

**G-Protein gekoppelte Rezeptoren für Parathormon:
Molekulare Determinanten der intrazellulären
Signalwegankopplung**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Ulla Heindel
aus
Würzburg

Würzburg 2005

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

Isaac Newton

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 1999 bis 2004 im Endokrinologischen Labor der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg unter der Leitung von Privatdozent Dr. med. Eberhard Blind angefertigt.

Eingereicht am: 19.08.2005

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ulrich Scheer

Gutachter: PD Dr. med. Eberhard Blind

Gutachter: Prof. Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums: 03.03.2006

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass die eingereichte Arbeit nicht anderweitig in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich keine weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 18.08.2006

Ulla Heindel

Danksagung

Herrn Privatdozent Dr.med. Eberhard Blind gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die immerwährende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr.med. Bruno Allolio möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Endokrinologischen Labor bedanken und für das kontinuierliche Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Erich Buchner danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Besonderer Dank gilt Susanne Meyer für ihre Mithilfe und den großen Einsatz bei allen Projekten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr.cand.med. Thomas Wobbe für die Mithilfe am Projekt der „Hybrid-Rezeptoren“ und bei Dr.cand.med. Farhad Daneschwar für seine Beiträge zum „TM 7-Mutanten“-Projekt.

Martina Zink sei gedankt für die hervorragende Betreuung der Zellkultur.

Herrn Dr. Jean-Pierre Vilardaga gebührt mein Dank für die stetige Diskussionsbereitschaft und die unproblematische Nutzung des konfokalen Mikroskops.

Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Piet Tas und Dr.cand.med. Falk Hauptmann für die Unterstützung bei den Messungen des intrazellulären Kalziums.

Allen ehemaligen und noch aktiven Mitarbeitern des endokrinologischen Labors danke ich vielmals für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die vielen kleinen und großen Hilfen im Laboralltag.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, Bettina und Tobias bedanken, deren Unterstützung diese Arbeit ermöglichte und erleichterte.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation gelang es, die strukturellen und molekularen Determinanten der PTH-Rezeptoren für die Ankopplung an intrazelluläre Signalwege näher zu charakterisieren.

Die Regulation des Kalzium-, Phosphat- und Knochenstoffwechsels wird zum erheblichen Teil über den PTH1-Rezeptor (P1R) vermittelt. Parathormon (PTH) aktiviert am P1R mindestens zwei Signalwege: den durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelten Weg und den Phospholipase C-Signalweg (PLC). Der nahe verwandte PTH2-Rezeptor (P2R) kann außer durch PTH auch über das tuberoinfundibuläre Peptid (TIP39) aktiviert werden. Jedoch besitzt dieser Rezeptor keine Ankopplung an den PLC-Signalweg.

Zur Aufklärung der strukturellen und molekularen Determinanten der intrazellulären Signalwegankopplung wurden verschiedene Versuchsansätze ausgewählt, die eine Untergliederung dieser Arbeit in drei Teilprojekte ermöglicht:

1) Die PTH-Rezeptoren sind wichtige Vertreter der Klasse II der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der siebten Transmembrandomäne dieser Klasse zeigt ein hoch konserviertes, cytosolnahes „YCFXN“-Motiv in diesem Bereich. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte durch Punktmutationen der einzelnen Aminosäuren dieses Motivs gezeigt werden, dass dieser Abschnitt eine entscheidende Determinierungsregion dieser Rezeptorfamilie sowohl für die Ankopplung an den cAMP-Weg, als auch an den PLC-Signalweg darstellt. Die Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass dieser Bereich für die Stabilisierung der Konformation dieser Rezeptoren von großer Bedeutung ist.

2) In einem zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde durch stufenweise Angleichung des P2R an den P1R eine Reihe von funktionell exprimierten P2R/P1R Hybridrezeptoren hergestellt, die eine Übereinstimmung des intrazellulären Bereichs des P1R von bis zu 95 % erreichen. Der Nachweis des PLC-Signalwegs durch die Bestimmung der akkumulierten Gesamtinositolphosphate und des intrazellulären Kalziums zeigte eindrucksvoll, dass trotz einer weitgehenden intrazellulären Übereinstimmung der Aminosäuresequenz des P2R mit dem P1R die Eigenschaft des P1R an den PLC-Signalweg zu koppeln nicht auf den P2R übertragen werden kann. Dies legt nahe, dass auch extrazelluläre Bereiche und Transmembranabschnitte die Ankopplung an intrazelluläre Signalwege steuern. Im Weiteren konnte für den cAMP-Signalweg durch diese Hybridrezeptoren gezeigt werden, dass im Kontext des P2R eingefügte Teilabschnitte des P1R (C-Terminus, zweite und dritte intrazelluläre Schleife) zusammenwirken und eine effizientere Ankopplung an den cAMP-Weg ermöglichen. Weiterführende Untersuchungen der Membrantranslokation von β -Arrestin2 mit einer anschließenden Internalisierung des Rezeptors

zeigten, dass sowohl der P2R als auch die hiervon abgeleiteten Hybridrezeptoren selektiv durch Stimulation mit TIP39, nicht jedoch nach einer Stimulation mit PTH, eine Translokation bewirken. Dieses Ereignis ist von den untersuchten Signalwegen (cAMP-, PLC- und Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg) unabhängig. Erstmals wurde hier gezeigt, dass der P2R eine Phosphorylierung von MAPK bewirkt, wobei hierfür einer β -Arrestin2 Translokation nicht notwendig ist.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der PTH-Rezeptor in unterschiedlichen Rezeptorkonformationen existiert, so dass einzelne Rezeptorabschnitte unabhängig voneinander verschiedene Signale aktivieren können.

3) Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Identifikation von intrazellulären Interaktionspartnern des humanen P1R.

Neue Protein-Interaktionen mit dem humanen P1R wurden mit einem „Yeast-two-Hybrid“ System identifiziert. Mit Hilfe dieser Methode konnte, als ein potentiell bedeutender intrazellulärer Interaktionspartner des humanen P1R, das PDZ-Protein PDZK1 identifiziert werden. Es gelang mit Hilfe von Koimmunpräzipitations-Experimenten und von GST-pull-down-Assays die Interaktion von PDZK1 mit dem P1R zu verifizieren. PDZK1 bindet an eine Liganden-Bindungsdomäne innerhalb des C-terminalen Abschnitts des P1R, vermutlich an die letzten vier Aminosäuren. Durch einen Hefe-Interaktionstest konnte von den vier in diesem Protein vorkommenden PDZ-Domänen die PDZ1-Domäne als einzige selektiv mit dem P1R interagierende Domäne identifiziert werden. In der Niere interagiert PDZK1 über die PDZ3-Domäne mit dem Na/P_i-Transporter IIa. Eine attraktive Hypothese ist daher die Funktion von PDZK1 als einem Bindeglied zwischen dem Rezeptor und dem Transporter und die damit einhergehende PTH-vermittelte Regulation des Phosphattransports in der Niere. Diese Hypothese bedarf aber noch weiterer funktioneller Analysen (z.B. durch Untersuchungen an PDZK1 Knock-Out Mäusen).

Summary

In this project we identified structural and molecular determinants of the PTH receptor family with importance for coupling to intracellular signaling pathways.

The PTH1-receptor (P1R) is involved in the systemic regulation of calcium and phosphate metabolism, and plays a decisive role in bone metabolism. PTH achieves this by activation of at least two intracellular signalling pathways: the adenylyl cyclase (AC) and the phospholipase C (PLC) pathway. The closely related PTH2-receptor (P2R) is, in addition to PTH, also activated by tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP 39), but unlike the P1R, does not couple to the PLC signaling pathway.

This project achieved the identification of structural and molecular determinants by three different approaches:

1) The PTH receptors belong to the class II of G-protein coupled receptors. A comparison of the amino acid sequences of the seventh transmembrane domain shows a highly conserved “YCFXN”-motif near the cytosolic interface of this domain. To examine the role of this conserved motif individual point mutations of these amino acids were generated and evaluated. Studies of the receptor mutants obtained showed that this region plays an important role in coupling to the adenylyl cyclase pathway as well as to the PLC signaling pathway. The data obtained in this work suggests that the “YCFXN”-motif is of significant importance for the stabilisation of the receptor conformation.

2) To identify the structural features responsible for activating the PLC pathway, we engineered a series of hybrid P1R/P2R receptor chimeras by gradually adapting the P2R's cytosolic interface to a P1R-like sequence. These modifications of key differing regions in the second and third loop, and the C-terminal tail allowed for > 95 % of P1R sequence in the cytosolic interface of the P2R. Despite these changes it was not possible to transfer the property of P1R to couple to the PLC signaling pathway to the P2R as shown impressively by the lack of activation of the PLC signaling pathway using measurements of inositol and intracellular calcium. Apparently, extracellular regions as well as transmembrane domains are required for selective coupling to intracellular signaling pathways. By contrast we could show for the cAMP signaling pathway, that when > 95 % of the P2R's cytosolic interface had a P1R-like sequence, P1R epitopes apparently interacted with each other to result in a more efficient coupling to the cAMP signaling pathway. Stimulation of the receptor by its ligands leads to translocation of β -arrestin2 to the cell surface thus initiating internalisation of the receptor. The P2R, as well as the hybrid P1R/P2R receptor chimeras, showed β -arrestin2 translocation selectively after stimulation with TIP39 but not after stimulation with PTH. Ligand-induced translocation of β -arrestin2 was completely independent

from cAMP-, PLC- and mitogen activated protein kinases (MAPK) signaling pathways in the P2R and its derived chimeric mutants. Furthermore, we could show here for the first time, that the P2R can activate MAPK and that this is independent from a β -arrestin2 translocation.

In conclusion, the PTH-receptors can exist in different receptor conformations which apparently allow the receptors to activate different signals independently.

3) Another goal of this work was the identification of intracellular proteins interacting with the human P1R.

A yeast-two-hybrid system was used to identify new protein-protein interactions of the human P1R. Using this method a possible important interacting protein could be identified. This protein was a PDZ-protein, named PDZK1. To verify this interaction co-immunoprecipitation experiments as well as GST-pull-down experiments were done. Binding of PDZK1 occurred within the C-terminal region of the P1R and there probably within the last four amino acids. PDZK1 has four PDZ-domains of which the first one was the exclusively interacting domain with the P1R, as determined by a additional yeast-two-hybrid interaction experiment.

In kidney the interaction of PDZK1 with the Na/P_i-transporter type IIa occurs via the third PDZ-domain. A hypothesis is that PDZK1 acts as a connecting link between the receptor and the transporter together with a PTH-mediated regulation of the phosphate-transport in kidney. However, this hypothesis will require further studies (e.g. experiments with PDZK1 knock-out mice).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Überblick.....	1
1.2	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	1
1.2.1	Strukturelle Eigenschaften von G-Protein gekoppelten Rezeptoren	1
1.2.2	Ligandenbindung und Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren	3
1.2.3	Signalübertragung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren	4
1.2.4	Klassifizierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren	5
1.3	Liganden des PTH1- und PTH2-Rezeptors.....	6
1.3.1	Parathormon (PTH).....	6
1.3.2	Parathormon-related Protein (PTHrP)	7
1.3.3	Tuberoinfundiläres Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP39).....	9
1.4	Der PTH/PTHrP-Rezeptor (PTH1-Rezeptor, P1R)	10
1.4.1	Allgemeine Struktur des PTH1-Rezeptors	10
1.4.2	Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung.....	11
1.4.3	Signaltransduktion und Rezeptorregulation.....	12
1.5	Der PTH2-Rezeptor (P2R)	14
1.5.1	Allgemeine Struktur des PTH2-Rezeptors	14
1.5.2	Ligandenbindung und Signaltransduktion am PTH2-Rezeptor.....	15
1.6	PDZ-Proteine.....	15
1.6.1	Eigenschaften und Funktionen von PDZ-Proteinen	15
1.6.2	Aufbau einer PDZ-Domäne und strukturelle Bindungseigenschaften	16
1.6.3	Strukturelle und chemische Eigenschaften des Bindungsproteins	17
1.7	Zielsetzung	19
2	Material	21
2.1	Chemikalien	21
2.2	Laborgeräte.....	22
2.3	Sonstige Materialien und Reagenzien	23
2.4	Kits (kommerzielle Reagenziensätze).....	24
2.5	Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine	25
2.6	Peptide.....	26
2.7	Enzyme.....	26
2.8	Antikörper	27
2.9	Primer	28
2.9.1	Sequenzspezifische Primer	28

2.9.2	Vektorspezifische Primer.....	30
2.10	Plasmide	31
2.11	Bakterien- und Hefestämme.....	33
2.11.1	E.coli-Stämme.....	33
2.11.2	Saccharomyces cerevisiae.....	34
2.12	Zelllinien	35
2.13	Medien für die Bakterienkultur	37
2.14	Medien für die Hefekultur.....	38
2.15	Lösungen und Materialien für die Zellkultur und Bioassays	39
2.16	Computerprogramme und Internet-Adressen.....	40
2.16.1	Computergestützte Sequenzanalyse.....	40
2.16.2	Computerprogramme	40
3	Methoden.....	41
3.1	Bakterienkultur.....	41
3.1.1	Kultur auf Platten.....	41
3.1.2	Kultur im Flüssigmedium	41
3.1.3	Kurzzeitige Konservierung von Bakterienstämmen.....	41
3.1.4	Langfristige Lagerung von Bakterienstämmen (Glycerinkultur)	41
3.1.5	Bestimmung der optischen Dichte (OD) aus einer Bakterienflüssigkultur	41
3.1.6	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	42
3.1.7	Herstellung elektrokompenter Zellen	42
3.2	Molekularbiologische Standardmethoden.....	43
3.2.1	Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterienzellen	43
3.2.2	Plasmid-Maxi-Präparation	44
3.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	45
3.2.4	DNA-Konzentrationsbestimmung aus Agarosegelen.....	45
3.2.5	DNA-Fällung	45
3.2.6	DNA-Reinigung mittels Phenol / Chloroform.....	46
3.2.7	Enzymatische Spaltung von DNA (Restriktionsverdau)	46
3.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	47
3.2.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	47
3.2.10	Dephosphorylierung von 5`-Enden mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps	48
3.2.11	Ligation von DNA-Fragmenten.....	48
3.2.12	Transformation chemisch kompetenter Zellen	49
3.2.13	Transformation elektrokompenter Zellen	49

3.2.14	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	49
3.2.15	Klonierung mit dem TA Cloning Kit (Invitrogen)	51
3.2.16	Sequenzierung von DNA	52
3.2.17	Isolierung von RNA aus Zellen	52
3.2.18	Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)	53
3.3	Proteinchemische Standardmethoden	54
3.3.1	Isolierung von Proteinen aus Zellen	54
3.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	54
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
3.3.4	Färbung von Proteinen mit Coomassie-Brilliantblau	57
3.3.5	„Western-Blotting“ (Immunoblotting)	57
3.3.6	Immundetektion und Luminolnachweis	58
3.3.7	Nachweis von phosphorylierten MAP-Kinasen	59
3.3.8	In-vitro Transkription und Translation	60
3.3.9	Koimmunpräzipitation von Proteinen.....	60
3.3.10	Induktion von GST-Fusionsproteinen	60
3.3.11	Aufreinigung von GST-Fusionsprotein	61
3.3.12	GST ”pull-down“-Assay.....	61
3.3.13	Membranpräparation aus Zellen	62
3.4	Zellkultur.....	63
3.4.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	63
3.4.2	Kultivieren von Zelllinien.....	64
3.4.3	Transfektion von Zelllinien	65
3.5	Bioassays.....	67
3.5.1	Kompetitive Verdrängungsreaktion mit radioaktiv markiertem rPTH (1-34).....	67
3.5.2	Bestimmung des akkumulierten cAMP nach PTH-Stimulation	67
3.5.3	Messung der akkumulierten Gesamtinositole nach Stimulation mit PTH(1-34) oder TIP39.....	68
3.5.4	Pharmakologische Hemmung von Proteinkinasen	69
3.5.5	Formelzusammenfassung zur Berechnung der Bindungsdaten	69
3.6	Messung von freigesetztem intrazellulärem Ca ²⁺ nach PTH-Stimulation	72
3.7	Untersuchung der β -Arrestin Translokation mittels konfokaler Mikroskopie.....	73
3.8	“Yeast-two-Hybrid“-Methoden.....	73
3.8.1	Kultur von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bierhefe).....	73
3.8.2	Verpaarung von haploiden Hefezellen	74
3.8.3	Transformation von Hefe nach der Lithiumacetat-Methode	75
3.8.4	“Yeast–two-Hybrid“-Screen.....	76

3.8.5	Plasmidpräparation aus Hefe	77
3.8.6	Präparation von Proteinextrakten aus Hefe	77
4	Ergebnisse	80
4.1	Charakterisierung eines hochkonservierten Abschnitts der siebten Transmembrandomäne des PTH1-Rezeptors (P1R)	80
4.1.1	Sequenzvergleich verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren der Klasse II	80
4.1.2	Generierung von Mutationen im konservierten Bereich der siebten Transmembrandomäne (TM7-Mutanten)	81
4.1.3	Bindungseigenschaften und Signaltransduktion der TM7-Mutanten	83
4.2	Charakterisierung von PTH1-/ PTH2-Rezeptor Hybridmutanten.....	97
4.2.1	Vergleich der humanen PTH2-Rezeptor (P2R) Aminosäuresequenz mit der humanen PTH1-Rezeptor-Aminosäuresequenz (P1R)	97
4.2.2	Konstruktion von Hybridmutanten des PTH1- und PTH2-Rezeptors	98
4.2.3	Bindungseigenschaften und Signaltransduktion der Hybrid-Rezeptoren	99
4.2.4	Translokation von β -Arrestin 2-GFP nach Stimulation mit hPTH (1-34) oder TIP39	116
4.2.5	Aktivierung von MAP-Kinasen nach Stimulation mit hPTH (1-34) und hTIP39	119
4.3	Identifikation intrazellulärer Interaktionspartner des humanen PTH1-Rezeptors	121
4.3.1	Die Herstellung der „Köderplasmide“	121
4.3.2	Screenen einer humanen Nierenbibliothek	122
4.3.3	Identifizierung verschiedener intrazellulärer Interaktionspartner des PTH1-Rezeptors	122
4.3.4	Charakterisierung des PDZ-Proteins PDZK1	130
4.3.5	Kartierung der Bindungsdomäne von PDZK1 mit dem PTH1-Rezeptor	132
4.3.6	Ein 3D-Modell der PDZ1-Domäne von PDZK1	134
4.3.7	Analyse der molekularen Determinanten für die Bindung von PDZK1 an den PTH1-Rezeptor	136
4.3.8	Koimmunpräzipitation von PDZK1 und dem PTH1-Rezeptor	139
4.3.9	GST-Pull-down von PDZK1 mit dem C-Terminus des PTH1-Rezeptors.....	141
4.3.10	Expression von verschiedenen PDZ-Proteinen und MAP17 in diversen Zelllinien.....	144
5	Diskussion	149
5.1	Der Einfluss von hoch konservierten Aminosäuren der siebten Transmembrandomäne auf den PKA- und PKC-Signalweg	149
5.1.1	Einfluss von polaren Aminosäuren der Transmembrandomänen auf die Bindungsaffinität.....	150
5.1.2	Auswirkungen der Mutationen auf die Ankopplung an G-Proteine	152
5.2	Funktionelle Charakterisierung von PTH1- / PTH2-Rezeptorhybriden	160

5.2.1	Intrazelluläre Rezeptormutationen verändern die Ligandenbindungscharakteristika nicht	161
5.2.2	Ist eine Übertragung von Signaleigenschaften vom PTH1-Rezeptor auf den PTH2-Rezeptor durch Angleichung bestimmter Aminosäuren möglich?	161
5.2.3	Wie wirkt sich eine Angleichung des intrazellulären Bereichs des PTH2-Rezeptors an den PTH1-Rezeptor auf den cAMP-Signalweg aus?	165
5.2.4	Eine durch den Liganden induzierte Translokation von β -Arrestin2 ist beim PTH2-Rezeptor und dessen Hybridrezeptoren unabhängig von einer G-Protein Aktivierung	167
5.2.5	Aktivierung von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) durch hPTH (1-34) und TIP39	170
5.3	Analyse der Interaktion des humanen PTH1-Rezeptors mit intrazellulären Proteinen ..	173
5.3.1	Identifizierung eines PDZ-Proteins	173
5.3.2	Bestimmung der interagierenden PDZ-Domäne mit dem PTH1-Rezeptor	175
5.3.3	Strukturanalyse der PDZ1-Domäne von PDZK1	176
5.3.4	Expression von PDZK1 in verschiedenen Zelllinien	177
5.3.5	Beteiligung von PDZK1 an der Regulation des Phosphattransports in der Niere	177
6	Literaturverzeichnis	182
7	Anhang	196

1 Einleitung

1.1 Überblick

Lebende Zellen sind durch Zellmembranen von ihrer Umgebung abgegrenzt, welche als selektive Barrieren zwischen Zelle und Umwelt wirken. Alle Lebensprozesse beruhen im wesentlichen auf den strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Membranen. Die Zelle ist darauf angewiesen einen gerichteten Stoff-, Energie- und Informationsaustausch mit ihrer Umgebung zu unterhalten. Dieses wurde im Laufe der Evolution durch den Einbau von Ionenkanälen, Ionenpumpen und Rezeptoren in die Zellmembran ermöglicht. Durch Ionenkanäle ist ein passiver Transport von Ionen entlang ihres Konzentrationsgefälles möglich, wohingegen Ionenpumpen einen aktiven Transport ermöglichen. Durch Rezeptoren können extrazelluläre Signale, wie z.B. chemische Substanzen, Licht, mechanische Kräfte oder elektrochemische Impulse selektiv ins Zellinnere weiter gegeben werden, wo durch Aktivierung von intrazellulären Signalwegen eine biologische Antwort ausgelöst werden kann. Diese biologische Antwort umfasst lebenswichtige Prozesse, wie Zellteilung, Zellbewegung, Zellstoffwechsel, Morphogenese oder Differenzierung. Die Entwicklung vom Einzeller, welcher mit der gesamten Zelle auf einen Umgebungsreiz antwortet, bis zum vielzelligen, komplexen Organismus spiegelt sich auch in der zunehmenden Komplexität des Signalübertragungsapparates wieder. Eine wichtige Gruppe von Rezeptoren, die hierbei eine Rolle spielen, sind die sogenannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Diese findet man bei Einzellern wie *Saccharomyces cerevisiae*, oder mehrzelligen Organismen wie *Caenorhabditis elegans*, bis hin zum komplex aufgebauten Säugetier.

1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

1.2.1 Strukturelle Eigenschaften von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren umfassen eine große Gruppe von Membranrezeptoren mit mehr als tausend Vertretern. Sie vermitteln eine Vielzahl biologischer Funktionen, wie z.B. Geruch, Sehen, Tasten, Hormonsekretion, Zellwachstum und –differenzierung, Chemotaxis, Exozytose, Kontrolle des Blutdrucks, Embryogenese und Entwicklung [92]. Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren weist ein hohes Ligandenspektrum auf. So können diese Rezeptoren z.B. durch Amine (z.B. Dopamin, Noradrenalin), Aminosäuren und ihre Derivate (z.B. Glutamat), Hormone, Neurotransmitter, Photonen, Glykoproteine, Nukleotide und Gerüche [87, 215] stimuliert werden.

Der allgemeine Aufbau (Abb. 1-1) G-Protein gekoppelter Rezeptoren ist definiert durch exakt sieben, die Membran durchspannende α -Helices, mit einer Länge von 20-27 Aminosäuren, wel-

che durch drei extrazelluläre Schleifen und durch drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Einen vierten intrazellulären Loop findet man z.B. beim α - und β -adrenergen Rezeptor. Dieser kommt durch eine Palmitoylierung einer Cystein-Seitenkette des C-Terminus zustande [87, 130, 173]. Die verbindenden Loop-Regionen können eine Länge von 5 bis 230 Aminosäuren aufweisen. Im extrazellulären Bereich befindet sich der N-terminale Abschnitt mit einer variablen Länge von 7 bis 595 Aminosäuren und im Cytosol der C-terminale Abschnitt des Rezeptors, mit einer Länge von 12 bis 359 Aminosäuren [120]. Die Größe der Rezeptoren kann dabei stark variieren und reicht von weniger als 300 Aminosäuren (z.B. Adrenokortikotropin-Rezeptor) bis hin zu mehr als 1100 Aminosäuren (z.B. metabotrope Glutamatrezeptoren).

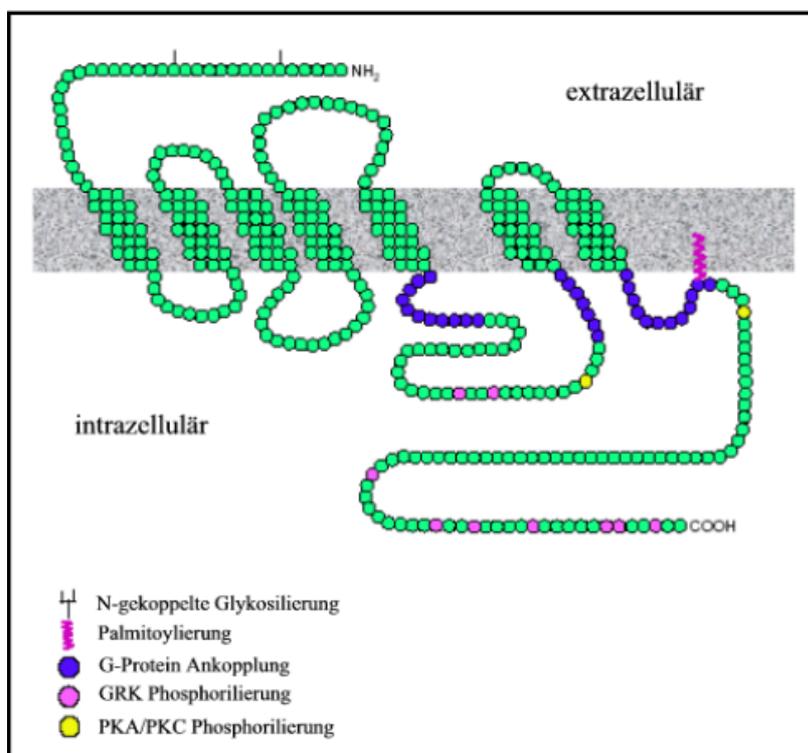


Abb. 1-1: Allgemeine, schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors.

Charakteristische Eigenschaften sind in Farbe dargestellt. Die Bindung von Liganden findet im N-terminalen, extrazellulären Bereich statt und kann auch Teile der extrazellulären Schleifen beinhalten. Phosphorylierungsstellen für G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs) findet man normalerweise im C-terminalen Bereich. Bei manchen Rezeptoren sind diese Phosphorylierungsstellen aber auch im Bereich der intrazellulären Schleifen zu finden.

PKA: Proteinkinase A;

PKC: Proteinkinase C.

(Nach Lefkowitz R. et al. (2000))

Die extrazellulären Bereiche und Teile der Transmembranabschnitte sind dabei für Wechselwirkungen mit dem Liganden verantwortlich, während der intrazelluläre Bereich selektiv an der G-Protein Ankopplung und somit an der Aktivierung vieler verschiedener Effektormoleküle und / oder Ionenkanäle beteiligt ist [215, 251].

Eine genaue räumliche Anordnung der Aminosäuren von G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist lediglich bei Rhodopsin bekannt [62, 178, 202].

Basierend auf den Untersuchungen zur Struktur der bakteriellen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin [105], ein aus sieben Transmembrandomänen bestehendes Protein von *Halobacterium halobium*, wurden weitere Modelle von Membranproteinen, welche der Superfamilie von G-Protein gekoppelten Rezeptoren angehören, erstellt. Bakteriorhodopsin selbst zählt nicht zu der

Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, ist aber dennoch funktionell mit dem Rhodopsin verwandt und somit wahrscheinlich strukturell ähnlich. Weitere Untersuchungen von J. Baldwin und Kollegen zur Struktur von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in Bezug auf die topologische Anordnung der verbindenden Schleifen, die ermittelten amphipatischen Eigenschaften und die Variabilität der verschiedenen Helices, geben weitere Hinweise auf die tatsächliche räumliche Struktur dieser Rezeptoren-Superfamilie [5].

1.2.2 Ligandenbindung und Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren weisen ein sehr weites Spektrum an Liganden auf, welches von kleinen Peptiden bis zu sehr großen Glykoproteinen reicht. Die beteiligten Bereiche, an der die Bindung von Liganden stattfindet, sind demzufolge sehr unterschiedlich. Kleine Liganden, wie z.B. Histamin und Adrenalin binden im hydrophoben Kernbereich des Rezeptors, welcher durch die in die Membran eingebetteten α -Helices gebildet wird. Rezeptoren für Peptidhormone binden ihre Liganden im Kernbereich unter Beteiligung der extrazellulären Schleifen. Eine Bindung großer Glykoproteine findet unter Beteiligung sowohl des N-terminalen Bereichs, als auch der extrazellulären Schleifen und des Kernbereichs statt [77, 87]. Es konnte eine schwach positive Korrelation zwischen der Länge des N-Terminus und der Größe des Liganden festgestellt werden, die auf eine Rolle dieses Bereichs bei der Bindung von großen Polypeptiden und Glykoprotein-Hormonen hinweist. Eine erwähnenswerte Ausnahme ist der 600 Aminosäuren lange N-terminale Bereich von Rezeptoren für Neurotransmitter, der sehr kleine Liganden, wie z.B. Kalziumionen oder Glutamat, bindet [120].

Die Aktivierung von Proteaserezeptoren, wie z.B. beim Thrombinrezeptor, basiert auf der Proteolyse des N-terminalen Segments [244]. Es entstehen ein neuer N-Terminus und ein kurzes Rezeptorfragment. Das neu freigesetzte N-terminale Segment dient nun als Ligand und aktiviert über die Wechselwirkung mit den extrazellulären Schleifen und den Transmembranbereichen den Rezeptor [32, 168].

Eine weitere Besonderheit findet sich bei Rhodopsin und den Opsin-Rezeptoren. Diese besitzen einen kovalent gebundenen Liganden [183], der durch eine photoneninduzierte Konformationsänderung den Rezeptor aktiviert [229].

Die Bindung des Liganden und die daraufhin folgende Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors kann mit dem Modell von Koshland und Neet [138], welches auf der Hypothese der konformationellen Selektion beruht und mittels des „*extended ternary complex*“-Modells [44, 149, 200] beschrieben werden. Nach diesen Modellen existieren Rezeptoren in mindestens zwei verschiedenen Zuständen R und R*, wobei es sich bei R um die inaktive Form des Rezeptors handelt, die nicht mit G-Proteinen interagieren kann. R* stellt die aktive Form dar, die im Falle

von G-Protein gekoppelten Rezeptoren aus einem Komplex besteht, der sowohl den Agonist, den Rezeptor als auch das G-Protein beinhaltet. Die beiden Formen R und R* liegen im Gleichgewicht vor, wobei in Abwesenheit eines Liganden eine Verschiebung zur Seite der inaktiven Rezeptorform R zu finden ist. Die Energieschwelle zwischen R und R* ist gering, so dass auch in Abwesenheit eines Liganden einige Rezeptoren vom inaktiven Zustand in den aktiven Zustand übergehen können, was zu einer messbaren Basalaktivität führt.

Die Wirksamkeit eines Liganden besteht in der Fähigkeit das Gleichgewicht zwischen R und R* zu verschieben. Ein Ligand, welcher mit hoher Affinität an R* bindet und eine Verschiebung auf die Seite der aktiven Rezeptoren bewirkt, nennt man auch Agonist. Im Gegensatz hierzu binden inverse Agonisten, bevorzugt an die inaktive Form des Rezeptors und bewirken eine Verschiebung auf die Seite von R [18, 35]. Inverse Agonisten drücken zudem die Basalaktivität unter den üblichen Wert. Als neutrale Agonisten bezeichnet man Liganden, die sowohl an R als auch an R* binden und keinen Einfluss auf das Gleichgewicht ausüben [200]. Bindet ein Ligand nur in geringem Maße an R* und verursacht eine geringe Gleichgewichtsverschiebung zu Gunsten R*, so bezeichnet man diesen als partiellen Agonisten.

Anhand dieses Modells können viele Eigenschaften von G-Protein gekoppelten Rezeptoren beschrieben werden. Trotzdem müssen künftig noch komplexere Modelle aufgestellt werden um die Bindung des Liganden an den Rezeptor und die damit verbundenen Aktivierungsprozesse besser zu beschreiben [129].

1.2.3 Signalübertragung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Die Bindung eines Agonisten an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor führt intrazellulär zu einer Ankopplung an G-Proteine (Guanosintrisphosphat (GTP)-bindende Proteine) und daraufhin zu einer Aktivierung von einem oder mehreren „*second messengern*“, wie z.B. Adenylatzyklase, Phospholipase A, C oder D, Phosphodiesterase oder Ionenkanälen.

G-Proteine gehören zu der Superfamilie der GTPasen und sind an der cytoplasmatischen Seite der Membran gebunden. Sie setzen sich aus heterotrimeren Komplexen zusammen, welche aus einer α -, β - und γ -Untereinheit bestehen. Bisher wurden 20 verschiedene α -Untereinheiten, 6 β - und 12 γ -Untereinheiten auf Grund ihrer Aminosäureähnlichkeiten beschrieben, die zu einer Vielzahl von $\alpha\beta\gamma$ -Trimeren assemblieren können. Es kann zwischen vier G-Protein-Unterfamilien unterschieden werden [12, 107]. Die Unterfamilie bezeichnet als G_s führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase, während G_i die Adenylatzyklase hemmt. Eine Aktivierung der Phospholipase C wird durch G_q ausgelöst. Die Funktion der Unterfamilie G_{12}/G_{13} ist noch nicht bekannt [96].

Die inaktive Form eines G-Proteins besteht aus dem heterotrimeren Komplex, an den GDP gebunden ist. Die Aktivierung von G-Proteinen beginnt mit deren Ankopplung an bestimmte cytoplasmatische Bereiche von aktivierten Rezeptoren. Durch die Bindung von GTP kommt es zu einer Abspaltung der α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Sowohl die α -Einheit, als auch das $\beta\gamma$ -Heterodimer sind in der Lage nachgeschaltete Signalwege zu aktivieren. Weitere Untersuchungen zeigen, dass die $\beta\gamma$ -Einheit z.B. in der Lage ist an den MAPK- und JNK-Signalweg zu koppeln [92].

Das G-Protein wird inaktiviert, indem durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit GTP in GDP gespalten wird und der $\beta\gamma$ -Komplex mit der α -Einheit reassoziert. Dieser trimere Komplex steht dann für eine erneute Aktivierung zur Verfügung. Ein aktivierter Rezeptor ist in der Lage innerhalb kürzester Zeit viele G-Proteine zu aktivieren, was zu einer Amplifikation des Signals führt [109, 195]. So kann z.B. der durch Licht aktivierte Rhodopsin-Rezeptor mehr als 3000 G-Proteine pro Sekunde zu einer Reaktion bewegen [99].

1.2.4 Klassifizierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Die Einteilung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in verschiedene Familien erfolgt durch Sequenzvergleiche und auf Grund ihrer biochemischen Eigenschaften. Dabei unterscheidet man sechs Familien, die ihrerseits in Unterfamilien aufgegliedert sind. Die Einteilung in die unterschiedlichen Familien erfolgt auf Grund der unterschiedlichen Liganden, wie bioaktive Amine, Glykoproteine, Lipide, Purine, Eicosanoide, Proteasen oder Chemokine [136].

Die Rezeptoren der Familie I bis III kommen ausschließlich im Bereich der *Metazoa* vor, wohingegen die Familie IV und V aus Rezeptoren besteht, die sich bei Pilzen, wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Ustilago maydis* finden. Vertreter der Familie VI, oder auch die cAMP-Familie genannt, sind ausschließlich beim Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* zu finden.

Die Klasse I ist die größte und am besten untersuchte Familie. Zu ihr gehören z.B. die sehr gut untersuchten Rezeptoren für Rhodopsin und der β_2 -adrenerge Rezeptor, sowie die Rezeptoren für Thrombin, Angiotensin, Serotonin und Dopamin. Die Sequenzhomologie innerhalb dieser Gruppe ist sehr gering und beschränkt sich auf einige wenige Aminosäuren, die aber wegen ihres hohen Konservierungsgrades eine strukturelle und funktionelle Rolle nahe legen.

Die Klasse III der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist durch einen extrem langen N-terminalen Bereich von 500 - 600 Aminosäuren gekennzeichnet. Diese Familie umfasst Rezeptoren, wie z.B. den metabotropen Glutamatrezeptor, den Calcium-Rezeptor oder Pheromonrezeptoren.

Die Klasse II beinhaltet ungefähr 20 verschiedene Rezeptoren, mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Peptidhormonen und Neuropeptiden als Liganden. Als Vertreter dieser Familie stehen unter anderem die Rezeptoren für Sekretin, vasoaktives-intestinales Peptid (VIP), Wachstumshormon-Releasing-Hormon (GRH), Glukagon, Calcitonin und Parathormon (PTH).

tumshormon-Releasing-Hormon (GRH), Glukagon, Calcitonin und Parathormon (PTH). Diese Familie zeichnet sich durch einen großen extrazellulären N-terminalen Bereich von 100 bis 170 Aminosäuren aus, welcher eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung spielt und weiterhin vier konservierte Konsensussequenzen für die N-Glykosylierung enthält. Innerhalb des extrazellulären Bereichs finden sich acht Cysteinreste, von denen sechs vermutlich ein konserviertes Disulfidmuster darstellen. Diese Hypothese wird gestützt durch eine Beeinträchtigung der Ligandenbindungsfähigkeit unter reduzierenden Bedingungen bei mehreren Rezeptoren dieser Familie und durch Mutagenesestudien dieser Cysteinseitenketten [74, 148].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem PTH / PTHrP-Rezeptor (P1R) und dem ebenfalls der Klasse II angehörenden PTH2-Rezeptor (P2R). Im Folgenden soll nun näher auf diese beiden Rezeptoren und ihre Liganden eingegangen werden.

1.3 Liganden des PTH1- und PTH2-Rezeptors

1.3.1 Parathormon (PTH)

1.3.1.1 Biosynthese und Metabolismus

Parathormon ist ein 84 Aminosäuren langes Polypeptid, welches in der Nebenschilddrüse synthetisiert und sezerniert wird. Wie viele andere sekretorische Proteine wird PTH als 115 Aminosäuren langes Prä-Pro-Hormon (Prä-Pro-PTH) synthetisiert [94, 106, 238]. Die Prä-Pro-Sequenz wird von einem RNA-Protein-Komplex erkannt, welcher von einem Rezeptor am Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebunden wird. Prä-Pro-PTH wird daraufhin über einen Kanal ins Innere des ER geschleust. An der Innenseite der ER-Membran befindet sich eine Signal-Peptidase, welche die Prä-Sequenz, bestehend aus 25 Aminosäuren, abspaltet und ein 90 Aminosäuren langes Pro-PTH übrig lässt. Von hier aus wird das Pro-Hormon über einen sekretorischen Weg zum Golgi-Apparat transportiert, wo die Pro-Sequenz aus 6 Aminosäuren abgespalten wird und das intakte PTH aus 84 Aminosäuren (PTH (1-84)) in Granulae gespeichert und anschließend sezerniert wird. Pro-PTH besitzt eine kurze Halbwertszeit von 15 Minuten und wird nicht, wie z.B. Proinsulin, sezerniert. Erst das intakte PTH (1-84) wird als Antwort auf einen Abfall des extrazellulären Kalziums in den Blutkreislauf eingeschleust. Intaktes PTH besitzt während der Zirkulation im Blut eine Halbwertszeit von wenigen Minuten [20]. Eine Spaltung von intaktem PTH geschieht aber auch schon in der Nebenschilddrüse. Die Zellen der Nebenschilddrüse besitzen nämlich ebenfalls einen Abbauweg für PTH, welcher Kalzium-sensitiv ist, und somit eine Anpassung an die extrazellulären Erfordernisse darstellt [93]. In geringem Umfang wird PTH (1-86) auch in der Niere abgebaut [157], trotzdem wird der größte Anteil in den Kupffer-Sternzellen der Leber gespalten. Die Spaltung erfolgt meistens zwischen den Aminosäuren 33 und 43, aber es wurden auch Fragmente mit N-terminalen Resten

wurden auch Fragmente mit N-terminalen Resten aus 24 und 28 Aminosäuren beobachtet [95, 151]. Die daraus resultierenden PTH-Fragmente gelangen wieder in den Blutkreislauf, wo sie an den Zielzellen, die den PTH-Rezeptor tragen, aktiv werden. Die resultierenden biologisch aktiven N-terminalen Fragmente sind, ebenso wie das intakte PTH, nur in geringem Maße im Blut messbar, wo hingegen das C-terminale Fragment für mehrere Stunden im Blut nachgewiesen werden kann [1, 95].

1.3.1.2 Physiologische Wirkung von PTH

PTH reguliert zusammen mit Calcitonin und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ die Kalziumhomöostase im Blut indem Kalzium aus Knochen mobilisiert wird, eine Steigerung der Kalzium-Absorption im Darm stattfindet und die renale Rückresorption von Kalzium in den distalen Tubuli der Niere verstärkt wird. Jedoch wird durch PTH im proximalen Tubulusabschnitt die Reabsorption von Phosphat gehemmt. Die Wirkung an Knochen und Niere wird direkt über die Aktivierung von PTH-Rezeptoren durch die Bindung von PTH vermittelt, wohingegen die Absorption von Kalzium im Darm indirekt über 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ausgelöst wird. In der Niere kommt es durch eine gesteigerte Aktivität der 1 α -Hydroxylase, welche durch PTH angeregt wird, zu einer vermehrten Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wirkt außerdem direkt auf den Kalzium- und Phosphattransport der Niere.

Durch einen „Feedback“-Mechanismus des extrazellulären Kalziums wird die Ausschüttung von PTH geregelt. Sinkt der extrazelluläre Kalziumspiegel ab, kommt es durch die Aktivierung des Calcium-Sensing-Rezeptors (CaSR) zu einer vermehrten Ausschüttung von PTH aus den Zellen der Nebenschilddrüse [22]. Hingegen wird eine längerfristige Kalziumhomöostase durch eine vermehrte Transkription des PTH-Gens bewirkt, was durch einen erniedrigten Serumkalziumspiegel ausgelöst wird [169].

1.3.2 Parathormon-related Protein (PTHrP)

1.3.2.1 Molekulare Eigenschaften von PTHrP

Das Gen für PTH-related-Protein (PTHrP) überspannt im Genom einen Bereich von 15 kb und besteht aus acht Exons. Für dieses Gen wurden drei Promotoren identifiziert [25, 154], sowie eine transkriptionelle Diversität, welche durch alternatives Splicing des Primärtranskripts erreicht wird [155, 224]. Dadurch können drei unterschiedliche Proteine generiert werden, die sich in ihrer Länge und Aminosäuresequenz am C-Terminus unterscheiden. Sie besitzen 139, 141 oder 173 Aminosäuren [257].

Die Gene für PTH und PTHrP zeigen eine hohe Ähnlichkeit in Bezug auf ihre strukturelle Organisation, was auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung schließen lässt [21, 257]. Trotzdem finden sich bei einem Aminosäurevergleich der beiden Proteine nur acht identische Amino-

säuren innerhalb der ersten 13 Aminosäuren des N-Terminus (Abb. 1-2). Im weiteren Bereich der Sequenz findet man keine weiteren Homologien.

	1	15	30
hPTH (1-34)	SVSEIQ	LMHNLGKHLNSMER	VEWLRKKLQDVHNF
hPTHrP (1-34)	AVSEHQ	LLHDKGKSIQDLRR	FFLHHLIAEIH

Abb. 1-2: Vergleich der Primärstrukturen der aminoterminalen Bereiche des humanen Parathormon (hPTH (1-34)) und des humanen Parathormon-related Protein (hPTHrP (1-34)). Farblich dargestellt sind die identischen Aminosäuren der beiden Peptide, wobei alleine im Bereich der Aminosäuren 1-13 acht identische Aminosäuren zu finden sind.

Sowohl intaktes PTHrP, als auch das aminoterminal (1-36)-Fragment binden mit der gleichen Affinität an den PTH1-Rezeptor wie hPTH (1-34) und lösen auch dieselben intrazellulären Antworten aus [146]. Kürzere Fragmente von PTHrP sind weniger potent [128] oder wirken sogar als Antagonisten am PTH1-Rezeptor, wie z.B. das (7-34)-Fragment [166].

Am PTH2-Rezeptor wirkt PTHrP als Antagonist. Es bindet an den PTH2-Rezeptor, löst aber keine messbaren intrazellulären Antworten aus [72].

1.3.2.2 Physiologische Wirkung und Metabolismus von PTHrP

Parathormon-related-Protein (PTHrP) wurde 1987 beim Syndrom der Tumorhyperkalzämie entdeckt [21, 164]. PTHrP wird durch die Tumoren ektopisch sezerniert und wurde als ein maßgeblicher Faktor der Tumorhyperkalzämie identifiziert. Das Syndrom der Tumorhyperkalzämie wurde erstmals 1941 von Fuller Albright beschrieben und steht häufig im Zusammenhang mit soliden Tumoren der Lunge, der Niere oder Plattenepithelkarzinomen [193]. Dieses paraneoplastische Syndrom ist gekennzeichnet durch eine Unterbrechung der normalen Kalziumhomöostase, wie sie bei Patienten mit primärem Hyperparathyreodismus beobachtet wird. Die pathophysiologischen Auswirkungen zeigen sich durch einen erhöhten cAMP-Spiegel im Urin, durch Hyperkalzämie, Hyperkalziurie und manchmal durch einen gesteigerten 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Spiegel [21, 162, 192].

PTHrP wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wie z.B. in der Schilddrüse, dem Knochenmark, der Nebenschilddrüse, der Magenschleimhaut, in fötaler Leber [117] und in einer Reihe von Zelllinien. In neuroendokrinen Zelltypen, wie man sie z. B. in Zellen des Zentralnervensystems, der Schilddrüse oder der Hirnanhangdrüse findet, wird PTHrP in sekretorische Vesikel verpackt, während in der Nebenschilddrüse über eine Co-Sekretion mit PTH spekuliert

wird [158]. In Zellen, wie z.B. Keratinozyten, Osteoblasten, Chondrozyten oder in Zellen der glatten Muskulatur wird PTHrP über eine konstitutive Ausschüttung von sekretorischen Vesikeln sezerniert, so dass die Menge des ausgeschütteten Proteins von der Menge des synthetisierten Proteins abhängig ist [249]. Über den Metabolismus von PTHrP ist wenig bekannt. Es werden aber einige Gemeinsamkeiten mit PTH vermutet. So könnte PTHrP durch die glomeruläre Filtration aus dem Blut entfernt werden, da sich bei Patienten mit chronischem Nierenversagen ein signifikanter Anstieg von carboxyterminalen PTHrP-Fragmenten im Blut findet [176]. Auch eine Bindung an den PTH1-Rezeptor (P1R), die damit verbundene Rezeptor-vermittelte Endozytose und anschließende lysosomale Degradation führt zu einem Entfernen von PTHrP aus dem Blutkreislauf [2, 60].

Eine physiologische Rolle als systemischer Regulator scheint PTHrP nicht zu besitzen, außer beim transplazentaren Kalziumtransport, welcher aber nicht über den gemeinsamen PTH1-Rezeptor vermittelt wird [139]. Neben der parakrin-vermittelten Relaxation von glatter Muskulatur [27], spielt PTHrP eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von fötalem und adultem Gewebe [89]. Außerdem scheint PTHrP eine wichtige Funktion bei der Knochen- und Knorpelentwicklung zu spielen, da bei „knock-out“-Mäusen, welche PTHrP nicht mehr exprimieren können, massive Skelettfehlbildungen zu beobachten sind [146].

1.3.3 Tuberoinfundiläres Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP39)

TIP39 (tuberoinfundiläres Peptid aus 39 AS) wurde im Jahr 1999 von T.B. Usdin und Kollegen aus dem Hypothalamus des Rindes isoliert und ist das dritte Mitglied der PTH-Ligandenfamilie [234]. TIP39 ist ein potenter Aktivator des humanen-, ratten- und zebrafisch-PTH2-Rezeptors ($EC_{50} = 0,5-0,8$ nM) [111, 236], wirkt aber als Antagonist am PTH1-Rezeptor [110]. Die Aktivierung des PTH2-Rezeptors der Ratte durch TIP39 resultiert in einem zweifach höheren cAMP-Anstieg als dies durch PTH erreicht wird [231].

Eine Expression von humaner TIP39 mRNA wurde in adultem und fötalem Hirn, im Cerebellum, in der Trachea, sowie im Rückenmark, Herz und Leber beobachtet [98].

Vergleiche zwischen den Aminosäuresequenzen von bovinem PTH und bovinem TIP39 zeigen, dass nur 9 von 39 Aminosäuren identisch sind (Abb. 1-3) [110].

bTIP39	SLALADDAAFRERARLLAALERRHWLNSYM--- HKLLVLDAP
bPTH (1-40)	--AVSEIQFMHNLGKHLSSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAS

Abb. 1-3: Aminosäurevergleich von bovinem TIP39 und bovinem PTH (1-40). Identische Aminosäuren sind in rot dargestellt.

Vergleicht man sowohl bTIP39, bPTH (1-40) und hPTHrP (1-39) miteinander, so finden sich lediglich fünf identische Aminosäuren. Allerdings erhält man durch eine phylogenetische Analyse den Hinweis, dass die drei Peptide auf einen gemeinsamen Vorläufer zurück zu führen sind [121].

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist TIP39 bekannt bei *Bos taurus* [234], *Mus musculus*, *Homo sapiens* [121] und *Danio rerio*. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz zeigt eine komplette Übereinstimmung der Aminosäureabfolge von bovinem und humanem TIP39, wo hingegen die Sequenz der Maus um nur vier Aminosäuren abweicht [121].

Das Gen für TIP39 besteht aus mindestens drei Exons, wovon eines den 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) darstellt [98, 121]. TIP39 wird als Precursor-Peptid synthetisiert, welches 61 Aminosäuren länger ist als das aktive TIP39. Computeranalysen des 100 AS langen Prä-Pro-TIP39 zeigen, dass die ersten 30 Aminosäuren als Signalpeptid, welches das Protein zum Endoplasmatischen Retikulum führt, dienen könnten [98].

Die Funktion von TIP39 ist noch ungeklärt. Auf Grund der Co-Lokalisation mit dem PTH2-Rezeptor im Rückenmark gibt es aber Hinweise, dass es eine mögliche Rolle bei der Schmerzempfindung spielt [47], einen Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Achse besitzen [248] und eine Rolle bei der Regulation des Blutdrucks spielen könnte.

1.4 Der PTH/PTHrP-Rezeptor (PTH1-Rezeptor, P1R)

1.4.1 Allgemeine Struktur des PTH1-Rezeptors

Der PTH1-Rezeptor wurde erstmals 1991 vom Opossum (Genbank-Zugriffsnummer: M74445) (*Didelphis virginiana*) kloniert und charakterisiert [124] und gehört zur Klasse II der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Bis heute ist der PTH1-Rezeptor bei einer Reihe weiterer Spezies bekannt, so unter anderem von *Canis familiaris* (Genbank-Zugriffsnummer: AF167095) [213], *Danio rerio* (Genbank-Zugriffsnummer: AF132084) [198], *Homo sapiens* (Genbank-Zugriffsnummer: NM_000316) [204], *Mus musculus* (Genbank-Zugriffsnummer: X78936) [159], *Rattus norvegicus* (Genbank-Zugriffsnummer: M77184) [3] und *Sus scrofa* (Genbank-Zugriffsnummer: U18315) [212]. Die Sequenzhomologie zum humanen PTH1-Rezeptor ist mit

dem Rezeptor vom Schwein und Hund am größten (95 %), gefolgt von Maus und Ratte (90 %) und dem Rezeptor des Opossum (79 %).

Der humane PTH1-Rezeptor besitzt eine Länge von 593 Aminosäuren und findet sich in dieser Variante in Zellen des Knochens und der Niere. Das Gen für den PTH1-Rezeptor ist komplex aufgebaut. Es besteht aus 14 Exons (Abb. 1-4), und besitzt mindestens zwei Transkriptionsstartpunkte, welche gewebespezifisch aktiv sind und die somit in unterschiedlichen Geweben alternative Splicingvarianten des Rezeptors ermöglichen [122, 160]. Neben Knochen und Niere wird der PTH1-Rezeptor auch in Herz- und Skelettmuskel, Haut, Uterus, Plazenta, Mamma, Ovar, Testis und Leber exprimiert [230].

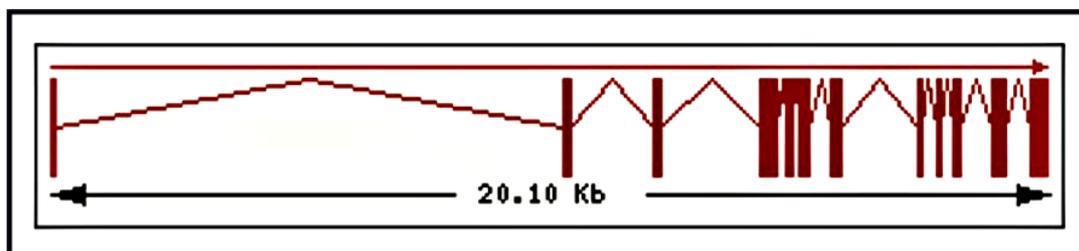


Abb. 1-4: **Darstellung der Exon-Intronstruktur des humanen PTH1-Rezeptors.** Das Gen besteht aus 14 Exons, welche sich über einen genomischen Bereich von 20,1 kb erstrecken.

1.4.2 Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung

Die aminoterminalen Peptide hPTH (1-34) und PTHrP (1-34) binden mit hoher Affinität an den PTH1-Rezeptor und führen zu einer kompletten Signalantwort [68]. Wie aus Abbildung 1-2 ersichtlich zeigen diese beiden Liganden innerhalb der ersten 13 Aminosäuren die größte Homologie, was auf eine mögliche Bedeutung dieser Aminosäuren bezüglich der Rezeptorinteraktion und / oder Rezeptoraktivierung schließen lässt. Durch verschiedene Analysen von mutierten und trunkierten Liganden kann sowohl für PTH, als auch für PTHrP die Region von Aminosäure 15 bis 34 als ausschlaggebender Faktor für die Rezeptorbindung ermittelt werden [30]. Hingegen ist der Bereich von Aminosäure 1 bis 14 die Schlüsseldomäne für die cAMP-Aktivierung [68], wobei die Aminosäuren 1 bis 9 eine entscheidende Rezeptor-Aktivierungsdomäne darstellen. Für die Aktivierung des PLC-Signalweges werden ebenfalls N-terminale Bereiche des Liganden diskutiert [211], da gezeigt wurde, dass PTH (2-34) und PTH (3-34) eine Verminderung der Inositolphosphatantwort hervorrufen [221]. Die PTH-Fragmente (3-34), PTH (7-34) und PTHrP (7-34) binden zwar mit hoher Affinität an den Rezeptor, können aber keine Signalantwort auslösen. Diese Fragmente bezeichnet man als kompetitive Antagonisten [172].

Anhand von Studien an Rezeptorchimären [125] und auf Grund von „Cross-Linking“ Untersuchungen konnten drei Domänen des PTH1-Rezeptors ermittelt werden, die für die Ligandenbin-

derung von vorrangiger Bedeutung sind. Zum einen das äußerste N-terminale Ende des Rezeptors, sowie der nahe der Membran liegende, extrazelluläre N-terminale Bereich. Des Weiteren spielt die dritte extrazelluläre Schleife eine bedeutende Rolle bei der Ligandeninteraktion [28, 148].

Zusammenfassend kann in einem vereinfachten Modell („two-site model“), nach strukturellen und funktionellen Gesichtspunkten, die PTH / PTH1R-Interaktion in zwei Hauptkomponenten unterteilt werden [69]. Eine entscheidende Komponente für die Bindungsaffinität spielt die Interaktion der C-terminalen Domäne des Liganden mit der N-terminalen Domäne des Rezeptors. Für die Aktivierung des Signalweges hingegen ist die Interaktion des N-terminalen Bereichs des Liganden mit juxtamembranären N-terminalen Bereichen des Rezeptors und mit nahe der Transmembrandomäne 6 (TM6) liegenden Bereichen der dritten extrazellulären Schleife von Bedeutung.

Die Aktivierung des Rezeptors durch seine Liganden bewirkt eine komplexe Konformationsänderung der Transmembrandomänen und der verbindenden intra- und extrazellulären Schleifen, so dass die cytoplasmatischen Abschnitte für G-Proteine zugänglicher werden [76]. Mit Hilfe einer auf FRET („fluorescence resonance energy transfer“) basierenden Technik kann gezeigt werden, dass die Aktivierung des PTH1-Rezeptors innerhalb einer Sekunde messbar ist [240]. Durch die Aktivierung kommt es vor allem zu einer Verschiebung der relativen Lage von Transmembrandomäne 3 (TM3) zu Transmembrandomäne 6 (TM6) [210]. Basierend auf molekularen Untersuchungen der Chondrodysplasie vom Typ Jansen zeigt sich, dass auch Konformationsänderungen in Bereichen der TM2 und TM7 eine Rolle spielen. Auf molekularer Ebene findet man bei diesem Krankheitsbild eine Punktmutation im Bereich von TM2 oder TM7, was eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors zur Folge hat [205, 207].

1.4.3 Signaltransduktion und Rezeptorregulation

Nach einer ligandeninduzierten Aktivierung des PTH1-Rezeptors schließen sich mindestens zwei intrazelluläre Signalwege an (Abb. 1-5). Die Kopplung an das stimulierende G-Protein G_s führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase (AC). Im folgenden kommt es zu einer Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und im weiteren zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) [123].

Ein zweiter Signalweg führt über die Ankopplung an das G-Protein G_q , welches die Phospholipase C (PLC) aktiviert [175, 184]. Als Produkte entstehen u.a. Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP_3). Im weiteren aktiviert DAG die Phosphokinase C und durch IP_3 kommt es zur Freisetzung von intrazellulärem Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum [50].

Die biologische Rolle des PKC-Signalweges ist bis zum heutigen Zeitpunkt unklar, wohingegen der PKA-Signalweg zum größten Teil für die durch PTH und PTHrP vermittelte Regulation des

Serumkalziumspiegels und deren Wirkung am Knochen verantwortlich gemacht werden kann [82].

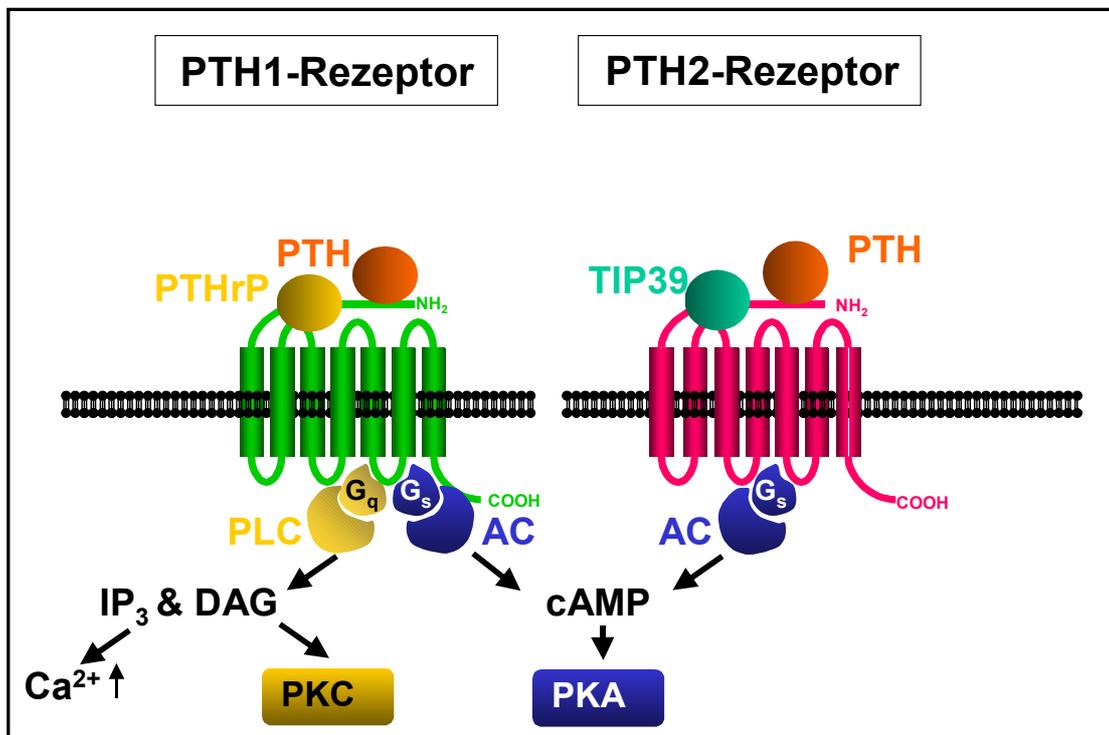


Abb. 1-5: **Schema der intrazellulären Signalübertragung des PTH1-Rezeptors und des PTH2-Rezeptors.** Der PTH1-Rezeptor koppelt nach Bindung von PTH oder PTHrP sowohl an den cAMP-Signalweg, als auch an den PLC-Signalweg an. Hingegen kann der PTH2-Rezeptor nach Aktivierung durch PTH oder TIP39 nur eine Aktivierung des cAMP-Signalwegs hervorrufen. G_q: G-Protein zur Ankopplung an den PLC-Signalweg; G_s: G-Protein zur Ankopplung an den cAMP-Signalweg; PLC: Phospholipase C; AC: Adenylatzyklase; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; IP₃: Inositoltrisphosphat; DAG: Diacylglycerol; Ca²⁺: intrazelluläres Kalzium; PKC: Phosphokinase C; PKA: Phosphokinase A

Um eine akute und chronische Überstimulation der Signalwege zu unterbinden unterliegt der Rezeptor einer strengen Regulation der Signaltransduktionskaskade. Nach Aktivierung durch die Liganden kommt es innerhalb von Minuten zur Desensibilisierung des Rezeptors und als Folge zu einem Entkoppeln der G-Proteine. Dieser Desensibilisierung schließt sich ein rascher Internalisierungsprozess des Rezeptors an [60, 153]. Bei diesem Desensibilisierungs-/ Internalisierungsprozess spielt die Phosphorylierung des Rezeptors eine wichtige Rolle. So führt die ligandeninduzierte Stimulation zu einer dosisabhängigen Phosphorylierung durch Serin-/ Threonin-Proteinkinasen (PKA und PKC) am C-Terminus des Rezeptors [17, 191]. In diesen Phosphorylierungsprozess sind auch weitere „Second-Messenger“-unabhängige Kinasen, wie z.B. die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase-2 (GRK-2) involviert [46, 153].

Die Rezeptorphosphorylierung durch GRKs ist dabei eine Grundvoraussetzung für die Rekrutierung von β -Arrestin aus dem Cytosol [90, 186]. Durch Bindung von β -Arrestinen an den Rezeptor, kommt es zu einer Entkopplung der G-Proteine und zur Beendigung der Agonisten-

vermittelten Signalübertragung [141, 185]. Es wurde gezeigt, dass β -Arrestin Clathrin mit hoher Affinität bindet und dort als Adaptor zwischen dem aktivierten, phosphorylierten Rezeptor und den „Clathrin-coated“-Vesikeln fungiert [58, 84, 142]. Zwar enthält der C-Terminus des PTH1-Rezeptors ausschlaggebende Faktoren für die β -Arrestin Interaktion, die unterschiedlich zu den Phosphorylierungsstellen des Rezeptors sind, diese spielen jedoch nur im Falle der transienten Assoziation mit dem Rezeptor eine Rolle. Für eine stabile Interaktion von β -Arrestin mit dem Rezeptor sind jedoch diese Phosphorylierungsstellen notwendig [242]. So wird zwar durch die Phosphorylierung und die Bindung von β -Arrestin der Komplex mit intrazellulären Regulatorproteinen stabilisiert, aber es sind noch weit mehr Komponenten für eine Internalisierung nötig, wie z.B. eine korrekte Konformationsänderung des Rezeptors [61, 241].

Nach einer erfolgten Endozytose des Rezeptors erscheint dieser, nach Durchlaufen eines intrazellulären Recyclingprozesses, als resensitisierte (dephosphorylierte) Rezeptor an der Membranoberfläche oder aber er wird in den Lysosomen degradiert [59, 150, 161].

1.5 Der PTH2-Rezeptor (P2R)

1.5.1 Allgemeine Struktur des PTH2-Rezeptors

Der PTH2-Rezeptor wurde im Jahr 1995 als weiteres Mitglied der Klasse II der G-Protein gekoppelten Rezeptorfamilie entdeckt und charakterisiert. Er zeigt eine 45 % identische Aminosäuresequenz zum PTH1-Rezeptor und 70 % Sequenzähnlichkeit [233]. Die größte Homologie erstreckt sich dabei über die Transmembrandomänen und weite Teile der drei intrazellulären Schleifen. Der PTH2-Rezeptor ist bis zum jetzigen Zeitpunkt bekannt bei *Homo sapiens* (Genbank-Zugriffsnummer: NM_005048) [233], *Rattus norvegicus* (Genbank-Zugriffsnummer: U55836) [232], *Mus musculus* (Genbank-Zugriffsnummer: AF332078) [52] und *Danio rerio* (Genbank-Zugriffsnummer: AF132082) [197].

Das Gen für den PTH2-Rezeptor wurde auf Chromosom 2q33 lokalisiert. Es erstreckt sich über einen genomischen Bereich von 88 kb und ist aus 13 Exons aufgebaut [235].

Der humane PTH2-Rezeptor besitzt eine Länge von 550 Aminosäuren und wird vor allem im Gehirn exprimiert. Nach Untersuchungen basierend auf Northern Blot-Analysen, findet man auch eine Expression dieses Rezeptors in Plazenta, Pankreas und Lunge [233] aber nicht in anderen Geweben. Allerdings kann nach immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine weiter verbreitete Expression des PTH2-Rezeptors auch in anderen Geweben vorhanden ist, die sich allerdings meist nur auf eine sehr eingegrenzte Zellpopulation ausdehnt [233, 247].

1.5.2 Ligandenbindung und Signaltransduktion am PTH2-Rezeptor

Für den PTH2-Rezeptor gilt TIP39 als potentieller Aktivator. Aber auch PTH ist in der Lage diesen Rezeptor zu aktivieren [110]. Eine Stimulation durch PTHrP hingegen findet nicht statt [233]. Dieses unterscheidet den PTH2-Rezeptor vom PTH1-Rezeptor, welcher nicht zwischen PTH und PTHrP unterscheidet [124].

Ein Vergleich von hPTH (1-34) und TIP39 nach NMR-Untersuchungen zeigt, dass beide Peptide eine sehr ähnliche Sekundärstruktur besitzen. Beide Peptide bestehen aus einer N-terminalen und einer C-terminalen α -Helix, welche durch eine Linker-Region, die bis jetzt nicht genau definiert ist, verbunden sind [187]. Auch PTHrP zeigt diese Struktur, so dass alle drei Peptide zu einer Familie gezählt werden können. Der PTH2-Rezeptor besitzt ebenso einige für die Klasse II der GPCR charakteristischen strukturellen Eigenschaften, wie z.B. einen 120 Aminosäuren langen, hydrophilen N-terminalen Bereich mit sechs konservierten Cysteinresten und vier konservierten Bereichen für die N-Glykosylierung. Auf Grund dieser Zusammenhänge ist die molekulare Basis für die Rezeptorinteraktion ebenfalls gut mit dem bereits für den PTH1-Rezeptor beschriebenen „two-site-model“ vereinbar [7].

Im Gegensatz zum PTH1-Rezeptor ist der PTH2-Rezeptor nur in der Lage den cAMP-Signalweg zu aktivieren. Eine Ankopplung an den Inositolphosphat-Signalweg nach der Bindung eines Liganden (TIP39, PTH) kann nicht gemessen werden (Abb. 1-5).

1.6 PDZ-Proteine

1.6.1 Eigenschaften und Funktionen von PDZ-Proteinen

Ionenkanäle, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle sind für die Kommunikation zwischen Zellen zuständig und sind ebenso Vermittler zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. Jede Zelle muss deshalb die Ionenkanäle und Rezeptoren an spezifischen subzellulären Orten organisieren, um Signale empfangen zu können und um deren Weiterleitung auf intrazelluläre Moleküle zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang haben PDZ-Proteine in den letzten zehn Jahren in zunehmendem Maße an Bedeutung gewonnen. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Organisation von Proteinkomplexen an der Plasmamembran und übernehmen eine wichtige Rolle als Adhäsionsmoleküle in der Signaltransduktion. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind mehr als 100 PDZ-Proteine identifiziert worden. Diese finden sich sowohl in höheren Lebewesen als auch in Pflanzen und Bakterien [188].

PDZ-Proteine bestehen aus 80-100 Aminosäuren langen Wiederholungssequenzen, die als PDZ-Domänen bezeichnet werden. Dieser Name ist ein Akronym und setzt sich zusammen aus den ersten identifizierten PDZ-Proteinen. Diese sind PSD-95 (postsynaptic density protein) [37], das

Drosophila Tumorsuppressorgen **Discs-large** [255] und das „Tight-junction“ Protein **ZO-1** [253]. Diese PDZ-Proteine gehören zu der Superfamilie der MAGUKs („membrane-associated guanylate kinases“), welche zusätzlich zu einer oder mehreren PDZ-Domänen eine SH3-Domäne und eine Guanylatkinase-Domäne besitzen. Als Synonyme findet man auch die Bezeichnung DHR-Proteine („discs-large homologous region“) oder GLGF-Proteine, benannt nach dem innerhalb der PDZ-Domänen immer wiederkehrenden Aminosäuremotiv „Gly-Leu-Gly-Phe“, welches bei der Interaktion von PDZ-Proteinen mit anderen Proteinen eine wichtige Rolle spielt [49]. Innerhalb der PDZ-Domänen verschiedener Proteine tauchen beträchtliche Sequenzunterschiede auf, was vermutlich die große Vielfalt ihrer funktionellen Rolle widerspiegelt. PDZ-Proteine sind involviert in der Signaltransduktion, der Zelldifferenzierung, der Wachstumskontrolle und Ionenkanalorganisation. Weiterhin sind sie an der Lokalisation von Proteinen in polaren Zellen beteiligt, sowie an der Zell-Zell-Interaktion und der Organisation von Multi-Proteinkomplexen an der Membran. Um diese Funktionen übernehmen zu können sind PDZ-Proteine deshalb in der Lage, sowohl Homo- als auch Heteromultimere zu bilden [48, 113]. Das Vorhandensein von mehreren PDZ-Domänen innerhalb eines Proteins deutet auf eine mögliche Rolle bei der Gruppierung von Proteinen über multiple Interaktionen mit verschiedenen Liganden hin, wie dies z.B. bei Rezeptoren oder Ionenkanälen der Fall ist.

1.6.2 Aufbau einer PDZ-Domäne und strukturelle Bindungseigenschaften

Die erste räumliche Darstellung einer PDZ-Domäne beruht auf den Röntgenstrukturanalysen von D. Doyle et al. an der dritten PDZ-Domäne des aus dem Gehirn stammenden, synaptischen Proteins PSD-95 [49] von *Rattus norvegicus*, sowie auf den Untersuchungen von J. Morais Cabral et al. an der dritten PDZ-Domäne des aus *Drosophila* stammenden Proteins Dlg-A [163].

Ein 3D-Modell der dritten PDZ-Domäne von PSD-95 ist in Abbildung 1-6 dargestellt.

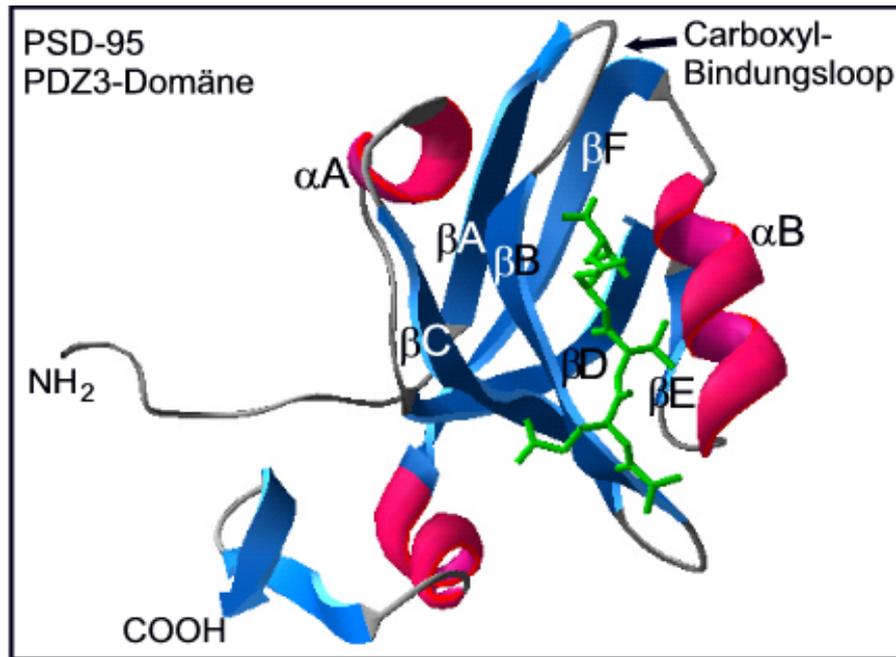


Abb 1-6: **3D-Modell der dritten PDZ-Domäne von PSD-95 mit der Bindung eines C-terminalen Fragments.** Das Modell ist der PDB-Datenbank entnommen. Es besitzt die Datenbank-Zugriffsnummer „1BE9“ und wurde mit Hilfe des PDB-Viewers dargestellt. Die Darstellung beruht auf Röntgenstrukturanalysen von D.A. Doyle et al. Die Domäne setzt sich zusammen aus sechs β -Faltblattsträngen (β A bis β F, in blau dargestellt) und zwei α -Helices (α A und α B, dargestellt in rot). Grün markiert ist ein kurzes C-terminales Peptidfragment, welches über die durch β B und α B entstandene Bindungstasche an die PDZ-Domäne bindet. Der dargestellte Carboxyl-Bindungsloop spielt dabei eine entscheidende Rolle.

PDZ-Domänen setzen sich aus sechs β -Faltblattsträngen (benannt β A bis β F) und zwei α -Helices (α A und α B) zusammen. Die Bindung von Peptiden erfolgt in einer durch den β B-Strang und die dazu antiparallel verlaufende α B-Helix geformten Tasche [55]. Dabei spielt die verbindende Schleife zwischen β A und β B eine entscheidende Rolle. In diesem Abschnitt findet sich das Motiv „Gly-Leu-Gly-Phe“ (GLGF-Sequenz) [37], welches in die Bindung der Carboxylgruppe des Peptids involviert ist. Daraus abgeleitet wird diese verbindende Schleife auch als Carboxyl-Bindungsloop bezeichnet [49]. Ein weiteres strukturelles Merkmal findet sich in den nahe zusammen liegenden N-terminalen und C-terminalen Enden der Domäne, welche sich auf der Rückseite, relativ zu der Peptid-Bindungsstelle, befinden. Diese Anordnung erlaubt es der Domäne leicht als funktionelle Einheit zu bestehen und trotz eines Wechsels von Bindungspartnern die Erhaltung der Bindungsdomäne zu gewährleisten [143].

1.6.3 Strukturelle und chemische Eigenschaften des Bindungsproteins

Jede PDZ-Domäne bindet einen einzelnen Peptidliganden in der durch den β B-Faltblattstrang und die α B-Helix gebildeten Tasche. Normalerweise werden kurze, C-terminale Peptidabschnitte eines Proteins gebunden. Allerdings ist bekannt, dass PDZ-Domänen auch interne Peptidmotive mit spezifischer Sekundärstruktur erkennen können. Ein Beispiel hierfür ist die Interaktion der

Synotrophin-PDZ-Domäne mit nNOS (neuronal Stickstoffmonoxyd Synthase). Diese Bindung erfolgt in diesem Fall über einen internen β -Finger des nNOS-Peptids [101].

In den häufigsten Fällen jedoch erfolgt die Bindung des Proteins an eine PDZ-Domäne über die letzten vier carboxyterminalen Aminosäuren. Röntgenstrukturanalysen von PDZ-Domänen, welche ein Peptid gebunden haben zeigen, dass mindestens 23 Kontaktstellen an dieser Bindung beteiligt sind [237], wobei einige dieser Kontaktstellen, wie z. B. das „GLGF“-Motiv, hoch konserviert sind.

Die vier carboxyterminalen Aminosäuren des Liganden zeigen eine Consensussequenz die, je nach Vorkommen einer bestimmten Aminosäureabfolge, die Einteilung in vier verschiedene Klassen erlaubt. Dabei bezeichnet man die Position der C-terminalen Aminosäure mit P_0 . Folgende Aminosäuren, in Richtung N-Terminus liegend, werden mit P_{-1} , P_{-2} und P_{-3} bezeichnet [102]. Es zeigt sich, dass dabei die Aminosäuren an den Positionen P_0 und P_{-2} eine entscheidende Rolle für die Erkennung durch die PDZ-Domäne spielen. Zur Klasse I zählt man Proteine mit dem Erkennungsmotiv „S/T-X- Φ “-COOH (X: beliebige Aminosäure; Φ : hydrophobe Aminosäure), Klasse II-Proteine besitzen das Motiv „ Φ/ψ -X- Φ “-COOH (ψ : aromatische Aminosäure) und Klasse III PDZ-Liganden werden über das Motiv „D/E-X-V“-COOH erkannt. Zur Klasse IV zählen die Proteine, welche am C-Terminus das Motiv „X- ψ -D/E“-COOH besitzen [237]. So erfolgt eine Klassifizierung der PDZ-Proteine über die von ihnen benutzte Erkennungssequenz des Liganden.

1.7 Zielsetzung

Der Mechanismus der Signaltransduktion und die damit verbundenen strukturellen und biochemischen Eigenschaften von G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind schon seit längerer Zeit Bestandteil intensiver Forschungen. Es handelt sich hierbei um einen sehr komplexen Mechanismus, an dem unterschiedliche biochemische und strukturelle Eigenschaften eines Rezeptors und eine Vielzahl von Proteinen beteiligt sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit soll es nun sein, durch verschiedene Ansätze die molekularen Eigenschaften sowohl des PTH1-Rezeptors, als auch des PTH2-Rezeptors bezüglich ihrer Signaltransduktionswege weiter aufzuklären und im Weiteren neue Interaktionspartner des PTH1-Rezeptors zu identifizieren. Es erfolgt eine Unterteilung der vorliegenden Arbeit in drei Teilabschnitte.

Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit einem konservierten Bereich der siebten Transmembrandomäne des PTH1-Rezeptors des Opossums (*Didelphis virginiana*). Es wird gezeigt, dass innerhalb der Klasse II von G-Protein gekoppelten Rezeptoren im Bereich der siebten Transmembrandomäne ein hoch konservierter Abschnitt zu finden ist. Da sich dieser konservierte Abschnitt in einem Bereich befindet, der nahe dem Cytosol liegt, soll eine mögliche Beteiligung dieser Aminosäuren an der Signaltransduktion untersucht werden. Durch Punktmutationen dieses Bereichs des PTH1-Rezeptor von *Didelphis virginiana* sollen die Aminosäuren dieses Abschnitts verändert und die neu erhaltenen Rezeptormutanten anschließend auf ihr Signalverhalten, bezüglich des cAMP-Wegs und des Inositolphosphatwegs, untersucht werden.

Weitere Untersuchungen zur Signaltransduktion sollen mit Hilfe von PTH1 / PTH2-Rezeptorhybriden durchgeführt werden. In vorangegangenen Untersuchungen konnte für den PTH1-Rezeptor gezeigt werden, dass Bereiche der zweiten und dritten intrazellulären Schleife für die Ankopplung an den cAMP und den Inositolphosphatweg von Bedeutung sind. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des PTH1-Rezeptors mit dem PTH2-Rezeptors zeigt in diesem Bereich Unterschiede bezüglich ihrer Aminosäuresequenz. Ein weiterer Unterschied der beiden Rezeptoren findet sich in Bezug auf ihr Signalverhalten. Der PTH1-Rezeptor zeigt nach Stimulation durch seine Liganden sowohl eine Aktivierung des cAMP-Wegs, als auch des Inositolphosphatwegs (IP). Hingegen aktiviert der PTH2-Rezeptor nur den cAMP-Signalweg. Die unterschiedlichen Aminosäuren im Bereich der zweiten und dritten intrazellulären Schleife könnten für die selektive Ankopplung des PTH2-Rezeptors an den cAMP-Signalweg von Bedeutung sein.

