

Rekombinante Herstellung, Renaturierung und  
biophysikalische Charakterisierung des humanen  
*Glucagon-like Peptide-1* Rezeptors

**Dissertation**

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

vorgelegt der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

**Kathrin Schröder-Tittmann**

geboren am 25. Juni 1978 in Schönebeck

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. Rainer Rudolph
2. Herr Prof. Dr. Dieter Oesterhelt
3. Herr Prof. Dr. Clemens Glaubitz

1	Einleitung	5
1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren <i>Struktureller Aufbau, Klassifizierung, Aktivierung und Deaktivierung</i>	5
1.2	Di- und Oligomerisierung von GPCR	12
1.3	Heterologe Expression von Membranproteinen	14
1.4	Strukturelle Analyse von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	17
1.5	Der <i>Glucagon-like peptide-1</i> Rezeptor	20
1.6	Zielstellung	26
2	Materialien	27
2.1	Chemikalien	27
2.2	Bakterienstämme, Plasmide und DNA	29
2.3	Enzyme und Antikörper	29
2.4	Oligonukleotide	30
2.5	Lösungen, Puffer und Medien	30
2.6	Sonstige Materialien	32
2.7	Geräte	32
3	Methoden	34
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	34
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.1.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	35
3.1.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	35
3.1.4	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	36
3.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten	36
3.1.6	Agarosegelelektrophorese	37
3.1.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	37
3.1.8	Quantitative Bestimmung von DNA-Fragmenten	38
3.1.9	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	38
3.1.10	Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente <i>E. coli</i> -Zellen	38
3.1.11	Sequenzierung	38

<b>3.2</b>	<b>Allgemeine proteinchemische Methoden</b>	40
3.2.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
3.2.3	Fällung von Proteinen	42
3.2.4	Proteinexpressionsanalyse	42
3.2.5	Immunologischer Proteinnachweis ( <i>Western-blotting</i> )	43
3.2.6	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	43
3.2.7	<i>Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography</i> (RP-HPLC)	44
3.2.8	Bestimmung des Disulfidbrückenmusters	44
<b>3.3</b>	<b>Expression, Reinigung und Rückfaltung des Gesamtrezeptors und der Domänen</b>	46
3.3.1	<i>Fed-batch</i> Fermentation	46
3.3.2a	Zellaufschluss und Isolierung der <i>inclusion bodies</i> des Gesamtrezeptors	47
3.3.2b	Zellaufschluss und Isolierung der <i>inclusion bodies</i> der Domänen (nGLP-1R, Loop_nGLP1R)	48
3.3.3	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)	48
3.3.4	Rückfaltung der GLP-1R-Konstrukte	49
<b>3.4</b>	<b>Reinigung und Spaltung der fluoreszenzmarkierten Peptide</b>	49
<b>3.5</b>	<b>Biophysikalische Charakterisierung</b>	50
3.5.1	Circulardichroismus	50
3.5.2	Fluoreszenzspektroskopie	51
3.5.3	Fluoreszenztitration	52
3.5.4	Oberflächenplasmonresonanz (Biacore)	54
3.5.5	Analytische Gelfiltration	56

<b>4</b>	<b>Ergebnisse &amp; Diskussion</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Rekombinante Herstellung des GLP-1-Gesamtrezeptors</b>	<b>57</b>
4.1.1	Klonierung der synthetischen DNA in die Vektoren pET 28a und pET 41b	57
4.1.2	Expression, Reinigung und Rückfaltung des GLP-1-Gesamtrezeptors	59
4.1.3	Identifizierung des humanen GLP-1-Gesamtrezeptors	66
<b>4.2</b>	<b>Strukturelle Untersuchungen des GLP-1-Gesamtrezeptors</b>	<b>68</b>
4.2.1	Fern-UV Circular dichroismus-Untersuchungen des GLP-1-Gesamtrezeptors	68
4.2.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen des GLP-1-Gesamtrezeptors	69
<b>4.3</b>	<b>Thermische Stabilität des GLP-1-Gesamtrezeptors</b>	<b>70</b>
4.3.1	Fluoreszenzspektroskopische Analyse der thermischen Entfaltung	70
4.3.2	CD-spektroskopische Analyse der thermischen Entfaltung	71
<b>4.4</b>	<b>Funktionsanalyse des rekombinanten GLP-1-Gesamtrezeptors</b>	<b>73</b>
4.4.1	Ligandenbindungsstudien des GLP-1R mittels Fluoreszenzspektroskopie	73
4.4.2	Ligandenbindungsstudien des GLP-1R mittels Oberflächenplasmonresonanz	77
4.4.3	Analytische Gelfiltration von Rezeptor-Ligand-Komplexen	80
<b>4.5</b>	<b>Rekombinante Herstellung und Charakterisierung der N-terminalen Domäne des GLP-1-Rezeptors (nGLP-1R)</b>	<b>84</b>
4.5.1	Expression, Reinigung und Rückfaltung des nGLP-1R	84
4.5.2	Identifizierung des nGLP-1R	85
4.5.3	RP-HPLC des nGLP-1R	86
4.5.4	Analyse des Disulfidbrückenmusters des nGLP-1R	87
4.5.5	Ligandenbindungsstudien des nGLP-1R mittels Oberflächenplasmonresonanz	89
4.5.6	Ligandenbindungsstudien des nGLP-1R mittels Fluoreszenzmessungen	91

<b>4.6</b>	<b>Rekombinante Herstellung und Charakterisierung des Fusionskonstruktes Loop_nGLP-1R</b>	<b>92</b>
4.6.1	Expression, Reinigung und Rückfaltung des Fusionskonstruktes Loop_nGLP-1R	92
4.6.2	Identifizierung des Konstruktes Loop_nGLP-1R	94
4.6.3	RP-HPLC des Konstruktes Loop_nGLP-1R	95
4.6.4	Analyse des Disulfidbrückenmusters des Konstruktes Loop_nGLP-1R	96
4.6.5	Ligandenbindungsstudien des Konstruktes Loop_nGLP-1R mittels Oberflächenplasmonresonanz	98
4.6.6	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen des Konstruktes Loop_nGLP-1R	101
<b>5</b>	<b>Abschließende Diskussion</b>	<b>102</b>
5.1	Expression und Renaturierung des GLP-1-Rezeptors	103
5.2	Biophysikalische Charakterisierung des GLP-1-Gesamtreptors	107
5.3	Analyse der Wechselwirkung des renaturierten humanen GLP-1-Gesamtreptors mit Liganden	108
5.4	Herstellung und Charakterisierung von verkürzten Varianten des GLP-1-Rezeptors und Vergleich mit dem Gesamtreptor	110
5.5	Ausblick	112
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>113</b>
6.1	Vektorkarten	113
6.2	Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide und Proteine	116
6.3	Abkürzungsverzeichnis	118
6.4	Auswertung der Oberflächenplasmonresonanzmessungen mit Hilfe der Evaluierungssoftware Biacore T100 Evaluation	119
6.5	Phylogenetische Verwandtschaft zwischen den GPCR der humanen Rhodopsinfamilie	120
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>121</b>

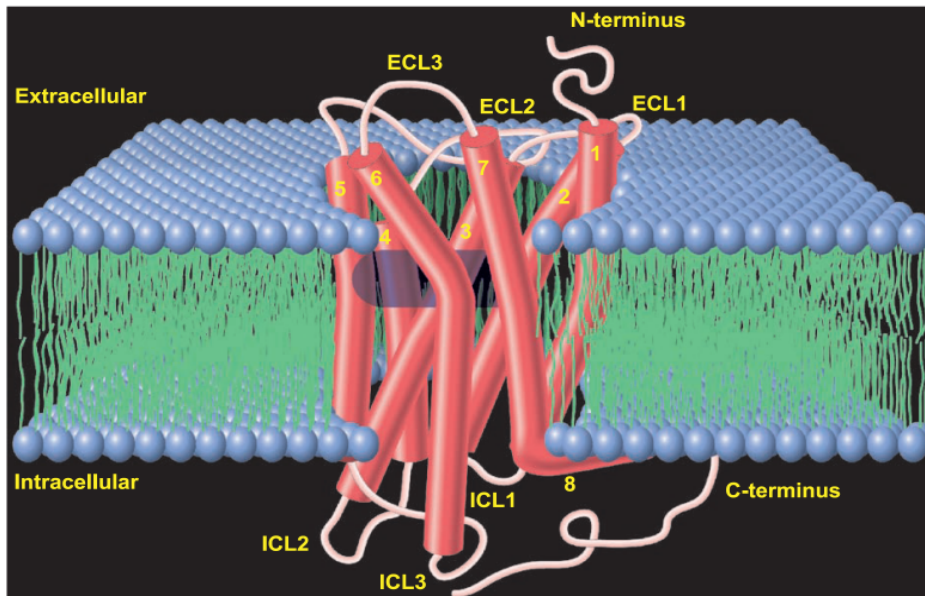
# 1 Einleitung

## 1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

### *Struktureller Aufbau, Klassifizierung, Aktivierung und Deaktivierung*

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stellen eine der größten Proteinfamilien im Säuger genom dar (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Ihre primäre Funktion besteht in der Weiterleitung bzw. Umwandlung extrazellulärer Stimuli in intrazelluläre Signale. Im humanen Genom konnten bislang 865 Gene identifiziert werden, welche GPCR Charakteristiken aufweisen (Vassilatis *et al.*, 2003). Circa 340 dieser Proteine werden zu den olfaktorischen Rezeptoren (Geruchsrezeptoren) gezählt (Malnic *et al.*, 2004). Für die pharmazeutische Industrie stellen die GPCR eine wichtige Proteinklasse dar, da zwischen einem Drittel (Robas *et al.*, 2003) bis der Hälfte (Flower *et al.*, 1999) der derzeit verkauften Medikamente auf diese Proteine wirken. Der dadurch erbrachte wirtschaftliche Umsatz wird auf über 25 Milliarden Dollar geschätzt. Unter diesen Medikamenten befinden sich beispielsweise die Betablocker, welche auf Adrenorezeptoren wirken bzw. die Opioide, welche durch die Bindung an Opioidrezeptoren Schmerzen herabsenken und den Hustenreiz hemmen. Trotz intensiver Forschung sind die natürlichen Liganden für einen Teil der GPCR bis heute unbekannt. Daher bezeichnet man diese Gruppe als *orphan* (Waisen) GPCR.

Bezüglich ihrer Struktur weisen alle GPCR eine identische Zusammensetzung aus definierten Domänen auf (Abb. 1). Extrazellulär gelegen befindet sich eine N-terminale Domäne, welche in ihrer Länge zwischen 7 und 595 Aminosäuren variieren kann. Dieser Bereich liegt häufig glykosyliert vor. Die Verankerung innerhalb der Zellmembran wird durch sieben Transmembranhelices (jeweils 20-27 Aminosäuren) realisiert, welche bei Sicht auf den Rezeptor von der extrazellulären Seite aus entgegen dem Uhrzeigersinn angeordnet sind. Die Verbindung zwischen den einzelnen Transmembranbereichen (TM) wird mit Hilfe von drei intra- bzw. drei extrazellulären Loopbereichen ermöglicht. Auch hier kann die Anzahl der Aminosäuren sehr unterschiedlich sein (5-320). Ein weiterer intrazellulärer Loop wurde für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren beschrieben, welcher durch Palmitoylierung eines Cysteinerestes innerhalb der C-terminalen Domäne und Verankerung des Fettsäurerestes in der Membran entsteht (Kennedy *et al.*, 1993). Im Zellinneren schließt sich an die siebente Helix die C-terminale Domäne an.



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors** (aus Kristiansen *et al.*, 2004). Dem extrazellulär gelegenen N-Terminus folgen sieben Transmembranhelices, welche über drei extrazelluläre bzw. drei intrazelluläre Schleifen (*loops*) miteinander verbunden sind. Der C-Terminus liegt intrazellulär und bildet bei Rezeptoren der hier dargestellten Klasse A eine achte intrazelluläre Helix aus.

Eine besondere Herausforderung stellt die Klassifizierung dieser Proteinklasse dar. Manche Einteilungen beruhen auf Bindungseigenschaften der Liganden, andere berücksichtigen physiologische und strukturelle Eigenschaften der Rezeptoren. Eine der am häufigsten verwendete Einteilung ist die von Attwood bzw. Kolakowski vorgeschlagene Nomenklatur in die Klassen bzw. Familien A bis F (Attwood *et al.*, 1994; Kolakowski 1994).

Mit diesem System werden alle GPCR berücksichtigt (Vertebraten und Invertebraten). Die Klassen A bis C enthalten alle humanen Rezeptoren. Klasse D und E repräsentieren die in Pilzen vorkommenden Pheromon- und cAMP Rezeptoren. In Familie F findet man unter anderem archaebakterielles Opsin.

Die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms ermöglichte neue phylogenetische Analysen der GPCR-kodierenden Gene. Mit Hilfe der daraus gewonnenen Erkenntnisse wurde 2003 eine neue Einteilung der humanen GPCR erstellt (Fredriksson *et al.*, 2003).

Die Aufteilung der Rezeptoren erfolgt in die Familien Glutamat, Rhodopsin, Adhäsion, Frizzled / Taste2 und Sekretin (Abb. 2) und wird als GRAFS Klassifizierung bezeichnet. Die große Anzahl an Rhodopsinrezeptoren erforderte deren weitere Unterteilung (siehe Abb. 45 im Anhang).

Die Mitglieder der Glutamat-, Sekretin- und Rhodopsinfamilie findet man auch in der von Attwood bzw. Kolakowski vorgeschlagenen Nomenklatur. Die Adhäsions- bzw. Frizzled/Taste2 Rezeptoren sind in dieser nicht vertreten.

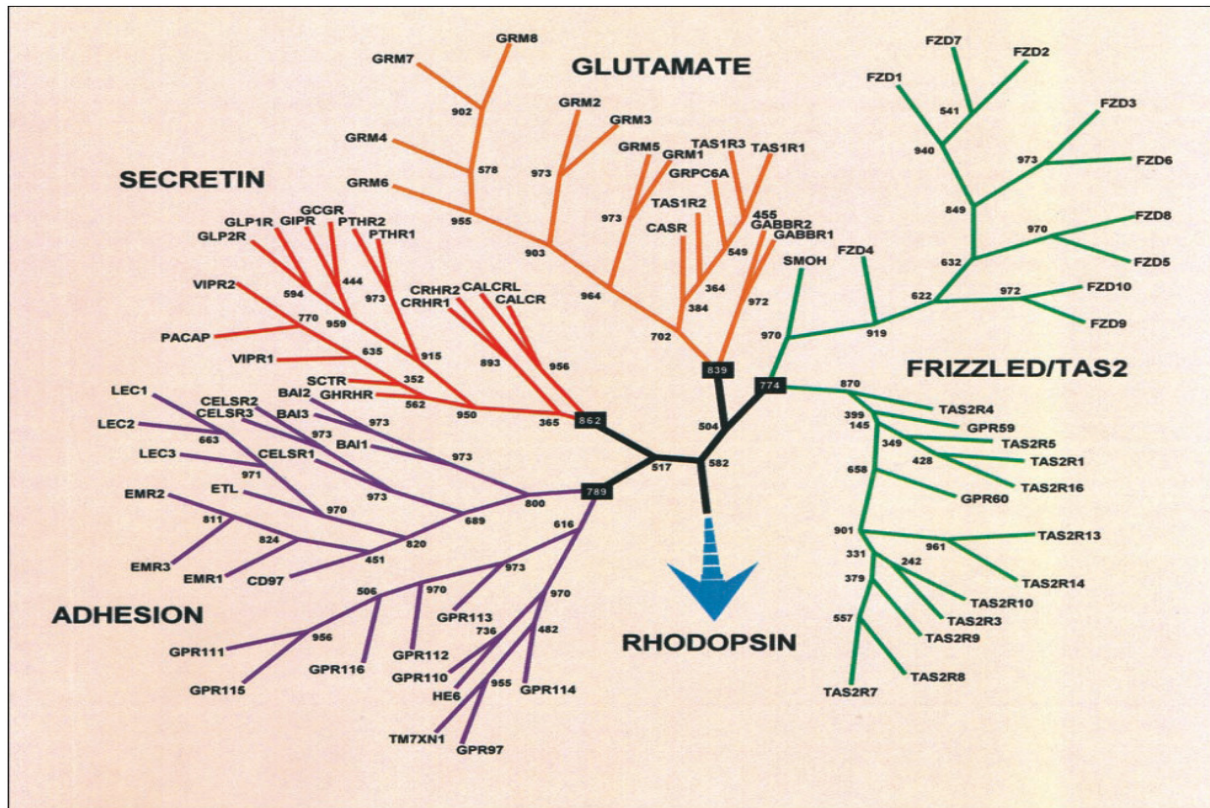


Abbildung 2: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im humanen Genom (aus Fredriksson *et al.*, 2003).

Die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor führt zur Konformationsänderung des Rezeptors und anschließend zur Ausbildung eines ternären Komplexes, an dem der Ligand, der Rezeptor und ein G-Protein beteiligt sind (Christopoulos *et al.*, 2002). Man geht davon aus, dass ein GPCR zwischen mindestens zwei Konformationen isomerisieren kann. Dabei handelt es sich zum einen um den nicht-aktivierten (R), zum anderen um den aktivierten Zustand (R\*). Im Grundzustand, wenn kein Ligand gebunden ist, liegt das Gleichgewicht zwischen R und R\* auf der Seite des inaktiven Zustandes. Die Bindung von Liganden beeinträchtigt dieses Gleichgewicht in unterschiedlicher Weise. Dieser Umstand ermöglicht der Pharmaindustrie Wirkstoffe zu entwickeln, welche den Zielrezeptor aktivieren, hemmen oder die Wirksamkeit des endogenen Liganden erhöhen.

Anhand ihrer Wirkung auf den Rezeptor lassen sich Liganden in verschiedene Klassen einteilen. Als orthosterische Liganden bezeichnet man jene Moleküle, welche den Zugang des natürlichen (endogenen) Liganden an die eigentliche Bindungsstelle am Rezeptor sterisch behindern. Allosterische Liganden besetzen andere Bindungsstellen als der endogene Ligand und beeinflussen von dort aus die Rezeptorfunktion (Kenakin *et al.*, 2001).



**Tabelle 1: Nomenklatur der ortho- bzw. allosterischen Liganden und ihre Wirkungsweise**

<b>Ligand</b>	<b>Bindungsort</b>	<b>Wirkung</b>
Vollständiger Agonist	orthosterisch	Produziert maximale Systemantwort
Partieller Agonist	orthosterisch	Produziert verringerte Systemantwort Blockiert Bindungsstelle für vollen Agonisten
Antagonist	orthosterisch	Produziert keine Systemantwort Blockiert Bindungsstelle für Agonisten
Inverser Agonist	orthosterisch (im inaktivierten Zustand)	Zeigt im nicht-konstitutiv aktiven System Antagonisten-Eigenschaften, Stabilisiert den inaktiven Zustand
Allosterischer Agonist	allosterisch	Fungiert als Agonist
Allosterischer Modulator (Antagonist)	allosterisch	Blockiert Rezeptorfunktion, ohne notwendigerweise die Ligand-Rezeptor Interaktion zu beeinträchtigen
Allosterischer Verstärker	allosterisch	Steigert die Effekte des Agonisten

Die Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren erfolgt über ein breites Spektrum an extrazellulären Signalen (Abb. 3). Zu ihnen gehören neben Proteinen (Interleukine, Chemokine) und kleinen Molekülen (Aminosäuren, Nukleotide, Peptide) auch Pheromone, Calciumionen und Licht (Bockaert *et al.*, 1999). Während der Evolution wurde eine große Vielfalt an molekularen Mechanismen entwickelt, um eine durch Ligandenbindung hervorgerufene Konformationsänderung zu bewirken. Katecholamine z. Bsp. binden an einer durch TM III bis TM VI gebildeten Bindungstasche. Bei Rhodopsin ist das Retinal kovalent über eine Schiff'sche Base in der Mitte von TM7 als inverser Agonist gebunden. Die Absorption eines Photons führt zu einer Isomerisierung des Retinals zum Agonisten (Ernst *et al.*, 2002). Bei Hormonrezeptoren, welche durch Peptide wie Glukagon, GLP-1 oder PTH aktiviert werden, spielt die extrazelluläre N-terminale Domäne eine Schlüsselfunktion bei der Ligandenbindung (Bazarsuren *et al.*, 2002; Pantaloni *et al.*, 1996).

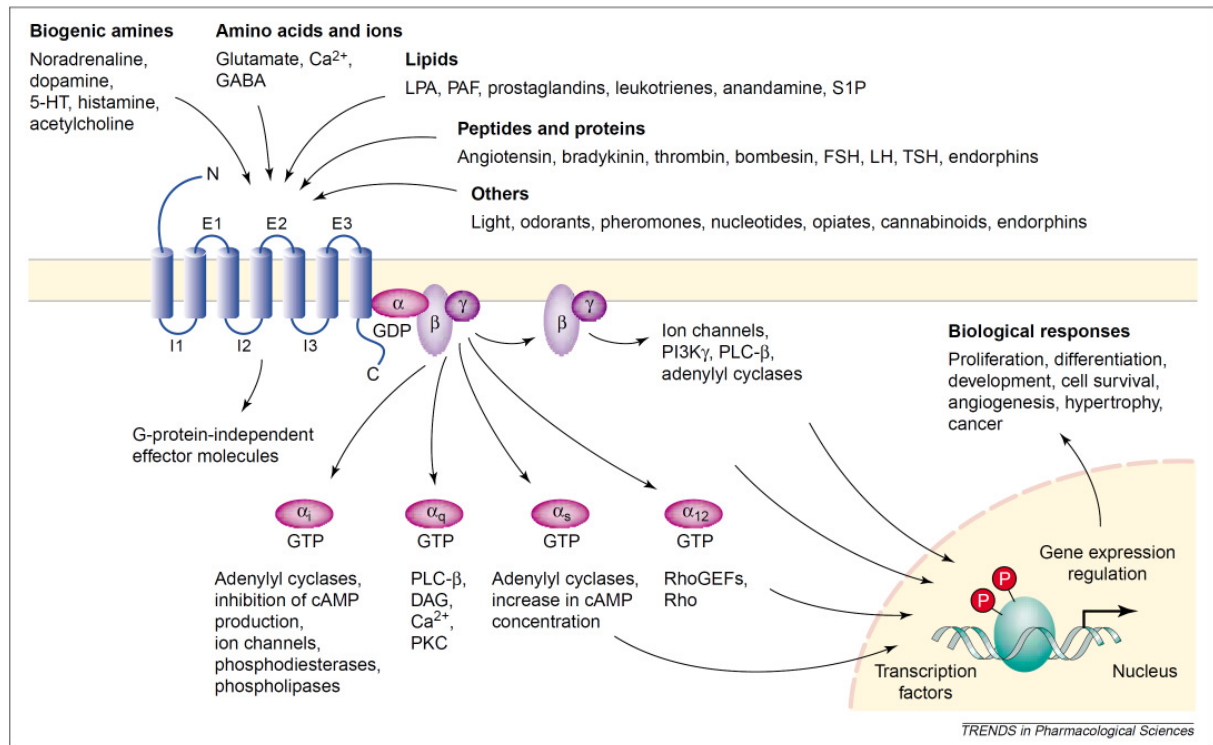
Unabhängig von ihrem Ursprung führt die Aktivierung des Rezeptors fast immer zur Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins. Letzteres setzt sich aus den Untereinheiten (UE)  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zusammen, wobei  $\alpha$  und  $\gamma$  über Lipidanker kovalent in der Zellmembran verankert sind. Die  $\beta$ -UE ist permanent an die  $\gamma$ -UE gebunden. Die  $\alpha$ -UE ist nur im inaktiven Zustand

befähigt, an die  $\beta$ -UE zu binden. Bisher wurden 15  $\alpha$ , 6  $\beta$  und 12  $\gamma$  Einheiten in der Literatur beschrieben. G-Proteine werden basierend auf der Sequenzhomologie und funktionellen Analogie der  $\alpha$ -Untereinheiten in vier Gruppen eingeteilt:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$ . (Tab. 2) (Neubig *et al.*, 2002).

**Tabelle 2:  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine und ihre Effekte (aus Neubig *et al.*, 2002)**

G-Protein Klasse	G-Protein Untereinheit	Effekt
$G_s$	$G_s\alpha$ , $G_{olf}\alpha$	Aktivierung der Adenylatcyclase
$G_i$	$G_i\alpha_{1-3}$ , $G_o\alpha$ , $G_z\alpha$ , $G\alpha_t$	Hemmung der Adenylatcyclase 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 $\epsilon$

Im inaktiven Zustand hat die  $\alpha$ - UE, welche über eine Nukleotidbindestelle verfügt, ein GDP Molekül gebunden und liegt als Komplex mit den anderen Untereinheiten vor. Wird der G-Protein-gekoppelte Rezeptor durch einen extrazellulären Liganden aktiviert, durchläuft er eine Konformationsänderung, welche seine Affinität zu einem G-Protein erhöht. Nach Bindung eines G-Proteins an den Rezeptor kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP in der  $\alpha$ -Untereinheit, was den Zerfall des heterotrimeren Komplexes zur Folge hat. Die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ ,  $\gamma$ -Untereinheiten können nun unabhängig voneinander, synergistisch oder antagonistisch verschiedene Effektoren aktivieren oder hemmen (Abb. 3). Nach Hydrolyse des an die  $\alpha$ -UE gebundenen GTP zu GDP und anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) reassemblieren die einzelnen Untereinheiten wieder zum vollständigen, nicht-aktiven G-Protein (Bourne *et al.*, 1989).



**Abbildung 3: Mannigfaltigkeit der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.** Bindung einer Vielzahl von unterschiedlichen Liganden, Beeinflussung zytoplasmatischer und nukleärer Zielobjekte mittels G-Protein-abhängiger oder unabhängiger Signalwege. Abkürzungen: DAG: Diacylglycerol, FSH: Follikel-stimulierendes Hormon, GEF: Guanin 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 (aus Marinissen *et al.*, 2001).

Nach der Aktivierung des Rezeptors und nachfolgender Auslösung einer Signalkaskade muss eine Desensibilisierung des GPCR erfolgen. Eine permanente Aktivierung kann zu pathologischen Zuständen führen. Ein Beispiel hierfür ist die Punktmutation im 2. Exon des PTH-Rezeptors, welche einen Austausch von Histidin-223 zu Arginin und einen konstitutiv aktiven Rezeptor zur Folge hat (Schipani *et al.*, 1995; Schipani *et al.*, 1996). Die daraus resultierende Krankheit wird als Jansen's Metaphyseal Chondrodysplasia (JMC) bezeichnet. Die Regulation der Signaltransduktion erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Extrazellulär kommt es zum Abbau des Liganden, z.Bsp. durch Verdünnung in der extrazellulären Flüssigkeit oder enzymatische Spaltung (Bohm *et al.*, 1997). Intrazelluläre Kontrollmechanismen verlaufen weitaus komplexer. Die Anzahl an aktivierbaren membranständigen GPCR wird durch Mechanismen der Internalisierung, Desensibilisierung und des Recycling reguliert (Bunemann *et al.*, 1999). Nach der Aktivierung des Rezeptors durch einen Agonisten erfolgt die schnelle Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten innerhalb der C-terminalen Rezeptordomäne und intrazellulären Loopregionen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRK1 –

GRK7) und/oder durch „second-messenger“ aktivierte Kinasen (Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC)). Letztere können einen Rezeptor auch dann phosphorylieren, wenn er keinen Liganden gebunden hat. Dieser Mechanismus ermöglicht die Desensibilisierung unterschiedlicher Rezeptorklassen einer Zelle (Roettger *et al.*, 1995; Aragay *et al.*, 1998).

Die Phosphorylierung führt zu einer erhöhten Affinität der Rezeptoren für  $\beta$ -Arrestine (Lohse *et al.*, 1992). Die Bindung dieser monomeren zytosolischen Proteine verhindert nicht nur die Kopplung von G-Proteinen (kurzzeitige Desensibilisierung), sondern markiert zudem die phosphorylierten Rezeptoren für die Endozytose durch Clathrin-umhüllte Vesikel (Internalisierung) (Ferguson *et al.*, 1998; Goodman *et al.*, 1996; Ferguson *et al.*, 2001). Innerhalb dieser Vesikel erfolgt die Dephosphorylierung der GPCR. Anschließend können diese zurück an die Zellmembran transportiert werden (Recycling) und dort für eine erneute Aktivierung durch spezifische Liganden zur Verfügung stehen (Abb. 4). Ein Teil der internalisierten Rezeptoren unterliegt der Degradation durch lysosomale Proteasen.

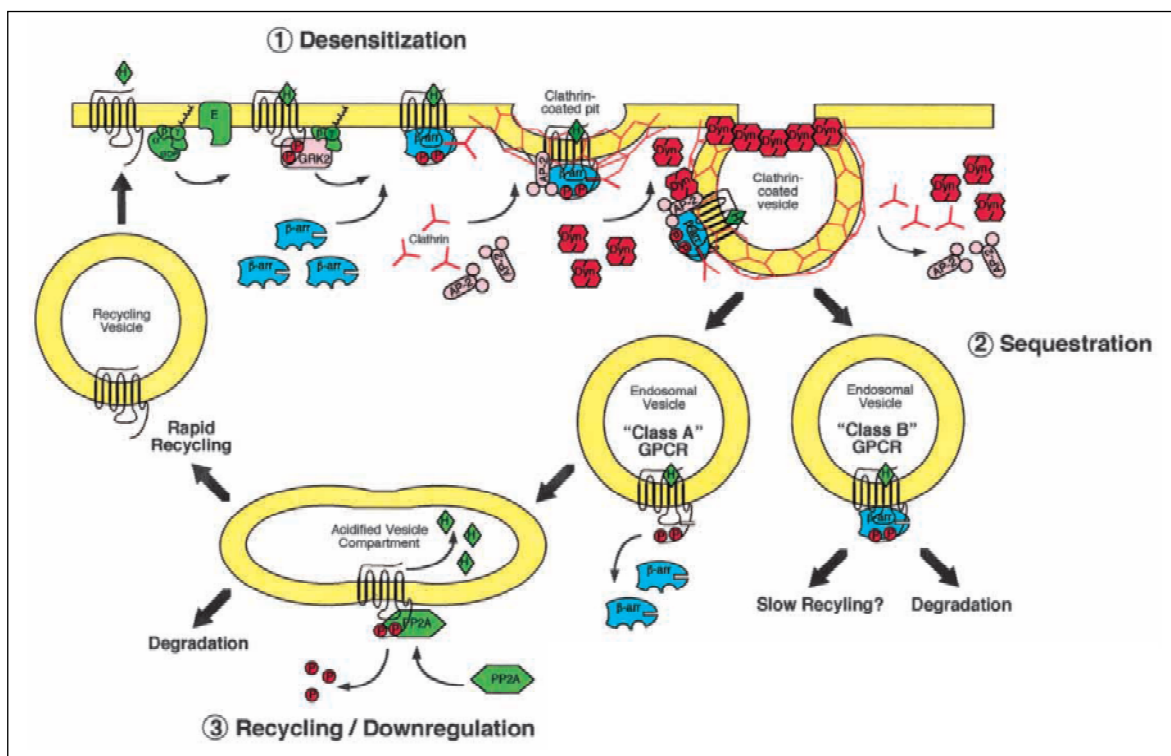


Abbildung 4: Regulation der Exposition von GPCR auf der Zelloberfläche (aus Luttrell *et al.*, 2002).

Bis vor wenigen Jahren ging man davon aus, dass GPCR ausschließlich über die Aktivierung von G-Proteinen eine Signalweiterleitung ins Zellinnere realisieren. Seit Mitte der 90er Jahre mehren sich Indizien, dass GPCR G-Protein-unabhängige Signalwege beeinflussen können (Brzostowski *et al.*, 2001). Beispiele hierfür sind die Aktivierung der JAK/STAT Signalkaskade (Marrero *et al.*, 1995; Lukashova *et al.*, 2001; Mellado *et al.*, 1998), die direkte

Interaktion mit Src-Kinasen (Yun *et al.*, 2007) und die Interaktion mit PDZ-Domänen-Proteinen (Hall *et al.*, 1998).

## 1.2 Di- und Oligomerisierung von GPCR

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass GPCR nur als Monomere existieren und als solche ihre Funktion erfüllen. Seit einigen Jahren gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass viele, aber wahrscheinlich nicht alle (Meyer *et al.*, 2006) G-Protein-gekoppelten Rezeptoren als Dimere oder höher organisierte Oligomere in lebenden Zellen existieren und die Formation dieser höher organisierten Strukturen essentiell für die Reifung und Funktion dieser Proteine sein kann. GPCR können sowohl als Homo-, als auch als Heterodi- bzw. Oligomere vorliegen. Grundsätzlich ausgeschlossen vom Prozess der Homodimerisierung sind die Geruchsrezeptoren, da jedes einzelne olfaktorische Neuron nur einen einzigen olfaktorischen Rezeptor exprimiert. Auch der Nachweis von Heterodimeren konnte bislang *in vivo* nicht erbracht werden, wenngleich die Coexpression einiger möglicher Dimerisierungspartner nachgewiesen wurde (Milasta *et al.*, 2006).

Abbildung 5 stellt die unterschiedlichen Phasen im Lebenszyklus eines Rezeptors dar, in denen die Dimerisierung eine potentielle Rolle spielen kann. Für manche Klasse A Rezeptoren ist die Coexpression bestimmter GPCR eine Voraussetzung für den Transport an die Zelloberfläche (Prinster *et al.*, 2005). Ein Beispiel dafür sind die GABA-Rezeptoren GbR<sub>1</sub> und GbR<sub>2</sub> (Marshall *et al.*, 1999). Werden diese Proteine unabhängig voneinander exprimiert, bleibt der GbR<sub>1</sub> im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurück. GbR<sub>2</sub> wird zwar an die Zelloberfläche transportiert, liegt dort jedoch nicht funktionell vor. Pathologische Auswirkungen einer verminderten Exposition von Rezeptoren an der Zelloberfläche konnte am Beispiel von HIV-infizierten Patienten gezeigt werden (Benkirane *et al.*, 1997). Trugen diese Patienten eine Mutation des CCR<sub>5</sub> Rezeptors (CCR<sub>5</sub>Δ32), welche einen Verlust der Exposition des Rezeptordimers an der Zelloberfläche zur Folge hat, kam es zu einem verspäteten Ausbruch der Symptome.

Der Einfluss von Liganden auf die Di- bzw. Oligomerisierung von GPCR wird derzeit in der Literatur kontrovers diskutiert. In einigen Studien wird ein positiver Effekt durch Ligandenbindung beschrieben (Kroeger *et al.*, 2001; Angers *et al.*, 2000; Horvat *et al.*, 2001), in anderen von einem negativen Effekt berichtet (Gines *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001; Latif *et al.*, 2002). Wieder andere Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Di- und

Oligomerisierung ein konstitutiver Prozess ist, welcher nicht von der Anwesenheit eines Liganden beeinträchtigt wird (Overton *et al.*, 2000; Ayoub *et al.*, 2002; Issafras *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2003). Diese Diskrepanz kann zum einen auf das individuelle Verhalten eines jeweiligen Rezeptors zurückzuführen sein, zum anderen von der zum Teil komplizierten Interpretation der Messdaten herrühren.

Ein weiterer Zeitpunkt im Lebenszyklus eines GPCR, bei dem die Heterodimerisierung eine wichtige Rolle spielt, ist die Signaltransduktion. Erste überzeugende Hinweise dafür stammen von Untersuchungen an den GbR-Rezeptoren (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000; Galvez *et al.*, 2001). Obwohl GbR<sub>1</sub> eine Bindungsstelle für GABA besitzt, kann dieser nur im Komplex mit GbR<sub>2</sub> die Signalkaskade über G-Proteine auslösen, wobei davon ausgegangen wird, dass GbR<sub>1</sub> den Liganden bindet und dadurch eine Konformationsänderung in GbR<sub>2</sub> bewirkt, welche die Bindung eines G-Proteins an den GbR<sub>2</sub>-Rezeptor ermöglicht. Vergleichbare Befunde ergaben Untersuchungen an Geschmacks- und Aminosäurerezeptoren (Nelson *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2002).

Nach Auslösen einer Signalkaskade werden die Rezeptoren durch Internalisierung von der Zelloberfläche entfernt. Viele Klasse A Rezeptoren werden als Di- oder Oligomere internalisiert (Yesilaltay *et al.*, 2000).

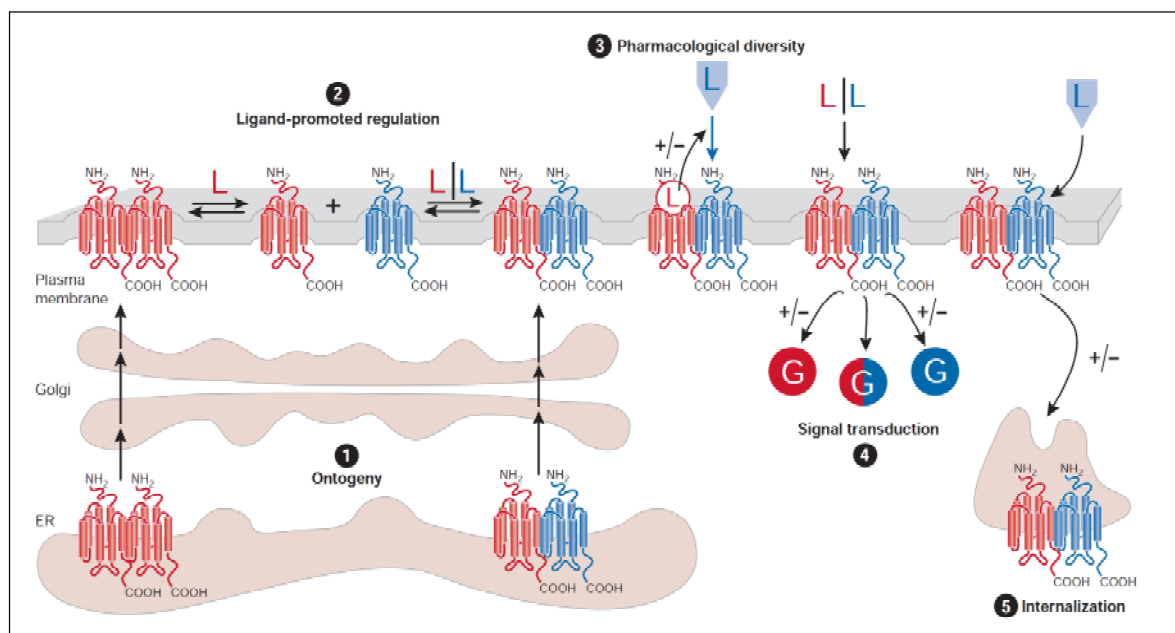


Abbildung 5: Potentieller Einfluss der GPCR-Dimerisierung auf deren Lebenszyklus (aus Terrillon *et al.*, 2004).

Das Wissen um die Existenz von Heterodi- bzw. Oligomerenst für die pharmazeutische Industrie von wachsender Bedeutung (George *et al.*, 2002). Die Entwicklung von Wirkstoffen (heterodimer-selektive Liganden), welche spezifisch Heterodimere adressieren, ohne das jeweilige Protomer zu aktivieren, werden derzeit intensiv beforscht (George *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005; Waldhoer *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005).

### 1.3 Heterologe Expression von Membranproteinen

Für die funktionelle und strukturelle Charakterisierung von Membranproteinen benötigt man ausreichende Mengen an homogenem und nativem Protein. Durch Fortschritte in der Gentechnik ist es inzwischen möglich, Proteine in artfremden Organismen heterolog zu exprimieren. Die derzeit verfügbaren Systeme reichen von Bakterien, Hefen und Pilzen bis zu Säugetier-, Insekten- und Pflanzenzellen. Alle genannten Expressionssysteme weisen sowohl Vorteile, als auch Limitationen auf. Tabelle 3 fasst die Vor- und Nachteile der am häufigsten verwendeten Wirte für die Produktion von Membranproteinen zusammen. Bis Mitte der neunziger Jahre wurde *E. coli* bevorzugt für die Produktion von pharmazeutisch relevanten Proteinen verwendet. Die einfache, kostengünstige und schnelle Kultivierung des Wirtes konnte mit keinem anderen System erreicht werden. Das wohl bekannteste rekombinant in *E. coli* produzierte Therapeutikum ist Insulin (Goeddel *et al.*, 1979).

Die hohe Expressionsrate führt häufig zur Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten (*inclusion bodies*), was eine Renaturierung des gewünschten Proteins zur Folge hat (Marston *et al.*, 1990; Rudolph *et al.*, 1997; Buchner *et al.*, 2005). Die Mehrzahl der in *E. coli* erzeugten Membranproteine liegen als *inclusion bodies* vor (Bane *et al.*, 2007; Rogl *et al.*, 1998; Michalke *et al.*, 2009). Von einigen Rezeptoren wurde die lösliche und funktionelle Expression in *E. coli* berichtet (Weiss *et al.*, 2002; Harding *et al.*, 2007). Neue von JOHN WALKER und Mitarbeitern entdeckte Stämme weisen einen hohen Anteil an intrazellulären Membranen auf. In dieser Umgebung können Membranproteine, welche in anderen *E. coli* Stämmen toxisch wirken, nach ihrer Expression angelagert werden (Miroux *et al.*, 1996; Arechaga *et al.*, 2000). BAYRHUBER und Mitarbeitern gelang es 2008, die Struktur eines in *E. coli* rekombinant produzierten humanen Ionenkanals zu lösen (Bayrhuber *et al.*, 2008).

Eine ähnlich kostengünstige Alternative zu Bakterien stellen Hefen dar. Zu *E. coli* vergleichbar preiswerte Medien, eine relativ hohe Wachstumsrate (Verdopplungszeit von 90 Minuten) und die einfache Fermentation stellen die wesentlichen Vorteile im Vergleich zu

allen anderen eukaryotischen Systemen dar (Sarramegna *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten entspricht das Glykosylierungsmuster häufig nicht dem des endogenen Proteins, was in manchen Fällen einen negativen Einfluss auf die Funktion des heterolog generierten Proteins haben kann (Kaushal *et al.*, 1994). Viele in Hefe exprimierte GPCR bleiben vollständig unglykosyliert (Sander *et al.*, 1994). Jedoch liefert auch dieses System ausreichend funktionelles Protein, um die Struktur von Membranproteinen zu lösen (Jidenko *et al.*, 2005, Long *et al.*, 2005). Glykosylierungen können die *in vitro* Stabilität und Homogenität von Membranproteinen beeinträchtigen. Daher wurden beispielsweise bei der Strukturaufklärung des rekombinant hergestellten beta2-adrenergen Rezeptors die Glykosylierungsstellen entfernt

Alle bislang veröffentlichten Strukturen von GPCR (außer Rhodopsin) entstanden von in Sf9-Insektenzellen heterolog exprimierten Rezeptoren (Rasmussen *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2007; Warne *et al.*, 2008). Dieses System stellt demnach die derzeit beste Option für die Lösung von GPCR-Strukturen dar. Im Vergleich zu Bakterien und Hefen werden die Proteine korrekt glykosyliert und inzwischen standardisierte Verfahren ermöglichen die Kultivierung von ausreichender Zellmasse für die Charakterisierung der Zielproteine. Wesentliche Nachteile dieses Wirtes sind die langen Verdopplungszeiten (24 h) und teuren Kulturmedien. Säugetierzellen stellen den authentischsten Wirt für die Produktion von GPCR dar. Posttranslationale Modifikationen und die Zusammensetzung der Zellmembran sind dem natürlich exprimierten Protein bzw. System sehr ähnlich. Die geringen Zellausbeuten bei hohem Kostenaufwand erschweren die Produktion von größeren Mengen an Protein. Bislang wurde keine Feinstruktur von in Säugetierzellen produzierten Membranproteinen veröffentlicht.



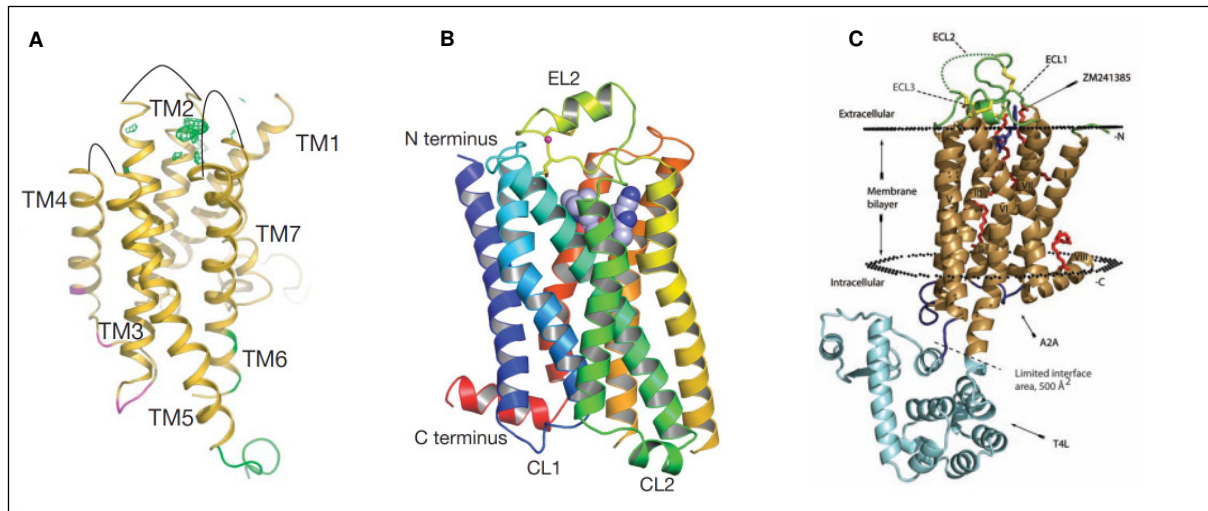
**Tabelle 3: Vergleich der unterschiedlichen Expressionssysteme für die heterologe Expression von Proteinen** (abgewandelt aus Arya *et al.*, 2008)

	<b>Bakterien</b>	<b>Hefen</b>	<b>Insektenzellen</b>	<b>Säugetierzellen</b>
Kosten (\$ / Gen)	5000	6000	15 - 20000	20 - 25000
Zeitaufwand (Monate / Gen)	3	4	4	6
Ausbeute	hoch	hoch	hoch	gering
Lagerung	Glyzerinstocks	Sporen, Glyzerinstocks	Virus (Baculovirus)	Zelllinien
Vorteile	Einfache und preisgünstige Medien, hohe Zelldichten, einfach zu kultivieren Fermentation für <i>up scaling</i> möglich, genetisch gut charakterisiert	Einfache und preisgünstige Medien, Fermentation möglich, keine Produktion von Endotoxinen, Proteinsekretion	Posttranslationale Modifikationen ähnlich denen in Eukaryoten, hohe Expressionsraten, Expression von bis zu 15 kb Genen	Posttranslationale Modifikationen wie im nativen Protein, sicher im Hinblick auf immunologische Belange
Nachteile	Keine posttranslationalen Modifikationen, geringe Proteinsekretion, Bildung von <i>IBs</i> , Produktion von Endotoxinen, proteolytischer Abbau, <i>codon usage</i> anders als im Eukaryoten	Glykosylierungsmuster anders als in höheren Eukaryoten, Übermannosilierung, proteolytischer Abbau	Langsames Zellwachstum, teure Medien, mühsame und zeitaufwendige Expression von größeren Mengen, Stabilitätsdefizite des Virussystems, komplexe Glykosylierung nicht möglich	Sehr langsames Wachstum, teure Medien, mühsame und zeitaufwendige Kultivierung von größeren Mengen, geringe Proteinausbeuten

## 1.4 Strukturelle Analyse von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

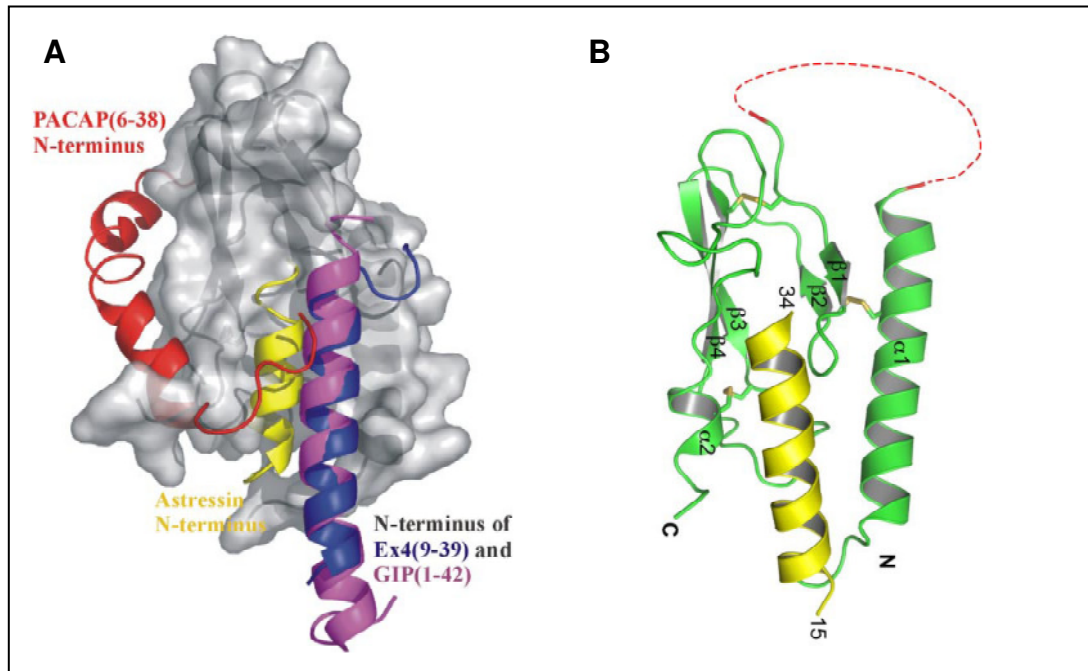
Erste Einblicke in den atomaren Aufbau von GPCR ermöglichten die zwei- bzw. dreidimensionalen Strukturen von Rhodopsin (Krebs *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 2000; Palczewski *et al.*, 2000; Schertler *et al.*, 1998). Für die Kristallisierung anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren war die Überwindung verschiedener technischer Barrieren von entscheidender Bedeutung. Dazu zählen vor allem die Produktion von großen Mengen an funktionellem Protein, die Stabilisierung flexibler Domänen, Hochdurchsatz-Kristallisationsscreens mit Lipiden und Detergenzien und die Weiterentwicklung der Mikrobeugungstechnik (Kobilka *et al.*, 2008). Seit 2007 konnten die Kristallstrukturen von drei weiteren GPCR gelöst werden. Hierbei handelt es sich um die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren 1 (Warne *et al.*, 2008) und 2 (Rasmussen *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2007) und den  $A_{2A}$ -Adenosinrezeptor (Jaakola *et al.*, 2008) (Abb. 6). Im Gegensatz zu Rhodopsin konnte keiner dieser Rezeptoren in einer vollständig unmodifizierten Form kristallisiert werden. Um die Flexibilität zu verringern, wurden alle Membranproteine C-terminal verkürzt. Der unstrukturierte und große intrazelluläre Loop 3 (ICL3) wurde entweder durch Bindung an ein Antikörperfragment ( $\beta_2$ AR) oder durch Insertion des gut strukturierten Proteins Lysozym stabilisiert ( $\beta_2$ AR,  $A_{2A}$ AR). Beim  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor wurden sechs Punktmutationen eingeführt, welche einen thermostabilisierenden Effekt zur Folge hatten. Um einen spontanen Wechsel zwischen inaktivem bzw. aktivem Zustand zu verhindern, wurden alle Rezeptoren in Gegenwart eines Antagonisten bzw. inversen Agonisten kristallisiert.

