letters* 555, 160-169.
124. Rey, A., Manen, D., Rizzoli, R., Caverzasio, J., and Ferrari, S.L. (2006) Proline-rich motifs in the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor C terminus mediate scaffolding of c-Src with beta-arrestin2 for ERK1/2 activation. *Journal of Biological Chemistry* 281, 38181-38188.
125. Rigaud, J.L., Levy, D., Mosser, G., and Lambert, O. (1998) Detergent removal by non-polar polystyrene beads - Applications to membrane protein reconstitution and two-dimensional crystallization. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 27, 305-319.
126. Rigaud, J.L., Pitard, B., and Levy, D. (1995) Reconstitution of Membrane-Proteins Into Liposomes - Application to Energy-Transducing Membrane-Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1231, 223-246.
127. Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., 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 beta(2)-adrenergic receptor function. *Science* *318*, 1266-1273.
128. Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G.F., and Kobilka, B.K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* *459*, 356-363.
129. 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.
130. Rozema, D., and Gellman, S.H. (1996) Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme: Modulation of the competition between renaturation and aggregation. *Biochemistry* *35*, 15760-15771.
131. Rudolph, R., and Lilie, H. (1997) In vitro folding of inclusion body proteins. *Nachrichten aus Chemie Technik und Laboratorium* *45*, 753-&.
132. Runge, S., Schimmer, S., Oschmann, J., Schiodt, C.B., Knudsen, S.M., Jeppesen, C.B., Madsen, K., Lau, J., Thogersen, H., and Rudolph, R. (2007) Differential structural properties of GLP-1 and exendin-4 determine their relative affinity for the GLP-1 receptor N-terminal extracellular domain. *Biochemistry* *46*, 5830-5840.
133. 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. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 11340-11347.
134. Schmid, F.X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In: *Protein Structure: a practical approach*. T.E.Creighton, ed. (IRL Press: Oxford), pp. 261-297.
135. Schmidt, P., Berger, C., Scheidt, H.A., Berndt, S., Bunge, A., Beck-Sickinger, A.G., and Huster, D. (2010) A reconstitution protocol for the in vitro folded human G protein-coupled Y(2) receptor into lipid environment. *Biophysical Chemistry* *150*, 29-36.
136. Schneider, H., Feyen, J.H.M., Seuwen, K., and Movva, N.R. (1993) Cloning and Functional Expression of A Human Parathyroid-Hormone Receptor. *European Journal of Pharmacology-Molecular Pharmacology Section* *246*, 149-155.
137. Schneider, R., Ader, C., Lange, A., Giller, K., Hornig, S., Pongs, O., Becker, S., and Baldus, M. (2008) Solid-state NMR spectroscopy applied to a chimeric potassium channel in lipid bilayers. *Journal of the American Chemical Society* *130*, 7427-7435.
138. Schröder-Tittmann, K., Bosse-Doenecke, E., Reedtz-Runge, S., Ihling, C., Sinz, A., Tittmann, K., and Rudolph, R. (2010) Recombinant Expression, in Vitro Refolding, and Biophysical Characterization of the Human Glucagon-like Peptide-1 Receptor. *Biochemistry* *49*, 7956-7965.
139. Seddon, A.M., Curnow, P., and Booth, P.J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim.Biophys.Acta.* *1666*, 105-117.
140. Seddon, A.M., Lorch, M., Ces, O., Templer, R.H., Macrae, F., and Booth, P.J. (2008) Phosphatidylglycerol lipids enhance folding of an alpha helical membrane protein. *Journal of Molecular Biology* *380*, 548-556.
141. Segawa, H., Kaneko, I., Takahashi, A., Kuwahata, M., Ito, M., Ohkido, I., Tatsumi, S., and Miyamoto, K. (2002) Growth-related renal type IINa/P-i cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 19665-19672.

142. Sen, S., Jaakola, V.P., Heimo, H., Engstrom, M., Larjomaa, P., Scheinin, M., Lundstrom, K., and Goldman, A. (2003) Functional expression and direct visualization of the human alpha(2B)-adrenergic receptor and alpha(2B)-AR-green fluorescent fusion protein in mammalian cell using Semliki Forest virus vectors. *Protein Expression and Purification* 32, 265-275.
143. Shanmugavadivu, B., Apell, H.J., Meins, T., Zeth, K., and Kleinschmidt, J.H. (2007) Correct folding of the beta-barrel of the human membrane protein VDAC requires a lipid bilayer. *Journal of Molecular Biology* 368, 66-78.
144. Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2003) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochemical Journal* 375, 503-515.
145. Sherwood, N.M., Krueckl, S.L., and Mcrory, J.E. (2000) The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrine Reviews* 21, 619-670.
146. Sreerama, N., and Woody, R.W. (1993) A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular-Dichroism. *Analytical Biochemistry* 209, 32-44.
147. Tager, H., Hohenboken, M., Markese, J., and Dinerstein, R.J. (1980) Identification and Localization of Glucagon-Related Peptides in Rat-Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 77, 6229-6233.
148. Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization - From ontogeny to signalling regulation. *Embo Reports* 5, 30-34.
149. Thomas, B.E., Woznica, I., Mierke, D.F., Wittelsberger, A., and Rosenblatt, M. (2008) Conformational changes in the parathyroid hormone receptor associated with activation by agonist. *Molecular Endocrinology* 22, 1154-1162.
150. Tohgo, A., Choy, E.W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K.L., Laporte, S., Oakley, R.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., and Luttrell, L.M. (2003) The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6258-6267.
151. Unger, V.M., and Schertler, G.F. (1995) Low resolution structure of bovine rhodopsin determined by electron cryo-microscopy. *Biophys.J.* 68, 1776-1786.
152. Urwyler, S. (2011) Allosteric Modulation of Family C G-Protein-Coupled Receptors: from Molecular Insights to Therapeutic Perspectives. *Pharmacological Reviews* 63, 59-126.
153. Usdin, T.B., Hoare, S.R.J., Wang, T., Mezey, E., and Kowalak, J.A. (1999) TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus. *Nature Neuroscience* 2, 941-943.
154. Usdin, T.B., Gruber, C., and Bonner, T.I. (1995) Identification and Functional Expression of a Receptor Selectively Recognizing Parathyroid Hormone, the PTH2 Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 270, 15455-15458.
155. 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. *Journal of Clinical Investigation* 113, 598-608.

156. Vik, S.B., Georgevich, G., and Capaldi, R.A. (1981) Diphosphatidylglycerol Is Required for Optimal Activity of Beef-Heart Cytochrome-C Oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 78, 1456-1460.
157. Vilardaga, J.P., Romero, G., Friedman, P.A., and Gardella, T.J. (2011) Molecular basis of parathyroid hormone receptor signaling and trafficking: a family B GPCR paradigm. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 1-13.
158. Violin, J.D., and Lefkowitz, R.J. (2007) beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 28, 416-422.
159. Walther, C., Nagel, S., Gimenez, L.E., Morl, K., Gurevich, V.V., and Beck-Sickinger, A.G. (2010) Ligand-induced Internalization and Recycling of the Human Neuropeptide Y-2 Receptor Is Regulated by Its Carboxyl-terminal Tail. *Journal of Biological Chemistry* 285, 41578-41590.
160. Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G.W., Tate, C.G., and Schertler, G.F.X. (2008) Structure of a beta(1)-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-492.
161. Wu, H., Su, K., Guan, X., Sublette, M., and Stark, R.E. (2010) Assessing the size, stability, and utility of isotropically tumbling bicelle systems for structural biology. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1798, 482-488.
162. Xiao, K.H., Shenoy, S.K., Nobles, K., and Lefkowitz, R.J. (2004) Activation-dependent conformational changes in beta-arrestin 2. *Journal of Biological Chemistry* 279, 55744-55753.
163. Yeliseev, A.A., Wong, K.K., Soubias, O., and Gawrisch, K. (2005) Expression of human peripheral cannabinoid receptor for structural studies. *Protein Sci.* 14, 2638-2653.