In vielen früheren Untersuchungen wurde immer wieder gezeigt, dass es möglich ist durch die Veränderung kurzer Aminosäureabfolgen oder sogar einzelner Aminosäuren ein vermindertes Ankoppeln von G-Proteinen oder sogar einen Totalverlust der Ankopplung zu erreichen. Durch eine Angleichung des humanen PTH2-Rezeptors an die Sequenz des humanen PTH1-Rezeptors im Bereich der zweiten und dritten intrazellulären Schleife, sowie im Abschnitt des C-Terminus soll nun erstmals versucht werden den IP-Weg des PTH2-Rezeptors zu rekonstituieren.

Im dritten Teilbereich dieser Arbeit wird versucht mit Hilfe des „Yeast-two-Hybrid“-Systems bis jetzt unbekannt Interaktionspartner des humanen PTH1-Rezeptors zu identifizieren. Da der PTH1-Rezeptor im Gegensatz zu anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren einen sehr langen C-Terminus besitzt und die dritte intrazelluläre Schleife eine Ausdehnung von 30 Aminosäuren aufweist, sollen diese beiden Abschnitte als „Köder“ für das Screenen einer humanen Nieren-cDNA-Bibliothek verwendet werden. Die durch diesen Screen identifizierten, potentiellen intrazellulären Interaktionspartner des PTH1-Rezeptors können erste Ansatzpunkte für eine weitere Aufklärung der PTH1-Rezeptorfunktion bieten.

2 Material

2.1 Chemikalien

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-Gal)	Sigma, Steinheim
30% Acrylamid-Bisacrylamid (29:1) Fertiglösung	Bio-Rad, München
Aceton	T.J.Baker
Acrylamid	Sigma, Steinheim
Adenin-Hemisulfat	Sigma, Steinheim
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Steinheim
Ammoniumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma, Steinheim
Ammoniumsalz der Ameisensäure (Formic acid)	Sigma, Steinheim
Ammoniumsulfat	Sigma, Steinheim
Ampizillin-Natriumsalz	Sigma, Steinheim
Amplify-Lösung	Bio-Rad, München
Borsäure	Sigma, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Butanol	Sigma, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma, Steinheim
Chloroform	Sigma, Steinheim
Coomassie Brillantblau R-250	Sigma, Steinheim
D(+)-Glucose	Sigma, Steinheim
Dimethylformamid (DMF)	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
Dithiotreitol	Sigma, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	T.J.Baker
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Steinheim
Ficoll	Sigma, Steinheim
Glycerol	Sigma, Steinheim
Glycin	Sigma, Steinheim
Hefeextrakt (Bacto yeast extract)	Carl Roth, Karlsruhe
Hepes	Invitrogen, Groningen, NL
Isoamylalkohol	Sigma, Steinheim
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Sigma, Steinheim
Kaliumacetat	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumsulfat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Steinheim
L-Histidin	Sigma, Steinheim
Lithiumacetat	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt

L-Leucin	Sigma, Steinheim
L-Methionin	Sigma, Steinheim
L-Tryptophan	Sigma, Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	T.J. Baker
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, München
N,N'-Methylen-Bisacrylamid	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumsalz der Ameisensäure (Sodium formate)	Sigma, Steinheim
Natriumtetraborat (Borax)	Sigma, Steinheim
Natronlauge	Merck, Darmstadt
N-Propyl-Gallat	Sigma, Steinheim
Phenol	Sigma, Steinheim
Polyethylenglykol	Sigma, Steinheim
Ponceau-S-Lösung	Bio-Rad, München
Resin	Bio-Rad, München
Rubidiumchlorid	Sigma, Steinheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe
Trockenmilch (fettfrei)	Bio-Rad, München
Trypton / Pepton aus Casein (Pepton)	Carl Roth, Karlsruhe
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Sigma, Steinheim
X-Gal	Sigma, Steinheim
X- α -Gal	Clontech, Heidelberg
Zitronensäure	Sigma, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim

2.2 Laborgeräte

Analysewaagen	Typ 572 SBA32	Kern, Balingen ScalTec
Autoklav	FVSI 1	Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Brutschrank	TH30 / SM30 Modell 400 Modell 3111 (CO ₂ water jacketed incubator)	Edmund Bühler, Hechingen Memmert, Schwabach Forma Scientific, Dreieich
Digitalkamera		Canon, Krefeld
Elektroporator	EquiBio EasyjecT Prima	Peqlab, Erlangen
Fluoreszenz-Mikroskop		
Gelelektrophorese-System	Joule-Box Electro-4	Stratagene, Amsterdam, NL Hybaid, Heidelberg
Heizblock	Dri-Block® DB 2D	Techne Progene, Wertheim
Kippschüttler	Rotator RS-60	BioSan, Warren, MI
Konfokales Mikroskop		Leica, Solms
Licht-Mikroskop	Leitz DMIL	Leica, Solms

Magnetrührer	L35	Labinco
Mikropipetten	P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Den Haag, Niederlande
Mikrowelle	Quick Cookmate	Daewoo
Netzgeräte	Power Pac 300	Bio-Rad, München
	Power Pac 200	Bio-Rad, München
	EPS 301	Amersham Biosciences, Freiburg
pH-Meter	MultiCal® pHMeter pH526	WTW
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
Proteingel-Apparatur	Mini-Protean®II	Bio-Rad, München
Semidry-Blotter	Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
sterile Werkbänke	LaminAir® HB2472	Heraeus
	SterilGARD®III Advance	The Baker Company
Taumler	Polymax 1040	Heidolph
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Optima TLX (Rotor: TLA 120.2)	Beckmann
UV-Tisch		IBI
Vakuum-Geltrockner	Modell 483 Gel Dryer	Bio-Rad, München
Vortexer, Schüttler	L46	GLW
Wasserbad	Typ WB7	Memmert
Zentrifugen	Centrifuge 5415 (Tischzentrifuge)	Eppendorf
	Biofuge pico (Tischzentrifuge)	Heraeus
	Rotanta 96RC	Hettich
	Megafuge 1.0R (Kühlzentrifuge)	Heraeus
	RC 5B plus (Rotoren: SS34 ; GSA)	Sorvall
γ-Counter	LB 2111	Berthold
β-Counter	LS 6000 IC	Beckman

2.3 Sonstige Materialien und Reagenzien

Blotting-Papier		Bio-Rad, München
		Whatman
Complete Mini-Tabletten	Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Deckgläser (21x26 mm)		Hartenstein, Würzburg
Dia-Filme	Elite Chrome 100 oder 400	Kodak
Glaskügelchen 450-600µm		Sigma, Steinheim
Küvetten (Plastik) 100µl	zur DNA-Konzentrationsbestimmung	Eppendorf
Küvetten (Plastik) 1ml		Sarstedt
Nitrocellulose Blotting Membran		Amersham, Freiburg
Objektträger (76x26 mm)		Hartenstein, Würzburg
RNasin® Ribonuclease Inhibitor		Promega, Mannheim
Röntgen-Filme	Super RX	Fuji
Spritzen und Kanülen		Braun, Melsungen
TRIzol® Reagenz		Invitrogen, Groningen, NL
Zellophan-Folie		Bio-Rad, München
Zentrifugenbecher 250 ml		Sorvall
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50ml		Greiner

Plastikverbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Hartenstein (Würzburg) und SK-Laborbedarf (Würzburg) bezogen.

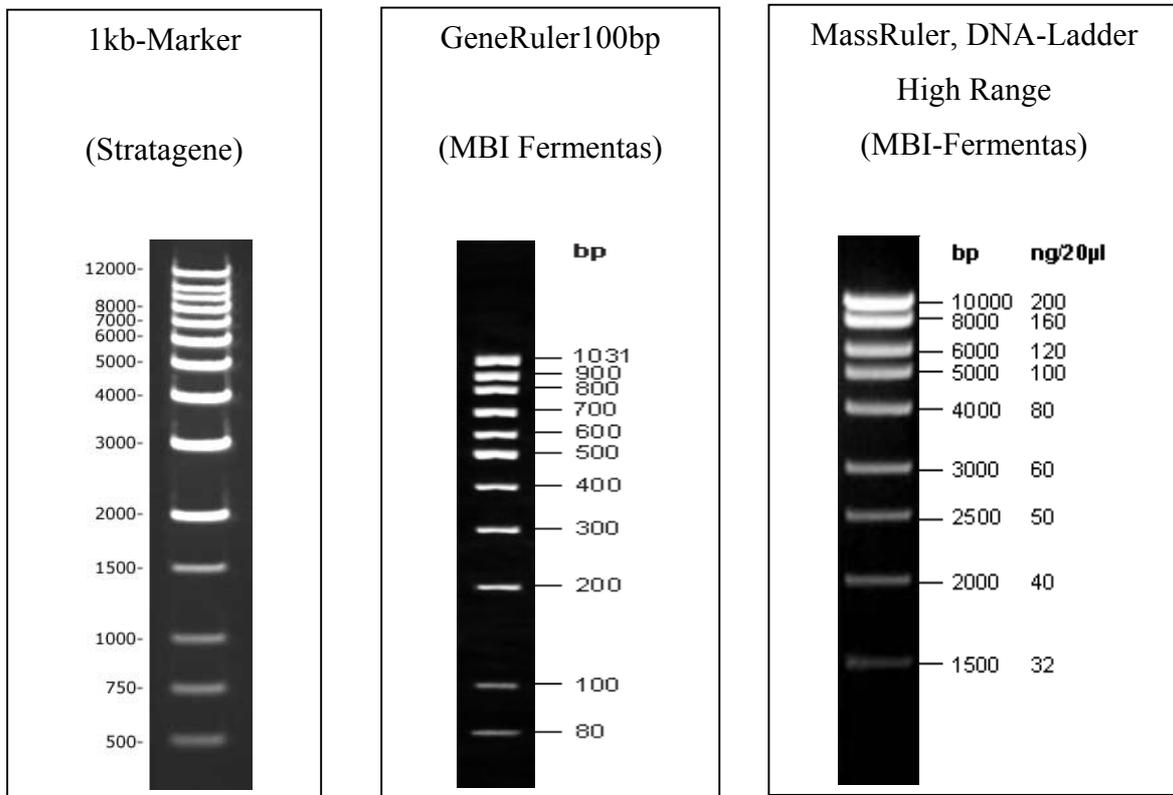
2.4 Kits (kommerzielle Reagenziensätze)

Folgende kommerzielle Reagenziensätze wurden in der vorgelegten Arbeit verwendet:

Name	Verwendung	Quelle
5 min-RT-Ligationskit	Ligation von DNA-Fragmenten	Roche, Mannheim
cAMP-RIA-Kit	Messung von extrahiertem cAMP aus Zellen	Beckmann Coulter, Krefeld
HotStarTaq™ PCR	PCR-Reaktionen	Qiagen, Hilden
Matchmaker Co-IP Kit	Koimmunpräzipitation von Proteinen	Clontech, Heidelberg
MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3	Detektion von Protein-Protein Interaktion <i>in vivo</i>	Clontech, Heidelberg
MilliporeUltrafree®-DA	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	Millipore, Schwalbach
One Step RT PCR-Kit	Reverse Transkription von RNA	Qiagen, Hilden
pretransformed MATCHMAKER Library	in Hefe transformierte cDNA-Bibliothek für das verwendete Hefe-two-hybrid System "MATCHMAKER GAL4"	Clontech, Heidelberg
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Plasmid DNA Maxipräparation	Qiagen, Hilden
Qiagen PCR-purification Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder enzymatischem Verdau	Qiagen, Hilden
QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit	cDNA-Herstellung mittels reverser Transkription aus RNA	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Plasmid DNA Minipräparation	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Reinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden
TNT®coupled Retikuloocyte-Lysat System	<i>in vitro</i> Translation von Proteinen	Promega, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit	direkte Klonierung von PCR-Fragmenten	Invitrogen, Groningen, NL

2.5 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

Marker für Agarose-Gele:



Proteinmarker (BenchMark™ prestained protein ladder, Invitrogen):

Lot: 1143774	Lot: 1169420	Lot: 1184183
182,9 kDa	177,6 kDa	181,8 kDa
113,7 kDa	113,9 kDa	115,5 kDa
80,9 kDa	81,2 kDa	82,2 kDa
63,8 kDa (pink Bande)	60,7 kDa (pink Bande)	63,2 kDa (pink Bande)
49,5 kDa	47,4 kDa	48,8 kDa
37,4 kDa	36,1 kDa	37,1 kDa
26,0 kDa	25,3 kDa	25,9 kDa
20,5 kDa	19,0 kDa	19,4 kDa
14,9 kDa	14,7 kDa	14,8 kDa
8,4 kDa	6,1 kDa	6,0 kDa

2.6 Peptide

Myo- ³ H-Inositol mit PT6-271	Amersham Pharmacia, Freiburg
TIP39	Immundiagnostik, Bensheim
humanes PTH (1-34)	Bachem, Weil am Rhein
[¹²⁵ I]-[Nle ^{8,21} , Tyr ³⁴] PTH (1-34)-amid (Ratte)	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim

2.7 Enzyme

Restriktionsenzyme:

Name	Erkennungssequenz	Firma
ALw44I(ApaI)	5'...G↓TGCAC...3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
BamHI	5'...G↓GATCC...3'	Invitrogen, Groningen, NL
BsaI	5'...GGTCTCN↓NNNN...3'	NEB, Frankfurt a.M.
BstAPI	5'...GCNNNN↓NTGC...3'	NEB, Frankfurt a.M.
BstEII	5'...G↓GTNACC...3'	Invitrogen, Groningen, NL
EcoRI	5'...G↓AATTC...3'	Invitrogen, Groningen, NL
EcoRV	5'...GAT↓ATC...3'	Invitrogen, Groningen, NL
HindIII	5'...A↓AGCTT...3'	Invitrogen, Groningen, NL
KpnI	5'...GGTAC↓C...3'	Invitrogen, Groningen, NL
NcoI	5'...C↓CATGG...3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
NotI	5'...GC↓GGCCGC...3'	Invitrogen, Groningen, NL
NsiI	5'...ATGCA↓T...3'	Invitrogen, Groningen, NL
PvuII	5'...CAG↓CAG...3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SapI	5'...GCTCTTCN↓NNN...3'	NEB, Frankfurt a.M.
SfiI	5'...GGCCNNNN↓NGGCC...3'	NEB, Frankfurt a.M.
SphI	5'...GCATG↓C...3'	Invitrogen, Groningen, NL
SstI	5'...GAGCT↓C...3'	Invitrogen, Groningen, NL
XbaI	5'...T↓CTAGA...3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
XhoI	5'...C↓TCGAG...3'	Invitrogen, Groningen, NL

Die Restriktionsenzyme wurden mit den jeweiligen, von den Firmen mitgelieferten, Puffern verwendet. Die Konzentrationen richteten sich nach den Angaben des Herstellers.

Sonstige Enzyme:

Enzym	Verwendung	Firma
Alkalische Phosphatase aus Shrimps	Dephosphorilierung von linearisierter Vektor-DNA	Roche, Mannheim
Lytikase (5 units / μ l)	Plasmidpräparation aus Hefe	Sigma, Steinheim
Pfu Turbo DNA Polymerase	PCR	Stratagene, Amsterdam, NL
RNase A	Verdau von RNA in DNA-Präparationen	Sigma, Steinheim
T4 DNA Ligase	Ligation von linearisiertem Vektor mit einem DNA-Fragment	Invitrogen, Groningen, NL
T7-Polymerase	in vitro Translation	Promega, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	für PCR, wenn anschließend TOPO-Klonierung erfolgte	Quiagen, Hilden

2.8 Antikörper

Antikörper	Verdünnung /Western Blot	Quelle
anti- β -Actin, monoklonal, Maus	1:5000	Sigma, Steinheim
anti-Maus-IgG, Schaf, konjugiert mit Peroxidase	1:1000	Amersham Pharmacia, Freiburg
phospho-ERK1/2, monoklonal, Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Kaninchen IgG, konjugiert mit Meerrettichperoxidase;	1:1000	Amersham Pharmacia, Freiburg
anti-Ziege-IgG, konjugiert mit Meerrettichperoxidase;	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
c-Myc-Tag-IgG, monoklonal, Maus		Clontech, Heidelberg
HA-Probe-IgG, monoklonal, Maus	1:200-1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
HA-Tag-IgG, polyklonal		Clontech, Heidelberg
OK1-IgG, monoklonal, Maus,	1:50	BAbCO,
PDZK1-AK, Huhn	1:60	Olivier Kocher (persönlich)
PTH2-Rezeptor-IgG, polyklonal, Ziege	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.9 Primer

2.9.1 Sequenzspezifische Primer

Sequenzspezifische Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) erworben.

1. opPTH1-Y453A :	$T_m = 74,9 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-TCATTCCAGGGATTTTTTCGTTGCCATTATAGCCTGTTTCTGCAATGGAGAGG-3'	
2. opPTH1-C454A :	$T_m = 74,1 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-TCATCCCAGGGATTTTTTCGTTGCCATTATATACGCTTTCTGCAATGGAGAGG-3'	
3. opPTH1-F455A:	$T_m = 74,9 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-TCATTCCAGGGATTTTTTCGTTGCCATTATATACTGTGCCTGCAATGGAGAGG-3'	
4. opPTH1-N457A:	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-TCATTCCAGGGATTTTTTCGTTGCCATTATATACTGTTTCTGCGCTGGAGAGGTACAAG-3'	
5. opPTH1-Del453-457:	$T_m = 74,2 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-TCATTCCAGGGATTTTTTCGTTGCCATTATAGGAGAGGTACAAGCAGAGATC-3'	
6. opPTH1-forw:	$T_m = 74,4 \text{ }^\circ\text{C}$
5'- TCAGGGATTCTTTGGCAAGTCCAAATGCACTATGAAATGCTCTTCAATTCATTCCAG-3'	
7. opPTH1(ApaI)-forw:	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-CTATTTGGGGTGCCTACTACATCGTCTTCATGGCCACGCCGTACACAGAAGTATCAGGG-3'	
8. opPTH1(NcoI)-rev:	$T_m = 73,6 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-ACACTTGTATGTGACACCATGGGGCCATAGCTGTAGGTAC-3'	
9. N457A-forw:	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GCTGGAGAGGTACAAGCAGAGATCAAGAAGTCATGGAGCCG-3'	
10. Y453A-rev :	$T_m = 74,1 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GCAGAAACAGGCTATAATGGCAACGAAAAATCCATGGAATGAATTGAAGAGC-3'	
11. hPTH1-3IZL-forw:	$T_m = 73,7 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GAATCCGGGTGCTCGCCACCAAGCTGCG-3'	
12. hPTH1-3IZL-rev:	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'- GGATCCGGATTTGAGCAGCTTCCGGTACTGCTGCC-3'	
13. hPTH1-CTERM-forw:	$T_m = 72,4 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGATTCTACTGTTTCTGCAATGGCGAGGTACAAGCTGAGATC-3'	
14. hPTH1-CTERM-rev:	$T_m = 73,7 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGATCCTCACATGACTGTCTCCCACTCTTCCTGTAGCAG-3'	
15. PTHR-homo(219-242):	$T_m = 73,2 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-ATGGGGACCGCCCGGATCGCACC-3'	
16. PTHR-homo(2000-1965):	$T_m = 71,6 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-TCACATGACTGTCTCCCACTCTTCCTGTAGCAGGG-3'	
17. PDZK1-5'(XhoI):	$T_m = 74,9 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-CTCGAGTTATGACCTCCACCTTCAACCCCGAGAATGTAAACTGT-3'	

18. PDZK1-3'(BamHI):	$T_m = 74,3 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGATCCTCACATCTCTGTATCTTCAGAATTGGAAGAAGAATGTGAGGGCTG-3'	
<hr/>	
19. PDZ1-5'(SfiI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGCCATGGAGGCCGAATGTAAACTGTCCAAGCAAGAAGGGCAAAACTA-3'	
<hr/>	
20. PDZ1-3'(SfiI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGCCTCCATGGCCCTAATCCCCATCCAGAAGTAAAGTCACTGAAT-3'	
<hr/>	
21. PDZ2-5'(SfiI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGCCATGGAGGCCCGGCTCTGCTATCTCGTGAAGGAGGAAGGAGG-3'	
<hr/>	
22. PDZ2-3'(SfiI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGCCTCCATGGCCCTATTCTTTGTCCACCAGCAGGAACATGACACGG-3'	
<hr/>	
23. PDZ3-5'(SfiI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGCCATGGAGGCCATTGTGGAGATGAAGAAAGGAAGCAATGGCTATGGTTTCTATC-3'	
<hr/>	
24. PDZ3-3'(SfiI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGCCTCCATGGCCCTACTCTTTGTCTACCACCAACAGTGAAGTCTGATCTC-3'	
<hr/>	
25. PDZ4-5'(SfiI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGCCATGGAGGCCCTCTGCAGGCTGGCTAAAGGTGAAAATGGCTATG-3'	
<hr/>	
26. PDZ4-3'(SfiI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGCCTCCATGGCCCTACTTCTTTCCACAGACTAGAAGTGTGACATTCTTCC-3'	
<hr/>	
27. PDZK1-5'(SfiI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGCCATGGAGGCCATGACCTCCACCTCAACCCCCGAGAATGTAAAC-3'	
<hr/>	
28. PDZK1-3'(SfiI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGCCTCCATGGCCCTCACATCTCTGTATCTTCAGAATTGGAAGAAGAATGTGAGGC-3'	
<hr/>	
29. hPTHR-5'(NotI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GCGGCCGCAATGGGGACCGCCCGGATCGCAC-3'	
<hr/>	
30. hPTHR-3'(BamHI):	$T_m = 73,9 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGATCCTCACATGACTGTCTCCACTCTTCCTGTAGC-3'	
<hr/>	
31. PDZK1-5'(NotI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GCGGCCGCAATGACCTCCACCTCCAACCCCCGAGAATGTAAACT-3'	
<hr/>	
32. PDZK1-5'(1181-1215):	$T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-TCTCTGGAAGTCTCAAGTCCACCAGATACTACAG-3'	
<hr/>	
33. PDZK1-3'(1490-1453):	$T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-AATCATAGGCCTTCTTTCCACAGACTAGAAGTGTGAC-3'	
<hr/>	
34. PDZK1-3'(no stop):	$T_m = 70,5 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-CCATCTCTGTATCTTCAGAATTGGAAGAAGAATGTGAGGC-3'	
<hr/>	
35. PDZ1-5':	$T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GCTATGGAATGTAAACTGTCCAAGCAAGAAGGGCAA-3'	
<hr/>	
36. PDZ1-3'(no stop):	$T_m = 70,6 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-CATCCCCATCCAGAAGTAAAGTCACTGAATTCCC-3'	
<hr/>	
37. PDZ2-5':	$T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GCTATGCTCTGCTATCTCGTGAAGGAAGAAG-3'	

48. PDZ2-3'(no stop):	$T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-CTTCTTTGTCCACCAGCAGGAACATGACACG-3'	
39. PDZ3-5':	$T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GCTATGCGAATTGTGGAGATGAAGAAAGGAAGCAATG-3'	
40. PDZ3-3'(no stop):	$T_m = 70,6 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-CTTTGTCTACCACCAACAGTGAAGTCTGATCTCCAC-3'	
41. PDZ4-5':	$T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GCTATGCTCTGCAGGCTGGCTAAAGGTG-3'	
42. PDZ4-3'(no stop):	$T_m = 70,6 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-CTCCACAGACTAGAAGTGTGACATTCTCCCACTG-3'	
43. NHERF1-5'(618-645):	$T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-CTTCGGCCTCGGCTCTGTACCATGAAG-3'	
44. NHERF1-3'(919-883):	$T_m = 70,6 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-TGCTCCTGAGATGGGATCACTCTGCATTTCTTGAAG-3'	
45. NHERF2-5'(51-76):	$T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-AGAGCAGGGCTACGGCTTCCACCTG-3'	
46. NHERF2-3'(405-382):	$T_m = 69,6 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-AGCTTCGGAGCTGTGGCTGCCGG-3'	
47. NHERF1-3'(BamHI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GGATCCGAGATGAGCGCGGACGCAGCGG-3'	
48. NHERF1-5'(NotI):	$T_m > 75 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-GCGGCCGCTCAGAGGTTGCTGAAGAGTTCGTTTTTCTTGCTCCAG-3'	
49. NHERF2-3'(HindIII):	$T_m = 72,7 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-AAGCTTGAGATGGCCGCGCCGGAGCC-3'	
50. NHERF2-5'(XbaI):	$T_m = 72,3 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-TCTAGATCAGAAGTTGCTGAAGATTTCACGCTTCCTGTTCCAG-3'	
51. MAP17 forw:	$T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-ATGTCGGCCCTCAGCCTCCTCATTCTG-3'	
52. MAP17 rev:	$T_m = 69,5 \text{ }^\circ\text{C}$
5'-TTACATCGGGGTGCTGCGGACCTTGC-3'	

2.9.2 Vektorspezifische Primer

53. Matchmaker 5' AD / LD-Insert-Screening Primer
5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3'
54. Matchmaker 3'-AD / LD-Insert-Screening Primer
5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT-3'
55. T7Promotor-Primer
5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
56. BGH reverse Primer
5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

2.10 Plasmide

pBluescript II SK(+): (Stratagene, Heidelberg)

pBluescript II SK(+) ist ein 3,0 kb großer Klonierungsvektor, mit 21 einmalig vorkommenden Restriktionsschnittstellen in der Polylinker-Sequenz. Die Polylinker-Sequenz ist flankiert von einem T3 und T7 Promotor, was eine *in-vitro* Translation eines klonierten Genabschnitts erlaubt. Außerdem trägt das Plasmid ein LacZ-Gen, in dem die Polylinker-Sequenz enthalten ist. Damit ist es möglich, Vektoren die kein Insert tragen, in den entsprechenden Bakterienstämmen durch eine Blaufärbung zu erkennen. Zur Selektion trägt der Vektor ein Ampizillin-Resistenzgen.

pCEP4: (Invitrogen, Groningen, NL)

Bei *pCEP4* handelt es sich um einen 10,2 kb großen, episomalen Expressionsvektor, welcher den Cytomegalovirus-Promotor (CMV) besitzt. Dies führt zu einer hohen Transkriptionsrate der jeweils eingefügten DNA, in der entsprechenden Zellumgebung (siehe 2.12). Beim Replikationsstartpunkt (*oriP*) handelt es sich um den Epstein-Barr-Origin. Außerdem trägt das Plasmid ein nukläres Antigen (EBNA-1) um eine extrachromosomale Replikation in humanen Zellen und Primatenzellen zu verhindern. Weiterhin besitzt das Plasmid ein Hygromycin B-Resistenzgen, welches die Selektion von transfezierten Zellen erlaubt. Die Selektion in Bakterien kann durch eine Ampizillinbehandlung erfolgen.

pCR[®]II-TOPO: (Invitrogen, Groningen, NL)

pCR[®]II-TOPO ist ein, in linearisierter Form vorliegender, 3,9 kb großer Klonierungsvektor, welcher an seinen Enden einzelne 3'-Thymidin-Überhänge besitzt, die ein direktes Klonieren von PCR-Fragmenten ermöglichen (siehe 3.2.15). Hierzu ist an den Vektor kovalent Topoisomerase I gebunden, welche ein Verbinden des linearisierten Vektors mit dem PCR-Fragment zulässt. Dieser Vektor besitzt sowohl Ampizillin- als auch Kanamycin-Resistenz und eignet sich ebenfalls zur Blau-Weiß-Selektion.

pcDNA 3.1 / CT-GFP-TOPO: (Invitrogen, Groningen, NL)

Dieser Vektor ist 6,1 kb groß und besitzt die gleichen Eigenschaften wie der oben beschriebene *pCR[®]II-TOPO*-Vektor. Erfolgt die Klonierung des PCR-Fragments im richtigen Leseraster, so erhält man ein Fusionsprotein, welches am C-Terminus ein GFP („green fluorescent protein“) trägt.

pGBKT7: (Clontech, Heidelberg)

Der 7,3 kb große pGBKT7-Vektor ist so konstruiert, dass Proteine, die mit einer Gal4-DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) fusioniert sind, exprimiert werden können. In der Hefe werden diese Fusionsproteine durch den konstitutiven ADH1-Promotor in hohem Maße exprimiert. Außerdem enthält pGBKT7 einen T7-Promotor für die *in-vitro* Translation, einen c-Myc-Epitop-Tag und eine multiple Klonierungssequenz. Dieser Vektor repliziert sich autonom sowohl in Hefe, als auch in Bakterien. Zur Selektion in Bakterien trägt der Vektor ein Kanamycin-Resistenzgen und für die Selektion in Hefe, das Gen für die Aminosäure Tryptophan.

pGADT7: (Clontech, Heidelberg)

pGADT7 ist 8,0 kb groß und ist die Grundlage für die Expression von Proteinen, welche mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert sind. Die weiteren Eigenschaften entsprechen dem des pGBKT7-Vektors, außer dass dieser Vektor anstelle des c-Myc-Tag einen HA-Tag besitzt, sowie ein Ampizillin-Resistenzgen anstelle des Kanamycin-Resistenzgens. Das Gen für die Aminosäure Tryptophan ist in diesem Vektor durch das Gen für Leuzin ersetzt.

pACT2: (Clontech, Heidelberg)

pACT2 ist ein 8,1 kb großer Expressionsvektor, der Proteine mit einer GAL4-Aktivierungsdomäne generiert. pACT2 ist der Vorläufer-Vektor zu pGADT7 und wurde von Clontech für die Klonierung der cDNA's der Nierenbibliothek verwendet. Er trägt außerdem ein Ampizillin-Resistenzgen und das Gen für die Aminosäure Leuzin.

pcDNA3.1 / Hygro (+): (Invitrogen, Groningen,NL)

pcDNA3.1 / Hygro (+) ist ein 5,6 kb großer Expressionsvektor, welcher von pcDNA3.1 abstammt. Der Vektor besitzt einen CMV-Promotor für ein hohes Expressionslevel, sowie ein Hygromycin-Resistenzgen zur Selektion stabiler Zelllinien. Außerdem unterliegt dieser Vektor einer episomalen Replikation in Zellen, welche mit dem SV40-Virus infiziert sind oder die das T-Antigen des SV40 Virus exprimieren (z.B. COS-1, COS-7). Zur Selektion in Bakterien trägt dieser Vektor ein Ampizillin-Resistenzgen.

pGEX-5X-1: (Amersham Biosciences, Freiburg)

pGEX-5X-1 ist ein 4,9 kb großer GST-Genfusionsvektor. Der Vektor besitzt einen *tac*-Promotor für eine chemisch induzierbare, hohe Expression des Fusionsproteins. Das GST-Gen enthält weiterhin eine „ATG“-Ribosomenbindungsstelle und steht unter der Kontrolle dieses *tac*-Promotors. Außerdem ermöglicht das Vorhandensein eines *lac I^q*-Gens im Vektor den Einsatz in allen *E.coli*-Stämmen. Das Genprodukt von *lac I^q* wirkt als Repressor und kann durch IPTG,

welches den Repressor bindet und somit eine Konformationsänderung hervorruft, inaktiviert werden. So kommt es durch eine IPTG-Induktion zu einem hohen Expressionslevel des Proteins. Das gewünschte Protein wird als Fusionsprotein mit einem 26 kDa großen, N-terminalen GST-Protein-Anteil exprimiert.

Der GST-Anteil des Fusionsproteins kann bei diesem Vektorsystem durch den Faktor Xa enzymatisch abgespalten werden.

Der Vektor enthält zur Selektion ein Ampizillin-Resistenzgen.

2.11 Bakterien- und Hefestämme

2.11.1 E.coli-Stämme

DH5α: [97]

Genotyp: F Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44* λ *thi-1 gyrA96 relA1*

Dieser Stamm wurde chemisch-kompetent gemacht und für Standard-Transformationen verwendet.

Xl-1 Blue: [24]

Genotyp: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-* F' (*roAB+ lacIq lacZDM15 Tn10*(tetr))

Dieser Stamm wurde für die Elektroporation verwendet.

TOP10F':

Genotyp: F' {*lacI^qTn10*(Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mrcBC* Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 deoR araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

Dieser Stamm wurde für die Transformation von TOPO-Reaktionen verwendet.

XL 10-Gold: [24]

Genotyp: Tet^R Δ (*mcrA*)183 Δ (*mrcCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn10(Tet^R) Amy Cam^R]

BL21 Codon+: [182, 217]

Genotyp: *E.coli* B F *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal* λ (DE3)

Dieser Stamm eignet sich sehr gut zur Proteinexpression von Genen die in einen pGEX-Vektor kloniert wurden. Da Prokaryonten normalerweise eine andere Zusammensetzung ihres tRNA-Pools besitzen als Eukaryonten, kann es bei der Proteinexpression von eukaryontischen Genen in

einem prokaryontischen System, zu Problemen kommen, die sich z.B. in degradierter RNA oder in Codonaustauschen bemerkbar machen. *E.coli BL21 Codon+* wurde nun so konzipiert, dass die normalerweise in Prokaryonten selten vorkommenden eukaryontischen tRNA's in ausreichender Menge produziert werden und somit zu einer optimalen Proteinexpression führen.

2.11.2 *Saccharomyces cerevisiae*

AH109 :[119]

Genotyp : MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

Reportergene: HIS3, ADE2, lacZ, MEL1

Y187 :[100]

Genotyp : MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-2,112, gal4Δ, met⁻, gal80Δ, URA3:: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ,Mel1

Reportergene : lacZ, MEL1

2.12 Zelllinien

HEK 293 E+ (human embryonic kidney, EBNA+)

Die nachfolgend aufgeführten Zelllinien sind transfezierte HEK 293 E+-Zellen (human embryonic kidney). Hierbei handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen die mit der Adenovirus Typ5-DNA transfeziert wurden [85]. Die hier verwendete Zelllinie wurde von Invitrogen erworben und wurde zusätzlich mit dem Eppstein-Barr-Virus-Gen (EBNA-1) stabil transfeziert. Das EBNA-1 Gen steht unter der Kontrolle eines CMV Promotors und wird so konstitutiv und hoch exprimiert. Außerdem trägt das Plasmid ein Neomycin-Resistenz-Gen, so dass ein Selektionsdruck durch Geneticin (G 418 Sulfat) auf die Zellen ausgeübt werden kann. Vektoren die einen EBV-Replikationsstartpunkt (oriP) tragen, werden in diesen Zellen in hoher Anzahl exprimiert. Einer dieser Vektoren ist pCEP4 (Invitrogen). Dieser wurde auch für die Herstellung in der folgenden Zusammenfassung aufgeführten stabilen Zelllinien verwendet.

Stabile Zelllinie basierend auf HEK 293 E+	eingebrahtes Gen
hP1R	humaner PTH1 Rezeptor
hP2R	humaner PTH2 Rezeptor (hP2R)
P2R-P1T	hP2R mit Austausch des C-Terminus des PTH1R an Pos. 493
P2R-L2	hP2R mit Austausch der AS DT->EK im 2. intrazell. Loop
P2R-L3	hP2R mit Austausch der AS IW->LR im 3. intrazell. Loop
P2R-L2/3	Kombination aus L2 und L3
P2R-L2/3-P1T	Kombination aus P2R-L2, P2R-L3 und P2R-P1T
opP1R	opossum PTH1-Rezeptor
Y453A	opP1R mit der Mutation Y453A
F454A	opP1R mit der Mutation F454A
C455A	opP1R mit der Mutation C455A
N457A	opP1R mit der Mutation N457A
Del 453-457	opP1R mit Deletion der Aminosäuren 453-457
Y453A/N457A	Kombination aus Y453A und N457A

MDCK-Zellen [75]

MDCK-Zellen sind benannt nach S. Madin und N.B. Darby. Es handelt sich dabei um normale Nierenzellen (kidney) von *Canis familiaris* (Cockerspaniel). MDCK-Zellen besitzen unter anderem einen schwach exprimierten, endogenen PTH1R.

Die weiterhin verwendeten Subklone MDCK-C7 und MDCK-C11 stammen von Prof. M.Gekle (Physiologisches Institut, Universität Würzburg). Diese wurden anhand ihrer morphologischen Unterschiede aus der Gesamtpopulation selektioniert.

COS-7-Zellen [81]

Die Zelllinie stammt aus der Niere von *Cercopithecus aethiops* (Malawi-Meerkatze). Die ursprüngliche Zelllinie CV-1 wurde durch Transfektion mit einer Origin-defekten Mutante des SV40-Gens, welches für das Wildtyp T-Antigen codiert, verändert.

OK-Zellen [140]

Bei OK-Zellen handelt es sich um Endothelzellen aus dem proximalen Tubulus der Niere von *Didelphis marsupialis virginiana* (Nordafrikanisches Opossum). Es werden unter anderem der alpha-2-adrenerge Rezeptor, der Serotonin-Rezeptor und der Parathormon-Rezeptor exprimiert.

SaoS-2-Zellen

Hierbei handelt es sich um eine humane Osteosarkom-Tumorzelllinie, welche von J. Fogh und G. Trempe [63] aus Knochen isoliert wurde. Bekannte Rezeptoren, die in dieser Linie exprimiert werden sind u.a. der EGF-Rezeptor (epidermal growth factor), der TGF-beta-Rezeptor (transforming growth factor, Typ 1 und 2) sowie der PTH1-Rezeptor .

ROS 17 / 2.8-Zellen

Hierbei handelt es sich um eine aus der Ratte stammende Osteosarkom-Tumorzelllinie, die ebenfalls den PTH1-Rezeptor exprimiert.

HT-29-Zellen

Hierbei handelt es sich um eine humane Kolonkarzinom-Zelllinie, welche unter anderem Muzin, die sekretorische Komponente von IgA, TGF beta-bindendes Protein und MAP17 expremiert. Das p53 Antigen wird in dieser Linie überproduziert. Expremierte Rezeptoren sind unter anderem der Urokinase-Rezeptor (u-PAR), der Vitamin D-Rezeptor und der adrenerge Rezeptor alpha2A.

2.13 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium (Luria-Bertami Medium)

Hierzu wurden 5 g Hefeextrakt, 10 g Bakto-Trypton und 5 g NaCl in 1 l H₂O gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt. Zur Sterilisation wurde das Medium autoklaviert.

LB-Agarplatten

1 l LB-Medium wurde mit 15 g Agar-Agar versetzt, autoklaviert und nach Abkühlung auf 60 °C in Petrischalen gegossen. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4 °C.

SOC-Medium

Für 1 l Medium wurden 20 g Bakto-Trypton, 5 g Hefeextrakt und 0,5 g NaCl in 950 ml H₂O gelöst. Aus einer 250 mM KCl-Stammlösung (1,86 g KCl in 100 ml H₂O) wurden 10 ml zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 5 N NaOH auf 7,0 eingestellt. Nach Auffüllen des Volumens auf 1 l wurde das Medium autoklaviert. Nach Abkühlen auf 60 °C wurden 10 ml einer 1 M Glucose-Stammlösung (18,2 g Glucose in 10 ml H₂O, steril filtriert) zugegeben.

Ampizillin-Stammlösung

Für eine 50 mg / ml Stammlösung wurden 500 mg Ampizillin-Natriumsalz in 10 ml deionisiertem Wasser gelöst, danach steril filtriert und in Aliquots bei –20 °C gelagert. Die Endkonzentration im Medium betrug 100 µg / ml.

Kanamycin-Stammlösung

300 mg Kanamycin wurden in 10 ml H₂O gelöst, steril filtriert und bei –20 °C gelagert. Die Arbeitskonzentration betrug 30 µg / ml.

X-Gal-Platten

Für X-Gal-Platten wurden 40 µl einer 20 mg / ml X-Gal Stammlösung (gelöst in DMF) und 4 µl einer 200 mg / ml IPTG-Stammlösung auf LB-Platten gegeben und mit einem Drygalski-Spatel verteilt. Anschließend wurden die Platten für mindestens zwei Stunden bei 37 °C getrocknet.

2.14 Medien für die Hefekultur

YPD-Medium

Für 1 l Medium wurden 20 g Difco-Pepton, 10 g Hefeextrakt in 950 ml deionisiertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde auf 5,8 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden 50 ml einer steril filtrierten 40 % Glucose-Stammlösung zugegeben.

YPD-Platten

1 l YPD-Medium wurde vor dem Autoklavieren 20 g Agar zugegeben. Nach Abkühlen des Mediums und Zugabe der Glucose wurde das Medium in Petrischalen gegossen. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert.

YPDA-Medium

Für das Adenin supplementierte YPD-Medium wurde 1 l YPD-Medium autoklaviert und nach dem Abkühlen mit 15 ml einer 0,2 % Adenin-Hemisulfat-Lösung (Enkonzentration im Medium 0,003 %) versetzt.

SD-Minimalmedium

26,7 g der SD-Minimal-Base (Clontech) und 0,64 g des Dropout-Supplements -Ade/-His/-Leu/-Met/-Trp wurden in 1 l H₂O gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 6,8 eingestellt und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen auf 55 °C wurde das Medium mit den entsprechenden Aminosäure-Stammlösungen ergänzt, um die gewünschten Minimalmedien zu bekommen.

SD-Minimalmedium-Platten

Einem Liter Minimalmedium wurden vor dem Autoklavieren 20 g Agar zugesetzt. Nach Abkühlen auf 60 °C wurde das Medium mit den entsprechenden Aminosäure-Stammlösungen ergänzt und in Petrischalen gegossen. Nach dem Trocknen wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

Verwendete Aminosäure-Stammlösungen (100x)

L-Adenin-Hemisulfat Salz	2 g / l
L-Histidin HCl-Monohydrat	2 g / l
L-Leuzin	10 g / l
L-Methionin	2 g / l
L-Tryptophan	2 g / l

2.15 Lösungen und Materialien für die Zellkultur und Bioassays

[¹²⁵ I]- Nle ^{8,21} Tyr ³⁴ rPTH (1-34)amid	NEN
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IMBX)	Sigma
6-, 12-, 24- Loch Platten	Costar
Bisindolylmaleimid- Derivat GF 109203X	Calbiochem
Bovines Serumalbumin (BSA)-Initale Fraktion < 99 % Reinheit	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)-Initiale Fraktion 95 % Reinheit	Sigma
cAMP Radio-Immunoassay	Immundiagnostik
Dulbecco's MEMalpha	Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax	Invitrogen
Effectene® Transfection Reagent	Qiagen
Einfrieröhrchen 1,8 ml	Greiner
Fluo-3-acetoxymethylester (Fluo-3-AM)	Molecular Probes, Eugene, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech
Gewebekulturflaschen T75, T25	Greiner
Gewebekulturschalen 60 mm	Greiner
Glasröhrchen für cAMP-Messung	Sarstedt
Hygromycin B	Roche, Mannheim
Isoquinolin-Sulfonamid-Derivat H-89	Calbiochem
Lipofectamin	Invitrogen
McCoy's 5a Medium mit 1,5 mM Glutamin	Invitrogen
Myo [³ H]-Insoitol	Amersham
Neubauer-Zählkammer	GLW
Nle ^{8,21} Tyr ³⁴ rPTH (1-34) amid	Bachem
PBS (steril)	PAN Biotech
Pipetten (einzeln steril verpackt) 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Falcon
Poly-Prep-Säulen	BioRad
Ready Protein + TM	Beckmann Coulter
Serumröhrchen für Bindungsstudien	Sarstedt
Trypanblau	Sigma
Trypsin	Sigma

2.16 Computerprogramme und Internet-Adressen

2.16.1 Computergestützte Sequenzanalyse

Name	Anwendung	www-Adresse
BLAST	Suche nach ähnlichen DNA- oder Proteinsequenzen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
BLASTN	durchsucht die Datenbank nach ähnlichen DNA-Sequenzen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
BLASTP	durchsucht die Datenbank nach ähnlichen Protein-Sequenzen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
ClustalW	Vergleich von DNA oder Proteinsequenzen	http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/
Expasy-TranslateTool	Übersetzen einer DNA-Sequenz in eine Proteinsequenz in allen sechs möglichen Leserastern	http://www.expasy.ch/tools/dna.html
PubMed	Literaturrecherche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi
reverse/complement	Zum Invertieren und Erstellen komplementärer Sequenzen einer bekannten DNA	http://bir.biology.washington.edu/SMS/index.html
ScanPfam	Durchsuchen einer Proteinsequenz nach Motiven die in der PFAM Datenbank gespeichert sind	http://www.sanger.ac.uk/Pfam/search.shtml
ScanProsite	Durchsuchen einer Proteinsequenz nach Motiven die in der PROSITE Datenbank gespeichert sind	http://www.expasy.ch/tools/scnpsit1.html
Swiss-3DIMAGE	Datenbank für biologische Makromoleküle mit bekannter dreidimensionaler Struktur	http://www.expasy.org/sw3d/
Swiss-Model	Zur automatischen Generierung von 3D-Proteinmodellen	http://swissmodel.expasy.org/
WebCutter 2.0	zeigt Restriktionsschnittstellen in einer DNA-Sequenz auf	http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html

2.16.2 Computerprogramme

Programm	Verwendung
DeepView / Swiss-PDBViewer 3.7	Programm zur Darstellung und Bearbeitung von 3D-Modellen (pdb-Dateien)
EndNote 5.0	Verwalten von Literatur
Excel 2000	Tabellenkalkulation
GeneTools	Programm zum Auswerten von Sequenzen (Restriktionsschnittstellen, Translation, Verwalten von Sequenzen)
Graph Pad Prism™ 4.0	Auswertung der Bioassays und Erstellung von Graphen
Photoshop 5.0	Erstellen von Präsentationen und in dieser Arbeit aufgeführte Graphiken
StatView 5.0	Statistikprogramm
Word 2000	Textverarbeitung

3 Methoden

Alle Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach „Current Protocols in Molecular Biology“ durchgeführt.

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Kultur auf Platten

Um aus einer Suspension einzelne Bakterienklone zu gewinnen (z.B. nach Transformation) wurden 100-200 µl Bakteriensuspension auf eine Agar-Platte pipetiert und mit einem Drigalski-Spatel verteilt. Zur Sterilisation wurde der Spatel in Ethanol getaucht und anschließend abgeflammt. Die Petrischalen wurden umgekehrt bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.1.2 Kultur im Flüssigmedium

Hierzu wurde mit einer sterilen Impföse eine einzelne Kolonie von einer Platte gepickt oder mit der Öse von der Oberfläche einer gefrorenen Glycerinkultur abgekratzt. Die Öse wurde in das entsprechende Selektionsmedium getaucht. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler (200-250 rpm).

3.1.3 Kurzzeitige Konservierung von Bakterienstämmen

Die Bakterienkultur wurde mit einem Drigalski-Spatel auf einer Agar-Platte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert, bis deutliche Kolonien zu erkennen waren (12-18 h). Die Bakterienplatten können so bei 4 °C für vier bis sechs Wochen bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

3.1.4 Langfristige Lagerung von Bakterienstämmen (Glycerinkultur)

Um Bakterienstämme länger lagern zu können, wurde 1 ml von einer Übernachtskultur mit 500 µl 87 %igem sterilem Glycerin versetzt und diese bei -80 °C eingefroren und gelagert.

3.1.5 Bestimmung der optischen Dichte (OD) aus einer Bakterienflüssigkultur

Um die Bakteriendichte im Flüssigmedium zu bestimmen, wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm im Biophotometer gemessen. Als Referenzwert wurde steriles Bakterienmedium verwendet. Es gilt bei einer OD von 1 und einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm, dass sich in der Lösung 8×10^8 Zellen / ml befinden.

3.1.6 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Nach D. Hanahan [97] :

Lösung I:	30 mM	Kaliumacetat
	50 mM	Manganchlorid
	100 mM	Rubidiumchlorid
	10 mM	Calciumchlorid
	15 %	Glycerin

Mit Essigsäure wurde der pH-Wert der Lösung I auf 5,8 eingestellt und anschließend steril filtriert. Eine Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Lösung II:	10 mM	MOPS
	75 mM	Calciumchlorid
	10 mM	Rubidiumchlorid
	15 %	Glycerin

Der pH-Wert von Lösung II wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt, die Lösung steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Es wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie (z.B. DH5 α , XL-1 Blue) angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Diese 5 ml wurden am nächsten Tag mit 100 ml warmem LB-Medium verdünnt und bis zum Erreichen der OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde danach kurz auf Eis gestellt und anschließend in einer Hettich-Zentrifuge bei 4 °C und 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml kalter Lösung I resuspendiert und erneut bei 4000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach erneuter Resuspendierung der Zellen in 8 ml Lösung II, wurden die Zellen in 200 μ l Aliquots bei -80 °C eingefroren.

3.1.7 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Gewinnung von elektrokompetenten Zellen wurde von einer Platte eine 5 ml Übernachtskultur angeimpft, die am nächsten Tag in 200 ml warmes LB-Medium gegeben wurde. Nach Erreichen der OD₆₀₀ von 0,6 und kurzem Abkühlen der Zellen auf Eis, erfolgte die Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 min. Das Pellet wurde in 100 ml eiskaltem sterilem Wasser durch Schütteln resuspendiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde nach gründlichem Entfernen des Überstandes in 400 μ l kaltem Wasser aufgenommen und mit 10 % Glycerin versetzt. Die Zellen wurden in gekühlten Eppendorf-Gefäßen zu 40 μ l aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterienzellen

3.2.1.1 alkalische Mini-Präparation

Die alkalische Minipräparation beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse [13]. In einem sehr hohen pH-Bereich (12,0-12,5) denaturiert genomische, lineare DNA. Kovalent geschlossene zirkuläre DNA (Plasmid-DNA) bleibt aber in Lösung. Während der Präparation wird die DNA-Lösung erst einem alkalischen pH-Wert ausgesetzt und anschließend wieder neutralisiert. Daraufhin fällen genomische DNA als unlöslicher Komplex und ebenso SDS-Proteinkomplexe aus der Lösung aus. Diese können zusammen abzentrifugiert werden.

Diese Methode kann verwendet werden um geringe DNA-Mengen zu erhalten. Da diese DNA aber durch RNA verunreinigt ist, ist ein anschließender Verdau mit RNase A nötig.

verwendete Lösungen:

GTE-Puffer:	50 mM	Glukose
	25 mM	Tris-HCl (pH = 8,0)
	10 mM	EDTA (pH = 8,0)
Lysispuffer:	0,2 N	NaOH
	1 %	SDS
saure Kaliumacetat-Lösung:	60 ml	5 M Kaliumacetat
	11,5 ml	Eisessig
	28,5 ml	H ₂ O

3 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (3000 rpm, RT) und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert und mit 200 µl Lysispuffer versetzt. Ein Mischen erfolgte durch Invertieren der Reaktionsgefäße. Die Lösung wurde 5 min auf Eis inkubiert, anschließend mit 150 µl saurer Kaliumacetatlösung versetzt, kräftig gemischt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, RT) wurde der Überstand in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, 750 µl kaltes Ethanol zugegeben und der Ansatz bei -20 °C für 1 h inkubiert. Durch anschließendes zentrifugieren (13.000 rpm, 20 min) wurde die DNA pelletiert und nach einem Waschschrift mit 500 µl 70 %igem Ethanol und anschließender Abnahme des Überstandes bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 30 µl H₂O aufgenommen.

3.2.1.2 Plasmid-Präparation nach Qiagen

Durch die Präparation nach der Qiagen-Methode erhält man DNA von hohem Reinheitsgrad. Die RNA wird durch Zugabe von RNase verdaut. Die verwendeten Qiagensäulen sind Anionenaustauschersäulen mit großporigen Silikatkugeln (Porendurchmesser im Durchschnitt 100 µm), die von hydrophilen Substanzen umhüllt sind. Mittels der mitgelieferten Puffer wird die DNA zunächst an die Säule gebunden und nach einem anschließenden Waschschrift, der die DNA von Verunreinigungen trennt, wieder von der Säule eluiert.

Im Kit wurden folgende Puffer mitgeliefert: Puffer P1, Puffer P2, Puffer N3, Puffer PE und Puffer EB; Eine genaue Zusammensetzung der Puffer ist nicht im Protokoll angegeben.

Für Anwendungen, die einen hohen Reinheitsgrad der DNA verlangen (z.B. Ligationen) wurde der QIAprep-Spin-Mini-Kit verwendet. Es wurden 5 ml einer Übernachtskultur bei 3000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 250 µl Puffer P1 (enthält RNaseA) resuspendiert und die Suspension in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden 250 µl Puffer P2 zugegeben, die Reaktionsgefäße invertiert und der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur zur Lyse der Zellen inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl Puffer N3 und kräftigem Invertieren bildet sich ein flockiger, weißer Niederschlag, der durch Zentrifugation bei 13.000 rpm pelletiert wurde. Der Überstand wurde auf die vorbereiteten Qiagensäulchen pipettiert, welche in einem 2 ml Auffanggefäß stecken. Eine anschließende Zentrifugation von 1 min bei 13.000 rpm bewirkte, dass der Überstand über die Säulen gezogen wurde. Nach Entfernen der abzentrifugierten Lösung, wurden die Säulen durch Zugabe von 750 µl Puffer PE gewaschen. Der Waschpuffer wurde ebenfalls durch Zentrifugation bei 13.000 rpm entfernt. Nach dem Trocknen der Säulen wurden diese in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß platziert, 50 µl Puffer EB auf die Säulen gegeben und nach einer Inkubation von 2-3 min die DNA mittels Zentrifugation (13.000 rpm, RT, 1 min) von der Säule eluiert. Die Plasmid-DNA Konzentrationen betragen in der Regel zwischen 200 µg / ml und 600 µg / ml.

3.2.2 Plasmid-Maxi-Präparation

Um größere Mengen DNA zu erhalten wurde eine Plasmid-Maxi-Präparation durchgeführt. Es wurde der QIAfilter-Maxi-Kit von Qiagen verwendet.

100 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge, Rotor GSA, 6000 rpm, 15 min) und in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach der Zellyse mit 10 ml Puffer P2 und der Präzipitation von genomischer DNA und Proteinen mit Puffer N3 wurde die gesamte Lösung in eine Spritze mit Filter (im Kit mitgeliefert) gegeben. Nach 10 min Inkubation wurde, indem die Lösung durch den Filter gedrückt wurde, das Lysat vom Präzipitat getrennt. Aus dem

klaren Lysat wurde durch Zugabe von 12,5 ml Isopropanol und anschließender Zentrifugation (Beckmann-Zentrifuge, Rotor SS34, 15.000 rpm, 30 min) die DNA pelletiert. Nach einmaligem Waschen des Pellets mit 5 ml 70 %igem Ethanol (15.000 rpm, 10 min) und Trocknen der DNA, wurde diese in 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris-Cl pH = 8,0, 1 mM EDTA (pH = 8,0)) gelöst. Die Ausbeute bei der Maxi-Präparation lag zwischen 500 µg / ml und 1 mg / ml.

3.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

UV-Licht der Wellenlänge 260 nm wird von Nukleinsäuren absorbiert. Durch Messung der Extinktion bei 260 nm im Bio-Photometer wurde die DNA-Konzentration bestimmt. Hierbei entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 50 µg DNA / ml. Da Proteine das UV-Licht bei 280 nm absorbieren, kann aus dem Quotienten 260 nm / 280 nm auf die Reinheit der DNA-Lösung geschlossen werden. Verunreinigungen durch Proteine mindern diesen Quotienten. Der Quotient reiner DNA liegt bei 1,8.

Zur Messung wurde eine Verdünnung der DNA-Lösung von 1:69 in Wasser hergestellt. Als Referenzwert diente reines Wasser. Die Messung erfolgte bei 260 nm und 280 nm.

3.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung aus Agarosegelen

Hierzu wurde eine kleine Menge DNA auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Als Vergleichswert diente ein Massen-Marker (high-mass Marker, MBI). Mit Hilfe dieses Markes war es möglich aus der Intensität der Bande auf die ungefähre DNA-Menge im Aliquot zu schließen.

3.2.5 DNA-Fällung

DNA kann aus einer 70 %igen Ethanollösung in Gegenwart von Natriumionen präzipitiert werden. In 70 %igem Ethanol sind die Alkalisalze der DNA unlöslich, weil die geladenen Phosphodiester- und Phosphatgruppen nicht mehr in ausreichender Menge hydratisiert vorliegen. Durch Zugabe von Natriumsalzen wird dieser Effekt verstärkt, weil diese zusätzlich zur DNA um die Hydrathüllen in Konkurrenz treten [53].

Die zu fällende DNA-Lösung wurde mit H₂O auf 300 µl aufgefüllt. Durch Zugabe von 30 µl 3 M Na-Acetat (Endkonzentration 0,3 M) und 750 µl 100 %igem Ethanol (2,5 Volumenprozent) wurde die DNA für mindestens 1 h bei -20 °C gefällt. Das durch eine anschließende Zentrifugation (13.000 rpm, 30 min) erhaltene Pellet wurde einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend nochmals 5 min zentrifugiert. Das nach dem Abnehmen des Überstandes vorhandene Pellet wurde anschließend luftgetrocknet.

3.2.6 DNA-Reinigung mittels Phenol / Chloroform

Eine gute Methode um verunreinigte DNA von Proteinen zu befreien ist die Phenol / Chloroform-Extraktion.

Hierzu wurde die DNA-Lösung mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt und mit 500 µl Phenol versetzt. Der Ansatz wurde 3 min kräftig geschüttelt und dann bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die obere, wässrige, DNA-enhaltende Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500 µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (29:28:1) wiederum 3 min geschüttelt. Nach dem Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurden 500 µl Chloroform zugegeben um Phenolreste zu entfernen. Dieses Gemisch wurde wiederum 3 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis kein Phenolgeruch mehr wahrnehmbar war. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt (siehe 3.2.5).

3.2.7 Enzymatische Spaltung von DNA (Restriktionsverdau)

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche die beiden DNA-Stränge durch Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen spalten. Diese Enzyme erkennen innerhalb der DNA spezifische Zielsequenzen. Dabei handelt es sich meist um Palindrome mit einer Länge von 6 bis 8 bp. Je nach Enzym kann die Spaltung der DNA-Stränge auf gleicher Höhe erfolgen, wobei sogenannte „blunt-end“- Fragmente entstehen. Ist die Schnittstelle um 2 bis 6 bp versetzt, so ergeben sich „sticky-end“-Fragmente, wobei je nach Enzym 3'- oder 5'- Enden zurückbleiben.

Die Bedingungen für einen Restriktionsverdau sowie die Enzymmenge entsprachen den Angaben der Hersteller (Invitrogen, MBI, NEB). Ein vollständiger Restriktionsverdau wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt und nach Inkubation von 1-2 h, bei 37 °C auf ein 1 %iges Agarsegel aufgetragen (siehe 3.2.8).

Für manche Anwendungen war es nötig einen partiellen Verdau der DNA zu erwirken. Das bedeutet, dass nicht alle Restriktionsschnittstellen, die von dem jeweiligen Enzym erkannt werden, geschnitten werden. Dies erreicht man durch den Einsatz einer sehr niedrigen Menge an Enzym und einer kurzen Inkubationszeit bei 37 °C. Zunächst wurde mit einem Enzym verdaut, welches nur eine Schnittstelle im Plasmid besitzt. Anschließend wurde dieser Ansatz über eine Qiagen-säule (aus dem Qiagen PCR purification kit) aufgereinigt, um Salze und restliche Enzyme zu entfernen. Das gereinigte Fragment wurde in 90 µl H₂O aufgenommen und 10 µl 10 x Puffer des entsprechenden zweiten Enzyms zugegeben. Dieser Ansatz wurde in fünf 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt, wobei in das erste Rörchen 30 µl vorgelegt wurden, in Nummer zwei, drei und vier jeweils 20 µl und in das letzte nur 10 µl des Ansatzes. Zu dem ersten Ansatz wurden

2 μ l des zweiten Enzyms auf Eis dazu gegeben und nachdem gut gemischt wurde, 10 μ l in den Ansatz 2 pipettiert. Dieser wurde wiederum gut gemischt und 10 μ l zu Ansatz 3 gegeben usw. Alle Röhrchen wurden für 15 min bei 37  C inkubiert, danach sofort auf Eis gestellt und möglichst schnell mit 5x Stop-Puffer versetzt. Bei der anschließenden Gelelektrophorese konnte man den Partialverdau mit zunehmender Verdünnung des Enzyms beobachten.

3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die hier verwendeten Gelelektrophoresekammern waren das „Hybaid-System“ und das „Joule-Box-System“ von Stratagene.

TBE-Laufpuffer (10x):	108 g	Tris-Base
	55 g	Bors�ue
	40 ml	500 mM EDTA (pH = 8,0)
	mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt	

Ethidiumbromidlösung:	10 mg / ml
-----------------------	------------

5x Stop-Puffer:	10 %	Ficoll 400
	50 mM	Na ₂ EDTA
	0,5 %	SDS
	0.125 %	Bromphenolblau
	0,125 %	Xylencyanol FF

1,2 g Agarose und 120 ml TBE-Laufpuffer wurden in der Mikrowelle aufgekoht und nach Abkühlen auf 70  C mit 3 μ l Ethidiumbromid (10 mg / ml) versetzt. Anschließend wurde die Lösung in die dazugehörigen Gelkammern gegossen. Die Kämme wurden eingesetzt und die Gele 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt.

Für die eigentliche Elektrophorese wurden die Schlitten mit dem Gel in die Kammer eingesetzt und mit Laufpuffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 0,25 Vol.% 5x Stop-Puffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung der unterschiedlichen DNA-Fragmente erfolgte bei 100 V für ca. 25 min.

3.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

3.2.9.1 Qiagen-Kit:

Nach der Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese wurden die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell unter UV-Licht exakt aus dem Gel heraus geschnitten. Die

Exposition mit UV-Licht sollte dabei immer möglichst gering sein, da es sonst zu Mutationen in der DNA kommen kann.

Die Reinigung des Fragments erfolgte mittels des QIAquick Gel Extraction Kits, nach den Angaben des Herstellers. Durch den mitgelieferten Puffer QG wurde die Agarose aufgelöst und der geeignete pH-Wert, sowie die optimale Salz-Konzentration eingestellt. Die Absorption von DNA erfolgte an eine Silicagel-Membran in der Anwesenheit von hohen Salz-Konzentrationen, wohingegen Verunreinigungen nicht gebunden wurden [243]. Die gebundenen DNA-Fragmente wurden anschließend mit 50 µl 10 mM Tris-Puffer von der Säule eluiert.

3.2.9.2 Millipore-Kit (Montage Gel Extraktions-Kit)

Nach dem Ausschneiden der gewünschten Bande aus dem Agarosegel, wurde das Gelstück in eine aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzte Filtervorrichtung gegeben. Das 1,5 ml Zentrifugenröhrchen wurde anschließend bei 5000 x g für 15 min in der Heraeus-Tischzentrifuge zentrifugiert. Dabei wurde zunächst die Gel-Struktur der Agarose durch die Zentrifugalkraft zerstört. Anschließend wurden die Gelfragmente durch eine kleine Öffnung, den sogenannten „Zerstäuber“ gedrückt, so dass am Ende eine aufgereinigte DNA-Lösung übrig blieb. Das Volumen der Lösung richtete sich nach der Menge der Agarose in der das ausgeschnittene Fragment enthalten war. Deshalb wurde beim Ausschneiden das Gelstück möglichst klein gehalten, um eine hohe DNA-Konzentration in der Endlösung zu erreichen.

3.2.10 Dephosphorilierung von 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps

Um eine Religation des linearisierten Vektors bei der Klonierung von DNA-Fragmenten zu verhindern, wurde die Abspaltung terminaler Phosphatgruppen mit der alkalischen Shrimp Phosphatase (Roche) durchgeführt.

Hierzu wurden 7 µl linearisierter Vektor, 0,9 µl Dephosphorilierungspuffer (10 x) und 1 µl Shrimp alkalische Phosphatase zusammen gegeben und für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde eine Hitzeinaktivierung der Phosphatase bei 65 °C für 15 min durchgeführt. Dieser Ansatz wurde für die Ligation verwendet (siehe 3.2.11).

3.2.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation des Vektors mit einem DNA-Fragment wurden zum Ansatz aus dem Dephosphorilierungsschritt 6 µl DNA-Fragment, 4 µl T4 Ligasepuffer (5 x) und 1 µl T4 Ligase (Invitrogen) zugegeben. Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht. Danach wurde die Ligase für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Anschließend wurde der Ligationsansatz für die Transformation in Bakterienzellen verwendet (siehe 3.2.12 und 3.2.13).

3.2.12 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Um die Bakterien mit Plasmid-DNA zu transformieren wurde ein Aliquot (200 µl chemisch kompetente Zellen, siehe 3.1.6) für 10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 500 ng DNA wurden die Zellen nochmals 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s und anschließendem dreiminütigem Abkühlen auf Eis wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei 37 °C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Nach Abzentrifugieren des Mediums und resuspendieren des Pellets in 200 µl frischem LB-Medium wurden die Zellen auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.13 Transformation elektrokompenter Zellen

Die Elektroporation von Zellen ist weitaus effizienter als die chemische Transformation. Deswegen wurde diese Methode vor allem für die Transformation von Liagtionen verwendet. E.coli Zellen wurden in 2 mm Küvetten mit einem 5 ms-Puls von 2500 V transformiert. Ein Aliquot von elektrokompenten Zellen (siehe 3.1.7) wurde auf Eis aufgetaut und 1-3 µl Plasmidlösung zugegeben. Nach kurzem Mischen wurden die Zellen 1 min auf Eis inkubiert und dann in eine vorgekühlte 2 mm Küvette überführt. Mit dem „Easyjet Prima“-Elektroporator wurde der elektrische Puls ausgelöst und die Zellen innerhalb der nächsten 30 s mit 960 µl SOC-Medium gemischt. Die Zellen wurden in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt und 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert.

3.2.14 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR wurde wie bei K. B. Mullis beschrieben durchgeführt [165].

Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) können DNA-Sequenzen amplifiziert werden, sobald die Sequenzen der flankierenden Bereiche bekannt sind. Für die PCR benötigt man Oligonukleotid-Primer in entgegengesetzter Orientierung, welche zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge komplementär sind. Wird die DNA denaturiert, dann können die Primer an die komplementären Sequenzen hybridisieren und dienen so als Startpunkt für die hitzestabile Polymerase.

Die PCR setzt sich aus drei Schritten zusammen:

1. Schmelzen der DNA (Denaturierung): Dieser Schritt wird bei 95 °C durchgeführt und führt zu Einzelstrang-DNA (ssDNA).
2. Hybridisierung der Primer mit den komplementären DNA-Sequenzen (Annealing): Die Temperatur dieses Schritts ist abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) der Primer.
3. DNA-Synthese (Elongation): Dieser Schritt erfolgt bei 72 °C, der optimalen Temperatur für die Polymerase.

Diese Abfolge wurde in der Regel 25 - 40 mal wiederholt. Idealerweise stieg dabei die Anzahl der dsDNA-Moleküle exponentiell an (2^n , n = Anzahl der Zyklen). Normalerweise wurde die sogenannte Taq-Polymerase verwendet. Diese stammt aus *Thermus aquaticus*, ein thermophiles Bakterium, welches in heißen Quellen lebt. Um die Fehlerrate bei der Amplifizierung geringer zu halten wurden außerdem sogenannte „proofreading“-Polymerasen eingesetzt, wie z.B. die Pfu-Polymerase von Stratagene.

3.2.14.1 Konzeption von Primern für die PCR

Bei der Auswahl der Primer ist darauf zu achten, dass beide Primer die selbe Schmelztemperatur besitzen. Der GC-Gehalt sollte außerdem ca. 50 % betragen. Folgende Formeln wurden verwendet um die Schmelztemperatur T_m zu bestimmen:

Bis zu einer Länge von 14 Basenpaaren gilt:

$$T_m = GC \times SL \times 4 + (1 - GC) \times SL \times 2$$

Ab einer Länge von 15 Basenpaaren gilt:

$$T_m = 69,3 + 0,41 + GC\% - \frac{650}{SL}$$

GC: GC-Gehalt

GC %: GC-Gehalt * 100

SL: Sequenzlänge

3.2.14.2 Durchführung der PCR

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten kam der Qiagen HotStarTaq™ DNA Polymerase-Kit zum Einsatz. Durch eine „hot-start“ PCR wird die Spezifität des Produkts und die Ausbeute erhöht. Verwendet wurde die HotStarTaq von Qiagen, welche eine modifizierte Form der 94 kDa Taq-DNA-Polymerase darstellt. Die Polymerase liegt zunächst in inaktiver Form vor und wird durch einen initialen Schritt bei 95 °C für 15 min aktiviert.

Für eine 100 µl PCR-Reaktion wurden folgende Komponenten eingesetzt:

1 µl	Template (=250 ng)
2 µl	dNTP-Mix (1 0mM von jedem Nukleotid)
10 µl	Primer -Mix (Mix aus: 18 µl H ₂ O, 1 µl Primer A, 1 µl Primer B)
10 µl	10x Puffer
10 µl	Lösung Q
0,5 µl	HotStarTaq-Polymerase
66,5 µl	H ₂ O

Das PCR-Programm wurde mit einem Denaturierungsschritt gestartet (15 min, 95 °C). Es folgten 25 - 35 Zyklen mit jeweils drei Abschnitten:

1. <i>Denaturierung</i>	1 min	94 °C
2. <i>Annealing</i>	1 min	65 °C (bei T _m = 70 °C). Die optimale Temperatur liegt in der Regel 5 °C unter der errechneten Schmelztemperatur
3. <i>Elongation</i>	3 min	72 °C Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des Amplifikats und beträgt in der Regel 2 min pro Kilobase (kb)

Anschließend folgte eine finale Extension für 10 min bei 72 °C. In diesem Schritt wurden alle Stränge fertig synthetisiert.

3.2.15 Klonierung mit dem TA Cloning Kit (Invitrogen)

3.2.15.1 Ligation

Der verwendete Vektor pCR[®]II-TOPO liegt in linearisierter Form vor und besitzt an den 3'-Enden einen Deoxythymidin-Überhang, sowie eine kovalent gebundene Topoisomerase I. Hierdurch kann das PCR-Produkt, welches einen 3'-Deoxyadenosin-Überhang (A-Überhang) besitzt, direkt in den Vektor ligiert werden. Die PCR musste hierzu mit einer Taq-Polymerase durchgeführt werden, da nur diese terminale Transferase-Aktivität besitzt und somit einzelne Deoxyadenosine an das 3'-Ende des PCR-Produkts anhängt. Der Nachteil einer Taq-Polymerase ist, dass sie eine höhere Wahrscheinlichkeit besitzt Fehler einzubauen. Sollte dies verhindert werden, musste die PCR mit einer „proof-reading“-Polymerase (Pfu-Polymerase) durchgeführt werden. Da aber die „proof-reading“-Polymerase die A-Überhänge entfernt, war es anschließend notwendig dem PCR-Ansatz 1 µl Taq-Polymerase zuzufügen und den Ansatz bei 72 °C für 10 min zu inkubieren. Dadurch wurden an das PCR-Produkt die 3'-A-Überhänge wieder ange-

fügt. Dieser Ansatz wurde anschließend auf Eis gestellt und sofort in die TOPO-Reaktion eingesetzt.

2 µl PCR-Produkt
0,5 µl Salzlösung
0,5 µl TOPO-Vektor

Der Ansatz wurde gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Transformation in Top10F'-Zellen.

3.2.15.2 Transformation in Top10F'-Zellen

Ein Aliquot von chemisch kompetenten Zellen wurde 5 min auf Eis aufgetaut und 2 µl des Ligationansatzes hinzu pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde ein Hitzepuls von 30 s bei einer Temperatur von 42 °C gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 3 min auf Eis abgekühlt und dann mit 250 µl warmem SOC-Medium versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C und 200 rpm auf dem Schüttler, wurde ein fünftel des Ansatzes und die restlichen 200 µl auf selektiven LB-Agarplatten, welche mit X-Gal / IPTG behandelt wurden, ausgestrichen.

Positive Klone sind nach Blau-Weiß-Selektion die weißen Kolonien. Durch den Einbau des PCR-Produktes wird das LacZ-Gen zerstört, so dass es den Zellen nicht möglich ist β -Galaktosidase zu exprimieren. Das auf den Platten enthaltene X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid) dient als Substrat für das exprimierte Enzym β -Galaktosidase. Bei der Umsetzung entsteht 5-Brom-4-Chlor-Indigo, was eine Blaufärbung der Zellen bewirkt, wenn die Zellen das vollständige lacZ-Gen besitzen.

3.2.16 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden von der Fa. MWG-Biotech, Ebersberg durchgeführt. Die DNA wurde mittels Ethanol gefällt und das Pellet in getrocknetem Zustand verschickt. Die Auswertung der gelieferten Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programm „Gene Tools“. Die Rohdaten konnten mit dem Chromas-Programm betrachtet und überarbeitet werden.

3.2.17 Isolierung von RNA aus Zellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurden diese auf 60 mm Gewebekulturschalen bis zur Konfluenz gezüchtet (siehe 3.4). Pro Schale wurden 0,5 ml TRIzol[®] Reagenz (monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat) zugegeben, die Zellen mit einem Zellschaaber von der Platte gelöst und auf einer Seite der Schale gesammelt. Die Zellsuspension wurde mit einer Insulinspritze (Omnifix-F, 1 ml plus; Feindosierungsspitze: 0,45*12/26G*1/2) mehr-

mals auf- und abgezogen um die Zellen zu homogenisieren. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 12.000 x g für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend in ein neues Gefäß überführt und mit 100 µl Chloroform versetzt, 15 s geschüttelt, 5 min bei RT inkubiert und nochmals bei 12.000 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Ausschütteln mit Chloroform wurde zweimal wiederholt. Danach wurden zur abgenommenen wässrigen Phase 250 µl Isopropanol gegeben, 15 min bei RT inkubiert und die RNA anschließend bei 14.000 x g pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl RNase-freiem H₂O resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

3.2.18 Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Für die RT-PCR wurde der QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit verwendet. Der Kit besteht aus einem Enzym-Mix, welcher sowohl Omniscript™ Reverse Transkriptase, Sensiscript™ Reverse Transkriptase als auch HotStarTaq® DNA Polymerase enthält.

Bei der RT-PCR wird zunächst die im Ansatz enthaltene RNA mittels einer reversen Transkriptase bei 50 °C in cDNA umgeschrieben. Durch einen anschließenden Schritt bei 95 °C wird die reverse Transkriptase inaktiviert und die DNA-Polymerase aktiviert, so dass als nächstes eine Amplifizierung stattfindet.

Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl	RNA (= 1 µg)
3 µl	Primer-Mix (Mix aus: 18 µl H ₂ O, 1 µl PrimerA, 1 µl PrimerB)
1 µl	dNTP's (10 mM von jedem Nukleotid)
5 µl	5x Puffer
5 µl	Lösung Q
1 µl	Enzym-Mix
9 µl	H ₂ O

Dieser 25 µl-Ansatz durchlief folgendes Programm im Thermocycler:

30 min	50 °C	
15 min	95 °C	
45 s	95 °C	} 20-40 mal wiederholt
45 s	65 °C	
1 min	72 °C	
10 min	72 °C	

Die RT-PCR kam zum Einsatz um das Vorhandensein spezifischer RNA in Zellen zu überprüfen. Um auszuschließen, dass eventuell eine Amplifizierung von DNA stattfand, wurden die Primer so konzipiert, dass ein Exon-Intron-Exon-Bereich durch die Primer überspannt wurde. So zeigt das Auftauchen einer größeren Bande an, dass es sich dabei nicht um die Amplifizierung von RNA, sondern um die Amplifikation von genomischer DNA handelt.

3.3 Proteinchemische Standardmethoden

3.3.1 Isolierung von Proteinen aus Zellen

Die Isolierung von Proteinen aus Zellen erfolgte mit Hilfe des sogenannten RIPA-Puffers. Dieser setzt sich wie folgt zusammen:

50 mM	Tris-HCl, pH=7,5
150 mM	NaCl
1 %	Nodidet®P40
0,5 %	Natriumdesoxycholat
0,1 %	SDS
1 Tabl.	Protease-Inhibitoren-Cocktail (Complete™Mini-Tabletten)

Zellen, welche auf 60 mm Gewebekulturschalen bis zur Konfluenz gewachsen waren, wurden dreimal mit 3 ml PBS gewaschen und anschließend auf Eis gestellt. Pro Schale wurden 0,6 ml RIPA-Puffer zugegeben und die Platte bei 4 °C für 15 min auf einem Taumler inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Platte wurde nochmals mit 0,3 ml RIPA-Puffer abgespült und die Überstände vereinigt. Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min, Hereaus-Tischzentrifuge) wurde der Überstand mit den Gesamtproteinen in ein neues Röhrchen überführt und bei –20 °C gelagert.

3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford bestimmt [19]. Hierbei handelt es sich um eine colorimetrische Methode, d.h. der Proteinbestimmung liegt eine Farbreaktion zu Grunde. Die Farbreaktion beruht auf der spezifischen, hydrophoben und elektrostatischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G250 an Argininreste bzw. N-terminale Aminogruppen der gelösten Proteine. Bei der Bildung des Farbstoff-Proteinkomplexes wird vor allem die anionische Form stabilisiert, wobei es im sauren Milieu zu einer Absorptionsverschiebung von 465 nm zu 595 nm kommt. Diese Nachweismethode ist sehr sensitiv und liegt unter optimalen Bedingungen bei einer Nachweisgrenze von unter 1 µg Protein.

Für die Proteinbestimmungen wurde das Bradford-Reagenz von Bio-Rad verwendet. Zu 2 µl Probe wurden 998 µl Bradford-Reagenz (1:4 verdünnt mit H₂O) gemischt und 5 min bei RT in-

kubiert. Die Extinktion wurde anschließend in Einmalküvetten bei 595 nm photometrisch gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Eichgerade erstellt, wobei als Standard Rinderserumalbumin (1 mg / ml BSA) verwendet wurde.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine sind amphotere Makromoleküle und besitzen einen proteinspezifischen Anteil an basischen (Lysin, Arginin, Histidin) bzw. sauren (Asparagin- und Glutaminsäure) Aminosäuren und daraus folgend eine charakteristische Nettoladung. Somit sind Proteine Ladungsträger, die in einem elektrischen Feld frei beweglich sind. Die elektrische Mobilität ist aber auch abhängig von Größe und Form der Proteine, sowie der Art und Konsistenz des jeweiligen Trägermaterials (z.B. poröse Gelmatrix).

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu werden die Proteine mit einem anionischen Detergenz (SDS) in Verbindung mit disulfidsbrückenpaltenden Thiolreagenzien (z.B. β -Mercaptoethanol) vorbehandelt. So werden die Proteine einerseits vollständig entfaltet und in ihre Untereinheiten zerlegt. Andererseits werden die dabei entstandenen Polypeptidketten durch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Detergenz (SDS) gleichsinnig negativ beladen und ihre Eigenladung somit überdeckt. Die so entstandenen SDS-Protein-Mizellen besitzen ein konstantes Ladungs / Masse-Verhältnis und werden so nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt.

Als Trennmedium wird meistens Polyacrylamid verwendet. Diese Gele entstehen durch die Polymerisation von Acrylamid mit N,N'-Methylenbisacrylamid, welches als Quervernetzer dient. Im folgenden wurde die Methode nach Laemmli [144] angewandt. Zuerst wurden die Proben durch ein Sammelgel an der Trennlinie zum Trenngel konzentriert und anschließend im folgenden Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Als Marker (Bio-Rad) wurde ein Gemisch aus Proteinen mit bekannter Molmasse verwendet. Dies erlaubte eine relativ genaue Bestimmung der Molmassen der Proteine in der Probe.