Wie auch Rhodopsin weisen die vorgestellten Membranproteine eine achte  $\alpha$ -Helix innerhalb der C-terminalen Domäne auf. Sie verläuft parallel zur Membranebene und ermöglicht zumindest bei Rhodopsin eine Interaktion des Rezeptors mit spezifischen Phospholipidmolekülen der Zellmembran (Beck *et al.*, 1998; Isele *et al.*, 2000). Im  $A_{2A}$ -Adenosinrezeptor wird sie durch die Interaktion mit der Helix I stabilisiert. Die Anordnung der Transmembranbereiche weist große Ähnlichkeiten auf, was nicht überraschend ist, da innerhalb der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren die Sequenzidentität für diese Bereiche bei 20-50 % liegt (Vassilatis *et al.*, 2003). Die Helices III, V, VI und VII gehen umfangreiche Kontakte mit den jeweiligen Liganden ein. Die extrazellulären Loops (ECL) 1 und 3 liegen weitgehend unstrukturiert vor, wogegen ECL2 eine  $\alpha$ -Helix bildet ( $\beta$ -AR) oder ein  $\beta$ -Faltblatt aufweist (Rhodopsin). Im Adenosinrezeptor weist der ECL2 keine Sekundärstruktur auf.



**Abbildung 6: Kristallstrukturen der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren** **A:**  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptor (Rasmussen *et al.*, 2007), **B:**  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptor (Warne *et al.*, 2008), **C:**  $A_{2A}$ -Adenosinrezeptor (Jaakola *et al.*, 2008).

Für die Kristallisation von GPCR, welche der Sekretinfamilie angehören, stellt die im Vergleich zu den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren große N-terminale Domäne (NTD) eine Besonderheit dar. Zwar ist es inzwischen gelungen, die Strukturen einiger dieser Domänen auf atomarer Ebene aufzuklären. Dabei handelt es sich um die NTD der Rezeptoren GIPR (Parthier *et al.*, 2007), CRF-R2 $\beta$  (Grace *et al.*, 2007), PAC-1R (Sun *et al.*, 2007), PTHR (Pioszak *et al.*, 2008) und GLP-1R (Runge *et al.*, 2008) (Abb. 7 A/B). Bislang liegt keine vollständige Struktur dieser Rezeptorklasse vor. Alle erwähnten Domänen wurden wiederum in Gegenwart eines stabilisierenden Liganden kristallisiert. Hierbei fällt auf, dass Bindungsstellen für die Peptide GIP, Astressin, PTH und Exendin 4 an ihren jeweiligen Rezeptoren sehr ähnlich gelegen sind und die räumliche Orientierung der Liganden identisch ist. PACAP (6-38) bindet im Vergleich zu den anderen Peptiden überraschenderweise an einer anderen Seite der N-terminalen Domäne des PACAP-Rezeptors und liegt in einer entgegengesetzten Orientierung vor. Dieses Ergebnis wird derzeit diskutiert und sollte durch eine entsprechende Kristallstruktur verifiziert werden.



**Abbildung 7: A: Überlagerung der N-terminalen Domänen der Rezeptoren GLP-1R, GIPR, PAC1-R und CRF-R2B.** Die konservierten Kernstrukturen der N-terminalen Domänen wurden durch Überlagerung der Liganden-gebundenen Strukturen mit Hilfe von PyMOL abgeglichen. Die Oberfläche von nGLP-1R ist in grau und die Liganden sind als Bandendiagramme dargestellt: Exendin4 (3-39) in blau, GIP (1-42) in magenta, Arestressin in gelb und PACAP (6-36) in rot. Abbildung aus (Runge *et al.*, 2008). **B: N-terminale Domäne des PTH1 Rezeptors mit PTH.** Rezeptordomäne in grün, Peptidligand in gelb.

Alle N-terminalen Domänen wurden in *E. coli* exprimiert, wobei nPAC1R, nPTHR und nCRF-R2B löslich vorlagen, nGLP-1R und nGIPR hingegen aus *inclusion bodies* renaturiert werden mussten.

Es ist zu erwarten, dass in den kommenden Jahren weitere Strukturen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gelöst werden. Die Vorarbeiten und Strategien der Gruppen von Kobilka und Schertler können auf andere Rezeptoren übertragen werden, darunter z. Bsp. der Einbau von Lysozym, welches stabilisierend wirkt und als Kristallisationskeim dient. Außerdem stellen die bislang bekannten Strukturen eine Grundlage für die Auswertung der Daten aus Röntgenstrukturanalysen anderer GPCR dar.

## 1.5 Der *Glucagon-like peptide-1* Rezeptor

Der *Glucagon-like peptide-1* Rezeptor (GLP-1R) gehört zur Sekretinklasse der G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Seine Identifizierung gelang erstmals 1988 mit Hilfe von Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Ligand an Rattenzellen (Goke *et al.*, 1988). Fünf Jahre später erfolgte die Klonierung des humanen GLP-1R aus humanen  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Dillon *et al.*, 1993). Die für ihn kodierende DNA konnte mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert werden (Stoffel *et al.*, 1993). Die mRNA für den GLP-1R wurde in Magen, Darm, Herz, Niere, Lunge, Hypothalamus und den Inselzellen des Pankreas nachgewiesen (Bullock *et al.*, 1996). Daneben wird der Rezeptor in spezifischen Regionen des Gehirns exprimiert, wo ihm eine Funktion beim Sättigungsbefinden und der Immunantwort zugeschrieben wird (Seeley *et al.*, 2000; Turton *et al.*, 1996). Außerdem konnte durch Versuche an Mäusen und Ratten gezeigt werden, dass die Expressionsrate des Rezeptors mit der Lern- und Erinnerungsfähigkeit korreliert (During *et al.*, 2003).

Der humane GLP-1R besteht aus 463 Aminosäuren, wobei die ersten 23 für eine Signalsequenz kodieren, welche im membranständigen Rezeptor nicht mehr vorhanden ist. Bislang konnte die atomare Struktur des Gesamtrezeptors nicht gelöst werden. Durch Fourier Transformation-Analysen und den Vergleich der Sequenz von Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren wurde ein Modell für die Transmembranbereiche und die sie verbindenden Loop-Regionen erstellt (Frimurer *et al.*, 1999) (Abb. 8).

Die N-terminale Domäne enthält sechs konservierte Cysteinreste, welche ein definiertes Disulfidbrückenmuster ausbilden (Cys<sup>46</sup> – Cys<sup>71</sup>; Cys<sup>62</sup>-Cys<sup>104</sup>; Cys<sup>85</sup> – Cys<sup>126</sup>) und für die Ligandenbindung essentiell sind (Bazarsuren *et al.*, 2002). Außerdem enthalten die ersten beiden extrazellulären Loops je einen Cysteinrest und es wird vermutet, dass auch hier eine Verbrückung stattfindet. Dies konnte bislang jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Die Sequenz enthält weiterhin sieben Tryptophanreste und der Austausch von Trp<sup>39</sup>, Trp<sup>72</sup>, Trp<sup>91</sup>, Trp<sup>110</sup> und Trp<sup>120</sup> gegen Alanin führt zum vollständigen Verlust der Liganden-Bindungsfähigkeit des GLP-1-Gesamtrezeptors (Wilmen *et al.*, 1997). Im Jahr 2008 gelang die Aufklärung der Struktur der N-terminalen Domäne (Runge *et al.*, 2008), welche im Komplex mit Exendin 4 (9-39) kristallisiert wurde (Abb. 8). Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven Antagonisten, welcher sowohl GLP-1 (7-37) als auch Exendin 4 (1-39) vom Rezeptor verdrängt (Lopez de Maturana *et al.*, 2003). Die Struktur von Exendin 4 allein zeigt, dass die letzten neun C-terminalen Aminosäurereste, welche als Tryptophan-Käfig bezeichnet

werden, zum zentralen  $\alpha$ -helikalen Teil von Exendin 4 zurückfalten (Neidigh *et al.*, 2002). Bislang ging man davon aus, dass dieser Tryptophan-Käfig mit dem nGLP-1R interagiert, was die höhere Affinität von Exendin 4 im Vergleich zu GLP-1 erklären sollte. Überraschenderweise ist dieses Element nicht in die Bindung involviert.

Die hohe Affinität von Exendin 4 basiert vermutlich auf dem erhöhten Helix-Gehalt des freien Liganden. Exendin 4 geht sowohl hydrophobe als auch hydrophile Wechselwirkungen mit dem nGLP-1R ein.

Die Struktur der N-terminalen Domäne beginnt mit einer  $\alpha$ -Helix (Leu<sup>32</sup> - Glu<sup>52</sup>), gefolgt von zwei Regionen mit antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern. Außerdem findet man die bereits erwähnten Disulfidverbrückungen, welche die Tertiärstruktur der Domäne stabilisieren. Einige Aminosäureseitenketten sind hochkonserviert und gehen intramolekulare Interaktionen ein, welche ebenfalls für die Stabilisierung der Tertiärstruktur von essentieller Bedeutung sind. Eine zentrale Rolle spielt hierbei Asp<sup>67</sup>, welches indirekt über ein Wassermolekül mit Arg<sup>102</sup> und direkt mit Trp<sup>72</sup> und Arg<sup>121</sup> interagiert. Außerdem stabilisiert es über die Wechselwirkung mit Tyr<sup>69</sup> und Ala<sup>70</sup> die Schleife zwischen dem ersten und zweiten  $\beta$ -Faltblatt.

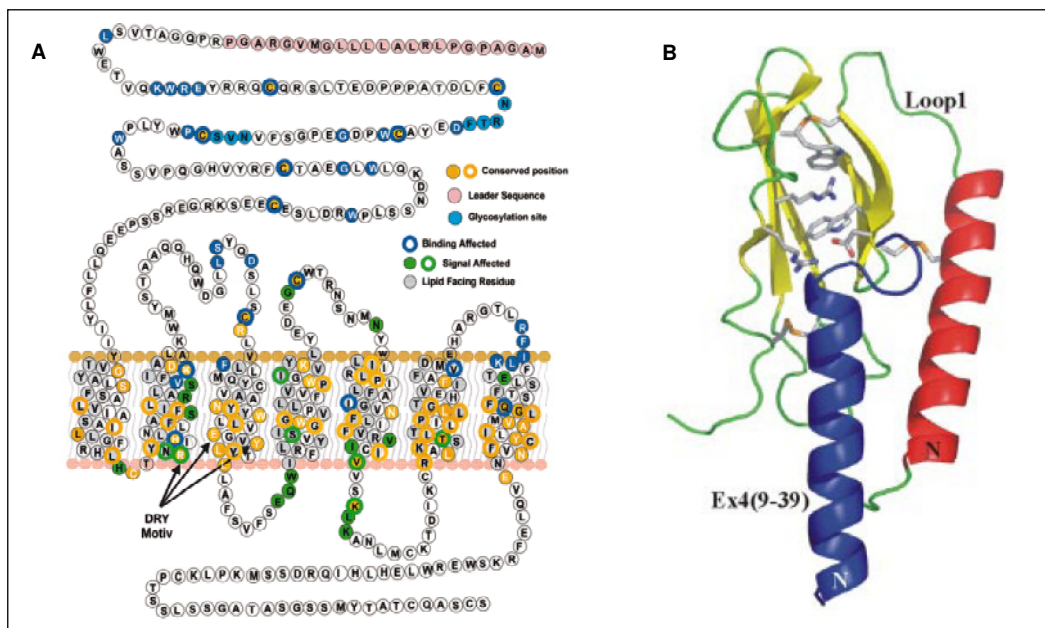
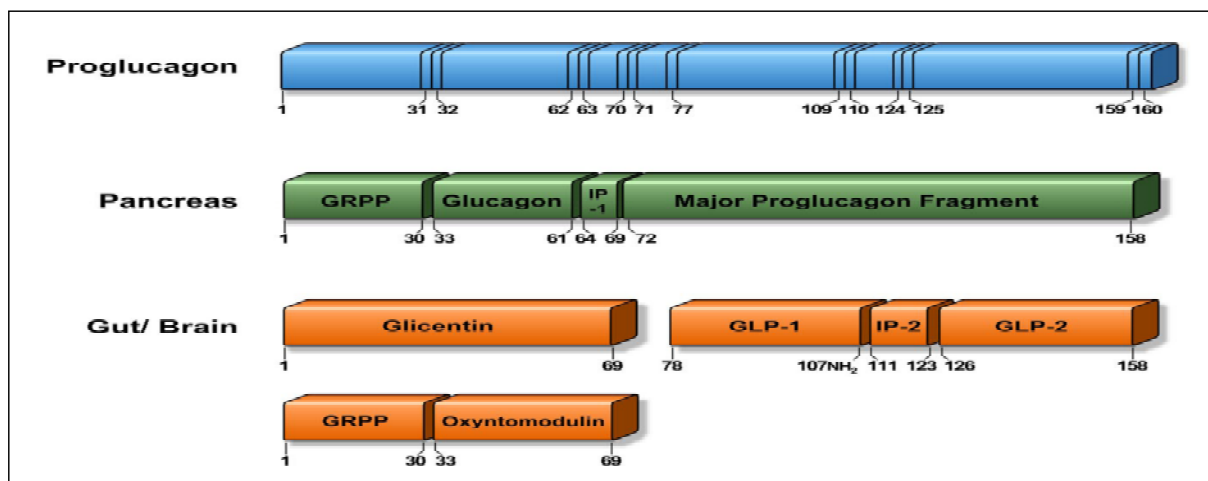


Abbildung 8: A: Schematische Darstellung des GLP-1-Rezeptors (Frimurer *et al.*, 1999). B: Röntgenkristallstruktur der N-terminalen Domäne des GLP-1-Rezeptors im Komplex mit dem Antagonisten Exendin 4 (9-39) (Runge *et al.*, 2008).  $\alpha$ -Helices in rot (nGLP-1R) bzw. blau (Exendin 4),  $\beta$ -Faltblätter in gelb, Schleifen in grün.

Durch Mutationsanalysen an den Transmembranbereichen wurde gezeigt, dass diese neben der N-terminalen Domäne an der Ligandenbindung beteiligt sind. Als Beispiel hierfür soll das negativ geladene Asp<sup>198</sup> am extrazellulären Ende der TM2 erwähnt werden. Ein Austausch gegen eine ungeladene Aminosäure (Alanin) führt zu einer drastischen Abnahme der Affinität für GLP-1 (de Maturana *et al.*, 2002).

Die intrazellulären Loop-Bereiche ICL1 und ICL3 vermitteln die Bindung an das G-Protein. Beim GLP-1-Rezeptor handelt es sich um ein G-Protein der G<sub>s</sub>α Klasse, wodurch es nach Aktivierung der Adenylatcyclase zu einem Anstieg der zyklischen AMP Konzentration kommt (Drucker *et al.*, 1987). Der C-Terminus, welcher aus 56 Aminosäuren besteht, ist in die Desensitisierung und Internalisierung des GLP-1R involviert (Widmann *et al.*, 1995; Widmann *et al.*, 1997).

Der endogene Ligand des GLP-1R ist das Peptidhormon *glucagon-like peptide-1* (GLP-1). Die für das Peptid kodierende DNA befindet sich innerhalb des Glukagongens, welches aus fünf Introns und sechs Exons besteht (Bell *et al.*, 1983) und im Darm, Pankreas und Gehirn exprimiert wird. Die Prozessierung der mRNA des Glukagongens findet mit gewebespezifischen Unterschieden statt (Abb. 9). Im Pankreas werden Glukagon, *glicentin-related pancreatic peptide* (GRPP) und das *major proglucagon fragment* (MPF) gebildet, wobei letzteres nicht weiter gespalten wird (Patzelt *et al.*, 1984). Im Darm und Gehirn durchläuft die mRNA des Glukagongens eine Spaltung in GLP-1, GLP-2 und Glicentin. Letzteres erfährt eine weitere Spaltung in GRPP und Oxyntomodulin (Thim *et al.*, 1981).



**Abbildung 9: Unterschiedliche posttranslationale Prozessierung der Proglucagon mRNA im Pankreas bzw. Darm und Gehirn.** Die Zahlen bezeichnen die Position der Aminosäure im Proglucagon (Holst 2007). Vertikale Linien zeigen die typischen Schnittstellen

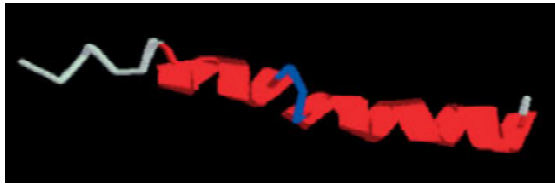
Die L-Zellen des Dünndarms sind die Hauptlieferanten an GLP-1. Das Hormon liegt zunächst in einer biologisch inaktiven Form vor (GLP-1(1-37)). Mit Hilfe der Prohormonkonvertasen werden die ersten sechs Aminosäuren abgespalten und es entsteht GLP-1 (7-37), welches biologisch aktiv ist (Orskov *et al.*, 1986). 80 % davon werden in die aktive Isoform GLP-1 (7-36)<sup>amid</sup> umgewandelt (Orskov *et al.*, 1994), welches eine höhere Plasmastabilität im Vergleich zu GLP-1 (7-37) besitzt (Orskov *et al.*, 1993).

Wie anhand von Abbildung 10 zu erkennen ist, liegen die ersten sieben Aminosäuren des GLP-1 als *random coil* vor, gefolgt von zwei  $\alpha$ -helikalen Bereichen (7-14, 18-29), welche über einen kurzen *Linker* (15-17) miteinander verbunden sind. Durch Abspaltung der ersten beiden Aminosäuren durch die Dipeptidylpeptidase IV wird das Hormon im Körper inaktiviert (Mentlein *et al.*, 1993).

GLP-1 zählt zu den Inkretinen. Diese Wirkstoffe lösen den Inkretineffekt aus, welcher beschreibt, dass bei oraler Aufnahme von Glukose eine verstärkte Insulinantwort der pankreatischen  $\beta$ -Zellen im Vergleich zu intravenöser Zufuhr erfolgt (Perley *et al.*, 1967). Ist Glukose im Blutserum enthalten, wird das Monosaccharid über den Glut2-Transporter in die  $\beta$ -Zelle aufgenommen, wo es über die Glykolyse in zwei Moleküle Pyruvat gespalten wird. Außerdem entstehen je zwei Moleküle ATP. Ein hoher ATP-Spiegel führt zu einer Inhibierung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle und damit zur Depolarisierung der Zellmembran. Die veränderte Ionenkonzentration hat die Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle zur Folge. Es resultiert ein Einstrom an  $\text{Ca}^{2+}$  - Ionen und die  $\text{Ca}^{2+}$  - abhängige Exozytose von Insulingranula. Die hohe Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bewirkt gleichzeitig die Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanälen, was eine Repolarisierung der Zellmembran bewirkt, wodurch der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und damit die Insulinausschüttung beendet wird (Holz 2004).

Bei einer oralen Glukoseaufnahme schütten die L-Zellen des Dünndarms GLP-1 aus, welches über die Blutbahn zur Pankreas gelangt. Dort bindet es an seinen Rezeptor und aktiviert über die  $G_s\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins die Adenylatcyclase. Diese bewirkt eine Erhöhung der Konzentration an cAMP, was eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zur Folge hat. Dieses Enzym phosphoryliert ATP-abhängige Kaliumkanäle und beschleunigt somit die Depolarisierung der Zellmembran (Light *et al.*, 2002). Außerdem wird über verschiedene Mechanismen die Konzentration an intrazellulärem Calcium erhöht, was die  $\text{Ca}^{2+}$  - abhängige Exozytose von Insulingranula beschleunigt (Wheeler *et al.*, 1993). Auf diesen Wegen erhöht GLP-1 die Insulinsekretion der  $\beta$ -pankreatischen Zellen.





**Abbildung 10: NMR Struktur von GLP-1 (1-37).** *Random coil* in grau,  $\alpha$ -helikale Regionen in rot und Linkerregionen in blau (Hui *et al.*, 2005).

Neben der Glukose-abhängigen Stimulierung der Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas wurden für das Hormon GLP-1 weitere Effekte nachgewiesen. Zu ihnen gehören unter anderen die Verringerung der Glukagonsekretion der pankreatischen  $\alpha$ -Zellen, die Stimulierung der Proinsulinsynthese der pankreatischen  $\beta$ -Zellen und die Verlangsamung der Darmentleerung, was ein Einstellen des Sättigungsgefühls bewirkt. Von besonderem medizinischen Interesse ist die Fähigkeit, die Anzahl der Glukose-sensitiven pankreatischen  $\beta$ -Zellen zu erhöhen und deren Funktion zu erhalten (Drucker 2003; Li *et al.*, 2003). Durch die hier genannten Eigenschaften wurden der GLP-1-Rezeptor und seine Liganden zu einem potentiellen Angriffsziel für die Behandlung der Stoffwechselkrankheit Diabetes mellitus.

Mit diesem Begriff werden verschiedene Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels zusammengefasst, die durch erhöhte Blutzuckerwerte gekennzeichnet sind. Die beiden wichtigsten Formen sind der Typ-1-Diabetes, an dem 5 bis 10 Prozent der Menschen mit Diabetes leiden, und der Typ-2-Diabetes, dem ca. 90 Prozent der Erkrankten zuzuordnen sind. Daneben gibt es einige seltenere Diabetesformen, die zahlenmäßig eher unbedeutend sind, aber häufig diagnostische und therapeutische Probleme bereiten (Alberti *et al.*, 1998). Beim Typ-1-Diabetes handelt es sich um eine Autoimmunkrankheit, welche auf einer genetischen Prädisposition beruht und mit einer Zerstörung der  $\beta$ -Zellen der Pankreas einhergeht. Typ-2-Diabetes tritt in der Regel bei alten und übergewichtigen Menschen auf. Bei den Betroffenen entwickelt sich eine Insulinresistenz, die zu einer erhöhten Ausschüttung von körpereigenem Insulin führt (Hyperinsulinämie). Dieses Phänomen hat eine Abnahme der Insulinrezeptoren und daraus resultierende Hypoinsulinämie zur Folge. Begleit- und Folgekrankheiten sind hierbei Bluthochdruck, diabetische Retinopathie, Herzinfarkt und seltener Amputationen und Erblindung (Diabetes-Union 2008). Eine Umstellung des Lebensstils und die Einnahme von Blutzucker-senkenden Medikamenten (z.Bsp. Metformin) sind die ersten therapeutischen Maßnahmen, um die Gefahr von Komplikationen zu verringern. Reicht dies nicht aus, muss ein zweites orales Antidiabetikum verabreicht werden. Hierbei handelte es sich in der Regel um Insulin. Neue Therapieansätze wurden durch die Erforschung der insulinotropen Eigenschaften von GLP-1 und nachfolgend Exendin 4 möglich. Beide Hormone bewahren in

Patienten mit Typ-2-Diabetes ihre Fähigkeit, die Insulinausschüttung der Bauchspeicheldrüse anzuregen. GLP-1 (7-37) weist *in vivo* eine geringe Halbwertszeit auf (1-2 min), da es durch die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) zu GLP-1 (9-37) gespalten und somit inaktiviert wird (Kieffer *et al.*, 1995). Die Entwicklung von DPP IV-Inhibitoren ist ein möglicher Therapieansatz. Solche Inhibitoren sind unter dem Namen Sitagliptin (Januvia<sup>®</sup>) bzw. Vildagliptin (Galvus<sup>®</sup>) seit 2006 in den USA zugelassen. Seit Februar 2007 liegt darüber hinaus eine positive Stellungnahme der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) vor. Exendin 4 ist gegen den Abbau durch DPP IV resistent. In den USA ist Exendin 4 von der Firma Amylin unter dem Handelsnamen Byetta seit 2005 auf dem Markt, für die EU hat der Pharmakonzern Lilly 2006 die Zulassung beantragt (Amori *et al.*, 2007).

Ein weiterer Therapieansatz ist die Entwicklung von nichtpeptidischen Agonisten des GLP-1-Rezeptors (Knudsen *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu anderen Wirkstoffen können diese synthetisch hergestellt und oral verabreicht werden.

Unter Berücksichtigung der Bevölkerungsentwicklung und aktueller Daten europäischer und deutscher Bevölkerungsstudien kann man bis zum Jahr 2010 mit bis zu 10 Millionen Menschen mit Typ-2-Diabetes in Deutschland rechnen (Hauner *et al.*, 2003). Die dadurch verursachten Behandlungskosten sind immens hoch. Eine dauerhaft erfolgreiche Behandlung dieser Stoffwechselstörung ist somit von großem Interesse.

## 1.6 Zielstellung

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, den humanen GLP-1-Rezeptor strukturell und funktionell zu charakterisieren. Dazu musste zunächst das Problem der heterologen Expression ausreichender Mengen gelöst werden. Als Expressionssystem sollte *E. coli* dienen. Aus diesem Grund musste die DNA-Sequenz auf den gewünschten Wirt optimiert werden. Um ausreichende Mengen an Protein zu erhalten und die Toxizität für den Wirt zu verringern, sollte der Rezeptor in Form von *inclusion bodies* produziert werden. Damit mussten im Anschluss an die Solubilisierung und Reinigung mittels Affinitätschromatographie Renaturierungsbedingungen etabliert werden, welche zum einen eine Ausbildung der korrekten Disulfidverbrückung, zum anderen die Stabilisierung der hydrophoben Transmembranbereiche gewährleisten. Das gereinigte und renaturierte Protein sollte hinsichtlich seiner Struktur und Aktivität untersucht werden. Verkürzte Varianten des GLP-1-Rezeptors dienten als Kontrollen für die etablierten Protokolle. Dazu wurden diese zunächst analog zum Gesamtrezeptor gereinigt und renaturiert. Im Anschluss daran folgten strukturelle und funktionelle Untersuchungen. Die daraus resultierenden Daten sollten mit denen des Gesamtrezeptors verglichen werden.

Es sollte bewiesen werden, dass ein komplexes Membranprotein in *E. coli* produziert und durch geeignete Protokolle in seine native Form überführt werden kann. Damit wäre die Bereitstellung von ausreichend homogenem und nativem Material für strukturelle Studien mittels röntgenkristallographischer Methoden oder NMR-Spektroskopie gewährleistet.

## 2. Materialien

### 2.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acetonitril	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Agarose GTQ	Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumchlorid, $\geq 99$ %, krist.	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APS), $\geq 98$ %	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Merck (Darmstadt)
<i>Antifoam 204</i>	Sigma (Steinheim)
Brij 35	Sigma (Steinheim)
Brij 58	Sigma (Steinheim)
Brij 78	Sigma (Steinheim)
Brij 98	Sigma (Steinheim)
Bromphenolblau (Na-Salz)	Roth (Karlsruhe)
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
CHAPS (3-[3-(Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat	Sigma (Steinheim)
Coomassie Brilliant Blau G250	Roth (Karlsruhe)
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	
DDM (n-Dodecyl $\beta$ -D-Maltosid)	Glycon Bioch. GmbH
Digitonin	
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Appllichem (Darmstadt)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma (Steinheim)
Extran® MA 02 neutral	Merck (Darmstadt)
Glukose	CVH Chemie-Vertrieb GmbH & Co Hannover KG
Glutathion oxidiert / reduziert	Appllichem (Darmstadt)
Glyzerin	Appllichem (Darmstadt)
Glyzin	Roth (Karlsruhe)

Guanidinhydrochlorid	NIGU bioselect
Hefeextrakt pulv. für die Bakteriologie	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt Typ KAV	Deutsche Hefewerke GmbH & Co Hamburg
Imidazol	Applichem (Darmstadt)
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid)	Applichem (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Kanamycinsulfat	Roth (Karlsruhe)
L-Arginin	Ajinomoto Co. (Japan)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth (Karlsruhe)
Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin	Wacker Chemie AG
Natriumchlorid	Applichem (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	KMF optiChem (Lohmar)
Phosphorsäure 85 %	KMF optiChem (Lohmar)
Rotiphorese® Gel 30 (37.5:1)	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 37 %	KMF optiChem (Lohmar)
SDS (Natriumdodecylsulfat) Pellets, $\geq 99$ %, für die Biochemie	Roth (Karlsruhe)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin), 99 %, p.a.	Roth (Karlsruhe)
Trifluoressigsäure (TFA)	Roth (Karlsruhe)
Tris	Applichem (Darmstadt)
Trypton/Pepton aus Casein pankreatisch verdaut	Roth (Karlsruhe)
Tween® 20, Ph.Eur. (Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat)	Roth (Karlsruhe)
Ultra Qualität Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, $\geq 99.9$ %	Roth (Karlsruhe)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien stammen von den Firmen Merck, Sigma, Applichem und hatten den Reinheitsgrad *p.a.*. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde ausschließlich deionisiertes Wasser (*Pure Lab Plus*, *USF Seral* bzw. Millipore®) verwendet.

## 2.2 Bakterienstämme, Plasmide und DNA

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp
BL21(DE3) <sup>c+</sup> RIL	F- <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) <i>dcm</i> +Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [ <i>argU ileY leuW Cam</i> <sup>r</sup> ]
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) <i>dcm</i> + <i>gal</i> λ (DE3)
BL21 Star <sup>TM</sup>	F- <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) <i>dcm</i> +Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> λ <i>endA</i>
Rosetta	F- <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) <i>dcm</i> +Tet <sup>r</sup> <i>gal ndA Hte</i> [ <i>argU ileY leuW proP Cam</i> <sup>r</sup> ]
MC 4100	<i>araD139</i> Δ( <i>argF-lac</i> ) U169 <i>rpsL150 relA1 flbB5301</i> <i>deoC1 ptsF25 rbsR</i>
C41 (DE3)	BF <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> m <sub>B</sub> ) <i>gal</i> λ (DE3) enthält mind. eine nicht charakterisierte Mutation
C43 (DE3)	BF <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> m <sub>B</sub> ) <i>gal</i> λ (DE3) enthält mind. zwei nicht charakterisierte Mutation
TOP10	F <i>mcrA</i> Δ( <i>mr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> ΔM 15Δ <i>lacX74 deoR</i> <i>recA1 araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>

Plasmide und DNA	Bezugsquelle	Resistenz
042086pPCR-Script (enthält synth. GLP1R)	Geneart	Ampicillin
pET 28a	Novagen	Kanamycin
pET 41b	Novagen	Kanamycin

## 2.3 Enzyme und Antikörper

Enzym	Bezugsquelle
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, Beverly USA
Deoxyribonuklease I aus Rinderpankreas	Sigma, Steinheim

HEW Lysozym für Zellaufschluß	Sigma, Steinheim
<i>Phusion Hot Start</i> DNA Polymerase	New England Biolabs, Beverly USA
<i>T4</i> DNA Ligase	New England Biolabs, Beverly USA
<i>Nde</i> I	New England Biolabs, Beverly USA
<i>Hind</i> III	New England Biolabs, Beverly USA
<i>Xho</i> I	New England Biolabs, Beverly USA

Antikörper	Verdünnung für WB	Bezugsquelle
anti-nGLP-1R (polyklonal aus Huhn)	1:500	Davids Biotechnologie
anti-Huhn (polyklonal aus Hase)	1:2000	Santa Cruz
anti-Hexa-His (polyklonal aus Maus)	1:1000	Santa Cruz
anti Maus (polyklonal aus Ziege)	1:2000	Santa Cruz

Für die Herstellung der Verdünnung wurde Blockierungspuffer verwendet (siehe 2.2.4).

## 2.4 Oligonukleotide

5' – cca cat aca tat gcg tcc gca ggg tg – 3'      Forward Primer GLP1R in pET 41b  
 5' - ggt ata ctc gag gct aca gct cgc ctg aca gg – 3'      Reverse Primer GLP-1R in pET 41b

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert.

## 2.5 Lösungen, Puffer und Medien

APS-Stammlösung:	10 % (w/v) in H <sub>2</sub> O
DNA-Probenpuffer (6x):	0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 30 % (v/v) Glycerin
<u>Inclusion bodies-Präparation Domänen:</u>	
Resuspendierungspuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 7.0, 1 mM EDTA
Triton-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH 7.0, 6 % Triton-X, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA
Waschpuffer 1:	100 mM Tris/HCl, pH 7.0, 1 % LDAO
Waschpuffer 2:	100 mM Tris/HCl, pH 7.0, 10 mM EDTA

Inclusion bodies-Präparation Gesamtzeptor:

Resuspendierungspuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 7.0, 1 mM EDTA
1. Waschpuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 % Triton
2. Waschpuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 7.0, 20 mM EDTA, 1 M NaCl

LB-Medium: 10 g/l Trypton/ Pepton, 5 g/l Hefeextrakt,  
5 g/l NaCl, 1 % (w/v) Glukose

LB-Platten: 10 g/l Trypton/ Pepton, 5 g/l Hefeextrakt,  
5 g/l NaCl, 15 g/l Agar-Agar

NiNTA-GLP-1R Konstrukte:

Waschpuffer: 50 mM Natriumphosphat, pH 8.0, 10 mM SDS

Elutionspuffer: 50 mM Natriumphosphat, pH 4.5, 10 mM SDS

Puffer A: 50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 150 mM NaCl,  
1 mM GSH, 0.2 mM GSSG

Puffer B: 50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 150 mM NaCl,  
0.1 mM Brij 78

RP-HPLC Laufpuffer A: 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) in bidest. H<sub>2</sub>O

RP-HPLC Laufpuffer B: 80 % Acetonitril, 0.1 % TFA in bidest. H<sub>2</sub>O

Rückfaltungspuffer: 0.1 M Tris/HCl, pH 8.5, 1 M L-Arginin,

SDS PAGE-Entfärber: 40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure

SDS PAGE-Färbelösung: 40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure,  
1 g/l Coomassie-Brillantblau G-250

SDS PAGE-Geltrocknungslösung: 45 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Glycerin

SDS PAGE-Laufpuffer: 0.025 M Tris/HCl, pH 8.3, 0.192 M Glyzin, 0.1 % SDS

SDS PAGE-Proteinprobenpuffer

(2 x): 124 mM Tris/HCl, pH 6.8, 4 % SDS, 0.2 %  
Bromphenolblau, 20 % (v/v) Glycerin, 100 mM DTT

SDS PAGE-Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8, 4 g/l SDS

SDS PAGE-Trenngelpuffer: 3 M Tris/HCl, pH 8.8, 4 g/l SDS

SOC-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 0.19 g/l  
KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 % (w/v) Glukose

Solubilisierungspuffer: 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, 0.1 M DTT, 1 mM EDTA,  
20 mM SDS



Sumo-Dialysepuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl
Sumo-Äquilibriumspuffer:	50 mM Natriumphosphat, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
Sumo-Waschpuffer:	50 mM Natriumphosphat, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Sumo-Elutionspuffer:	50 mM Natriumphosphat, pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol
TBT-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.2 % (v/v) Tween 20
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris/HCl, pH 8.5, 0.1 M EDTA, 1 M Essigsäure
<u>Western-blotting:</u>	
Ponceau-Lösung:	2 % Ponceau S in 3%iger TFA-Lösung
Blockierungspuffer:	5 % (w/v) Milchpulver in TBT-Puffer
ECL-Lösung 1:	1 ml 1 M Tris/HCl, pH 8.5, 44 µl Cumarinsäure, ad 10 ml bidest. Wasser
ECL-Lösung 2:	1 ml 1 M Tris/HCl, pH 8.5, 6.4 µl Wasserstoffperoxid ad 10 ml bidest. Wasser
Entwickler- & Fixierer-Lösung:	(Kodak™ <i>Processing chemicals</i> ): Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Western Blot-Inkubationspuffer:	SDS-PAGE-Laufpuffer (1x)

## 2.6 Sonstige Materialien

Dialyseschläuche MWCO 6-8000:	Spektrum Laboratories, Inc. (USA & Canada)
Nitrocellulose <i>blotting</i> Membran (0.45 µm):	PeQLab Biotechnologie (Erlangen)

## 2.7 Geräte

Absorptionsspektrophotometer	Beckman DU 7400 (Beckman), Ultrospec 3000 (Pharmacia)
------------------------------	--

ÄKTA <i>Explorer</i> 100:	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Bioreaktor	Biostat ED (B.Braun)
Brutschrank BM 200:	Memmert (Schwabach)
Brutschrank WST3010	MLW (Kent, UK)
Dampfsterilisator	Varioklav (H und P Labortechnik)
Elektroporationsgerät	Gene-Pulser System (Biorad, USA)
Elektroporationsküvetten	Gene Pulse/Micro Pulser (Biorad, USA)
Fermentor <i>Biostat</i> ED 10 l:	Braun Biotech, jetzt Sartorius (Göttingen)
„Großer“ Gaulin Homogenisator:	Typ Lab60/60-10TBS APV (Invensys Deutschland GmbH, Unna)
„Kleiner“ Gaulin Homogenisator:	MICRON LAB 40 CONT (Invensys Deutschland GmbH, Unna)
HPLC-Anlage:	Gina 50 Gynkotec (Idstein)
Instr. Heizblock	SHT100D (Stuart Scientific)
Laminarflowbox	Hera Safe (Heraeus Instruments)
Magnetrührer	MR 3000, MR 3001, MR Hei-Standard (Heidolph)
Orbitalshaker	Polymax 1040 (Heidolph)
Schüttelinkubatoren	SM 30 (Edmund Bühler), HAT Multitron (Infors AG)
SDS-PAGE-Apparatur:	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Semi-Phor (WesternBlot):	Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA)
Spannungsquellen	EPS 200, EPS 600 (Pharmacia)
Spektropolarimeter J-810:	Jasco
Spektrofluorimeter Fluoromax3:	SPEX Instruments S.A., Inc. (Edison, NJ, USA)
Quarzglas-Küvetten:	Hellma (Mühlheim)
Thermomixer <i>comfort</i> :	Eppendorf (Hamburg)
Vakuumregler	CVC 2000 (Vacuubrand)
Vortexer	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
Western Blot Apparatur	SEMI-PHOR (Hoefer)
Zentrifugen Avanti JA-20, JLA 16.25 0, JLA 8.1000 (und Zubehör):	Beckman (München)
Tischzentrifuge: Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus Instruments

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine effiziente Methode, mit deren Hilfe spezifische Bereiche eines DNA-Abschnittes amplifiziert werden können. Das Prinzip der PCR wurde 1986 von Mullis (Mullis *et al.*, 1986) entwickelt. Ein typischer PCR-Zyklus beinhaltet einen Denaturierungsschritt (Trennung der DNA-Doppelstränge), einen Annealingschritt (Hybridisierung der Primer mit denaturierter DNA) und einen Elongationsschritt (Verlängerung der Primer). Für alle Reaktionen wurde *Phusion Hot Start* DNA Polymerase verwendet. Die einzelnen Schritte eines PCR Standard-Programms sind in Tabelle 4 dargestellt.

#### Ein 50 µl Reaktionsansatz enthielt:

5-50 ng	DNA-Matrize
10 µl	5 x <i>Phusion</i> -Puffer
8 µl	1.25 mM dNTP-Mix
2.5 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
2.5 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
0.5 µl	<i>Phusion Hot Start</i> DNA Polymerase
ad 50 µL	steriles bidest. Wasser

**Tabelle 4: Standard-PCR Programm**

Prozess	Temperatur	Zeit	Zyklen
Deckel vorheizen	105 °C		
Denaturierung	98 °C	2 min	1
Denaturierung	98 °C	30 - 60 s	30
<i>annealing</i>	(variabel)	20 - 30 s	
<i>extension</i>	72 °C	(30 s pro kb)	
Auffüllreaktion	72 °C	10 min	1
Lagerung	4 °C	∞	1

Die jeweilige Annealing-Temperatur sowie sonstige etwaige Änderungen sind in den jeweiligen Experimenten angegeben.

### 3.1.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden zunächst die Zellen aus 5 ml einer Übernachtskultur für zwei Minuten bei 13000 rpm (Biofuge Pico) abzentrifugiert, mit Hilfe einer alkalischen Lyse aufgeschlossen und die Proteine gefällt. Die Plasmid-DNA wurde nach Bindung an ein Silica-Material mit 50 µl sterilem Wasser eluiert und bei -20 °C gelagert.

### 3.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Um gewünschte DNA-Sequenzen in Plasmide zu klonieren, können beide Reaktionspartner durch Restriktionsverdau und anschließende Ligation miteinander verknüpft werden. Beim Restriktionsverdau werden Phosphodiesterbindungen der doppelsträngigen DNA hydrolytisch gespalten. Dabei verbleiben an den Fragmenten entweder Enden ohne Überhang (*blunt end*) oder Enden mit Überhängen einzelsträngiger DNA (*sticky end*). Diese Methode wurde zum einen verwendet, um DNA-Fragmente für eine Ligation vorzubereiten (präparativer Verdau), zum anderen, um den Einbau von *insert*-DNA in einen Vektor zu analysieren (analytischer Verdau). Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für einen präparativen bzw. analytischen DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen**

Bestandteil	Präparativer Verdau	Analytischer Verdau
DNA	3-4 µg	0.5 µg
10x Puffer	3 µl	1 µl
Enzyme	1.5 µl (jeweils)	0.5 µl (jeweils)
H <sub>2</sub> O	ad 30 µl	ad 10 µl

Die Spaltungsreaktionen erfolgten bei den verwendeten Enzymen bei 37 °C. Die Dauer hing von der jeweiligen Aktivität des Enzyms ab. Nach der Spaltung wurden die Enzyme nach Angaben des Herstellers hitzeinaktiviert.

### 3.1.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung der Religation wurden die mit Restriktionsenzymen geschnittenen Plasmide mit alkalischer Phosphatase am 5'-Ende dephosphoryliert. Da das Enzym in jedem beliebigen NEB-Puffer aktiv ist, konnte es direkt in den Verdauansatz nach Deaktivierung des Restriktionsenzym zugegeben werden. Nach Zugabe von 2 µl der Phosphatase erfolgte die Reaktion für 2 h bei 37 °C. Das Erhitzen des Ansatzes auf 65 °C für 20 min inaktivierte das Enzym.

### 3.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der T4-Ligase wurde die linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA kovalent mit der *insert*-DNA verknüpft. Unter ATP-Verbrauch werden dabei Phosphodiesterbindungen ausgebildet und es entsteht wieder ein vollständig doppelsträngiges Plasmid. Dabei wurde die *insert*-DNA in fünf- bzw. zehnfachem molarem Überschuss gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt. Die Menge an Vektor DNA betrug 50 ng. Die Berechnung der Masse an einzusetzender *insert*-DNA erfolgte nach Gleichung 1. In der Formel ist die Länge des *inserts* und des Vektors in bp und die eingesetzte Masse an Vektor-DNA in ng einzusetzen. Die Umrechnung der Massen in Volumina erfolgte mit Hilfe einer Konzentrationsabschätzung der DNA-Lösungen aus einem Agarosegel (Gl. 1). Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 6 dargestellt.

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} = \frac{\text{Überschuss} \cdot \text{Länge}_{\text{Insert}} \cdot \text{Masse}_{\text{Vektor}}}{\text{Länge}_{\text{Vektor}}} \quad \text{Gleichung 1}$$

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Ligationsansätze**

Reagenzien	Verwendete Mengen bzw. Volumina
Linearisierte, gereinigte Plasmid-DNA	50 - 100 ng
Verdaute, gereinigte <i>insert</i> -DNA	1 bis 3-facher Überschuss zur Plasmid-DNA
10 x Ligase-Puffer	1 µl
T4-DNA-Ligase (400 U/ml)	1 µl
Bidest H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 16 °C.