## 10 Anhang

### 10.1 Produktion von PTH- und GLP1-ECFP Fusionsproteinen

Für den Liganden PTH wurde eine hohe unspezifische Interaktion mit Oberflächen gefunden. Aufgrund dessen wurde für PTH ein Fusionspartner gesucht, der sowohl die Neigung zur Selbstassoziation, als auch zur Aggregation herabsetzt. Die Wahl fiel dabei auf das *enhanced cyan fluorescent protein* (ECFP). Die spezifische ECFP Absorption konnte als spektroskopische Sonde zur Analyse der Konzentration verwendet werden. Der Vorteil gegenüber einem anderen Kopplungsreagens wie z.B. AEDANS liegt in einem höheren spezifischen Extinktionskoeffizienten des ECFP. Dadurch wird eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erreicht. Die Fusion des ECFP erfolgte am C-Terminus des PTH 1-84. Zur Aktivierung der PTHR1 sind die ersten 34 Aminosäuren des N-Terminus des PTH ausreichend und die C-terminalen 50 Aminosäuren dienen hier als *linker*, um sterische Einflüsse des ECFP auf die Ligandenbindung zu unterbinden.

Tabelle 10-1: Aufbau und Aminosäuresequenz von PTH-ECFP

Proteinname	Aminosäure Sequenz
<b>SUMO-Erkennungssequenz</b>	MGSSHHHHHHGSGLVPRGSASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHIN LKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKRQ GKEMDSL RFLYDGI RIQ ADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGG
<b>PTH (1-84)</b>	SVSEIQLMHN LGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAPLAPRD AGSQRPRKKEDNVLVESHEKSLGEADKADVNLTKAKSQ
<b>ECFP</b>	GSMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMP EGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNI LGHKLENYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHY QQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGI TLGMDELYK

Im Gegensatz bestand die GLP-Sequenz nur aus den ersten 33 N-terminalen Aminosäuren, die zur Aktivierung ausreichend sind. Es wurde ein *linker* aus der Sequenz (GS)<sub>6</sub> zwischen GLP und ECFP eingesetzt.

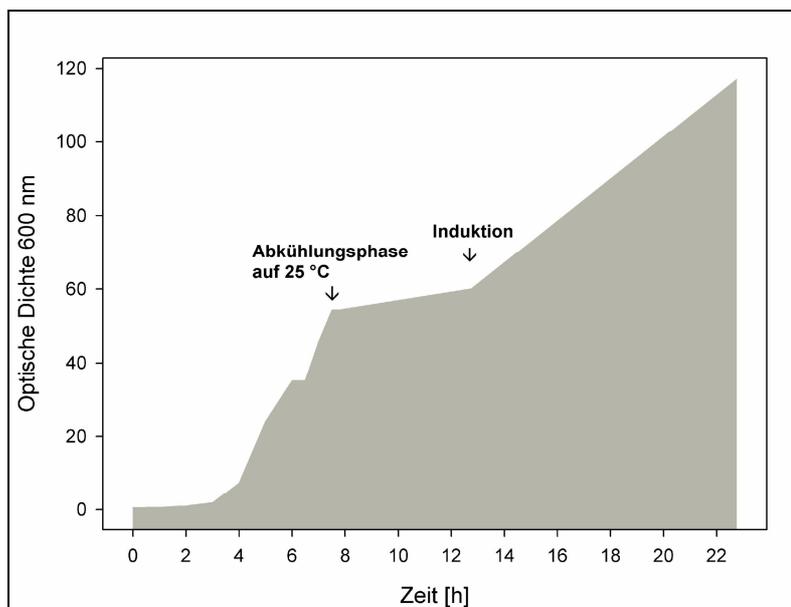
Die Fusionsproteine PTH- und GLP-ECFP wurden ebenfalls als Fusionsproteine bestehen aus dem SUMO-(*small ubiquitin like modifier*)-Protein und einem entsprechenden Ligand für den PTHR1 oder GLP1R gekoppelt an *enhanced cyan fluorescence protein* (ECFP) produziert.

Tabelle 10-2: Aufbau und Aminosäuresequenz von GLP-ECFP

Proteinname	Aminosäure Sequenz
Summ- Erkennungs- Sequenz	MGSSHHHHHGSGLVPRGSASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHIN LKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFKRQKEMDSLRFYDGIQ ADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGG
GLP1	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGPQ
linker	GSGSGSGSGSGS
ECFP	GSMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMP EGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNI LGHKLEYNYISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHY QQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGI TLGMDELYK

### 10.1.1 Fermentation der SUMO-ECFP Fusionsproteine

Im *fed-batch*-Verfahren wurde eine große Menge an Biomasse unter streng kontrollierten Parametern produziert. Die Fermentation erfolgte nach einem Protokoll zur Anzucht im Komplexmedium. Zur Produktion wurde der *E.coli*-Stamm BL21 Rosetta pLys eingesetzt. Die Zellen wuchsen bis zu einer optischen Dichte  $OD_{600} = 60$  heran. In **Abbildung 10-1** ist das Profil der Fermentation von SUMO-PTH-ECFP dargestellt. Unter idealen Wachstumsbedingungen wird ein logarithmisches Zellwachstum erhalten. Die Absenkung der Temperatur von 37 °C auf 25 °C gewährleistet eine überwiegend lösliche Produktion. Bei der Reduzierung der Temperatur im Fermenter wurde ein verringertes Zellwachstum aufgrund eines reduzierten Stoffwechsels der Zellen beobachtet. Bei Erreichen einer Temperatur von 25 °C erfolgte die Induktion der Proteinbiosynthese mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG im Fermenter. Ab dem Zeitpunkt der Induktion stieg das Zellwachstum unter gleichbleibenden Bedingungen erneut an.



**Abbildung 10-1: Fermentation des Fusionskonstruktes SUMO-PTH-ECFP.** Die Fermentation erfolgte auf Komplexmedium im *fed-batch*-Verfahren. Im Startmedium lag eine Glukosekonzentration von 5 g/l vor. Der Verbrauch an Glukose wurde mit einer Glukoselösung (10 g/l) kompensiert. Im Fermenter betrug der Sauerstoffpartialdruck 30%, reguliert durch die Luftzufuhr und der Rührerdrehzahl. Bei einer optischen Dichte von 60 erfolgte eine Abkühlung des Fermenter in 3 °C-Schritten auf 25 °C. Bei stabiler Temperatur wurde die Induktion der SUMO-PTH-ECFP Produktion durch 1 mM IPTG vorgenommen.

Die Ursache könnte eine Anpassung der Zellen an die Temperatur durch Produktion von Kälteschock-Proteinen, die den Organismus stabilisieren, sein. Die Zellernte erfolgte 10 h nach dem Zeitpunkt der Induktion. Es konnte eine Biofeuchtmasse von 1,7 kg Zellen mit SUMO-PTH-ECFP aus 8 l Kultur gewonnen werden.

