

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am humanen Parathormon-Rezeptor



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von Frau **Ulla Grauschopf**
geb. am 23.05.1971 in Leonberg

Promotionsgesuch eingereicht am 5. April 2000.

Verteidigt am 13. September 2000.

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Rainer Rudolph.

1. Gutachter: Prof. Rainer Rudolph
2. Gutachter: Prof. Dr. Alfred Maelicke
3. Gutachter: Prof. Dr. Walter Sebald

Das eben haben wir mit Wissenschaft gemeint. Daß das Fragen wie das Antworten mit Ungewißheit verbunden ist. Und daß beides weh tut. Doch daß es keinen Weg drumherum gibt. Und daß man nichts verbirgt, sondern alles offen ans Licht kommt.

(Peter Høeg, „Der Plan von der Abschaffung des Dunkels“)

Meinen Vätern

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Überblick	1
2	Strukturelle Eigenschaften und Klassifizierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren	3
3	Ligandenbindung und Signalübertragung G-Protein gekoppelter Rezeptoren	7
4	Rezeptoren für PTH und PTHrP: Biologische Wirkung und funktionelle Eigenschaften	11
5	Problemstellung	14
II	Material und Methoden	16
1	Material	16
1.1	Chemikalien	16
1.2	Standards und Kits	16
1.3	Proteine, Peptide, Antikörper und Enzyme	17
1.4	Chromatographiematerial- und Säulen	17
1.5	Sonstiges Material	17
1.6	Geräte	18
1.7	Organismen	18
1.8	Plasmide und Oligodesoxynukleotide	18
1.9	Medien, Antibiotika und Puffer	19
1.10	Programme	21
2	Methoden	22
2.1	Allgemeine gentechnische Methoden	22
2.1.1	<i>Kultivierung und Konservierung von E. coli-Stämmen</i>	22
2.1.2	<i>Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA</i>	22
2.1.3	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	22
2.1.4	<i>Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	23
2.1.5	<i>Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	23
2.1.6	<i>Gelelektrophorese von DNA</i>	23
2.1.7	<i>Ligierung von DNA-Fragmenten</i>	23
2.1.8	<i>Sequenzierung von Plasmid-DNA</i>	23
2.1.9	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	24
2.2	Allgemeine proteinchemische Methoden	24
2.2.1	<i>Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Proteinfärbung</i>	24
2.2.2	<i>Immunologischer Protein-Nachweis (Western-Blot)</i>	25
2.2.3	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	26
2.2.3.1	<i>UV-Absorptionsspektroskopie</i>	26
2.2.3.2	<i>Proteinbestimmung nach Lowry</i>	26
2.2.4	<i>Bestimmung freier SH-Gruppen</i>	26
2.2.5	<i>Aufkonzentrierung von Proteinlösungen</i>	27
2.2.6	<i>Fällung von Proteinen</i>	27
2.2.7	<i>N-terminale Proteinsequenzierung</i>	27
2.3	Reinigung und Charakterisierung des rekombinanten humanen PTH-Rezeptors (hPTHr) aus eukaryontischen Zellen	28
2.3.1	<i>Generierung einer Expressions-Zelllinie für den humanen PTH-Rezeptor</i>	28
2.3.2	<i>Eukaryontische Zellkultivierung</i>	28
2.3.3	<i>Membranpräparation und Solubilisierung von Membranproteinen</i>	28
2.3.4	<i>Lektinaffinitätschromatographie</i>	29
2.3.5	<i>Immunoaffinitätschromatographie</i>	29

2.3.6	Deglykosylierung mittels Endoglycosidase F.....	30
2.4	Rückfaltung und Reinigung des N-terminalen Rezeptorfragments (nPTHr) aus <i>E. coli inclusion bodies</i>	30
2.4.1	Erstellung des Expressionsplasmids p(nPTHr).....	30
2.4.2	Anzucht von Bakterien.....	31
2.4.2.1	Schüttelkolbenanzucht.....	31
2.4.2.2	Fed Batch-Fermentation.....	31
2.4.3	Zellaufschluß von Bakterien.....	31
2.4.4	Inclusion body-Isolierung und -Solubilisierung.....	31
2.4.5	Immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC).....	32
2.4.6	Rückfaltung des nPTHr.....	32
2.4.7	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	32
2.4.8	Präparative Gelfiltration.....	33
2.5	Biophysikalische Charakterisierung.....	33
2.5.1	Circulardichroismus.....	33
2.5.2	Fluoreszenzspektroskopie.....	34
2.5.3	Guanidiniumchlorid-induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge des nPTHr.....	34
2.5.4	Differential Scanning Kalorimetrie (DSC).....	35
2.6	Disulfidbrückenanalyse des nPTHr.....	35
2.7	Rückfaltung und Reinigung des PTH-Rezeptors (PTHr) aus <i>E. coli inclusion bodies</i>	36
2.7.1	Erstellung des Expressionsplasmids p(PTHr).....	36
2.7.2	Expression, Rückfaltung und Reinigung des PTH-Rezeptors.....	36
2.8	Untersuchungen zur Ligandenbindung.....	37
2.8.1	Quervernetzung von nPTHr und PTH.....	37
2.8.2	Oberflächenplasmonresonanz.....	37
2.8.3	Thrombinspaltung des nPTHr und Analytik der Spaltprodukte.....	39
2.8.4	Radioaktiver Ligandenbindungstest an eukaryontischen, bPTHr-haltigen Plasmamembranen.....	39
2.8.5	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	40
2.8.6	Ligandenaffinitätschromatographie.....	41
2.9	Analytische Ultrazentrifugation.....	41
2.10	Analytische Reversed Phase HPLC (RP-HPLC).....	42
2.11	Massenspektrometrie.....	42
2.12	1D-NMR-Spektroskopie.....	42

III Experimente und Ergebnisse 43

1	Gewinnung und Charakterisierung des rekombinanten humanen PTH-Rezeptor (hPTHr).....	43
1.1	Aufreinigung des humanen PTH-Rezeptors.....	43
1.2	Enzymatische Deglykosylierung des aufgereinigten Rezeptors.....	46
1.3	Bestimmung des N-Terminus des murenen Rezeptors.....	46
1.4	Ligandenbindung an einer Parathormon-Affinitätsäule.....	47
1.5	Bestimmung der Ligandenbindungsstärke an Zellmembran-präparationen.....	48
2	Untersuchung des N-terminalen PTH-Rezeptorfragments (nPTHr).....	49
2.1	Klonierung und Expression des nPTHr.....	49
2.2	Rückfaltung und Reinigung von nPTHr aus <i>E. coli inclusion bodies</i>	51
2.3	Charakterisierung des renaturierten nPTHr.....	53
2.3.1	Identität und Homogenität.....	53
2.3.2	Sekundär- und Tertiärstruktur.....	55
2.3.3	Thermische Stabilität.....	60
2.3.4	Stabilität gegenüber Guanidiniumchlorid.....	62
2.3.5	Analyse des Disulfidbrückenmusters.....	64
2.4	Ligandenbindung des renaturierten nPTHr an PTH.....	67
2.4.1	Bindungsspezifität und Bindungsstärke.....	67
2.4.1.1	Quervernetzung von nPTHr mit PTH.....	67
2.4.1.2	Oberflächenplasmonresonanz.....	68
2.4.1.3	Isothermale Titrationskalorimetrie.....	70
2.4.1.4	Einfluß des His-tags auf die Bindung.....	71
2.4.2	Stabilität und Struktur des nPTHr-PTH-Komplexes.....	72
2.4.2.1	Spektroskopische Charakterisierung.....	72

2.4.2.2	Stabilität gegenüber Temperatur und Guanidiniumchlorid	74
2.4.3	Molekulare Wechselwirkungen zwischen nPTHR und PTH.....	77
2.4.3.1	Temperaturabhängigkeit der Bindung und DCp.....	77
2.4.3.2	Salzabhängigkeit und pH-Abhängigkeit der Bindung.....	78
2.4.3.3	Bindung als Protonenübertragungsreaktion	80
3	Rückfaltung des PTH-Rezeptors aus E. coli inclusion bodies	81
3.1	Expression des PTH-Rezeptors (PTHR) in <i>E. coli</i>	81
3.2	Rückfaltung und Reinigung von PTHR aus <i>inclusion body</i> Material.....	83
3.3	Bindungsstudien am renaturierten PTH-Rezeptor.....	85
IV	Diskussion	87
1	Gewinnung des humanen Parathormon-Rezeptors aus eukaryontischem Zellmaterial.....	87
2	Untersuchung des N-terminalen Rezeptorsegments nPTHR.....	89
2.1	nPTHR läßt sich zu einer stabilen Proteindomäne renaturieren.....	90
2.2	nPTHR bildet eine funktionelle Ligandenbindungsdomäne	92
1	Prokaryontische Expression und Rückfaltung des humanen Parathormon-Rezeptors	98
4	Ausblick.....	100
V	Literaturverzeichnis.....	101
VI	Abkürzungen.....	113

I Einleitung

1 Überblick

Die physikalische Abgrenzung einer lebenden Zelle von ihrer Umgebung durch eine Zellmembran schafft die Voraussetzung für eine interne Regulierbarkeit chemischer Reaktionen und damit für Lebensprozesse überhaupt. Gleichzeitig ist die Zelle auf den Austausch von Wärme, Sauerstoff, Nahrungs- und Abfallstoffen, sowie von Informationen angewiesen. Damit Zellen mit ihrer Umgebung Informationen austauschen können, beispielsweise auf externe Stimuli reagieren können, müssen sie über einen Signalübertragungsapparat verfügen. Dies wurde im Verlauf der Evolution durch den Einbau von Rezeptoren in die zellumgebende Membran bewerkstelligt, die selektiv Signale ins Zellinnere weiterleiten und dadurch über die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen eine biologische Antwort auslösen. Als Signale dienen dabei chemische Substanzen, Licht, mechanische Kräfte, Temperaturveränderungen oder elektrochemische Impulse. Die biologische Antwort umfasst lebenswichtige Prozesse wie Zellbewegung, Zellteilung, Zellstoffwechsel, Morphogenese, Differenzierung, sowie sensorische Vorgänge. Der Übergang vom Einzeller, der mit der ganzen Zelle auf einen Umgebungsreiz antwortet, zum vielzelligen Organismus mit einer starken Spezialisierung von Zellgruppen macht sich auch in einer zunehmenden Komplexität des Signalübertragungsapparats und der auslösenden Stimuli bemerkbar. Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren stellen dabei eine Gruppe von in der Zellmembran eingelagerten Rezeptorproteinen dar, die sowohl in einzelligen Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, als auch in einfachen Mehrzellern, wie *Dictyostelium discoideum* und *Caenorhabditis elegans*, bis zu Säugern eine wichtige Rolle im Informationsaustausch spielen und je nach Komplexität des Organismus in einem mehr oder minder großem Repertoire vorhanden sind. Die Signalübertragung durch diese Rezeptoren wird durch Ligandenbindung, im Falle des Rhodopsins durch Isomerisierung des kovalent gebundenen Liganden, initiiert. Diese Interaktion bewirkt eine Konformationsänderung, die intrazellulär eine Wechselwirkung mit trimeren G-Proteinen, bestehend aus α -, β -, und γ -Untereinheiten, fördert. Nach Austausch des Nukleotids GDP gegen GTP in der α -Untereinheit löst sich diese vom Rezeptor und dem $\beta\gamma$ -Komplex. Die freie α -Untereinheit und der $\beta\gamma$ -Komplex können nun mit distinkten Effektorenzymen und Ionenkanälen interagieren und das primäre Signal weiterleiten.

Die Existenz G-Protein gekoppelter Rezeptoren wurde in den siebziger Jahren entdeckt: Die Arbeitsgruppe von Rodbell beschrieb 1977 die GTP-modulierbare, Glukagon-abhängige Aktivierung der Adenylatzyklase aus Rattenleber und die Inhibierung der Glukagonbindung

durch den dazugehörigen Rezeptor mittels Guanosinnukleotide (Welton *et al.*, 1977). Eine ähnliche Pharmakologie des β -adrenergen Rezeptors wurde von der Arbeitsgruppe von Gilman beschrieben (Insel *et al.*, 1976). Diese reinigten daraufhin das Guanosinnukleotid-bindende Protein (G-Protein), mit der die GTP-sensitive Ligandenbindung und Stimulierung der Adenylatzyklase wiederhergestellt werden konnte (Northup *et al.*, 1980). Von 1983, dem Jahr, in dem die Gensequenz des Rinderopsins veröffentlicht wurde (Nathans & Hogness, 1983), bis heute wurden nahezu 2000 G-Protein gekoppelte Rezeptoren kloniert, die unterschiedlichste Liganden binden und verschiedenste zelluläre Reaktionen hervorrufen. Diese Anzahl wächst stetig durch die Klonierung neuer Gensequenzen, die Sequenzhomologien zu bereits bekannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren aufweisen und als Orphanrezeptoren bezeichnet werden. Wie durch die Sequenzierung des Genoms des Nematoden *Caenorhabditis elegans* bekannt wurde, umfassen 5 % aller Gene dieses Organismus G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Bargmann, 1998). Bei Schätzung eines Säuger-genoms auf 80 000 bis 100 000 Gene kann demnach in Analogie zum Genom von *Caenorhabditis elegans* mit ca. 5000 G-Protein gekoppelten Rezeptoren im Säugerorganismus gerechnet werden (Marchese *et al.*, 1999).

Mutationen in Genen G-Protein gekoppelter Rezeptoren werden mit einer Vielfalt unterschiedlicher vererbbarer und somatischer Krankheiten assoziiert, die von Krebs bis Unfruchtbarkeit reichen. Dabei konnten Defekte bei der Ligandenbindung und Signalübertragung, sowie verringerte Expression oder konstitutive Aktivität bestimmter Rezeptoren festgestellt werden. So wird beispielsweise die autosomal dominant vererbte Krankheit Retinitis Pigmentosa durch eine Mutation von Thr17 des Rhodopsins und die dadurch bewirkte verringerte Rezeptorexpression ausgelöst (Macke *et al.*, 1993), Mutationen im Vasopressinrezeptor können zu einer bestimmten Art von Diabetes führen (Szalai *et al.*, 1998). Da die G-Protein gekoppelten Rezeptoren und ihre endogenen Liganden zudem eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Physiologie der menschlichen Organsysteme spielen, sind die Rezeptoren wichtige Angriffspunkte therapeutischer Interventionen. So wurden Therapeutika entwickelt, die wie beispielsweise die sogenannten β -Blocker für die β -adrenergen Rezeptoren (Main & Tucker, 1985) an Rezeptormolekülen spezifisch angreifen und dadurch ihre physiologische Wirkung modulieren. Die Aufklärung struktureller und funktioneller Eigenschaften G-Protein gekoppelter Rezeptoren und ihrer Liganden stellt daher ein wichtiges Arbeitsgebiet dar und soll zur Erweiterung des Kenntnisstands auf diesem Gebiet beitragen, um bestimmte Krankheiten besser zu verstehen und neue Therapiemöglichkeiten zu eröffnen.

2 Strukturelle Eigenschaften und Klassifizierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Der allgemeine Aufbau von G-Protein gekoppelten Rezeptoren umfasst ein extrazelluläres, glykosyliertes N-terminales Segment, sieben Transmembranhelices, drei Exoloops, drei Cytoloops und ein C-terminales, intrazelluläres Segment. Ein vierter Cytoloop wird bei Palmitoylierung einer Cysteinseitenkette des C-terminalen Segments, wie beispielsweise in α - und β -adrenergen Rezeptoren (O'Dowd *et al.*, 1989; Kennedy & Limbird, 1993) beschrieben, ausgebildet (Abb. 1). Die Größe der Rezeptoren kann von weniger als 300 Aminosäuren (Adrenokortikotrophin-Rezeptor) bis zu mehr als 1100 Aminosäuren (metabotrope Glutamatrezeptoren) variieren; die Länge der Transmembranbereiche liegt dabei zwischen 20 und 27 Aminosäuren, N- und C-terminale Segmente (7 bis 600 Aminosäuren) sowie loop-Regionen (5 bis 230 Aminosäuren) besitzen je nach Rezeptortyp unterschiedliche Längen.

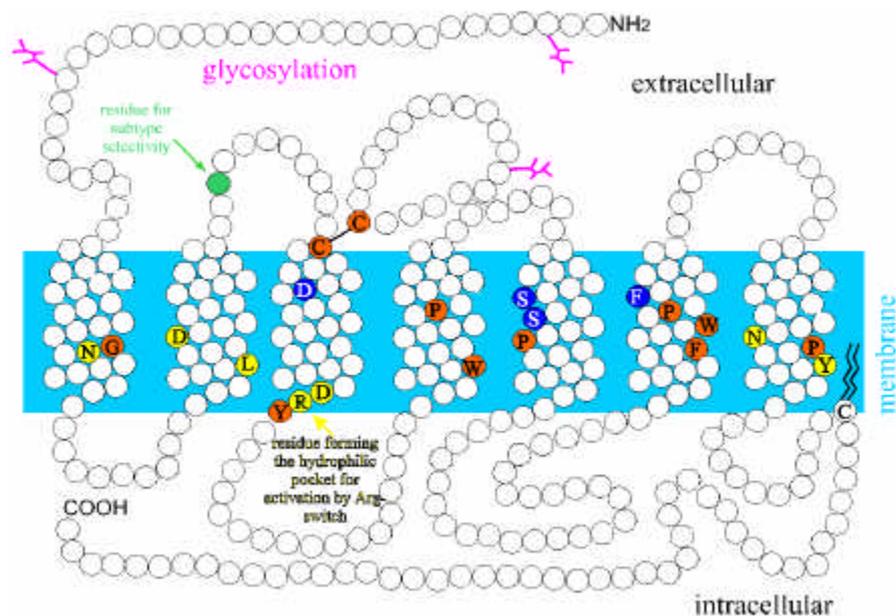


Abb. 1. Allgemeiner Aufbau eines G-Protein gekoppelten Rezeptors der Rhodopsin-Familie. Rezeptoren dieser Familie besitzen häufig ein kurzes N-terminales glykosyliertes Segment und hochkonservierte Aminosäureseitenketten (in rot) in den Transmembranhelices. In grün ist ein Aminosäurerest dargestellt, der Subtypenselektivität von Peptidrezeptoren vermittelt; Aminosäureseitenketten, die eine wichtige Rolle bei Bindung von Adrenalin an den β_2 -adrenergen Rezeptor spielen, sind in blau abgebildet. Seitenketten, die eine Rolle bei der Signaltransduktion besitzen, sind gelb markiert, der hochkonservierte Argininrest in Transmembranhelix 3 ist in mit einer gelb-grünen Markierung versehen (Abbildung entnommen aus Beck-Sickinger (1996)).

Während die extrazellulären Rezeptorbereiche sowie Transmembrananteile für Wechselwirkungen mit dem Liganden verantwortlich sind, ist der intrazelluläre Bereich an der selektiven

G-Protein-Erkennung und -Aktivierung und damit an der Modulierung der Signalantwort beteiligt (Strader *et al.*, 1994; Wess, 1997).

Bis heute gelang noch keine hochauflösende Strukturaufklärung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors. Mittels Elektronenmikroskopie konnten jedoch Strukturen niedriger Auflösung des Photorezeptors Rhodopsin dargestellt werden (Schertler *et al.*, 1993; Schertler & Hargrave, 1995; Unger *et al.*, 1997; Schertler, 1999). Diese und weitere biochemische Analysen bestätigten die vorhergesagte Anzahl von sieben Transmembranhelices in G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die wie in der bakteriellen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (Pebay-Peyroula *et al.*, 1997) in einer in Aufsicht zur Zelloberfläche gesehenen, entgegen dem Uhrzeigersinn gerichteten Orientierung angeordnet sind (Zhou *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995; Mizobe *et al.*, 1996) (Abb. 2).

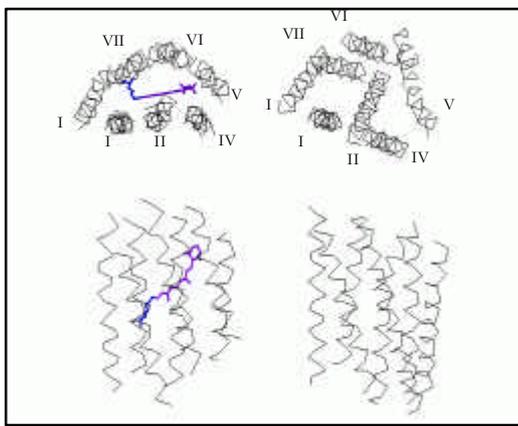


Abb. 2. Transmembranhelix-Anordnung in Bakteriorhodopsin und Rhodopsin. Dargestellt sind die Anordnungen der 7 Transmembranhelices von Bakteriorhodopsin (links) und Rhodopsin (rechts). Im Bakteriorhodopsin ist der kovalent mittels einer Schiffischen Base (blau) an Helix 7 gebundene Retinal-Ligand in lila dargestellt. Die oberen Abbildungen zeigen die Aufsicht auf die Zellmembran, in den unteren Abbildungen sind die Strukturen in Seitenansicht dargestellt.

Die Anordnung der Transmembranhelices zeigt, daß diese nicht alle senkrecht in der Membran eingelagert sind, sondern zur Membranebene unterschiedliche Neigungswinkel aufweisen können. Es kommt zur Ausbildung eines dichtgepackten Kernbereichs, der durch Salz- und Wasserstoffbrücken zwischen Transmembranhelices stabilisiert wird. Dieser dient vermutlich als Bindungstasche für den Liganden, bzw. für Anteile des Liganden (Ji *et al.*, 1998). Die Struktur von Bakteriorhodopsin wird zur Modellbildung G-Protein gekoppelter Rezeptoren verwendet, da es funktionelle Ähnlichkeit zu Rhodopsin aufweist (Donnelly & Findlay 1994). Das Protein aus der Purpurmembran von *Halobacterium halobium* gehört aber selbst nicht zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren.

Obwohl die Transmembranhelices G-Protein gekoppelter Rezeptoren Cysteinseitenketten besitzen, konnten bisher keine intramolekularen Disulfidbrücken in diesem Bereich identifiziert werden. Zwei hochkonservierte Cysteinreste in den Exoloops 1 und 2 sind aber in Rinderhodopsin (Karnik *et al.*, 1988), TSH-Releasing-Hormon-Rezeptor, dem Thromboxanrezeptor und dem Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor über eine Disulfidbrücke miteinander

verknüpft (Ji *et al.*, 1998). Diese experimentellen Befunde sprechen für eine in den meisten G-Protein gekoppelten Rezeptoren konservierte Disulfidbrücke, die eine konformationelle Restriktion ausüben könnte. Eine Ausnahme davon bilden die peripheren Cannabinoidrezeptoren, denen diese Cysteinreste fehlen (Munro *et al.*, 1993). Weitere Disulfidbrücken liegen bei manchen Rezeptoren in N-terminalen Rezeptorbereichen und Exoloops vor (Ji *et al.*, 1998).

Die Klassifizierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren in Familien und Gruppen innerhalb der Familien erfolgt über Sequenzvergleiche und den Vergleich der biochemischen Eigenschaften (Kolakowski, 1994). Die Homologie zwischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren liegt zwischen 20% bis 30% für Rezeptoren mit völlig unterschiedlichen Liganden und 50% bis 80% für Subtypen von Rezeptoren, die denselben oder sehr ähnliche Liganden binden. Es lassen sich 6 Familien aufstellen, wobei Familien A, B und C ausschließlich Vertreter aus dem Bereich der *Metazoa* beinhalten. Familien D und E sind in Pilzen, wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae* und *Ustilago maydis* zu finden, Familie F umfasst Rezeptoren des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum*. Die drei in Mehrzellern vorkommende Familien A bis C (Abb. 3) sollen im folgenden kurz vorgestellt werden.

Die größte Rezeptorfamilie stellt bis heute die Familie A dar, die Rhodopsin und ähnliche Rezeptoren umfasst. Rezeptoren dieser Familie bilden Gruppen, die unterschiedlichste Liganden wie bioaktive Amine, kurze Peptide, Glykoproteine, Lipide, Purine, Eicosanoide, Proteasen oder Chemokine binden. Der N-terminale Bereich dieser Rezeptoren ist hochglykosyliert, eine Anzahl polarer Aminosäuren sind in den Transmembranbereichen konserviert (Abb. 1). Diese Reste bilden vermutlich ein Netzwerk strukturstabilisierender Wasserstoffbrücken aus oder sind an der Signaltransduktion beteiligt. Es wird angenommen, daß konservierte Prolinreste in den Transmembranhelices 4 bis 7 eine Rolle bei der Rezeptordynamik spielen könnten, so beispielsweise im Wechsel von aktiven zu inaktiven Zuständen (Gether *et al.*, 1997). Die Palmitoylierung einer Cysteinseitenkette im C-terminalen Segment führt zur Ausbildung eines vierten Cytoloops. Diesem wird eine Rolle bei der Desensibilisierung der Rezeptoren zugeschrieben. Die Cytoloops 2 und 3 interagieren mit den trimeren G-Proteinen und sind damit direkt an der Signalübertragung beteiligt (Beck-Sickinger, 1996).

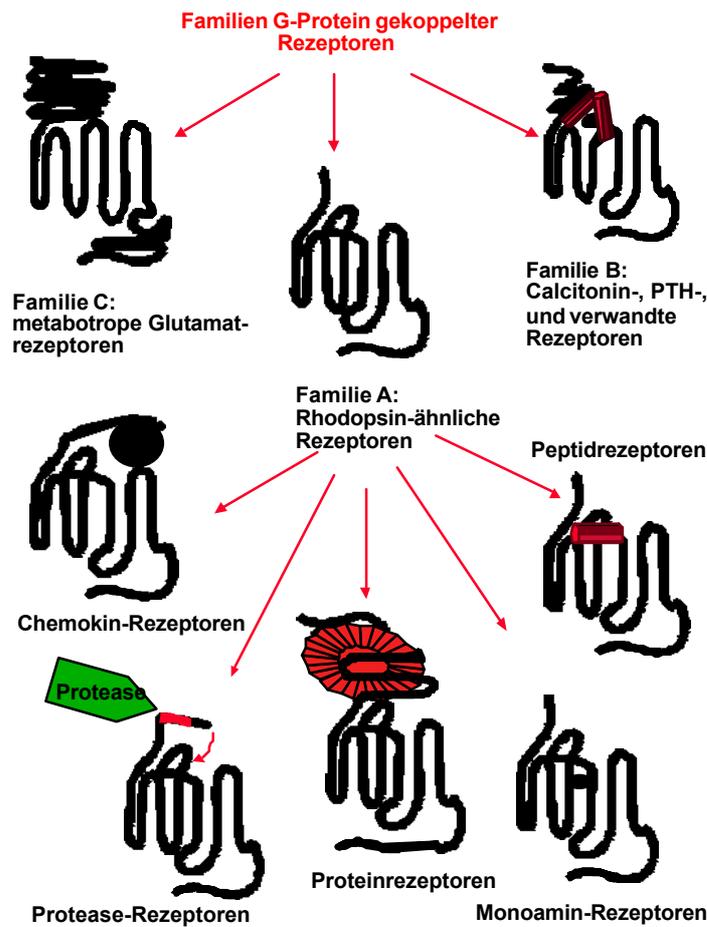


Abb. 3. Hauptfamilien G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Rezeptoren sind in schwarz, Liganden in rot dargestellt (modifiziert nach Beck-Sickinger, 1996).

Hauptsächlich Peptidhormone, wie Glucagon, Calcitonin oder Parathormon und Neuropeptide, wie das Growth Hormone Releasing Hormon binden an Rezeptoren der Klasse B. Diese zeichnen sich durch einen großen extrazellulären N-terminalen Rezeptorbereich (100 bis 170 Aminosäurereste) aus, der eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung spielt und konservierte Konsensussequenzen für N-Glykosylierung enthält. Sechs hochkonservierte Cysteinreste in diesem Rezeptorteil legen die Vermutung eines konservierten Disulfidmusters nahe. Diese wird durch eine Beeinträchtigung der Ligandenbindungsfähigkeit mehrerer Familienmitglieder unter reduzierenden Bedingungen und bei Mutagenese von Cysteinseitenketten unterstützt (Lee *et al.*, 1994; Gaudin *et al.*, 1996).

Die dritte und bisher kleinste Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren im Metazoenreich umfasst 6 Mitglieder, unter ihnen die G-Protein gekoppelten Glutamatrezeptoren und der Kalzium-Sensor des Parathormonrezeptors. Die großen extrazellulären Domänen (500 bis 600 Aminosäurereste) dieser Rezeptoren ähneln denen einer Familie bakterieller periplasmatischer

Bindeproteine. Mutagenesestudien und Modelling der metabotropen Glutamatrezeptoren lassen vermuten, daß Glutamat ähnlich wie in den bakteriellen Bindeproteinen, zwischen zwei Subdomänen des N-terminalen Rezeptorteils gebunden wird (O'Hara *et al.*, 1993).

3 Ligandenbindung und Signalübertragung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Die an der Ligandenbindung beteiligten Bereiche G-Protein gekoppelter Rezeptoren sind je nach Art der Agonisten sehr unterschiedlich. Sehr kleine Liganden, wie beispielsweise die Monoamin-Liganden Adrenalin und Histamin, binden im Kernbereich der Transmembranhelices, während die Bindungsbereiche größerer Peptide und Proteine auch den N-terminalen Rezeptoranteil und Exoloops beinhalten (Gether & Kobilka, 1998). Es konnte eine schwach positive Korrelation zwischen Ligandengröße und der Länge des N-terminalen Segments festgestellt werden, die auf eine Rolle dieses Bereichs vor allem in der Bindung von Polypeptiden und Glykoprotein-Hormonen hinweist. Eine erwähnenswerte Ausnahme davon ist das ca. 600 Aminosäuren lange N-terminale Segment der Neurotransmitter-Rezeptoren, die sehr kleine Liganden wie beispielsweise Kalziumionen binden. Rhodopsin und die Opsin-Rezeptoren besitzen kovalent gebundene Liganden, die durch eine photoneninduzierte Konformationsänderung den Rezeptor aktivieren. Die Aktivierung der Proteaserezeptoren, wie des Thrombinrezeptors, beinhaltet die Abspaltung eines Rezeptorsegments durch die gebundene Protease (Vu *et al.*, 1991). Der neu entstandene N-terminale Rezeptorbereich dient daraufhin als Ligand, der mit Exoloops und Transmembranbereichen wechselwirkt (Nanevicz *et al.*, 1996; Lerner *et al.*, 1996).

Als Modell der Bindung eines Liganden an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor dient die Hypothese der konformationellen Selektion, die auf dem Modell von Koshland und Neet (1968) und dem *extended ternary complex*-Modell (Samama *et al.*, 1993), beruht. Gemäß dieser Vorstellung existieren Rezeptoren in mindestens zwei unterschiedlichen Zuständen R und R*, die miteinander im Gleichgewicht stehen. R stellt dabei eine Rezeptorkonformation dar, die nicht mit G-Proteinen interagieren kann und deshalb inaktiv ist. R* bindet an G-Proteine und ist aktiv. Solange keine Liganden gebunden sind, liegt das Gleichgewicht zwischen R und R* auf der Seite der inaktiven Rezeptoren (Gleichgewichtskonstante $K = (R)/(R^*) \gg 1$). Dennoch sind auch unter diesen Bedingungen einige Rezeptoren aktiv und sorgen für eine meßbare Basalaktivität. Liganden besitzen nun unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Rezeptorkonformationen, die sich in unterschiedlichen Assoziationskonstanten K_A und K_A^* ausdrücken. Die Wirksamkeit eines Liganden besteht in der Fähigkeit desselben, das

Gleichgewicht zwischen beiden Konformationen zu verschieben. Liganden, die mit hoher Affinität an R^* binden, verschieben das Gleichgewicht zugunsten der aktiven Rezeptoren; sie werden als Agonisten bezeichnet. Bindet ein Ligand mit hoher Affinität an die inaktive Rezeptorkonformation und reduziert damit den Anteil aktiver Rezeptoren, so wirkt er als inverser Agonist (Chidiac *et al.*, 1994). Inverse Agonisten zeichnen sich dadurch aus, daß sie die Rezeptorantwort unter den üblichen Basallevel drücken. Liganden, die sowohl an R und R^* binden und keinen Einfluß auf das Gleichgewicht zwischen beiden Konformationen ausüben, werden als kompetitive Agonisten bezeichnet. Bindet ein Ligand nur schwach an R^* und verschiebt das Gleichgewicht nur sehr wenig, wirkt er als partieller Agonist.

Das Modell der konformationellen Selektion wird durch eine Reihe experimenteller Untersuchungen gestützt, die vor allem an konstitutiv-aktiven Rezeptormutanten durchgeführt wurden (Lefkowitz *et al.*, 1993; Spiegel, 1996; Schwartz & Rosenkilde, 1996). Es wird davon ausgegangen, daß die inaktive Rezeptorkonformation konformationellen Einschränkungen unterliegt, die erst bei Aktivierung (oder spezifischer Mutation) aufgehoben werden und dadurch eine Wechselwirkung zwischen G-Proteinen und C-terminalem Rezeptorbereich zulassen (Kjelsberg *et al.*, 1992; Lefkowitz *et al.*, 1993; Gether *et al.*, 1997).

Obwohl viele bekannte Eigenschaften G-Protein gekoppelter Rezeptoren durch dieses Modell beschrieben werden können, deuten neuere experimentelle Befunde darauf hin, daß zukünftig noch komplexere Modelle aufgestellt werden müssen, um die Bindung zwischen Rezeptoren und Liganden und die damit verbundenen Aktivierungsprozesse besser beschreiben zu können (Kenakin, 1997; Gether & Kobilka, 1998).

Der Prozess der Signalübertragung über die Zellmembran hinweg ist am Lichtrezeptor Rhodopsin bisher am ausführlichsten im molekularen Detail untersucht worden. Die durchgeführten Studien zeigen, daß der Aktivierungsprozess keine ausgeprägten Konformationsänderungen des Rezeptorproteins beinhaltet, sondern über subtile Änderungen der relativen Orientierung der Transmembranhelices zueinander vonstatten geht (Hargrave & McDowell, 1992; Lin & Sakmar, 1996; Farrens *et al.*, 1996). Rhodopsin hat seinen Retinalliganden kovalent über eine Schiff'sche Base zwischen der Aldehydgruppe und einer Lysinseitenkette in der Mitte von Transmembranhelix 7 als inversen Agonisten gebunden. Durch die Absorption eines Photons isomerisiert dieser in der Bindungstasche zu einem Agonisten. Die Tatsache, daß bei diesem Rezeptor der Prozess der Ligandenbindung nicht einen Teil des Aktivierungsvorgangs darstellt, ist vermutlich auf den Bedarf einer extrem schnellen Antwort des Moleküls auf Lichteinwirkung zurückzuführen (Gether & Kobilka, 1998). Die Umwandlung des inversen Agonisten *cis*-Retinal zum Agonisten *trans*-Retinal erfolgt im Femtosekundenbereich. Rhodopsin durchläuft danach innerhalb von Mikrosekunden eine Serie von spektroskopisch

charakterisierbaren Konformationsänderungen der Transmembranhelices 3 und 6 relativ zu den verbliebenen Transmembranhelices über Bathorhodopsin, Lumirhodopsin, Metarhodopsin I zu Metharhodopsin II, das die aktive Konformation R* darstellt. Diese Konformation interagiert mit dem G-Protein Transducin, das das erhaltene Signal verstärkt und weiterleitet (Hargrave & McDowell, 1992; Wess, 1997).

Im Gegensatz zu den Aktivierungsprozessen des Rhodopsins ist wenig bekannt über den Mechanismus, der nach Bindung diffundierbarer Liganden wie Peptiden, Monoaminen oder Glykoprotein-hormonen zur Ausbildung des R*-Zustands führt. Gether und Mitarbeitern gelang es jedoch kürzlich, Konformationsänderungen des humanen β_2 -adrenergen Rezeptors nach Agonistenbindung durch Echtzeit-Fluoreszenzspektroskopie zu untersuchen (Gether *et al.*, 1995; Gether *et al.*, 1997). Die Bindungstasche für Catecholamine im β_2 -adrenergen Rezeptor weist eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zur Ligandenbindungsstelle des Rhodopsins auf (Strader *et al.*, 1995; Sakmar, 1998). Im Gegensatz zu den schnellen Aktivierungsprozessen im Rhodopsinmolekül zeigten sich hier jedoch die durch den Agonisten induzierten Konformationsänderungen erst im Minutenbereich. Die beobachteten Unterschiede der Aktivierungskinetiken deuten auf grundsätzlich unterschiedliche Aktivierungsmechanismen zwischen Rezeptoren mit kovalent gebundenem Liganden und diffundierbaren Agonisten hin (Gether & Kobilka, 1998), schließen aber einen ähnlichen aktiven Zustand R* nicht aus.

Die Rekrutierung unterschiedlicher G-Proteine durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren erfolgt vermutlich in R* durch spezifische Wechselwirkungen des zweiten und dritten Cytoloops mit den G-Protein-Heterotrimeren (Wess, 1997). Kurze synthetische Peptide aus diesen Bereichen wurden erfolgreich zur Kompetition der Wechselwirkung zwischen G-Proteinen und Rezeptoren eingesetzt (Konig *et al.*, 1989; Munch *et al.*, 1991). Darüber hinaus scheint ein in der Rhodopsin-Rezeptorfamilie hochkonserviertes Seitenkettenmotiv in der dritten Transmembranhelix (Abb. 1) Asp(Glu)-Arg-Tyr eine wichtige Rolle bei der Konformationsänderung zu R* und damit bei der Ermöglichung dieser Wechselwirkung zu spielen (Ohyama *et al.*, 1992). Studien an Rezeptorchimären, die Proteinbereiche zweier Rezeptoren miteinander verknüpfen, bewiesen die Rolle der Cytoloops an der spezifischen Wechselwirkung eines Rezeptors mit einem Subset an G-Proteinen. Die Aufklärung der Kristallstrukturen zweier G-Protein-Trimere (Wall *et al.*, 1995; Lambright *et al.*, 1996) trug zudem dazu bei, eine potentielle Orientierung von Rezeptor und G-Protein zueinander, sowie die Orientierung des G-Proteins an der Zellmembran zu postulieren (Iiri *et al.*, 1998) (Abb. 4).

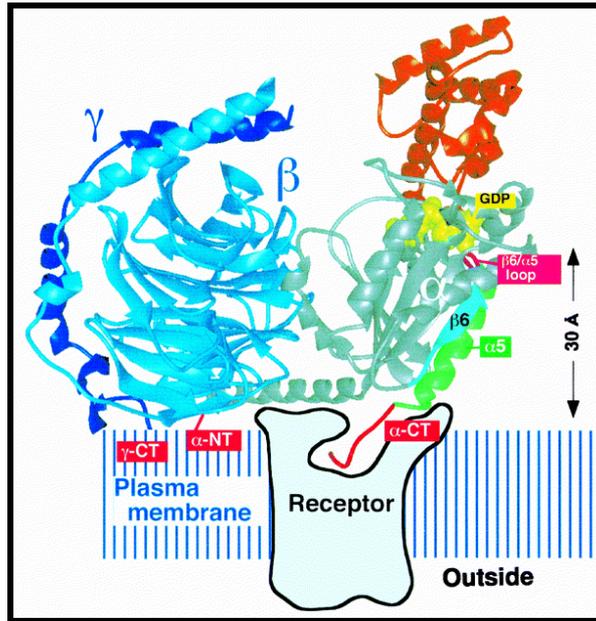


Abb. 4. Postulierte Orientierung eines G-Protein-Trimers an einem Transmembranrezeptor (Iiri et al., 1998). Der C-Terminus interagiert mit dem Rezeptormolekül, Lipidmodifikationen des N-Terminus von G α und G γ verankern das G-Protein in der Plasmamembran. Die Struktur des Trimers basiert auf Daten von Lambright und Mitarbeitern (1996).

Bisher wurden 20 α -, 5 β - und 6 γ -G-Protein-Untereinheiten beschrieben, die zu einer Vielzahl potentieller $\alpha\beta\gamma$ -Trimeren assemblieren können. Diese treten mit unterschiedlichen G-Protein gekoppelten Rezeptoren in Wechselwirkung (Tab. 1) und leiten dann das von außen erhaltene Signal bei gleichzeitiger Verstärkung in der Zelle über Interaktionen mit Adenylatzyklase, Guanylatzyklase, Phospholipasen A oder C, Ca²⁺ - oder K⁺-Kanälen weiter.

Tab. 1. Auswahl einiger Liganden für G-Protein gekoppelte Rezeptoren und der durch sie aktivierten Signalwege (entommen aus Beck-Sickinger, 1996).

Rezeptor-Familie	Ligand/Ligandenfamilie	Rezeptor	G-Proteine (a-Untereinheiten)	Signalweg
Familie A Monoaminrezeptoren	Acetylcholin	M ₁ , M ₃ , M ₅	G _q , G ₁₁	PLC ↑
		M ₂ , M ₄	G _i , G _o	cAMP ↓, Ca ²⁺ ch ↑
Familie A Peptidrezeptoren	Dopamin	D ₂ , D ₃ , D ₄	G _i , G _o	cAMP ↓, Ca ²⁺ , K ⁺ ↑
	Neurotensin	Neurotensinrezeptor	G _q , G ₁₁	PLC ↑
Familie A Proteaserezeptoren	Vasopressin	V _{1a} , V _{1b}	G _q , G ₁₁	PLC ↑
		V ₂	G _s	cAMP ↑
		durch Thrombin freigesetzter N-Terminus = Ligand	Thrombinrezeptor (PAR1)	G _q , G ₁₁
Familie A	11-cis-Retinal (Licht)	Rhodopsin	Transducin	cGMP-Phosphodiesterase ↑
Familie B	Calcitonin	Calcitoninrezeptor	G _s	cAMP ↑
	Parathormon	Parathormonrezeptor	G _s	cAMP ↑, PLC ↑
Familie C Metabotrope Glutamatrezeptoren	Glutamat	mGluR ₁ , mGluR ₅	G _q , G ₁₁	PLC ↑
		mGluR _{2,3,4} ,	G _i , G _o	cAMP ↓
		mGluR _{6,7,8}		

Abkürzungen: PLC, Phospholipase C; Ca²⁺ch, Ca²⁺-Kanäle; ↓, Inhibierung; ↑, Aktivierung.

4 Rezeptoren für PTH und PTHrP: Biologische Wirkung und funktionelle Eigenschaften

Humane Rezeptoren für die Peptidhormone Parathormon (PTH) und Parathormon-related peptide (PTHrP) werden hauptsächlich in hoher Anzahl im Knochengewebe und der Niere exprimiert. Sie sorgen in diesen Organen für die Parathormon-abhängige Regulierung des Mineralstoffhaushalts. Darüber hinaus vermittelt der Parathormon-Rezeptor (PTHrP) die parakrine Wirkung des PTHrP, das eine entscheidende Rolle im Prozess der endochronalen Knochenbildung spielt (Mannstadt *et al.*, 1999). Schon 1978 konnten Goltzman und Mitarbeiter den PTHR als G-Protein gekoppelten Rezeptor identifizieren (Goltzman *et al.*, 1978). 1995 wurde ein zweiter Subtyp des Parathormon-Rezeptors (PTHrP2) entdeckt (Usdin *et al.*, 1995), der allein auf Parathormon, nicht auf PTHrP reagiert und dessen biologische Bedeutung bislang unbekannt blieb. Beide Rezeptoren gehören zur Familie B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und aktivieren mehrere intrazelluläre Signalkaskaden, darunter den lange bekannten Signalweg über die Adenylatzyklase mit einem Anstieg des intrazellulären cAMP und den Phospholipase-C-Weg mit einer Bildung von Diacylglycerol, Inositolphosphaten und einem Anstieg des intrazellulären Kalziums. Zusammen mit den Rezeptoren für Calcitonin, Glucagon, Glucagon-like Peptide, Secretin, PACAP und anderen zeichnen sie sich durch eine große N-terminale Domäne mit sechs konservierten Cysteinseitenketten aus (Abb. 5).