### 3.1.6 Agarosegelelektrophorese

Um das Ergebnis eines Restriktionsverdau oder PCR-Produkte zu analysieren, wurde eine größenabhängige Auftrennung der DNA durchgeführt. Hierfür wurden die Proben mit 6× DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Für die Herstellung der 1%igen Gele wurde Agarose durch Erhitzen in 1× TAE-Puffer gelöst. Die Zugabe von Ethidiumbromid (1 µg/ml) erfolgte vor dem Einsetzen der Polymerisationsreaktion. Das Absorptionsspektrum von Ethidiumbromid in Wasser zeigt zwei Absorptionsbanden im UV-Bereich ( $\lambda = 210 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 40000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 285 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 50000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) mit zwei Schultern ( $\lambda = 316 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 5000 - 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 343 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 200 - 500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und eine im sichtbaren Bereich ( $\lambda = 480 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 5300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Hudson *et al.*, 1975; Sharp *et al.*, 1973). Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren (Einlagerung im Abstand von 10 Basenpaaren) und verändert dabei sein Absorptionsspektrum. Das Emissionsspektrum bleibt nahezu unverändert. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in Nukleinsäuren nimmt die Intensität der Fluoreszenz-Emission um den Faktor 50 - 100 zu. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden, hell auf, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden DNA/RNA-Konzentration, sowie zur Länge der Nukleinsäure. Die verwendete Ethidiumbromid-Konzentration im Agarosegel lag bei 0.1 – 0.5 µg/ml. Die Auftrennung wurde bei einer Stromstärke von 100 mA und Spannung von 100 V mit 1×TAE-Puffer als Laufmittel durchgeführt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

### 3.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um die DNA von Komponenten wie Nukleotiden, ungeschnittenen Fragmenten, Enzymen, Puffersubstanzen und ähnlichem zu trennen, wurde die DNA-Lösung in mehreren Spuren in ein Agarosegel aufgetragen und unter Spannung aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden unter sehr kurzer Bestrahlung mit UV-Licht markiert und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mittels QIAquick Gel Extraktion Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit sterilem Wasser eluiert und bei -20 °C gelagert.

### 3.1.8 Quantitative Bestimmung von DNA-Fragmenten

Die quantitative DNA-Bestimmung erfolgte spektrophotometrisch, indem die Absorption bei 260 nm gegen eine geeignete Referenz gemessen wurde. Eine Absorption von 1 entspricht näherungsweise einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA (dsDNA). Für die Berechnung der DNA-Konzentration wurde Gleichung 2 verwendet.

$$OD_{260} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 50 = \text{dsDNA-Gehalt in } \mu\text{g/ml} \quad \text{Gleichung 2}$$

Alle Messungen wurden am Spektrometer Ultrospec 3000 in Mikro-UV-Küvetten durchgeführt.

### 3.1.9 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen wurde eine 20 ml LB-Medium Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden mehrere 200 ml Hauptkulturen mit je 2 ml Vorkultur inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die optische Dichte (OD) wurde stündlich bei einer Wellenlänge von 600 nm kontrolliert. Beim Erreichen einer  $OD_{600} = 0.5 - 0.7$  wurden die Zellen für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend auf 50 ml Zentrifugenbecher aufgeteilt. Die Zellen wurden für 10 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die folgenden Waschschrte wurden alle auf Eis und mit einer vorgekühlten 10%igen Glyzerinlösung durchgeführt. Sie sind nötig, um Ionen zu entfernen, welche bei der Elektroporation zu Kurzschlüssen führen würden. Im ersten Waschschrte wurde das Zellpellet in insgesamt 200 ml Glyzerinlösung resuspendiert und für 7 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet über vier Schrte in abnehmenden Volumina Glyzerinlösung (100 ml, 20 ml, 10 ml, 2 ml) resuspendiert und jeweils erneut zentrifugiert. Die finale 2 ml Zellsuspension wurde in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Bei allen Zentrifugationsschritten wurde der JLA 12.50 Rotor verwendet.

### **3.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente *E. coli* Zellen**

Um Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen einzuschleusen, wurde die Elektroporation angewendet. Bei dieser Methode wird durch einen schnell entladenden Kondensator ein elektrisches Feld erzeugt, wodurch in der behandelten Zellmembran der Bakterien mikroskopisch kleine Löcher entstehen, durch welche die Plasmid-DNA in die Zellen geschleust werden kann. Hierfür wurden 1 bis 2  $\mu$ l Ligationansatz zu 50  $\mu$ l elektrokompetenten *E. coli* Zellen gegeben und anschließend in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgt mittels eines Gene-Pulser II Elektroporationsgerätes bei 1.8 bis 2.5 kV, 25  $\mu$ F und 200  $\Omega$ . Nach erfolgreicher Elektroporation (Zeitkonstante zwischen 4 und 5 ms) wurden die Zellen sofort in 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium überführt und 45 min bei 37 °C geschüttelt. Die Selektion transformierter Klone erfolgte durch Ausplattieren der Zellen auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **3.1.11 Sequenzierung**

Zur Überprüfung von Ligations- oder Mutationsreaktionen und zum Ausschluß von zufälligen Punktmutationen während der PCR wurde die Plasmid-DNA sequenziert. Alle Sequenzierungen wurden von der Firma MWG durchgeführt. Hierfür wurde eine Einzelkolonie gepickt und eine Plasmidpräparation wie in 3.1.2 beschrieben durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde wie in Gleichung 2 beschrieben bestimmt und ein Aliquot von 1  $\mu$ g zur Analyse zu MWG geschickt. Als Primer wurden die T7 Promotor- und Terminatorsequenz verwendet.



## **3.2 Allgemeine proteinchemische Methoden**

### **3.2.1 Diskontinuierliche 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 Detergenz SDS maskiert die Eigenladung von Proteinen und verleiht ihnen eine negative Gesamtladung. Wird eine Spannung angelegt, so entsteht ein elektrisches Feld und die Proteine wandern in Richtung der Anode. Die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine hängt somit nur von ihrer Molekularmasse und nicht von ihrer Nettoladung ab. 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 Raumtemperatur durchgeführt. Zur Auftrennung wurde ein 14%iges SDS-PAGE-Trenngel verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie-Brilliantblau-Lösung im Gel angefärbt.

Die Proteinproben wurden vor der Auftragung mit SDS-Probenpuffer versetzt und, mit Ausnahme des Gesamtzeptors, bei einer Temperatur von 95 °C für 5 min vollständig denaturiert. Bei Proteinproben des Gesamtzeptors wurde auf den Denaturierungsschritt verzichtet, da hohe Temperaturen hydrophobe Interaktionen erhöhen. Dies führt dazu, dass das Protein teilweise oder ausschließlich als Oligomer vorliegt und nicht in das Trenngel einwandert.

### **3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen wurden spektrophotometrisch an einem DU-7400 Diodenarray-Spektrophotometer in Quarzglasküvetten mit 1 cm Schichtdicke durchgeführt. Alle Spektren wurden über einen Wellenlängenbereich von 240 – 340 nm aufgenommen, wobei der entsprechende Puffer als Referenz diente. Die Berechnung der molaren Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung 3):

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

**Gleichung 3**

mit

A: Absorption bei 280 nm

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

c: Proteinkonzentration in M

d: Schichtdicke der Küvette in cm

Die für die jeweiligen Proteine und Peptide benutzten Extinktionskoeffizienten wurden anhand des ProtParam Tools der SwissProt Datenbank basierend auf der Methode von Gill und Hippel aus den Werten für Tryptophan, Tyrosin und Cystin ermittelt (Gill & Hippel, 1989). Die Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Proteine sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7: Molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine bzw. Peptide**

<b>Protein bzw. Peptid</b>	<b><math>\varepsilon_{280}</math> (<math>\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}</math>)</b>
GLP-1-Rezeptor	124570
nGLP-1R	46325
Loop_nGLP-1R	68910
Sumo-GLP-1-ECFP	34505
GLP1-ECFP	33015
Sumo-PTH-ECFP	33015
PTH-ECFP	31525
GLP-1 (7-37)	6970
Exendin 4	5500
PTH	5500
NPY	7450

### 3.2.3 Fällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen aus verdünnten oder Guanidinhydrochlorid-haltigen Lösungen erfolgte durch Trichloressigsäure-Präzipitation. Die Proteinlösung wurde dazu im Verhältnis 1:1 mit einer 20%igen TCA-Lösung (w/v) gemischt, für 45 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 13000 rpm (Biofuge) zentrifugiert. Das Präzipitat wurde anschließend mit dem doppelten Ausgangsvolumen Aceton gewaschen, erneut zentrifugiert und nach dem Verdunsten des restlichen Acetons in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

### 3.2.4 Proteinexpressionsanalyse

Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden 10 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und mit einer Glycerinkultur eines plasmidtransformierten *E. coli*-Expressionsstammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 125 rpm geschüttelt. Aus dieser Übernachtskultur wurden 100 ml frisches LB-Medium so inokuliert, dass eine Start-OD<sub>600</sub> von 0.1 erreicht wurde. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0.6 bis 0.8 inkubiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 1 mM. Zur Überprüfung der Expression wurden vor und 3 Stunden nach der Induktion 1.5 ml des Kulturmediums steril entnommen und zentrifugiert (Biofuge *fresco*, 13000 rpm, RT, 60 min). Das Zellpellet wurde in 100 µl Zellaufschlusspuffer (0.1 M Tris, 7 M Harnstoff, 20 mM SDS, pH 8) resuspendiert und 15 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl SDS-Probenpuffer zugegeben und 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm wurden 10 µl des Überstandes mittels SDS-PAGE analysiert.

### 3.2.5 Immunologischer Proteinnachweis (Western-*blotting*)

Während eines *Western-blottings* werden Proteine aus einem SDS-Acrylamidgel elektrophoretisch auf eine 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 (*blotting*) erfolgte in einer SEMI-PHOR Blotting Apparatur (Hoefer) bei einer Stromstärke von 100 mA für 150 min. Dazu wurde das SDS-Gel auf die Membran und beides zwischen je 3 Lagen mit SDS-PAGE Laufpuffer getränkte Filterpapiere (8 x 9 cm) gelegt. Durch anschließendes Färben der Membran mit 2%iger Ponceau S-Lösung und Markierung des mitgeführten Molekularmassenstandards ist eine spätere Größenordnung der Banden möglich. Die folgende vierstündige Inkubation in TBT-Puffer mit 5 % (*w/v*) Magermilchpulver diente der Absättigung freier Proteinbindungsstellen auf der Membran. Nach Bindung des primären Antikörpers (Anti-Histidin-AK) (1:5000 in TBT-Puffer, 5 % (*w/v*) Magermilch) bei 4 °C über Nacht wurde unspezifisch haftender Antikörper durch intensives Waschen (3 x 10 min) mit TBT-Puffer entfernt. Anschließend wurde die Membran in TBT-Puffer mit 5 % Magermilchpulver und dem sekundären Anti-Maus-IgG Antikörper (1:1000) für 1 h bei 4 °C inkubiert und erneut mit TBT-Puffer gewaschen (3 x 10 min).

Das Anfärben der spezifisch markierten Banden erfolgte mittels frischer ECL-Lösung. Diese aktiviert bei Kontakt mit der Membran die am sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase, die anschließend die Oxidation des in der Lösung enthaltenen Luminols katalysiert und damit eine Chemilumineszenz auslöst. Nach einminütiger Inkubation wurde die Peroxidase-Aktivität durch Auflegen eines Röntgenfilms auf der Membran und anschließende Entwicklung des Films nachgewiesen.

### 3.2.6 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Die Aufkonzentrierung der Proteinlösungen erfolgte mit Amicon Ultra 30 (Gesamtzeptor) bzw. 15 (Domänen) K NMWL (Nominal Molecular Weight Limit) Membran-Konzentratoren (Millipore) mit einem Volumen von 15 ml gemäß der Anleitung des Herstellers bei 4 °C.

### 3.2.7 Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Zur Analyse der Homogenität und zur Präparation von Proteinen für massenspektrometrische Untersuchungen wurde eine *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) an einer Nucleosil 500-5 C3 PPN Säule (Macherey-Nagel) durchgeführt.

In der RP-HPLC erfolgt die Trennung der Komponenten eines Substanzgemisches durch ein Phasensystem, bestehend aus der polaren mobilen Phase und der unpolaren stationären Phase. Die Probenkomponenten stören in Abhängigkeit von ihren hydrophoben Eigenschaften die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Molekülen der mobilen wässrigen Phase unterschiedlich stark. Stark hydrophobe Probemoleküle halten sich somit länger an der stationären Phase auf als Verbindungen mit polaren funktionellen Gruppen. Die Retentionskraft der stationären Phase steigt mit ihrer Hydrophobizität, d.h. mit der Kettenlänge der Alkylgruppen auf ihrer Oberfläche. Die mobile Phase setzte sich aus den Puffern A und B zusammen. Nach dem Auftragen von 50 – 100 µg Protein wurde zunächst für 4 min mit Puffer A gewaschen und anschließend über folgende Gradienten eluiert: 0 - 25 % B (11 min), 25 - 55 % B (60 min), 55 - 100 % B (15 min).

Die *Reversed Phase* Chromatographie wurde an einem Gynkotek HPLC-System (Dionex) durchgeführt.

### 3.2.8 Bestimmung des Disulfidbrückenmusters

Für die Bestimmung des Disulfidbrückenmusters wurden Elutionsproben der RP-HPLC in einem Vakuumkonzentrator getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl 100 mM Tris pH 7.8 mit 10 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert, mit 4 µg Chymotrypsin versetzt und für 16 Stunden bei 37 °C verdaut. Die aus dem Verdau resultierenden Peptide wurden mittels *offline* nano-HPLC / MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie analysiert. Die Trennung der Peptide durch RP-HPLC erfolgte an einem Ultimate 3000 nano-HPLC System (Dionex Corporation, Idstein) über eine PepMap C18 Säule (Vorsäule: 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100'; Trennsäule: 75 µm x 150 mm, 3 µm, 100'; Dionex Corporation, Idstein, Deutschland). Zunächst wurden die Peptide auf der Vorsäule für 15 min mit 0.1 % TFA in bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen, um Salze zu entfernen. Danach erfolgte die Elution unter Verwendung eines Gradienten von 5 - 35 % Puffer B (für 90 min), 35 - 100 % Puffer B (1 min und 100 % Puffer B (5 min), wobei Puffer A aus 5 % Acetonitril (ACN) mit 0.05 % TFA in bidest und Puffer B 80 % ACN mit 0.04 % TFA in bidest. H<sub>2</sub>O bestand. Das Eluat wurde direkt auf einen MALDI-Probenhalter (384

MTP 800  $\mu\text{m}$  *Anchor Chip* MALDI target, Bruker Daltonik, Bremen) unter Verwendung eines LC / MALDI Fraktionssammlers (Proteiner FC, Bruker Daltonik, Bremen) fraktioniert und dort mit  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (CHCA) als Matrix co-kristallisiert. Die Massenspektren wurden automatisch an einem Ultraflex III MALDI-TOF/TOF Gerät (Bruker Daltonik, Bremen) im positiven Ionisations- und Reflektormodus aufgezeichnet. Pro Fraktion wurden 2000 Laserschüsse abgegeben und die entsprechenden Einzelspektren zu einem Gesamtspektrum im Bereich  $m/z$  800-5000 aufaddiert. Detektierte Peptidsignale mit einem Signal-Rausch-Verhältnis größer als 10 wurden anschließend automatisch einer Fragmentierung mittels MALDI-LIFT-TOF/TOF-MS/MS unterzogen, um Fragmentmassenspektren der entsprechenden Peptide zu erhalten. Zur Aufnahme und Auswertung der Daten wurden die Programme Flex Control 3.0.101.1 und Flex Analysis 3.0.54 verwendet (Bruker Daltonik, Bremen).

Kandidaten für mutmaßlich disulfidverbrückte Peptide wurden zunächst basierend auf ihrer experimentellen Masse (maximale Toleranz 30 ppm) unter Verwendung der Programme GPMAW (General Protein Mass Analysis for Windows) und BioTools 3.1.1.36 (Bruker, Daltonik, Bremen) identifiziert. Zur endgültigen Bestätigung der Disulfidbrücken wurden anschließend MS/MS Daten herangezogen. Da disulfidverbrückte Peptide gewöhnlich informationsarme Fragmentationenspektren liefern, wurde zusätzlich das Phänomen der *in-source reduction* der Disulfide während des MALDI-Prozesses ausgenutzt. Die MS/MS-Daten der so erzeugten einzelnen Peptides mit reduzierten Cysteinen konnten für die eindeutige Bestätigung der Disulfide genutzt werden (Patterson *et al.*, 1994; Kalkhof *et al.*, 2008).

### 3.3 Expression, Reinigung und Rückfaltung des Gesamtrezeptors und der Domänen

#### 3.3.1 *Fed-batch* Fermentation

Die Fermentation wurde in einem *Biostat* ED-Fermenter (Braun, Melsungen) mit 10 l Arbeitsvolumen und einem digitalen Mess- und Regelsystem durchgeführt. Es wurden 5 l einer Hefeextraktlösung (Deutsche Hefewerke, 60 g/l) mit 3 g Ammoniumchlorid und 1 ml Antischaummittel im Bioreaktor 20 min bei 121 °C autoklaviert. Als Antischaummittel wurde eine 50%ige Polypropylenglykollösung (PLURIOL® P2000, BASF, Ludwigshafen) verwendet. Anschließend wurde das Medium unter sterilen Bedingungen mit 5 g/l Glukose, 0,5 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 11 g/l Kaliumphosphat und 35 mg/l Kanamycin versetzt und mit bidest. Wasser zu einem Endvolumen von 6 l aufgefüllt. Wenn nötig, wurde der pH-Wert auf pH 7.0 eingestellt. Die Regulierung des pH-Wertes erfolgte mit einer 10%igen Natriumhydroxid- bzw. 10%igen Phosphorsäurelösung.

Die Vorkultur von 200 ml LB-Medium mit Kanamycin wurde mit mehreren Kolonien angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Kultur zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 10 min, JA-10/Beckman) und das Zellpellet in sterilem Leitungswasser aufgenommen. Diese Kultur diente als Inokulum. Die Kultivierung wurde zunächst bei 37 °C durchgeführt.

Die Zugabe der *feeding*-Lösung (300 g/l Hefeextrakt, 125 g/l Glukose) erfolgte nach vollständigem Verbrauch der Glukose im Hefeextraktmedium (5 ml/min). Bei Erreichen einer  $\text{OD}_{600} \sim 50 - 60$  wurde die Temperatur schrittweise auf 42 °C angehoben. Im Anschluss daran erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG für vier Stunden. Anschließend wurden die *E. coli*-Zellen 20 min bei 4000 g zentrifugiert und bei -80 °C gelagert.

Die Expression der Kontrollproteine nGLP1R und Loop\_nGLP1R erfolgte im Gegensatz zum Gesamtrezeptor bei 37 °C.

### 3.3.2a Zellaufschluss und Isolierung der *inclusion bodies* des Gesamtrezeptors

Für den Zellaufschluss wurden ca. 250-300 g Zellen in 1500 ml Resuspendierungspuffer homogenisiert (Ultraturrax) und mit 1.5 mg Lysozym pro Gramm Zellen versetzt. Nach Inkubation für 60 min bei 4 °C erfolgte der Zellaufschluß mittels Hochdruckdispersion in einem „Großen“ Gaulin-Homogenisator bei einem Maximaldruck von 600 bar in 3 Passagen. Nach dem Zellaufschluß wurde die Suspension mit einer 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung versetzt, so dass eine Endkonzentration von 3 mM erreicht wurde. Der Verdau der DNA erfolgte durch Zugabe von 10 µg/ml Desoxyribonuklease und Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur. Durch Zentrifugation (35000×g, 60 min, 4 °C) konnten die unlöslichen *inclusion bodies* von Zellwandbestandteilen und löslichen Proteinen getrennt werden. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet in 1500 ml Waschpuffer 1 mit Hilfe des Ultraturrax resuspendiert, 30 min inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit Waschpuffer 2 und abschließend mit Resuspendierungspuffer wurden die *inclusion bodies* sofort solubilisiert oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Für die Solubilisierung wurden 1.5 g *inclusion bodies* in 150 ml Solubilisierungspuffer über Nacht bei Raumtemperatur unter stetigem Rühren gelöst. Vor der sich anschließenden Reinigung mittels IMAC wurden die solubilisierten *inclusion bodies* zwei Tage gegen 50 mM Natriumphosphat, pH 4.5, 10 mM SDS dialysiert.



### **3.3.2b Zellaufschluss und Isolierung der *inclusion bodies* der Domänen (nGLP-1R, Loop\_nGLP1R)**

Für den Zellaufschluss wurden 80 g Zellen in 400 ml Resuspendierungspuffer homogenisiert (Ultraturrax) und mit 1.5 mg Lysozym pro Gramm Zellen versetzt. Nach Inkubation für 30 min bei 4 °C (unter Rühren) erfolgte der Zellaufschluss mittels Hochdruckdispersion in einem „Kleinen“ Gaulin-Homogenisator bei einem Maximaldruck von 900 bar in 3 Passagen. Nach dem Zellaufschluss wurde die Suspension mit einer 1 M MgCl<sub>2</sub> –Lösung versetzt, so dass eine Endkonzentration von 3 mM erreicht wurde. Der Verdau der DNA erfolgte durch Zugabe von 10 µg/ml Desoxyribonuklease und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur (unter Rühren). Nach dem DNase-Verdau wurde das Zelllysate mit 0.5 Volumen Tritonpuffer versetzt und 30 min bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Durch Zentrifugation (35000 × g, 30 min, 4 °C) konnten die unlöslichen *inclusion bodies* von Zellwandbestandteilen und löslichen Proteinen getrennt werden. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet in 600 ml Waschpuffer 1 mit Hilfe des Ultraturrax resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit dem Waschpuffer 2 wurden die *inclusion bodies* sofort solubilisiert oder bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C aufbewahrt.

Die Solubilisierung und alle weiteren Reinigungsschritte erfolgten analog zum Gesamtzeptor.

### **3.3.3 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)**

Die Reinigung des GLP-1R bzw. der Domänen erfolgte im denaturierten Zustand mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Säulenmaterial an einem Äkta-System. Um die Bindung an Ni<sup>2+</sup>-NTA –Agarose (HisPrep™ FF 16/10, Säulenvolumen 20 ml) im denaturierten Zustand zu ermöglichen, wurde der pH –Wert des *inclusion bodies*-Solubisates mit 5 N NaOH auf 8.0 eingestellt. Das mit 3 Säulenvolumina (SV) Waschpuffer äquilibrierte Säulenmaterial wurde an der Höchstgrenze der Bindungskapazität mit dem Protein beladen (Flussrate: 0.5 ml/min). Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde das Säulenmaterial mit 5 SV Waschpuffer gewaschen (Flussrate: 2 ml/min). Die Elution erfolgte durch Senkung des pH-Wertes auf 4.5. Bei diesem pH-Wert ist der Imidazolring des Histidins protoniert und kann keinen Komplex mehr mit den Nickelionen bilden, so dass die gebundenen Proteine vom Säulenmaterial dissoziieren. Das eluierte Protein wurde entweder unmittelbar für die Rückfaltung eingesetzt oder bei –20 °C gelagert.

### 3.3.4 Rückfaltung der GLP-1R Konstrukte

Zur präparativen Renaturierung des Rezeptors und seiner Domänen erfolgte eine Pulsrenaturierung (Rudolph *et al.*, 1997). Sie beruht auf dem Prinzip der sukzessiven Zugabe von *inclusion bodies*-Solubilisat in einen Renaturierungspuffer. Durch die schnelle Verdünnung wird die lokale hohe Konzentration von un- oder missgefalteten Spezies vermieden. Erst nach Ablauf einer gewissen Zeit wird eine neue Portion denaturiertes Protein hinzugegeben (Puls). Dabei wird das denaturierende Agens SDS durch die Anwesenheit von beta-Cyclodextrin aus der Lösung und vom Protein entfernt (Artificial Chaperon System, Gellman *et al.*, 1998). Gleichzeitig sind mildere Detergenzien im Puffer vorhanden, die eine Renaturierung und Lösungsvermittlung des Proteins gewährleisten. Die Ausbildung der nativen Disulfidverbrückung wird durch ein Redoxshuffling-System aus renaturiertem und oxidiertem Glutathion gefördert.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Renaturierungen erfolgten in einem Volumen von 50 bis 150 ml. Hierbei wurde im Abstand von mindestens sechs Stunden tropfenweise IMAC Eluat ( $c = 0.5$  mg/ml Protein) bis zu einer Endkonzentration von je  $35 \mu\text{g/ml}$  zum Rückfaltungspuffer dazu gegeben. Sechs Stunden nach dem letzten Puls wurde der Rückfaltungsansatz auf  $4^\circ\text{C}$  abgekühlt und anschließend zentrifugiert (JLA 16.250, 16000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 60 min). Zur Vorbereitung der Aufkonzentrierung wurde der Ansatz über Nacht gegen ausreichend Dialysepuffer A dialysiert.

### 3.4 Reinigung und Spaltung der fluoreszenzmarkierten Peptide

Die Expression der Konstrukte erfolgte mittels *Fed-batch* Fermentation durch Herrn Nils Drechsler und dieser stellte freundlicherweise einige Gramm Zellmaterial zur Verfügung.

Für die Isolierung der Peptide wurden zunächst je 4 g Zellen in Sumo-Äquilibriumspuffer resuspendiert und anschließend nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym für 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte der Zellaufschluss mittels Hochdruckdispersion in einem Gaulin-Homogenisator mit einem Maximaldruck von 1000 bar in drei Passagen. Nach dem Zellaufschluß wurde die Suspension mit einer 1 M  $\text{MgCl}_2$ -Lösung versetzt, so dass eine Endkonzentration von 3 mM erreicht wurde. Der Verdau der DNA erfolgte durch Zugabe einer Spatelspitze Desoxyribonuklease und Inkubation für 20 min auf Eis. Durch die sich daran anschließende Zentrifugation ( $10000\times g$ , 30 min,  $4^\circ\text{C}$ ) konnten unlösliche Zellbestandteile von löslichen Proteinen getrennt werden.

Für eine erste Reinigung mittels IMAC wurde der Überstand der Zentrifugation mit dreimal Sumo-Äquilibrationpuffer äquilibriertem NiNTA-Material für 1 h bei 4 °C inkubiert. Dieses Ni<sup>2+</sup>-NTA-Material-Proteingemisch wurde anschließend in eine Leersäule überführt und mit 3 SV Sumo-Waschpuffer gewaschen. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte durch Zugabe von Sumo-Elutionspuffer. Die Hauptfraktionen der Elution wurden vereinigt und gegen 3 Liter Sumo-Dialysepuffer über Nacht dialysiert. Die Abspaltung des Sumopeptides vom Fusionsprotein erfolgte durch Spaltung mit Sumo-Protease (aus eigener Herstellung – freundlicherweise von Frau DR. BOSSE-DOENECKE zur Verfügung gestellt).

Hierfür wurde das dialysierte IMAC-Eluat mit Sumo-Protease-Puffer und Sumo-Protease versetzt und für drei Stunden auf Eis inkubiert. Um das abgespaltene Sumopeptid und die Sumo-Protease (beide mit His-tag) zu entfernen, wurde der Spaltungsansatz zunächst über Nacht gegen 3 Liter Sumo-Dialysepuffer dialysiert und anschließend kontinuierlich auf 4 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Material aufgetragen, wobei der Durchlauf die gewünschten fluoreszenzmarkierten Peptide enthielt. Sumopeptid und Sumo-Protease wurden zur Kontrolle mit Sumo-Elutionspuffer vom Säulenmaterial gewaschen.

## 3.5 Biophysikalische Charakterisierung

### 3.5.1 Circular dichroismus

Chirale Moleküle wechselwirken abhängig von der Wellenlänge und der Polarisationsrichtung des eingestrahlt Lichts charakteristisch mit zirkular polarisiertem Licht. Auf diese Weise treten Absorptionsunterschiede zwischen links und rechts zirkular polarisiertem Licht auf. Zirkular polarisiertes Licht wird aus linear polarisiertem Licht erzeugt, indem linear polarisiertes Licht auf ein  $\frac{1}{4}\lambda$  Plättchen gelenkt wird. Dies führt zu einer Depolarisierung des linear polarisierten Lichts im Winkel von 90° und einer Phasenverschiebung um  $\lambda/4$ , so dass die Summe beider Vektoren (linear polarisiertes Licht und orthogonal polarisiertes Licht mit einer Phasenverschiebung um  $\lambda/4$ ) zirkular polarisiertes Licht ergibt. Im CD-Spektrometer wird die Probenküvette mit zirkular polarisiertem Licht durchstrahlt, das mit einer Frequenz im kHz-Bereich die Polarisationsrichtung von rechts und links zirkular polarisiertem Licht ändert, wobei die Absorption der Probe mit einem Photomultiplier gemessen wird. Die Messung und Berechnung des Absorptionsunterschieds zwischen links und rechts zirkular

polarisiertem Licht erfordert eine äußerst genaue Optik und Auswertelektronik, da die gemessene Grundabsorption bereits sehr hoch und der Absorptionsunterschied sehr klein ist. Bei der CD-Spektroskopie von Proteinen lassen sich verschiedene Sekundärstrukturelemente durch charakteristische Spektren unterscheiden. Im Fern-UV-Bereich absorbieren die Elektronen der Amidgruppen des Proteins. In diesem Wellenlängenbereich können Unterschiede im Proteinerückgrat und somit in den Sekundärstrukturelementen detektiert werden.

Fern-UV-CD-Spektren wurden an einem Spektropolarimeter J-810 (Jasco®) in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 0.1 cm aufgenommen. Die Spektren wurden 50fach bei einer Integrationszeit von 1 s und 2 nm Bandbreite akkumuliert und gemittelt. Alle Spektren wurden bei 20 °C aufgenommen. Die gemessene Elliptizität  $\Theta$  wurde anhand Gleichung 4 in die mittlere residuale Elliptizität  $[\Theta]_{\text{MRW}}$  (*mean residue weight*) umgerechnet.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{[\Theta] \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A} \qquad \text{Gleichung 4}$$

mit

$[\Theta]$ : gemessene Elliptizität in Grad

$[\Theta]_{\text{MRW}}$ : mittlere residuale Elliptizität

$M_r$ : Molekularmasse in Dalton

$c$ : Proteinkonzentration in mg/ml

$d$ : Schichtdicke der Küvette in cm

$N_A$ : Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül

### 3.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Bei der Fluoreszenzspektroskopie wird das von einer Probe absorbierte Licht teilweise als Licht niedrigerer Energie wieder abgestrahlt. Fluoreszenz tritt auf, wenn durch das eingestrahlte Licht Elektronen in einen höheren Zustand angeregt werden, die nicht durch strahlungslose Übergänge, sondern unter Lichtemission in den Grundzustand zurückkehren.

Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluoromax3-Spektrofluorimeter mit 5 nm Spaltbreiten des Anregungs- und Emissionsstrahls durchgeführt. Die Emissionsspektren wurden nach Anregung der Fluorophore bei 295 nm mit einer Zeitkonstante von 0.3 s aufgenommen.

Proteinkonzentrationen und Pufferbedingungen sind in den jeweiligen Experimenten beschrieben. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert.

### 3.5.3 Fluoreszenztitration

Um die native Struktur und Funktionalität des rekombinant hergestellten GLP-1-Rezeptors nachweisen zu können, erfolgte eine Bindungsmessung des Liganden Exendin 4 an den Rezeptor mittels Fluoreszenztitration.

Die Fluoreszenz des an der Interaktion von zwei Molekülen beteiligten Tryptophans kann durch Wechselwirkung mit einem Bindungspartner messbar verringert werden. Dieses Fluoreszenz-*quenching* ist abhängig von der Konzentration des Bindungspartners und der Dissoziationskonstante des Komplexes.

Die Messungen erfolgten in einer rührbaren Fluoreszenzküvette am FluoroMax-3 bei 20 °C. Das Peptid Exendin 4 wurde in 50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 150 mM NaCl gelöst und eine Konzentration von 100 - 150 µM eingestellt. Die Zugabe des Peptides zur Rezeptorlösung erfolgte schrittweise und unter stetem Rühren. Nach Zugabe wurde das Rezeptor-Peptid Gemisch für 2 min inkubiert und anschließend wurden drei Spektren aufgezeichnet. Aus der erhaltenen Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Konzentration des titrierten Exendin 4 konnte die Dissoziationskonstante wie folgt bestimmt werden.

Die beobachtete Meßgröße ist die Abnahme der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des GLP1-R (R) durch *quenching* nach Bindung des Liganden (L). Die Abnahme des Fluoreszenzsignals ( $\Delta F$ ) ist dem Bindungsgrad relativ zur eingesetzten Rezeptorkonzentration direkt proportional ( $[R-L]/[R_0]$ ). Dabei beschreibt  $\Delta F_{\max}$  eine Proportionalitätskonstante, die man bei vollständiger Besetzung des GLP1-R mit Ligand erhält (Bindungsgrad von 1).

$$\Delta F = \Delta F_{\max} \cdot \frac{[R-L]}{[R_0]} \quad \text{Gleichung 5}$$

$\Delta F$	partielle Fluoreszenzänderung bei sequentieller Titration
$\Delta F_{\max}$	maximale Fluoreszenzänderung bei vollständiger Sättigung des Rezeptors mit Ligand
$[R-L]$	Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes
$[R_0]$	eingesetzte Gesamtkonzentration des Rezeptors

Die gemessene Gesamtfluoreszenz  $F$  setzt sich aus der Grundfluoreszenz  $F_0$  des Rezeptors, der Fluoreszenzabnahme  $\Delta F$  durch *quenching* nach Bindung des Liganden und der intrinsischen Fluoreszenz  $F_{\text{Lig}}$  des Liganden L zusammen, wobei letztere Größe durch Variation der Ligandenkonzentration in Experimenten mit dem isolierten Liganden (in Abwesenheit des Rezeptors) ermittelt wurde.

$$F = F_0 - \Delta F_{\text{max}} \cdot \frac{[\text{R-L}]}{[\text{R}_0]} + (F_{\text{Lig}} \cdot [\text{L}]) \quad \text{Gleichung 6}$$

Die Bindung des Liganden L an den Rezeptor R lässt sich in einem Minimalmodell durch eine reversible Gleichgewichtsreaktion und unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie wie folgt beschreiben:



Nach dem Gesetz der Massenerhaltung gilt:

$$[\text{R}_0] = [\text{R}] + [\text{R-L}] \quad \text{Gleichung 8}$$

$$[\text{L}_0] = [\text{L}] + [\text{R-L}] \quad \text{Gleichung 9}$$

$[\text{R}_0]$	eingesetzte Gesamtkonzentration des Rezeptors
$[\text{R}]$	Konzentration von freiem Rezeptor
$[\text{R-L}]$	Konzentration des Rezeptor-Ligand Komplexes
$[\text{L}_0]$	Gesamtkonzentration des Liganden
$[\text{L}]$	Konzentration des freien Liganden

Die Gleichgewichtskonstante der Bindungsreaktion ergibt sich zu:

$$K_D = \frac{[\text{R}] \cdot [\text{L}]}{[\text{R-L}]} \quad \text{Gleichung 10}$$

Die Kombination der Gleichungen 8-10 ergibt:

$$K_D = \frac{([\text{R}_0] - [\text{R-L}]) \cdot ([\text{L}_0] - [\text{R-L}])}{[\text{R-L}]} \quad \text{Gleichung 11}$$

Durch Auflösen der Gleichung 11 nach R-L und Lösen der resultierenden quadratischen Gleichung ergibt sich:

$$[R - L] = \frac{([L_0] + [R_0] + K_D)}{2} \pm \sqrt{\frac{([L_0] + [R_0] + K_D)^2}{4} - [L_0] \cdot [R_0]}$$

**Gleichung 12 bzw.**

$$[R - L] = \frac{([L_0] + [R_0] + K_D)}{2} \pm \frac{1}{2} \cdot \sqrt{([L_0] + [R_0] + K_D)^2 - 4 \cdot [L_0] \cdot [R_0]}$$

**Gleichung 13**

wobei jeweils nur die Lösung mit negativem Vorzeichen vor der Wurzelfunktion physikalisch sinnvoll ist.

Die Substitution von Gleichung 13 in Gleichung 6 ergibt:

$$F = F_0 - \frac{\Delta F_{\max}}{2 \cdot [R_0]} \cdot \left[ ([L_0] + [R_0] + K_D) - \sqrt{([L_0] + [R_0] + K_D)^2 - 4 \cdot [L_0] \cdot [R_0]} \right] + (F_{\text{Lig}} \cdot [L_0])$$

**Gleichung 14**

Durch Titration von verschiedenen Konzentrationen an Ligand zu einer definierten Konzentration von eingesetztem Rezeptor konnte die Änderung des Gesamtfluoreszenzsignals  $F$ , bedingt durch *a) quenching* der intrinsischen Rezeptorfluoreszenz nach Ligandenbindung und *b) der konzentrationsabhängigen Zunahme* der intrinsischen Ligandenfluoreszenz nach Gleichung 14 ausgewertet werden, um die apparente Gleichgewichtskonstante  $K_D$  des Rezeptor-Ligand-Komplexes zu bestimmen.

### 3.5.4 Oberflächenplasmonresonanz (Biacore)

Bei der Oberflächenplasmonresonanz wird ein Molekül (Ligand) an einer goldgebundenen Dextran-Oberfläche immobilisiert (kovalente Bindung an Aminfunktion oder über Disulfidbrücken, Biotin/Streptavidin). Das wechselwirkende Molekül (Analyt) wird in einer Flusskammer darüber gespült. Eine Anreicherung des Analyten (durch Wechselwirkung mit dem Liganden) an der Oberfläche wird in Echtzeit ohne Markierung gemessen. Hierbei wird die Veränderung des Brechungsindex in der oberflächennahen Schicht (einige 100 nm über der Gold-beschichteten Oberfläche) detektiert.

Die Bindungsmessungen von GLP-1R, nGLP1R und Loop\_nGLP-1R mit verschiedenen Peptiden wurde an einem Biacore T100 durchgeführt. Die Kopplung der cysteinylierten

Peptide (freundlicherweise von der Firma Novo-Nordisk zur Verfügung gestellt) erfolgte mittels einer Thiolkopplung nach Angaben des Herstellers an einen CM5-Chip. Da der Sensorchip T100 über vier Flusszellen verfügt, konnten alle drei relevanten Peptide (GLP-1, Exendin 4 und PTH) an den gleichen Chip gekoppelt werden. Flußzelle eins diente als Referenzflusszelle und wurde anstelle eines Peptides mit Cystein kovalent modifiziert. Die Bindungsmessungen wurden bei 20 °C und einer Flußrate von 30 µl/min durchgeführt. Als Laufpuffer diente Puffer B. Die Analyt-Proteinlösung wurde zuvor ausreichend gegen den Laufpuffer dialysiert. Für die Messung wurden je 50 µl Proteinlösung injiziert und nach Ende der Injektion wurde die Dissoziation über 1000 Sekunden aufgezeichnet. Zur vollständigen Entfernung des Analyten vom Liganden wurde der Sensorchip nach einem Bindungsexperiment mit jeweils 50 µl 6 M Harnstoff-Lösung gewaschen. Die Aktivität des gekoppelten Liganden wurde dadurch nicht beeinträchtigt. Die Auswertung der Bindungsdaten im Gleichgewicht erfolgte mit Hilfe des Programms BIAevaluation T100 (Biacore, Freiburg).

Kompetitionsexperimente wurden durch Vorinkubation des GLP-1R mit verschiedenen Konzentrationen von Exendin 4 und daran anschließenden Messungen der Bindung an immobilisiertes Exendin 4 bzw. GLP-1 durchgeführt. Die Datenanalyse der Kompetitionsexperimente erfolgte über nichtlineare Regression.

In Analogie zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten durch Fluoreszenztitration (siehe 3.5.3) ist die Abnahme des Biacore Resonanzsignals  $S_{GGW}$  unter Gleichgewichtsbedingungen vom Bindungsgrad des mit Ligand vorinkubierten Rezeptors relativ zur eingesetzten Rezeptorkonzentration ( $[R-L]/[R_0]$ ) abhängig.

$$S_{GGW} = S_{GGW}^0 - \Delta S_{max} \cdot \left( \frac{[R-L]}{[R_0]} \right) \quad \text{Gleichung 15}$$

$S_{GGW}$	Resonanzsignal des Rezeptor-Ligand Komplexes nach Injektion unter Gleichgewichtsbedingungen
$S_{GGW}^0$	Resonanzsignal des Rezeptor-Ligand Komplexes nach Injektion unter Gleichgewichtsbedingungen ohne Präinkubation des Rezeptors mit Kompetitor (Ligand)
$\Delta S_{max}$	maximale Änderung des Resonanzsignals bei vollständiger Sättigung des Rezeptors mit Ligand



Die Substitution von Gleichung 13 (Herleitung siehe 3.5.3) in Gleichung 15 ergibt:

$$S_{\text{GGW}} = S_{\text{GGW}}^0 - \frac{\Delta S_{\text{max}}}{2 \cdot [\text{R}_0]} \cdot \left[ ([\text{L}_0] + [\text{R}_0] + K_D) - \sqrt{([\text{L}_0] + [\text{R}_0] + K_D)^2 - 4 \cdot [\text{L}_0] \cdot [\text{R}_0]} \right]$$

**Gleichung 16**

Die Abnahme des Resonanzsignals in Abhängigkeit der Konzentration von präinkubiertem Liganden  $[\text{L}_0]$  bei einer konstanten Rezeptorkonzentration  $[\text{R}_0]$  wurde zur Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  des Rezeptor-Ligand-Komplexes mit Hilfe von Gleichung 16 verwendet.

### 3.5.5 Analytische Gelfiltration

Bei der Gelfiltration oder Größenaustauschchromatographie können Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dies ist möglich, da die Säulenmatrix aus siebartigen Partikeln mit definiertem Poren-Durchmesser besteht und somit größere Moleküle nicht in die Partikel eindringen können. Dies hat eine kürzere Verweildauer auf der Säule zur Folge. Kleinere Moleküle diffundieren in die Poren hinein und verweilen dadurch länger.

Die analytische Gelfiltration wurde angewandt, um die Bindung von fluoreszenzmarkierten Peptiden an den GLP-1-Rezeptor nachzuweisen. Hierfür wurde eine Superdex 200 10/300 GL Säule von GE Healthcare verwendet. Die Flussrate betrug 0.5 ml/min, das Injektionsvolumen 100  $\mu\text{l}$ . Zunächst wurden alle relevanten Komponenten einzeln auf die Säule aufgetragen (GLP-1R, GLP-1-ECFP, PTH-ECFP). Anschließend wurden äquimolare Mengen von Rezeptor und Ligand 30 min vorinkubiert und im Komplex aufgetragen. Die Konzentrationen der Proteine und Peptide sind in der entsprechenden Abbildungslegende angegeben.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Rekombinante Herstellung des GLP-1-Gesamtrezeptors

#### 4.1.1 Klonierung der synthetischen DNA in die Vektoren pET 28a und pET 41b

Da Konstrukte mit der humanen cDNA des GLP-1R keine nachweisbare Expression in *E. coli* aufwiesen (Schröder 2004), wurde diese hinsichtlich der für *E. coli* typischen *codon usage* analysiert (*E. coli codon usage Analysis 2.0* by Morris Maduro). Dabei zeigte sich, dass für 17 % der Triplets weniger als 10 % tRNAs (im Vergleich zu 100 % im eukaryotischen System) für die Translation zur Verfügung stehen. Besonders betroffen sind dabei die Triplets, welche für die Aminosäuren Prolin, Leucin, Arginin, Tyrosin und Glyzin kodieren. Durch das Fehlen von ausreichenden Mengen an tRNA kann es zu einer Verlangsamung oder sogar dem Abbruch der Translation kommen.

Aus diesem Grund wurde die DNA-Sequenz auf die *codon usage* von *E. coli* optimiert. Die Synthese einer entsprechenden cDNA erfolgte bei der Firma Geneart. An das 5'- bzw. 3'-Ende wurden die Sequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* synthetisiert. Dies ermöglichte eine direkte Klonierung in den Vektor pET 28a. Eine Karte des von der Firma bereitgestellten Klonierungsvektors mit eingefügtem Gen für den GLP-1R (042086pPCR-Script) befindet sich im Anhang.

Zunächst wurden die Vektoren pET28a und 042086pPCR-Script im präparativen Maßstab mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* verdaut. Um eine Religation des Zielvektors (pET28a) zu verhindern, wurde dieser dephosphoryliert. Anschließend wurden die DNA-Lösungen auf ein 1%iges präparatives Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Banden aus dem Gel gereinigt. Nach der Ligation erfolgte die Transformation in elektrokompente Zellen von *E. coli* Top 10. Von vier Kolonien wurden Plasmidpräparationen durchgeführt und anschließend die DNA im analytischen Maßstab mit *NdeI* und *HindIII* verdaut. Alle vier Klone enthielten ein DNA-Fragment von ca. 1400 bp, welches mittels Sequenzierung als GLP-1R-Gen identifiziert wurde (siehe 3.1.3 bis 3.1.11).

Die Expression dieses in den Vektor pET28a klonierten Gens resultiert in der Synthese des Rezeptors mit sechsfacher N-terminaler Histidinfusion (Proteinsequenz siehe Anhang). Dies ermöglichte die Reinigung des Proteins mit Hilfe einer Immobilisierten Metallchelate Affinitäts-Chromatographie (IMAC). Die Aminosäuresequenz, welche durch die Klonierung

des Gens in den Vektor und die Expression des *tags* entsteht, sollte im Anschluss mit Hilfe einer Thrombinspaltung entfernt werden. Das daraus resultierende Protein enthält nur drei zusätzliche N-terminale Aminosäuren (Glyzin-Serin-Histidin).

Parallel wurde die synthetische DNA in den Vektor pET 41b kloniert. Die Expression dieses Konstruktes hat ein Protein mit achtfacher C-terminaler Histidinfusion zur Folge. Diese Strategie wurde verfolgt, da so während der Reinigung mittels IMAC auf Rezeptormoleküle mit vollständiger Sequenz selektiert wird. Die zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren (Leucin-Glutamat-8xHistidin) bleiben im Konstrukt erhalten, da diese Variante keine Thrombinschnittstelle enthält.

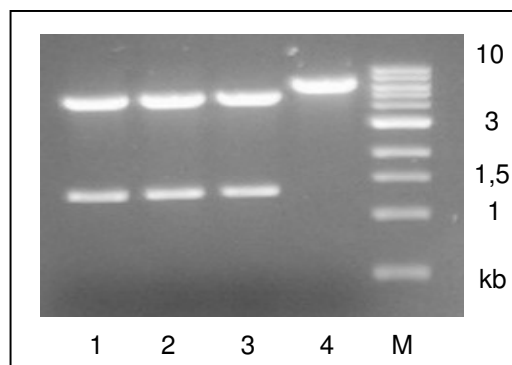
Zunächst wurde im analytischen Maßstab eine PCR-Reaktion wie in 3.1.1 beschrieben durchgeführt (5 x 10 µl). Das verwendete PCR-Programm (Tab. 8) weicht vom üblichen Standardprogramm ab. Während der ersten Teilreaktion wurde die *annealing*-Temperatur pro Zyklus um 0.5 °C erhöht, um auf die DNA-Produkte zu selektieren, die auch die ursprünglich überhängenden Sequenzen für die Restriktionsendonuklease-Schnittstellen enthielten. Außerdem wurde die Amplifizierung über einen Temperaturgradienten von 10 °C (57 °C bis 67 °C) getestet.

**Tabelle 8: PCR-Programm zur Amplifizierung der synthetischen GLP-1R-DNA für die Klonierung in den Vektor pET41b**

1. Teilreaktion	Zeit (s)	Temperatur (°C)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	300	95	1
Denaturierung	60	95	
<i>annealing</i>	60	57.1 / 59.2 / 61.8 / 64.5 / 67.2 ( $\Delta T = 0.5 \text{ °C pro Zyklus}$ )	9
<i>extension</i>	120	72	
2. Teilreaktion			
Denaturierung	60	95	
<i>annealing / extension</i>	240	72	20
Auffüllreaktion	420	72	1
Abkühlung	$\infty$	4	

Bei der *annealing*-Temperatur von 61.8 °C wurde die größte Menge Produkt gebildet (Daten nicht gezeigt). Daher wurde eine präparative PCR (2 x 50 µl) bei dieser Temperatur durchgeführt. Die dabei synthetisierte Rezeptor-DNA konnte durch die Verwendung eines 1 %igen Agarosegels von der *template*-DNA bzw. den Primern abgetrennt werden. Nach der

Isolierung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte der Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* und anschließend eine Reinigung mittels PCR-*Purification*-Kit. Nach der Ligationsreaktion wurde die DNA mittels Transformation in elektrokompente Zelle *E. coli* Top 10 überführt. Von vier Kolonien wurden Plasmidpräparationen durchgeführt, anschließend wurde die DNA im analytischen Maßstab mit *NdeI* und *XhoI* verdaut. Drei der vier Klone enthielten ein DNA-Fragment einer Größe von ~ 1400 bp (siehe Abb. 11). Die Sequenzierung der Klone ergab, dass die Klone 1 und 2 die korrekte Basenfolge enthielten, während Klon 3 einen Basenaustausch aufwies. Für die folgenden Experimente wurde Klon 1 verwendet.