### 10.1.2 GLP-ECFP Produktion

Tabelle 10-3: Optische Dichte der Fermentation von GLP-ECFP in *E.coli* BL21c<sup>+</sup>

Zeit	Optische Dichte (600 [nm])	Temperatur [°C]
0	0,47	37
1	0,563	37
2	0,972	37,7
3	1,863	37,5
4	7,3	37
5	24	36,7
6	35	36,3
6,5	35	35,9
7	45,7	36,3
7,5	54,3	31
7,75	54,3	25
12,25	60	24,6
22,75	117	25

Die Fermentation wurde analog zur Produktion von PTH-ECFP durchgeführt. Die Zellernte erfolgte 10 h nach dem Zeitpunkt der Induktion. Es konnte eine Biofeuchtmasse von 1,65 kg Zellen mit SUMO-GLP-ECFP aus 8 L Kultur gewonnen werden.

### 10.1.3 Reinigung der SUMO-ECFP Fusionsproteine

Vom jeweiligen Fusionskonstrukt wurden 4 g Zellen im Aufschlusspuffer resuspendiert und an der French-Press aufgeschlossen, wobei das Protein im Überstand enthalten war. Die Reinigung des Fusionskonstruktes SUMO-PTH-ECFP erfolgte mittels Ni-NTA-Sepharose aus der löslichen Fraktion. Zur Gewinnung der Fusionsproteine wurde diese mit der SUMO-Protease verdaut. Diese spaltete spezifisch hinter der SUMO-Schnittstelle im Fusionsprotein, aber vor dem N-Terminus des Liganden PTH-ECFP. Im Reaktionsansatz tragen nur die SUMO-Protease und die SUMO-Erkennungssequenz einen His-tag und konnten durch einen Ni-NTA-

Sepharose Chromatographie-Schritt abgetrennt werden, während das Fusionsprotein im Durchlauf isoliert werden konnte.

Aus 1 g Biofeuchtmasse konnten 12 ml von PTH-ECFP in einer Konzentration von 105  $\mu$ M gewonnen werden. Die Analyse der einzelnen Reinigungsschritte erfolgte durch SDS-PAGE. Dabei zeigt sich, dass der Verdau mit der SUMO-Protease quantitativ erfolgte. Mittels Massenspektrometrie wurde die vollständige N-terminale Sequenz der gereinigten Proteine PTH-ECFP und GLP-ECFP nachgewiesen (Tabelle 10-4). Unter der Verwendung von Konzentratoren wurde das entsprechende Protein (PTH-/ GLP-ECFP) auf bis zu 300  $\mu$ M angereichert.

#### 10.1.4 Massenspektrometrische Analyse der gereinigten Fusionsproteine

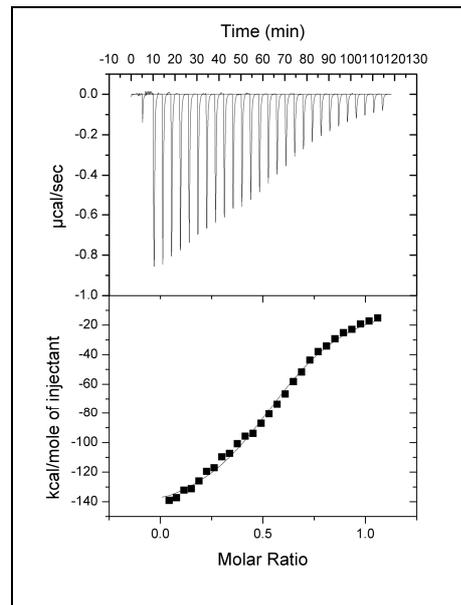
Die gereinigten und prozessierten Fusionsproteine wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und die erhaltenen Banden durch Massenspektrometrie analysiert.

Tabelle 10-4: Sequenzanalyse der gereinigten PTH-ECFP Fusionsproteine. Die identifizierten Fragmente sind eingefärbt.

PTH	ECFP
SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLR KKLQDVHNFVALGAPLAPRDAGSQR RKKEDNVLVESHEKSLGEADKADV VLTKAKSQ	GSMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKF SVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPW PTLVTTLTWGVQCFSRYPDHMKQHDFKSA MPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD TLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNISH NVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLA DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSK DPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

In den massenspektrometrischen Analysen konnte der vollständige N-terminale Bereich von PTH (1-84) identifiziert werden. Daraus folgt, dass der N-Terminus nicht durch Proteasen während der Reinigung prozessiert wurde.

### 10.1.5 Analyse der Ligandenbindung von PTH-ECFP zu nPTHR1



**Abbildung 10-2: Charakterisierung des Fusionsproteins PTH-ECFP mittels isothermer Titrationskalorimetrie.** 29 Injektionen á 10 µl einer 250 µM PTH-ECFP-Lösung wurden zu 5 µM nPTHR1 bei 20 °C titriert. Die Bindungsstärke des Fusionsproteins PTH-ECFP zu nPTHR1 wird durch eine Dissoziationskonstante von 27 µM charakterisiert. Die Probenvorbereitung und die Messungen erfolgten in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 bei 20° C.

Die Bindungsfähigkeit von PTH-ECFP zur N-terminalen Domäne des PTHR1 (nPTHR1) wurde mit ITC überprüft. In **Abbildung 10-2** ist die ITC-Messung dargestellt, bei der eine Dissoziationskonstante von 27 µM ermittelt werden konnte. Der Literaturwert der Dissoziationskonstante für nPTHR1 und dem Peptidliganden PTH beträgt 3 µM (Grauschopf *et al.*, 2000). Diese Abweichung ist vermutlich auf die relativ schlechte Datenqualität der ITC-Messung zurückzuführen. Idealerweise wird eine Messung mit hohen Proteinkonzentrationen durchgeführt. Dabei muss in der ITC-Messzelle eine Proteinkonzentration vorliegen, die der 10-fachen Konzentration der Dissoziationskonstante entspricht. Der Titrant sollte wiederum eine Proteinkonzentration 100-fach über der Dissoziationskonstante erreichen. Nach Dialyse gegen den ITC-Puffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4<sup>@ 4°C</sup>) wurde eine Proteinkonzentration des PTH-ECFP von 250 µM gemessen. Dieses wurde vollständig zur Messung eingesetzt. Gleichzeitig wurde die Negativkontrolle GLP-ECFP gereinigt und die Bindungsfähigkeit mittels isothermer Titrationskalorimetrie zu nPTHR1 charakterisiert. Dabei konnte keine Bindung von GLP-ECFP an nPTHR1 detektiert werden. Die C-terminale Fusion des ECFP besitzt keinen störenden Einfluss auf die Bindung zu nPTHR1. Die hochaffine Bindung am PTHR1 benötigt lediglich einen intakten N-Terminus des Liganden, daher können

die produzierten Fusionsproteine PTH- und die Negativkontrolle GLP-ECFP für Bindungsstudien am PTHR1 genutzt werden.

## 10.2 Basen- und Aminosäuresequenz des Parathormon Rezeptor 1

Gen des humanen Parathormonrezeptors 1 (hPTHr1) ohne Signalsequenz (Aminosäuren 23-593) kloniert in pET41b<sup>9</sup> Restriktionsenzyme *NdeI* und *NotI*.