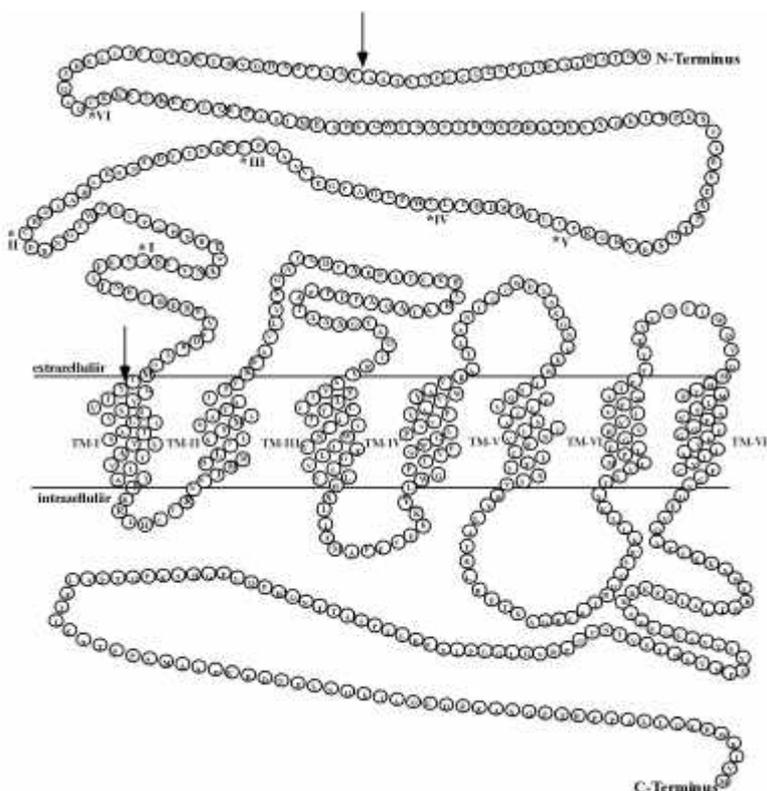


Abb. 5. Schematische Struktur des humanen Parathormonrezeptors. Die Primärstruktur des Gesamtrezeptors ist mit der vermutlichen Topologie der Transmembranhelices (Gardella *et al.*, 1996) dargestellt. Konservierte Cysteinreste sind mit Sternchen versehen. Die Pfeile bezeichnen das in dieser Arbeit bearbeitete Rezeptorfragment nPTHrP.

Die Aktivierung des PTHR durch Bindung seiner Liganden scheint zwei Schritte zu beinhalten, wobei in einem Schritt eine spezifische Wechselwirkung des N-terminalen Rezeptoranteils und der Exoloops mit den Peptidhormonen ausgebildet wird, im anderen Schritt die Interaktion dieses Komplexes mit Transmembrananteilen zur Signalübertragung führt (Behar *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 1998; Rolz *et al.*, 1999; Mannstadt *et al.*, 1999).

Der PTH-Ligand des PTHR wird in einer reifen Form von 84 Aminosäuren in den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüsen, PTHrP in mehreren durch alternatives mRNA-Splicing produzierten Formen zwischen 139 und 173 Aminosäuren gebildet. Zur Aktivierung des PTHR und des PTHR2 sind jedoch die 34 Aminosäure langen N-terminalen Fragmente dieser Peptide ausreichend (Mannstadt *et al.*, 1999). Beide Liganden zeigen eine signifikante Sequenzhomologie in den ersten 13 Aminosäureresten auf, was auf die funktionelle Bedeutung dieser Aminosäuren bei der Aktivierung der Rezeptoren hindeutet. Im Bereich zwischen Aminosäure 14 und 34 sinkt die Homologie deutlich, oberhalb Aminosäure 34 ist keine Ähnlichkeit mehr feststellbar. Die Liganden PTH1-34 und PTHrP1-36 konnten mittels NMR strukturell untersucht werden (Barden & Kemp, 1994; Marx *et al.*, 1995; Gronwald *et al.*, 1997) und weisen definierte Sekundärstrukturelemente auf (Abb. 6). Der C-terminale Bereich enthält eine stabile α -Helix, die durch eine flexible Region mit einer weniger stabilen N-terminalen α -Helix verbunden ist. Mutagenesestudien und *cross-linking*-Experimente deuten daraufhin, daß die C-terminalen Bereiche (Aminosäuren 15 bis 34) beider Liganden über die α -helikale Struktur mit dem N-terminalen Anteil des PTHR wechselwirken, die N-terminalen Aminosäuren jedoch mit Aminosäureresten der Transmembranhelices interagieren und für eine Weiterleitung des Signals, bzw. eine aktivierte Konformation R* des Rezeptors verantwortlich sind (Juppner *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Behar *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1996; Gardella *et al.*, 1996; Bisello *et al.*, 1998; Mannstadt *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1998; Marx *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 1999).

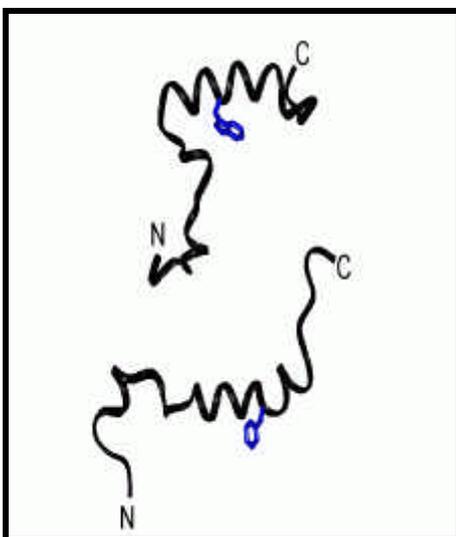


Abb. 6. NMR-Strukturen des PTH und des PTHrP. Oben: PTH-Struktur nach Marx und Mitarbeitern (1995) mit konserviertem Trp23 in blau. Unten: Struktur des PTHrP nach Barden & Kemp (1994) mit konserviertem Phe22 in blau.

In Säugern ist PTH der wichtigste Regulator der Kalziumionen-Homöostase (Potts & Juppner, 1997). Die Synthese des Hormons wird dabei durch die extrazelluläre Kalziumkonzentration geregelt, die durch den Kalzium-Sensor der Nebenschilddrüsenzellen gemessen wird (Brown *et al.*, 1993). Als Antwort auf eine niedrige Kalziumionenkonzentration der Extrazellulärflüssigkeit ($< 2,5$ mM) wird PTH in die Blutbahn abgegeben und wirkt hauptsächlich an Knochengewebe und Niere zur Wiederherstellung des Norm-Kalziumniveaus (Fitzpatrick *et al.*, 1992). Im Nierengewebe stimuliert PTH über seine Wechselwirkung mit dem PTH-Rezeptor direkt die tubuläre Reabsorption von Kalzium und die Aktivität der Transkription der D3-1 α -Hydrolase, was zur Erhöhung der 1,25-Dihydroxyvitamin-D3-abhängigen Kalziumabsorption im Darm führt. Im Knochengewebe kann PTH eine schnelle Freisetzung von Kalzium aus der Knochenmatrix bewirken (Bringham, 1989). Es vermittelt darüberhinaus auch längerfristige Änderungen des Kalzium-Stoffwechsels durch eine direkte Wirkung auf Osteoblasten und eine indirekte aktivierende Wirkung auf Osteoklasten. Zusätzlich zu den regulatorischen Wirkungen auf den Kalziumhaushalt, wirkt PTH bei der Aufrechterhaltung der Normkonzentration des Phosphats im Blut durch eine Inhibierung der Phosphatresorption in den proximalen und distalen Nierentubuli mit.

PTHrP wurde als häufigste Ursache des Syndroms der humoralen Hyperkalzämie in malignen Erkrankungen entdeckt (Suva *et al.*, 1987), bei denen das Hormon durch den Tumor überproduziert wird, spielt aber in gesunden Menschen eine essentielle Rolle in der Skelettentwicklung. Die Wirkung des PTHrP entfaltet sich dabei über die Aktivierung des PTHR in prähypertrophen Chondrocyten der metaphysealen Wachstumsplatten während der Ausbildung des Skeletts. Auch weitere wichtige Funktionen bei Entwicklungsvorgängen werden beiden Molekülen zugeschrieben (Mannstadt *et al.*, 1999).

PTH und PTHrP gehören zu den wenigen Substanzen, denen eine knochenaufbauende Wirkung nachgewiesen werden konnte (Dempster *et al.*, 1993). Bei geeigneter Applikation, nämlich intermittierend als wiederholte subkutane Injektionen, können PTH und PTHrP eine anabole Wirkung am Skelett besitzen (Chevalley & Rizzoli, 1999). Dies konnte sowohl an ovariectomierten Ratten als einem Tiermodell der Osteoporose (Mitlak *et al.*, 1996) als auch in ersten kleinen Pilotstudien am Menschen demonstriert werden (Reeve, 1996; Plotkin *et al.*, 1998). In einer Studie mit einer allerdings kleinen Fallzahl an Frauen mit Osteoporose-Risikoerkrankungen kam es nicht nur zu einem ausgeprägten Knochenmassegewinn, sondern auch zu einer signifikanten Reduktion der Wirbelkörperfrakturen. Für eine breitere Anwendung solcher Therapieformen sollen zukünftig knochenanabole PTH/PTHrP-Analoga entwickelt werden, die möglichst selektive Eigenschaften besitzen.

Die wichtige Rolle der PTH/PTHrP-vermittelten Signalübertragung durch den PTH-Rezeptor bei der Steuerung der Entwicklung von Knorpel und Knochen offenbart sich auch bei einigen seltenen erblichen Erkrankungen, die durch eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors oder durch eine Hemmung der Signalübertragung aufgrund von Rezeptormutationen verursacht werden. Bei der Chondrodysplasie vom Typ Jansen konnten drei Punktmutationen in genomischer Patienten-DNA festgestellt werden. His223→Arg, Thr410→Pro, oder Ile458→Arg-Mutationen führten zu einer konstitutiven, agonistenunabhängigen Rezeptoraktivierung. Dies führt neben einer daraus resultierenden Hyperkalzämie u.a. zu einer verzögerten endochondralen Knochenbildung mit Zwergwuchs und gesteigertem Knochenauf- und -abbau (Schipani *et al.*, 1995; Schipani *et al.*, 1996; Schipani *et al.*, 1997; Schipani *et al.*, 1999). Mutationen, die eine Signalübertragung des PTH-Rezeptors verhindern, wurden kürzlich in zwei verschiedenen Fällen der Chondrodysplasie vom Typ Blomstrand entdeckt. Diese sehr seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung geht mit einer frühzeitigen Skelettreifung und einer verstärkten Ossifikation einher (Blomstrand *et al.*, 1985). In einem Fall waren 11 Aminosäuren der Transmembranhelix 5 deletiert (Jobert *et al.*, 1998), im anderen Fall konnte eine Punktmutation, die die hochkonservierte Aminosäureseitenkette Pro132 gegen Leucin austauschte (Zhang *et al.*, 1998), nachgewiesen werden. Beide Mutationen verminderten die Bindung von PTH und PTHrP an den Rezeptor und führten zu einer starken Reduktion der Signalantwort in cAMP-Assays.

5 Problemstellung

In den letzten Jahren wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, die molekulare Wechselwirkung zwischen PTH-Rezeptor und seinen Liganden und ihre physiologische Rolle zu charakterisieren. Durch Mutagenesestudien, *cross-linking*-Experimente und Studien an chimären Rezeptoren gelang die Identifikation einiger für Bindung und Signaltransduktion wichtiger Aminosäuren und Proteinabschnitte (Mannstadt *et al.*, 1999). Bislang beschränkten sich diese Untersuchungen jedoch auf *in vivo*-Studien an rekombinanten, PTHR-exprimierenden Zell-Linien.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Parathormon-Rezeptor und Teile desselben isoliert auf Proteinebene strukturell und funktionell zu charakterisieren. Dazu sollen geeignete Expressionssysteme eingesetzt werden, um den PTHR in auch für Strukturaufklärung ausreichenden Mengen herzustellen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollen die Möglichkeiten einer Säugerzell-Expression zur Herstellung des humanen PTH-Rezeptors getestet und Aufreinigungsverfahren für den Membranrezeptor entwickelt werden.

Im zweiten Teil soll der extrazelluläre N-terminale Rezeptoranteil auf seine Fähigkeit zur Ausbildung einer eigenständigen Ligandenbindungsdomäne hin untersucht werden. Dazu soll das Rezeptorfragment in *E. coli* in *inclusion bodies* exprimiert und aus diesen zurückgefaltet werden. Bei Ausbildung eines funktionellen Proteins sollen die Ligandenbindungseigenschaften näher charakterisiert werden. Eine wichtige strukturelle Einschränkung der Polypeptidkette erfahren die Mitglieder der Familie B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren vermutlich durch die Ausbildung dreier Disulfidbrücken in ihrer extrazellulären, N-terminalen Domäne (Juppner, 1994). Die Ausbildung dieser potentiellen Disulfidverbrückung und -falls vorhanden- das Verknüpfungsmuster sollen an dem separat exprimierten Rezeptorfragment untersucht werden.

Die strukturelle Untersuchung von Membranrezeptoren scheitert häufig an der schlechten Verfügbarkeit homogenen Materials. Dies liegt oft an der limitierten Expression von Rezeptoren in funktioneller Form (Tate & Grishammer, 1996). Eine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, wäre eine Expression in nicht-funktioneller Form in *inclusion bodies* und die darauffolgende Renaturierung zu funktionellen Rezeptoren. Im letzten Teil dieser Arbeit soll daher der Versuch unternommen werden -aufbauend auf den Renaturierungsdaten des N-terminalen Segments-, den gesamten Rezeptor in *E. coli* als *inclusion bodies* herzustellen und aus diesem Material zu einer ligandenbindungsfähigen Spezies zurückzufalten.

Diese drei Herangehensweisen sollen auf ihre Fähigkeiten hin überprüft werden, Proteinmaterial in ausreichenden Mengen für weitergehende Charakterisierungsschritte herzustellen. Dabei steht, neben der funktionellen Charakterisierung der molekularen Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand, eine Bereitstellung von Material für strukturelle Studien mittels NMR und Kristallographie im Vordergrund.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Ampicillin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
8-Anilino-1-Naphtalen-Sulfonsäure	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Bacitracin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Bacto Agar	Difco, Detroit, U.S.A.
Bacto Trypton	Difco, Detroit, U.S.A.
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit, U.S.A.
Chymostatin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
1,4-Dithiothreitol	ICN, Eschwege
Fötale Rinderserum	Gibco, Eschwege
Geneticin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Glutathion, oxidiert	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Glutathion, reduziert	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Guanidiniumhydrochlorid C-grade	Nigu Chemie, Walskraiburg
Guanidiniumhydrochlorid ultrapure	Applichem, Darmstadt
Harnstoff	ICN, Eschwege
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
L-Arginine Monohydrochlorid	Ajinomoto, Tokio, Japan
Lauroyl-Sarkosin	ICN, Eschwege
Lauryldimethylaminoxid 30%	Calbiochem, LaJolla, U.S.A.
L-Cystein	ICN, Eschwege
Leupeptin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
n- Decyl- β -Maltosid	Glycon, Luckenwalde
N-Acetyl-Glucosamin	Sigma, St. Louis, U.S.A.
Penicillin/Streptomycin 100x	Gibco, Eschwege
Pepstatin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Pferdeserum	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Phenylmethylsulfonylchlorid	Sigma, St. Louis, U.S.A.
2-2-Piridinyldithioetaneamin-Hydrochlorid	Biacore, Uppsala, Schweden
Triton X-100 10%	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Alle nicht eigens aufgeführten Chemikalien stammen von den Firmen ICN, Sigma und Fluka und hatten den Reinheitsgrad p.a.. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde Millipore-Wasser verwendet.

1.2 Standards und Kits

1 kbp DNA Längenstandard	New England Biolabs, Beverly, U.S.A.
10 kDa Protein Längenstandard	Gibco, Eggenstein
Amine-Coupling Kit	Biacore AB, Freiburg

ECL Western blotting reagents	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
LMW Electrophoresis Calibration Kit	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
PCR-Script Amp Cloning Kit	Stratagene, La Jolla, U.S.A.
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
SequiTherm ExcellIII Long-Read DNA Sequencing Kit	Epicentre Technologies, Madison, U.S.A.

1.3 Proteine, Peptide, Antikörper und Enzyme

Anti-Maus-IgG-Peroxidase Konjugat	Sigma, St.Louis, U.S.A.
Anti-PTH1-Rezeptor-Antikörper 1F3.4C1	K. Honold, Roche Pharma GmbH, Penzberg
Aprotinin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DNaseI	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lysozym	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
N-Glycosidase F, rekombinant	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Pfu-Polymerase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
(Ahx ^{35,36} ; Cys ³⁷)-PTH-(1-37)-NH ₂	E. Hoffmann, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
(Nle ^{8,18} , Tyr ³⁴)-PTH(1-34) (bovine)	Bachem, Heidelberg
¹²⁵ J-PTH (1-34) Parathyroid Hormone, human	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
PTH (1-37), rekombinant	K. Sellinger, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Restriktionsendonukleasen	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
RNase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Trypsin/EDTA (1x)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

1.4 Chromatographiematerial- und Säulen

Hi-Trap NHS-activated, 1 ml Säulen	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
His-Bind Resin	Novagen, Bad Soden
Phenylsepharose Fast Flow (low sub)	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
SulfoLink Coupling Gel	Pierce, Rockford, U.S.A.
Superdex 75 prepgrade	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Weizenkeimagglutinin (Lektin aus <i>triticum vulgare</i>) immobilisiert an quervernetzter 4%iger Agarose	Sigma, St.Louis, U.S.A.

1.5 Sonstiges Material

Dialysemembranen Spectra Por; MCWO 500 und 6000-8000	Spectrum, Gardena, U.S.A.
Polyvinylidendifluorid Protein Sequencing Membrane	Bio Rad Laboratories, Hercules, U.S.A.
Retina XBD Röntgenfilm	INTAS, Göttingen
Sensor Chip CM5	Biacore AB, Freiburg
Wannenstapel „Nunc Cell Factory“	Nunc, Naperville, U.S.A.

1.6 Geräte

Es wurden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet. Spezielle Geräte werden bei den einzelnen Methoden explizit aufgeführt.

1.7 Organismen

Eukaryontische Zelllinie:

CHO-K1 Klon B7

K. Honold, Roche Diagnostics, Penzberg

E. coli-Stämme:

BL21 (DE3)

F⁻, sdS, gal::λ DE3 del (int) lacUV5PO T7RNAPol, rB⁻, mB⁻, lon, ompT (Studier & Moffatt, 1986)

XL1 blue

F⁻::Tn10 pro A⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/ recA endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_K⁻m_K⁺) supE44 relA1 lac (Stratagene, La Jolla, U.S.A.)

1.8 Plasmide und Oligodesoxynukleotide

Plasmid	Hersteller
PCR-Script Amp SK(+) Cloning Vector	Stratagene, La Jolla, U.S.A.
pET15bnPTHR	diese Arbeit
pET15bPTHR	diese Arbeit
PTHRcDNA	unveröffentlicht, wurde freundlicherweise von Konrad Honold zur Verfügung gestellt
pUBS520	(Kurland & Gallant, 1996)

- Sequenzierungsprimer

T7 forward-Primer: 5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA-3'

T7 reverse-Primer: 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3'

Interner PTHR-Primer: 5'-TAC TTT AGG CGG CTG CAC TGC-3'

- Klonierungsprimer

nPTH1: 5'-GGGAAACTTCATATGTACGCGCTGGTGGATGCA-3'

nPTH2: 5'-CACGGATCCTCCTCATTAATCATGCCAGGCGGTCAAACAC-3'

PTHR: 5'-CACGGATCCTCACATGACTGTCTCCCACTC-3'

Alle verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) HPLC gereinigt bezogen.

1.9 Medien, Antibiotika und Puffer

Zellkulturmedium für die Kultivierung der CHO-Zellen:

MEM-Alpha-Medium mit Glutamin, Ribonukleotiden und Desoxyribonukleotiden (Gibco, Eggenstein) unter Zugabe von 10 % fötalem Rinderserum, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 1 mg/ml Geneticin G 418

LB-Medium:

10 g/l Bacto Trypton

5 g/l Yeast Extract

5 g/l NaCl

Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,5 gebracht und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden nach Bedarf Antibiotika zugesetzt.

2x YT-Medium:

17 g/l Bacto Trypton

10 g/l Yeast Extract

5 g/l NaCl

15 g/l Bacto Agar (nur für Kulturplatten)

Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,5 gebracht und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden nach Bedarf Antibiotika zugesetzt.

SOC-Medium:

2 g Trypton

0,5 g Hefeextrakt

0,05 g NaCl mit H₂O_t auf 100 ml auffüllen und autoklavieren

+1 ml 1 M MgCl₂

+1 ml 1 M MgSO₄

+1ml 20 % (w/v) Glucose

Fermentations-Medium:

16,0 g Na₂SO₄

19,74 g (NH₄)₂SO₄

4,0 g NH₄Cl

116,8 g K₂HPO₄

32,0 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O

8,0 g (NH₄)₂-Citrat

Die Salze wurden in 8 l entionisiertes Wasser gelöst, und der pH-Wert mit 10 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

Feeding-Lösung:

In 100 ml kochendem Wasser wurden 330 g Glucose gelöst, die Lösung wurde daraufhin mit H₂O auf 400 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Es wurden 50 ml einer Salzlösung (1 g Na₂SO₄; 1,246 g (NH₄)₂SO₄; 0,25 g NH₄Cl; 7,3 g K₂HPO₄; 1,8 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O; 0,5 g (NH₄)₂-Citrat/50 ml H₂O) angesetzt und autoklaviert.

Zur Erstellung der *feeding*-Lösung wurde die Glucoselösung, die Salzlösung, 1 ml 1M MgSO₄ und 5 ml Spurenelemente (CaCl₂ x 6 H₂O 0.74 g/l; ZnSO₄ x 7H₂O 0.18 g/l; MnSO₄ x H₂O 0.1 g/l; Na-EDTA 20.1 g/l; FeCl₃ x 6H₂O 16.7 g/l; CuSO₄ 0.1 g/l; CoCl₂ 0.104 g/l) unter Sterilbedingungen zusammengegeben und gut vermischt.

Ampicillin-Stammlösung:

100 mg/ml in H₂O. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei – 20 °C gelagert. Zugabe zum Medium erfolgte im Verhältnis (v/v) 1:1000.

Kanamycin-Stammlösung:

50 mg/ml in H₂O. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei – 20 °C gelagert. Zugabe zum Medium erfolgte im Verhältnis (v/v) 1:1000.

TAE-Puffer:

40 mM Tris/Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA

TBT-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

0,2 % Tween-20

PBS:

10 mM Na-Phosphat, pH 7,4

27 mM KCl

137 mM NaCl

Anodenpuffer für SDS-Gelelektrophorese nach Schägger:

200 mM Tris/HCl, pH 8,9

Kathodenpuffer für SDS-Gelelektrophorese nach Schägger:

100 mM Tris

100 mM Tricin

0,1 % SDS

SDS-Probenpuffer (2fach)

124 mM Tris

100 mM DTT

20 % Glycerin (w/v)

2 % SDS (w/v)

0,2 % Bromphenolblau (w/v)

1.10 Programme

Kalorimetrische Experimente wurden mit Origin (Microcal Software Inc., Northampton, MA, U.S.A., Version 4.1 und 2.9), Oberflächenplasmonresonanz-Messungen mit dem Programm BIAevaluation 3.0 (Biacore AB, Freiburg) ausgewertet. Alle anderen Daten wurden mit SigmaPlot Version 5.0 (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, U.S.A.) ausgewertet und dargestellt.

2 Methoden

2.1 Allgemeine gentechnische Methoden

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

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C in LB-Medium, dem bei plasmidtragenden Stämmen das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Agar-Platten angeimpft. Das bakterielle Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 546 nm verfolgt. Zur dauerhaften Konservierung von Bakterienstämmen wurden 400 µl einer stationären Übernachtskultur mit 600 µl 20 % Glycerin versetzt und bei – 80 °C aufbewahrt..

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

Die Einführung von Plasmiden in *E. coli*-Stämme wurde mittels Elektroporation durchgeführt (Dower *et al.*, 1988). Die Überführung der Bakterien in eine transformationskompetente Form erfolgte leicht modifiziert nach Ausubel und Mitarbeitern (Ausubel *et al.*, 1987). Dabei wurden *E. coli* Zellen nach Animpfung mit einer Übernacht-Kultur bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte bei 546 nm von ca. 0,4 kultiviert. Das durch Zentrifugation (10 min; 4000 x g; 4°C) gewonnene Zellsediment wurde mehreren Waschschritten mit eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin unterzogen (1; ½ 1/10 Volumen des Zellanzuchtmediums) und anschließend in 1/1000 Volumen 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Bis zu ihrer Verwendung wurde die Zellsuspension in 40 µl Aliquots bei – 80 °C aufbewahrt.

Die Elektroporation wurde mit 1 bis 100 ng Plasmid-DNA unter Verwendung eines Gene-Pulser II Elektroporationsgeräts (Gene Pulser System, Bio Rad, Hercules, U.S.A.) nach Vorschrift des Herstellers bei 2,5 kV; 25 µF und 200 Ω durchgeführt. Nach sofortigem Versetzen der Zellen mit 1 ml SOC-Medium und einstündiger Inkubation bei 37 °C, wurden 75 bis 150 µl der Zellsuspension zur Selektion auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte mittels des Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers. Aus 10 ml einer Übernachtskultur konnten je nach Art des Plasmids 1 bis 10 µg DNA gewonnen werden, die direkt zur Spaltung durch Restriktionsendonukleasen und zur Sequenzierung eingesetzt werden konnte.

2.1.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 10 bis 15 μl mit 1 μg Plasmid-DNA, 5 bis 10 Einheiten der entsprechenden Restriktionsendonukleasen sowie 1 bis 1,5 μl des vom Hersteller mitgelieferten 10fach konzentrierten Reaktionspuffers durchgeführt. Die Ansätze wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 5-fach konzentriertem DNA-Auftragspuffer (50 % Glycerin; 0,25 % Bromphenolblau) versetzt und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

DNA-Spaltungen im präparativen Maßstab wurden in einem Volumen von 60 bis 100 μl durchgeführt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte über Nacht, um eine vollständige Spaltung zu gewährleisten.

2.1.5 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung von DNA-Fragmenten auf einem 1%igem Agarosegel und Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid wurde die gewünschte Bande unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraktionskit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.1.6 Gelelektrophorese von DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA mittels horizontaler Gelelektrophorese wurden 1 %-ige Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Zur Probenvorbereitung wurde die DNA mit 1/5 ihres Volumens Auftragspuffer (50 % Glycerin; 0,25 % Bromphenolblau) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 130 Volt durchgeführt. Der DNA-Nachweis erfolgte nach der Elektrophorese durch 10-minütige Inkubation des Agarosegels in einer Ethidiumbromidlösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Das interkalierende Ethidiumbromid wurde daraufhin bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

2.1.7 Ligierung von DNA-Fragmenten

Ligierungen wurden mit 10 ng Vektor-DNA, einem 40 bis 100-fachen molaren Überschuss an Insert-DNA und 1 Einheit T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller mitgelieferten Ligasepuffer in einem Volumen von 10 bis 20 μl durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert, anschließend wurden 2 μl für die Transformation von *E. coli* eingesetzt.

2.1.8 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Bestimmung der Basenabfolge von Plasmid-DNA erfolgte gemäß der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) mit dem „SequiTherm EXCEL II“ Kit der Firma Epicentre Technologies nach Vorschrift des Herstellers. Die Auftrennung der DNA-Fragmente

erfolgte in einem denaturierenden 6%igem Polyacrylamidgel (Sequagel XR, BIOzym) mit einer Trennstrecke von 44 cm. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde ein halbautomatisches Sequenziergerät (LI-COR DNA Sequencer 4000, MWG-Biotech) verwendet.

2.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen wurden mit der thermostabilen Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene, LaJolla, U.S.A.) durchgeführt. Sie besitzt neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität und ist somit in der Lage, fehlerhaft eingebaute Nukleotide zu korrigieren. Dies ermöglicht eine nahezu fehlerfreie Amplifikation auch sehr langer DNA-Fragmente. Der Reaktionsansatz von 100 µl enthielt je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 250 ng beider Primer, 10 ng Plasmid-DNA, 10 µl des 10fach konzentrierten Reaktionspuffers und 5 Einheiten Pfu-Polymerase. Nach Überschichten des Ansatzes mit Mineralöl wurde die Polymerasekettenreaktion in 31 Zyklen nach folgendem Zeitschema durchgeführt:

Denaturierung:	45 Sekunden	94 °C
Hybridisierung:	45 Sekunden	35 °C bis 55 °C
Synthese:	2 min/kB	72 °C
Endsynthese:	10 min	72 °C

2.2 Allgemeine proteinchemische Methoden

2.2.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Proteinfärbung

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach apparanter Molekularmasse wurde nach der Methode von Schägger und Jagow (1987) durchgeführt.

Tab. 2. Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele

	Sammelgele	Trenngele
3,0 M Tris/HCl; 0,3 % SDS; pH 8,45	1 ml	3,1 ml
30 % Acrylamid/ 0,8 % N,N'-Methylen-bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)	0,7 ml	3,3 ml (10%iges Gel) 4,0 ml (12%iges Gel)
Glycerin	-	1,33 g
H ₂ O	2,3 ml	2,1 ml (10%iges Gel) 1,4 ml (12%iges Gel)
TEMED	5 µl	5 µl
10 % APS	36 µl	75 µl

Es wurden Midget-Gele (10 x 8 x 0,15 cm) verwendet, die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA bei 6 °C durchgeführt. Die Proben wurden vor der Auftragung 1:2 mit 2fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (124 mM Tris; 100 mM DTT; 20 % Glycerin (w/v); 2% SDS (w/v); 0,2 % Bromphenolblau (w/v)) versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Im Falle von Membranproteinproben wurden diese für 10 min auf 37 °C erwärmt. Als Molekularmassenstandard diente zum einen eine 10 kD-Leiter (GIBCO), zum anderen eine Mischung aus Phosphorylase B (94,0 kD), Albumin (67,0 kD), Ovalbumin (43,0 kD), Carboanhydrase (30,0 kD), Trypsininhibitor (20,1 kD) und α -Laktalbumin (14,4 kD) (LMW Electrophoresis Calibration Kit, Amersham Pharmacia).

Zur Anfärbung der Proteine nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel in einem Methanol/Eisessig/ H₂O-Gemisch (3/1/6) mit 0,15 % Serva Blau R 250 (w/v) für 2 bis 3 h inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte im selben Lösungsmittel ohne Zugabe von Serva Blau R 250. Silberfärbungen wurden nach dem Protokoll von Heukeshoven & Dernick (1988) durchgeführt.

2.2.2 Immunologischer Protein-Nachweis (Western-Blot)

Zum immunspezifischen Nachweis des PTH-Rezeptors wurden die Proteine nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.2.1) auf eine PVDF-Membran (Bio Rad, Hercules, U.S.A.) überführt. Der Proteintransfer erfolgte nach Harlow & Lane (1988) für 1 h bei 40 V und 100 mA/Midget-Gel in einer Semidry-Blotting-Apparatur (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden). Vor der Inkubation der Membran mit dem spezifischen Antikörper wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch das Einwirken von TBT/5 % Magermilchpulver (w/v) abgesättigt (10 min; 20 °C).

Der monoklonale Antikörper 1.F3.4C1, der gegen eine C-terminale Proteinsequenz des humanen PTHR generiert worden war (K. Honold, Roche, Penzberg), wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in TBT/ 5 % Magermilchpulver (w/v) für 1 Stunde bei 6 °C mit der Membran inkubiert. Nach Waschen der Membran mit TBT (3 x 10 min, 20 °C) erfolgte die Einwirkung des sekundären Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörpers (Sigma, St. Louis, U.S.A.) in einer Verdünnung von 1:1000 in TBT (30 min, 20 °C). Die Detektion der gebundenen Antikörper auf der Membran erfolgte nach wiederholtem Waschen (3 x 10 min, 20 °C) mit TBT mit Hilfe einer chemilumineszierenden Reaktion mit dem ECL-Detektionssystem (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) gemäß der Anleitung des Herstellers.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.2.3.1 UV-Absorptionsspektroskopie

Konzentrationsbestimmungen gereinigter Proteine wurden spektrophotometrisch an einem DU-7400 Diodenarray - Spektrophotometer (Beckman, Hercules, U.S.A.) durchgeführt. Die Konzentration von Lösungen des nPTHr und des PTHr, sowie des PTH-Liganden wurden aus dem Lambert-Beerschen Gesetz erhalten.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl.1})$$

Dabei entsprechen ϵ dem molaren Extinktionskoeffizienten in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, c der Konzentration in M und d der Schichtdicke der verwendeten Küvette in cm. Der Extinktionskoeffizient für PTHr, nPTHr und PTH wurde aus den Werten für Tryptophan, Tyrosin, und Cystin berechnet (Gill & von Hippel, 1989).

Tab. 3. Molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine

	$\epsilon_{280\text{nm}}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$
PTHr	118070
nPTHr	37770
PTH(1-37)	5690

Bei ungereinigten Proteinlösungen wurde Gleichung 2 (Warburg & Christian, 1941) zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt:

$$\text{Protein (mg/ml)} = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260} \quad (\text{Gl. 2})$$

Alle Spektren wurden in 1 cm Quarzglas-Küvetten (Hellma, Müllheim) über einen Wellenlängenbereich von 240 nm bis 340 nm mit Puffer als Referenz aufgenommen.

2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Proteinkonzentrationen von Zellmembransuspensionen und tritonhaltigen Proteinlösungen wurden mit Hilfe einer modifizierten, detergentenkompatiblen Proteinbestimmungsmethode (Bio Rad (DC) Protein Assay) der Firma Bio Rad nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951) bestimmt. Als Referenzprotein diente Rinderserumalbumin.

2.2.4 Bestimmung freier SH-Gruppen

Die Bestimmung der reduziert vorliegenden Cysteinseitenketten eines Proteins erfolgte nach Ellman (Riddles *et al.*, 1983). Dazu wurden 30 bis 350 μg des Proteins in 0,08 M Na-Phosphat;

0,5 mg/ml EDTA; 2 % SDS; pH 8,0 mit 30 μ l einer DTNB-Lösung (4 mg/ml DTNB in 0,1 M Na-Phosphat; pH 8,0) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu erfolgte eine Leerwertsbestimmung ohne Protein im Testansatz. Die Bestimmung der Absorption wurde photometrisch bei 410 nm durchgeführt. Mit dem Extinktionskoeffizienten des DTNB ($\epsilon_{\text{DTNB}} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und der leerwertkorrigierten Absorption bei 410 nm wurde die molare Konzentration an freien SH-Gruppen berechnet und durch die Proteinkonzentration geteilt. Die Anzahl freier SH-Gruppen pro Proteinmolekül wurden damit erhalten.

2.2.5 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Die Aufkonzentrierung von Proteinlösungen erfolgte je nach Ausgangsvolumen mit Ultrafree Biomax 5 KNMWL Membran Konzentratoren (Millipore, Bedford) mit einem Volumen von 4 ml und 15 ml, mit Centriprep 10 Konzentratoren (Amicon, Beverly) gemäß der Anleitung der Hersteller bei 4 °C, sowie durch Einlegen eines mit der Proteinlösung gefüllten Dialyseschlauchs (MCWO 6000-8000) in Polyethylenglykol 35 000 (Fluka, Neu-Ulm).

2.2.6 Fällung von Proteinen

Fällung von Proteinen aus verdünnten Proteinlösungen erfolgte mittels TCA-Präzipitation. Dazu wurde die Proteinlösung 1:2 mit einer eiskalten 72 %-igen TCA-Lösung (w/v) gemischt, für 10 min auf Eis inkubiert und daraufhin 10 min bei 13000 rpm und 20 °C abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit Aceton gewaschen, erneut abzentrifugiert und nach Verdunsten des restlichen Acetons in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.2.7 N-terminale Proteinsequenzierung

Die Überprüfung der Identität von Proteinen sowie der Nachweis der Intaktheit des N-Terminus wurden durch N-terminale Sequenzierung über automatischen Edman-Abbau mit einem Applied Biosystems 476A Gasphasen-Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) durchgeführt. Die Sequenzierung von Proteinen aus Proteingemischen erfolgte nach Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Elektrotransfer in 50 mM Borat/NaOH; 20 % Methanol; pH 9,0 auf eine PVDF-Membran (Bio Rad, Hercules, U.S.A.). Nach Anfärbung der Membran mit Coomassie wurde die zu untersuchende Proteinbande ausgeschnitten, mit Methanol entfärbt und zur Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzanalyse des nPTHR und des rekombinant in *E. coli* exprimierten PTHR wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Rücknagel (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt. Die Sequenzierung des in CHO-Zellen rekombinant exprimierten hPTHR erfolgte freundlicherweise durch Frau Dr. Kraft (Max-Delbrück-Zentrum für molekulare Medizin, Berlin).

2.3 Reinigung und Charakterisierung des rekombinanten humanen PTH-Rezeptors (hPTHr) aus eukaryontischen Zellen

2.3.1 Generierung einer Expressions-Zelllinie für den humanen PTH-Rezeptor

Der humane PTH-Rezeptor wurde mittels Standardklonierungstechniken (siehe auch Kapitel 1.1) aus der humanen Osteosarkom-Zell-Linie SaOS-2 und aus humaner fötaler Nieren-cDNA (Clontech, Palo Alto, U.S.A.) kloniert. Es wurden Expressionsvektoren konstruiert, die die PTH-Rezeptor cDNA unter der Kontrolle des SV40-Promotors und des SV40-Polyadenylierungssignals enthielten. CHO-K1-Zellen wurden mit diesem Konstrukt durch Lipofektin-Transfektion gemäß den Anleitungen des Herstellers (Gibco-BRL, Eschwege) transfiziert. Positive Klone wurden mit 1 mg/ml Geneticin (G418) selektiert und resistente Klone mittels Radioligandenbindungsstudien auf Parathormon-Bindung getestet.

Die Erstellung der Expressionszell-Linie fand in Zusammenarbeit mit Konrad Honold (Roche Diagnostics, Penzberg) durch Mitglieder seiner Arbeitsgruppe statt. Der positive Klon B7 wurde für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Eukaryontische Zellkultivierung

CHO-K1-Zellen (Klon B7) wurden in MEM-Alpha-Medium unter Zugabe von 10 % fötalem Rinderserum, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 1 mg/ml Geneticin (G 418) kultiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C unter 5%iger (v/v) CO₂-Begasung angezogen und zweimal wöchentlich subkultiviert. Für die präparative Anzucht wurden Wannenstapel mit 6000 cm² Kultivierungsfläche (NUNC, Naperville, U.S.A.) verwendet.

2.3.3 Membranpräparation und Solubilisierung von Membranproteinen

Ein Wannenstapel mit konfluenten Zellen wurde zweimal mit je 1 l PBS gewaschen, die Ablösung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 ml PBS und 0,02 % EDTA. Nach 4-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Zellablösung durch Abklopfen gefördert. Die abgelösten Zellen wurden mit 500 ml frischem Kultivierungsmedium (ohne Antibiotika) ausgespült und durch Zentrifugation sedimentiert (10 min; 1000 rpm; 4°C; GSA-Rotor). Das Zellsediment wurde daraufhin in 30 ml Aufschlußpuffer (10 mM Tris/HCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mM MgCl₂; pH 7,5) unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF; 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 80 µg/ml Bacitracin, 1 µg/ml Pepstatin und 1 µg/ml Chymostatin) aufgenommen und mit einem Dounce Homogenisator resuspendiert. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden noch intakte Zellen durch Zentrifugation (10 min; 1000 x g, 4°C) abgetrennt und nochmals der Aufschlussprozedur unterzogen. Die nach Zentrifugation

erhaltenen Überstände wurden vereinigt und in OptiSeal-Röhrchen (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, U.S.A.) für 1 Stunde bei 100 000 rpm und 4 °C (TLA 100.4-Rotor; Beckman Optima TLX Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Die abzentrifugierten Membranen wurden in 10 mM Tris/HCl; 0,2 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA und 250 mM Sucrose; pH 7,5 unter Zugabe der oben genannten Proteinaseinhibitoren resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Vor der Solubilisierung wurde das Membranmaterial zweimalig in 50 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl₂ und 250 mM Sucrose; pH 7,5 resuspendiert und gewaschen (Zentrifugation für 15 min; 4°C; 100 000 rpm; TLA 100.4-Rotor). Die Solubilisierung fand nach vorsichtigem Resuspendieren der Membranen in 50 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 250 mM Sucrose und 1 % Triton X-100; pH 7,5 unter Zugabe von Proteaseinhibitoren, innerhalb einer einstündigen Inkubation auf Eis statt. Das Protein zu Detergenz-Verhältnis betrug 1:6 (w/w). Nicht solubilierte Anteile der Membranpräparation wurden durch Ultrazentrifugation (1 h; 4° C; 100 000 rpm; TLA 100.4-Rotor) abgetrennt. Das Proteinsolubilisat wurde, falls nicht sofort weiterverarbeitet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

2.3.4 Lektinaffinitätschromatographie

Die Bindung des humanen PTH-Rezeptors an WGA-Agarose (Säulenvolumen 8 ml) fand mittels 16-stündiger Zirkulation des Proteinsolubilisats bei 6 °C auf dem Säulenmaterial statt. Dabei wurden je 40 ml Membranproteinsolubilisat (1 bis 1,5 mg Protein/ml) auf 1 ml Säulenmaterial mit einer Flußrate von 0,25 ml/min geladen. Nach einem Waschschriff mit 15 Säulenvolumina 50 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 250 mM Sucrose und 0,1 % Triton X-100; pH 7,5, der die Detergenzkonzentration von 1% Triton X-100 auf 0,1 % Triton X-100 herabsetzte, wurde das Protein durch Zugabe von 0,8 M N-Acetylglucosamin und Proteaseinhibitoren zu obigem Puffer in 10 ml Fraktionen eluiert. Um die Elution zu fördern, wurde dabei der Elutionspuffer auf 37 °C vorgewärmt, die Elution fand daraufhin bei Raumtemperatur statt.

2.3.5 Immunoaffinitätschromatographie

Zur Erstellung der Immunoaffinitätssäule wurde der monoklonale Antikörper 1F3.4C1 (K. Honold, Roche Diagnostics, Penzberg) gemäß der Anleitung des Herstellers kovalent an eine NHS-aktivierte HiTrap-Säule (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit einem Volumen von 1 ml gekoppelt. Anschließende Reinigungsschritte erfolgten bei 6 °C im Kühlraum. Nach einer Äquilibration des Säulenmaterial mit 20 Säulenvolumina 50 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA; 250 mM Sucrose und 0,1 % Triton X-100; pH 7,5 wurden 20 ml des

Eluats der Lektinaffinitätssäule 16 h auf der Säule zirkuliert. Die Elution fand nach einem Waschschrift mit 20 Säulenvolumina des Äquilibriumspuffers durch eine Absenkung des pH-Werts im Elutionspuffer (0,1 M Glycin/HCl; 0,1 % Triton X-100; pH 2,5; Proteaseinhibitoren) statt. Die Elutionsfraktionen von 1 ml wurden sofort mit 1/10 Volumen einer 1 M Tris-Lösung eines pH-Wertes von 10 bis 11 neutralisiert.

2.3.6 Deglykosylierung mittels Endoglycosidase F

Nach einer Vorinkubation des aufgereinigten Rezeptorproteins in 2%iger SDS-Lösung (w/v) für 10 min bei 37 °C wurde der PTH-Rezeptor 10fach mit einem DTT-haltigen Inkubationspuffer (20 mM Na-Phosphat; 0,5 % Triton X-100; 10 mM DTT; pH 7,6) zu einem Endvolumen von 45 µl verdünnt. Nach Zugabe von 1 IU N-Glykosidase F (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) erfolgte eine 16-stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Der Deglykosylierungsansatz wurde daraufhin mittels SDS-Gelelektrophorese (10%iges Tricingel nach Schägger) und Western-Blot analysiert.

2.4 Rückfaltung und Reinigung des N-terminalen Rezeptorfragments (nPTHR) aus E. coli inclusion bodies

2.4.1 Erstellung des Expressionsplasmids p(nPTHR)

Die Erstellung eines Expressionsplasmids für das N-terminale Fragment des humanen PTH-Rezeptors (Tyr23 bis Ile191), p(nPTHR), wurde mit Hilfe von Standardklonierungstechniken (siehe Kapitel 2.1) durchgeführt. Dazu wurde die kodierende Region für Tyr23 bis Ile191 aus einer cDNA des humanen PTH-Rezeptors (K. Honold, Roche, Penzberg) mittels PCR durch Einsatz der Primer nPTHR1 und nPTHR2 amplifiziert. Das erhaltene Gensegment wurde in den PCR-Script Amp SK(+) Cloning Vector (Stratagene, LaJolla, U.S.A.) zwischenkloniert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und BamHI in den Vektor pET15b (Novagen, Bad Soden) inseriert. Die Richtigkeit der Gensequenz wurde durch DNA-Sequenzanalyse überprüft.