**Abbildung 11: Agarosegel des analytischen Verdau der Klone 1 – 4 des GLP-1R-pET41b Konstruktes.** Spuren 1-3: Klone 1-3 positiv (da Fragment ~1400bp erkennbar), Spur 4: Klon 4 negativ (linearisierter Vektor), Spur M: DNA-Standard.

#### 4.1.2 Expression, Reinigung und Rückfaltung des GLP-1-Gesamtrezeptors

Zunächst sollte die Expression der beiden GLP-1R-Konstrukte im kleinen Maßstab (100 ml) getestet werden. Dazu wurden wie unter 2.2.4 beschrieben Expressionstests durchgeführt. Obwohl die DNA-Sequenz hinsichtlich ihrer *codon usage* auf die Expression in *E. coli* optimiert vorlag, wurde bei den Bakterienstämmen mit zusätzlichen tRNA-Synthetasen (BL21 (DE3)<sup>c+</sup> RIL und Rosetta) das jeweilige zur Selektion nötige Antibiotikum zugegeben. Die Analyse der Bildung des Expressionsproduktes erfolgte neben der SDS-PAGE mit Hilfe des immunologischen Proteinnachweises (siehe 3.2.5). Beim *Western-blotting* wurden zwei unterschiedliche primäre Antikörper verwendet. Hierbei handelte es sich einmal um einen Antikörper gegen die N-terminale Histidinfusion (Anti-Hexa-His), zum anderen um einen gegen Epitope innerhalb der N-terminalen Domäne des GLP-1-Rezeptors (Anti-nGLP-1R). Letzterer wurde durch Injektion von nGLP-1R in Hühner und Reinigung der gebildeten Antikörper aus deren Eiern gewonnen (Durchführung Firma Dabio).

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9: Zusammenfassung der Expressionsanalysen der GLP-1R-Konstrukte in verschiedenen *E. coli*-Stämmen**

Expressionsstamm	GLP-1R-Konstrukt	Antibiotika	Expression anhand von SDS-Gel	Expression anhand von Western-blotting
BL21 <sup>star</sup> (DE3)	pET28a	Kanamycin	Nein	nein
BL21 (DE3)	pET28a / 41b	Kanamycin	Nein	nein
BL21 (DE3) c <sup>+</sup> RIL	pET28a / 41b	Kanamycin / Chloramphenicol	Nein	nein
C41 (DE3)	pET28a / 41b	Kanamycin	Nein	nein
C43 (DE3)	pET28a / 41b	Kanamycin	Nein	nein
Rosetta	pET28a / 41b	Kanamycin / Chloramphenicol	Nein	nein
MC 4100	pET28a / 41b	Kanamycin	Nein	nein

Wie dort zu erkennen ist, konnte mit keiner getesteten Kombination von GLP-1R-Konstrukt und *E. coli*-Stamm eine sichtbare Expression nachgewiesen werden. Grundsätzlich wurde beobachtet, dass nach der Induktion der Genexpression die Zelldichte konstant blieb oder in den meisten Fällen abnahm. Ein Grund hierfür könnte eine mögliche Toxizität des Rezeptors sein. Dies wurde bereits für andere Membranproteine beobachtet (Laage *et al.*, 2001; Miroux *et al.*, 1996). Da die Expression im Schüttelkolben ohne Erfolg blieb, sollte untersucht werden, ob die Kultivierung der Bakterien in einem Hochzelldichte-Fermenter zu einer nachweisbaren Synthese des Membranrezeptors führt. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass die Kultivierungsparameter kontrolliert und geregelt werden können. Damit werden optimale Wachstumsbedingungen für die Bakterien geschaffen und es wird eine gute Reproduzierbarkeit des Experiments gewährleistet. Zu den kontrollierbaren Parametern gehören unter anderen die Temperatur, der pH-Wert und die Sauerstoffsättigung (pO<sub>2</sub>). Da die physikalische Löslichkeit von Sauerstoff verglichen mit dem Bedarf von aeroben Mikroorganismen sehr klein ist, kommt der Sauerstofftransferkapazität als Kenngröße für die Leistungsfähigkeit eines Reaktors große Bedeutung zu. Im Schüttelkolben ist dieser Wert häufig die limitierende Größe. Während einer Fermentation kann über den gesamten Zeitraum eine optimale Versorgung der Zellen mit Sauerstoff gewährleistet werden. Von den

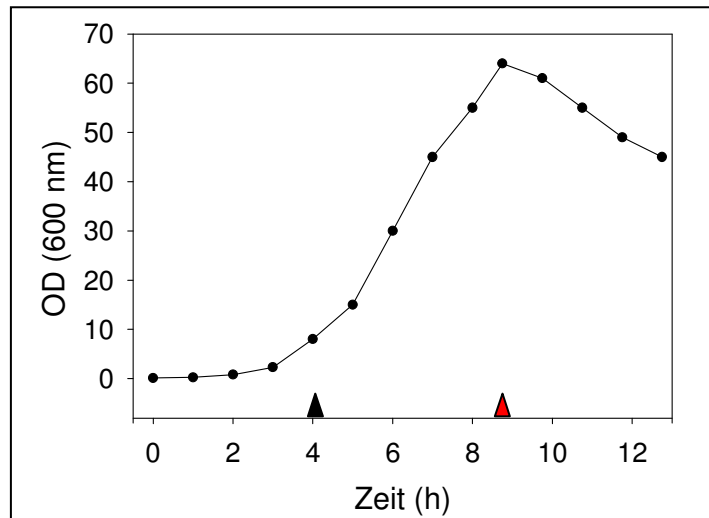
Eigenschaften des Produkts (Stabilität, Toxizität usw.) und einer gewünschten Expression in löslicher oder unlöslicher Form hängen Stärke und Zeitpunkt der Induktion ab.

Zur Expression des Gens des GLP-1-Rezeptors wurden die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3)  $c^+$  RIL, MC 4100 und BL21 (DE3) C43 mit dem Plasmid GLP-1R-pET28a transformiert und jeweils eine 6 Liter *fed-batch*-Fermentation durchgeführt (siehe 3.3.1). Nach der Anzucht des Expressionsstammes in Vollmedium bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte  $OD_{600} \sim 50-60$ , wurde die Proteinproduktion durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Während der folgenden vier Stunden wurde ein deutlicher Abfall der optischen Dichte auf einen Wert von  $OD_{600} \sim 36-40$  beobachtet. Bei keinem Versuch konnte aus dem derart generierten Zellmaterial GLP-1-Rezeptor isoliert werden.

Aufgrund der stark hydrophoben  $\alpha$ -Helices im Rezeptormolekül und den zahlreichen Cysteinresten wurde davon ausgegangen, dass das Protein in *E. coli* in unlöslicher Form als *inclusion bodies* exprimiert wird.

Um die Toxizität des Rezeptors für die Bakterien zu verhindern, sollte die Bildung von *inclusion bodies* verstärkt werden. Dies hätte zur Folge, dass alles gebildete Protein in unlöslicher Form vorliegt und somit die Wirtszelle nicht schädigen kann. Darum wurde die Expression bei einer Kultivierungstemperatur von 42 °C untersucht. Hierfür erfolgte nach Anzucht der Zellen bei zunächst 37 °C bis zu einer  $OD_{600} \sim 45-50$  eine schrittweise Erhöhung der Temperatur auf 42 °C. Nach Erreichen dieses Wertes wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Danach war wiederum ein drastischer Abfall der optischen Dichte des Mediums zu beobachten. Im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Fermentationen wurde der GLP-1-Rezeptor bei einer Expressionstemperatur von 42 °C von *E. coli* reproduzierbar synthetisiert. Als Wirt diente der Stamm BL21 (DE3)  $c^+$  RIL, wobei während der Fermentation auf die Zugabe von Chloramphenicol verzichtet wurde.

Der typische Verlauf der Zelldichte während einer Fermentation ist in Abbildung 12 dargestellt. Die Ausbeuten an Zellmasse (Feuchtwicht) lagen je nach Fermentationsverlauf zwischen 600 und 800 Gramm.

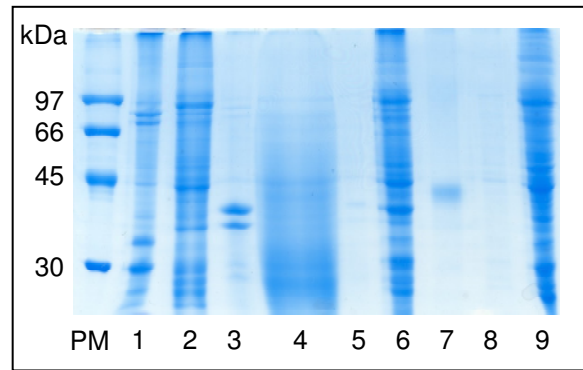


**Abbildung 12: Wachstumskurve von *E. coli* BL21 (DE3)  $c^+$  RIL mit dem Konstrukt GLP-1R-28a während der *fed-batch*-Fermentation.** Abhängigkeit der optischen Dichte des Mediums bei 600 nm von der Zeit. Das schwarze Dreieck markiert den Zeitpunkt des Beginns des *feedings*, das rote Dreieck kennzeichnet den Zeitpunkt der Induktion der Expression mit 1 mM IPTG.

Die Rezeptorkonzentration in den Bakterien war so gering, dass das Protein vor der *inclusion-bodies*-Präparation weder im denaturierenden SDS-Gel noch immunologisch nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die *inclusion bodies* wurden nach dem Zellaufschluss mittels Hochdruckdispersion isoliert (siehe 3.3.2a). Die Analyse der Überstände der jeweiligen Waschschrte ist in Abbildung 14 A dargestellt. Die Ausbeute an *inclusion bodies* betrug dabei im Durchschnitt 9 %.

Die isolierten *inclusion bodies* wurden anschließend im Hinblick auf ihre Löslichkeit in unterschiedlichen Denaturanzien getestet. Untersucht wurden die Substanzen SDS (20 mM), Harnstoff (6 M), Guanidinhydrochlorid (6 M) und CTAB (15 mM). Dabei wurden je 200 mg *inclusion bodies* in 10 ml Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM DTT, 1 mM EDTA + Denaturanz) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze zentrifugiert (Biofuge *fresco*, 13000 rpm, 60 min, RT), um die lösliche Fraktion von der unlöslichen zu trennen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 13).



**Abbildung 13: SDS-gelelektrophoretische Analyse der unterschiedlichen Solubilisierungsansätze der GLP-1R enthaltenden *inclusion bodies* mit N-terminaler Hexa-Histidinfusion.** PM: Proteinstandard, 1: Pellet 6 M Harnstoff, 2: Überstand 6 M Harnstoff, 3: Pellet 6 M GdmCl, 4: Überstand 6 M GdmCl, 5: Pellet 6 M GdmCl + 15 mM CTAB, 6: Überstand 6 M GdmCl + 15 mM CTAB, 7: Elution IMAC, 8: Pellet 20 mM SDS, 9: Überstand 20 mM SDS.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 10 qualitativ zusammengefasst. Die Sterne (\*) symbolisieren dabei den relativen Proteinanteil in der jeweiligen Fraktion (vier Sterne entsprechen 100 %). Wie anhand Tabelle 10 zu erkennen ist, konnten die besten Ergebnisse mit 20 mM SDS bzw. 6 M GdmCl und 15 mM CTAB erreicht werden. Bei Verwendung dieser Denaturanzien wurden die *inclusion bodies* nahezu vollständig solubilisiert. Alle folgenden Solubilisierungen wurden mit 20 mM SDS durchgeführt.

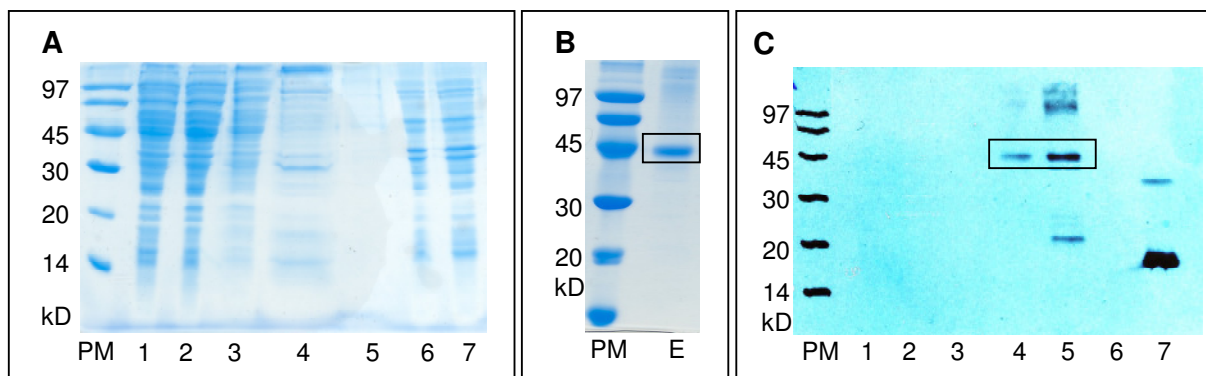
**Tabelle 10: Löslichkeit von *inclusion bodies* in verschiedenen Denaturanzien.** Die Sterne (\*) kennzeichnen den jeweiligen Anteil an Protein innerhalb der Probe. Vier Sterne (\*\*\*\*) entsprechen 100 % Proteinanteil, kein Stern 0 %.

Denaturanz	Protein im Pellet (%)	Protein im Überstand (%)
6 M Harnstoff	**	**
6 M GdmCl	*	****
6 M GdmCl + 15 mM CTAB		****
20 mM SDS		****
15 mM CTAB	**	**
20 mM SDS + 6 M Harnstoff	*	****

Um den Rezeptor aus dem Proteingemisch zu reinigen, wurde eine Affinitätschromatographie im denaturierten Zustand durchgeführt (siehe 3.3.3). Hierbei wurde die Bindung des Proteins



zu den an der Matrix gekoppelten Ni<sup>2+</sup>-Ionen durch die N- bzw. C-terminale Histidinfusion am Rezeptor vermittelt. In den Elutionsfraktionen war das gewünschte Protein im SDS-Gel sichtbar (siehe Abb. 14 A/B). Aus 150 ml Solubilisierungsansatz konnten für das GLP-1R-Konstrukt mit N-terminaler Histidinfusion im Durchschnitt 15 mg Rezeptor gereinigt werden. Bei der Reinigung der Rezeptorvariante mit C-terminaler Histidinfusion war die Ausbeute an Protein nach der IMAC deutlich geringer (~ 5 mg/150 ml Solubilisierungsansatz). Außerdem konnte die Reinheit des eluierten Proteins im Vergleich zum anderen Konstrukt nicht verbessert werden. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Untersuchungen mit der Rezeptorvariante mit N-terminaler Histidinfusion durchgeführt.



**Abbildung 14: SDS-gelelektrophoretische Analysen und Western-blotting der isolierten *inclusion bodies* und Reinigung des rekombinant hergestellten GLP-1-Rezeptors mit N-terminaler Histidinfusion.**

**A: Isolierung der *inclusion bodies*:** PM: Proteinstandard, 1: Zellysate nach Zellaufschluß, 2: Überstand nach 1. Zentrifugation, 3: Überstand nach Waschen mit 1. Waschpuffer, 4: Überstand nach Waschen mit 2. Waschpuffer, 5: Überstand nach wiederholtem Waschen mit Resuspensionspuffer, 6 + 7: *inclusion bodies*, **B: Elutionsfraktion der NiNTA**, **C: Western-blotting:** 1: Zellysate vor Induktion mit 1 mM IPTG, 2: Zellysate nach 2 h Induktion mit IPTG, 3: Zellysate nach 4 h Induktion mit IPTG, 4: solubilisierte *inclusion bodies*, 5: Elutionsfraktion IMAC, 6: Negativkontrolle (GIP-Rezeptor), 7: Positivkontrolle (nGLP1R).

Um den gereinigten denaturierten Rezeptor in seine native Form zu überführen, mussten zunächst Bedingungen für eine Renaturierung gefunden werden. Dabei sollte der stabilisierende Einfluss von verschiedenen Detergenzien bzw. Arginin und Glycerin untersucht werden.

Der gewählte Rückfaltungspuffer setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 100 mM Tris/HCl, pH 8.5, 1 mM EDTA, 20 mM Cyclodextrin, 5 mM GSH, 1 mM GSSG. Die verwendeten Detergenzien waren Vertreter der Brij-Reihe, sowie CHAPS, Digitonin und DDM. Als Stabilisatoren wurden entweder 30 % (v/v) Glycerin oder 1 M Arginin verwendet. Arginin hält denaturiertes Protein in Lösung und verhindert dessen Aggregation (Rudolph, 1997). Die Untersuchungen wurden im 10 ml-Maßstab durchgeführt. Vor der Zugabe des

Proteins wurden die Ansätze für 20 min entgast. Je Puls wurde Protein bis zu einer Endkonzentration von 35 µg/ml unter Rühren in die Ansätze getropft und nach weiteren 20 min wurde der Rührer ausgestellt. Die Pulse erfolgten in einem Abstand von mindestens sechs Stunden.

Nach weiteren sechs Stunden wurden die Rückfaltungsansätze auf 4 °C gekühlt und anschließend zentrifugiert (Biofuge *fresco*, 13000 rpm, 4 °C, 60 min), um Proteinaggregate abzutrennen. Der Überstand wurde zweimal gegen Puffer dialysiert (100 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Cyclodextrin). Nach der Dialyse wurden die Ansätze wiederum zentrifugiert (Biofuge *fresco*, 13000 rpm, 4 °C, 60 min). Von den Überständen wurde mittels Absorptionsbestimmung bei 280 nm die Proteinkonzentration ermittelt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

**Tabelle 11: Zusammenfassung der Optimierung der Rückfaltung von GLP-1R hinsichtlich verschiedener Stabilisatoren und Detergenzien.**

Abkürzungen: cmc: kritische Mizellenkonzentration, n.m.: nicht messbar

Stabilisator	Detergens	Detergenzkonzentration (mM)	cmc (mM)	Proteinkonzentration (µg/ml)
30 % (v/v) Glyzerin	Brij 58	3	0.08	16
	Brij 78	3	0.05	35
	Brij 98	1	0.025	n.m.
1 M Arginin	Brij 58	3	0.08	45
	Brij 78	3	0.05	67
	Brij 98	1	0.025	n.m.
	Brij 35	1	0.09	5
	CHAPS	5	6 – 10	7
	Digitonin	1.5	< 0.5	3
	DDM	3	0.1 – 0.6	7

Die Kombination von 1 M Arginin mit 3 mM Brij 78 führte zur größten Ausbeute an löslichem Rezeptor bei der Renaturierung. Daher wurden diese beiden Substanzen für alle folgenden Renaturierungsansätze verwendet.

#### **4.1.3 Identifizierung des humanen GLP-1-Gesamtrezeptors**

Die Identifizierung des GLP-1-Rezeptors erfolgte zum einen mittels *Western-blotting*, zum anderen durch tryptischen Verdau und anschließende massenspektrometrische Analyse der Peptide. Beim immunologischen Nachweis wurden die unter 4.1.2 beschriebenen Antikörper Anti-Hexa-His und Anti-nGLP-1R verwendet. Beide ermöglichten die Detektion des GLP-1-Rezeptors im Solubilisierungsansatz und in den Elutionsfraktionen der IMAC (Abb. 14 C).

Für eine Identifizierung mittels Massenspektrometrie wurde zunächst eine Elutionsfraktion der IMAC auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die dem Rezeptor zugeschriebene Bande aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und das Protein aus dem Polyacrylamidgel eluiert. Danach erfolgte ein Verdau mit Trypsin. Die daraus resultierenden Peptide wurden hinsichtlich ihrer Masse untersucht und mit der Aminosäuresequenz des Gesamtrezeptors verglichen. Der tryptische Verdau und die massenspektrometrische Analyse der Peptide wurden freundlicherweise von Frau DR. ANGELIKA SCHIERHORN durchgeführt. Mit dieser Methode konnten 31.7 % der Aminosäuren des humanen GLP-1R identifiziert werden (Abb. 15). Die Ausbildung der alpha-helikalen Strukturen innerhalb der Transmembranbereiche wurde auch für den SDS-solubilierten Rezeptor nachgewiesen (siehe 4.2.1). Dadurch ist das Protein dicht gepackt und erschwert den Verdau durch Proteasen (Trypsin) innerhalb dieser Bereiche, was die geringe Sequenzabdeckung erklären könnte. Dieses Phänomen wurde bereits für andere Transmembranproteine berichtet (Engelhardt *et al.*, 2007).

Abbildung 15 zeigt die Aminosäuresequenz des GLP-1-Rezeptors mit N-terminaler Histidinfusion. Die durch die massenspektrometrische Analyse detektierten Peptide sind in Rot dargestellt. Nicht nachweisbare Sequenzen, welche vermutlich zu Transmembranbereichen gehören (Frimurer *et al.*, 1999) und somit für Proteasen sterisch schwer zugänglich sind, sind in Blau hervorgehoben. Alle anderen Aminosäuren sind in Schwarz dargestellt.

```
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMRPQGATVSLWETVQKWREYRRQCQRSLTEDPPPATDLFCNR
TFDEYACWPDGEPGSFVNVSCPWYLPWASSVPQGHVYRFCTAEGWLQKDSSLPWRDLSEC
EESKRGERSSPEEQLLFLYIIYTVGYALSFSALVIASAILLGFRHLHCTRNYIHLNLFASFILRALSV
FIKDAALKWMYSTAAQQHQWDGLLSYQDSLSCRLVFLMQYCVAANYWLLVEGVYLYTLL
AFSVFSEQWIFRLYVSIGWGVPLLFPVWGVKYLVEDEGCWTRNSNMNYWLIIRLPILFGIGVN
FLIFVRVICIVVSKLKANLMCKTDIKRLAKSTLTLIPLLGTHEVIFAFVMDEHARGTLRFIKLFTE
LSFTSFQGLMVAILYCFVNNEVQLEFRKSWERWRLEHLHIQRDSSMKPLKCPTSSLSSGATAGSS
MYTATCQASCS
```

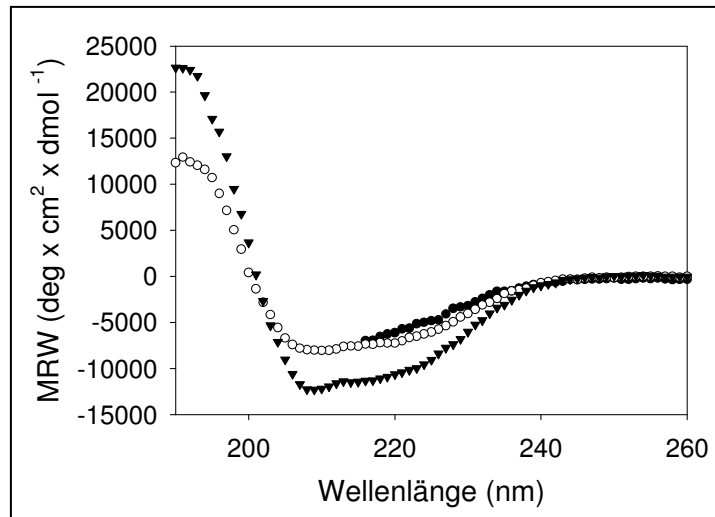
**Abbildung 15: Massenspektrometrische Analyse der Aminosäuresequenz des humanen GLP-1-Rezeptors mit N-terminaler Histidinfusion.** Rot markierte Buchstaben stehen für Aminosäuren, welche nach tryptischem Verdau des denaturierten Rezeptors und Analyse der Peptide mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden. Blau markierte Buchstaben stellen nicht identifizierte Aminosäuren der Transmembranbereiche dar. Schwarz markierte Buchstaben stehen für nicht transmembranäre und nicht identifizierte Aminosäuren.

## 4.2 Strukturelle Untersuchungen des GLP-1-Gesamtrezeptors

### 4.2.1 Fern-UV Circular dichroismus-Untersuchungen des GLP-1-Gesamtrezeptors

Zur Analyse der Sekundärstruktur des GLP-1-Rezeptors wurden CD-Spektren im Fern-UV für das denaturierte und native Protein aufgenommen (Abb. 16). Das Spektrum des nativen Proteins weist ein negatives Extremum bei 208 nm auf. Reine  $\alpha$ -helikale Strukturen zeigen ein weiteres negatives Extremum bei 222 nm (Kelly *et al.*, 2005). Dieses Extremum ist beim GLP-1R nicht eindeutig ausgeprägt. Für eine quantitative Auswertung des Gehaltes an Sekundärstruktur des nativen und SDS-solubilisierten Rezeptors wurde das Programm CDNN (Böhm *et al.*, 1992) verwendet. Die Auswertung erfolgte für den spektralen Bereich 205 - 260 nm. Das native Protein weist dabei einen  $\alpha$ -helikalen Anteil von circa 44 % und einen  $\beta$ -Faltblatt-Anteil von 13 % auf. Die Abschätzung der Strukturanteile beruht auf dem Vergleich der experimentell bestimmten CD-Daten mit denen von strukturell charakterisierten Proteinen. Da bislang in der Literatur nur sehr wenige Strukturinformationen von Transmembranrezeptoren zur Verfügung stehen, sind die aufgeführten Werte mit Vorsicht zu behandeln. Bei der in SDS solubilisierten Probe lagen die Werte bei 51 % ( $\alpha$ -Helix) bzw. 10 % ( $\beta$ -Faltblatt). Die für den GLP-1-Rezeptor bestimmten Werte stehen in Einklang mit den in der Literatur beschriebenen CD-Daten von GPCR (Baneres *et al.*, 2003; Baneres *et al.*, 2005).

Das CD-Spektrum des denaturierten Rezeptors konnte aufgrund des starken Signals von GdmCl nur von 260 nm bis 216 nm aufgenommen werden. Es entspricht nicht dem einer vollständig entfalteten Polypeptidkette. Vollständig denaturierte Proteine zeigen bis 220 nm fast kein CD-Signal (Creighton *et al.*, 2002). Das hier beobachtete Ergebnis könnte auf die Stabilisierung der Transmembranbereiche durch das Detergenz Brij 78 zurückzuführen sein. Für die Aufnahme der CD-Spektren des in GdmCl-denaturierten Rezeptors wurde natives Protein gegen einen Guanidin-haltigen Puffer dialysiert. Die geringe kritische Mizellenkonzentration (cmc) von Brij 78 (~45  $\mu$ M) macht das vollständige Entfernen dieser Substanz durch Dialyse unmöglich (Srirama *et al.*, 2001). Dadurch kann in der Lösung verbliebenes Detergenz den Rezeptor in Gegenwart von GdmCl stabilisieren. Das Protein kann daher nur unvollständig denaturiert werden. Möglicherweise bleibt dadurch ein Teil der Struktur des nativen Proteins erhalten.

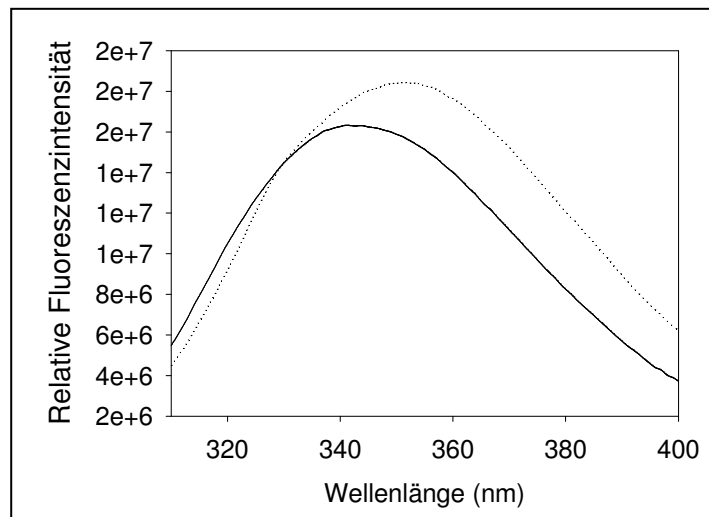


**Abbildung 16: Analyse der Sekundärstruktur des nativen und denaturierten GLP-1-Rezeptors mittels Fern-UV Circular dichroismus.** Spektren des nativen Proteins ( $\blacktriangledown\blacktriangledown\blacktriangledown$ ) wurden in 50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 0.1 mM Brij 78 aufgenommen. Das denaturierte Protein wurde in ( $\circ\circ\circ$ ) 50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 10 mM SDS bzw. in ( $\bullet\bullet\bullet$ ) 50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 6 M GdmCl, 0.1 mM Brij 78 gemessen. Die Temperatur betrug jeweils 20 °C. Alle Spektren wurden 60-mal akkumuliert.

#### 4.2.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen des GLP-1-Gesamtzeptors

Bei Proteinen mit aromatischen Aminosäuren kann die Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt werden, um Aussagen über die Tertiärstruktur des Moleküls zu erhalten. Dabei wird die Gesamtfluoreszenz durch den Beitrag der Tryptophanreste dominiert. In einer hydrophoben Umgebung emittieren Tryptophanreste bei Wellenlängen zwischen 320 und 340 nm (Indole zeigen in Hexan ein Emissionsmaximum bei 320 nm). Im nativen Protein sind die aromatischen Seitenketten zumeist in eine hydrophobe Umgebung im Proteininneren eingebettet. Durch die Entfaltung des Proteins kommen die Fluorophore in Kontakt mit dem umgebenden Lösungsmittel (wässrige Lösung). Das Emissionsmaximum von Tryptophan in Wasser liegt bei 350 nm (Eftink *et al.*, 1994; Creighton *et al.*, 2002).

Abbildung 17 zeigt die Fluoreszenz-Emissionspektren des nativen und denaturierten GLP-1-Rezeptors. Das Emissionsmaximum des nativen Proteins liegt bei 341 nm, das des denaturierten Rezeptors weist mit 351 nm eine Rotverschiebung um 10 nm auf. Das Protein besitzt insgesamt 17 Tryptophanreste, wobei nach strukturellen Vorstellungen nur vier davon innerhalb der Transmembranbereiche liegen. Die restlichen Tryptophanreste lagen demnach in GdmCl-haltigem Puffer weitgehend exponiert zum Lösungsmittel vor.



**Abbildung 17: Fluoreszenz-Emissionsspektren des nativen und denaturierten GLP-1-Rezeptors.** Emissionsspektrum des nativen (–) GLP-1R in 50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 mM Brij78. Emissionsspektrum des denaturierten (···) Rezeptors in 50 mM Natriumphosphat, 6 M GdmCl, pH 7.4. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 0.5  $\mu$ M, die Temperatur 20 °C und die Anregungswellenlänge 295 nm.

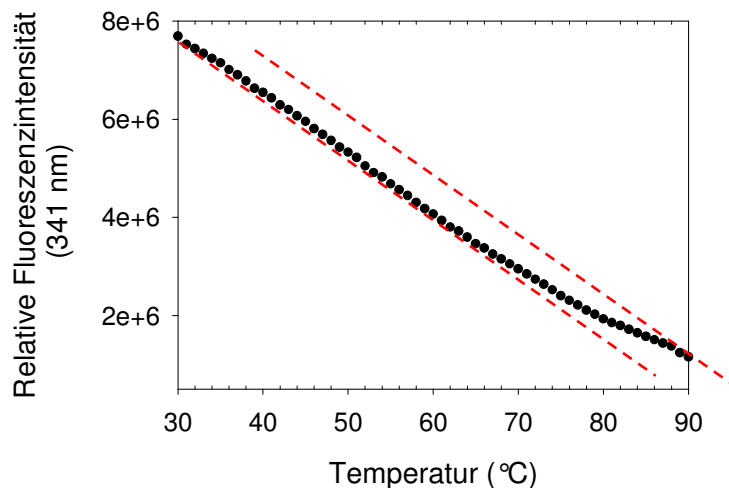
### 4.3 Thermische Stabilität des GLP-1-Gesamtrezeptors

Die Stabilität eines Proteins hängt maßgeblich von seiner Umgebungstemperatur ab. Dies bedeutet, dass das Gleichgewicht zwischen nativem und denaturiertem Zustand in Abhängigkeit von der Temperatur unterschiedlich schnell erreicht wird. Eine Detektion des thermischen Übergangs ist durch die Aufnahme von Absorptions-, Fluoreszenz- bzw. CD-Spektren in Abhängigkeit von der Temperatur möglich. Geht man von einem Zwei-Zustands-Modell aus, liegt das Protein entweder in seiner nativen (N) oder entfalteten (U) Form vor. Sind die thermisch induzierten Entfaltungsübergänge reversibel, so lassen sich daraus (mit Hilfe der Gibbs-Helmholtz-Gleichung) die Änderung der Enthalpie  $\Delta H$ , der Entropie  $\Delta S$  und der Wärmekapazität  $\Delta c_p$  durch Denaturierung des nativen Proteins bestimmen (Pace *et al.*, 2002).

#### 4.3.1 Fluoreszenzspektroskopische Analyse der thermischen Entfaltung

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität des Proteins wurden fluoreszenzspektroskopische Messungen bei 341 nm in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 90 °C durchgeführt (Abb. 18). Der Entfaltungsprozess sollte dabei anhand der Änderung

der intrinsischen Fluoreszenz nach Anregung der Tryptophanseitenketten bei 295 nm verfolgt werden. Die Messung wurde bei einer Proteinkonzentration von 0.5  $\mu\text{M}$  in Puffer B durchgeführt. Wie anhand von Abbildung 18 zu erkennen ist, beginnt die thermische Entfaltung bei einer Temperatur von ca. 65 °C. Bei einer Temperatur von 90 °C lag das Protein wahrscheinlich vollständig in der entfalteten Form vor. Da der Entfaltungsprozess nicht reversibel war, können keine Aussagen zur Änderung der freien Enthalpie, Entropie bzw. Wärmekapazität des Proteins gemacht werden. Deutlich erkennbar ist jedoch, dass die Tertiärstruktur des GLP-1R durch die Erhöhung der Temperatur geändert wird und das Protein von seiner nativen in die denaturierte Form übergeht (Eftink *et al.*, 1994).



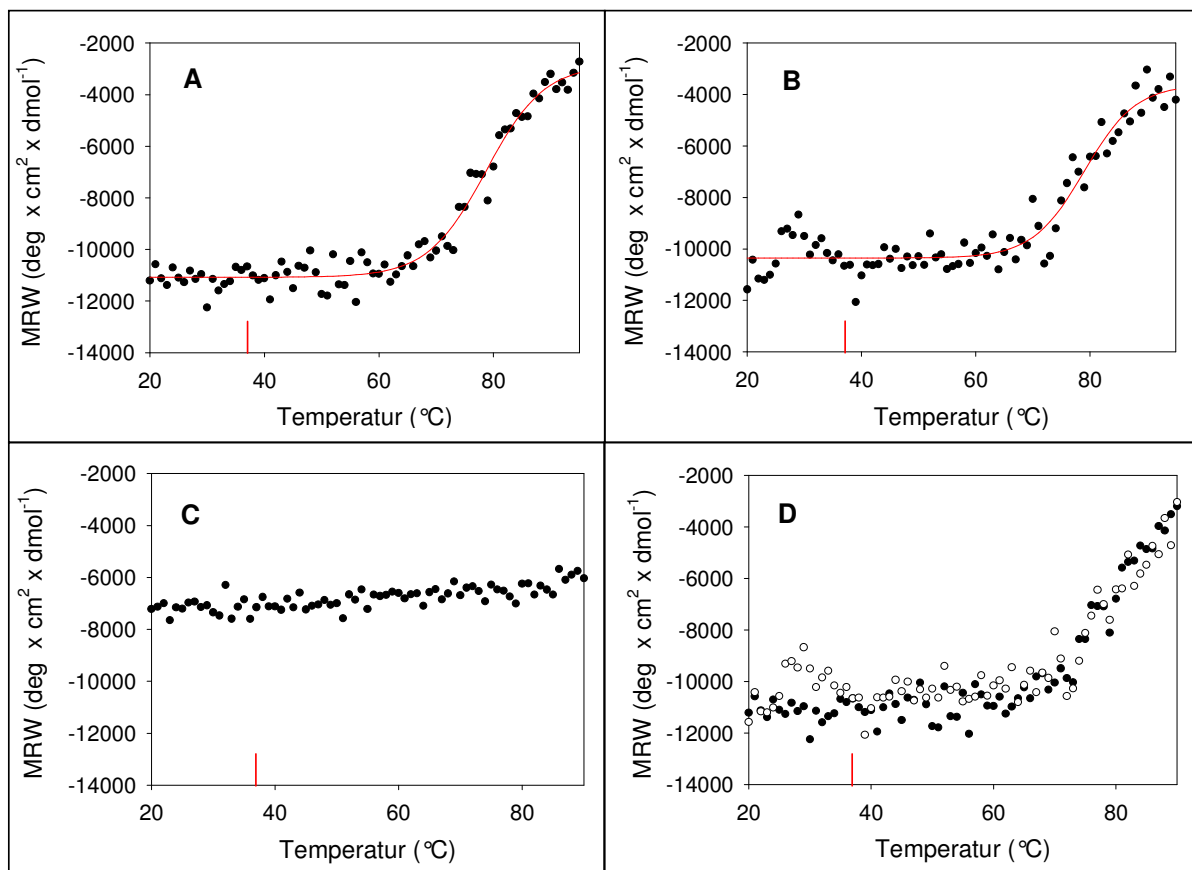
**Abbildung 18: Fluoreszenz-Temperaturübergang von GLP-1R:** Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm, die Emissionsspektren wurden über einen Bereich von 310 bis 400 nm aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte bei 341 nm. Die Rezeptorkonzentration betrug 0.5  $\mu\text{M}$ . Gemessen wurde in Puffer B in einer Fluoreszenzküvette (1 cm x 1 cm) mit Rührer.

#### 4.3.2 CD-spektroskopische Analyse der thermischen Entfaltung

Als weitere Methode zur Untersuchung der thermischen Stabilität des GLP-1-Rezeptors in freier bzw. Ligand-gebundener Form wurden Fern-UV-CD-Spektren bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Außerdem wurde der Einfluss der Temperatur auf den SDS-solubilisierten Rezeptor untersucht. Da die Entfaltung unter keiner getesteten Bedingung reversibel war, können nur Aussagen zum Übergangsmittelpunkt der jeweiligen Proteinprobe unter den gegebenen Bedingungen getroffen werden.



Der freie Rezeptor weist einen Übergangsmittelpunkt ( $T_m$ ) von  $78.7 \pm 0.6$  °C auf. Für den Komplex aus Rezeptor und GLP-1 wurde ein  $T_m$  von  $79.0 \pm 0.9$  °C bestimmt (Abb. 19 A/B). Die Zugabe von GLP-1 führte somit nicht zu einer mit dieser Methode detektierbaren Erhöhung der Stabilität des Rezeptors. Untersuchungen an der isolierten N-terminalen Domäne (Messung des thermischen Entfaltungsübergangs mittels DSC) ergaben nach Zugabe von GLP-1 eine Erhöhung der Schmelztemperatur um 5 °C (Runge *et al.*, 2007). Die erwartungsgemäß höhere Stabilität des Gesamtrezeptors im Vergleich zur Domäne könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass der GLP-1R durch die Zugabe von GLP-1 keine weitere Erhöhung des Übergangsmittelpunktes erfährt. Bei dem in SDS gelösten Protein konnte kein Entfaltungsübergang detektiert werden (Abb. 19 C). Alle Proteinproben sind bei einer Temperatur von 37 °C stabil (Abb. 19, rote Linie), was besonders für den nativen Rezeptor von Bedeutung ist.

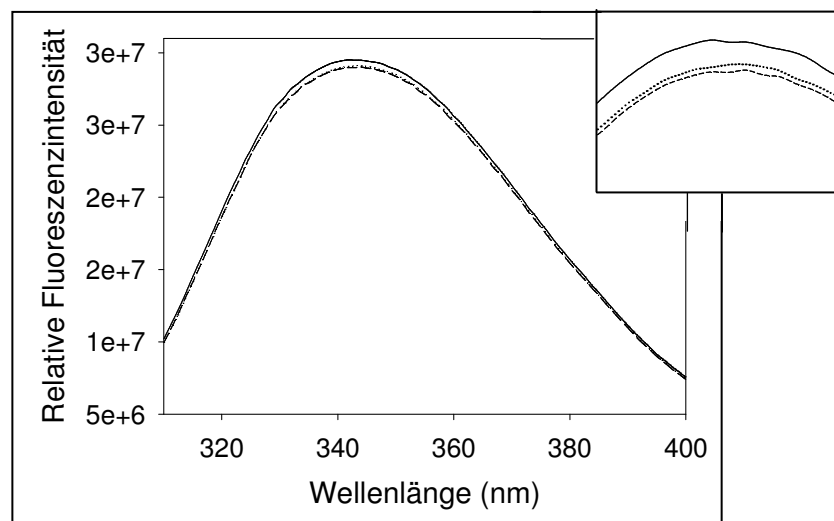


**Abbildung 19: Untersuchung der thermischen Stabilität des GLP-1-Gesamtrezeptors mittels Fern-UV CD-Spektroskopie.** Die Änderung des CD-Signals wurde bei 220 nm analysiert. Der rote Strich markiert die physiologisch relevante Temperatur von 37 °C. **A:** 3.3 µM GLP-1R in Puffer B, **B:** 3.3 µM GLP-1R im Komplex mit 3.3 µM GLP-1 in Puffer B, **C:** 4 µM GLP-1R in 5 mM Natriumphosphat, 10 mM SDS, pH 7.4, **D:** Vergleich von freiem (●●●) und GLP-1 gebundenem (○○○) GLP-1R.

## 4.4 Funktionsanalyse des rekombinanten GLP-1-Gesamtrezeptors

### 4.4.1 Ligandenbindungsstudien des GLP-1R mittels Fluoreszenzspektroskopie

Um nachzuweisen, ob der GLP-1-Rezeptor nach der Rückfaltung in seiner nativen Konformation vorlag, wurden Ligandenbindungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Hierbei wurde zunächst getestet, ob das Fluoreszenzsignal des angeregten Rezeptors über den Zeitraum der Messung stabil blieb. Dazu wurde eine Fluoreszenzküvette (1 cm x 1 cm) mit verschiedenen Konzentrationen an Rezeptor (0.1 bis 1  $\mu\text{M}$ ) in Puffer B befüllt und stündlich Emissionsspektren aufgezeichnet. Diese Messungen ergaben, dass das Fluoreszenzsignal über eine Zeit von 6 Stunden beständig an Intensität verlor (Daten nicht gezeigt). Dies ist neben der photochemischen Oxidation der Tryptophanreste wahrscheinlich auch auf eine starke Adsorption des Rezeptors an die Küvetten-Glaswand zurückzuführen, in deren Folge ständig Protein aus der Lösung entfernt wurde. Daraufhin wurde das Protein über Nacht (mindestens 14 h) bei Raumtemperatur in der Küvette vorinkubiert. Am Folgetag wurden die Emissionsspektren aufgezeichnet. Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, blieb das Fluoreszenzsignal nach dieser Vorbehandlung über 30 Minuten unter Rühren der Lösung stabil. Mit dem vorinkubierten Rezeptor wurden Bindungsstudien durchgeführt.



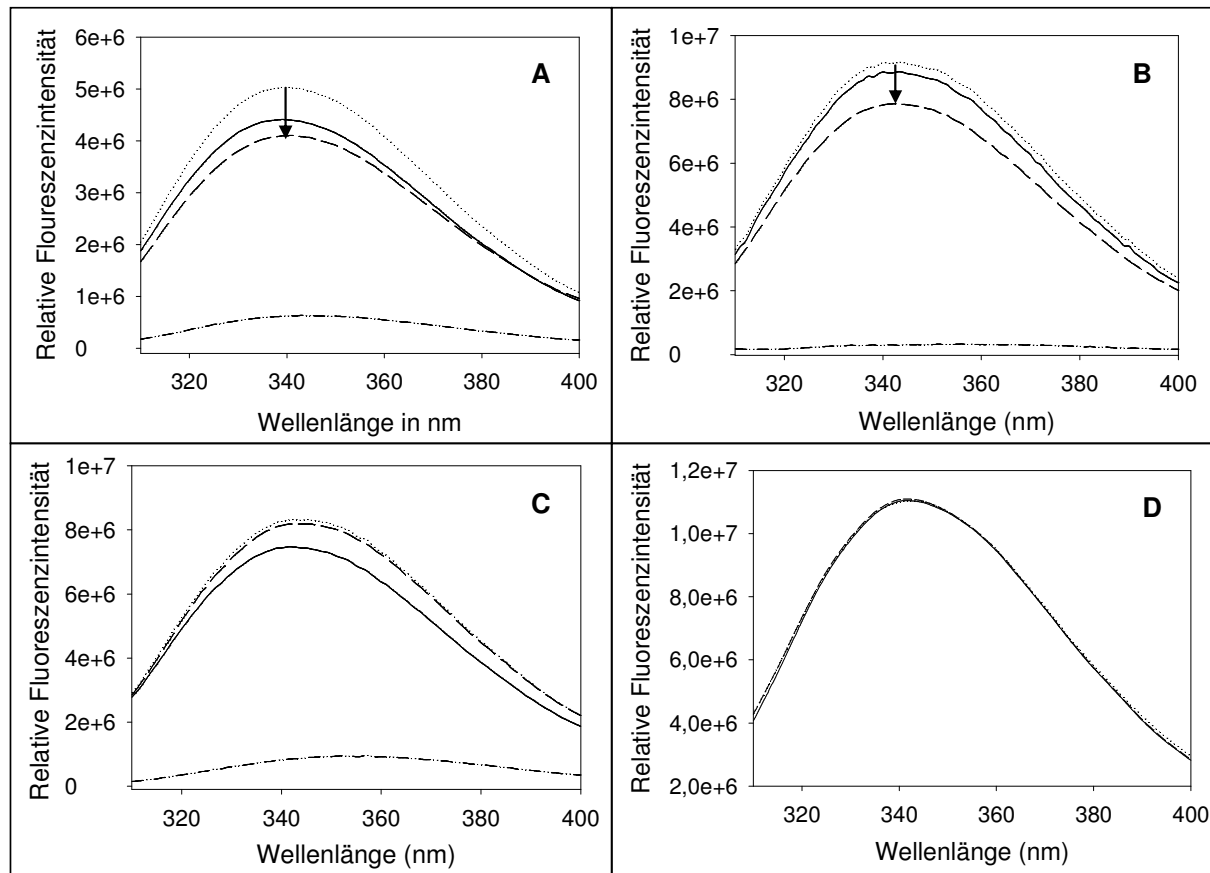
**Abbildung 20: Fluoreszenz-Emissionsspektren des GLP-1R nach Inkubation über Nacht.** 0.5  $\mu\text{M}$  GLP-1R in Puffer B nach Inkubation bei 20 °C über Nacht. Aufnahme von Fluoreszenzspektren am Folgetag (Fluoromax-3). Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm. Die Emission wurde über einen Bereich von 310-400 nm nach 0 min (—), 30 min (---) und 60 min (···) aufgezeichnet. Kleines Bild: Vergrößerung des Bereiches von 330-355 nm.