Lösung A:	30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid (gebrauchsfertig, Bio-Rad)
Lösung B (4x):	1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS (pH = 8,8)
Lösung C (4x):	0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS (pH = 6,8)
Lösung D:	10 % Ammoniumpersulfat (APS)
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (BioRad)
Probenpuffer:	Roti-Load (4x) (Fa. Roth)
Elektrophorese- puffer (10 x):	15,1 g Tris; 94 g Glycin; 50 ml 10 % SDS (für 1 l)

Für die Gelelektrophorese wurde das „Mini-Protean®II“-System von Bio-Rad verwendet. Die Apparatur wurde nach den Angaben des Herstellers zusammengebaut. Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Folgender Ansatz reichte für 2 Mini-Gele:

	10 %iges Trenngel	20 %iges Trenngel
Lösung A	6,7 ml	13,4 ml
Lösung B	5 ml	5 ml
Lösung D	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl
H₂O	8,3 ml	1,6 ml

Die Lösungen wurden entsprechend dem obigen Pipettierschema gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von APS gestartet. Das Gel wurde bis ca. 3 cm unter den Rand der Gelkammer gegossen und anschließend mit Butanol (H₂O gesättigt) überschichtet, weil die Polymerisation am besten unter Luftausschluss ablaufen kann. Das Gel sollte vor dem Gießen des Sammelgels 30 min polymerisieren. Anschließend wurde das Butanol entfernt und der Zwischenraum der Glasplatten mit deionisiertem Wasser gespült. Nach dem Trocken der Geloberfläche mit Filterpapier wurde das Sammelgel nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

	5 %iges Sammelgel
Lösung A	1,7 ml
Lösung C	2,5 ml
Lösung D	100 µl
TEMED	10 µl
H₂O	5,8 ml

Das Sammelgel wurde mit Hilfe einer Pateurpipette über das Trenngel geschichtet und anschließend der Kamm eingesetzt. Vor dem Beladen wurde der Kamm entfernt, die Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer befüllt und die Taschen mit diesem Puffer gespült, um Gelreste zu entfernen. Die Proben wurden mit Roti-Load-Puffer (1:3) versetzt, anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert, kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 80 V für ca. 20 min, bis an der Grenze vom Trenngel zum Sammelgel eine diskrete Bande zu erkennen war. Anschließend wurde der Gellauf bei 160 V für 1,5 bis 2 h fortgesetzt. Das Gel wurde im Anschluß entweder mit Coomassie gefärbt (siehe 3.3.4) oder geblottet (siehe 3.3.5).

3.3.4 Färbung von Proteinen mit Coomassie-Brilliantblau

Diese Methode beruht auf der nichtspezifischen Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau R-250 an Proteine. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,3 bis 1 µg Protein / Spur.

Färbelösung:	50 % (v/v) Methanol
	0,005 % (v/v) Coomassie-Brilliantblau R-250
	10 % (v/v) Eisessig
	40 % (v/v) H ₂ O
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Eisessig
	40 % (v/v) Methanol
	50 % (v/v) H ₂ O

Das Gel wurde für 30 min auf dem Kippschüttler in Färbelösung gebadet. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Gel, unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung, für mehrere Stunden entfärbt. Durch Inkubation des Gels in Entfärbelösung welche zusätzlich mit 2 % Glycerol versetzt wurde, konnte das Schrumpfen des Gels rückgängig gemacht werden. Das Gel wurde auf ein Whatmann-Papier gelegt, zwischen zwei Zellophanfolien gepackt und bei 80 °C unter Vakuum für 2 h getrocknet.

3.3.5 „Western-Blotting“ (Immunoblotting)

Der Elektrotransfer von Proteinen (Westernblot) [16, 226] dient der Übertragung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf proteinbindende Oberflächen, wie z.B. Nitrozellulose. Die an die Membrantextur gebundenen Moleküle sind dann leichter zugänglich, z.B. für einen immunologischen Nachweis mit spezifischen Antikörpern. Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten des Elektrotransfers: Zum einen das Tank- oder Naß(zellen)-Blotting und zum anderen das Filter- oder Semi-Dry Blotting. In diesem Fall wurde die Methode des Semi-Dry Blottings angewandt [147].

Semi-Dry-Blotting-Puffer:	2,93 g Glycin, 5,81 g Tris-HCl, 3,7 ml 10 % SDS, 200 ml Methanol; ad. 1000 ml H ₂ O
PBS:	Fa. PAN, ohne Magnesium, ohne Calcium
PBS-T:	PBS + 0,1 % Tween-20
Blocking-Lösung:	5 % Trockenmilch in PBS-T
Ponceau-S-Lösung:	Fa. Sigma

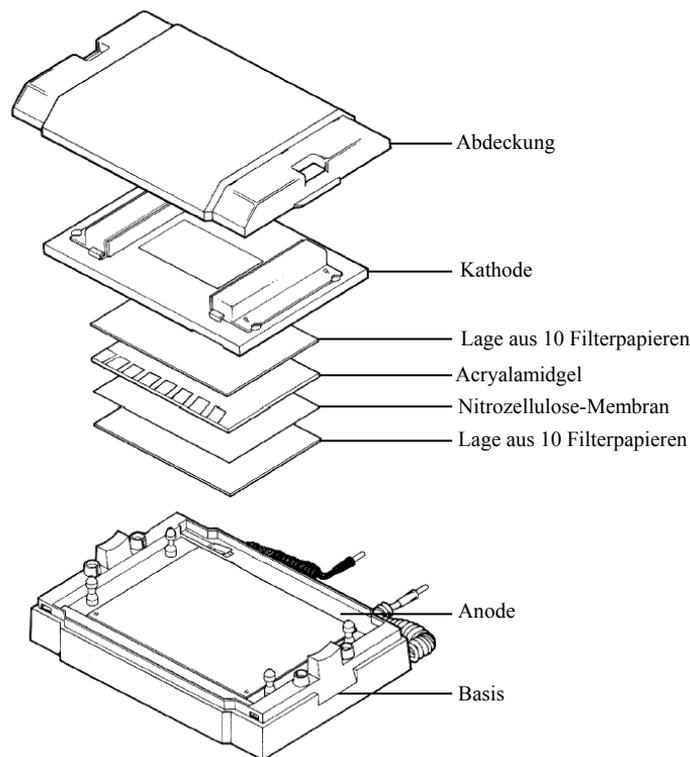


Abb. 3-1: Aufbau eines Western-Blots

Zur Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde die Semi-Dry Blot-Apparatur Trans-Blot SD von Bio-Rad verwendet. Hierzu wurde nach der Elektrophorese das Sammelgel mittels einer Rasierklinge abgetrennt und das Trenngel, sowie die auf gleiche Größe zugeschnittene Membran und 20 Whatman-Filterpapiere für 30 min in Semi-dry-Puffer eingeweicht. Der Aufbau des Blots erfolgte wie in Abbildung 3-1 gezeigt. Der Transfer der Proteine wurde bei 25 V für 2 h durchgeführt. Nachdem der Transfer erfolgt war, wurde die Membran in Ponceau-S-Lösung für 1-2 min gefärbt um die Vollständigkeit des Transfers zu überprüfen [199]. Die Nachweisgrenze dieser Färbung liegt bei 250 bis 500 ng Protein. Zum Entfärben wurde der Blot kurz in PBS geschwenkt.

3.3.6 Immundetektion und Luminolnachweis

Nach dem Transfer auf die Membran folgte die Identifizierung von Antigenen mit spezifischen Antikörpern. Meist handelt es sich dabei um ein indirektes Detektionsverfahren, da zunächst ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen bindet. Im Anschluß daran folgt die Bindung eines markierten Sekundärantikörpers. Diese Markierung kann aus einer Biotinylierung bestehen, eine Markierung mit radioaktiven Isotopen oder eine Adsorption an Schwermetalle sein. In den meisten Fällen wird der Sekundärantikörper chemisch an Enzyme gekoppelt, wie z.B. die Meer-

rettichperoxidase (horseradish-peroxidase = HRP). Der Nachweis erfolgt in diesem Fall mittels luminogener Substanzen.

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde der Blot zunächst 1 h bei RT in Blockpuffer (5 % Trockenmilch in PBS / 0,1 % Tween-20) inkubiert. Danach wurde der erste Antikörper (spezifisch gegen das zu detektierende Protein) in Blockpuffer verdünnt und der Blot über Nacht bei 4 °C in einem 50 ml Plastikröhrchen auf einem Rollinkubator inkubiert. Anschließend wurde fünfmal für 5 min mit PBS / 1 % Tween-20 gewaschen. Der zweite Antikörper, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist und zusätzlich an Meerrettichperoxidase gekoppelt vorliegt, wurde ebenfalls in Blockpuffer verdünnt und der Blot darin 1 h auf einem Kippschüttler inkubiert.

Der Nachweis des Proteins wurde mit dem ECL-Kit (enhanced chemiluminescence kit) von Amersham erbracht. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol. Dies führt zu einer Chemilumineszenz, welche die Schwärzung eines Röntgenfilms zur Folge hat.

Um den Nachweis zu erbringen wurde der Blot in 2 ml Nachweisreagenz (bestehend aus den zwei Komponenten des Kits) für 1 min geschwenkt. Die überstehende Lösung wurde mit Filterpapier gut abgetrocknet und die Membran anschließend für 1 - 30 min, je nach Stärke des Signals, auf einem Röntgenfilm exponiert.

3.3.7 Nachweis von phosphorylierten MAP-Kinasen

Zum Nachweis der Aktivierung von MAP-Kinasen wurden die Zellen, welche stabil mit den verschiedenen Rezeptoren transfiziert waren, in 6-Loch Platten ausgesät. Pro Loch wurden 2 Mio. Zellen eingebracht und mit 1 ml Medium überschichtet. Zuvor wurden die Platten mit Poly-L-Lysin (0,1 mg / ml) beschichtet um ein Ablösen der Zellen zu verhindern. Nach einer Inkubation von 24 h wurde das Zellkulturmedium (DMEM mit Glutamax, 10 % FCS) gegen serumfreies Medium, versetzt mit 1 % BSA, ausgetauscht. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 100 nM hPTH (1-34), 100 nM hTIP39 oder mit 10 % FCS als positive Kontrolle für 5 min oder 15 min stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Gesamtproteine nach der Laemmli-Methode extrahiert. Hierzu wurden 400 µl SDS-Puffer (62,5 mM Tris-HCl (pH = 6.8), 2 % SDS, 10 % Glycerol, 5 % 2-Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau) auf die Zellen gegeben und diese mit einer abgeschnittenen 1000 µl-Pipettenspitze resuspendiert. Nach Überführen der Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, wurden die Proben 10 min bei 95 °C aufgekocht, anschließend für 1 min auf Eis gestellt und dann bei 13.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Zum Nachweis wurden 20 µl der Suspension auf ein SDS-Gel aufgetragen und ein Western Blot durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mittels eines spezifischen Anti-

körpers gegen pERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), welcher in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T (1 x PBS, 0,1 % Tween-20) / 5 % Trockenmilch eingesetzt wurde. Als Sekundärantikörper wurde ein an Meerrettichperoxidase gekoppelter anti-Maus-IgG Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T / 5 % Trockenmilch verwendet.

3.3.8 In-vitro Transkription und Translation

Die in-vitro Transkription und Translation wurde mit dem TNT[®]coupled Retikuloocyte-Lysat Systems von Promega durchgeführt. Dieses System erlaubt die Transkription und anschließende Translation in einem Schritt. Die Reaktion startete in diesem Fall an einem T7-Promotor, der sich sowohl im Vektor pGBKT7 als auch in pGADT7 (beide aus dem Hefescreen) befindet. Weiterhin wurde bei der Reaktion die Aminosäure Methionin als [³⁵S] markiertes Methionin eingesetzt, um einen Nachweis der Produkte mittels Autoradiographie zu ermöglichen.

Die Reaktionen wurden nach dem mitgelieferten Protokoll von Promega durchgeführt. Die so erhaltenen Proteine wurden unter anderem für die Koimmunpräzipitation weiterverwendet.

3.3.9 Koimmunpräzipitation von Proteinen

Mittels der Koimmunpräzipitation sollte die Interaktion von Proteinen, welche z.B. bei einem „Yeast-two-Hybrid Screen“ gefunden wurden, bestätigt werden. Hierfür wurde der Matchmaker-Koimmunpräzipitations-Kit von Clontech verwendet. Dieser Kit ist mit den Vektoren aus dem Gal4 „Yeast-two-Hybrid“ System3 von Clontech kompatibel, so dass ein Umklonieren der DNAs nicht nötig war. Es erfolgte eine Inkubation der beiden in-vitro translatierten Proteine (mit HA- oder c-Myc-Tag) für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde zu dem Ansatz jeweils ein Antikörper (HA-AK oder c-Myc-AK) gegeben und eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Durch anschließende Zugabe von „Protein A-Beads“ konnte der Protein-Protein-Antikörper-Komplex aus der Lösung gefällt werden, weil durch die „Protein A-Beads“ der Fc-Anteil des Antikörpers gebunden wird. Nach mehrmaligem Waschen des Ansatzes wurden die „Beads“ in SDS-Puffer aufgenommen, bei 95 °C denaturiert und auf einem SDS-PAGE analysiert.

3.3.10 Induktion von GST-Fusionsproteinen

Zur Gewinnung von Fusionsprotein wurde die gewünschte cDNA in den Vektor pGEX-5X-1 kloniert. Danach erfolgte die Transformation in den *E.coli*-Stamm BL21 Codon+.

500 ml LB-Medium mit 100 µg / ml Ampizillin wurden mit 30 ml Übernachtskultur angeimpft. Nach Erreichen der OD₆₀₀ mit einem Wert zwischen 0,4 und 0,6 wurde die Induktion mit 1 mM IPTG eingeleitet. Die Kultur wurde nun für 5 Stunden bei 30 °C, 200 rpm inkubiert. Zur Kontrolle wurde jeweils vor der Induktion, und nach jeder Stunde, 1 ml Bakteriensuspension abge-

nommen, abzentrifugiert und in 40 µl SDS-Load-Puffer aufgenommen. Diese Proben wurden auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und dienten als Verlaufskontrolle der Induktion.

Nach fünf Stunden wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 6.000 rpm (Beckmann Zentrifuge, GSA-Rotor) pelletiert und nach Abnahme des Überstandes bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.11 Aufreinigung von GST-Fusionsprotein

Das Bakterienpellet (aus Kapitel 3.3.10) wurde in 25 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 % Triton-X-100 und 20 µl / mg Lysozym wurde die Suspension für 20 min bei RT auf dem Rollinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension sonifiziert, bis ein klares Lysat sichtbar wurde (10 - 20 Pulse à 5 ms). Danach wurde das Lysat nochmals für 10 Minuten auf dem Rollinkubator inkubiert. Dieses ist nötig um eventuell gebildete Mizellen zu zerstören. Der so entstandene Proteineinschluss würde im anschließenden Schritt mit abzentrifugiert und wäre damit verloren.

Das Lysat wurde nun in Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellbestandteile bei 9.500 rpm (Beckmann-Zentrifuge, SS34-Rotor), 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Der klare Überstand, mit dem darin enthaltenen Fusionsprotein wurde mit Glutathion-Sepharose 4B versetzt. Die Sepharose wird in 70 % EtOH geliefert, und musste zunächst vom Ethanol befreit werden. Deshalb wurde zur Aufreinigung pro Ansatz 340 µl originale Sepharose, dreimal mit 2,5 ml PBS gewaschen. Zwischen den Waschsritten erfolgte eine Zentrifugation (Hettich) bei 900 rpm für 5 min. Die Sepharose wurde am Ende des Waschvorgangs in 250 µl PBS aufgenommen, was nun einer 50 %igen Sepharoselösung entspricht. Diese wurde nun zum gereinigten Lysat gegeben. Es folgte eine Inkubation auf dem Rollinkubator für mindestens 1 Stunde bei RT zur Bindung des GST-Fusionsproteins. Das nun gebundene Protein wurde zusammen mit der Glutathion-Sepharose abentrifugiert und anschließend dreimal mit 2,5 ml PBS gewaschen. Die Sepharose wurde schließlich in 500 µl PBS aufgenommen und für den GST-pull-down verwendet.

3.3.12 GST "pull-down"-Assay

Das hierfür benötigte Proteinextrakt wurde aus transient transfezierten Zellen gewonnen. Die Zellen wurden in 60 mm Platten ausgesät und mit 2 µg DNA und dem Transfektionsreagenz Effectene (Qiagen) transfeziert. Nach 24 h wurden die Platten auf Eis gestellt und mit 250 µl eiskaltem Lysispuffer (20 mM Tris pH = 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X-100, 1 Tablette complete Mini Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche)) überschichtet. Nach einer einstündigen Inkubation auf dem Taumler bei 4 °C wurde das Zelllysate in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 rpm für 15 min, bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Gesamtproteine aus dieser Extraktion.

Nach Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach der Methode von Bradford (siehe 3.3.2) wurden 200 µg Gesamtprotein mit 40 µl Sepharose und dem daran gebundenen GST-Protein in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sepharose dreimal mit 100 µl kalten PBS gewaschen und anschließend in 50 µl SDS-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden anschließend im Western-Blot (siehe 3.3.3 und 3.3.5) analysiert.

3.3.13 Membranpräparation aus Zellen

Um Zellmembranen zu präparieren wurde eine konfluente T75-Kulturflasche mit stabil transfizierten HEK 293 E+-Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und im Anschluss mit 5 ml Lösung A (10 mM Hepes (pH = 7,4), 1 mM EDTA, 1 Tablette complete Mini Proteaseinhibitoren) inkubiert (15 min, 4 °C). Die Zellen wurden mittels eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst und in einen Glashomogenisator überführt. Mit dem Pistill wurden die Zellen homogenisiert. Um den Zellkern und Zellbestandteile zu entfernen wurde das Homogenisat in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt und zentrifugiert (750 x g, 10 min, 4 °C). Die postnukleäre Membranfraktion wurde durch Ultrazentrifugation des Überstands bei 75.000 x g, 4 °C, für 30 min gewonnen. Das Pellet wurde in Lösung A, supplementiert mit 12 % Saccharose, aufgenommen und konnte so bei -80 °C gelagert werden.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

3.4.1.1 Zentrifugation von Zellen

Alle Zentrifugationsschritte mit Zellen wurden in einer Heraeus-Zentrifuge (Megafuge1.0R) bei 800 rpm und 18 °C für 8 min durchgeführt.

3.4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:1 (oder 1:3, bei vielen Zellen) mit Trypanblau (Sigma) gemischt. Dadurch wurden die toten Zellen blau angefärbt und daraufhin in der Zellzählung nicht berücksichtigt. Ein Deckglas wurde so auf die Neubauer-Kammer aufgebracht, dass die Newton'schen Ringe zu sehen sind. Mit einer Pipette wurde seitlich unter das Deckglas die Zellsuspension eingebracht. Die Zellen wurden in vier großen Quadraten (bestehend aus 16 Feldern) ausgezählt und der Mittelwert (X) gebildet. Die Zellzahl pro Milliliter errechnet sich wie folgt:

1:1 Verdünnung	Zellen / ml = X * 2 * 10.000
1:3 Verdünnung	Zellen / ml = X * 4 * 10.000

3.4.1.3 Einfrieren von Zellen

Aus einer 80 % konfluenten T75-Flasche wurden die Zellen abgelöst und pelletiert. Das Pellet wurde in 1,8 ml kaltem Einfriermedium (70 % Medium, 20 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert, die Zellsuspension in 2 ml Kryoröhrchen (Greiner) überführt und sofort bei -80 °C langsam eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen für eine dauerhafte Lagerung in flüssigen Stickstoff gebracht.

3.4.1.4 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde ein Einfrieröhrchen bei 37 °C möglichst rasch aufgetaut und die Zellsuspension anschließend in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt. Unter sehr langsamer, tropfenweiser Zugabe von 8 ml Kulturmedium wurde das Einfriermedium verdünnt. Nach Zentrifugation und Resuspendieren der Zellen in 10 ml Kulturmedium wurden die Zellen in eine Kulturflasche überführt und bei 37 °C / 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt oder die Zellen passagiert.

3.4.2 Kultivieren von Zelllinien

3.4.2.1 Kultur von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293 E+):

HEK 293 E+-Zellen (human embryonic kidney cells) (Invitrogen, Groningen, NL) wurden in T75-Gewebekulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Begasungsbrutschrank in feuchter Atmosphäre kultiviert. Das verwendete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax (Invitrogen) wurde mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) versetzt. Die Zellen besitzen eine Verdopplungszeit von 24 h, so dass nach 3 bis 4 Tagen eine 90 %ige Konfluenz erreicht wurde. Die Zellen wurden dann im Verhältnis 1:10 passagiert. Hierzu entfernte man das verbrauchte Medium. Die Zellen wurden anschließend mit 5 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin abgelöst. Nach Inaktivierung des Trypsins mit 8 ml frischem Medium wurden die Zellen in Verhältnis 1:10 in neue Kulturflaschen überführt.

3.4.2.2 Kultur von COS-7 und OK-Zellen

Diese Zellen wurden wie bei HEK 293 E+- Zellen beschrieben, in DMEM-Medium mit Glutamax und 10 % FCS, kultiviert.

3.4.2.3 SaoS-2- Zellen:

Die Pflege der Zellen und Kulturbedingungen entsprachen denen von HEK 293 E+-Zellen. Als Medium wurde McCoy's 5a Medium mit 1,5 mM Glutamin und 10 % FCS verwendet.

3.4.2.4 Kultur von MDCK-Zellen

MDCK-Zellen wurden in MEMalpha Medium mit Glutamin (Invitrogen) und 10 % FCS kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte im Verhältnis 1:2, da die Wachstumsrate dieser Zellen geringer ist, als bei HEK-Zellen. Die Zellen weisen eine starke Adhärenz auf, so dass es nötig war vor der Inkubation mit Trypsin die Zellen mit EDTA-Lösung (0,2 g / l EDTA, 8 g / l NaCl, 0,2 g / l KCl, 1,15 g / l Na₂HPO₄, 0,2 g / l KH₂PO₄) für 10 min bei 37 °C zu behandeln. Dadurch werden die Zell-Zell-Verbindungen aufgelöst und ein Ablösen der Zellen mit Trypsin wird erleichtert. Die weitere Vorgehensweise wurde, wie bei den HEK-Zellen beschrieben, durchgeführt.

3.4.2.5 Kultur von ROS17 / 2.8 Zellen

ROS17 / 2.8-Zellen wurden in HAM's F12-Medium und 10 % FCS kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte zweimal pro Woche nach der Methode, wie bei HEK 293-Zellen beschrieben. Allerdings wurden die ROS17 / 2.8 Zellen in einem Verhältnis von 1:4 passagiert.

3.4.3 Transfektion von Zelllinien

3.4.3.1 Transfektion von Zellen mit Lipofectamin (Invitrogen):

Bei dieser Methode wird es der DNA ermöglicht mit einem kationischen Lipid-Reagenz einen Komplex einzugehen. Die positiv geladenen Lipide [56] gehen mit der negativ geladenen DNA eine spontane Verbindung ein. Dieser lipophile und positiv geladene Komplex kann nun an die negativ geladene und hydrophobe Zellmembran binden [209].

Hierzu wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 nach Erreichen der Konfluenz in neue Kulturflaschen überführt. Nach einer Inkubation über 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen, die nun 50 % konfluent waren, dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend mit 8 ml serumfreiem Medium überschichtet.

Die zu transfezierende DNA wurde wie folgt vorbereitet: in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde die benötigte DNA-Menge (normalerweise 3 µg DNA / Flasche) in 100 µl serumfreies Medium aufgenommen. In einem weiteren sterilen Reaktionsgefäß wurden in ebenfalls 100 µl serumfreies Medium 20 µl Lipofectamin (Invitrogen) aufgenommen. Die DNA und Lipofectamin-Lösungen wurden gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 800 µl serumfreiem Medium versetzt und der gesamte Milliliter langsam und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 5 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach dieser Zeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 10 ml Medium mit FCS wurden die Zellen über Nacht kultiviert und nach 18 h in Loch-Platten ausgesät.

Für Untersuchungen mit transient transfezierten Zellen erfolgten die Versuche 2 Tage nach dem Aussäen.

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurde die Transfektion wie oben beschrieben durchgeführt. Allerdings erfolgte am Tag nach der Transfektion eine Behandlung der Zellen mit 250 µg Hygromycin B. Der hier verwendete Expressionsvektor pCEP4 trägt ein Resistenzgen für Hygromycin, so dass nur die Vektor-tragenden Zellen unter Antibiotika-Behandlung überleben können. Die Behandlung wurde alle 3 bis 4 Tage, über einen Zeitraum von 4 Wochen, wiederholt. Als Kontrolle der Absterberate dienten untransfezierte Zellen.

3.4.3.2 Transfektion von Zellen nach der Kalzium-Phosphat-Methode:

Bei dieser Methode wird DNA über ein Kalzium-Phosphat-Präzipitat, welches sich direkt an die Zellen anlagert, in die Zelle eingebracht. Dieses Präzipitat entsteht dadurch, dass eine HEPES-gepufferte Salzlösung langsam und tropfenweise mit einer Lösung gemischt wird, die DNA und Kalziumchlorid enthält.

2 x HeBS-Puffer:	16,4 g	NaCl
	11,9 g	HEPES-Salz
	0,21 g	Na ₂ HPO ₄

Die Salze wurden in einem Liter H₂O aufgelöst. Die Lösung wurde mit 5 N NaOH auf pH = 7,05 eingestellt. Der exakte pH-Wert ist absolut essentiell für eine funktionierende Transfektion. Anschließend wurde der Puffer steril filtriert und in 10 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

2,5 M CaCl₂: 183,7 g CaCl₂-Dihydrat in 500 ml H₂O

Die Lösung wurde steril filtriert und in 10 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion im Verhältnis 1:3 gesplittet, so dass am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50 % erreicht war. Die zu transfezierende DNA (3 µg) wurde mit Ethanol gefällt (siehe 3.2.5) und in 450 µl sterilem H₂O resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl 2,5 M CaCl₂. In einem 15 ml-Falconröhrchen wurden 500 µl 2 x HeBS-Puffer vorgelegt. Mit einer elektrischen Pipettierhilfe wurde durch den HeBS-Puffer Luft geblasen und gleichzeitig die DNA / CaCl₂-Mischung tropfenweise zugegeben. Das Gemisch wurde sofort für 5 s durch vortexen vermischt und anschließend bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert.

Zwischenzeitlich wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit 8 ml Kulturmedium überschichtet. Es folgte eine langsame und tropfenweise Zugabe des Präzipitats zu den Zellen. Nach einer Inkubation von 5 h bei 37 °C / 5 % CO₂ wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 10 ml Kulturmedium zugegeben.

Diese Methode wurde ausschließlich zur transienten Transfektion verwendet, bei der die Zellen 48 h nach Transfektion auf ihr Bindungs- und Signalverhalten getestet wurden.

3.4.3.3 *Transfektion von MDCK-Zellen mit Effectene (Qiagen):*

MDCK-Zellen können nur unzureichend mit Lipofectamin transfeziert werden. Als gutes Reagenz erwies sich in diesem Fall das nicht-liposomale Lipid-Transfektionsreagenz Effectene (Qiagen). Dieses eignet sich auch gut für die Transfektion von Zellen, die für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden sollen, da das Reagenz im Gegensatz zu Lipofectamin keine Eigenfluoreszenz zeigt. Effectene (DNA-Kondensations-Reagenz) wird zusammen mit einer „Enhancer“-Lösung verwendet. Zunächst wird es der DNA, in einem definierten Puffersystem, ermöglicht mit dem „Enhancer“ zu kondensieren. Anschließend wird das Effectene-Reagenz zugegeben um kondensierte Effectene-DNA-Komplexe zu bilden. Das Effectene Reagenz bildet spontan eine Mizellen-Struktur aus, welche die kondensierte DNA umgibt. Dieser Komplex wird in eukaryontische Zellen eingeschleust.

Zur Transfektion wurden die MDCK-Zellen 24 h vor der Transfektion in 6-Loch-Platten mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Loch ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden 2 μg DNA in 150 μl EC-Puffer (im Kit mitgeliefert) aufgenommen. Nach Zugabe von 16 μl „Enhancer“ (das Verhältnis von 1 μg DNA / 8 μl „Enhancer“ muss immer beibehalten werden) wurde der Ansatz kurz mit dem Schüttler gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 20 μl Effectene-Reagenz zugegeben, der Ansatz kurz gemischt und nochmals 10 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Die Transfektionslösung wurde mit 1 ml Vollmedium versetzt und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 6 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Weiterverarbeitung der Zellen erfolgte nach 48 h.

3.5 Bioassays

3.5.1 Kompetitive Verdrängungsreaktion mit radioaktiv markiertem rPTH (1-34)

Stabil oder transient transfezierte HEK 293 E+-Zellen wurden mit einer Dichte von 200.000 bis 250.000 Zellen / Loch in einer 24-Loch-Platte ausgesät. Nach 48 h Inkubation im Begasungsbrutschrank, bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit Versuchsmedium (DMEM mit Glutamax, versetzt mit 5 % FCS und 0,5 % BSA) 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ vorinkubiert. Nach erneutem Absaugen des Mediums wurden 150 μl Versuchsmedium in jedes Loch pipettiert. In je 30 μl Versuchsmedium wurden unterschiedliche Konzentrationen an hPTH (1-34) oder TIP39 (angesetzt als 10 mM Stammlösung in 10 mM Essigsäure und 1 % BSA) in 7-facher Konzentration angesetzt. So betrug z.B. für eine Endkonzentration von 1 μM die Konzentration der zugegebenen 30 μl 7 μM . Ebenso wurde in 30 μl eine konstante Menge an [¹²⁵I]- Nle^{8,21}Tyr³⁴rPTH (1-34) amid (50.000 cpm / Loch) gelöst. Die unterschiedlichen Konzentrationen an nicht-markiertem PTH oder TIP39 wurden in Triplikaten bestimmt. Das Endvolumen im Loch betrug 210 μl . Es folgte eine Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur über 1 h. Danach wurden die Zellen auf Eis dreimal mit 0,5 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit zweimal 0,5 ml 1 M NaOH lysiert. Das Lysat wurde in Serumröhrchen überführt und anschließend im γ -Counter gemessen. Die gemessenen cpm-Werte wurden auf eine Million Zellen / Loch normiert und mit dem Programm GraphPad PRISM™ 4.0 ausgewertet.

3.5.2 Bestimmung des akkumulierten cAMP nach PTH-Stimulation

3.5.2.1 Stimulation der Zellen mit hPTH (1-34) oder TIP39

Zur Bestimmung des intrazellulär akkumulierten cAMPs (zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat) wurden die Zellen mit einer Dichte von 300.000 Zellen / Loch in 12-Loch-Platten ausgesät. Nach

einer Inkubation von 48 h bei 37 °C / 5 % CO₂ und Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen, nach Absaugen des Kulturmediums, 1 h mit 1 ml Versuchsmedium (DMEM mit Glutamax, 1 % BSA, 20 mM HEPES, 1 mM IBMX) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an hPTH (1-34) oder TIP39 für 15 min bei 37 °C / 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml Ethanol (pH = 3) und anschließender Inkubation bei 4 °C für 2 h lysiert. Der Überstand, mit dem darin gelösten cAMP, wurde in Glasröhrchen überführt und unter Begasung mit N₂ im Wasserbad bei 37 °C abgedampft. Das nun lyophilisierte cAMP wurde in 1 ml 1 x Assay-Puffer (im Kit mitgeliefert als 10 x Lösung) gelöst.

3.5.2.2 Messung des akkumulierten cAMP mit Hilfe eines Radio-Immuno-Assays (RIA)

Der hier verwendete cAMP-RIA-Kit funktioniert nach folgendem Prinzip: Es werden Röhrchen verwendet, die mit monoklonalem Antikörper gegen cAMP beschichtet sind. In dieses Röhrchen wird zusammen mit der Probe eine konstante Menge an [¹²⁵I]-cAMP gegeben. Diese Radioaktivität wird durch die zu messende Probe kompetitiv verdrängt, so dass die an den Antikörper gebundene Radioaktivität welche nach der Entfernung des Überstandes gemessen wird, umgekehrt proportional zur cAMP-Konzentration der Probe ist.

Nach Herstellung einer Verdünnung im Verhältnis 1:20 oder 1:50 wurden 100 µl dieser Verdünnung in Antikörperbeschichtete Röhrchen pipettiert und nach Zugabe von 500 µl mit [¹²⁵I]-cAMP 18 h bei 4 °C inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde die gebundene Radioaktivität im γ-Counter gemessen. Aus den im Kit mitgelieferten Standards konnte eine Eichkurve erstellt werden. Somit konnte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die cAMP-Konzentration der Proben bestimmt werden. Die Auswertung der Graphen erfolgte mittels des Programms GraphPad PRISM™ 4.0.

3.5.3 Messung der akkumulierten Gesamtinositole nach Stimulation mit PTH(1-34) oder TIP39

Hierzu wurden die Zellen in 6-Loch-Platten mit einer Dichte von 500.000 Zellen pro Loch in Triplikaten ausgesät. 24 h vor dem eigentlichen Versuch erfolgte eine Beladung der Zellen mit 2 µCi / ml Myo-[³H]-Inositol. Nach dieser Inkubation wurde der radioaktive Überstand abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Versuchsmedium (DMEM, 5 % FCS, 20 mM HEPES-Puffer, 10 mM Lithiumchlorid) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Versuchsmedium, versetzt mit der jeweiligen Konzentration an PTH(1-34) oder TIP39, 1 h bei 37 °C / 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und 1 ml 20 mM Ameisensäure, zur Lyse der Zellen, zugegeben. Nach einer Inkubation von 60 min bei 4 °C wurde der Überstand in Glasröhrchen überführt und Na₄OH (1:10 verdünnt) zugegeben, bis ein pH-Wert von 7 bis 8 erreicht wurde. Mittels Anionen-Austausch-Chromatographie wurden die akkumulierten Gesamtinositole

abgetrennt. Hierzu wurden Poly-Prep-Säulen (BioRad) mit 1,4 ml Ionenaustauscher AG1-X8 Resin (0,5 g Resin / ml H₂O) beladen. Das Zelllysate wurde auf die Säulen gegeben und anschließend in sechs Durchgängen mit je 4 ml Waschpuffer (60 mM Natriumsalz der Ameisensäure, 5 mM Borax) gewaschen. Die radioaktiven Geamtinositole wurden mit 0,5 ml Elutionspuffer (2 mM Ammoniumsalz der Ameisensäure, 0,1 M Ameisensäure) eluiert und nach Zugabe von 4,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ready Protein+) im β -Counter gemessen.

Die Auswertung der Graphen erfolgte mittels des Programms GraphPad PRISM™ 4.0.

3.5.4 Pharmakologische Hemmung von Proteinkinasen

Eine spezifische Hemmung der Proteinkinase A (PKA) erfolgte mit dem Isoquinolin-Sulfonamid-Derivat H-89 [36], für das gezeigt werden konnte, dass vor allem die PKA-abhängige Phosphorylierung des PTH1-Rezeptors blockiert wird. Durch das Bisindolylmaleimid-Derivat GF 109203X kann die Proteinkinase C (PKC) spezifisch gehemmt werden. In diesem Fall wird ebenfalls die PKC-abhängige Phosphorylierung des Rezeptors verhindert.

Bei den jeweiligen Versuchen wurden die Zellen mit den Inhibitoren für 1 h bei 37 °C vorinkubiert, bevor der eigentliche Versuch folgte. H-89 wurde in einer Konzentration von 30 μ M eingesetzt, GF 109203X hingegen in einer Konzentration von 6 μ M.

3.5.5 Formelzusammenfassung zur Berechnung der Bindungsdaten

3.5.5.1 Berechnung von IC_{50} / EC_{50} -Werten:

Aus den Daten der Verdrängungskurven konnten mittels des Programms GraphPad Prism™ 4.0 die IC_{50} -Werte (= halbmaximale inhibitorische Konzentrationen) der verschiedenen Rezeptoren errechnet werden. Als Voraussetzung hierfür gilt, dass beide Kompetitoren (unmarkiertes und markiertes Peptid), im Falle des Gleichgewichts, reversibel an eine Bindungsstelle binden. Das Programm berechnet den IC_{50} -Wert nach folgender Gleichung:

$$Y = \text{unspezifisch} + \frac{(\text{gesamt} - \text{unspezifisch})}{1 + 10^{\log[PTH] - \log IC_{50}}} \quad (1)$$

mit:

<i>PTH</i> :	<i>eingesetzte Konzentrationen an unmarkiertem Parathormon (PTH in nM)</i>
<i>Y</i> :	<i>gemessene cpm bei unterschiedlichen Konzentrationen an unmarkiertem PTH</i>
„gesamt“:	<i>gemessene cpm bei Abwesenheit von unmarkiertem PTH</i>
„unspezifisch“:	<i>gemessene cpm bei einer sättigenden Konzentration an unmarkiertem PTH</i>
IC_{50} :	<i>Konzentration an unmarkiertem PTH, das die Hälfte der spezifischen Bindungsstellen besetzt (Angabe in nM)</i>

Analog zu den IC_{50} -Werten der Bindung werden die EC_{50} -Werte für den cAMP-Assay und den Inositol-Assay berechnet.

3.5.5.2 Berechnung der auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoranzahl

Die Gleichung nach Cheng and Prusoff [33] lautet wie folgt:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[Radioligand]}{K_d}} \quad (2)$$

mit :

- K_i : Affinitätskonstante (Affinität des Rezeptors zum Liganden)
 IC_{50} : Konzentration an unmarkiertem PTH, das die Hälfte der spezifischen Bindungsstellen besetzt (nM)- siehe Gleichung (1)
 $[Radioligand]$: Konzentration an radioaktiv markiertem PTH (nM)
 K_d : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen einer homologen, kompetitiven Bindung mit $[^{125}I]\text{-PTH} \ll \text{PTH}_{\text{unmarkiert}}$ und der Annahme, dass radioaktiv markiertes PTH ($[^{125}I]$ PTH) und unmarkiertes Peptid (PTH) die gleichen Affinitäten zum Rezeptor besitzen, folgt aus der Gleichung nach Cheng und Prusoff:

$$K_d = K_i = IC_{50} - [Radioligand] \quad (3)$$

Weiterhin sollten die Annahmen gelten, dass zum einen nur eine sehr geringe Menge des Radioliganden an den Rezeptor bindet und somit die freie Konzentration in der Lösung nicht verändert wird. Zum anderen darf es zwischen den einzelnen Liganden kein Zusammenwirken geben. Das bedeutet, dass die Bindung des Liganden an eine Bindungsstelle nicht die Bindungsaffinität einer anderen Bindungsstelle beeinflusst. Wenn die Bindung reversibel ist und dem Gesetz der Massenerhaltung folgt so gilt im Falle des Gleichgewichts:

$$Y = \frac{B_{\max} \times X}{K_d + X} \quad (4)$$

mit:

- Y : spezifische Bindung (gesamt-unspezifisch) (cpm)
 X : Konzentration des Radioliganden (nM) $[Radioligand]$
 B_{\max} : bei völliger Sättigung gebundene Stoffmenge (nM)
 K_d : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante

Nach Einsetzen von Gleichung (3) in Gleichung (4), Umformung und dem Umstand, dass 1 mol aus $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen besteht, ergibt sich folgende Formel für die Gesamtzahl der Rezeptoren / Zelle:

$$\text{Rezeptoren / Zelle} = \frac{B_0}{\frac{[\text{Radioligand}]}{(K_d + [\text{Radioligand}]}} \times 6,022 \times 10^{23} \times 10^{-9} \times \frac{1}{\text{Zellzahl}} \quad (5)$$

wobei:

Zellzahl: tatsächliche am Versuchstag vorhandene Anzahl an Zellen pro Loch

B₀: spezifische gebundene Counts (gesamt - unspezifisch)

[Radioligand]: Konzentration des Radioliganden (nM)

Berechnung der Konzentration des Radioliganden:

$$[\text{Radioligand}] = \frac{C(\text{cpm}) / Y(\text{cpm} / \text{fmol})}{V(\text{ml})} \times \frac{0.001(\text{pmol} / \text{fmol})}{0.001(\text{liter} / \text{ml})} \quad (6)$$

mit:

C: gemessenen cpm

Y: Spezifische Aktivität des Radioliganden (für [¹²⁵I] markierte Peptide gilt eine initiale spezifische Aktivität von 2200 Ci / mmol. Dieser Wert muss aber in cpm / fmol umgerechnet werden (siehe unten))

V: Volumen der Lösung, welche gezählt wurde (in den hier dargestellten Veruchen betrug das Lösungsvolumen 210 µl)

Umrechnung der spezifischen Aktivität des Radioliganden (Y) von Ci / mmol in cpm / fmol.

Hierbei gilt, dass 1 Ci $2,22 \times 10^{12}$ Zerfällen pro Minute entspricht:

$$Y(\text{cpm} / \text{fmol}) = Z \left(\frac{\text{Ci}}{\text{mmol}} \right) \times 2,22 \times E \quad (7)$$

mit:

Y: Spezifische Aktivität des Radioliganden in cpm / fmol

Z: Angabe der spezifischen Radioaktivität in Ci / mmol (dieser Wert kann dem Beipackzettel des Radioliganden entnommen werden)

E: Effizienz des Counters (wobei 1 = 100 %). Im Falle des verwendeten Berthold LB2111 γ-Counters betrug die Effizienz 75 % (= 0,75)

Um die tatsächliche Konzentration des Radioliganden am Tag der Bindung zu errechnen, muss die errechnete Konzentration des Radioliganden ([Radioligand], Gleichung (6)) mit der am Versuchstag geltenden Zerfallskonstante des [¹²⁵I]-Liganden multipliziert werden. Die Werte für die Zerfallskonstante von [¹²⁵I]-PTH (1-34) können aus dem mitgelieferten Datenblatt entnommen werden.

Mit diesen Formeln wurde ein Excel-Datenblatt erstellt, welches es ermöglicht, nach Eingabe der gemessenen Werte aus den Bindungsexperimenten, die Rezeptorzahl pro Zelle für die jeweiligen Zelllinien zu ermitteln.

3.6 Messung von freigesetztem intrazellulärem Ca²⁺ nach PTH-Stimulation

Zur Messung des freigesetzten, intrazellulären Kalziums nach PTH Stimulation wurden die Zellen auf poly-L-Lysin (0,1 mg / ml) beschichteten, runden Deckgläschen (Ø 40 mm) mit einer Zelldichte von 50.000 Zellen / ml ausgesät. Das Flächenwachstum der Zellen wurde durch einen sterilen Plastikring (Ø 1 cm), welcher auf das Deckglas aufgesetzt wurde, begrenzt. Nach einer Wachstumsphase von 48 h bei 37 °C / 5 % CO₂ hatten die Zellen eine 50 %ige Konfluenz erreicht und konnten für die Messung verwendet werden.

Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen dreimal mit Puffer C (25 mM HEPES, 0,4 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 25 mM D-Glucose (pH = 7,4)) gewaschen und anschließend 30 min bei 37 °C / 5 % CO₂ mit 5 µM Fluo-3 AM beladen. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Zellen mit Puffer C zum Entfernen des extrazellulären Fluo-3 AM, wurde das runde Deckglas in eine luftdichte, Temperatur kontrollierbare FCS-2 Perfusionskammer (Bioprotech Inc. Butter, PA, USA) eingespannt und auf dem Mikroskoptisch befestigt. Die Zellen wurden zunächst mit magnesiumfreiem Puffer perfundiert. Alle Perfusionslösungen (Puffer C, PTH oder Thrombin) wurden mittels Spritzenpumpen (PHD 2000, ZAK, Marktheidenfeld) mit einer Durchflussrate von 500 µl / min über Teflon-Schläuche in das System eingebracht. Die Messungen erfolgten nach Erwärmen der Glasoberfläche der Deckgläser auf 30 °C mit einem konfokalen Lasermikroskop (BioRad MRC-1024), welches mit einem Krypton-Argon Laser ausgestattet war.

Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen ([Ca²⁺]_i) wurden als relative Änderungen der Fluo-3 AM assoziierten Fluoreszenzintensität gegenüber dem Hintergrund dargestellt. Hierzu wurden etwa 20 einzelne Zellen markiert und zusätzlich der schwarze Hintergrund ausgewählt. Die Anregung von Fluo-3 AM erfolgte bei einer Wellenlänge von 486 nm und konnte mittels der von BioRad stammenden „LaserSharp-Aquisition“ Software aufgezeichnet und verwaltet werden.

Zur Bestimmung des freigesetzten intrazellulären Kalziums wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an hPTH (1-34) (1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM, gelöst in Puffer C versetzt mit 1 % BSA) stimuliert. Als Positivkontrolle erfolgte eine Stimulation der Zellen mit Thrombin (2 units / ml).

3.7 Untersuchung der β -Arrestin Translokation mittels konfokaler Mikroskopie

Um eine Translokation von β -Arrestin darzustellen, wurde zunächst ein „green-fluorescent protein“ (GFP)-gekoppeltes β -Arrestin 2 benötigt. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Jean-Pierre Vilardaga (Pharmakologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Zu untersuchende stabile Zelllinien wurde auf 60 mm Gewebekulturschalen ausgesät, so dass am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 50 % erreicht war. An diesem Tag wurde mit Hilfe des Transfektionsreagenz Effectene (Qiagen) eine transiente Transfektion mit 2 μ g DNA pro Ansatz durchgeführt (siehe 3.4.3.3). Nach einer Inkubation von 24 h wurden die Zellen aus einer Gewebekulturschale auf die sechs Löcher einer 6-Loch Platte verteilt, in die zuvor jeweils ein steriles Deckglas gelegt wurde. Nach einer weiteren 24 stündigen Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂ wurden die Zellen mit 1000 nM hPTH (1-34) oder mit 1000 nM TIP39 für 10 min bei Raumtemperatur stimuliert. Nach dem Abnehmen des Mediums und zügigen Waschen mit 1 ml eiskaltem PBS wurden die Zellen 20 min in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend auf einem Objektträger in 60 %igem Glycerol eingebettet. Die so behandelten Zellen konnten nun mit Hilfe eines Ölimmersionsobjektivs (40x) und einem konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica, TCS NT / SP) ausgewertet werden.

3.8 “Yeast-two-Hybrid”-Methoden

3.8.1 Kultur von *Saccharomyces cerevisiae* (Bierhefe)

Wie Bakterienzellen können auch Hefezellen in Flüssigkultur und auf Agarplatten gezüchtet werden. Die optimale Inkubationstemperatur für Hefe liegt bei 30 °C. Hefezellen benötigen ein Medium (Minimalmedium, SD-Medium), welches Glukose als Kohlenstoffquelle enthält. Außerdem müssen verschiedene Salze vorhanden sein, die als Lieferanten für Stickstoff, Phosphor und Spurenelemente dienen. Ein besseres Wachstum kann erreicht werden, wenn die Hefezellen in Vollmedium (YPD) gezüchtet werden. Dieses Medium enthält außerdem Protein- und Hefezell-Extrakte, die zusätzlich Aminosäuren, Nukleotidvorstufen, Vitamine und andere Metaboliten liefern.

Wenn eine Inkubation im Vollmedium erfolgt, findet die Teilung von Hefezellen alle 90 min statt.

3.8.1.1 Flüssigkultur von *Saccaromyces cerevisiae*

Für den Hefe-Screen wurden zwei verschiedene Hefestämme verwendet. Zum einen der Stamm AH109 (Reportergene: HIS3, ADE2, LacZ), sowie der Stamm Y187 (Reportegen: LacZ). Beide Stämme wurden in YPD-Medium kultiviert, da sie auxotroph für die Aminosäuren Adenin, Histidin, Leuzin und Tryptophan sind. Wenn die Stämme mit verschiedenen Vektoren transformiert wurden, so wurde die Auxotrophie für bestimmte Aminosäuren durch diese Vektoren komplementiert. Die Stämme wurden dann in den entsprechenden Minimalmedien kultiviert. Eine Inkubation der Flüssigkultur erfolgte bei 30 °C und 200 rpm für 24 h Stunden.

3.8.1.2 Kultur von *Saccaromyces cerevisiae* auf Agar-Platten

Um eine Plattenkultur zu erhalten wurden entweder 200 µl Zellsuspension mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen oder aus einem Glycerolstock wurde mit einer Impföse etwas von der Oberfläche abgekratzt und dieses durch Ausstreichen auf der Platte verteilt. Die Platten wurden mit Parafilm umwickelt, um ein Austrocknen zu verhindern und anschließend, mit der Unterseite nach oben, für 3 bis 5 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

3.8.1.3 Glycinkultur von *Saccaromyces cerevisiae*

Hefezellen können in 15 %igem Glycerol bei -80 °C für fünf Jahre gelagert werden. Hierzu wurde 1 ml einer Hefekultur in der späten logarithmischen Phase oder der frühen stationären Phase mit 210 µl 86 %igem, steril filtriertem Glycerol versetzt und diese bei -80 °C eingefroren.

3.8.2 Verpaarung von haploiden Hefezellen

Aus den haploiden Stämme AH109 vom Paarungstyp Mat a und dem haploide Stamm Y187 vom Paarungstyp Mat α kann durch Verpaarung ein diploiden Stamm erzeugt werden [91]. Die Verpaarung ist eine gute Alternative zur Methode der Co-Transformation, um zwei Plasmide in eine Hefezelle zu bringen.

Für die Verpaarung wurden 0,5 ml YPD-Medium in ein steriles 15 ml Plastikröhrchen pipettiert. Das Medium wurde mit jeweils einer Kolonie von beiden haploiden Stämmen angeimpft und die Zellklumpen durch kräftiges Rütteln zerstört. Die Inkubation erfolgte 24 h bei 30 °C und 200 rpm. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert und in 200 µl 0,5 x YPD-Medium resuspendiert und anschließend auf den entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen.

3.8.3 Transformation von Hefe nach der Lithiumacetat-Methode

Die Transformation wurde nach H. Ito et al. [118] durchgeführt. Modifiziert ist die Methode nach J. Hill, R. H. Schiestl und D. Gietz [78, 108, 203].

Stock-Lösungen:

Heringssperma-Träger-DNA:	10 mg / ml
50 % Polyethylenglycol 3350:	50 g Polyethylenglycol 3350 wurden mit sterilem H ₂ O auf 100 ml aufgefüllt. Damit sich das Pulver löst wurde die Lösung auf 50 °C erwärmt.
100 % DMSO	
10 x TE-Puffer:	0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH = 7,5). Die Lösung wurde durch autoklavieren sterilisiert und in 10 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.
10 x LiAc-Lösung:	1 M Lithiumacetat (pH = 7,5) wurde ebenfalls autoklaviert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

		für 10 ml Lösung:
PEG / LiAc-Lösung:	40 % Polyethylenglykol 4000	8 ml 50 % PEG 4000
	1 x TE-Puffer	2 ml 10 x TE
	1 x LiAc-Lösung	2 ml 10 x LiAc

3.8.3.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

Eine Kolonie von einer Agar-Platte wurde in 1 ml YPD-Medium gebracht und für 5 min stark geschüttelt (Vortexer) um alle Zellklumpen zu zerstören. Diese Starterkultur wurde in 50 ml YPD-Medium gegeben und bei 30 °C mit 250 rpm für 16 bis 18 h inkubiert, bis die stationäre Phase erreicht war ($OD_{600} > 1,5$). Am nächsten Tag wurden 30 ml der Übernachtskultur in 300 ml YPD-Medium pipettiert. Die OD_{600} betrug nun zwischen 0,2 und 0,3. Die Kultur wurde für ca. 3 h bei 30 °C und 230 rpm inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,4 bis 0,6 erreicht worden war. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Plastikröhrchen aufgeteilt und in der Zentrifuge (Hettich) bei 1000 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in jeweils 7 ml sterilem TE-Puffer resuspendiert. Die Suspensionen wurden zusammengeführt und nochmals bei 1000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet in 1,5 ml sterilem 1 x TE / 1 x LiAc resuspendiert.

3.8.3.2 Transformation der Hefezellen

In einem sterilen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 100 ng zu transformierende DNA und 100 µg Heringssperma-DNA (10 µg / ml) gemischt. Dann wurden 10 µl kompetente Hefezellen hinzupipettiert und durch vortexen gut vermischt. Nach Zugabe von 600 µl steriler PEG / LiAc-Lösung und vortexen für 10 s wurde der Ansatz für 30 min bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 70 µl DMSO und mischen durch Invertieren, wurden die Hefezellen für 15 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Danach wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend 5 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 0,5 ml sterilem 1 x TE-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden nun auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und für 3 bis 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

3.8.4 “Yeast-two-Hybrid”-Screen

Das Prinzip des hier verwendeten Matchmaker Gal4-„Yeast-two-Hybrid“ System 3 ist wie folgt: Das Köder-Protein wird als Fusionsprotein mit einer Gal4-Bindungsdomäne exprimiert. Im Gegenzug werden die cDNAs aus der Bibliothek als Fusionsproteine mit einer GAL4-Aktivierungsdomäne exprimiert. Wenn das Köderprotein mit einem Fusionsprotein aus der Bibliothek interagiert, dann werden Gal4-Bindungs- und Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe gebracht, so dass ein Ablesen von vier Reportergenen ermöglicht wird (siehe Abb. 3-2).

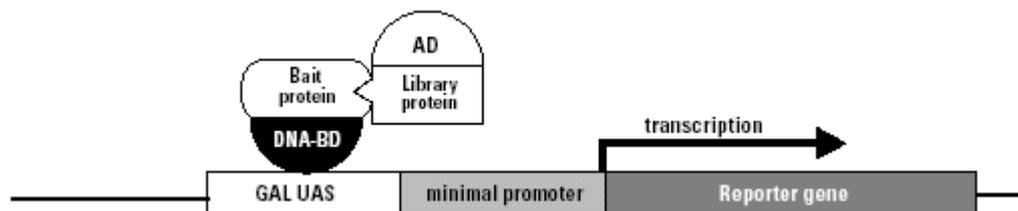


Abb. 3-2: **Prinzip eines “Yeast-two-Hybrid Screens”**. Das Köderprotein („Bait protein“) wird als Fusionsprotein mit einer DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) exprimiert. Hingegen werden die cDNAs aus der Bibliothek („Library protein“) als Fusionsproteine mit einer Aktivierungsdomäne (AD) exprimiert. Interagieren beide Proteine miteinander, so wird die AD in räumliche Nähe zur DNA-BD gebracht und die Transkription eines Reportergens ermöglicht.

Das Köder-Plasmid wurde mittels der LiAc-Methode (siehe 3.8.3) in einen Hefestamm (AH109) der Paarungstyps Mat a gebracht und auf SD/-Trp-Platten selektioniert. Anschließend wurden 50 ml SD/-Trp-Medium mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag abzentrifugiert (1000 x g, 5 min) und in 5 ml SD/-Trp resuspendiert. In einem 2 l-Kolben wurden 50 ml 2 x YPDA / Kanamycin-Medium vor-

gelegt und mit 5 ml des Stammes AH109, welcher das Köder Plasmid enthielt, angeimpft. In der Zwischenzeit wurde 1 ml der pretransformierten, humanen-Nieren cDNA-Bibliothek (Clontech), kloniert in den Stamm Y187- Mat α , bei RT aufgetaut und sofort zu dem 50 ml-Ansatz gegeben. Die Inkubation erfolgte über 24 h bei 30 °C und 30 - 50 rpm. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (1000 x g, 10 min, RT) und in 10 ml 0,5 x YPDA / Kanamycin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in jeweils 200 μ l-Ansätzen zur Hälfte auf großen (\varnothing 15 cm) SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp-Platten (hohe Stringenz) und zum anderen Teil auf niedrig stingenten Platten (SD/-His/-Leu/-Trp) ausplattiert und für 3 bis 8 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die ersten Kolonien gepickt und auf frische SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/ X- α -Gal-Platten (hohe Stingenz), welche auf der Rückseite der Platte mit einem Raster versehen waren, gesetzt. Nachdem diese Kolonien vier Tage bei 30 °C inkubiert worden waren, wurden aus den Hefezellen der Kolonien, die gewachsen waren und sich blau verfärbt hatten, Plasmide präpariert (siehe 3.8.5).

3.8.5 Plasmidpräparation aus Hefe

Zur Plasmidisolation wurden 0,5 ml entsprechendes Minimalmedium mit einer Hefekolonie angeimpft und gut resuspendiert. Nach einer Inkubation bei 30 °C und 200 rpm über Nacht wurden die Hefezellen mittels Zentrifugation (14.000 rpm, 5 min) pelletiert, der Überstand entfernt und das Pellet erneut in 50 μ l Medium aufgenommen. Nach Zugabe von 10 μ l Lytikase (5 units / μ l), wurde die Zellsuspension sofort gut gemischt und nach einer weiteren Inkubation der Reaktionsgefäße bei 37 °C für 1 h bei 230 rpm 10 μ l 20 % SDS zugegeben. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C eingefroren (ca. 1 h) und nach dem Auftauen gut gemischt um die Zellen komplett zu lysieren. Um die Plasmid-DNA zu isolieren wurde das Probenvolumen mit TE-Puffer (pH = 8,0) auf 200 μ l aufgefüllt und mit 200 μ l Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Die Proben wurden mit dem Schüttler auf höchster Stufe für 5 min gemischt und anschließend bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase (obere Phase) wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 8 μ l 10 M Ammoniumacetat versetzt. Anschließend wurden 500 μ l 95 – 100 % Ethanol zugegeben und die Proben 1 h bei -20 °C eingefroren. Durch Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min wurde die Plasmid-DNA pelletiert und nach Entfernen des Überstandes und anschließendem Trocknen des Pellets in 20 μ l H₂O resuspendiert.

3.8.6 Präparation von Proteinextrakten aus Hefe

Die Proteinextraktion aus Hefe erfolgte mit der TCA-Methode. Zunächst werden die Hefezellwände mit physikalischen und chemischen Methoden zerstört. Dabei ist es wichtig die mannigfaltigen Proteasen, die nun aus der Hefe freigesetzt werden, zu inhibieren.

3.8.6.1 Vorbereitung der Hefezellen zur Proteinextraktion

5 ml Medium (Minimalmedium oder YPD-Medium) wurden mit einer Kolonie von einer Platte angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml Medium mit dieser Übernachtskultur angesetzt und bei 30 °C und 200 rpm geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,6 erreicht wurde. Aus diesem Wert wurden die OD₆₀₀ Einheiten berechnet. Hierzu wurde der gemessene OD₆₀₀ Wert von 1 ml mit der Gesamtmenge der Kultur multipliziert (hier immer 55 ml).

Die Kultur wurde sofort auf Eis gekühlt und in ein Zentrifugenröhrchen, welches halb mit Eis gefüllt war, überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1000 x g, für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 50 ml eiskaltem H₂O resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (1000 x g, 5 min, 4 °C) wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.8.6.2 Präparation der Proteine mittels der TCA-Methode

TCA-Puffer:	20 mM	Tris-HCl (pH = 8,0)
	50 mM	Ammoniumacetat
	2 mM	EDTA
	500 µl	Proteaseinhibitoren (1 Tablette gelöst in 1 ml H ₂ O)
SDS / Glycerol-Lösung:	7,3 %	SDS
	29,1 %	Glycerol
	83,3 mM	Tris-Base
	0,025 %	Bromphenolblau
Tris / EDTA-Lösung:	200 mM	Tris-Base
	20 mM	EDTA
TCA-Laemmli-Puffer:	vor Gebrauch immer frisch ansetzen:	
	480 µl	SDS / Glycerol-Lösung
	400 µl	Tris / EDTA-Lösung
	50 µl	β-Mercaptoethanol
	20 µl	Proteinaseinhibitor-Lösung
	50 µl	H ₂ O
20 % Trichloressigsäure:	20 g	TCA mit H ₂ O auf 100 ml aufgefüllt

Das eingefrorene Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut (10 - 20 min) und mit 100 µl eiskaltem TCA-Puffer pro 7,5 OD₆₀₀-Einheiten versetzt. Die Suspension wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 100 µl Glaskügelchen und 100 µl 20 % TCA pro 7,5 OD₆₀₀-Einheiten dazu pipettiert. Die Zellsuspension wurde insgesamt fünfmal für 1 min bei RT vortext, wobei die Reaktionsgefäße zwischendurch für 30 s auf Eis gestellt wurden. Nach Absetzen der Glaskügelchen wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert (= 1. Zellextrakt). Die Glaskügelchen wurden mittels zweimaligem vortexen für jeweils 1 min mit 500 µl aus einem 1:1 Gemisch von 20 % TCA und TCA-Puffer gewaschen. Der Überstand stellte das 2. Zellextrakt dar, welches mit dem ersten vereinigt wurde. Danach wurde für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand entfernt und die pelletierten Proteine nochmals kurz zentrifugiert um die restliche Flüssigkeit zu entfernen. Das Pellet wurde in TCA-Laemmli-Puffer resuspendiert (10 µl / 1 OD₆₀₀-Einheit). Nach dem Aufkochen bei 100 °C im Hitzeblock für 10 min wurde nochmals für 10 min bei RT und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden direkt auf ein SDS-Gel geladen und mittels eines Western-Blots analysiert (siehe 3.3.5).

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung eines hochkonservierten Abschnitts der siebten Transmembrandomäne des PTH1-Rezeptors (P1R)

Zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören eine Vielzahl verschiedener Mitglieder, die unter anderem auf Grund ihrer Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz in die verschiedenen Klassen eingeteilt werden. Ein Ansatz zur Identifizierung wichtiger funktioneller Bereiche ist ein Aminosäuresequenzvergleich.

4.1.1 Sequenzvergleich verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren der Klasse II

Vergleicht man die Sequenzen verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren der Klasse II, so findet sich ein auffällig hoch konservierter Bereich innerhalb des siebten Transmembranabschnitts.

Durch computergestützte Sequenzanalyse mittels ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) wurde ein genauer Sequenzvergleich der Aminosäureabfolge der siebten Transmembrandomäne von verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Klasse II erstellt (Abb. 4-1).

Rezeptoren der Klasse II	%	Aminosäuresequenz
PTH1-Rezeptor (<i>Homo sapiens</i>)	100	MHYEMLFNSFQGFVVAII YCF C N GEVQAEIKKSWSRWTLAL
PTH1-Rezeptor (<i>Sus scrofa</i>)	95	MHYEMLFNSFQGFVVAII YCF C N GEVQAEIKKSWSRWTLAL
PTH1-Rezeptor (<i>Rattus norvegicus</i>)	90	MHYEMLFNSFQGFVVAII YCF C N GEVQAEIRKSWSRWTLAL
PTH1-Rezeptor (<i>Mus musculus</i>)	90	MHYEMLFNSFQGFVVAII YCF C N GEVQAEIRKSWSRWTLAL
PTH1-Rezeptor (<i>Didelphis virginiana</i>)	79	MHYEMLFNSFQGFVVAII YCF C N GEVQAEIKKSWSRWTLAL
PTH2-Rezeptor (<i>Homo sapiens</i>)	45	MHCELFNSFQGFVVAII YCY C N GEVQAEVKKMWSRWNLV
Secretin-Rezeptor (<i>Homo sapiens</i>)	37	LFFELALASFQGLVAVL YCF L N GEVQLEVQKKWQQWHLRE
VIP-Rezeptor (<i>Homo sapiens</i>)	35	MVFELVVGFSFQGFVVAII YCF L N GEVQAE LRRKWRWHLQ
Wachstumshormon-RF-R. (<i>Homo sapiens</i>)	32	LPLELGLGSFQGFVVAII YCF L N QEV RTEISRKWHGHDPEL
Glucagon-Rezeptor (<i>Homo sapiens</i>)	30	LFTELSFTSFQGLMVVAII YCF V N NEVQLEFRKSWERWRLEH
Corticotropin-RF-Rezeptor (<i>H. sapiens</i>)	28	IYFNSFLESFQGFVSVF YCF L N SEVRS AIRKRWRWQDKH
Calcitonin-Rezeptor (<i>Homo sapiens</i>)	27	DYVMHSLIHFQGFVVAII YCF C N NEVQT TVKRQWAQFKIQW

Abb. 4-1: Vergleich verschiedener Rezeptoren der Klasse II von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Dargestellt ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz des Bereichs der siebten Transmembrandomäne. Der homologe Bereich ist grau hinterlegt. In Spalte 2 ist die Homologie der gesamten Aminosäuresequenz zum humanen P1R wiedergegeben. Folgende Genbank-Zugriffsnummern wurden verwendet: PTH1-Rezeptor (*Homo sapiens*, L04308), PTH1-Rezeptor (*Sus scrofa*, U18315), PTH1-Rezeptor (*Rattus norvegicus*, M77184), PTH1-Rezeptor (*Mus musculus*, X78936), PTH1-Rezeptor (*Didelphis virginiana*, M74445), PTH2-Rezeptor (*Homo sapiens*, U25128), Secretin-Rezeptor (*Homo sapiens*, U20178), VIP-Rezeptor (*Homo sapiens*, U11087), Wachstumshormon-RF-Rezeptor (*Homo sapiens*, L01406), Glucagon-Rezeptor (*Homo sapiens*, U01104), Corticotropin-RF-Rezeptor (*Homo sapiens*, X72304), Calcitonin-Rezeptor (*Homo sapiens*, X69920);

Dabei zeigt sich eine sehr starke Homologie zwischen den unterschiedlichen Rezeptoren innerhalb des nahe dem Cytosol gelegenen Abschnittes der siebten Transmembrandomäne. Das Motiv „YCFXN“ findet sich ebenso als hochkonservierte Aminosäureabfolge in Rezeptoren wieder, die eine Gesamthomologie zum humanen PTH1-Rezeptor von unter 30 % besitzen.

4.1.2 Generierung von Mutationen im konservierten Bereich der siebten Transmembrandomäne (TM7-Mutanten)

4.1.2.1 Punktmutationen des „YCFXN“-Motivs

Um den hoch konservierten Bereich, der sich im Opossum PTH1-Rezeptor von AS 453 bis AS 457 erstreckt, näher zu charakterisieren, wurden die vier homologen Aminosäuren des „YCFXN“-Motivs punktmuiert. Es erfolgte jeweils ein Austausch gegen die Aminosäure Alanin. Die Aminosäure Alanin wurde deshalb gewählt, weil es sich hierbei um die Aminosäure mit der einfachen Seitenkette „-CH₃“ handelt. Somit wird verhindert, dass eine räumliche Behinderung anderer Aminosäuren oder unerwünschte ionische Interaktionen auftreten und auf diese Weise die Sekundär- und Tertiärstruktur beeinflusst wird. Dies wäre vor allem der Fall, wenn Aminosäuren mit ausgeprägten Seitenketten, wie z.B. die Aminosäuren Prolin oder Phenylalanin, oder Aminosäuren mit geladenen Seitenketten (Lysin, Arginin) eingefügt würden.

Zusätzlich zu den Punktmutationen wurde eine Deletionsmutante erzeugt, bei welcher der Aminosäureabschnitt Y⁴⁵³-N⁴⁵⁷ komplett entfernt wurde.

Eine Übersicht der generierten Rezeptormutanten ist in Abbildung 4-2 dargestellt.

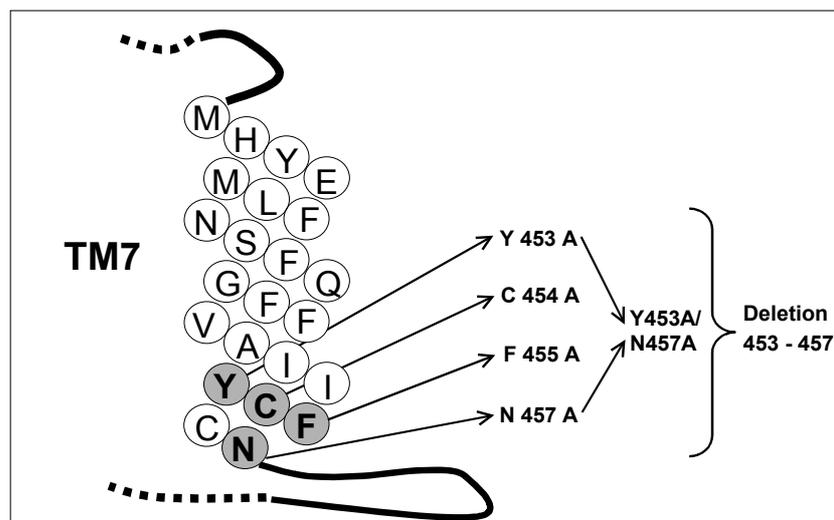


Abb. 4-2: Schematischer Ausschnitt der Sequenz der siebten Transmembrandomäne des Opossum PIR. Der hoch konservierte Bereich, welcher hier genauer untersucht werden soll, ist grau hinterlegt. Es wurde jeweils eine Aminosäure dieses Bereichs gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Des weiteren wurde eine Kombination der Mutanten Y453A und N457A erzeugt. Außerdem wurde die Deletion der Aminosäuren 453 bis 457 vorgenommen.

Die Punktmutationen wurden mittels „site-directed“-Mutagenese eingefügt. Hierzu wurde ein Teilbereich der Opossum PTH1-Rezeptor cDNA von der Basenpaarposition 1360 bis 1587 amplifiziert, da sich an diesen Stellen Restriktionsschnittstellen finden, welche nur einmal in der gesamten PTH-Rezeptor-Sequenz vorkommen, so dass ein späteres subklonieren ermöglicht wurde.

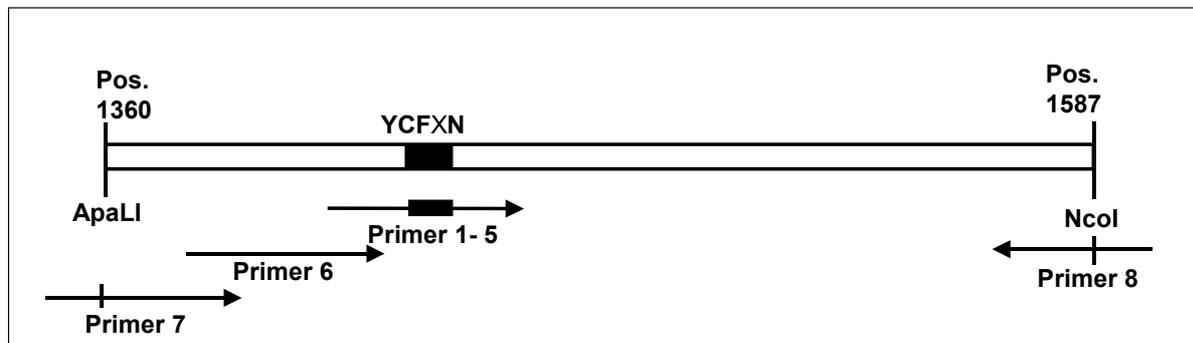


Abb. 4-3: **Lage der Primer zur Generierung der TM7-Einzelmutanten.** Die Sequenz der Primer ist in Kapitel 2.9.1 dargestellt. Die hier verwendete Nummerierung ist mit der Nummernvergabe der Auflistung der Primer im Kapitel 2.9.1 identisch. Die Positionen 1360 und 1587 geben die Stellen der Basen wieder, an denen sich im Opossum PTH1-Rezeptor die dargestellten Restriktionsschnittstellen (ApaLI und NcoI) wiederfinden. Die Längenverhältnisse der Primer sind nicht proportional zu der dargestellten Sequenz.

Zunächst wurden fünf unterschiedliche PCR-Ansätze (siehe 3.2.14) mit den Primern 1-5 (für die Mutationen Y453A, C454A, F455A, N457A und Del453-457) als 5'-Primer und Primer 8 als 3'-Primer durchgeführt. Diese PCR-Produkte wurden jeweils als Vorlage für eine weitere PCR mit Primer 6 und 8 verwendet, um dann im Anschluß eine dritte PCR-Runde mit den Primern 7 und 8 und dem PCR-Produkt aus Runde zwei als Vorlage, durchzuführen. Die Schnittstellen für ApaLI und NcoI lagen innerhalb der Primersequenz, so dass ein anschließender Restriktionsverdau (siehe 3.2.7) der PCR-Produkte mit diesen Enzymen durchgeführt werden konnte.

Aus dem Vektor pBluescript II SK (+), mit der Opossum PTH1-Rezeptor cDNA als Insert, wurde mittels eines KpnI und NcoI Doppelverdaus die P1R-cDNA bis auf den C-Terminus (ab Pos 1587) herausgeschnitten, wobei sich die KpnI-Schnittstelle im Bereich der „multiple cloning site“ (MCS) am 5'-Ende der Rezeptor-DNA befindet. Durch einen Restriktionsverdau mit KpnI und ApaLI wurde die cDNA des P1R bis Position 1360 isoliert. Anschließend erfolgte eine Dreifachligation aus den beiden isolierten Fragmenten und dem restriktionsverdauten PCR-Fragment. Die verschiedenen, mutierten cDNAs wurden über die Schnittstellen KpnI und NotI aus pBluescriptIIISK(+) in den Expressionsvektor pCEP4 umklontiert.

4.1.2.2 Konstruktion einer Doppelmutante

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen der oben beschriebenen Mutanten (siehe 4.1.3), folgte die Konstruktion einer Doppelmutante aus Y453A und N457A. Die Kombination dieser beiden

Punktmutationen wurde deshalb gewählt, weil ein Zusammenhang zwischen polaren Aminosäuren der Transmembrandomänen und der Rezeptorfunktion beschrieben wird. Bei Y⁴⁵³ und N⁴⁵⁷ handelt es sich um die beiden einzigen polaren Aminosäuren des „YCFXN“-Motivs.

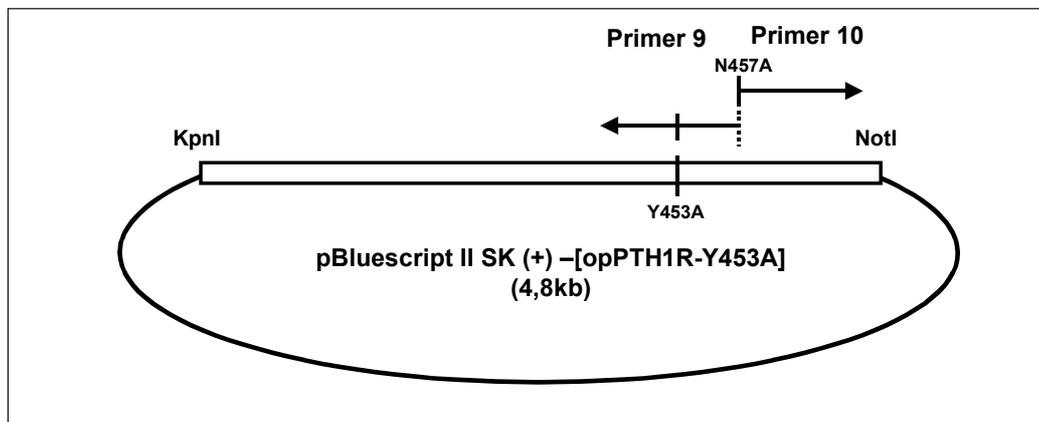


Abb. 4-4: Lage der Primer für die Doppelmutante Y453A/N457A. Als Vorlage für die PCR diente die Plasmid-DNA der Einzelmutante Y453A im Vektor pBluescript II KS (+). Die Längenverhältnisse der Primer sind nicht proportional zu der dargestellten Sequenz. Die Sequenz der Primer ist in Kapitel 2.9.1 aufgeführt und stimmt mit der dort angegebenen Nummerierung überein.

Mittels einer durch Pfu-Polymerase ablaufenden PCR-Reaktion wurde die komplette Plasmid-DNA, durch Verwendung der Primer 9 und 10, amplifiziert. Die Primer 9 und 10 wurden dabei so konzipiert, dass ihre 5'-Enden in der Sequenz exakt nebeneinander zu liegen kommen. Nach Überprüfen der Richtigkeit durch Sequenzierung, wurde die cDNA der Doppelmutante Y453A/N457A in pCEP4 über die Restriktionsschnittstellen KpnI und NotI subkloniert.

4.1.3 Bindungseigenschaften und Signaltransduktion der TM7-Mutanten

4.1.3.1 Bindungseigenschaften der TM7-Mutanten im Vergleich zum Opossum PTH1-Rezeptor

Durch eine kompetitive Verdrängungsstudie können die Bindungseigenschaften des Liganden (in diesem Fall hPTH (1-34)) zum WT-Rezeptor und zu den mutierten Rezeptoren ermittelt werden. Hierzu verwendet man eine konstante Menge an radioaktiv markiertem Peptid (Radioligand), wohingegen das unmarkierte Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen zum Ansatz gegeben wird. Anhand einer Reihe verschiedener Konzentrationen von unmarkiertem hPTH (1-34) wird über die radioaktiv markierten hPTH (1-34)-Moleküle die Konzentrationsabhängigkeit der Rezeptor-Ligandenbindung dargestellt. Mittels dieser Sättigungskurve können Parameter, wie die Bindungskonstante und die Rezeptorzahl ermittelt werden. Die Berechnungsgrundlagen und Formeln sind in Kapitel 3.5.5 näher dargestellt und ausgeführt.

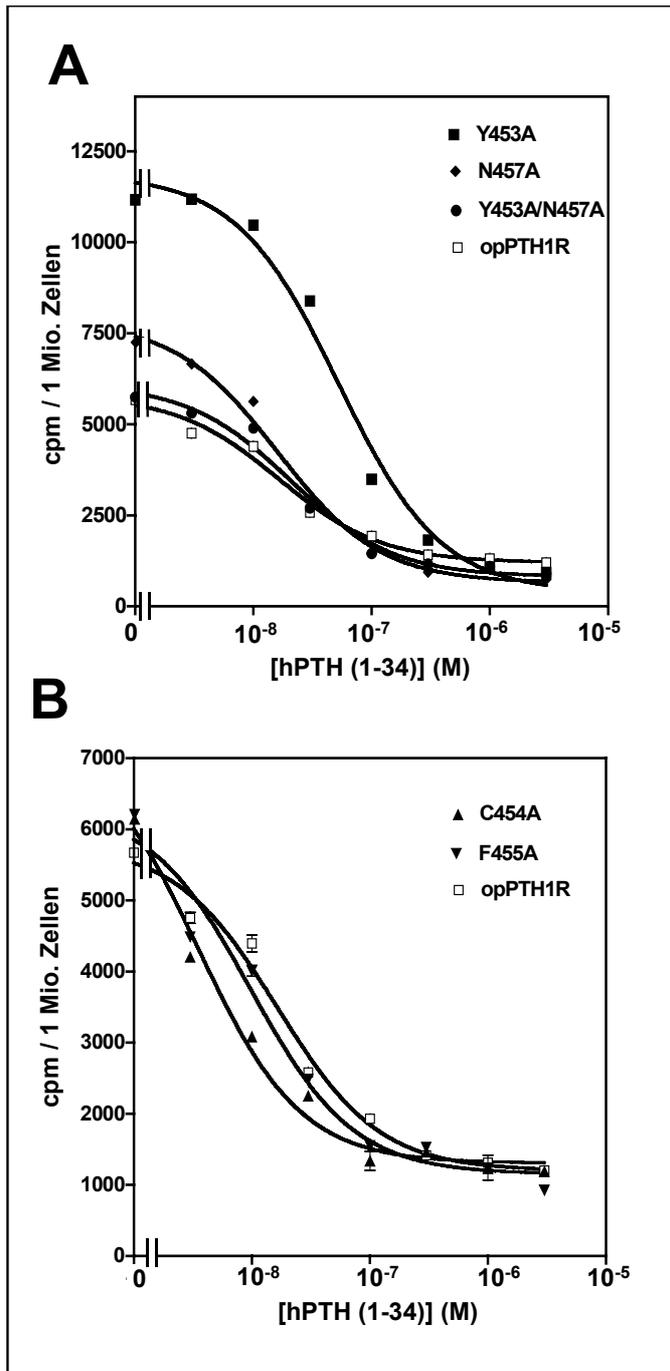


Abb. 4-5: PTH Bindungseigenschaften des Opossum PTH1-Rezeptors (opPTH1R) und der TM7-Mutanten.

Dargestellt sind repräsentative Verdrängungskurven (von drei unabhängigen Experimenten) mit radioaktiv markiertem $[125\text{I}]\text{-Nle8,21Tyr34 rPTH (1-34)}$ -amid und hPTH (1-34) als Ligand. HEK 293E+-Zellen wurden mit der WT-Rezeptor-DNA und den mutierten cDNA's stabil transfeziert. Gezeigt sind die Messpunkte, zusammen mit der Kurvenangleichung mittels einer nichtlinearen Regression. Die Kurvenpunkte sind Triplikate (Mittelwert \pm S.E).