2.4.2 Anzucht von Bakterien

2.4.2.1 Schüttelkolbenanzucht

Es wurden 1,5 l YT-Medium in einem 5 l Erlenmeyerkolben mit je 1,5 ml Kanamycin (Stammlösung 50 mg/ml) und Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml) versetzt und mit 15 ml einer stationären Übernachtskultur des plasmidtragenden Stammes angeimpft. Das Inokulat wurde bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte bei 546 nm von 1,0 bis 1,5 geschüttelt. Die Induktion erfolgte daraufhin durch Zugabe von 0,7 mM IPTG. Nach weiteren

3 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min; 6240 x g, 4°C) geerntet. Bis zur Aufarbeitung wurde das abzentrifugierte Zellmaterial bei – 20 °C gelagert.

Zur Überprüfung der Expression vor und während der Induktionszeit wurde ca. 1 ml des Kulturmediums steril entnommen, die optische Dichte bei 546 nm gemessen und eine Probenmenge in µl von $1 / OD_{546nm} \times 200$ abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt und nach Erhitzen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

2.4.2.2 Fed Batch-Fermentation

Die Fermentation in einem 10 l Biostat ED Bioreaktor (B. Braun, Deutschland) wurde nach Neubauer und Mitarbeitern (Teich *et al.*, 1998) mit geringfügigen Änderungen durchgeführt. Das Kulturvolumen betrug 8 l. Die Kultivierungstemperatur lag bei 35 °C. Zwei Stunden nach Beginn der Zugabe der *Feeding-Lösung* wurde die rekombinante Proteinexpression bei einer optischen Dichte bei 500 nm von 60 durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (20 min; 6240 x g, 4 °C) und bei – 20 °C gelagert.

2.4.3 Zellaufschluß von Bakterien

Der Zellaufschluß wurde mittels Hochdruckdispersion in einem Gaulin-Homogenisator (Gaulin Micron Lab 40; APV Homogeniser GmbH; Lübeck) bei einem Druck von 1200 bar und einer Konzentration von 0,2 g Zellmaterial/ml in 0,1 M Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 7,0 durchgeführt.

2.4.4 Inclusion body Isolierung und Solubilisierung

Die Lösung der aufgeschlossenen Zellen wurde zum Verdau der DNA mit 10 µg/ml DNaseI und 3 mM MgCl₂ versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz mit 0,5 Volumen 0,1 M Tris/HCl; 150 mM NaCl und 1,5 % LDAO; pH 7,0 gemischt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Unlösliches Material (*inclusion bodies*) wurde mittels Zentrifugation (30 min; 30 000 x g; 4 °C) sedimentiert und in 0,1 M Tris/HCl, 150 mM NaCl und 0,5 % LDAO; pH 7,0 mit Hilfe eines Ultraturrax-Homogenisators (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.) resuspendiert. Nach zwei Waschschritten (Resuspendieren mittels Ultraturrax und Zentrifugation bei 30 000 x g) mit 0,1 M Tris/HCl, 150 mM NaCl und 0,5 % LDAO; pH 7,0 wurden zwei Waschschrritte mit 0,1 M Tris/HCl, 150 mM NaCl; pH 7,0 durchgeführt. Das so erhaltene *inclusion body* Material konnte bei – 20 °C gelagert werden.

Die Solubilisierung der *inclusion bodies* in 6 M Guanidiniumchlorid; 0,1 M Tris/HCl; 100 mM DTT; 1 mM EDTA; pH 8,0 wurde bei einer Konzentration von 10 bis 40 mg *inclusion bodies*/ml für 2 h durchgeführt. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation (30 min; 30 000 x g; 4 °C) abgetrennt. Der Ansatz wurde durch Zugabe von 37 %-iger HCl-Lösung auf

pH 2,0 titriert und zur Entfernung des DTT gegen 500 Volumina einer 4 molaren Guanidiniumchlorid-Lösung dialysiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das *inclusion body* Solubilisat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.4.5 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Zur Bindung an Ni^{2+} -NTA-Agarose (His-Bind Resin; Novagen; Säulenvolumen: 15 ml) wurde der pH-Wert des *inclusion bodies*-Solubilisats mit 10 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Das mit 4 M Guanidiniumchlorid; 0,01 M Tris/HCl; 0,1 M Na-Phosphat; pH 8,0 äquilibrierte Säulenmaterial wurde daraufhin mit der Proteinlösung an der Höchstgrenze der Bindungskapazität (10 mg Protein/ml Säulenmaterial) beladen. Nach Bindung des nPTHR wurden unspezifisch gebundenen Proteine mit 4 M Guanidiniumchlorid; 0,01 M Tris/HCl; 0,1 M Na-Phosphat; pH 6,3 entfernt. Die Elution des nPTHR erfolgte in 6 ml Fraktionen durch eine pH-Absenkung mit 4 M Guanidiniumchlorid; 0,01 M Tris/HCl; 0,1 M Na-Phosphat; pH 4,5. Zur Vorbereitung der Rückfaltung wurde das Eluat gegen 500 Volumina einer 4 molaren Guanidiniumchlorid-Lösung dialysiert.

2.4.6 Rückfaltung des nPTHR

Die Rückfaltung des nPTHR erfolgte während einer viertägigen Dialyse bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ des vorgereinigten, denaturierten Proteins gegen 1 M Arginin; 0,05 M Na-Phosphat; 1 mM EDTA; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; pH 8,0 bei einer Proteinkonzentration von 1,0 bis 1,3 mg/ml.

2.4.7 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Zur Aufreinigung des renaturierten Proteins wurde die Rückfaltungslösung gegen 20 Volumina des HIC-Auftragspuffers (0,05 M Na-Phosphat; 1,5 M Ammoniumsulfat; pH 8,0) dialysiert. Ausgefallenes Protein wurde mittels Zentrifugation (30 min; $30\ 000 \times g$; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) entfernt und der Überstand der Zentrifugation (60 bis 100 mg Protein) bei einer Flußrate von 1 ml/min auf eine mit 10 Säulenvolumina des HIC-Auftragspuffers äquilibrierte 12 ml Phenyl-Sepharose-Chromatographiesäule (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub), Pharmacia) geladen. Nach einem Waschschriff mit 10 Säulenvolumina des HIC-Auftragspuffers erfolgte die Elution des gebundenen Proteins in 5 ml Fraktionen mittels eines 30-minütigen linearen Gradienten von 1,5 M Ammoniumsulfat auf 0 M Ammoniumsulfat im Säulenpuffer. Den proteinhaltigen Fraktionen wurde zum Schutz gegen Proteasen vor der weiteren Aufreinigung 1 mM PMSF zugesetzt.

2.4.8 Präparative Gelfiltration

Letzte Verunreinigungen in der Proteinlösung wurden durch Größenausschlußchromatographie an einer Superdex 75 prep grade Säule (Amersham Pharmacia; Säulenvolumen 120 ml) entfernt. Dazu wurden 4 ml des Eluats der HIC-Reinigung (4 bis 6 mg Protein) auf die in 2 Volumina Laufpuffer (0,05 M Na-Phosphat; 0,3 M Ammoniumsulfat; pH 8,0) äquilibrierte Säule bei einer Flußrate von 1 ml/min aufgetragen. Der Säulendurchlauf bei derselben Flußrate wurde in 5 ml Fraktionen aufgefangen. Die Proteinfractionen der Reinigung wurden vereinigt, mit 1 mM EDTA und 1 mM PMSF versetzt und bei 4 °C bis zur weiteren Charakterisierung gelagert.

2.5 Biophysikalische Charakterisierung

2.5.1 Circular dichroismus

Nah- und Fern-UV-CD-Spektren wurden an einem Aviv 62A DS Spektropolarimeter (Aviv, Lakewood, NJ, U.S.A.) in Quartzglasküvetten (106-QS und 104-QS, Hellma) mit Schichtdicken zwischen 0,02 cm und 0,5 cm aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer Zeitkonstante von 7 s und 1 nm Bandbreite zwischen 10fach und 20fach akkumuliert und, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufgenommen. Proteinkonzentrationen und Pufferbedingungen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Nach Abzug des Puffersignals wurde die gemessene Elliptizität Θ in mittlere molare Elliptizitäten pro Aminosäurerest Θ_{MRW} mit Hilfe von Gleichung 3 umgerechnet (Schmid, 1989):

$$\Theta_{MRW} = \frac{(\Theta \cdot 100 \cdot M_w)}{(d \cdot c \cdot n_{AS})} \quad (\text{Gl. 3})$$

mit

Θ :	gemessene Elliptizität in Grad
M_w :	Molekularmasse in Dalton
d :	Schichtdicke der Küvette in cm
c :	Konzentration des Proteins in mg/ml
n_{AS} :	Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül

2.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluoromax-2 Spektrofluorimeter (SPEX Instruments S. A., Inc., Edison, NJ, U.S.A.) und einem Hitachi F-4500 Spektrofluorimeter (Hitachi, Tokyo, Japan) in 1 cm Quartzglasküvetten (Hellma, Müllheim) durchgeführt. Emissionsspektren wurden nach Anregung der Fluorophore bei 295 nm (Tryptophan) und 275 nm (Tyrosin und Tryptophan) mit einer Zeitkonstante von 0,2 s aufgenommen (Spaltbreite bei Anregung 1 nm;

Spaltbreite bei Emission 5 nm). Proteinkonzentrationen und Pufferbedingungen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Alle Spektren wurden um den Pufferbeitrag korrigiert. Temperaturübergänge wurden mit Hilfe des Programms FTLM.BAS an einem Hitachi F-4500 Spektrofluorimeter (Hitachi, Tokyo, Japan) in Verbindung mit einem Haake Thermostat F6 in rührbaren 1 cm Küvetten (Hellma, Müllheim) durchgeführt (Waldmann, 1998).

Die Bindung von 1-Anilino-8-naphtalensulfonat (ANS) an nPTHR wurde durch Zugabe eines hundertfachen molaren Überschusses an ANS zur Proteinlösung und Aufnahme eines Emissionsspektrums (Anregungswellenlängen 280 nm und 390 nm) untersucht.

2.5.3 Guanidiniumchlorid-induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge des nPTHR

Zur Messung von Entfaltungsübergängen wurde eine Lösung des nativen nPTHR jeweils 10fach in Pufferlösungen mit unterschiedlichen Guanidiniumchlorid-Konzentrationen verdünnt und für 12 h inkubiert. Die Rückfaltung wurden durch jeweils 10fache Verdünnung des denaturierten nPTHR in Pufferlösungen mit unterschiedlichen Guanidiniumchlorid-Konzentrationen initiiert und wiederum für 12 h inkubiert. Proteinkonzentrationen, Pufferbedingungen und Temperatur sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Die Bestimmung des Anteils an ungefalteter Spezies erfolgte durch die Messung des Fern-UV CD-Signals bei 220 nm. Von jeder Probe wurde nach Abschluß der Messung refraktrometrisch die genaue Guanidiniumchloridkonzentration mit Hilfe von Gl. 4 ermittelt (Pace, 1986):

$$[\text{Guanidiniumchlorid}] = 57,147 \cdot \Delta n + 38,68 \cdot \Delta n^2 - 91,6 \cdot \Delta n^3 \quad (\text{Gl. 4})$$

mit

[Guanidiniumchlorid]: Konzentration an Guanidiniumchlorid in mol/l

Δn : Differenz der Brechungsindizes für eine Lösung mit und ohne Guanidiniumchlorid

Die Auswertung der Übergänge erfolgte nach Pace (Pace & Scholtz, 1997) unter Annahme eines Zwei-Zustands-Modells. Die freie Stabilisierungsenthalpie ΔG (H_2O) wurde durch lineare Extrapolation der erhaltenen ΔG -Werte auf 0 M Guanidiniumchlorid bestimmt.

2.5.4 Differential Scanning -Kalorimetrie (DSC)

Änderungen der Wärmekapazität von Proteinlösungen in Abhängigkeit von der Temperatur wurden in einem VP-DSC Mikrokalorimeter (MicroCal, Inc., Northampton, U.S.A.) gemessen. Die verwendeten Puffer und Proteinkonzentrationen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Die Referenzzelle wurde mit Puffer befüllt. Die Lösungen wurden für 15 min auf

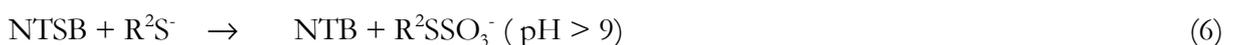
4 °C äquilibriert, die Aufheizrate betrug 60 °C/h. Die Schmelzkurven wurden mit Hilfe des Programms MicroCal Origin 4.1 für DSC (MicroCal *Software Incorporation*, Northampton, U.S.A.) ausgewertet.

2.6 Disulfidbrückenanalyse des nPTHR

Die Analyse des Disulfidmusters fand in Kooperation mit Dr. M. Wozny und D. Reusch (Roche, Penzberg) statt.

47 µg nPTHR in 100 mM Tris/HCl; 10 mM CaCl₂; pH 7,8 wurde in einem Volumen von 1 ml einem Proteaseverdau mit Chymotrypsin (6 µg Chymotrypsin, 16 h bei 37 °C) unterzogen. Mit 200 µl des Ansatzes wurde eine RP-HPLC an einer YMC ODS-AQ C 18 Säule (Porengröße 120 Å, Partikelgröße 5 µm, Säulenlänge 25 cm, innerer Durchmesser 1 mm) bei einer Temperatur von 35 °C durchgeführt. Die Elution erfolgte durch einen linearen Anstieg der Acetonitril-Konzentration (Laufmittel A: 0,1 % TFA in Wasser, Laufmittel B: 80 % Acetonitril, 0,1 % TFA in Wasser, Steigung des Gradienten: 0,67 % Laufmittel B/min, Flußrate: 50 µl/min).

Die *on-line*-Detektion disulfidverbrückter Fragmente erfolgte nach einer Methode von Tannhauser und Mitarbeitern (Tannhauser *et al.*, 1987) mittels einer Nachsäulenderivatisierung. Dabei wurden im Reaktionsgemisch zuerst vorhandene Disulfidbrücken durch Sulfityolyse gespalten (Gl. 5), dann die entstandenen Thiolat-Anionen mit 2-Nitro-5-Thiosulfobenzoat (NTSB) umgesetzt (Gl. 6).



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

Zur Untersuchung und Identifikation der Fragmente wurde ein zweiter HPLC-Lauf mit dem Proteaseverdau durchgeführt, bei dem keine Nachsäulenderivatisierung stattfand, sondern die identifizierten disulfidverbrückten Fragmente gesammelt wurden. Diese Fragmente wurden daraufhin mittels N-terminaler Sequenzierung analysiert.

2.7 Rückfaltung und Reinigung des PTH-Rezeptors (PTHR) aus *E. coli* inclusion bodies

2.7.1 Erstellung des Expressionsplasmids p(PTHR)

Die Erstellung eines Expressionsplasmids für den PTH-Rezeptor (Tyr23 bis Met571), p(PTHR), wurde mit Hilfe von Standardklonierungstechniken (siehe Kapitel 2.1) durchgeführt. Dazu wurde die kodierende Region für Tyr23 bis Met571 aus einer cDNA des humanen PTH-Rezeptors (K. Honold, Roche, Penzberg) mittels PCR durch Einsatz der Primer nPTHR und PTHR amplifiziert. Das erhaltene Gensegment wurde in den PCR-Script Amp SK(+) Cloning Vector (Stratagene, LaJolla, U.S.A.) zwischenkloniert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und BamHI in den Vektor pET11a (Novagen, Bad Soden) inseriert. Die Richtigkeit der Gensequenz wurde durch DNA-Sequenzanalyse überprüft.

2.7.2 Expression, Rückfaltung und Reinigung des PTH-Rezeptors

Die Expression des PTHR in *E. coli* und die Präparation der *inclusion bodies* erfolgte mittels *fed batch* Fermentation (siehe Kapitel 2.4.2.2) und Detergenz-Extraktion (siehe Kapitel 2.4.4) unter denselben Bedingungen wie für nPTHR. Zur Solubilisierung der gewonnenen *inclusion bodies* wurde 0,5 g *inclusion body*-Material in 27 ml PBS/1,25 % Lauroylsarkosin resuspendiert und für 1 min auf Eis in einem Ultraschallbad beschallt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (40 min; 24 000 rpm; 4 °C; SS34-Rotor), das Solubilisat bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert.

Die Rückfaltung wurde durch 100 fache Verdünnung des *inclusion body*-Solubilisats auf eine Gesamtproteinkonzentration von 100 µg/ml in 1 M Arginin; 0,05 M Na-Phosphat; 1 mM EDTA; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; pH 8,0 initiiert. Nach einer 16-stündigen Inkubationszeit bei 6 °C wurde die Rückfaltungslösung mit 0,1 % n-Decyl-β-Maltosid versetzt und gegen 50 Volumina PBS/0,1 % n-Decyl-β-Maltosid dialysiert. Die weitere Aufreinigung fand bei 6 °C durch Immunoaffinitätschromatographie an einer Antikörpersäule statt (siehe Kapitel 2.3.5). Nach Äquilibration des Säulenmaterial mit 20 Säulenvolumina PBS/0,1 % n-Decyl-β-Maltosid wurden 100 ml des Dialysats bei einer Flußrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Die Elution fand nach einem Waschschrift mit 20 Säulenvolumina des Äquilibrationpuffers durch eine Absenkung des pH-Wertes im Elutionspuffer (0,1 M Glycin/HCl; 0,1 % n-Decyl-β-Maltosid; pH 2,5) statt. Die Elutionsfraktionen von 1 ml wurden sofort mit 1/10 Volumen einer 1 M Tris-Lösung eines pH-Wertes von 10 bis 11 neutralisiert.

2.8 Untersuchungen zur Ligandenbindung

2.8.1 Quervernetzung von nPTHR und PTH

1 μM nPTHR und 10 μM PTH wurden in 50 mM Na-Phosphat; 300 mM NaCl; pH 8 durch Zugabe von 40 mM Glutaraldehyd während einer Inkubationszeit von 20 min bei 4 °C miteinander vernetzt. Die Abstopfung der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 43 mM Natriumborhydrid aus einer Stammlösung von 1 M Natriumborhydrid in 0,1 M NaOH. Die Proben wurden daraufhin mit TCA gefällt und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Als Kontrolle zum PTH-Liganden diente das Peptidhormon Insulin. Zudem wurden auch nPTHR und PTH ohne Partner der Quervernetzungsreaktion unterzogen.

2.8.2 Oberflächenplasmonresonanz

Bindungsmessungen von nPTHR und PTHR an PTH wurden in einem BIAcoreX System (Biacore AB, Freiburg) durchgeführt. Zur Herstellung eines PTH-Sensorchips wurde gemäß den Angaben des Herstellers cysteinyliertes PTH ((Ahx35,36; Cys37)-PTH-(1-37)-NH₂; E. Hoffman, Roche) mittels einer Thiolkopplung kovalent an die Flußzelle 2 eines CM5-Sensorchip gebunden. Flußzelle 1 diente als Referenzflußzelle und wurde mit Cystein kovalent modifiziert. Vor jeder neuen Messreihe wurde eine Regenerationsprozedur nach Bazasuren & Panzner (Bazasuren & Panzner, 1999) mit anschließender Neukopplung von PTH an den Sensorchip vollzogen. Die Bindungseigenschaften des Sensorchips wurden trotz mehrmaliger Regeneration nicht beeinträchtigt. Bindungsmessungen wurden bei 20 °C, sofern nicht anders angegeben, und einer Flußrate von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt. Die Pufferbedingungen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Zur Bindungsmessung wurden jeweils 50 μl der Proteinlösung injiziert und eine Verzögerungszeit von 60 s nach Ende der Injektion bis zum Waschen der Flußzellen mit Meßpuffer festgesetzt. Zur vollständigen Entfernung von Protein, wurde der Sensorchip nach einem Bindungsexperiment mit jeweils 50 μl 0,2 % SDS und 6 M Harnstoff; 0,1 M Glycin/HCl; pH 2,5 gewaschen. Die Aktivität des gekoppelten Liganden wurde dadurch nicht beeinträchtigt. Die Auswertung der Bindungsdaten im Gleichgewicht erfolgte mit Hilfe des Programms BIAevaluation 3.0 (Biacore AB, Freiburg).

Zur Kontrolle der Bindungsspezifität des rückgefalteten und gereinigten PTHR wurden 200 μl der Proteinlösung (150 nM) in PBS/0,1 % mit 4,7 mM DTT versetzt und nach 20minütiger Inkubation bei 22 °C durch Zugabe von 210 μl einer 2,2 M Iodacetamid-Lösung einer Cysteinseitenketten-Modifikation unterzogen. Nach Dialyse gegen 1000 Volumina PBS/0,1 % n-Decyl- β -Maltosid zur Entfernung der Modifikationsreagenzien wurde die Bindung an den PTH-Sensorchip getestet.

Kompetitionsexperimente wurden durch Vorinkubation des nPTHr oder des PTHr mit unterschiedlichen Konzentrationen an PTH(1-37) und darauffolgender Messung der Bindung an den PTH-Sensorchip durchgeführt. Die Datenanalyse des Competitionsexperiments erfolgte über nichtlineare Regression. Die Dissoziationskonstante K_d wurde durch Anpassen der Lösung einer quadratischen Gleichung, die die Rezeptor-Liganden-Komplexkonzentration in einem bimolekularen Gleichgewicht unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie beschreibt, an die Messdaten errechnet.

Es gilt



wobei nach der Massenerhaltung

$$(E)_0 = (E) + (EL) \text{ und } (L)_0 = (L) + (EL) \quad (7.1 \text{ und } 7.2)$$

gilt und sich damit die Dissoziationskonstante K_d zu

$$K_d = \frac{[(E)_0 - (EL)] \times [(L)_0 - (EL)]}{(EL)} \quad (7.3)$$

ergibt. Auflösung der Gleichung (7.3) liefert die physikalisch sinnvolle Lösung

$$(EL) = \frac{[(E)_0 + (L)_0 + K_d]}{2} - \sqrt{\left[\frac{[(E)_0 + (L)_0 + K_d]}{2} \right]^2 - (E)_0 \times (L)_0} \quad (7.4)$$

Die Abnahme der Resonanzplateaus im Gleichgewicht bei steigender Zugabe von freiem Kompetitor ist gleich dem Bindungsgrad $(EL)/(E)_0$, multipliziert mit der maximalen Änderung, die man bei Sättigung (Bindungsgrad 1) erhält. Damit ergibt sich das Gesamtsignal R_{eq} aus der Summe des Resonanzsignals ohne Kompetitor und der partiellen Signaländerung bei Kompetitorzugabe:

$$R_{eq} = R_{eq0} - \Delta R_{\max} \times \frac{(EL)}{(E)_0} \quad (7.5)$$

zusammen mit Gleichung (7.4) ergibt sich

$$R_{eq} = R_{eq0} - \Delta R_{max} \times \frac{\left[\frac{(E)_0 + (L)_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left[\frac{(E)_0 + (L)_0 + K_d}{2} \right]^2 - (E)_0 \times (L)_0} \right]}{(E)_0} \quad (7.6)$$

mit

R_{eq}	Resonanzsignal im Gleichgewicht nach Injektion
R_{eq0}	Resonanzsignal des gebundenen nPTHr/PTHr an den Sensorchip ohne Zugabe von Kompetitor
(EL)	Konzentration des Rezeptor-Ligandenkomplexes am Chip im Gleichgewicht
$(E)_0$	Konzentration des eingesetzten Rezeptors
$(L)_0$	Konzentration des zur Konkurrenz eingesetzten Liganden

Die gemessene Bindungskurve des Kompetitors an nPTHr oder PTHr ist R_{eq} in Abhängigkeit von $(L)_0$. Ein Kurvenanpassung an die Meßdaten unter Verwendung von Gl. 7.6 mit konstantem $(E)_0$ und den Fit-Parametern R_{eq0} , ΔR_{max} und K_d liefert die Dissoziationskonstante des gesuchten Gleichgewichts.

2.8.3 Thrombinspaltung des nPTHr und Analytik der Spaltprodukte

Zur Abspaltung der durch die Klonierung N-terminal zusätzlich angefügten Aminosäureseitenketten wurden 200 µl einer 13 µM nPTHr-Lösung in 0,05 M Na-Phosphat; 0,3 M NaCl; pH 7,5 bei Raumtemperatur mit 2 IU Thrombin inkubiert. Die Spaltungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 µM Thrombininhibitor ($K_i = 29$ nM) abgestoppt. Die Analyse der Spaltprodukte erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Oberflächenplasmonresonanz. Da zur Bindungsmessung an einen PTH-Sensorchip Thrombin und Thrombininhibitor nicht aus der Probe entfernt wurden, wurde eine Bindungskontrolle mit den eingesetzten Konzentrationen an Thrombin und Thrombininhibitor durchgeführt. Es konnte keine unspezifische Bindung dieser Moleküle an den Sensorchip festgestellt werden.

2.8.4 Radioaktiver Ligandenbindungstest an eukaryontischen, hPTHr-haltigen Plasmamembranen

CHO-K1 (Klon B7)-Plasmamembranen (≈ 500 µg Protein) wurden mit 0,5 ml Waschpuffer (50 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM CaCl_2 ; 2 mM MgCl_2 ; pH 7,5) gewaschen und in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert (30 s, 13000 rpm, 22 °C). Die sedimentierten Membranen wurden daraufhin in 0,5 ml Bindungspuffer (Waschpuffer + 5 % Pferdeserum; 0,5 % fötales Rinderserum; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml Aprotinin; 80 µg/ml Bacitracin; 1 mM PMSF und 0,83 bis 22 pM (≈ 20 000 bis 100 000 cpm) J_{125} -bPTH) resuspendiert. Nach Zugabe von nicht radioaktiv markiertem PTH in steigenden

Konzentrationen wurden die Ansätze 3,5 Stunden bei 15 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Membranen dreimalig mit Waschpuffer gewaschen, um ungebundenes PTH weitmöglichst zu entfernen. Gebundene Radioaktivität wurde in einem automatischen Gamma-Zähler (Gamma-Counter, WALLAC, Freiburg) vermessen.

Der IC 50-Wert wurde durch eine Angleichung der experimentellen Daten nach Gleichung 8 ermittelt:

$$Y = \text{unspezifisch} + \frac{(\text{gesamt} - \text{unspezifisch})}{1 + 10^{(\log(\text{PTH}) - \log(\text{IC50}))}} \quad (\text{Gl. 8})$$

mit

PTH	eingesetzte Konzentrationen an unmarkiertem Parathyroidhormon
Y	Meßsignal bei unterschiedlichen Konzentrationen von unmarkiertem PTH
gesamt	Meßsignal in Abwesenheit von unmarkiertem PTH
unspezifisch	Meßsignal bei einer sättigenden Konzentration von unmarkiertem PTH
IC50	Konzentration an unmarkiertem PTH, das die Hälfte der spezifischen Bindungsstellen besetzt

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen ($(I_{125}\text{-PTH}) \ll (\text{PTH}_{\text{unmarkiert}})$) und unter Annahme identischer Bindungsaffinitäten von radioaktiv markiertem und nicht markiertem PTH zum PTH-Rezeptor konnte der IC50-Wert der Dissoziationskonstante K_d gleichgesetzt werden. Eine Linearisierung der Bindungsdaten nach Scatchard wurde nach Umrechnung der Meßdaten unter Berücksichtigung der experimentell eingesetzten Konzentrationen an Membranprotein und $I_{125}\text{-PTH}$ durchgeführt.

2.8.5 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Kalorimetrische Titrationsen wurden an einem Microcal MCS Titrationskalorimeter (MicroCal, Northampton, MA, U.S.A.) durchgeführt. Es wurden 25 bis 30 μM nPTHR vorgelegt und mit einer 700 bis 800 μM Lösung an PTH in der Titrationsspritze in 2 bis 8 μl Titrationsschritten bis zur Sättigung titriert. Für Protein-, wie Ligandenlösung wurden identische Puffer verwendet. Die Injektionsgeschwindigkeit betrug ca. 1 $\mu\text{l/s}$, die Integrationszeit 2 s, nach jeder Injektion wurde 4 min das Erreichen der Basislinie abgewartet. Die Datenauswertung fand mit Hilfe von MicroCal Origin für ITC Version 2.9 statt.

Zur Bestimmung der Änderung der Wärmekapazität bei Bindung, ΔC_p , wurden bei unterschiedlichen Temperaturen die experimentell bestimmte app. Bindungsenthalpien, ΔH_{ITC} , gegen die Temperatur in °C aufgetragen. Aus der Steigung der berechneten Geraden, konnte

gemäß $\Delta C_p = d(\Delta H)/dT$ die Änderung der Wärmekapazität, ΔC_p , bestimmt werden. Dabei wurde davon ausgegangen, daß ΔC_p in diesem Temperaturbereich temperaturunabhängig ist.

Die Anzahl der übertragenen Protonen bei der Bindungsreaktion, sowie die pufferunabhängige Bindungsenthalpie, ΔH_{bind} , wurde über den Einfluß der Ionisierungsenthalpien der Pufferlösungen, ΔH_{ion} , auf die app. Bindungsenthalpie, ΔH_{ITC} , nach Gleichung 9 über lineare Regression bestimmt.

$$\Delta H_{\text{ITC}} = \Delta H_{\text{bind}} + n_{\text{H}^+} \times \Delta H_{\text{ion}} \quad (\text{Gl. 9})$$

mit

ΔH_{ITC}	apparente Bindungsenthalpie im ITC-Experiment in J/mol
ΔH_{bind}	pufferunabhängige Bindungsenthalpie in J/mol
ΔH_{ion}	Ionisierungsenthalpie des verwendeten Puffers in J/mol
n_{H^+}	Anzahl der bei der Bindungsreaktion ausgetauschten Protonen

2.8.6 Ligandenaffinitätschromatographie

Zur Erstellung einer Ligandensäule wurde cysteinyliertes PTH ((Ahx35,36; Cys37)-PTH-(1-37)-NH₂; E. Hoffmann, Roche) kovalent gemäß der Anleitung des Herstellers an 2 ml Sulfolink-Material (Pierce, Rockford, U.S.A.) gekoppelt. Um die unspezifische Bindung des PTH-Rezeptors an das Säulenmaterial zu überprüfen, wurde dasselbe Vorgehen auch ohne Parathormon-Liganden durchgeführt. Die Äquilibration des Säulenmaterials erfolgte mit 20 Säulenvolumina 50 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 250 mM Sucrose und 0,1 % Triton X-100; pH 7,5. Daraufhin wurden 7 ml des lektinaffinitätsgereinigten Proteinsolubilisats (aus 10 ml Membranproteinsolubilisat mit 10 bis 15 mg Membranprotein/ml) einer 16-stündigen Zirkulation auf dem Säulenmaterial unterzogen. Nach einem Waschschriff mit 20 Säulenvolumina Äquilibrationpuffer wurde denaturierend in 2 ml Fraktionen eluiert (6 M Harnstoff und 6 M Harnstoff, 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,5).

2.9 Analytische Ultrazentrifugation

Sedimentations-Gleichgewichtsläufe des nPTH_R wurden in einer Optima XL-A analytischen Ultrazentrifuge (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, U.S.A.) durchgeführt. Es wurden Doppelsektor-Zellen bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 20 000 rpm bei 20 °C in einem An60Ti-Rotor verwendet. Die zur Analyse eingesetzte nPTH_R-Konzentration betrug 0,4 mg/ml in 0,05 M Kaliumphosphat; 0,3 M KCl bei pH 8,0. Die experimentellen Daten wurden mit Hilfe eines von A. Minton entwickelten Programms analysiert (Rivas *et al.*, 1999); die Berechnungen fanden unter Annahme eines partiellen spezifisches Volumens von 0,734 ml/mg statt.

2.10 Analytische Reversed Phase HPLC (RP-HPLC)

Zur Untersuchung der Homogenität des renaturierten nPTHR wurde eine Reversed Phase Chromatographie an einer ET125x2 Nucleosil500-5 C3PPN-Säule (Macherey & Nagel) durchgeführt. Dazu wurden ca. 3 µg Protein in 0,05 M Na-Phosphat; 0,3 M NaCl; 1 mM PMSF; pH 7,5 bei 40 °C und einer Flußrate von 0,2 ml/min auf die äquilibrierte Säule (Äquilibrierungslösung: 0,09% TCA/1% Acetonitril) aufgetragen und nach einem Waschschrift (2 min, 0,09% TCA/1 % Acetonitril) durch einen Gradienten von 30% auf 80% Acetonitril eluiert (Lösungsmittel A: 0,09% TCA; Lösungsmittel B: 0,09% TFA, 80% Acetonitril).

2.11 Massenspektrometrie

Elektrospray-Ionisations-Massenspektren zur Molekularmassenbestimmung wurden an einem Esquire-LC Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen) aufgenommen. Dazu wurden 20 µl Probenvolumen direkt in die Elektrospray-Quelle mit einer Flußrate von 4 µl/min injiziert. Als Lösungsmittel diente ein Acetonitril: Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1 (v/v) in 1 % Ameisensäure.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem REFLEX Spektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen) aufgenommen. Die Ionisierung erfolgte bei 337 nm durch Laser-Desorption und die Ionen wurden linear bei einer Spannung von 28,4 kV beschleunigt. Als Matrix diente eine gesättigte Lösung von Sinapinsäure in einem Acetonitril:Methanol:Wasser Verhältnis von 3:2:5 (v/v/v). Die Kalibrierung erfolgte mit humanen Angiotensin II, Rinder-Insulin sowie Cytochrom c (Pferdeherz) als externe Standards und Cytochrom c als internen Standard.

Die massenspektrometrische Analyse wurde freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

2.12 1D-NMR-Spektroskopie

1D-NMR-Spektren von nPTHR wurden bei einer Proteinkonzentration von 22 µM in 0,05 M Na-Phosphat; 0,3 M KCl; pH 6,0 und einer Temperatur von 27 °C in einem Bruker 500 MHz NMR-Spektrometer mit einer digitalen Console (Bruker, Rheinstetten) vermessen. Dazu wurden 450 µl der Proteinlösung mit 50 µl D₂O versetzt. Die Aufnahmen von 2000 *scans* erfolgten mit 32 000 Datenpunkten über eine Aufnahmeweite von 12 ppm. Es wurde eine Wasserunterdrückung durch Sättigung des Wassersignals durchgeführt.

Die Spektren wurden freundlicherweise von Dr. P. Bayer (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) aufgenommen.

III Ergebnisse

1 Gewinnung und Charakterisierung des rekombinanten humanen PTH-Rezeptor (hPTHr)

1.1 Aufreinigung des humanen PTH-Rezeptors

Ausgangspunkt der Aufreinigung des hPTHr aus eukaryontischem Zellmaterial war Klon B7 einer CHO-K1-Zell-Linie. Dieser Klon enthielt die Gensequenz des Proteins chromosomal integriert unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Die Stabilität der Integration wurde dabei über eine Antibiotikaselektion mit Geneticin (G 418) gewährleistet. FACS-Studien und Scatchard-Analysen an ganzen Zellen wiesen auf eine starke Expression des Rezeptorproteins von $\geq 3 \times 10^6$ Rezeptoren/Zelle in der Zellmembran der CHO-Zellen hin (K. Honold, persönliche Mitteilung).

Zur Isolation des hPTHr, wurden Zellen in Wannenstapeln adhärent bis zur Konfluenz angezogen und mit PBS/0,02% EDTA vom Untergrund abgelöst. Dabei wurde auf den Einsatz von Trypsin verzichtet, um einen möglichen proteolytischen Abbau des Rezeptorproteins zu vermeiden. Nach Zellaufschluß mittels osmotischen Schocks wurden die Zellmembranen durch mehrere Zentrifugationsschritte isoliert (Abb. 7). Dabei konnten nicht aufgeschlossene Zellen abgetrennt und nochmals der Aufschlußprozedur unterzogen werden. Aus 1 g bzw. ca. $2,8 \times 10^8$ Zellen konnten ca. 50 mg Protein in der Membranpräparation isoliert werden.



Abb. 7. Membranpräparation der hPTHr-exprimierenden CHO-Zellen. Humaner PTH-Rezeptor wurde nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (10 % Tricینگel) gleicher Volumenanteile der Fraktionen durch einen Western-Blot nachgewiesen. Bahn 1: Gesamtzellextrakt, Bahn 2: Überstand nach niedrigtouriger Zentrifugation (20 min; 1000 x g) zur Abtrennung nicht aufgeschlossener Zellen, Bahn 3: Überstand der Ultrazentrifugation (1h, 100 000 rpm, TLA 100.4-Rotor), Bahn 4: resuspendierte Membranen.

Vor der Solubilisierung mit Detergenz wurden die Zellmembranen einem Salzwaschschritt unterzogen, um membranassoziierte Proteine abzutrennen. Daraufhin wurden die Membranproteine durch einen tritonhaltigen Solubilisierungspuffer (50 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 250 mM Sucrose und 1% Triton X-100; pH 7,5) aus der Zellmembran gelöst. Beste Solubilisierungsergebnisse ergaben sich dabei bei einem Protein-

zu-Detergenz-Verhältnis von 1:6 (w/w). Der lösliche Überstand nach Ultrazentrifugation wurde als solubilisierter Proteinfraktion weiterverarbeitet.

Im Western-Blot (Abb. 8) sind einzelne Schritte der Solubilisierung dargestellt. Die detergenteninduzierte Solubilisierung des Rezeptors verlief nahezu vollständig; nach Ultrazentrifugation des Solubilisats konnte in der unlöslichen Fraktion kein intakter Rezeptor nachgewiesen werden. Eine schwache Bande im Bereich von 50 kD deutete jedoch auf ein Abbauprodukt hin, das durch Triton X-100 nicht in Lösung gehalten wurde.

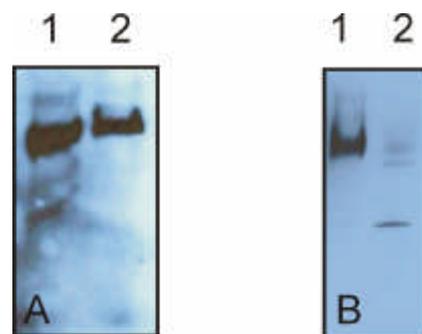


Abb. 8. Solubilisierung von hPTHr. Die Solubilisierung des humanen PTH-Rezeptors aus CHO-Zellmembranen fand in 50 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 250 mM Sucrose und 1% Triton X-100; pH 7,5 bei 4°C und einem Protein-zu-Detergenz-Verhältnis von 1:6 (w/w) statt. Gleiche Volumenanteile der Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (10%iges Tricingel) und Western-Blot analysiert. A: Bahn 1: Membranproteinpräparation, Bahn 2: Solubilisat. B: Bahn 1: Solubilisat, Bahn 2: unlösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation.

Die Lektinaffinität des glykosylierten Rezeptors an Weizenkeimagglutinin (WGA) (Karpf *et al.*, 1987) wurde in einem ersten Reinigungsschritt zur Anreicherung von hPTHr benutzt. Das solubilierte Rezeptorprotein wurde dabei an eine WGA-Agarose-Säule gebunden und mit N-Acetylglucosamin, das spezifisch gebundene Zuckerreste verdrängt, eluiert (Abb. 9). Die Detergenzkonzentration wurde im Waschschrift zur schonenderen Behandlung des Rezeptors auf 0,1 % Triton X-100 herabgesetzt. Diese Detergenzkonzentration wurde in den darauffolgenden Reinigungs- und Charakterisierungsschritten beibehalten.



Abb. 9. Aufreinigung von hPTHr an WGA-Agarose. Gleiche Volumenanteile der Reinigungsfraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (12 %iges Tricingel) und darauffolgendem Western-Blot analysiert. Bahn 1: Membranproteinsolubilisat, Bahn 2: Säulendurchfluß, Bahn 3: Waschfraktion, Bahn 4: Eluat.

Die weitere Aufreinigung des humanen PTH-Rezeptors erfolgte über Immunoaffinitätschromatographie (Abb. 10). Als Antikörper wurde der monoklonale Antikörper 1F3.4C1, der gegen ein C-terminales Peptid des Rezeptors generiert wurde, verwendet. Das Eluat der Lektinaffinitätschromatographie wurde auf eine 1 ml Antikörper-Säule geladen, die Elution erfolgte durch Absenkung des pH-Werts von pH 7,5 auf pH 2,5 (0,1 M Glycin/HCl; 0,1 % Triton X-100; pH 2,5). Um die erhaltenen Elutionsfraktionen sofort zu neutralisieren und damit eine Schädigung des Rezeptors durch den niedrigen pH-Wert zu vermeiden, erfolgte die Elution in eine konzentrierte Tris-Lösung. Dadurch wurde der pH-Wert des Eluats auf einen Wert von pH 7 - 8 angehoben.

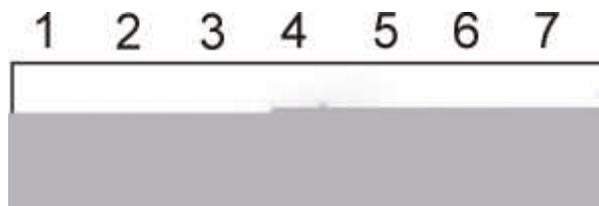


Abb. 10. Immunoaffinitätsreinigung von hPTHrP. Gleiche Volumenanteile der Reinigungsfraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (12%iges Tricingel) und darauffolgendem Western-Blot analysiert. Bahn 1: Säulendurchlauf, Bahn 2: Waschfraktion, Bahn 3 bis 7: Elutionsfraktionen.

Abbildung 11 zeigt ein Konzentrat des aufgereinigten Rezeptors nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung, sowie einen Western-Blot desselben Konzentrats. Aus 10 mg Membranprotein ließen sich ca. 600 bis 1000 ng humaner PTH-Rezeptor isolieren. Die Verunreinigung bei 30 kD konnte mittels N-terminaler Sequenzierung als Carlsberg-Subtilisin identifiziert und als Verunreinigung der Proteaseinhibitormischung nachgewiesen werden.

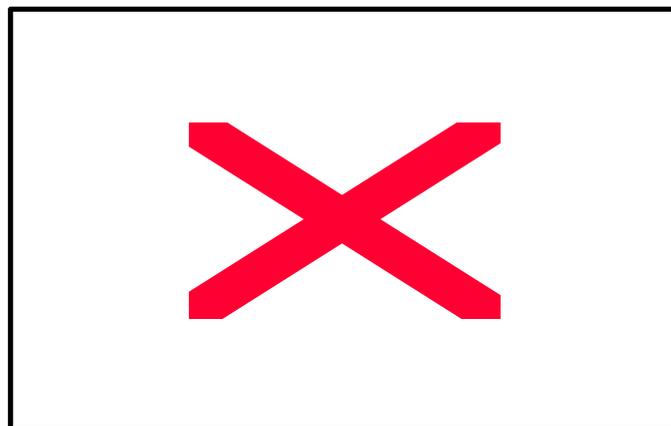


Abb. 11. 12%iges Tricingel des affinitätsgereinigten hPTHrP nach Silberfärbung und Western-Blot. Bahn 1: Molekularmassenstandard, Bahn 2: Konzentriertes Eluat der Immuno-affinitätssäule, Bahn 3: Western-Blot des aufgereinigten Rezeptors.