Zunächst wurde untersucht, ob die Zugabe von Agonisten (GLP-1, Exendin 4) einen Effekt auf das Emissionsspektrum des GLP-1-Rezeptors haben. Die Bindung eines Liganden führt in der Regel zu einer Konformationsänderung innerhalb des Rezeptors (siehe 1.1), welche zu einer veränderten Position der Tryptophanreste führen kann. Diese wiederum bewirkt eine Veränderung des Emissionsmaximums der Seitenketten. Liegt der Rezeptor nativ und somit funktionell vor, sollte dies nach Zugabe der Liganden anhand der Fluoreszenzspektren erkennbar sein.

Für eine qualitative Aussage in Bezug auf die Aktivität des GLP-1R wurden zunächst Fluoreszenzspektren des freien Rezeptors bzw. freien Liganden aufgezeichnet. Anschließend erfolgte die Zugabe von äquimolaren Mengen GLP-1 bzw. Exendin 4 zum GLP-1R. Diese Ansätze wurden für drei Minuten unter Rühren inkubiert und anschließend am Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug dabei 295 nm und das Emissionssignal wurde über einen Bereich von 310 nm bis 400 nm aufgezeichnet. Um die durch Ligandenbindung hervorgerufenen Effekte beurteilen zu können, wurde das gemessene Emissionsspektrum des Rezeptor-Liganden-Komplexes mit einem aus der Summe der Einzelspektren von Rezeptor und Ligand berechneten Spektrums verglichen. Dabei konnte bei der Bindung von GLP-1 eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um 18,5 % ermittelt werden (Abb. 21 A). Außerdem konnte eine leichte Rotverschiebung (um 3 nm) des Fluoreszenzmaximums detektiert werden. Beide Befunde lassen darauf schließen, dass der Rezeptor nativ vorlag und GLP-1 binden konnte. Die Zugabe von Exendin 4 zum Rezeptor führte zu einer relativen Abnahme des intrinsischen Fluoreszenzsignals um 14 % (Abb. 21 B) und, analog zur Bindung von GLP-1, zu einer Rotverschiebung des Emissionsmaximums um 3 nm. Somit kann auch in diesem Fall auf eine Bindung des Peptidhormons an den Rezeptor geschlossen werden.

Um eine unspezifische Bindung der Peptide an den GLP-1R auszuschließen, wurden Kontrollversuche mit Liganden für andere GPCR durchgeführt. Hierbei handelte es sich um die Peptidhormone PTH und NPY, welche *in vivo* nicht an den GLP-1R binden und somit keine Veränderung des Fluoreszenzspektrums bewirken sollten. Die Untersuchungen erfolgten analog zu den oben beschriebenen Bindungsstudien mit GLP-1 und Exendin 4. Nach Zugabe der Peptide PTH und NPY zum GLP-1R konnte keine Löschung (*quenching*) der Proteinfluoreszenz beobachtet werden (Abb. 21 C, D). Im Fall von PTH stimmt das gemessene Spektrum des Komplexes mit dem berechneten fast vollständig überein. Somit hat das Peptidhormon wahrscheinlich nicht an den Rezeptor gebunden. Im Falle des NPY sind

alle gemessenen Spektren identisch. Da NPY selbst kein Tryptophan besitzt, ergibt die berechnete Summe der Einzelspektren aus Rezeptor und Peptid das Spektrum des Gesamtrezeptors. Eine mögliche Bindung von NPY an den GLP-1R hätte zu einer Veränderung des Emissionsmaximums führen können. Da dies nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass vermutlich keine Bindung des NPY-Peptides an den Rezeptor stattgefunden hat.



**Abbildung 21: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen des freien bzw. Ligand-gebundenen GLP-1-Gesamtrezeptors:** Freier Rezeptor (—), Rezeptor im Komplex mit Ligand (---), Ligand (···) und berechnetes Spektrum der Summe aus Rezeptor und Ligand (·-·-) **A:** 150 nM GLP-1-R mit 150 nM GLP-1, **B:** 200 nM GLP-1R mit 200 nM Exendin 4, **C:** Negativkontrolle: 200 nM GLP-1R mit 200 nM PTH und **D:** Negativkontrolle: 200 nM GLP-1R mit 200 nM NPY. Die Temperatur betrug jeweils 20 °C.

Zur Ermittlung von Bindungskonstanten wurden Fluoreszenztitrationen durchgeführt. Dabei wurde der Rezeptor in den Konzentrationen von 0.5 bzw. 1  $\mu$ M vorgelegt und über Nacht in einer Fluoreszenzküvette präinkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Ansätze hinsichtlich der Stabilität des Fluoreszenzsignals untersucht. Im Falle eines nachweislich konstanten Fluoreszenzsignals wurde Ligand zum Rezeptor titriert. Die Probe wurde während der gesamten Messung gerührt (Fluoromax-3, Rührer Stufe 3). Als Ligand diente Exendin 4,

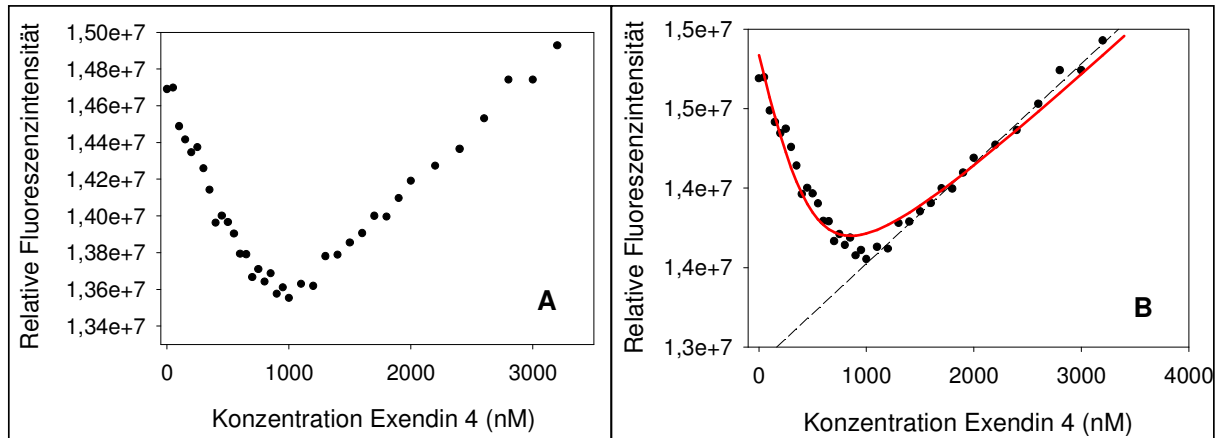
welches schrittweise zum Rezeptor titriert wurde (Tab. 12). Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm. Emissionsspektren wurden über einen Bereich von 330 bis 350 nm aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 342 nm.

**Tabelle 12: Eingesetzte Konzentrationen an Exendin 4 für die Fluoreszenztitration mit 0.5  $\mu$ M GLP-1R.**

Konzentrationsbereich an Ligand in der Messküvette (nM)	Konzentrationschritte an Exendin 4 (nM)
0 – 1000	50
1000 – 2000	100
2000 - 3600	400

Unter allen verwendeten Versuchsbedingungen konnte eine Abnahme des intrinsischen Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration bis zur Sättigung des Rezeptors beobachtet werden. Bei weiterer Zunahme der Ligandenkonzentration wurde eine lineare Zunahme der Fluoreszenzintensität durch die erhöhte Eigenfluoreszenz des Liganden beobachtet. In Kontrollexperimenten ohne Rezeptor wurde ebenfalls eine lineare Abhängigkeit der intrinsischen Ligandenfluoreszenz von der Ligandkonzentration beobachtet (Daten nicht gezeigt). Zur Auswertung der Titrationsexperimente wurden die Versuche mit 0.5  $\mu$ M GLP-1R verwendet (Abb. 22). Die Berechnung der apparenten Dissoziationskonstante erfolgte mittels nichtlinearer Regression durch Anpassung an eine quadratische Gleichung und ergab einen  $K_D$ -Wert von  $116 \pm 18$  nM.

Im Vergleich dazu liegen die Bindungskonstanten, welche mit Hilfe von radioaktiven Liganden an isolierten pankreatischen  $\beta$ - bzw. HEK 293-Zellen bestimmt wurden, im einstelligen nanomolaren Bereich (Kieffer *et al.*, 1996; Gromada *et al.*, 1995). Die Diskrepanz zwischen den in der Literatur beschriebenen und in dieser Arbeit ermittelten Werten ist sehr wahrscheinlich auf die unterschiedliche Rezeptorumgebung zurückzuführen. Im Gegensatz zu Protein in  $\beta$ - bzw. HEK 293-Zellen musste der GLP-1R nach Expression in *E. coli* denaturierend solubilisiert und gereinigt werden. Die anschließende Renaturierung erfolgte durch eine Stabilisierung des Proteins in Detergenzmizellen, welche in ihren Eigenschaften von Lipidmembranen abweichen. Demzufolge befindet sich das in die Mizellen eingebettete Protein in einem artifiziellen System. Einflüsse der natürlichen Membranbestandteile oder von anderen Proteinen können so nur sehr begrenzt ersetzt werden. Diese Argumente stellen eine mögliche Ursache für die schlechteren Bindungseigenschaften dar.

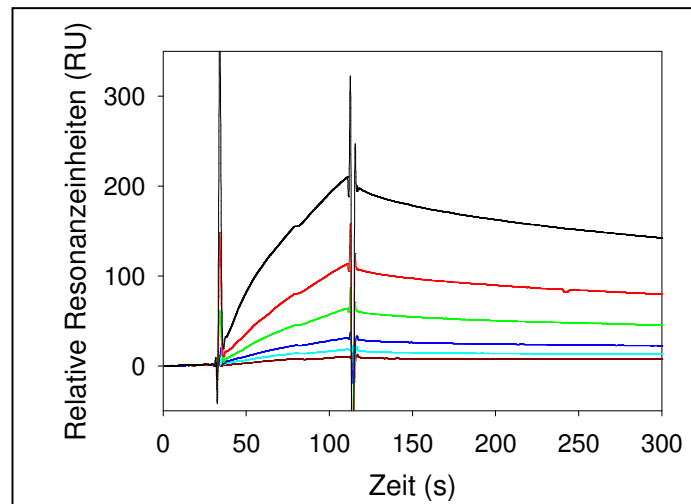


**Abbildung 22: Fluoreszenztitration des GLP-1R mit Exendin 4.** **A:** Titration von Exendin 4 zu 0.5  $\mu\text{M}$  GLP-1R in Puffer B bei 20  $^{\circ}\text{C}$  und Rührer Stufe 3 (Fluoromax-3). **B:** Berechnung der Dissoziationskonstante durch Anpassung an eine quadratische Gleichung (Gleichung 14). Die Anpassung der Titrationskurve (–) ergab einen  $K_D$ -Wert von  $116 \pm 18$  nM. Die gestrichelte Linie zeigt die in unabhängigen Versuchen bestimmte, konzentrationsabhängige Eigenfluoreszenz des isolierten Liganden in Puffer B.

#### 4.4.2 Ligandenbindungsstudien des GLP-1R mittels Oberflächenplasmonresonanz

Eine weitere unabhängige Methode zur Quantifizierung der Bindung von GLP-1 und Exendin 4 an den rekombinant hergestellten Rezeptor stellte die Oberflächenplasmonresonanz dar. Die Studien wurden an einem Biacore T100 Gerät durchgeführt. Zunächst wurden die C-terminal cysteinylierten Peptide (GLP-1, Exendin 4 und PTH) kovalent über eine Thiolkopplung an die Chipoberfläche gebunden, wobei darauf geachtet wurde, dass nicht mehr als 150 RU (*response units*) Peptid immobilisiert wurden. Dazu wurden während der Kopplung nur sehr niedrig konzentrierte Peptidlösungen mit der aktivierten Chipoberfläche in Kontakt gebracht und bei Bedarf wurde erneut injiziert. Während der Bindungsmessungen wurden Lösungen mit steigenden Konzentrationen an Rezeptor über die Chipoberfläche geleitet.

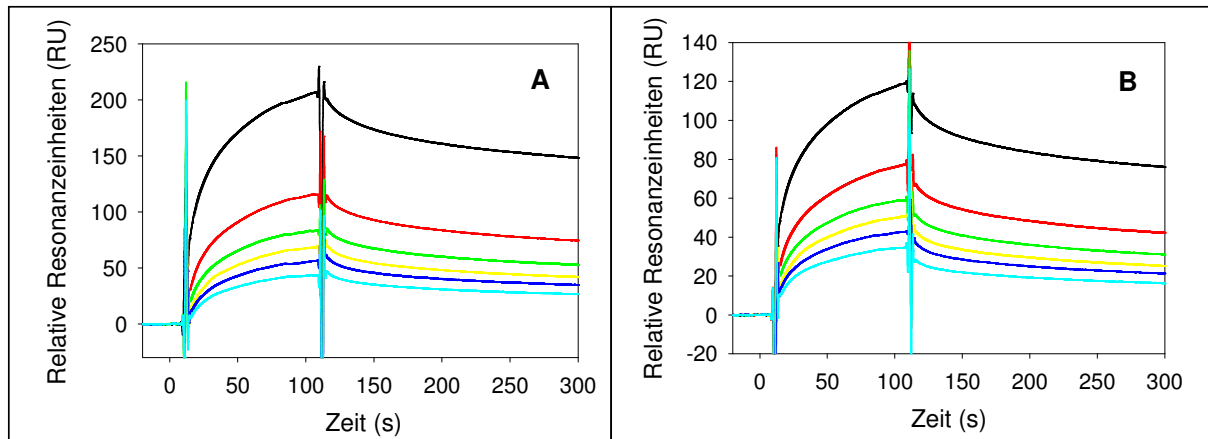
Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, nimmt das maximale Resonanzsignal bei steigenden Konzentrationen an Rezeptor zu. Dies lässt auf eine konzentrationsabhängige Bindung des GLP-1-Rezeptors an den Liganden Exendin 4 schließen. Die Auswertung der Bindungsdaten erfolgte mit Hilfe der Biacore T100 Evaluation Software. Bei Annahme einer 1:1-Bindung konnte eine Dissoziationskonstante von 99 nM bestimmt werden (Auswertung siehe 6.4). Als Negativkontrolle wurde die gleiche Proteinlösung über eine mit PTH gekoppelte Flusszelle geleitet. Es konnte keine Bindung detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



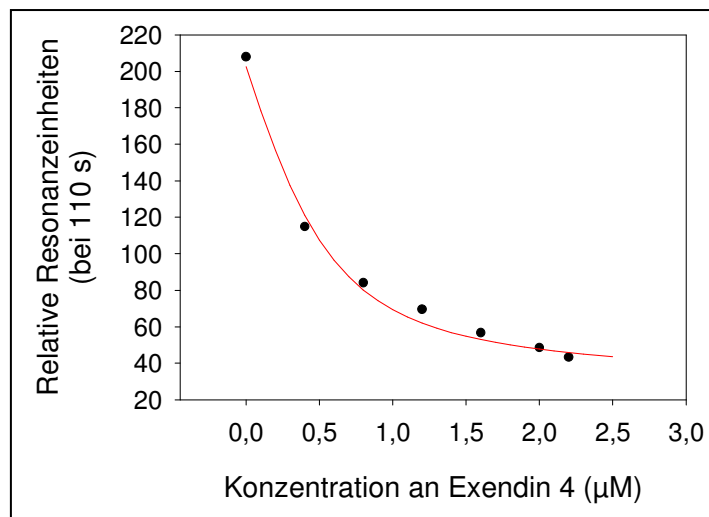
**Abbildung 23: Sensogramm der Bindung von GLP-1-Gesamtrezeptor an Exendin 4.** Auf dem Sensorchip wurden 150 RU Exendin 4 immobilisiert. Die Resonanzsignale resultieren aus der Injektion verschiedener Konzentrationen an GLP-1R (— 0.11  $\mu\text{M}$ ; — 0.22  $\mu\text{M}$ ; — 0.45  $\mu\text{M}$ ; — 0.9  $\mu\text{M}$ ; — 1.8  $\mu\text{M}$ ; — 3.6  $\mu\text{M}$ ). Bei Annahme einer 1:1-Bindung konnte eine Dissoziationskonstante von 99 nM bestimmt werden.

Im Anschluss an diese Bindungsstudien wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Dazu wurde der Rezeptor mit verschiedenen Konzentrationen an Exendin 4 vorinkubiert und anschließend die Bindung an auf der Chipoberfläche immobilisiertem Exendin 4 bzw. GLP-1 untersucht.

Wie in Abbildung 24 zu erkennen ist, sinkt mit steigender Konzentration an vorgelegtem Exendin 4 das maximale Resonanzsignal sowohl an der mit Exendin 4 als auch an der mit GLP-1 immobilisierten Flusszelle. Für die Auswertung wurden die maximalen Resonanzsignale unter Gleichgewichtsbedingungen gegen die Konzentration an präinkubiertem Exendin 4 aufgetragen (Abb. 25). Die Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) erfolgte nur für das Experiment am Exendin 4-Chip, da auch mit Exendin 4 kompetitiert wurde. Unter Anwendung von Gleichung 16 konnte ein  $K_D$ -Wert von  $180 \text{ nM} \pm 60 \text{ nM}$  ermittelt werden. Eine mögliche Erklärung für den Unterschied zu Daten aus Messungen an  $\beta$ -pankreatischen- und transfizierten HEK 293-Zellen veröffentlichten  $K_D$ -Werten befindet sich in Abschnitt 4.4.1.



**Abbildung 24: Sensogramme der Konkurrenzexperimente von GLP-1R mit Exendin 4.** 0.5  $\mu\text{M}$  GLP-1R in Puffer B wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Exendin 4 bei 20 °C für 30-60 min vorinkubiert und anschließend wurde die Bindung an Sensorchip-Oberflächen gemessen. Die Exendin 4-Konzentrationen waren: – 0  $\mu\text{M}$ , – 0.4  $\mu\text{M}$ , – 0.8  $\mu\text{M}$ , – 1.2  $\mu\text{M}$ , – 1.6  $\mu\text{M}$ , – 2.0  $\mu\text{M}$ . **A:** Flusszelle mit immobilisiertem Exendin 4. **B:** Flusszelle mit immobilisiertem GLP-1.



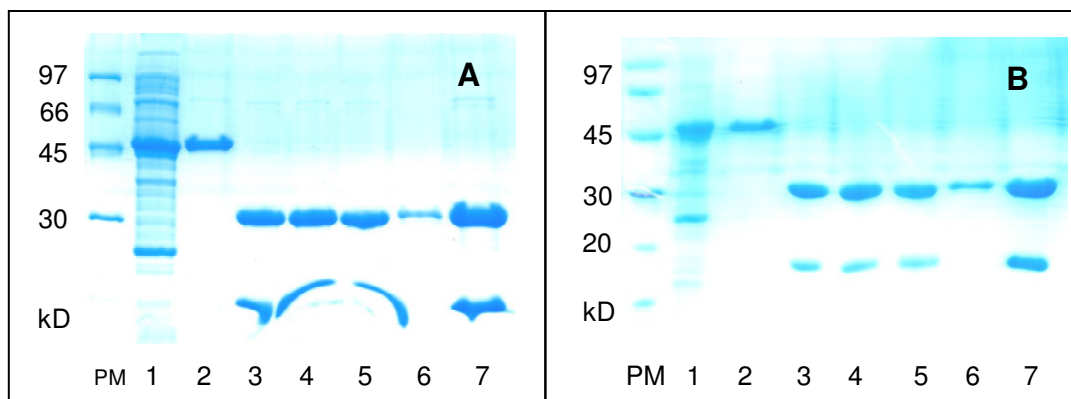
**Abbildung 25: Auswertung des Konkurrenzexperimentes von GLP-1R mit Exendin 4 am Exendin 4-gekoppelten Biacore-Chip.** Verschiedene Konzentrationen an freiem Exendin 4 wurden mit 0.5  $\mu\text{M}$  GLP-1R in Puffer B für 30-60 min bei 20 °C vorinkubiert. Anschließend wurde die Bindung des verbleibenden freien Rezeptors an einem Exendin 4-Sensorchip getestet. Die Auswertung der gegen die Konzentration an zugegebenem Exendin 4 aufgetragenen maximalen Resonanzsignale erfolgte unter Anwendung von Gleichung 16. Die berechnete Dissoziationskonstante betrug 180 nM  $\pm$  60 nM.



#### 4.4.3 Analytische Gelfiltration von Rezeptor-Ligand-Komplexen

Als ein weiterer Funktionsnachweis des GLP-1R sollte die Bindung von fluoreszenzmarkierten Peptiden an den Rezeptor untersucht werden. Die Ausbildung von Rezeptor-Ligand-Komplexen sollte zu einem veränderten Laufverhalten auf einer analytischen Gelfiltrationssäule führen. Die Markierung der Peptide mit Fluoreszenzmarkern ermöglichte deren gezielte Detektion während des Versuches.

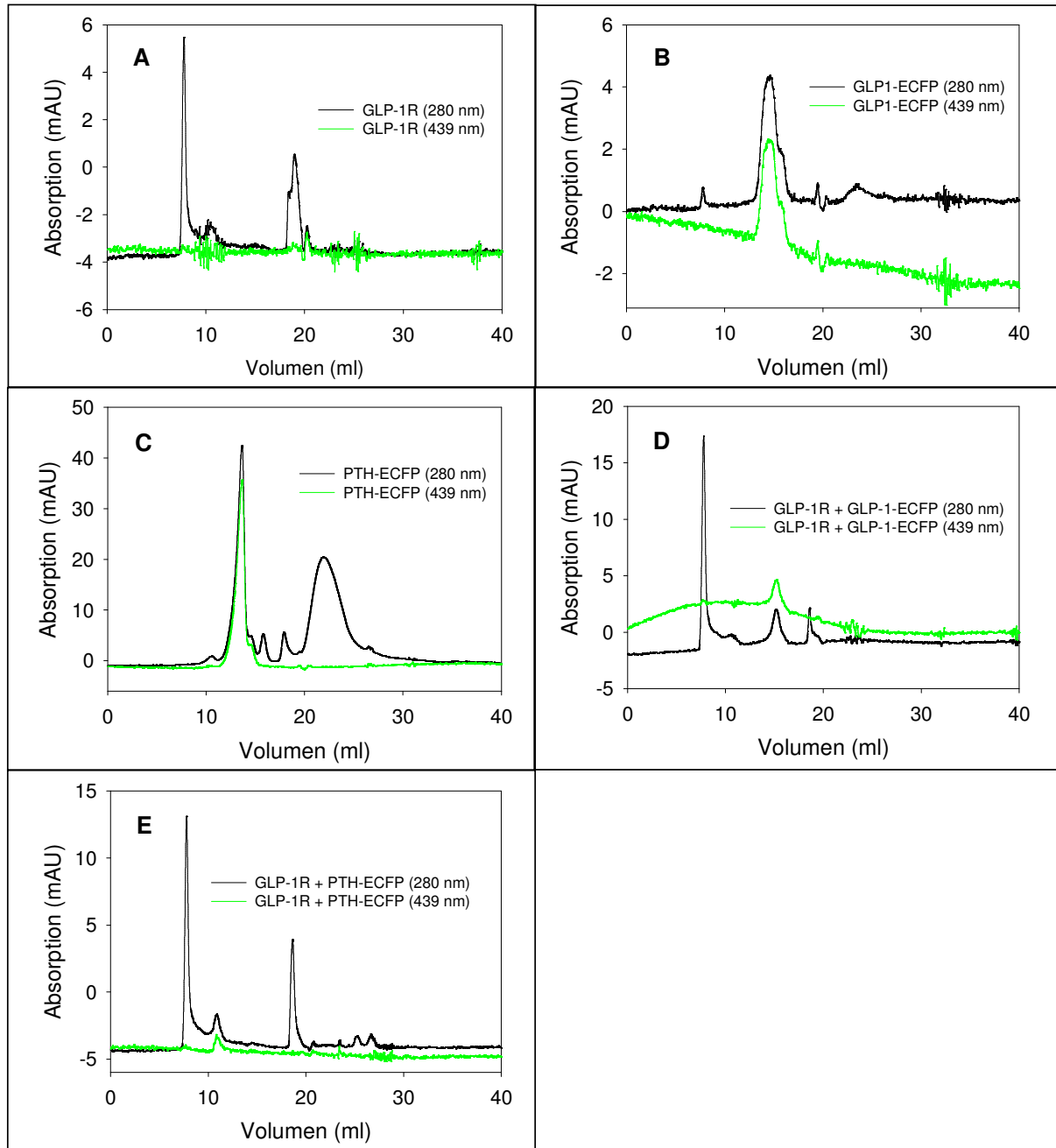
Zunächst mussten die Fusionsproteine SUMO-GLP-1-ECFP und SUMO-PTH-ECFP aus *E. coli*-Zellmaterial isoliert, gereinigt und mit SUMO-Protease gespalten werden (siehe 3.4).



**Abbildung 26: SDS-Gel der Reinigung und Spaltung der Fusionsproteine SUMO-GLP-1-ECFP und SUMO-PTH-ECFP.** PM: Proteinstandard, 1: Überstand vom Zellaufschluss, 2: Elutionsfraktion der 1. IMAC, 3 - 5: Spaltung mit SUMO-Protease nach ein bis drei Stunden, 6: Durchlauf der 2. IMAC, 7: Elutionsfraktion der 2. IMAC, **A:** SUMO-GLP-1-ECFP; **B:** SUMO-PTH-ECFP.

Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, konnten die SUMO-Fusionsproteine vollständig gespalten und GLP-1-ECFP bzw. PTH-ECFP (ca. 30 kDa) zur Homogenität gereinigt werden. Die Fraktion 6 des entsprechenden Proteins wurde für die folgenden Untersuchungen verwendet.

ECFP zeigt ein Absorptionsmaximum bei 439 nm und kann somit unabhängig von der Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm detektiert werden. Bei einer Bindung der fluoreszenzmarkierten Peptide an den Gesamtrezeptor sollte das Absorptionssignal des Rezeptors (bei 280 nm) und das des ECFP (bei 439 nm) zusammenfallen. Außerdem sollte sich die Retentionszeit der Fusionsproteine verkürzen, da der Komplex aus Rezeptor und Fusionsprotein größer ist und somit schlechter in die Poren des Gelfiltrationsmaterials einwandern kann.



**Abbildung 27: Absorptionsprofile der analytischen Gelfiltration von GLP-1R und nach Inkubation mit GLP-1-ECFP und PTH-ECFP.** A: 6  $\mu$ M GLP-1R, B: 16  $\mu$ M GLP-1-ECFP, C: 185  $\mu$ M PTH-ECFP (Probe während Proteaseverdau entnommen), D: 17  $\mu$ M GLP-1R & 17  $\mu$ M GLP-1-ECFP, E: 17  $\mu$ M GLP-1R & 17  $\mu$ M PTH-ECFP. Der Rezeptor lag in 50 mM Natriumphosphat, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 mM Brij78 gelöst vor. Die fluoreszenzmarkierten Peptide waren in 50 mM Natriumphosphat, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol gelöst.

Abbildung 27 zeigt die Absorptionsprofile der analytischen Gelfiltration. Das Elutionsprofil des GLP-1-Rezeptors weist zwei Absorptionsmaxima auf. Das Maximum bei 8 min stellt wahrscheinlich die di- bzw. oligomere Fraktion dar. Das andere Maximum erscheint bei 19 min. Hierbei handelt es sich vermutlich um die monomere Fraktion der Proteinlösung. Das Fusionsprotein GLP-1-ECFP weist eine maximale Absorption bei einer Elutionszeit von 15 min auf, sowohl bei 280 nm als auch bei 439 nm. Das Elutionsprofil der Negativkontrolle (PTH-ECFP) hat ein Absorptionsmaximum bei circa 13.5 min (439 nm). Bei Detektion bei 280 nm sind im Elutionsprofil noch weitere Peaks zu erkennen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um das SUMO-Protein, da in diesem Versuch eine Probe des Proteaseverdaus aufgetragen wurde. Die frühzeitige Elution der Fusionsproteine im Vergleich zum Rezeptor erscheint *per se* ungewöhnlich. Das Elutionsverhalten von Proteinen von einer Gelfiltrationssäule wird aber nicht nur durch das Molekulargewicht, sondern auch durch die Oberflächenstruktur (Stokes-Radius) des Moleküls bestimmt. Dadurch ist es prinzipiell möglich, dass Proteine mit kleinerem Molekulargewicht vor größeren Proteinen eluieren können.

Für den Nachweis einer stabilen Bindung wurden äquimolare Konzentrationen an GLP-1R und Fusionsprotein für 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend auf die analytische Gelfiltrationssäule aufgetragen. Im Gemisch aus GLP-1R und GLP-1-ECFP erscheint die maximale Absorption von 439 nm im Elutionsprofil bei 15 min. Dies entspricht dem Elutionsvolumen des isolierten Peptides. Es ist also davon auszugehen, dass das Fusionsprotein nicht stabil an den Rezeptor gebunden hat. Bei der Probe von GLP-1R und PTH-ECFP erscheint das Fluoreszenzsignal bereits bei 11 min und damit 2.5 min früher als beim isolierten Peptid. Da die Absorption nicht zeitgleich mit der des Rezeptors erfolgte, ist auch hier davon auszugehen, dass das Fusionsprotein nicht an den Rezeptor gebunden vorliegt.

Mit den hier durchgeführten Experimenten konnte keine stabile Bindung der fluoreszenzmarkierten Peptide an den GLP-1R nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache könnte die im Vergleich zu den Peptidhormonen große ECFP-Fusion sein. GLP-1 (7-37) hat ein Molekulargewicht von 3.3 kDa. ECFP besteht aus 244 Aminosäuren und ist mit einem Molekulargewicht von 27.4 kDa achtmal so groß wie GLP-1. Es ist vorstellbar, dass ECFP die Bindung des Hormons an den Rezeptor behindert hat, obwohl es an den C-terminalen Teil des Peptides fusioniert wurde und dieser keinen Anteil an der Bindung hat (siehe 1.5). Zum anderen liegen bei der verwendeten Methode der analytischen Gelfiltration im Gegensatz zur Fluoreszenztitration oder Oberflächenplasmonresonanz-Analyse keine echten

Gleichgewichtsbedingungen vor, so dass ein möglicherweise während der Vorinkubation gebildeter Komplex aus GLP-1R und Ligand bei Migration über die Säule dissoziieren kann. Ist die Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes ( $k_{\text{off}}$ ) hinreichend hoch im Vergleich zur Analyse- bzw. Elutionszeit, kann die nicht beobachtete Coelution von Rezeptor und Ligand nicht als Beweis für eine ausbleibende Bindung interpretiert werden.

## 4.5 Rekombinante Herstellung und Charakterisierung der N-terminalen Domäne des GLP-1-Rezeptors (nGLP-1R)

### 4.5.1 Expression, Reinigung und Rückfaltung des nGLP-1R

Um zu überprüfen, ob die für den Gesamtrezeptor etablierten Protokolle auch für die Gewinnung einer funktionellen N-terminalen Domäne verwendet werden können, wurde diese analog zum GLP-1R gereinigt und renaturiert. Mit Hilfe von Bindungsstudien sollte dann untersucht werden, ob die isolierte N-terminale Domäne die Peptidhormone GLP-1 und Exendin 4 mit zum Gesamtrezeptor vergleichbaren Dissoziationskonstanten binden kann.

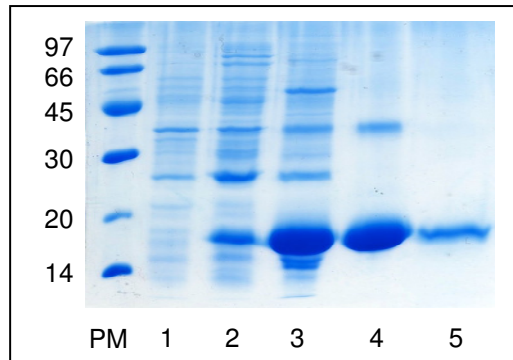
Die für die Domäne kodierende DNA lag bereits als Konstrukt nGLP-1R-pET15b vor. Somit konnten die Experimente auf der Stufe der Expression gestartet werden. Zunächst wurde die Plasmid-DNA in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3)  $c^+$  RIL transformiert. Die Expression des Gens der Rezeptordomäne erfolgte analog zum Gesamtrezeptor (siehe 3.3.1). Die Temperatur blieb während der gesamten Fermentation konstant bei 37 °C. Das Antibiotikum Ampicillin wurde vor der Inokulation und im Verlauf der Kultivierung alle drei Stunden in einer Konzentration von 200 µg/ml zum Medium gegeben. Bei einer optischen Dichte des Mediums von  $OD_{600} = 11$  war die Glukose vollständig aufgebraucht und es erfolgte die Zugabe von *feeding*-Lösung.

Bei einer optischen Dichte des Mediums von  $OD_{600} = 56$  erfolgte die Induktion der Genexpression mit 1 mM IPTG. Im Gegensatz zum Gesamtrezeptor kam es bei der N-terminalen Domäne nach der Induktion nicht zum Abfall der optischen Dichte der Zellkultur. Nach vier Stunden Induktion und einer  $OD_{600} = 72$  des Mediums wurden die Zellen geerntet. Die Ausbeute an Feuchtzellmasse betrug 840 g aus ca. 8 Litern Kulturmedium. Im Gegensatz zum Gesamtrezeptor ist die Expression des nGLP-1R bereits im Lysat der Zellkultur erkennbar (Abb. 28).

Die *inclusion bodies* wurden nach dem Zellaufschluss mittels Hochdruckdispersion wie in Abschnitt 3.3.2b beschrieben isoliert. Die Ausbeute an *inclusion bodies* betrug 3.2 % bezogen auf die eingesetzte Zellmasse. Analog zur Reinigung des Gesamtrezeptors wurden 1.5 g *inclusion bodies* in 150 ml Solubilisierungspuffer über Nacht gelöst und zwei Tage gegen 50 mM Natriumphosphat, pH 4.5, 10 mM SDS dialysiert. Mit Hilfe der IMAC konnten aus 1.5 g *inclusion bodies* 234 mg nGLP-1R gereinigt werden.

Die Rückfaltung der Rezeptordomäne erfolgte im 400 ml-Maßstab analog zum Gesamtrezeptor. Während der Renaturierung waren keine Aggregate sichtbar. Vor dem

Aufkonzentrieren mittels Amicon Membran-Konzentratoren wurde der Ansatz über Nacht gegen 3 Liter Puffer B dialysiert. Nach Reduktion des Gesamtvolumens auf 12 ml erfolgte eine erneute Dialyse gegen Puffer B. Abbildung 28 zeigt ein repräsentatives SDS-Gel mit Proben der einzelnen Stufen der Expression und Reinigung.



**Abbildung 28: SDS-gelelektrophoretische Analyse der Expression, Reinigung und Renaturierung des nGLP-1R.** PM: Proteinstandard, 1: Zellysate vor der Induktion, 2: Zellysate nach der Induktion, 3: *inclusion bodies*, 4: Elutionsfraktion der IMAC, 5: nGLP-1R nach der Renaturierung.

#### 4.5.2 Identifizierung des nGLP-1R

Eine Analyse der Identität des gereinigten Proteins erfolgte durch einen immunologischen Nachweis mit Hilfe von Antikörpern gegen die N-terminale Histidinfusion bzw. gegen Epitope innerhalb der N-terminalen Domäne. In beiden Fällen konnte das Protein nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestätigung des korrekten Molekulargewichts wurde eine Elutionsprobe (Retentionszeit 61 min) der RP-HPLC (siehe 3.2.7) des nativen nGLP-1R mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Hierbei konnte die theoretisch erwartete Masse für die Domäne mit drei Disulfidverbrückungen (16468 Da) detektiert werden (Abb. 29).

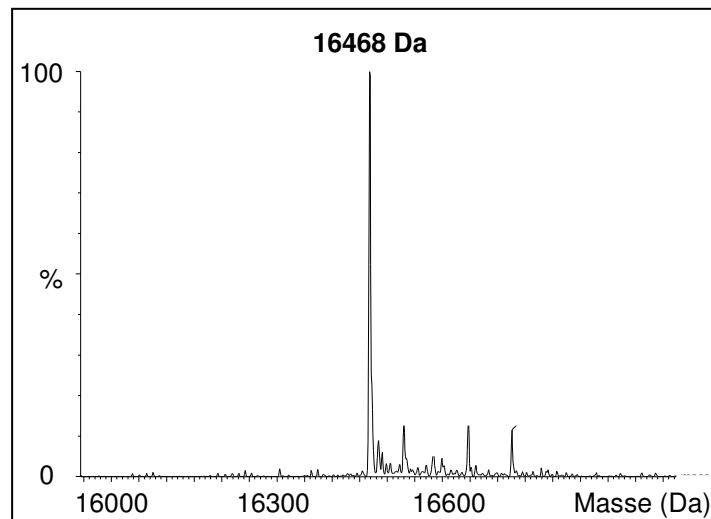
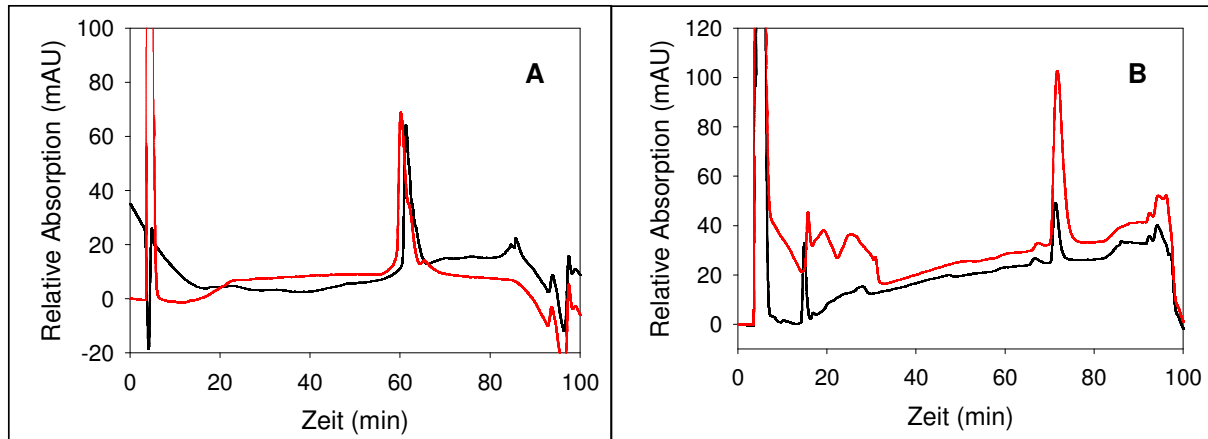


Abbildung 29: Massenspektrum (MALDI-TOF) des analog zum Gesamtrezeptor renaturierten nGLP-1R.

#### 4.5.3 RP-HPLC des nGLP-1R

Durch umfangreiche Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass nach Rückfaltung mit einem von BAZASUREN etablierten Protokoll die isolierte N-terminale Domäne mit korrekter Disulfidverbrückung vorlag (Bazarsuren 2003). Die dabei eingesetzten Protokolle werden im Folgenden als „konventionelle“ Reinigung bzw. Faltung bezeichnet. Bindungsstudien ergaben, dass die N-terminale Domäne nach konventioneller Herstellung die Peptide GLP-1 und Exendin 4 binden kann (Runge *et al.*, 2007). Mit Hilfe der folgenden Versuche sollte untersucht werden, ob auch die für den Gesamtrezeptor etablierten Protokolle zu einer korrekt gefalteten und funktionellen Domäne führen.

Zunächst wurde das Laufverhalten von nativem und denaturiertem nGLP-1R während einer RP-HPLC untersucht (siehe 3.2.7). Parallel dazu wurde die konventionell hergestellte Domäne untersucht (freundlicherweise von STEFFEN RUNGE / Novo Nordisk zur Verfügung gestellt) und mit den Ergebnissen der nach Protokollen für den Gesamtrezeptor renaturierten Domäne verglichen.



**Abbildung 30: RP-HPLC der N-terminalen Domäne des GLP-1R.** Vergleich des Laufverhaltens von konventionell (–) und nach neuem Protokoll renaturiertem (–) nGLP-1R. **A:** Chromatogramme nach Auftragung von je 100 µg nativem nGLP-1R. Beide Proben eluieren bei einer Retentionszeit von 61 min. **B:** Chromatogramme nach Auftragung von 30 µg (konventionell) bzw. 100 µg (Rückfaltung analog zu GLP-1R) denaturiertem (4.5 M Harnstoff, 2 % SDS, 25 mM β-Mercaptoethanol) nGLP-1R. Beide Proben zeigen eine Verschiebung der Retentionszeit von 10 min.

Wie in Abbildung 30 zu erkennen ist, zeigen beide Proteine sowohl im nativen als auch im denaturierten Zustand das gleiche Laufverhalten. Die nativen Proteine eluieren bei einer Retentionszeit von 61 min. Die mit Harnstoff und β-Mercaptoethanol behandelten Proben zeigen eine Verschiebung der Retentionszeit von 10 min. Daraus kann geschlossen werden, dass die Domäne nach Rückfaltung unter Verwendung des neu etablierten Protokolls analog zum Gesamtrezeptor in einer nativen Konformation vorlag.

#### 4.5.4 Analyse des Disulfidbrückenmusters des nGLP-1R

Um die Ergebnisse der RP-HPLC bzw. der MALDI-TOF-massenspektrometrischen Analyse zu untermauern, sollte untersucht werden, ob das Renaturierungsprotokoll des Gesamtrezeptors zu einer korrekten Ausbildung der Disulfidbrücken innerhalb der N-terminalen Domäne führen. Bei einer korrekten Ausbildung der Disulfidbrücken wird folgendes Brückenmuster erwartet: Cys<sup>46</sup>-Cys<sup>71</sup>, Cys<sup>62</sup>-Cys<sup>104</sup> und Cys<sup>85</sup>-Cys<sup>126</sup> (Bazarsuren *et al.*, 2002).

Zur Überprüfung des Disulfidbrückenmusters des rückgefalteten nGLP-1R wurde das native Protein erneut auf die RP-HPLC-Säule geladen und der Elutionspeak bei 61 min gesammelt. Die Peptidlösung wurde anschliessend wie in 3.2.8 beschrieben behandelt. Die aus dem Trypsinverdau resultierenden Peptide wurden nach Auftrennung über eine nano-HPLC-Säule



ionisiert. Dieser Vorgang führt häufig zur Reduktion von Disulfidbrücken. Daher ist es möglich, von jedem disulfidverbrückten Peptid drei individuelle Signale zu detektieren: das des kovalent verbrückten Peptides und die beiden der reduzierten unverbrückten Peptide. Dadurch können Disulfidbrücken mit dieser Methode eindeutig nachgewiesen werden. Abbildung 31 zeigt exemplarisch ein MALDI-TOF Massenspektrum von nGLP-1R, in dem alle drei Peptide, die bei der Ionisierung eines disulfidverbrückten Peptides entstehen, nachweisbar sind. Eine quantitative Aussage ist in diesem Kontext nicht möglich, da die einzelnen Peptide möglicherweise unterschiedlich gut ionisiert werden können. Im Anschluss an die Detektion des Molekulargewichts wurden die betreffenden Peptide mit Hilfe einer MS/MS-Analyse sequenziert und mit der bekannten Peptidsequenz verglichen. Dies ermöglichte eine eindeutige und genaue Zuordnung der Signale, wodurch eine korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken bestätigt werden konnte.

Da Trypsin sehr häufig innerhalb einer Proteinkette schneidet (nach den Seitenketten Lysin, Arginin und Cystein), entstehen je Disulfidbrücke mehrere Peptidfragmente (Tabelle 13, erste Spalte). Bei dem Vergleich von berechnetem und experimentell detektiertem Molekulargewicht wurden nur Unterschiede bis zu 30 ppm toleriert. Wie Anhand von Tabelle 13 zu erkennen ist, konnten alle drei Disulfidbrücken innerhalb der N-terminalen Domäne des GLP-1-Rezeptors nachgewiesen werden. Damit führt das für den Gesamtrezeptor etablierte Renaturierungsprotokoll zur Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken innerhalb der N-terminalen Domäne.

**Tabelle 13: Vergleich der berechneten und detektierten Molekulargewichte der disulfidverbrückten Peptide innerhalb der N-terminalen Domäne des GLP-1-Rezeptors.**

Brücke	Detektiertes Molekül (g/mol)	Berechnetes Molekül (g/mol)	Fehler (ppm)	1. Peptid (Sequenzbereich)	Detektiertes Molekül (g/mol)	2. Peptid (Sequenzbereich)	Detektiertes Molekül (g/mol)
46-71	2209.006	2209.003	1	100-108	1082.509	68-78	1165.477
46-71	2008.944	2008.886	29	41-46	846.465	68-78	1165.485
62-104	1533.687	1533.694	5	60-64	640.278	100-107	896.431
62-104	2126.914	2126.906	4	60-67	1047.421	100-108	1082.507
85-126	2282.089	2282.029	26	119-132	1693.809	81-85	591.242
85-126	2339.029	2339.039	4	119-131	1537.675	79-85	804.36
85-126	2495.199	2495.14	24	119-132	1693.791	79-85	804.35
85-126	3165.529	3165.458	22	119-140	2577.239	81-85	591.241
85-126	3265.54	3265.485	17	119-139	2464.126	79-85	804.359
85-126	3312.559	3312.526	10	119-141	2724.285	81-85	591.263

85-126	3378.678	3378.569	32	119-140	2577.247	79-85	804.335
85-126	3.525.73	3525.637	25	119-141	2724.315	79-85	804.365
85-126	2110.944	2110.928	8	122-130	1309.381	79-85	804.367

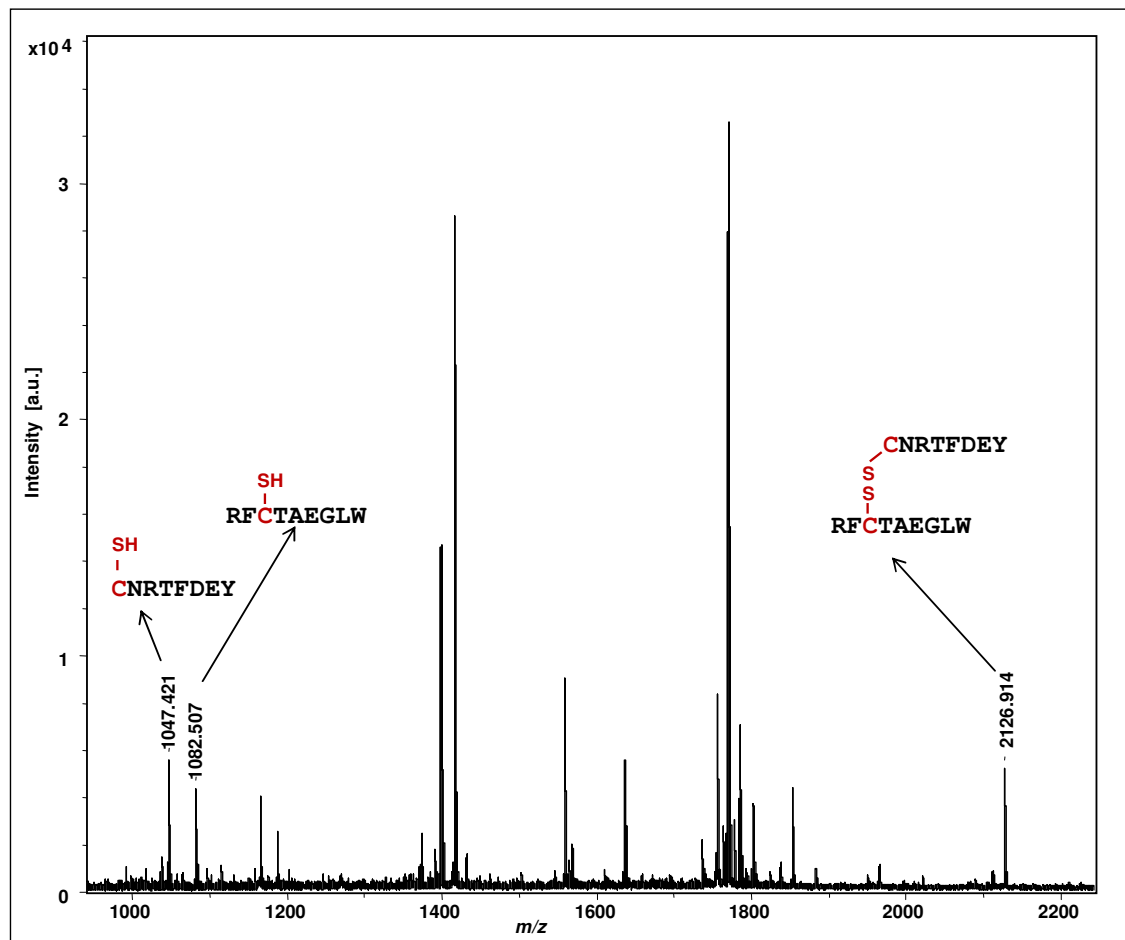
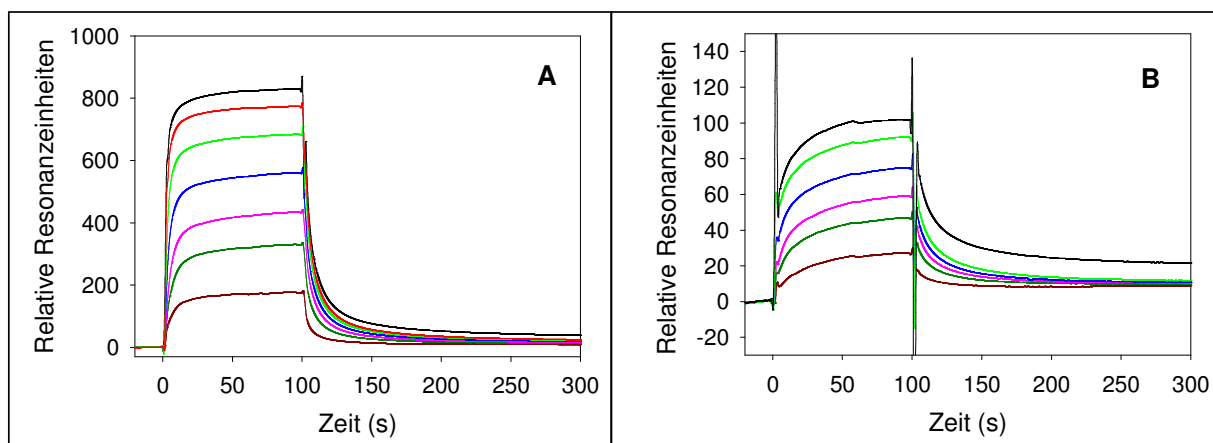


Abbildung 31: Massenspektrum (MALDI-TOF) einer nano-HPLC-Fraktion von proteolytisch behandeltem nGLP-1R. Zu erkennen sind sowohl das disulfidverbrückte Protein (2126.914 g/mol) als auch die beiden durch die Ionisierung reduzierten Einzelpeptide (1047.421 bzw. 1082.507 g/mol). Bei dem hier dargestellten Spektrum handelt es sich um eine Verknüpfung zwischen den Cysteinseitenketten Cys<sup>62</sup> und Cys<sup>104</sup>.