A: Vergleich des WT-Rezeptors mit den Mutanten-Rezeptoren Y453A, N457A und Y453A/N457A.

B: Darstellung der Mutanten-Rezeptoren C454A und F455A im Vergleich zum opPTH1R (WT-Rezeptor).

Wie aus der Abbildung 4-5 ersichtlich ist, werden sowohl der Wildtyp-Rezeptor (opPTH1R), als auch alle mutierten Rezeptoren gut an der Zelloberfläche exprimiert. Die Deletionsmutante Del433-457 zeigte keine Expression ihrer Rezeptoren auf der Oberfläche der Zelle. Deswegen wurde die Mutante in dieser Abbildung und im weiteren Verlauf nicht weiter untersucht und dargestellt.

Die Mutanten C454A, F455A, N457A und die Kombinationsmutante Y453A/N457A zeigen im Kurvenverlauf keinen wesentlichen Unterschied zum WT-Rezeptor (Abb. 4-5). Wie auch aus Tabelle 4-1 ersichtlich, unterscheiden sich diese Mutanten nicht wesentlich in der maximal gebunden Radioaktivität, bezogen auf die gesamte eingesetzte Menge des Radioliganden. Die

Menge der spezifisch gebundenen Radioaktivität lag beim WT-Rezeptor und bei diesen Mutanten zwischen 15 - 20 % der zugesetzten Radioaktivität.

Bezüglich der spezifischen gebundenen Radioaktivität verhält sich die Mutante Y453A auffällig. Diese kann im Vergleich zum WT (15 % spezifische Bindung) die doppelte Menge an Radioaktivität binden (30 % spezifische Bindung). Dies ist ein Hinweis auf eine höhere Expressionsdichte dieses Rezeptors auf der Zelloberfläche im Vergleich zum WT-Rezeptor.

Weiterhin können aus den Daten der Verdrängungskurven, mittels des Programms GraphPad Prism™ 4.0, die IC₅₀-Werte (= halbmaximale inhibitorische Konzentrationen) der verschiedenen Rezeptoren errechnet werden.

Diese IC₅₀-Werte sind in der Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Rezeptor	gebundene Radioaktivität (%)	IC ₅₀ (nM)	Expressionsdichte (Rezeptoren / Zelle)
hPTH (1-34)			
Y453A	30,1 ± 4,5	47,8 ± 9,2	2.100.000
C454A	17,5 ± 3,3	25,8 ± 7,5	1.100.000
F455A	16,8 ± 3,2	32,5 ± 18,5	1.600.000
N457A	20,1 ± 2,3	32,2 ± 14,0	1.400.000
Y453A/N457A	19,1 ± 2,9	15,4 ± 12,2 *	1.000.000
opPTH1R	14,3 ± 1,2	43,5 ± 28,5	1.500.000

Tab. 4-1: **Zusammenfassung der errechneten und gemessenen Werte für den WT-Rezeptor und die Rezeptor-Mutanten.** In der Spalte „gebundene Radioaktivität (%)“ ist der Prozentsatz der gebundenen Radioaktivität, ausgehend von der gesamten eingesetzten Radioaktivität (cpm), angegeben. Die Werte sind Mittelwerte (± S.D.) aus zwei unabhängigen Bindungsexperimenten, deren Werte jeweils im Triplikat bestimmt wurde. Die IC₅₀-Werte wurden mit dem Programm GraphPad Prism™ 4.0 errechnet, und sind die Mittelwerte (± S.D.) aus mindestens 5 unabhängigen Bindungsexperimenten. Die Expressionsdichte der Rezeptoren auf der Zelle wurde, wie in Kapitel. 3.5.5 beschrieben, errechnet.

*Die Mutante Y453A/N457A zeigt gegenüber dem WT einen signifikant erniedrigten IC₅₀-Wert (p < 0,01)

Die in der Literatur angegebenen IC₅₀-Werte für den WT-Rezeptor liegen zwischen 3 und 6 nM [70]. Der hier um den Faktor 10 höher liegende Wert, der sowohl beim WT-Rezeptor, als auch bei den mutierten Rezeptoren auftritt, ist auf die Verwendung des pCEP4-Expressionsvektors zurück zu führen, da es in dem verwendeten System (Kombination mit HEK 293 E+) zu einer stark erhöhten Expression der Rezeptor-DNA kommt und in der Folge zu einer Rechtsverschiebung der Verdrängungskurve. Die Grundlage für die Berechnung der IC₅₀-Werte setzt die An-

nahme voraus, dass die zugegebene Menge an radioaktiv markiertem Liganden, durch die Bindung an den Rezeptor, nicht verändert wird. Durch eine zu hohe Rezeptoranzahl auf der Zelloberfläche gilt diese Annahme nicht mehr uneingeschränkt. Die Folge hiervon ist eine Verschiebung der Kurve nach rechts.

Durch den IC_{50} -Wert kann die Affinität des Liganden zum Rezeptor beschrieben werden. Im Falle der Mutanten Y453A, C454A, F455A und N457A zeigt sich, dass diese Rezeptoren eine ähnliche Affinität wie der WT-Rezeptor zum Liganden besitzen. Die Doppelmutante Y453A/N457A dagegen besitzt eine bessere Affinität zum Liganden, als dies der WT zeigt. Dies drückt sich in einem signifikant erniedrigten IC_{50} -Wert ($p < 0,01$) aus.

Wie sich schon im erhöhten Wert der maximal gebundenen Radioaktivität abgezeichnet hat, liegt Zahl der Rezeptoren / Zelle für die Mutante Y453A am höchsten. Jedoch bewegen sich alle Werte der mutierten Rezeptoren in einem Bereich, der nicht wesentlich vom WT-Rezeptor abweicht (1 - 2 Mio. Rezeptoren / Zelle). Das bedeutet, dass mögliche Unterschiede in der Signaltransduktion nicht auf wesentlich unterschiedliche Rezeptorzahlen zurück zu führen sind.

4.1.3.2 Signaltransduktion der TM7-Mutanten

Die Signaltransduktion der verschiedenen Rezeptormutanten wurde sowohl für den Adenylatzyklase-Weg, als auch für den PLC-abhängigen Signalweg untersucht.

Der PTH1-Rezeptor koppelt sowohl an den cAMP-Signalweg, als auch an den PLC-Signalweg an. Da die erzeugten Mutationen in der Transmembrandomäne 7 im Modell sehr nahe am Cytosol liegen oder eventuell in dieses hineinragen, könnten diese Aminosäuren eine Rolle bei der Ankopplung an die Signalwege spielen. Es ist ebenso denkbar, dass es bei einer Aktivierung des Rezeptors durch den Liganden zu einer Veränderung der Lage der Aminosäuren kommt, so dass diese dann für die Ankopplung weiterer Proteine in Betracht kommen. Im Folgenden wurden die beiden Signalwege der unterschiedlichen Mutanten hinsichtlich ihres Signalverhaltens und dabei eventuell auftretender Unterschiede in der Signaltransduktion betrachtet.

A. cAMP-Signalweg

In Abbildung 4-6 ist der Verlauf der cAMP-Akkumulation nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an hPTH (1-34) dargestellt. Es zeigt sich, dass die mutierten Rezeptoren N457A, C454A und F455A keinen Unterschied zum Opossum WT-Rezeptor (opPTH1R) bezüglich des Kurvenverlaufs zeigen. Auch innerhalb der EC_{50} -Werte sind bei diesen mutierten Rezeptoren keine signifikanten Unterschiede zum Opossum WT-Rezeptor festzustellen (Tabelle 4-2).

Die maximale PTH-abhängige cAMP-Akkumulation wurde 15 Minuten nach Zugabe einer hohen PTH-Konzentration (1000 nM) gemessen. Vergleicht man die maximale cAMP-Produktion dieser drei Mutanten (C453A, F455A und N457A) mit denen des WT-Rezeptors so ist ebenfalls kein Unterschied zu verzeichnen (Abb. 4-7).

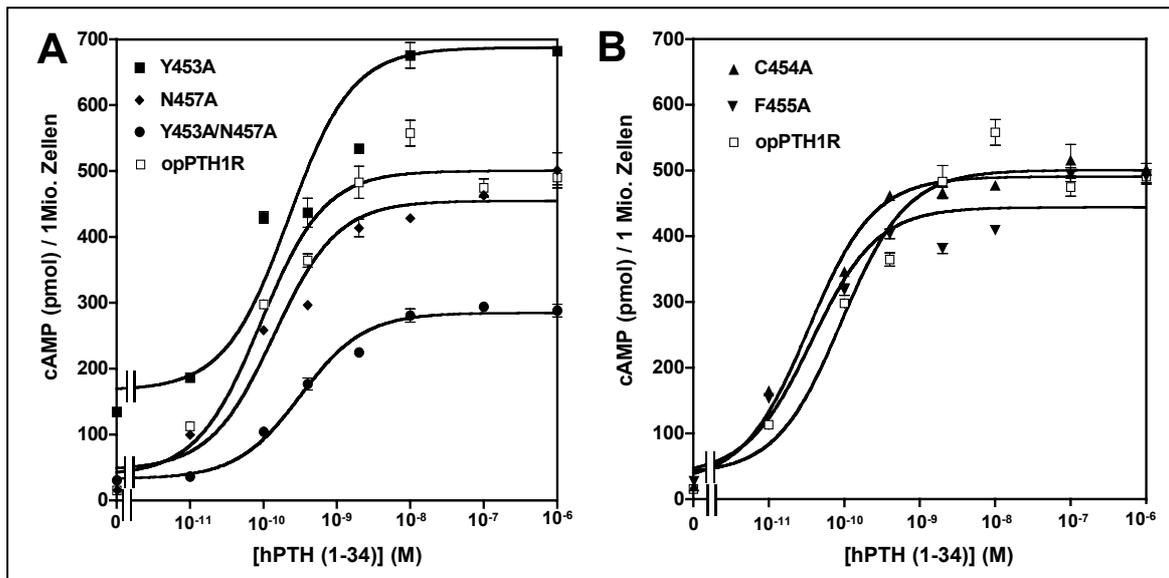


Abb. 4-6: cAMP-Produktion der Zellen (in pmol / 1 Mio. Zellen) nach Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen Mengen an hPTH (1-34). Das akkumulierte cAMP wurde mittels kommerziell erhältlichem RIA gemessen. Die Kurve ist repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. Die Kurvenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten (\pm S.E.) einer Tripletbestimmung. **A:** Vergleich der Mutanten Y453A, N457A und Y453A/N457A mit dem Opossum PTH1-Rezeptor (opPTH1R) **B:** Vergleich der mutierten Rezeptoren C454A und F457A mit dem WT-Rezeptor (opPTH1R).

Der Rezeptor der Mutante Y453A zeigt auch ohne PTH-Stimulation eine erhöhte basale cAMP-Produktion (opPTH1R: 15 pmol / 1 Mio. Zellen; Y453A: 130 pmol / 1 Mio. Zellen; (Tabelle 4-2). Dies gibt möglicherweise einen Hinweis auf eine konstitutiv aktive cAMP-Produktion dieser Rezeptor-Mutante. Im weiteren zeigt sich hier, trotz der hohen Rezeptordichte dieser Rezeptormutante, dass eine größere Menge an hPTH (1-34) nötig ist, um die halbmaximale cAMP-Stimulation zu erreichen (opPTH1R: $EC_{50} = 0,04 \pm 0,037$; Y453A: $EC_{50} = 0,24 \pm 0,008$). Dieser Wert ist signifikant gegenüber dem WT-Rezeptor erhöht ($p < 0,05$).

Betrachtet man die maximale cAMP-Produktion, nach Abzug der basal produzierten cAMP-Menge, so zeigt die Mutante Y453A eine ebenfalls signifikant erhöhte cAMP-Produktion ($p < 0,05$) im Vergleich zum WT-Rezeptor (Abb. 4-7).

Rezeptor	EC ₅₀ (nM)	cAMP-Akkumulation im Vergleich zum WT-Rezeptor (%)
Y453A	0,24 ± 0,008 *	122 ± 19,3 **
C454A	0,03 ± 0,021	106 ± 18,9
F455A	0,04 ± 0,051	94 ± 28,9
N457A	0,08 ± 0,098	108 ± 21,2
Y453A/N457A	0,41 ± 0,041 *	59 ± 8,7 **
opPTH1R	0,04 ± 0,037	100

Tab. 4-2: EC₅₀-Werte und maximal akkumuliertes cAMP der unterschiedlichen Rezeptoren. Die EC₅₀-Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (± S.D.).

* Die EC₅₀-Werte der Mutanten-Rezeptoren Y453A und Y453A/N457A sind signifikant gegenüber dem WT erhöht ($p < 0,005$).

Die Werte der maximalen cAMP-Akkumulation sind Mittelwerte (± S.D.) der prozentualen Aktivität der mutierten Rezeptoren im Vergleich zum WT-Rezeptor. Die Zahlenwerte ergeben sich aus vier unabhängig gemessenen cAMP-Assays.

**Die maximale cAMP-Produktion der mutierten Rezeptoren Y453A und Y453A/N457A sind gegenüber dem WT-Rezeptor signifikant erhöht, bzw. erniedrigt ($p < 0,005$).

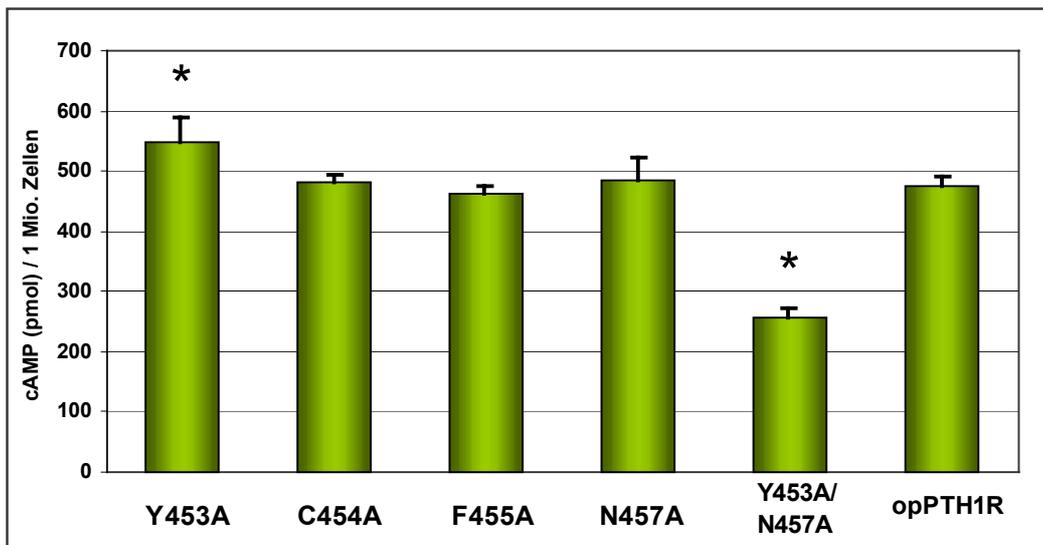


Abb. 4-7: Maximale cAMP-Produktion der TM7-Mutanten und des WT-Rezeptors (opPTH1R). Die Werte errechnen sich aus der Differenz des maximal akkumulierten cAMP, abzüglich der Basalproduktion der Zellen. Eine Stimulation der Zellen wurde mit 1000 nM PTH (1-34) durchgeführt.

* Die Mutante Y453A/N457A zeigt eine signifikant erniedrigte cAMP-Produktion gegenüber dem WT-Rezeptor, die Mutante Y453A eine signifikant erhöhte cAMP-Produktion gegenüber dem WT-Rezeptor ($p < 0,05$).

Die Rezeptor-Mutante Y453A/N457A zeigt gegenüber dem WT-Rezeptor eine signifikant erniedrigte maximale cAMP-Produktion (Abb. 7-7). Beim Vergleich der EC₅₀-Werte erkennt man, dass diese Mutation des Rezeptors einen signifikant erhöhten Wert gegenüber dem WT-Rezeptor

aufweist (**opPTH1R**: $EC_{50} = 0,04 \pm 0,037$; **Y453A/N457A**: $EC_{50} = 0,41 \pm 0,041$; $p < 0.05$). Das bedeutet, dass höhere Mengen an hPTH (1-34) notwendig sind, um den cAMP-Weg zu stimulieren.

B. Inositolphosphat-Signalweg

Die generierten Rezeptor-Mutanten wurden im weiteren auch auf ihr Verhalten bezüglich des Inositol-Phosphatweges untersucht. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit $2 \mu\text{Ci/ml}$ Myo- $[\text{}^3\text{H}]$ -Inositol wurden die Zellen mit einer maximalen Konzentration von 3000 nM hPTH (1-34) stimuliert und die akkumulierten Gesamtinositolphosphate anschließend im β -Counter gemessen.

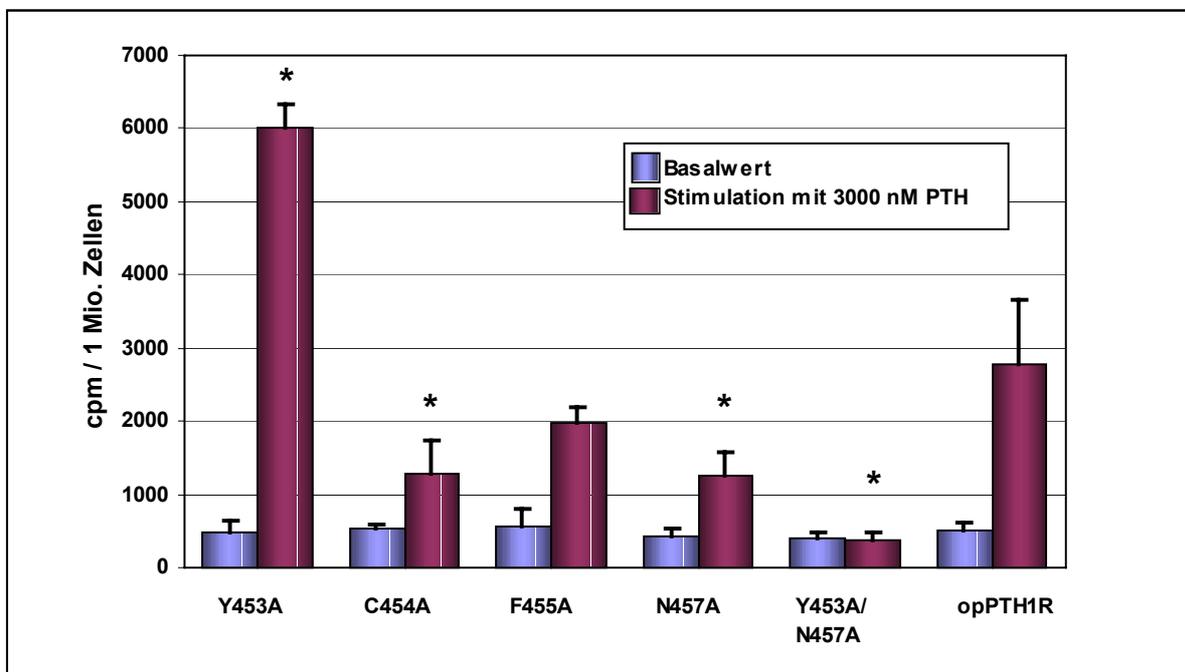


Abb. 4-8: Graphische Darstellung der maximal akkumulierten und radioaktiv markierten Gesamtinositolphosphate der TM7-Mutanten im Vergleich zum WT-Rezeptor. Die Zellen wurden 24 h vor der Stimulation mit $2 \mu\text{Ci/ml}$ Myo- $[\text{}^3\text{H}]$ -Inositol beladen. Die lila Balken zeigen die Basalwerte, welche für die einzelnen Mutanten-Rezeptoren und den WT-Rezeptor gemessen wurden. Dunkelrot dargestellt sind die gemessenen Werte nach Maximalstimulation mit 3000 nM hPTH (1-34) für 1 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Jeder Wert wurde in Triplikaten bestimmt.

* $p < 0.005$: signifikant unterschiedlich gegenüber dem WT-Rezeptor

Der Opossum PTH1-Rezeptor (opPTH1R) zeigt nach Stimulation mit 3000 nM hPTH (1-34) einen fünffachen Anstieg der Gesamtinositole gegenüber dem Basalwert.

Die meisten der untersuchten Mutanten zeigen im Vergleich zum WT-Rezeptor eine veränderte Signalantwort. Die Rezeptor-Mutante F455A jedoch verhält sich so wie der WT-Rezeptor und zeigt einen ähnlich hohen Wert der akkumulierten Gesamtinositolphosphate.

Auffällig zeigt sich die Mutante Y453A, welche im Gegensatz zum WT-Rezeptor (opPTH1R) eine doppelt so hohe Inositolproduktion wie der WT aufweist.

Die Mutanten C454A und N457A zeigen eine signifikante Reduktion der Ankopplung an den Inositolphosphatweg, wobei die Mutante N457A nur 45 % des Gesamtinositolanstiegs des WT-Rezeptors besitzt und die Mutante C454A nur 35 % der Gesamtproduktion, bei einer maximalen Stimulation von 3000 nM.

Rezeptor	Gesamtinositol-Ansammlung im Vergleich zum WT-Rezeptor (%)
Y453A	282 ± 103,5 *
C454A	44 ± 34,3 *
F455A	75 ± 41,4
N457A	47 ± 14,9 *
Y453A/N457A	0
opPTH1R	100

Tab 4-3: **Zusammenfassung der maximalen Gesamtinositolproduktion in %, ausgehend vom Opossum PTH1-Rezeptor (opPTH1R).** Die Werte wurden aus 2 verschiedenen Inositolphosphat (IP)-Assays berechnet (\pm S.D.).

* $p < 0,005$: die maximale IP-Produktion der mutierten Rezeptoren Y453A, N457A und Y453A/N457A sind gegenüber dem WT-Rezeptor signifikant erhöht, bzw. erniedrigt.

4.1.3.3 Messung der intrazellulären Kalziumausschüttung der TM7-Mutanten

Der Anstieg des über den Phospholipase C-Signalweg intrazellulär freigesetzten Kalziums kann über die Messung eines Fluoreszenzmarkermoleküls angezeigt werden. Die Zellen werden vor der Messung mit dem membranpermeablen Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM beladen. Wird intrazelluläres Kalzium freigesetzt, dann geht es mit Fluo-3 AM einen Chelatkomplex ein, was zu einer Verschiebung der Fluoreszenzintensität führt. Diese Fluoreszenz kann mit einem 488 nm Argon-Laser angezeigt werden. Die hier dargestellten Werte lassen keinen Schluß auf die freigesetzte Menge an intrazellulären Kalzium zu. Es kann nur ein relativer Wert im Vergleich zum Basalwert des Hintergrunds gemessen werden. Dies ist auch der Grund dafür, dass die gemessenen und in den Diagrammen dargestellten maximalen Werte zwischen den Versuchen, welche unabhängig durchgeführt wurden, erhebliche Unterschiede aufweisen, und demnach auch nicht in eine genau quantifizierbare Beziehung zueinander gesetzt werden können.

In den folgenden Diagrammen ist der Verlauf der Kurven dargestellt, welche die Freisetzung des intrazellulären Kalziums nach PTH-Stimulation oder nach Thrombingabe aufzeigen.

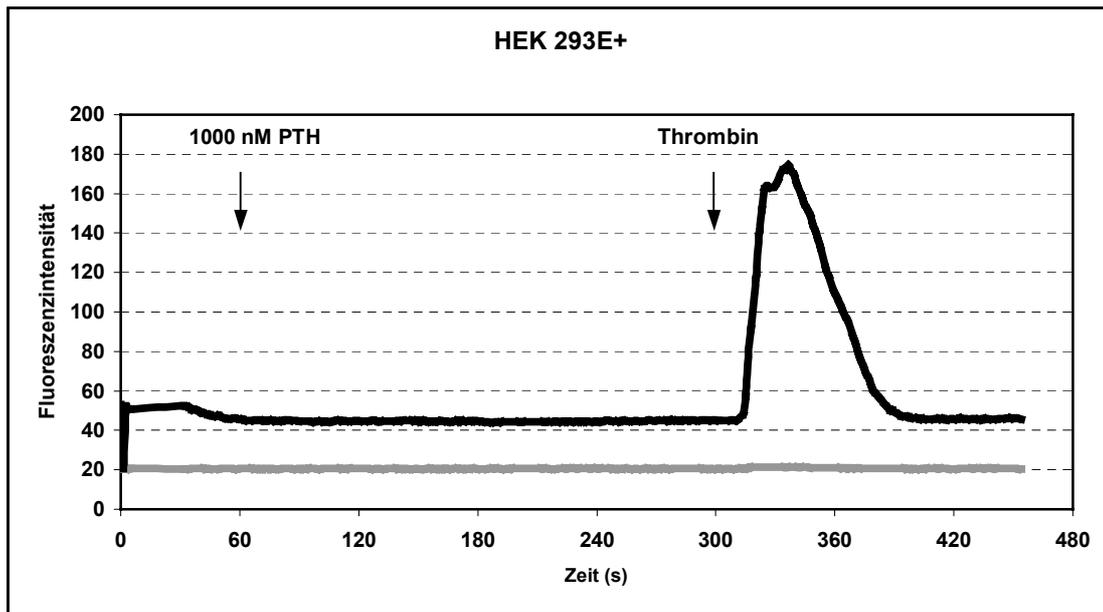


Abb. 4-9: **Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) von untransfuzierten HEK 293 E+-Zellen.** Die Stimulation wurde mit 1000 nM PTH und mit Thrombin (2 units / ml) durchgeführt. Die Gabe der Stimulationssubstanz erfolgte über den Zeitraum von 1 min. Die *graue* Linie gibt die gemessene Intensität des Hintergrunds wieder. Die *schwarze* Linie zeigt die über die Zeit ermittelte Intensität der Fluoreszenz der gemessenen Zellen auf. Bei dieser Kurve handelt es sich um den Mittelwert der Fluoreszenzintensität von 20 verschiedenen, gemessenen Zellen. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

Als Kontrollzellen wurden untransfuzierte HEK 293 E+-Zellen mit 1000 nM hPTH (1-34) für 1 min stimuliert. Die nicht transfuzierten Zellen, denen der PTH1-Rezeptor fehlt, reagieren nicht auf eine PTH-Stimulation (Abb. 4-9). Als Kontrollreaktion für funktionsfähige Zellen wurde mit 2 units / ml Thrombin für 1 min stimuliert. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz, woraus auf eine Freisetzung des intrazellulären Kalziums durch Aktivierung des Thrombin-Rezeptors geschlossen werden kann.

Die Stimulation der Zellen welche stabil mit dem Opossum PTH1-Rezeptor transfuziert wurden, erfolgte zunächst mit 10 nM PTH (Abb. 4-10). Schon bei dieser Menge an PTH, bei welcher eine Gesamtinositolproduktion mit der angewendeten Methode noch nicht messbar ist, kann eine Ausschüttung des intrazellulären Kalziums beobachtet werden. Zur Kontrolle wurden diese Zellen nach einer dreiminütigen Pause nochmals für 1 min mit 2 units / ml Thrombin stimuliert, was ebenfalls zu einer massiven Ausschüttung des intrazellulären Kalziums führte.

In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass nach einer Stimulationsabfolge von 10 nM, 100 nM und anschließend 1000 nM PTH, die Fluoreszenz bei der dritten Stimulation geringer ausfällt, woraus auf eine Desensibilisierung des Rezeptors oder nachfolgender Signalwege geschlossen werden kann (Daten nicht gezeigt). Da in diesem Experiment bei einer nachfolgenden Thrombingabe wiederum eine starkes Fluoreszenzsignal messbar wurde, ist die beobach-

tete Abschwächung des Signals nicht auf eine allgemein verminderte Reaktion der Zellen zurück zu führen.

In einer weiteren Messung zeigte sich (Daten nicht dargestellt), dass es beim Opossum PTH1-Rezeptor erst nach einer Stimulation mit 10 nM PTH (wie in Abb. 4-10 gezeigt) zu einer meßbaren intrazellulären Kalziumausschüttung kommt, wohingegen bei einer Stimulation mit 1 nM PTH noch keine Veränderung in der Fluoreszenzintensität aufgezeigt werden kann.

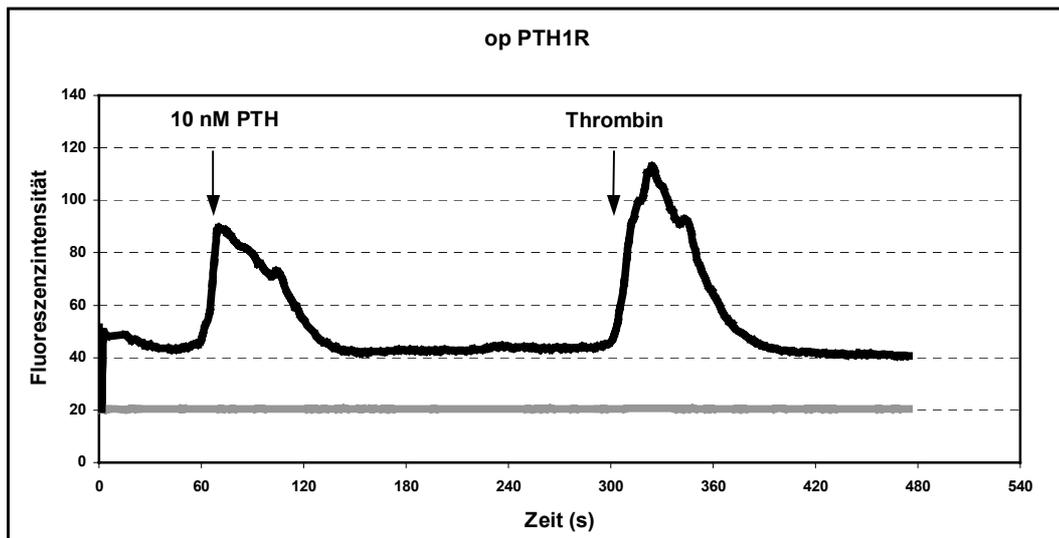


Abb. 4-10: **Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) von 293 E+-Zellen welche stabil mit dem Opossum PTH1-Rezeptor transfeziert wurden.** Zunächst wurde für 1 min mit 10 nM PTH stimuliert. Nach dreiminütigem Waschen der Kammer mit Puffer C wurde als Kontrolle für 1 min Thrombin (2 units / ml) auf die Zellen gegeben. Die Kurve (*schwarz*) basiert auf dem Mittelwert von 20 unabhängig gemessenen Zellen. Die *graue* Kurve stellt die gemessene Intensität des Hintergrunds dar. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

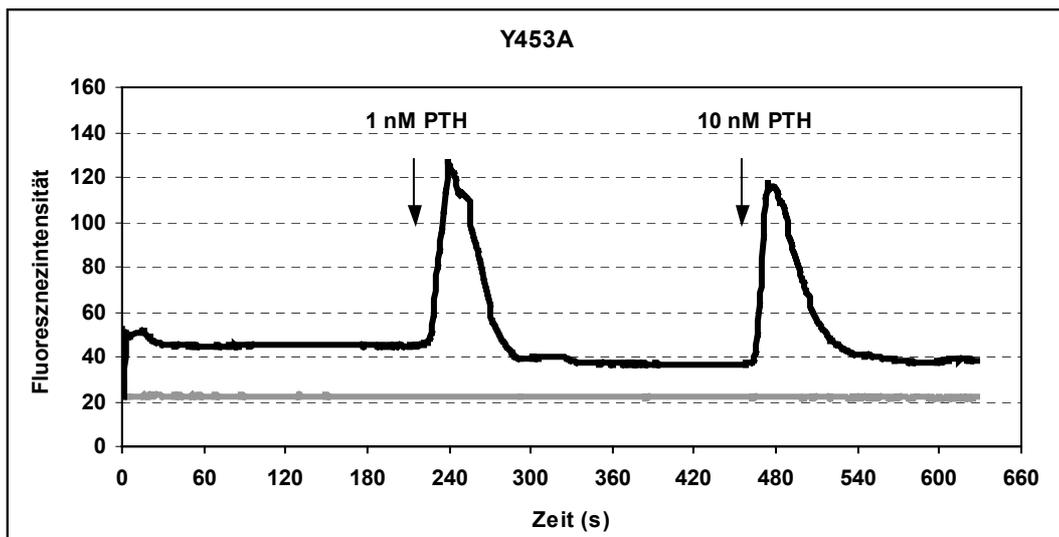


Abb. 4-11: **Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) von HEK 293 E+-Zellen, welche die Rezeptor-Mutante Y453A auf der Zelloberfläche exprimieren.** Es wurde für 1 min mit 1 nM hPTH (1-34) stimuliert. Nach 3 Minuten Auswaschen der Kammer mit Puffer C wurde für eine weitere Minute mit 10 nM hPTH (1-34) stimuliert. Bei der dargestellten Kurve (*schwarz*), handelt es sich um den Mittelwert aus 22 unabhängig voneinander gemessenen Zellen. Die Intensität des Hintergrunds ist in *grau* dargestellt. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

Für die Mutante Y453A kann hingegen schon bei einer einminütigen Gabe von 1 nM PTH ein deutlicher Anstieg des intrazellulären Kalziums gemessen werden (Abb. 4-11). Eine weitere Stimulation der Zellen mit 10 nM PTH, nach einer Pause von 3 Minuten, ergibt ebenfalls ein eindeutiges, kaum in der Intensität geringeres, Signal.

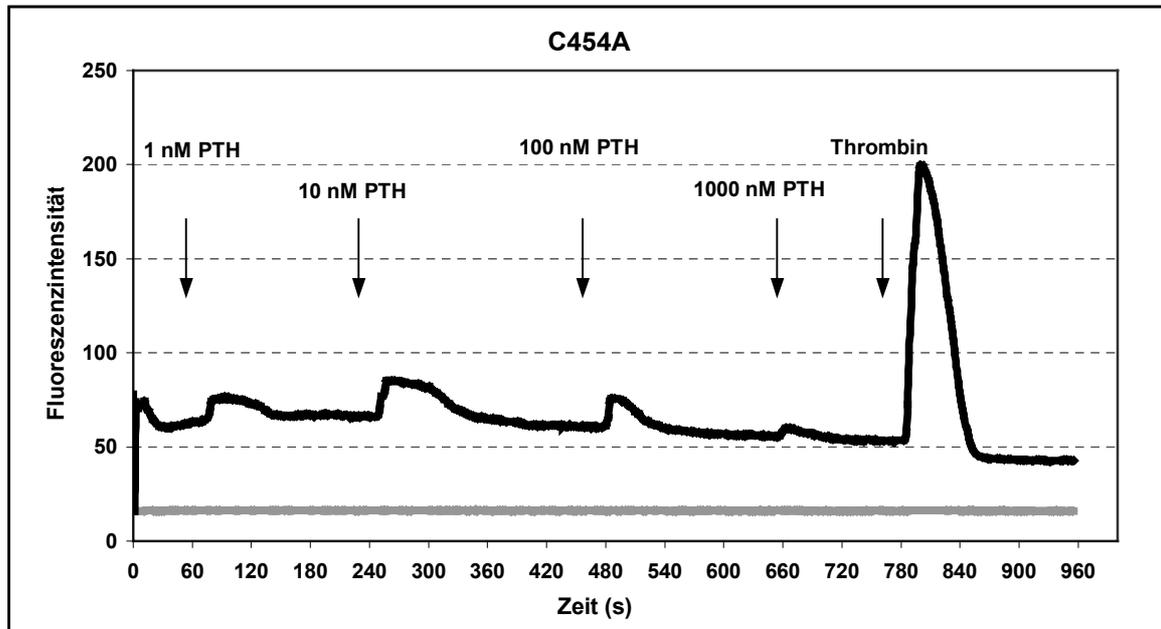


Abb. 4-12: Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) von HEK 293 E+-Zellen, welche die Rezeptor-Mutante C454A auf der Zelloberfläche exprimieren. Es wurde für 1 min mit 1 nM PTH stimuliert. Nach Auswaschen der Kammer für 2 min mit Puffer C wurde für eine weitere Minute mit 10 nM PTH stimuliert. Eine weitere Stimulation mit 100 nM PTH und 1000 nM PTH erfolgte nach einer jeweils weiteren Pause von 2 Minuten. Als Kontrolle wurde anschließend eine Stimulation mit 2 unit / ml Thrombin durchgeführt. Die dargestellte Kurve (schwarz) wurde aus dem Mittelwert von 20 gemessenen Zellen ermittelt. Der Hintergrund ist als graue Linie dargestellt. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

Die Zellen, welche die Rezeptor-Mutante C454A auf der Zelloberfläche exprimieren, wurden zunächst mit steigenden Konzentrationen an hPTH (1-34) stimuliert (1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM PTH). Die PTH-Gabe erfolgte jeweils für 1 Minute mit einer circa zweiminütigen Pause vor der nächsten Stimulation (Abb. 4-12). Während dieser Zeit wurde die Kammer mit Puffer C gespült. In dieser Messung wird deutlich, wie es sich auch aus der Gesamtinositolphosphatproduktion ableiten lässt, dass kaum intrazelluläres Kalzium über den Phospholipase C-Signalweg freigesetzt wird.

Zur Kontrolle, ob die Zellen funktionsfähig bezüglich der intrazellulären Kalziumausschüttung sind, wurden die Zellen im Anschluss mit 2 units / ml Thrombin stimuliert. Es zeigte sich, dass es sich bezüglich der Kalziumausschüttung um funktionstüchtige Zellen handelte.

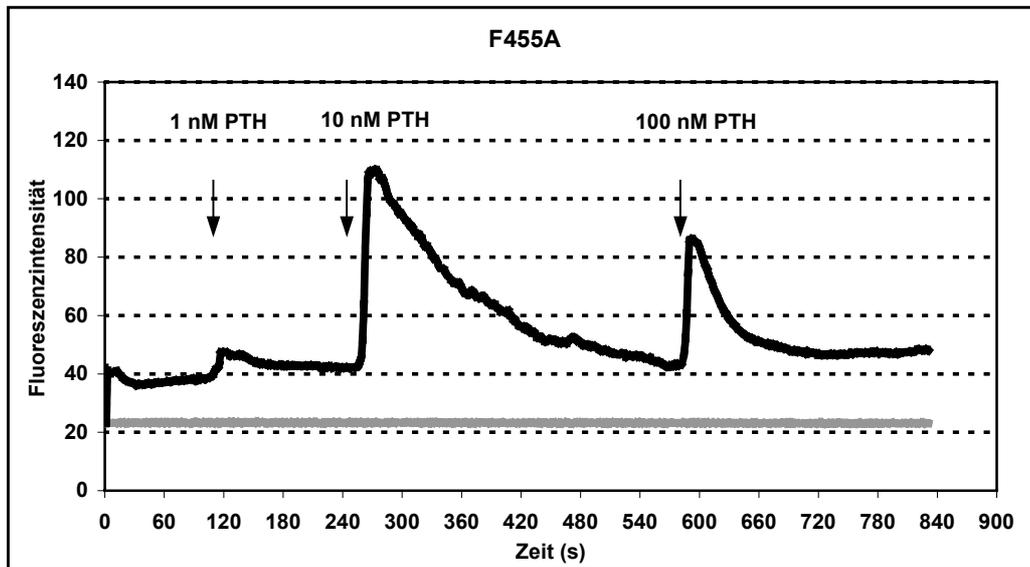


Abb. 4-13: **Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) von HEK 293 E+-Zellen, welche die Rezeptor-Mutante F455A auf der Zelloberfläche exprimieren.** Es wurde für 1 min mit 1 nM PTH stimuliert. Nach einer Pause von 2 Minuten und Auswaschen der Kammer mit Puffer C wurde für eine weitere Minute mit 10 nM PTH stimuliert. Eine weitere Stimulation mit 100 nM PTH erfolgte nach einer weiteren Pause von ca. 5 Minuten. Die Kurve (schwarz) berechnet sich aus dem Mittelwert der gemessenen Fluoreszenz von 20 markierten Zellen. Die Intensität des Hintergrunds ist als graue Linie dargestellt. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

Untersuchungen der Mutante F455A (Abb. 4-13) bezüglich der Fähigkeit durch den Phospholipase C-Signalweg intrazelluläres Kalzium auszuschütten, wurde durch eine erste Stimulation mit 1 nM PTH durchgeführt. Bei dieser geringen PTH-Konzentration zeigten die Zellen keine merkliche Veränderung in der Intensität der Fluoreszenz. Nach einer zweiminütigen Pause wurden die Zellen erneut mit 10 nM PTH stimuliert. Diese Konzentration reichte aus, um intrazellulär Kalzium auszuschütten. Auffällig bei dieser Mutante ist, dass die Abnahme der Fluoreszenz bis auf das Basalniveau deutlich zeitverzögert statt findet.

Eine weitere Stimulation mit 100 nM PTH ergab einen geringeren Anstieg des Maximalwertes, was eventuell auf eine Desensibilisierung des Rezeptors oder nachgeschalteter Signalwege zurück zu führen ist.

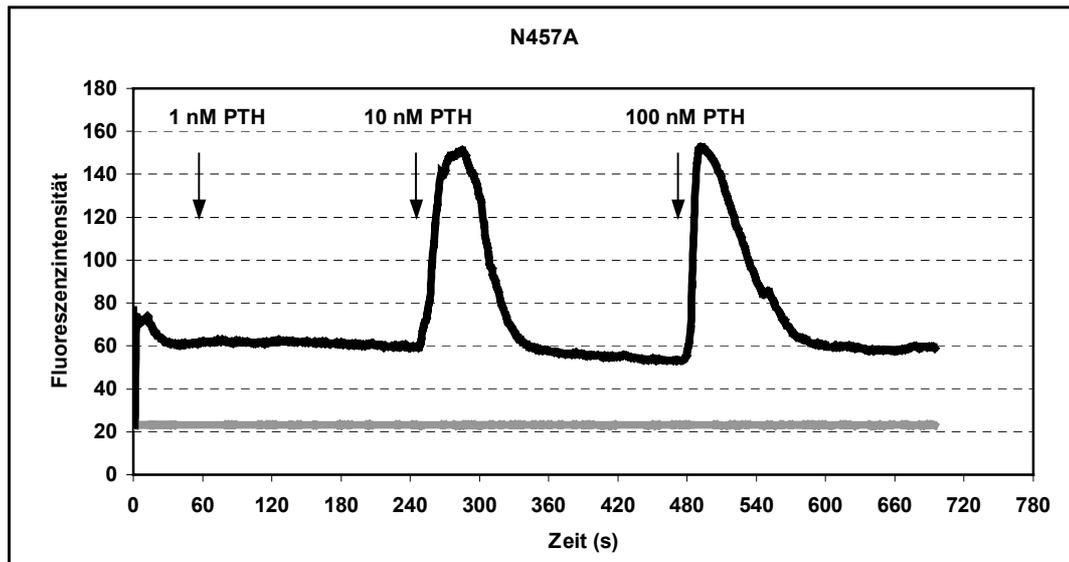


Abb. 4-14: **Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) von HEK 293 E+-Zellen, welche die Rezeptor-Mutante N457A auf der Zelloberfläche exprimieren.** Es wurde für 1 min mit 1 nM PTH stimuliert. Nach einer Pause von 2 Minuten wurde im folgenden für eine Minute mit 10 nM PTH stimuliert. Eine erneute Stimulation mit 100 nM PTH erfolgte nach einer weiteren Pause von ca. 3 Minuten. Basierend auf dem Mittelwert aus 21 markierten und gemessenen Zellen wurde die oben dargestellte Kurve (*schwarz*) ermittelt. Der Hintergrund ist als *graue* Linie dargestellt. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

Die Mutante N457A (Abb. 4-14) zeigt, wie der WT-Rezeptor, keinen messbaren Anstieg des intrazellulären Kalziums nach einer Stimulation mit 1 nM PTH. Hingegen kann, wie beim WT-Rezeptor eine Freisetzung von Kalzium nach einer erneuten Stimulation mit 10 nM PTH und 100 nM PTH beobachtet werden.

Auch für die Mutante Y453A/N457A kann bei der Kalzium-Messung nur eine kaum meßbare Änderung der Fluoreszenzintensität angezeigt werden. In Folge wurde die Konzentration von 1 nM über 10 nM auf 100 nM PTH gesteigert. Die Stimulation erfolgte für jeweils eine Minute, mit einer dazwischen liegenden Pause von drei Minuten. Dies entspricht auch den Erwartungen aus den Messungen der Gesamtinositole, da auch in diesem Fall kein Anstieg der Inositolphosphate, nach einer maximalen Stimulation von PTH, messbar war. Die Funktionsfähigkeit der Zellen wurde mit einer abschließenden Thrombinstimulation nachgewiesen.

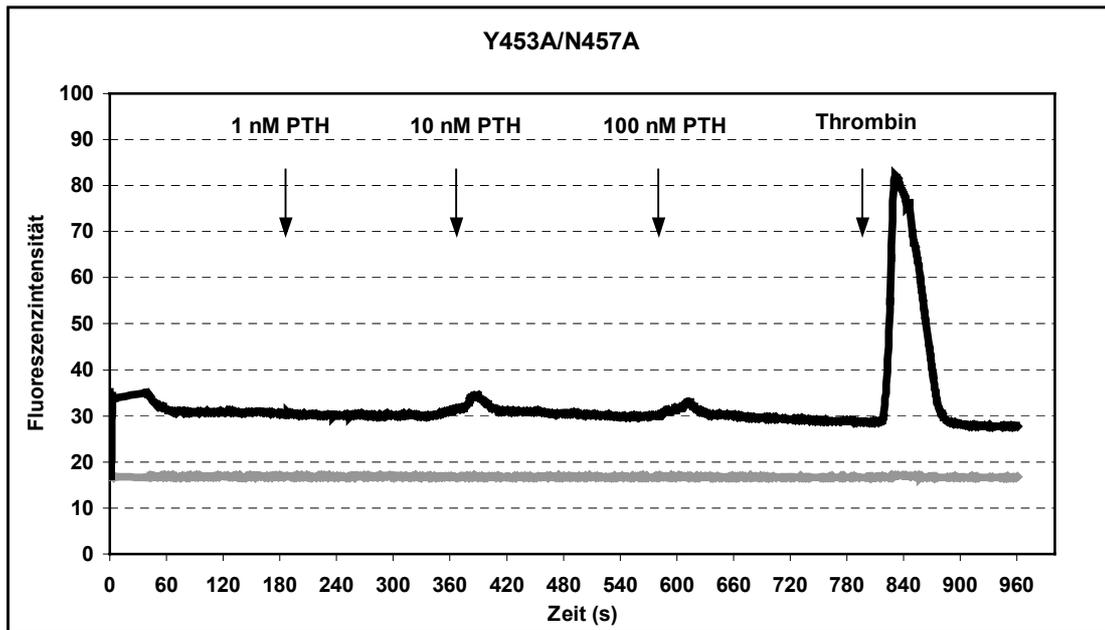


Abb. 4-15: **Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) von HEK 293 E+-Zellen, welche die Rezeptor-Mutante Y453A/N457A auf der Zelloberfläche exprimieren.** Es wurde für 1 min mit 1 nM PTH stimuliert. Nach einer Pause von ca. 2 Minuten, in welcher die Kammer mit Puffer C gewaschen wurde, erfolgte als nächstes für eine weitere Minute eine Stimulation mit 10 nM PTH. Nach einer weiteren zweiminütigen Pause wurden die Zellen mit 100 nM PTH stimuliert. Zur Kontrolle wurde eine abschließende Stimulation mit 2 units / ml Thrombin durchgeführt. Bei der dargestellten Kurve (*schwarz*), handelt es sich um den Mittelwert aus 20 voneinander unabhängig gemessenen Zellen. Die Hintergrundintensität ist als *graue* Linie dargestellt. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

4.2 Charakterisierung von PTH1-/ PTH2-Rezeptor Hybridmutanten

4.2.1 Vergleich der humanen PTH2-Rezeptor (P2R) Aminosäuresequenz mit der humanen PTH1-Rezeptor-Aminosäuresequenz (P1R)

Vergleicht man die Aminosäuresequenz des humanen P2R mit der Sequenz des humanen P1R so ergibt sich eine Sequenzhomologie, bezogen auf identische Aminosäuren, von 45 % (berechnet mit dem Programm ClustalW). Dabei erkennt man, dass der Prozentsatz der identischen Aminosäuren innerhalb der sieben Transmembrandomänen besonders groß ist [233]. Aber auch die Abschnitte der drei intrazellulären Schleifen weisen, bis auf wenige Aminosäureunterschiede, sehr hohe Gemeinsamkeiten auf.

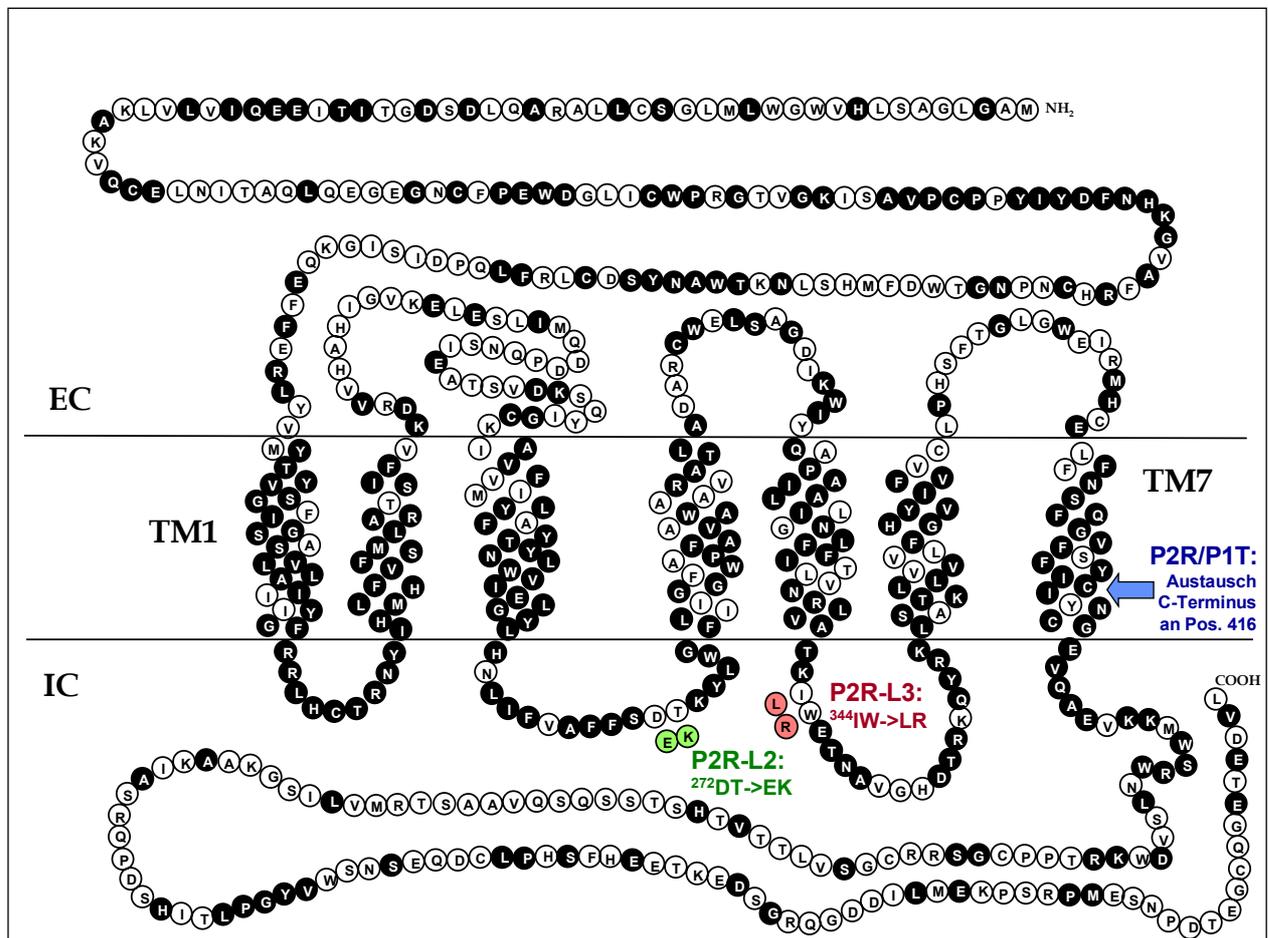


Abb. 4-16: Schematische Darstellung des PTH2-Rezeptors (P2R) mit seinen 550 Aminosäuren. Gezeigt ist die vermutete Lage der sieben Transmembrandomänen (TM1-7) mit den verbindenden extrazellulären und intrazellulären Schleifen (IC = intrazellulärer Bereich; EC = extrazellulärer Bereich). Konservierte Aminosäuren des P2R zum P1R sind durch *schwarze, ausgefüllte* Kreise dargestellt. Ein Teil der nicht konservierten Aminosäuren der zweiten und dritten intrazellulären Schleife sind farbig dargestellt. Die Aminosäuren der zweiten Schleife, welche in dieser Arbeit durch die entsprechenden Aminosäuren des P1R ausgetauscht worden sind, sind *grün* markiert. Ebenso die Aminosäuren der dritten Schleife, welche *rot* unterlegt sind. Die Stelle an welcher der C-Terminus des P2R durch den C-Terminus des P1R ausgetauscht wurde, wird durch einen *blauen* Pfeil dargestellt. Diese Darstellung ist angelehnt an die Abbildung von P. Turner et al. [228].

Von Iida-Klein et al. [115] wurde gezeigt, dass die Aminosäure-Abfolge „EKKY“ im Bereich der zweiten intrazellulären Schleife des P1R der Ratte für die Ankopplung an den Phospholipase C-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt.

Ebenso finden sich im N-terminalen Bereich der dritten intrazellulären Schleife des Opossums P1R Aminosäuren, die für die Ankopplung an den Inositolphosphat-Signalweg von entscheidender Bedeutung sind [114].

Im Gegensatz zum P1R, zeigt der P2R keine Ankopplung an den Phospholipase C-Signalweg. Durch schrittweise Angleichung der humanen PTH2-Rezeptorsequenz an den humanen PTH1-Rezeptor sollte nun versucht werden, die Ankopplung an diesen Signalweg mit verschiedenen erzeugten Mutanten (Abb. 4-16) zu rekonstituieren.

Hierzu wurde zunächst ein veränderter Rezeptor erzeugt, welcher eine Angleichung der Aminosäuren der zweiten Schleife beinhaltet. Da die Aminosäure-Abfolge „EKKY³¹⁷⁻³²⁰“ eine wichtige Rolle bei der Ankopplung an den Phospholipase C-Weg spielt, wurde diese Abfolge durch die Mutation DT²⁷²->EK²⁷³ wieder hergestellt. Daraus ergibt sich die Mutante P2R-L2.

Ähnliches wurde für die dritte intrazelluläre Schleife durchgeführt, indem durch den Austausch der Aminosäuren IW³⁴⁴->LR³⁴⁵ der N-terminale Bereich dieser Schleife an den P1R angeglichen wurde. Diese Mutante wird im folgenden P2R-L3 genannt.

Die Aminosäureunterschiede innerhalb des C-Terminus sind, wie in Abbildung 4-16 dargestellt, wesentlich größer. Deshalb wurde der komplette C-Terminus des P2R durch den C-Terminus des P1R ausgetauscht. Diese Mutante wird im folgenden als P2R-P1T bezeichnet. Ausserdem wurde eine Kombination der einzelnen Mutanten der zweiten und dritten Schleife generiert (P2R-L2/3), sowie eine Mutante, die sich aus allen drei Mutationen zusammensetzt (P2R-L2/3-P1T).

4.2.2 Konstruktion von Hybridmutanten des PTH1- und PTH2-Rezeptors

Die Rezeptor cDNA's für die Mutanten P2R-L2, P2R-L3 und P2R/P1T wurden freundlicherweise von Markus R. John zur Verfügung gestellt. Diese Mutanten wurden mittels „overlap-extension“-PCR generiert und in den Expressionsvektor pCEP4 subkloniert.

Zur Erstellung der Doppelmutante aus P2R-L2 und P2R-L3 (P2R-L2/3) wurden, aus methodischen Gründen, die beiden einzelnen Mutanten P2R-L2 und P2R-L3 in den Klonierungsvektor pBluescript II KS(+), über die Schnittstellen KpnI und NotI, eingebaut. Eine Analyse der Restriktionsschnittstellen der Mutanten P2R-L2 und P2R-L3 zeigte, dass sich eine einzeln vorkommende Schnittstelle für das Restriktionsenzym BstAPI im Sequenzbereich befindet, welcher zwischen den beiden eingefügten Mutationen in der zweiten und dritten Schleife liegt. Durch Restriktionsverdau der beiden cDNAs mit den Enzymen KpnI und BstAPI konnten zwei Fragmente isoliert werden. Zum einen der vollständige Vektor mit dem C-terminalen Bereich (bein-

haltet P2R-L3-Mutation) des PTH2-Rezeptors mit einer Gesamtgröße von 4,2 kb. Des Weiteren ein 1,0 kb großes Fragment mit dem N-terminalen Bereich des PTH2-Rezeptors, welcher die Mutation in der zweiten intrazellulären Schleife trägt. Diese beiden Fragmente wurden ligiert und das Plasmid zur Kontrolle sequenziert. Die cDNA der Doppelmutante P2R-L2/L3 wurde anschließend über die Restriktionsschnittstellen KpnI und NotI in den episomalen Expressionsvektor pCEP4 zurück kloniert.

Zur Konstruktion einer Mutante aus der Kombination von P2R-L2, P2R-L3 und P2R/P1T war es nötig den Vektor pCEP4, welcher die cDNA für die Mutante P2R-L2/L3 beinhaltet, mit dem Enzym SacI partiell zu verdauen. Im Sequenzbereich zwischen der dritten intrazellulären Schleife und dem C-Terminus findet sich eine SacI-Schnittstelle, welche in der weiteren Sequenz nicht mehr vorkommt. Allerdings weist der Vektor pCEP4 zwei weitere SacI-Schnittstellen auf, so dass es nötig war einen Partialverdau mit SacI und KpnI durchzuführen. Durch den Verdau des Plasmids mit der P2R-P1T-Mutante wurde ein 11,6 kb großes Fragment isoliert, welches die Sequenz des Vektors und den C-terminalen Anteil des PTH1-Rezeptors (P1T-Anteil) beinhaltete. Durch einen weiteren Verdau der Mutante P2R-L2/L3 mit den Enzymen KpnI und SacI konnte der restliche Anteil des PTH2-Rezeptors isoliert werden. Durch die Ligation der beiden isolierten Fragmente wurde die Mutante P2R-L2/L3/P1T generiert. Zur Kontrolle wurde die Plasmid-DNA sequenziert.

4.2.3 Bindungseigenschaften und Signaltransduktion der Hybrid-Rezeptoren

4.2.3.1 Bindungseigenschaften der Hybrid-Rezeptoren im Vergleich zu den humanen PTH1- und PTH2-Rezeptoren (P1R, P2R)

Wie auch für die TM7-Mutanten beschrieben (siehe 4.1.3), wurden auch für die Hybridmutanten kompetitive Verdrängungsstudien durchgeführt (Abb. 4-17, Fig. A und B). Da für den P2R als physiologischer Ligand das Peptid TIP39 diskutiert wird [234], wurden die Bindungseigenschaften der WT-Rezeptoren und der daraus abgeleiteten Mutantenrezeptoren sowohl für hPTH (1-34), als auch für TIP39 überprüft.

A. Bindungsexperimente mit hPTH (1-34) als Ligand

In ersten Bindungsexperimenten mit den Hybridmutanten, wurde ebenfalls das Problem der Rechtsverschiebung der Verdrängungskurven durch eine zu hohe Rezeptorexpression auf der einzelnen Zelle deutlich, wie dies schon bei den vorher untersuchten TM7-Mutanten zu beobachten war. Um dieses Phänomen, welches durch den pCEP4-Expressionsvektor in Kombination mit HEK 293 E⁺-Zellen auftaucht, zu unterbinden, wurden die Zellen, vor der Aussaat mit nicht transfizierten 293 E⁺-Zellen im Verhältnis 1:10 verdünnt. Im Gesamtansatz wird so die Menge

der vorhandenen Rezeptoren pro Loch reduziert. Die rechnerische Voraussetzung für die Berechnung der Expressionsdichte der Zellen, dass die Konzentration des radioaktiven Liganden im Ansatz durch die Bindung an den Rezeptor nicht wesentlich verändert wird, ist somit wieder hergestellt.

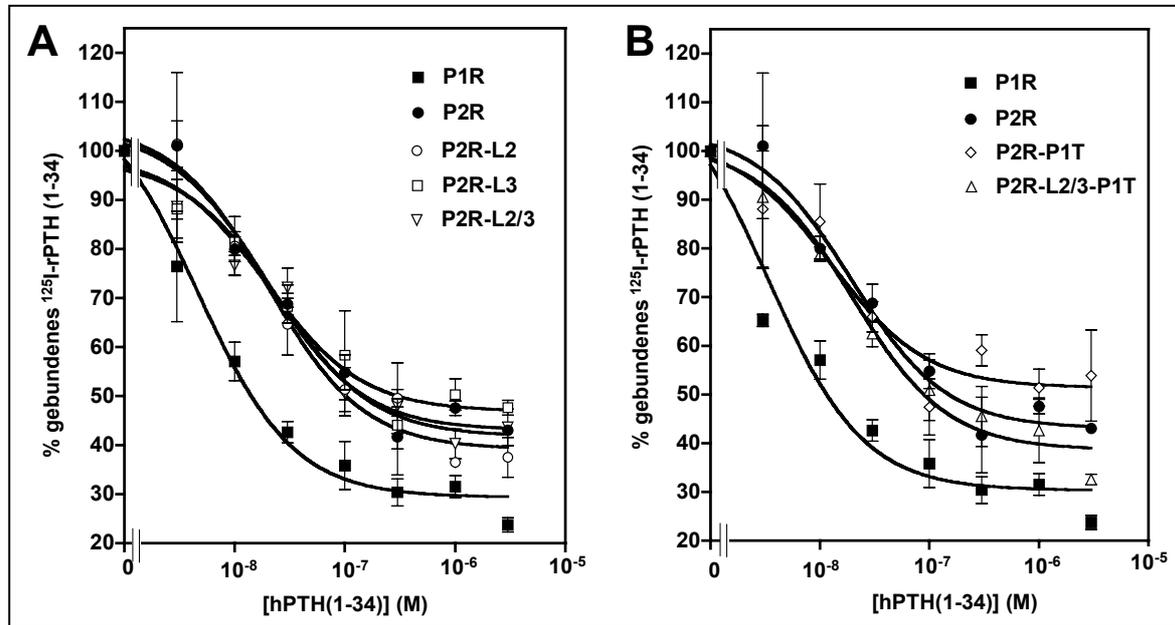


Abb. 4-17: **Bindungseigenschaften der Hybridrezeptoren im Vergleich zu den Wildtyp-Rezeptoren P1R und P2R nach PTH-Stimulation.** Dargestellt sind repräsentative Verdrängungskurven (aus zwei unabhängigen Experimenten) mit radioaktiv markiertem [^{125}I]-Nle 8,21 Tyr 34 rPTH (1-34) amid und hPTH (1-34) als Ligand. HEK 293 E+-Zellen wurden mit der WT-Rezeptor-DNA und den cDNA's der Hybrid-Rezeptoren stabil transfiziert. Gezeigt sind die Messpunkte, zusammen mit der Kurvenangleichung mittels einer nichtlinearen Regression. Die Kurvenpunkte sind die Mittelwerte (\pm S.E.) aus einer Tripletbestimmung.

A: Vergleich der WT-Rezeptoren P1R und P2R mit den Mutanten P2R-L2, P2R-L3 und P2R-L2/3.

B: Darstellung der Mutanten P2R-P1T und P2R-L2/3-P1T im Vergleich zu P1R und P2R (WT-Rezeptoren).

Alle Rezeptoren werden auf der Zelloberfläche exprimiert (Abb. 4-17). Hinsichtlich des Kurvenverlaufs der Verdrängungskurve des P2R und der Hybrid-Mutanten besteht kein wesentlicher Unterschied. Die Verdrängungskurve des P1R ist um etwa eine Zehnerpotenz nach links verschoben, was in einer besseren Affinität des Liganden zu diesem Rezeptor begründet liegt. Die maximale spezifische, gebundene Radioaktivität (Tabelle 4-4, "gebundene Radioaktivität (%)") liegt bei allen Rezeptoren im Bereich von 10 - 15 % der gesamten eingesetzten Radioaktivität.

Die Berechnung der Expressionsdichte (Tabelle 4-4) mittels der Formeln aus Kapitel 3.5.5 zeigt, dass die Menge, der auf der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptoren im wesentlichen vergleichbar ist. Nur für die Hybridmutante P2R-L2/3 ergibt sich, im Vergleich zu den anderen Mutanten, eine erhöhte Rezeptorzahl. Eine ähnliche Expressionsdichte der Rezeptoren auf den Zellen ist wichtig, um zu zeigen, dass eventuelle Unterschiede im Signalverhalten nicht auf eine unterschiedliche Menge an Rezeptoren zurück zu führen sind.

Rezeptor	gebundene Radioaktivität (%)	IC ₅₀ (nM)	Expressionsdichte (Rezeptoren / Zelle)
hPTH (1-34)			
P1R	17,0 ± 5,5	4,6	1.300.000
P2R	11,0 ± 3,1	19,1	1.100.000
P2R-L2	11,1 ± 0,07	20,0	2.700.000
P2R-L3	9,5 ± 0,3	19,2	1.450.000
P2R-P1T	6,1 ± 1,5	12,6	1.150.000
P2R-L2/3	9,8 ± 2,8	29,3	3.500.000
P2R-L2/3-P1T	8,1 ± 2,9	42,1	1.500.000

Tab. 4-4: **Zusammenfassung der errechneten Werte für die WT-Rezeptoren (P1R, P2R) und die Hybrid-Mutanten.** In der Spalte „gebundene Radioaktivität (%)“ ist der Prozentsatz der gebundenen Radioaktivität, ausgehend von der gesamten eingesetzten Radioaktivität (cpm), angegeben. Die Werte sind Mittelwerte (\pm S.D.) aus zwei unabhängigen Bindungsexperimenten, welche jeweils in Tripletwerten bestimmt wurden.

Die IC₅₀-Werte wurden mit dem Programm GraphPad Prism™ 4.0 errechnet. Diese Werte beziehen sich auf die oben dargestellte kompetitive Verdrängungskurve und sind repräsentativ für zwei unabhängige Bindungsexperimente.

Die Expressionsdichte der Rezeptoren auf der Zelle wurde, wie in Kapitel 3.5.5 beschrieben, errechnet. Die hier aufgeführten Werte, stellen die berechneten Rezeptorzahlen dar, welche mit 10 multipliziert wurden, da die Zellen im Experiment 1:10 verdünnt waren.

Weiterhin kann aus der kompetitiven Verdrängungstudie die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀-Wert) ermittelt werden (Tabelle 4-4). Der in der Literatur angegebene IC₅₀-Wert des P1R liegt bei 3 - 6 nM [70]. Der in diesem Fall mit Hilfe des Programms GraphPad Prism™ 4.0 berechnete IC₅₀-Wert liegt für den P1R bei 4,6 nM.

Für den P2R gilt, dass hPTH (1-34) einen ebenso hoch affinen Liganden darstellt, wie für den P1R [72], [38]. Die halbmaximale, inhibitorische Konzentration liegt hier zwischen 10 - 20 nM. Der in diesen Experimenten errechnete Wert ist mit den Literaturwerten vergleichbar (**P2R: IC₅₀ = 19,1 nM**).

Die für die Hybrid-Rezeptoren ermittelten IC₅₀-Werte (IC₅₀ = 12 - 40 nM) liegen ebenfalls innerhalb des für den P2R angegebenen Bereichs. Allerdings zeigen die Doppelmutante (P2R-L2/3) und die Mutante P2R-L2/3-P1T etwas schlechtere Affinitäten zum Liganden (IC₅₀ = 30 - 40 nM), als dies für die restlichen Hybrid-Rezeptoren der Fall ist.

B. Bindungsexperimente mit TIP39 als Ligand

Da der P2R als Ligand ebenso TIP39 bindet, wurden die WT-Rezeptoren (P1R, P2R) und die daraus abgeleiteten Hybrid-Rezeptoren auch hinsichtlich der TIP39-Bindung untersucht.

In folgender Abbildung (Abb. 4-18) ist die kompetitive Verdrängungskurve, mit TIP39 als nicht-radioaktiv markierter Ligand, dargestellt. Als radioaktiv markierter Ligand wurde ^{125}I -rPTH (1-34) verwendet. Es wird gezeigt, dass auch TIP39 in der Lage ist hPTH (1-34) vom Rezeptor zu verdrängen.

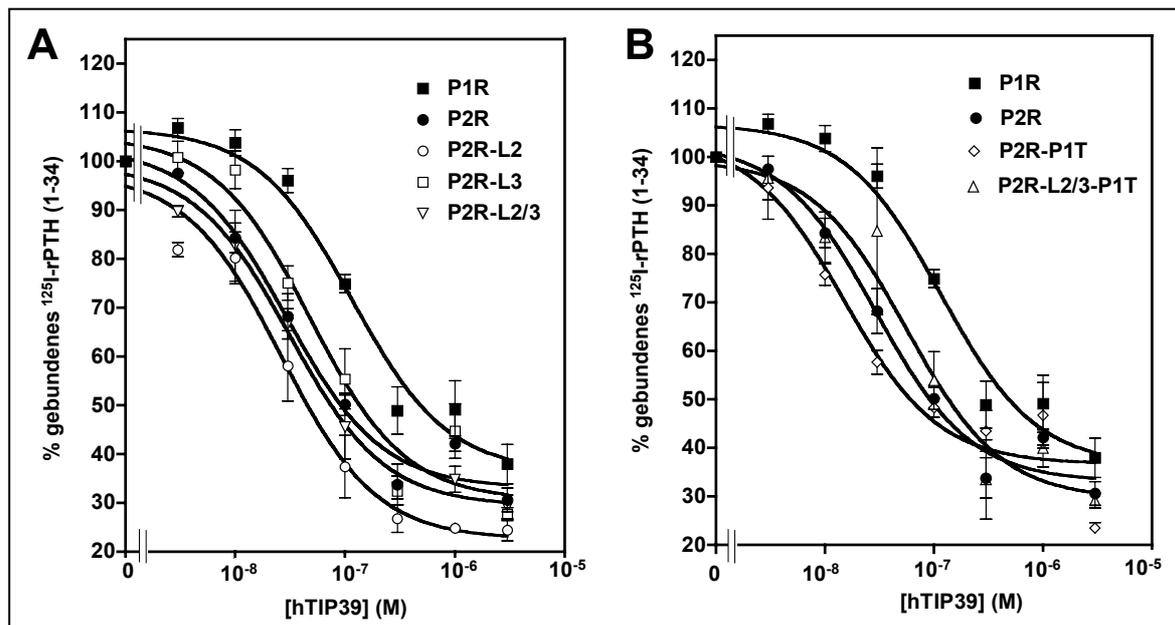


Abb. 4-18: **Bindungseigenschaften der Hybridrezeptoren im Vergleich zu den Wildtyp-Rezeptoren P1R und P2R nach TIP39-Stimulation.** Dargestellt sind repräsentative Verdrängungskurven (von zwei unabhängigen Experimenten) mit radioaktiv markiertem [^{125}I]-Nle^{8,21}Tyr³⁴-rPTH (1-34) amid und hTIP39 als Ligand. HEK 293 E+-Zellen wurden mit der WT-Rezeptor-DNA und den cDNA's der Hybrid-Rezeptoren stabil transfeziert. Gezeigt sind die Messpunkte, zusammen mit der Kurvenangleichung mittels einer nichtlinearen Regression. Die Kurvenpunkte sind Triplikate (Mittelwert \pm S.E).

A: Vergleich der WT-Rezeptoren P1R und P2R mit den Mutanten P2R-L2, P2R-L3 und P2R-L2/3.

B: Darstellung der Mutanten P2R-P1T und P2R-L2/3-P1T im Vergleich zu P1R und P2R (WT-Rezeptoren).

Die IC_{50} -Werte und die maximal gebundene Radioaktivität der einzelnen Rezeptoren sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst.

Eine Bindung von TIP39 an den P2R erfolgt mit ähnlicher Affinität, wie dies für hPTH (1-34) der Fall ist ($\text{IC}_{50} = 29,4 \text{ nM}$ (TIP39) vs. $19,1 \text{ nM}$ (PTH)). Für den P1R kann eine wesentlich schlechtere Affinität gegenüber TIP39 gezeigt werden ($\text{IC}_{50} = 116,4 \text{ nM}$ (TIP39) vs. $4,6 \text{ nM}$ (PTH)). Wie in früheren Arbeiten gezeigt [98], wirkt TIP39 am P1R als kompetitiver Antagonist zum biologisch aktiven Teil von hPTH (hPTH (1-34)).

Für die vom P2R abgeleiteten, mutanten Rezeptoren (P2R-L2, P2R-L3, P2R-P1T, P2R-L2/3 und P2R-L2/3-P1T) sind die Affinitäten zu TIP39 vergleichbar mit dem P2R ($\text{IC}_{50} = 15 - 55 \text{ nM}$).

Die maximale, spezifische, gebundene Radioaktivität (Tabelle 4-5, "gebundene Radioaktivität (%)") liegt bei allen Rezeptoren im Bereich von 12-21 % der eingesetzten Radioaktivität und damit etwas höher, als dies für hPTH (1-34) der Fall ist.

Rezeptor	IC ₅₀ (nM)	gebundene Radioaktivität (%)
		TIP39
P1R	116,4	17,8
P2R	29,4	21,0
P2R-L2	26,1	18,0
P2R-L3	48,0	14,6
P2R-P1T	14,9	12,9
P2R-L2/3	31,0	16,2
P2R-L2/3-P1T	56,1	17,0

Tab. 4-5: **Zusammenfassung der errechneten Werte für die WT-Rezeptoren (P1R, P2R) und die Hybrid-Mutanten.** Die IC₅₀-Werte wurden mit dem Programm GraphPad Prism™ 4.0 errechnet. Diese Werte beziehen sich auf die oben dargestellte, kompetitive Verdrängungskurve und sind repräsentativ für zwei unabhängige Bindungsexperimente.

In der Spalte „gebundene Radioaktivität (%)“ ist der Prozentsatz der gebundenen Radioaktivität, ausgehend von der gesamten eingesetzten Radioaktivität (cpm), angegeben. Diese Werte beziehen sich auf die oben dargestellte Verdrängungskurve.

4.2.3.2 Signaltransduktion der Hybrid-Rezeptoren

Sowohl der humane P1R, als auch der humane P2R koppeln über das G-Protein G_s an den cAMP-Signalweg an. Dieser Signalweg kann beim P1R über die Liganden hPTH (1-34) oder PTHrP aktiviert werden [3]. Im Gegensatz dazu, lässt sich der P2R nicht über PTHrP aktivieren [233], wohl aber über das von T.B. Usdin [234] isolierte Neuropeptid TIP39. Am P1R zeigt TIP39 keine Stimulation der Signalwege.

Der P1R kann außerdem über die Aktivierung des G-Proteins G_q, nach Stimulation mit hPTH (1-34) oder PTHrP, an den PLC-Signalweg ankoppeln. Dies ist beim P2R nicht möglich, weder nach Stimulation mit hPTH (1-34), noch nach Stimulation mit TIP39.

Da sich die hier untersuchten Rezeptor-Hybride vom P1R und P2R ableiten, wurde ihr Signalverhalten sowohl nach Stimulation mit hPTH (1-34), als auch nach Stimulation mit TIP39 untersucht.

A. Inositolphosphat-Signalweg

Von Iida-Klein et al. [115] wurde gezeigt, dass die Mutation der zweiten intrazellulären Schleife des P2R der Ratte, durch den Austausch der Aminosäuren „EKKY³¹⁷⁻³²⁰“ in das Aminosäuremotiv „DSEL“, dazu führt, dass der Inositolphosphatweg nach Stimulation mit PTH nicht mehr aktiviert wird. In weiteren Versuchen wurden die Aminosäurepositionen E³¹⁷, K³¹⁸ und Y³²⁰ einzeln, in die jeweiligen Aminosäuren des oben genannten Motivs, abgeändert. Auch die Punktmutationen führten zu einer erheblichen Reduktion der Inositolphosphat-Antwort.

In einer weiteren Arbeit von Z. Huang et al. [114] wurde gezeigt, dass N-terminal liegende Bereiche der dritten Schleife des Opossum P1R, ebenfalls einen kritischen Bereich für die G_q-Ankopplung darstellen.

Basierend auf diesen Untersuchungen wurde nun versucht mittels den erzeugten P2R/P1R-Hybridrezeptoren die Aktivierung des Inositolphosphatwegs zu rekonstituieren. Die gemessene Akkumulation der Gesamtinositolphosphate der verschiedenen Rezeptoren ist in Abbildung 4-19 dargestellt.

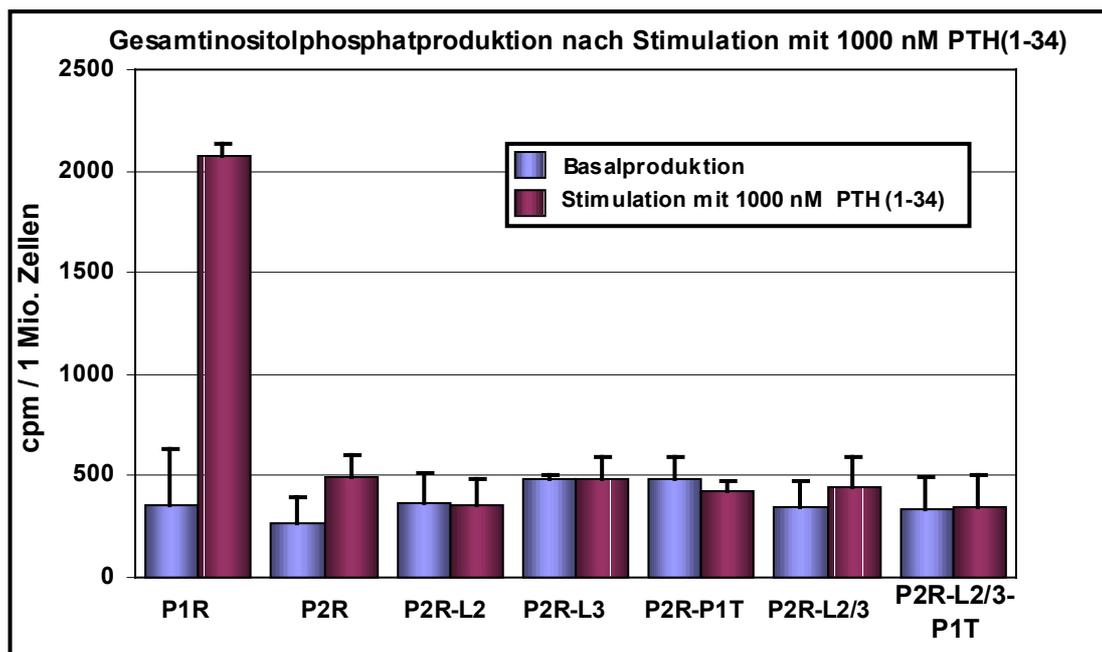


Abb. 4-19: Akkumulation von radioaktiv markiertem Gesamtinositolphosphat in Zellen, welche die P2R-P1R-Hybridmutanten und die WT-Rezeptoren (P1R, P2R) exprimieren. Die Zellen wurden 24 h vor der Stimulation mit 2 μ Ci / ml Myo-[³H]-Inositol beladen. Die lila Balken zeigen die Basalwerte, welche für die einzelnen Mutanten und die WT-Rezeptoren gemessen wurden. Dunkelrot dargestellt sind die gemessenen Werte nach Maximalstimulation mit 1000 nM hPTH (1-34) für 1 h bei 37 °C. Jeder Wert wurde in Triplikaten bestimmt (\pm S.D.).

Im Fall der hier untersuchten Hybrid-Rezeptoren sollte zunächst versucht werden, mit punktuellen Angleichungen des P2R, an intrazelluläre Bereiche des P1R, den Inositolphosphat-Signalweg wieder herzustellen. Sowohl die Angleichung der zweiten, als auch der dritten intrazellulären Schleife für sich alleine genommen, führt nicht zu einer messbaren Akkumulation der Gesamt-

nositolphosphate. Auch eine drastischere Angleichung an den P1R, durch den Austausch des kompletten C-Terminus, ist nicht in der Lage auf eine Stimulation mit hPTH (1-34) durch Akkumulation von Inositolphosphat zu reagieren.