1.2 Enzymatische Deglykosylierung des aufgereinigten Rezeptors

Der humane PTH-Rezeptor besitzt 4 möglichen Glykosylierungsstellen in der extrazellulären N-terminalen Domäne (Karpf *et al.*, 1987; Shigeno *et al.*, 1988). Die Glykosylierung erfolgt N-glykosidisch, vermutlich an Asn151, Asn161, Asn166 und Asn176 (Juppner, 1994). Diese Glykosylierung führt zu einer Retardierung in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und einer apparenten Molekularmasse von ca. 80 kD. Die Tatsache, daß der präparierte, rekombinante Rezeptor ebenfalls diese Molekularmasse aufwies, deutete daraufhin, daß die Glykosylierung auch bei rekombinanter Expression vollständig verlief. Um die Molekularmasse des Proteinanteils des Rezeptors zu bestimmen, wurde ein Verdau mit N-Glykosidase F durchgeführt. N-Glykosidase F schneidet alle Typen Asparagin-gebundener N-Glycanketten, vorausgesetzt, daß sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen und daß das Oligosaccharid die Mindestgröße der Chitobiosecore Einheit aufweist (Tarentino *et al.*, 1985; Chu, 1986). Um eine vollständige Abspaltung aller Zuckerreste zu gewährleisten, wurde der Rezeptor durch die Zugabe von SDS und DTT denaturiert. Der deglykosylierte Rezeptor zeigte im Western-Blot im Gegensatz zum glykosylierten Protein eine der aus der Aminosäuresequenz errechneten Molekularmasse von 64,22 kD angenäherten Molekularmasse von ca. 60 kD (Abb. 12).

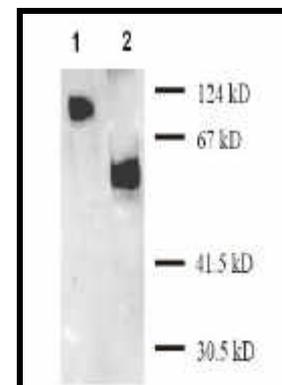


Abb. 12. Deglykosylierung von hPTHr. Immunoaffinitätsgereinigter hPTHr wurde mit 1 IU N-Glykosidase F unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen 16 h bei Raumtemperatur glykosidisch verdaut. Die Western-Blot Analyse zeigt nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf einem 12%igem Tricingel die Aufhebung der Retardierung des Proteins. Die Molekularmasse wird von apparenten 80 kD mit Glykosylierung zu apparenten 60 kD im deglykosylierten Zustand verschoben. Bahn 1: Immunoaffinitätsgereinigter hPTHr, Bahn 2: hPTHr nach dem glykolytischen Verdau.

1.3 Bestimmung des N-Terminus des murenen Rezeptors

Als membranständiges Protein wird der humane PTH-Rezeptor mit einer Signalsequenz synthetisiert, die während der Einlagerung in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums abgespalten wird. Verschiedene Algorithmen zur Bestimmung der Signalsequenz von hPTHr wiesen auf eine Signalsequenzlänge von 22 bis 25 Aminosäuren hin, mit Beginn der reifen Form des Rezeptors zwischen Tyr23 (Usdin *et al.*, 1995; Mannstadt *et al.*, 1998) und Val26 (Lee *et al.*, 1994). Um den Aminosäurestart der prozessierten Rezeptorform zu bestimmen und die Identität

des aufgereinigten Proteins zweifelsfrei nachzuweisen, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. R. Kraft (Max-Delbrück-Zentrum für molekulare Medizin, Berlin) eine Aminosäuresequenzanalyse über N-terminalen Edman-Abbau durchgeführt. Dazu wurde das aufgereinigte und aufkonzentrierte Protein (ca. 800 ng) nochmals über RP-HPLC entsalzt und konzentriert.

15 Zyklen der N-terminalen Sequenzierung ergaben eine Aminosäureabfolge von **YALVDAADVMTKEEQ**. Diese Sequenz entspricht dem N-Terminus des humanen PTH-Rezeptors, beginnend mit Tyr23.

1.4 Ligandenbindung an einer Parathormon-Affinitätssäule

Zum Nachweis der Bindung des solubilisierten Proteins an Parathormon wurde eine Ligandenaffinitätschromatographie durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde PTH über einen C-terminal angefügten Cysteinrest kovalent mittels einer Thioetherbindung an eine Agarosematrix gekoppelt.

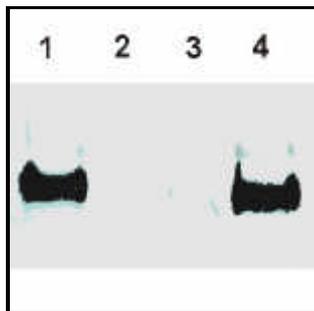


Abb. 13. Ligandenaffinitätschromatographie. Gleiche Anteile der Chromatographiefraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (12%igem Tricin-gel) und darauffolgendem Western-Blot analysiert. Bahn 1: WGA-gereinigtes Proteinsolubilisat, Bahn 2: Waschfraktion, Bahn 3: Eluat in 6 M Harnstoff, Bahn 4 Eluat in 6 M Harnstoff; 0,1 M Glycin/HCl; pH 2,5.

Die Bindung des WGA-vorgereinigten, solubilisierten Rezeptors an die Ligandenaffinitätsmatrix erfolgte in 0,1 % Triton; 100 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl₂; 250 mM Sucrose und 500 mM NaCl; pH 7,5. Nach einem Waschschrift wurde eine denaturierende Elution mit 6 M Harnstoff und daraufhin mit 6 M Harnstoff; 0,1 M Glycin; pH 2,0 vorgenommen. Im Western-Blot konnte nur im Eluat bei pH 2,0 der humane PTH-Rezeptor nachgewiesen werden (Abb. 13). Nach Aufkonzentrierung des pH 2,0-Eluats war auch im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel eine schwache, diffuse Bande bei 80 kD zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Die Identität dieser Bande wurde nochmals im Western-Blot überprüft.

Als Kontrolle wurde die Bindung des rezeptorhaltigen Proteinsolubilisats an „leeres“ Säulenmaterial, ohne Kopplung des PTH-Liganden, überprüft. Dabei konnte keine unspezifische Bindung nachgewiesen werden.

1.5 Bestimmung der Ligandenbindungsstärke an Zellmembranpräparationen

Die quantitative Bestimmung der Parathormonbindung an Zellmembranen des Klons B7 der CHO-Zell-Linie K1 wurde über einen radioaktiven Ligandenbindungstest durchgeführt. Verdrängungsexperimente mit unmarkiertem PTH(1-37) (Abb. 14) ergaben eine Dissoziationskonstante von 3,9 nM +/- 0,1. Dies ist in Übereinstimmung mit Werten aus der Literatur, bei denen sowohl ganze Zellen ($K_d = 5$ nM; Gardella *et al.*, 1993), als auch Zellmembranen ($K_d = 0,47 - 0,63$ nM; Goldman *et al.*, 1988) auf ihre Parathormonbindung untersucht wurden.

Da die aufgereinigte Rezeptormenge nicht den erwarteten Mengen (vgl. Kapitel 1.1.1) entsprach, wurden Scatchard-Analysen durchgeführt (Abb. 14, Insert). Die so errechnete und aus drei Messungen gemittelte Rezeptorkonzentration betrug 665 +/- 226 fmol/mg Membranprotein, was einer Menge von rund 40 ng humanem PTH-Rezeptor/mg Membranprotein entspricht. Diese Daten stimmen unter Berücksichtigung der Ungenauigkeiten bei der Abschätzung der aufgereinigten Rezeptormenge gut mit den veranschlagten 600 bis 1000 ng hPTHr/10 mg Membranprotein überein. In Untersuchungen an Rindernieren- und Hundenierenmenbranen wurden Werte von 475 fmol/mg Membranprotein und 395 fmol/mg Membranprotein (Goldman *et al.*, 1988) gemessen.

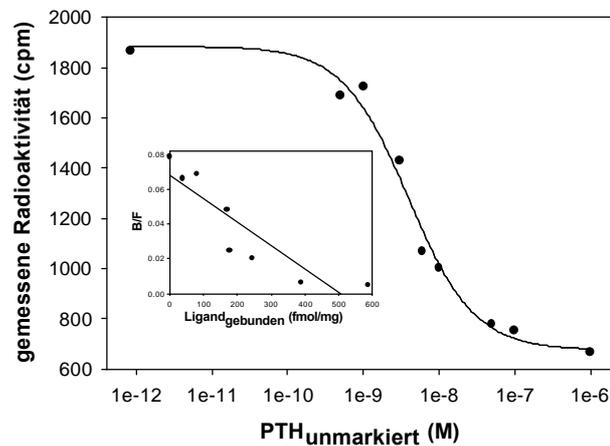


Abb. 14. Bestimmung der Dissoziationskonstante der Bindung von Parathormon an humanen PTH-Rezeptor. Zellmembranen (500 µg Membranprotein) wurden mit I_{125} -PTH (20 000 bis 100 000 cpm) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an unmarkiertem PTH(1-37) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membranen wurde die gebundene Radioaktivität mit einem γ -Zähler bestimmt. Gezeigt wird eine repräsentative Verdrängungskurve des radioaktiv markierten Liganden mit unmarkiertem PTH. Dargestellt sind die Meßdaten zusammen mit dem Kurvenangleich mittels einer nichtlinearen Angleichung. Die Dissoziationskonstante dreier Messungen wurde auf 3,9 nM +/- 0,1 gemittelt. Insert: Scatchard-Transformation der dargestellten Bindungsdaten. Der Kurvenangleich wurde den experimentellen Daten linear angepasst und ergab einen K_d -Wert von 5,8 nM +/- 0,7 und eine Rezeptorenmenge von 509 +/- 48 fmol/mg Membranprotein.

Aufgrund der sehr geringen Menge des humanen PTH-Rezeptors, die aus CHO-K1 Zell-Linie isoliert werden konnte, wurden keine weitergehenden Untersuchungen zur Struktur und Funktion des isolierten Rezeptorproteins im Rahmen dieser Doktorarbeit angestrebt.

2 Untersuchung des N-terminalen PTH-Rezeptorfragments (nPTHr)

2.1 Klonierung und Expression des nPTHr

Mutagenesestudien, Photocrosslink-Experimente und Untersuchungen an chimären Rezeptoren wiesen sowohl bei PTH-Rezeptor als auch bei weiteren G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Klasse B auf eine entscheidende Funktion des N-terminalen, extrazellulären Rezeptoranteils bei der Bindung des Liganden hin (Ji *et al.*, 1998; Mannstadt *et al.*, 1999). Zur Bereitstellung des N-terminalen PTH-Rezeptorfragments für eine funktionelle und strukturelle Untersuchung wurde die kodierende Region für die Aminosäuren Tyr23 bis Ile191 aus einer PTH-Rezeptor cDNA mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pET15b (Novagen) inseriert. Die Richtigkeit der amplifizierten und eingefügten Gensequenz wurde durch DNA-Sequenzanalyse überprüft. Die Verwendung von Tyr23 als N-terminale Aminosäure wurde aus der Charakterisierung der Prozessierung des muren Rezeptorproteins (siehe Kapitel 1.3) abgeleitet. Ile191 wurde als C-terminale Aminosäure unter der Annahme ausgewählt, daß sie die Aminosäure darstellt, welche sich gemäß Sequenzanalyse des PTH-Rezeptors (Gardella *et al.*, 1996) direkt vor der ersten Transmembranhelix befindet (Abb. 5, Einleitung). Der entstandene Expressionsvektor p(nPTHr) enthielt die kodierende Region für den N-terminalen Rezeptoranteil, N-terminal fusioniert an einem Histidin₆-tag, unter Kontrolle des T7-Promotors (Abb. 15).

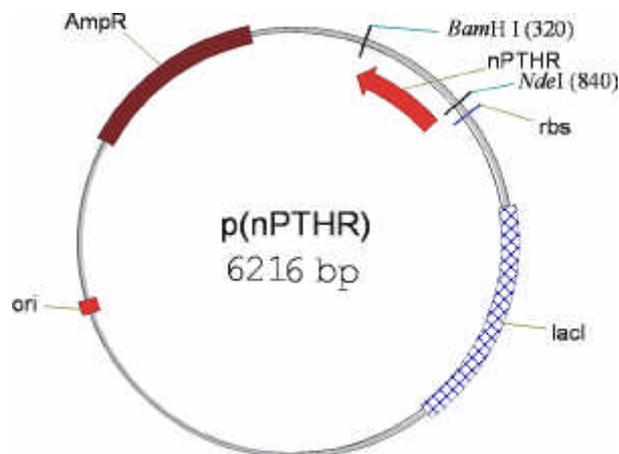


Abb.15. Schematische Darstellung des Expressionsplasmid p(nPTHr).

Die Expression von nPTHr erfolgte in *E. coli* BL21(DE3). Da die Translation eukaryontischer Transkriptionsprodukte in prokaryontischen Systemen oft durch eine unterschiedliche *codon-usage* verschlechtert wird (häufig im Falle der seltenen Arg-Codons AGA und AGG), wurde der *E. coli*-Stamm zusätzlich mit dem Plasmid pUBS520 transformiert. pUBS520 ermöglicht die konstitutive Expression der tRNA für die seltenen Arg-Codons und verbessert dadurch oftmals die Translation eukaryontischer Gentranskripte in prokaryontischen Expressionssystemen (Brinkmann *et al.*, 1989; Kurland & Gallant, 1996). Die Überexpression des nPTHr in *E. coli* BL21(DE3) wurde in einem Expressionstest geprüft. Abbildung 16 zeigt *E. coli*-Gesamtproteinfraktionen vor und während der Expression. Die Expression des nPTHr nach Induktion ließ sich dabei durch die Zunahme einer Proteinbande im SDS-Polyacrylamidgel im Molekularmassenbereich zwischen 20 und 30 kD verfolgen. Die Identität dieser Bande als nPTHr wurde durch N-terminale Sequenzierung bestätigt.

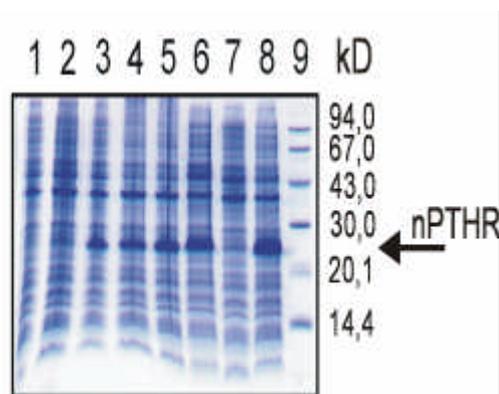
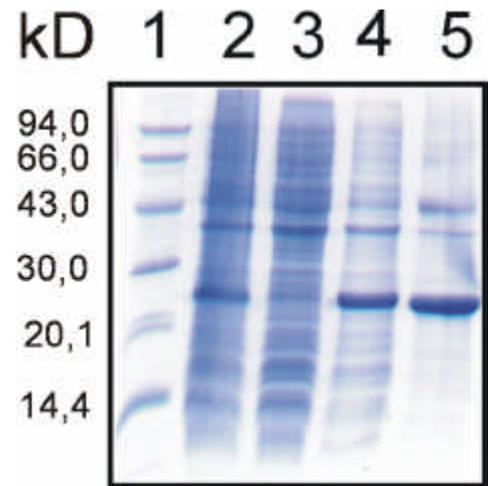


Abb. 16. Expression des nPTHr. Kulturmedium wurde mit einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3) pNPTHr angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der Induktion der rekombinanten Protein-expression mit IPTG wurden zu den angegebenen Zeiten Proben genommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und nach Erhitzen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Bahn 1: Gesamtzellfraktion vor Induktion; Bahn 2 bis 6; 10, 30, 60, 120, 180 min nach Induktion; Bahn 7: vor Induktion; Bahn 8: nach dreistündiger Induktion; Bahn 9: Molekularmassenstandard.

Starke Überexpression disulfidverbrückter Proteine im Cytoplasma von *E. coli* führt in vielen Fällen zu einer Expression als unlösliches Protein in *inclusion bodies* (Marston, 1986). Abbildung 17 zeigt, daß das überexprimierte Protein vollständig in der unlöslichen *E. coli*-Fraktion in *inclusion bodies* anfiel, und durch Waschschriffe mit dem Detergenz LDAO von Verunreinigungen befreit werden konnte. Aus 60 g Zellen (Naßgewicht) konnte so 1,1 g *inclusion body*-Material präpariert werden.

Abb. 17. Inclusion body -Präparation. Die Isolierung von *inclusion bodies* fand wie in „Material und Methoden“ beschrieben nach Zellaufschluß durch Zentrifugation und mehrere Waschschrte mit/ohne dem Detergenz LDAO statt. Gleiche Volumenanteile der erhaltenen Fraktionen wurden auf einem 12%igen Tricingel mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Bahn 1: Molekularmassenstandard; Bahn 2: Gesamtzellextrakt; Bahn 3: Überstand des Zellaufschluß; Bahn 4: unlösliches Material nach LDAO-Extraktion; Bahn 5: Gewaschene *inclusion body*-Fraktion.



2.2 Rückfaltung und Reinigung von nPTHR aus *E. coli* inclusion bodies

Die Solubilisierung des *inclusion body*-Materials erfolgte unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (6 M Guanidiniumchlorid; 0,1 M Tris/HCl; 100 mM DTT; 1 mM EDTA; pH 8,0), die eine vollständige Entfaltung der Polypeptidkette gewährleisten. Aus 60 g *E. coli* Zellen wurde 500 mg solubiliertes Protein gewonnen.

Zur Entfernung von Verunreinigungen in der solubilierten *inclusion body*-Präparation wurde eine Vorreinigung mittels Immobilisierter Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) durchgeführt (siehe Abb. 19, Bahn 5). Die Rückfaltung des nPTHR erfolgte während einer 4-tägigen Dialyse gegen Rückfaltungspuffer (1 M Arginin; 0,05 M Naphosphat; 1 mM EDTA; 5 mM GSH und 1 mM GSSG; pH 8,0) bei 6 °C und einer Proteinkonzentration von 1,0 bis 1,3 mg/ml. Die Ausbildung der nativen Disulfidverbrückung wurde dabei durch den Einsatz eines Redox-Systems aus oxidiertem und reduziertem Glutathion begünstigt. Ohne den Zusatz des Faltungshelfers Arginin im Rückfaltungspuffer wurde starke Aggregation beobachtet. Bei Zusatz von Arginin blieb die Renaturierungslösung dagegen klar.

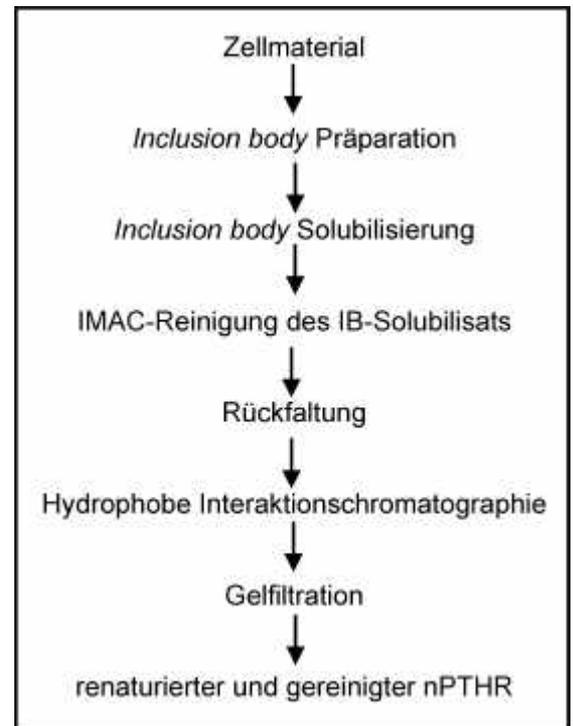


Abb. 18. Schematische Darstellung der Aufarbeitungs-, Rückfaltungs- und Reinigungsprozedur für nPTHR.

Abb. 18 zeigt schematisch die für nPTHR entwickelte Aufarbeitungs- und Reinigungsprozedur.

Zur Proteinreinigung nach der Renaturierung wurde eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) durchgeführt, die geeignet ist verschieden gefaltete Spezies gemäß ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität aufzutrennen. Dazu erfolgte nach der Renaturierung eine Dialyse der Proteinlösung gegen den Äquilibriumspuffer (1,5 M Ammoniumsulfat; 0,05 M Natriumphosphat; pH 7,5) und darauffolgend eine Abtrennung von Aggregaten durch Zentrifugation. Der Zentrifugationsüberstand wurde auf eine Phenylsepharose-Säule aufgetragen und nPTHR in einem linear fallenden Ammoniumsulfatgradienten eluiert. nPTHR konnte ab einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 0,3 M vom Säulenmaterial eluiert werden. Das Fehlen weiterer dominanter Elutionspeaks deutete daraufhin, daß falsch gefaltete Formen bereits bei der Dialyse gegen den Äquilibriumspuffer ausgefallen waren, bzw. auf der Säule aggregierten und sich nicht mehr durch eine Absenkung der Ammoniumsulfat-Konzentration eluieren ließen. Beim Regenerieren des Säulenmaterials mit 1 M NaOH konnte dies bestätigt werden, da die Regenerationslösung große Mengen an Protein vom Säulenmaterial löste.

Wie Abbildung 19 zeigt liegt nPTHR nach diesem Reinigungsschritt nahezu homogen vor; um letzte Verunreinigungen zu entfernen wurde, eine präparative Gelfiltration an einer Superdex 75-Säule durchgeführt.

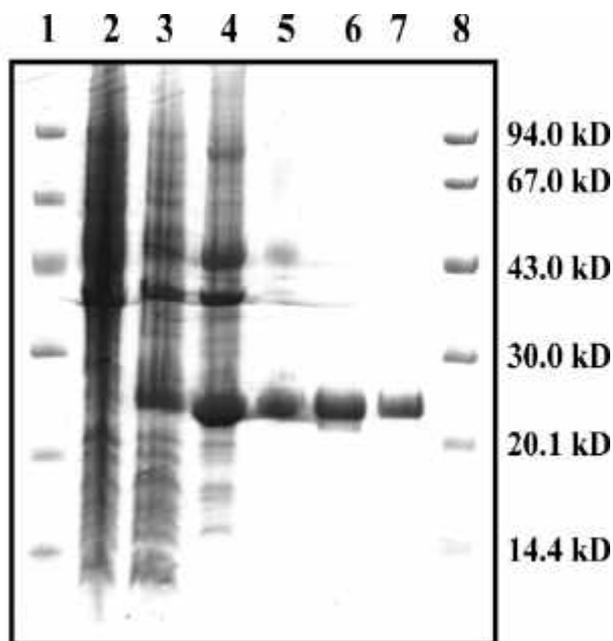


Abb. 19. Reinigung des nPTHR. Gleiche Volumenanteile der Aufarbeitungs-, und Reinigungsfraktionen wurden auf einem 12%igen Tricingel mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Bahn 1: Molekularmassenstandard; Bahn 2: Gesamtzellextrakt vor Induktion; Bahn 3: Gesamtzellextrakt nach dreistündiger Induktion; Bahn 4: *Inclusion body* Präparation; Bahn 5: *Inclusion body* Solubilisat nach IMAC-Reinigung; Bahn 6: Proteinfraktion nach Renaturierung und hydrophober Interaktionschromatographie; Bahn 7: Eluat der Gelfiltration; Bahn 8: Molekularmassenstandard.

Die Reinheit des eluierten nPTHR betrug im SDS-Polyacrylamidgel nach der Gelfiltration 95 bis 99 %; die Ausbeute nach Renaturierung und Reinigung betrug 25 bis 35 % des solubilisierten, denaturierten *inclusion bodies* Ausgangsmaterials. Aus 60 g Zellen konnten somit 130 mg bis 180 mg nativer nPTHR isoliert werden.

2.3 Charakterisierung des renaturierten nPTHR

2.3.1 Identität und Homogenität

Die Identität des gereinigten nPTHR sowie die Intaktheit des N-Terminus wurde sowohl mit Elektrospray-Ionisations- (Abb. 20) und MALDI-TOF-Massenspektrometrie, als auch mittels N-terminaler Sequenzierung bestätigt.

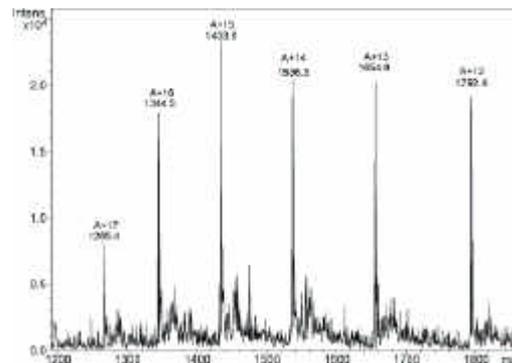


Abb. 20. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrum des rückgefalteten und gereinigten nPTHR.

Die Dekonvolution des Elektrospray-Ionisations Massenspektrums ergab die Existenz zweier Spezies, mit Molekularmassen von 21,497 kD und 21,512 kD. Da die errechnete Molekularmasse von nPTHR 21,496 kD beträgt, entspricht Spezies 1 im Rahmen der Messgenauigkeit von 0,03 % bei Molekülen bis 150 kD (Fitzgerald & Siuzdak, 1996) dem unmodifizierten Rezeptorfragment. Spezies 2, deren Anteil an der Gesamtmenge 1/3 betrug, könnte durch eine Aufoxidation eines Methioninrests am Protein bei der Probenvorbereitung zur massenspektrometrischen Analyse entstanden sein; dies würde zu einem Massenzuwachs von 16 Da führen. Das MALDI-TOF Massenspektrum des gereinigten nPTHR ergab eine molekulare Masse von 21,504 kD, was im Rahmen der Meßgenauigkeit dieser Methode von 0,05 % (Caprioli & Suter, 1995) gut mit der berechneten Molekularmasse übereinstimmt.

Die Molekularmasse im nativen Zustand sowie der Oligomerisierungszustand von nPTHR wurde mit Hilfe von analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Abbildung 21 zeigt den Sedimentations-Gleichgewichtslauf des aufgereinigten Proteins in 50 mM K-Phosphat; 0,3 M KCl; pH 7,5 bei einer Proteinkonzentration von 0,4 mg/ml. Aus den experimentellen Daten konnte die Molekularmasse zu 20, 81 kD errechnet werden, was einem monomeren Zustand des Proteins entspricht.

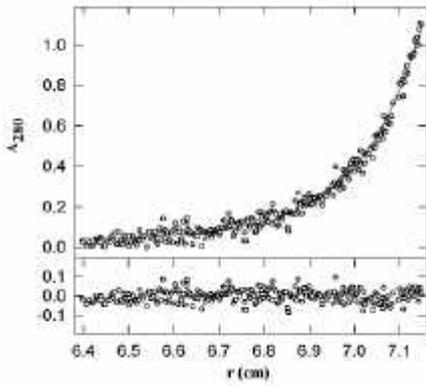


Abb. 21. Analytische Ultrazentrifugation zur Molekularmassen-Bestimmung des nPTHR. Das Sedimentationsgleichgewicht wurde bei 20 000 rpm und 20 °C mit einer 0,4 mg/ml Proteinelösung in 0,05 M K-Phosphat; 0,3 M KCl; pH 7,5 gemessen. Oben: Kurvenvergleich der experimentellen Daten (⊙) liefert eine Spezies von 20,81 kD (-). Unten: Abweichung des Kurvenvergleichs von den experimentellen Daten.

Zur Überprüfung der Disulfidverbrückung wurde ein Ellman's Test durchgeführt. Dabei konnten keine freien Cysteinseitenketten nachgewiesen werden. Somit liegen alle 6 Cysteinreste des nPTHR in Disulfidbrücken vor. Da im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse keine Spezies mit gemischten Disulfidbrücken zu Glutathion auftraten, kann von einer intramolekularen Disulfidverbrückung ausgegangen werden. Die Homogenität dieser Disulfidverbrückung konnte mittels *Reversed Phase* HPLC nachgewiesen werden. Abbildung 22 zeigt das erhaltene Chromatogramm; nPTHR eluierte von der Säule bei 13,63 min, ohne eine Auftrennung in mehrere Spezies zu zeigen. Dies deutete stark darauf hin, daß die Disulfidverbrückung während des Rückfaltungsprozesses nicht ein statistischer Prozess war, sondern durch die Ausbildung einer definierten Sekundär- und Tertiärstruktur determiniert wurde.

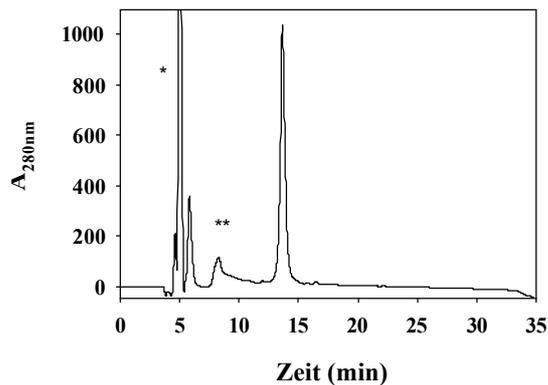


Abb. 22. Reversed Phase HPLC-Chromatogramm. Ca. 3 µg nPTHR in 50 mM Na-Phosphat; 0,3 M NaCl; 1 mM PMSF; pH 7,5 wurden auf eine ET125x2 Nucleosil500-5 C3PPN Reversed Phase Säule aufgetragen und nach einem Waschschrift (2 min; 1 % Acetonitril, 0,09 % TFA) durch einen Gradienten von 30 % auf 80% Acetonitril eluiert (Lösungsmittel A: 0,09 % TFA; Lösungsmittel B: 0,08 % TFA, 80 % Acetonitril). nPTHR eluierte bei 13,63 min. Peaks bei 5 min (*) und 8 min (**) entsprachen jeweils dem zugesetzten Proteaseinhibitor PMSF und dem Gradientenschritt von 2 auf 30 % Acetonitril.

2.3.2 Sekundär- und Tertiärstruktur

Zur Analyse des Sekundärstrukturgehalts wurden Fern-UV Circular dichroismus-Spektren des rückgefalteten nPTHR aufgenommen und mit Spektren des denaturierten Proteins verglichen (Abb. 23).

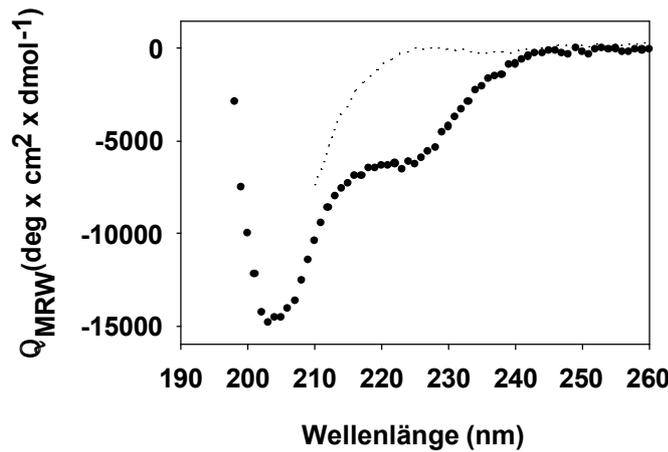


Abb. 23. Fern-UV CD-Spektrum des nPTHR. CD-Spektren von 18 μM nPTHR in 0,05 M Na-Phosphat; 0,3 M NaCl; pH 7,5 (●●●) und 28 μM nPTHR in 6 M Guanidiniumchlorid (---) wurden in 0,02 cm Küvetten mit einer Integrationszeit von 7 s und 1 nm Bandbreite bei 22 °C aufgenommen und jeweils zehnfach akkumuliert.

Deutliche Unterschiede zwischen nativem und denaturierten nPTHR konnten im Wellenlängenbereich von 210 nm bis 240 nm beobachtet werden. Das Spektrum des denaturierten Proteins entspricht dabei dem einer vollständig entfalteten Polypeptidkette (Schmid, 1989), das des nativen Proteins, mit einem Hauptminimum bei 204 nm und einem Nebenminimum bei ca. 220 nm, weist auf eine partiell α -helikale Struktur hin. Eine quantitative Auswertung des Sekundärstrukturgehalts erfolgte mit dem Programm CDNN (Böhm *et al.*, 1992). Damit konnte der α -helikale Anteil zu 25 % und der β -sheet Anteil zu 23 % abgeschätzt werden. Diese mittels Fern-UV CD dargestellte Struktur des Proteins erwies sich gegenüber Variation äußerer Parameter als sehr stabil. So konnten keine signifikanten strukturellen Unterschiede in einem pH-Bereich von pH 4 bis pH 10, noch in einem Temperaturbereich von 4 ° bis 40 °C festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Aussagen über die asymmetrische Umgebung von aromatischen Proteinseitenketten und damit über die Tertiärstruktur lassen sich im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 350 nm im Nah-UV Circular dichroismus-Spektrum treffen. Zur Untersuchung der Tertiärstruktur des nPTHr wurden Nah-UV CD-Spektren im nativen und im denaturierten Zustand aufgenommen (Abb. 24).

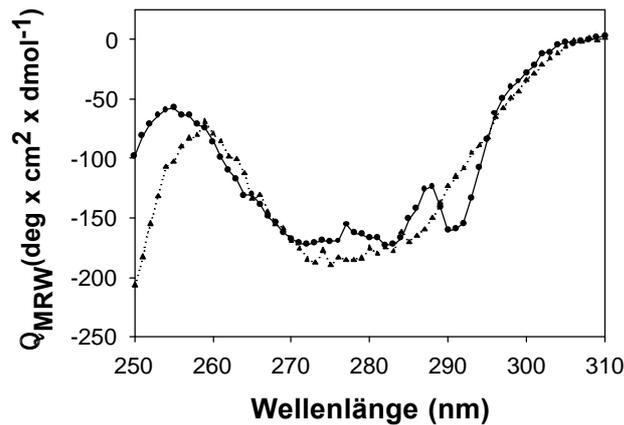


Abb. 24. Nah-UV CD-Spektrum des nPTHr. CD-Spektren einer 28 μM nPTHr-Lösung in 0,05 M Na-Phosphat; 0,3 M NaCl; pH 7,5 (●●●) und einer 32 μM nPTHr-Lösung in 0,05 M Na-Phosphat; 6 M Guanidiniumchlorid; pH 7,5 (▲▲▲) wurden in 0,5 cm Küvetten mit einer Integrationszeit von 7 s und 1 nm Bandbreite bei 22 °C aufgenommen und jeweils zehnfach akkumuliert.

Bei 288 nm und 276 nm ließen sich im Nativspektrum deutliche Feinstrukturen erkennen, die im Spektrum des denaturierten Proteins nicht vorhanden waren. Auch ist die Bande des Nativspektrums bei 255 nm im Vergleich zum Spektrum des denaturierten Proteins um ca. 5 nm zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben. Die spektrale Intensität im Nah-UV CD-Spektrum des denaturierten nPTHr ist ungewöhnlich stark für ein chemisch denaturiertes Protein. Da die Denaturierung aber unter nicht reduzierenden Bedingungen stattfand, also die drei Disulfidbrücken des nPTHr intakt blieben, läßt sich das gemessene Signal vermutlich auf Beiträge der konformationell eingeschränkten Disulfidchromophore zurückführen (Woody & Dunker, 1996).

Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren des nPTHr stellte eine weitere Methode dar, Aussagen über die Konformation des Moleküls zu erhalten. Dabei konnten Umgebungsänderungen aromatischer Aminosäuren mit hoher Empfindlichkeit detektiert werden.

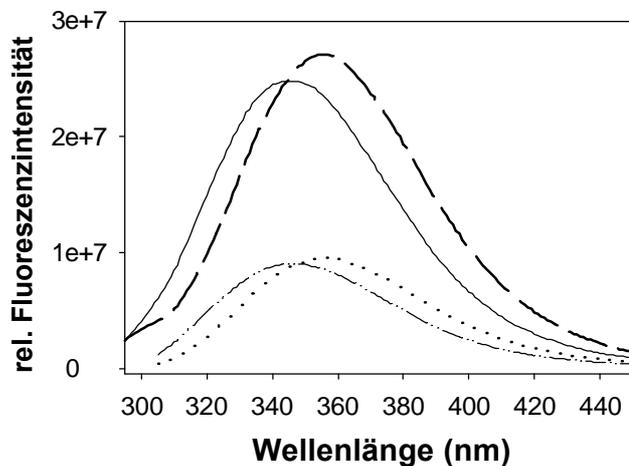


Abb. 25. Fluoreszenzmissionsspektren des nativen und denaturierten nPTHr. Emissionsspektren des nativen nPTHr in 0,05 M Na-Phosphat; 0,3 M NaCl; pH 7,5 und des denaturierten nPTHr in 6 M Guanidiniumchlorid wurden bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und 295 nm mit einer Zeitkonstante von 0,2 s an einem Fluoromax-2 Spektrofluorimeter (SPEX Instruments S. A., Inc., Edison, NJ, USA) in 1 cm Küvetten (Hellma) zehnfach akkumuliert (Spaltbreite bei Anregung 1 nm; Spaltbreite bei Emission 5 nm). Die Meßtemperatur betrug 20 °C, die Proteinkonzentration war 1 µM (- -):denaturiert (Anregung 280); (···): denaturiert (Anregung 295 nm); (—): nativ (Anregung 280 nm); (-·-·-): nativ (Anregung 295 nm)

Abb. 25 zeigt Fluoreszenzmissions-Spektren des nativen und des denaturierten nPTHr. Es konnte eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums von 344 nm im Nativspektrum auf 354 nm im Spektrum des vollständig denaturierten Proteins, sowohl bei Anregung von Tyrosin- und Tryptophanseitenketten bei 280 nm, als auch bei alleiniger Anregung der Tryptophanseitenketten bei 295 nm, beobachtet werden. Diese Wellenlängenverschiebung läßt sich durch den stärkeren Kontakt der Fluorophore im entfaltenen Protein mit dem umgebenden Lösungsmittel erklären. Sind alle Tryptophanseitenketten eines Proteins lösungsmittlexponiert, so liegt das Emissionsmaximum bei 350 nm bis 352 nm (Holtzhauer, 1996). Eine Einbettung von aromatischen Seitenketten in eine hydrophobe Umgebung im Proteininneren verschiebt das Emissionsmaximum zu weitaus kürzeren Wellenlängen (320 nm bis 340 nm). Ein Emissionsmaximum von 344 nm im Falle des Nativspektrums des nPTHr deutet auf eine partielle Exposition von aromatischen Seitenketten hin. Mit dieser Meßmethode ließ sich nicht ausschließen, daß die Lösung des renaturierten nPTHr aus einem Gemisch aus nativen und denaturierten Molekülen bestand. Über Aktivitätsmessungen (siehe Kapitel 2.4.1.3) konnte jedoch bestätigt werden, daß nPTHr nach Rückfaltung und Reinigung eine einheitliche, native Spezies darstellt.

Zur weiteren Charakterisierung des Faltungszustand des nativen nPTHr wurden Interaktionsstudien des nativen und des denaturierten nPTHr mit dem hydrophoben Farbstoff 1-Anilino-8-naphtalensulfonat (ANS) durchgeführt. Die unpolare Anilino-Naphtalengruppe des ANS-Moleküls bindet an lösungsmittlexponierte hydrophobe Oberflächenabschnitte von

Proteinmolekülen (Slavik, 1982; Creighton, 1992; Engelhard & Evans, 1995), was einen Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute sowie eine Verschiebung des Emissionsmaximums der angeregten ANS-Moleküle zur Folge hat. In wäßriger, nicht proteingebundener Umgebung wird die Fluoreszenzemission des Farbstoffmoleküls durch Fluoreszenzlöschung wirkungsvoll abgeschirmt (Kirk *et al.*, 1996).

Abbildungen 26 und 27 zeigen Fluoreszenzemissionsspektren des rückgefalteten und des denaturierten nPTHR in Anwesenheit eines Überschusses an ANS, sowie als Referenz eine proteinfreie ANS-Lösung gleicher Konzentration. Die Fluoreszenzemission wurde sowohl bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm (Anregung des Proteins) als auch von 380 nm (Anregung des ANS-Fluorophors) gemessen.

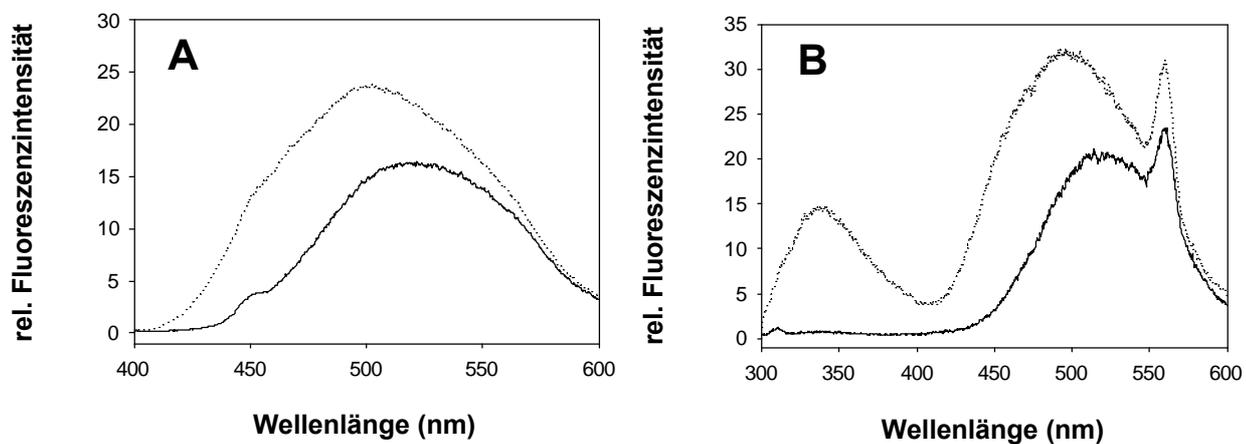


Abb. 26. ANS-Interaktion des nativen nPTHr. Fluoreszenzemissionsspektren von 1 μ M nPTHr in 0,05 M Na-Phosphat; 0,3 M NaCl; pH 7,5 (····) und 0,05 M Na-Phosphat; 0,3 M NaCl; pH 7,5 (—) wurden in Anwesenheit von 100 μ M ANS bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm (A) und 280 nm (B) mit einer Zeitkonstante von 0,2 s und einer Bandweite von 1 nm zehnfach akkumuliert (Spaltbreite bei Anregung 1 nm; Spaltbreite bei Emission 5 nm). Die Meßtemperatur betrug 20 °C.

Eine Interaktion zwischen nativem nPTHr und ANS ist in den Fluoreszenzemissionsspektren deutlich erkennbar. Das Emissionsmaximum des ANS-Fluorophors weist bei einer Anregung bei 380 nm eine ca. 1,5 fach gesteigerte Intensität auf und ist von 511 nm auf 504 nm verschoben. Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm lässt sich im Emissionsspektrum neben dem Fluoreszenzmaximum des nPTHr bei 340 nm wiederum die ca. 1,5 fache Intensitätssteigerung des Emissionsmaximums des ANS-Fluorophors und eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von 510 nm auf 495 nm erkennen. Darüberhinaus ist der absolute Wert der Fluoreszenzintensität am Emissionsmaximum im Vergleich mit dem bei 380 nm angeregten Emissionsspektrum ca. 1,3 fach erhöht. Dies erklärt sich durch Energietransferprozesse, die zwischen den angeregten Fluorophoren des nPTHr und ANS bei Bindung auftreten können.

Bei chemisch induzierter Entfaltung des nPTHr durch 6 M Guanidiniumchlorid wird die Interaktion mit ANS aufgehoben. Fluoreszenzemissionsmaximum und die Intensität des ANS-Fluoreszenzsignals zeigen bei Anregungswellenlängen von 380 nm und 280 nm keinerlei Unterschied in An- und Abwesenheit des entfalteten Proteins (Abb. 27).

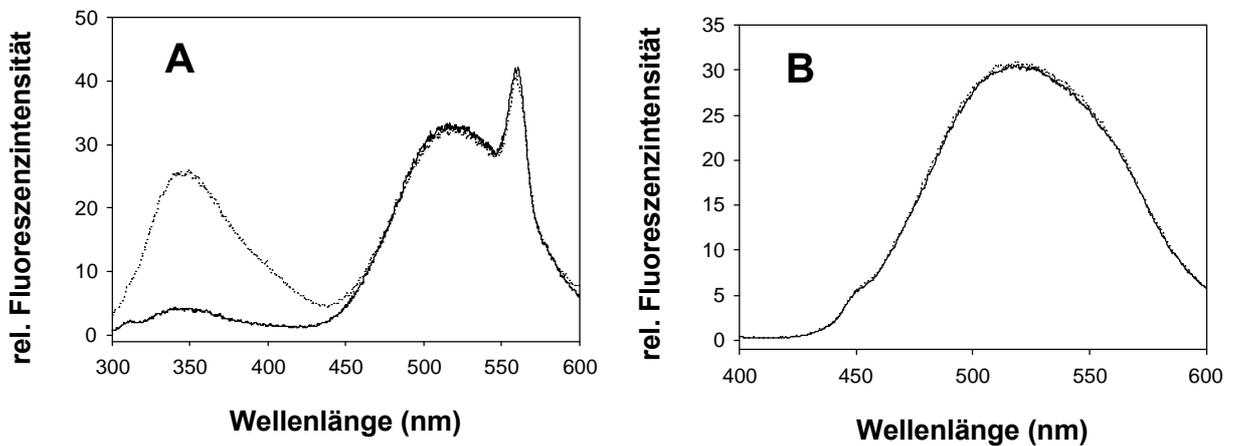


Abb. 27. ANS-Interaktion des denaturierten nPTHr. Fluoreszenzmissionsspektren von 1 μ M nPTHr in 6 M Guanidiniumchlorid (····) und 6 M Guanidiniumchlorid (—) wurden in Anwesenheit von 100 μ M ANS bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm (A) und 390 nm (B) mit einer Zeitkonstante von 0,2 s zehnfach akkumuliert (Spaltbreite bei Anregung 1 nm; Spaltbreite bei Emission 5 nm). Die Meßtemperatur betrug 20 °C.