### 10.2.1 Basensequenz des humanen PTHR1

```

ATGTACGCGCTGGTGGATGCAGATGACGTCATGACTAAAGAGGAACAGATCTTCTT
GCTGCACCGTGCTCAGGCCAGTGCGAAAAACGGCTCAAGGAGGTCCTGCAGAGG
CCAGCCAGCATAATGGAATCAGACAAGGGATGGACATCTGCGTCCACATCAGGGA
AGCCCAGGAAAGATAAGGCATCTGGGAAGCTCTACCCTGAGTCTGAGGAGGACAA
GGAGGCACCCACTGGCAGCAGGTACCGAGGGCGCCCCTGTCTGCCGGAATGGGAC
CACATCCTGTGCTGGCCGCTGGGGGCACCAGGTGAGGTGGTGGCTGTGCCCTGTCC
GGACTACATTTATGACTTCAATCACAAGGCCATGCCTACCGACGCTGTGACCGCA
ATGGCAGCTGGGAGCTGGTGCCTGGGCACAACAGGACGTGGGCCAACTACAGCGA
GTGTGTCAAATTTCTCACCAATGAGACTCGTGAACGGGAGGTGTTTGACCGCCTGG
GCATGATTTACACCGTGGGCTACTCCGTGTCCCTGGCGTCCCTACCGTAGCTGTGC
TCATCCTGGCCTACTTTAGGCGGCTGCACTGCACGCGCAACTACATCCACATGCACC
TGTTCCCTGTCCTTCATGCTGCGCGCCGTGAGCATCTTCGTCAAGGACGCTGTGCTCT
ACTCTGGCGCCACGCTTGATGAGGCTGAGCGCCTCACCGAGGAGGAGCTGCGCGCC
ATCGCCCAGGCGCCCCCGCCGCCTGCCACCGCCGCTGCCGGCTACGCGGGCTGCAG
GGTGGCTGTGACCTTCTTCTTTACTTCCCTGGCCACCAACTACTACTGGATTCTGGT
GGAGGGGCTGTACCTGCACAGCCTCATCTTCATGGCCTTCTTCTCAGAGAAGAAGT
ACCTGTGGGGCTTCACAGTCTTCGGCTGGGGTCTGCCCGCTGTCTTCGTGGCTGTGT
GGGTCAGTGTCAGAGCTACCCTGGCCAACACCGGGTGCTGGGACTTGAGCTCCGGG
AACAAAAAGTGGATCATCCAGGTGCCCATCCTGGCCTCCATTGTGCTCAACTTCATC
CTTTCATCAATATCGTCCGGGTGCTCGCCACCAAGCTGCGGGAGACCAACGCCGG
CCGGTGTGACACACGGCAGCAGTACCGGAAGCTGCTCAAATCCACGCTGGTGCTCA
TGCCCCTCTTTGGCGTCCACTACATTGTCTTCATGGCCACACCATAACCGAGGTCT
CAGGGACGCTCTGGCAAGTCCAGATGCACTATGAGATGCTCTTCAACTCCTTCCAG
GGATTTTTTGTGCGCAATCATATACTGTTTCTGCAACGGCGAGGTACAAGCTGAGATC
AAGAAATCTTGGAGCCGCTGGACACTGGCACTGGACTTCAAGCGAAAGGCACGCA
GCGGGAGCAGCAGCTATAGCTACGGCCCCATGGTGTCCCACACAAGTGTGACCAAT
GTCGGCCCCCGTGTGGGACTCGGCCTGCCCCTCAGCCCCCGCCTACTGCCCACTGCC

```

<sup>9</sup> Vektorkarte unter: [www.lablife.org/p?a=vdb\\_view&id=g2.\\_OxEwswbDalCFVQyJKGT.j7Lgag-](http://www.lablife.org/p?a=vdb_view&id=g2._OxEwswbDalCFVQyJKGT.j7Lgag-)

```
ACCACCAACGGCCACCCTCAGCTGCCTGGCCATGCCAAGCCAGGGACCCCAGCCCT
GGAGACCCTCGAGACCACACCACCTGCCATGGCTGCTCCCAAGGACGATGGGTTCC
TCAACGGCTCCTGCTCAGGCCTGGACGAGGAGGCCTCTGGGCCTGAGCGGCCACCT
GCCCTGCTACAGGAAGAGTGGGAGACAGTCATGTGA
```

### 10.2.2 Entfernung des C-terminalen Stop-Codons

Die zur Klonierung verwendete *primer* war die T7-Promoter-Sequenz Die Amplifizierung des Gens aus pET15b PTHR und die Restriktion erfolgte über die im Amplifikat enthaltene *NdeI*-Erkennungssequenz.

Homologe Rekombination mit dem Primer PTHR\_NotI\_rev mit folgender Sequenz 5'- CGA GTG **CGG CCG** CCA TGA CTG TCT CCC -3', diente zur Entfernung des Stopcodon vom PTHR1-Gen. Die Restriktion erfolgte über die eingeführte Schnittstelle *NotI*. Die drei Sequenzierungen mit T7prom, T7term und einem internen *primer* (12/06, MWG) verliefen erfolgreich. Die erhaltene Sequenz konnte online mittels T-Coffee<sup>10</sup> im Modus *regular* mit der PTHR1-Sequenz erfolgreich abgeglichen werden.

### 10.2.3 Proteinsequenz

Darstellung der Proteinsequenz des PTHR1 mit C-terminalen His-tag. Die Sequenz konnte auf Proteinebene durch einen Verdau Trypsin und einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse der erhaltenen Peptide verifiziert werden.

```
MYALVDADDVMTKEEQIFLLHRAQAQCEKRLKEVLQRPASIMESDKGWTSASTSGKP
RKDKASGKLYPESEEDKEAPTGSRYRGRPLPEWDHILCWPLGAPGEVVAVPCPDYIY
DFNHKGHAYRRCDRNGSWELVPGHNRTWANYSECVKFLTNETREREVFDRLGMIYTV
GYSVSLASLTVAVLILAYFRRLHCTRNYIHMHLFLSFMLRAVSIFVKDAVLYSGATLDE
AERLTEEELRAIAQAPPPATAAAGYAGCRVAVTFFLYFLATNYYWILVEGLYLHSLIF
MAFFSEKKYLWGFTVFGWGLPAVFVAVWVSVRATLANTGCWDLSSGNKKWIIQVPIL
ASIVLNFILFINIVRVLATKLRNAGRCDTRQQYRKLKSTLVLMPFLGVHYIVFMATP
YTEVSGTLWQVQMHYEMLFNSFQGFVAIIYCFNGEVQAEIKKSWSRWTLALDFKRK
ARSGSSSYSYGPMVSHTSVTNVGPVGLGLPLSPRLLPTATTNGHPQLPGHAKPGTPAL
ETLETPPAMAAPKDDGFLNGSCSGLDEEASGPERPPALLQEEWETVMAAALEHHHHH
HHH
```

---

<sup>10</sup> <http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&daction=TCOFFEE::Regular>

## 10.3 Herstellung von PTHR1-Varianten

Die Variante PTHR1-TEV sollte zur Quantifizierung der Orientierung des PTHR1 in den Proteoliposomen herangezogen werden. Bei einer entgegengesetzten Orientierung würde die TEV-Protease Zugang zum C-Terminus erhalten. Nach einer Prozessierung konnte eine densitometrische Analyse der Banden eines Gels einer SDS-PAGE Rückschlüsse über die verkehrt eingebauten PTHR1 liefern. Auf diese Weise könnte die Rekonstitutionsprozedur hinsichtlich der Orientierung optimiert werden.