Im weiteren wurden die Kombinationen der einzelnen Hybrid-Rezeptoren (P2R-L2/3 und P2R-L2/3-P1T) untersucht. Auch in diesen Fällen konnte keine messbare Akkumulation festgestellt werden.

Nicht dargestellt sind die Messungen nach Stimulation mit TIP39, da auch in diesem Falle keine Veränderung des Signalweges beobachtet werden konnte.

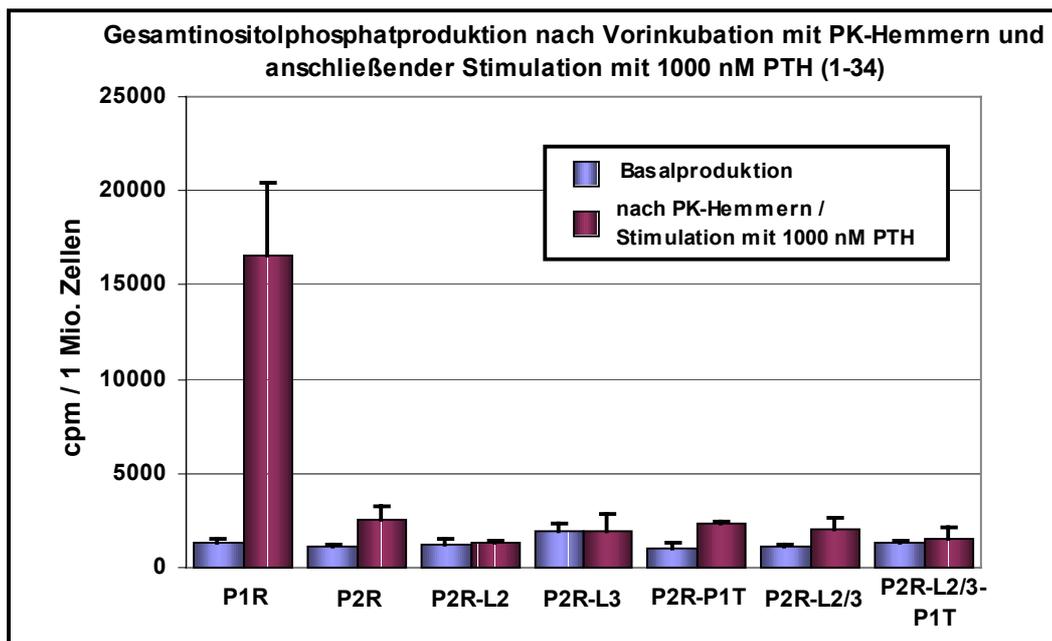


Abb. 4-20: Akkumulation von radioaktiv markiertem Gesamtinositolphosphat nach Behandlung mit Proteinkinasehemmern (PK-Hemmer). Vergleich von Zellen, welche die P2R-P1R-Hybridmutanten und die WT-Rezeptoren (P1R, P2R) exprimieren. Die Zellen wurden 24 h vor der Stimulation mit 2 μCi / ml Myo- ^3H -Inositol beladen. Am Versuchstag erfolgte eine Vorinkubation mit 30 μM H-89 (PKA-Hemmer) und 6 μM GF 109203X (PKC-Hemmer) für 1 h bei 37 °C. Die *lila* Balken zeigen die Basalwerte, welche für die einzelnen Mutanten und die WT-Rezeptoren gemessen wurden. *Dunkelrot* dargestellt sind die gemessenen Werte nach Maximalstimulation mit 1000 nM hPTH (1-34) für 1 h bei 37 °C. Jeder Wert wurde in Triplikaten gemessen (\pm S.D.).

Zur Unterstützung der vorher aufgezeigten Ergebnisse wurden die Zellen mit Proteinkinaseinhibitoren (H89, GF 109203X) behandelt (Abb. 4-20), bevor die eigentliche Messung der Gesamtinositolphosphate folgte. Dies bedeutet, dass der Rezeptor nicht mehr einer PKA / PKC-vermittelten Phosphorylierung ausgesetzt ist. Als Folge dieser Hemmung, kommt es zu einem fünf- bis zehnfach höheren Anstieg der Gesamtinositolphosphate, im Gegensatz zu den nicht behandelten Zellen. Dieser Effekt kann gut in Abbildung 4-20 beobachtet werden. Vergleicht man die gesamte akkumulierte Radioaktivität des P1R mit der in Abbildung 4-19 gemessenen Radioaktivität, so kann man deutlich die Verstärkung des Signals um den achtfachen Wert erkennen (Anstieg von ~ 2000 cpm auf ~ 16.000 cpm). Aber trotz dieser „Verstärkung“ der Inosi-

tolphosphat-Antwort durch Proteinkinase-Hemmer, kann bei den Hybrid-Rezeptoren keine Inositolphosphat-Akkumulation beobachtet werden.

B. cAMP-Signalweg nach Stimulation mit hPTH (1-34)

Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, spielen die Bereiche der zweiten und dritten intrazellulären Schleife eine wesentliche Rolle bei der Ankopplung des Rezeptors an den Inositolphosphat-Signalweg. Die in den oben erwähnten Publikationen untersuchten mutierten Rezeptoren wurden auch auf ihr Signalverhalten bezüglich des cAMP-Signalweges untersucht. Dabei zeigen diese Mutationen der zweiten intrazellulären Schleife keine wesentlichen Unterschiede zum PTH1-Rezeptor, in Bezug auf den cAMP-Signalweg [115]. Die N-terminale Region der dritten intrazellulären Schleife hingegen besitzt einen negativen Einfluss, sowohl auf den Inositolphosphat-Signalweg, als auch den cAMP-Signalweg [114]. Auf Grund der Hinweise aus diesen Publikationen, dass Bereiche der intrazellulären Schleifen Einfluss auf den cAMP-Weg nehmen könnten, wurden auch die hier generierten Rezeptormutanten hinsichtlich der cAMP-Akkumulation untersucht.

In Abbildung 4-21 ist der Verlauf der cAMP-Akkumulation der Hybrid-Rezeptoren im Vergleich zu den WT-Rezeptoren (P1R und P2R) dargestellt, nachdem die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an hPTH (1-34) stimuliert wurden.

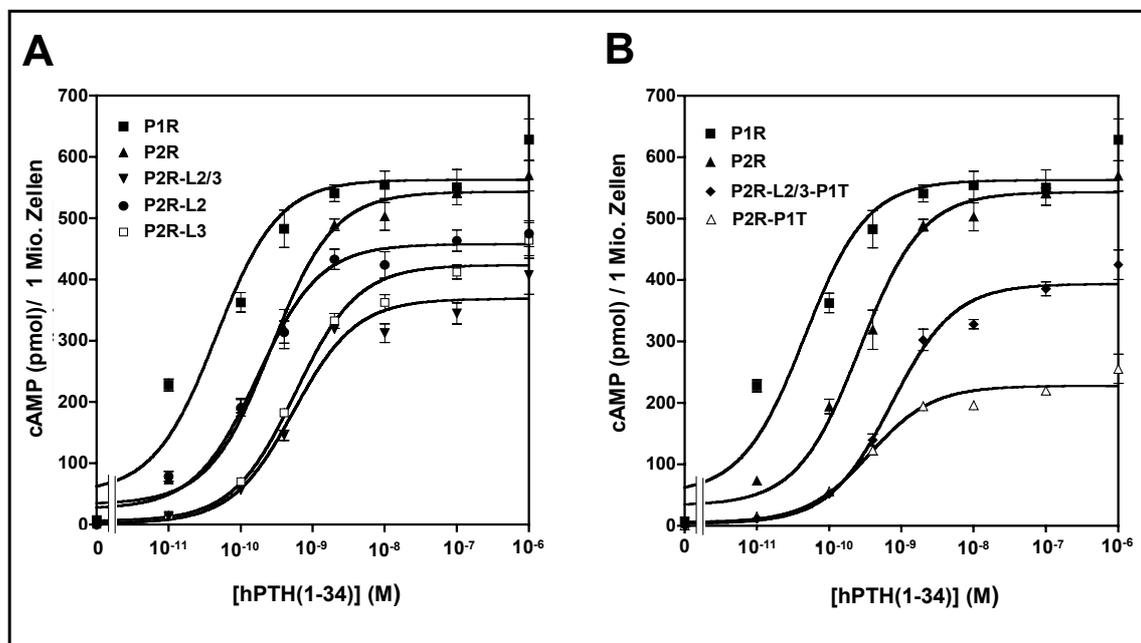


Abb. 4-21: cAMP-Produktion der Zellen (in pmol / 1Mio Zellen) nach Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen Mengen an hPTH (1-34). Das akkumulierte cAMP wurde mittels kommerziell erhältlichem RIA gemessen. Die Kurve ist repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. Die Kurvenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten (\pm S.E.) einer Tripletbestimmung. **A:** Vergleich der Mutanten P2R-L2, P2R-L3 und der Kombination P2R-L2/3, sowohl mit dem humanen P1R als auch mit dem humanen P2R. **B:** Vergleich der mutierten Rezeptoren P2R-P1T und P2R-L2/3-P1T mit den beiden WT-Rezeptoren (P1R und P2R).

Der Vergleich der beiden WT-Rezeptoren untereinander zeigt, dass hPTH (1-34) den P1R in Bezug auf die cAMP-Antwort besser stimulieren kann, als den P2R. Dieser Effekt wird auch im Vergleich der EC_{50} -Werte (Tabelle 4-6) sichtbar, welche für den P1R mindestens um den Faktor 10 niedriger liegt, als dies für den P2R der Fall ist. Im Gegensatz hierzu findet man bei der maximalen cAMP-Akkumulation dieser beiden Rezeptoren, keinen signifikanten Unterschied (Abb. 4-22).

Die Hybrid-Rezeptoren zeigen bezüglich ihres Kurvenverlaufs nach hPTH (1-34) Stimulation und hinsichtlich ihrer EC_{50} -Werte eine wesentlich deutlichere Übereinstimmung mit dem P2R, als mit dem P1R.

Wie auch im Fall der Veränderung der zweiten intrazellulären Schleife des P1R gezeigt wurde [115], hat eine Abwandlung des P2R, in Richtung PTH1-Rezeptor, wie durch die Mutante P2R-L2 dargestellt, ebenfalls keinen Einfluss auf das cAMP-Signalverhalten (EC_{50} : **P2R** = 0,56 nM \pm 0,29 nM; **P2R-L2** = 0,41 nM \pm 0,26 nM). Ebenso ist kein signifikanter Unterschied in der maximalen cAMP-Akkumulation zu sehen (Abb. 4-22 und Tabelle 4-6).

Rezeptor	EC_{50} (nM)	max. cAMP im Vergleich zum P2R (%)
P1R	0,04 \pm 0,01	120,2 \pm 28,4
P2R	0,56 \pm 0,29	100
P2R-L2	0,41 \pm 0,26	82,1 \pm 11,5
P2R-L3	1,26 \pm 0,66*	74,5 \pm 16,3 *
P2R-P1T	0,65 \pm 0,39	34,9 \pm 18,5 **
P2R-L2/3	1,51 \pm 1,15*, ⁺	62,1 \pm 12,1 *
P2R-L1/3-P1T	2,06 \pm 1,38*, ⁺	63,7 \pm 6,9 *

Tab. 4-6: Zusammenfassung der EC_{50} -Werte der unterschiedlichen Hybrid-Rezeptoren im Vergleich zu den WT-Rezeptoren (P1R und P2R) und Gegenüberstellung des maximal akkumulierten cAMP (%) im Vergleich zum P2R. Die EC_{50} -Werte sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten (\pm S.D.). Die EC_{50} -Werte im Vergleich zum P1R sind für die Rezeptoren P2R-L3, P2R-L2/3 und P2R-L2/3-P1T signifikant erhöht (* $p < 0,005$). Im Vergleich zum P2R zeigt sich eine signifikante Erhöhung (+: $p < 0,005$) für die Rezeptoren P2R-L2/3 und P2R-L2/3-P1T. Die %-Werte in Bezug zum P2R wurden aus jeweils fünf verschiedenen cAMP-Assays berechnet (\pm S.E.). Die Rezeptoren P2R-L2, P2R-L3, P2R-P1T, P2R-L2/3, und P2R-L2/3-P1T zeigen gegenüber dem P2R eine signifikant erniedrigte cAMP-Akkumulation nach Stimulation mit 1000 nM hPTH (1-34) (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,0001$)

Erstaunlicherweise ist für den Hybrid-Rezeptor P2R-L3 im Vergleich zum P2R eine größere Menge an hPTH (1-34) nötig um den halbmaximalen Effekt zu erreichen (EC_{50} : **P2R** = 0,56 nM \pm 0,29 nM; **P2R-L3** = 1,26 nM \pm 0,66 nM). Auch die maximale Menge an produziertem cAMP ist signifikant gegenüber dem P2R vermindert. Im reziproken Fall wurde gezeigt, dass eine Veränderung der dritten intrazellulären Schleife im Bereich des N-terminalen Abschnittes zu einer drastischen Verminderung der cAMP-Antwort führt [114]. So scheint auch im Fall der Hybrid-Mutanten dieser Bereich für eine Ankopplung an G_s eine Rolle zu spielen. Die Kombination der Mutanten P2R-L2 und P2R-L3 (P2R-L2/3) zeigt nochmals eine Verschlechterung bezüglich des halbmaximalen Effekts (EC_{50} : **P2R** = 0,56 nM \pm 0,29 nM; **P2R-L2/3** = 1,51 nM \pm 1,15 nM) und ebenso im Hinblick auf die maximale akkumulierte cAMP-Menge (Abb. 4-22 und Tabelle 4-6).

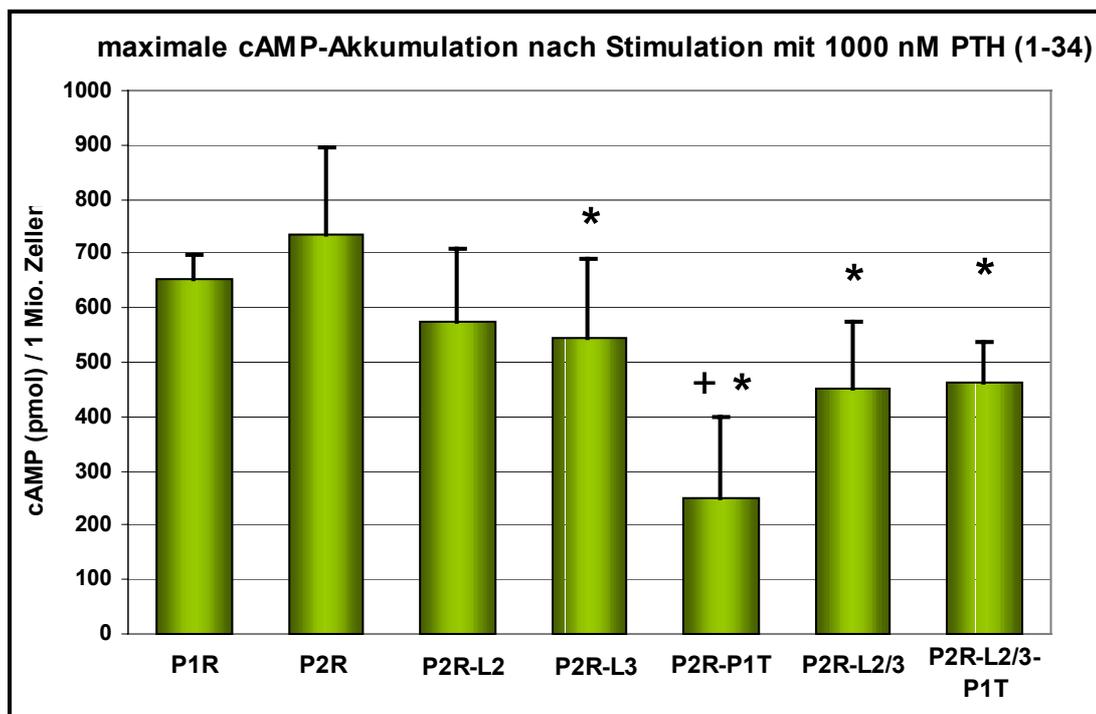


Abb. 4-22: **Maximale cAMP-Produktion der P2R-Hybride im Vergleich zu den beiden WT-Rezeptoren P1R und P2R.** Die Werte errechneten sich aus der Differenz des maximal akkumulierten cAMPs abzüglich der Basalproduktion der Zellen (\pm S.D.) und stammen aus vier unabhängigen Versuchen, bei denen die Werte jeweils in Triplikaten bestimmt wurden. Alle Werte wurden auf 1 Mio. Zellen standardisiert. Die Rezeptoren P2R-L3, P2R-P1T, P2R-L2/3 und P2R-L2/3-P1T zeigen gegenüber dem P2R eine signifikant erniedrigte maximale cAMP-Produktion (*: $p < 0,05$). Der Rezeptor P2R-P1T zeigt auch gegenüber dem P1R eine signifikant erniedrigte maximale cAMP-Akkumulation (+: $p < 0,005$)

Durch die Angleichung des P2R an den P1R, durch einen Austausch weiter Teile des C-Terminus, ändert sich der halbmaximale Effekt dieser Mutante (P2R-P1T) gegenüber dem WT-Rezeptor nicht merklich (EC_{50} : **P2R** = 0,56 nM \pm 0,29 nM; **P2R-P1T** = 0,65 nM

$\pm 0,39$ nM). Bemerkenswert ist die extreme Verringerung der maximalen cAMP-Akkumulation (Abb. 4-22 und Tabelle 4-6) bezüglich des P2R, aber auch gegenüber dem P1R.

Erstaunlicherweise kann durch eine Kombination aller Mutationen, wie dies in der Rezeptor-Mutante P2R-L2/3-P1T verwirklicht wurde, das cAMP-Signal im Vergleich zum P2R-P1T-Rezeptor merklich verbessert werden. Allerdings zeigt sich beim halbmaximalen Effekt ein signifikant erhöhter Wert im Vergleich zum PTH2-Rezeptor (EC_{50} : **P2R** = $0,56$ nM $\pm 0,29$ nM; **P2R-L2/3-P1T** = $2,06$ nM $\pm 1,38$ nM).

C. cAMP-Signalweg nach Stimulation mit TIP39

Da am P2R, das neu gefundene Peptid TIP39 höchstwahrscheinlich als physiologischer Ligand agiert, wurde der cAMP-Signalweg der Hybrid-Rezeptoren, die sich in großen Bereichen vom P2R ableiten, auch hinsichtlich der Stimulation mit TIP39 untersucht.

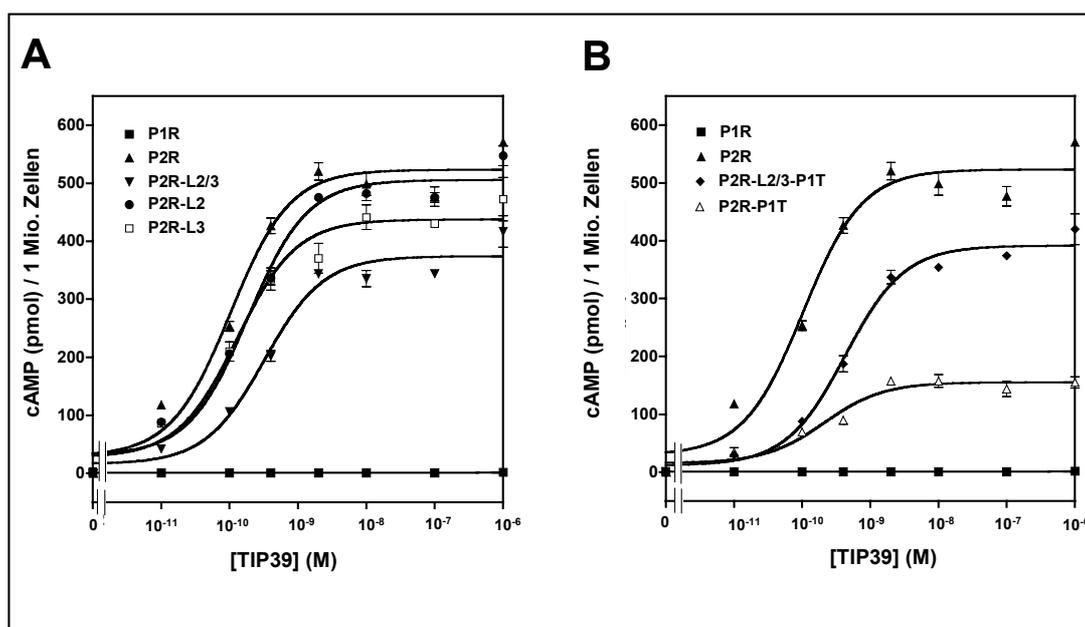


Abb. 4-23: cAMP-Produktion der Zellen (in pmol / 1 Mio Zellen) nach Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen Mengen an hTIP39. Das akkumulierte cAMP wurde mittels kommerziell erhältlichem RIA gemessen. Die Kurve ist repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente. Die Kurvenpunkte ergeben sich aus den Mittelwerten (\pm S.E.) einer Triplettestimmung.

A: Vergleich der Mutanten P2R-L2, P2R-L3 und der Kombination P2R-L2/3, sowohl mit dem humanen P1R als auch dem humanen P2R

B: Vergleich der mutierten Rezeptoren P2R-P1T und P2R-L2/3-P1T mit den WT-Rezeptoren (P1R und P2R))

In Abbildung 4-23 ist der Anstieg des akkumulierten cAMPs nach Stimulation mit unterschiedlichen TIP39-Konzentrationen dargestellt. Wie schon in anderen Arbeiten beschrieben [110] und in Abbildung 4-23 nochmals bestätigt, ist der P1R mit TIP39, bezüglich des cAMP-Signalwegs, nicht stimulierbar.

Bei der Stimulation des P2R mit TIP39, findet im Vergleich zur Stimulation mit hPTH (1-34), eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve nach links statt (EC_{50} : **P2R / PTH** = 0,56 nM \pm 0,29 nM; **P2R / TIP39** = 0,11 nM \pm 0,09 nM). Die maximale cAMP-Akkumulation ändert sich im Vergleich der beiden Peptide nicht merklich.

Wie auch nach Aktivierung der Hybrid-Rezeptoren durch hPTH (1-34) erkennbar, folgt die Mutante P2R-L2 in ihren Eigenschaften dem P2R. Dies zeigt sich im gleichen Wert der halbmaximalen Konzentration (EC_{50} : **P2R** = 0,11 nM \pm 0,09 nM; **P2R-L2** = 0,14 nM \pm 0,12 nM) ebenso, wie im maximal akkumulierten cAMP (beide 500 pmol / 1 Mio. Zellen).

Bemerkenswert ist, dass der Hybrid-Rezeptor P2R-L3 nach hPTH (1-34)-Gabe merklich schwerer zu aktivieren ist, als mit TIP39. Im Fall dieses Peptids, tritt kein Unterschied zum WT-Rezeptor auf. (EC_{50} : **P2R** = 0,11 nM \pm 0,09 nM; **P2R-L3** = 0,16 nM \pm 0,03 nM). Der Effekt des niedrigeren maximalen cAMP-Wertes, wird durch TIP39 wieder aufgehoben. Auch hier ist das maximale cAMP vergleichbar mit dem P2R (Abb. 4-24 und Tabelle 4-7).

Rezeptor	EC ₅₀ (nM)	max. cAMP im Vergleich zum P2R (%)
		TIP39
P2R	0,11 \pm 0,09	100
P2R-L2	0,14 \pm 0,12	91 \pm 16,4
P2R-L3	0,16 \pm 0,03	99 \pm 13,5
P2R-P1T	0,11 \pm 0,14	28 \pm 3,4 **
P2R-L2/3	0,22 \pm 0,14	77 \pm 4,0*
P2R-L1/3-P1T	0,30 \pm 0,17	83 \pm 3,3*

Tab. 4-7: Zusammenfassung der EC_{50} -Werte und Gegenüberstellung des maximal akkumulierten cAMPs (%) im Vergleich zum P2R nach Stimulation mit TIP39. Die EC_{50} -Werte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (\pm S.D.). Innerhalb dieser Werte zeigt sich kein signifikanter Unterschied zum WT-Rezeptor (P2R).

Die %-Werte in Bezug zum P2R wurden aus jeweils zwei verschiedenen cAMP-Assays berechnet (\pm S.D.). Die Rezeptoren P2R-P1T, P2R-L2/3 und P2R-L2/3-P1T zeigen gegenüber dem P2R eine signifikant erniedrigte cAMP-Akkumulation nach Stimulation mit 1000 nM TIP39 (*: $p < 0,005$; **: $p < 0,0001$)

Der Austausch des kompletten C-Terminus (P2R-P1T) zeigt bezüglich des cAMP-Wegs nach TIP39-Stimulation den gleichen Effekt wie nach PTH-Aktivierung. Der halbmaximale Effekt bleibt gegenüber dem WT-Rezeptor gleich (EC_{50} : **P2R** = 0,11 nM \pm 0,09 nM; **P2R-P1T** = 0,11 nM \pm 0,14 nM), aber die maximale cAMP-Akkumulation ist deutlich vermindert (Abb. 4-24 und Tabelle 4-7).

Interessanterweise wird die halbmaximale Konzentration durch Aktivierung des Rezeptors P2R-L2/3 mit TIP39 nicht signifikant verändert (EC_{50} : **P2R** = $0,11 \pm 0,09$; **P2R-L2/3** = $0,22 \pm 0,14$), wie dies durch PTH der Fall ist. Aber die niedrigere cAMP-Antwort nach TIP39-Gabe bleibt bestehen.

Auch die Kombination aller Mutationen zeigt keine signifikante Änderung des EC_{50} -Wertes (EC_{50} : **P2R** = $0,11 \pm 0,09$; **P2R-L2/3-P1T** = $0,30 \pm 0,17$). Ebenso bleibt die bessere Anbindung dieser Mutante an das G-Protein G_s nach TIP39-Stimulation, im Vergleich zum P2R-P1T, bestehen.

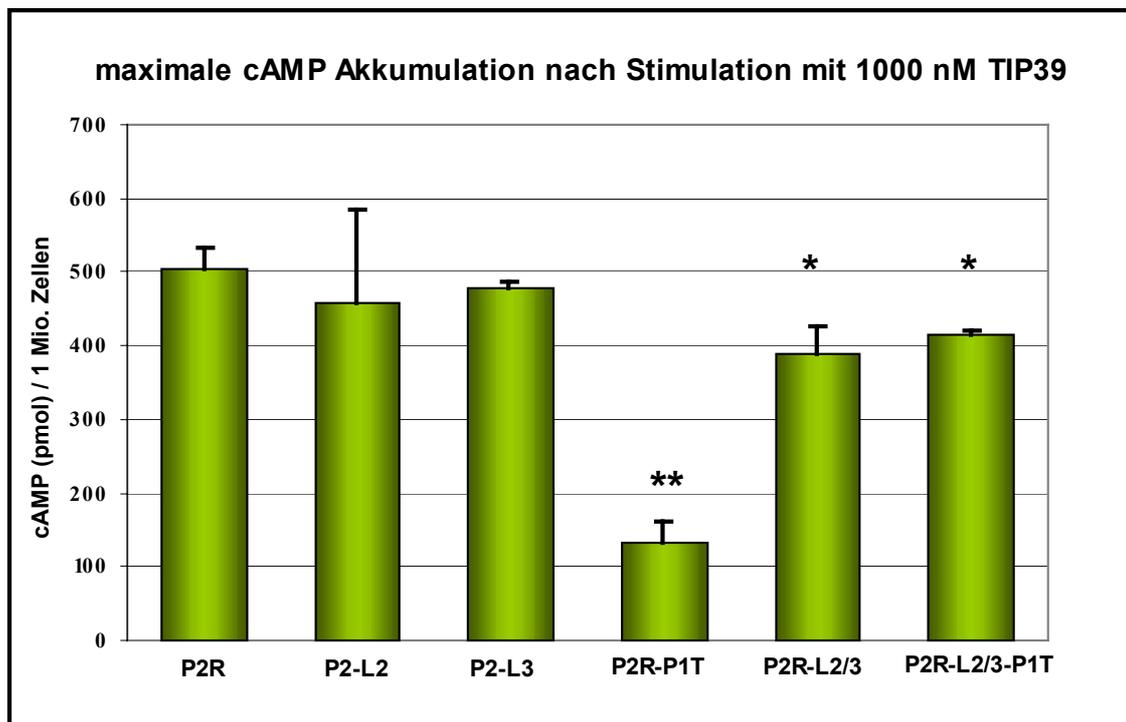


Abb. 4-24: **Maximale cAMP-Produktion der P2R-Hybride im Vergleich zum P2R.** Die Werte errechneten sich aus der Differenz des maximal produzierten cAMPs abzüglich der Basalproduktion der Zellen (\pm S.D.) und stammen aus zwei unabhängigen Versuchen, bei denen die Werte jeweils in Triplikaten bestimmt wurden. Alle Werte wurden auf 1 Mio. Zellen standardisiert. Die Rezeptoren P2R-L2 und P2R-L3 zeigen gegenüber dem WT-Rezeptor keine veränderte Signalantwort. Hingegen ist bei den Rezeptoren P2R-L2/3 und P2R-L2/3-P1T eine niedrigere maximale cAMP-Produktion (*: $p < 0,05$), im Vergleich zum P2R zu erkennen. Weiterhin kann man beim Rezeptor P2R-P1T, im Vergleich zum P2R, eine hoch signifikant erniedrigte maximale cAMP-Akkumulation beobachten (**: $p < 0,001$).

4.2.3.3 Messungen der intrazellulären Kalziumausschüttung der Hybrid-Mutanten

Um die Aktivierbarkeit des PLC-Signalweges (siehe 4.2.3.2-Abschnitt A) zu überprüfen und zu bestätigen wurde sowohl bei den WT-Rezeptoren, als auch den Hybrid-Rezeptoren der Anstieg des intrazellulären Kalziums gemessen. Die Methode wurde, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3AM beladen. Eine Verän-

derung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) kann so als relative Änderung der Fluo-3AM assoziierten Fluoreszenzaktivität gegenüber dem Hintergrund dargestellt werden.

Wie in Abbildung 4-25 gezeigt, konnte schon mit einer Konzentration, welche dem halbmaximalen Effekt der cAMP-Stimulation mit hPTH (1-34) gleicht, ein deutlicher Anstieg des intrazellulären Kalziums gemessen werden. Die Abnahme des Signals nach weiteren PTH-Gaben, trotz ansteigender PTH-Konzentrationen, spiegelt die Desensibilisierung des Rezeptors wieder. Eine Desensibilisierung des Rezeptors wird durch die Phosphorylierung des Rezeptors durch Proteinkinase und der Bindung von β -Arrestinen verursacht. Das bedeutet, dass sich der Rezeptor, auch nach einer erneuten, kurzfristigen Stimulation mit dem Liganden in einem inaktiven Zustand befand und somit keine Signaltransduktion gemessen werden konnte.

Die anschließende Stimulation mit Thrombin bewies, dass es sich auch nach mehrmaligem Stimulieren der Zellen und Waschen der Kammer um lebende Zellen handelte.

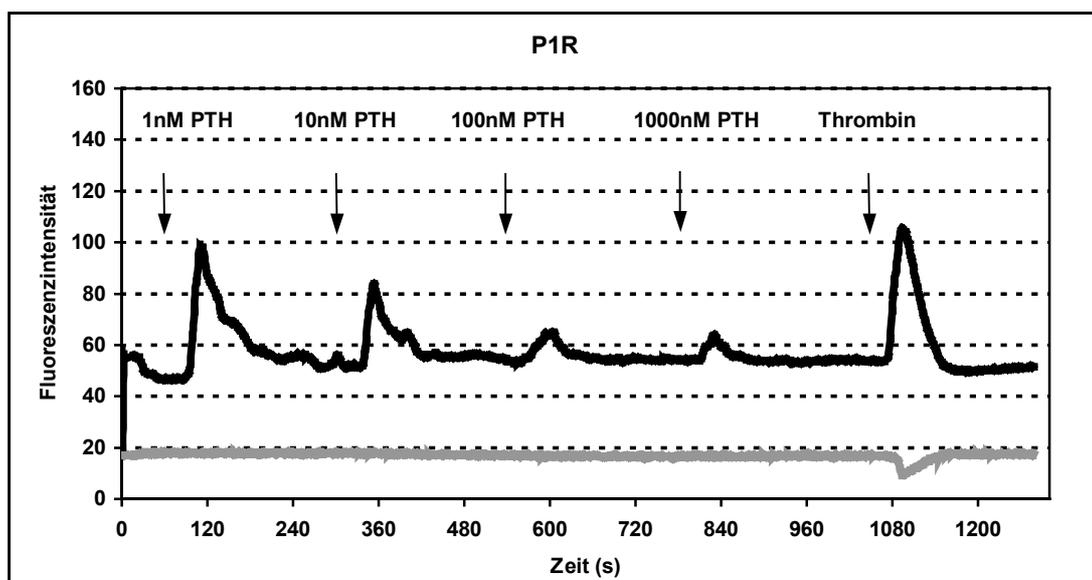


Abb. 4-25: **Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) in HEK 293 E+-Zellen welche stabil mit dem humanen PTH1-Rezeptor transfeziert wurden.** Die Messung wurde in einer Perfusionsmesskammer durchgeführt. Zunächst wurde für 1 min mit 1 nM PTH stimuliert. Nach zweiminütigem Waschen der Kammer mit Puffer C wurde mit 10 nM PTH, nach einer weiteren zweiminütigen Pause mit 100 nM PTH und anschließend mit 1000 nM PTH stimuliert. Als Kontrolle für das Überleben der Zellen wurde für 1min mit Thrombin (2 units / ml) stimuliert. Die *schwarze* Kurve stellt den Mittelwert aus der Fluoreszenzintensität von 20 markierten Zellen dar. Die Hintergrundintensität ist als *graue* Linie dargestellt. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten „aufgetragen.

Im Gegensatz zum P1R lässt sich beim P2R, auch nach extrem hohen PTH-Konzentrationen, keine intrazelluläre Kalziumausschüttung nachweisen (Abb. 4-26). Dies bekräftigt die Ergebnisse aus den Inositolphosphat-Experimenten, da eine Ausschüttung des intrazellulären Kalziums

ebenfalls Folge der Aktivierung der PLC ist. Da dieser Signalweg durch den P2R nicht aktiviert wird, kommt es auch nicht zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums.

Eine generelle Funktion der Zellen wurde durch Thrombin nachgewiesen, da hier ein messbarer Kalziumanstieg beobachtet werden konnte.

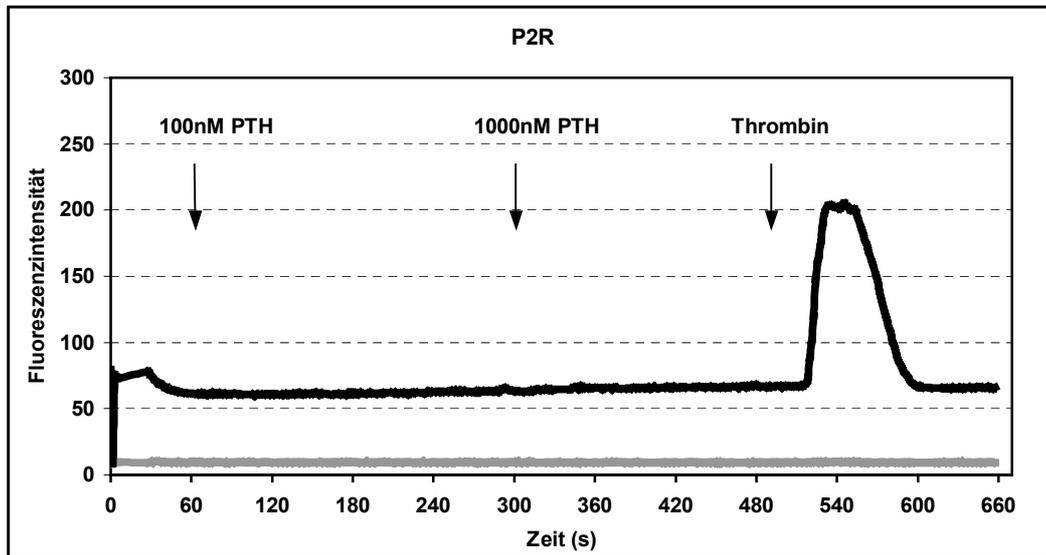


Abb. 4-26: **Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) in HEK 293 E+-Zellen, welche den PTH2-Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren.** Die Messung erfolgte in einer Perfusionmesskammer. Es wurde für 1 min mit 100 nM PTH stimuliert. Nach einer Pause von drei Minuten wurde im folgenden für eine Minute mit 1000 nM PTH stimuliert. Die Funktionalität der Zellen wurde durch Gabe von 2 units / ml Thrombin bestätigt. Die Kurve (*schwarz*) bezieht sich auf den Mittelwert von 20 unabhängig gemessenen Zellen. Durch die *graue* Linie wird die Intensität des Hintergrunds dargestellt. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

In den folgenden Abbildungen für die Hybrid-Mutanten (Abb. 4-27 bis Abb. 4-31) zeigt sich ein ebenfalls mit den Inositolphosphatmessungen übereinstimmendes Bild. Bei keiner der Mutanten konnte nach Stimulation mit hohen hPTH (1-34)-Konzentrationen ein meßbares Kalziumsignal erreicht werden.

Die Funktion der Zellen wurde in allen Experimenten durch eine Stimulation mit Thrombin nachgewiesen.

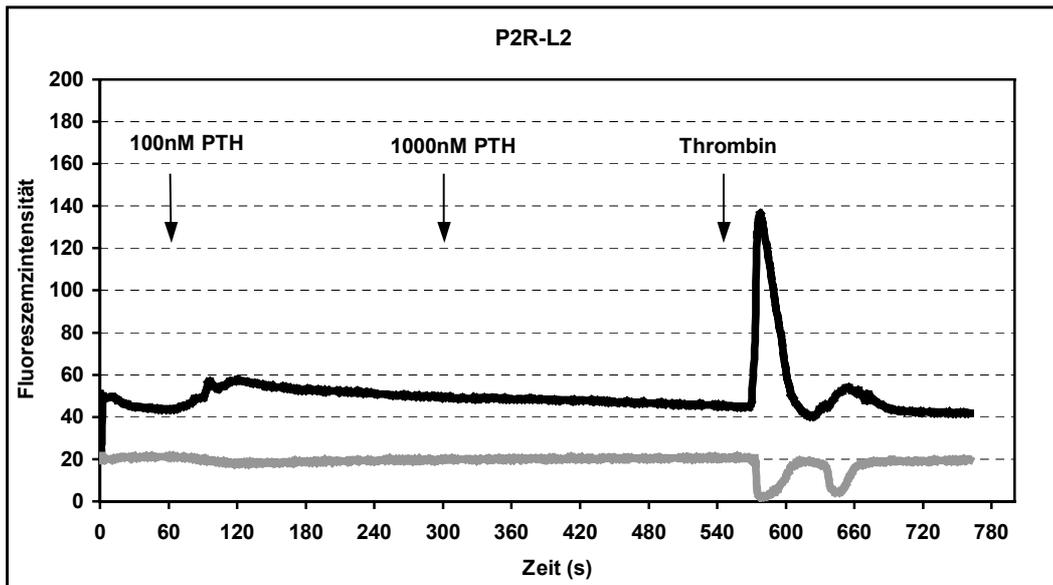


Abb. 4-27: Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) in HEK 293 E+-Zellen, welche den Hybrid-Rezeptor P2R-L2 auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Zellen wurden für 1 min mit 100 nM PTH in einer Perfusionsmesskammer stimuliert. Nach einer Pause von ca. 3 Minuten, in welcher die Kammer mit Puffer C gewaschen wurde, erfolgte eine weitere einminütige Stimulation mit 1000 nM PTH. Zur Kontrolle wurde eine abschließende Stimulation mit 2 units / ml Thrombin durchgeführt. Die dargestellte Kurve (*schwarz*) stellt den berechneten Mittelwert aus 20 unabhängig gemessenen Zellen dar. Die Fluoreszenz des Hintergrunds ist in *grau* dargestellt. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

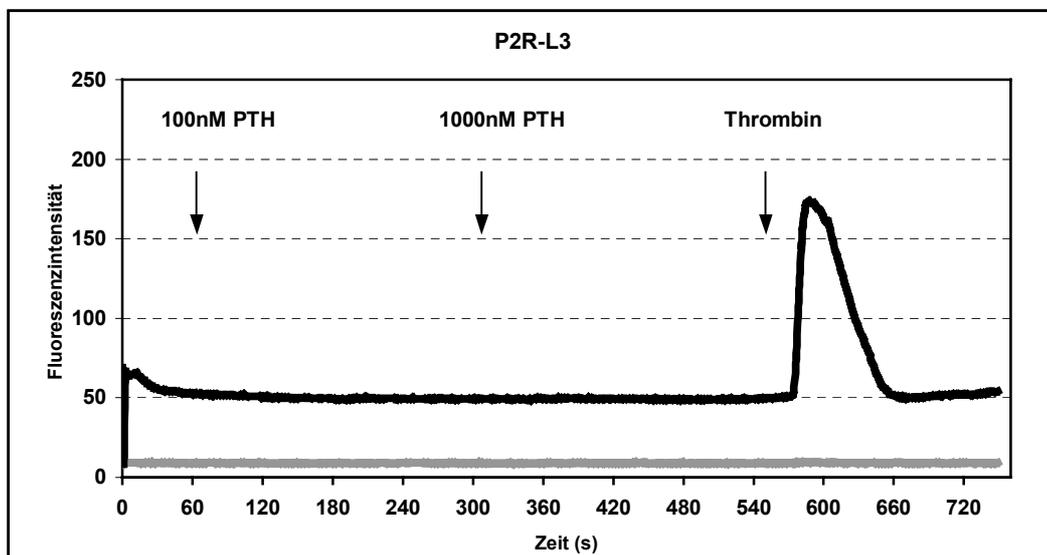


Abb. 4-28: Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) in HEK 293 E+-Zellen welche stabil mit dem Hybrid-Rezeptor P2R-L3 transfeziert wurden. Zunächst wurden die Zellen für 1 min mit 100 nM PTH in einer Perfusionsmesskammer stimuliert. Nach dreiminütigem Waschen der Kammer mit Puffer C wurde mit 1000 nM PTH stimuliert. Als Kontrolle für das Überleben der Zellen wurde für 1min Thrombin (2 units / ml) auf die Zellen gegeben. Die Kurve (*schwarz*) stellt den Mittelwert aus 20 gemessenen Zellen dar. Die Intensität des Hintergrunds ist in *grau* dargestellt. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

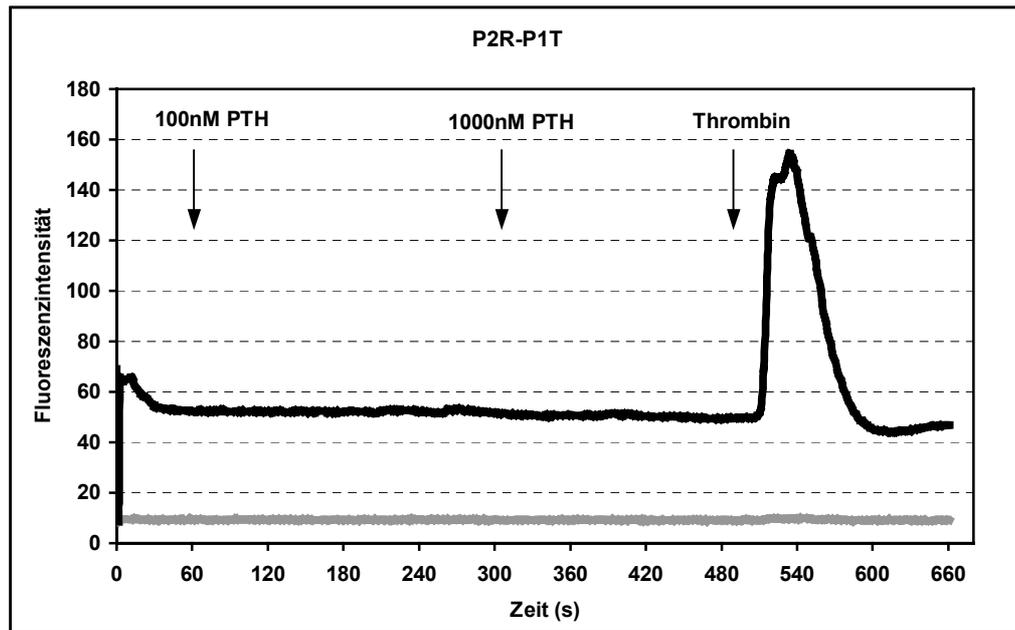


Abb. 4-29: Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) in HEK 293 E+-Zellen, welche den P2R-P1T auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Zellen wurden für 1 min in einer Perfusionsmesskammer mit 100 nM PTH stimuliert. Nach einer Pause von drei Minuten und Auswaschen der Kammer mit Puffer C, wurde im folgenden für eine Minute mit 1000 nM PTH stimuliert. Als Kontrolle für das Überleben der Zellen wurde für 1 min Thrombin (2 units / ml) auf die Zellen gegeben. Die schwarze Kurve ist der Mittelwert aus 20 unabhängig gemessenen Zellen. Die Bestimmung der Hintergrundintensität ist als graue Linie dargestellt. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

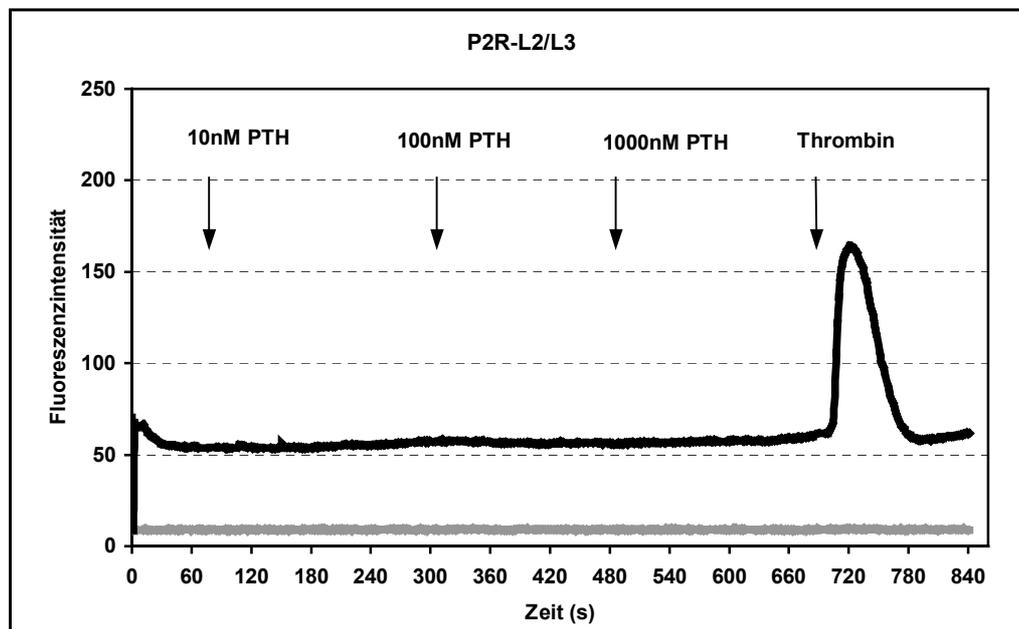


Abb. 4-30: Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) in HEK 293 E+-Zellen, welche stabil mit dem Hybrid-Rezeptor P2R-L2/3 transfeziert wurden. Es wurde in einer Perfusionsmesskammer für 1min mit 10 nM PTH stimuliert. Nach einer Pause von 3 min wurde im folgenden für 1 min mit 100 nM PTH stimuliert. Nach einem weiteren Auswaschen der Kammer für 2 min mit Puffer C, wurde zum Abschluß 1000 nM PTH auf die Zellen gegeben. Die Funktionalität der Zellen wurde durch eine abschließende Gabe von 2 units / ml Thrombin bestätigt. Diese Kurve (schwarz) stellt den Mittelwert von 20 gemessenen Zellen dar. Die Hintergrundintensität ist als graue Linie dargestellt. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

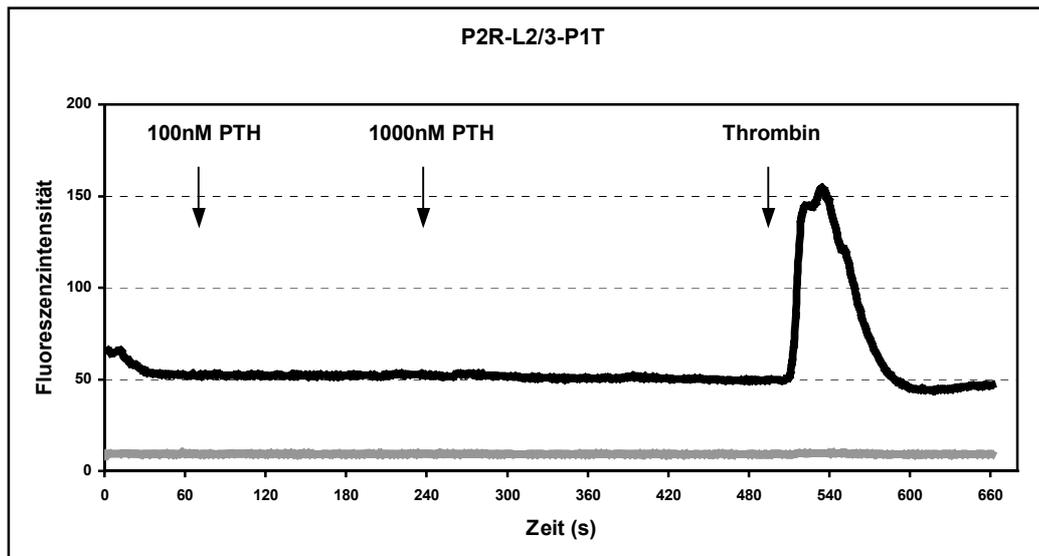


Abb. 4-31: Messung der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) in HEK 293 E+-Zellen, welche stabil mit dem Hybrid-Rezeptor P2R-L2/3-P1T transfeziert wurden. Die Zellen wurden für 1 min mit 100 nM PTH in einer Perfusionmesskammer stimuliert. Nach einer Pause von 2 min wurde im folgenden für 1 min mit 1000 nM PTH stimuliert, nach einem weiteren Auswaschen der Kammer für 3 min mit Puffer C, wurde eine abschließende Stimulation mit 2 units / ml Thrombin durchgeführt, um die Funktionalität der Zellen zu bestätigen. Diese Kurve (*schwarz*) stellt den Mittelwert von 20 gemessenen Zellen dar. Die Hintergrundintensität ist als *graue* Linie dargestellt. Auf der y-Achse sind als Skalierung „willkürliche Einheiten“ aufgetragen.

4.2.4 Translokation von β -Arrestin 2-GFP nach Stimulation mit hPTH (1-34) oder TIP39

Die Signaltransduktion und Regulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) erfordert die Interaktion dieser Rezeptoren mit mindestens drei Gruppen von Proteinen. Dies sind G-Proteine, G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und Arrestine [150]. Durch eine Aktivierung des Rezeptors wird dieser durch GRKs phosphoryliert und es erfolgt eine Rekrutierung von Arrestin aus dem Cytosol. Eine anschließende Rezeptorinternalisierung erfordert hierbei die Bindung von Arrestinen, wobei die Bindung dieser Arrestine, nicht die Rezeptorkonformation benötigt, welche für eine Ankopplung an G-Proteine (G_s und G_q) nötig ist [241]. Allerdings wird durch die Ankopplung von Arrestin an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) eine anschließende Entkopplung der G-Proteine erwirkt und somit eine Beendigung der Agonistenvermittelten Signalübertragung erreicht [84].

In folgender Abbildung (4-32) ist die Lokalisation von β -Arrestin 2-GFP dargestellt. Sowohl die mit den WT-Rezeptoren stabil transfezierten Zellen (P1R, P2R), als auch die stabil mit den mutierten Rezeptoren transfezierten Zellen, wurden mit hPTH(1-34) oder mit TIP39 stimuliert und die Lokalisation des GFP-gekoppelten β -Arrestin 2 mittels konfokaler Lasermikroskopie visualisiert.

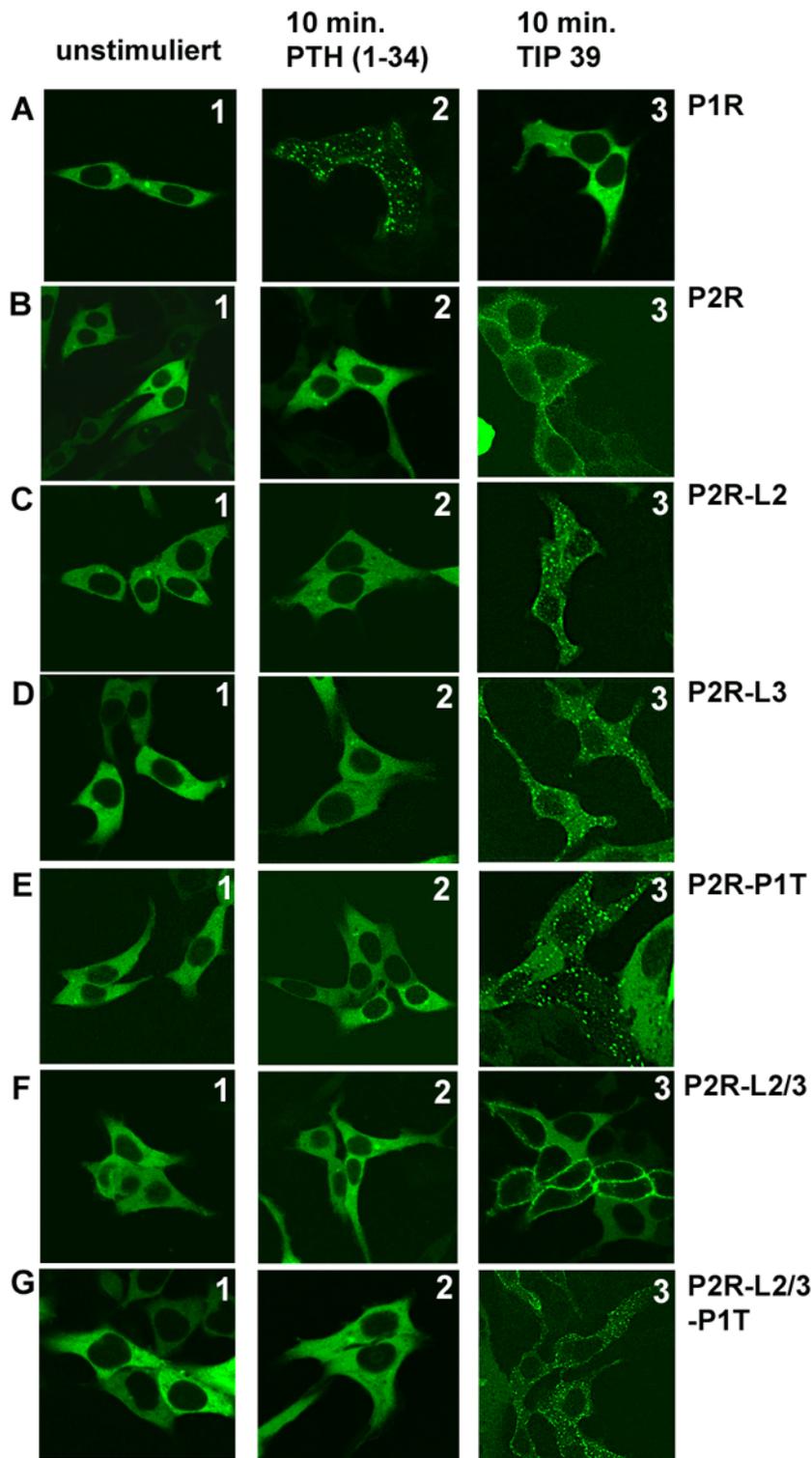


Abb. 4-32:

Lokalisation von β -Arrestin 2-GFP in HEK 293E+-Zellen, welche die WT-Rezeptoren oder die Hybrid-Rezeptoren exprimieren.

Die stabilen Zelllinien wurden transient mit β -Arrestin 2-GFP transfeziert. Nach einer Inkubation von 48 h wurde entweder für 10 min mit 1000 nM PTH (1-34) (jeweils Bild 2) oder mit 1000 nM TIP39 (jeweils Bild 3) stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht stimulierte Zellen (jeweils Bild 1). Nach der Stimulation wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min fixiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Ölimmersionsobjektives (40x) und einem konfokalen Laser-mikroskop. Die Wildtyp-Rezeptoren sind in Reihe A (P1R) und Reihe B (P2R) dargestellt. Die Hybridrezeptoren sind in den Bilderreihen C (P2R-L2), D (P2R-L3), E (P2R-P1T), F (P2R-L2/3) und G (P2R-L2/3-P1T) aufgezeigt.

Die Untersuchung der Hybrid-Rezeptoren im Hinblick auf die Signaltransduktion über die „second messenger“-Wege des cAMP und Inositolphosphat ergab Unterschiede, welche sich auf den Adenylatzyklaseweg beschränken. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von Arrestinen einen Einfluss auf den Internalisierungsprozeß von G-Protein gekoppelten Rezeptoren besitzt. Im Folgenden sollte nun überprüft werden, in wie weit eine strukturelle Angleichung des P2R an den P1R, die Ankopplung von β -Arrestin 2 beeinflusst und einen mög-

lichen Effekt auf die Internalisierung der untersuchten Rezeptoren hat. Da es sich hierbei um Hybridrezeptoren handelt, die im extrazellulären Bereich vollständig dem P2R entsprechen, wurde sowohl mit hPTH (1-34), als auch mit TIP39 als Ligand die Translokation von β -Arrestin 2 untersucht.

In der oben dargestellten Abbildung (Abb. 4-32) sind die Ergebnisse aufgezeigt, welche nach einer zehnmütigen Stimulation mit dem jeweiligen Liganden zu erkennen waren. Als Kontrolle wurden nicht stimulierte Zellen gegenübergestellt.

Wie zu erwarten war, folgte auf eine Stimulation des P1R mit hPTH (1-34) eine Rekrutierung von β -Arrestin 2 aus dem Cytosol. Nach zehn Minuten konnte in diesem Fall auch schon die Internalisierung des Rezeptors beobachtet werden (Bild A2). Nach Stimulation der P1R exprimierenden Zellen mit TIP39 war keine Translokation von β -Arrestin 2 zu erkennen (Bild A3), wie dies auch im Fall der Kontrolle zu sehen war (Bild A1).

Erstaunlicherweise ist für Zellen welche den P2R exprimieren nach Stimulation mit hPTH (1-34) keine Translokation von β -Arrestin 2 an die Zellmembran zu erkennen gewesen (Bild B2). Durch die Aktivierung des P2R durch den physiologischen Liganden TIP39, konnte hingegen deutlich eine β -Arrestin 2 Lokalisation an der Membran beobachtet werden (Bild B3). Allerdings zeigt ein Vergleich mit Bild A2, dass es in diesem Fall ein langsamerer Prozeß zu sein scheint, da hier nach zehn Minuten hauptsächlich eine Lokalisation an der Membran, aber nur in Anfängen internalisierte Vesikel im Cytosol zu sehen waren.

Im weiteren zeigten alle Zellen, welche die auf dem P2R basierenden Hybrid-Rezeptoren exprimieren ein ähnliches Bild, wie der P2R selbst. Eine Stimulation mit hPTH (1-34) zeigte bei keinem der Rezeptoren eine erkennbare Translokation von β -Arrestin 2 an die Membran (Bild C2-G2). Durch eine Aktivierung der verschiedenen Hybridrezeptoren durch TIP39, konnte bei allen untersuchten Zellen, mit Ausnahme der P2R-L2/3- Rezeptors ein extremer Internalisierungsprozeß beobachtet werden (Bild C3-E3, G3). Bei diesen Rezeptorhybriden scheint der Vorgang der β -Arrestin 2-Translokation schneller vonstatten zu gehen, als beim P2R selbst. Hingegen konnte man beim Rezeptorkonstrukt P2R-L2/3 (Bild F3) eine ähnlich verlangsamte β -Arrestin 2-Rekrutierung beobachten, wie dies auch beim PTH2-Rezeptor zu erkennen war.

4.2.5 Aktivierung von MAP-Kinasen nach Stimulation mit hPTH (1-34) und hTIP39

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind wichtige Regulatoren des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. Für G-Protein gekoppelte Rezeptoren wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von MAP-Kinasen über viele verschiedene Signalwege ablaufen kann. Daran beteiligt sein können Proteinkinase A, Proteinkinase C, aber auch eine „second messenger“-unabhängige Aktivierung ist möglich.

Für einen Teil der hier untersuchten Rezeptormutanten sollte nun die Aktivierung der MAP-Kinasen p42 und p44 (benannt nach dem Molekulargewicht von 42 kDa bzw. 44 kDa) untersucht werden. Diese Proteine werden auch als ERK1/2 (extracellular-signal related kinase 1 and 2) bezeichnet. ERK-Proteine werden durch die Phosphorylierung von spezifischen Tyrosinen und Threoninen innerhalb eines charakteristischen „Thr-Glu-Tyr“-Motivs aktiviert [40, 41]. Für eine vollständige enzymatische Aktivierung ist die Phosphorylierung an beiden Positionen unbedingt notwendig [179]. Als Antwort auf eine Aktivierung, werden durch pERK1/2 weitere „downstream“ liegende Komponenten an Serinen und Threoninen phosphoryliert. „Upstream“ liegende Komponenten von ERK1/2 beinhalten MAP-Kinasen-Kinasen (MEK), MEK-Kinasen und Raf-1 [179].

Wie durch den unten dargestellten Western Blot gezeigt wird (Abb. 4-33), kam es in den verschiedenen Zellen erst nach einer Stimulation mit 10 % FCS zu einer Phosphorylierung von ERK1/2. Zellen welche 24 h ohne Serum gehalten wurden und keiner Stimulation unterzogen wurden, zeigten keine nachweisbare Phosphorylierung von ERK1/2.

Nach einer fünfminütigen Stimulation mit hPTH (1-34) in P1R-transfuzierten Zellen war eine deutliche Zunahme von ERK1/2 im phosphoryliertem Zustand (= pERK1/2) zu erkennen. Die Menge an pERK1/2 nahm nach 15 min wieder ab, was sich in einer schwächeren Bande äußerte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch eine Stimulation von P1R exprimierenden Zellen mit hTIP39 keinerlei Aktivierung von ERK1/2 statt fand.

Im Gegenzug hierzu konnte bei Zellen, welche den P2R exprimieren, sowohl nach Stimulation mit hPTH (1-34), als auch nach Stimulation mit hTIP39 eine Phosphorylierung von ERK1/2 nach 5 min beobachtet werden. In diesem Fall wurde die Abnahme der aktivierten MAP-Kinasen nach 15 min noch deutlicher.

Für die untersuchten Rezeptorhybride ergab sich ein ähnliches Bild, wie für den P2R. Auch hier war bei den untersuchten Hybriden, sowohl nach Stimulation mit hPTH (1-34), als auch nach Stimulation mit hTIP39 eine Aktivierung von ERK1/2 messbar, welche nach 15 min einer deutlichen Reduktion unterlag. Die bei der Hybridmutante P2R-L2/3 deutlich schwächeren Banden ergaben sich aus einer geringeren Menge eingesetzten Protein. Dieses wird dadurch deutlich,

dass auch die Banden für die FCS-stimulierten Ansätze deutlich schwächer ausfielen, als dies bei den anderen untersuchten Zellextrakten der Fall war.

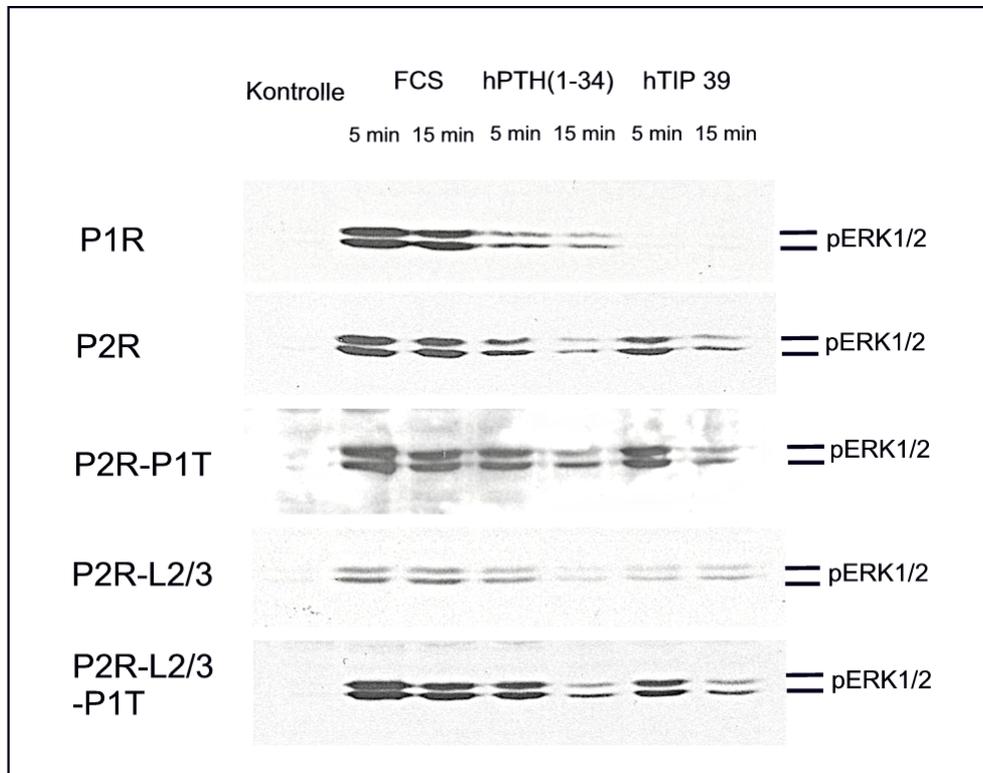


Abb. 4-33: Aktivierung von ERK 1/2 nach Stimulation mit hPTH (1-34) und hTIP39.

HEK 293 E⁺- Zellen, welche stabil die WT-Rezeptoren (P1R, P2R) oder die Hybrid-Rezeptoren (P2R-P1T, P2R-L2/3, P2R-L2/3-P1T) exprimieren, wurden für 5 min oder 15 min mit 100 nM hPTH (1-34) oder mit 100 nM hTIP39 stimuliert. Die Zellen wurden 24 h vor dem Versuch in serumfreiem Medium gezüchtet. Die Kontrolle beinhaltet unstimulierte Zellen und dient als negative Kontrolle. Als positive Kontrollreaktion wurden die Zellen mit 10 % FCS stimuliert. Nach Extraktion der Gesamtproteine, nach der Laemmli-Methode, erfolgte der Nachweis von pERK1/2 mittels Western Blot.

4.3 Identifikation intrazellulärer Interaktionspartner des humanen PTH1-Rezeptors

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Identifikation von neuen intrazellulären Interaktionspartnern des humanen PTH1-Rezeptors. Die Methode der Wahl bestand hier in der Anwendung eines „Yeast-two-Hybrid“-Systems (siehe 3.8.4). Mit dieser Methode kann eine cDNA-Bibliothek nach neuen Interaktionspartnern durchsucht werden. Als sogenannte „Köderplasmide“ wurden sowohl der 136 Aminosäuren lange C-Terminus des Rezeptors verwendet als auch die dritte intrazelluläre Schleife mit einer Länge von 27 Aminosäuren.

4.3.1 Die Herstellung der „Köderplasmide“

Der PTH1-Rezeptor besitzt, im Vergleich zu anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, einen sehr langen cytosolischen C-Terminus. Dieser könnte einen wesentlichen Anteil an der Interaktion mit anderen Proteinen spielen.

Die dritte intrazelluläre Schleife wurde deshalb als „Köderprotein“ gewählt, da sie im Gegensatz zu den anderen beiden intrazellulären Schleifen eine noch ausreichend lange Aminosäuresequenz besitzt, um in einem Hefe-Screen als „Köderprotein“ verwendet werden zu können.

Folgende „Köderplasmide“ wurden konstruiert:

1. Ein „Köderplasmid“, welches für den kompletten intrazellulär gelegenen C-Terminus des PTH1-Rezeptors, einschließlich des „YCFXN“-Motivs der siebten Transmembrandomäne kodiert. Der klonierte Aminosäuresequenzabschnitt beginnt mit Aminosäure Y⁴⁵⁸ und endet mit Aminosäure M⁵⁹³. Im Folgenden wird für dieses Konstrukt die Bezeichnung „**CTERM**“ verwendet.
2. Ein weiteres „Köderplasmid“ wurde durch Klonierung des Sequenzabschnitts der dritten intrazellulären Schleife des PTH1-Rezeptors konstruiert. Dieser Sequenzabschnitt beginnt mit Aminosäure R³⁸³ und endet mit Aminosäure S⁴⁰⁹. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird dieses Konstrukt mit „**IZL-3**“ bezeichnet.

Diese Abschnitte des PTH1-Rezeptors wurden mittels PCR (siehe 3.2.14) gewonnen. Als Vorlage für diese PCR diente die cDNA des humanen PTH1-Rezeptors, welche in früheren Experimenten in den pCEP4 Expressionsvektor kloniert wurde. Die Amplifizierung erfolgte für den „CTERM“-Abschnitt mit dem Primerpaar Nr. 13 und Nr. 14. Für den „IZL-3“-Abschnitt wurden die Primer Nr. 11 und Nr. 12 verwendet (siehe 2.9.1). Anschließend wurde die DNA in den Vek-

tor pCRII-TOPO kloniert. Aus diesem konnten die beiden Fragmente mittels Restriktionsverdau, mit Hilfe der Enzyme BamHI und NotI, herausgeschnitten werden. Diese Restriktionsschnittstellen wurden während der PCR über die Primer in die Sequenz eingefügt. Im Anschluss wurden die beiden Fragmente in den für den „Yeast-two-Hybrid“-Screen benötigten Vektor pGBKT7 subkloniert.

Die Korrektheit der Sequenzen wurde durch Sequenzierung bestätigt.

4.3.2 Screenen einer humanen Nierenbibliothek

Der PTH1-Rezeptor wird neben dem Knochen auch in der Niere, einem weiteren wichtigen Zielorgan expremiert. Deswegen wurde für die Suche nach neuen Interaktionspartnern eine pretransformierte cDNA-Bibliothek verwendet, welche aus Nierengewebe gewonnen wurde. Diese cDNA-Bibliothek ist kommerziell erhältlich und wurde von der Firma Clontech bezogen. Die cDNAs aus der kommerziell erworbenen Bibliothek sind in den Vektor pACT2 kloniert. Die Screening-Prozedur wurde, wie in Kapitel 3.8.4 beschrieben, durchgeführt.

Aus dem Ansatz von diploiden Hefezellen, die jeweils ein „Köderplasmid“ und ein Plasmid mit einer cDNA aus der Bibliothek trugen, wurden 25 hoch stringente und 25 schwach stringente Platten ausgestrichen (siehe 3.8.1.2). Nach acht Tagen wurden die gewachsenen Kolonien, sowohl von den hoch stringenten (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp), als auch von den schwach stringenten (SD/-His/-Leu/-Trp) Platten nochmals auf hoch stringente Platten, welche mit X- α -Gal behandelt wurden (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/ X- α -Gal), umgesetzt.

4.3.3 Identifizierung verschiedener intrazellulärer Interaktionspartner des PTH1-Rezeptors

4.3.3.1 Ergebnisse aus dem Screen mit der dritten intrazellulären Schleife (IZL-3) als Köder

Von den schwach stringenten Platten konnten nach acht Tagen insgesamt 288 Kolonien auf SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/ X- α -Gal-Platten umgesetzt werden. Von den hoch stringenten Platten wurden insgesamt 191 Kolonien umgesetzt. Nach weiteren acht Tagen wurden 51 Kolonien von den ursprünglich hoch stringenten Platten und 33 Kolonien von den ursprünglich schwach stringenten Platten vereinzelt und die Plasmide daraus gewonnen. Letztendlich wurden 40 Plasmide vom 5' Ende her ansequenziert und analysiert.

Mittels der NCBI-Datenbank BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) wurden die gefundenen Sequenzen identifiziert.

Eine Auswahl der sequenzierten und identifizierten Plasmide ist in Tabelle 4-8 zusammengefasst. Bei allen aufgeführten und identifizierten Klonen handelt es sich um humane Proteine. Die Identität der sequenzierten Abschnitte stimmte in allen Fällen zu 100 % mit der in der Datenbank gefundenen Sequenz überein.

Klon	Protein	Genbank-Zugriffsnummer-Nukleotid	Genbank-Zugriffsnummer-Protein	Häufigkeit n = 40
I-17, I-21, I-73, II-37	actin-binding protein (ABP-278) = Filamin B	NM_001457	NP_001448	4 x
I-5, I-58, I-76	Niemann-Pick disease, Typ C2 (NPC2)	NM_006432	NP_006423	3 x
I-3, I-40, I-73,	Na ⁺ / K ⁺ -ATPase, beta1 polypeptid (ATP1B1)	NM_001677	NP_001668	3 x
I-6	Metallothionein 2A	BC007034		1 x
I-70	Endothelin Rezeptor (EDNRB)	NM_000115	NP_000106	1 x
II-3	Phosphoglucomutase 1 (PGM1)	NM_002633	NP_002624	1 x
II-10	Na ⁺ / K ⁺ -ATPase, beta3 polypeptid (ATP1B3)	NM_001679	NP_001670	1 x
II-15	Laminin, beta 2 (LAMB2)	NM_002292	NP_116126	1 x

Tab. 4-8: **Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem „Yeast-two-Hybrid-Screen“ mit dem IZL-3 als „Köderplasmid“.** Die Bezeichnung der Klone wurde willkürlich gewählt und ergibt sich aus dem Schema, welches für die Kennzeichnung der einzelnen Kolonien auf den Selektionsplatten aufgebracht wurde. Die Genbank-Zugriffsnummern erlauben einen schnellen Zugriff auf die in der NCBI-Datenbank gespeicherten Informationen, sowohl zum Protein, als auch zum Nukleotid.

In der Spalte „Häufigkeit“ ist angegeben, wie oft dieses Protein unter den 40 identifizierten Proteinen vorkam. Alle Proteine sind Proteine der Spezies *Homo sapiens* und weisen mit den in der Datenbank gefundenen Sequenzen eine Identität von 100 % auf.

Bei vier der gefundenen Klone handelt es sich um Teile des humanen, mitochondrialen Genoms. Diese Klone können als „falsch positiv“ ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurden einige „ORFs“ (offene Leseraster) gefunden, die für kein in der Datenbank bekanntes Protein kodieren.

Die Bibliotheksplasmide I-17, I-21, I-73 und II-37 enthalten Teile der cDNA von Filamin B. Filamine sind u.a. für die räumliche Vernetzung von Actin-Filamenten in der Zelle verantwortlich. Für Filamin B ist die Interaktion mit dem cytoplasmatischen Teil des Glycoproteins Ib alpha beschrieben [220]. In Endothelzellen spielt Filamin B wahrscheinlich für die Funktion von Glycoproteins Ib alpha eine Rolle.

Die analysierten Plasmide I-5, I-58 und I-76 kodieren für ein Protein, welches bei der Niemann-Pick-Krankheit Typ C von Bedeutung ist. Hierbei handelt es sich um eine vererbte Stoffwechselstörung, welche durch einen Defekt im Gen, welches für das Protein NPC2 kodiert, ausgelöst wird. Das Protein NPC2 besitzt eine Lipid-Erkennungsstelle und ist in die Regulation des Transports von Cholesterol innerhalb des späten endosomalen / lysosomalen Systems involviert. Bei der Niemann-Pick-Krankheit ist der Transport von Cholesterin durch die Zelle gestört [66].

Bei den gefundenen Bibliotheksplasmiden I-3, I-40 und I-73 handelt es sich um eine Polypeptidkette, die einen Teil der Na^+ / K^+ -ATPase- β -Untereinheit darstellt. Der Klon II-10 kodiert ebenfalls für einen Teil der Na^+ / K^+ -ATPase- β -Untereinheit. Die Na^+ / K^+ -ATPase ist eine Protonenpumpe, welche unter Verbrauch von ATP Kalium aus der Zelle und Natrium in die Zelle schleust. Diese Protonenpumpe spielt auch in der Niere eine wichtige Rolle, wo Glukose durch den Natrium-Glukose-Transporter reabsorbiert wird. Der dazu benötigte Na^+ / K^+ -Gradient wird durch die Na^+ / K^+ -ATPase aufrecht erhalten.

Die analysierte cDNA des Klons I-6 kodiert für ein Metallothionein. Metallothioneine (MTs) sind niedrig molekulare Proteine mit extrem hohem Schwermetall und Schwefelgehalt. Sie spielen in der Fixierung und der Regulation der Konzentrationen von Zink und Kupfer in der Zelle eine Rolle. Außerdem dienen Metallothioneine der Neutralisation von toxischen Elementen, wie Kadmium und Quecksilber. Dieses Protein wurde als „falsch positiv“ bewertet.

Bei einem weiteren analysierten Plasmid handelt es sich um die cDNA des Endothelin B-Rezeptors (I-70). Der Endothelin B-Rezeptors (EDNRB) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor der Klasse I. Durch Aktivierung des Rezeptors durch den Liganden Endothelin, wird der Inositolphosphat / Calcium-Signalweg und der cAMP-Siganlweg aktiviert [54]. Bekannt ist, dass ein Gendefekt des Rezeptors ein zentraler Auslöser der Hirschsprung-Krankheit ist [190, 223]. Dieser Rezeptor kann trotz alledem als „falsch positiv“ ausgeschlossen werden, da im Screening-Experiment nur ein 1,1 kb langer Teilabschnitt des Rezeptors als Interaktor gefunden wurde. Dieser Abschnitt kodiert für den größten Teil des extrazellulär liegenden N-Terminus des Endothelin-Rezeptors, so dass ein Interaktion mit intrazellulären Abschnitten des PTH1-Rezeptors nicht möglich ist.

Die durch den Klon II-3 identifizierte Phosphoglucomutase (PGM1) ist ein Enzym, welches sowohl beim Galaktose-Metabolismus, als auch beim Glykogen-Abbau den Umbau von Gluko-

se-1-Phosphat in Glukose-6-Phosphat, katalysiert. PGM1 wurde 1992 erstmals isoliert und charakterisiert [252].

Als letzter gefundener Interaktionspartner mit der dritten intrazellulären Schleife konnte das Protein Laminin beta 2 (LAMB2) identifiziert werden, welches zu der großen Gruppe der Laminine zählt. Laminine besitzen eine wichtige Funktion bei der Bildung und Stabilisierung der Basallamina der Plasmamembran. Allerdings handelt es sich bei LAMB2 um ein nukleäres Lamin, welches sowohl mit anderen Laminen, als auch mit Chromatin interagieren kann [86]. Da es sich um ein Kernprotein handelt, kann dieser Fund als „falsch positiv“ bewertet werden.

4.3.3.2 Ergebnisse aus dem Screen mit dem C-Terminus (CTERM) als „Köder“

Von den schwach stringenten Platten konnten nach acht Tagen insgesamt 765 Kolonien auf SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/ X- α -Gal-Platten umgesetzt werden. Von den hoch stringenten Platten wurden insgesamt 66 Kolonien umgesetzt. Diese 66 Kolonien sind auch nach weiteren acht Tagen auf SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/ X- α -Gal-Platten gewachsen und zeigten eine starke Blaufärbung. Von den ursprünglich schwach stringenten Platten sind nur 33 Kolonien gewachsen und wiesen eine Blaufärbung auf. Aus den letztendlich übrig gebliebenen Kolonien wurden die Plasmide isoliert, anschließend davon 50 Plasmide ausgewählt, sequenziert und analysiert.

In Tabelle 4-9 sind die gefundenen „Beuteproteine“, welche mit dem „CTERM“ als Köder gefunden wurden aufgelistet. Die Identifikation der sequenzierten Plasmide erfolgte mittels Durchsuchen der Datenbank des NCBI.