Die ANS-Messungen zeigen, daß im renaturierten nPTHr hydrophobe Seitenketten partiell exponiert vorliegen. Es ist anzunehmen, daß diese Exposition durch den fragmentarischen Charakter des nPTHr verursacht wird. Im natürlich vorkommenden Protein ist der N-terminale, extrazelluläre Teil des humanen PTH-Rezeptors zum einen C-terminal in der Zellmembran verankert, zum anderen können Tertiärkontakte dieses Rezeptorteils mit extrazellulären *loop*-Regionen des Gesamt Rezeptors ausgebildet werden.

Zur Untersuchung der Tertiärstruktur wurden zudem ein 1D-NMR Spektrum aufgenommen. Abb. 28 zeigt Methylgruppen des nPTHr, die einer Hochfeldverschiebung unterliegen. Dabei handelt es sich um Gruppen, die in eine definierte Tertiärstruktur eingebunden sind, da die beobachtete Hochfeldverschiebung durch den Ringstrom benachbarter aromatischer Aminosäuren in asymmetrischer Umgebung zustandekommt. Da es allerdings zu keiner hohen Dispersion der Signale im Bereich der Aromaten- und NH-Region (7 ppm bis 9 ppm) kam, ist davon auszugehen, daß unter den experimentellen Bedingungen nur eine Teilpopulation gefalteter Moleküle vorlag. Das Fehlen einer ausreichenden Zahl von NH-Resonanzen bei einem Protein mit 188 Aminosäureseitenketten und einem pH-Wert von 6,0, wie im Fall des nPTHr,

läßt auf das Vorkommen hoch-oligomerer Spezies schließen; die entsprechenden NH-Resonanzen sind in solchen Oligomeren stark verbreitert und können in der Basislinie des Spektrums untergehen. Es ist davon auszugehen, daß nPTHr bei den für NMR-Untersuchungen nötigen Proteinkonzentrationen bei den gewählten Pufferbedingungen zur Aggregation neigte.

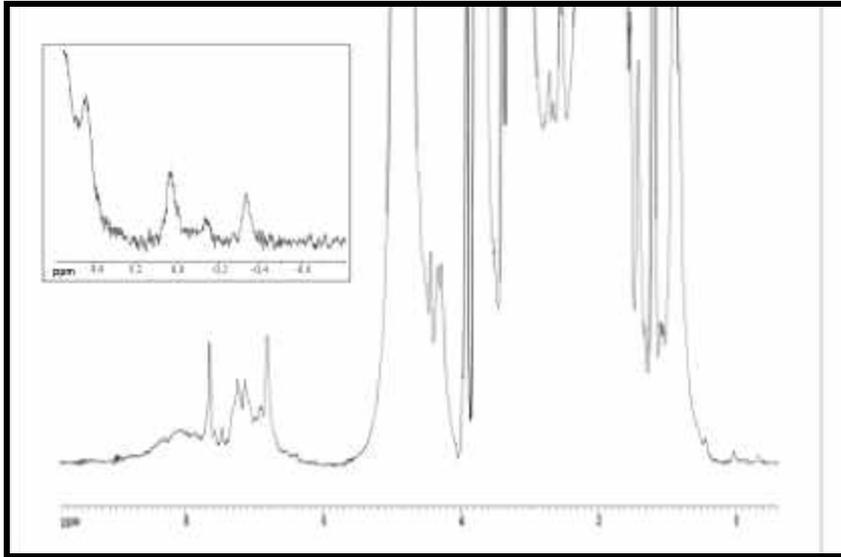


Abb. 28. 1D-NMR-Spektrum von nPTHr. 22 μ M nPTHr in 0,05 M Na-Phosphat; 0,3 M KCl; pH 6,0 wurde in einem Bruker 50 DRX-NMR-Spektrometer bei einer Temperatur von 27 °C vermessen. Das Insert zeigt einen vergrößerten Ausschnitt im Bereich um 0 ppm.

2.3.3 Thermische Stabilität

Um die thermische Stabilität des rückgefalteten nPTHr zu untersuchen, wurde die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzemission des Proteins bei 340 nm zwischen 4 °C und 80 °C gemessen (Abb. 29). Dabei konnte eine nahezu lineare Abnahme des Fluoreszenzsignals mit Erhöhung der Temperatur festgestellt werden. Ein temperaturinduzierter Entfaltungsschritt konnte mit dieser Methode nicht detektiert werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß das spezifische Signal, welches durch die Entfaltung des Proteinmoleküls hervorgerufen wird, gegenüber der unspezifischen temperaturabhängigen Signaländerung eine zu geringe Signalintensität aufwies. Weiterhin könnte das Fehlen eines spezifischen Signals aber auch daraufhin deuten, daß bei der Temperaturdenaturierung des nPTHr die Fluorophore des Proteins keinen ausgeprägten Umgebungswechsel erfahren. Das kann einerseits eine nur partielle Denaturierung des Proteins durch Temperatur zur Ursache haben (Privalov, 1992), andererseits auf eine schon im nativen Zustand vorhandene Exposition der Fluorophore hindeuten.

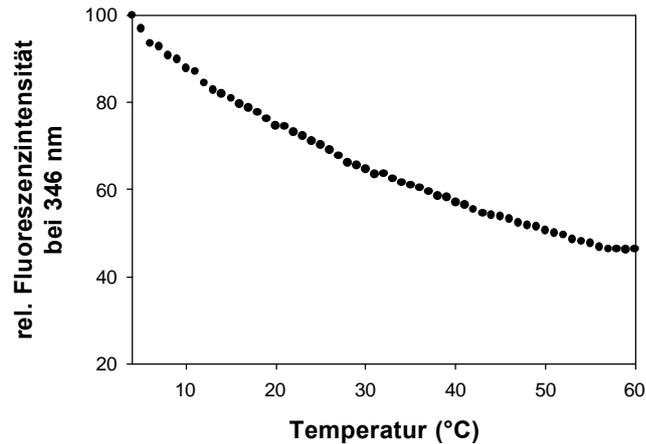


Abb. 29. Fluoreszenz-Temperaturübergang von nPTHR. Die Fluoreszenzemission bei 340 nm (Anregungswellenlänge 270 nm) von 1,7 μ M nPTHR in 0,05 M Na-Phosphat; pH 7,5 (●) wurde in einer 1 cm Küvette in Abhängigkeit von der Temperatur an einem Hitachi F-4500 Spektrofluorimeter (Hitachi, Tokyo, Japan) detektiert. Dazu wurde das von L. Waldmann entwickelte Programm FTLM.BAS (Waldmann, 1998) verwendet.

Auch unter Zugabe eines 100 fach molaren Überschusses an ANS und Messung der ANS-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur konnte kein temperaturinduzierter Entfaltungsschritt detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Um die Wärmekapazität der Proteinlösung in Abhängigkeit von der Temperatur direkt zu messen, wurden kalorimetrische Untersuchungen an einem *Differential Scanning* Kalorimeter durchgeführt. Abbildung 30a zeigt die thermische Entfaltung des nPTHR anhand aufeinanderfolgender kalorimetrischer Messungen von 7 °C bis 85 °C. Die Schmelztemperatur des nPTHR wurde zu 61 °C bestimmt. Der Temperaturübergang war unter den gewählten Meßbedingungen (Aufheizen bis 85 °C) partiell reversibel, die Ausgangsamplitude bei 61 °C von Messung 1 wurde in Messung 2 zu 71 %, in Messung 3 zu 52 % erreicht. Die Auswertung der ersten Messung (Abb. 30b) ergab eine Entfaltungsenthalpie ΔH_{cal} von 217 kJ/mol, wobei der Abfall der Basislinie nach Denaturierung keine Bestimmung der Wärmekapazitätsänderung ΔC_p zwischen nativem und ungefaltetem Zustand zuließ. Bei einem weiteren Experiment mit einem Erhitzen der Proteinlösung auf nur 80 °C konnte 85%ige Reversibilität in Messung 2 und 3 festgestellt werden.

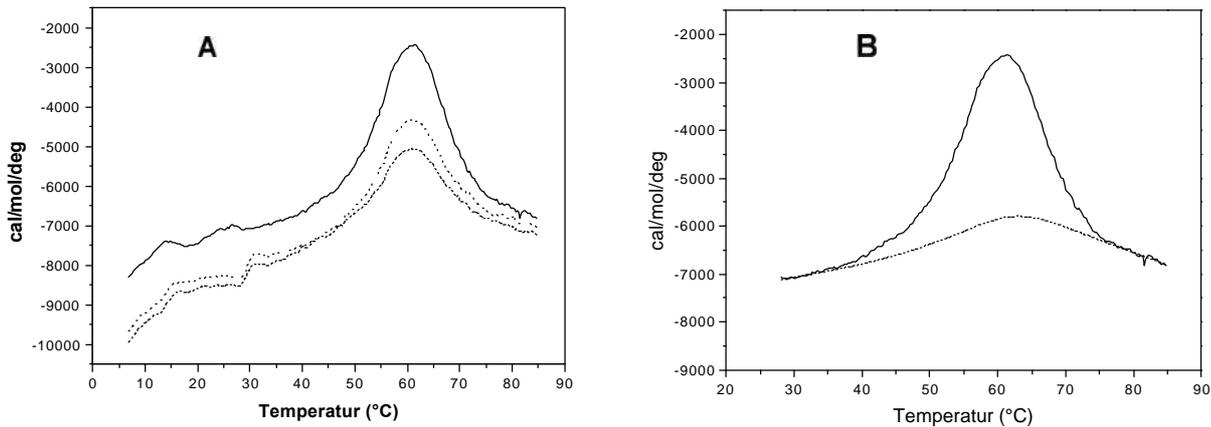


Abb. 30 Kalorimetrische Untersuchung der thermischen Stabilität von nPTHR. Messungen der partiellen molaren Wärmekapazität einer 13 μM nPTHR-Lösung in 0,05 M Na-Phosphat; 150 mM NaCl; pH 7,0 wurden in einem VP-DSC Mikrokolorimeter (MicroCal, Inc., Northampton, USA) mit einer Aufheizrate von 60 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ durchgeführt. A: Messungen 1 (—); 2 (---); 3 (---); B: Auswertung von Messung 1 mit Hilfe des Programms MicroCal Origin 4.1 für DSC (MicroCal Software Incorporation, Northampton, USA). Die Schmelztemperatur betrug 61 $^{\circ}\text{C}$, die Entfaltungsenthalpie ΔH_U wurde mittels Integration der Fläche oberhalb der errechneten Basislinie (-----) zu 217 kJ/mol bestimmt.

Eine Stabilisierung des nPTHR konnte unter Zugabe von 0,5 M Ammoniumsulfat erreicht werden; die Übergangstemperatur erhöhte sich durch Zusetzung dieses stabilisierenden Agens zur Proteinlösung von 61 $^{\circ}\text{C}$ auf 71 $^{\circ}\text{C}$.

2.3.4 Stabilität gegenüber Guanidiniumchlorid

Der Einfluß des Denaturierungsmittels Guanidiniumchlorid auf die Sekundärstruktur und die Tertiärstruktur des renaturierten nPTHR wurde mittels Fern-UV Circular dichroismus untersucht. Abbildung 31 zeigt die Änderung des CD-Signals bei 220 nm in Abhängigkeit von der Guanidiniumchlorid-Konzentration. Der Übergang vom nativen in den denaturierten Zustand war reversibel mit einer nur geringen Kooperativität. Unter Annahme eines Zwei-Zustands-Modells ergab die quantitative Auswertung einen Übergangsmittelpunkt von 2,5 M Guanidiniumchlorid, eine Freie Stabilisierungsenthalpie $\Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{U}}$ von 9,9 kJ/mol und eine Kooperativität des Übergangs m von 3,92 kJ/mol $\times M_{\text{GdmHCl}}$.

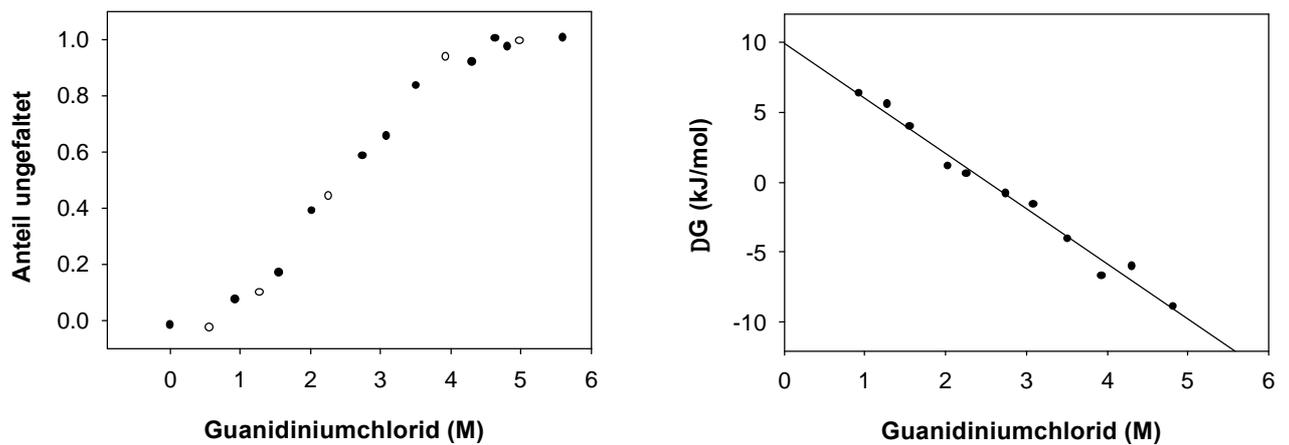


Abb. 31. Guanidiniumchlorid induzierter Entfaltungs-/Rückfaltungs-Übergang im Fern-UV CD. Zur Messung der Entfaltung (●) wurde nativer nPTHR, zur Messung der Rückfaltung (○) wurde denaturierter nPTHR in 6 M Guanidiniumchlorid 10-fach in unterschiedliche Konzentrationen an Guanidiniumchlorid in 0,05 M Na-Phosphat; pH 7,5 auf 2,6 μ M verdünnt. Nach 16-stündiger Inkubation bei 18 °C wurden die Proben bei 220 nm im CD-Spektrometer vermessen. Die exakte Bestimmung der Guanidiniumchlorid-Konzentration fand über die Messung des Brechungsindex der Probenlösung (Pace, 1986) statt. Die Auswertung der experimentellen Daten wurde gemäß eines Zwei-Zustandsmodells nach der linearen Extrapolationsmethode (Pace & Scholtz, 1997) durchgeführt.

Im Vergleich mit in der Natur vorkommenden globulären Proteinen, wie RNase T1 ($\Delta G_{N \rightarrow U} = 23,52$ kJ/mol) oder Barnase ($\Delta G_{N \rightarrow U} = 39,48$ kJ/mol) (Pace, 1990), zeigt nPTHR eine deutlich verringerte Kooperativität des Übergangs und eine niedrige Freie Stabilisierungsenthalpie $\Delta G_{N \rightarrow U}$.

Durch die Messungen der Stabilität des nPTHR gegenüber Temperatur und Guanidiniumchlorid konnte nachgewiesen werden, daß das rückgefaltete Protein eine stabile Struktur aufweist, die einer kooperativen Entfaltung unterliegt. Diese Struktur ist gegenüber Temperaturdenaturierung genauso stabil wie andere in der Natur vorkommende Proteine, zeigt aber gegenüber chemisch induzierter Denaturierung mit Guanidiniumchlorid im Fern-UV CD bei 220 nm und in der Fluoreszenzemission bei 360 nm (Daten nicht gezeigt) eine verringerte Kooperativität des Übergangs und eine niedrige Freie Stabilisierungsenthalpie.

2.3.5 Analyse des Disulfidbrückenmusters

Zur Bestimmung der Disulfidbrückenverknüpfung des nativen nPTHR wurde ein chymotryptischer Verdau durchgeführt, die disulfidhaltigen Fragmente identifiziert und mittels Edman-Abbau analysiert.

Abbildung 32 zeigt *Reversed Phase* HPLC-Chromatogramme des proteolytischen Verdaus. Die Detektion disulfidbrückenhaltiger Fragmente erfolgte über eine Nachsäulenderivatisierung mit Sulfitolyse der Disulfidbrücken und Detektion der entstandenen Thiolatanionen durch Umsetzung mit DNTB. Somit konnte bei einer Detektionswellenlänge von 432 nm das Reaktionsprodukt NTB, und damit das cysteinhaltige Peptid, identifiziert werden. In einem weiteren HPLC-Lauf wurden die identifizierten disulfidhaltigen Proteinfragmente gesammelt; sie konnten daraufhin N-terminal ansequenziert werden.

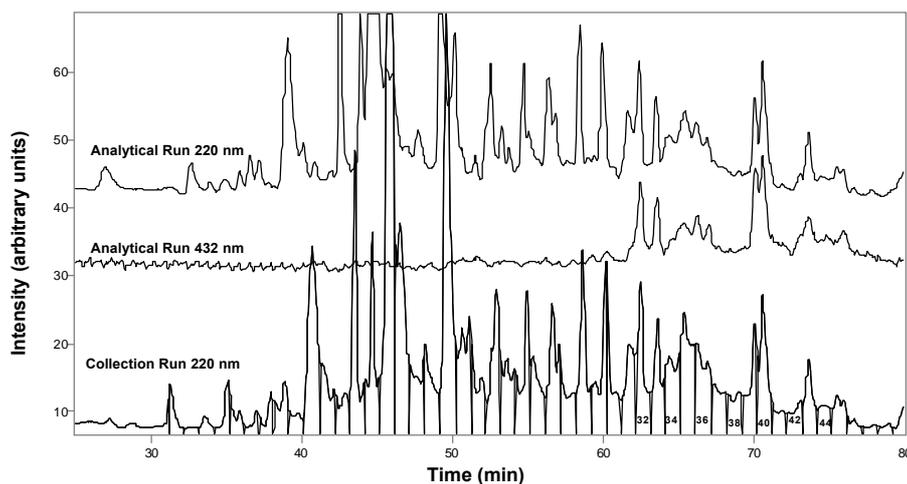


Abb. 32. Disulfidmuster-Analyse des nPTHR. Ein chymotryptischer Verdau des nPTHR wurde mittels RP-HPLC an einer YMC ODS-AQ C 18 Säule bei einer Temperatur von 35 °C aufgetrennt. Der analytische Lauf zeigt die Detektion von Spaltprodukten bei 220 nm vor der Nachsäulenderivatisierung, und bei 432 nm nach der Derivatisierungsreaktion. Das bei 432 nm erhaltene Chromatogramm wurde 10-fach verstärkt, um den Vergleich mit den anderen Läufen zu erleichtern. Die disulfidbrückenhaltigen Fragmente wurden im Sammellauf fraktioniert und mittels automatisiertem Edman-Abbau analysiert.

Fractionen 32 bis 45 wurden 10 bis 13 Abbauzyklen unterzogen; die erhaltenen Aminosäuresequenzen konnten nPTHR zweifelsfrei zugeordnet werden (Tab. 4).

Die beobachteten Spaltstellen stimmen dabei mit der Spezifität von Chymotrypsin (Spaltung bevorzugt C-terminal von aromatischen und hydrophoben Aminosäureseitenketten) überein. Zusätzlich zu den bestimmten Aminosäuresequenzen enthält Tabelle 4 auch die Peptidmenge, die aus den initialen Ausbeuten der korrespondierenden Aminosäuresequenzen abgeschätzt werden konnte.

Fraktion 39 enthielt zwei Peptide vergleichbarer Intensität, die sich in Größe und Hydrophobizität stark unterschieden. Da diese Fraktion zugleich ein starkes Signal bei 432 nm aufwies, konnte aus den Daten eindeutig eine Disulfidbrücke zwischen Cys131 und Cys170 abgeleitet werden. Derselbe Rückschluß konnte für die Peptide aus Fraktion 40 erbracht werden, da die Menge des Peptides mit der Sequenz ALV₂₆... die Menge der beiden anderen Peptide stark überstieg. Zusätzlich kann davon ausgegangen werden, daß dieses Peptid nicht über Leu41 hinausreicht und daher cysteinfrei ist, da die Sequenz ..FLL₄₁.. eine multiple Spaltstelle für Chymotrypsin darstellt.

In den verbliebenen analysierten Fraktionen konnten im Gegensatz zu Fraktion 39 und 40 mehrere cysteinhaltige Peptide detektiert werden. Da die vorliegenden Daten die strukturelle Homogenität des nativen nPTHr (siehe Kapitel 2.3.1) beweisen, lassen sich aber dennoch die Proteinfragmente eindeutig einem einheitlichen Disulfidmuster zuordnen. Neben der Disulfidbrücke zwischen Cys131 und Cys170 befinden sich Disulfidbrücken zwischen Cys48 und Cys117, sowie zwischen Cys106 und Cys146.

Die Interpretation der in Tabelle 4 aufgeführten Daten wird dabei von der Tatsache unterstützt, daß die mittels Edman-Abbau bestimmten Peptidmengen der verschiedenen Peptide der Zuordnung der Disulfidbrücken entsprechen. Zusätzlich stimmen auch die bei 432 nm gemessenen Intensitäten des analytischen HPLC-Laufs mit den Cysteinmengen überein, die durch den Edman-Abbau in den Fraktionen bestimmt werden konnten. Die Abwesenheit freier Thiole in der Proteinprobe konnte darüberhinaus durch einen Ellman's Test nachgewiesen werden; alle Cysteinreste sind demnach miteinander durch Disulfidbrücken verknüpft.

Bei Aufsummierung der zu den Disulfidbrücken zugehörigen Peptidmengen wurden beträchtliche Mengenunterschiede festgestellt (Cys48 – Cys117: 4 pmol; Cys108 – Cys148: 5 pmol; Cys131 – Cys170: 19 pmol). Diese Beobachtung ist jedoch kein Hinweis auf die Existenz weiterer alternativer Disulfidbrücken, da nicht von einer vollständigen Spaltung an allen zur Verfügung stehenden Spaltstellen unter den experimentellen Bedingungen ausgegangen werden kann. So könnten bei limitierter Proteolyse auch größere Komplexe disulfidverbrückter Proteinfragmente auftreten (fehlende Spaltung zwischen Cys108 und Cys117 führt zu Komplexen aus 4 Peptiden, die durch zwei Disulfidbrücken verknüpft sind), die aufgrund ihrer erhöhten Hydrophobizität nur mit schlechter Ausbeute zurückzugewinnen sind.

Tabelle 4. N-terminale Sequenzierung der cyst(e)inehaltigen Fraktionen des HPLC-Sammellaufs (Abb.32). Detaillierte Interpretation der Daten im Text.

Fraktion #	Anzahl der Abbau-Zyklen	nPTHR Aminosäure-Sequenz ¹⁾	Peptid-menge ²⁾ (pmol)	Interpretation ³⁾		
32	10	Y -LVDADD-MT	3	ALVDADDVMT...		
		L -APGEVVAVP Y -E-VKF	1.5 1.5	C ₁₃₁ -C ₁₇₀ Disulfidbrücke zwischen GAPGEVVAVPC ₁₃₁ ... und SEC ₁₇₀ VKF		
		H -AQAQ-E-R L -WPL	2 2	C ₄₈ -C ₁₁₇ Disulfidbrücke zwischen RAQAQC ₄₈ E... und C ₁₁₇ WPL		
33	12	L -APGEVVAVP-P Y -E-VK W -NY-E	3.5 3 0.5	C ₁₃₁ -C ₁₇₀ Disulfidbrücke zwischen GAPGEVVAVPC ₁₃₁ P... und SEC ₁₇₀ VK... oder ANYSEC ₁₇₀ ...		
		34	10	L -APG-VVAVP Y -E—VK	1 1	C ₁₃₁ -C ₁₇₀ Disulfidbrücke zwischen GAPGEVVAVPC ₁₃₁ ... und SEC ₁₇₀ VKF
				Y -GRP-LPE Y -R-DRNGS	1 1	C ₁₀₈ -C ₁₄₈ Disulfidbrücke zwischen RGRPC ₁₀₈ LPE... und RRC ₁₄₈ DRNGS...
Y -LVDADD Y -FNHK	0.5 1			ALVDADD... DFNHK...		
35	12	Y -LVDADDVMTKE Y -GRP-LPE Y -R-DRNGS	2 2 2	ALVDADDVMTKE... C ₁₀₈ -C ₁₄₈ Disulfidbrücke zwischen RGRPC ₁₀₈ LPE... und RRC ₁₄₈ DRNGS... C ₁₃₁ -C ₁₇₀ Disulfidbrücke zwischen GAPGEVVAVPC ₁₃₁ ... und SEC ₁₇₀ VKF		
		L --PG-V-A Y -E—KF	0.5 0.5			
		36	10	V -VP-PDYIY Y -E-VKF	1.5 1.5	C ₁₃₁ -C ₁₇₀ Disulfidbrücke zwischen AVPC ₁₃₁ PDYIY... und SEC ₁₇₀ VKF
Y -GRP-LPE-D Y -R-DRNGS	2 2			C ₁₀₈ -C ₁₄₈ Disulfidbrücke zwischen RGRPC ₁₀₈ LPEWD... und RRC ₁₄₈ DRNGS...		
39	12			L -APGEVVAVP-P Y -E-VKF	4 4	C ₁₃₁ -C ₁₇₀ Disulfidbrücke zwischen GAPGEVVAVPC ₁₃₁ P... und SEC ₁₇₀ VKF
		40	12	L --PGEVVAVP-P Y -E—VKF	4 4	C ₁₃₁ -C ₁₇₀ Disulfidbrücke zwischen GAPGEVVAVPC ₁₃₁ P... und SEC ₁₇₀ VKF
				Y -LVDADDVMTKE	8	ALVDADDVMTKE...
43	13			L --PGEVVAVP-PD Y -E-VKF L -WPLGAPGE-VAV	1.5 2.5 1	C ₁₃₁ -C ₁₇₀ Disulfidbrücke zwischen SEC ₁₇₀ VKF und GAPGEVVAVPC ₁₃₁ PD... oder C ₁₁₇ WPLGAPGEVVAVPC ₁₃₁ ..., keine Detektion von Peptiden mit Cys48
		45	10	L --PGEVVAVP Y -E-VKF L -WPLGAPGE-	1.5 2.5 1	C ₁₃₁ -C ₁₇₀ Disulfidbrücke zwischen SEC ₁₇₀ VKF und GAPGEVVAVPC ₁₃₁ ... oder C ₁₁₇ WPLGAPGEVVAVPC ₁₃₁ ..., keine Detektion von Peptiden mit Cys48

¹⁾ -: Aminosäurebestimmung aufgrund von starkem Hintergrund nicht möglich, Übertragung von vorangegangenem Zyklus, Anwesenheit einer Aminosäure mit niedriger Detektionseffizienz oder Anwesenheit eines Cysteinrestes

²⁾ X|: X bezeichnet die der Sequenz vorangegangene Aminosäure
abgeschätzt von der Ausbeute an korrespondierender Aminosäuresequenz, Ziffern in Fettdruck entsprechen den disulfidverbrückten Peptiden

³⁾ ...: kein definierter C-Terminus durch die Sequenzierungsergebnisse

2.4 Ligandenbindung des renaturierten nPTHr an PTH

Nachdem gezeigt werden konnte, daß nPTHr zu einer strukturierten, stabilen Proteindomäne renaturiert werden kann, wurde die molekulare Wechselwirkung dieses extrazellulären Rezeptorfragments des humanen PTH-Rezeptors mit PTH untersucht.

2.4.1 Bindungsspezifität und Bindungsstärke

2.4.1.1 Quervernetzung von nPTHr mit PTH

Um eine qualitative Aussage über Ligandenbindung und Bindungsspezifität zu erhalten wurde ein Quervernetzungsexperiment mit dem bifunktionellen *cross-linking* Agens Glutaraldehyd, das Lysin-Seitenketten kovalent miteinander verknüpft, durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (Abb. 33).

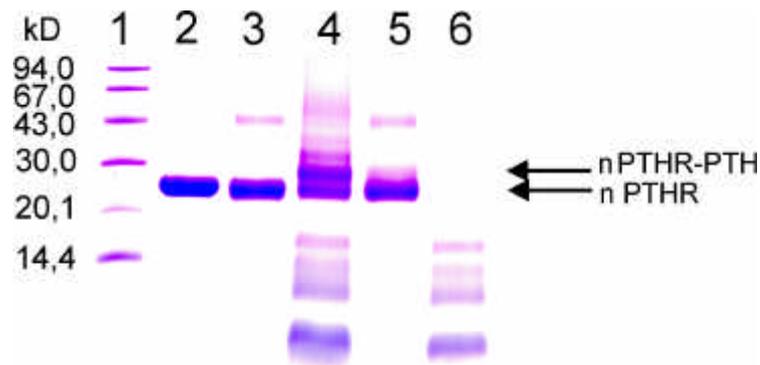


Abb. 33. Quervernetzungsexperiment mit Glutaraldehyd. Jeweils 1 μ M nPTHr in 50 mM Na-Phosphat; 300 mM NaCl; pH 8 wurde mit 10 μ M PTH oder 10 μ M Insulin in Anwesenheit von 40 mM Glutaraldehyd für 20 min bei 4 °C inkubiert. Weitere Kontrollreaktionen wurden mit nPTHr (1 μ M) und PTH (10 μ M) in 50 mM Na-Phosphat; 300 mM NaCl; pH 8 jeweils einzeln durchgeführt. Zu den Reaktionsansätzen wurde 43 mM Natriumborhydrid zugegeben, nach TCA-Fällung wurden die Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf einem 12 %-igen Tricingel analysiert. Bahn 1: Molekularmassenstandard; Bahn 2: nPTHr ohne Glutaraldehyd; Bahn 3: nPTHr mit Quervernetzer; Bahn 4: nPTHr und PTH mit Glutaraldehyd; Bahn 5: nPTHr und Insulin mit Glutaraldehyd; Bahn 6: PTH mit Glutaraldehyd.

Es konnte ein spezifisches Vernetzungsprodukt von nPTHr und PTH identifiziert werden, dessen apparentes Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamidgel im Vergleich zu nPTHr um ca. 4 kD erhöht war. Mit einem Molekulargewicht des PTH von 4,4 kD entspricht dieser Massenzuwachs der Ausbildung eines nPTHr-PTH-Komplexes. Kontrollreaktionen mit dem Peptidhormon Insulin und nPTHr, sowie mit PTH bzw. nPTHr alleine, zeigten keinerlei Bande in diesem Molekularmassenbereich.

2.4.1.2 Oberflächenplasmonresonanz

Zur Quantifizierung der Bindung des PTH-Liganden an nPTH_R, wurden Bindungsmessungen mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanz in einem BIACoreX-System (Biacore AB, Freiburg) durchgeführt. Dazu wurde C-terminal mit einem Cysteinrest modifiziertes PTH mittels Thiolkopplung kovalent auf einem Sensorchip immobilisiert. Das erhaltene Meßsignal bei Injektion einer nPTH_R-Lösung in das Flußsystem des PTH-Sensorchips korreliert mit der Massenzunahme auf der Sensorchip-Oberfläche und somit mit der Wechselwirkung von nPTH_R mit dem immobilisierten Bindungspartner.

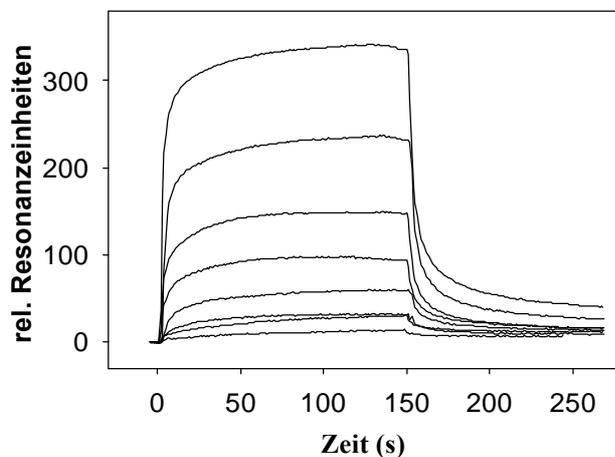


Abb. 34. Sensorgramme der Bindung des nPTH_R an den PTH-Sensorchip. Bindungsreaktionen wurden bei einer Flußrate von 20 µl/min in 0,05 M Tris/HCl; 100 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; pH 7,5 bei einer Temperatur von 20 °C detektiert. Auf der Sensorchip-Oberfläche wurden 100 Resonanzeinheiten PTH immobilisiert. Dargestellt ist der Verlauf der Resonanzsignale nach Injektionen unterschiedlicher Konzentrationen an nPTH_R bei t_0 (von unten nach oben: 0,0615 µM; 0,123 µM; 0,25 µM; 0,49 µM; 0,981 µM; 1,962 µM; 3,925 µM und 7,85 µM).

Abbildung 34 zeigt ein Bindungsexperiment, bei dem unterschiedliche Konzentrationen von nPTH_R über die Sensorchip-Oberfläche geleitet wurden. Die Spezifität der Bindung wurde durch die Injektion eines anderen Proteins, dem N-terminalen Fragment des GLP1-Rezeptors, überprüft. Es konnte keine unspezifische Wechselwirkung dieses Proteins mit dem PTH-Sensorchip festgestellt werden. Die Auswertung der Bindungsdaten erfolgte mittels Auftragung der Resonanzsignale nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts gegen die Konzentration des eingesetzten nPTH_R (Abb. 35) durch nichtlineare Regression. Unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie konnte eine Dissoziationskonstante von $4,9 \pm 0,68$ µM bestimmt werden.

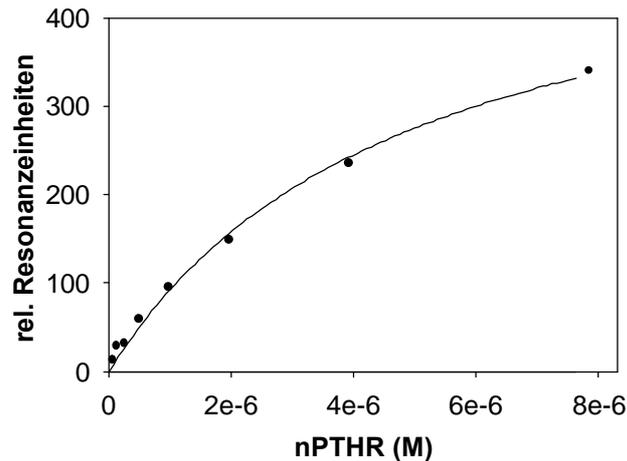


Abb. 35. Gleichgewichts-Bindungsexperiment am PTH-Sensorchip. Die gemessenen Resonanzsignale der Bindungsgleichgewichte wurden gegen die nPTHr-Konzentration aufgetragen (●) und mit Hilfe des Programms BIAevaluation 3.0 (Biacore AB, Freiburg) gemäß der Langmuir-Bindungsisotherme ausgewertet (—). Unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie ergab sich eine Dissoziationskonstante von $4,9 \pm 0,68 \mu\text{M}$.

Zur Überprüfung dieser Dissoziationskonstante wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an PTH mit nPTHr vorinkubiert und daraufhin auf Bindung an die Sensorchipoberfläche getestet. Mit steigender Konzentration an freiem PTH konnte eine Abnahme der Bindung an den Sensorchip festgestellt werden (Abb. 36). Die Auswertung der Konkurrenzdaten ergab hierbei eine Dissoziationskonstante von $3,4 \pm 0,33 \mu\text{M}$.

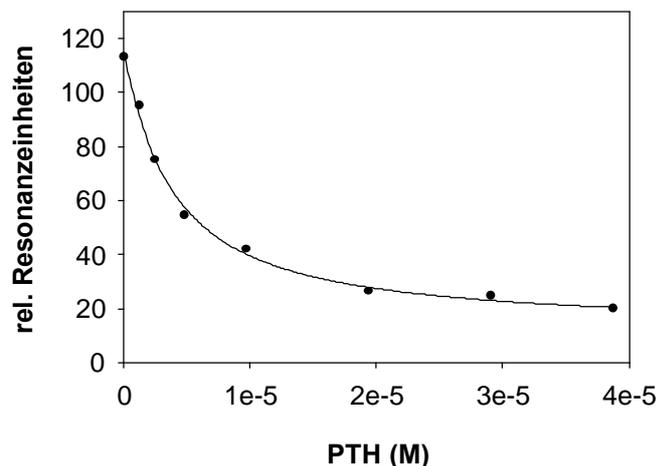


Abb. 36. Konkurrenzexperiment am PTH-Sensorchip. Unterschiedliche Konzentrationen an freiem PTH-Liganden wurden mit $1 \mu\text{M}$ nPTHr in $0,05 \text{ M}$ Tris/HCl; 100 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; pH 7,5 bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ vorinkubiert. Daraufhin wurde die Bindung an den PTH-Sensorchip bestimmt. Eine Auswertung der gegen die Konzentration an freiem PTH aufgetragenen Resonanzsignale im Bindungsgleichgewicht (●) mittels nichtlinearer Regression (-) ergab eine Dissoziationskonstante von $3,4 \pm 0,33 \mu\text{M}$.

Die Unterschiede der bestimmten Dissoziationskonstanten beider Experimenten sind sehr gering. Die leicht verringerte Bindungsaffinität im Gleichgewichts-Bindungsexperiment könnte

durch eine Einschränkung der Beweglichkeit des immobilisierten PTH-Liganden verursacht worden sein.

2.4.1.3 Isothermale Titrationskalorimetrie

Da die Bindungsexperimente mittels Oberflächenplasmonresonanz die Immobilisierung eines Bindungspartners erfordern und damit eine Beeinflussung der Bindungsreaktion einhergehen kann, wurde Isothermale Titrationskalorimetrie als weitere Methode gewählt, um quantitativ die Bindung von nPTHR an PTH in Lösung zu messen.

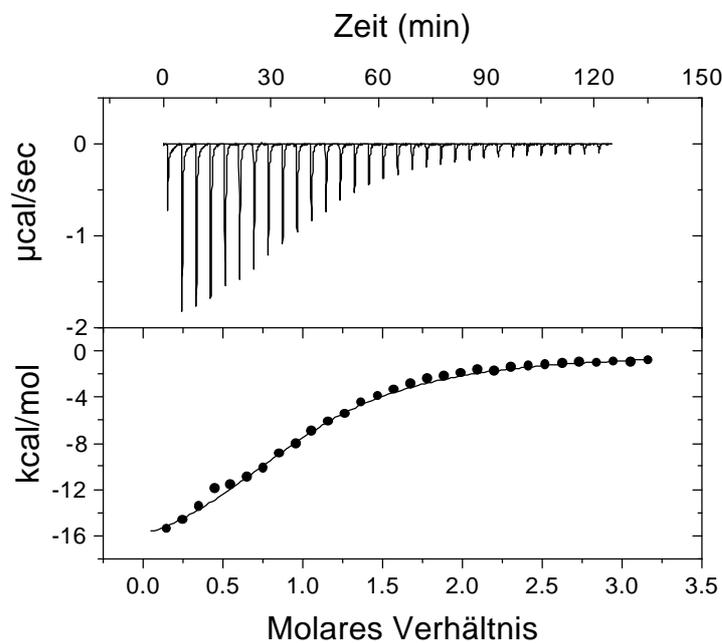


Abb. 37. Isothermale Titrationskalorimetrie von PTH zu nPTHR. Es wurden $23 \mu\text{M}$ nPTHR in $0,05 \text{ M}$ Tris/HCl; 100 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM CaCl_2 ; 2 mM MgCl_2 ; pH 7,5 vorgelegt und mit einer $780 \mu\text{M}$ Lösung an PTH in der Titrationsspritze in $6 \mu\text{l}$ Titrationsschritten bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Sättigung in einem Microcal MCS Titrationskalorimeter (MicroCal, Northampton, USA) titriert. Für Protein-, wie Ligandenlösung wurden identische Puffer verwendet. Die Injektionsgeschwindigkeit betrug ca. $1 \mu\text{l/s}$, die Integrationszeit 2 s , nach jeder Injektion wurde 4 min das Erreichen der Basislinie abgewartet. Die Datenauswertung fand mit Hilfe von MicroCal Origin für ITC Version 2.9 statt. Oben: basislinienkorrigierter Wärmeumsatz der Titrationsschritte in $\mu\text{cal/s}$; Unten: flächenintegrierte und konzentrationsnormalisierte Enthalpieänderung in Abhängigkeit der molaren PTH/nPTHR-Verhältnisse. Die durchgezogene Linie stellt den Kurvenangleich an die experimentellen Daten dar.

Abbildung 37 zeigt ein typisches Titrationsexperiment und dessen Auswertung. Da die Heizleistung an der Referenzzelle nach Injektion von PTH zu nPTHR abgesenkt werden musste, um isotherme Bedingungen aufrecht zu erhalten, ist die Bindung von PTH an nPTHR exotherm. Die am Ende der Titration abgegebenen Wärmemengen stellen die Verdünnungswärme von PTH dar. Dies wurde durch eine Kontrolltitration von PTH zu einer proteinfreien Pufferlösung

bestätigt. Die Analyse dreier unabhängiger Messungen ergab in Übereinstimmung mit dem Konkurrenzexperiment mittels Oberflächenplasmonresonanz eine Dissoziationskonstante K_d von $3,4 \pm 0,98 \mu\text{M}$.

Die Messung der bei Bindungsreaktionen ausgetauschten Wärmemengen erlaubt eine Bestimmung weiterer thermodynamischer Bindungsparameter (Jelesarov & Bosshard, 1999). In Tab. 5 sind die Werte für die Freie Bindungsenthalpie ΔG_{ITC} , die apparente Bindungsenthalpie ΔH_{ITC} , die apparente Bindungsentropie ΔS_{ITC} , sowie die Stöchiometrie N der Bindung von nPTHR an PTH bei 20 °C zusammengefasst.

Tab. 5. Thermodynamische Parameter der Bindung von PTH an nPTHR bei 20 °C in 50 mM Tris/Saline pH 7,5

$\Delta G_{\text{ITC}}^{1)}$	$- 30,6 \times 10^3 \text{ J/mol}$
ΔH_{ITC}	$- 68,4 \times 10^3 \pm 7 \times 10^3 \text{ J/mol}$
$\Delta S_{\text{ITC}}^{2)}$	$- 129 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
N	$1,04 \pm 0,06$

1.) Berechnung der app. Freien Bindungsenthalpie über $\Delta G = - RT \ln K_a$

2.) Berechnung der app. Bindungsentropie über die Gibbsgleichung, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

Die Bindungsreaktion ist enthalpiegetrieben mit einer apparenten Bindungsenthalpie von $- 68,4 \text{ kJ/mol}$; die Änderung der apparenten Entropie, ΔS_{ITC} , ist negativ. Der ΔS_{ITC} -Wert von $- 129 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ kann zum einen eine Verringerung konformationeller Freiheitsgrade eines oder beider Bindungspartner im Komplex bedeuten, zum anderen auf eine Strukturierung von Wassermolekülen im Komplex (Bhat *et al.*, 1994) hinweisen. Die Stöchiometrie N von 1,04 ist bei einer 1:1-Stöchiometrie der Bindungspartner der Nachweis, daß rückgefalteter nPTHR keine inaktiven Teilpopulationen beinhaltet.

2.4.1.4 Einfluß des His-tags auf die Bindung

Durch die Klonierungsstrategie waren an den N-Terminus von nPTHR zu Reinigungszwecken ein *His-tag*, bestehend aus 6 Histidinseitenketten, und weitere 14 Aminosäuren als Verbindungsstück angefügt worden. Der Einfluß dieser zusätzlichen 20 Aminosäureseitenketten am nPTHR auf die Bindung von PTH wurde nach Thrombinspaltung durch Bindungsmessungen mittels Oberflächenplasmonresonanz überprüft.