#### 4.5.5 Ligandenbindungsstudien des nGLP-1R mittels Oberflächenplasmonresonanz

Nachdem bestätigt werden konnte, dass die N-terminale Domäne nach Renaturierung analog zum Gesamtrezeptor ein korrektes Disulfidbrückenmuster ausbildet, sollte das Protein nun hinsichtlich seiner Funktionalität der Ligandenbindung untersucht werden. Dazu wurden Analysen mittels Oberflächenplasmonresonanz durchgeführt (siehe 3.5.4). Zur Vorbereitung

wurde der renaturierte nGLP-1R mehrfach gegen Puffer B dialysiert. Anschließend erfolgten Bindungsstudien an einem Biacore T100-Instrument mit Puffer B als Laufpuffer. Bei den immobilisierten Peptiden handelte es sich wieder um die cysteinylierten Hormone GLP-1, Exendin 4 und PTH. Für GLP-1 und Exendin 4 konnte eine konzentrationsabhängige Bindung der Domäne an die Peptide beobachtet werden (Abb. 32). Mit Hilfe des Evaluierungsprogramms für Biacore T100 wurde für die Messung mit GLP-1 eine Bindungskonstante ( $K_D$ ) von  $1.1 \mu\text{M}$  ermittelt (Auswertung siehe Anhang 6.4). Für die Messung mit Exendin 4 konnte mit der implementierten Software kein physikalisch sinnvoller  $K_D$ -Wert ermittelt werden. An die mit PTH gekoppelte Flusszelle wurde keine Bindung detektiert (Daten nicht gezeigt).

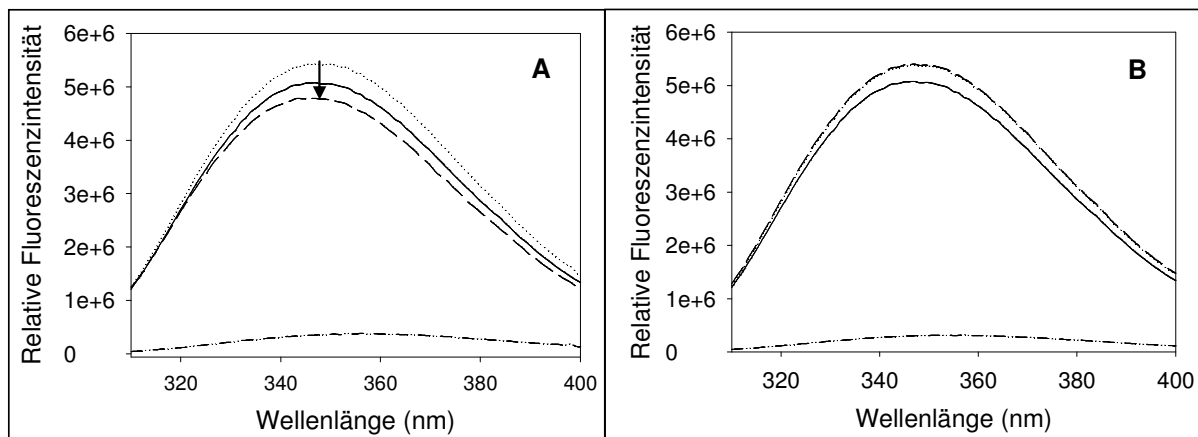


**Abbildung 32: Sensogramme der Bindung von GLP-1 (A) und Exendin 4 (B) an nGLP-1R.** Auf dem Sensorchip wurden 600 RU GLP-1 bzw. 150 RU Exendin 4 immobilisiert. Die Resonanzsignale entsprechen der Injektion verschiedener Konzentrationen an nGLP-1R (—  $0.17 \mu\text{M}$ ; —  $0.68 \mu\text{M}$ ; —  $1.35 \mu\text{M}$ , —  $2.7 \mu\text{M}$ ; —  $5.4 \mu\text{M}$ ; —  $10.8 \mu\text{M}$ ; —  $21.6 \mu\text{M}$ ).

#### 4.5.6 Ligandenbindungsstudien des nGLP-1R mittels Fluoreszenzmessungen

Als ein weiterer unabhängiger Bindungsnachweis wurden fluoreszenzspektroskopische Messungen durchgeführt. Hierfür wurde die Proteinlösung analog zu den Studien mit dem Gesamtrezeptor über Nacht bei Raumtemperatur in der Fluoreszenzküvette vorinkubiert und am nächsten Morgen hinsichtlich der Stabilität des intrinsischen Fluoreszenzsignals des nGLP-1R untersucht. Da dieses stabil war, wurden Bindungsmessungen mit GLP-1, Exendin 4 und PTH durchgeführt (Abb. 33). Dabei konnte eine durch die Zugabe von Exendin 4 induzierte Löschung (*quenching*) des Fluoreszenzsignals von 12 % detektiert

werden. Die Zugabe von GLP-1 in äquimolarer Konzentration führte zu keiner Veränderung der Fluoreszenzintensität der N-terminalen Domäne (Daten nicht gezeigt). Bei der Messung von nGLP-1R mit PTH liegen die Spektren des gemessenen Rezeptor-Ligand-Komplexes und das der berechneten Summe aus Domäne- und Ligandenspektrum genau übereinander. PTH hat demnach unter den eingesetzten Bedingungen nicht an die Rezeptordomäne gebunden. Mit diesen Messungen konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne des GLP-1-Rezeptors nach Rückfaltung analog zum Gesamtrezeptor das Peptid Exendin 4 binden konnte und demnach wahrscheinlich in seiner nativen Form vorlag. Die bereits in der Literatur beschriebene geringere Affinität von nGLP-1R für GLP-1 im Vergleich zu Exendin 4 (Runge *et al.*, 2007) ist möglicherweise die Ursache für die nicht nachweisbare nGLP-1R – GLP-1 Komplexbildung bei den hier verwendeten Konzentrationen von Domäne und Ligand.



**Abbildung 33: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen des freien und Ligand-gebundenen nGLP-1R:** freie Rezeptordomäne (—), Rezeptordomäne im Komplex mit Ligand (---), Ligand (----) und berechnete Summe aus Rezeptordomäne und Ligand (····) **A:** 500 nM nGLP-1-R mit 500 nM Exendin 4, **B:** Negativkontrolle: 500 nM nGLP-1R mit 500 nM PTH. Temperatur bei 20 °C.

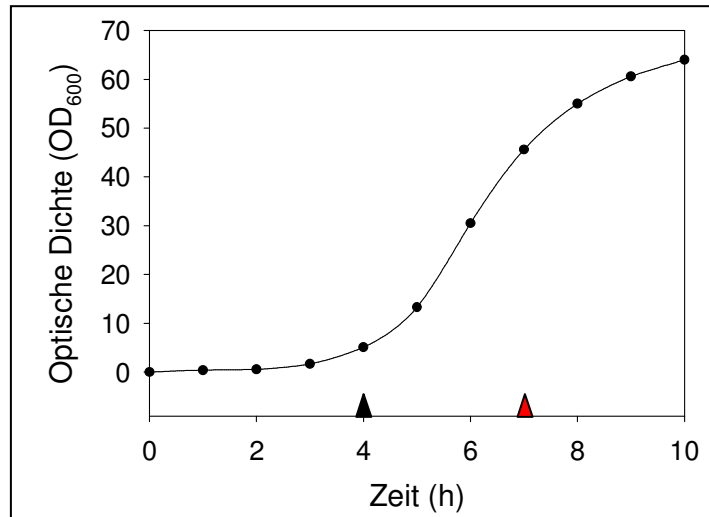
## 4.6 Rekombinante Herstellung und Charakterisierung des Fusionskonstruktes Loop\_nGLP-1R

Bei dem Fusionskonstrukt Loop\_nGLP-1R handelt es sich um die N-terminale Domäne des GLP-1-Rezeptors, an welche zusätzlich die beiden ersten *exoloops* über einen sechsfachen Glyzin-Serin-*linker* fusioniert wurden (Aminosäuresequenz siehe Anhang). Innerhalb der Sequenzen der *loop*-Bereiche befindet sich jeweils ein Cysteinrest. Bislang konnte nicht gezeigt werden, ob zwischen diesen beiden Seitenketten eine Disulfidbrücke ausgebildet wird. Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob das Fusionskonstrukt nach Reinigung und Renaturierung analog zum Gesamtrezeptor funktionell dargestellt werden kann und sich eine kovalente Bindung zwischen den zwei Cysteinresten der beiden benachbarten *exoloops* ausbildet.

### 4.6.1 Expression, Reinigung und Rückfaltung des Fusionskonstruktes Loop\_nGLP-1R

Zur Herstellung des Proteins wurde das DNA-Konstrukt Loop\_nGLP-1R-pET15b in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3)  $c^+$  RIL transformiert. Von einer Einzelkolonie wurde die Übernachtskultur beimpft. Die Expression erfolgte mit Hilfe einer drei Liter *fed-batch* Fermentation (siehe 3.3.1). Die Temperatur blieb während der gesamten Fermentation konstant bei 37 °C. Das Antibiotikum Ampicillin wurde vor der Inokulation und im Verlauf der Kultivierung alle drei Stunden in einer Konzentration von 200 µg/ml zum Medium gegeben.

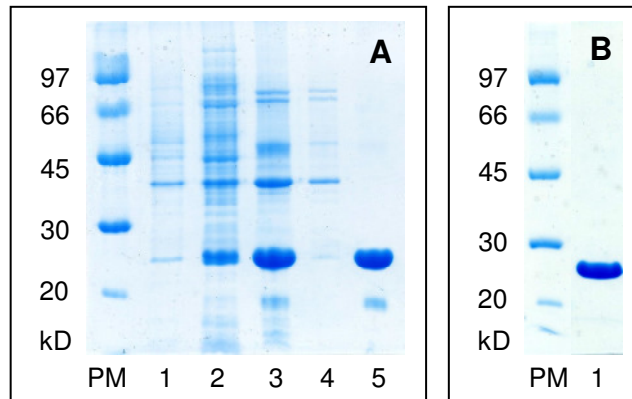
Bei einer optischen Dichte  $OD_{600} = 13$  war die Glukose des Startmediums vollständig aufgebraucht und es erfolgte die Zugabe von *feeding*-Lösung. Nach weiteren zwei Stunden und einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 46$  wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Im Gegensatz zum Gesamtrezeptor kam es bei der Expression des *loop*-Konstruktes nach Induktion nicht zum Abfall der optischen Dichte der Zellkultur. Nach drei Stunden Induktion ( $OD_{600} = 64$ ) wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet. Die Ausbeute an Feuchtzellmasse betrug 280 g aus ca. 4 Litern Kulturmedium. Der Verlauf der Änderung der optischen Dichte mit der Zeit ist in Abbildung 34 dargestellt.



**Abbildung. 34: Wachstumskurve von *E. coli* BL21 (DE3)  $c^+$  mit dem Fusionskonstrukt Loop\_nGLP-1R-pET15b während der *fed-batch* Fermentation.** Darstellung der Änderung der optischen Dichte bei 600 nm gegen die Zeit. Das schwarze Dreieck markiert den Zeitpunkt des Beginns des *feedings*, das rote Dreieck kennzeichnet den Zeitpunkt der Induktion der Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG.

Die *inclusion bodies* wurden nach dem Zellaufschluss mittels Hochdruckdispersion wie in Abschnitt 3.3.2b beschrieben isoliert. Die Ausbeute an *inclusion bodies* betrug 10 % bezogen auf die eingesetzte Zellmasse und lag damit deutlich höher im Vergleich zur isolierten N-terminalen Domäne. Für die Reinigung wurden 0.5 g *inclusion bodies* in 30 ml Solubilisierungspuffer über Nacht gelöst und anschließend über zwei Tage gegen 50 mM Natriumphosphat, pH 4.5, 20 mM SDS dialysiert. Die SDS-Konzentration im Dialysepuffer musste im Vergleich zur Dialyse des Gesamtzeptors und des nGLP-1R verdoppelt werden, da das *loop*-Konstrukt bei niedrigerer Detergenzkonzentration vollständig aggregierte. Mit Hilfe der IMAC konnten 80 mg Loop\_nGLP-1R aus 0.5 g *inclusion bodies* gereinigt werden. Dies entspricht einer zum nGLP-1R vergleichbaren Ausbeute.

Die Rückfaltung der Domäne erfolgte im 100 ml Maßstab analog zum Gesamtzeptor. Während der Renaturierung waren keine Aggregate sichtbar. Vor dem Aufkonzentrieren mit Hilfe von Amicon Membran-Konzentratoren wurde der Ansatz über Nacht gegen 2 Liter Puffer B dialysiert. Nachdem das Gesamtvolumen auf ein Drittel des Ausgangsvolumens reduziert wurde (ca. 30 ml), erfolgte eine erneute Dialyse gegen Puffer B. Wie in Abbildung 35 zu erkennen ist, lag das Fusionsprotein nach der Renaturierung bandenrein vor.

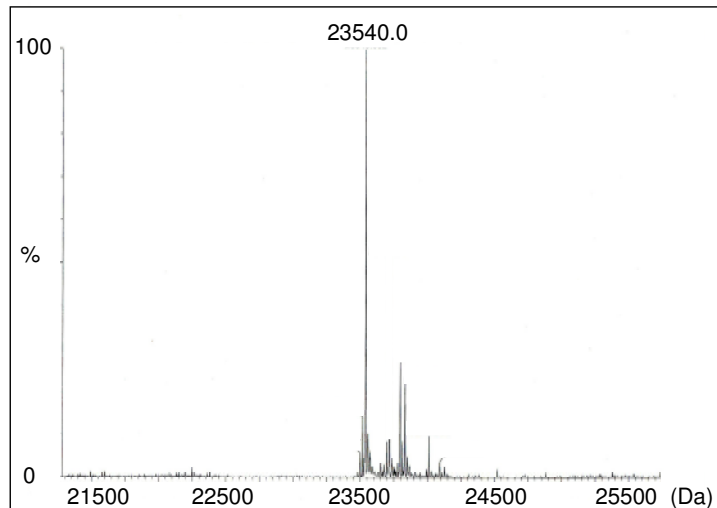


**Abbildung 35: SDS-gelelektrophoretische Analyse der Expression, Reinigung und Renaturierung des Fusionsproteins Loop\_nGLP-1R.** PM: Proteinstandard, **A:** 1: Zelldysat vor der Induktion, 2: Zelldysat nach der Induktion, 3: *inclusion bodies*, 4: Durchlauf der IMAC, 5: Elutionsfraktion der IMAC, **B:** 1: Loop\_nGLP-1R nach der Renaturierung.

#### 4.6.2 Identifizierung des Konstruktes Loop\_nGLP-1R

Eine erste Analyse der Identität des gereinigten Proteins erfolgte analog zu den anderen Proteinvarianten durch einen immunologischen Nachweis mit Hilfe der Antikörper Anti-Hexa-His und Anti-nGLP-1R. In beiden Fällen konnte das Protein nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestätigung des korrekten (theoretisch erwarteten) Molekulargewichts wurde eine Elutionsprobe der RP-HPLC des SDS-solubilisierten Loop\_nGLP-1R mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Hierbei konnte die korrekte Masse für die Domäne mit reduzierten Cysteinresten (23541 Da) detektiert werden (Abb. 36). Die Differenz von einem Dalton liegt innerhalb des Fehlers der Meßmethode und kann daher toleriert werden.

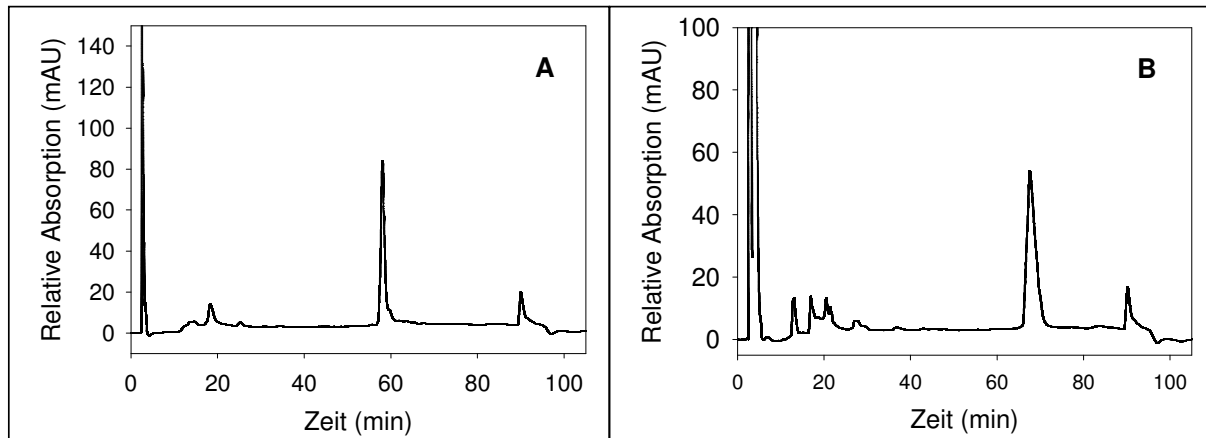


**Abbildung 36: Massenspektrum des analog zum Gesamtrezeptor renaturierten Loop\_nGLP-1R.** Für den Hauptpeak wurde ein Molekulargewicht von 23540 Da ermittelt, was der theoretisch erwarteten Masse des Konstruktes mit reduzierten Cysteinresten entspricht (23541 Da).

#### 4.6.3 RP-HPLC des Konstruktes Loop\_nGLP-1R

Mit Hilfe der RP-HPLC (siehe 3.2.7) sollte untersucht werden, ob Loop\_nGLP-1R in Abwesenheit bzw. Gegenwart von Denaturanzien ein unterschiedliches Laufverhalten aufweist. Das native Protein eluierte bei einer Retentionszeit von 58 min. Nach Dialyse der Probe gegen 6 M Guanidinhydrochlorid verschob sich die Retentionszeit um 9.5 Minuten zu 67.5 Minuten (Abb. 37). Dieses Ergebnis ist ein starkes Indiz dafür, dass die Domäne im Dialysepuffer B in einer vermutlich nativen Konformation vorlag. Die Gegenwart von Guanidinhydrochlorid führte zu einer Entfaltung des Proteins und somit zu einer stärkeren Interaktion mit dem hydrophoben Säulenmaterial.





**Abbildung 37: RP-HPLC des Fusionskonstruktes Loop\_nGLP-1R.** **A:** Chromatogramm nach Auftragung von 120 µg nativem Loop\_nGLP-1R in Puffer B. Die Retentionszeit betrug 67.5 min. **B:** Chromatogramm nach Auftragung von 100 µg denaturiertem (4.5 M Harnstoff, 2 % SDS, 25 mM β-Mercaptoethanol) Loop\_nGLP-1R. Das Protein eluierte bei einer Retentionszeit von 77 min.

#### 4.6.4 Analyse des Disulfidbrückenmusters des Konstruktes Loop\_nGLP-1R

Wie bereits erwähnt, konnte bislang nicht experimentell gezeigt werden, ob zwischen den Cysteinresten des ersten und zweiten *exoloops* des GLP-1-Rezeptors eine Disulfidbrücke ausgebildet wird. Um herauszufinden, ob die für den Gesamtrezeptor etablierte Renaturierung zu einer Verknüpfung der Cysteinreste führt, wurde das Fusionsprotein zunächst erneut auf die RP-HPLC-Säule geladen und die Elutionsfraktion bei 58 min gesammelt. Diese wurde mit Chymotrypsin verdaut und die daraus resultierenden Peptide mittels nano-HPLC / MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie aufgetrennt und analysiert. Die Bestimmung des Disulfidbrückenmusters erfolgte wie unter 3.2.7 beschrieben. Es konnte bestätigt werden, dass sowohl die Disulfidbrücken innerhalb der N-terminalen Domäne korrekt ausgebildet wurden als auch eine Verbrückung der Cysteinreste innerhalb der ersten beiden extrazellulären *loops* stattgefunden hatte (Tab. 14). Hierbei handelte es sich um die Positionen Cys<sup>187</sup> und Cys<sup>208</sup>. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die ersten beiden *exoloops* im GLP-1-Rezeptor durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Ein exemplarisches MALDI-TOF-Massenspektrum für diese kovalente Verknüpfung ist in Abbildung 38 dargestellt.

**Tabelle 14: Vergleich der berechneten und detektierten Molekulargewichte der disulfidverbrückten Peptide innerhalb der N-terminalen Domäne des GLP-1-Rezeptors.** Die bislang noch nicht experimentell nachgewiesene Disulfidbrücke zwischen dem ersten und zweiten *exoloop* befindet sich zwischen den Cysteinresten in Position 187-208.

<b>Brücke</b>	<b>Detektiertes Molekül (g/mol)</b>	<b>Berechnetes Molekül (g/mol)</b>	<b>Fehler (ppm)</b>	<b>1. Peptid (Sequenzbereich)</b>	<b>Detektiertes Molekül (g/mol)</b>	<b>2. Peptid (Sequenzbereich)</b>	<b>Detektiertes Molekül (g/mol)</b>
187-208	2403.958	2403.909	20	184-199	1392.551	200-207	1013.401
187-208	2387.899	2387.915	7	184-207	2387.899		
187-208	2127.801	2127.761	19	184-199	1392.564	202-207	738.243
187-208	2847.109	2847.11	0	180-199	1835.761	200-207	1013.371
85-126	2110.962	2110.928	16	79-85	804.386	119-130	1309.598
85-126	3378.606	3378.569	11	79-85	804.406	119-140	2577.222
85-126	3265.534	3265.485	15	79-85	804.419	119-139	2464.137
85-126	2495.143	2495.14	1	79-85	804.349	119-132	1693.816
85-126	2339.06	2339.039	9	79-85	804.371	119-131	1537.711
85-126	2282.081	2282.029	23	81-85	591.281	119-132	1693.822
62-104	1416.617	1416.603	10	60-64	640.287	102-108	779.389
46-71	2008.877	2008.886	4	41-46	846.436	68-78	1165.463
46-71	1852.814	1852.785	16	41-45	690.346	68-78	1165.462
46-71	1568.641	1568.626	10	44-46	406.187	68-78	1165.462

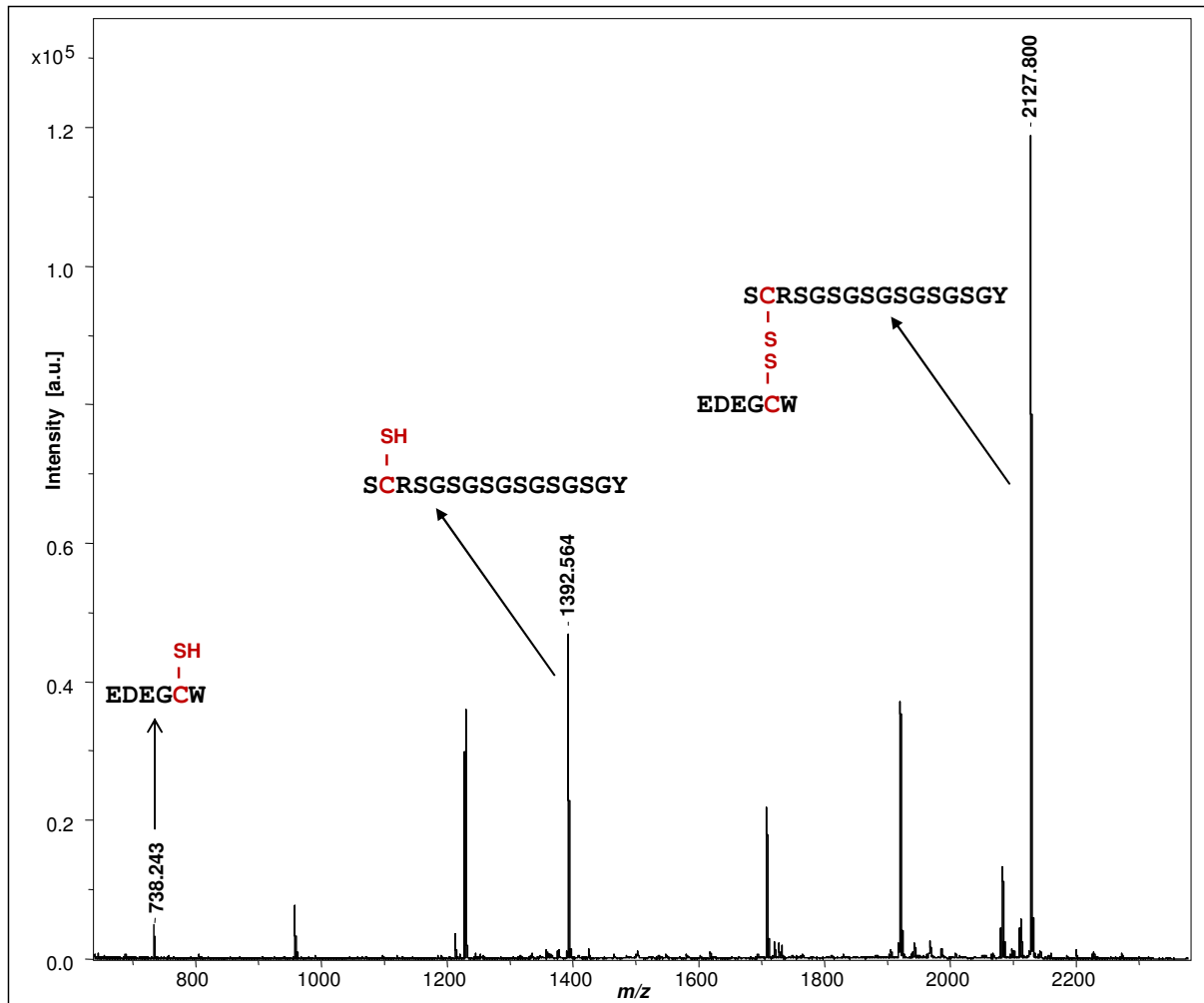
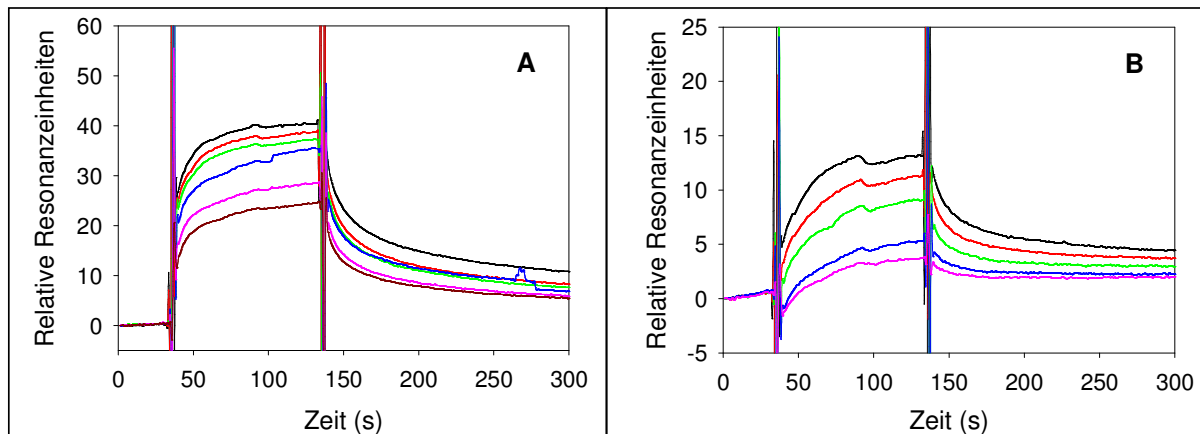


Abbildung 38: Massenspektrum (MALDI-TOF) einer nano-HPLC-Fraktion von proteolytisch behandeltem nGLP-1R. Zu erkennen ist sowohl das disulfidverbrückte Protein (2127.800 g/mol) als auch die beiden durch die Ionisierung reduzierten Einzelpeptide (1392.564 bzw. 738.243 g/mol). Bei dem hier dargestellten Spektrum handelt es sich um eine Verknüpfung zwischen den Cysteinseitenketten Cys<sup>187</sup> und Cys<sup>208</sup>.

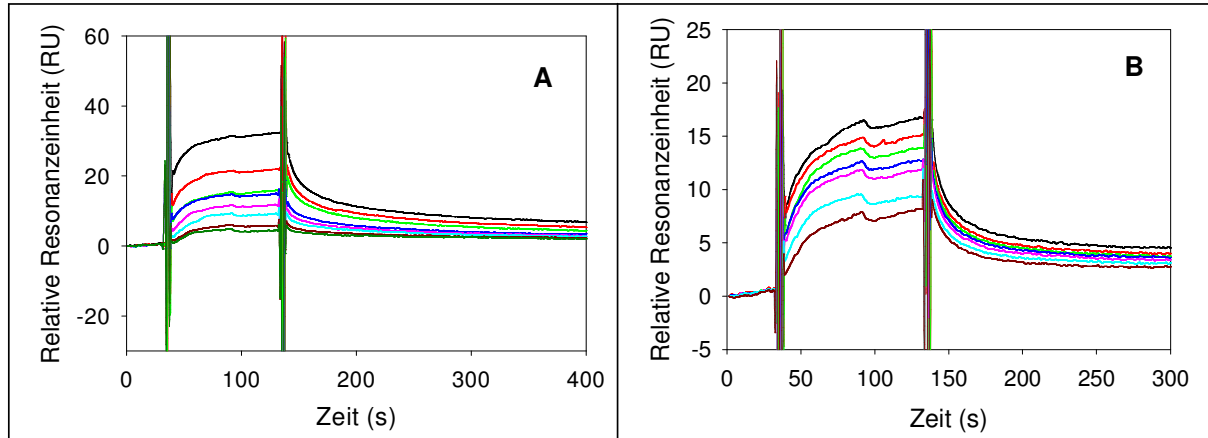
#### 4.6.5 Ligandenbindungsstudien des Konstruktes Loop\_nGLP-1R mittels Oberflächenplasmonresonanz

Mit Hilfe von Messungen am Biacore-Instrument sollte bestätigt werden, dass das *loop*-Konstrukt nach Renaturierung analog zum Gesamtrezeptor in einer nativen und funktionellen Form vorliegt und somit in der Lage ist, die Liganden GLP-1 und Exendin 4 zu binden. Abbildung 39 zeigt die Sensogramme der Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonresonanz des *loop*-Konstruktes. Das Protein weist eine konzentrationsabhängige Bindung an die Peptide Exendin 4 und GLP-1 auf. Bei der Messung an der mit PTH gekoppelten Flusszelle konnte keine Bindung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

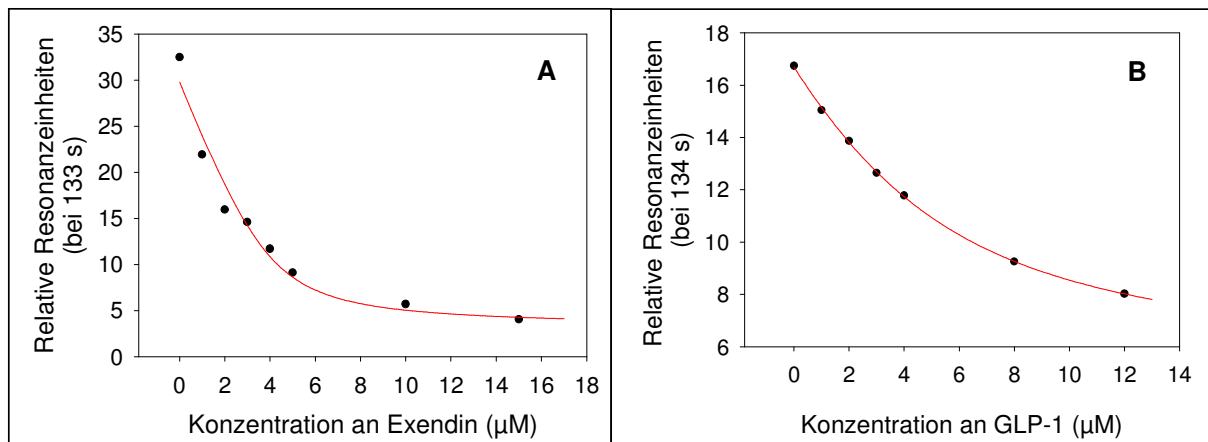


**Abbildung 39: Sensogramme der Biacore-Messungen der Bindung von Exendin 4 (A) bzw. GLP-1 (B) an Loop\_nGLP-1R.** Auf dem Sensorchip wurden 150 RU Exendin 4 und 600 RU GLP-1 immobilisiert. Die Resonanzsignale entsprechen der Injektion verschiedener Konzentrationen an Loop\_nGLP-1R (— 0,5 µM; — 1 µM, — 2 µM; — 3 µM; — 4 µM; — 4,9 µM).

Da aus den derart generierten Daten mit Hilfe der Evaluierungssoftware für Biacore T100 keine physikalisch sinnvollen Dissoziationskonstanten ermittelt werden konnten, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Dabei wurde eine konstante Konzentration an Loop\_nGLP-1R mit unterschiedlichen Konzentrationen GLP-1 bzw. Exendin 4 vorinkubiert und anschließend auf die jeweilige Chipoberfläche injiziert. Mit steigender Konzentration des zuvor zugegebenen Peptides konnte eine Abnahme des Resonanzsignals und damit eine Abnahme der Bindung an das immobilisierte Peptid beobachtet werden (Abb. 40). Die Auswertung der Konkurrenzexperimente mit Hilfe von Gleichung 16 ergab für die Konkurrenz mit Exendin 4 eine Dissoziationskonstante von  $0,46 \mu\text{M} \pm 0,30 \mu\text{M}$  und für die Konkurrenz mit GLP-1 einen  $K_D$ -Wert von  $3,10 \pm 0,27 \mu\text{M}$  (Abb. 41). Exendin 4 bindet demnach an das loop-Konstrukt mit sechsfach höherer Affinität im Vergleich zu GLP-1. Diese Eigenschaft wurde bislang nur für die isolierte N-terminale Domäne beschrieben (de Maturana *et al.*, 2003).



**Abbildung 40: Sensogramme der Biacore-Messungen der Konkurrenzexperimente des Konstruktes Loop\_nGLP-1R mit Exendin bzw. GLP-1. A:** Unterschiedliche Konzentrationen an freiem Exendin 4 (– 0 µM, – 1 µM, – 2 µM, – 3 µM, – 4 µM, – 5 µM, – 10 µM, – 15 µM) wurden mit 4 µM Loop\_nGLP-1R für 60 min bei 20 °C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Bindungsstärke der Komplexe an immobilisiertes Exendin 4. **B:** Inkubation von 4 µM Loop\_nGLP-1R mit unterschiedlichen Konzentrationen an freiem GLP-1 (– 0 µM, – 1 µM, – 2 µM, – 3 µM, – 4 µM, – 8 µM, – 12 µM) bei 20 °C für 60 min mit anschließender Analyse der Bindung der Komplexe an immobilisiertes GLP-1.

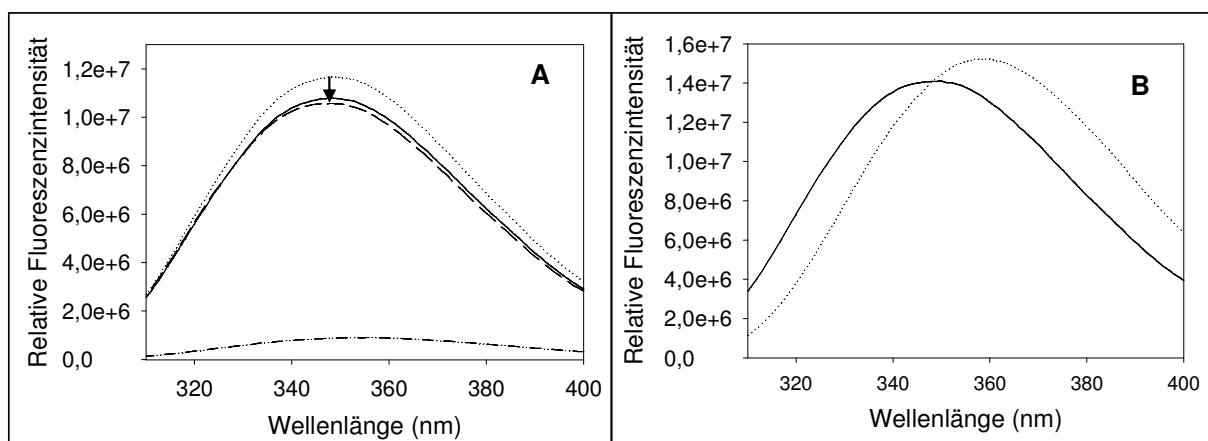


**Abbildung 41: Auswertung der Konkurrenzexperimente des Konstruktes Loop\_nGLP-1R mit (A) Exendin 4 am mit Exendin 4 beladenen Biacore-Chip bzw. (B) mit GLP-1 am GLP-1 beladenen Biacore-Chip.** Unterschiedliche Konzentrationen an freiem Exendin 4 bzw. GLP-1 wurden mit 4 µM GLP-1R in Puffer B für 60 min bei 20 °C vorinkubiert. Anschließend wurde die Bindung der Komplexe an den jeweils am Sensorchip immobilisierten Liganden untersucht. Die Auswertung der gegen die Konzentration an freiem Liganden aufgetragenen maximalen Resonanzsignale erfolgte unter Anwendung von Gleichung 16. Die berechneten Dissoziationskonstanten betragen für die Bindung von Exendin 4  $K_D = 0.46 \mu\text{M} \pm 0.30 \mu\text{M}$  und für GLP-1  $K_D = 3.10 \pm 0.27 \mu\text{M}$ .

#### 4.6.6 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen des Konstruktes Loop\_nGLP-1R

Um die Ergebnisse der Messungen am Biacore mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden fluoreszenzspektroskopische Bindungsstudien durchgeführt. Hierbei wurde zunächst die Stabilität des Fluoreszenzsignals über die Zeit untersucht. Wie bereits beim Gesamtrezeptor und auch bei der N-terminalen Domäne beobachtet, war das Signal über eine Messdauer von 7 Stunden nicht stabil (Daten nicht gezeigt). Daher wurde das Fusionsprotein über Nacht bei Raumtemperatur in der Messküvette vorinkubiert und am Folgetag Emissionsspektren unter Rühren aufgezeichnet. Nach dieser Vorbehandlung war das Fluoreszenzsignal über die Messdauer hinweg stabil. Mit der vorinkubierten Rezeptordomäne wurden Bindungsstudien durchgeführt. Die Zugabe von Exendin 4 führte zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität um 9.5 % (Abb. 42 A). Damit lag das Protein vermutlich in seiner funktionellen Form vor. Die Zugabe von stöchiometrischen Konzentrationen GLP-1 und PTH führten zu keiner Veränderung in der Fluoreszenzintensität des *loop*-Konstruktes (Daten nicht gezeigt).

Neben den Bindungsmessungen wurden Untersuchungen hinsichtlich der Tertiärstruktur durchgeführt (Abb. 42 B). Das native Protein weist dabei ein Fluoreszenzmaximum bei 348 nm auf. Nach Dialyse gegen 6 M Guanidinhydrochlorid kam es zu einer Verschiebung des Maximums zu 358 nm. Die zehn Tryptophanreste des *loop*-Konstruktes lagen demnach im Gegensatz zu Puffer B in GdmCl-haltigem Puffer weitgehend lösungsmittel exponiert vor.



**Abbildung 42: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen des Konstruktes Loop\_nGLP-1R: A:** Bindungsstudie: freie Rezeptordomäne (—), Rezeptordomäne im Komplex mit Exendin 4 (---), Exendin 4 (---) und berechnete Summe aus Rezeptordomäne und Exendin 4 (···), die Proteinkonzentration betrug jeweils 2  $\mu$ M, **B:** Emissionsspektren des nativen (—) Loop\_nGLP-1R in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 mM Brij78 und des denaturierten (···) Rezeptors in 50 mM Natriumphosphat, 6 M GdmCl, pH 7,4. Die Rezeptorkonzentration betrug 1,2  $\mu$ M.

## 5 Abschließende Diskussion

Die rekombinante Expression, Reinigung und gegebenenfalls Rückfaltung von Membranproteinen (MP) in eine native und funktionelle Form stellt im Vergleich zu löslich exprimierten cytoplasmatischen Proteinen eine besondere technische Herausforderung dar. Dies ist in erster Linie auf die amphiphile Natur dieser Proteine zurückzuführen, die eine funktionelle Rekonstitution der MP in membranähnlichen Systemen wie Mizellen, Liposomen oder Nanodisks<sup>TM</sup> erforderlich macht. Da große Proteinmengen Voraussetzung für Strukturuntersuchungen sind, ist es nicht überraschend, dass derzeit nur ca. 7 % aller Struktureinträge in der Proteindatenbank von Membranproteinen stammen (Junge *et al.*, 2008). Atomar aufgelöste Strukturen von MP aus Mammalia wurden erstmalig im Jahr 2000 veröffentlicht. Dabei wurde neben den Strukturen des Wasserkanals Aquaporin-1 (Murata *et al.*, 2000) und einer ATP-abhängigen Ionenpumpe (Toyoshima *et al.*, 2000) auch die erste Röntgenkristallstruktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (Rhodopsin, (Palczewski *et al.*, 2000)) veröffentlicht. Einer der wesentlichen Gründe für die erfolgreiche Kristallisation dieser drei Proteine lag in deren hohen zellulären Konzentrationen und der damit einhergehenden Möglichkeit der Anreicherung aus nativen Quellen begründet, wodurch eine rekombinante Expression und alle damit verbundenen Komplikationen umgangen werden konnten. Im Gegensatz zu diesen genannten MP muss die Mehrzahl der membranständigen Rezeptoren, Ionenkanäle und Transporter in Wirtszellen überexprimiert werden, um ausreichende Mengen an Protein für funktionelle und strukturelle Studien gewinnen zu können. Bei der Auswahl eines geeigneten Expressionssystems müssen verschiedene unabhängige Parameter berücksichtigt werden. Neben der Intention, funktionelles Protein in großer Menge im Wirtsorganismus zu erzeugen, spielen Kosten- und Zeitfaktoren für die Gewinnung des jeweiligen Zielproteins eine wichtige Rolle (siehe dazu auch 1.3).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der humane GLP-1 Rezeptor heterolog in *E. coli* in Form von *inclusion bodies* erfolgreich exprimiert. Diese unlöslichen Proteinaggregate wurden nachfolgend mit Hilfe des denaturierenden Detergenz SDS solubilisiert. Anschließend wurde der solubilisierte Rezeptor durch chromatographische Verfahren zur Homogenität gereinigt. Nach der Renaturierung des Rezeptors durch Austausch von SDS gegen das mildere Detergenz Brij78 und der Ausbildung des korrekten Disulfidbrückenmusters unter Verwendung eines Redoxshuffling-Systems, wurden strukturelle und funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Um ausschließen zu können, dass die nachweisbare

Funktionalität des Rezeptors nur auf die autonome Aktivität der hormonbindenden N-terminalen Domäne zurückzuführen ist, wurden zwei verkürzte Varianten des Rezeptors (N-terminale Domäne, N-terminale Domäne + Exoloops 1 und 2) analog zum Gesamtrezeptor gereinigt, renaturiert und funktionell charakterisiert. In diesem Kontext konnte eine bislang nicht beschriebene Disulfidverbrückung zwischen dem ersten und zweiten Exoloop nachgewiesen werden.

## 5.1 Expression und Renaturierung des GLP-1 Rezeptors

Die Expression von eukaryotischen Proteinen in prokaryotischen Systemen wird durch die Universalität des genetischen Codes ermöglicht. Abgesehen von wenigen Ausnahmen (Breitenberger *et al.*, 1985) kodiert ein gegebenes DNA-Basentriplett immer für die gleiche Aminosäure. Außer für Methionin und Tryptophan stehen für die meisten Aminosäuren mehrere Basenkombinationen zur Verfügung, deren Verwendung in den verschiedenen Organismen unterschiedlich stark variiert. Liegen große Unterschiede in der *codon usage* des Zielgens und des Expressionswirtes vor, so kann dies zu einem frühzeitigen Abbruch der Translation oder zum Einbau falscher Aminosäuren führen (Kurland *et al.*, 1996). Die Analyse der für den humanen GLP-1 Rezeptor kodierenden DNA hinsichtlich der für *E. coli* typischen *codon usage* ergab, dass für 17 % der Triplets weniger als 10 % tRNAs (im Vergleich zu 100 % im eukaryotischen System) für die Translation zur Verfügung stehen. Expressionsversuche unter Verwendung von DNA mit nativer (humaner) Basensequenz hatten im Gegensatz zur isolierten N-terminalen Domäne (Bazarsuren *et al.*, 2003) zu keiner nachweisbaren Expression des GLP-1 Gesamtrezeptors in *E. coli* geführt (Schröder 2004). Aus diesem Grund wurde die DNA für die Expression im prokaryotischen System optimiert. Bei GC-reichen Sequenzen kommt es zudem sehr häufig zur Ausbildung von stabilen Sekundärstrukturelementen innerhalb der mRNA. Diese können in Abhängigkeit von ihrer Entfernung zum Start-Methionin (AUG) die Initiation der Translation behindern (Liebhaber *et al.*, 1992). Durch die Optimierung der für den GLP-1 Rezeptor kodierenden DNA-Sequenz wurde der GC-Gehalt von 57 % auf 52 % reduziert.