Ebenso, wie bei der Verwendung des „IZL-3“ als Köder, wurden mit dem „CTERM-Köderplasmid“ zwei Klone identifiziert, bei denen es sich um Teile des humanen, mitochondrialen Genoms handelt. Diese Klone können als „falsch Positive“ ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wurden auch hier einige „ORFs“ (offene Leseraster) gefunden, die für kein in der Datenbank bekanntes Protein kodieren.

Ein Klon konnte als ribosomales Protein identifiziert werden und ist somit „falsch positiv“. Drei der sequenzierten Klone lieferten keine brauchbare und auswertbare Sequenz.

Klon	Protein	Genbank-Zugriffsnummer-Nukleotid	Genbank-Zugriffsnummer-Protein	Häufigkeit n = 50
A17, A31	Metallothionein	BC007034		2 x
A13, J10	Zink-Finger-Protein 106 (ZFP106)	XM_031736	NP_071918	2 x
B6, K5	tripatite motif-containing 2 (TRIM2)	NM_015271	NP_056086	2 x
A23, C12	Na ⁺ / K ⁺ -ATPase, beta 1 polypeptid (ATP1B1)	NM_001677	NP_001668	2 x
A 32, B15	Heat shock Protein 40 kDa Protein 1 (HSPF1)	NM_006145	NP_006136	2 x
A21	Humanes capping Protein alpha	U03851	AAC_00534	1 x
A5	Glykosamin (N-acetyl)-6-Sulfatase	NM_002076	NP_002067	1 x
A6	Ferrochelatase	NM_000140	NP_000131	1 x
A8	Serin-Protease 11 (IGF bindend) (PRSS11)	NM_002775	NP_002766	1 x
A7	Calcium-sensing Rezeptor (CaSR)	S83176	AAB46873	1 x
A43	cold inducible RNA-Bindungsprotein (CIRBP)	NM_001280	NP_061271	1 x
B8	adipose differentiation-related Protein (ADFP), Adipophilin	XM_048266	NP_001113	1 x
J16	Cubilin (intrinsischer Faktor-Cobalamin Rezeptor) (CUBN)	NM_001081	NP_001072	1 x
J17	membranspezifische Serinprotease 1 (MT-SP1)	AF133086	AAF00109	1 x
J18	Crystallin, alpha B (CRYAB)	NM_001885	NP_001876	1 x
A 28	PDZ domain containing 1 (PDZK1)	NM_002614	NP_002605	1 x
B17	complement component 7 (C7)	NM_000587	NP_000578	1 x
C2	RAB1 (Mitglied der RAS Oncogen-Familie)	XM_046674	NP_004152	1 x
K 19	Matrix Gla Protein (MGP)	M5270	NP_000891	1 x

Tab. 4-9: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem „Yeast-two-Hybrid-Screen“ mit CTERM als „Köderplasmid“. Die Bezeichnung der Klone ist willkürlich gewählt und ergibt sich aus dem Schema, welches für die Kennzeichnung der einzelnen Kolonien auf den Platten angebracht wurde. Die Genbank-Zugriffsnummern erlauben einen schnellen Zugriff auf die in der NCBI-Datenbank gespeicherten Informationen, sowohl zum Protein, als auch zum Nukleotid.

In der Spalte „Häufigkeit“ ist angegeben, wie oft dieses Protein unter den 50 identifizierten Proteinen vorkam. Alle Proteine sind Proteine der Spezies *Homo sapiens*. Die sequenzierten Abschnitte weisen mit den in der Datenbank gefundenen Sequenzen eine Identität von 100 % auf.

Das zweimal gefundenen Metallothionein-Protein (Klon A17, A31) kann ebenso, wie unter Kapitel 4.3.3.1 beschrieben, als „falsch positiv“ ausgeschlossen werden.

Das Zink-Finger-Protein 106 (ZFP106), welches durch die Klone A13 und J10 identifiziert wurde, besitzt drei Zinkfinger motive. Bei der Maus wurde der H3a-Lokus als Homolog zum humanen zfp106-Gen charakterisiert [260]. Da Zinkfinger motive bei der Bindung von Proteinen an DNA eine Rolle spielen, sind diese Plasmide als typisch „falsch positiv“ zu bewerten.

Die Klone B6 und K5 kodieren für ein Protein, welches zur sogenannten TRIM-Familie zählt. Aus der Familie der „tripartite motif“-Proteine (TRIM) sind zum jetzigen Zeitpunkt 37 Mitglieder identifiziert [194]. Die Proteine dieser Familien enthalten drei Zink-bindende Domänen, jeweils eine **B-Box** vom Typ 1 und 2, sowie eine **RING-Finger-Domäne** und ein „Coiled-Coil“-Motiv, welche zusammen genommen auch als **BRCC-Motiv** bezeichnet werden. Das gefundene Protein TRIM2 ist an cytoplasmatischen Filamenten lokalisiert. Seine Funktion ist nicht bekannt.

Die durch die Klone A23 und C12 identifizierten „heat-shock“-Proteine, mit einem Molekulargewicht von 40 kDa (HSPF1), sind als typisch „falsch Positive“ bekannt.

„Capping“-Proteine (CP) sind Actin-bindende Proteine und bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit. Das Plasmid A21 kodiert für die α -Untereinheit. Capping-Proteine sind wichtig für den Zusammenbau der Actinfilamente und für die Zellmobilität [103].

N-Acetylglukosamin-6-Sulfatase, ist ein Enzym, welches durch Klon A5 identifiziert wurde. Dieses Enzym kommt in der Leber vor, wo es als physiologisches Substrat Heparin, einen gerinnungshemmenden Stoff, umsetzt [64]. Der PTH1-Rezeptor wird ebenfalls in der Leber exprimiert [230]. Ein weiteres Substrat der N-Acetylglukosamin-6-Sulfatase ist Keratansulfat, welches sich in Knorpel und Cornea findet.

Das durch Klon A6 identifizierte Enzym Ferrochelatase [167] findet sich in den Mitochondrien, wo es in der Häm-Synthese die Insertion von Eisen (Fe^{3+}) in Protoporphyrin IX katalysiert. Als mitochondriales Enzym kann Ferrochelatase als „falsch positiv“ bewertet werden.

Klon A8 kodiert für eine IGF-bindende Serinprotease [261], welche zur Trypsin-Familie der Serinproteasen gezählt wird. Es handelt sich hierbei um ein sekretiertes Enzym, welches die Eigenschaft besitzt IGF's (insulin-like growth factors) die Möglichkeit zu verleihen IGF-bindende Proteine zu spalten.

Der Calcium-sensing Rezeptor (CaSR) wurde mit Klon A7 als Interaktionspartner des „CTERM“ identifiziert. Dieser Rezeptor gehört zur Klasse III der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Nach Stimulation durch extrazelluläres Ca^{2+} kommt es zur Aktivierung des Inositolphosphat-Wegs und als Folge zu einer Inhibierung der PTH-Sekretion [65]. Auch hier kann, wie schon für den Endothelin-Rezeptor beschrieben, die gefundene Interaktion als „falsch positiv“ bewertet werden. Bei dem identifizierten, interagierenden Abschnitt im „Yeast-two-Hybrid-Screen“ konnte eine 1,7 kb große Teilsequenz bestimmt werden, welche für einen extrazellulären N-terminalen Teilbereich des Calcium-sensing Rezeptors kodiert. Eine wahre Interaktion mit dem dem intrazellulär liegenden C-Terminus des PTH1-Rezeptors ist somit ausgeschlossen.

Die Sequenz des Klons A43 kodiert für ein kälteinduzierbares RNA-bindendes Protein (CIRP). Mikroorganismen und Säugetierzellen reagieren auf einen Kältestress mit der Synthese von bestimmten Proteinen, welche in verschiedenen Zellprozessen, wie z.B. der Transkription, Translation und der Rekombination eine Rolle spielen. Ein solches Protein ist CIRP, welches in der kälteinduzierten Suppression der Zellproliferation involviert ist [170]. In Mäusezellen wurde CIRP als nukleoplasmatisches Protein identifiziert [171] und kann deswegen als „falsch positiv“ ausgeschlossen werden.

Adipophilin (Klon B8) ist auf der Oberfläche von Fetttropfchen lokalisiert. Das Ansteigen des Adipophilin-mRNA-Spiegels ist ein früher Indikator für die Adipocytendifferenzierung [104].

Klon J16 kodiert für das Protein Cubilin (CUBN). Cubilin ist ein Multiligandenzephor mit 27 CUB-Domänen, welcher zum einen für die intestinale Absorption des intrinsischen Faktors Cobalamin im Darm sorgt und zum anderen für die Vermittlung einer selektiven Proteinreabsorption im renalen Tubus verantwortlich ist [11].

Die durch Klon J17 identifizierte membranständige Serinprotease (MT-SP1) wurde im Zusammenhang mit fünf weiteren Proteasen identifiziert, welche aus Prostatakarzinomgewebe isoliert wurden. MT-SP1 besitzt eine Transmembrandomäne, zwei CUB-Domänen, vier LDLR-„repeats“ und eine Serinprotease-Domäne. Dieser Protease wird eine mögliche Rolle in der Differenzierung von Prostatagewebe und beim Wachstum von Prostatakarzinomen zugeschrieben [222].

Crystalline, wie durch Klon J18 identifiziert, sind eine große Familie aus sehr stabilen Proteinen, die hauptsächlich in der Vertebratenlinse vorkommen. Hier sorgen sie für die Transparenz und

den Brechungsindex der Linse [45]. Crystalline wurden aber auch in Niere, Herz und Skelettmuskel gefunden [126].

Die Komplementkomponente C7 (Klon B17) ist ein Teil des Komplementsystems, welches aus einer Gruppe von Serumproteinen besteht [83]. Diese Proteine sind an der Kontrolle von Entzündungen, der Aktivierung von Phagozyten und der lytischen Zerstörung von Zellmembranen beteiligt. Das Komplementsystem wird durch die Interaktion mit dem Immunsystem aktiviert. Da es sich um Serumproteine handelt kann eine physiologisch sinnvolle Interaktion mit dem intrazellulären Teil des PTH1R ausgeschlossen werden.

Klon C2 identifiziert das Protein RAB1, welches ein Mitglied der RAS-Onkogenfamilie ist. RAB1, sowie andere Mitglieder dieser Familie, besitzen GTPase-Aktivität und sind sowohl in sekretorische und biosynthetische Signalwege, als auch in der Endozytose involviert [258]. Für jedes RAB-Protein ist eine charakteristische Verteilung an bestimmten Zellmembranen vorhanden und jedes Organell besitzt mindestens ein RAB-Protein auf seiner cytosolischen Oberfläche. RAB1 findet man sowohl auf dem Endoplasmatischen Retikulum, als auch auf der Membranoberfläche des Golgi-Apparats.

Matrix-Gla-Protein (MGP), welches durch Klon K19 identifiziert wurde, ist ein Vitamin K-abhängiges Protein, welches erstmals aus bovinem Knochen isoliert wurde. MGP wird auch in hohem Maße in Herz, Lunge und Niere exprimiert. In Knochenzellen kommt es durch Vitamin D zu einer Hochregulierung von MGP [26].

Das durch den Klon A28 kodierte Protein, ist als PDZ-Protein identifiziert worden. In einer kürzlich veröffentlichten Publikation [152] wurde NHERF2, welches ebenfalls zur Klasse der PDZ-Proteine gehört, als Interaktionspartner mit dem C-Terminus des PTH1-Rezeptors beschrieben. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des PTH1-Rezeptors. PDZ-Proteine gewinnen für den Ablauf von Zellfunktionen in zunehmendem Maße an Bedeutung. Deswegen wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit das PDZK1-Protein näher untersucht und charakterisiert.

4.3.4 Charakterisierung des PDZ-Proteins PDZK1

PDZ-Proteine sind Proteine mit sogenannten PDZ-Domänen, welche aus 80 - 100 Aminosäuren bestehen. Das durch den Hefescreen identifizierte PDZ-Protein PDZK1 besitzt eine Länge von 519 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 63 kDa. Durch eine Motiv-Suche innerhalb der Pfam-Datenbank (<http://www.sanger.ac.uk/Pfam/search.shtml>) konnten vier PDZ-Domänen innerhalb dieses Proteins identifiziert werden. PDZK1 ist bis jetzt bekannt bei *Homo sapiens* (NP_002605) [134], *Mus musculus* (NP_067492) [246], *Rattus norvegicus* (NP_113900) [42] und *Oryctolagus cuniculus* (AAO34667).

In Abbildung 4-34 ist ein Proteinsequenzvergleich der bekannten PDZK1-Proteine der verschiedenen Spezies aufgezeigt. Das bei der Maus (*Mus musculus*) bekannte PDZK1-Homolog mit der Bezeichnung Diphor-1, besitzt ebenso wie das humane Protein eine Länge von 519 Aminosäuren. Das Protein des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*) ist mit 518 Aminosäuren nur um eine Aminosäure verkürzt. Hingegen zeigt das PDZK1-Protein der Ratte (*Rattus norvegicus*) eine Länge von 523 Aminosäuren. Die in dieser Abbildung gezeigten PDZ-Domänen wurden mittels einer Pfam-Datenbankanalyse ermittelt.

Vergleicht man die Identität der Aminosäuren der einzelnen Spezies miteinander, so findet man beim PDZK1-Protein des Menschen eine Homologie von 84 % im Vergleich zur Proteinsequenz des Kaninchens. Die PDZK1-Proteine von Maus und Ratte weisen mit 78 % bzw. 77 % eine geringere Identität mit dem humanen Protein auf.

Die PDZ-Domänen sind im Falle des PDZK1 80 - 82 Aminosäuren lang. Innerhalb dieser Domänen finden sich im Vergleich der vier bekannten Spezies die größten Homologien mit bis zu 95 % (Vergleich der PDZ1-Domäne von Mensch und Kaninchen). Die „Linker“-Regionen zwischen den einzelnen Domänen sind dabei jedoch wesentlich unterschiedlicher.

Homo	MTSTFNP	RECKLSKQEGQNYGFFLRIEKDT	EGHLVRRV	VEKCS	PAEKAGLQDGD	RVLRING	60										
Oryctolagus	MASTFNP	RECKLSKEEGQNYGFFLRIEKDT	EGHLVRRV	IEKGS	PAEKAGLQDGD	RVLRING	60										
Rattus	MASTFNP	RECKLSKKEGQNYGFFLRIEKDT	DGHLVRRV	IEEGS	PAEKAGLLDGD	RVLRING	60										
Mus	MASTFNP	RECKLSKQEGQNYGFFLRIEKDT	DGHL	IRVI	IEEGS	PAEKAGLLDGD	RVLRING	60									
	*:*****	*****:*****:*****:***:***:*	*****	*****	*****	*****	*****										
								PDZ1									
Homo		VFVDKEEHMQVVDLVRKSGNSVTLLVL		DGDSY	EKAVKTRV	DLKELGQS	QKEQGLSDN	ILS 120									
Oryctolagus		VFVDKEEHMQVVDLVRKSGNAVTLVL		DGNSY	EKAVKKQV	DLKELGQSR	QEQADLR	ENVA 120									
Rattus		VFVDKEEHAQVVDLVRKSGNSVTLLVL		DGDSY	EKAVKHQV	DLKELDQS	PREPALNE	KKP 120									
Mus		VFVDKEEHAQVVE	LVRKSGNSVTLLVL	DGDSY	EKAVKNQV	DLKELDQS	QREAA	LNDKKPG 120									
	*****	***:*****:*****	*****	**:	*****	:*****:*	* * :										
Homo	PVMNGGVQ	TWTQPR	LCYL	VKEGGS	YGFS	LKTVQ	GKGVY	MTDITPQGVAMRAGVLADDDL 180									
Oryctolagus	PVMNGGVET	TWTQPR	LCYL	EKG	NSY	GFS	LKTVQ	GKGVYMTDIPQSVAMKAGVLADDDL 180									
Rattus	LGMNGGVET	CAQPR	LCYL	VKEGNS	FGFS	LKTI	QGKGV	FLTDITPQGVAMKAGVLADDDL 180									
Mus	PGMNGAV	EPCAQPR	LCYL	VKEGNS	FGFS	LKTI	QGKGV	YLTDIMPQGVAMKAGVLADDDL 180									
	:*	:	*****	*	*****	*****	*****	*****									
								PDZ2									
Homo	IEVNGENVEDASHEEV	VEKVKKSGSRV	MFLLVDKET		DKRHVE	QKIQ	FKRETAS	LKLLPHQ 240									
Oryctolagus	IEVNGENVEDASHEEV	VEKVKKSGNR	IVFLLVDKET		EKRHSE	QKIE	FRREAS	LKLLPHQ 240									
Rattus	IEVNGENVENASHEEV	VEKVTKSGSRI	MFLLVDKET		ARCHSE	QKTP	FKRETAS	LKLLPHQ 240									
Mus	IEVNGENVENASHEEV	VEKVTKSGSRI	MFLLVDKET		ARCHSE	QKTF	FKRETAS	LKLLPHQ 240									
	*****	*****:*****:*****	*****	:	***	*:***:*****											
Homo	P	RIVEMKKSNGYGFYLRAGSE	QKQI	IKDIDSGSPAE	EAGL	KNNDLV	AVNGESVET	LD 300									
Oryctolagus	P	RIVEMKKSNGYGFYLRAGSE	QKQI	IKDIDSGSPAE	AAGL	KNNDLV	I	AVNGKSVEALD 300									
Rattus	P	RVVVIKKSNGYGFYLRAGPE	QKQI	IKDIEPGSPAE	AAGL	KNNDLV	AVNGESVET	LD 300									
Mus	P	RVVVIKKSNGYGFYLRAGPE	QKQI	IKDIEPGSPAE	AAGL	KNNDLV	AVNGKSVEALD	300									
	*	:*	***:*****:***	*****:*****:*****	*****	*****:*****:*****	*****:*****:*****										
								PDZ3									
Homo	HDSV	VEMIRKGGDQ	TSLLVVDK	ETDN	MYRLA	HFS	PFLY	YQSQELPN	GSVKEAPAPTPTSL 360								
Oryctolagus	HDG	VVELIK	GGDQ	TSLLVVDK	EAD	MYRLA	HFS	PFLY	YQSQELPN	GSVTEVAAPTPTVPP 360							
Rattus	HDSV	VEMIRN	GGDQ	TLLVLDK	EAD	RIYSL	ARFSP	LLY	CQSQELPN	GSVKEAPAPISAPL 360							
Mus	HDG	VVEMIRKGGDQ	TLLVLDK	EAESI	YSL	ARFSP	LLY	CQSQELPN	GSVKEGAPAPISAPL 360								
	::*	:*****:***:***	*****	*::	*	**:	***:***	*****	*****:***:***	...							
Homo	EVSS	PPDTE	EVDH	KPK	KLCRL	AKGEN	YG	FHLN	AIRGLPGS	F	KEVQKGG	PADLAGLE	DE 420				
Oryctolagus	EVSS	PPDTE	EVDH	KPK	KLCRL	DKGEN	YG	FHLN	AIRGLPGS	F	KEVQKGS	PADLAGLE	DE 420				
Rattus	EAPG	SAT	EDV	GH	KPK	RL	IKED	DS	YG	FHLN	AIRG	QPGS	F	KEVQKGG	PADKAGLE	NE 420	
Mus	EATG	SEP	TE	DAE	GH	KPK	RL	IKED	DS	YG	FHLN	AIRG	QPGS	F	KEVQKGG	PADKAGLE	NE 420
	...	:*	:***	*****	*	:*	*****	*****	*****:***:***	*****	*****	*****	*****				
Homo	DVI	IEVNGV	NVLDE	PEYK	VVDRI	QSSG	KNV	TLLV	CG	KKAY	DYFQ	AKKIP	IVSS	LAD	PLDT	480	
Oryctolagus	DI	IEVNGV	NVLDE	PEYK	VVDRI	QSSG	DNV	TLLV	CG	KKAY	EYFQ	AKKIP	IVSS	MA	LPLAI	480	
Rattus	DI	IEVNGENVQ	DEPY	DRV	VERIK	SSGE	HV	TLLV	CG	KVAYS	YFQ	AKKIP	IVSS	LAD	PLVA	480	
Mus	DVI	IEVNGENVQ	EPEY	DRV	VERIK	SSG	HV	TLLV	CG	KMAYS	YFQ	AKKIP	IVSS	MAE	PLVA	480	
	*:*****	**	:***:***:***	*****	*****	*****	*****	*****	*****	* **	*****	*****:***:***	*****	*****	*****	*****	
Homo	PPDS	KEG---	IVVES	NHD-	SHMA	KA	RAH	STASH	SSS	NS	ED	TEM	519				
Oryctolagus	PADS	-QG---	MLAE	LEYN-	LHEA	KA	RAH	STASH	SSS	NS	ED	TEL	518				
Rattus	GPDE	KGETE	HDSA	E	STK	SSHP	ARD	RTL	SA	ASH	SSS	NS	ED	TV	523		
Mus	GPDE	KGE---	TSAE	SEHD-	AHPA	K	ARD	RTL	ST	ASH	SSS	NS	ED	TEM	519		
	.*	.	:	* **:	*:***:*****	:											

Abb. 4-34: Proteinsequenzvergleich der bekannten PDZK1-Proteine von *Homo sapiens* (NP_002605), *Oryctolagus cuniculus* (AAO34667), *Rattus norvegicus* (NP_113900) und *Mus musculus* (NP_067492). Grau hinterlegt sind die Aminosäuren, welche identisch zum humanen PDZK1-Protein sind. Die gelben Boxen kennzeichnen die vier verschiedenen PDZ-Domänen, die für das Protein bekannt sind (ermittelt durch Pfam-Datenbankrecherche). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW erstellt. Die Kennzeichnung unterhalb der Sequenzen bedeutet:
 *- identische Aminosäuren
 . - ähnliche Aminosäuren
 : - sehr ähnliche Aminosäuren

4.3.5 Kartierung der Bindungsdomäne von PDZK1 mit dem PTH1-Rezeptor

Durch weitere Hefe-Interaktionstests, soll die bindende PDZ-Domäne von PDZK1 mit dem PTH1-Rezeptor ermittelt werden.

4.3.5.1 Konstruktion der einzelnen PDZ-Domänen

Zunächst wurde die gesamte cDNA von PDZK1 mit Hilfe der RT-PCR (siehe 3.2.18) und den Primern Nr. 17 und Nr. 18 (siehe 2.9.1) amplifiziert. Als Template diente eine humane gesamt-RNA-Präparation aus der Niere. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den pCRII-TOPO-Vektor subkloniert.

Für die durch die Pfam-Datenbankanalyse ermittelten vier PDZ-Domänen wurden Primer konzipiert, welche es erlaubten die einzelnen Domänen mittels PCR zu amplifizieren. Als Template wurde die zuvor klonierte gesamt-DNA von PDZK1 verwendet. Die Lage der Primer ist in Abbildung 4-35 dargestellt. Mit Hilfe der Primer wurde jeweils am 5'-Ende und am 3'-Ende eine SfiI-Schnittstelle eingefügt, welche es erlaubte nach einer erfolgten TOPO-Klonierung des PCR-Produkts, die einzelnen cDNA's der Domänen in den Hefevektor pGADT7 zu subklonieren. Ein vorliegen der PDZ-Domänen im richtigen Leseraster wurde durch Dequenzierung bestätigt. Die korrekte Expression der PDZ-Domänen als Fusionsprotein mit einer Gal4-Domäne war somit gewährleistet.

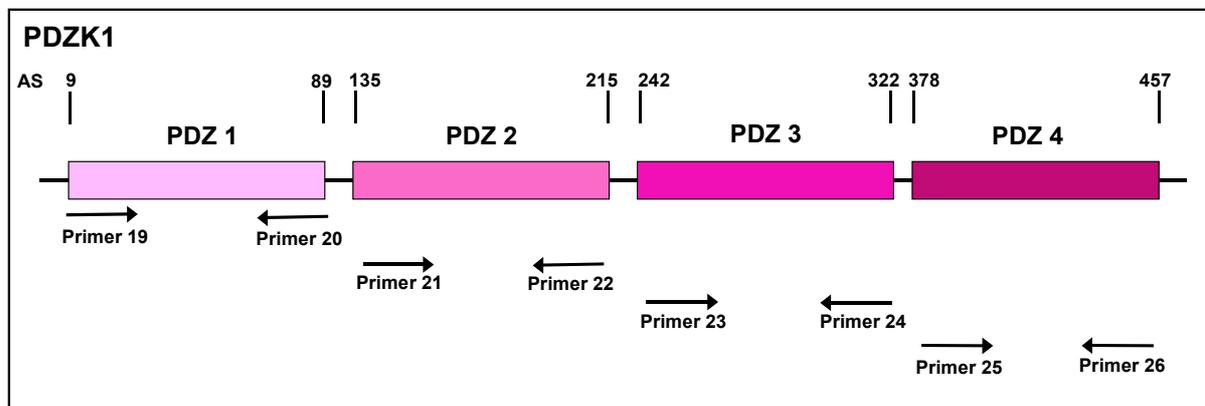


Abb. 4-35: **Lage der Primer für die Amplifizierung der einzelnen PDZ-Domänen von PDZK1.** Die Primersequenz ist in Kapitel 2.9.1 aufgeführt. Jeder Primer besitzt am 5'-Ende eine SfiI-Schnittstelle. Über die 3'-Primer wurde in alle Konstrukte ein Stop-Codon eingefügt. Die Länge der hier dargestellten Primer ist nicht proportional zur Länge der einzelnen Domänen. AS: Aminosäureposition ausgehend vom kompletten PDZK1-Protein

Die auf diese Weise hergestellten Vektoren (PDZ-Domänen in pGADT7) wurden in den Hefestamm Y187 transformiert und mit dem schon vorhandenen Stamm AH 109-(pGBKT7-CTERM) verpaart. Die diploiden Hefezellen wurden auf verschiedenen Selektionsplatten getestet.

4.3.5.2 Ermittlung der PDZ-Bindungsdomäne für den PTH1-Rezeptor

Zur Interaktionsprüfung wurden sowohl die Hefestämme mit den einzelnen Plasmiden, als auch die verpaarten diploiden Hefezellen auf Selektionsplatten ausgestrichen.

Die nachfolgende Tabelle 4-10 zeigt die Ergebnisse aus dem Interaktionstest.

„Köder“	„Beute“	-Leu/X- α -Gal Phänotyp	-Trp/X- α -Gal Phänotyp
CTERM	---	Ø	+++ , weiß
---	PDZ1	+++ , weiß	Ø
---	PDZ2	+++ , weiß	Ø
---	PDZ3	+++ , weiß	Ø
---	PDZ4	+++ , weiß	Ø

„Köder“	„Beute“	-Leu/-Trp Phänotyp	-His/-Leu/-Trp Phänotyp	-Ade/-His/-Leu/-Trp/ X- α -Gal-Phänotyp
CTERM	PDZ1	+++	+++	+++ , blau
CTERM	PDZ2	+++	+	Ø
CTERM	PDZ3	+++	Ø	Ø
CTERM	PDZ4	+++	+	Ø

Tab. 4-10: **Zusammenfassung des Interaktionstests.** Die Stärke der gefundenen Reporteraktivität wurde in folgende Kategorien eingeteilt. Die Einteilung erfolgte anhand der Anzahl der gewachsenen Kolonien:

+++ - starke Interaktion

++ - durchschnittliche Interaktion

+ - schwache Interaktion

Ø - keine Interaktion

--- nicht bestimmt

„blau“ bedeutet eine Aktivierung des Mel1-Reportergens, wodurch es zu einem Umsetzen des zugegeben X- α -Gal in einen blauen Farbstoff kommt. „weiß“ bedeutet, dass die Kolonien das Mel1-Gen nicht exprimieren.

Zur Kontrolle, ob durch die einzelnen Domänen eine Autoaktivierung des Hefe-Systems hervorgerufen werden kann, wurden die Hefestämme, welche nur mit den Vektoren der einzelnen Domänen transformiert waren, auf SD/-Leu/X- α -Gal und SD/-Trp/X- α -Gal ausgestrichen. Im Falle des „Köderplasmids“ pGBKT7-(CTERM), fand kein Wachstum auf SD/-Leu/X- α -Gal-Platten statt. Die Kolonien auf den SD/-Trp/X- α -Gal-Platten waren weiß. Da der C-Terminus in den Vektor pGBKT7 subkloniert wurde, welcher es dem Hefestamm ermöglicht Tryptophan herzustellen, war ein Wachstum der Zellen auf den Selektionsplatten möglich. Da die Kolonien aber

weiß geblieben sind zeigt dies, dass der Vektor exprimiert wird, aber eine Autoaktivierung nicht statt findet.

Im umgekehrten Fall wurden die einzelnen Domänen in den Hefevektor pGADT7 kloniert. Diese Hefezellen können nun Leuzin selbst herstellen, nicht aber Tryptophan. Es fand deswegen kein Wachstum auf SD/-Trp/X- α -Gal-Platten statt, hingegen sind auf SD/-Leu/X- α -Gal Kolonien gewachsen, diese blieben aber weiß. Dies bedeutet, dass auch im Fall der einzelnen Domänen keine Autoaktivierung stattfindet.

Zur Kontrolle, ob die Verpaarung der Hefezellen erfolgreich war, wurden die diploiden Stämme auf SD/-Leu/-Trp-Platten ausgestrichen. Nur wenn die Hefezelle durch das Vorhandensein beider Plasmide in der Lage ist, sowohl die Aminosäure Tryptophan als auch Leuzin autotroph zu produzieren, ist auf diesen Platten ein Wachstum möglich.

Es konnte gezeigt werden, dass die PDZ-Domänen 2 bis 4 nicht mit dem C-Terminus des PTH1-REZEPTOR interagieren. Die wenigen Kolonien, die auf den schwach stringenten Platten (SD/-His/-Leu/-Trp) gewachsen sind, sind auf eine schwache His3p-Expression (= Hefe HIS3-Protein) zurück zu führen. Das Problem hätte durch ein Einstellen der Selektionsplatten mit 3-AT (3-Amino-1,2,4-Triazol) behoben werden können. 3-AT ist ein Inhibitor der His3p-Expression und kann somit ein nicht erwünschtes Hintergrundwachstum von Zellen, die keine HIS3-Expression besitzen, verhindern [51]. Da die Zellen auch auf hoch stringenten Platten (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal) getestet wurden, wurde in diesem Fall darauf verzichtet.

Es zeigte sich in diesem Hefetest eindeutig, dass nur die PDZ 1-Domäne von PDZK1 mit dem C-Terminus des PTH1-REZEPTOR interagieren kann. Dieses wurde zum einen durch das starke Wachstum, sowohl auf den schwachen, als auch auf den hoch stringenten Platten deutlich. Auf der anderen Seite wurde zusätzlich auf ein drittes Reporter gen getestet, welches zu einer starken Blaufärbung der Kolonien führte. Dies ist auf die Expression des Mel1-Gens zurück zu führen, welches für α -Galaktosidase kodiert. Durch Umsetzung von X- α -Gal durch dieses Enzym färben sich die Kolonien blau.

4.3.6 Ein 3D-Modell der PDZ1-Domäne von PDZK1

Mit Hilfe eines automatisierten Protein-Modelling Servers, welchen die Firma Glaxo Welcome Inc. im Internet zur Verfügung stellt, kann mit Hilfe des Programms ProMod-II ein vergleichendes Proteinmodell durchgeführt werden [88, 208]. Bei dem erstellten Modell handelt es sich um ein Homologiemodell, welches durch den Vergleich der errechneten Sekundärstruktur des Zielproteins mit der bekannten 3D-Struktur eines ähnlichen Proteins erstellt wurde.

Die durch das Modelling erhaltenen Proteinstrukturen sind hoch spekulativ und ermöglichen es nur eine hypothetische 3D-Struktur des Proteins zu bekommen. Für genauere Aussagen ist eine exakte Analyse z.B. mittels Röntgenstrukturanalyse unbedingt notwendig.

Eine Datenbankanfrage für ein 3D-Modell der PDZ1-Domäne von PDZK1 lieferte ein Modell, welches auf der PDZ1-Domäne von NHERF-1, einem ebenfalls mit dem PTH1R-Rezeptor interagierendes PDZ-Protein, basiert. Als zu analysierender Proteinabschnitt von PDZK1 wurden die Aminosäuren im Bereich von Aminosäure 9 bis 89 verwendet. Die in diesem Bereich des PDZK1-Proteins ermittelte Sequenzhomologie mit der PDZ1-Domäne von NHERF-1 liegt bei 53,6 %.

Das Modell der PDZ1-Domäne von NHERF-1, welches für das Protein-Modelling verwendet wurde, basiert auf Röntgenstrukturanalysen von S. Karthikeyan und Kollegen [127].

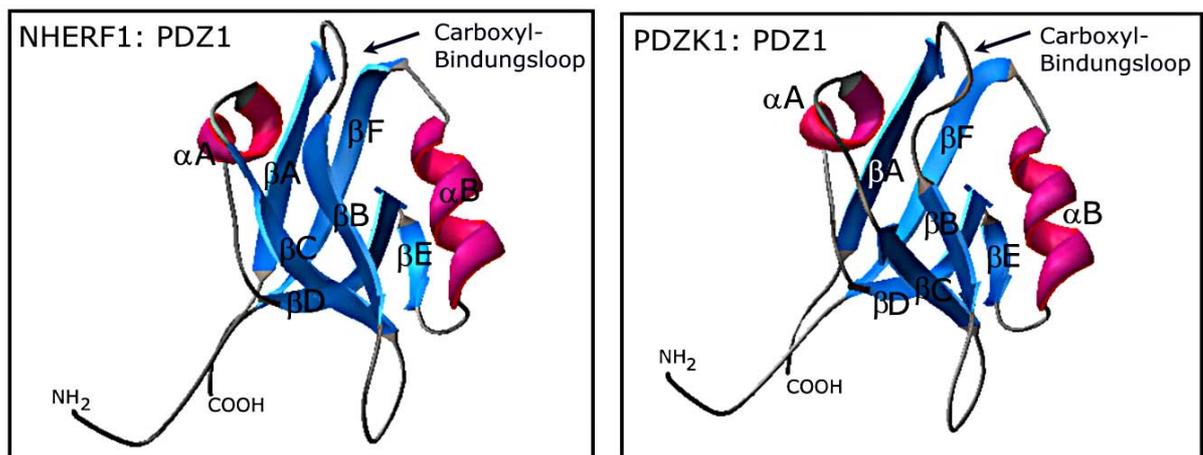


Abb. 4-36: **3D-Modell der PDZ1-Domänen von NHERF-1 und PDZK1.** Das Modell für die PDZ1-Domäne von NHERF-1 ist der PDB-Datenbank entnommen (Zugriffsnr: 1G90); Das Modell für die PDZ1-Domäne von PDZK1 wurde mit Hilfe des Protein-Modelling-Servers (Swiss-Model: <http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>) und dem Programm ProMod-II erstellt. αA und αB bezeichnen die beiden α -Helices (rot). Durch βA – βF sind die sechs Faltblattstränge gekennzeichnet (blau).

Ein Vergleich beider Modelle zeigt sehr hohe strukturelle Ähnlichkeiten. Auffällig aber ist, dass die PDZ1-Domäne von PDZK1 einen, gegenüber der PDZ1-Domäne von NHERF-1, verkürzten βB -Faltblattstrang besitzt und somit einen verlängerten Carboxyl-Bindungsloop. Da dieser Strang im Bereich der Bindungstasche für C-terminale Proteinabschnitte liegt, könnte dies eventuell bei der Auswahl der Bindungspartner eine Rolle spielen. Ein weiterer Unterschied besteht in dem ebenfalls deutlich verkürzten βC -Faltblattstrang.

4.3.7 Analyse der molekularen Determinanten für die Bindung von PDZK1 an den PTH1-Rezeptor

Der PTH1-Rezeptor weist am C-Terminus die Sequenz „ETVM⁵⁹⁰⁻⁵⁹³“ auf. Nach dem in der Einleitung (siehe 1.6.3) beschriebenen Schema für die Einteilung der Erkennungsmotive von PDZ-Proteinen, handelt es sich in diesem Fall um eine Erkennungssequenz der Klasse I („S/T-X-Φ“-COOH; wobei X: beliebige Aminosäure; Φ: hydrophobe Aminosäure). In der Arbeit von M. J. Mahon und Kollegen [152] wird gezeigt, dass der PTH1-Rezeptor über dieses Erkennungsmotiv die PDZ-Proteine NHERF-1 und NHERF-2 bindet. Im Falle des Proteins NHERF-2 wurde die zweite PDZ-Domäne als interagierende Domäne beschrieben. Wie in Kapitel 4.3.8 und 4.3.9 gezeigt wird, bindet PDZK1 an den C-Terminus des PTH1R. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch in diesem Fall eine Bindung an diesem Aminosäuremotiv statt findet.

Um zu überprüfen, ob die PDZ1-Domäne von PDZK1, welche als Interaktor mit dem PTH1R identifiziert wurde (siehe 4.3.5), die strukturellen Eigenschaften besitzt, die für eine Bindung von Klasse I-Proteinen nötig sind, wurde ein Aminosäurevergleich mit der dritten PDZ-Domäne von PSD-95 angestellt. PSD-95 („postsynaptic-density-protein“) ist eines der ersten beschriebenen PDZ-Proteine. Dieses Protein wird im Gehirn exprimiert und ist dort für die Organisation verschiedener Ionenkanäle und Rezeptoren an der Membran verantwortlich [132, 137]. In einer Arbeit von D. A. Doyle und Kollegen [49] konnten die Aminosäuren, welche die molekulare Basis für eine Peptiderkennung durch PDZ-Proteine darstellen, mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden. Als bindendes Peptid wurde ein kurzer Peptidabschnitt mit der Aminosäureabfolge „Thr-Lys-Asn-Tyr-Lys-Gln-Thr-Ser-Val“ verwendet.

Um diese molekularen Eigenschaften, welche für die dritte PDZ-Domäne von PSD-95 beschrieben wurden mit den PDZ-Domänen von PDZK1, NHERF-1 und NHERF-2 zu vergleichen, ist in Abbildung 4-37 eine Gegenüberstellung dieser Domänen aufgezeigt. Die Proteine NHERF-1 und NHERF-2 wurden deshalb in die Betrachtung mit einbezogen, da es sich hierbei ebenfalls um PDZ Proteine handelt, deren Interaktion mit dem PTH1-Rezeptor beschrieben worden ist [152]. Man findet einige konservierte Aminosäuren innerhalb der hier verglichenen PDZ-Domänen. Dabei handelt es sich zum einen um Aminosäuren die für die strukturellen Eigenschaften der Domänen verantwortlich zu sein scheinen. So ist z. B. der Hauptteil der hydrophoben konservierten Aminosäuren an der Bildung der hydrophoben Kernstruktur beteiligt. Zum anderen zeigen einige der konservierten Glycinreste eine Beteiligung bei der Anordnung der Hauptkette des Peptidabschnitts. Die Eigenschaften dieser konservierten Aminosäuren legen die Vermutung nahe, dass eine allgemeine strukturelle Ähnlichkeit innerhalb der Familie der PDZ-Proteine

Die kurz auf das β A-Faltblatt folgende Aminosäure ist im Fall von PSD-95 ein Arginin (K). Diese Aminosäure bindet über ein hoch konserviertes Wasserstoffmolekül an die C-terminale Aminosäure Valin (Position P_0). An dieser Stelle findet sich bei der an den PTH1-Rezeptor bindenden PDZ1-Domäne von PDZK1 ein Lysin (K) und ebenso bei allen weiteren Domänen von NHERF-1 und NHERF-2. Arginin und Lysin sind sehr nahe verwandte Aminosäuren und unterscheiden sich nur in einer zusätzlichen Aminogruppe der Arginin-Seitenkette. Außerdem zeigen noch viele weitere PDZ-Domänen, welche Klasse I-Peptide binden, an dieser Position ein Lysin. Daraus folgernd scheinen sowohl Lysin, als auch Arginin an dieser Position zur Funktionalität beizutragen.

In Teilen des Carboxyl-Bindungsloops und z. T. in das β B-Faltblatt hineinragend findet sich das „GLGF“-Motiv, welches unter anderem für diese Proteinfamilie namensgebend ist. Bei der PDZ 1-Domäne von PDZK1 findet sich an dieser Stelle die Aminosäureabfolge „NYGF“. Für PSD-95 wird gezeigt, dass vor allem jeweils über die Stickstoffatome der Hauptkette von Leuzin (L), dem zweiten Glycin (G) und dem darauf folgenden Phenylalanin (F) eine Wasserstoffbrückenbindung zum Valin (Position P_0) des gebundenen Peptids vorhanden ist. Da sich aber auch in allen Domänen der NHERF-Familie an Stelle des Leuzins ein Tyrosin (Y) findet und die PDZ-2 Domäne von NHERF-2 an den PTH1-Rezeptor bindet, scheint auch ein Tyrosin an dieser Position toleriert zu werden und ebenfalls für eine Wasserstoffbrückenbindung zur Verfügung zu stehen.

Ebenso wie die Stabilisierung der C-terminalen Aminosäure (Position P_0) des gebundenen Peptids durch verschiedene Wasserstoffbrückenbindungen wichtig ist, scheint die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Aminosäure an Position P_{-2} und dem Histidin (H, α B-Helix) von Bedeutung zu sein. Wie in obiger Abbildung dargestellt, zeigt das Histidin der α B-Helix einen sehr hohen Konservierungsgrad, was auf eine entscheidende Rolle bei der Bindung des Peptids hinweist.

Nicht alle Aminosäuren, die bei der Bindung von PSD-95 an sein Peptid von Bedeutung sind, findet man bei den involvierten PDZ-Domänen für die Bindung an den PTH1-Rezeptor. Trotzdem sind kritische Aminosäuren meist gleich oder zumindest strukturell verwandt. Unterschiede an manchen Aminosäurepositionen könnten wiederum einen Hinweis auf selektive Bindungseigenschaften geben.

4.3.8 Koimmunpräzipitation von PDZK1 und dem PTH1-Rezeptor

Das durch einen „Yeast-two-Hybrid-Screen“ identifizierte PDZK1-Protein soll im weiteren Verlauf als direkter Interaktionspartner des PTH1-Rezeptors durch ein Koimmunpräzipitations-Experiment bestätigt werden. Die Methode der Koimmunpräzipitation beruht auf der Bindung zweier *in vitro* translaterter Proteine, welche als Fusionsproteine mit verschiedenen Proteinanteilen (Hämagglutinin-Tag oder c-Myc-Tag) exprimiert werden. Durch den Protein-Tag kann mit dem entsprechenden Antikörper der Protein-Protein-Komplex aus der Lösung präzipitiert werden. Die Herstellung von Fusionsproteinen mit einem Tag-Anteil war nötig, da für die beiden hier untersuchten Proteine zu diesem Zeitpunkt kein spezifischer Antikörper vorhanden war. Zum späteren Nachweis auf einem Polyacrylamidgel, wurden diese Proteine durch den Einbau von [S^{35}]-Methionin radioaktiv markiert.

4.3.8.1 Konstruktion der Plasmide für die Koimmunpräzipitation

Das für den Hefe-Screen verwendete „Köderplasmid“ pGBKT7-(CTERM) wurde auch für die Koimmunpräzipitation verwendet. Der Vektor pGBKT7 ist so konzipiert, dass an den N-Terminus der klonierten DNA, sowohl die GAL4-Bindungsdomäne, welche für den Hefe-Screen benötigt wird, als auch ein c-myc-Tag angehängt wird. Dieser erlaubt es dieses Protein für die Präzipitation mit einem Antikörper gegen diesen Proteinanteil zu verwenden.

Die PDZK1-DNA wurde mittels RT-PCR und dem Primerpaar Nr. 27 und Nr. 28 (siehe 2.9.1) aus einer gesamt-RNA-Präparation der Niere amplifiziert. Durch die Primer wurde zusätzlich eine SfiI-Schnittstelle eingefügt, um die DNA im folgenden über diese Schnittstellen in den Vektor pGADT7 zu klonieren. Dieser Vektor enthält sowohl die GAL4-Aktivierungsdomäne für den Hefe-Screen, als auch einen HA-Tag für die Immunpräzipitation.

4.3.8.2 *In vitro* Translation und Koimmunpräzipitation von PDZK1 mit dem C-Terminus des PTH1-Rezeptors

Die beiden Proteine (PDZK1 und CTERM) wurden mit Hilfe des „TNT®coupled Retikulozyte-Lysat“-Systems von Promega *in vitro* transkribiert und translatiert. Die Synthese erfolgte unter Zugabe von [S^{35}]-Methionin. Nach erfolgreicher Herstellung der Proteine wurden diese über Nacht bei 4 °C miteinander inkubiert. Nach Zugabe von jeweils einem der beiden Antikörper (HA-Antikörper oder c-Myc-Antikörper), einer weiteren Inkubation für 2 h und dem anschließenden Ausfällen des Protein-Protein-Antikörper-Komplexes mit Protein A-Kügelchen, erfolgte der Nachweis auf einem Polyacrylamidgel.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4-38 dargestellt.

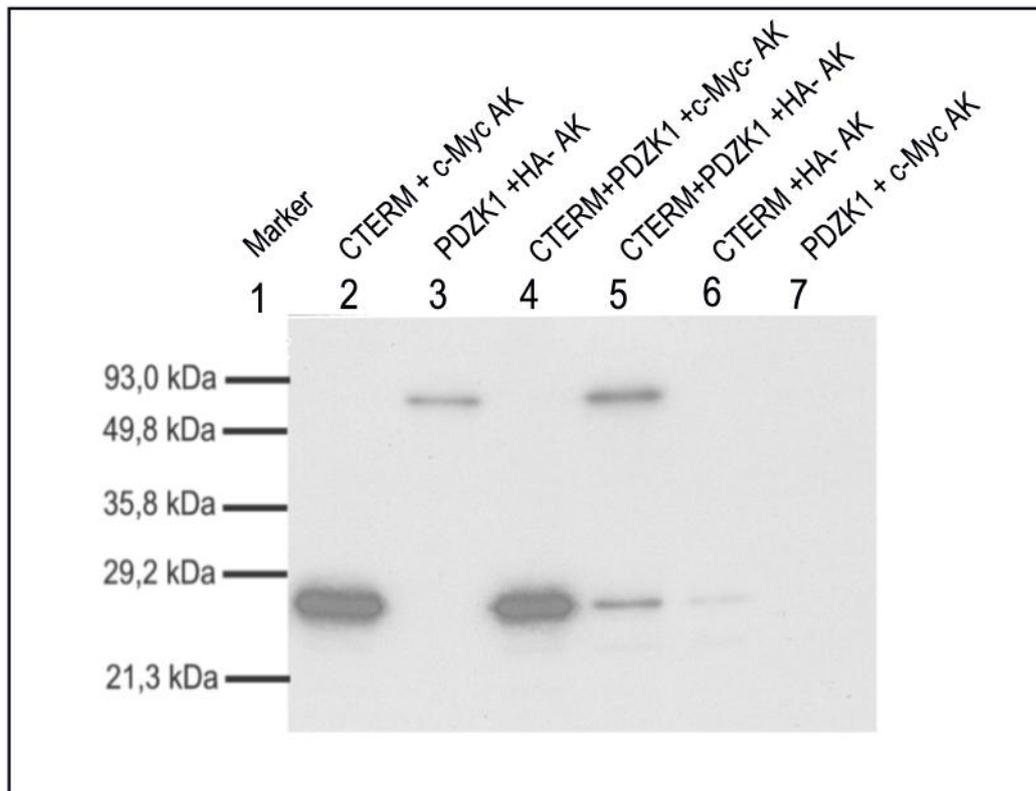


Abb. 4-38: **Koimmunpräzipitation von PDZK1 mit dem C-Terminus des PTH1-Rezeptors.** Die Koimmunpräzipitation erfolgte mit *in vitro* translatierten Proteinen von PDZK1 und dem C-Terminus des PTH1-Rezeptors (CTERM). In Spur 1 ist als Orientierung zur Größenbestimmung ein Gewichtsstandard aufgetragen. Spur 2 und 3 sind die positiven Kontrollen der beiden verschiedenen Ansätze. Spur 4 und 5 stellen das eigentliche Koimmunpräzipitations-Experiment dar. In Spur 4 wurde der c-Myc-Antikörper verwendet, in Spur 5 der HA-Antikörper. Spur 6 und 7 sind die dazugehörigen Negativkontrollen.

Zur Kontrolle der Präzipitation durch den entsprechenden Antikörper wurde sowohl der C-Terminus (CTERM) alleine mit dem c-Myc-Antikörper, als auch das PDZK1-Protein mit dem HA-Antikörper aus der Lösung gefällt. Bei beiden Proteinen kann auf Höhe der erwarteten Proteingröße von ca. 20 kDa für den C-Terminus (CTERM) und 65 kDa für PDZK1 eine Bande detektiert werden. Die Bande für den C-Terminus zeigt nach der Auftrennung auf dem SDS-Polyacrylamidgel ein etwas höheres Molekulargewicht, als dies rein rechnerisch ermittelt wurde (<http://bioinformatics.org/sms/>). Auf Grund der dreidimensionalen Struktur des Proteins ist dieses Phänomen jedoch nicht ungewöhnlich. Die Negativkontrollen, bei denen das jeweilige Protein mit dem entgegengesetzten Antikörper inkubiert wurde, ist zumindest bei PDZK1 und dem c-Myc Antikörper komplett negativ. Bei der Inkubation des CTERM mit dem HA-Antikörper ist eine schwache Bande zu erkennen, was bedeuten kann, dass dieser Antikörper zwar schwach, aber unspezifisch an den C-Terminus bindet.

Eine Koimmunpräzipitation von PDZK1 mit dem C-Terminus in Kombination mit dem c-Myc-Antikörper erwies sich als erfolglos. Allerdings zeigt sich bei der Kombination des C-Terminus mit PDZK1 und dem HA-Antikörper eine deutliche Bande auf Höhe des CTERM-Proteins. Dies

bedeutet, dass es möglich ist den C-Terminus des PTH1-Rezeptors mit dem PDZK1-Protein aus der Lösung zu fällen. Zwar erscheint auch bei der Negativkontrolle diese Bande, diese ist aber im Gegensatz zu der hier auftauchenden Bande wesentlich schwächer. Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, dass auch außerhalb des Hefesystems diese beiden Proteine miteinander interagieren.

4.3.9 GST-Pull-down von PDZK1 mit dem C-Terminus des PTH1-Rezeptors

Da die Koimmunpräzipitation nur einen ersten Hinweis auf die Interaktion des PTH1-Rezeptors mit PDZK1 geben konnte, sollte dieser Befund durch einen GST-pull-down bestätigt werden. Hierzu wird ein Protein welches als „Köder“ dienen soll, mit einem GST-Tag (Glutathion-S-Transferase) verbunden. Dieses Fusionsprotein kann nun an Glutathion-Sepharose (immobilisiertes Glutathion) binden. Diese mit dem Köder-Protein ummantelte Sepharose wird anschließend mit Zelllysat oder verschiedenen Proteinpräparationen inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Sepharose und anschließendem Versetzen der Sepharose mit „SDS-Loading“-Puffer können die Proben mittels Western Blot analysiert werden.

4.3.9.1 Klonierung des C-Terminus des PTH1-Rezeptors in einen GST-Expressionsvektor

Um den C-Terminus des PTH1-Rezeptors mit einem GST-Anteil zu fusionieren, wurde die cDNA des C-Terminus, welche zu einem früheren Zeitpunkt in den Hefevektor pGBKT7 kloniert wurde, mit den Restriktionsenzyme Sall und EcoRI herausgeschnitten und in den GST-Expressionsvektor pGEX-5X-1 umklontiert. Zur Kontrolle wurde der Vektor sequenziert. Die einklonierte DNA befand sich im Leseraster mit dem GST-Anteil.

Dieser Vektor wurde in BL21-Codon+-Bakterienzellen transformiert. Diese Zellen exprimieren einen spezifischen Prokaryonten tRNA-Pool und sind so für die Expression von prokaryontischen Proteinen sehr gut geeignet.

4.3.9.2 Induktion von GST-Fusionsprotein

Die Bakterien welche mit dem pGEX-5X-1 Vektor oder dem pGEX-5X-1-(CTERM) transformiert wurden, wurden in einer 1 l-Kultur hochgezogen und anschließend bei einer OD_{600} von 0,4 - 0,6 mit 1M IPTG induziert. Durch IPTG wird das $lacI^q$ -Genprodukt, welches als Repressor dient inaktiviert und es kommt zu einer verstärkten Expression des einklonierten Gens.

In Abb. 4-39 ist der Verlauf der Induktion dargestellt.

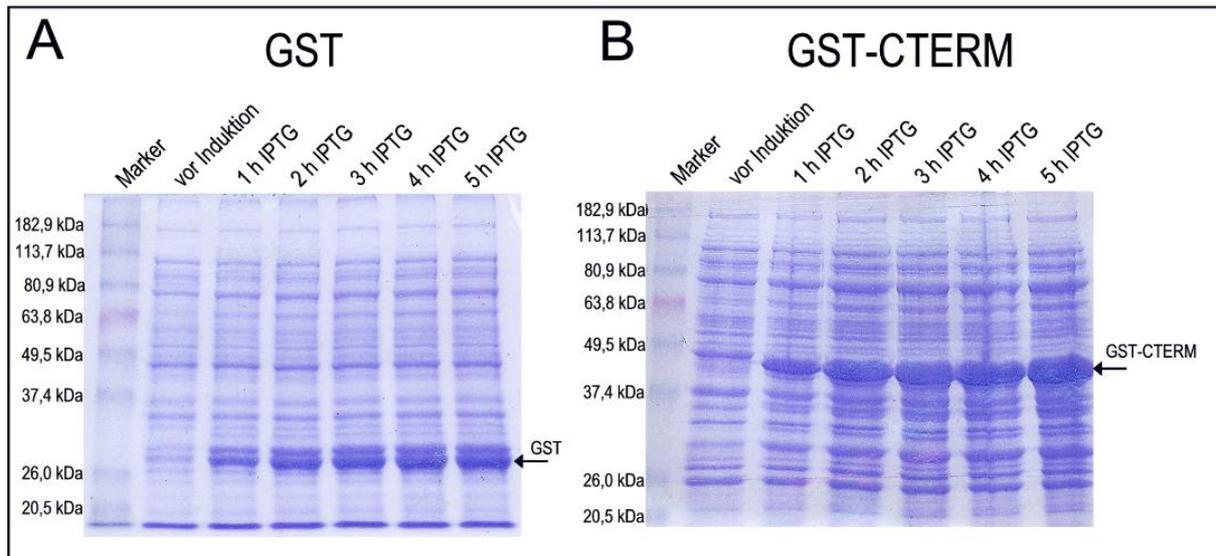


Abb. 4-39: **Verlauf der Induktion von GST-Protein und GST-CTERM-Protein.** Die Induktion erfolgte mit 1 M IPTG für 5 h. Es wurde vor der Induktion und nach jeder weiteren Stunde 1 ml Bakteriensuspension abgenommen, abzentrifugiert und mit 20 μ l SDS-Load versetzt. Dieses diente zur Verlaufskontrolle der Induktion.

A: Verlauf der Induktion von GST;

B: Verlauf der Induktion von GST-CTERM; Zur Größenbestimmung ist in der linken Spur ein Proteinstandard (BenchMark prestained Proteinstandard, Bio-Rad) aufgetragen.

Wie hier deutlich zu erkennen ist, nahm die Menge an gewünschtem Protein im Verlauf von fünf Stunden deutlich zu. Eine Expression vor der Induktion mit 1M IPTG ist kaum oder gar nicht zu erkennen. Die Proteingrößen für GST mit ca. 30 kDa und für GST-CTERM mit ca. 45 kDa stimmen gut mit den erwarteten Größen überein.

Nach Beenden der Induktion wurden das GST-Protein und das Fusionsprotein GST-CTERM gereinigt und an Glutathion-Sepharose gebunden. Diese ummantelte Sepharose wurde für den GST-pull-down eingesetzt.

4.3.9.3 GST Pull-down von PDZK1

Wie in Kapitel 4.3.10 anhand einer RT-PCR gezeigt wird, wird PDZK1 auch in 293E+-Zellen exprimiert. Allerdings konnte im Western Blot, dieses Protein nur schwach oder gar nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis könnte zum einen an der geringen exprimierten Menge und zum anderen an der schlechten Qualität des Antikörpers liegen. Aus diesem Grund wurden HEK 293 E+ Zellen mit dem Expressionsvektor pCMV-(PDZK1) transient transfiziert, um eine ausreichende Menge an PDZK1-Protein für den GST-Pull-down in den Zellen vorliegen zu haben. Zum Einsatz kamen sowohl Proteinextrakte aus nicht transfizierten HEK 293 E+-Zellen, als auch mit PDZK1 transient transfizierte Zellen.

Für das Pull-down Experiment wurden sowohl 200 μ g Gesamtproteinextrakt von nativen HEK-Zellen als auch von transient mit PDZK1 transfizierten HEK-Zellen mit GST-Sepharose oder mit GST-CTERM-Sepharose über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach sehr gründlichem Waschen

mit PBS wurde die Sepharose in SDS-Loading Puffer aufgenommen und auf einem Acrylamidgel, mit anschließendem Western Blot, analysiert. Zur Kontrolle wurden Gesamtproteinextrakte aus den Zellpräparationen mit auf das Acrylamidgel aufgetragen.

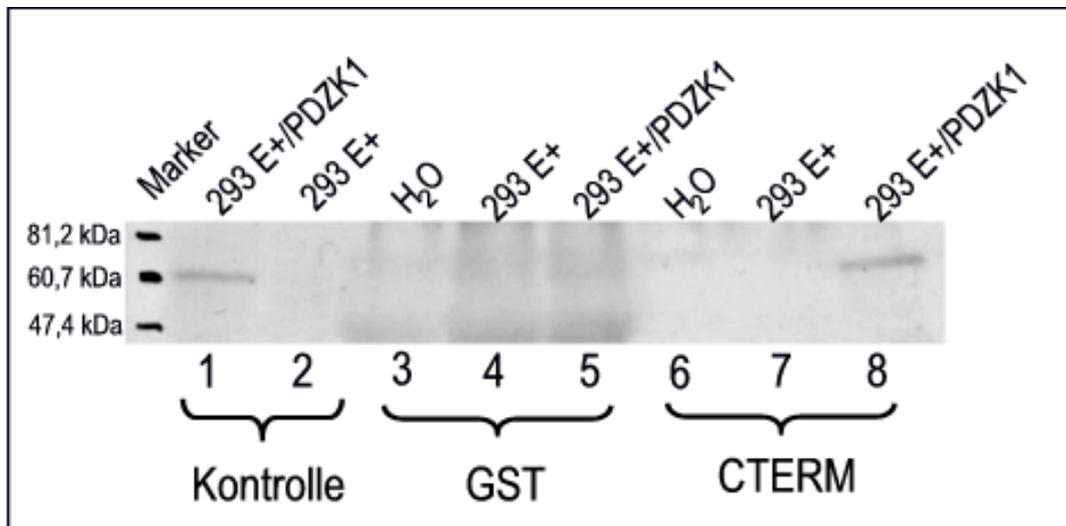


Abb. 4-40: **GST-Pull-down von PDZK1 mit dem C-Terminus des PTH1-Rezeptors.** Für den Western Blot wurde ein spezifischer Antikörper gegen PDZK1 (aus Hühnchen (chicken)) in einer Verdünnung von 1:25 eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit einem an Meerrettichperoxidasegekoppelten chicken-IgG-Sekundärantikörper (Verdünnung 1:1000) und anschließender Luminolreaktion. **1:** Gesamtproteinextrakt aus transient transfizierten HEK 293 E+-Zellen (20 µg) **2:** Gesamtproteinextrakt aus untransfizierten HEK 293 E+-Zellen (20 µg) **3:** GST-Sepharose mit H₂O inkubiert **4:** GST-Sepharose mit Gesamtproteinextrakt (200 µg) aus untransfizierten HEK 293 E+-Zellen **5:** GST-Sepharose mit Gesamtproteinextrakt (200 µg) aus transient transfizierten HEK 293 E+-Zellen **6:** GST-CTERM-Sepharose mit H₂O inkubiert **7:** CTERM-Sepharose mit Gesamtproteinextrakt (200 µg) aus untransfizierten HEK 293 E+-Zellen **8:** CTERM-Sepharose mit Gesamtproteinextrakt (200 µg) aus transient transfizierten HEK 293 E+-Zellen; Zur Kontrolle der Proteingrößen wurde auf der linken Seite ein Proteinstandard (BenchMark prestained Proteinstandard, BioRad) aufgetragen.

Wie aus Abbildung 4-40 ersichtlich, kann PDZK1 in transient transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Spur 1). Die erwartete Proteingröße von 63 kDa für PDZK1 stimmte mit der hier erscheinenden Bande gut überein. In untransfizierten HEK-Zellen konnte keine Bande detektiert werden, da die Expression in diesem Falle unter der Nachweisgrenze lag (Spur2).

Eine unspezifische Bindung von PDZK1 sowohl an Glutathion-Sepharose, als auch an GST-Protein kann ausgeschlossen werden, da weder bei der Inkubation von GST-Sepharose mit Proteinextrakt aus transfizierten noch aus untransfizierten Zellen eine Bande detektiert werden konnte (Spur 4 und 5).

Eindeutig ist, dass mit dem C-Terminus des PTH1-Rezeptors PDZK1 aus dem Gesamtproteinextrakt von transient transfizierten Zellen herausgefiltert werden kann. Dies zeigte sich in einer klar definierten Bande in Spur 8. Dies bedeutet, dass das Ergebnis der Koimmunpräzipitation durch einen GST-Pull-down bestätigt werden konnte. PDZK1 bindet *in vitro* an den C-Terminus des PTH1-Rezeptors.

4.3.10 Expression von verschiedenen PDZ-Proteinen und MAP17 in diversen Zelllinien

4.3.10.1 Expression von PDZK1 in verschiedenen Zelllinien

Um einen Überblick über das Vorhandensein von PDZK1-mRNA in verschiedenen Zelllinien zu bekommen, wurden verschiedenen RNA-Präparationen aus unterschiedlichen Zellen mittels RT-PCR und PDZK1 spezifischen Primern auf ein eventuelles Vorhandensein von PDZK1-spezifischer mRNA untersucht.

Das Gen für PDZK1 ist aus 8 Exons und 7 Introns aufgebaut. Dies wurde mit Hilfe der NCBI-Datenbank ermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>).

Die Primer wurden so konzipiert, dass diese in jeweils zwei unterschiedlichen Exons des PDZK1-Gens zu liegen kamen. In diesem Fall lag der 5'-Primer (siehe 2.9.1, Nr. 34) in Exon 1 und der 3'-Primer (siehe 2.9.1, Nr.35) in Exon 2. So konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der detektierten Bande um eine Amplifikation von genomischer DNA handelte. Durch eine Amplifikation von DNA würde es zu einer 2 kb großen Bande kommen, da die Primer in diesem Fall eine Intronstruktur von ca. 1,7 kb überspannen und diese ebenso amplifiziert würde. Findet aber eine Amplifizierung der mRNA statt, so erscheint im Fall der PDZK1-mRNA eine 300 bp große Bande.

Mittels der Trizol-Methode (siehe 3.2.17) wurde die RNA aus den verschiedenen Zellen gewonnen. Diese RNA diente als Vorlage für eine RT-PCR. Um eine semi-quantitative Aussage über die Menge der vorhandenen mRNA machen zu können, wurde die RT-PCR mit unterschiedlicher Zyklenzahl durchgeführt. In diesem Fall wurde eine Zyklenzahl zwischen 30 Zyklen und 40 Zyklen gewählt.

In Abb. 4-41 ist eine Zusammenfassung der verschiedenen RT-PCRs dargestellt.

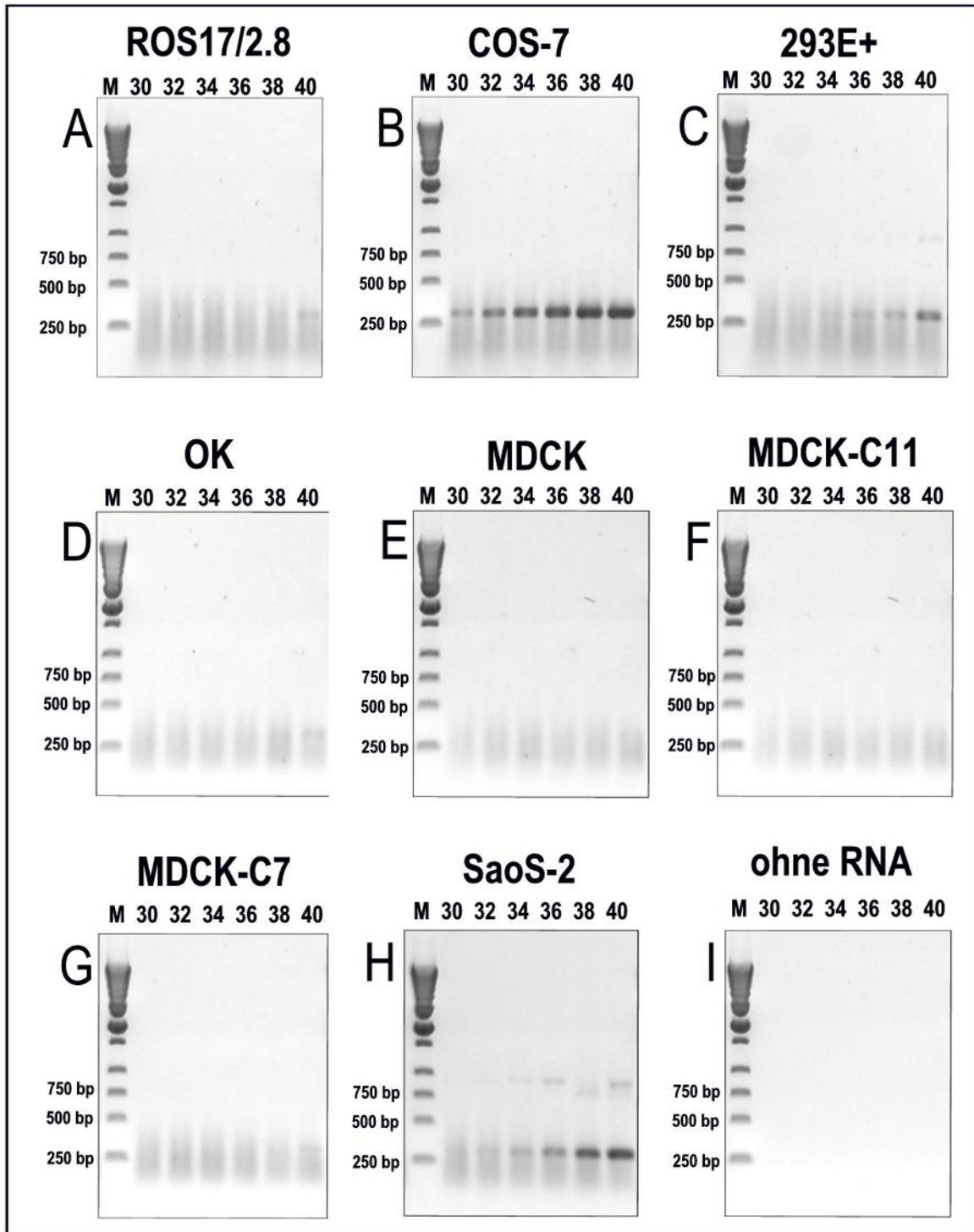


Abb. 4-41: **RT-PCR mit RNA aus verschiedenen Zellen unter Verwendung PDZK1-spezifischer Primer.** Pro Ansatz wurde 1 µg gesamt-RNA eingesetzt. Die Zyklenzahl wurde zwischen 30 und 40 gewählt. Eine Beschreibung der Zelllinien findet sich in Kapitel 2.12. Zur Größenbestimmung wurde 10 µl eines 1 kb-Markers (Stratagene) aufgetragen.

Aus dem Gesamtansatz der RT-PCR bestehend aus 50 µl, wurden 10 µl mit Puffer versetzt und auf einem 1 %-igen Agarosegel analysiert. Als Kontrolle, zum Ausschluss von falsch positiven Ergebnissen, wurde ein Ansatz pro RT-PCR ohne RNA pipettiert. Wie aus Abbildung 4-41 Bild I ersichtlich, war keine Kontamination der Lösungen und Primer zu beobachten.

In OK-Zellen (Bild D), in MDCK-Zellen (Bild E), sowie in den aus diesen Zellen entstandenen Subklonen MDCK-C7 (Bild G) und MDCK-C11 (Bild F), war keine PDZK1-spezifische RNA nachweisbar.

Da es sich bei OK-Zellen um Nierenzellen von *Didelphis marsupialis virginiana* (nordafrikanisches Opossum) und bei MDCK-Zellen um Nierenzellen von *Canis familiaris* (Cockerspaniel) handelt, besteht die Möglichkeit, dass die Primer, welche für die humane Sequenz konzipiert wurden, hier nicht spezifisch sind und somit keinen Nachweis ermöglichen. Für beide Spezies wurde PDZK1 bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht kloniert. Deswegen ist ein Sequenzvergleich der Primer mit der PDZK1-DNA dieser Spezies nicht möglich.

Bei der Zelllinie ROS 17 / 2.8 handelt es sich um eine Osteosarkomlinie von *Rattus norvegicus*. In Zyklus 40 war eine schwache Bande zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass PDZK1-RNA in dieser Linie exprimiert wird. Das humane Primer-Paar scheint in diesem Fall auch für die Ratte eine gewisse Spezifität zu besitzen. Vergleicht man die Sequenzen der verwendeten Primer, so findet sich mit dem humanen 5'-Primer eine 56 %ige Identität mit der Rattensequenz. Beim 3'-Primer sind es 75 % Identität im Vergleich der Rattensequenz zur humanen PDZK1-Sequenz. Die humanen Linien SaoS-2 (Osteosarkom-Linie) und HEK 293 E+ (humane embryonale Nierenzellen) zeigten eine gute Expression der PDZK1-mRNA. Dies gibt einen guten Hinweis darauf, dass PDZK1 auch als Protein in diesen Linien vorkommt.

Die größte Menge an PDZK1-mRNA war in COS7-Zellen nachzuweisen. Hier wurde schon bei der niedrigsten Zyklenzahl von 30 eine klare Bande erkennbar. Bei COS7-Zellen handelt es sich um Nierenzellen von *Cercopithecus aethiops* (Malawi-Meerkatze). Die Primer sind anscheinend auch in diesem Falle kompatibel. Ein klärender Sequenzvergleich ist aber mangels fehlender Sequenzinformation auch hier nicht möglich.

4.3.10.2 Expression von MAP17, NHERF-1 und NHERF-2 in verschiedenen Zelllinien

NHERF-1 und NHERF-2 sind ebenfalls PDZ-Proteine, die durch einen Hefe-Interaktionstest identifiziert wurden und mit dem PTH1-Rezeptor interagieren. In PS120-Zellen übernimmt NHERF-2 eine Regulatorfunktion in der Signaltransduktion [152]. Auf Grund der wichtigen Rolle von NHERF-Proteinen in der Signaltransduktion des PTH1-Rezeptors, wurde das Vorkommen der RNA von NHERF-1 und NHERF-2 in verschiedenen Zelllinien untersucht (Tabelle 4-11).

MAP17 (membrane-associated protein of 17 kDa) ist ein membranständiges Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa. Für eine Translokation von PDZK1 an die Zellmembran ist dieses Protein unbedingt notwendig [79]. PDZK1 kann über die PDZ4-Domäne an MAP17 binden. Da für weitere Untersuchungen der Interaktion des PTH1-Rezeptors mit PDZK1 das Vorhanden-

sein von MAP17 essentiell ist, wurde auch die Expression von MAP17-RNA in den unterschiedlichen, zur Verfügung stehenden Zelllinien, untersucht.

Für alle hier untersuchten RNAs wurde bei der Konzeption der Primer ebenfalls darauf geachtet, dass ein Exon-Intron-Bereich überspannt wurde, um die Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen. Für den Nachweis von NHERF-1 wurden die Primer Nr. 43 und Nr. 44, für NHERF-2 Primer Nr. 45 und Nr. 46 und für MAP17 Primer Nr. 51 und Nr. 52 verwendet (siehe 2.9.1).

Zellen	human	NHERF-1	NHERF-2	MAP17	PDZK1
ROS 17/2.8	-	+	+	Ø	Ø
COS-7	-	+++	Ø	Ø	+++
HEK 293 E+	+	+++	+++	Ø	+
MDCK	-	+++	+	++	Ø
MDCK-C7	-	+++	+	++	Ø
MDCK-C11	-	+++	+	++	Ø
SaoS-2	+	+++	+++	Ø	++
OK	-	Ø	+	Ø	Ø
HT-29	+	+++	+++	+++	++

Tab. 4-11: Zusammenfassung der verschiedenen RT-PCRs mit RNA aus verschiedenen Zellen und Verwendung spezifischer Primer für NHERF-1, NHERF-2 und MAP17. Pro Ansatz wurde 1 µg gesamt-RNA für die RT-PCR eingesetzt. Die Zyklenzahl für die RT-PCR wurde zwischen 30 und 40 gewählt. Anhand des Auftauchens einer Bande während einer bestimmten Zyklenzahl und deren Intensität wurde die Expressionsstärke in verschiedene Kategorien eingeteilt.

Ø: keine Bande sichtbar

+: zwischen Zyklus 38 - 40 auftauchen einer Bande

++: zwischen Zyklus 34 - 36 auftauchen einer Bande

+++ : bei Zyklenzahl von 30 intensive Bande erkennbar

Eine Beschreibung der Zelllinien findet sich in Kapitel 2.12. In der Spalte „human“ ist angegeben, ob die dargestellte Zelllinie humanen Ursprungs ist.

NHERF-1 RNA konnte in den meisten Zelllinien detektiert werden. Bei der schwachen Expression in ROS 17/2.8 Zellen ist zu bedenken, dass es sich hier um spezifische Primer für die humane Sequenz handelt, ROS 17/2.8-Zellen aber aus der Ratte stammen. NHERF-1 wurde für *Rattus norvegicus* noch nicht kloniert, aber für die nahe verwandte Spezies *Mus musculus*. Bei einem Sequenzvergleich der Maussequenz mit der humanen NHERF-1 Sequenz finden sich im Bereich des 5'-Primers vier Fehler, bei einer Gesamtlänge des Oligonukleotids von 30 bp. Für den 3'-Primer können drei Fehler bei einer Gesamtlänge von 35 bp bestimmt werden. Da davon aus-

zugehen ist, dass sich die Sequenz von Maus und Ratte sehr ähnlich sind, ist mit einer guten Übereinstimmung des humanen Primer auch für die Sequenz der Ratte zu rechnen.

Für NHERF-1 ist der Nachweis in OK-Zellen negativ. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass die verwendeten humanen Primer eventuell nicht kompatibel sind. In diesem Fall kann also nicht ausgeschlossen werden, dass NHERF-1 nicht doch expremiert wird. In MDCK-Zellen war eine starke Bande schon bei einer Zyklenzahl von 30 zu erkennen. Die könnte bedeuten, dass die Primer eine gute Homologie zu der Sequenz von NHERF-1 von *Canis familiaris* besitzen. Die schwächere Expression von NHERF-2 RNA in MDCK-Zellen, kann sowohl auf eine geringere Expression, aber auch auf eine nicht sehr gute Spezifität der Primer hindeuten. NHERF-2 RNA war in HEK-293 E+ Zellen, in SaoS 2-Zellen und in HT-29-Zellen sehr gut nachweisbar. Die schwache Expression in ROS17/2.8 Zellen und in COS-7 Zellen könnte wiederum ein Problem der Spezifität sein.

Für MAP17 gilt eindeutig, dass in HEK 293E+-Zellen und in der humanen Zelllinie SaoS-2 keine RNA nachweisbar war. Hingegen fand sich in der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 eine sehr gute Expression. Auch in den Nierenzellen von *Canis familiaris* konnte die RNA von MAP17 in ausreichender Menge nachgewiesen werden. Für alle anderen untersuchten Zelllinien gilt, dass keine MAP17 RNA nachweisbar war. Allerdings muss auch in diesen Fällen die Spezifität der Primer berücksichtigt werden.

Für die meisten untersuchten Zelllinien konnte die Sequenzübereinstimmung der Primer nicht überprüft werden, da die untersuchten Proteine (NHERF-1, NHERF-2 und MAP17) für die unterschiedlichen Spezies (*Rattus norvegicus*, *Cercopithecus aethiops*, *Canis familiaris* und *Didelphis marsupialis virginiana*) noch nicht kloniert wurden. Eine Ausnahme hiervon bildet die Sequenz von MAP17 von *Rattus norvegicus*. Ein Vergleich der Primer ergibt hier den Befund, dass sich im 5'-Primer mit einer Gesamtlänge von 27 bp sechs Fehler in der Übereinstimmung finden und für den 3'-Primer mit einer Gesamtlänge von 26 bp vier Fehler. Das Ausmaß der nicht übereinstimmenden Basen ist auf die Länge des Primers betrachtet vernachlässigbar, so dass der negative Befund in ROS17/2.8 Zellen als korrekt zu bewerten ist.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden wichtige neue Erkenntnisse über die PTH-Rezeptorfamilie gewonnen. Ziel dieser Arbeit war es, die Aktivierung der „second-messenger“ Wege, insbesondere den Mechanismus der Ankopplung an G-Proteine näher aufzuklären und darüber hinaus eventuell einen allgemeinen Kenntniserwerb für die Klasse II der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zu erzielen. Der Einsatz verschiedener, sich ergänzender Strategien untergliedert die Arbeit in drei Teilbereiche. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Frage untersucht welchen Einfluss verschieden Aminosäuren der siebten Transmembrandomäne des PTH1-Rezeptors auf die Signalwege besitzen. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit PTH1 / PTH2-Rezeptorhybriden, die zunächst hinsichtlich der zwei wichtigsten „second messenger“-Wege untersucht wurden. Im weiteren Verlauf wurde zusätzlich die Aktivierung weiterer Signalereignisse nach Stimulation der verschiedenen Rezeptorhybride untersucht. Der letzte Teil dieser Arbeit widmete sich der Identifizierung neuer Interaktionspartner der PTH1-Rezeptors. Hierfür kam die Methode des „Yeast-two-Hybrid“-Systems zum Einsatz.

5.1 Der Einfluss von hoch konservierten Aminosäuren der siebten Transmembrandomäne auf den PKA- und PKC-Signalweg

Ein Vergleich von verschiedenen Rezeptoren der Klasse II (siehe 4.1.1, Abbildung 4-1) zeigt, dass das „YCFXN“-Motiv der siebten Transmembrandomäne (TM7) eine besonders hoch konservierte Aminosäureabfolge dieser Rezeptorklasse darstellt. Dieser hoch konservierte Bereich wurde durch Mutagenesestudien auf die Bedeutung dieser Region, für die Ankopplung an die zwei wichtigsten Signalwege, überprüft. Beim PTH1-Rezeptor des Opossums konnten in diesem Bereich vier verschiedene Punktmutationen erzeugt werden (Y453A, C454A, F455A, N457A). Zusätzlich gelang die Konstruktion einer Deletionsmutante, die diesen Bereich umfasst (Del 453-457). Eine weitere Rezeptormutante wurde durch die Kombination von zwei Punktmutationen erstellt (Y453A/N457A). Da ein Zusammenhang zwischen polaren Aminosäuren der Transmembrandomänen und der Rezeptorfunktion beschrieben wird [70], wurde eine Kombination dieser beiden Aminosäuren gewählt, da es sich hierbei um die beiden einzigen polaren Aminosäuren des „YCFXN“-Motivs handelt.

In allen Fällen wurde ein Austausch gegen die Aminosäure Alanin vorgenommen, welche eine strukturell kleine, apolare und hydrophobe Aminosäure (Seitenkette $-CH_3$) darstellt. Bei einem Austausch gegen z. B. Phenylalanin oder Prolin würde es eventuell durch die bei diesen Aminosäuren vorkommende, ausgeprägte Seitenkette zu einer Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur kommen. Auf der anderen Seite muss aber berücksichtigt werden, dass der Austausch im

Fall der Aminosäuren Y453 und F455 zu Alanin, auf Grund der sehr unterschiedlichen Seitenketten, umgekehrt einen Einfluss auf die Sekundär- und Terziärstruktur nehmen kann und darin eine mögliche Erklärung für die aufgezeigten Ergebnisse begründet liegt.

5.1.1 Einfluss von polaren Aminosäuren der Transmembrandomänen auf die Bindungsaffinität

HEK293 E⁺-Zellen, welche die hergestellten Rezeptormutanten exprimieren, konnten als stabile Zelllinien etabliert werden. Die Identität der Rezeptormutanten-DNA wurde zunächst durch Sequenzierung bestätigt und deren erfolgreiche Expression mittels kompetitiver Verdrängung nachgewiesen. Eine Ausnahme stellte die Deletionsmutante (Del 453-457) dar, deren DNA-Sequenz zwar als korrekt bestätigt wurde, die aber dennoch nicht erfolgreich an der Oberfläche der Zelle exprimiert werden konnte. Eine plausible Erklärung hierfür ist, dass durch die Deletion von fünf Aminosäuren eine inkorrekte Faltung des Proteins entsteht. Eine möglicherweise damit im Zusammenhang stehende drastische Änderung der Konformation könnte z. B. bewirken, dass die Signalsequenz des PTH1-Rezeptors [122] nicht mehr abgespalten werden kann. Eine Folge hiervon wäre die Unterbrechung des Transportweges über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat an die Membran.

Alle weiteren Rezeptormutanten zeigten eine gute und gleichmäßige Expression auf der Zelloberfläche, mit einer errechneten Rezeptordichte zwischen ein und zwei Mio. Rezeptoren pro Zelle. Die Bindungsaffinitäten der verschiedenen Rezeptoren, mit Ausnahme der Mutante Y453A/N457A, waren dabei vergleichbar mit dem Wildtyp opPTH1-Rezeptor. In der Gesamtheit zeigte sich jedoch eine Abweichung der gemessenen IC₅₀-Werte um den Faktor 10 vom Literaturwert des PTH1-Rezeptors, welcher zwischen 3 - 6 nM liegt [70]. Diese Abweichung ist durch eine hohe Rezeptordichte auf der Zelloberfläche zu erklären. Diese hohe Rezeptordichte ist in diesem Fall auf eine Kombination von HEK 293 E⁺-Zellen mit dem Expressionsvektor pCEP4 zurück zu führen (siehe 2.12). In einem Kontrollversuch konnte gezeigt werden, dass durch ein Verdünnen der Zellen mit nicht-transfizierten Zellen der IC₅₀-Wert korrigiert werden konnte, da im Gesamtansatz die Rezeptorzahl pro Loch dadurch abnahm. Die für die Berechnungen verwendete Annahme, dass die Konzentration des Radioliganden durch die Bindung an die Rezeptoren nicht verändert wird, wurde hierdurch wieder hergestellt. Wie sich aus weiteren Untersuchungen zeigte, ist das relative Verhältnis der IC₅₀-Werte bei beiden Versuchsansätzen vergleichbar, so dass demnach ein Rückschluss auf eventuelle Abweichungen der IC₅₀-Werte zum WT-Rezeptor gezogen werden konnte.

Betrachtet man die Doppelmutante Y453A/N457A, so zeigte diese im Vergleich zum opPTH1-Rezeptor eine verbesserte Affinität (**opP1R**: 43,5 nM ± 28,5 nM vs. **Y453A/N457A**: 15,4 nM ±

12,2 nM) zum verwendeten Liganden hPTH (1-34). In einigen früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass für die Bindung des Liganden beim PTH-Rezeptor insbesondere der N-terminale Abschnitt des Rezeptors und Bereiche der dritten extrazellulären Schleife von Bedeutung sind [125, 148]. Durch Untersuchungen an Rezeptorchimären verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren verstärken sich jedoch die Hinweise, dass nicht nur einzelnen Bereichen eine bestimmte Funktion zugeordnet werden kann, sondern dass ein Zusammenspiel multipler Domänen von Bedeutung sein kann [23, 112]. Ein wichtiges Prinzip für das Zusammenwirken der Domänen wurde an der β -adrenerge Rezeptorfamilie aufgezeigt, bei welcher polare Aminosäuren der Transmembrandomänen (TM) einen wichtigen Beitrag für die Bindungsaffinität und Ligandenspezifität leisten [5, 216]. Diese polaren Aminosäuren innerhalb der Transmembrandomänen stellen auch hier eine wichtige Komponente für die Aufrechterhaltung der Rezeptorstruktur dar [5], wobei Interaktionen von Aminosäuren der TM2 mit der TM7 von besonderer Bedeutung sind. Auch bei Untersuchungen am Ratten-PTH1-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass verschiedene polare Aminosäuren der TM2 und der TM7 miteinander interagieren und so für die Rezeptorstruktur und dessen Funktion wichtig sind [70]. So wurde in der Arbeit von T. Gardella und Kollegen gezeigt, dass die Mutation der polaren Aminosäure Arginin (R233) der TM2 und die Veränderung der polaren Aminosäure Glutamin (Q451) der TM7 zu einer drastischen Reduktion der Bindungsaffinität führen. Erstaunlicherweise wird durch die Kombination beider Mutationen dieser Effekt aufgehoben. Allerdings zeigt diese Doppelmutante den kompletten Verlust sowohl der cAMP-Signalantwort, als auch der Inositolphosphat-Antwort. Dies deutet darauf hin, dass die TM2 und die TM7 funktionell gekoppelt sind.

Bei der hier untersuchten Doppelmutante Y453A/N457A gehören beide Aminosäuren der Gruppe der polaren Aminosäuren an, welche in den hier angeführten Untersuchungen durch die apolare Aminosäure Alanin ersetzt wurden. Die Kenntnis der räumlichen Ausrichtung der Aminosäuren in diesen Rezeptorabschnitten konnte, basierend auf Modellannahmen und aus indirekten Hinweisen, gewonnen werden. Detaillierte Hypothesen hierzu können aus der Auswertung umfangreicher Interaktionsdaten von Mutationsexperimenten der PTH-Rezeptorfamilie und der Verwendung der bekannten räumlichen Struktur des Bakteriorhodopsins generiert werden. In einer solchen, von W. Schäfer, Roche Diagnostika GmbH, Penzberg, durchgeführten Untersuchung (persönliche Mitteilung, unpublizierte Daten) wird die Stellung der Aminosäure Y453 als in Richtung TM2 ausgerichtet vorhergesagt. Die Seitenkette der Aminosäure N457 hingegen, ist in diesem Modell in die Lipidschicht gerichtet. Wie auch für die oben beschriebenen Untersuchungen am β -adrenergen Rezeptor und am Ratten-PTH1-Rezeptor gezeigt, stehen auch die hier veränderten polaren Aminosäuren im Zusammenhang mit einer veränderten Affinität des Rezeptors zum Liganden, die sich in diesem Fall verstärkend auf die Bindung des Liganden an den

Rezeptor auswirkte. Im Hinblick auf die Einzelmutationen (Y453A und N457A), die nicht zu einer Veränderung der Bindungsaffinität gegenüber dem WT-Rezeptor führten, scheint es sich so zu verhalten, dass erst durch die Veränderung beider Aminosäuren die Rezeptorstruktur dahingehend verändert wird, dass ein besseres Anbinden des Liganden an den Rezeptor ermöglicht wird, ein einzelner Austausch der Aminosäuren aber nicht ausreichend ist.

5.1.2 Auswirkungen der Mutationen auf die Ankopplung an G-Proteine

Für viele G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind geladene Aminosäuren innerhalb der Transmembrandomänen entscheidend für die Rezeptorfunktion. Basierend auf Untersuchungen am Katecholaminrezeptor und am G-Protein gekoppelten Rezeptor für Photonen wurde ein Modell erstellt, indem die sieben Transmembranhelices von G-Protein gekoppelten Rezeptoren so zueinander in Kontakt treten, dass durch spezifische Helix-Helix-Interaktionen der Rezeptor in einem inaktiven Zustand stabilisiert werden kann [227]. Durch die Bindung von Agonisten an den Rezeptor wird die Position der Helices zueinander verändert, so dass durch eine Konformationsänderung von cytoplasmatischen Bereichen die Aktivierung von G-Proteinen ermöglicht wird [218].

5.1.2.1 *Änderung der Ankopplung und partielle konstitutive Aktivierung des cAMP-Signalwegs durch die TM7-Rezeptormutanten*

Für den opPTH1-Rezeptor konnte nach Stimulation mit 1000 nM hPTH (1-34) eine maximale Akkumulation von 500 pmol cAMP pro 1 Mio. Zellen gemessen werden (siehe 4.1.3.2). Der nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an hPTH (1-34) ermittelte halbmaximale Wert (EC_{50}) lag bei 40 pM. Die Messung des intrazellulär akkumulierten cAMPs für die mutierten Rezeptoren zeigte, dass die Veränderungen der Aminosäuren zu Alanin an Position C454, F455 und N457 keinen Einfluss auf die Ankopplung an das G-Protein G_s nehmen. Wie für den Wildtyp opPTH1-Rezeptor konnte auch für die Mutanten eine vergleichbare maximale angesammelte cAMP-Menge (≈ 500 pmol pro 1 Mio. Zellen) gemessen werden. Ebenso bewegten sich die halbmaximalen Werte in einem Bereich von 30 bis 80 pM, welche vergleichbar mit dem WT-Rezeptor sind.

Auffällig hingegen verhielt sich die Mutante Y453A, bei der ein höherer halbmaximaler Wert gefunden wurde (240 pM). Trotzdem zeigte diese Mutante in der maximal angesammelten cAMP-Menge einen signifikant erhöhten Wert (550 pmol) im Vergleich zum WT-Rezeptor (490 pmol). Da die basale cAMP-Akkumulation deutlich über dem des opPTH1-Rezeptors liegt (**opPTH1R** = 20 pmol vs. **Y453A** = 150 pmol), handelt es sich in diesem Fall um eine konstitutiv aktive Mutation. Eine durch konstitutiv aktive PTH1-Rezeptoren verursachte Erkrankung beim Menschen ist die metaphysäre Chondrodysplasie vom Typ Jansen. Diese äußert sich in

einer verzögerten enchondralen Knochenbildung die zu Zwergwuchs führt. Ein weiteres Merkmal dieses Krankheitsbildes ist eine Hyperkalzämie und Hypophosphatämie. Die bei einem Screen von Patienten identifizierten Rezeptormutationen zeigen zwei unterschiedliche Punktmutationen des PTH1-Rezeptors. Im ersten Fall handelt es sich um den Austausch der AS Histidin an Position 223 (TM2) zu Arginin, im anderen Fall liegt ein Austausch der Aminosäure Threonin an Position 410 (TM6) zu Prolin vor [207]. Beide Mutationen bewirken, dass das basal produzierte cAMP um den Faktor sechs höher liegt als beim WT-Rezeptor. Das Ausmaß der konstitutiven Aktivierung des cAMP-Signalweges stimmt also recht genau mit dem unserer Rezeptormutante überein, was die Annahme einer vergleichbaren Konfiguration des Rezeptors möglich erscheinen lässt. Weitere genetischen Untersuchungen an Patienten führten zu der Entdeckung einer neuen Punktmutation, welche sich in der Transmembrandomäne 7 befindet, und ebenfalls für die Chondrodysplasie vom Typ Jansen verantwortlich gemacht werden kann. Hier findet ein Austausch der AS Isoleuzin an Position 458 zu Arginin statt [206]. Die analoge Aminosäure Isoleuzin findet sich beim hier untersuchten opPTH1-Rezeptor an Position 452, welche die direkt benachbarte Aminosäure der hier untersuchten Mutante Y453A darstellt. Da die beiden nebeneinander vorkommenden Aminosäuren jeweils für eine konstitutiv aktive Rezeptormutation verantwortlich sind, könnte dieser Bereich eine wesentliche Rolle in der Stabilisierung des Rezeptors im aktiven Zustand spielen. Basierend auf 3D-Modellen von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und im Weiteren der Vergleich von Sequenzen, der zur Identifizierung von konservierten Aminosäuren führt, kann gezeigt werden, dass unter anderem in der TM7 aromatische Aminosäuren (vor allem Tyr) an wichtigen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. Diese vermitteln den Übergang zwischen verschiedenen Konformationsstadien und spielen somit eine wichtige Rolle in der Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung [227]. Da es sich bei Tyrosin um eine aromatische Aminosäure handelt, kann durch den Austausch in die Aminosäure Alanin, mit einer wesentlich kleineren Seitenkette, die Konformation des Rezeptors möglicherweise so verändert werden, dass der Zustand eines inaktiven Rezeptors nicht erreicht werden kann und eine Dauerstimulation, auch ohne Aktivierung durch den Liganden, statt findet.

Mit dieser Punktmutation ist es erstmals gelungen, durch gezielten Austausch einer Aminosäure einen konstitutiv aktiven PTH1-Rezeptor zu generieren. Alle bisher bekannten konstitutiv aktiven Rezeptormutanten wurden ausschließlich durch Analyse von defizienten PTH1-Rezeptoren von Patienten mit metaphysärer Chondrodysplasie vom Typ Jansen ermittelt. Mit dieser Rezeptormutante steht ein geeignetes Werkzeug zur Verfügung, um die Suche nach inversen Agonisten des PTH1-Rezeptors, welche eine spontane Rezeptorsignalaktivität unterdrücken können, fortzusetzen. Die Entwicklung von inversen Agonisten ist ein erster Schritt, um Krankheiten zu behandeln, die im Zusammenhang mit rezeptoraktivierenden Mutationen stehen [71].

Betrachtet man die Doppelmutante (Y453A/N457A), benötigt diese im Gegensatz zum opPTH1-Rezeptor eine höhere hPTH (1-34)-Konzentration um den halbmaximalen Effekt zu erreichen (EC_{50} : **Y453A/N457A** = 410 pM vs. **opPTH1R** = 40 pM). Auch die Gesamtmenge an akkumuliertem cAMP entspricht nur der Hälfte des WT-Rezeptors (**Y453A/N457A** = 250 pmol vs. **opPTH1R** = 490 pmol). Erstaunlich ist, dass durch die Kombination einer konstitutiv aktiven Mutation, mit dem Austausch einer polaren, aromatischen Aminosäure in eine apolare Aminosäure, mit dem Austausch einer weiteren polaren Aminosäure (Asparagin) zu Alanin, diese Eigenschaft aufgehoben werden kann und sich teilweise sogar in das Gegenteil verwandeln lässt. Dies zeigt, dass durch die Kombination dieser beiden Mutationen der Rezeptor auf der einen Seite seine Eigenschaft zurück erhält sich in einem inaktiven Zustand befinden zu können, aber auf der anderen Seite scheint eine durch diese Mutation ausgelöste Änderung der Rezeptorkonformation eine schlechtere Ankopplung an das G-Protein G_s zu bewirken. Diese verminderte Ankopplung findet trotz verbesserter Affinität des Rezeptors zum Liganden statt.

5.1.2.2 Die Transmembrandomäne 7 besitzt wichtige strukturelle Eigenschaften für die Ankopplung an den PLC-Signalweg

Da der PTH1-Rezeptor auch über den PLC-Signalweg Informationen an die Zelle vermittelt, wurden die hergestellten Rezeptormutanten auch hinsichtlich ihres Aktivierungspotentials des Inositolphosphatwegs untersucht. Im weiteren Verlauf dieses Signalwegs kommt es unter anderem durch die Bindung von Inositolphosphat an einen Inositolphosphatrezeptor zur Freisetzung von intrazellulärem Kalzium [8]. Für die hier untersuchten Rezeptormutanten wurde über die gemessenen Daten aus den Inositolphosphatversuchen hinaus zusätzlich die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium nach Stimulation mit hPTH (1-34) gemessen.

In Mutagenesestudien an G-Protein gekoppelten Rezeptoren wurde immer wieder gezeigt, dass hoch konservierte Bereiche, vor allem auch Bereiche der siebten Transmembrandomäne, eine fundamentale Rolle in der Erhaltung der Rezeptorkonformation spielen und wichtig sind, um grundlegende Eigenschaften des Rezeptors zu erhalten, wie z.B. Bindung des Liganden, G-Protein-Kopplung und Signalweiterleitung [67].

Für den opPTH1-Rezeptor wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass nach maximaler Stimulation mit hPTH (1-34) ein fünffacher Anstieg der Gesamtinositole gegenüber dem Basalwert zu messen ist. Zu einer Ausschüttung von intrazellulärem Kalzium kam es bereits nach einer Stimulation der transfizierten Zellen mit lediglich 10 nM hPTH (1-34), wobei der Basalwert wieder nach 75-80 s erreicht wurde.

Als Kontrolle für die Intaktheit des über extrazelluläre Rezeptoren vermittelten Anstiegs des intrazellulären Kalziums wurde bei allen Zellen eine zusätzliche Thrombinstimulation gewählt, um auszuschließen, dass ein beobachteter Effekt einer nicht erfolgten oder verminderten intrazel-

lulären Kalziumfreisetzung, nicht in einem zellulären Defekt begründet liegt, sondern tatsächlich durch die opPTH1-Rezeptormutanten bedingt ist. Eine Stimulation der Zellen ist durch 2 units / ml α -Thrombin möglich, wobei auch hier der Basalwert nach einer Zeitspanne von 70-80 s erreicht wurde. In Untersuchungen von M. Babich wird aufgezeigt, dass die Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium durch hPTH (1-34) und durch Thrombin in UMR106-Zellen über zwei verschiedene Rezeptoren vermittelt wird [4].

Für den PLC-Signalweg sind deutlich höhere halbmaximale Wirkkonzentration notwendig, als für den cAMP-Signalweg. In einer Arbeit von A. Iida-Klein und Kollegen [116] wird in COS-7 Zellen gezeigt, dass ein kritischer Wert der Rezeptorzahl überschritten werden muss, damit der Inositolphosphatweg messbar aktiviert wird. Weiterhin wird deutlich, dass in Relation zur Rezeptorzahl sowohl cAMP als auch Inositolphosphat ansteigen. Unsere untersuchten Rezeptormutanten wiesen nach Berechnung aus den Bindungsdaten eine Rezeptordichte von ein bis zwei Mio. Rezeptoren pro Zelle auf (siehe 4.1.3.1). Die bei A. Iida-Klein ermittelte minimale Rezeptorzahl für eine messbare Inositolantwort liegt im Bereich von 100.000 bis 200.000 Rezeptoren pro Zelle, so dass die hier berechneten Rezeptorzahlen in jedem Fall ausreichend waren um eine mögliche Stimulation des Inositolphosphatwegs nachzuweisen.

Die in dieser Arbeit maximal gemessenen cAMP-Werte zeigten bei allen Rezeptoren, trotz nicht völlig identischer Rezeptorzahlen, keine signifikanten Unterschiede. So kann ein Effekt bezüglich des PLC-Signalwegs nicht durch eine hohe Abweichung in den Rezeptorzahlen begründet werden.

Die hier untersuchten TM7-Mutanten lassen sich auf Grund ihrer unterschiedlichen Inositolphosphatantwort in zwei Gruppen unterteilen:

Für die Mutante Y453A war nach Stimulation mit 3000 nM hPTH (1-34) eine doppelt so hohe Ansammlung an markiertem Inositol messbar, als dies für den WT-Rezeptor der Fall war. Eine Freisetzung von intrazellulärem Kalzium war hier schon ab einer Konzentration von 1 nM nachweisbar. Ebenso fiel die gemessene Fluoreszenzintensität nach einer Zeitspanne von 70-80 s wieder auf das Basalniveau zurück. Zu beachten ist, dass keine Kalibrierung der gemessenen Fluoreszenzintensität stattfand, so dass zwischen den untersuchten Rezeptoren keine quantifizierbaren Vergleiche gezogen werden konnten.

Im Gegensatz zur Rezeptormutante Y453A konnte für den WT-Rezeptor bei einer Konzentration von 1 nM hPTH (1-34) noch keine Freisetzung von intrazellulärem Kalzium gemessen werden. Dieser Befund, zusammen mit der erhöhten maximalen Inositolphosphatproduktion der Y453A-Mutante, gibt einen Hinweis darauf, dass trotz gleicher Affinität zum Liganden, diesem Rezeptor eine verbesserte Ankopplung an das G-Protein G_q möglich ist. Betrachtet man die drei analysierten Punktmutationen, welche für die Chondrodysplasie vom Typ Jansen verantwortlich sind, so

zeigt sich, dass die Mutationen H223R und T410P eine deutlich reduzierte Inositolphosphat-Akkumulation im Vergleich zum WT-Rezeptor besitzen [207]. Hingegen zeigt die später identifizierte Mutation I458R, welche sich in direkter Nachbarschaft zur Mutation Y453A im opPTH1-Rezeptor findet (hier I452), eine gleich starke Inositolantwort wie der WT-Rezeptor [206]. Im Gegensatz zu den Mutationen der Transmembrandomäne 2 (H223R) und 6 (T410P) scheinen die Aminosäuren Y453 und I452 der Transmembrandomäne 7 keinen negativen Einfluss auf die Kopplung an das G-Protein G_q zu nehmen, sondern wie im Fall der Y453A-Mutante sogar eine Verbesserung der Antwort zu ermöglichen.

Auf der anderen Seite stehen die Mutationen C454A und N457A, die eine deutliche Reduktion im Hinblick auf die Aktivierung des PLC-Signalweg zeigten. Eine besondere Mutation wurde durch den Y453A/N457A-Rezeptor erreicht, welcher trotz verbesserter Affinität zum Liganden einen kompletten Ausfall dieses PLC-Signalwegs zur Folge hatte.

Für die Mutante C454A wurde das Ergebnis der Gesamtinositolmessungen auch durch die Messung der intrazellulären Kalziumfreisetzung bestätigt, welche nach Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen an hPTH (1-34) einen nur sehr schwachen Anstieg der Fluoreszenz zeigte. Ein Nachweis einer verminderten Ankopplung an den PLC-Signalweg der Mutante N457A konnte zunächst nicht bestätigt werden, da hier wie beim WT-Rezeptor nach Stimulation mit 10 nM hPTH (1-34) ein Fluoreszenzsignal messbar wurde. Allerdings hätte einen Vergleich der Intensitäten zwischen hPTH (1-34) und Thrombin möglicherweise einen Hinweis auf eine verminderte Kalziumausschüttung geben können. Somit ist nicht völlig auszuschließen, dass eine verringerte Kalziumausschüttung, welche über den PLC-Signalweg ausgelöst wird, trotzdem vorhanden ist.

Für die Doppelmutante Y453A/N457A wurde durch die Messung von intrazellulärem Kalzium nach PTH-Stimulation deutlich, dass der Austausch dieser Aminosäure (N457A) von kritischer Bedeutung ist, da auch nach einer hohen hPTH (1-34)-Dosis keine Fluoreszenz messbar war.

In drei unabhängigen Untersuchungen kann die Bedeutung eines Asparagins (N) oder einer Asparaginsäure (D) der TM7 auch an anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren gezeigt werden. So zeigen Experimente am Cholecystokin B-Rezeptor, die wichtige Rolle eines hoch konservierten Asparagin oder einer Asparaginsäure innerhalb eines (N/D)PX_{2,3}Y-Aminosäuremotivs für die Ankopplung an G_q . Die generierte Rezeptormutante N391A des Cholecystokin-B Rezeptors zeigt das gleiche Expressionsniveau in COS7-Zellen wie der WT-Rezeptor, jedoch ist diese Rezeptormutante nicht mehr in der Lage den PLC-Signalweg zu aktivieren. Dies zeigt, dass dieses Asparagin an der G_q -Protein-Ankopplung beteiligt ist [67].

Die Bedeutung von Asparaginen oder Asparaginsäuren in der TM7 wird auch durch zwei Punktmutationen am μ -Opioid-Rezeptor deutlich. Hier wurde das konservierte Asparagin der TM7 durch Asparaginsäure ersetzt und eine hoch konservierte Asparaginsäure der TM2 durch

Asparagin ausgetauscht. Beide Einzelmutationen haben extrem negative Auswirkungen auf die Kopplung an G-Proteine. Erstaunlich ist, dass durch die Kombination beider Mutationen dieser negative Effekt wieder rückgängig gemacht werden kann. Dies deutet auf eine enge Verbindung dieser beiden AS der TM2 und TM7 und ihre wichtige chemische Eigenschaft hin [256]. Für den Gonatropin-releasing Hormon-Rezeptor gilt die reziproke Ausgangssituation. Hier findet sich ein Asparagin in der TM2 und eine Asparaginsäure in TM7. Auch hier können durch eine Kombination beider reziproken Mutationen die ursprünglichen Eigenschaften des Rezeptors wieder hergestellt werden [259].

Weitere Untersuchungen zur Kopplung der TM2 und TM7 in G-Protein gekoppelten Rezeptoren findet man in der Literatur beim Thyrotropin-releasing Hormon-Rezeptor. Bei diesem Rezeptor findet sich sowohl in TM2 als auch in TM7 ein hoch konserviertes Asparagin. Die Einzelmutationen zu Alanin führen zu einer Verringerung der Aktivität des Rezeptors, wohingegen eine Kombination dieser beiden Einzelmutationen einen komplett inaktiven Rezeptor zur Folge hat [180].

Vergleicht man die verschiedenen Mitglieder der Klasse II von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, so findet sich bei allen mindestens ein Asparagin in der TM2, wie dies auch für den opPTH-Rezeptor der Fall ist. In Analogie mit den Mutationen des Thyrotropin-releasing Hormon-Rezeptors könnte die Verringerung der Inositolphosphatantwort durch die Mutante N453A durch eine Veränderung der Verbindung zwischen der TM7 und der TM2 des PTH1-Rezeptors erklärbar sein. Durch die Mutation Y453A ist eine Veränderung gelungen, die sowohl in Bezug auf den cAMP-Signalweg als auch auf den PLC-Signalweg dem Rezeptor eine deutlich verbesserte Signalübertragung ermöglicht.

Ein weiteres hilfreiches Analogiemodell ist der β -adrenerge Rezeptor. Dieser besitzt ein konserviertes Tyrosin innerhalb der TM7, welches zusammen mit anderen Aminosäuren der TM1 und TM2 eine polare Tasche bildet, in die ein Aminosäuremotiv der TM3 mit der Aminosäureabfolge „DRY“ eingebettet ist. Nach Aktivierung des Rezeptors findet eine Verschiebung dieses Motivs ins Cytoplasma statt und ermöglicht die Ankopplung an G-Proteine. Veränderungen der intramolekularen Strukturen bezüglich der polaren Tasche führen zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors [201]. Dies legt die Möglichkeit nahe, dass durch eine Veränderung des Y453 zu Alanin auch im PTH-Rezeptor eine dauerhafte Konformationsänderung, unabhängig von einer ligandeninduzierten Aktivierung, bezüglich der G_s -Ankopplung zustande kommt und dass diese Konformationsänderung zusätzlich eine bessere Ankopplung an G_q ermöglicht. Allerdings scheint diese Eigenschaft durch die hier erzeugte Doppelmutante aufgehoben zu werden, da durch die Kombinationsmutante die Ankopplung an den PLC-Signalweg komplett unterbunden wurde. So besitzt die Veränderung beider Aminosäuren einen so hohen Einfluss auf die

Konformation des Rezeptors nach Aktivierung, dass eine G-Protein Ankopplung nicht mehr stattfinden kann.

Die Rezeptormutante F455A zeigte zwar in der Aktivierung des Inositolphosphat-Signalwegs keinen signifikanten Unterschied zum WT-Rezeptor, aber der Zeitverlauf der Fluoreszenzintensität zeigte eine deutliche Verzögerung bis zum Wiedererreichen des Basalwerts. Die Zeitspanne lag hier zwischen fünf und sechs Minuten und war somit um das fünffache länger als beim WT-Rezeptor. Normalerweise kommt es nach einer Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden und anschließender Aktivierung der Signalwege zu einer raschen Desensibilisierung des Rezeptors und als Folge zu einem Entkoppeln der G-Proteine. Im Anschluss daran wird der Rezeptor internalisiert [60, 153]. Der durch die Rezeptormutation F455A verzögerten Abnahme des freigesetzten, intrazellulären Kalziums liegt möglicherweise eine verzögerte Entkopplung von G_q zu Grunde.

In einer Arbeit von J. P. Vilardaga und Kollegen konnte, durch das Einfügen von zwei Histidinen in der dritten und sechsten Transmembranhelix des PTH1-Rezeptors, eine Zinkionen-Bindungstelle generiert werden. Nach Zugabe von Zn (II) zum Versuchsansatz, wird Helix 3 mit Helix 6 durch eine Zinkionen-Brücke verbunden, so dass der Rezeptor in einer Konformation stabilisiert wird, die es nicht mehr ermöglicht an G-Proteine anzukoppeln. Daraus wird ersichtlich, dass eine relative Bewegung dieser beiden Helices zueinander eine wichtige Funktion in der Ankopplung, sowohl an G_s , als auch an G_q darstellt [241].

Die Aminosäure F455 des PTH1-Rezeptors wird, basierend auf dem Modell von Dr. W. Schäfer, in Richtung Helix 6 ausgerichtet vorhergesagt (persönliche Mitteilung von Dr. W. Schäfer, Roche Diagnostika GmbH, Penzberg), was auf eine mögliche Interaktion dieser Aminosäure mit der sechsten Transmembranhelix hindeutet. Wenn diese Aminosäure mit Helix 6 interagiert, wäre es durchaus möglich, dass durch die Mutation F455A die Verbindung zu Helix 6 gestört wird und die relative Verschiebung von Helix 2 zu Helix 6 beim Zurückkehren in die inaktive Konformation verzögert wird.

Mit dem Desensibilisierungsprozess und der anschließenden Internalisierung des Rezeptors geht eine β -Arrestin Rekrutierung aus dem Cytosol einher, wodurch die Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor eine Entkopplung der G-Proteine bewirkt und als Folge die Agonisten-vermittelte Signalübertragung unterbrochen wird [141, 185]. Eine Analyse der β -Arrestin Translokation zu unterschiedlichen Zeitpunkten, im Vergleich zum WT-Rezeptor, könnte Aufschluss darüber geben, ob möglicherweise durch eine verlangsamte Rekrutierung von β -Arrestin eine Verzögerung in der Terminierung der Signalübertragung zustande kommt.

Zusammenfassend kann aus den hier erstellten Rezeptormutanten der Schluss gezogen werden, dass im „YCFXN“-Aminosäuremotiv der siebten Transmembrandomäne, welches sich in allen

G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Klasse II wieder findet, eine wichtige strukturelle Determinante der Signalankopplung, sowohl an den cAMP-, als auch an den PLC-Signalweg enthalten ist.

Für die Ankopplung an G-Proteine ist anhand verschiedener Untersuchungen gezeigt worden, dass die relativen Stellungen der Helices untereinander von entscheidender Bedeutung sind. Zusammen mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sich im cytosolnahen Bereich der siebten Transmembrandomäne ein wichtiger Abschnitt für die Erhaltung der Konformation des Rezeptors, sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustand befindet.

5.2 Funktionelle Charakterisierung von PTH1- / PTH2-Rezeptorhybriden

Ein Aminosäurevergleich des PTH2-Rezeptors mit dem PTH1-Rezeptor zeigt eine Übereinstimmung der identischen Aminosäuresequenz von 45%, eine Gegenüberstellung der ähnlichen Aminosäuren eine Übereinstimmung von 70%. Ein beachtlicher Teil der identischen Aminosäuren ist hier innerhalb der sieben Transmembrandomänen [233] und der drei intrazellulären Schleifen zu finden. In funktioneller Hinsicht besteht zwischen den beiden Rezeptoren ein wesentlicher Unterschied für die Signaltransduktion. Der PTH1-Rezeptor vermittelt Signale sowohl über den Adenylatzyklaseweg, als auch über den PLC-Signalweg. Für den PTH2-Rezeptor ist jedoch bekannt, dass eine Signalweiterleitung nur über den Adenylatzyklaseweg, nicht aber den PLC-Weg statt findet. Eine Reihe von Publikationen beschäftigt sich damit, die strukturellen Eigenschaften und Bedingungen zu analysieren, die für diese Selektivität verantwortlich sind. Die hierfür generierten und untersuchten Mutanten-Rezeptoren, welche sowohl einen positiven als auch einen negativen Einfluss auf die Signaltransduktion besitzen, zeigen sich dabei über einen weiten Bereich der Rezeptorsequenz verteilt. Auch N-terminale, extrazelluläre Bereiche können indirekt die Signaltransduktion beeinflussen [156].

Ein Überblick analysierter Mutationen von G-Protein gekoppelten Rezeptoren findet sich unter http://www.cmbi.kun.nl/7tm/mutation/receptors_mut.html.

Durch verschiedene Mutationen, vor allem in den intrazellulären Schleifen, kann in vielen Fällen eine Abschwächung, sowohl des PLC-Signalwegs, als auch des Adenylatzyklasewegs erreicht werden [114, 115]. In dieser Arbeit wurde nun gegenteilig der Versuch unternommen, durch schrittweise Angleichung der intrazellulären Sequenz des PTH2-Rezeptors an den PTH1-Rezeptor, die Eigenschaft des PTH1-Rezeptors an den PLC-Signalweg zu koppeln, auf den PTH2-Rezeptor zu übertragen.

Ein weiteres Merkmal, welches diese beiden Rezeptoren unterscheidet, ist die Bindung der Liganden: Der PTH1-Rezeptor kann durch PTH und PTHrP, nicht aber durch TIP39 aktiviert werden [68]. Der PTH2-Rezeptor hingegen wird durch TIP39 und ebenso wie der PTH1-Rezeptor durch PTH aktiviert, nicht aber durch PTHrP. TIP39 ist höchst wahrscheinlich der physiologische Ligand für den PTH2-Rezeptor [110, 233]. Dafür spricht unter anderem, dass sowohl der PTH2-Rezeptor als auch TIP39 im Gehirn expremiert werden. PTH hingegen wird im Gehirn nur in geringen Mengen expremiert. Weiterhin zeigt TIP39 eine bessere Affinität zum PTH2-Rezeptor als PTH und aktiviert diesen selektiv. An den PTH1-Rezeptor kann TIP39 zwar binden, aber es kommt zu keiner Aktivierung des Rezeptors [236]. Die Funktion von Ligand und Rezeptor bei der Schmerzempfindung [47], der Regulation des Blutdrucks und der Einfluss auf die

Hypothalamus-Hypophysen-Achse [248] sind weitere Aspekte, die für TIP39 als physiologischen Liganden des PTH2-Rezeptors sprechen.

5.2.1 Intrazelluläre Rezeptormutationen verändern die Ligandenbindungscharakteristika nicht

Die generierten Rezeptormutanten wurden stabil in HEK 293 E⁺-Zellen transfeziert. HEK 293 E⁺-Zellen sind in diesem Fall möglicherweise ein gutes Zellsystem, da sie eine Untersuchung in einem homologen, humanen Modell erlauben. Mit Hilfe einer kompetitiven Verdrängungstudie wurden diese Zellen bezüglich ihrer Bindungseigenschaften untersucht.

Die hier berechneten halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen für die WT-Rezeptoren entsprachen exakt den in der Literatur angegebenen Werten. Für den humanen PTH1-Rezeptor lag der IC₅₀-Wert bei einer Konzentration von 4,6 nM (Literaturwert: 4-6 nM [70]). An den PTH2-Rezeptor band hPTH (1-34) schlechter, mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von 19,1 nM (Literaturwert: 10-20 nM).

Die Affinität von hPTH (1-34) wich bei den untersuchten Hybridmutanten nicht von der Affinität des Wildtyp PTH2-Rezeptor ab. Dies zeigte sich durch die berechneten IC₅₀-Werte, welche bei allen Rezeptorhybriden in einem Bereich zwischen 12 nM und 40 nM lagen. Ebenso waren alle ermittelten Rezeptorzahlen untereinander vergleichbar (1 – 3 Mio. Rezeptoren/Zelle). Bei den mit TIP39 durchgeführten Bindungsexperimenten konnten die gleichen Eigenschaften beschrieben werden, wie auch schon in früher durchgeführten Experimenten aufgezeigt wurde [98]. Auch nach Stimulation mit TIP39 wichen die Hybridrezeptoren nicht wesentlich von den Bindungseigenschaften des Wildtyp-PTH2-Rezeptors ab.

Mit den hier durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Hybridrezeptoren, bezüglich der Liganden-Bindungseigenschaften nicht unterscheidbar vom PTH2-Rezeptor waren. Ein verändertes Signalverhalten der Hybridrezeptoren im Vergleich zum PTH2-Rezeptor ist somit nicht auf unterschiedliche Bindungseigenschaften der Liganden zurück zu führen, sondern alleine mit den eingebrachten Veränderungen in Zusammenhang zu bringen.

5.2.2 Ist eine Übertragung von Signaleigenschaften vom PTH1-Rezeptor auf den PTH2-Rezeptor durch Angleichung bestimmter Aminosäuren möglich?

Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem PTH1-Rezeptor und dem PTH2-Rezeptor besteht in der Eigenschaft an den G_q-Signalweg zu koppeln. Der PTH1-Rezeptor zeigt schon eine messbare Aktivierung des Inositolphosphatwegs nach Stimulation mit einer Konzentration von 10⁻⁹ M PTH [116]. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, konnte im Vergleich zum PTH1-Rezeptor beim PTH2-Rezeptor erst nach Stimulation mit einer hohen Dosis von 10⁻⁶ M PTH ein geringer Anstieg der Gesamtinositole, als Maß für die Aktivierung der G_q-Proteine, gemessen werden. In

diesen Experimenten war auch die Menge des gesamten akkumulierten Inositolphosphats sehr unterschiedlich. So konnte für den PTH1-Rezeptor nach Stimulation mit 10^{-6} M PTH ein sechsfacher Anstieg beobachtet werden. Für den PTH2-Rezeptor betrug dieser Anstieg nur das 1,5-fache gegenüber dem Basalwert. Noch deutlicher kam dies zum Ausdruck, wenn die Zellen mit Proteinkinaseinhibitoren vorbehandelt wurden. Hier lag der Wert für das gemessene akkumulierte Gesamtinositol beim PTH1-Rezeptor 13 mal höher als der Basalwert. Für den PTH2-Rezeptor erreichte dieser Wert, nach Stimulation mit 10^{-6} M PTH, nur das Doppelte des Basalwerts. Dieser geringe Anstieg ist für die hier untersuchte Aussage, ob eine Annäherung an die Antwort des PTH1-Rezeptors erzielt werden kann, vernachlässigbar. Für die später beschriebene β -Arrestin Rekrutierung könnte dieses Phänomen allerdings von Bedeutung sein.

Wird im PTH1-Rezeptor das Aminosäuremotiv „EKKY³¹⁷⁻³²⁰“ der zweiten intrazellulären Schleife, welche eine wichtige Region in der Ankopplung an den Inositolphosphatweg darstellt, durch die Aminosäureabfolge „DSEL“ ersetzt, so verliert der Rezeptor die Fähigkeit an den Inositolphosphatweg zu koppeln [115]. Der Adenylatzyklaseweg bleibt durch diese Mutation unbeeinflusst. Das Verändern einzelner Aminosäuren dieses Bereichs führt in allen Fällen nur zu einer Verringerung der PLC-Signalantwort, nicht aber, wie durch den Austausch des Gesamtmotivs „DSEL“ zu „AAAA“, zu einem Totalausfall der Inositolphosphatantwort [115]. Die durch uns generierte Mutante P2R-L2, stellt eine Angleichung dieses Bereichs der zweiten intrazellulären Schleife des PTH2-Rezeptors an den PTH1-Rezeptor dar. Wie aber durch die Stimulation dieser Mutante sowohl mit hPTH (1-34) als auch mit TIP39 gezeigt werden konnte, ist alleine durch die Angleichung der zweiten intrazellulären Schleife an den PTH1-Rezeptor eine Kopplung an G_q , wie beim PTH1-Rezeptor nicht rekonstituierbar.

Auch für die Mitglieder der Klasse I der G-Protein gekoppelten Rezeptoren kann die dritte intrazelluläre Schleife als wichtige strukturelle Region für die Kopplung an G-Proteine identifiziert werden, wie dieses z.B. anhand des β -adrenergen Rezeptors gezeigt wird [177, 214]. Ebenso kann für die Klasse II der G-Protein gekoppelten Rezeptoren die Wichtigkeit der dritten intrazellulären Schleife für eine Ankopplung an G-Proteine aufgezeigt werden. Untersuchungen am PTH1-Rezeptor des Opossum zeigen, dass sowohl der Austausch der Aminosäureabfolge „TKLR³⁸¹⁻³⁸⁴“ der dritten intrazellulären Schleife zu „AAAA“, als auch die Veränderung der C-terminal gelegene Aminosäureabfolge „ETNA³⁸⁵⁻³⁸⁸“ zu „AAAA“, eine deutliche Reduktion der Inositolphosphatantwort zur Folge haben [114]. Ein Austausch der einzelnen Aminosäuren des „TKRL³⁸¹⁻³⁸⁴“-Motivs zu der Aminosäure Alanin zeigen aber für die im PTH2-Rezeptor vom PTH1-Rezeptor abweichenden Positionen „R³⁸³“ und „L³⁸⁴“ keine signifikante Abschwächung in der Ankopplung an den Inositolphosphatweg. Da die Aminosäureabfolge „ETNA³⁸⁵⁻³⁸⁸“ genau so auch im PTH2-Rezeptor vorkommt, nicht aber „TKRL³⁸¹⁻³⁸⁴“, wurde der Bereich der dritten

Schleife des PTH2-Rezeptor durch die Mutante P2R-L3 der PTH1-Rezeptorsequenz in diesem Abschnitt gleichgesetzt. Trotz des Ergebnisses aus der Arbeit von Z. Huang [114], dass die einzelnen Aminosäuren „R³⁸³“ und „L³⁸⁴“ keinen direkten Einfluss auf den PLC-Signalweg besitzen, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein Zusammenspiel mehrerer Aminosäuren eines Bereichs statt findet. Wie auch schon für die TM7-Mutanten diskutiert wurde, könnte auch im Fall der Hybrid-Rezeptoren zwar keine unmittelbare Beeinflussung, aber eventuell eine indirekte Einflussnahme vorhanden sein. Trotz dieser Überlegungen war es auch durch die Mutante P2R-L3 nicht möglich eine messbare Antwort bezüglich des Inositolphosphatwegs zu bekommen.

Wie in der Arbeit von J. P. Vilardaga et al. gezeigt wird [241], stehen die Helices der TM3 und TM6 des PTH1-Rezeptors über verschiedene Aminosäuren in Kontakt. Eine Änderung des Zusammenspiels beider Helices, z.B. durch Veränderung einzelner Aminosäuren, hat eine negative Auswirkung, sowohl für die Kopplung an G_s als auch an G_q. So ist es denkbar, dass auch außerhalb der Transmembranabschnitte ein Zusammenwirken verschiedener Bereiche eines Rezeptors zur vollständigen Funktionalität beitragen. Ein mögliches Zusammenwirken der zweiten und dritten intrazellulären Schleife wurde in dieser Arbeit mit der Kombinationsmutante P2R-L2/3 untersucht. Aber auch durch diese intrazelluläre Angleichung an den PTH1-Rezeptor konnte keine Aktivierung des PLC-Signalwegs erzielt werden.

Da der gesamte C-terminale Abschnitt des PTH2-Rezeptors sehr unterschiedlich zum PTH1-Rezeptor ist, wurde im weiteren hier der Versuch unternommen, durch den kompletten Austausch dieses C-terminalen Abschnitts durch die Sequenz des PTH1-Rezeptors, eine Ankopplung zu ermöglichen. Aber auch die daraus resultierende Mutante P2R-P1T brachte keinen messbaren Anstieg der Gesamtinositolphosphate. So war es letztlich auch nicht möglich, durch eine drastische Angleichung des intrazellulären Bereichs an den PTH1-Rezeptor, nämlich durch Kombination aller Einzelmutanten (= P2R-L2/3-P1T), eine Ankopplung an G_q zu erwirken.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde ein empfindlicheres Verfahren angewendet, um die Daten aus den Inositolphosphatmessungen zu bestätigen. Die Messung der akkumulierten Gesamtinositole wurde hierzu nach Behandlung der Zellen mit PKA- und PKC-Hemmern durchgeführt. Dieses bewirkt beim PTH1-Rezeptor einen erhöhten Anstieg der Gesamtinositole um das fünf- bis zehnfache. Trotzdem konnte auch in diesen Experimenten keine messbare PLC-Antwort sowohl beim Wildtyp-PTH2-Rezeptor, als auch bei den Hybridrezeptoren gefunden werden.

Eine weitere sensitive Methode die Aktivierung des G_q-gekoppelten Signalweges zu überprüfen, ist die Messung des intrazellulär ausgeschütteten Kalziums nach Stimulation der verschiedenen Rezeptoren. So konnte für den PTH1-Rezeptor schon ab einer Konzentration von 10⁻⁹ M

PTH (1-34) ein deutlicher Anstieg des intrazellulär ausgeschütteten Kalziums gemessen werden. Sowohl für den PTH2-Rezeptor, als auch für die von diesem Rezeptor abgeleiteten Hybrid-Rezeptoren war kein Fluoreszenzsignal detektierbar. Die Methode der Messung der akkumulierten Gesamtinositolphosphate und die Messung des Anstiegs des intrazellulären Kalziums zeigte übereinstimmend, dass nach Stimulation der mit den Hybridrezeptoren transfizierten Zellen, keine Ankopplung an den Inositolphosphatweg statt fand.

Interessante Versuche aus der Literatur zeigen aber, dass es möglich ist Eigenschaften von einem Rezeptor auf den anderen zu übertragen, indem man die dritten intrazellulären Schleifen austauscht. So ist es möglich dem β 2-adrenergen Rezeptor (β 2AR), welcher nur an den G_s -Signalweg koppelt ein Anbinden an den G_q -Signalweg zu ermöglichen, indem ein großer Anteil der dritten intrazellulären Schleife gegen den entsprechenden Anteil des α 1-adrenergen Rezeptors (α 1B)AR) ausgetauscht wird [39]. In einem weiteren Experiment kann bestätigt werden, dass ein Übertragen von Signaleigenschaften von einem Rezeptor auf einen anderen Rezeptor durch den Austausch von intrazellulären Bereichen möglich ist. Der M1-muscarine-cholinerge Rezeptor (M1AChR) kann an den G_q -Signalweg, nicht aber an den G_s -Signalweg ankoppeln. Das Ersetzen der dritten intrazellulären Schleife des M1AChR, durch den entsprechenden Anteil der dritten Schleife aus dem β 2-adrenergen Rezeptor, überträgt die Eigenschaft an den cAMP-Signalweg zu koppeln auf den M1AChR. Dieser chimäre M1AChR kann nun sowohl an G_q als auch an G_s ankoppeln [254]. Auch wenn in diesen Fällen eine Übertragung von Eigenschaften von einem auf den anderen Rezeptor möglich war, zeigen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, dass trotz fast vollständiger intrazellulärer Angleichungen des PTH2-Rezeptors, an den PTH1-Rezeptor, keine Kopplung an das G_q - Protein statt findet.

Eine mögliche Erklärung für den überraschenden Befund, dass sich der Inositolphosphatweg durch verschiedene Angleichungen an den PTH1-Rezeptor nicht rekonstituieren lässt, liegt in dem Zusammenwirken mehrerer Teilsequenzen, nicht nur innerhalb cytosolischer Abschnitte, sondern auch solcher, welche innerhalb von Transmembranabschnitten liegen. Wie auch an Untersuchungen der Transmembrandomäne 7 des PTH1-Rezeptors gezeigt wurde (siehe 5.1), ist es durchaus möglich, dass Aminosäuren die in den Transmembranabschnitten zu finden sind einen entscheidenden Einfluss auf die Kopplung an die G-Proteine nehmen können. Nicht zuletzt dadurch, dass diese den Rezeptor in einer Konformation stabilisieren, welche die Ankopplung an G-Proteine erst ermöglicht. Daraus wird ersichtlich, dass nicht nur einzelne Aminosäuren an der Kopplung unterschiedlichster Proteine an den Rezeptor verantwortlich sind, sondern dass der Gesamtkontext, indem sie sich befinden, entscheidend dazu beiträgt.

5.2.3 Wie wirkt sich eine Angleichung des intrazellulären Bereichs des PTH2-Rezeptors an den PTH1-Rezeptor auf den cAMP-Signalweg aus?

Eine intrazellulärer Angleichung großer Teilbereiche des PTH2-Rezeptors an den PTH1-Rezeptor konnte die Eigenschaft des PTH1-Rezeptors an den G_q -Signalweg zu koppeln nicht übertragen. Jedoch konnten aus diesen Hybridrezeptoren wichtige, neue Erkenntnisse über das Zusammenspiel bestimmter Bereiche für die Ankopplung an den cAMP-Weg gewonnen werden. Für G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Rhodopsin-Familie, auch Klasse I genannt, zeigt eine Vielzahl von Studien, dass eine Aktivierung von G-Proteinen durch Aminosäuren der zweiten und dritten intrazellulären Schleife und durch proximale Teile des C-Terminus reguliert wird [174, 251]. Hingegen ist die erste intrazelluläre Schleife der Klasse I von G-Protein gekoppelten Rezeptoren für eine G-Protein Ankopplung meist nicht von Bedeutung [5, 251]. Auch anhand von Hybridrezeptoren, bei denen die erste intrazelluläre Schleife des Glukagon-Rezeptors gegen die erste intrazelluläre Schleife des Dopamin-Rezeptors ausgetauscht wurde wird deutlich, dass dieser Bereich zwar für die Proteinfaltung und Oberflächenexpression wichtig ist, aber nicht bei der Ankopplung von G-Proteinen eine Rolle spielt [43]. Allerdings führt der Austausch der zweiten und dritten intrazellulären Schleife des Glukagon-Rezeptors gegen die erste Schleife des Dopamin-Rezeptors zu einer deutlichen Reduktion der cAMP-Antwort. Eine Kombination beider Mutationen zieht sogar einen kompletten Verlust der Adenylatzyklaseantwort nach sich.

Durch die in dieser Arbeit generierten Hybridrezeptoren P2R-L2 und P2R-L3 wird eine Angleichung an die zweite und dritte intrazelluläre Schleife des PTH1-Rezeptors vorgenommen. Die Mutante P2R-L2 unterscheidet sich dann nur noch durch zwei Aminosäuren von der zweiten intrazellulären Schleife des PTH1-Rezeptors. Der Unterschied zum PTH1-Rezeptor in der dritten intrazellulären Schleife reduziert sich, durch die Hybrid-Mutante P2R-L3, auf vier unterschiedliche Aminosäuren. Allerdings liegen die ausgetauschten Bereiche dann in einem anderen Umfeld von Aminosäuren, nämlich dem des PTH2-Rezeptors.

Für den PTH1-Rezeptor wird in einer Arbeit von A. Iida-Klein und Kollegen gezeigt, dass es durch die Abwandlung der Aminosäureabfolge „EKKY³¹⁷⁻³²⁰“ der zweiten intrazellulären Schleife in die Aminosäureabfolge „DSEL³¹⁷⁻³²⁰“ nur zur Beeinträchtigung des PLC-Signalwegs kommt, dass diese Veränderung aber keinen Einfluss auf den cAMP-Signalweg nimmt [115]. Dieses wird durch die in dieser Arbeit generierte Mutante P2R-L2 auch für den PTH2-Rezeptor belegt, da hier sowohl das maximal akkumulierte cAMP, als auch der halbmaximale Wert mit dem des Wildtyp-PTH2-Rezeptors übereinstimmten. Die oben genannten Befunde von A. Iida-Klein et al. und die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Veränderungen in der zweiten intrazellulären Schleife keinen wesentlichen Einfluss auf die Rezeptorstruktur und somit auf die Ankopplung an das G-Protein G_s nehmen.

Der C-terminale Bereich der dritten intrazellulären Schleife hingegen hat einen erheblichen Einfluss auf die Ankopplung an den cAMP-Signalweg. Wie schon in einer anderen Arbeit für den PTH1-Rezeptor gezeigt wird, ergibt eine Mutation des „TKLR³⁸¹⁻³⁸⁴“-Motivs zu „AAAA“ eine um die Hälfte reduzierte Aktivierung der Adenylatzyklase im Vergleich zum WT-Rezeptor. Auch der halbmaximale Effekt ist deutlich gegenüber dem WT-Rezeptor verringert. Erstaunlich ist, dass nach Veränderung des „TKLR³⁸¹⁻³⁸⁴“-Motivs an jeder einzelnen Position zu Alanin nur die Mutanten T381A und K382A zu einer Reduktion der cAMP-Antwort führen, nicht aber die Einzelmutationen L383A und R384A [114]. Zwar zeigte die in dieser Arbeit untersuchte Mutante P2R-L3 einen deutlich schlechteren halbmaximalen Effekt gegenüber dem PTH2-Rezeptor (**P2R-L3** = 1,26 nM ± 0,66 nM vs. **P2R** = 0,56 nM ± 0,29 nM), allerdings ist die Reduktion des gesamten cAMP hier nicht so deutlich ausgeprägt.

Ein Vergleich der Untersuchungen von Z. Huang et al. mit den hier dargestellten Ergebnissen für die Hybrid-Mutante P2R-L3 zeigt, dass nicht immer ein Umkehrschluss aus schon untersuchten Mutationen gezogen werden kann. Zwar gehören der PTH1-Rezeptor und der PTH2-Rezeptor der selben Klasse von G-Protein gekoppelten Rezeptoren an und auch strukturell weisen beide Rezeptoren hohe Gemeinsamkeiten auf, dennoch ist die Auswirkung einer Mutation, welche sich zwar an einer vergleichbaren Position innerhalb der untersuchten Rezeptoren befindet, nicht auch automatisch auf einen nahe verwandten Rezeptor zu übertragen. Somit trägt auch die Umgebung dieser Aminosäuren einen entscheidenden Faktor zur Funktionsfähigkeit eines Rezeptors bei. Untermauert wird dies durch die Kombination der Einzelmutanten, resultierend im Hybridrezeptor P2R-L2/3, welcher eine deutlich schlechtere Ankopplung an das G-Protein G_s besitzt und ebenso einen deutlich schlechteren halbmaximalen Effekt aufweist (**P2R-L2/3** = 1,51 nM ± 1,15 nM vs. **P2R** = 0,56 nM ± 0,29 nM).

Eine mögliche Kooperativität verschiedener Bereiche eines Rezeptors bei der Bindung an G-Proteine wird durch die Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Mutante P2R-L2/3-P1T eindrucksvoll dargestellt. So ist die Einzelmutante P2R-P1T, die durch den Austausch des C-Terminus des PTH2-Rezeptors durch den C-Terminus des PTH1-Rezeptors hervorgegangen ist, stark in der Aktivierung des cAMP-Signalwegs eingeschränkt. Die maximale Antwort beträgt nur noch ca. 35 % des PTH2-Rezeptors. Hingegen kann durch die Kombination aller einzelnen Mutanten (P2R-L2/3-P1T) die Bindung an G_s zum größten Teil wieder hergestellt werden. Dieser Hybrid-Rezeptor erreicht wieder ca. 65 % des gesamten akkumulierten cAMPs des WT-Rezeptors nach Stimulation mit hPTH (1-34). Das durch den Austausch des C-Terminus entstandene Defizit im cAMP-Weg kann durch eine Kombination mit den Mutationen der zweiten und dritten intrazellulären Schleife teilweise wieder ausgeglichen werden, so dass dieser Be-

fund den Schluss zulässt, dass eine Interaktion zwischen den beiden intrazellulären Schleifen und dem C-Terminus besteht.

Alle hier dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf eine Stimulation der Rezeptoren mit hPTH (1-34). Der oben beschriebene Effekt wird bei der Durchführung der Experimente mit TIP39 als Liganden noch deutlicher. Die maximale cAMP-Antwort für die Hybrid-Mutante P2R-P1T liegt mit hPTH (1-34) bei 35 % gegenüber dem PTH2-Rezeptor. Nach Stimulation mit TIP39 können hingegen nur noch 25 % des gesamten akkumulierten cAMPs des PTH2-Rezeptors gemessen werden. Im Weiteren zeigt die Hybrid-Mutante P2R-L2/3-P1T nach Stimulation mit hPTH (1-34) eine Rekonstitution des cAMP-Signals, welches nun 64 % des PTH2-Rezeptors beträgt. Drastischer zeigt sich die verbesserte Ankopplung an den cAMP-Signalweg nach Stimulation mit TIP39. Hier sind sogar 83 % des akkumulierten cAMPs vom PTH2-Rezeptor messbar. Da die Ergebnisse mit TIP39 noch deutlicher ausfallen, zeigen diese Untersuchungen, dass der oben beschriebene Effekt nicht in einem ligandenspezifischen Phänomen begründet liegt.

In der Vergangenheit wurde durch unterschiedliche Experimente gezeigt, dass es durch die Veränderung kleiner Aminosäureabfolgen oder sogar einzelner Aminosäuren [114] möglich ist die Ankopplung an verschiedene Signalwege sowohl positiv, als auch negativ zu beeinflussen. In manchen Fällen ist es sogar gelungen, eine Selektivität für den einen oder anderen Signalweg zu erreichen [115].

Zusammenfassend lässt sich durch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es einfacher ist, einen Signalweg welcher durch den WT-Rezeptor aktiviert werden kann durch unterschiedliche Aminosäureveränderungen abzuschwächen, als eine Ankopplung eines im WT-Rezeptors nicht vorkommenden Signalwegs zu erreichen. Durch die Vielzahl der untersuchten Mutationen an den verschiedensten Positionen eines Rezeptors wird deutlich, dass die Veränderung einer einzelnen Aminosäure viele unterschiedlicher Veränderungen im gesamten Rezeptor nach sich ziehen kann und es somit nicht möglich ist eine universale Konsensussequenz für die Ankopplung an G-Proteine zu definieren.

5.2.4 Eine durch den Liganden induzierte Translokation von β -Arrestin2 ist beim PTH2-Rezeptor und dessen Hybridrezeptoren unabhängig von einer G-Protein Aktivierung

Wichtige Regulatorproteine im Zusammenhang mit der Inaktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind die beiden Arrestin-Isoformen β -Arrestin1 und β -Arrestin2. Als Antwort auf eine Aktivierung des Rezeptors und die häufig damit in Zusammenhang stehende Phosphorylierung des Rezeptors durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs), kommt es zur Rekrui-

tierung von β -Arrestinen aus dem Cytosol. Der entstehende Rezeptor-Arrestin-Komplex ist in vielen Fällen für die anschließende Internalisierung notwendig [57]. Beim PTH1-Rezeptor findet eine Co-Internalisierung mit β -Arrestin statt [31]. Die Desensibilisierung und anschließende Endozytose erfolgt beim PTH1-Rezeptor über einen Dynamin- und Clathrin-abhängigen Weg [29, 60, 241]. Es wurde in früheren Untersuchungen gezeigt, dass β -Arrestin Clathrin mit hoher Affinität bindet und dort als Adaptor zwischen dem aktivierten, phosphorylierten Rezeptor und den „Clathrin-coated“-Vesikeln fungiert [58, 84, 142]. Nach dem Ablösen des Liganden (PTH) schließt sich ein Recyclingprozess an, der aber β -Arrestin unabhängig ist [31]. Ob der PTH2-Rezeptor einer ähnlichen Regulation unterliegt ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht aufgeklärt und sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Verschiedene strukturelle und funktionelle Rezeptoruntersuchungen deuten daraufhin, dass eine G-Protein Aktivierung und die darauf folgende Endozytose des Rezeptors nicht in Zusammenhang stehen und diese Prozesse von unterschiedlichen Konformationen des Rezeptors abhängig sind. Dies wird durch verschiedene Versuchsansätze z. B. für den PTH1-Rezeptor [14, 241], den β -2-adrenergen Rezeptor [34], den Endothelin-Rezeptor [9] oder den Cholecystokinin-Rezeptor [196] gezeigt.

Für den PTH1-Rezeptor konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Rekrutierung von β -Arrestin2 aus dem Cytosol an die Zellmembran nach Stimulation mit hPTH (1-34) statt findet, dessen Folge die Internalisierung des Rezeptors ist. Dies kann durch die nach zehn Minuten sichtbaren grün-fluoreszierenden Vesikel im Cytosol gezeigt werden. Hierbei handelt es sich um β -Arrestin-GFP, welches zusammen mit dem Rezeptor über „Clathrin-coated“-Vesikel den Internalisierungsprozess durchläuft.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass für den PTH2-Rezeptor nach Stimulation mit 1000 nM hPTH (1-34) keine Rekrutierung von β -Arrestin2 an die Membran statt findet. Es ist bekannt, dass die Rekrutierung von β -Arrestin an den PTH1-Rezeptor von einer bestimmten Rezeptorkonformation abhängig ist, die sich aber von den Konformationen, welche für die Ankopplung an den cAMP- und PLC-Signalweg notwendig sind, unterscheidet [241]. Auch für den PTH2-Rezeptor trifft dieses offenbar zu, da trotz einer starken cAMP-Signalantwort nach Stimulation mit hPTH (1-34) eine β -Arrestin2 Translokation an die Membran nicht zu beobachten ist. Auch die mit einer β -Arrestin Translokation einhergehende Internalisierung ist für den PTH2-Rezeptor nach Stimulation nicht nachweisbar. In einer Arbeit von A. Bisello und Kollegen kann gezeigt werden, dass eine Internalisierung des PTH2-Rezeptor beobachtet werden kann, wenn die beiden Regionen, nämlich der N-terminale Bereich des PTH2-Rezeptors und die dritte extrazelluläre Schleife, welche für die Bindungselektivität verantwortlich gemacht werden, gegen

diese Regionen des PTH1-Rezeptors ausgetauscht werden. Ein Austausch der dritten intrazellulären Schleife und des gesamten C-Terminus hingegen zeigt keine Internalisierung des Rezeptors nach Stimulation mit hPTH (1-34) [15].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass weder eine Angleichung der dritten intrazellulären Schleife an den PTH1-Rezeptor, noch der Austausch des C-Terminus, welcher beim PTH1-Rezeptor für eine β -Arrestin Interaktion verantwortlich gemacht werden kann [14, 61, 241], eine Rekrutierung von β -Arrestin bewirken konnte. Ebenso war durch die Angleichung der zweiten intrazellulären Schleife an den PTH1-Rezeptor und durch die Kombination aller Mutationen keine β -Arrestin Translokation und eine anschließende Internalisierung beobachtbar. Dieses, und die trotz der Mutationen mehr oder weniger messbare cAMP-Antwort bei allen Hybridrezeptoren, untermauert den Befund, dass nur die durch einen bestimmten Liganden ausgelöste Konformationsänderung zu der notwendigen Rezeptorkonstellation führt, welche für die Rekrutierung von β -Arrestin notwendig ist. Die Ankopplung an G-Proteine hingegen spielt in diesem Fall keine Rolle.

Die Visualisierung der β -Arrestin2 Lokalisation nach der Stimulation mit TIP39 zeigte, dass für den PTH1-Rezeptor keine Rekrutierung aus dem Cytosol beobachtet werden kann. TIP39 wirkt am PTH1-Rezeptor als Antagonist, weil es zwar als Ligand gebunden wird, aber eine Signalübertragung durch die Kopplung von G-Proteinen unterbleibt [110]. Durch Bindung des Liganden TIP39 wird offensichtlich keine Konformationsänderung am Rezeptor ausgelöst, die für eine β -Arrestin Translokation hinreichend ist.

Der PTH2-Rezeptor hingegen ist in der Lage nach einer Aktivierung durch TIP39 β -Arrestin2 aus dem Cytosol an die Zellmembran zu bringen. In einer kürzlich erschienenen Studie wird angenommen, dass eine Rekrutierung von β -Arrestin im Zusammenhang mit einer PKC β -Aktivierung durch den PTH2-Rezeptor steht. Nach Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer Verlagerung dieses Proteins aus dem Cytosol an die Membran [15]. Experimente in der hier vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass über die Messung der akkumulierten Gesamtinositole nach der Rezeptoraktivierung mit 1000 nM TIP39 ein geringer Anstieg messbar wurde (Daten nicht gezeigt). Diese wesentlich geringere Aktivierung der PKC β durch den PTH2-Rezeptor im Vergleich zum PTH1-Rezeptor zeigen auch die in der Arbeit von A. Bisello und Kollegen veröffentlichten Aufnahmen. Die dargestellte Fluoreszenz durch PKC-GFP ist am PTH2-Rezeptor durch 100 nM TIP39 wesentlich schwächer, als dies für den PTH1-Rezeptor nach Stimulation mit 100 nM hPTH (1-34) gezeigt werden kann [15].

Eine Diskrepanz ergibt sich allerdings für die Aktivierung des PTH2-Rezeptors durch hPTH (1-34). Unsere Experimente zeigten sowohl nach Stimulation mit hPTH (1-34), als auch mit TIP39 einen messbaren Inositolphosphatanstieg. Hingegen wurde von A. Bisello und Kolle-

gen bei der Verwendung von PKC β -GFP, als indirekter Nachweis der G $_q$ -Protein-Ankopplung, keine Rekrutierung von PKC β -GFP nachgewiesen. Was hier allerdings beachtet werden muss, ist die Tatsache, dass eine Rekrutierung von PKC β -GFP bereits nach einer Simulation von 100 nM mit dem jeweiligen Liganden gemessen wurde. Im Fall der Inositolphosphatmessung ist dieser Anstieg erst nach einer sehr hohen Konzentration der Liganden zu beobachten (1000 nM). Weiterhin ist wahrscheinlich die Sensitivität des radioaktiven Inositolphosphat-Assays wesentlich geringer, als die Visualisierung von PKC durch ein GFP-Konstrukt. So ist nicht auszuschließen, dass der PTH2-Rezeptor bei geringeren Konzentrationen von TIP39 PKC an die Membran rekrutieren kann, nach Stimulation mit hPTH (1-34) hingegen nicht. Eine Ausnahme bilden die hier untersuchten Hybridrezeptoren P2R-L2, P2R-L3, P2R-P1T und P2R-L2/3. Bei diesen Mutanten kann auch nach einer Stimulation mit 1000 nM TIP39 kein Anstieg der Inositolphosphatantwort gemessen werden. Die Lokalisation von β -Arrestin an der Zellmembran durch TIP39 unterscheidet sich jedoch in diesen Fällen auch nicht von der Lokalisation des PTH2-Rezeptors. Da ein indirekter Nachweis der G $_q$ -Protein-Aktivierung durch PKC β -GFP höchst wahrscheinlich sensitiver ist, als eine Messung der akkumulierten Gesamtinositolphosphate, ist es im Weiteren notwendig auch die hier erzeugten Hybridrezeptoren auf die Fähigkeit PKC β -GFP zu rekrutieren zu untersuchen. Möglicherweise kann dadurch ein Zusammenhang zwischen einer PKC-Aktivierung und der Rekrutierung von β -Arrestin an die Membran bestätigt werden. In jedem Fall lassen die hier dargestellten Ergebnisse auch für den PTH2-Rezeptor den Schluss zu, dass es sich bei der Rekrutierung von β -Arrestin aus dem Cytosol an die Zellmembran um einen durch den Liganden bestimmten Effekt handelt. Dieser Vorgang ist offenbar unabhängig von einer G-Protein-Aktivierung durch TIP39.

5.2.5 Aktivierung von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) durch hPTH (1-34) und TIP39

Es gibt viele Anhaltspunkte dafür, dass die Signaltransduktion über G-Proteine alleine nicht ausreichend ist, um die Vielzahl der zellulären Antworten zu erklären die durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt werden. Wichtige Regulatoren des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung sind z.B. die Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK).

Um die nicht vorhandene Ankopplung des PTH2-Rezeptors und dessen hier generierten Hybridrezeptoren an den PLC-Signalweg weiter aufzuklären, wurde im weiteren auch die Aktivierung von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) untersucht, welche in unterschiedlichen Modellsystemen oft von einer PLC-Aktivierung abhängig sind.

Für den PTH1-Rezeptor konnten wir zeigen, dass nach Expression in HEK 293E+-Zellen und anschließender Stimulation mit 100 nM PTH (1-34) nach fünf Minuten eine Zunahme der

phosphorilierten Form der MAP-Kinase ERK1/2 (extracellular-signal related kinase1 and 2) zu beobachten ist. Diese Aktivierung ist zeitlich begrenzt. Im Western Blot konnte deswegen nach 15 Minuten eine deutliche Reduktion der phosphorilierten Form nachgewiesen werden (siehe 4.2.5). Mit TIP39 ist keine Aktivierung von ERK1/2 möglich.

Für den PTH2-Rezeptor konnte hier zum ersten mal gezeigt werden, dass nach der Expression in HEK293E+-Zellen sowohl nach PTH (1-34) Stimulation, als auch nach TIP39-Stimulation die Aktivierung von ERK1/2 erfolgt. Gezeigt wird dies nach einer PTH (1-34) und einer TIP39 Stimulation und der nach 5 Minuten detektierbaren Bande in beiden Fällen. Eine zeitliche Begrenzung konnte auch hier sowohl nach PTH (1-34) als auch nach TIP39 Stimulation gezeigt werden, da die Bande nach 10 Minuten deutlich schwächer ausfiel.

Die Umstände zur Aktivierung von MAP-Kinasen sind entscheidend vom verwendeten Zellsystem abhängig. So erfolgt in der Osteoblastenzelllinie UMR-106 die Aktivierung von ERK1/2 über den PTH1-Rezeptor nur nach Stimulation mit niedrigen Dosen an PTH ($\sim 10^{-11}$ M). Hingegen kann durch hohe PTH-Konzentrationen ($\sim 10^{-8}$ M) keine Aktivierung nachgewiesen werden [219]. In CHO-Zellen (Ovarialzelllinie des Hamsters) verhält es sich wie bei den in dieser Arbeit verwendeten HEK293 E+-Zellen. Hier sind hohe PTH-Konzentrationen notwendig um die phosphorilierte Form von ERK1/2 nachzuweisen [239].

Ebenso wie unterschiedliche Konzentrationen in den verschiedenen Zellsystemen notwendig sein können, ist es auch von den verwendeten Zellen anhängig welche Signalwege für eine Aktivierung von ERK1/2 notwendig sind. So erfolgt in UMR-106 Zellen die Aktivierung von ERK1/2 über den PLC-Signalweg [219]. In CHO-Zellen hingegen ist diese Aktivierung cAMP-abhängig [239]. In dem in dieser Arbeit verwendeten Zellsystem ist die Aktivierung von ERK1/2 unabhängig vom PLC-Signalweg, da hier für den PTH2-Rezeptor und die davon abgeleiteten Hybridrezeptoren gezeigt werden konnte, dass eine Ankopplung an G_q nicht statt fand, aber dennoch die Aktivierung von ERK1/2 sowohl durch hPTH (1-34) als auch durch TIP39 möglich war.

Im Zusammenhang mit dem Angiotensin II Typ1a-Rezeptor (AT1aR) wird gezeigt, dass es bei diesem Rezeptor sowohl über die Aktivierung von G_q zur Phosphorylierung von ERK1/2 kommt, dass aber auch ein β -Arrestin-abhängiger Weg existiert. Wird in COS-7 Zellen, welche den AT1a-Rezeptor exprimieren β -Arrestin überexprimiert, kommt es nach Stimulation mit Angiotensin zu einer Reduktion der Inositolphosphat-Hydrolyse, aber im Gegenzug zu einer gesteigerten Stimulation der ERK1/2-Phosphorylierung [225]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 durch β -Arrestin ausgeschlossen werden, da der PTH1-Rezeptor und die davon abgeleiteten Hybrid-Rezeptoren nach Stimulation mit hPTH (1-34) keine β -Arrestin-Translokation an die Membran zeigten, aber trotzdem ein Anstieg des phosphorylierten ERK1/2 nachweisbar war.

Mit Hilfe der Untersuchungen der β -Arrestin-Translokation und der Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 konnte hier gezeigt werden, dass die Aktivierung von ERK1/2 durch den PTH2-Rezeptor in HEK293E+-Zellen unabhängig von einer PLC-Aktivierung ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Aktivierung auch nicht die Translokation von β -Arrestin an die Membran benötigt.

5.3 Analyse der Interaktion des humanen PTH1-Rezeptors mit intrazellulären Proteinen

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es neue intrazelluläre Interaktionspartner des PTH1-Rezeptor zu identifizieren. Hierzu wurden der Abschnitt der dritten intrazellulären Schleife (IZL-3) und der C-terminale Bereich (CTERM) des PTH1-Rezeptors als „Köder“ für „Yeast-two-Hybrid“-Experimente verwendet. Diese beiden Anschnitte stellen zusammen ca. 80-85% der intrazellulären Interaktionsfläche des Rezeptors dar und übernehmen, wie auch in den vorangegangenen Teilabschnitten dieser Arbeit gezeigt, eine wichtige Rolle in der Ankopplung an verschiedene Signaltransduktionswege. Die Niere ist ein wichtiges Zielorgan der PTH-Wirkung und exprimiert in vielen Anteilen den PTH1-Rezeptor. Aus diesem Grund wurde für das „Screening“ eine Nieren-cDNA-Bibliothek verwendet.

5.3.1 Identifizierung eines PDZ-Proteins

Die Durchführung des „Yeast-two-Hybrid“-Experiments führte zu einer Vielzahl positiver Kolonien, sowohl mit dem „IZL-3-Köderplasmid“, als auch mit dem „CTERM-Köderplasmid“. Somit war die erste Voraussetzung erfüllt, dass die als „Köder“ verwendeten Rezeptorteilabschnitte, als Fusionsprotein mit einer GAL4-Bindungsdomäne, in der Lage sind mit anderen Fusionsproteinen zu interagieren und im Zellkern der Hefe eine Aktivierung der Reportergene zu bewirken. Eine Autoaktivierung der beiden verwendeten „Köderplasmide“ wurde durch Tests auf Minimalmedium-Platten ausgeschlossen. Eine Zusammenstellung der verschiedenen Interaktionspartner findet sich in Kapitel 4.3.3, Tabelle 4-8 und Tabelle 4-9. Eine Einschätzung bezüglich eventueller falsch positiver Klone ist ebenfalls in Kapitel 4.3.3 aufgelistet.

Aus der Liste der verschiedenen identifizierten Interaktionspartner wurde das PDZK1-Protein als potentiell hoch relevantes Interaktionsprotein ausgewählt. Eine Analyse mit Hilfe der Motiv-Datenbank „Pfam“ (<http://www.sanger.ac.uk/Pfam/search.shtml>) zeigte, dass es sich hier um ein PDZ-Protein mit vier PDZ-Domänen handelt. Weitere Protein-Motive konnten mit Hilfe der „Pfam-Datenbank“ in PDZK1 nicht ermittelt werden. Auf Grund verschiedener Hinweise auf die Wichtigkeit von PDZ-Proteinen untersuchten wir das gefundene PDZ-Protein PDZK1 weiter.

In der letzten Zeit haben die sogenannten PDZ-Proteine in der Organisation von Proteinkomplexen an der Plasmamembran zunehmend an Bedeutung gewonnen. Außerdem wird ihnen eine wichtige Rolle als Adhäsionsmoleküle in der Signaltransduktion zugeschrieben [55]. Eine Rolle von PDZ-Proteinen für den PTH1-Rezeptor konnte erstmals durch M. Mahon und Kollegen gezeigt werden. In dieser Arbeit von M. Mahon und Kollegen wurden, ebenfalls unter Verwendung des C-Terminus als „Köderplasmid“, die PDZ-Proteine NHERF-1 und NHERF-2 (Na^+/H^+ ex-

changer regulatory factor) als Interaktionspartner des humanen PTH1-Rezeptors identifiziert. Diesen Proteinen kommt offenbar eine Rolle in der Regulation der Signaltransduktion des PTH1-Rezeptors zu. Als Zellen zur *in vivo* Untersuchung wurden in diesem Fall PS120 Zellen verwendet. PS120 ist eine Fibroblastenzelllinie des Hamsters, welche NHERF-1 und NHERF-2, sowie den PTH1-Rezeptor nicht exprimiert. Es wird dort gezeigt, dass in PS120-Zellen, durch Kotransfektion dieser Zellen mit dem PTH1-Rezeptor und NHERF-2 eine Verschiebung der Signalantwort zu Gunsten des PLC-Signalwegs statt findet. Dieses geschieht durch die Stimulation des inhibitorischen G-Proteins $G_{i/o}$ [152].

Da in unseren Versuchen durch den Hefetest nur ein vorläufiger Hinweis auf eine relevante Interaktion in Säugetierzellen möglich ist, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine Bestätigung der Interaktion von PDZK1 mit dem PTH1-Rezeptor durch zwei weitere unterschiedliche Ansätze, welche nicht auf einem Hefesystem basieren, erbracht. Zum einen konnte die Interaktion durch Koimmunpräzipitation bestätigt werden. Der entsprechende C-terminale Abschnitt, welcher auch als „Köder“ im Hefe-Interaktionstest Verwendung fand, wurde als Fusionsprotein mit einem c-Myc Tag erfolgreich *in vitro* translatiert. Eine *in vitro*-Translation war ebenfalls für das komplette PDZK1, mit einer Länge von 519 Aminosäuren, möglich. Dieses Protein konnte erfolgreich als Fusionsprotein mit einem HA-Tag transkribiert und translatiert werden. Eine Inkubation beider Proteine und die anschließende Immunpräzipitation mit einem der entsprechenden Antikörper zeigte, dass PDZK1 mit dem C-Terminus des PTH1-Rezeptors interagieren kann. Die Immunpräzipitation war nur mit einem der beiden Antikörper möglich. Eine Erklärung hierfür könnte in einer schwachen und temporär begrenzten Bindung der beiden Proteine liegen.

Eine zusätzliche Bestätigung der Interaktion konnte durch ein „GST-pull-down“-Experiment erbracht werden. Der C-Terminus des PTH1-Rezeptors, welcher als Fusionsprotein mit einem GST-Anteil (Glutathion-S-Transferase) in Bakterien exprimiert wurde, konnte nach erfolgreicher Aufbereitung an Glutathion-Sepharose gebunden werden. Nach Zugabe von Zelllysat aus transient mit pcDNA3.1-PDZK1 transfizierten HEK 293 E+-Zellen, konnte das gebundenen PDZK1 mittels eines spezifischen Antikörpers in der SDS-PAGE nachgewiesen werden.

Somit wurde in dieser Arbeit in drei unabhängigen Versuchsansätzen gezeigt, dass PDZK1 an den C-Terminus des PTH1-Rezeptors bindet.

Ein Durchsuchen der Gendatenbank des National Institut of Health (NIH) zeigt, dass PDZK1 bis zum jetzigen Zeitpunkt bei *Homo sapiens*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* bekannt ist. Ein Vergleich der Proteinsequenzen dieser Spezies zeigt sehr hohe Homologien innerhalb der durch Pfam-Datenbankrecherche ermittelten PDZ-Domänen. Die verbindenden Regionen weichen jedoch stärker voneinander ab. Ein Beispiel hierfür zeigt ein Ver-

gleich der Sequenzen für PDZK1 von Mensch und Ratte. Hier findet man innerhalb der PDZ1-Domäne eine Homologie auf Proteinebene von 91 %. Der Grad der Homologie für die PDZ2-Domäne liegt bei 89 %. Hingegen wird für die verbindende Region zwischen der PDZ1- und der PDZ2-Domäne nur eine Sequenzidentität von 61 % erreicht. Der hohe Konservierungsgrad innerhalb der vier PDZ-Domänen gibt einen Hinweis auf eine ähnliche Funktion bei allen Spezies.

5.3.2 Bestimmung der interagierenden PDZ-Domäne mit dem PTH1-Rezeptor

Das als Interaktionspartner des PTH1-Rezeptors identifizierte PDZ-Protein PDZK1, besteht aus vier PDZ-Domänen [134]. Die verschiedenen PDZ-Domänen eines Proteins können dabei mit unterschiedlichen anderen Proteinen in Kontakt treten. Ebenso wie durch die Bindungssequenz des Zielproteins, ist auch durch die PDZ-Domäne eine gewisse Spezifität für die Zielproteine vorhanden [55]. In der vorliegenden Arbeit wurden die vier bekannten PDZ-Domänen von PDZK1 einzeln auf ihre Fähigkeit überprüft an den C-Terminus des PTH1-Rezeptors zu binden. Nach Amplifikation jeder einzelnen Domäne mittels PCR aus der gesamten cDNA von PDZK1 und anschließender Klonierung in den Vektor pGADT7 wurde die Expression der Domänen als Fusionsprotein mit einer GAL4-Aktivierungsdomäne ermöglicht. Im anschließenden Hefe-Interaktionstest konnte die PDZ1-Domäne von PDZK1 eindeutig als die einzige interagierende PDZ-Domäne mit dem C-Terminus des PTH1-Rezeptors identifiziert werden.