In Abb. 38 ist ein Vergleich der Bindung des nPTHR mit der Bindung des thrombingespaltenen nPTHR an einen PTH-Sensorchip dargestellt.

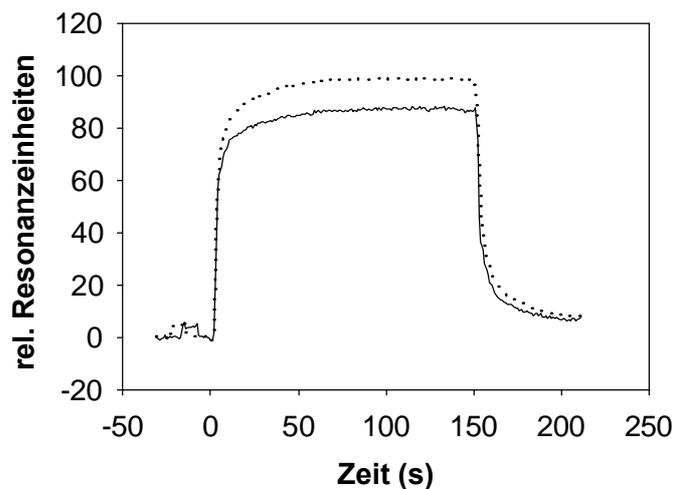


Abb. 38. Vergleich der Bindung an einen PTH-Sensorchip von nPTH und nPTH ohne His-tag. Sensorgramme mit einer Injektion von jeweils $13 \mu\text{M}$ nPTH (····) und nPTH ohne His-tag (—) bei t_0 wurden bei einer Flußrate von $20 \mu\text{l}/\text{min}$ und bei einer Temperatur von 20°C aufgenommen.

Der Kurvenverlauf ist bei gleicher molarer Konzentration der beiden nPTH-Spezies identisch, das Resonanzsignal nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts ist für den thrombingespalteten nPTH um ca. 12 Resonanzeinheiten (ca. 10 % des Signals) vermindert. Diese Signalminderung trägt der verminderten Masse des thrombingespalteten nPTH (19,34 kD im Vergleich zu 21,5 kD) Rechnung. Damit konnte bewiesen werden, daß die 20 Aminosäuren lange Extension am N-Terminus des nPTH keinen Einfluß auf die Bindung des PTH-Liganden besitzt. In weiteren Experimenten wurde deshalb auf eine Abspaltung des *tags* verzichtet.

2.4.2 Stabilität und Struktur des nPTH-PTH-Komplexes

2.4.2.1 Spektroskopische Charakterisierung

Der Einfluß der Ligandenbindung auf Sekundär- und Tertiärstruktur des nPTH wurde mittels Fern-UV CD-Messungen und Fluoreszenzspektroskopie untersucht.

Abbildung 39 zeigt Fern-UV CD-Spektren von nPTH, PTH und dem Komplex aus nPTH und PTH im Wellenlängenbereich von 195 nm bis 260 nm. Es wurden für die Messungen Konzentrationen von nPTH und PTH gewählt, die gemäß der Dissoziationskonstante von 3 bis $5 \mu\text{M}$ den Komplex zu $\geq 80\%$ populieren. PTH als Peptidhormon mit definierter Sekundärstruktur in Lösung (Marx *et al.*, 1995) weist ein eigenes CD-Spektrum auf, das im Kurvenverlauf dem des nPTH ähnelt. Es konnte eine geringe Änderung der Sekundärstruktur

der beiden Bindungspartner bei Ausbildung des nPTH-PTH-Komplexes festgestellt werden, die auf eine Strukturinduktion bei Bindung hindeuten könnte.

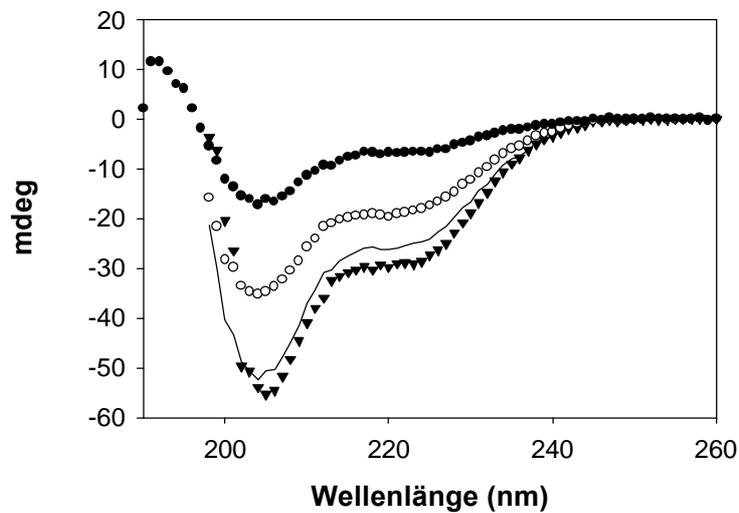


Abb. 39. Fern-UV CD-Spektren von nPTH, PTH und nPTH-PTH-Komplex. Fern-UV CD-Spektren von 6,3 μM nPTH (\bullet) und 50 μM PTH (o) in 0,05 M Na-Phosphat; 150 mM NaCl; pH 7,5 wurden einzeln und nach Ausbildung des nPTH-PTH-Komplexes (\blacktriangledown) aufgenommen. Die Messungen wurden bei 20 $^{\circ}\text{C}$ in 0,5 cm Küvetten bei einer Integrationszeit von 7 s und einer Bandweite von 1 nm 10 fach akkumuliert. Die Messdaten sind pufferkorrigiert, wurden aber zum leichteren Vergleich nicht normiert. Die durchgezogene Linie zeigt die rechnerische Aufsummierung der Spektren von nPTH und PTH.

Abbildung 40 zeigt Fluoreszenzemissionsspektren von nPTH, PTH und des nPTH-PTH-Komplexes. Es ist eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums des Komplexes nach Anregung bei 275 nm zu erkennen. nPTH besitzt ein Emissionsmaximum bei 346 nm, der Komplex weist ein Maximum bei 352 nm auf. Da auch PTH eine Tryptophanseitenketten besitzt (Emissionsmaximum bei 353 nm), konnte die Signaländerung im Komplex keinem der beiden Bindungspartner zugeordnet werden. Die rechnerische Aufsummierung der beiden Einzelspezies ergab ein Spektrum, das eine höhere Fluoreszenzintensität als das tatsächlich gemessene Spektrum des Komplexes aufweist und ein Emissionsmaximum bei ca. 354 nm besaß. Dies ist ein Anzeichen dafür, daß ein oder mehrere Fluorophore der beiden Bindungspartner bei Ausbildung des Komplexes eine Umgebungsänderung erfahren. Zum einen kann dies allein durch die bimolekulare Wechselwirkung bewirkt werden, zum anderen aber auch auf eine Änderung der Tertiärstruktur bei Ausbildung des Komplexes hindeuten.

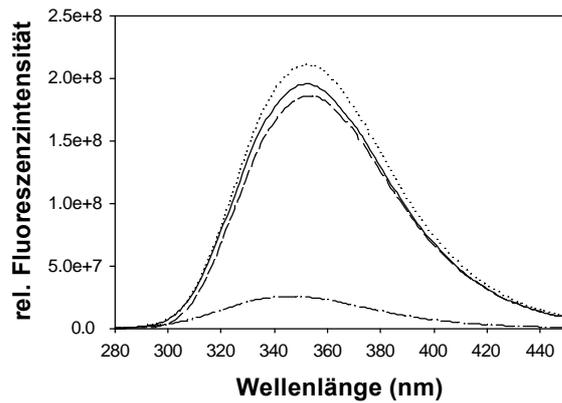


Abb. 40. Emissionsfluoreszenzspektren von nPTHR, PTH und Komplex. Emissionspektren von $1,2 \mu\text{M}$ nPTHR (\cdots), $20 \mu\text{M}$ PTH (—), sowie $1,2 \mu\text{M}$ nPTHR und $20 \mu\text{M}$ PTH (---) in $0,05 \text{ M}$ Na-Phosphat; 100 mM NaCl; pH 7,5 wurden bei einer Anregungswellenlänge von 275 nm bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ mit einer Zeitkonstante von $0,2 \text{ s}$ an einem an einem Fluoromax-2 Spektrofluorimeter (SPEX Instruments S. A., Inc., Edison, NJ, USA) in 1 cm Küvetten zehnfach akkumuliert. Die gepunktete Linie stellt die rechnerische Aufsummierung des nPTHR- und des PTH-Spektrums dar.

2.4.2.2 Stabilität gegenüber Temperatur und Guanidiniumchlorid

Zur Untersuchung der Stabilität des nPTHR-PTH-Komplexes gegenüber Temperatur und Guanidiniumchlorid wurden kalorimetrische und spektroskopische Messungen durchgeführt.

Die Messung der Fluoreszenzemission des Komplexes in Abhängigkeit von der Temperatur ergab keinen Unterschied zur Messung des freien nPTHR. Auch hier konnte eine nahezu lineare Abnahme des Fluoreszenzsignals mit Erhöhung der Temperatur festgestellt werden; ein temperaturinduzierter Dissoziations-, oder Entfaltungsschritt war nicht detektierbar.

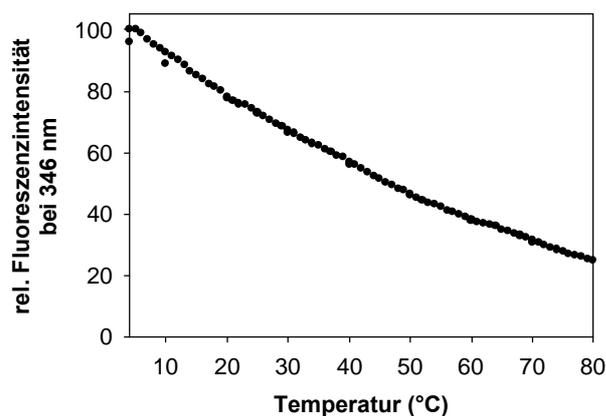


Abb. 41. Fluoreszenz-Temperaturübergang des nPTHR-PTH-Komplexes. Die Fluoreszenzemission bei 340 nm (Anregungswellenlänge 270 nm) von $1,0 \mu\text{M}$ nPTHR und $10 \mu\text{M}$ PTH in $0,05 \text{ M}$ Na-Phosphat; pH 7,5 wurde in einer 1 cm Küvette an einem Hitachi F-4500 Spektrofluorimeter (Hitachi, Tokyo, Japan) in Abhängigkeit von der Temperatur detektiert. Dazu wurde das von L. Waldmann entwickelte Programm FTL.M.BAS (Waldmann, 1998) verwendet. Nach Erhitzen auf $80 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Probe in $10 \text{ }^\circ\text{C}$ -Schritten wieder auf die Ausgangstemperatur von $4 \text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt.

Eine Stabilisierung des ligandengebundenen nPTHr im Vergleich zu freiem nPTHr konnte auch mittels *Differential-Scanning* Kalorimetrie nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 42 zeigt DSC-Messungen von nPTHr in An-, und Abwesenheit eines Überschusses an PTH in Abhängigkeit von der Temperatur. Zudem sind die Wärmekapazitätsdifferenzen der Pufferlösung und einer PTH-Lösung zu Vergleichszwecken abgebildet. Die Denaturierung von nPTHr fand unter diesen Bedingungen in einem Temperaturintervall von ca. 50 °C bis 70 °C mit einem Übergangsmittelpunkt bei 62 °C statt. Eine Stabilisierung von nPTHr bzw. PTH durch die Komplexbildung konnte hiermit nicht nachgewiesen werden.

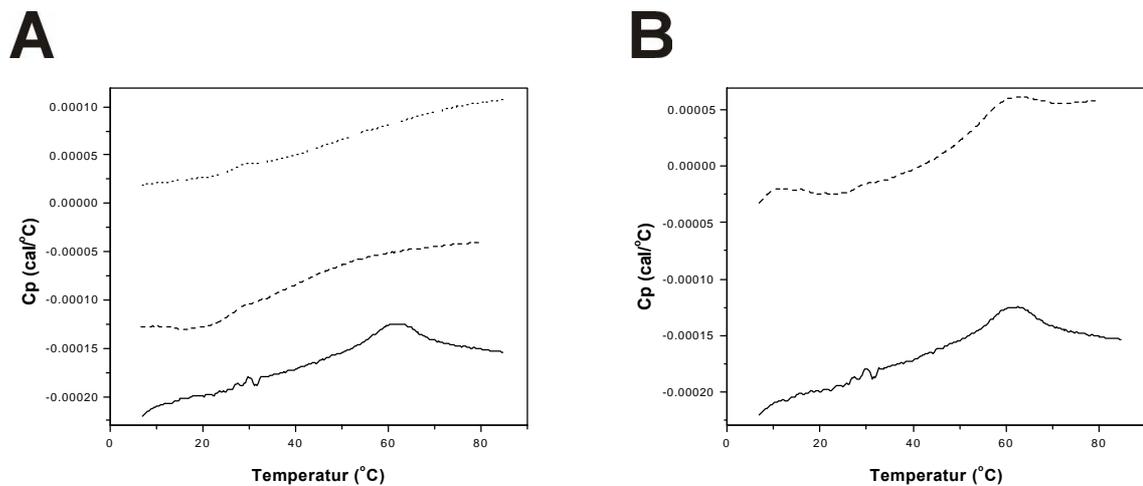


Abb. 42. Thermogramme von nPTHr, Puffer, PTH und nPTHr unter Zugabe von PTH. Messungen der Wärmekapazität von 13,2 μ M nPTHr, 337 mM PTH, einer Mischung beider Spezies in denselben Konzentrationen und einer Pufferlösung wurden in einem VP-DSC Mikrokalorimeter (MicroCal, Inc., Northampton, USA) mit einer Aufheizrate von 60 °C/h durchgeführt. Alle Messungen fanden in 0,05 M Na-Phosphat; 0,2 M NaCl; pH 7,5 statt. A: Thermogramme von Pufferlösung (···), PTH (--) und Mischung aus nPTHr und PTH (—). B: Thermogramme von nPTHr (···) und nPTHr unter Zugabe von PTH (—).

Es muß davon ausgegangen werden, daß schon bei einer Temperatur unterhalb 50 °C eine Dissoziation der Bindungspartner auftrat. Dennoch konnte kein distinkter Entfaltungübergang für Parathormon bei niedrigeren Temperaturen festgestellt werden. Da die Sekundärstruktur des PTH-Peptids nur aus 1 bis 2 α -Helices besteht, war jedoch anzunehmen, daß dieses Struktur keine kooperative Änderung der Wärmekapazität bei Entfaltung zeigen würde. Dies wurde durch die kalorimetrische Messung des freien PTH-Liganden (Abb. 42a) bestätigt.

Die Temperaturdenaturierung des freien nPTHr fand in einem etwas größeren Temperaturintervall statt als die des nPTHr unter Zugabe von PTH. Außerdem sind die Anstiege der Basislinien leicht unterschiedlich (Abb. 42b). Dies könnte auf konformationelle Änderungen und/oder Dissoziation des Komplexes im Temperaturbereich vor der

Denaturierung des nPTHr zurückzuführen sein. Bei Auswertung der Kurvenfläche des Thermogramms des Komplexes nach Basislinienkorrektur und Normalisierung auf die nPTHr-Konzentration konnte eine Entfaltungsenthalpie ΔH_U von 210 kJ/mol bestimmt werden. Diese stimmt im Rahmen der Genauigkeit der Auswertungsprozedur mit der Entfaltungsenthalpie ΔH_U für freien nPTHr von 217 kJ/mol überein.

Auch Messungen chemisch induzierter Entfaltungs- und Rückfaltungsübergängen im Fern-UV CD bei 220 nm ergaben keine Stabilisierung des Komplexes gegenüber freiem nPTHr (Daten nicht gezeigt).

Unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen war demnach keine zusätzliche Stabilisierung des ligandengebundenen nPTHr gegenüber temperaturinduzierter und Guanidiniumchlorid-induzierter Entfaltung zu verzeichnen. Dies ist im Zusammenhang mit der mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie bestimmten Freien Bindungsenthalpie ΔG_{ITC} von $-30,6 \times 10^3$ J/mol, die sich im Bereich der Freien Stabilisierungsenthalpien monomerer Proteine befindet (Pace, 1990), überraschend. Das Fehlen eines stabilisierenden Einflusses des PTH-Liganden auf nPTHr ist jedoch im Einklang mit den Ergebnissen aus Kapitel 2.4.2.1, in dem weder ausgeprägte Änderungen der Sekundärstruktur, noch der Tertiärstruktur des nPTHr bei Bindung an PTH festgestellt werden konnten. Es kann davon ausgegangen werden, daß die Dissoziation der beiden Bindungspartner der Denaturierung des nPTHr vorausging, und daß dies unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen nicht detektierbar war.

2.4.3 Molekulare Wechselwirkungen zwischen nPTHR und PTH

2.4.3.1 Temperaturabhängigkeit der Bindung und ΔC_p

Die Messungen der apparenten Bindungsenthalpie in Abhängigkeit von der Temperatur durch Isothermale Titrationskalorimetrie liefert die Änderung der Wärmekapazität bei Bindung gemäß $\Delta C_p = \Delta H/dT$ (Jelesarov & Bosshard, 1999). Abbildung 43 zeigt die erhaltenen apparenten Bindungsenthalpien, ΔH_{ITC} , in Abhängigkeit von der Temperatur. Durch lineare Regression wurde ΔC_p zu $-1,715 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ bestimmt.

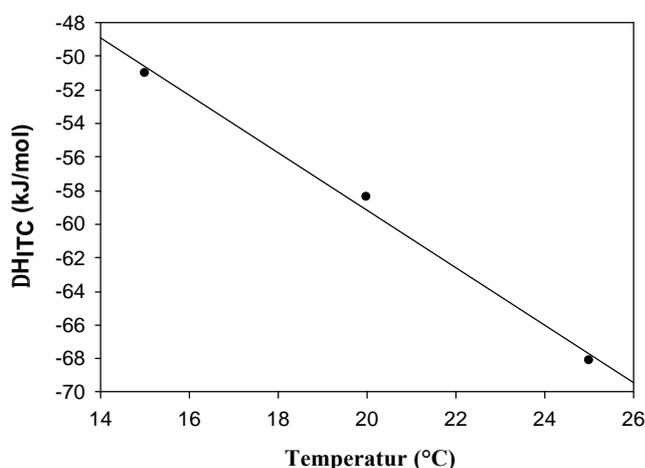


Abb. 43.. Bestimmung der Wärmekapazität ΔC_p bei Bindung von nPTHR an PTH. Isothermale Titrations von PTH zu nPTHR wurden bei den angegebenen Temperaturen in 0,05 M Na-Phosphat; 100 mM NaCl; pH 7,0 in einem Microcal MCS Titrationskalorimeter (MicroCal, Northampton, USA) durchgeführt. Die Bestimmung der apparenten Bindungsenthalpien fand mit Hilfe des Programms MicroCal Origin für ITC Version 2.9 statt. Über lineare Regression der gegen die Temperatur aufgetragenen app. Bindungsenthalpien (—) wurde ein ΔC_p -Wert von $-1,715 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ermittelt.

ΔC_p ist im allgemeinen bei Bindungsreaktionen negativ, wenn vom Komplex als Referenzzustand ausgegangen wird (Jelesarov & Bosshard, 1999). Auch hier besitzt der Komplex aus nPTHR und PTH eine niedrigere Wärmekapazität als die Summe der freien Komponenten. Ein ΔC_p -Wert von ca. $-1,715 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ kann als typisch für Protein-Peptid-Interaktionen (Murphy *et al.*, 1993; Mandiyan *et al.*, 1996) angesehen werden. ΔC_p -Werte einer Bindungsreaktion können annäherungsweise mit der unpolaren Fläche ΔA_{np} , die bei Komplexbildung bedeckt wird, gemäß der Beziehung $\Delta A_{np} = -3,6 (\pm 0,6) \times \Delta C_p$, korreliert werden (Livingstone *et al.*, 1991). Eine Abschätzung von ΔA_{np} für die Bindung von PTH an nPTHR ergab eine Fläche zwischen 1230 \AA^2 und 1722 \AA^2 .

Ein Vergleich der durch Oberflächenplasmonresonanz und ITC bestimmten Dissoziationskonstanten mit steigender Temperatur zeigt zum einen die gute Übereinstimmung der aus zwei unabhängigen Methoden erhaltenen Werte, zum anderen, daß mit steigender Temperatur die Bindungsaffinität zu Parathormon leicht abnimmt (Tab. 6).

Tab. 6. Vergleich der Dissoziationskonstanten aus Oberflächenplasmonresonanz-Bindungsmessungen und Isothermaler Titrationskalorimetrie. Dissoziationskonstanten wurden in 0,05 M Na-Phosphat; 100 mM NaCl; pH 7,0, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, bestimmt.

Oberflächenplasmonresonanz		Isothermale Titrationskalorimetrie	
Meßtemperatur	K_d	Meßtemperatur	K_d
5 °C	5,2 μ M	15 °C	3,1 μ M
10 °C	7,3 μ M	20 °C	3,4 μ M
20 °C	9,5 μ M	25 °C	5,3 μ M
30 °C	12,4 μ M		
37 °C	13,4 μ M		
40 °C	22,1 μ M		

2.4.3.2 Salzabhängigkeit und pH-Abhängigkeit der Bindung

Die Abhängigkeit der Komplexbildung von nPTHr und PTH von der NaCl-Konzentration wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz in einem Bereich von 0 M bis 1 M NaCl überprüft. Es konnte keine signifikante Beeinflussung der Bindungsstärke mit zunehmender NaCl-Konzentration festgestellt werden (Tab. 7). Dies weist darauf hin, daß ionische Wechselwirkungen bei der Bindung des PTH-Liganden an den nPTHr nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Tab. 7. Salzabhängigkeit der Dissoziationskonstante. Dissoziationskonstanten wurden in 0,05 M Na-Phosphat; pH 7,5 und den angegebenen NaCl-Konzentrationen durch Messung der Bindung jeweils 6 verschiedenener Konzentrationen nPTHr an einen PTH-Sensorchip über Oberflächenplasmonresonanz bei 20 °C bestimmt.

NaCl-Konzentration im Meßpuffer (0,05 M Na-Phosphat; pH 7,5)	Dissoziationskonstante K_d
0 M	4,7 μ M
0,3 M	5,4 μ M
0,5 M	9,1 μ M
1 M	6,9 μ M

Ligandenbindung weist bei Proteinen oftmals eine Abhängigkeit der Bindungsaffinität vom pH-Wert auf, und spiegelt damit den Zusammenhang zwischen Ligandenbindung und Änderung des pK_a -Werts einer ionisierbaren Gruppe im Proteinmolekül wider (Baker & Murphy, 1996). Sowohl nPTHHR als auch PTH besitzen solch ionisierbare Seitenketten.

Die Messung der pH-Abhängigkeit der Bindung beider Moleküle mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie ergab im pH-Bereich zwischen pH 5,19 und pH 8,94 keine ausgeprägte Änderung der Bindungsaffinität (Tab. 8).

Tab. 8. pH-Abhängigkeit der Dissoziationskonstante. Dissoziationskonstanten wurden durch Isothermale Titration bei 20 °C bestimmt. Dazu wurden 25 bis 30 μM nPTHHR vorgelegt und mit einer 700 bis 800 μM Lösung an PTH in der Titrationsspritze in bis 8 μl Titrationsschritten bis zur Sättigung titriert. PTH und nPTHHR wurden gegen die jeweiligen Puffer dialysiert, der genaue pH-Wert beider Lösungen wurde vor der Messung bestimmt.

pH-Wert der Meßlösung	Dissoziationskonstante K_d
8,94 ^{1.)}	2,95 μM
7,50 ^{1.)}	3,42 μM
6,86 ^{2.)}	1,77 μM
6,63 ^{2.)}	5,92 μM
5,19 ^{3.)}	4,27 μM

1.) 0,05 M Na-Phosphat; 0,3 M NaCl

2.) 0,1 M Tris/HCl; 0,3 M NaCl

3.) 0,1 M Citrat; 0,3 M NaCl

Ab einem pH-Wert von pH 4,5 konnte keine Bindung mehr nachgewiesen werden. Die fehlende pH-Abhängigkeit zwischen pH 5 und pH 9 könnte einerseits darauf hindeuten, daß die pK_a -Verschiebungen nur sehr gering, und dadurch schwierig zu detektieren sind, andererseits ihr völliges Ausbleiben andeuten. Unterhalb von pH 4,5 könnte einsetzende Säuredenaturierung des nPTHHR und seines Liganden für die fehlende Bindung verantwortlich sein. Fern-UV CD-Spektren (s. Kapitel 2.3.2) zeigten jedoch eine intakte Sekundärstruktur des nPTHHR bis pH 4,0. Auch die Sekundärstruktur des Parathyroidhormon blieb bis zu einem pH-Wert von 2,5 unverändert. Das Maximum der Fluoreszenzemission von nPTHHR bei 346 nm und von PTH bei 353 nm zeigte keine Verschiebung bei Absenkung des pH-Werts auf pH 4. Eine Änderung der Tertiärstruktur konnte nicht festgestellt werden. Somit scheint die Aufhebung der Wechselwirkung zwischen nPTHHR und PTH ab einem pH-Wert von 4,5 der Protonierung geladener Aspartat- und Glutamatseitenkette oder aber einer geringen mit den verwendeten spektroskopischen Methoden nicht detektierbaren Strukturänderung zuzuschreiben sein.

2.4.3.3 Bindung als Protonenübertragungsreaktion

Die Anzahl der Protonen, n_{H^+} , die während einer Bindungsreaktion mit dem Lösungsmittel ausgetauscht werden können, lassen sich sehr sensitiv direkt durch Isothermale Titrationskalorimetrie bestimmen. Wenn die Bindungsreaktion eine Änderung des Protonierungszustands, d.h. einer Änderung des pKa-Werts einer ionisierbaren Gruppe, eines der Bindungspartner beinhaltet, werden Protonen mit dem gepufferten Medium ausgetauscht. Die apparente Bindungsenthalpie ΔH_{ITC} beinhaltet dann auch einen Term, der von der Ionisierungsenthalpie des Puffers abhängig ist. Über Bindungsmessungen am selben pH-Wert, aber in Puffern unterschiedlicher Ionisierungsenthalpien, ΔH_{ion} , lassen sich daraufhin die Anzahl der übertragenen Protonen und die pufferunabhängige Bindungsenthalpie ΔH_{bind} , gemäß $\Delta H_{ITC} = \Delta H_{bind} + n_{H^+} \times \Delta H_{ion}$, bestimmen (Jelesarov & Bosshard, 1999).

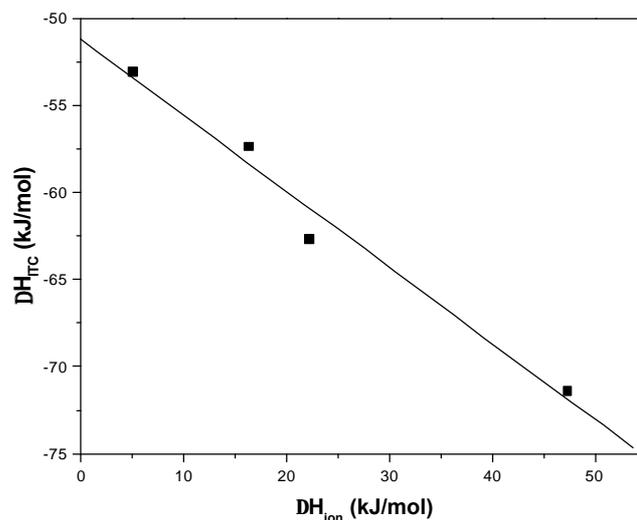


Abb. 44. Änderung der apparenten Bindungsenthalpien in Abhängigkeit von den Ionisierungsenthalpie der Meßpuffer. Bindungsmessungen mittels ITC wurden bei 20 °C und pH 7,0 bei einer nPTHR-Konzentration von 17 μ M und einer PTH-Konzentration von 400 bis 600 μ M in Tris mit $\Delta H_{ion} = 47,279$ kJ/mol (Meijberg *et al.*, 1998), Mops mit $\Delta H_{ion} = 22,175$ kJ/mol (Xie *et al.*, 1998), Hepes mit $\Delta H_{ion} = 16,317$ kJ/mol (Pantoliano *et al.*, 1994) und Phosphat mit $\Delta H_{ion} = 5,021$ kJ/mol (Kresheck *et al.*, 1995) durchgeführt. Alle Puffer hatten eine Konzentration von 50 mM und beinhalteten 100 mM NaCl. Die experimentellen Daten wurden mit Hilfe des Programms MicroCal Origin für ITC Version 2.9 ausgewertet und lieferten die apparenten Bindungsenthalpien. Nach Auftragung der app. Bindungsenthalpien gegen die Ionisierungsenthalpien der Meßpuffer konnte über lineare Regression die Anzahl der übertragenen Protonen n_{H^+} aus der Steigung des Kurvenangleichs an die experimentellen Daten ermittelt werden. Es ergab sich ein n_{H^+} -Wert von $-0,44 \pm 0,05$. Der Schnittpunkt mit der Ordinate lieferte zudem eine pufferunabhängige Bindungsenthalpie, ΔH_{bind} , bei pH 7,0 von $-51,2 \pm 1,3$ kJ/mol.

Aus Bindungsmessungen von nPTHR an PTH bei pH 7,0 in Puffern unterschiedlicher Ionisierungsenthalpien ergab sich die Anzahl der übertragenen Protonen, n_{H^+} , zu

– $0,44 \pm 0,05$. Dies bedeutet, daß unter den experimentellen Bedingungen Protonen bei Bindung ins gepufferte Medium abgegeben wurden. Der gemessene Wert von $-0,44$ deutet darauf hin, daß bei pH 7,0 eine nur partiell ionisierte Gruppe, entweder in nPTHR oder im PTH-Ligand vorliegt. Dies deutet auf die Beteiligung einer Histidin-Seitenkette ($pK_a \approx 6,8$) an der Bindung hin. Um diese molekulare Interpretation abzusichern, müssten die bei Komplexbildung auftretenden Deprotonierungen jedoch noch bei weiteren pH-Werten untersucht werden.

Die pufferunabhängige Bindungsenthalpie ΔH_{bind} besitzt bei pH 7,0 einen Wert von $-51,2$ kJ/mol. Die pufferunabhängige Bindungsentropie ΔS_{bind} berechnet sich daraus, zusammen mit der durchschnittlichen Dissoziationskonstante der Reaktionen von $3,29$ μM und einer Meßtemperatur von 20 °C zu $-68,07$ J mol⁻¹ K⁻¹.

3 Rückfaltung des PTH-Rezeptors aus *E. coli* inclusion bodies

3.1 Expression des PTH-Rezeptors (PTHR) in *E. coli*

Die rekombinante Expression von eukaryontischen Membranproteinen, die helikale Transmembranbereiche aufweisen, kann in prokaryontischen Systemen einerseits zu einer Inserierung des Membranproteins in die bakterielle Zellmembran, andererseits zu einer Ablagerung des exprimierten Proteins in *inclusion bodies* führen. Die funktionelle Expression erfordert in der Regel eine Fusion an Proteine des periplasmatischen Raums, wie z. B. an das Maltose-binding Protein und hat bisher ein Expressionsniveau von 100 pmol/mg Membranprotein nicht überstiegen (Grishammer & Tate, 1995). Die rekombinante Expression von Membranproteinen in *inclusion bodies* zur Herstellung größerer Proteinmengen und die Rückfaltung aus diesem Material ist derzeit noch eine selten angewandte Methode. Sie umgeht aber die cytotoxischen Effekte einer funktionellen Überexpression eines Membranproteins, das in die bakteriellen Zellmembran eingebaut werden muß. Das Expressionsniveau scheint dabei von der Verteilung der positiven Ladungen in den loop-Regionen der Membranproteine abzuhängen (Kiefer *et al.*, 2000).

Da bereits Rückfaltungsdaten für die N-terminale Rezeptordomäne vorlagen, wurde zur Herstellung und Charakterisierung des gesamten PTH-Rezeptors eine Expression in *inclusion bodies* angestrebt. Zur Expression des PTHR in *E. coli* wurde das Expressionsplasmid p(PTHR) erstellt (Abb. 45), das die codierende Region des PTHR von Tyr23 bis M571 unter der Kontrolle des T7-Promotors beinhaltet.

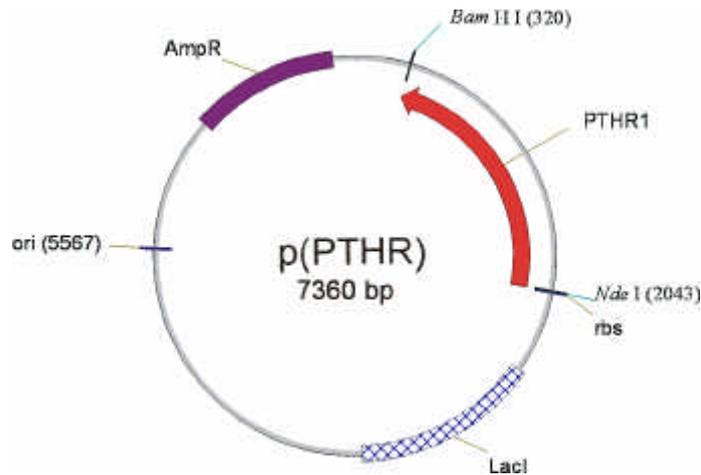


Abb. 45. Schematische Darstellung des Expressionsplasmid p(PTHR).

Dazu konnte die entsprechende Gensequenz aus einer PTH-Rezeptor cDNA amplifiziert und in den Vektor pET11a (Novagen) kloniert werden. Die Richtigkeit der amplifizierten und eingefügten Gensequenz wurde durch DNA-Sequenzanalyse überprüft. Die Verwendung von Tyr23 als N-terminale Aminosäure ergab sich wiederum aus der Charakterisierung der Prozessierung des murenen Rezeptorproteins im eukaryontischen Expressionssystem (siehe Kapitel 1.3)

Die Expression von PTHR erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) nach Kotransfektion mit dem für die tRNA der seltenen Arg-Codons codierenden Plasmid pUBS (siehe Kapitel 2.1). (Brinkmann *et al.*, 1989; Kurland & Gallant, 1996). Die Expression des PTHR wurde in einem Expressionstest mittels Western-Blot geprüft (Abb. 46). Die Expression des PTHR nach Induktion ließ sich dabei durch das Auftreten einer Proteinbande von 60 kD verfolgen.

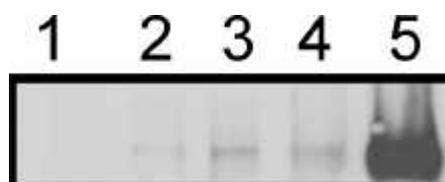


Abb. 46. Expressionstest des PTHR. Kulturmedium wurde mit einer stationären Übernachtskultur von BL21(DE3)pPTHR angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Mit und ohne Induktion der rekombinanten Protein-expression mit IPTG wurden zu den angegebenen Zeiten Proben genommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und nach Erhitzen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot analysiert. Bahn 1: Gesamtzellfraktion vor Induktion; Bahn 2: 1 h ohne Induktion; Bahn 3: 1 h mit Induktion; Bahn 4: 3 h ohne Induktion; Bahn 5: 3 h mit Induktion.

Im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel konnte keine deutliche Expressionsbande ausgemacht werden, was auf ein sehr niedriges Expressionsniveau von PTHR in *E. coli* hindeutet. Auch eine Expression mit dem für nPTHr verwendeten Vektor, der das Protein mit einem N-terminalen *His-tag* versieht, ergab keine Verbesserung des Expressionsniveaus. Die Expression des PTHR in *inclusion bodies* konnte nach Zellaufschluß und Extraktion mit dem Detergenz LDAO im Western-Blot nachgewiesen werden.

3.2 Rückfaltung und Reinigung von PTHR aus inclusion body Material

Die Präparation von *inclusion bodies* wurde gemäß der für nPTHr verwendeten Vorschrift durchgeführt. Diese enthielten in hohem Maße Verunreinigungen, sodaß auch nach der *inclusion body* Präparation PTHR nur im Western-Blot eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Die Solubilisierung der *inclusion bodies* erfolgte durch das Detergenz Lauroylsarkosin. Lauroylsarkosin wurde bereits erfolgreich bei der Solubilisierung von *inclusion bodies* weiterer Membranproteine, wie des olfaktorischen Rezeptors OR5 und Toc75, einer Komponente des Chloroplastenimport-Apparates (Kiefer *et al.*, 1996; Rogl *et al.*, 1998) verwendet.

Die Rückfaltungsbedingungen orientierten sich an der für nPTHr entwickelten Prozedur. Das PTHR-Solubilisat wurde 100fach zu einer Gesamtproteinkonzentration von ca. 100 µg/ml in einen argininhaltigen Renaturierungspuffer (1 M Arginin; 0,05 M Na-Phosphat; 1 mM EDTA; 5 mM GSH und 1 mM GSSG; pH 8,0) verdünnt, der ein Redox-System aus oxidiertem und reduzierten Glutathion beinhaltet. Die 100fache Verdünnung der detergenzhaltigen Proteinlösung bei Initiierung der Rückfaltung unter die cmc des Detergenz hatte überraschenderweise keinen Einfluß auf die Löslichkeit des Rezeptors (Abb. 47). Dies könnte auf die Anwesenheit molarer Konzentrationen an Arginin im Rückfaltungspuffer zurückzuführen sein. Es konnte gezeigt werden, daß nach vollständiger Entfernung des Lauroylsarkosins aus dem Rückfaltungsansatz durch Dialyse PTHR durch 1 M Arginin genauso in Lösung gehalten werden konnte wie durch 0,1 % Triton X-100 (Abb. 47).

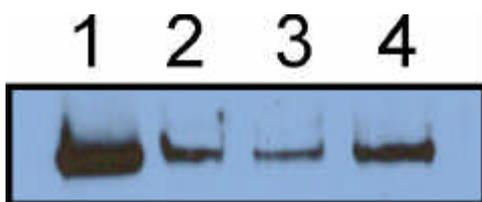


Abb. 47. Löslichkeitstest des PTHR. Ein Rückfaltungsansatz des PTHR wurden aufgeteilt und gegen 1000 Volumina der angegebenen Puffer dialysiert. Nach Abtrennung von aggregiertem Protein durch Ultrazentrifugation (1h; 100 000 rpm; 100.4 TLA-Rotor) wurden gleiche Volumenanteile der Dialysate mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (10%iges Tricینگel) und Western-Blot analysiert. Bahn 1: Rückfaltungsansatz; Bahn 2: Dialysat gegen 0,05 M Na-Phosphat; 100 mM NaCl; 0,1 % Triton X-100; pH 7,0; Bahn 3: Dialysat gegen 0,05 M Na-Phosphat; 0,3 M Arginin; pH 7,0; Bahn 4: Dialysat gegen 0,05 M Na-Phosphat; 1 M Arginin; pH 7,0.

Die Renaturierung erfolgte bei 6 °C für 2 Tage. Anschließend wurde die Proteinlösung mit 0,1 % n-Decyl- β -Maltosid versetzt und gegen 50 Volumina 0,05 M Na-Phosphat; 100 mM NaCl; pH 8,0 dialysiert. Die Aufreinigung des PTHR aus dem Proteinrenaturat erfolgte mittels Immunoaffinitätschromatographie an einer Antikörper-Säule. Als Antikörper wurde der monoklonale Antikörper 1F3.4C1 (K. Honold, Roche, Penzberg), der gegen ein C-terminales Peptid des Rezeptors generiert wurde, verwendet. Nach Bindung der Proteine an das Säulenmaterial und einem Waschschrift, erfolgte die Elution durch Absenkung des pH-Werts von pH 7,5 auf pH 2,5 (0,1 M Glycin/HCl; 0,1 % n-Decyl- β -Maltosid; pH 2,5). Um die erhaltenen Elutionsfraktionen sofort zu neutralisieren und damit eine Schädigung des Rezeptors durch den niedrigen pH-Wert zu vermeiden, erfolgte die Elution in eine konzentrierte Tris-Lösung. Dadurch wurde der pH-Wert des Eluats auf einen Wert von pH 7 bis 8 angehoben.



Abb. 48. Rückfaltung und Aufreinigung des PTHR. Gleiche Volumenanteile der Rückfaltungs- und Reinigungsfraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (10%iges Tricingel) und darauffolgendem Western-Blot analysiert. Bahn 1: *Inclusion body* Präparation; Bahn 2: *Inclusion body*-Solubilisat; Bahn 3: Rückfaltungsansatz in Arginin; Bahn 4: Rückfaltungsansatz nach Versetzen mit n-Decyl- β -Maltosid und Dialyse; Bahn 5 bis 7: Waschfraktionen; Bahn 8: Elutionsfraktion 2; Bahn 9: Elutionsfraktion 3.

Abbildung 48 zeigt den Verlauf der Reinigung im Western-Blot; in Abbildung 49 ist das Eluat der Antikörpersäule, im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, dargestellt. Die Identität des aufgereinigten PTHR wurde durch N-terminale Sequenzierung bestätigt.

Aus 150 mg *inclusion body* Material konnten mit dieser Prozedur ca. 10 bis 20 μ g PTHR in einer Reinheit von 75 bis 80 % gewonnen werden.

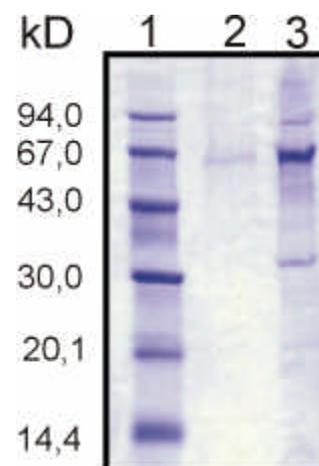


Abb. 49. Coomassiegel des gereinigten PTHR. Bahn 1: Molekularmassenstandard; Bahn 2: Eluat der Immunoaffinitäts-Säule; Bahn 3: Aufkonzentriertes Eluat der Immunoaffinitäts-Säule.

3.3 Bindungsstudien am renaturierten PTH-Rezeptor

Zur Überprüfung der Funktionalität des rückgefalteten und gereinigten PTH-Rezeptors wurden Bindungsmessungen mittels Oberflächenplasmonresonanz in einem BIAcoreX-System (Biacore AB, Freiburg) analog zu den Messungen mit nPTHr durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.1.2).

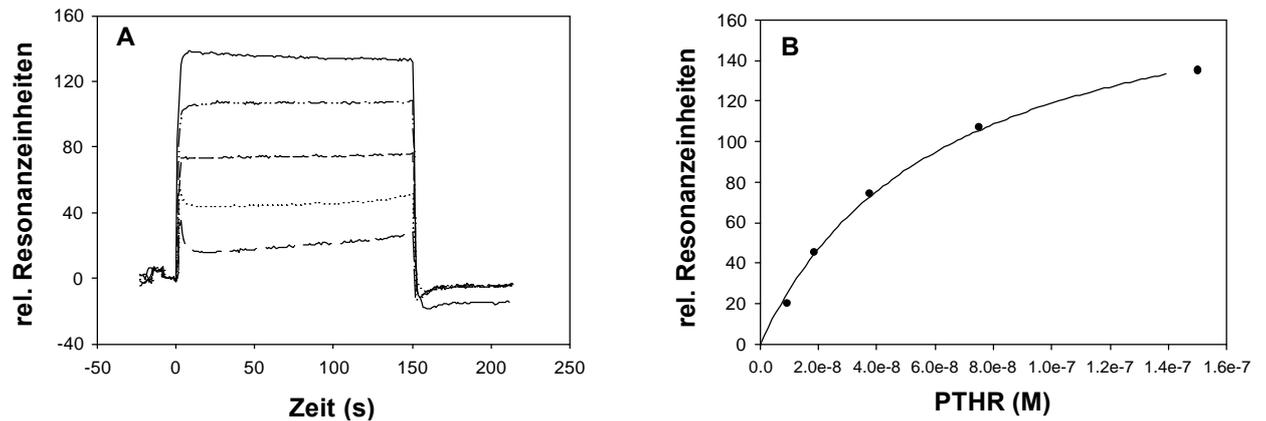


Abb. 50. Sensorgramme der Bindung des PTHR an den PTH-Sensorchip. A: Bindungsreaktionen wurden bei einer Flußrate von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ in PBS/0,1 % n-Decyl- β -Maltosid bei einer Temperatur von 20 $^{\circ}\text{C}$ detektiert. Dargestellt ist der Verlauf der Resonanzsignale nach Injektionen unterschiedlicher Konzentrationen an PTHR bei t_0 (von unten nach oben: 9,38 nM; 18,75 nM; 37,5 nM; 75 nM; 150 nM). B: Die gemessenen Resonanzsignale der Bindungsgleichgewichte wurden gegen die PTHR-Konzentration aufgetragen (\bullet) und mit Hilfe des Programms BIAevaluation 3.0 (Biacore AB, Freiburg) gemäß der Langmuir-Bindungsisotherme (—) ausgewertet. Unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie ergab sich eine Dissoziationskonstante von $62 \pm 7,9$ nM.