### 10.3.1 Basensequenz des PTHR1 mit eingefügter Schnittstelle für die TEV-Protease

```

ATGTACGCGCTGGTGGATGCAGATGACGTCATGACTAAAGAGGAACAGATCTTCCT
GCTGCACCGTGCTCAGGCCAGTGCGAAAAACGGCTCAAGGAGGTCCTGCAGAGG
CCAGCCAGCATAATGGAATCAGACAAGGGATGGACATCTGCGTCCACATCAGGGA
AGCCCAGGAAAGATAAGGCATCTGGGAAGCTCTACCCTGAGTCTGAGGAGGACAA
GGAGGCACCCACTGGCAGCAGGTACCGAGGGCGCCCCTGTCTGCCGGAATGGGAC
CACATCCTGTGCTGGCCGCTGGGGGCACCAGGTGAGGTGGTGGCTGTGCCCTGTCC
GGACTACATTTATGACTTCAATCACAAAGGCCATGCCTACCGACGCTGTGACCGCA
ATGGCAGCTGGGAGCTGGTGCCTGGGCACAACAGGACGTGGGCCAACTACAGCGA
GTGTGTCAAATTTCTCACCAATGAGACTCGTGAACGGGAGGTGTTTGACCGCCTGG
GCATGATTTACACCGTGGGCTACTCCGTGTCCCTGGCGTCCCTACCGTAGCTGTGC
TCATCCTGGCCTACTTTAGGCGGCTGCACTGCACGCGCAACTACATCCACATGCACC
TGTTCCCTGTCCTTCATGCTGCGCGCCGTGAGCATCTTCGTCAAGGACGCTGTGCTCT
ACTCTGGCGCCACGCTTGATGAGGCTGAGCGCCTCACCGAGGAGGAGCTGCGCGCC
ATCGCCAGGCGCCCCCGCCGCTGCCACCGCCGCTGCCGGCTACGCGGGGCTGCAG
GGTGGCTGTGACCTTCTTCTTTACTTCTGGCCACCAACTACTACTGGATTCTGGT
GGAGGGGCTGTACCTGCACAGCCTCATCTTCATGGCCTTCTTCTCAGAGAAGAAGT
ACCTGTGGGGCTTCACAGTCTTCGGCTGGGGTCTGCCCGTGTCTTCGTGGCTGTGT
GGGTCAGTGTGAGAGCTACCCTGGCCAACACCGGGTGCTGGGACTTGAGCTCCGGG
AACAAAAAGTGGATCATCCAGGTGCCATCCTGGCCTCCATTGTGCTCAACTTCATC
CTCTTCATCAATATCGTCCGGGTGCTCGCCACCAAGCTGCGGGAGACCAACGCCGG
CCGGTGTGACACACGGCAGCAGTACCGGAAGCTGCTCAAATCCACGCTGGTGCTCA
TGCCCCTCTTTGGCGTCCACTACATTGTCTTCATGGCCACACCATAACCGAGGTCT
CAGGGACGCTCTGGCAAGTCCAGATGCACTATGAGATGCTCTTCAACTCCTTCCAG
GGATTTTTTGTGCGCAATCATATACTGTTTCTGCAACGGCGAGGTACAAGCTGAGATC
AAGAAATCTTGGAGCCGCTGGACACTGGCACTGGACTTCAAGCGAAAGGCACGCA
GCGGGAGCAGCAGCTATAGCTACGGCCCCATGGTGCTTAAGGAAAACCTGTATTTT
CAGGGTCTTAAGTCCCACACAAGTGTGACCAATGTGCGGCCCCCGTGTGGGACTCGG
CCTGCCCTCAGCCCCCGCCTACTGCCACTGCCACCACCAACGGCCACCCTCAGCT
GCCTGGCCATGCCAAGCCAGGGACCCCAGCCCTGGAGACCCTCGAGACCACACCAC

```

CTGCCATGGCTGCTCCCAAGGACGATGGGTTCTCAACGGCTCCTGCTCAGGCCTG  
GACGAGGAGGCCTCTGGGCCTGAGCGGCCACCTGCCCTGCTACAGGAAGAGTGGG  
AGACAGTCATGGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACCACCAC

### 10.3.2 Aminosäuresequenz des PTHR1-TEV-Konstrukts

MYALVDADDVMTKEEQIFLLHRAQAQCEKRLKEVLQRPASIMESDKGWTSASTSGKP  
RKDKASGKLYPESEEDKEAPTGSRYRGRPLPEWDHILCWPLGAPGEVAVPCPDYIY  
DFNHKGHAYRRCDRNGSWELVPGHNRTWANYSECVKFLTNETREREFVDFRLGMIYTV  
GYSVSLASLTVAVLILAYFRRLHCTRNYIHMHLFLSFMLRAVSIFVKDAVLYSGATLDE  
AERLTEEELRAIAQAPPPATAAAGYAGCRVAVTFFLYFLATNYYWILVEGLYLHSLIF  
MAFFSEKKYLWGFTVFGWGLPAVFVAVWVSVRATLANTGCWDLSSGNKKWIIQVPIL  
ASIVLNFILFINIVRVLATKLRETNAGRCDRQQYRKLKSTLVLMPFLGVHYIVFMATP  
YTEVSGTLWQVQMHYEMLFNSFQGFVAIIYCFNGEVQAEIKKSWSRWTLALDFKPK  
ARSGSSSYSYGPMPV**ENLYFQGS**HTSVTNVGPVGLGLPLSPRLPTATTNGHPQLPGHA  
KPGTPALETLETPPAMAAPKDDGFLNGSCSGLDEEASGPERPPALLQEEWETVMAAA  
LEHHHHHHHH

Das Konstrukt PTHR1-TEV besteht aus 592 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 67239,3 kDa. und einem theoretischen isoelektrischen Punkt von 8,13. Die Erkennungssequenz der TEV-Protease ist rot dargestellt. Der prozessierte C-Terminus besteht aus folgenden Aminosäuren:

SHTSVTNVGPVGLGLPLSPRLPTATTNGHPQLPGHAKPGTPALETLETPPAMAAPK  
DDGFLNGSCSGLDEEASGPERPPALLQEEWETVMAAALEHH HHHHHH

Der C-Terminus besitzt 106 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 11169,4 kDa. mit einem theoretischen isoelektrischen Punkt von 5,80.

### 10.4 Detergens-Optimierung zur Renaturierung des PTHR1

Eine Übersicht der getesteten Detergenzien zur Stabilisierung des PTHR1. Die aufgelisteten Detergenzien stabilisierten PTHR1 im Rückfaltungspuffer für mindestens ein halbes Jahr. Die stabilisierende Wirkung wurde von Cymal-6, n-Decyl- $\beta$ -D-maltosid

und CTAB durch thermische Entfaltung mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Dabei bewirkte keines der gewählten Detergenzien eine höhere Stabilisierung des PTHR1.

Tabelle 10-5: Detergenzien zur Stabilisierung des PTHR1 in Lösung.