Die Erkennungssequenz des PTH1-Rezeptors wurde nicht näher eingegrenzt. Durch die Verwendung des C-terminalen Abschnitts in allen Interaktionsversuchen, muss sich jedoch das Erkennungsmotiv im C-Terminus befinden. Für eine Vielzahl von PDZ-Proteinen ist bekannt, dass sie bevorzugt an die vier letzten Aminosäuren des C-terminalen Abschnitts des Zielproteins binden [237]. Für NHERF-1 und NHERF-2 wird gezeigt, dass die Bindungsstelle dieser beiden PDZ-Proteine innerhalb der letzten vier Aminosäuren „ETVM⁵⁹⁰⁻⁵⁹³“ des PTH1-Rezeptors lokalisiert ist. Durch den Austausch der einzelnen Aminosäuren zu Alanin kann durch M. Mahon und Kollegen weiterhin gezeigt werden, dass durch eine Veränderung von T⁵⁹¹ zu Alanin und M⁵⁹³ zu Alanin eine Bindung nicht mehr möglich ist [152]. Auch für das PDZ-Protein PSD-95 (postsynaptic-density-protein), welches mit der dritten PDZ-Domäne an ein Klasse I Erkennungsmotiv bindet, ist die Aminosäure an Position P₂ (Threonin) entscheidend an der Bindung beteiligt [49] (Eine nähere Beschreibung der Klassifikation der Erkennungsmotive findet sich in Kap. 1.6.3). Um eine Beteiligung des Klasse I Erkennungsmotivs an der Bindung von PDZK1 zu testen, wurde eine PTH1-Rezeptormutante generiert, bei welcher die letzte Aminosäure des C-Terminus M⁵⁹³ zu Alanin verändert wurde. Diese Rezeptormutante (M593A) kann in zukünftigen Experimenten dazu verwendet werden eine Bestätigung der Bindung von PDZK1 an das C-terminal gelegene Aminosäuremotiv zu finden. Dieses kann zunächst durch ein weiteres GST-

Pull-down-Experiment versucht werden, indem der native Rezeptor als Vergleich herangezogen wird. Im Weiteren kann eine Transfektion von PDZK1 in HEK 293E+-Zellen, welche die Rezeptormutante M593A exprimiert, Aufschluss über mögliche Unterschiede in der Signaltransduktion geben. Dadurch könnte eine erste mögliche Funktion des PDZK1-Proteins untersucht werden.

Obwohl die Bestätigung noch aussteht, ist zu vermuten, dass auch von PDZK1 das Erkennungsmotiv „ETVM⁵⁹⁰⁻⁵⁹³“ des PTH1-Rezeptors als Bindungsstelle verwendet wird.

5.3.3 Strukturanalyse der PDZ1-Domäne von PDZK1

Mittels einer Datenbankabfrage konnte für die erste PDZ-Domäne (PDZ1) von PDZK1 ein 3D-Modell erstellt werden, welches anhand der Struktur der PDZ1-Domäne von NHERF-1 modelliert wurde. Das Modell für die PDZ-1 Domäne von NHERF-1 selbst basiert dabei auf Röntgenstrukturanalysen von S. Karthikeyan und Kollegen [127].

Ein wichtiges strukturelles Merkmal aller PDZ-Domänen ist der zwischen dem β A-Faltblattstrang und dem β B-Faltblattstrang vorhandene Carboxyl-Bindungsloop. Dieser besitzt eine entscheidende Rolle in der Spezifität der Bindung des Zielproteins. So ist die Fähigkeit der Stabilisierung des Carboxyl-Bindungsloops ein wichtiger Aspekt bei der Erkennung des Peptids durch die PDZ-Domäne [49]. Vergleicht man die Modelle der PDZ1-Domäne von PDZK1 mit dem Modell der PDZ1-Domäne von NHERF-1 (siehe Kapitel 4.3.6), so zeigen sich hohe strukturelle Ähnlichkeiten. Ein entscheidender Unterschied aber besteht in der Länge des vorhergesagten β B-Faltblattstrangs, welcher wesentlich kürzer ist und somit in einem verlängerten Carboxyl-Bindungsloop der PDZ1-Domäne von PDZK1 resultiert. Betrachtet man die Aminosäuresequenz der PDZ1-Domäne im Vergleich zu anderen PDZ-Domänen (siehe 4.3.7, Abb. 4-37) so findet sich eine zusätzliche Aminosäure (Glycin) im Bereich des Carboxyl-Bindungsloops. Ebenfalls abweichend von dem ubiquitär vorkommenden „GLGF“-Motiv findet man bei der PDZ1-Domäne von PDZK1 ein „NYGF“-Motiv. In diesen Unterschieden könnte die Spezifität dieser Domäne für den C-Terminus des PTH1-Rezeptors begründet liegen.

Ein weiteres, mit PDZK1 interagierendes Protein ist der Na/P_i-Transporter Typ IIa der Niere. Als interagierende Domäne mit dem Na/P_i-Transporter kann in der Arbeit von S. M. Gisler und Kollegen die PDZ3-Domäne identifiziert werden [80]. Diese bindet an den C-Terminus des Na/P_i-Transporter Typ II. Als Erkennungssequenz des Na/P_i-Transporter kann das am C-terminalen Ende liegende „TRL“-Motiv bestimmt werden [80]. Auch hier handelt es sich um ein Erkennungsmotiv der Klasse I. Weiterhin zeigte ein Aminosäurevergleich der PDZ1-Domäne mit der PDZ3-Domäne von PDZK1, dass innerhalb der PDZ3-Domäne ein „GYGF“-Motiv im Carboxyl-Bindungsloop identifiziert werden kann. Die zusätzliche Aminosäure, wie für die PDZ1-Domäne beschrieben, findet sich hier nicht. Diese Unterschiede, in einer der entscheidenden

den Bindungsregionen, könnten für die Spezifität der verschiedenen Domänen von PDZK1 verantwortlich sein.

5.3.4 Expression von PDZK1 in verschiedenen Zelllinien

Um weitere Untersuchungen mit PDZK1 in Zellkulturmodellen durchzuführen zu können, wurden mehrere etablierte Zelllinien auf die Expression von PDZK1 untersucht. Mit Hilfe der RT-PCR konnte ein Überblick über das Vorkommen von PDZK1-mRNA in den Zellen geschaffen werden. Eine falsch-positive Bande, durch die Amplifikation von genomischer DNA, wurde durch die gewählten Primer vermieden: Bei der Konzeption der Primer wurde berücksichtigt, dass sich der zu amplifizierende Bereich über eine Exon-Intron-Grenze erstreckte.

Die Expression von PDZK1 in Nierengewebe wurde schon anhand von Northern Blot-Analysen gezeigt [134]. Die mRNA von PDZK1 konnte von uns mit Hilfe der RT-PCR auch in COS-7-Zellen, in HEK 293 E+-Zellen und in SaoS-2-Zellen nachgewiesen werden, wobei es sich bei COS-7-Zellen und HEK 293 E+-Zellen um Zelllinien handelt, welche aus Nierengewebe stammen. Da COS-7-Zellen von *Cercopithecus aethiops* abstammen, scheint die Aminosäuresequenz von PDZK1 dieser Spezies, im Bereich der Primer gut mit der humanen Sequenz übereinzustimmen. Eine Expression von PDZK1 im Knochen konnte bis jetzt noch nicht gezeigt werden. Durch die humane Osteosarkom-Tumorzelllinie SaoS-2 konnte das Vorkommen der PDZK1-mRNA in Knochen bestätigt werden. Bei der Bewertung dieses Ergebnisses muss jedoch berücksichtigt werden, dass PDZK1 in verschiedenen Karzinomen hoch reguliert wird [133] und somit eventuell nur in Tumorzellen des Knochens, nicht aber in normalem Knochengewebe PDZK1 zu finden ist.

In den anderen untersuchten Zelllinien konnte PDZK1 nicht nachgewiesen werden. Dies lässt jedoch nicht sicher den Schluss zu, dass hier keine Expression statt findet. So sind ROS17/2.8-Zellen, MDCK-Zellen und OK-Zellen nicht humanen Ursprungs. Da MDCK-Nierenzellen von *Canis familiaris* abstammen besteht hier die Möglichkeit, dass die Primer nicht mit dieser Spezies kreuz reagieren. Dies gilt ebenfalls für die Osteosarkom-Tumorzelllinie von *Rattus norvegicus* ROS17/2.8 und die aus der Niere von *Didelphis marsupialis virginiana* stammende OK-Zelllinie.

5.3.5 Beteiligung von PDZK1 an der Regulation des Phosphattransports in der Niere

PDZ-Proteine sind wichtige Komponenten bei der Organisation und Anordnung von Membrantransportern und Rezeptoren. Außerdem können sie der Verankerung von Komponenten dienen, die an den regulatorischen Prozessen der Zelle beteiligt sind [73]. In den proximalen Tubuluszellen der Niere kann unter anderem die Expression der PDZ-Proteine PDZK1 und NHERF-1 gezeigt werden [80, 245]. Für NHERF-1 kann eine Interaktion mit dem Na^+/H^+ -Austauscher

(NHE-3) [145], dem Na/P_i-Transporter Typ IIa [80] und dem PTH1-Rezeptor [152] gezeigt werden. Die regulatorische Bedeutung von NHERF-1 wird durch die in diesem Protein vorkommende Ezrin-Bindungsstelle klar. Ezrin wird an dieser Stelle an NHERF-1 gebunden und dient als Anker für Proteinkinase A. Es wird gezeigt, dass der Komplex aus PKA und NHERF-1 wichtig für die Phosphorylierung des NHE-3 ist [250]. Eine weitere regulatorische Funktion besitzt NHERF-1 in der Signaltransduktion des PTH1-Rezeptors [152].

Als Interaktionspartner des ebenfalls in der Niere exprimierten PDZK1 wurde ebenso wie für NHERF-1 der Na/P_i-Transporter Typ IIa identifiziert [80]. Im Weiteren wurde das Membran-assoziierte Protein MAP17 als Interaktionspartner für PDZK1 gefunden [133]. In der vorgelegten Arbeit wurde nun durch unterschiedliche Versuchsansätze gezeigt und bestätigt, dass auch der PTH1-Rezeptor als Interaktionspartner für PDZK1 funktioniert. Allerdings konnte für PDZK1 bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine regulatorische Funktion beschrieben werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde versucht mit einem PDZK1-GFP Fusionsprotein eine Lokalisation von PDZK1 an die Membran zu detektieren, nachdem PTH1-Rezeptor exprimierende HEK-Zellen mit hPTH (1-34) stimuliert wurden (Daten nicht gezeigt). Zeitgleich wurde von S. Pribanic und Kollegen in OK-Zellen nachgewiesen, dass eine Lokalisation von PDZK1 nur durch das Vorhandensein des Membran-assoziierten Proteins MAP17 möglich ist. Die Interaktion von PDZK1 mit MAP17 findet über die PDZ4-Domäne statt und ist Voraussetzung für eine apikale Lokalisation von PDZK1 in renalen proximalen Tubuluszellen. Hingegen ist eine apikale Lokalisation von MAP17 vom PDZK1-Protein unabhängig [189]. Mit Hilfe der Methode der RT-PCR und spezifischen Primern für MAP17 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden dass HEK 293 E⁺-Zellen MAP17 nicht exprimieren (siehe 4.3.10, Tabelle 4-11) und somit eine Grundvoraussetzung für eine Membranlokalisation in diesen Zellen möglicherweise nicht gegeben ist. Eine Assoziation von PDZK1 mit MAP17 kann in der Arbeit von S. M. Gisler und Kollegen anhand verschiedener Versuchsansätze (Hefe-Interaktionstests, Koimmunpräzipitation) gezeigt werden. Hingegen ist eine Interaktion von NHERF-1 mit MAP17 bisher nicht gezeigt worden [79].

Verschiedene Untersuchungen des PDZK1-Proteins deuten auf eine mögliche Beteiligung an der Regulation des Phosphattransports in der Niere hin. Unter normalen physiologischen Bedingungen werden bis zu 80 % des Phosphats (P_i) im proximalen Tubulus der Niere reabsorbiert. Der Hauptteil der Reabsorption erfolgt hierbei über den Na/P_i-Transporter Typ IIa. In Mäusen bei denen die Expression des Na/P_i-Transporters Typ IIa unterdrückt wird, kommt es zu einer 70 %igen Reduktion des Natrium-Phosphat Transports [6], wobei die verbleibende Transportak-

tivität nicht PTH-abhängig ist. Somit wird der Hauptteil der Phosphatabsorption über eine PTH-abhängige Regulation des Na/P_i-Transporters Typ IIa bewerkstelligt [10].

Eine mögliche Funktion von PDZK1 beim Menschen kann anhand des homologen Proteins der Ratte, bezeichnet als Diphor-1 („dietary P_i-regulated RNA-1“), postuliert werden. In der Ratte wird Diphor-1 vor allem im Cortex der Niere exprimiert. Unterzieht man Ratten einer phosphatarmen Diät, so kann im Cortex der Rattenniere eine erhöhte Expression von Diphor-1 mRNA nachgewiesen werden. Ebenso hat der Phosphat-Entzug eine Erhöhung der Na/P_i-Transporter Typ IIa-mRNA zur Folge [42]. Ein Zusammenhang von Diphor-1 mit der Regulation des Phosphathaushalts durch den Na/P_i-Transporter Typ IIa kann durch eine Koexpression von Diphor-1 und dem Na/P_i-Transporter Typ IIa in *Xenopus laevis* Oozyten gezeigt werden. Die Koinjektion dieser beiden cRNAs hat eine Erhöhung der Natrium-abhängigen Phosphataufnahme um das 1,7-fache zur Folge, gegenüber Oozyten die nur mit Na/P_i-Transporter Typ IIa-cRNA alleine injiziert wurden [42].

Auch für das humane PDZK1-Protein kann eine Interaktion mit dem humanen Na/P_i-Transporter der Niere nachgewiesen werden [80]. Anhand dieser Interaktion und der sehr hohen Sequenzhomologie von Diphor-1 mit PDZK1 (siehe 4.3.4), lässt sich auf eine ähnliche Funktion schließen. Anhand von *in vivo* Experimenten an OK-Zellen kann gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit hPTH (1-34) die Internalisierung des Na/P_i-Transporters vom Typ IIa zur Folge hat [181]. Diese Internalisierung erfolgt mit Hilfe von sogenannten „Clathrin-coated“-Vesikeln [131].

Zwar wurde in der Arbeit von S. M. Gisler und Kollegen [79] die Hypothese aufgestellt, dass kein Hormonrezeptor, wie z. B. der PTH1-Rezeptor oder der β₂-adrenerge Rezeptor in der Lage ist an PDZK1 zu binden. Jedoch konnte in der vorgelegten Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass eine Interaktion von PDZK1 mit dem PTH1-Rezeptor statt findet. Folgend aus dieser Tatsache und den Befunden aus Experimenten mit Diphor-1 der Ratte kann ein mögliches Modell des Phosphattransports in der Niere unter Beteiligung von PDZK1 aufgestellt werden:

Ist ein niedriger Phosphatspiegel vorhanden, wird sowohl der Na/P_i-Transporter Typ IIa, als auch PDZK1 vermehrt expremiert. Durch die Interaktion von PDZK1 mit dem Na/P_i-Transporter Typ IIa kommt es zu einer erhöhten Phosphatreabsorption in den proximalen Tubuluszellen der Niere. Diese Interaktion erfolgt über die PDZ3-Domäne von PDZK1 mit dem Na/P_i-Transporter Typ IIa, wobei MAP17 als Anker-molekül für PDZK1 fungiert und mit diesem Protein über dessen PDZ4-Domäne interagiert. Ist der Phosphatspiegel des Blutes niedrig, dient PDZK1 somit als positives Regulatorelement.

Im Falle eines erhöhten Phosphatspiegels kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von PTH. Die Stimulation des PTH1-Rezeptors durch PTH in der Niere bewirkt eine Kopplung des Na/P_i-

Transporters Typ IIa an den PTH1-Rezeptor über das Adapterprotein PDZK1. Hierbei bindet PDZK1 über seine PDZ1-Domäne an den PTH1-Rezeptor. Auch in diesem Fall fungiert MAP17 als Ankerprotein und ermöglicht es PDZK1 an die Membran zu translozieren. Wirkt PDZK1 als Adapter zwischen dem Na/P_i-Transporter Typ IIa und dem PTH1-Rezeptor so ist es möglich, dass der Na/P_i-Transporter Typ IIa durch eine Kointernalisierung mit dem PTH1-Rezeptor von der Membranoberfläche verschwindet und somit die Rückresorption von Phosphat vermindert wird. PDZK1 wirkt in diesem Fall als negatives Regulatorelement.

Ein erster Schritt, um diese Hypothese zu überprüfen, könnte die Bestimmung der Kointernalisierung des Na/P_i-Transporters Typ IIa mit dem PTH1-Rezeptor sein, indem man sich fluoreszierende Proteine (CFP, YFP, RFP, GFP; „fluorescent proteins“) zu Nutze macht. Hierzu exprimiert man sowohl den Rezeptor, als auch den Na/P_i-Transporter Typ IIa mit jeweils unterschiedlich fluoreszierenden Proteinanteilen in ein und der selben Zelle. Nach PTH-Stimulation könnte eine Lokalisation sowohl des Rezeptors, als auch des Transporters bei der für den fluoreszierenden Proteinanteil entsprechenden Wellenlänge sichtbar gemacht werden. Anschliessend müsste eine mögliche Koexistenz in den Internalisierungsvesikeln durch eine Überlagerung der Bilder überprüft werden.

Einen weiteren Ansatzpunkt bieten die von O. Kocher und Kollegen generierten Knock-out Mäuse, die PDZK1 nicht mehr exprimieren [135]. Die generierten homozygoten Mäuse entwickeln sich normal und zeigen keine auffälligen phänotypischen Veränderungen. Für einige Ionenkanäle (Aquaporin 1 und CAT-2 (Kationen / Aminosäuren-Transporter)) konnte eine veränderte Expression gezeigt werden. Außerdem wurde bei diesen knock-out Mäusen ein erhöhter Serum-Cholesterin-Wert gemessen. Eine Veränderung der Expression des Na/P_i-Transporter Typ IIa konnte nicht gezeigt werden. Allerdings zeigen die PDZK1-knock-out Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen eine erniedrigte Phosphatausscheidung im Urin. Um einen Zusammenhang von PDZK1 mit der Phosphatregulation in der Niere ermitteln zu können, könnte man sowohl die PDZK1-knock-out Mäuse, als auch die WT-Mäuse einer phosphatreichen Diät unterziehen und im Anschluss nochmals die Phosphatausscheidung im Urin bestimmen. Besteht ein Zusammenhang zwischen einer PDZK1-Expression und der Phosphatregulation in der Niere, würde man bei den knock-out-Mäusen eine geringere Toleranz gegenüber einer phosphatreichen Nahrung nachweisen können. Einen ähnlichen Effekt müsste man mit der Gabe einer hohen Dosis an PTH erreichen, welche den Mäusen injiziert wird. Ein erhöhter Phosphatspiegel hat normalerweise eine vermehrte PTH-Ausschüttung zur Folge und im weiteren eine dadurch erhöhte Phosphatausscheidung über die Niere [10]. Die Behandlung von PDZK1-knock-out-Mäusen sollten im Falle einer PDZK1-Beteiligung nach PTH-Gabe nicht mit einer erhöhten Phosphatausscheidung über die Niere im Vergleich zu den WT-Mäusen einhergehen.

Zusammenfassend konnte im dritten Teil der vorgelegten Arbeit durch verschiedene Versuchsansätze gezeigt und bestätigt werden, dass eine Interaktion des PDZ-Proteins PDZK1 über die PDZ1-Domäne mit dem PTH1-Rezeptor statt findet. Weiterhin wurde die Expression von PDZK1-mRNA in verschiedenen Zelllinien, unter anderem auch in Zelllinien die aus Nierengewebe abstammen, nachgewiesen. Auf Grund der verschiedenen Untersuchungen und Überlegungen kann eine Beteiligung von PDZK1 am Phosphattransport in der Niere postuliert werden.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Measuring the PTH level. *Lancet* 1988. **1**: 94-95.
- 2 **Aarts, M. M., Rix, A., Guo, J., Bringham, R. and Henderson, J. E.**, The nucleolar targeting signal (NTS) of parathyroid hormone related protein mediates endocytosis and nucleolar translocation. *J Bone Miner Res* 1999. **14**: 1493-1503.
- 3 **Abou-Samra, A. B., Juppner, H., Force, T., Freeman, M. W., Kong, X. F., Schipani, E., Urena, P., Richards, J., Bonventre, J. V., Potts, J. T., Jr. and et al.**, Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. **89**: 2732-2736.
- 4 **Babich, M., Choi, H., Johnson, R. M., King, K. L., Alford, G. E. and Nissenson, R. A.**, Thrombin and parathyroid hormone mobilize intracellular calcium in rat osteosarcoma cells by distinct pathways. *Endocrinology* 1991. **129**: 1463-1470.
- 5 **Baldwin, J. M.**, The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *Embo J* 1993. **12**: 1693-1703.
- 6 **Beck, L., Karaplis, A. C., Amizuka, N., Hewson, A. S., Ozawa, H. and Tenenhouse, H. S.**, Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. **95**: 5372-5377.
- 7 **Behar, V., Bisello, A., Rosenblatt, M. and Chorev, M.**, Direct identification of two contact sites for parathyroid hormone (PTH) in the novel PTH-2 receptor using photoaffinity cross-linking. *Endocrinology* 1999. **140**: 4251-4261.
- 8 **Berridge, M. J.**, Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993. **361**: 315-325.
- 9 **Bhowmick, N., Narayan, P. and Puett, D.**, The endothelin subtype A receptor undergoes agonist- and antagonist-mediated internalization in the absence of signaling. *Endocrinology* 1998. **139**: 3185-3192.
- 10 **Biber, J., Hernando, N., Traebert, M., Volkl, H. and Murer, H.**, Parathyroid hormone-mediated regulation of renal phosphate reabsorption. *Nephrol Dial Transplant* 2000. **15 Suppl 6**: 29-30.
- 11 **Birn, H., Verroust, P. J., Nexø, E., Hager, H., Jacobsen, C., Christensen, E. I. and Moestrup, S. K.**, Characterization of an epithelial approximately 460-kDa protein that facilitates endocytosis of intrinsic factor-vitamin B12 and binds receptor-associated protein. *J Biol Chem* 1997. **272**: 26497-26504.
- 12 **Birnbaumer, L.**, Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* 1992. **71**: 1069-1072.
- 13 **Birnboim, H. C. and Doly, J.**, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979. **7**: 1513-1523.
- 14 **Bisello, A., Chorev, M., Rosenblatt, M., Monticelli, L., Mierke, D. F. and Ferrari, S. L.**, Selective ligand-induced stabilization of active and desensitized parathyroid hormone type 1 receptor conformations. *J Biol Chem* 2002. **277**: 38524-38530.
- 15 **Bisello, A., Manen, D., Pierroz, D. D., Usdin, T. B., Rizzoli, R. and Ferrari, S. L.**, Agonist-specific Regulation of Parathyroid Hormone Receptor Type 2 Activity. Structural and Functional Analysis of PTH- and TIP39-stimulated Desensitization and Internalization. *Mol Endocrinol* 2004.
- 16 **Bittner, M., Kupferer, P. and Morris, C. F.**, Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal Biochem* 1980. **102**: 459-471.
- 17 **Blind, E., Bambino, T., Huang, Z., Bliziotis, M. and Nissenson, R. A.**, Phosphorylation of the cytoplasmic tail of the PTH/PTHrP receptor. *J Bone Miner Res* 1996. **11**: 578-586.
- 18 **Bond, R. A., Leff, P., Johnson, T. D., Milano, C. A., Rockman, H. A., McMinn, T. R., Apparundaram, S., Hyek, M. F., Kenakin, T. P., Allen, L. F. and et al.**, Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. *Nature* 1995. **374**: 272-276.

- 19 **Bradford, M. M.**, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976. **72**: 248-254.
- 20 **Bringhurst, F. R., Stern, A. M., Yotts, M., Mizrahi, N., Segre, G. V. and Potts, J. T., Jr.**, Peripheral metabolism of PTH: fate of biologically active amino terminus in vivo. *Am J Physiol* 1988. **255**: E886-893.
- 21 **Broadus, A. E., Mangin, M., Ikeda, K., Insogna, K. L., Weir, E. C., Burtis, W. J. and Stewart, A. F.**, Humoral hypercalcemia of cancer. Identification of a novel parathyroid hormone-like peptide. *N Engl J Med* 1988. **319**: 556-563.
- 22 **Brown, E. M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M. A., Lytton, J. and Hebert, S. C.**, Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993. **366**: 575-580.
- 23 **Buggy, J. J., Livingston, J. N., Rabin, D. U. and Yoo-Warren, H.**, Glucagon-glucagon-like peptide I receptor chimeras reveal domains that determine specificity of glucagon binding. *J Biol Chem* 1995. **270**: 7474-7478.
- 24 **Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M.**, XL1-BLUE: A HIGH EFFICIENCY PLASMID TRANSFORMING RECA ESCHERICHIA COLI STRAIN WITH BETA-GALACTOSIDASE SELECTION. *Product Application Focus, Biotechniques* 1987. **5**: 376-379.
- 25 **Campos, R. V., Wang, C. and Drucker, D. J.**, Regulation of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) gene transcription: cell- and tissue-specific promoter utilization mediated by multiple positive and negative cis-acting DNA elements. *Mol Endocrinol* 1992. **6**: 1642-1652.
- 26 **Cancela, L., Hsieh, C. L., Francke, U. and Price, P. A.**, Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene. *J Biol Chem* 1990. **265**: 15040-15048.
- 27 **Care, A. D., Abbas, S. K., Harmeyer, J. and Boivin, R.**, The relaxant effects of parathyroid hormone(1-34) and parathyroid hormone-related protein(1-34) on ovine reticulo-ruminal smooth muscle in vivo. *Exp Physiol* 1999. **84**: 665-675.
- 28 **Carter, P. H., Shimizu, M., Luck, M. D. and Gardella, T. J.**, 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* 1999. **274**: 31955-31960.
- 29 **Castro, M., Dicker, F., Vilardaga, J. P., Krasel, C., Bernhardt, M. and Lohse, M. J.**, Dual regulation of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling by protein kinase C and beta-arrestins. *Endocrinology* 2002. **143**: 3854-3865.
- 30 **Caulfield, M. P., McKee, R. L., Goldman, M. E., Duong, L. T., Fisher, J. E., Gay, C. T., DeHaven, P. A., Levy, J. J., Roubini, E., Nutt, R. F. and et al.**, The bovine renal parathyroid hormone (PTH) receptor has equal affinity for two different amino acid sequences: the receptor binding domains of PTH and PTH-related protein are located within the 14-34 region. *Endocrinology* 1990. **127**: 83-87.
- 31 **Chauvin, S., Bencsik, M., Bambino, T. and Nissenson, R. A.**, Parathyroid Hormone Receptor Recycling: Role of Receptor Dephosphorylation and beta-Arrestin. *Mol Endocrinol* 2002. **16**: 2720-2732.
- 32 **Chen, J., Ishii, M., Wang, L., Ishii, K. and Coughlin, S. R.**, Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular liganding mode. *J Biol Chem* 1994. **269**: 16041-16045.
- 33 **Cheng, Y. and Prusoff, W. H.**, Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973. **22**: 3099-3108.
- 34 **Cheung, A. H., Dixon, R. A., Hill, W. S., Sigal, I. S. and Strader, C. D.**, Separation of the structural requirements for agonist-promoted activation and sequestration of the beta-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 1990. **37**: 775-779.
- 35 **Chidiac, P., Hebert, T. E., Valiquette, M., Dennis, M. and Bouvier, M.**, Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* 1994. **45**: 490-499.

- 36 **Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T. and Hidaka, H.**, Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 1990. **265**: 5267-5272.
- 37 **Cho, K. O., Hunt, C. A. and Kennedy, M. B.**, The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 1992. **9**: 929-942.
- 38 **Clark, J. A., Bonner, T. I., Kim, A. S. and Usdin, T. B.**, Multiple regions of ligand discrimination revealed by analysis of chimeric parathyroid hormone 2 (PTH2) and PTH/PTH-related peptide (PTHrP) receptors. *Mol Endocrinol* 1998. **12**: 193-206.
- 39 **Cotecchia, S., Ostrowski, J., Kjelsberg, M. A., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.**, Discrete amino acid sequences of the alpha 1-adrenergic receptor determine the selectivity of coupling to phosphatidylinositol hydrolysis. *J Biol Chem* 1992. **267**: 1633-1639.
- 40 **Crews, C. M., Alessandrini, A. and Erikson, R. L.**, The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 1992. **258**: 478-480.
- 41 **Crews, C. M. and Erikson, R. L.**, Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. **89**: 8205-8209.
- 42 **Custer, M., Spindler, B., Verrey, F., Murer, H. and Biber, J.**, Identification of a new gene product (diphor-1) regulated by dietary phosphate. *Am J Physiol* 1997. **273**: F801-806.
- 43 **Cypess, A. M., Unson, C. G., Wu, C. R. and Sakmar, T. P.**, Two cytoplasmic loops of the glucagon receptor are required to elevate cAMP or intracellular calcium. *J Biol Chem* 1999. **274**: 19455-19464.
- 44 **De Lean, A., Stadel, J. M. and Lefkowitz, R. J.**, A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1980. **255**: 7108-7117.
- 45 **Derham, B. K. and Harding, J. J.**, Alpha-crystallin as a molecular chaperone. *Prog Retin Eye Res* 1999. **18**: 463-509.
- 46 **Dicker, F., Quitterer, U., Winstel, R., Honold, K. and Lohse, M. J.**, Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. **96**: 5476-5481.
- 47 **Dobolyi, A., Ueda, H., Uchida, H., Palkovits, M. and Usdin, T. B.**, Anatomical and physiological evidence for involvement of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in nociception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. **99**: 1651-1656.
- 48 **Dong, H., Zhang, P., Song, I., Petralia, R. S., Liao, D. and Huganir, R. L.**, Characterization of the glutamate receptor-interacting proteins GRIP1 and GRIP2. *J Neurosci* 1999. **19**: 6930-6941.
- 49 **Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. and MacKinnon, R.**, Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein- binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 1996. **85**: 1067-1076.
- 50 **Dunlay, R. and Hruska, K.**, PTH receptor coupling to phospholipase C is an alternate pathway of signal transduction in bone and kidney. *Am J Physiol* 1990. **258**: F223-231.
- 51 **Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. and Elledge, S. J.**, The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 1993. **7**: 555-569.
- 52 **Ehringer, M. A., Thompson, J., Conroy, O., Xu, Y., Yang, F., Canniff, J., Beeson, M., Gordon, L., Bennett, B., Johnson, T. E. and Sikela, J. M.**, High-throughput sequence identification of gene coding variants within alcohol-related QTLs. *Mamm Genome* 2001. **12**: 657-663.
- 53 **Eickbush, T. H. and Moudrianakis, E. N.**, The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids. *Cell* 1978. **13**: 295-306.
- 54 **Elshourbagy, N. A., Korman, D. R., Wu, H. L., Sylvester, D. R., Lee, J. A., Nuthalaganti, P., Bergsma, D. J., Kumar, C. S. and Nambi, P.**, Molecular characterization and regulation of the human endothelin receptors. *J Biol Chem* 1993. **268**: 3873-3879.

- 55 **Fanning, A. S. and Anderson, J. M.**, PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 1999. **103**: 767-772.
- 56 **Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. and Danielsen, M.**, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987. **84**: 7413-7417.
- 57 **Ferguson, S. S. and Caron, M. G.**, Green fluorescent protein-tagged beta-arrestin translocation as a measure of G protein-coupled receptor activation. *Methods Mol Biol* 2004. **237**: 121-126.
- 58 **Ferguson, S. S., Downey, W. E., 3rd, Colapietro, A. M., Barak, L. S., Menard, L. and Caron, M. G.**, Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 1996. **271**: 363-366.
- 59 **Ferguson, S. S., Zhang, J., Barak, L. S. and Caron, M. G.**, Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci* 1998. **62**: 1561-1565.
- 60 **Ferrari, S. L., Behar, V., Chorev, M., Rosenblatt, M. and Bisello, A.**, Endocytosis of ligand-human parathyroid hormone receptor 1 complexes is protein kinase C-dependent and involves beta-arrestin2. Real-time monitoring by fluorescence microscopy. *J Biol Chem* 1999. **274**: 29968-29975.
- 61 **Ferrari, S. L. and Bisello, A.**, Cellular distribution of constitutively active mutant parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptors and regulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling by beta-arrestin2. *Mol Endocrinol* 2001. **15**: 149-163.
- 62 **Findlay, J. B. and Pappin, D. J.**, The opsin family of proteins. *Biochem J* 1986. **238**: 625-642.
- 63 **Fogh, J., Wright, W. C. and Loveless, J. D.**, Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 1977. **58**: 209-214.
- 64 **Freeman, C. and Hopwood, J. J.**, Human liver N-acetylglucosamine-6-sulphate sulphatase. Catalytic properties. *Biochem J* 1987. **246**: 355-365.
- 65 **Freichel, M., Zink-Lorenz, A., Holloschi, A., Hafner, M., Flockerzi, V. and Raue, F.**, Expression of a calcium-sensing receptor in a human medullary thyroid carcinoma cell line and its contribution to calcitonin secretion. *Endocrinology* 1996. **137**: 3842-3848.
- 66 **Frolov, A., Zielinski, S. E., Crowley, J. R., Dudley-Rucker, N., Schaffer, J. E. and Ory, D. S.**, NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols. *J Biol Chem* 2003. **278**: 25517-25525.
- 67 **Gales, C., Kowalski-Chauvel, A., Dufour, M. N., Seva, C., Moroder, L., Pradayrol, L., Vaysse, N., Fourmy, D. and Silvente-Poirot, S.**, Mutation of Asn-391 within the conserved NPXXY motif of the cholecystokinin B receptor abolishes Gq protein activation without affecting its association with the receptor. *J Biol Chem* 2000. **275**: 17321-17327.
- 68 **Gardella, T. J. and Juppner, H.**, Interaction of PTH and PTHrP with their receptors. *Rev Endocr Metab Disord* 2000. **1**: 317-329.
- 69 **Gardella, T. J. and Juppner, H.**, Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2001. **12**: 210-217.
- 70 **Gardella, T. J., Luck, M. D., Fan, M. H. and Lee, C.**, Transmembrane residues of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor that specifically affect binding and signaling by agonist ligands. *J Biol Chem* 1996. **271**: 12820-12825.
- 71 **Gardella, T. J., Luck, M. D., Jensen, G. S., Schipani, E., Potts, J. T., Jr. and Juppner, H.**, Inverse agonism of amino-terminally truncated parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide (PTHrP) analogs revealed with constitutively active mutant PTH/PTHrP receptors. *Endocrinology* 1996. **137**: 3936-3941.
- 72 **Gardella, T. J., Luck, M. D., Jensen, G. S., Usdin, T. B. and Juppner, H.**, Converting parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) into a potent PTH-2 receptor agonist. *J Biol Chem* 1996. **271**: 19888-19893.
- 73 **Garner, C. C., Nash, J. and Haganir, R. L.**, PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol* 2000. **10**: 274-280.
- 74 **Gaudin, P., Couvineau, A., Maoret, J. J., Rouyer-Fessard, C. and Laburthe, M.**, 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* 1996. **805**: 585-589.

- 75 **Gaush, C. R., Hard, W. L. and Smith, T. F.**, Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med* 1966. **122**: 931-935.
- 76 **Gether, U.**, Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 2000. **21**: 90-113.
- 77 **Gether, U. and Kobilka, B. K.**, G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 1998. **273**: 17979-17982.
- 78 **Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. and Schiestl, R. H.**, Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 1992. **20**: 1425.
- 79 **Gisler, S. M., Pribanic, S., Bacic, D., Forrer, P., Gantenbein, A., Sabourin, L. A., Tsuji, A., Zhao, Z. S., Manser, E., Biber, J. and Murer, H.**, PDZK1: I. A major scaffold in brush borders of proximal tubular cells. *Kidney Int* 2003. **64**: 1733-1745.
- 80 **Gisler, S. M., Stagljar, I., Traebert, M., Bacic, D., Biber, J. and Murer, H.**, Interaction of the type IIa Na/Pi cotransporter with PDZ proteins. *J Biol Chem* 2001. **276**: 9206-9213.
- 81 **Gluzman, Y.**, SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 1981. **23**: 175-182.
- 82 **Goltzman, D.**, Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules. *J Bone Miner Res* 1999. **14**: 173-177.
- 83 **Gonzalez, S., Martinez-Borra, J. and Lopez-Larrea, C.**, Cloning and characterization of human complement component C7 promoter. *Genes Immun* 2003. **4**: 54-59.
- 84 **Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. and Benovic, J. L.**, Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 1996. **383**: 447-450.
- 85 **Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R.**, Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977. **36**: 59-74.
- 86 **Gruenbaum, Y., Wilson, K. L., Harel, A., Goldberg, M. and Cohen, M.**, Review: nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol* 2000. **129**: 313-323.
- 87 **Gudermann, T., Nurnberg, B. and Schultz, G.**, Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med* 1995. **73**: 51-63.
- 88 **Guex, N. and Peitsch, M. C.**, SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997. **18**: 2714-2723.
- 89 **Guise, T. A., Yin, J. J., Taylor, S. D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B. F., Yoneda, T. and Mundy, G. R.**, Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* 1996. **98**: 1544-1549.
- 90 **Gurevich, V. V., Dion, S. B., Onorato, J. J., Ptasienski, J., Kim, C. M., Sterne-Marr, R., Hosey, M. M. and Benovic, J. L.**, Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 1995. **270**: 720-731.
- 91 **Guthrie, C. and Fink, G. R.**, Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology (Academic Press, San Diego)* 1991. **194**: 1-932.
- 92 **Gutkind, J. S.**, The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 1998. **273**: 1839-1842.
- 93 **Habener, J. F., Kemper, B. and Potts, J. T., Jr.**, Calcium-dependent intracellular degradation of parathyroid hormone: a possible mechanism for the regulation of hormone stores. *Endocrinology* 1975. **97**: 431-441.
- 94 **Habener, J. F., Rosenblatt, M., Kemper, B., Kronenberg, H. M., Rich, A. and Potts, J. T., Jr.**, Pre-parathyroid hormone; amino acid sequence, chemical synthesis, and some biological studies of the precursor region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978. **75**: 2616-2620.
- 95 **Habener, J. F., Rosenblatt, M. and Potts, J. T., Jr.**, Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol Rev* 1984. **64**: 985-1053.
- 96 **Hamm, H. E.**, The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 1998. **273**: 669-672.

- 97 **Hanahan, D.**, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983. **166**: 557-580.
- 98 **Hansen, I. A., Jakob, O., Wortmann, S., Arzberger, T., Allolio, B. and Blind, E.**, Characterization of the human and mouse genes encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues, a ligand of the parathyroid hormone receptor family. *J Endocrinol* 2002. **174**: 95-102.
- 99 **Hargrave, P. A., Hamm, H. E. and Hofmann, K. P.**, Interaction of rhodopsin with the G-protein, transducin. *Bioessays* 1993. **15**: 43-50.
- 100 **Harper, J. F., Clancy, M. J. and Magee, P. T.**, Properties of polyadenylate-associated ribonucleic acid from *Saccharomyces cerevisiae* ascospores. *J Bacteriol* 1980. **143**: 958-965.
- 101 **Harris, B. Z., Lau, F. W., Fujii, N., Guy, R. K. and Lim, W. A.**, Role of electrostatic interactions in PDZ domain ligand recognition. *Biochemistry* 2003. **42**: 2797-2805.
- 102 **Harris, B. Z. and Lim, W. A.**, Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 2001. **114**: 3219-3231.
- 103 **Hart, M. C., Korshunova, Y. O. and Cooper, J. A.**, Vertebrates have conserved capping protein alpha isoforms with specific expression patterns. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997. **38**: 120-132.
- 104 **Heid, H. W., Moll, R., Schwetlick, I., Rackwitz, H. R. and Keenan, T. W.**, Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res* 1998. **294**: 309-321.
- 105 **Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E. and Downing, K. H.**, An atomic model for the structure of bacteriorhodopsin. *Biochem Soc Trans* 1990. **18**: 844.
- 106 **Hendy, G. N., Kronenberg, H. M., Potts, J. T., Jr. and Rich, A.**, Nucleotide sequence of cloned cDNAs encoding human preproparathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981. **78**: 7365-7369.
- 107 **Hepler, J. R. and Gilman, A. G.**, G proteins. *Trends Biochem Sci* 1992. **17**: 383-387.
- 108 **Hill, J., Donald, K. A., Griffiths, D. E. and Donald, G.**, DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res* 1991. **19**: 5791.
- 109 **Hille, B.**, G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* 1992. **9**: 187-195.
- 110 **Hoare, S. R., Clark, J. A. and Usdin, T. B.**, Molecular determinants of tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) selectivity for the parathyroid hormone-2 (PTH2) receptor. N-terminal truncation of TIP39 reverses PTH2 receptor/PTH1 receptor binding selectivity. *J Biol Chem* 2000. **275**: 27274-27283.
- 111 **Hoare, S. R., Rubin, D. A., Juppner, H. and Usdin, T. B.**, Evaluating the ligand specificity of zebrafish parathyroid hormone (PTH) receptors: comparison of PTH, PTH-related protein, and tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Endocrinology* 2000. **141**: 3080-3086.
- 112 **Holtmann, M. H., Hadac, E. M. and Miller, L. J.**, Critical contributions of amino-terminal extracellular domains in agonist binding and activation of secretin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. Studies of chimeric receptors. *J Biol Chem* 1995. **270**: 14394-14398.
- 113 **Hsueh, Y. P., Kim, E. and Sheng, M.**, Disulfide-linked head-to-head multimerization in the mechanism of ion channel clustering by PSD-95. *Neuron* 1997. **18**: 803-814.
- 114 **Huang, Z., Chen, Y., Pratt, S., Chen, T. H., Bambino, T., Nissenson, R. A. and Shoback, D. M.**, The N-terminal region of the third intracellular loop of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is critical for coupling to cAMP and inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction pathways. *J Biol Chem* 1996. **271**: 33382-33389.
- 115 **Iida-Klein, A., Guo, J., Takemura, M., Drake, M. T., Potts, J. T., Jr., Abou-Samra, A., Bringhurst, F. R. and Segre, G. V.**, Mutations in the second cytoplasmic loop of the rat parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor result in selective loss of PTH-stimulated phospholipase C activity. *J Biol Chem* 1997. **272**: 6882-6889.
- 116 **Iida-Klein, A., Guo, J., Xie, L. Y., Juppner, H., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M., Bringhurst, F. R., Abou-Samra, A. B. and Segre, G. V.**, Truncation of the carboxyl-terminal region of the rat parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor enhances PTH stimulation of adenylyl cyclase but not phospholipase C. *J Biol Chem* 1995. **270**: 8458-8465.

- 117 **Ikeda, K., Weir, E. C., Mangin, M., Dannies, P. S., Kinder, B., Defetos, L. J., Brown, E. M. and Broadus, A. E.**, Expression of messenger ribonucleic acids encoding a parathyroid hormone-like peptide in normal human and animal tissues with abnormal expression in human parathyroid adenomas. *Mol Endocrinol* 1988. **2**: 1230-1236.
- 118 **Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A.**, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 1983. **153**: 163-168.
- 119 **James, P., Halladay, J. and Craig, E. A.**, Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 1996. **144**: 1425-1436.
- 120 **Ji, T. H., Grossmann, M. and Ji, I.**, G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 1998. **273**: 17299-17302.
- 121 **John, M. R., Arai, M., Rubin, D. A., Jonsson, K. B. and Juppner, H.**, Identification and characterization of the murine and human gene encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Endocrinology* 2002. **143**: 1047-1057.
- 122 **Joun, H., Lanske, B., Karperien, M., Qian, F., Defize, L. and Abou-Samra, A.**, Tissue-specific transcription start sites and alternative splicing of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor gene: a new PTH/PTHrP receptor splice variant that lacks the signal peptide. *Endocrinology* 1997. **138**: 1742-1749.
- 123 **Juppner, H.**, 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* 1994. **3**: 371-378.
- 124 **Juppner, H., Abou-Samra, A. B., Freeman, M., Kong, X. F., Schipani, E., Richards, J., Kola-kowski, L. F., Jr., Hock, J., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M. and et al.**, A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 1991. **254**: 1024-1026.
- 125 **Juppner, H., Schipani, E., Bringham, F. R., McClure, I., Keutmann, H. T., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M., Abou-Samra, A. B., Segre, G. V. and Gardella, T. J.**, 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* 1994. **134**: 879-884.
- 126 **Kamradt, M. C., Chen, F., Sam, S. and Cryns, V. L.**, The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2002. **277**: 38731-38736.
- 127 **Karthikeyan, S., Leung, T., Birrane, G., Webster, G. and Ladias, J. A.**, Crystal structure of the PDZ1 domain of human Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor provides insights into the mechanism of carboxyl-terminal leucine recognition by class I PDZ domains. *J Mol Biol* 2001. **308**: 963-973.
- 128 **Kemp, B. E., Moseley, J. M., Rodda, C. P., Ebeling, P. R., Wettenhall, R. E., Stapleton, D., Diefenbach-Jagger, H., Ure, F., Michelangeli, V. P., Simmons, H. A. and et al.**, Parathyroid hormone-related protein of malignancy: active synthetic fragments. *Science* 1987. **238**: 1568-1570.
- 129 **Kenakin, T.**, Agonist-specific receptor conformations. *Trends Pharmacol Sci* 1997. **18**: 416-417.
- 130 **Kennedy, M. E. and Limbird, L. E.**, Mutations of the alpha 2A-adrenergic receptor that eliminate detectable palmitoylation do not perturb receptor-G-protein coupling. *J Biol Chem* 1993. **268**: 8003-8011.
- 131 **Keusch, I., Traebert, M., Lotscher, M., Kaissling, B., Murer, H. and Biber, J.**, Parathyroid hormone and dietary phosphate provoke a lysosomal routing of the proximal tubular Na/Pi-cotransporter type II. *Kidney Int* 1998. **54**: 1224-1232.
- 132 **Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y. N. and Sheng, M.**, Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 1995. **378**: 85-88.
- 133 **Kocher, O., Comella, N., Gilchrist, A., Pal, R., Tognazzi, K., Brown, L. F. and Knoll, J. H.**, PDZK1, a novel PDZ domain-containing protein up-regulated in carcinomas and mapped to chromosome 1q21, interacts with cMOAT (MRP2), the multidrug resistance-associated protein. *Lab Invest* 1999. **79**: 1161-1170.

- 134 **Kocher, O., Comella, N., Tognazzi, K. and Brown, L. F.**, Identification and partial characterization of PDZK1: a novel protein containing PDZ interaction domains. *Lab Invest* 1998. **78**: 117-125.
- 135 **Kocher, O., Pal, R., Roberts, M., Cirovic, C. and Gilchrist, A.**, Targeted disruption of the PDZK1 gene by homologous recombination. *Mol Cell Biol* 2003. **23**: 1175-1180.
- 136 **Kolakowski, L. F., Jr.**, GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 1994. **2**: 1-7.
- 137 **Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. and Seeburg, P. H.**, Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 1995. **269**: 1737-1740.
- 138 **Koshland, D. E., Jr. and Neet, K. E.**, The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annu Rev Biochem* 1968. **37**: 359-410.
- 139 **Kovacs, C. S., Lanske, B., Hunzelman, J. L., Guo, J., Karaplis, A. C. and Kronenberg, H. M.**, Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. **93**: 15233-15238.
- 140 **Koyama, H., Goodpasture, C., Miller, M. M., Teplitz, R. L. and Riggs, A. D.**, Establishment and characterization of a cell line from the American opossum (*Didelphys virginiana*). *In Vitro* 1978. **14**: 239-246.
- 141 **Krupnick, J. G. and Benovic, J. L.**, The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998. **38**: 289-319.
- 142 **Krupnick, J. G., Goodman, O. B., Jr., Keen, J. H. and Benovic, J. L.**, Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J Biol Chem* 1997. **272**: 15011-15016.
- 143 **Kuriyan, J. and Cowburn, D.**, Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1997. **26**: 259-288.
- 144 **Laemmli, U. K.**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. **227**: 680-685.
- 145 **Lamprecht, G., Weinman, E. J. and Yun, C. H.**, The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3. *J Biol Chem* 1998. **273**: 29972-29978.
- 146 **Lanske, B., Divieti, P., Kovacs, C. S., Pirro, A., Landis, W. J., Krane, S. M., Bringham, F. R. and Kronenberg, H. M.**, The parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mediates actions of both ligands in murine bone. *Endocrinology* 1998. **139**: 5194-5204.
- 147 **Lauriere, M.**, A semidry electroblotting system efficiently transfers both high- and low-molecular-weight proteins separated by SDS-PAGE. *Anal Biochem* 1993. **212**: 206-211.
- 148 **Lee, C., Gardella, T. J., Abou-Samra, A. B., Nussbaum, S. R., Segre, G. V., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M. and Juppner, H.**, Role of the extracellular regions of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor in hormone binding. *Endocrinology* 1994. **135**: 1488-1495.
- 149 **Leff, P.**, The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 1995. **16**: 89-97.
- 150 **Lefkowitz, R. J.**, G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 1998. **273**: 18677-18680.
- 151 **MacGregor, R. R., Jilka, R. L. and Hamilton, J. W.**, Formation and secretion of fragments of parathormone. Identification of cleavage sites. *J Biol Chem* 1986. **261**: 1929-1934.
- 152 **Mahon, M. J., Donowitz, M., Yun, C. C. and Segre, G. V.**, Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 2 directs parathyroid hormone 1 receptor signalling. *Nature* 2002. **417**: 858-861.
- 153 **Malecz, N., Bambino, T., Bencsik, M. and Nissenson, R. A.**, Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization. *Mol Endocrinol* 1998. **12**: 1846-1856.
- 154 **Mangin, M., Ikeda, K., Dreyer, B. E. and Broadus, A. E.**, Isolation and characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989. **86**: 2408-2412.

- 155 **Mangin, M., Ikeda, K., Dreyer, B. E., Milstone, L. and Broadus, A. E.**, Two distinct tumor-derived, parathyroid hormone-like peptides result from alternative ribonucleic acid splicing. *Mol Endocrinol* 1988. **2**: 1049-1055.
- 156 **Mannstadt, M., Juppner, H. and Gardella, T. J.**, Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol* 1999. **277**: F665-675.
- 157 **Martin, K. J., Hruska, K. A., Freitag, J. J., Klahr, S. and Slatopolsky, E.**, The peripheral metabolism of parathyroid hormone. *N Engl J Med* 1979. **301**: 1092-1098.
- 158 **Matsushita, H., Usui, M., Hara, M., Shishiba, Y., Nakazawa, H., Honda, K., Torigoe, K., Kohno, K. and Kurimoto, M.**, Co-secretion of parathyroid hormone and parathyroid-hormone-related protein via a regulated pathway in human parathyroid adenoma cells. *Am J Pathol* 1997. **150**: 861-871.
- 159 **McCuaig, K. A., Clarke, J. C. and White, J. H.**, Molecular cloning of the gene encoding the mouse parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994. **91**: 5051-5055.
- 160 **McCuaig, K. A., Lee, H. S., Clarke, J. C., Assar, H., Horsford, J. and White, J. H.**, Parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor gene transcripts are expressed from tissue-specific and ubiquitous promoters. *Nucleic Acids Res* 1995. **23**: 1948-1955.
- 161 **McDonald, P. H. and Lefkowitz, R. J.**, Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions. *Cell Signal* 2001. **13**: 683-689.
- 162 **McKee, R. L. and Caulfield, M. P.**, Synthetic peptides as tools for investigating the pathogenicity of disease: humoral hypercalcemia of malignancy. *Pept Res* 1989. **2**: 161-166.
- 163 **Morais Cabral, J. H., Petosa, C., Sutcliffe, M. J., Raza, S., Byron, O., Poy, F., Marfatia, S. M., Chishti, A. H. and Liddington, R. C.**, Crystal structure of a PDZ domain. *Nature* 1996. **382**: 649-652.
- 164 **Moseley, J. M., Kubota, M., Diefenbach-Jagger, H., Wettenhall, R. E., Kemp, B. E., Suva, L. J., Rodda, C. P., Ebeling, P. R., Hudson, P. J., Zajac, J. D. and et al.**, Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987. **84**: 5048-5052.
- 165 **Mullis, K. B.**, The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990. **262**: 56-61, 64-55.
- 166 **Nagasaki, K., Yamaguchi, K., Miyake, Y., Hayashi, C., Honda, S., Urakami, K., Miki, K., Kimura, S., Watanabe, T., Abe, K. and et al.**, In vitro and in vivo antagonists against parathyroid hormone-related protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1989. **158**: 1036-1042.
- 167 **Nakahashi, Y., Taketani, S., Okuda, M., Inoue, K. and Tokunaga, R.**, Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human ferrochelatase. *Biochem Biophys Res Commun* 1990. **173**: 748-755.
- 168 **Nanevicz, T., Wang, L., Chen, M., Ishii, M. and Coughlin, S. R.**, Thrombin receptor activating mutations. Alteration of an extracellular agonist recognition domain causes constitutive signaling. *J Biol Chem* 1996. **271**: 702-706.
- 169 **Naveh-Many, T., Friedlaender, M. M., Mayer, H. and Silver, J.**, Calcium regulates parathyroid hormone messenger ribonucleic acid (mRNA), but not calcitonin mRNA in vivo in the rat. Dominant role of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 1989. **125**: 275-280.
- 170 **Nishiyama, H., Higashitsuji, H., Yokoi, H., Itoh, K., Danno, S., Matsuda, T. and Fujita, J.**, Cloning and characterization of human CIRP (cold-inducible RNA-binding protein) cDNA and chromosomal assignment of the gene. *Gene* 1997. **204**: 115-120.
- 171 **Nishiyama, H., Itoh, K., Kaneko, Y., Kishishita, M., Yoshida, O. and Fujita, J.**, A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *J Cell Biol* 1997. **137**: 899-908.
- 172 **Nutt, R. F., Caulfield, M. P., Levy, J. J., Gibbons, S. W., Rosenblatt, M. and McKee, R. L.**, Removal of partial agonism from parathyroid hormone (PTH)-related protein-(7-34)NH₂ by substitution of PTH amino acids at positions 10 and 11. *Endocrinology* 1990. **127**: 491-493.

- 173 **O'Dowd, B. F., Hnatowich, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Bouvier, M.**, 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* 1989. **264**: 7564-7569.
- 174 **O'Dowd, B. F., Hnatowich, M., Regan, J. W., Leader, W. M., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.**, Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human beta 2-adrenergic receptor. Localization of regions involved in G protein-receptor coupling. *J Biol Chem* 1988. **263**: 15985-15992.
- 175 **Offermanns, S., Iida-Klein, A., Segre, G. V. and Simon, M. I.**, G alpha q family members couple parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide and calcitonin receptors to phospholipase C in COS-7 cells. *Mol Endocrinol* 1996. **10**: 566-574.
- 176 **Orloff, J. J., Soifer, N. E., Fodero, J. P., Dann, P. and Burtis, W. J.**, Accumulation of carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein in renal failure. *Kidney Int* 1993. **43**: 1371-1376.
- 177 **Ostrowski, J., Kjelsberg, M. A., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J.**, Mutagenesis of the beta 2-adrenergic receptor: how structure elucidates function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992. **32**: 167-183.
- 178 **Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. and Miyano, M.**, Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* 2000. **289**: 739-745.
- 179 **Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J. and Sturgill, T. W.**, Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *Embo J* 1991. **10**: 885-892.
- 180 **Perlman, J. H., Colson, A. O., Wang, W., Bence, K., Osman, R. and Gershengorn, M. C.**, Interactions between conserved residues in transmembrane helices 1, 2, and 7 of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 1997. **272**: 11937-11942.
- 181 **Pfister, M. F., Ruf, I., Stange, G., Ziegler, U., Lederer, E., Biber, J. and Murer, H.**, Parathyroid hormone leads to the lysosomal degradation of the renal type II Na/Pi cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. **95**: 1909-1914.
- 182 **Phillips, T. A., VanBogelen, R. A. and Neidhardt, F. C.**, Ion gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *J Bacteriol* 1984. **159**: 283-287.
- 183 **Phillips, W. J. and Cerione, R. A.**, Rhodopsin/transducin interactions. I. Characterization of the binding of the transducin-beta gamma subunit complex to rhodopsin using fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem* 1992. **267**: 17032-17039.
- 184 **Pines, M., Fukayama, S., Costas, K., Meurer, E., Goldsmith, P. K., Xu, X., Muallem, S., Behar, V., Chorev, M., Rosenblatt, M., Tashjian, A. H., Jr. and Suva, L. J.**, Inositol 1-,4-,5-trisphosphate-dependent Ca²⁺ signaling by the recombinant human PTH/PTHrP receptor stably expressed in a human kidney cell line. *Bone* 1996. **18**: 381-389.
- 185 **Pippig, S., Andexinger, S., Daniel, K., Puzicha, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Lohse, M. J.**, Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 1993. **268**: 3201-3208.
- 186 **Pippig, S., Andexinger, S. and Lohse, M. J.**, Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol* 1995. **47**: 666-676.
- 187 **Piserchio, A., Usdin, T. and Mierke, D. F.**, Structure of tuberoindubular peptide of 39 residues. *J Biol Chem* 2000. **275**: 27284-27290.
- 188 **Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E. and Blake, D. J.**, PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* 1997. **19**: 469-479.
- 189 **Pribanic, S., Gisler, S. M., Bacic, D., Madjdpour, C., Hernando, N., Sorribas, V., Gantenbein, A., Biber, J. and Murer, H.**, Interactions of MAP17 with the NaPi-IIa/PDZK1 protein complex in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003. **285**: F784-791.
- 190 **Puffenberger, E. G., Hosoda, K., Washington, S. S., Nakao, K., deWit, D., Yanagisawa, M. and Chakravart, A.**, A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 1994. **79**: 1257-1266.

- 191 **Qian, F., Leung, A. and Abou-Samra, A.**, Agonist-dependent phosphorylation of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Biochemistry* 1998. **37**: 6240-6246.
- 192 **Ralston, S. H.**, The pathogenesis of humoral hypercalcaemia of malignancy. *Lancet* 1987. **2**: 1443-1446.
- 193 **Raue, F. and Blind, E.**, [Parathyroid hormone-related protein. A new calcium regulating hormone and its significance in tumor-associated hypercalcemia]. *Dtsch Med Wochenschr* 1993. **118**: 916-920.
- 194 **Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P. G. and Ballabio, A.**, The tripartite motif family identifies cell compartments. *Embo J* 2001. **20**: 2140-2151.
- 195 **Rodbell, M., Krans, H. M., Pohl, S. L. and Birnbaumer, L.**, The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanylnucleotides on binding of 125I-glucagon. *J Biol Chem* 1971. **246**: 1872-1876.
- 196 **Roettger, B. F., Ghanekar, D., Rao, R., Toledo, C., Yingling, J., Pinon, D. and Miller, L. J.**, Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *Mol Pharmacol* 1997. **51**: 357-362.
- 197 **Rubin, D. A., Hellman, P., Zon, L. I., Lobb, C. J., Bergwitz, C. and Juppner, H.**, A G protein-coupled receptor from zebrafish is activated by human parathyroid hormone and not by human or teleost parathyroid hormone-related peptide. Implications for the evolutionary conservation of calcium-regulating peptide hormones. *J Biol Chem* 1999. **274**: 23035-23042.
- 198 **Rubin, D. A. and Juppner, H.**, Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide. *J Biol Chem* 1999. **274**: 28185-28190.
- 199 **Salinovich, O. and Montelaro, R. C.**, Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1986. **156**: 341-347.
- 200 **Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T. and Lefkowitz, R. J.**, A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 1993. **268**: 4625-4636.
- 201 **Scheer, A., Fanelli, F., Costa, T., De Benedetti, P. G. and Cotecchia, S.**, Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *Embo J* 1996. **15**: 3566-3578.
- 202 **Schertler, G. F., Villa, C. and Henderson, R.**, Projection structure of rhodopsin. *Nature* 1993. **362**: 770-772.
- 203 **Schiestl, R. H. and Gietz, R. D.**, High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 1989. **16**: 339-346.
- 204 **Schipani, E., Karga, H., Karaplis, A. C., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M., Segre, G. V., Abou-Samra, A. B. and Juppner, H.**, Identical complementary deoxyribonucleic acids encode a human renal and bone parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *Endocrinology* 1993. **132**: 2157-2165.
- 205 **Schipani, E., Kruse, K. and Juppner, H.**, A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science* 1995. **268**: 98-100.
- 206 **Schipani, E., Langman, C., Hunzelman, J., Le Merrer, M., Loke, K. Y., Dillon, M. J., Silve, C. and Juppner, H.**, A novel parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mutation in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1999. **84**: 3052-3057.
- 207 **Schipani, E., Langman, C. B., Parfitt, A. M., Jensen, G. S., Kikuchi, S., Kooh, S. W., Cole, W. G. and Juppner, H.**, Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia [see comments]. *N Engl J Med* 1996. **335**: 708-714.
- 208 **Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. and Peitsch, M. C.**, SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 2003. **31**: 3381-3385.

- 209 **Sells, S. P., Smith, T. E. and Sprenkle, D. H.**, Integrating qualitative and quantitative research methods: a research model. *Fam Process* 1995. **34**: 199-218.
- 210 **Sheikh, S. P., Vilardarga, J. P., Baranski, T. J., Lichtarge, O., Iiri, T., Meng, E. C., Nissenson, R. A. and Bourne, H. R.**, Similar structures and shared switch mechanisms of the beta2-adrenoceptor and the parathyroid hormone receptor. Zn(II) bridges between helices III and VI block activation. *J Biol Chem* 1999. **274**: 17033-17041.
- 211 **Shimizu, M., Potts, J. T., Jr. and Gardella, T. J.**, Minimization of parathyroid hormone. Novel amino-terminal parathyroid hormone fragments with enhanced potency in activating the type-1 parathyroid hormone receptor. *J Biol Chem* 2000. **275**: 21836-21843.
- 212 **Smith, D. P., Zhang, X. Y., Frolik, C. A., Harvey, A., Chandrasekhar, S., Black, E. C. and Hsiung, H. M.**, Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Biochim Biophys Acta* 1996. **1307**: 339-347.
- 213 **Smock, S. L., Vogt, G. A., Castleberry, T. A., Lu, B. and Owen, T. A.**, Molecular cloning and functional characterization of the canine parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor (PTH1). *Mol Biol Rep* 2001. **28**: 235-243.
- 214 **Strader, C. D., Fong, T. M., Graziano, M. P. and Tota, M. R.**, The family of G-protein-coupled receptors. *Faseb J* 1995. **9**: 745-754.
- 215 **Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D. and Dixon, R. A.**, Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 1994. **63**: 101-132.
- 216 **Strader, C. D., Sigal, I. S., Register, R. B., Candelore, M. R., Rands, E. and Dixon, R. A.**, Identification of residues required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987. **84**: 4384-4388.
- 217 **Studier, F. W. and Moffatt, B. A.**, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986. **189**: 113-130.
- 218 **Suryanarayana, S., von Zastrow, M. and Kobilka, B. K.**, Identification of intramolecular interactions in adrenergic receptors. *J Biol Chem* 1992. **267**: 21991-21994.
- 219 **Swarthout, J. T., Doggett, T. A., Lemker, J. L. and Partridge, N. C.**, Stimulation of extracellular signal-regulated kinases and proliferation in rat osteoblastic cells by parathyroid hormone is protein kinase C-dependent. *J Biol Chem* 2001. **276**: 7586-7592.
- 220 **Takafuta, T., Wu, G., Murphy, G. F. and Shapiro, S. S.**, Human beta-filamin is a new protein that interacts with the cytoplasmic tail of glycoprotein Ibalpha. *J Biol Chem* 1998. **273**: 17531-17538.
- 221 **Takasu, H., Gardella, T. J., Luck, M. D., Potts, J. T., Jr. and Bringhurst, F. R.**, 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* 1999. **38**: 13453-13460.
- 222 **Takeuchi, T., Shuman, M. A. and Craik, C. S.**, Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. **96**: 11054-11061.
- 223 **Tanaka, H., Moroi, K., Iwai, J., Takahashi, H., Ohnuma, N., Hori, S., Takimoto, M., Nishiyama, M., Masaki, T., Yanagisawa, M., Sekiya, S. and Kimura, S.**, Novel mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease and their characterization. *J Biol Chem* 1998. **273**: 11378-11383.
- 224 **Thiede, M. A., Strewler, G. J., Nissenson, R. A., Rosenblatt, M. and Rodan, G. A.**, Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormone-like peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988. **85**: 4605-4609.
- 225 **Tohgo, A., Pierce, K. L., Choy, E. W., Lefkowitz, R. J. and Luttrell, L. M.**, beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem* 2002. **277**: 9429-9436.

- 226 **Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.**, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979. **76**: 4350-4354.
- 227 **Trumpp-Kallmeyer, S., Hoflack, J., Bruinvels, A. and Hibert, M.**, Modeling of G-protein-coupled receptors: application to dopamine, adrenaline, serotonin, acetylcholine, and mammalian opsin receptors. *J Med Chem* 1992. **35**: 3448-3462.
- 228 **Turner, P. R., Mefford, S., Bambino, T. and Nissenson, R. A.**, Transmembrane residues together with the amino terminus limit the response of the parathyroid hormone (PTH) 2 receptor to PTH-related peptide. *J Biol Chem* 1998. **273**: 3830-3837.
- 229 **Unger, V. M., Hargrave, P. A., Baldwin, J. M. and Schertler, G. F.**, Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* 1997. **389**: 203-206.
- 230 **Urena, P., Kong, X. F., Abou-Samra, A. B., Juppner, H., Kronenberg, H. M., Potts, J. T., Jr. and Segre, G. V.**, Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology* 1993. **133**: 617-623.
- 231 **Usdin, T. B.**, The PTH2 receptor and TIP39: a new peptide-receptor system. *TIPS* 2000. **21**: 128-130.
- 232 **Usdin, T. B., Bonner, T. I., Harta, G. and Mezey, E.**, Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat. *Endocrinology* 1996. **137**: 4285-4297.
- 233 **Usdin, T. B., Gruber, C. and Bonner, T. I.**, Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem* 1995. **270**: 15455-15458.
- 234 **Usdin, T. B., Hoare, S. R., Wang, T., Mezey, E. and Kowalak, J. A.**, TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus. *Nat Neurosci* 1999. **2**: 941-943.
- 235 **Usdin, T. B., Modi, W. and Bonner, T. I.**, Assignment of the human PTH2 receptor gene (PTHR2) to chromosome 2q33 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1996. **37**: 140-141.
- 236 **Usdin, T. B., Wang, T., Hoare, S. R., Mezey, E. and Palkovits, M.**, New members of the parathyroid Hormone/Parathyroid hormone receptor family: the parathyroid hormone 2 receptor and tuberoinfundibular peptide of 39 residues [In Process Citation]. *Front Neuroendocrinol* 2000. **21**: 349-383.
- 237 **Vaccaro, P. and Dente, L.**, PDZ domains: troubles in classification. *FEBS Lett* 2002. **512**: 345-346.
- 238 **Vasicek, T. J., McDevitt, B. E., Freeman, M. W., Fennick, B. J., Hendy, G. N., Potts, J. T., Jr., Rich, A. and Kronenberg, H. M.**, Nucleotide sequence of the human parathyroid hormone gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983. **80**: 2127-2131.
- 239 **Verheijen, M. H. and Defize, L. H.**, Parathyroid hormone activates mitogen-activated protein kinase via a cAMP-mediated pathway independent of Ras. *J Biol Chem* 1997. **272**: 3423-3429.
- 240 **Villardaga, J. P., Bunemann, M., Krasel, C., Castro, M. and Lohse, M. J.**, Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol* 2003. **21**: 807-812.
- 241 **Villardaga, J. P., Frank, M., Krasel, C., Dees, C., Nissenson, R. A. and Lohse, M. J.**, Differential conformational requirements for activation of G proteins and the regulatory proteins arrestin and G protein-coupled receptor kinase in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein. *J Biol Chem* 2001. **276**: 33435-33443.
- 242 **Villardaga, J. P., Krasel, C., Chauvin, S., Bambino, T., Lohse, M. J. and Nissenson, R. A.**, Internalization determinants of the parathyroid hormone receptor differentially regulate beta-arrestin/receptor association. *J Biol Chem* 2002. **277**: 8121-8129.
- 243 **Vogelstein, B. and Gillespie, D.**, Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979. **76**: 615-619.
- 244 **Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I. and Coughlin, S. R.**, Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991. **64**: 1057-1068.

- 245 **Wade, J. B., Welling, P. A., Donowitz, M., Shenolikar, S. and Weinman, E. J.**, Differential renal distribution of NHERF isoforms and their colocalization with NHE3, ezrin, and ROMK. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001. **280**: C192-198.
- 246 **Wang, S., Yue, H., Derin, R. B., Guggino, W. B. and Li, M.**, Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* 2000. **103**: 169-179.
- 247 **Wang, T., Palkovits, M., Rusnak, M., Mezey, E. and Usdin, T. B.**, Distribution of parathyroid hormone-2 receptor-like immunoreactivity and messenger RNA in the rat nervous system. *Neuroscience* 2000. **100**: 629-649.
- 248 **Ward, H. L., Small, C. J., Murphy, K. G., Kennedy, A. R., Ghatei, M. A. and Bloom, S. R.**, The actions of tuberoinfundibular peptide on the hypothalamo-pituitary axes. *Endocrinology* 2001. **142**: 3451-3456.
- 249 **Weckmann, M. T., Grone, A., Capen, C. C. and Rosol, T. J.**, Regulation of parathyroid hormone-related protein secretion and mRNA expression in normal human keratinocytes and a squamous carcinoma cell line. *Exp Cell Res* 1997. **232**: 79-89.
- 250 **Weinman, E. J., Steplock, D. and Shenolikar, S.**, Acute regulation of NHE3 by protein kinase A requires a multiprotein signal complex. *Kidney Int* 2001. **60**: 450-454.
- 251 **Wess, J.**, G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *Faseb J* 1997. **11**: 346-354.
- 252 **Whitehouse, D. B., Putt, W., Lovegrove, J. U., Morrison, K., Hollyoake, M., Fox, M. F., Hopkinson, D. A. and Edwards, Y. H.**, Phosphoglucomutase 1: complete human and rabbit mRNA sequences and direct mapping of this highly polymorphic marker on human chromosome 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. **89**: 411-415.
- 253 **Willott, E., Balda, M. S., Heintzelman, M., Jameson, B. and Anderson, J. M.**, Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. *Am J Physiol* 1992. **262**: C1119-1124.
- 254 **Wong, S. K., Parker, E. M. and Ross, E. M.**, Chimeric muscarinic cholinergic: beta-adrenergic receptors that activate Gs in response to muscarinic agonists. *J Biol Chem* 1990. **265**: 6219-6224.
- 255 **Woods, D. F. and Bryant, P. J.**, The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* 1991. **66**: 451-464.
- 256 **Xu, W., Ozdener, F., Li, J. G., Chen, C., de Riel, J. K., Weinstein, H. and Liu-Chen, L. Y.**, Functional role of the spatial proximity of Asp114(2.50) in TMH 2 and Asn332(7.49) in TMH 7 of the mu opioid receptor. *FEBS Lett* 1999. **447**: 318-324.
- 257 **Yasuda, T., Banville, D., Hendy, G. N. and Goltzman, D.**, Characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. Functional and evolutionary aspects. *J Biol Chem* 1989. **264**: 7720-7725.
- 258 **Zahraoui, A., Touchot, N., Chardin, P. and Tavitian, A.**, The human Rab genes encode a family of GTP-binding proteins related to yeast YPT1 and SEC4 products involved in secretion. *J Biol Chem* 1989. **264**: 12394-12401.
- 259 **Zhou, W., Flanagan, C., Ballesteros, J. A., Konvicka, K., Davidson, J. S., Weinstein, H., Millar, R. P. and Sealfon, S. C.**, A reciprocal mutation supports helix 2 and helix 7 proximity in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Pharmacol* 1994. **45**: 165-170.
- 260 **Zuberi, A. R., Christianson, G. J., Mendoza, L. M., Shastri, N. and Roopenian, D. C.**, Positional cloning and molecular characterization of an immunodominant cytotoxic determinant of the mouse H3 minor histocompatibility complex. *Immunity* 1998. **9**: 687-698.
- 261 **Zumbrunn, J. and Trueb, B.**, Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett* 1996. **398**: 187-192.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen und Anglizismen

°C	Grad Celcius
AC	Adenylatzyklase
AD	Aktivierungsdomäne
AS	Aminosäure
Assay	Experiment
BD	Bindungsdomäne
blunt- end	„stumpfes“ Ende
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFP	cyan fluorescent protein = blau fluoreszierender Proteinanteil
c-Myc-Tag	c-Myc-Anhang
counts	counts per minute = radioaktive Zerfälle pro Minute
CTERM	Bezeichnung des C-terminalen Abschnitt des P1R als „Köder“ für den „Yeast-two-Hybrid Screen“
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	double-strand DNA = Doppelstrang-DNA
EC ₅₀	halbmaximale effektive Wirkkonzentration
FCS	fötales Kälberserum
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GFP	green fluorescent protein = grün fluoreszierender Proteinanteil
G _i	inhibierendes G-Protein
GPCR	G-protein coupled receptor= G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosintrisphosphat (GTP)-bindendes Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
G _s	stimulierendes G-Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA-Tag	Hämagglutinin-Anhang
HEK 293 E+	humane embryonale Nierenzellen stabil mit dem EBV-Origin transfeziert
hP1R	PTH1-Rezeptor des Menschen
hPTH (1-34)	humanes Parathormon mit 34 AS
hPTHrP	humanes Parathormon-related-protein
IBMX	Isobutyl-Methylxanthin
IC ₅₀	halbmaximale effektive Hemmkonzentration
Insert	kurzes DNA-Fragment
IP	Inositolphosphat
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IZL-3	Bezeichnung der dritte intrazellulären Schleife des P1R als „Köder“ für den Yeast-two-Hybrid Screen“
kb	kilo Basenpaare
K _D	Bindungsaffinitätskonstante
kDa	kilo Dalton
MAPK	mitogen activated protein kinases, Mitogen aktivierte Proteinkinasen
min	Minute
MW	molecular weight = Molekulargewicht
NMR	nuclear magnetic resonance = Kernspinresonanz
OD	optische Dichte
opP1R	PTH1-Rezeptor des Oossums
ORF	open reading frame = offenes Leseraster
P1R	PTH1-Rezeptor
P2R	PTH2-Rezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction = Polymeraseketten- Reaktion

pERK1/2	phosphorylated extracellular-signal related kinase 1/2
PKA	Proteinkinase A (cAMP abhängige Proteinkinase)
PKC	Proteinkinase C
Plasmid	Klonierungsvektor
PLC	Phospholipase C
Primer	DNA-Oligonukleotid
RFP	red fluorescent protein = rot fluoreszierender Proteinanteil
RIA	Radio- Immuno-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.D.	„standard deviation“ = Standardabweichung
S.E.	„standard error“ = Standardfehler
Screen/screening	Suche/durchsuchen
ssDNA	single-strand DNA = Einzelstrang-DNA
sticky end	„klebriges“ Ende
TIP39	tuberoinfindubular peptide of 39 AA = tuberoinfindibulares Peptid aus 39 AS
TM	Transmembrandomäne
U	units = Einheiten
WT	Wildtyp-(Rezeptor)
yeast	Hefe
YFP	yellow fluorescent protein = gelb fluoreszierender Proteinanteil

7.2 Publikationen

Veröffentlichung in wissenschaftlicher Zeitschrift

Ein Teil dieser Arbeit ist zur Veröffentlichung eingereicht bei „Endocrinology“:

Ulla Heindel, Thomas Wobbe, Markus John, Bruno Allolio and Eberhard Blind

„ Signaling properties of the parathyroid hormone 2 receptor tuned by the molecular interplay of type 1 receptor’s intracellular domains“

Vorträge

U. Heindel, S. Schmitt, J.-P. Vilardaga, B. Allolio, E. Blind

“Critical role of a conserved Tyr453 residue in the seventh transmembrane helix of the parathyroid hormone receptor for its coupling to phospholipase C but not to adenylyl cyclase”

44. Symposium DGE und 35. Jahrestagung DDG, München, 2000

U. Heindel, T.Wobbe, M.Weber, M.John, E. Blind

„Characterization of PTH receptor epitopes involved in inositol phosphate signaling using chimeric PTH-1/PTH-2 receptor hybrid constructs“

46. Symposium DGE, Göttingen, 2002

U. Heindel, S. Meyer, B. Allolio, E. Blind

„Identification of proteins interacting with the intracytoplasmatic C-terminal tail of the PTH receptor“

47. Symposium DGE, Köln, 2003

E.M. Endress, **U. Heindel**, A.Eßwein, W. Schäfer, B. Allolio, E. Blind

“Possible role of cysteine residues in the third extracellular loop of the human PTH-2 receptor for its ligand specificity”

44. Symposium DGE und 35. Jahrestagung DDG, München, 2000

O. Jakob, **U. Heindel**, B. Allolio, E. Blind

“Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) acts as a potent agonist of the human PTH-2 receptor (P2R) and as an antagonist for the human PTH-1 receptor (P1R)”

45. Symposium DGE, Magdeburg, 2001

Posterpräsentationen

U. Heindel, J.-P. Vilaradaga, B. Allolio, E. Blind

(1. Posterpreis)

„Die Aminosäuren Tyr-453 und Asn-457 in der siebten Transmembrandomäne des Parathormon-Rezeptors spielen eine wichtige Rolle für dessen Ankopplung an den Phospholipase C-Signalweg“

2. Bad Brückenauer Wintertagung der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg, Bad Brückenau, 2001

U. Heindel, T. Wobbe, M. Weber, E. Blind

„Charakterisierung der für den Inositolphosphat-Signalweg notwendigen Abschnitte des PTH-Rezeptors mittels PTH1R/PTH2R-Hybridkonstrukten“

Alumni-Treffen der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg, Würzburg, 2002

O. Jakob, **U. Heindel**, B. Allolio, E. Blind

„Das neu entdeckte tuberoinfundibuläre Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP39) ist ein potenter Agonist am humanen PTH2-Rezeptor (P2R) und ein Antagonist am humanen PTH1-Rezeptor (P1R)“

2. Bad Brückenauer Wintertagung der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg, Bad Brückenau, 2001

O. Jakob, E.M. Endress, **U. Heindel**, B. Allolio, E. Blind

“Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) interacts both with the human PTH-1 receptor (P1R) and the human PTH-2 receptor (P2R)”

Osteologie 2001, Wiesbaden, 2001

E.M. Endress, **U. Heindel**, A. Eßwein, W. Schäfer, B. Allolio, E. Blind

“Role of the cysteine residues in the third extracellular loop of the PTH receptor for ligand specificity”

23th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Phoenix, Arizona, USA, 2001

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Ulla Heindel

geboren am 23.12.1972 in Würzburg

ledig

Ausbildungsweg und Schule

- 09/79-07/83 Grundschule Ebrach
- 09/83-07/89 Gymnasium FLSH Schloß Gaibach / Außenstelle Gerolzhofen
- 09/89-07/92 Gymnasium FLSH Schloß Gaibach
- 11/92-09/98 Studium der Biologie
an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg
Abschluss: Diplom
- 08/97-08/98 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der Universität Würzburg
Thema:
„Untersuchungen zur Omb Funktion bei *Drosophila melanogaster*“
- 04/99-02/04 Promotionsstudium, im endocrinologischen Labor von
Prof. Dr. med. Bruno Allolio, Medizinische Klinik der Universität Würzburg

Berufstätigkeit

- 04/99-02/04 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Endokrinologischen Labor der
Medizinischen Klinik der Universität Würzburg
- seit 08/04 Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
im Bereich Medizin - klinisches Studienmanagement