Abbildung 50 zeigt ein Bindungsexperiment, bei dem unterschiedliche Konzentrationen von PTHR über die Sensorchipoberfläche des PTH-Sensorchips geleitet wurden. Dabei liegt bei der gewählten Detergenzkonzentration weniger als 1 Rezeptormolekül pro Detergenzmizelle vor. Die Auswertung der Bindungsdaten erfolgte mittels Auftragung der Resonanzsignale nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts gegen die Konzentration des eingesetzten nPTHr durch nichtlineare Regression. Es ergab sich eine apparente Dissoziationskonstante von $62 \pm 7,9$ nM, die unter Berücksichtigung der nicht ganz reinen Proteinpräparation und der damit verbundenen unpräzisen Konzentrationsangabe noch niedriger liegen kann.

Um die Spezifität der Bindung zu überprüfen, wurden der gereinigte PTHR durch Zugabe von DTT reduziert, und vorhandene freie Thiolgruppen mit Jodacetamid kovalent modifiziert. Nach Entfernen der Reagenzien durch Dialyse gegen PBS/0,1 % n-Decyl- β -Maltosid wurde die Bindungsmessung mittels Oberflächenplasmonresonanz wiederholt. Der Vergleich der Bindung nach Injektion gleicher Konzentrationen an unmodifiziertem und modifiziertem PTHR zeigte eine deutlich verminderte Bindungsfähigkeit des modifizierten PTHR (Abb. 51). Dies stellte einen starken Hinweis auf die Spezifität der gemessenen Bindungsreaktion dar, da die

Bindungsfähigkeit des humanen Parathormonrezeptors wesentlich von der Ausbildung der extrazellulären Disulfidbrücken abhängt (Karpf *et al.*, 1988; Karpf *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994).

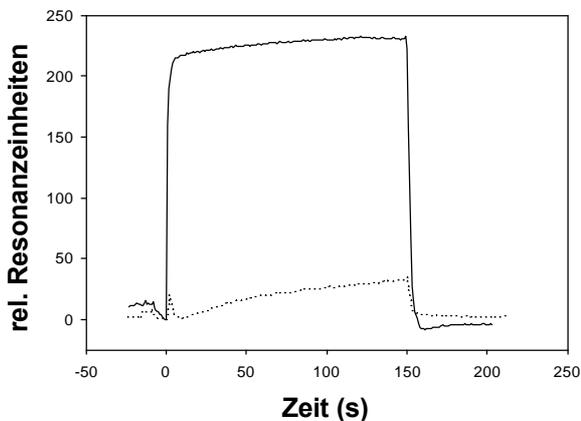


Abb. 51. Kontrollelexperiment zur Bindungsspezifität des PTHR. 200 μ l einer PTHR-Lösung in PBS/0,1 % n-Decyl- β -Maltosid wurden mit DTT zu 4,7 mM versetzt und 20 min bei 22 °C inkubiert. Der Ansatz wurde daraufhin nach Zugabe von 2 μ l 10 % n-Decyl- β -Maltosid mit 210 μ l einer 2,2 M Iodacetamidlösung gemischt. Nach Dialyse gegen 1000 Volumina PBS/0,1 % n-Decyl- β -Maltosid wurde die Bindung an einen PTH-Sensorchip bei einer Flußrate von 20 μ l/min und 20 °C überprüft (··). Als Kontrolle wurde eine unmodifizierte PTHR-Lösung gleicher Konzentration (150 nM) injiziert und auf Bindung untersucht (—).

Die Kompetition der Bindung an den PTH-Sensorchip erforderte ungewöhnlich hohe Konzentrationen an freiem Parathormon (Abb. 52). Es konnte hiermit eine Dissoziationskonstante von 50,6 μ M berechnet werden, die sich um einen Faktor 820 von der aus direkten Bindungsmessungen bestimmten Dissoziationskonstante unterschied. Der Einsatz solch hoher PTH-Konzentrationen zur Kompetition könnte über die Herabsetzung der effektiven Konzentration von Parathormon im Detergenzpuffer erklärt werden. Es scheint, daß das freie PTH mit den Detergenzmizellen in Wechselwirkung tritt und dadurch dessen Bindung an PTHR behindert wird. Immobilisiertes PTH auf der Sensorchipoberfläche könnte in diesem Fall anderen räumlichen Gegebenheiten unterliegen und keine Beeinträchtigung der Wechselwirkung mit PTHR erfahren.

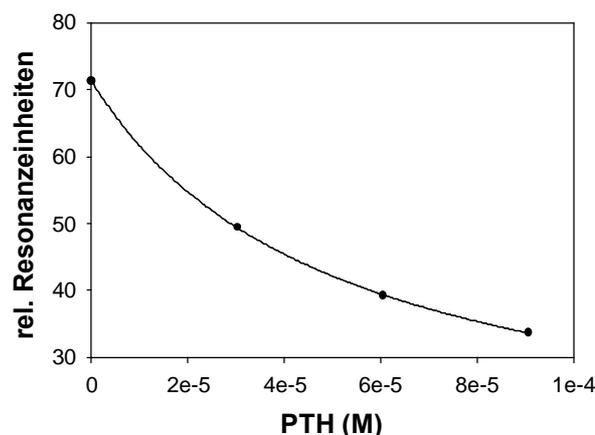


Abb. 52. Kompetitionsexperiment am PTH-Sensorchip. Eine 37,5 nM PTHR-Lösung in PBS/0,1 % n-Decyl- β -Maltosid wurde mit steigenden Mengen an PTH in PBS/0,1 % n-Decyl- β -Maltosid versetzt und auf Bindung an den PTH-Sensorchip untersucht. Eine Auswertung der gegen die Konzentration an freiem PTH aufgetragenen Resonanzsignale im Bindungsgleichgewicht (●) mittels nichtlinearer Regression (—) ergab eine Dissoziationskonstante von 50,6 μ M.

IV Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem humanen PTH-Rezeptor auf drei Teilebenen: (1) hPTHr wurde in einem Säugerzell-Expressionssystem exprimiert und konnte aus den Zellmembranen isoliert werden, um erste Charakterisierungsschritte durchzuführen. Aufgrund der geringen Expression wurde jedoch zur Herstellung des Proteins in einem prokaryontischen Expressionssystem übergegangen. (2) Mit einer Expression des N-terminalen Rezeptorteils sollte die Hypothese einer N-terminalen Ligandenbindungsdomäne überprüft werden. Die Rückfaltung dieses Rezeptorfragments aus *E. coli inclusion bodies* lieferte eine stabile Proteindomäne mit der Fähigkeit zur Ligandenbindung. Untersuchungen zu strukturellen Eigenschaften dieser Domäne sowie der molekularen Wechselwirkung mit Parathormon wurden durchgeführt. (3) Die Untersuchung des Gesamt Rezeptors wurde nach prokaryontischer Expression in *inclusion bodies* und Rückfaltung fortgeführt. Es werden erste Ansätze zur Entwicklung geeigneter Herstellungsmethoden des gesamten Rezeptorproteins in für strukturelle Untersuchungen ausreichenden Mengen vorgestellt.

1. Gewinnung des humanen Parathormon-Rezeptors aus eukaryontischem Zellmaterial

Die Aufreinigung des hPTHr aus einer CHO-K1-Zelllinie gelang durch den Einsatz zweier Affinitätschromatographien, die zum einen die Bindung des glykosylierten Rezeptors an das Lektin Weizenkeimagglutinin, zum anderen die Bindung an einen monoklonalen Antikörper ausnutzten. Der N-Terminus des aufgereinigten Rezeptors entsprach Aminosäure Tyr23, damit konnte die Signalsequenz, deren Länge bisher nur anhand von Algorithmen postuliert worden war, zweifelsfrei festgelegt werden. Die Bindung des Rezeptors an eine PTH-Ligandensäule deutete auf Funktionalität des solubilisierten und aufgereinigten Proteins hin. Diese Art der Affinitätschromatographie konnte allerdings für die Reinigung nicht eingesetzt werden; die Bindung erwies sich als so stabil, daß eine Elution nur durch Denaturierung erreicht werden konnte. Die veranschlagte Menge des Rezeptors, die aus FACS- und Scatchard-Analysen der zur Verfügung gestellten CHO-K1-Zell-Linie bestimmt wurde (K. Honold, Roche Diagnostics, Penzberg), konnte aus dem Zellmaterial nicht aufgereinigt werden. Laut eigener Analysen ergab sich eine Rezeptormenge von rund 670 fmol/mg Membranprotein. Da die beiden Reinigungsschritte ohne nennenswerte Verluste durchgeführt werden konnten, läßt sich davon ausgehen, daß die Expression von hPTHr in dieser Zelllinie nicht den vorangegangenen

Analysen entsprach. Dies wurde auch durch die durchgeführte Scatchard-Analyse an präparierten CHO-K1-Zellmembranen bestätigt. Die gemessenen Rezeptormengen/mg Membranprotein entsprachen hierbei nur ca. 1,5fach der in Rinder-, und Hundenierenmembranen vorkommenden Rezeptormenge und liegen damit deutlich unter den für die rekombinante Zelllinie postulierten Werten. Im Falle der Scatchard-Analytik an ganzen Zellen könnte eine Verfälschung der Meßergebnisse auf eine Internalisierung des radioaktiv markierten Parathormons während der Bindung, die bei 15 °C durchgeführt wurde (K. Honold, persönliche Mitteilung), zurückzuführen sein. Ein falsch-positives Ergebnis der FACS-Analytik ließe sich durch eine unspezifische Bindung des für die FACS-Analytik verwendeten Antikörpers erklären. Die unspezifische Reaktion dieses Antikörpers wurde im Verlauf dieser Arbeit im Western-Blot mit CHO-K1-Zellmembranen aufgezeigt. Eine weitere Möglichkeit für die mangelnde Rezeptormenge in den Membranpräparationen wäre der Abbau des Proteins während der Präparation der Membranen selbst. Dies ist eher unwahrscheinlich, weil immer unter Zugabe von Proteaseinhibitoren gearbeitet wurde, und in keinem Western-Blot der Membranpräparationen starke Abbaubanden des Rezeptors festgestellt werden konnten. Da der zur Detektion verwendete monoklonale Antikörper aber nur den C-terminalen Bereich des PTH-Rezeptors detektiert, konnten eventuell vorhandene Abbauprodukte mit trunkiertem C-Terminus nicht nachgewiesen werden.

Da für Struktur- und Funktionsanalysen die gereinigte Proteinmenge nicht ausreichend war, wurde auf eine weitergehende Charakterisierung des humanen PTH-Rezeptors aus CHO-K1-Zellen verzichtet. Auch eine Optimierung der Zell-Linie hinsichtlich verstärkter hPTHr-Expression wurde für nicht geeignet befunden, um den Rezeptor in für strukturelle Analysen ausreichenden Mengen zu erzeugen. Literaturdaten zur rekombinanten Expression von weiteren G-Protein gekoppelten Rezeptoren in CHO-Zellen (Grishammer & Tate, 1995) wiesen daraufhin, daß nur in einem einzigen Fall ein Expressionsniveau von 200 pmol/mg Membranprotein (Lohse, 1992) erreicht werden konnte, im weiteren Fällen bewegten sich die Expressionsniveaus zwischen 0,3 pmol/mg (Felder *et al.*, 1992) und 7 pmol/mg Membranprotein (Turcatti *et al.*, 1993). Stattdessen wurden nun die Möglichkeiten der prokaryontischen Proteinüberexpression genutzt, um ausreichend Untersuchungsmaterial zur Verfügung zu stellen.

2. Untersuchung des N-terminalen Rezeptorsegments nPTHrP

Die N-terminalen extrazellulären Domänen der Klasse B G-Protein gekoppelter Rezeptoren spielen eine essentielle Rolle bei der selektiven Ligandenbindung. Durch Mutagenesestudien, *cross-linking* Experimente und den Einsatz von chimären Rezeptoren konnte die Bedeutung dieser Rezeptorfragmente experimentell nachgewiesen werden (Bergwitz *et al.*, 1996; Potts, Jr. *et al.*, 1997; Kronenberg *et al.*, 1997; Ji *et al.*, 1998). Im Falle des GLP1-Rezeptors führte eine bakterielle Expression des N-terminalen Rezeptoranteils zu einer funktionellen Proteindomäne (Wilmen *et al.*, 1996), ein Rezeptorfragment des PACAP-Rezeptors, das aus einer membranverankerten N-terminaler Rezeptordomäne bestand, wies eine hochaffine und spezifische Bindung zu PACAP auf (Cao *et al.*, 1995).

Studien am PTH-Rezeptor wiesen schon früh auf eine mögliche N-terminale Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors hin. So konnte die Bindung radioaktiv markierten Parathormons wirkungsvoll durch Weizenkeimagglutinin kompetitiert werden, das an den glykosylierten N-terminalen Rezeptorteil bindet und somit die Wechselwirkung zwischen einem Liganden und diesem Bereich behindert (Karpf *et al.*, 1987). Mutagenesestudien zeigten, daß der Austausch bestimmter Aminosäuren und Deletionen im N-terminalen Rezeptorbereich zu einer starken Herabsetzung oder dem Verlust der Ligandenbindungsfähigkeit führt (Lee *et al.*, 1994). Dabei bestärkte sich auch die Vermutung einer strukturell essentiellen Disulfidverbrückung der 6 vorhandenen Cysteinseitenketten, da Substitution dieser Reste durch Serine nicht toleriert wurden. Neben Bereichen im N-terminalen Rezeptoranteil konnten jedoch auch weitere wichtige Aminosäurereste im dritten extrazellulären *loop* gefunden werden, deren Deletion oder Mutation zu einem Verlust der Ligandenbindungsaktivität führten (Lee *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995). Genaue Interaktionspunkte zwischen Rezeptor und Ligand konnten weiterhin durch *cross-linking*-Studien mit photoreaktiven Ligandenanaloga nachgewiesen werden. Es konnten die Aminosäuren Thr33 und Gln37 im N-terminalen Segment, als auch Arg186 kurz vor der ersten Transmembranhelix als Kontaktpunkte mit jeweils den Positionen 13 und 23 des PTH-Liganden identifiziert werden. (Mannstadt *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1998). Neueste Arbeiten weisen auf eine Beteiligung von Phe184 und Leu187 an der Ligandenbindung hin (Carter *et al.*, 1999). Die Abkopplung der Ligandenbindungsfähigkeit des Rezeptors von der Fähigkeit zur Signalübertragung ist ein wichtiger, experimentell bestätigter Aspekt bei den bestehenden Modellvorstellungen und bestärkt die Annahme einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne (Ji *et al.*, 1998; Mannstadt *et al.*, 1999). So konnte die Bindung von N-terminal trunkeerten oder modifizierten Liganden, z. B. PTH(3-34) und Bpa²-PTHrP, an den PTH-Rezeptor nachgewiesen werden, die verminderte oder keinerlei signalauslösende Eigenschaften besitzen (Goltzmann *et al.*, 1975; Segre *et al.*, 1979;

Coleman *et al.*, 1994; Behar *et al.*, 2000). Darüber hinaus gelang die Konstruktion von PTH-Analoga, die mit gleicher Affinität an den Rezeptor binden, aber eine Selektivität bezüglich des Signalwegs aufzeigen (Takasu *et al.*, 1999). Es wird davon ausgegangen, daß einerseits eine Bindung zwischen N-terminalem Rezeptoranteil und C-terminalen Bereichen der Liganden PTH und PTHrP stattfindet, andererseits das Auslösen der Signalübertragung über Interaktion der N-terminalen Aminosäurereste der Liganden mit Transmembranbereichen vonstatten geht (Rölz *et al.*, 1999). Dies wurde durch die Identifikation eines Kontaktpunkts zwischen den N-terminal lokalisierten Aminosäuren von PTH und PTHrP und Met425 in der sechsten Transmembranhelix des Rezeptors unterstützt (Behar *et al.*, 1996; Bisello *et al.*, 1998).

Das für eine Expression in *E. coli* ausgewählte Rezeptorfragment nPTHR beinhaltet den gesamten extrazellulären N-terminalen Rezeptoranteil, beginnend mit der ersten Aminosäure nach der Signalsequenz (Tyr23) und endend mit der unmittelbar vor der putativen ersten Transmembranhelix stehenden Aminosäure (Ile191). Bei Vorliegen einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne im humanen PTH-Rezeptor sollte dieses trunkierte Rezeptorfragment eine stabile disulfidverbrückte Proteindomäne mit Ligandenbindungseigenschaften ausbilden können.

2.1 nPTHR läßt sich zu einer stabilen Proteindomäne renaturieren

Um strukturelle und funktionelle Analysen mit dem N-terminalen Anteil des humanen PTH-Rezeptors durchführen zu können, wurde nPTHR in *E. coli* in *inclusion bodies* exprimiert. Diese Ablagerung von rekombinant hergestellten Proteinen in *E. coli* ist ein häufig beobachtetes Phänomen (Marston, 1986), das besonders bei im nativen Zustand disulfidverbrückten Proteinen auftritt (Lilie *et al.*, 1998). Zur Wiederherstellung der Funktionalität der Proteine müssen spezielle Renaturierungsverfahren angewandt werden, die dem jeweiligen Charakter des Proteinmoleküls Rechnung zu tragen haben.

Zur Rückfaltung des nPTHR wurde ein argininhaltiger Redoxpuffer verwendet, der zum einen durch die Anwesenheit eines Disulfid-*shuffling*-Systems, zum anderen durch den Einsatz des Faltungshelfers Arginin, eine Rückfaltung vom denaturierten und reduzierten Zustand zu einer funktionellen, nativen Proteinspezies ermöglichte. Arginin als niedermolekulares Faltungsgagens unterdrückt dabei die unproduktive Aggregation von Polypeptidketten oder Faltungsintermediaten während des Rückfaltungsprozesses und stabilisiert den nativen Zustand durch präferentielle Hydratation (Rudolph *et al.*, 1987; Lin & Timasheff, 1996; De Bernandez Clark *et al.*, 1999). Der verwendete Redoxpuffer beinhaltet ein 5:1-Gemisch aus reduziertem und oxidiertem Glutathion, das ein schnelles *reshuffling* falsch ausgebildeter Disulfidbrücken

ermöglicht (Rudolph *et al.*, 1998). Es gelang mittels des entwickelten Protokolls, nPTHR mit einer Ausbeute von 25 bis 30 % zu renaturieren. Nach zwei zusätzlichen Reinigungsschritten lag das Rezeptorfragment in homogener, monomerer und einheitlich disulfidverbrückter Form vor.

Der Nachweis, daß es sich bei nPTHR um eine stabile, eigenständige Proteindomäne handelt, erfolgte über spektroskopische und kalorimetrische Methoden. Das Fern-UV CD-Spektrum des nativen nPTHR wies eine ausgeprägte Sekundärstruktur mit 25 % α -helikalem und 23 % β -sheet Anteil auf, die durch den Einsatz chemischer Denaturierungsmittel, wie Guanidiniumchlorid denaturiert werden konnte. Der Vergleich mit dem Fern-UV CD-Spektrum des N-terminalen Rezeptoranteils des humanen GLP1-Rezeptors ergab eine weitgehende Übereinstimmung in der Sekundärstruktur (A. Bazarsuren, persönliche Mitteilung), was die Annahme sehr ähnlicher struktureller Eigenschaften der N-terminalen Anteile der Klasse B G-Protein gekoppelter Rezeptoren unterstützt. Über Nah-UV-CD-Spektroskopie, der Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren und 1D-NMR-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, daß verschiedene Bereiche des Proteins in Tertiärkontakten involviert sind, aber auch hydrophobe Oberflächen exponiert vorliegen, die zur Aggregationsanfälligkeit unter bestimmten Pufferbedingungen führten. Diese Exposition könnte durch den fragmentarischen Charakter des nPTHR, dem Tertiärkontakte mit den *loop*-Regionen des Gesamtrezeptors und die N-terminale Verankerung in der Lipidmembran fehlen, zustande kommen. Die thermische Stabilität des Rezeptorfragments lag bei 61 °C in einem für stabile Proteindomänen typischen Bereich und konnte durch den Zusatz von Ammoniumsulfat um 10 °C erhöht werden.

Zusammenfassend lassen diese Untersuchungen den Schluß zu, daß nPTHR eine definierte und stabile Tertiärstruktur aufweist.

Zudem wurde die Annahme des Vorliegens einer nativen Struktur, die nicht einem *molten-globule* Zustand entspricht, durch die gerichtete Ausbildung eines distinkten Disulfidbrückenmusters unterstützt. Bei 6 vorhandenen Cysteinseitenketten, die 3 Disulfidbrücken ausbilden können, sind 15 verschiedene Kombinationen der Verknüpfung möglich, falls die Disulfidbrückenausbildung statistisch erfolgt (Rudolph *et al.*, 1998). Dies würde ein Verknüpfungsmuster zu ca. 7 % populieren. nPTHR läßt sich jedoch mit einer Ausbeute von 25 bis 30 % zu einer einheitlich disulfidverbrückten Spezies renaturieren. Dies liegt weit über dem statistisch möglichen Anteil und legt die Ausbildung einer nativen Konformation nahe. Mittels Analyse proteolytischer Fragmente konnte die Verbrückung der Cysteinseitenketten I und III, II und V; und IV und VI beginnend vom C-Terminus von nPTHR eindeutig zugewiesen werden. Der Vergleich mit dem Disulfidbrückenmuster des N-terminalen Rezeptorsegments des humanen GLP1-Rezeptors (A. Bazarsuren, persönliche Mitteilung), das dasselbe Muster aufweist, läßt der Vermutung Raum, daß sämtliche Rezeptoren der Klasse B eine einheitliche Verknüpfung ihrer konservierten

Cysteinseitenketten aufweisen - eine Hypothese, die nun durch die Untersuchung weiterer Mitglieder dieser Rezeptorfamilie überprüft werden kann. Die Einschränkung der konformationellen Freiheit der Polypeptidkette durch die drei Disulfidbrücken erleichterte zudem Möglichkeiten der Modellbildung eines Liganden-Rezeptorkomplexes (Abb. 53), der auf der Grundlage der Struktur von Bakteriorhodopsin und der NMR-Struktur des ungebundenen PTH-Liganden, zusammen mit sämtlichen publizierten Bindungs- und Aktivitätsdaten durch molekulares Modelling generiert werden konnte (Wolfgang Schäfer, Manuskript in Vorbereitung). Das Modell stellt eine strukturelle Hypothese der Interaktion des Rezeptors mit seinem Liganden auf, die besagt, daß die Bindung der C-terminalen Ligandenhelix an den N-terminalen Rezeptorteil ein tiefes Eintauchen der N-terminalen Ligandenhelix in den Transmembranbereich des Rezeptors zur Folge hat, und dadurch die Aktivierung des Rezeptormoleküls erfolgt.

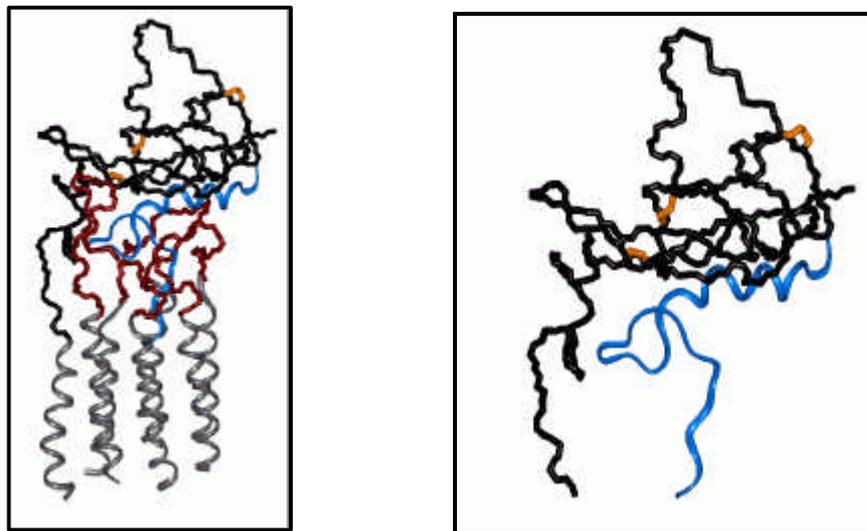


Abb. 53. Modellvorstellung des PTH/PTH-Rezeptor-Komplexes. Das von Dr. Wolfgang Schäfer erstellte Modell beruht auf der bekannten Struktur des Bakteriorhodopsins, dem Disulfidmuster des nPTH und publizierten Bindungs- und Aktivitätsdaten der Klasse B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. In grau: Transmembranhelices, in rosa: extrazelluläre *loop*-Regionen, in schwarz: N-terminaler Rezeptoranteil, in gelb: Disulfidbrücken; in blau: PTH-Ligand. Links ist der gesamte Rezeptor, links nur das N-Terminale Fragment mit gebundenem Liganden dargestellt.

2.2 nPTH bildet eine funktionelle Ligandenbindungsdomäne

Die Bindung der renaturierten Rezeptordomäne an PTH konnte qualitativ über ein *cross-linking*-Experiment, quantitativ über Isothermale Titrationskalorimetrie und Messungen der Oberflächenplasmonresonanz an einem PTH-Sensorchip nachgewiesen werden. Dabei ergab sich eine Dissoziationskonstante der Bindung von 3 μM bis 5 μM bei 20 °C unter denselben Pufferbedingungen, die auch für die Messung des radioaktiv markierten Parathormons an PTH-Rezeptor-haltige Zellmembranen verwendet wurden. Da es sich bei der Rezeptor-Ligand-Interaktion um eine 1:1-Wechselwirkung handelt und im ITC-Experiment auch diese

Stöchiometrie gemessen wurde, liegt das renaturierte, gereinigte Protein als homogene, aktive Spezies vor. Ein Gemisch aus gefalteten und ungefalteten Molekülen kann somit ausgeschlossen werden.

Spektroskopisch ließen sich geringe Änderungen der Signale bei Ausbildung des Komplexes feststellen. Ob diese einer Strukturänderung und/oder Umgebungsänderung des Liganden oder der Rezeptordomäne zuzuschreiben sind, konnte aber nicht eindeutig festgestellt werden. Eine Stabilisierung von nPTHrP und PTH durch Komplexbildung gegenüber chemisch oder thermisch induzierter Denaturierung fand nicht statt. Wie NMR-Messungen gezeigt haben, ist der PTH-Ligand auch im ungebundenen Zustand einheitlich strukturiert (Marx *et al.*, 1995) und besteht nicht aus einem Ensemble unterschiedlichster Konformationen wie kürzere Peptidliganden (Gomez & Freire, 1997). Mutagenese- und Deletionsexperimente am PTH-Liganden weisen daraufhin, daß für die Ausbildung molekularer Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand bereits Strukturdetails im PTH vorliegen müssen (Cohen *et al.*, 1991; Barden & Kemp, 1994; Marx *et al.*, 1998). Es scheint sich somit bei der Hormon-Rezeptor-Bindung um eine Wechselwirkung zwischen zwei strukturierten Molekülen zu handeln, deren Peptidrückgrate schon vor Bindung eine ausgebildete Struktur besitzen. Dies wird im allgemeinen bei Wechselwirkungen größerer Proteinmoleküle, wie der Interaktion zwischen Proteinantigenen mit Antikörpern oder zwischen bestimmten Enzymen und ihren Inhibitorproteinen, beschrieben (Gomez & Freire, 1997). Bei kleineren Peptiden wird dagegen immer von einer Strukturausbildung des Peptids erst im gebundenen Zustand ausgegangen (Creighton, 1993). Das Vorliegen einer Struktur im ungebundenen PTH-Liganden schließt aber dennoch eine mögliche Strukturänderung bei Ausbildung des Komplexes nicht aus. Die Bindung zwischen nPTHrP und PTH scheint eine Beeinflussung der Ligandenstruktur im gebundenen Zustand durch äußere Parameter zuzulassen, wodurch es zu einer partiellen Denaturierung kommen könnte. Dies wiederum hätte eine unkooperative Dissoziation zur Folge. Eine Strukturaufhebung des Liganden, sowie der Dissoziationsprozess konnten jedoch mit den gewählten Meßmethoden nicht detektiert werden.

Die Bindung von PTH und nPTHrP wird durch einen stark enthalpischen Beitrag ($\Delta H_{ITC} = -68,4$ kJ/mol) gegenüber einem ungünstigen entropischen Beitrag ($T\Delta S_{ITC} = -37,8$ kJ/mol) charakterisiert. Die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p bei Ausbildung des Komplexes betrug $-1,715$ kJ mol⁻¹ K⁻¹. Dieser stark negative Wert liegt im typischen Bereich von Peptid-Protein- und Protein-Protein-Wechselwirkungen und spricht für eine spezifische Interaktion. So beträgt ΔC_p der Bindung von Pepstatin an Plasmeypsin II $-1,67$ kJ mol⁻¹ K⁻¹ (Holdgate *et al.*, 1997) und das der Bindung von Lysozym an das Fv-Fragment eines monoklonalen Antikörpers

– 1,577 kJ mol⁻¹ K⁻¹ (Goldbaum *et al.*, 1996). Aus dem ΔC_p – Wert einer Bindung lassen sich vorsichtige Schätzungen der Bedeckung apolarer Oberflächen im Komplex ableiten (Spolar & Record, 1994). Nach der Formel von Spolar & Record ergab sich eine Fläche zwischen 1230 Å² und 1722 Å². Diese Werte liegen im Bereich beobachteter Oberflächenbedeckungen in Bindungskomplexen (Janin & Chothia, 1990). Die Korrelation von Wärmekapazitätsänderungen und Bedeckung apolarer Oberflächen wurden jedoch in anderen Studien in Frage gestellt (Bhat *et al.*, 1994; Ladbury *et al.*, 1994). Sie soll in diesem Falle nur einen Anhaltspunkt geben, der in späteren strukturellen Studien und bei der Weiterentwicklung von Modellen überprüft werden kann.

Die sich wenig verändernde Affinität von nPTH an PTH mit steigender Temperatur und steigender Salzkonzentration läßt auf eine überwiegend hydrophobe Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptorfragment schließen. PTH selbst zeichnet sich durch einen hohen Anteil unpolarer Aminosäuren aus (Leucin: 16,2 %; Valin: 10,8 %). Neueste Arbeiten von Gardella und Mitarbeitern (Carter *et al.*, 1999), die durch Mutageneseexperimente am Gesamtrezeptor die Wichtigkeit hydrophober Aminosäuren am C-terminalen Ende der N-terminalen, extrazellulären Domäne für die Ligandenbindung nachwiesen, bestärken dies. Sie konnten zeigen, daß Rezeptor-Interaktionen der Region Ser3 bis His14 des PTH-Liganden durch Mutationen in den Aminosäuren 182 bis 190 des PTH-Rezeptors beeinflußt werden. Dabei war die Art der Mutationen entscheidend für die Änderung der Bindungsaffinität. Eine Substitution der beiden hydrophoben Aminosäurereste Phe184 und Leu187 durch polare Aminosäuren resultierte in einer 10fachen bis 50fachen Reduktion der spezifischen PTH-Bindung. Ein Austausch mit unpolaren Aminosäuren, wie Valin oder Methionin ergab nur eine zweifache Reduktion der spezifischen Ligandenbindung. Ob die Änderung der Bindungsaffinität dabei über eine direkte Störung der molekularen Wechselwirkung zwischen PTH und Rezeptor, oder über eine Strukturänderung des PTH-Rezeptors erfolgte, konnte aus diesen Experimenten nicht ersehen werden. Rölz und Mitarbeiter (Rölz *et al.*, 1999) weisen dagegen auf starke Coulombinteraktionen hin, die in ihrem computergenerierten Bindungsmodell eine entscheidende Rolle bei der Bindung des Liganden spielen sollen. Sie verwenden zur Modellbildung, neben durch *cross-linking* identifizierten Interaktionspunkten, die in einer Lipidumgebung gewonnene NMR-Struktur eines Fragments des humanen PTH-Rezeptors, das die Aminosäureseitenketten 168 bis 198 umfasst. Dieses Fragment, das Teile der ersten Transmembranhelix beinhaltet, besteht darüberhinaus aus zwei amphipathischen Helices (Seitenketten 169 bis 176, und 180 bis 189), die auf der Oberfläche einer Lipidmizelle liegen. Helix Arg180 – Met189 soll laut Modell mit der C-terminalen Helix des PTH-Liganden über Coulomb-Interaktionen in Wechselwirkung treten. Dabei wird auf die große Anzahl geladener Aminosäureseitenketten in der Region Thr177 – Arg 186 des PTH-Rezeptors

und in der C-terminalen Helix des PTH-Liganden verwiesen. Es ist jedoch fraglich und in keiner Weise nachgewiesen, daß dieses untersuchte Fragment tatsächlich eine Struktur ausbildet, die derjenigen im Gesamtrezeptor entspricht. Die für nPTHR gewonnenen Daten weisen nicht auf eine ausgeprägt ionische Wechselwirkung zwischen Rezeptordomäne und Ligand hin; weder Variation des pH-Werts noch der Salzkonzentration ergab eine signifikante Änderung der Bindungsaffinität.

Die apparente Reaktionsenthalpie eines ITC Experiments beinhaltet neben den energetischen Beiträgen der Bindung auch die Ionisierungsenthalpie des verwendeten Puffers (Baker & Murphy, 1996). Falls bei der Bindung des PTH-Liganden bei einem konstantem pH-Wert sich der pKa-Wert einer ionisierbaren Gruppe der Bindungspartner ändert, findet ein Protonenaustausch mit dem gepufferten Medium statt. Die kalorimetrisch bestimmte Reaktionsenthalpie zeigt dann eine Pufferabhängigkeit auf, aufgrund derer die Anzahl der übertragenen Protonen n_{H^+} und die pufferunabhängige Bindungsenthalpie bestimmt werden können. Bei Bindung von PTH an nPTHR wurden 0,44 Protonen bei pH 7,0 ins gepufferte Medium abgegeben. Dies ist einer nur partiell ionisierten Seitenkette bei pH 7,0 zuzuschreiben und könnte auf die Beteiligung eines einzelnen Histidinrestes an der Bindungsreaktion hinweisen. Genauere Analysen bei weiteren pH-Werten sind jedoch nötig, um diese Hypothese zu überprüfen; eine pH-Wert abhängige Änderung der Bindungsaffinität konnte im Bereich von pH 5 bis 9 nicht festgestellt werden. Unterhalb eines pH-Werts von pH 4,5 konnte keine Bindung mittels Isothermaler Kalorimetrie nachgewiesen werden. Dies könnte einerseits durch Protonierung ionisierbarer Aminosäureseitenketten, andererseits durch geringe, aber entscheidende Strukturänderungen ab diesem pH-Wert bewirkt werden. Da keine systematische Abhängigkeit der Bindungsaffinität von der Salzkonzentration festgestellt werden konnte, scheint es sich dabei eher um eine Strukturänderung zu handeln.

Die pufferunabhängige Bindungsenthalpie ΔH_{bind} betrug $-51,2$ kJ/mol, daraus ließ sich die pufferunabhängige Bindungsentropie ΔS_{bind} zu $-68,07$ J mol⁻¹ K⁻¹ berechnen. Die Entropieänderung setzt sich dabei aus mehreren Beiträgen zusammen, die mit unterschiedlichem Vorzeichen zur Gesamtänderung beitragen: $\Delta S_{\text{bind}} = \Delta S_{\text{conf}} + \Delta S_{\text{solv}} + \Delta S_{\text{rt}} + \Delta S_{\text{ion}}$.

ΔS_{conf} umfasst den Beitrag der Reduzierung konformationeller Freiheitsgrade von nPTHR und PTH bei Komplexbildung, ΔS_{solv} beinhaltet den energetisch günstigen Beitrag der Änderung der Lösungsmittelentropie, ΔS_{rt} besteht aus der Reduzierung von Freiheitsgraden der Rotation und Translation und ΔS_{ion} ist dem Transfer von Protonen zuzuschreiben (Gomez & Freire, 1997). Der negative Gesamtwert der Entropieänderung ΔS_{bind} bei Ausbildung des Komplexes impliziert, daß die Abnahme von ΔS_{conf} und ΔS_{rt} nicht durch ΔS_{solv} und ΔS_{ion} kompensiert werden, sondern

deutet an, daß eine verringerte Mobilität der Bindungspartner im gebundenen Zustand und/oder eine Strukturierung von Wassermolekülen im Komplex vorliegt (Bhat *et al.*, 1994). Die einzelnen Beiträge werden sich aber eindeutig erst durch die Analyse der Wechselwirkungen auf atomarer Ebene mittels Kristallstrukturanalyse oder NMR-Studien zusammen mit weiteren kalorimetrischen Studien und Mutageneseexperimenten aufklären lassen.

Die Bindungsaffinität von nPTHr ist im Vergleich mit der für den zellmembraninserierten Gesamtrezeptor gemessenen Bindungsaffinität stark herabgesetzt ($K_d(\text{Gesamtrezeptor}) = 3,8 \text{ nM}$ und $K_d(\text{nPTHr}) = 3,4 \text{ } \mu\text{M}$). Die Ursache dieser verschlechterten Bindungsfähigkeit kann in mehreren sich nicht gegenseitig ausschließenden Gründen liegen:

1. Umfangreiche Studien am Gesamtrezeptor haben neben der essentiellen Rolle des N-terminalen Rezeptoranteils an der Bindung den Einfluß des dritten *exoloops* und einzelner Aminosäureseitenketten der Transmembranhelices nachgewiesen. Diese Bereiche fehlen in nPTHr und können weder zur Bindungsreaktion an sich, noch zu einer eventuellen Strukturstabilisierung des nPTHr und/oder des Komplexes beitragen.
2. Die Rolle mehrerer Aminosäureseitenketten des C-Terminus der N-terminalen Domäne an der Bindungsfähigkeit des PTH-Rezeptors konnte von mehreren Arbeitsgruppen experimentell nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 1997; Carter *et al.*, 1999). Ein Einfluß der Membranverankerung auf die Struktur dieses Bereichs kann nicht ausgeschlossen werden, nPTHr ist jedoch trunziert und endet mit Ile191.
3. Der Wegfall cytoplasmatischer *loop*-Regionen und Transmembrananteilen könnte dazu führen, daß ein hochaffiner Zustand des Rezeptors, der sich durch ein „Eindeckeln“ der ersten 4 Aminosäurereste des Liganden auszeichnet, nicht generiert werden kann, und somit nur eine lose Assoziation beider Moleküle möglich wird. Dies wird im Modell von Rölz und Mitarbeitern postuliert (Rölz *et al.*, 1999)
4. Experimentelle Befunde besagen, daß die Affinität G-Protein gekoppelter Rezeptoren in vielen Fällen, wie beispielsweise im Falle des Serotonin 5-HT_{1a}-Rezeptors (Bertin *et al.*, 1992) und der humanen Opioid-Rezeptoren (Stanasila *et al.*, 1999), abhängig von der funktionellen Kopplung der trimeren G-Proteine an das Rezeptormolekül ist. Es konnte gezeigt werden, daß nach Expression dieser Rezeptorproteine in der Zellmembran von *E. coli* eine Zugabe von G-Proteinen zur Membranpräparation einen hochaffinen Bindungszustand herstellen konnte. nPTHr fehlt die Kopplungsmöglichkeit an derartige Moleküle, ein Einfluß auf die Bindungsaffinität kann daher nicht stattfinden.
5. Schwyzer und Mitarbeiter (1986) haben ein Bindungsmodell für Hormon-Rezeptorwechselwirkungen aufgestellt, bei dem eine unspezifische Membranassoziation des Peptidhormons einer Bindungsreaktion mit dem Rezeptor vorangeht. Dies kann bei

Verwendung einer löslichen Bindungsdomäne nicht erfolgen, und somit die apparente Affinität der Bindung durch Herabsetzung der effektiven Konzentration des Peptidliganden verschlechtern.

6. Die fehlende Glykosylierung der N-terminalen Domäne im prokaryontischen Expressionssystem könnte eine Herabsetzung der Bindungsfähigkeit im Vergleich mit dem glykosylierten Gesamtrezeptor bewirken. Karpf und Mitarbeiter (Karpf *et al.*, 1987) beschrieben die Kompetitierung der Ligandenbindung an den PTH-Rezeptor durch Weizenkeimagglutinin. Dieses Protein bindet mit hoher Spezifität an die Zuckerreste des glykosylierten Rezeptors. Sie schlußfolgerten daraus eine mögliche Beteiligung der angefügten Zuckerketten direkt an der Ligandenbindung. Die Rolle der Glykosylierung scheint aber eher in der korrekten Verteilung der Rezeptoren und der Kontrolle deren Expression zu liegen, als in der Wechselwirkung mit Liganden (Beck-Sickinger, 1996). Beispielsweise wurde im Falle des β_2 -adrenergen Rezeptors bei Inhibierung der Glykosylierung durch Tunicamycin kein Einfluß auf die Ligandenbindung gefunden (George *et al.*, 1986). Die Blockierung der PTH-Bindung an den an Weizenkeimagglutinin gebundenen Rezeptor erfolgt möglicherweise durch eine sterische Behinderung der Ausbildung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung. Die Glykosylierungsstellen liegen alle in dem C-terminalen Bereich der N-terminalen, extrazellulären Rezeptordomäne, dem eine wichtige Rolle bei der Komplexbildung zugeschrieben wird. Gewißheit über einen Einfluß von Zuckerketten auf die Bindungsaffinität läßt sich aber erst durch Bindungsstudien mit dem deglykosylierten Gesamtrezeptor erreichen.
7. Die Renaturierung von nPTHR könnte zu einem Gleichgewicht zweier Spezies, einer bindungskompetenten Form und einer bindungsunfähigen Form, führen. Ein solches Gleichgewicht würde die apparente Dissoziationskonstante erheblich erhöhen, ist aber im Falle von nPTHR nicht wahrscheinlich. Das eindeutige Disulfidmuster sowie die spektroskopische und kalorimetrische Charakterisierung weisen auf eine klar definierte Sekundär- und Tertiärstruktur hin, die sich bei Ausbildung des Komplexes nur gering ändert. Zudem konnte mittels Aktivitätsmessungen die volle Funktionalität des renaturierten Proteins nachgewiesen werden.

Die gewonnenen Daten zeigen, daß das N-terminale Segment des humanen PTH-Rezeptors in großen Mengen in *E. coli* hergestellt werden kann und nach Renaturierung eine eigenständige Proteindomäne ausbildet. Diese Domäne besitzt Ligandenbindungsaktivität – wenn auch mit verringerter Bindungsaffinität im Vergleich zum gesamten Rezeptorprotein - und kann zukünftig

als ein Modellsystem zur Untersuchung der molekularen Wechselwirkung zwischen Parathormon und seinem Rezeptor und der Struktur der Bindungspartner dienen.