Die ersten 23 N-terminalen Aminosäuren kodieren für eine Signalsequenz (SwissProt Datenbank), welche die Translokation des Rezeptors durch die Membran des endozytoplasmatischen Retikulums nach der Proteinbiosynthese steuert und anschließend abgespalten wird (Voet *et al.*, 1995). Aus diesem Grund beginnen die in dieser Arbeit untersuchten Proteinvarianten N-terminal mit der Aminosäure Arginin 24.



Nachdem Expressionsversuche im kleineren Maßstab (Schüttelkolben) zu keiner nachweisbaren Menge an GLP-1 Rezeptor führten, wurden Hochzeldichtefermentationen im sechs Liter Maßstab bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C durchgeführt. Aus dem so gewonnenen Zellmaterial konnte wiederum kein Rezeptor isoliert werden. Allerdings wurde während der Expressionsphase eine starke Abnahme der Zelldichte beobachtet. Möglicherweise wurde das Rezeptorprotein in geringen Mengen in *E. coli* hergestellt und in die Zellmembran eingebaut. Dies könnte eine Veränderung der Membraneigenschaften hervorrufen und einen toxischen Effekt auf die Wirtszelle erklären (Laage *et al.*, 2001). Die Erhöhung der Expressionstemperatur von 37 °C auf 42 °C führte schließlich zu einer nachweisbaren Produktion des GLP-1R in Form von *inclusion bodies*.

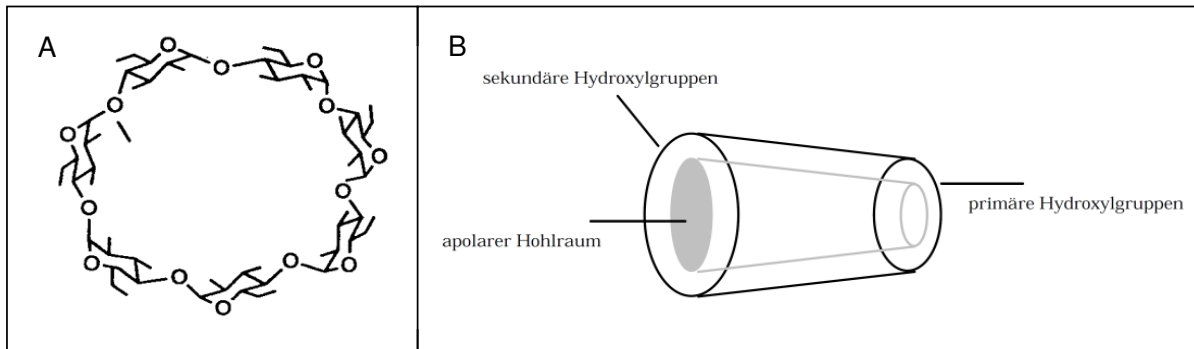
Die isolierten *inclusion bodies* des Rezeptors wurden unter stark denaturierenden und reduzierenden Bedingungen solubilisiert. SDS stabilisiert durch seine hydrophoben Anteile die Transmembranbereiche des Rezeptors, die vermutlich in  $\alpha$ -helicaler Form vorliegen. Anschließend wurden die solubilisierten *inclusion bodies* in einen SDS-haltigen Puffer mit niedrigem pH-Wert umgepuffert. Dadurch wurde eine Oxidation der Cysteine vor der Renaturierung verhindert. Da die *inclusion bodies* hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung sehr inhomogen waren, musste der GLP-1 Rezeptor vor der Renaturierung aus diesem Proteingemisch zur Homogenität gereinigt werden. Dies gelang durch die Verwendung einer N-terminalen Histidinfusion mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie. Auf diese Weise konnten aus einem Liter Fermentationskultur ca. 70 – 80 mg GLP-1 Rezeptor gereinigt werden. Damit ist die Ausbeute geringer als die für andere GPCR beschriebenen Proteinausbeuten (Michalke *et al.*, 2009). Für die von Michalke *et al.* beschriebene heterologe Expression und Reinigung verschiedener Rezeptoren konnten Ausbeuten von 100 – 350 mg Protein pro Liter Zellkultur erreicht werden.

Die Renaturierung des Rezeptors erfolgte durch schnelle Verdünnung in einen argininhaltigen Puffer. Dieses niedermolekulare Additiv erwies sich als besonders geeignet für die Rückfaltung des GLP-1 Rezeptors. Bislang konnte nicht eindeutig geklärt werden, worauf die stabilisierende Wirkung dieser Aminosäure beruht, man vermutet jedoch, dass sie nur einen geringen Effekt auf das Faltungsgleichgewicht von Proteinen hat (Arakawa *et al.*, 2003; Taneja *et al.*, 1994). Daher wurde postuliert, dass L-Arginin die Löslichkeit von ungefaltetem Protein und Faltungsintermediaten erhöht und somit deren Aggregation verhindert (Buchner *et al.*, 1991; Rudolph *et al.*, 1997). BAYNES und Coautoren beschreiben die Wirkung von L-Arginin mit dem so genannten *Gap*-Effekt (Baynes *et al.*, 2005). Dieser besagt, dass L-Arginin selektiv die Energiebarriere für die Ausbildung von Protein-Protein-Komplexen

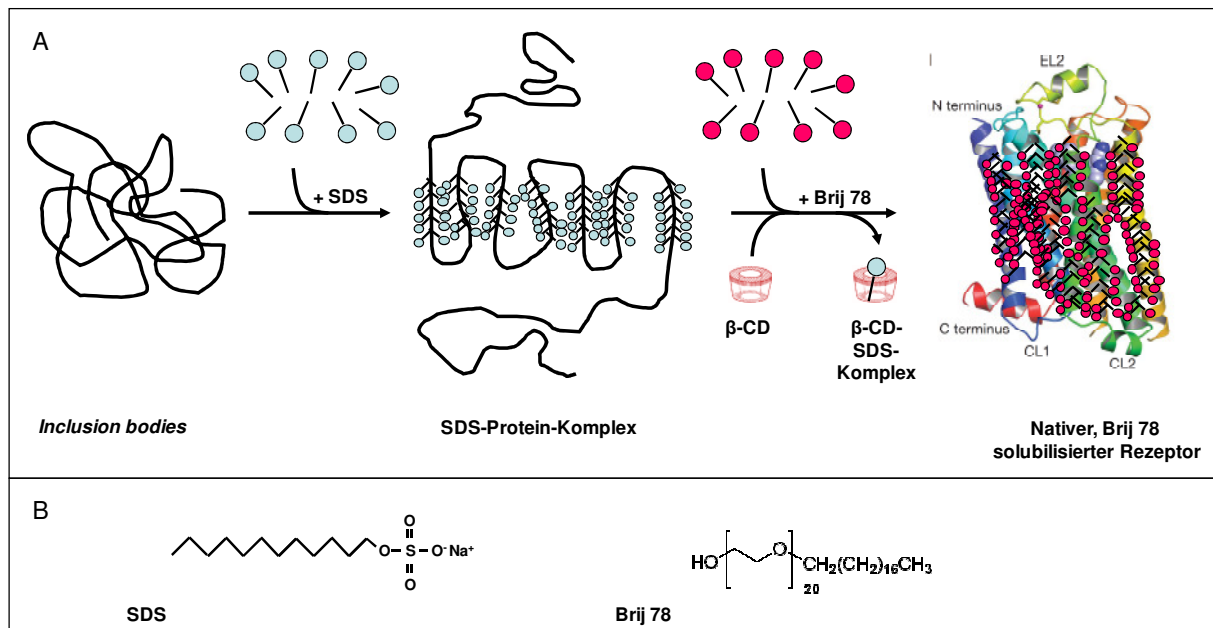
erhöht, während die freie Energie eines einzelnen Proteinmoleküls gar nicht oder nur geringfügig beeinflusst wird.

Während der Renaturierung musste ein Austausch des denaturierenden SDS gegen das mildere Detergenz Brij78 erfolgen. Um eine quantitative Dissoziation von SDS vom Rezeptorprotein zu gewährleisten, wurde dem Rückfaltungspuffer  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD) zugesetzt (Abb. 44). Cyclodextrine gehören zu den zyklischen Oligosacchariden und bestehen aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosemolekülen. Dadurch entsteht eine ringartige Struktur mit einem zentralen Hohlraum, in dem hydrophobe Moleküle komplexiert werden können. Cyclodextrine können aus sechs ( $\alpha$ -CD) bis neun ( $\delta$ -CD) Glukoseeinheiten bestehen. Mittels isothermaler titrationskalorimetrischer Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass ein aus sieben Glukosemolekülen bestehendes  $\beta$ -Cyclodextrin für die Komplexierung von SDS besonders gut geeignet ist (Daten nicht gezeigt). Abbildung 43 stellt den molekularen bzw. räumlichen Aufbau dieses  $\beta$ -Cyclodextrins schematisch dar.

Diese Strategie der Rückfaltung wird als *artificial chaperon* unterstützte Renaturierung bezeichnet und wurde erstmals 1995 von Rozema und Gellman beschrieben (Rozema *et al.*, 1995). Hierbei erfolgt zunächst eine Stabilisierung der hydrophoben Proteinbereiche mit Hilfe von Detergenzien. Dadurch wird eine Aggregation des nicht-nativen Proteins weitgehend verhindert. Die Initiation der Renaturierung erfolgt durch die quantitative Entfernung des Detergenz unter Einsatz von Cyclodextrin. Mit dieser Methode wurden zunächst cytosolische Proteine wie die Citratsynthase und Lysozym erfolgreich renaturiert (Daugherty *et al.*, 1998). Inzwischen konnte die *artificial chaperon* unterstützte Renaturierung auch für die Rückfaltung von Membranproteinen, wie zum Beispiel den humanen Parathormon-Rezeptor eingesetzt werden (Oschmann 2008).



**Abbildung 43: Aufbau des aus 7 Glukosemolekülen bestehenden β-Cyclodextrins.** A: Anordnung der α-1,4-glykosidisch verknüpften Glukosemoleküle im β-Cyclodextrin-Molekül. B: Räumliche Darstellung des β-CD in Form eines hohlen Kegelstumpfes. Die Methyl- und Glykosidgruppen bilden eine Höhlung mit hoher Elektronendichte, welche lipophile Moleküle ganz oder teilweise aufnehmen kann. Der Innenraum weist einen Durchmesser von 0.78 nm auf.



**Abbildung 44: Vereinfachte Darstellung der Rückfaltung des GLP-1-Rezeptors mit Hilfe des artificial chaperon systems.** A: Inclusion bodies des GLP-1-Rezeptors werden mit Hilfe des Detergenz SDS solubilisiert. Dies führt zu einer Stabilisierung der α-helikalen Transmembranhelices des Proteins. Durch die Zugabe von β-CD wird das denaturierend wirkende SDS komplexiert und das mildere Detergenz Brij 78 lagert sich an die TM an. Die Wirkung von DTT und Glutathion wird in dieser Darstellung nicht berücksichtigt. B: Molekülstrukturen der Detergenzien SDS und Brij 78. SDS gehört zu den ionischen Detergenzien und weist eine anionische Kopfgruppe (negativ geladene Sulfatgruppe) auf. Brij 78 zählt zu den nicht-ionischen, nicht-denaturierenden Detergenzien (Srirama and Bhairi 2001). Die Anlagerung von Brij 78 an die hydrophoben TM des Rezeptors ermöglicht eine Stabilisierung des Proteins in seiner nativen funktionellen Form.

Der GLP-1-Rezeptor enthält insgesamt 17 Cysteine, wobei acht davon in den putativ extrazellulär gelegenen Bereichen des Proteins lokalisiert sind. Innerhalb der hormonbindenden N-terminalen Domäne konnten bereits drei definierte Disulfidbrücken nachgewiesen werden (Bazarsuren *et al.*, 2002). Für die korrekte Ausbildung dieser kovalenten Verknüpfungen muss dem Rückfaltungspuffer ein *redox shuffling* System in Form von reduziertem und oxidiertem Glutathion zugesetzt werden. Diese niedermolekularen Reagenzien katalysieren die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion und beschleunigen so die Ausbildung des nativen Disulfidbrückenmusters eines Proteins (Ahmed *et al.*, 1975).

Kinetisch betrachtet ist die Renaturierung eine monomolekulare Reaktion erster Ordnung, deren Umsatz von der Konzentration des eingesetzten denaturierten Proteins abhängig ist (Schellenberger 1989). Durch eine Erhöhung der Konzentration von denaturiertem Protein im Faltungsansatz kann demnach auch die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein gesteigert werden. Während der *in vitro* Rückfaltung steht die Renaturierung des denaturierten Proteins in Konkurrenz mit dessen Aggregation, die einen Prozess höherer Ordnung darstellt (Zettlmeissl *et al.*, 1979). Dadurch wird auch dieser Prozess mit zunehmender Konzentration an entfaltetem Protein begünstigt. Um die Renaturierung gegenüber der Aggregation zu begünstigen, wird die Rückfaltungsreaktion in der Regel bei niedrigen Temperaturen (~ 15 °C) durchgeführt. Da SDS bei Temperaturen unterhalb von 20 °C in wässrigem Milieu ausfällt, musste die Rückfaltung des Rezeptorproteins bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Um eine Aggregation des Proteins weitgehend zu unterdrücken, wurde eine finale Proteinkonzentration im Rückfaltungsansatz von 0.1 mg/ml nicht überschritten. Unter den genannten Bedingungen konnte die Bildung von sichtbaren Aggregaten verhindert werden. Die Identität des Proteins konnte mittels *Western-blotting* Analyse und massenspektrometrischer Analyse des tryptisch verdauten Rezeptors nachgewiesen werden.

## 5.2 Biophysikalische Charakterisierung des GLP-1-Gesamtrezeptors

Nach der erfolgreichen Expression, Reinigung und Renaturierung des GLP-1-Rezeptors wurden zur Charakterisierung der Sekundär- und Tertiärstruktur Circular dichroismus-spektroskopische und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Zunächst wurden Circular dichroismus-Spektren des renaturierten Proteins im Fern-UV Bereich aufgenommen und hinsichtlich der relativen Anteile von Sekundärstrukturelementen quantitativ analysiert (Programm CDNN, (Böhm *et al.*, 1992)). Für das native, rückgefaltete

Protein konnten dabei 44 %  $\alpha$ -Helices und 13 %  $\beta$ -Faltblattstruktur abgeschätzt werden. Der in SDS solubilisierte Rezeptor weist sogar einen etwas höheren Anteil an  $\alpha$ -Helices (51 %) auf. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da SDS hydrophobe Proteinbereiche und damit die TM von membranständigen Rezeptoren stabilisieren kann. Interessanterweise liegt der aus Detergenzien in Guanidin-Hydrochlorid-haltigen Puffer überführte GLP-1 Rezeptor nicht als vollständig entfaltete Polypeptidkette vor. Eine Ursache hierfür könnte die geringe *cmc* des Detergenz Brij 78 sein, das bei der Dialyse des nativen Proteins möglicherweise nicht vollständig entfernt werden konnte und somit weiterhin Transmembranbereiche des Rezeptors strukturell stabilisieren kann.

Um qualitative Aussagen zur Ausprägung einer korrekten Tertiärstruktur des renaturierten Rezeptors vornehmen zu können, wurde die intrinsische Tryptophanfluoreszenz des nativen vergleichend zu der des denaturierten Proteins analysiert. Nach der selektiven Anregung der Tryptophanfluoreszenz bei 295 nm konnte eine starke Rotverschiebung des Fluoreszenz-Emissionsmaximums des denaturierten Proteins ( $\lambda_{\max} = 351$  nm) im Vergleich zum nativen Zustand ( $\lambda_{\max} = 341$  nm) beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist indikativ für einen definiert gefalteten Zustand des GLP-1 Rezeptors nach Renaturierung, erlaubt aber keine Aussagen zur Funktionalität. Vergleichbare spektroskopische Ergebnisse wurden auch für andere Transmembranproteine, wie zum Beispiel für Toc 75, einem Translokon in Chloroplasten, und für das Porin OmpA beschrieben (Rogl *et al.*, 1998; Surrey *et al.*, 1992).

### **5.3 Analyse der Wechselwirkung des renaturierten humanen GLP-1 Gesamtrezeptors mit Liganden**

Nach der Reinigung und Rückfaltung des GLP-1 Rezeptors sollte weiterhin untersucht werden, ob das Protein in seiner nativen und funktionellen Form gewonnen werden konnte. Dazu wurden zunächst fluoreszenzspektroskopische Ligandenbindungsstudien (statische Fluoreszenzlöschung der intrinsischen Rezeptorfluoreszenz im Protein-Ligand Komplex) durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass der rückgefaltete Rezeptor sowohl das natürlich vorkommende Peptid GLP-1 als auch den Agonisten Exendin 4 mit hoher Affinität bindet. Durch Kontrollmessungen mit Peptidhormonliganden anderer GPCR (Parathormon, PTH; Neuropeptid Y, NPY), in denen eine Fluoreszenzlöschung nicht nachweisbar war, konnte eine unspezifische Bindung von GLP-1 und Exendin 4 an den Rezeptor ausgeschlossen werden.

Die quantitative Charakterisierung der Bindung von GLP-1 und Exendin 4 an den GLP-1 Rezeptor erfolgte anschließend mit Hilfe von Fluoreszenztitrationsexperimenten und Oberflächenplasmonresonanzmessungen. Durch fluoreszenzspektroskopische Analyse nach Titration von Exendin 4 zum GLP-1R konnte eine Dissoziationskonstante von  $116 \pm 18$  nM ermittelt werden. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit der für Exendin 4 berechneten Dissoziationskonstanten ( $99$  nM bzw.  $180$  nM  $\pm$   $60$  nM in Konkurrenzexperimenten), die in Oberflächenplasmonresonanzexperimenten bestimmt werden konnten. Somit konnten für den GLP-1 Rezeptor unter Verwendung von zwei völlig unabhängigen quantitativen Methoden vergleichbare Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich ermittelt werden. Die Verwendung der Oberflächenplasmonresonanz als Methode zur Analyse der Ligandenbindung eines GPCR wurde bislang nur für den Neurotensinrezeptor Typ 1 beschrieben (Harding *et al.*, 2007). Die Berechnung von Bindungskonstanten aus Konkurrenzexperimenten wurde bis dato noch für keinen anderen G-Protein-gekoppelten Gesamtrezeptor veröffentlicht.

Wie bereits in Abschnitt 4.4.1 beschrieben, weichen die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Dissoziationskonstanten von Peptidliganden des GLP-1 Rezeptors von den in der Literatur mit anderen Methoden beschriebenen ab. Die mit Hilfe von radioaktiven Liganden an isolierten pankreatischen  $\beta$ - bzw. transfizierten HEK 293 Zellen bestimmten  $K_D$ -Werte liegen im einstelligen nanomolaren Bereich. Eine Ursache für die apparente Diskrepanz der Bindungskonstanten könnte zum einen die notwendige Renaturierung des als *inclusion bodies* exprimierten GLP-1-Rezeptors sein, die möglicherweise nicht in der korrekten Ausbildung der biologisch relevanten Konformation resultierte. Weiterhin könnte das Ausbleiben von funktionell relevanten posttranslationalen Proteinmodifikationen in *E. coli* im Gegensatz zum eukaryotischen Expressionssystem eine wichtige Rolle spielen. Der GLP-1 Rezeptor besitzt innerhalb seiner N-terminalen Domäne drei (Asn<sup>63</sup>, Asn<sup>82</sup> und Asn<sup>115</sup>) und im ersten Exoloop zwei weitere (Asn<sup>185</sup> und Asn<sup>186</sup>) potentielle Glykosylierungsstellen. Göke *et al.* konnte 1994 zeigen, dass der in RINm5F Zellen (eine Insulin-produzierende Tumorzelllinie) exprimierte GLP-1-Rezeptor nach Behandlung mit der Glykopeptidase F ein deutlich geringeres Molekulargewicht aufwies (Göke *et al.*, 1994). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass der GLP-1-Rezeptor ein Glykoprotein mit N-glykosidisch verknüpften Oligosacchariden darstellt. Außerdem führte die Behandlung der Zellkultur mit Tunicamycin, einem Inhibitor für die GlcNAc Phosphotransferase (GPT), zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der GLP-1 Bindung an die RINm5F Zellen. Das Ausbleiben der Glykosylierung in *E. coli* könnte eine weitere Erklärung für die geringere Bindungsaffinität des heterolog exprimierten und

rückgefalteten GLP-1-Rezeptors sein. Die Notwendigkeit einer korrekten Glykosylierung von GPCR hinsichtlich biologischer Funktionalität wurde auch für andere Proteine dieser Klasse, wie zum Beispiel den humanen CRLR (*Calcitonin receptor-like receptor*) beschrieben (Kamitani *et al.*, 2001).

#### **5.4 Herstellung und Charakterisierung von verkürzten Varianten des GLP-1 Rezeptors und Vergleich mit dem Gesamtrezeptor**

Die für den renaturierten Gesamtrezeptor ermittelten Dissoziationskonstanten der Peptidliganden sind mit denen der rekombinant in *E. coli* hergestellten N-terminalen Domäne vergleichbar (Bazarsuren *et al.*, 2002; Bazarsuren *et al.*, 2003). Dadurch ergibt sich die prinzipielle Möglichkeit, dass die für den Gesamtrezeptor ermittelten Konstanten ausschließlich auf die autonome Funktion (Ligandenbindung) der extrazellulären Domäne zurückzuführen sein könnten. Um diese Vermutung ausschließen zu können, wurden zwei verkürzte Varianten des GLP-1R (N-terminale Domäne, N-terminale Domäne + Exoloops 1 und 2) rekombinant in *E. coli* exprimiert und analog zum Gesamtrezeptor gereinigt, renaturiert und funktionell charakterisiert. Im Falle der N-terminalen Domäne betrug die Ausbeute dabei 520 mg, beim Loop-Konstrukt 560 mg gereinigtes Protein aus einem Liter Fermentationsmedium. Damit stand aus jeweils einer Kultivierung genug Protein für alle folgenden Versuche zur Verfügung.

Die Identität und Integrität beider Proteinvarianten konnte mittels *Western-blotting* und massenspektrometrischer Analyse nachgewiesen werden. Mit Hilfe der *Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography* wurde die Homogenität der renaturierten Proteine überprüft. Dabei zeigten beide Varianten jeweils einen einzelnen Elutionspeak. Die mit Harnstoff und  $\beta$ -Mercaptoethanol behandelten Domänen wiesen eine um ca. 10 min längere Retentionszeit auf der RP-HPLC Säule auf. Für die N-terminale Domäne stand zudem eine authentische, nach veröffentlichten Protokollen renaturierte, native Probe zur Verfügung. Letztere und die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Domäne zeigten ein identisches Laufverhalten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das für den Gesamtrezeptor etablierte Solubilisierungs- und Renaturierungsprotokoll zu einer homogenen Spezies von nativer N-terminaler Domäne (+/- Exoloops) führt.

Innerhalb der Klasse B der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren befinden sich in der N-terminalen Domäne sechs konservierte Cysteine, welche eine wichtige strukturelle Rolle für

das native Protein spielen (Knudsen *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 1997). Für den Gesamtrezeptor konnten trotz intensiver Bemühungen keine experimentellen Bedingungen für eine erfolgreiche Elution von einer RP-HPLC Säule gefunden werden (Daten nicht gezeigt), wodurch die Bestimmung bzw. Analyse der Disulfidverbrückung für das Protein erschwert ist. Die Ausbildung des korrekten Disulfidbrückenmusters konnte im Rahmen dieser Arbeit nur indirekt über die Analyse der beiden verkürzten Rezeptorvarianten antizipiert werden. Beide Proteine wurden nach Elution von der RP-HPLC Säule mit Trypsin verdaut und die daraus resultierenden Peptide wurden massenspektrometrisch analysiert. Dabei konnte für die N-terminale Domäne eine korrekte Verbrückung aller sechs Cysteinreste detektiert werden. Eine kovalente Disulfidverbrückung wurde für folgende Cystein-Paare nachgewiesen: Cys<sup>46</sup>-Cys<sup>71</sup>, Cys<sup>62</sup>-Cys<sup>104</sup> und Cys<sup>85</sup>-Cys<sup>126</sup>. Dieses Ergebnis impliziert, dass auch im renaturierten Gesamtrezeptor höchstwahrscheinlich eine korrekte Verbrückung der Cysteinreste innerhalb der N-terminalen Domäne vorliegt, da identische Rückfaltungsbedingungen für den Gesamtrezeptor und die isolierte Domäne eingesetzt wurden. Eine bis dato ungeklärte Frage war, ob zwischen Cysteinresten des ersten und zweiten Exoloops eine Disulfidbrücke ausgebildet wird. Nach der Renaturierung der Loop-Variante analog zum Gesamtrezeptor konnte diese kovalente Verknüpfung erstmalig nachgewiesen werden (Cys<sup>187</sup>-Cys<sup>208</sup>).

Neben den strukturellen Untersuchungen wurden Ligandenbindungsstudien mit den verkürzten Rezeptorvarianten durchgeführt. Dabei konnte mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanz-basierten Experimenten für die N-terminale Domäne eine Bindungskonstante für den Liganden GLP-1 von ca. 1  $\mu$ M ermittelt werden. Für die Loop-Variante wurde für die Bindung von GLP-1 eine Dissoziationskonstante von ca. 3  $\mu$ M und für die Bindung von Exendin 4 von ca. 0.5  $\mu$ M ermittelt werden. Damit weisen die isolierten Domänen im Vergleich zum Gesamtrezeptor eine deutlich verringerte Affinität (größere Dissoziationskonstanten) auf. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass an der Bindung des Liganden an den Gesamtrezeptor neben den extrazellulären Domänen auch die Transmembranhelices beteiligt sind und das renaturierte Protein demnach in seiner nativen, funktionellen Form vorlag. Die höhere Affinität des Loop-Konstruktes für Exendin 4 im Vergleich zu GLP-1 steht im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten (de Maturana *et al.*, 2003).



## 5.5 Ausblick

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stehen im Fokus der pharmazeutischen Industrie, da derzeit bis zu 50 % der verkauften Medikamente auf diese Proteinklasse wirken. Bedingt durch den komplexen Aufbau von GPCR, welcher sowohl hydrophobe, als auch hydrophile Proteinbereiche umfasst, stellt deren funktionelle und strukturelle Analyse eine besondere Herausforderung dar.

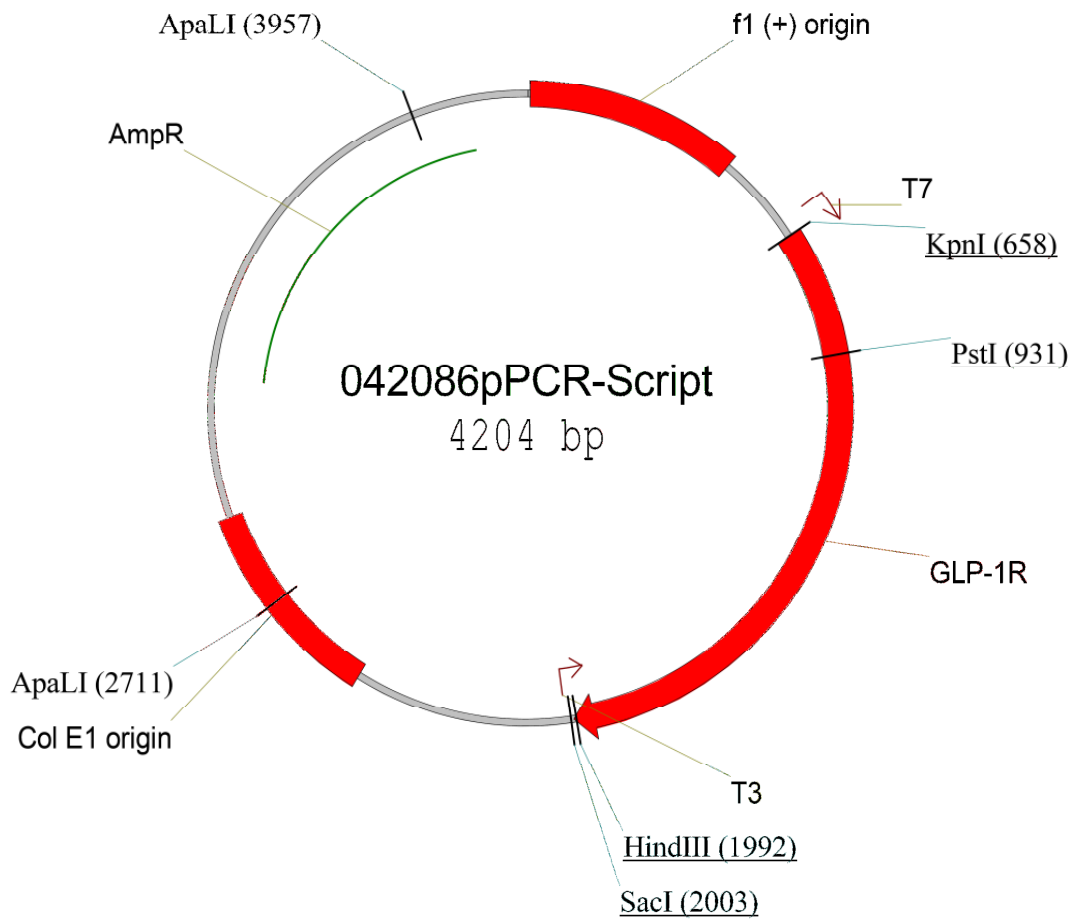
Die in dieser Arbeit etablierten Protokolle zur Produktion, Reinigung und Renaturierung des GLP-1-Rezeptors bilden eine wichtige Grundlage für weiterführende Arbeiten. Begründet durch die kurze Haltbarkeit des Rezeptors im mizellären Stadium sind für eine mögliche Kristallisierung proteinstabilisierende Modifikationen nötig. Erste Arbeiten dazu wurden von Romy Schneider im Rahmen ihrer Diplomarbeit gemacht (Schneider 2008). Dabei wurde versucht, die Stabilität des Rezeptors durch Abtrennung der C-terminalen Domäne zu erhöhen. Diese Verkürzung wurde für alle veröffentlichten, nicht-rhodopsinogenen GPCR-Strukturen beschrieben (Rasmussen *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2007; Warne *et al.*, 2008). Die lange und flexible intrazelluläre Schleife 3 könnte ein weiterer Angriffspunkt zur Erhöhung der Proteinstabilität sein. Der Einbau von gut kristallisierenden Proteinen unter gleichzeitiger Verkürzung der Schleife half bei der Kristallisierung der GPCR  $\beta_2$ AR und  $A_{2A}$ AR. MARTIN *et al.* berichteten kürzlich von der Stabilisierung des Grundzustandes des BLT1R durch den Einbau einer Metallbindungsstelle, welche die dritte und sechste TM des Rezeptors miteinander verbindet. Dadurch konnten die durch Ligandenbindung induzierten Molekülbewegungen reduziert werden (Martin *et al.*, 2009).

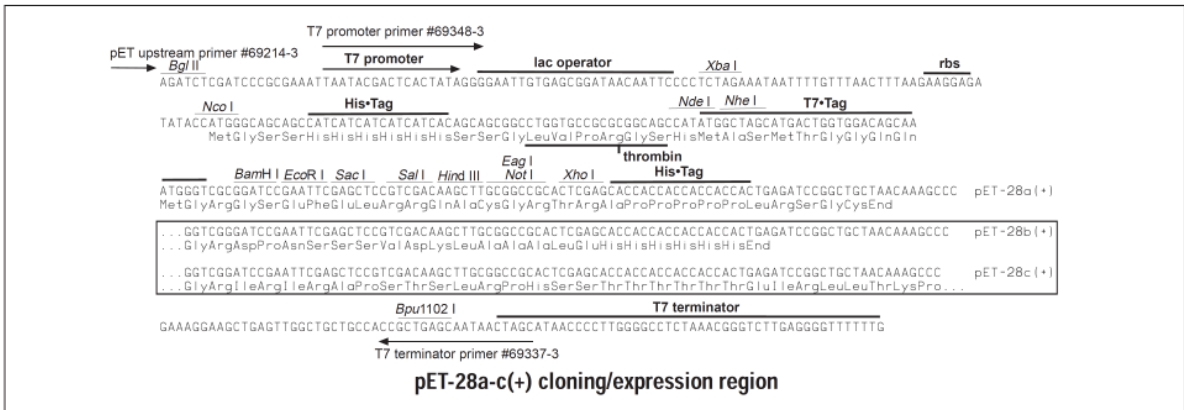
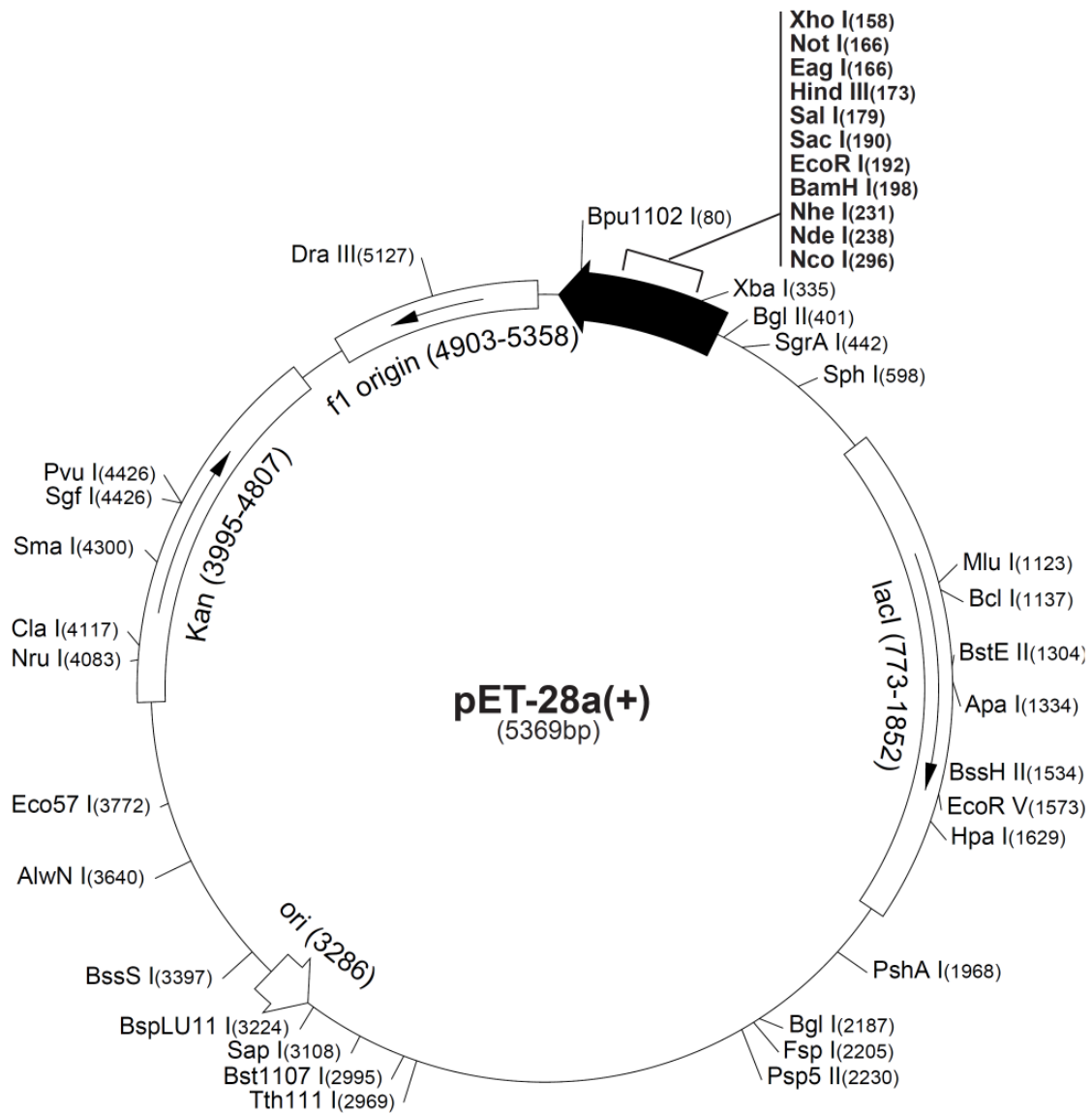
Unabhängig von diesen Arbeiten sollte untersucht werden, ob der GLP-1R in funktioneller Form exprimiert werden kann. Dadurch könnte die zeitaufwendige Renaturierung umgangen werden. Eine lösliche Expression in *E. coli* wurde bereits für den Neurotensinrezeptor Typ 1 beschrieben (Harding *et al.*, 2007).

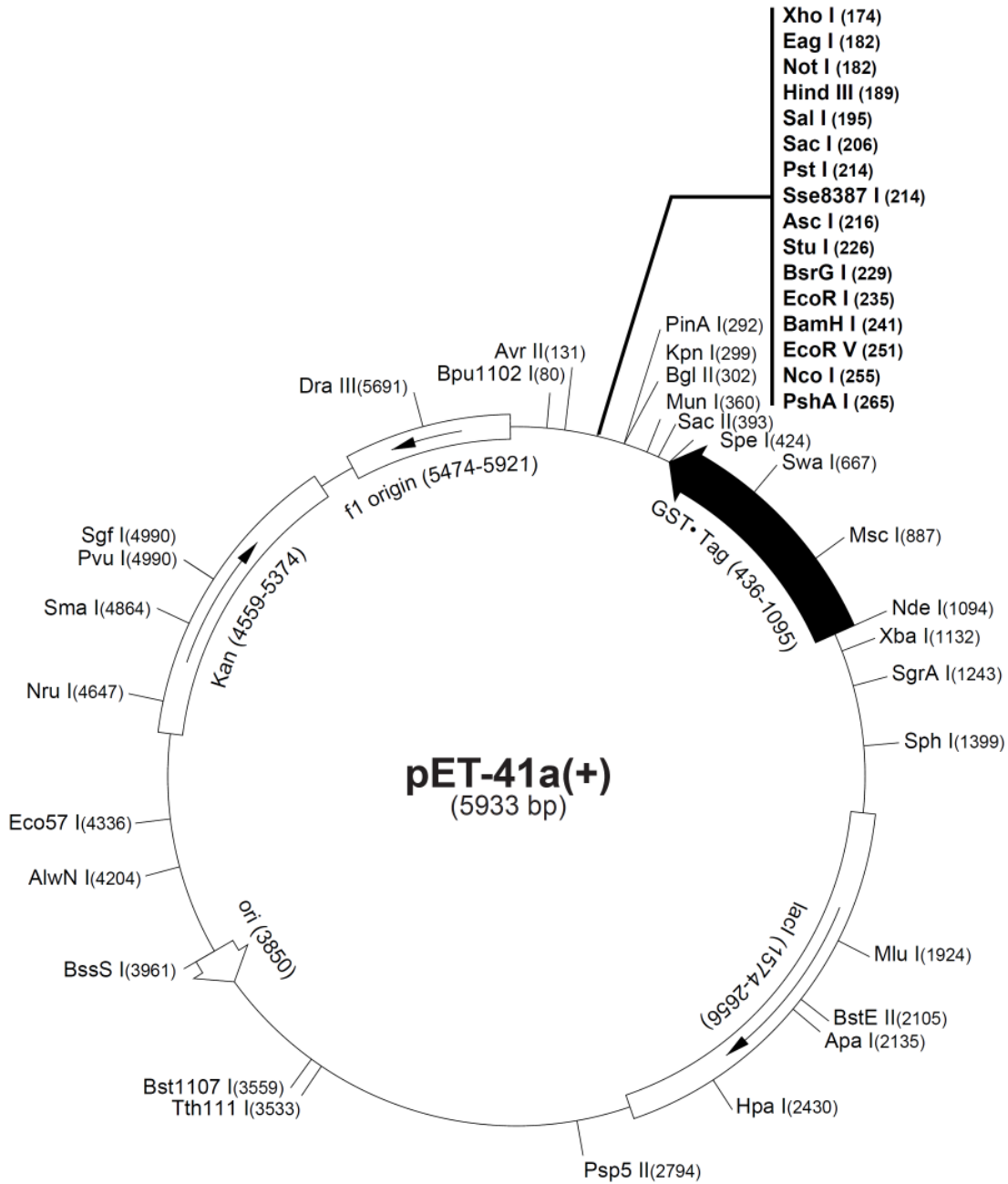
## 6 Anhang

### 6.1 Vektorkarten

Vektor von Geneart mit synthetischer DNA des GLP-1-Rezeptors







**T7 promoter**
 **lac operator**
 **XbaI**
 **rbs**
 **NdeI**

AATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCCCT

Met Ser Pro

**GST-Tag**
 **SpeI**
 **His-Tag**
 **SacII**

ATACTAGGTATT...627bb...GACCATCCTCAAAAATCGGATGGTCAACCTAGTGGTCTGGTCAACCATCACCATCACTCCCGGGTCTGGTCCACCGGGTAGT  
 Ile Leu Gly Tyr...209ba...Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly His His His His His Ser Ala Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser

thrombin I

**MunI**
 **S-Tag**
 **S-Tag primer #69945-3**
 **BglII**
 **KpnI**
 **PstI**
 **PshA1**

ACTGCAATTGGTATGAAGAACCCTGCTGCTAAATTCGAACGCCASCACATGGACAGCCEAGATCTGGTACCCTGGTGGCTCCGGTGGTATGACGACGACAAAG  
 Thr Ala Ile Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Gly Gly Ser Gly

Asp Asp Asp Asp Lys  
 enterokinase I

**NcoI**
 **EcoRV**
 **BamHI**
 **EcoRI**
 **BsrGI**
 **StuI**
 **AscI**
 **Sse8387I**
 **SacI**
 **SalI**
 **HindIII**
 **EapI**
 **NobI**
 **XhoI**
 **His-Tag**

AGTCCATGGGATATCGGGATCCGAATTCGTACAGCCCTTGGCGCCCTCGAGGCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGCGCGCACTCGAGCACCACCACCCACCACCACCTAATTGATTAA pET-41a(+)  
 Ser Pro Met Gly Tyr Arg Gly Ser Glu Phe Cys Thr Gly Leu Gly Ala Pro Ala Gly Glu Leu Arg Arg Gln Ala Cys Gly Arg Thr Arg Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ile Asp End

AGTCCATGGGATATCGGGATCCGAATTCGTACAGCCCTTGGCGCCCTCGAGGCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGCGCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACCAATGATTAA pET-41b(+)  
 Ser Pro Met Asp Ile Gly Asp Pro Asn Ser Val Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Ala Ser Ser Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His His His

AGTCCATGGGATATCGGGATCCGAATTCGTACAGCCCTTGGCGCCCTCGAGGCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGCGCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACCACCAATGATTAA pET-41c(+)  
 Ser Pro Met Ala Ile Ser Gly Ile Arg Ile Leu Tyr Arg Pro Trp Arg Ala Cys Arg Arg Ala Pro Ser Thr Ser Leu Arg Pro His Ser Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr

**AvrII**
 **Bpu102I**
 **T7 terminator**

TACTAGCTGCTAAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTGGCTGCTGCCACCCCTGAGCAATAACATACATAACCCCTTGGGGCTTAAACGGGCTTGAGGGGTTTTTG  
 T7 terminator primer #69337-3

**pET-41a(+)** cloning/expression regions

## 6.2 Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide und Proteine

### Aminosäuresequenz des GLP-1 Rezeptors nach Expression vom Vektor pET28a

(Rot dargestellte Aminosäuren gehören nicht zur GLP-1R Proteinsequenz, sondern stammen aus dem Vektor)

**MGSSHHHHHSSGLVPRGSH**MRPQGATVSLWETVQKWREYRRQCQRSLTEDPPPAT  
DLFCNRTFDEYACWPDGEPGSFVNVSCPWYLPWASSVPQGHVYRFCTAEGWLQK  
DNSSLPWRDLSECEESKRGERSSPEEQLLFLYIIYTVGYALSFSALVIASAILLGFRHLH  
CTRNYIHLNLFASFILRALS VFIKDAALKWMYSTAAQQHQWDGLLSYQDSLSCRLVF  
LLMQYCVAANYYWLLVEGVLYTLTLLAFSVFSEQWIFRLYVVSIGWGVPLLFVVPWGI  
VKYLYEDEGCWTRNSNMNYWLIIRLPILFGIGVNFLIFVRVICIVVSKLKANLMCKTDI  
KCRLAKSTLTLIPLLGTHEVIFAFVMDEHARGTLRFIKLFTELSFTSFQGLMVAILYCF  
VNNEVQLEFRKSWERWRLEHLHIQRDSSMKPLKCPTSSLSSGATAGSSMYTATCQAS  
CS

### Aminosäuresequenz des GLP-1 Rezeptors nach Expression vom Vektor pET41b

(Rot dargestellte Aminosäuren gehören nicht zur GLP-1R Proteinsequenz, sondern stammen aus dem Vektor)

MRPQGATVSLWETVQKWREYRRQCQRSLTEDPPPATDLFCNRTFDEYACWPDGEPG  
SFVNVSCPWYLPWASSVPQGHVYRFCTAEGWLQKDNSSLPWRDLSECEESKRGER  
SSPEEQLLFLYIIYTVGYALSFSALVIASAILLGFRHLHCTRNYIHLNLFASFILRALS VFI  
KDAALKWMYSTAAQQHQWDGLLSYQDSLSCRLVFLLMQYCVAANYYWLLVEGVY  
LYTLTLLAFSVFSEQWIFRLYVVSIGWGVPLLFVVPWGIKYLKYEDEGCWTRNSNMNYW  
LIIRLPILFGIGVNFLIFVRVICIVVSKLKANLMCKTDIKCRLAKSTLTLIPLLGTHEVIFA  
FVMDEHARGTLRFIKLFTELSFTSFQGLMVAILYCFVNNEVQLEFRKSWERWRLEHL  
HIQRDSSMKPLKCPTSSLSSGATAGSSMYTATCQASCS**LEHHHHHHH**

### Aminosäuresequenz des nGLP-1R Konstruktes nach Expression vom Vektor pET15b

(Rot dargestellte Aminosäuren gehören nicht zur GLP-1R Proteinsequenz, sondern stammen aus dem Vektor)

**MGSSHHHHHSSGLVPRGSH**MRPQGATVSLWETVQKWREYRRQCQRSLTEDPPPAT  
DLFCNRTFDEYACWPDGEPGSFVNVSCPWYLPWASSVPQGHVYRFCTAEGWLQK  
DNSSLPWRDLSECEESKRGERSSPEEQLLFLY

Aminosäuresequenz des Loop nGLP-1R Konstruktes nach Expression vom Vektor pET15b

(Rot dargestellte Aminosäuren gehören nicht zur GLP-1R Proteinsequenz, sondern stammen aus dem Vektor; in Blau dargestellte Aminosäuren kennzeichnen die Linkerregionen zwischen der N-terminalen Domäne und dem 1-Exoloops bzw. zwischen dem 1. und 2. Exoloop)

MGSSHHHHHHH SSGLVPRGSH MRPQGATVSL WETVQKWREY RRQCQRSLTE  
NRTFDEYACW PDGEPGSFVN VSCPWYLPWA SSV PQGHVYR FCTA EGLWLQ  
LSECEESKRG ERSSPEEQLL FLYSGSGSGS GSGSGKDAAL KWMYSTAAQQ  
DSLSCRSGSG SGSGSGSGYL YEDEGCWTRN SNM

Aminosäuresequenz des Fusionsproteins SUMO-PTH (1-84)-ECFP

(Das Sumo-Protein ist in Blau, PTH (1-84) in Rot und ECFP in Schwarz dargestellt)

MGSSHHHHHHHGSGLVPRGSASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFF  
KIKKTTPLRRLMEAF AKRQ GKEMDSL RFLYD GIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQ  
IGGSVSEIQLMHN LGKHLNSMERVEWLRK KLQDVHNFVALGAPLAPRDAGSQRPRK  
KEDNVLVESHEKSLGEADKADVNLTKAKSQGSMVSKGEELFTGVVPILVELDGDV  
NGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDHM  
KQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNI  
LGHKLEYN YISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVL  
LPDNH YLSTQSALS KDPNEKR DHMV LLEFVTAAGITLGMDELYK

Aminosäuresequenz des Fusionsproteins SUMO-GLP-1-ECFP

(Das Sumo-Protein ist in Blau, GLP-1 in Rot und ECFP in Schwarz dargestellt)

MGSSHHHHHHHGSGLVPRGSASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFF  
KIKKTTPLRRLMEAF AKRQ GKEMDSL RFLYD GIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQ  
IGGHAEGTFTSDVSSYLEGQA AKEFI AWLVKGRGSMVSKGEELFTGVVPILVELDG  
DVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFSRYPDH  
MKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDG  
NILGHKLEYN YISHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGP  
VLLPDNH YLSTQSALS KDPNEKR DHMV LLEFVTAAGITLGMDELYK

Aminosäuresequenz von GLP-1 (7-37) und Exendin 4

(Identisch besetzte Positionen innerhalb der Peptide sind in Rot dargestellt)

GLP-1: HAEGTFTSDV SSYLEGQA AK EFI AWLVKGR G

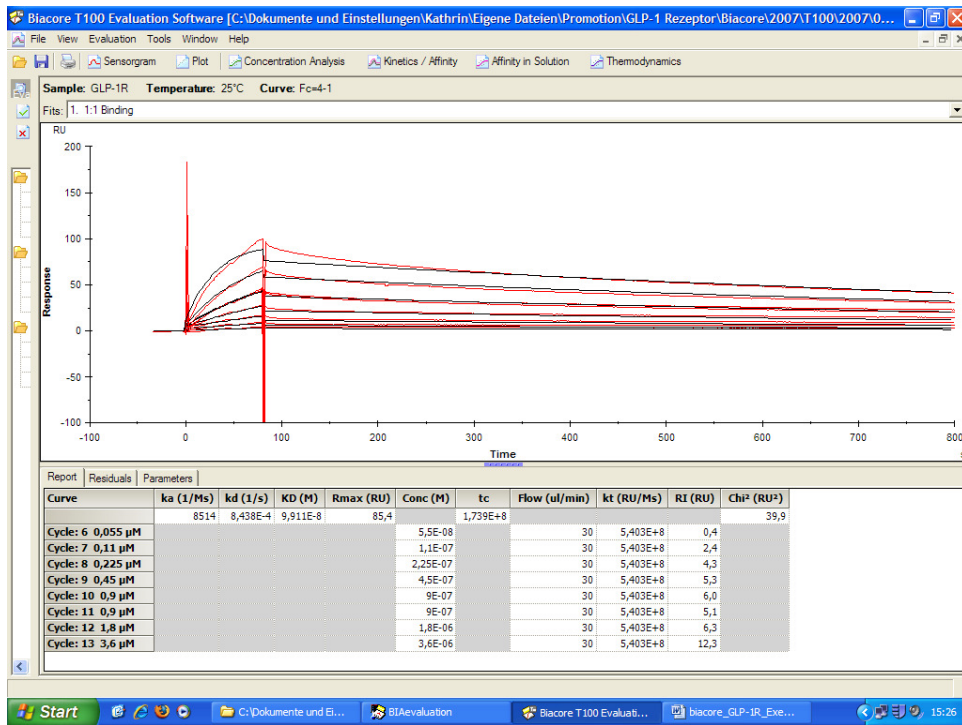
Exendin 4: HEGTFTSDL SKQMEEEA VR LFIEWLVKNGG PSSGAPPPS

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

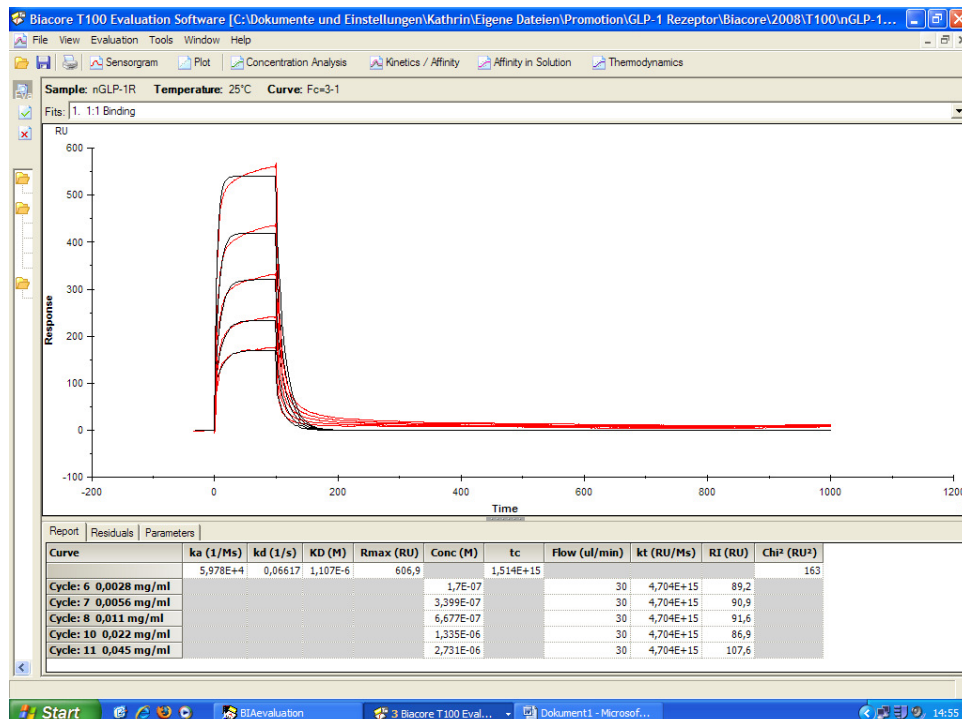
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
Brij	Polyalkylenglykolether
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	doppelsträngige DNA-Kopie der mRNA
Da	Dalton
CD	Circulardichroismus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>exoloop</i>	extrazellulär gelegene Schleife
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GLP-1	<i>glucagon-like peptide-1</i>
GLP-1R	<i>glucagon-like peptide-1</i> Rezeptor
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>ib</i>	<i>inclusion bodies</i>
kb	Kilobasen
$K_D$	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani oder <i>lysogeny broth</i> (komplexes Nährmedium)
<i>loop</i>	Schleife (Transmembranbereiche verbindende Aminosäuresequenzen)
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i> : einzelsträngige Kopie der DNA
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte einer Lösung bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
rpm	<i>rotation per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
PTH	Parathormon
RT	Raumtemperatur
SV	Säulenvolumen
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure)
TFA	Trifluoressigsäure
TM	Transmembranbereich
tRNA	<i>transport RNA</i>

## 6.4 Auswertung der Oberflächenplasmonresonanzmessungen mit Hilfe der Evaluierungssoftware Biacore T100 Evaluation

a) Auswertung der Bindung des GLP-1R an eine mit Exendin 4 gekoppelte Flusszelle



b) Auswertung der Bindung von Loop\_nGLP-1R an eine mit GLP-1 gekoppelte Flusszelle





## 6.5 Phylogenetische Verwandtschaft zwischen den GPCR der humanen Rhodopsinfamilie

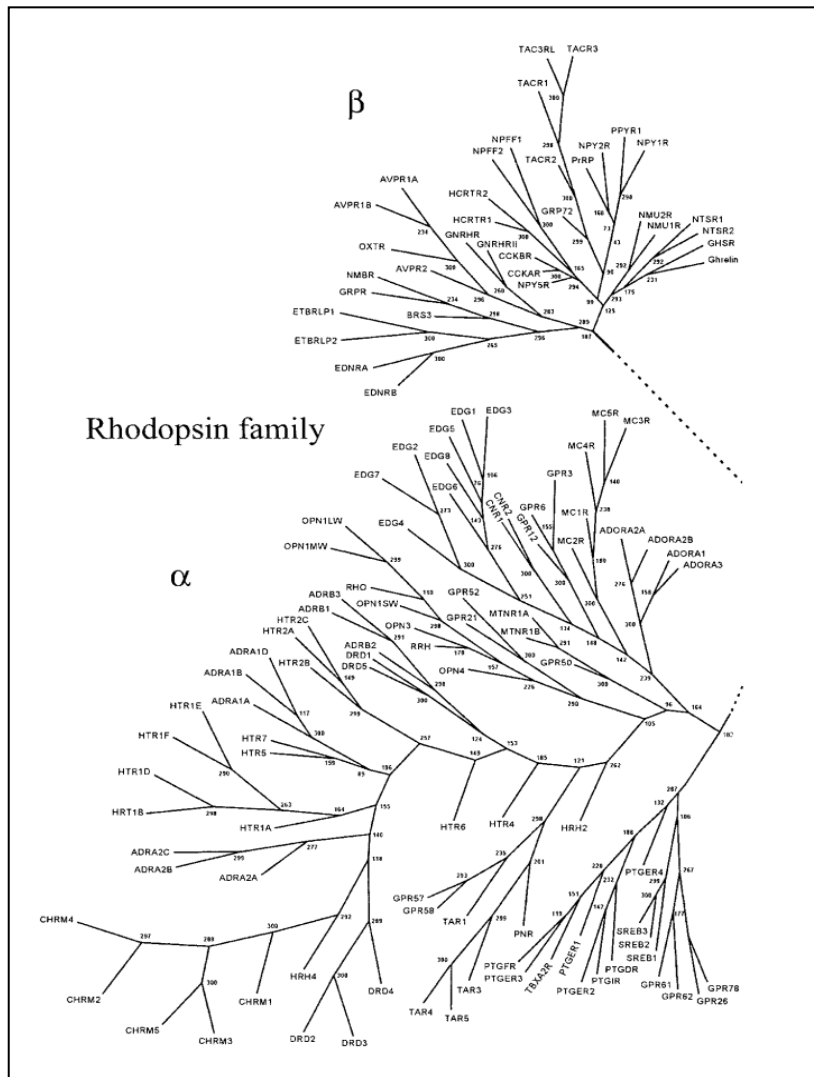


Abbildung 45: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen den GPCR der humanen Rhodopsinfamilie.

Ergänzende Abbildung zu Abb. 2 der Einleitung (aus Fredriksson *et al.*, 2003).

## Literaturverzeichnis

- Ahmed, A. K., Schaffer, S. W. und Wetlaufer, D. B. (1975) Nonenzymic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers, *Journal of Biological Chemistry* **250**, 8477-8482.
- Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P. Z. und Consultation, WHO. (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus - Provisional report of a WHO consultation, *Diabetic Medicine* **15**, 539-553.
- Amori, R. E., Lau, J. und Pittas, A. G. (2007) Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes - Systematic review and meta-analysis, *Journal of the American Medical Association* **298**, 194-206.
- Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilaiet, S., Chelsky, D., Dennis, M. und Bouvier, M. (2000) Detection of beta(2)-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3684-3689.
- Aragay, A. M., Ruiz-Gomez, A., Penela, P., Sarnago, S., Elorza, A., Jimenez-Sainz, M. C. und Mayor, F. (1998) G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions, *FEBS Letters* **430**, 37-40.
- Arakawa, T. und Tsumoto, K. (2003) The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**, 148-152.
- Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S., Huijbregts, R., de Kruijff, B., Runswick, M. J. und Walker, J. E. (2000) Characterisation of new intracellular membranes in Escherichia coli accompanying large scale over-production of the b subunit of F1Fo ATP synthase, *FEBS Letters* **482**, 215-219.
- Arya, R., Bhattacharya, A. und Saini, K. S. (2008) Dictyostelium discoideum-a promising expression system for the production of eukaryotic proteins, *FASEB Journal* **22**, 4055-4066.
- Attwood, T. K. und Findlay, J. B. C. (1994) Fingerprinting G-protein-coupled receptors, *Protein Engineering* **7**, 195-203.
- Ayoub, M. A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M. und Jockers, R. (2002) Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer, *Journal of Biological Chemistry* **277**, 21522-21528.
- Bane, S. E., Velasquez, J. E. und 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.
- Baneres, J. L., Martin, A., Hullot, P., Girard, J. P., Rossi, J. C. und Parello, J. (2003) Structure-based analysis of GPCR function: Conformational adaptation of both agonist and receptor upon leukotriene B-4 binding to recombinant BLT1, *Journal of Molecular Biology* **329**, 801-814.
- Baneres, J. L., Mesnier, D., Martin, A., Joubert, L., Dumuis, A. und Bockaert, J. (2005) Molecular characterization of a purified 5-HT4 receptor - A structural basis for drug efficacy, *Journal of Biological Chemistry* **280**, 20253-20260.
- Baynes, B. M., Wang, D. I. C. und Trout, B. L. (2005) Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation, *Biochemistry* **44**, 4919-4925.

- Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., Vornrhein, C., Griesinger, C., Zweckstetter, M. und Zeth, K. (2008) Structure of the human voltage-dependent anion channel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15370-15375.
- Bazarsuren, A., Grauschopf, U., Wozny, M., Reusch, D., Hoffmann, E., Schaefer, W., Panzner, S. und Rudolph, R. (2002) In vitro folding, functional characterization, and disulfide pattern of the extracellular domain of human GLP-1 receptor, *Biophysical Chemistry* **96**, 305-318.
- Bazarsuren, A. (2003) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Ligandenbindungsdomäne des humanen GLP-1 Rezeptors, *Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät (mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Beck, M., Siebert, F. und 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.
- Bell, G. I., Sanchezpescador, R., Laybourn, P. J. und Najarian, R. C. (1983) Exon duplication and divergence in the human proglucagon gene, *Nature* **304**, 368-371.
- Benkirane, M., Jin, D. Y., Chun, R. F., Koup, R. A. und Jeang, K. T. (1997) Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5 Delta 32, *Journal of Biological Chemistry* **272**, 30603-30606.
- Bockaert, J. und Pin, J. P. (1999) Molecular tinkering of G-protein-coupled receptors: an evolutionary success, *EMBO Journal* **18**, 1723-1729.
- Böhm, G., Muhr, R. und Jaenicke, R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV Circular-dichroism spectra by neural networks, *Protein Engineering* **5**, 191-195.
- Bohm, S. K., Grady, E. F. und Bunnett, N. W. (1997) Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors, *Biochemical Journal* **322**, 1-18.
- Bourne, H. R., Landis, C. A. und Masters, S. B. (1989) Hydrolysis of GTP by the alpha-chain of Gs and other GTP binding-proteins, *Proteins-Structure Function and Genetics* **6**, 222-230.
- Breitenberger, C. A. und RajBhandary, U. L. (1985) Some highlights of mitochondrial research based on analyses of Neurospora crassa mitochondrial DNA, *Trends in Biochemical Sciences* **10**, 478-483.
- Brzostowski, J. A. und Kimmel, A. R. (2001) Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors, *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 291-297.
- Buchner, J. und Rudolph, R. (1991) Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in Escherichia coli, *Bio-Technology* **9**, 157-162.
- Buchner, J. und Kiefhaber, T. (2005) Protein Folding Handbook, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, 1245 - 1280.
- Bullock, B. P., Heller, R. S. und Habener, J. F. (1996) Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor, *Endocrinology* **137**, 2968-2978.
- Bunemann, M., Lee, K. B., Pals-Rylaarsdam, R., Roseberry, A. G. und Hosey, M. M. (1999) Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system, *Annual Review of Physiology* **61**, 169-192.

- Cheng, Z. J. und Miller, L. J. (2001) Agonist-dependent dissociation of oligomeric complexes of G protein-coupled cholecystinin receptors demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer, *Journal of Biological Chemistry* **276**, 48040-48047.
- Christopoulos, A. und Kenakin, T. (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing, *Pharmacological Reviews* **54**, 323-374.
- Cook, J. V. F. und Eidne, K. A. (1997) An intramolecular disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the gonadotropin-releasing hormone receptor is essential for binding and activation, *Endocrinology* **138**, 2800-2806.
- Creighton, T. E. (2002) Protein Structure A Practical Approach, *Oxford University Press, New York* Second Edition.
- Daugherty, D. L., Rozema, D., Hanson, P. E. und Gellman, S. H. (1998) Artificial chaperone-assisted refolding of citrate synthase, *Journal of Biological Chemistry* **273**, 33961-33971.
- de Maturana, R. L. und Donnelly, D. (2002) The glucagon-like peptide-1 receptor binding site for the N-terminus of GLP-1 requires polarity at Asp198 rather than negative charge, *FEBS Letters* **530**, 244-248.
- de Maturana, R. L., Willshaw, A., Kuntzsch, A., Rudolph, R. und Donnelly, D. (2003) The isolated N-terminal domain of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor binds exendin peptides with much higher affinity than GLP-1, *Journal of Biological Chemistry* **278**, 10195-10200.
- Diabetes-Union, Deutsche. (2008) Deutsche Diabetes-Union: Gesundheitsbericht Diabetes 2007.
- Dillon, J. S., Tanizawa, Y., Wheeler, M. B., Leng, X. H., Ligon, B. B., Rabin, D. U., Yoowarren, H., Permutt, M. A. und Boyd, A. E. (1993) Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (Glp-1) receptor, *Endocrinology* **133**, 1907-1910.
- Drucker, D. J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W. L. und Habener, J. F. (1987) Glucagon-like peptide-I stimulates insulin gene-expression and increases cyclic-AMP levels in a rat islet cell-line, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 3434-3438.
- Drucker, D. J. (2003) Glucagon-like peptides: Regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis, *Molecular Endocrinology* **17**, 161-171.
- During, M. J., Cao, L., Zuzga, D. S., Francis, J. S., Fitzsimons, H. L., Jiao, X. Y., Bland, R. J., Klugmann, M., Banks, W. A., Drucker, D. J. und Haile, C. N. (2003) Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection, *Nature Medicine* **9**, 1173-1179.
- Eftink, M. R. (1994) The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins, *Biophysical Journal* **66**, 482-501.
- Engelhardt, H., Meins, T., Poynor, M., Adams, V., Nussberger, S., Welte, W. und 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.
- Ernst, O. P. und Bartl, F. J. (2002) Active states of rhodopsin, *Chembiochem* **3**, 968-974.
- Ferguson, S. S. G., Zhang, J., Barak, L. S. und Caron, M. G. (1998) Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization, *Life Sciences* **62**, 1561-1565.
- Ferguson, S. S. G. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling, *Pharmacological Reviews* **53**, 1-24.

- Flower, D. R. (1999) Modelling G-protein-coupled receptors for drug design, *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes* **1422**, 207-234.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. und Schioth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints, *Molecular Pharmacology* **63**, 1256-1272.
- Frimurer, T. M. und Bywater, R. P. (1999) Structure of the integral membrane domain of the GLP1 receptor, *Proteins-Structure Function and Genetics* **35**, 375-386.
- Galvez, T., Duthey, B., Kniazeff, J., Blahos, J., Rovelli, G., Bettler, B., Prezeau, L. und Pin, J. P. (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function, *EMBO Journal* **20**, 2152-2159.
- George, S. R., O'Dowd, B. F. und Lee, S. R. (2002) G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery, *Nature Reviews Drug Discovery* **1**, 808-820.
- Gines, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casado, V., Canela, E. I., Rondin, S., Lew, J. Y., Watson, S., Zoli, M., Agnati, L. F., Vernier, P., Lluís, C., Ferre, S., Fuxe, K. und Franco, R. (2000) Dopamine D-1 and adenosine A(1) receptors form functionally interacting heteromeric complexes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8606-8611.
- Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. und Riggs, A. D. (1979) Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 106-110.
- Goke, R. und Conlon, J. M. (1988) Receptors for glucagon-like peptide-1(7-36) amide on rat insulinoma-derived cells, *Journal of Endocrinology* **116**, 357-362.
- Göke, R., Just, R., Lankatbuttgerit, B. und Göke, B. (1994) Glycosylation of the GLP-1 receptor is a prerequisite for regular receptor function, *Peptides* **15**, 675-681.
- Goodman, O. B., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. und Benovic, J. L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta(2)-adrenergic receptor, *Nature* **383**, 447-450.
- Grace, C. R. R., Perrin, M. H., Gulyas, J., DiGrucchio, M. R., Cantle, J. P., Rivier, J. E., Vale, W. W. und Riek, R. (2007) Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 4858-4863.
- Gromada, J., Rorsman, P., Dissing, S. und Wulff, B. S. (1995) Stimulation of cloned human glucagon-like peptide-1 receptor expressed in Hek-293 cells induces cAMP-dependent activation of Calcium-induced Calcium-release, *Febs Letters* **373**, 182-186.
- Guo, W., Shi, L. und Javitch, J. A. (2003) The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer, *Journal of Biological Chemistry* **278**, 4385-4388.
- Hall, R. A., Ostedgaard, L. S., Premont, R. T., Blitzer, J. T., Rahman, N., Welsh, M. J. und Lefkowitz, R. J. (1998) A C-terminal motif found in the beta(2)-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor family of PDZ proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 8496-8501.

- Hall, R. A., Premont, R. T., Chow, C. W., Blitzer, J. T., Pitcher, J. A., Claing, A., Stoffel, R. H., Barak, L. S., Shenolikar, S., Weinman, E. J., Grinstein, S. und Lefkowitz, R. J. (1998) The beta(2)-adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, *Nature* **392**, 626-630.
- Harding, P. J., Attrill, H., Ross, S., Koeppe, J. R., Kapanidis, A. N. und Watts, A. (2007) Neurotensin receptor type 1: Escherichia coli expression, purification, characterization and biophysical study, *Biochemical Society Transactions* **35**, 760-763.
- Hauner, H., I., Köster. und von Ferber, L. (2003) Prävalenz des Diabetes mellitus in Deutschland 1998 – 2001. Sekundärdatenanalyse der Versichertenstichprobe der AOK Hessen / KV Hessen, *Dtsch Med Wochenschr* **128**, 2638 – 2643.
- Holst, J. J. (2007) The physiology of glucagon-like peptide 1, *Physiological Reviews* **87**, 1409-1439.
- Holz, G. G. (2004) Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell, *Diabetes* **53**, 5-13.
- Horvat, R. D., Roess, D. A., Nelson, S. E., Barisas, B. G. und Clay, C. M. (2001) Binding of agonist but not antagonist leads to fluorescence resonance energy transfer between intrinsically fluorescent gonadotropin-releasing hormone receptors, *Molecular Endocrinology* **15**, 695-703.
- Hudson, B. und Jacobs, R. (1975) Ultraviolet transitions of ethidium cation, *Biopolymers* **14**, 1309-1312.
- Hui, H. X., Zhao, H. N. und Perfetti, R. (2005) Structure and function studies of glucagon-like peptide-1 (GLP-1): the designing of a novel pharmacological agent for the treatment of diabetes, *Diabetes-Metabolism Research and Reviews* **21**, 313-331.
- Isele, J., Sakmar, T. P. und Siebert, F. (2000) Rhodopsin activation affects the environment of specific neighboring phospholipids: An FTIR spectroscopic study, *Biophysical Journal* **79**, 3063-3071.
- Issafras, H., Angers, S., Bulenger, S., Blanpain, C., Parmentier, M., Labbe-Jullie, C., Bouvier, M. und Marullo, S. (2002) Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors, *Journal of Biological Chemistry* **277**, 34666-34673.
- Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y. T., Lane, J. R., IJzerman, A. P. und Stevens, R. C. (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A(2A) adenosine receptor bound to an antagonist, *Science* **322**, 1211-1217.
- Jidenko, M., Nielsen, R. C., Sorensen, T. L. M., Moller, J. V., le Maire, M., Nissen, P. und Jaxel, C. (2005) Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in Saccharomyces cerevisiae, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11687-11691.
- Junge, F., Schneider, B., Reckel, S., Schwarz, D., Dötsch, V. und Bernhard, F. (2008) Large-scale production of functional membrane proteins, *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 1729-1755.
- Kalkhof, S., Haehn, S., Ihling, C., Paulsson, M., Smyth, N. und Sinz, A. (2008) Determination of disulfide bond patterns in laminin beta 1 chain N-terminal domains by nano-high-performance liquid chromatography/matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**, 1933-1940.
- Kamitani, S. und Sakata, T. (2001) Glycosylation of human CRLR at Asn123 is required for ligand binding and signaling, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1539**, 131-139.

- Kaushal, S., Ridge, K. D. und Khorana, H. G. (1994) Structure and function in rhodopsin - the role of asparagine-linked glycosylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4024-4028.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. und Price, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism, *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1751**, 119-139.
- Kenakin, T. (2001) Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation, *FASEB Journal* **15**, 598-611.
- Kennedy, M. E. und Limbird, L. E. (1993) Mutations of the alpha-2A-adrenergic receptor that eliminate detectable palmitoylation do not perturb receptor-G-protein coupling, *Journal of Biological Chemistry* **268**, 8003-8011.
- Kieffer, T. J., Mcintosh, C. H. S. und Pederson, R. A. (1995) Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide-1 in-vitro and in-vivo by dipeptidyl peptidase-IV, *Endocrinology* **136**, 3585-3596.
- Kieffer, T. J., Heller, R. S., Unson, C. G., Weir, G. C. und Habener, J. F. (1996) Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets, *Endocrinology* **137**, 5119-5125.
- Knudsen, L. B., Kiel, D., Teng, M., Behrens, C., Bhumralkar, D., Kodra, J. T., Holst, J. J., Jeppesen, C. B., Johnson, M. D., de Jong, J. C., Jorgensen, A. S., Kercher, T., Kostrowicki, J., Madsen, P., Olesen, P. H., Petersen, J. S., Poulsen, F., Sidemann, U. G., Sturis, J., Truesdale, L., May, J. und Lau, J. (2007) Small-molecule agonists for the glucagon-like peptide 1 receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 937-942.
- Knudsen, S. M., Tams, J. W., Wulff, B. S. und Fahrenkrug, J. (1997) A disulfide bond between conserved cysteines in the extracellular loops of the human VIP receptor is required for binding and activation, *FEBS Letters* **412**, 141-143.
- Kobilka, B. und Schertler, G. F. X. (2008) New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations, *Trends in Pharmacological Sciences* **29**, 79-83.
- Kolakowski, L. F. (1994) Gcrdb - a G-protein-coupled receptor database, *Receptors & Channels* **2**, 1-7.
- Krebs, A., Villa, C., Edwards, P. C. und Schertler, G. F. X. (1998) Characterisation of an improved two-dimensional P22121 crystal from bovine rhodopsin, *Journal of Molecular Biology* **282**, 991-1003.
- Kristiansen, K. (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function, *Pharmacology & Therapeutics* **103**, 21-80.
- Kroeger, K. M., Hanyaloglu, A. C., Seeber, R. M., Miles, L. E. C. und Eidne, K. A. (2001) Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor - Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer, *Journal of Biological Chemistry* **276**, 12736-12743.
- Kurland, C. und Gallant, J. (1996) Errors of heterologous protein expression, *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 489-493.
- Laage, R. und Langosch, D. (2001) Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins, *Traffic* **2**, 99-104.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H. M., Yu, J., Wang, J., Huang, G. Y., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S. Z., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H. Q., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G. R., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W. H., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J. R., Slater, G., Smit, A. F. A., Stupka, E., Szustakowki, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J. und Conso, Int. Human Genome Sequencing. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* **409**, 860-921.

Latif, R., Graves, P. und Davies, T. F. (2002) Ligand-dependent inhibition of oligomerization at the human thyrotropin receptor, *Journal of Biological Chemistry* **277**, 45059-45067.

Li, Y. Z., Hansotia, T., Yusta, B., Ris, F., Halban, P. A. und Drucker, D. J. (2003) Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis, *Journal of Biological Chemistry* **278**, 471-478.

Liebhaber, S. A., Cash, F. und Eshleman, S. S. (1992) Translation inhibition by an messenger-RNA coding region secondary structure is determined by its proximity to the AUG initiation codon, *Journal of Molecular Biology* **226**, 609-621.

Light, P. E., Fox, J. E. M., Riedel, M. J. und Wheeler, M. B. (2002) Glucagon-like peptide-1 inhibits pancreatic ATP-sensitive potassium channels via a protein kinase A- and ADP-dependent mechanism, *Molecular Endocrinology* **16**, 2135-2144.

Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J. P., Caron, M. G. und Lefkowitz, R. J. (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins - kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta-2-adrenergic receptor and rhodopsin systems, *Journal of Biological Chemistry* **267**, 8558-8564.



- Long, S. B., Campbell, E. B. und MacKinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel, *Science* **309**, 897-903.
- Lopez de Maturana, R., Willshaw, A., Kuntzsch, A., Rudolph, R. und Donnelly, D. (2003) The isolated N-terminal domain of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor binds exendin peptides with much higher affinity than GLP-1, *Journal of Biological Chemistry* **278**, 10195-10200.
- Lukashova, V., Asselin, C., Krolewski, J. J., Rola-Pleszczynski, M. und Stankova, J. (2001) G-protein-independent activation of Tyk2 by the platelet-activating factor receptor, *Journal of Biological Chemistry* **276**, 24113-24121.
- Luttrell, L. M. und Lefkowitz, R. J. (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals, *Journal of Cell Science* **115**, 455-465.
- Malnic, B., Godfrey, P. A. und Buck, L. B. (2004) The human olfactory receptor gene family, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2584-2589.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization, *Neuron* **27**, 97-106.
- Marinissen, M. J. und Gutkind, J. S. (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms, *Trends in Pharmacological Sciences* **22**, 368-376.
- Marrero, M. B., Schieffer, B., Paxton, W. G., Heerdt, L., Berk, B. C., Delafontaine, P. und Bernstein, K. E. (1995) Direct stimulation of Jak/Stat pathway by the angiotensin-II at(1) receptor, *Nature* **375**, 247-250.
- Marshall, F. H., Jones, K. A., Kaupmann, K. und Bettler, B. (1999) GABA(B) receptors - the first 7TM heterodimers, *Trends in Pharmacological Sciences* **20**, 396-399.
- Marston, F. A. O. and Hartley, D. L. (1990) Solubilization of protein aggregates, *Methods in Enzymology* **182**, 264-276.
- Martin, A., Damian, M., Laguerre, M., Parello, J., Pucci, B., Serre, L., Mary, S., Marie, J. und Baneres, J. L. (2009) Engineering a G protein-coupled receptor for structural studies: Stabilization of the BLT1 receptor ground state, *Protein Science* **18**, 727—734.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Aragay, A., del Real, G., Martin, A. M., Vila-Coro, A. J., Serrano, A., Mayor, F. und Martinez-A, C. (1998) The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor, *Journal of Immunology* **161**, 805-813.
- Mentlein, R., Gallwitz, B. & Schmidt, W.E. (1993) Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum, *European Journal of Biochemistry* **214**, 829-835.
- Meyer, B. H., Segura, J. M., Martinez, K. L., Hovius, R., George, N., Johnsson, K. und Vogel, H. (2006) FRET imaging reveals that functional neurokinin-1 receptors are monomeric and reside in membrane microdomains of live cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2138-2143.
- Michalke, K., Graviere, M.-E., Huyghe, C., Vincentelli, R., Wagner, R., Pattus, F., Schroeder, K., Oschmann, J., Rudolph, R., Cambillau, C. und Desmyter, A. (2009) Mammalian G-protein-coupled receptor expression in Escherichia coli: I. High-throughput large-scale production as inclusion bodies, *Analytical Biochemistry* **386**, 147 - 155.

- Milasta, S., Pediani, J., Appelbe, S., Trim, S., Wyatt, M., Cox, P., Fidock, M. und Milligan, G. (2006) Interactions between the Mas-related receptors MrgD and MrgE alter signalling and trafficking of MrgD, *Molecular Pharmacology* **69**, 479-491.
- Miroux, B. und Walker, J. E. (1996) Over-production of proteins in Escherichia coli: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels, *Journal of Molecular Biology* **260**, 289-298.
- Mullis, K., Falcoona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Ehrlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *COLD SPRING HARBOR SYMP. QUANT. BIOL.* **51**, 263-273.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A. und Fujiyoshi, Y. (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1, *Nature* **407**, 599-605.
- Neidigh, J. W., Fesinmeyer, R. M. und Andersen, N. H. (2002) Designing a 20-residue protein, *Nature Structural Biology* **9**, 425-430.
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y. F., Ryba, N. J. P. und Zuker, C. S. (2001) Mammalian sweet taste receptors, *Cell* **106**, 381-390.
- Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L. X., Zhao, G., Ryba, N. J. P. und Zuker, C. S. (2002) An amino-acid taste receptor, *Nature* **416**, 199-202.
- Neubig, R. R. und Siderovski, D. R. (2002) Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets, *Nature Reviews Drug Discovery* **1**, 187-197.
- Okada, T., Le Trong, I., Fox, B. A., Behnke, C. A., Stenkamp, R. E. und Palczewski, K. (2000) X-ray diffraction analysis of three-dimensional crystals of bovine rhodopsin obtained from mixed micelles, *Journal of Structural Biology* **130**, 73-80.
- Orskov, C., Holst, J. J., Khuhtsen, S., Baldissera, F. G. A., Poulsen, S. S. und Nielsen, O. V. (1986) Glucagonlike peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small-intestine but not pancreas, *Endocrinology* **119**, 1467-1475.
- Orskov, C., Wettergren, A. und Holst, J. J. (1993) Biological effects and metabolic rates of glucagon-like peptide-1 7-36 amide and glucagon-like peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable, *Diabetes* **42**, 658-661.
- Orskov, C., Rabenhøj, L., Wettergren, A., Kofod, H. und Holst, J. J. (1994) Tissue and plasma-concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide-I in humans, *Diabetes* **43**, 535-539.
- Oschmann, J. (2008) Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung des humanen Parathormon-Rezeptors, *Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät (mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Overton, M. C. und Blumer, K. J. (2000) G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo, *Current Biology* **10**, 341-344.
- Pace, C. N. und Scholtz, J. M. (2002) Measuring the conformational stability of a protein, *Protein Structure - A practical approach*, Second edition.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. und Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor, *Science* **289**, 739-745.

- Pantaloni, C., Brabet, P., Bilanges, B., Dumuis, A., Houssami, S., Spengler, D., Bockaert, J. und Journot, L. (1996) Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation, *Journal of Biological Chemistry* **271**, 22146-22151.
- Park, P. S. H. und Palczewski, K. (2005) Diversifying the repertoire of G-protein-coupled receptors through oligomerization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8793-8794.
- Parthier, C., Kleinschmidt, M., Neumann, P., Rudolph, R., Manhart, S., Schlenzig, D., Fanghanel, J., Rahfeld, J. U., Demuth, H. U. und Stubbs, M. T. (2007) Crystal structure of the incretin-bound extracellular domain of a G-protein-coupled receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 13942-13947.
- Patterson, S. D. und Katta, V. (1994) Prompt fragmentation of disulfide-linked peptides during matrix-assisted laser-desorption ionization mass spectrometry, *Analytical Chemistry* **66**, 3727-3732.
- Patzelt, C. und Schiltz, E. (1984) Conversion of proglucagon in pancreatic alpha-cells - the major end products are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains 2 glucagon-like sequences, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - Biological Sciences* **81**, 5007-5011.
- Perley, M. J. und Kipnis, D. M. (1967) Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose - Studies in normal and diabetic subjects, *Journal of Clinical Investigation* **46**, 1954-1962.
- Pioszak, A. A. und 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.
- Prinster, S. C., Hague, C. und Hall, R. A. (2005) Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: Specificity and functional significance, *Pharmacological Reviews* **57**, 289-298.
- 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. und Kobilka, B. K. (2007) Crystal structure of the human beta(2)-adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature* **450**, 383-388.
- Robas, N., O'Reilly, M., Katugampola, S. und Fidock, M. (2003) Maximizing serendipity: strategies for identifying ligands for orphan G-protein-coupled receptors, *Current Opinion in Pharmacology* **3**, 121-126.
- Roettger, B. F., Rentsch, R. U., Pinon, D., Holicky, E., Hadac, E., Larkin, J. M. und Miller, L. J. (1995) Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor, *Journal of Cell Biology* **128**, 1029-1041.
- Rogl, H., Kosemund, K., Kuhlbrandt, W. und Collinson, I. (1998) Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography, *FEBS Letters* **432**, 21-26.
- 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. und Kobilka, B. K. (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta(2)-adrenergic receptor function, *Science* **318**, 1266-1273.

- Rozema, D. und Gellman, S. H. (1995) Artificial chaperones - Protein refolding via sequential use of detergent and cyclodextrin, *Journal of the American Chemical Society* **117**, 2373-2374.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. und Jaenicke, R. (1997) Protein function: A practical approach (T. E. Creighton., ed.), *Oxford University Press, New York*, 57 - 96.
- Runge, S., Schimmer, S., Oschmann, J., Schiodt, C. B., Knudsen, S. M., Jeppesen, C. B., Madsen, K., Lau, J., Thogersen, H. und 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.
- Runge, S., Thogersen, H., Madsen, K., Lau, J. und Rudolph, R. (2008) Crystal structure of the ligand-bound glucagon-like peptide-1 receptor extracellular domain, *Journal of Biological Chemistry* **283**, 11340-11347.
- Sander, P., Grunewald, S., Reilander, H. und Michel, H. (1994) Expression of the human D2s dopamine-receptor in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* - a comparative study, *FEBS Letters* **344**, 41-46.
- Sarramegna, V., Talmont, R., Demange, P. und Milon, A. (2003) Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification, *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 1529-1546.
- Schellenberger, A. (1989) Enzymkatalyse, *VEB Gustav Fischer Verlag*, 1. Auflage.
- Schertler, G. F. X. (1998) Structure of rhodopsin, *Eye* **12**, 504-510.
- Schipani, E., Kruse, K. und Juppner, H. (1995) A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia, *Science* **268**, 98-100.
- Schipani, E., Langman, C. B., Parfitt, A. M., Jensen, G. S., Kikuchi, S., Kooh, S. W., Cole, W. G. und Juppner, H. (1996) Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia, *New England Journal of Medicine* **335**, 708-714.
- Schneider, R. (2008) Klonierung, Reinigung und in vitro Renaturierung von Varianten des humanen Glucagon-like peptide-1 Rezeptors, *Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Schröder, K. (2004) Optimierung der rekombinanten Herstellung des humanen Glucagon-like peptide-1 Rezeptors in *E. coli*, *Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät (mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Seeley, R. J., Woods, S. C. und D'Alessio, D. (2000) Editorial: Targeted gene disruption in endocrine research - The case of glucagon-like peptide-1 and neuroendocrine function, *Endocrinology* **141**, 473-475.
- Sharp, P. A., Sugden, B. und Sambrook, J. (1973) Detection of 2 restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis, *Biochemistry* **12**, 3055-3063.
- Srirama, M. und Bhairi, Ph. D. (2001) Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems, *Calbiochem-Novabiochem Corporation*.
- Stoffel, M., Espinosa, R., Lebeau, M. M. und Bell, G. I. (1993) Human glucagon-like peptide-1 receptor gene - Localization to chromosome B and 6p21 by fluorescence in situ hybridization and

linkage of a highly polymorphic simple tandem repeat DNA polymorphism to other markers on chromosome 6, *Diabetes* **42**, 1215-1218.

Sun, C. H., Song, D. Y., Davis-Taber, R. A., Barrett, L. W., Scott, V. E., Richardson, P. L., Pereda-Lopez, A., Uchic, M. E., Solomon, L. R., Lake, M. R., Walter, K. A., Hajduk, P. J. und Olejniczak, E. T. (2007) Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-Rs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 7875-7880.

Surrey, T. und Jahng, F. (1992) Refolding and oriented insertion of a membrane protein into a lipid bilayer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7457-7461.

Taneja, S. und Ahmad, F. (1994) Increased thermal stability of proteins in the presence of amino-acids, *Biochemical Journal* **303**, 147-153.

Terrillon, S. und Bouvier, M. (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization - From ontogeny to signalling regulation, *EMBO Reports* **5**, 30-34.

Thim, L. und Moody, A. J. (1981) The primary structure of porcine glicentin (proglucagon), *Regulatory Peptides* **2**, 139-150.

Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. und Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 angstrom resolution, *Nature* **405**, 647-655.

Turton, M. D., OShea, D., Gunn, I., Beak, S. A., Edwards, C. M. B., Meeran, K., Choi, S. J., Taylor, G. M., Heath, M. M., Lambert, P. D., Wilding, J. P. H., Smith, D. M., Ghatei, M. A., Herbert, J. und Bloom, S. R. (1996) A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding, *Nature* **379**, 69-72.

Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F. S., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., Brown, A., Rodriguez, S. S., Weller, J. R., Wright, A. C., Bergmann, J. E. und Gaitanaris, G. A. (2003) The G-protein-coupled receptor repertoires of human and mouse, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4903-4908.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. Q. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J. H., Miklos, G. L. G., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, C., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z. M., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W. M., Gong, F. C., Gu, Z. P., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z. X., Ketchum, K. A., Lai, Z. W., Lei, Y. D., Li, Z. Y., Li, J. Y., Liang, Y., Lin, X. Y., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nuskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B. X., Sun, J. T., Wang, Z. Y., Wang, A. H., Wang, X., Wang, J., Wei, M. H., Wides, R., Xiao, C. L., Yan, C. H., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W. Q., Zhang, H. Y., Zhao, Q., Zheng, L. S., Zhong, F., Zhong, W. Y., Zhu, S. P. C., Zhao, S. Y., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H. J., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E.,

Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigo, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H. Y., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A. D., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X. J., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M. Y., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A. und Zhu, X. H. (2001) The sequence of the human genome, *Science* **291**, 1304-1351.

Voet, D. und Voet, J. G. (1995) Biochemistry, Chapter 11: Lipids and membranes, *John Wiley & Sons, inc.*, Second edition.

Waldhoer, M., Fong, J., Jones, R. M., Lunzer, M. M., Sharma, S. K., Kostenis, E., Whistler, J. L. und Portoghese, P. S. (2005) A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G-protein-coupled receptor dimers, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9050-9055.

Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., Leslie, A. G. W., Tate, C. G. und Schertler, G. F. X. (2008) Structure of a beta(1)-adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature* **454**, 486-491.

Weiss, H. M. und Grisshammer, R. (2002) Purification and characterization of the human adenosine A(2a) receptor functionally expressed in Escherichia coli, *European Journal of Biochemistry* **269**, 82-92.

Wheeler, M. B., Lu, M., Dillon, J. S., Leng, X. H., Chen, C. und Boyd, A. E. (1993) Functional expression of the rat glucagon-like peptide-I receptor, evidence for coupling to both adenylyl-cyclase and phospholipase C, *Endocrinology* **133**, 57-62.

Widmann, C., Dolci, W. und Thorens, B. (1995) Agonist-induced internalization and recycling of the glucagon-like peptide-1 receptor in transfected fibroblasts and in insulinomas, *Biochemical Journal* **310**, 203-214.

Widmann, C., Dolci, W. und Thorens, B. (1997) Internalization and homologous desensitization of the GLP-1 receptor depend on phosphorylation of the receptor carboxyl tail at the same three sites, *Molecular Endocrinology* **11**, 1094-1102.

Wilmen, A., Van Eyl, B., Göke, B. & Göke R. (1997) Five out of six tryptophan residues in the N-terminal extracellular domain of the rat GLP-1 receptor are essential for its ability to bind GLP-1, *Peptides* **18**, 301-305.

Xie, Z. H., Bhushan, R. G., Daniels, D. J. und Portoghese, P. S. (2005) Interaction of bivalent ligand KDN21 with heterodimeric delta-kappa opioid receptors in human embryonic kidney 293 cells, *Molecular Pharmacology* **68**, 1079-1086.

Yesilaltay, A. und Jenness, D. D. (2000) Homo-oligomeric complexes of the yeast alpha-factor pheromone receptor are functional units of endocytosis, *Molecular Biology of the Cell* **11**, 2873-2884.

Yun, H. M., Kim, S., Kim, H. J., Kostenis, E., Kim, J. I., Seong, J. Y., Baik, J. H. und Rhim, H. (2007) The novel cellular mechanism of human 5-HT<sub>6</sub> receptor through an interaction with Fyn, *Journal of Biological Chemistry* **282**, 5496-5505.

Zettlmeissl, G., Rudolph, R. und Jaenicke, R. (1979) Reconstitution of lactic dehydrogenase - Non-covalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation, *Biochemistry* **18**, 5567-5571.

## **Dankesworte**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph danke ich für Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der hervorragenden Infrastruktur des Institutes für Biotechnologie anzufertigen. Außerdem möchte ich mich insbesondere für sein Verständnis bedanken, Wissenschaft und Familie unter ‚einen Hut zu bekommen‘.

Dr. Eva Bosse-Doenecke möchte ich für die vielen wissenschaftlichen und freundschaftlichen Gespräche während der letzten fünf Jahre danken. Ihr immerwährendes Interesse am Verlauf meiner Arbeit und nicht zuletzt die Korrekturlesung meiner Arbeit haben ganz wesentlich zu deren Fertigstellung beigetragen.

Den Mitstreitern der Arbeitsgruppe „Membranproteine“, ganz besonders Nils und Eva, danke ich für die Hilfe im Labor und die fast täglichen Aufmunterungen, die bei einem Mißerfolg zum Weitermachen motiviert haben.

Bei Herrn PD Dr. Ralph Golbik und Kai Tittmann bedanke ich mich ganz herzlich für ihre Hilfe bei der Auswertung spektroskopischer und thermodynamischer Daten und Korrekturlesung meiner Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Biotechnologie möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Uta Best danke ich ganz besonders für ihre unkomplizierte Hilfe bei den zahllosen Fermentationen.

Bei Herrn Dr. Christian Ihling bedanke ich mich für die massenspektrometrischen Analysen zur Aufklärung der Disulfidbrückenmuster der Varianten des GLP-1R. Frau Dr. Angelika Schierhorn danke ich für die Durchführung aller weiteren in dieser Arbeit aufgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Ihre immerwährende Unterstützung und Liebe haben mir den nötigen Antrieb für die Fertigstellung der Arbeit gegeben. Ohne sie hätte ich ein ums andere Mal aufgegeben. Danke!



## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Halle, April 2009

Kathrin Schröder-Tittmann

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Kathrin Schröder-Tittman (geb. Schröder)  
Geburtsdatum: 25. Juni 1978  
Geburtsort: Schönebeck / Elbe  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung

09/1985 - 08/1991: Besuch der Polytechnischen Oberschule „Diesterwegschule“ in Stendal  
09/1991 - 06/1997: Besuch des Gymnasiums „Rudolf-Hildebrand“ in Stendal  
06/1997: Abitur  
  
07/1997 - 08/1998: *Au pair* Aufenthalt in Philadelphia (USA)

### Universitäre Ausbildung:

10/1998 - 07/2000: Grundstudium des Studienganges Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
07/2000: Vordiplom  
08/2000-07/2001: Studium an der *Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes* (Frankreich) über das SOKRATES Förderprogramm der EU  
10/2001-07/2004: Hauptstudium des Studienganges Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
07/2004: Diplom (Prädikat: Sehr gut)  
seit 10/2004: Promotion zum Thema: „Rekombinante Herstellung, Renaturierung und biophysikalische Charakterisierung des humanen *Glucagon-like Peptide-1* Rezeptors“ unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Rainer Rudolph in der Abteilung Biotechnologie des Institutes für Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
04/2006-01/2007: Mutterschutz und Erziehungsurlaub