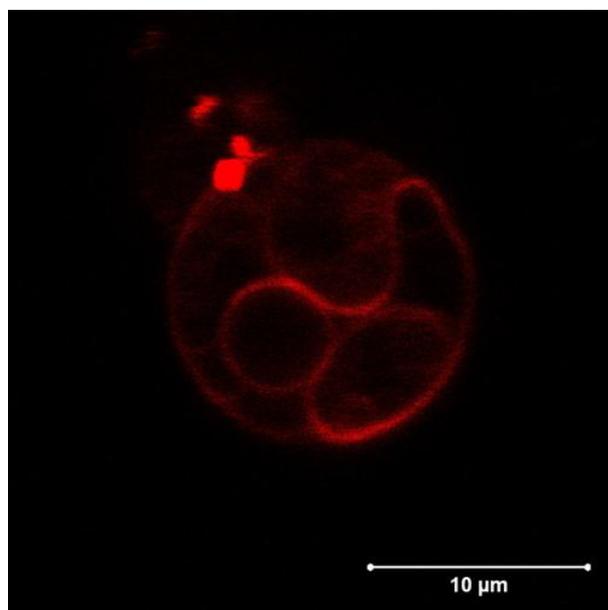
Detergens	CMC	Type
BAM	keine Angabe	ionisch
CTAB	1	ionisch
1-s-Nonyl- $\beta$ -D-thioglucosid	2,9	nicht-ionisch
1-s-Octyl- $\beta$ -D-thioglucosid	9	nicht-ionisch
Anapoe X-305	keine Angabe	nicht-ionisch
Anapoe 20	0,059	nicht-ionisch
Anapoe 35	keine Angabe	nicht-ionisch
Anapoe 58	keine Angabe	nicht-ionisch
Anapoe 80	0,012	nicht-ionisch
Anapoe X-114	keine Angabe	nicht-ionisch
Anapoe X-405	keine Angabe	nicht-ionisch
C12E8	0,11	nicht-ionisch
C12E9	0,05	nicht-ionisch
Cymal-1	340	nicht-ionisch
Cymal-4	7,6	nicht-ionisch
Cymal-5	2,4	nicht-ionisch
Cymal-6	0,56	nicht-ionisch
Cymal-2	120	nicht-ionisch
DDAO	10,4	nicht-ionisch
Deoxy-BigChap	1,4	nicht-ionisch
Hecameg	19,5	nicht-ionisch
IPTG	keine Angabe	nicht-ionisch
n-Decanoylsaccharose	2,5	nicht-ionisch
n-Decyl- $\beta$ -D-maltosid	1,8	nicht-ionisch
<b>n-Dodecyl-<math>\beta</math>-D-maltosid</b>	<b>0,17</b>	<b>nicht-ionisch</b>
n-Hexadecyl- $\beta$ -D-maltosid	0,0006	nicht-ionisch

Detergens	CMC	Type
n-Hexyl- $\beta$ -D-glucosid	250	nicht-ionisch
n-Nonyl- $\beta$ -D-maltosid	6	nicht-ionisch
n-Nonyl- $\beta$ -D-thiomaltosid	3,2	nicht-ionisch
n-Octyl- $\beta$ -D-thiomaltosid	8,5	nicht-ionisch
Nonyl- $\beta$ -D-glucosid	6,5	nicht-ionisch
n-Tetradecyl- $\beta$ -D-maltosid	0,01	nicht-ionisch
n-Tridecyl- $\beta$ -D-maltosid	0,033	nicht-ionisch
n-Undecyl- $\beta$ -D-maltosid	0,59	nicht-ionisch
Pluronic F 68	keine Angabe	nicht-ionisch
Thesit	0,09	nicht-ionisch
FOS-Choline-8	114	zwitterionisch
FOS-Choline-9	39,5	zwitterionisch
FOS-Choline-10	11	zwitterionisch
FOS-Choline-12	1,5	zwitterionisch
Zwittergent 3-12	4	zwitterionisch
Zwittergent-3-08	330	zwitterionisch

## 10.5 Rekonstitution in riesigen unilamellaren Vesikeln (GUVs)

Die Herstellung von Proteo-GUVs ist in zwei Teilschritte gegliedert. In einem ersten Schritt erfolgte eine Detergens vermittelte Rekonstitution zu PTHR1-Proteoliposomen (6.2.2). Diese Vesikel wurden aus dem Lipid POPC hergestellt, um eine optimale Fusion mit den GUVs in zweiten Schritten zu gewährleisten. In diesem zweiten Schritt konnten GUVs mit der Methode des *electroswelling* hergestellt werden. Das bedeutet, dass ein getrockneter Lipid-Film unter dem Einfluss von Wechsellspannung rehydratisiert wurde (Girard *et al.*, 2004). Die Lipidmischung wurde in Chloroform gelöst und auf eine elektrisch leitfähige Oberfläche (Indium-Zinnoxid beschichtete Objektträger, ITO-Gläschen) aufgetragen. Die ITO-Gläschen wurden mit 25  $\mu$ l der gelösten Lipidmischung mit einer Konzentration von 2 mg/ml benetzt und für 3 h im Vakuum bei RT getrocknet. Nach dem Zusammenbau wurde eine 210 mM Sorbitollösung als Rehydratisierungslösung eingefüllt und 10  $\mu$ l der PTHR1-POPC-Proteoliposomen-Lösung hinzugefügt. Die Kammer wurde luftblasenfrei mit einer Hämatokrit-Masse abgedichtet und über Kupferbänder an einen Frequenzgenerator angeschlossen. Für

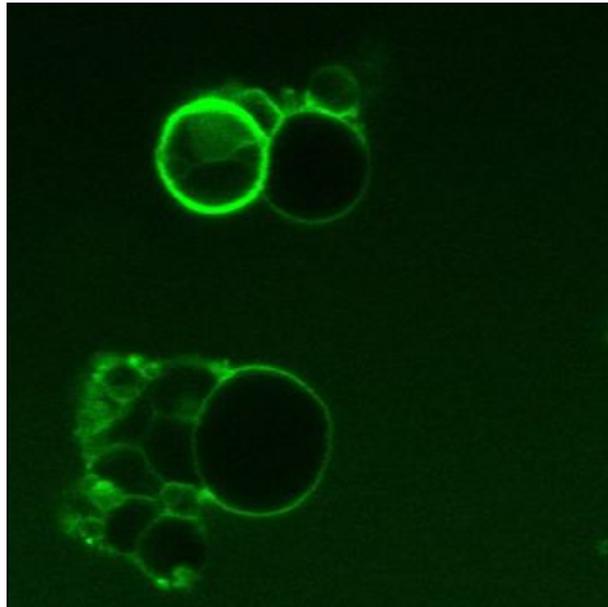
GUVs mit POPC als Basiskomponente wurde eine Spannung von 50 mV mit einer Frequenz von 12 Hz angelegt und kontinuierlich gesteigert. Die Spannungserhöhung erfolgte bis zu einem Wert von 200 mV in Schritten von 10 mV pro min, dann in 100 mV Schritten bis zu einer Spannung von 1,6 V. Diese Spannung wurde für 3 h konstant gehalten.



**Abbildung 10-3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PTHR1-GUVs.** Direkter Nachweis der Fusion von PTHR1-POPC-Proteoliposomen mit den POPC-Lipiden zu GUVs durch die Verwendung von 0,1% eines Rhodamin markiertem DPPC. Dokumentation der Rhodamin-Fluoreszenz auf der Oberfläche der PTHR1-GUVs durch die Verwendung eines konfokalen Laserrastermikroskops. Die Anregungswellenlänge für das Rhodamin markierte DPPC betrug 560 nm und die Detektion erfolgte bei 584 nm.

Das Ablösen der GUVs von den Glaswänden wurde durch langsame Absenkung der Frequenz auf 5 Hz und einem 15 minütigen Wechsel der Sinus- auf Rechteckspannung erreicht. Ein zugesetztes Rhodamin markiertes DPPC zu den PTHR1-POPC-Liposomen diente dem Nachweis einer Fusion mit den GUVs. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 10-3) zeigten im Hintergrund eine leichte Fluoreszenz der gesamten GUVs. Auf der GUVs-Oberfläche waren dominante runde Strukturen zu erkennen. Jedoch konnten keine isolierten Liposomen einer Größe im Bereich von 400 nm gefunden werden. Die GUVs fusionierten erfolgreich mit den PTHR1-POPC-Proteoliposomen. Die produzierten GUVs variierten in ihrer Größe im Bereich zwischen 5 – 15 µm. Der Einbau von PTHR1 in den Proteoliposomen aus POPC und einer erfolgreichen Fusion zu den GUVs wurde mit einem FITC markierten Anti-His Antikörper gezeigt. Dabei wurden die produzierten Proteo-GUVs mit dem Antikörper inkubiert und gewaschen.

Die **Abbildung 10-4** zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der inkubierten Proteo-GUVs. Die Oberfläche der GUVs war dabei einheitlich grün angefärbt und hebt sich von der Hintergrundfluoreszenz deutlich ab. Aufgrund des spezifischen Antikörpers konnte PTHR1 in den GUVs nachgewiesen werden. Vergleichende Messungen mit reinen POPC-GUVs zeigten keine unspezifischen Bindungen des Antikörpers. Im linken unteren Bildrand wurden kleine *cluster* bzw. Vesikel gefunden, die auf den GUVs adhärirten.



**Abbildung 10-4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PTHR1-GUVs mit einem FITC markiertem Anti-His Antikörper.** Direkter Nachweis der Rekonstitution von PTHR1 in GUVs mittels FITC markiertem Anti-His-Antikörper. Inkubation mit Antikörper erfolgte für 2 Stunden in 136,9 mM KCl, 8,1 mM NaP, 1,5 mM KP mit 4  $\mu$ l Anti-His-Antikörper. Darstellung der FITC-Fluoreszenz auf der Oberfläche der PTHR1-GUVs durch die Verwendung eines konfokalen Laserrastermikroskops. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm und die Fluoreszenzemission wurde im Bereich von 490-600 nm gemessen.

Dieses könnte auf einem Überschuss der eingesetzten PTHR1-POPC-Proteoliposomen beruhen und möglicherweise könnte eine Reduktion der Konzentrationen dieses verhindern. Aufgrund dessen wurden nur 10  $\mu$ l der PTHR1-POPC-Proteoliposomen mit einer Lipidkonzentration von 2 mg/ml zur Rekonstitution in GUVs eingesetzt. Eine erfolgreiche Rekonstitution in GUVs wurde mit einem Anti-His-Antikörper analysiert. Da der Antikörper gegen den C-terminalen His-tag des PTHR1 gerichtet ist, können nur falsch eingebaute PTHR1 markiert werden. Dies ist mit einer statistischen Orientierung von Membranproteinen und einer zu schnellen Prozessführung während der Rekonstitution zu begründen (Kühlbrandt, 2003). Die **Abbildung 10-4** zeigten, dass sich der C-Terminus des rekonstituierten PTHR1 außerhalb der GUVs befindet.

Die dominante Fluoreszenz der GUVs wurde durch die Verwendung des konfokalen Laserrasterelektronenmikroskops erreicht. Das erzeugte Bild entsprach einem optischen Schnitt durch die Vesikel. Durch Antikörperfärbung mit einem spezifisch gegen die N-terminale Domäne des PTHR1 gerichteten Antikörpers konnte der Anteil des PTHR1 mit einer korrekten Orientierung nachgewiesen werden. Dennoch konnte die Fusion von PTHR1-POPC-Liposomen zu GUVs erfolgreich gezeigt werden. Somit wurde ein Einsatz der PTHR1-GUVs in Filterbindungs-Assay ermöglicht unberücksichtigt der Orientierung des PTHR1. Diese konnte in den Messungen vernachlässigt werden, da kein aktiver Transport in oder aus den Vesikeln erfolgte. Für PTHR1-GUVs konnte in ersten Experimenten keine Ligandenbindung nachgewiesen werden.

## 10.6 Rekonstitution des PTHR1 in Nanodiscs

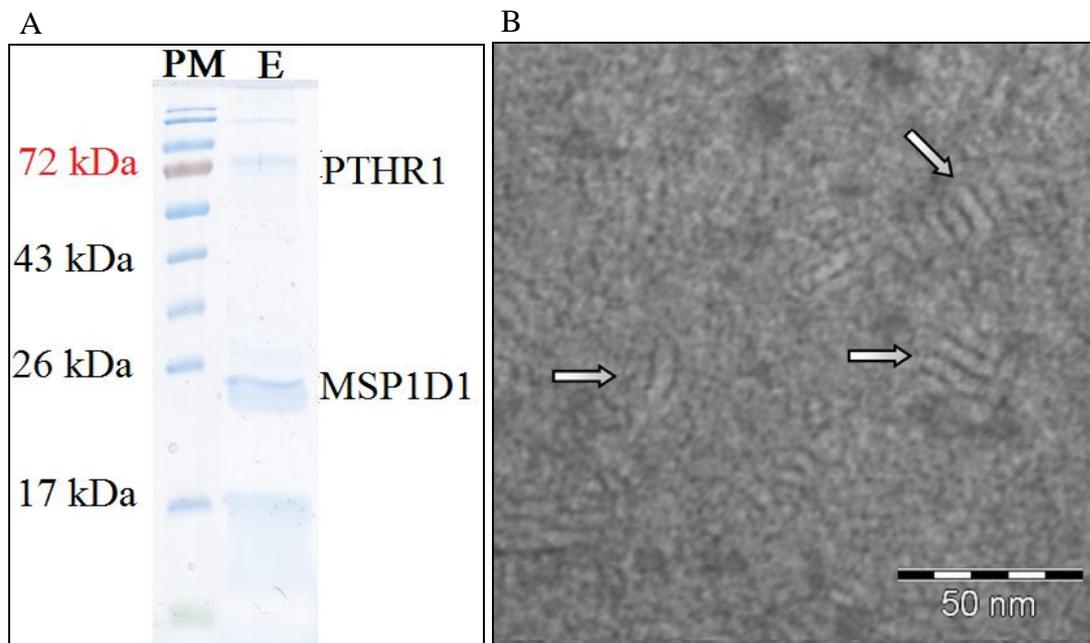
Die Lösung einer möglichen falschen Orientierung des PTHR1 in den künstlichen Membranen lieferte die Verwendung von Nanodiscs. Diese künstlichen Membransysteme bestehen aus einer Lipiddoppelschicht und einem Derivat des Apolipoprotein AI hier *membrane scaffold protein* (MSP1D1). Das MSP1D ist ein  $\alpha$ -helikales Protein aus dem Cholesterinstoffwechsel. Zwei Monomere umgeben die Lipide wie ein Gürtel und es entsteht ein diskoidaler Partikel mit einer Größe von 10 nm genannt Nanodiscs. Bei diesem System sind der normalerweise extrazelluläre N-terminale Bereich und der zellinnere C-terminale Bereich nicht durch ein Kompartiment getrennt, sondern beide Bereiche sind zugänglich.

Tabelle 10-6: Schematischer Ansatz zur Rekonstitution des PTHR1 in Nanodiscs

Schritt	Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
1	PTHR1	14 $\mu$ M	1,7 ml	4,76 $\mu$ M
2	MSP1D1	230 $\mu$ M	2,5 ml	116 $\mu$ M
3	POPC/ Cholat	50 mM/ 100 mM	0,7 ml	7 mM/ 14 mM
4	DDM	1%	32 $\mu$ l	0,1%

Zur Rekonstitution des PTHR1 in Nanodiscs wurden zahlreiche Komponenten benötigt. Der Rezeptor in möglichst hochkonzentrierter Form. Ebenfalls das MSP1D1. Als Lipid wird POPC mit einer Konzentration von 50 mM verwendet, das in 100 mM Cholat gelöst ist. Zusätzlich wurde 0,1% DDM zum Gesamtansatz gegeben. Zur Rekonstitution mussten mindestens 7 mM des Lipids eingesetzt werden. Dazu wurde das MSP1D1 in einem Verhältnis von 1: 60 (Protein

[M]:Lipid [M]) gegeben. Danach erfolgte die Inkubation für 1 h auf einem Orbitalshaker bei 4 °C. Zu dem Ansatz wurden BioBeads in einem Schritt zugegeben, um die Detergenzien zu entziehen und die Bildung der PTHR1-Nanodiscs erfolgte. Zur Rekonstitution des PTHR1 in Nanodiscs wurde eine strikte Reihenfolge der Zugabe der Komponenten befolgt (Tabelle 10-6). PTHR1 konnte mittels Amicon auf 14 µM aufkonzentriert werden.



**Abbildung 10-5: Analyse der Elutionsfraktion von der Nickel-NTA-Sephарose und Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme von PTHR1-Nanodiscs.** (A) Coomassie gefärbtes Gel einer SDS-PAGE (15% Acrylamid) der erhaltenen Fraktion von der Nickel-NTA-Sephарose. Die Proteinbanden für die entsprechenden Molekulargewichte von PTHR1 und MSP1D1 konnten identifiziert werden. (B) Es wurde 1 µl der Probe der isolierten PTHR1-Nanodiscs auf ein Kupfergrid aufgetragen. Die Probe war zur Probenvorbereitung für Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme gegen 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dialysiert worden. Nach einer 1 min Inkubation wurde das *grid* 3-fach mit Wasser gewaschen und für 30 sek. mit 0,1% Uranylazetat inkubiert. Danach erfolgte die Trocknung des *grid*s im Exzikator über Nacht bei RT.

Nach Inkubation der Komponenten wurden die enthaltenen Detergenzien (Cholat und DDM) mittels BioBeads aus der Lösung entfernt. Die Isolierung der PTHR1-Nanodiscs erfolgt mittels Ni-NTA-Sephарose. Dabei wird der Ansatz mit dem Material inkubiert. Es konnten die PTHR1-Nanodiscs über den His-*tag* des PTHR1 mittels Ni-NTA-Sephарose von den leeren Nanodiscs abgetrennt werden. Anschließend erfolgte die Analyse der PTHR1 Nanodiscs mittels SDS-PAGE und Western-Blotting. Die **Abbildung 10-5** zeigt die erhaltene eine Coomassie gefärbtes Gel einer SDS-PAGE. Die identifizierten Proteinbanden können PTHR1 und MSP1D1 zugeordnet werden. Zusätzlich erfolgte die Analyse durch Western-Blotting mit einem Antikörper gerichtet gegen den Histidin-*Tag* des PTHR1. Die Analyse mittels Western-Blotting dieser Elutionsfraktion konnte positiv auf PTHR1 getestet werden (Daten nicht gezeigt).

Nachdem erwiesen ist, dass die Elutionsfraktion der Ni-NTA-Sepharose eindeutig die verwendeten Proteine enthielt, sollte die korrekte Assemblierung der Nanodiscs bestätigt werden. Den eindeutigen Beweis erbrachten Aufnahmen durch Transmission-Elektronenmikroskopie (**Abbildung 10-5**). Hierbei konnte die korrekte Formation von Nanodiscs, die sich zu charakteristischen Stapeln zusammenlagern, gezeigt werden. Die Rekonstitution des PTHR1 in Nanodiscs konnte erfolgreich durchgeführt werden.

## **11 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet. Ich hab diese Arbeit bisher weder an der Martin-Luther-Universität, noch an einer anderen Bildungseinrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

Wörgl, den

## 12 Danksagung

Ich bin Prof. Dr. Rainer Rudolph zu tiefem Dank verpflichtet für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas, einer immerwährenden Gelassenheit und dem richtigen Tipp zur richtigen Zeit.

Ein ganz persönlicher Dank gilt Dr. Eva Bosse-Doenecke für viele lehrreiche Gespräche, Anregungen, fruchtbaren Diskussionen und Engagement.

Ich möchte mich ganz herzlich bei PD Dr. Hauke Lilie, Prof. Dr. Elisabeth Schwarz, PD Dr. Ralph Golbik, Prof. Jochen Balbach, Dr. Gerd Hause, Dr. Christian Lange, Prof. Dr. Milton Stubbs, Dr. Christoph Parthier, SFB610 und GRK1026 für eine unvergessliche Zeit am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bedanken.

Prof. Dr. Dieter Oesterhelt für die Überlassung von 40 mL Bakteriorhodopsin zur Etablierung der Rekonstitution von Bakteriorhodopsin in Liposomen und Nanodiscs.

Dr. Werner Kühlbrandt, Dr. Winfried Haase und Dr. Christine Ziegler vom Institut für Biophysik, Frankfurt, sowie Dr. Dan Donnelly, vom Institute of Pharmacology, Leeds für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppen und Unterstützung bei Versuchen mit PTHR1.

Prof. Dr. Andreas Engel und seinen Mitarbeitern für die wertvollen Ratschläge zur Bearbeitung von Membranproteinen. Ebenfalls für die Anfertigung der 2D-Kristalle von PTHR1 und den ersten *single-particle*-Aufnahmen.

Allen ehemaligen Diplomanden: Christian Carnarius (besonders für die Anfertigung von PTHR1-GUVs), Jens Liebold, Stefan Augustin, Maria Stammwitz, Katarina Kappe und Heike Böcker die an Themen rundum die Rekonstitution des PTHR1 mitgearbeitet haben.

## 13 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Drechsler  
Vorname: Nils Hendrik  
Anschrift: Mozartstrasse 3  
6300 Wörgl  
Österreich  
Geburtsdatum: 24.07.1979  
Geburtsort: Oldenburg (Oldb)  
Familienstand: ledig

### Ausbildung:

12/2011- Sandoz GmbH, Kundl, Österreich  
02/2007-10/2011 Doktorand am Institut für Biotechnologie der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
10/2000-12/2006 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
04/2006-12/2006 Diplomarbeit, Institut für Biotechnologie,  
AG Membranproteine: „Herstellung von Liposomen und  
Rekonstitution eines G-Protein gekoppelten Rezeptors in  
Liposomen“  
05/2000 Allgemeine Hochschulreife, Fichte-Gymnasium, Krefeld

## 14 Publikation

**Drechsler, N., Fröbel, J., Jahreis, G., Gopalswamy, G., Balbach, J., Bosse-Doenecke, E., Rudolph, R.**

Binding specificity of the ectodomain of the parathyroid hormone receptor

Biophysical Chemistry 154 (2011), 66-72