3. Prokaryontische Expression und Rückfaltung des humanen Parathormon-Rezeptors

Die Expression G-Protein gekoppelte Rezeptoren in *E. coli* kann einerseits in funktioneller, zellmembraninsertierter Form, andererseits als *inclusion bodies* im Cytoplasma erfolgen. Eine funktionelle Expression mit 800 Rezeptorkopien pro Zelle wurde beispielsweise durch die Fusion des Neurotensinrezeptors an das periplasmatische Maltose-Bindungs-Protein erreicht (Tucker & Grisshammer, 1996). Ligandenbindungsstudien ergaben ähnliche Bindungs-affinitäten für die in prokaryontische Zellmembranen eingelagerten Rezeptoren im Vergleich mit eukaryontisch exprimierten Rezeptoren, bisher liegen jedoch keine quantitativen Daten für den Anteil korrekt gefalteter zu falschgefalteten Rezeptormolekülen vor. Wie auch bei der Expression von Membranproteinen in eukaryontischen Systemen scheint es ein Expressionslimit zu geben, daß nicht überschritten werden kann (Grisshammer & Tate, 1995). Die Menge an Protein, die in *inclusion bodies* abgelagert werden kann, ist im Gegensatz dazu nahezu unbegrenzt. Cytotoxische Effekte treten nur dann auf, wenn Teile der Rezeptoren nach der Translation mit der Zellmembran in Wechselwirkung treten und darin partiell inseriert werden (Kiefer *et al.*, 2000). Die Entwicklung von Rückfaltungsprozeduren für G-Protein gekoppelte Rezeptoren steht im Gegensatz zu den gut etablierten Methoden für β -barrel Membranproteine (Jähnig & Surrey, 1997) erst am Anfang, konnte jedoch für einen olfaktorischen Rezeptor erfolgreich durchgeführt werden (Kiefer *et al.*, 1996).

Da für nPTHr eine Rückfaltungsprozedur entwickelt worden war, die zu einer homogenen, disulfidverbrückten Spezies führte, wurde versucht auch den Gesamtrezeptor in *E. coli* in *inclusion bodies* herzustellen und daraus zu renaturieren. Die Expression des Rezeptors gelang dabei nur in sehr geringen Mengen, die die Expression des nPTHr bei weitem unterschritten. Das geringe Expressionsniveau des Gesamtrezeptors konnte dabei nicht durch eine schlechte Initiierung der Translation erklärt werden, da beide Proteine mit denselben N-terminalen Aminosäuren exprimiert wurden. Kiefer und Mitarbeiter, die die Überexpression von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in *E. coli inclusion bodies* untersucht haben (Kiefer *et al.*, 2000), weisen auf eine starke Korrelation positiv geladener Aminosäurereste in den *loop*-Regionen der Rezeptoren mit dem erreichten Expressionsniveau hin. Positive Ladungen in *loop*-Bereichen sollen eine Translokation der Transmembranbereiche in prokaryontischen Expressionssystemen, die laut statistischer Sequenzanalysen einer „positiv-inside-rule“ gehorchen (Von Heijne, 1986), verhindern. So

konnten Kiefer und Mitarbeiter die niedrige Expression zweier Rezeptoren durch die Einführung positiver Ladungen in *loop*-Regionen verbessern. Ein positiver Effekt wurde ab einem Anteil von 25 % positiv geladener Seitenketten festgestellt.

Eine Analyse der *loop*-Regionen des PTHR ergab, daß nur in *cytoloop* 1 mehr als 25 % positive Ladungen vorliegen. *Exoloops* 1, 2 und 3 enthalten jeweils einen Anteil positiver Ladungen von 9%, 16% und 0%. *Cytoloops* 2 und 3 enthalten 13% und 21% positiv geladene Aminosäureseitenketten. Eine Verbesserung des Expressionsniveaus könnte auch hier durch Einführung positiv geladener Aminosäuren, vor allem in den *exoloop* 1 bewirkt werden (H. Kiefer, persönliche Mitteilung). Dies würde aber eine erhebliche Änderung der Primärsequenz mit sich bringen, da, um auf einen 25%igen Anteil positiv geladener Aminosäureseitenketten in *exoloop* 1 zu kommen, mehr als 6 positive Ladungen eingeführt werden müssten. Eine Steigerung der Expression sollte deshalb zuerst durch Variation äußerer Parameter versucht werden.

Die für den Gesamtrezeptor verwendete Rückfaltungsprozedur orientierte sich an dem für nPTHR entwickelten Vorgehen. Der Rückfaltungspuffer beinhaltet wiederum ein Redoxsystem und den Faltungshelfer Arginin. Die Verdünnung des detergenzsolubilisierten *inclusion body* Materials unter die cmc des verwendeten Detergenz, sowie eine Entfernung desselben aus dem Renaturat durch Dialyse hatte überraschenderweise unter Zugabe von 1 M Arginin keinen Einfluß auf die Rezeptorlöslichkeit. Es konnte dabei eine Abhängigkeit von der Argininkonzentration festgestellt werden. Ob dieser Effekt tatsächlich auf den solubilisierenden Einfluß von Arginin zurückzuführen ist, oder fest gebundene Detergenzmoleküle den Rezeptor unter diesen Bedingungen in Lösung halten, wird durch weitere Experimente zu klären sein.

Nach einer Immunoaffinitätschromatographie des Rezeptorrenaturats in 0,1 % n-Decyl- β -Maltosid konnte der PTHR in einer Reinheit von 75% bis 80% gewonnen werden. Ligandenbindungsstudien wurden daraufhin über Messungen der Oberflächenplasmonresonanz durchgeführt. Es konnte eine spezifische Bindung mit einer apparenten Dissoziationskonstante von $62 \pm 7,9$ nM, die ca. 20fach über der für den membraninserierten Rezeptor im Radioligandenbindungstest bestimmten Dissoziationskonstante liegt, nachgewiesen werden. Bei Konkurrenz der Wechselwirkung von kovalent an den Sensorchip gebundenen PTH-Liganden und renaturiertem Rezeptor mit freiem PTH ergab sich eine apparente Dissoziationskonstante von 50,6 μ M. Diese extrem hohe Konzentration von freiem PTH, die eingesetzt werden mußte, um die Bindung des Rezeptors an den Sensorchip herabzusetzen, könnte sich über die Herabsetzung der effektiv wirksamen Konzentration des freien Parathormons in der Detergenzlösung erklären lassen. Oberflächengebundenes PTH scheint unter diesen Pufferbedingungen eine andere Aktivität zu besitzen, als das möglicherweise an Detergenzmizellen assoziierte, oder in Detergenzmizellen eingeschlossene freie Parathormon.

Eine Überprüfung dieser Hypothese sollte durch Ligandenbindungsmessungen und Kompetition im selben Meßsystem an nPTHR in detergenzhaltigem Puffer möglich sein.

Die Expression des PTH-Rezeptors in *E. coli* und Rückfaltung aus *inclusion bodies* stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, der auch trotz eines geringen Expressionsniveaus auf einfachem Wege zu größeren Mengen an Proteinmaterial im mg-Bereich führen wird. Damit ergibt sich erstmals die Möglichkeit, strukturelle und funktionelle Untersuchungen auf proteinchemischer Ebene an diesem Molekül durchzuführen.

4. Ausblick

Das Hauptaugenmerk der Forschung am humanen PTH-Rezeptor liegt auf der Charakterisierung der molekularen Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptormolekül. Dies soll es zukünftig ermöglichen, geeignete Ligandenanaloga zu entwickeln, die in der Therapie bestimmter Stoffwechselerkrankungen eingesetzt werden können (Mannstadt *et al.*, 1999).

Die in dieser Arbeit erfolgte Renaturierung einer funktionellen Ligandenbindungsdomäne nPTHR des PTH-Rezeptors eröffnet die Möglichkeit zu weitreichenden strukturellen Studien an diesem Rezeptorfragment. NMR-Messungen und Röntgenstrukturanalyse können nun eingesetzt werden, um die Struktur der N-terminalen Rezeptordomäne zusammen mit dem gebundenen Liganden aufzuklären. Darüberhinaus können durch die Entwicklung weiterer löslicher Konstrukte, die beispielsweise *exoloop*-Bereiche des Gesamt Rezeptors an nPTHR fusionieren, Einsichten über die Rolle bestimmter Rezeptorbereiche an der Ligandenbindung und Strukturbildung der N-terminalen Domäne gewonnen werden. Von besonderem medizinischen Interesse wäre die Untersuchung einer Mutante des nPTHR, in der die hochkonservierte Aminosäure Pro132 gegen Leucin ausgetauscht würde. Dieser Austausch im Gesamt Rezeptor wurde als Ursache eines Falles von Chondrodysplasie des Typs Blomstrand beschrieben (Zhang *et al.*, 1998).

Die erfolgreichen Versuche zur Expression und Rückfaltung des Gesamt Rezeptors in einem prokaryontischen System eröffnen zudem Möglichkeiten, das gesamte Rezeptorprotein direkt strukturellen Untersuchungen zugänglich zu machen. Die Aufklärung der Struktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors im atomaren Detail scheiterte bis heute in den meisten Fällen an der zu geringen zur Verfügung stehenden Proteinmenge. Dies könnte zukünftig durch die Ausarbeitung geeigneter Rückfaltungsprotokolle und die Verbesserung von Expressionsmethoden für Membranproteinrezeptoren in *E. coli* zusammen mit der in dieser Arbeit vorgestellten Expression funktioneller Domänen möglich werden.

V Literaturverzeichnis

- Adams A. E., Bisello A., Chorev M., Rosenblatt M., & Suva L. J. (1998) Arginine 186 in the extracellular N-terminal region of the human parathyroid hormone 1 receptor is essential for contact with position 13 of the hormone. *Mol.Endocrinol.* 12: 1673-1683.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., & Struhl K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Baker B. M. & Murphy K. P. (1996) Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. *Biophys.J.* 71: 2049-2055.
- Barden J. A. & Kemp B. E. (1994) Stabilized NMR structure of the hypercalcemia of malignancy peptide PTHrP[Ala-26](1-34)amide. *Biochim.Biophys.Acta* 1208: 256-262.
- Bargmann C. I. (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282: 2028-2033.
- Bazarsuren A. & Panzner S. (1999) Re-Use of Thiol Coupled Surfaces at Different Ligand Concentrations. *BiaJournal* 6: 25-26
- Beck-Sickinger A. G. (1996) Structural characterization and binding sites of G-protein-coupled receptors. *DDT* 1: 502-513.
- Behar V., Bisello A., Bitan G., Rosenblatt M., & Chorev M. (2000) Photoaffinity cross-linking identifies differences in the interactions of an agonist and an antagonist with the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor. *J Biol.Chem.* 275: 9-17.
- Behar V., Nakamoto C., Greenberg Z., Bisello A., Suva L. J., Rosenblatt M., & Chorev M. (1996) Histidine at position 5 is the specificity "switch" between two parathyroid hormone receptor subtypes. *Endocrinology* 137: 4217-4224.
- Bergwitz C., Gardella T. J., Flannery M. R., Potts J. T., Jr., Kronenberg H. M., Goldring S. R., & Juppner H. (1996) Full activation of chimeric receptors by hybrids between parathyroid hormone and calcitonin. Evidence for a common pattern of ligand- receptor interaction. *J.Biol.Chem.* 271: 26469-26472.
- Bertin B., Freissmuth M., Breyer R. M., Schutz W., Strosberg A. D., & Marullo S. (1992) Functional expression of the human serotonin 5-HT1A receptor in *Escherichia coli*. Ligand binding properties and interaction with recombinant G protein alpha-subunits. *J. Biol.Chem* 267: 8200-8206.
- Bhat T. N., Bentley G. A., Boulot G., Greene M. I., Tello D., Dall'Acqua W., Souchon H., Schwarz F. P., Mariuzza R. A., & Poljak R. J. (1994) Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 91: 1089-1093.
- Bisello A., Adams A. E., Mierke D. F., Pellegrini M., Rosenblatt M., Suva L. J., & Chorev M. (1998) Parathyroid hormone-receptor interactions identified directly by photocross-linking and molecular modeling studies. *J.Biol.Chem.* 273: 22498-22505.
- Blomstrand S., Claesson I., & Save-Soderbergh J. (1985) A case of lethal congenital dwarfism with accelerated skeletal maturation. *Pediatr.Radiol.* 15: 141-143.

- Böhm G., Muhr R., & Jaenicke R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* 5: 191-195.
- Bringham F. R. (1989) Calcium and Phosphate Distribution, Turnover, and Metabolic Actions. In: *Endocrinology* (ed L. J. DeGroot) pp. 805-843. Saunders, Philadelphia.
- Brinkmann U., Mattes R. E., & Buckel P. (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* 85: 109-114.
- Brown E. M., Gamba G., Riccardi D., Lombardi M., Butters R., Kifor O., Sun A., Hediger M. A., Lytton J., & Hebert S. C. (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366: 575-580.
- Cao Y. J., Gimpl G., & Fahrenholz F. (1995) The amino-terminal fragment of the adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) receptor functions as a high affinity PACAP binding domain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 212: 673-680.
- Caprioli R. M. & Suter M. J. F. (1995) Mass Spectrometry. In: *Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research* (eds J. A. Glasel and M. D. Deutscher) pp. 147-204. Academic Press, San Diego.
- Carter P. H., Shimizu M., Luck M. D., & Gardella T. J. (1999) The hydrophobic residues phenylalanine 184 and leucine 187 in the type- 1 parathyroid hormone (PTH) receptor functionally interact with the amino-terminal portion of PTH-(1-34). *J. Biol.Chem* 274: 31955-31960.
- Chevalley T. & Rizzoli R. (1999) Bone and hormones: Effects of parathyroid hormone on the bone. *Presse Med.* 28: 547-553.
- Chidiac P., Hebert T. E., Valiquette M., Dennis M., & Bouvier M. (1994) Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol.Pharmacol.* 45: 490-499.
- Chu F. K. (1986) Requirements of cleavage of high mannose oligosaccharides in glycoproteins by peptide N-glycosidase F. *J. Biol.Chem.* 261: 172-177.
- Cohen F. E., Strewler G. J., Bradley M. S., Carlquist M., Nilsson M., Ericsson M., Ciardelli T. L., & Nissenson R. A. (1991) Analogues of parathyroid hormone modified at positions 3 and 6. Effects on receptor binding and activation of adenylyl cyclase in kidney and bone. *J. Biol.Chem.* 266: 1997-2004.
- Coleman D. T., Fitzpatrick A., & Bilezikian J. P. (1994) In: *The Parathyroids* (eds J. P. Bilezikian, M. A. Levine, and R. Marcus) pp. 239-258. Raven Press, New York.
- Creighton T. (1992) Protein Folding. W. H. Freeman and Company, New York.
- Creighton T. E. (1993) Proteins: Structures and Molecular Properties, 2nd edn. H. Freeman and Company, New York.
- De Bernardez C. E., Schwarz E., & Rudolph R. (1999) Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods Enzymol.* 309: 217-236.
- Dempster D. W., Cosman F., Parisien M., Shen V., & Lindsay R. (1993) Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr.Rev.* 14: 690-709.

- Donnelly D., Findlay J. B. C. (1994) Seven-helix receptors: structure and modelling. *Current Opinion in Structural Biology* 4: 582-589.
- Dower W. J., Miller J. F., & Ragsdale C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145.
- Engelhard M. & Evans P. A. (1995) Kinetics of interaction of partially folded proteins with a hydrophobic dye: evidence that molten globule character is maximal in early folding intermediates. *Protein Sci.* 4: 1553-1562.
- Farrens D. L., Altenbach C., Yang K., Hubbell W. L., & Khorana H. G. (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274: 768-770.
- Felder C. C., Veluz J. S., Williams H. L., Briley E. M., & Matsuda L. A. (1992) Cannabinoid agonists stimulate both rece. *Mol.Pharmacol.* 42: 838-845.
- Fitzgerald M. C. & Siuzdak G. (1996) Biochemical mass spectrometry: worth the weight? *Chem. Biol.* 3: 707-715.
- Fitzpatrick L. A., Coleman D. T., & Bilezikian J. P. (1992) The Target Tissue Actions of Parathyroid Hormone. In: *Disorders of Bone and Mineral Metabolism* (eds F. L. Coe and M. J. Favus) pp. 123-148. Raven Press.
- Gardella T. J., Luck M. D., Fan M. H., & Lee C. (1996) Transmembrane residues of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor that specifically affect binding and signaling by agonist ligands. *J. Biol.Chem.* 271: 12820-12825.
- Gardella T. J., Wilson A. K., Keutmann H. T., Oberstein R., Potts J. T., Jr., Kronenberg M., & Nussbaum S. R. (1993) Analysis of parathyroid hormone's principal receptor-binding region by site-directed mutagenesis and analog design. *Endocrinology* 132: 2024-2030.
- Gaudin P., Couvineau A., Maoret J. J., Rouyer-Fessard C., & Laburthe M. (1996) Role of cysteine residues in the N-terminal extracellular domain of the human VIP 1 receptor for ligand binding. A site-directed mutagenesis study. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 805: 585-589.
- George S. T., Ruoho A. E., & Malbon C. C. (1986) N-glycosylation in expression and function of beta-adrenergic receptors. *J. Biol.Chem.* 261: 16559-16564.
- Gether U. & Kobilka B. K. (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J. Biol.Chem.* 273: 17979-17982.
- Gether U., Lin S., Ghanouni P., Ballesteros J. A., Weinstein H., & Kobilka B. K. (1997) Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *EMBO J* 16: 6737-6747.
- Gether U., Lin S., & Kobilka B. K. (1995) Fluorescent labeling of purified beta 2 adrenergic receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes. *J. Biol.Chem.* 270: 28268-28275.
- Gill S. C. & von Hippel P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal.Biochem.* 182: 319-326.

- Goldbaum F. A., Schwarz F. P., Eisenstein E., Cauerhff A., Mariuzza R. A., & Poljak R. J. (1996) The effect of water activity on the association constant and the enthalpy of reaction between lysozyme and the specific antibodies D1.3 and D44.1. *J. Mol. Recognit.* 9: 6-12.
- Goldman M. E., Chorev M., Reagan J. E., Nutt R. F., Levy J. J., & Rosenblatt M. (1988) Evaluation of novel parathyroid hormone analogs using a bovine renal membrane receptor binding assay. *Endocrinology* 123: 1468-1475.
- Goltzman D., Callahan E. N., Tregear G. W., & Potts J. T., Jr. (1978) Influence of guanyl nucleotides on parathyroid hormone-stimulated adenylyl cyclase activity in renal cortical membranes. *Endocrinology* 103: 1352-1360.
- Goltzmann D., Peytremann A., Callahan E., Tregear G. W., & Potts J. T., Jr. (1975) Analysis of the requirements for parathyroid hormone action in renal membranes with the use of inhibiting analogues. *J. Biol. Chem.* 250: 3199-3203.
- Gomez J. & Freire E. (1997) Thermodynamic Approach to Molecular Design. In: *Structure-Based Drug Design: Thermodynamics, Modeling and Strategy* (eds J. E. Ladbury and P. R. Connelly) Landes Bioscience.
- Grisshammer R. & Tate C. G. (1995) Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q. Rev. Biophys.* 28: 315-422.
- Gronwald W., Schomburg D., Tegge W., & Wray V. (1997) Assessment by ¹H NMR spectroscopy of the structural behaviour of human parathyroid-hormone-related protein(1-34) and its close relationship with the N-terminal fragments of human parathyroid hormone in solution. *Biol. Chem.* 378: 1501-1508.
- Hargrave P. A. & McDowell J. H. (1992) Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB J.* 6: 2323-2331.
- Harlow E. & Lane D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NJ.
- Heukeshoven J. & Dernick R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9: 28-32.
- Holdgate G. A., Tunnicliffe A., Ward W. H., Weston S. A., Rosenbrock G., Barth P. T., Taylor I. W., Pauptit R. A., & Timms D. (1997) The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry* 36: 9663-9673.
- Holtzhauer M. (1996) In: *Methoden in der Proteinanalytik*.
- Iiri T., Farfel Z., & Bourne H. R. (1998) G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature* 394: 35-38.
- Insel P. A., Maguire M. E., Gilman A. G., Bourne H. R., Coffino P., & Melmon K. L. (1976) Beta adrenergic receptors and adenylate cyclase: products of separate genes? *Mol. Pharmacol.* 12: 1062-1069.
- Jähnig F. & Surrey T. (1997) Folding and Insertion of Proteins into Membranes. In: *Membrane Protein Assembly* (ed G. von Heijne) R. G. Landes Company.

- Janin J. & Chothia C. (1990) The structure of protein-protein recognition sites. *J. Biol.Chem.* 265: 16027-16030.
- Jelesarov I. & Bosshard H. R. (1999) Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol.Recognit.* 12: 3-18.
- Ji T. H., Grossmann M., & Ji I. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol.Chem* 273: 17299-17302.
- Jobert A. S., Zhang P., Couvineau A., Bonaventure J., Roume J., Le Merrer M., & Silve C. (1998) Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia. *J. Clin.Invest.* 102: 34-40.
- Juppner H. (1994) Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient family of G protein-coupled receptors. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 3: 371-378.
- Juppner H., Schipani E., Bringhurst F. R., McClure I., Keutmann H. T., Potts J. T., Jr., Kronenberg H. M., Abou-Samra A. B., Segre G. V., & Gardella T. J. (1994) The extracellular amino-terminal region of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor determines the binding affinity for carboxyl-terminal fragments of PTH-(1-34). *Endocrinology* 134: 879-884.
- Karnik S. S., Sakmar T. P., Chen H. B., & Khorana H. G. (1988) Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 85: 8459-8463.
- Karpf D. B., Arnaud C. D., Bambino T., Duffy D., King K. L., Winer J., & Nissenson R. A. (1988) Structural properties of the renal parathyroid hormone receptor: hydrodynamic analysis and protease sensitivity. *Endocrinology* 123: 2611-2620.
- Karpf D. B., Arnaud C. D., King K., Bambino T., Winer J., Nyireddy K., & Nissenson R. A. (1987) The canine renal parathyroid hormone receptor is a glycoprotein: characterization and partial purification. *Biochemistry* 26: 7825-7833.
- Karpf D. B., Bambino T., Alford G., & Nissenson R. A. (1991) Features of the renal parathyroid hormone-parathyroid hormone-related protein receptor derived from structural studies of receptor fragments. *J. Bone Miner.Res.* 6: 173-182.
- Kenakin T. (1997) Agonist-specific receptor conformations. *Trends Pharmacol.Sci* 18: 416-417.
- Kennedy M. E. & Limbird L. E. (1993) Mutations of the alpha 2A-adrenergic receptor that eliminate detectable palmitoylation do not perturb receptor-G-protein coupling. *J. Biol.Chem.* 268: 8003-8011.
- Kiefer H., Krieger J., Olszewski J. D., Von Heijne G., Prestwich G. D., & Breer H. (1996) Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli*: purification, reconstitution, and ligand binding. *Biochemistry* 35: 16077-16084.
- Kiefer H., Vogel R., & Maier K. (2000) Bacterial Expression of G-protein Coupled Receptors: Prediction of Expression Levels from Sequence. *Receptors.Channels* (im Druck).

- Kirk W. R., Kurian E., & Prendergast F. G. (1996) Characterization of the sources of protein-ligand affinity: 1-sulfonato- 8-(1')anilinonaphthalene binding to intestinal fatty acid binding protein. *Biophys.J.* 70: 69-83.
- Kjelsberg M. A., Cotecchia S., Ostrowski J., Caron M. G., & Lefkowitz R. J. (1992) Constitutive activation of the alpha 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *J. Biol.Chem.* 267: 1430-1433.
- Kolakowski L. F., Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors.Channels* 2: 1-7.
- Konig B., Arendt A., McDowell J. H., Kahlert M., Hargrave P. A., & Hofmann K. P. (1989) Three cytoplasmic loops of rhodopsin interact with transducin. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 86: 6878-6882.
- Koshland D. E., Jr. & Neet K. E. (1968) The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annu.Rev.Biochem.* 37: 359-410.
- Kresheck G. C., Vitello L. B., & Erman J. E. (1995) Calorimetric studies on the interaction of horse ferricytochrome c and yeast cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* 34: 8398-8405.
- Kronenberg H. M., Abou-Samra A., Bringham F. R., Gardella T. J., Jüppner H., & Segre G., V (1997) In: *Molecular Genetics in Endocrine Disorders* (ed R. V. Thakker) Chapman&Hall, London.
- Kurland C. & Gallant J. (1996) Errors of heterologous protein expression. *Curr.Opin.Biotechnol.* 7: 489-493.
- Ladbury J. E., Wright J. G., Sturtevant J. M., & Sigler P. B. (1994) A thermodynamic study of the trp repressor-operator interaction. *J. Mol.Biol.* 238: 669-681.
- Lambright D. G., Sondek J., Bohm A., Skiba N. P., Hamm H. E., & Sigler P. B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379: 311-319.
- Lee C., Gardella T. J., Abou-Samra A. B., Nussbaum S. R., Segre G. V., Potts J. T., Jr., Kronenberg H. M., & Juppner H. (1994) Role of the extracellular regions of the parathyroid hormone (PTH)/PTH- related peptide receptor in hormone binding. *Endocrinology* 135: 1488-1495.
- Lee C., Luck M. D., Juppner H., Potts J. T., Jr., Kronenberg H. M., & Gardella T. J. (1995) Homolog-scanning mutagenesis of the parathyroid hormone (PTH) receptor reveals PTH-(1-34) binding determinants in the third extracellular loop. *Mol.Endocrinol.* 9: 1269-1278.
- Lefkowitz R. J., Cotecchia S., Samama P., & Costa T. (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol.Sci* 14: 303-307.
- Lerner D. J., Chen M., Tram T., & Coughlin S. R. (1996) Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function. *J. Biol.Chem.* 271: 13943-13947.
- Lilie H., Schwarz E., & Rudolph R. (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr.Opin.Biotechnol.* 9: 497-501.
- Lin S. W. & Sakmar T. P. (1996) Specific tryptophan UV-absorbance changes are probes of the transition of rhodopsin to its active state. *Biochemistry* 35: 11149-11159.

- Lin T. Y. & Timasheff S. N. (1996) On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Sci.* 5: 372-381.
- Liu J., Schoneberg T., van Rhee M., & Wess J. (1995) Mutational analysis of the relative orientation of transmembrane helices I and VII in G protein-coupled receptors. *J. Biol.Chem.* 270: 19532-19539.
- Livingstone J. R., Spolar R. S., & Record M. T., Jr. (1991) Contribution to the thermodynamics of protein folding from the reduction in water-accessible nonpolar surface area. *Biochemistry* 30: 4237-4244.
- Lohse M. J. (1992) Stable overexpression of human beta 2-adrenergic receptors in mammalian cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 345: 444-451.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., & Randall R. J. (1951) *J. Biol.Chem.* 193: 265.
- Macke J. P., Davenport C. M., Jacobson S. G., Hennessey J. C., Gonzalez-Fernandez F., Conway B. P., Heckenlively J., Palmer R., Maumenee I. H., & Sieving P. (1993) Identification of novel rhodopsin mutations responsible for retinitis pigmentosa: implications for the structure and function of rhodopsin. *Am. J. Hum.Genet.* 53: 80-89.
- Main B. G. & Tucker H. (1985) Recent advances in beta-adrenergic blocking agents. *Prog.Med.Chem* 22: 121-164.
- Mandiyan V., O'Brien R., Zhou M., Margolis B., Lemmon M. A., Sturtevant J. M., & Schlessinger J. (1996) Thermodynamic studies of SHC phosphotyrosine interaction domain recognition of the NPXpY motif. *J. Biol.Chem* 271: 4770-4775.
- Mannstadt M., Juppner H., & Gardella T. J. (1999) Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am. J. Physiol.* 277: F665-F675.
- Mannstadt M., Luck M. D., Gardella T. J., & Juppner H. (1998) Evidence for a ligand interaction site at the amino-terminus of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor from cross-linking and mutational studies. *J.Biol.Chem.* 273: 16890-16896.
- Marchese A., George S. R., Kolakowski L. F., Jr., Lynch K. R., & O'Dowd B. F. (1999) Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology. *Trends Pharmacol.Sci* 20: 370-375.
- Marston F. A. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem.J* 240: 1-12.
- Marx U. C., Adermann K., Bayer P., Meyer M., Forssmann W. G., & Rosch P. (1998) Structure-activity relation of NH2-terminal human parathyroid hormone fragments. *J. Biol.Chem.* 273: 4308-4316.
- Marx U. C., Austermann S., Bayer P., Adermann K., Ejchart A., Sticht H., Walter S., Schmid F. X., Jaenicke R., & Forssmann W. G. (1995) Structure of human parathyroid hormone 1-37 in solution. *J. Biol.Chem.* 270: 15194-15202.
- Marx U. C., Austermann S., Bayer P., Adermann K., Ejchart A., Sticht H., Walter S., Schmid F. X., Jaenicke R., & Forssmann W. G. (1995) Structure of human parathyroid hormone 1-37 in solution. *J. Biol.Chem.* 270: 15194-15202.

- Meijberg W., Schuurman-Wolters G. K., & Robillard G. T. (1998) Thermodynamic evidence for conformational coupling between the B and C domains of the mannitol transporter of *Escherichia coli*, enzyme II_{mtl}. *J. Biol.Chem.* 273: 7949-7956.
- Mitlak B. H., Burdette-Miller P., Schoenfeld D., & Neer R. M. (1996) Sequential effects of chronic human PTH (1-84) treatment of estrogen- deficiency osteopenia in the rat. *J. Bone Miner.Res.* 11: 430-439.
- Mizobe T., Maze M., Lam V., Suryanarayana S., & Kobilka B. K. (1996) Arrangement of transmembrane domains in adrenergic receptors. Similarity to bacteriorhodopsin. *J. Biol.Chem.* 271: 2387-2389.
- Munch G., Dees C., Hekman M., & Palm D. (1991) Multisite contacts involved in coupling of the beta-adrenergic receptor with the stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein. Structural and functional studies by beta-receptor-site-specific synthetic peptides. *Eur.J. Biochem.* 198: 357-364.
- Munro S., Thomas K. L., & Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61-65.
- Murphy K. P., Xie D., Garcia K. C., Amzel L. M., & Freire E. (1993) Structural energetics of peptide recognition: angiotensin II/antibody binding. *Proteins* 15: 113-120.
- Nanevicz T., Wang L., Chen M., Ishii M., & Coughlin S. R. (1996) Thrombin receptor activating mutations. Alteration of an extracellular agonist recognition domain causes constitutive signaling. *J. Biol.Chem.* 271: 702-706.
- Nathans J. & Hogness D. S. (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* 34: 807-814.
- Northup J. K., Sternweis P. C., Smigel M. D., Schleifer L. S., Ross E. M., & Gilman A. G. (1980) Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 77: 6516-6520.
- O'Dowd B. F., Hnatowich M., Caron M. G., Lefkowitz R. J., & Bouvier M. (1989) Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J. Biol.Chem.* 264: 7564-7569.
- O'Hara P. J., Sheppard P. O., Thogersen H., Venezia D., Haldeman B. A., McGrane V., Houamed K. M., Thomsen C., Gilbert T. L., & Mulvihill E. R. (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 11: 41-52.
- Ohyama K., Yamano Y., Chaki S., Kondo T., & Inagami T. (1992) Domains for G-protein coupling in angiotensin II receptor type I: studies by site-directed mutagenesis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 189: 677-683.
- Pace C. N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* 131: 266-280.
- Pace C. N. (1990) Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem.Sci.* 15: 14-17.
- Pace N. C. & Scholtz M. J. (1997) Measuring the Conformational Stability of a Protein. In: *Protein Structure: A Practical Approach* (ed T. Creighton) pp. 299-322. IRL Press, Oxford.

- Pantoliano M. W., Horlick R. A., Springer B. A., Van Dyk D. E., Tobery T., Wetmore D. R., Lear J. D., Nahapetian A. T., Bradley J. D., & Sisk W. P. (1994) Multivalent ligand-receptor binding interactions in the fibroblast growth factor system produce a cooperative growth factor and heparin mechanism for receptor dimerization. *Biochemistry* 33: 10229-10248.
- Pebay-Peyroula E., Rummel G., Rosenbusch J. P., & Landau E. M. (1997) X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* 277: 1676-1681.
- Plotkin H., Gundberg C., Mitnick M., & Stewart A. F. (1998) Dissociation of bone formation from resorption during 2-week treatment with human parathyroid hormone-related peptide-(1-36) in humans: potential as an anabolic therapy for osteoporosis. *J. Clin.Endocrinol.Metab.* 83: 2786-2791.
- Potts J. T., Jr. & Juppner H. (1997) Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in calcium homeostasis, bone metabolism, and bone development: the proteins, their genes, and receptors. In: *Metabolic Bone Disease* (eds L. V. Avioli and H. P. Krohn) pp. 51-94. Academic, New York.
- Potts J. T., Jr., Gardella T. J., Juppner H., & Kronenberg H. (1997) The history of parathyroid hormone and its receptor: structure-based design of parathyroid hormone analogues. *Osteoporos.Int.* 7 Suppl 3: S169-S173.
- Privalov P. L. (1992) Physical Basis of the Stability of the Folded Conformations of Proteins. In: *Protein Folding* (ed T. Creighton) pp. 83-126. W. H. Freeman and Company, New York.
- Riddles P. W., Blakeley R. L., & Zerner B. (1983) Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* 91: 49-60.
- Rivas G., Stafford W., & Minton A. P. (1999) Characterization of heterologous protein-protein interactions using analytical ultracentrifugation. *Methods* 19: 194-212.
- Rogl H., Kosemund K., Kuhlbrandt W., & Collinson I. (1998) Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Lett.* 432: 21-26.
- Rölz C., Pellegrini M., & Mierke D. F. (1999) Molecular characterization of the receptor-ligand complex for parathyroid hormone. *Biochemistry* 38: 6397-6405.
- Rudolph R., Böhm G., Lilie H., & Jaenicke R. (1998) In: *Protein Function: A Practical Approach* (ed T. E. Creighton) pp. 57-99. IRL Press at Oxford University, Oxford.
- Rudolph, R., Fischer, S., and Mattes, US Patent 5,453,363 (1995).
- Sakmar T. P. (1998) Rhodopsin: a prototypical G protein-coupled receptor. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 59: 1-34.
- Samama P., Cotecchia S., Costa T., & Lefkowitz R. J. (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol.Chem.* 268: 4625-4636.
- Sanger F., Nicklen S., & Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 74: 5463-5467.

- Schägger H. & von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal.Biochem.* 166: 368-379.
- Schertler G. F. & Hargrave P. A. (1995) Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 92: 11578-11582.
- Schertler G. F. (1999) Structure of rhodopsin. *Novartis.Found.Symp.* 224: 54-66.
- Schertler G. F., Villa C., & Henderson R. (1993) Projection structure of rhodopsin. *Nature* 362: 770-772.
- Schipani E., Jensen G. S., Pincus J., Nissenson R. A., Gardella T. J., & Juppner H. (1997) Constitutive activation of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling pathway by parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptors mutated at the two loci for Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *Mol.Endocrinol.* 11: 851-858.
- Schipani E., Kruse K., & 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., & Juppner H. (1996) Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia [see comments]. *N.Engl.J.Med.* 335: 708-714.
- Schipani E., Langman C., Hunzelman J., Le Merrer M., Loke K. Y., Dillon M. J., Silve C., & Juppner H. (1999) A novel parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mutation in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *J Clin.Endocrinol.Metab* 84: 3052-3057.
- Schmid F. X. (1989) In: *Protein Structure: A Practical Approach* (ed T. E. Creighton) pp. 251-285. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- Schwartz T. W. & Rosenkilde M. M. (1996) Is there a 'lock' for all agonist 'keys' in 7TM receptors?. *Trends Pharmacol.Sci* 17: 213-216.
- Schwyzer R. (1986) Molecular mechanism of opioid receptor selection. *Biochemistry* 25: 6335-6342.
- Segre G. V., Rosenblatt M., Reiner B. L., Mahaffey J. E., & Potts J. T., Jr. (1979) Characterization of parathyroid hormone receptors in canine renal cortical plasma membranes using a radioiodinated sulfur-free hormone analogue. Correlation of binding with adenylate cyclase activity. *J. Biol.Chem.* 254: 6980-6986.
- Shigeno C., Yamamoto I., Kitamura N., Noda T., Lee K., Sone T., Shiomi K., Ohtaka A., Fujii N., & Yajima H. (1988) Interaction of human parathyroid hormone-related peptide with parathyroid hormone receptors in clonal rat osteosarcoma cells. *J. Biol.Chem.* 263: 18369-18377.
- Slavik J. (1982) Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim.Biophys.Acta* 694: 1-25.
- Spiegel A. M. (1996) Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annu.Rev.Physiol.* 58: 143-170.
- Spolar R. S. & Record M. T., Jr. (1994) Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* 263: 777-784.

- Stanasila L., Massotte D., Kieffer B. L., & Pattus F. (1999) Expression of delta, kappa and mu human opioid receptors in *Escherichia coli* and reconstitution of the high-affinity state for agonist with heterotrimeric G proteins. *Eur.J. Biochem.* 260: 430-438.
- Strader C. D., Fong T. M., Graziano M. P., & Tota M. R. (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J* 9: 745-754.
- Strader C. D., Fong T. M., Tota M. R., Underwood D., & Dixon R. A. (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu.Rev.Biochem.* 63: 101-132.
- Studier F. W. & Moffatt B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol.Biol.* 189: 113-130.
- Suva L. J., Winslow G. A., Wettenhall R. E., Hammonds R. G., Moseley J. M., Diefenbach-Jagger H., Rodda C. P., Kemp B. E., Rodriguez H., & Chen E. Y. (1987) A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 237: 893-896.
- Szalai C., Triga D., & Czimmer A. (1998) C112R, W323S, N317K mutations in the vasopressin V2 receptor gene in patients with nephrogenic diabetes insipidus. *Hum.Mutat.* 12: 137-138.
- Takasu H., Gardella T. J., Luck M. D., Potts J. T., Jr., & Bringhurst F. R. (1999) Amino-terminal modifications of human parathyroid hormone (PTH) selectively alter phospholipase C signaling via the type 1 PTH receptor: implications for design of signal-specific PTH ligands. *Biochemistry* 38: 13453-13460.
- Tannhauser T. W., Konishis Y., & Scheraga H. S. (1987) In: *Methods in Enzymology* pp. 115-119. Academic Press, New York.
- Tarentino A. L., Gomez C. M., & Plummer T. H., Jr. (1985) Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry* 24: 4665-4671.
- Tate C. G. & Grisshammer R. (1996) Heterologous expression of G-protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol.* 14: 426-430.
- Teich A., Lin H. Y., Andersson L., Meyer S., & Neubauer P. (1998) Amplification of Cole1 related plasmids in recombinant cultures of *Escherichia coli* after IPTG induction. *J.Biotechnol.* 64: 197-210.
- Tucker J. & Grisshammer R. (1996) Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem.J* 317 (Pt 3): 891-899.
- Turcatti G., Ceszowski K., & Chollet A. (1993) Biochemical characterization and solubilization of human NK2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Recept.Res.* 13: 639-652.
- Turner P. R., Bambino T., & Nissenson R. A. (1996) Mutations of neighboring polar residues on the second transmembrane helix disrupt signaling by the parathyroid hormone receptor. *Mol.Endocrinol.* 10: 132-139.
- Unger V. M., Hargrave P. A., Baldwin J. M., & Schertler G. F. (1997) Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* 389: 203-206.
- Usdin T. B., Gruber C., & Bonner T. I. (1995) Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J. Biol.Chem.* 270: 15455-15458.

- Von Heijne G. (1986) Net N-C charge imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J. Mol.Biol.* 192: 287-290.
- Vu T. K., Wheaton V. I., Hung D. T., Charo I., & Coughlin S. R. (1991) Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* 353: 674-677.
- Waldmann L. (1998) Spektroskopische Charakterisierung von Proteinen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wall M. A., Coleman D. E., Lee E., Iniguez-Lluhi J. A., Posner B. A., Gilman A. G., & Sprang S. R. (1995) The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* 83: 1047-1058.
- Warburg O. & Christian W. (1941) *Biochemische Zeitung* 310: 384.
- Welton A. F., Lad P. M., Newby A. C., Yamamura H., Nicosia S., & Rodbell M. (1977) Solubilization and separation of the glucagon receptor and adenylate cyclase in guanine nucleotide-sensitive states. *J. Biol.Chem.* 252: 5947-5950.
- Wess J. (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* 11: 346-354.
- Wilmen A., Goke B., & Goke R. (1996) The isolated N-terminal extracellular domain of the glucagon-like peptide-1 (GLP)-1 receptor has intrinsic binding activity. *FEBS Lett.* 398: 43-47.
- Woody R. A. & Dunker K. A. (1996) Aromatic and Cysteine Side-Chain Circular Dichroism in Proteins. In: *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* (ed G. D. Fasman) pp. 109-158. Plenum Press, New York.
- Xie D., Gulnik S., Collins L., Gustchina E., Bhat T. N., & Erickson J. W. (1998) Thermodynamics and proton uptake for pepstatin binding to retroviral and eukaryotic aspartic proteases. *Adv.Exp.Med.Biol.* 436: 381-386.
- Zhang P., Jobert A. S., Couvineau A., & Silve C. (1998) A homozygous inactivating mutation in the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor causing Blomstrand chondrodysplasia. *J. Clin.Endocrinol.Metab* 83: 3365-3368.
- Zhou A. T., Bessalle R., Bisello A., Nakamoto C., Rosenblatt M., Suva L. J., & Chorev M. (1997) Direct mapping of an agonist-binding domain within the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor by photoaffinity crosslinking. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 94: 3644-3649.
- Zhou W., Flanagan C., Ballesteros J. A., Konvicka K., Davidson J. S., Weinstein H., Millar R. P., & Sealfon S. C. (1994) A reciprocal mutation supports helix 2 and helix 7 proximity in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol.Pharmacol.* 45: 165-170.

VI Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ANS	1-Anilino-8-naphtalensulfonat
app.	apparent
bp	Basenpaar(e)
CD	Circulardichroismus
D	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	Differential Scanning Kalorimetrie
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluoreszenz assorted Cell Sorting
Gl.	Gleichung
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IMAC	Immobilisierte
	Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
K_d	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
LDAO	N,N-Dimethyldodecylamin-N-Oxid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
nPTHR	N-terminale Domäne des Parathormon-rezeptors
	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTH	Parathormon
PTHR	Parathormon-Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
	Umdrehungen pro Minute
rpm	
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WGA	Weizenkeimagglutinin

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

Halle, März 2000

Die vorliegende Arbeit wurde vom November 1996 bis März 2000 am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe Proteintechnologie bei Professor Rainer Rudolph angefertigt.

Herrn Professor Rainer Rudolph möchte sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen und Arbeitssituationen danken. Hauke Lilie und Gerald Böhm waren mir unermüdliche Diskussionspartner und Hilfen bei der Erstellung dieser Arbeit. Konrad Honold und Steffen Panzner danke ich für die Betreuung des ersten Teils meiner Arbeit. Dank gebührt dabei auch Matthias Brandsch und Ria Baumgräß, die mir Einiges zum Umgang mit eukaryontischen Zellen beigebracht haben und mir äußerst anregende Diskussionspartner waren. Thomas Kiefhaber und Herrn Prof. Alfred Blume möchte ich ganz herzlich für die unproblematische Nutzung ihrer kalorimetrischen Meßgeräte danken. Gerrit Präfke und Christan Herrmann sei gedankt für die hervorragende Einführung in die kalorimetrische Untersuchung von Protein-Peptid-Wechselwirkungen mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie. Herzlichen Dank auch an Karin Berr, mit der ich in abendfüllenden Telefonaten allerlei Einzelheiten der Proteinchemie im Allgemeinen und Besonderen besprechen konnte, sowie an Peter Bayer und Karl Peter Rücknagel. Allen Mitgliedern des Lehrstuhls, vorangestellt Ariuna Bazarsuren, Tanja Lisse, Sabine Meyenburg und Kai Stubenrauch, danke ich vielmals für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die vielen kleinen und großen Hilfen im Laboralltag.

Besonders möchte ich mich bei meiner Mutter, Eva, Horst und Faust bedanken, deren Unterstützung diese Arbeit ermöglichte und erleichterte.

Lebenslauf

Name: Ulla Grauschopf
Geburtsdatum: 23. Mai 1971
Geburtsort: Leonberg (Baden-Württemberg)
Eltern: Gerd Grauschopf und Brigitte Grauschopf, geb. Wiegandt

Ausbildung:

Sept. 1977 – Juli 1981 Besuch der Spitalschule in Leonberg und der Endelbang-Grundschule in Stuttgart
Sept. 1981 – Mai 1990 Besuch des Karlsruhgymnasiums in Stuttgart
8. Mai 1990 Abiturprüfung
Nov. 1990 – Mai 1995 Studium der Biochemie an der Universität Regensburg
Dez. 1994 – Mai 1995 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biophysikalische Chemie (Prof. Jaenicke) unter Anleitung von James Bardwell. Thema: Biophysikalische und Genetische Analyse des C-X-X-C-Motivs der Oxidoreduktase DsbA
26. Mai 1995 Diplomprüfung
Juli 1995 – Nov. 1996 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Dez. 1996 – März 2000 Doktorarbeit am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg