

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Mögliche Rolle von Cystein-Resten in der dritten
extrazellulären Schleife des humanen PTH-2 Rezeptors für
dessen Ligandenspezifität**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Eva-Maria Endress
aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2006

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. E. Blind

Koreferent: Professor Dr. med. C. Wanner

mündlicher Prüfer: Priv.-Doz. Dr. med. W. Müllges

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

Danksagung

Hiermit möchte ich die Gelegenheit ergreifen, mich bei meinen leider viel zu früh verstorbenen Grosseltern, Maria und Rudolf Köhler, bedanken, die mir stets wichtige Begleiter in meinem Leben waren und für mich auch heute noch Vorbilder sind. Ihnen ist die vorliegende Arbeit gewidmet.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, Hildegard und Robert Endress, deren nicht zuletzt auch finanzielle Unterstützung mir das Studium ermöglichte und erleichterte.

Herrn Priv. - Doz. Dr. med. Eberhard Blind gebührt mein Dank für die Auswahl und Überlassung des Themas sowie seine motivierende Unterstützung, Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Allen MitarbeiterInnen des endokrinologischen Labors gilt mein Dank für die freundliche Arbeitsatmosphäre, insbesondere möchte ich mich hier bei Frau Simone Hillgärtner (geb. Schmitt) für die tatkräftige und aufmunternde Unterstützung sowie bei Herrn Prof. Dr. med. Bruno Allolio für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Meinem Freundeskreis danke ich für das ausgelassene Freizeitprogramm. Hier gilt insbesondere auch mein Dank meinem Freund Marco Dressler, der mich in einer Phase von experimentellen Rückschlägen fachlich beraten und unterstützt hatte.

Last but not least bedanke ich mich bei meinem Wecker, der mich zu manch unmenschlicher Stunde aus meiner Traumwelt gerissen hat, um mich der Wissenschaft widmen zu können.

1 EINLEITUNG	0
1.1 PARATHORMON (PTH)	6
1.1.1 Biosynthese und Metabolismus	6
1.1.2 Regulation der Synthese und Sekretion	7
1.1.3 Physiologie und Pathophysiologie	7
1.2 PARATHORMON-RELATED-PROTEIN (PTHrP)	9
1.2.1 Biosynthese und Metabolismus	9
1.2.2 Regulation der PTHrP-Produktion	9
1.2.3 Physiologie und Pathophysiologie	10
1.3 TUBEROINFUNDIBULARPEPTID (TIP39)	12
1.4 REZEPTOREN FÜR PTH UND PTHrP	13
1.4.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	13
1.4.2 Die Familie der Sekretin-/ PTH/PTHrP-/ Calcitoninrezeptoren	15
1.5 DER PTH-1 REZEPTOR	15
1.5.1 Charakterisierung	15
1.5.2 Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung	16
1.5.3 Regulation der Signalübertragung	19
1.6 DER PTH2-REZEPTOR	20
1.6.1 Charakterisierung	20
1.6.2 Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung	21
1.7 DER PTH3-REZEPTOR	21
1.8 GPCR-KRANKHEITEN	22
1.8.1 Chondrodysplasie vom Typ Blomstrand	22
1.8.2 Chondrodysplasie vom Typ Jansen	23
1.8.3 Pseudohypoparathyreoidismus (PHP)	23
2 FRAGESTELLUNG	25
3 MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 MATERIAL	27
3.1.1 Chemikalien	27
3.1.2 Lösungen, Medien und Puffer	27
3.1.3 Enzyme	27
3.1.4 Kits	28
3.1.5 Längen-/Gewichtsmarker	28
3.1.6 Primer	29
3.1.7 Vektoren	30
3.1.8 Peptide und Tracer	30
3.1.9 Zelllinie HEK 293E+ (human embryonic kidney)	31

3.1.10 Besondere Verbrauchsmaterialien	31
3.1.11 Laborgeräte	33
3.1.12 Computerprogramme	33
3.2 METHODEN	34
3.2.1 Molekularbiologische Strategien	34
3.2.1.1 Klonierungen	34
3.2.1.2 Überlappungs-Extensions-PCR	35
3.2.1.3 Rezeptor-Mutanten	35
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	37
3.2.2.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden	37
3.2.2.3 Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel	37
3.2.2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation von DNA	38
3.2.2.5 Ligation von linearen DNA-Fragmenten mit der T4-DNA-Ligase	39
3.2.2.6 Herstellung kompetenter E. coli DH5 α -Zellen	39
3.2.2.7 Transformieren von Bakterien	40
3.2.2.8 Glycerolstocks von Bakterienstämmen	41
3.2.2.9 Polymerase-Chain-Reaction (=PCR)	41
3.2.2.10 Plasmid-DNA Extraktion	42
3.2.2.10.1 Analytische Plasmid-DNA Isolierung (Mini-Präparation)	42
3.2.2.10.2 Quantitative Plasmid-DNA-Gewinnung: Maxi-Präparation über QIAGEN-Säulen	43
3.2.2.11 Restriktionsverdau von DNA	43
3.2.3 Zellbiologische Methoden	44
3.2.3.1 Zellkultur von humanen embryonalen Nierenzellen HEK-293	44
3.2.3.2 Transfektion von Plasmid-DNA	45
3.2.3.2.1 Stabile Transfektion mit Lipofektamin	45
3.2.3.2.2 Transiente Transfektion mit Lipofektamin	45
3.2.3.2.3 Transiente Transfektion mit FuGENE™ 6	46
3.2.3.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen	46
3.3 BINDUNGSSTUDIEN	47
3.4 INTERNALISIERUNGSSTUDIEN	48
3.5 MESSUNG DER AKTIVIERUNG DES AC/ cAMP – SIGNALWEGES	49
3.5.1 Akkumulation von cAMP	49
3.5.2 Messung von cAMP im Radio- Immuno- Assay	49
3.6 MESSUNG DER AKTIVIERUNG DES PLC/ IP₃ – SIGNALWEGES	50
3.7 PHARMAKOLOGISCHE HEMMUNG VON PROTEINKINASEN	51
3.8 DATENVERARBEITUNG UND STATISTIK	51
4 ERGEBNISSE	53

4.1 BINDUNGSSTUDIE AN DEN WILDTYPREZEPTOREN PTH1-R UND PTH2-R SOWIE DEN EINZELNE AMINOSÄUREN MUTIERTEN ALA426CYS-R, TYR443CYS-R UND DER DOPPELMUTANTE ALA426,TYR443CYS-R	53
4.2 INTERNALISIERUNGSSTUDIEN	61
4.3 CAMP-SIGNALWEG DES ALA426CYS-, TYR443CYS- UND ALA426,TYR443CYS-REZEPTORS	62
4.4 IP-SIGNALWEG DES ALA426CYS-, TYR443CYS- UND ALA426,TYR443CYS-REZEPTORS	69
4.4.1 IP-Anstieg nach Stimulation mit hPTH(1-34)	69
4.4.2 IP-Anstieg nach Stimulation mit PTHrP(1-34)	70
4.4.3 IP-Antwort nach Blockierung der einzelnen Proteinkinasen	72
5 DISKUSSION	74
5.1 AKTUELLE STUDIE	74
5.1.1 Bindung	74
5.1.2 Internalisierung	75
5.1.3 AC/cAMP-Signalweg	76
5.1.4 PLC-/IP ₃ -Signalweg	76
5.2 WICHTIGE STRUKTUREN IN LIGAND UND REZEPTOR, WELCHE DIE ANKOPPLUNG AN DEN PLC-SIGNALWEG BEDINGEN	77
5.3 DIE KOMPLEXITÄT DES BINDUNGSVERHALTENS DES PTH1-REZEPTORS	78
5.4 WIE GELINGT DEM PTH2-REZEPTOR SEINE LIGANDENSPEZIFITÄT?	83
5.5 DISULFIDBRÜCKENBILDUNGEN IM EXTRAZELLULÄRRaum DER REZEPTOREN	84
5.6 PTH – PTHrP – TIP 39: EIN STRUKTURVERGLEICH	87
6 ZUSAMMENFASSUNG	90
7 LITERATURVERZEICHNIS	92

1 Einleitung

1.1 Parathormon (PTH)

1.1.1 Biosynthese und Metabolismus

Obwohl geringe Mengen an Parathormon-mRNA im Hypothalamus der Ratte detektiert wurden, sind die Nebenschilddrüsen in Säugern der einzige nachgewiesene Synthesort von PTH (1). Parathormon (Parathyrin; PTH) findet sich in allen bisher erforschten Säugetierarten als ein Peptidhormon bestehend aus einem Singulärstrang von 84 Aminosäuren (AS) mit einem Molekulargewicht von 9300g/mol.

Das humane PTH-Gen wurde in enger Nachbarschaft zu dem für Calcitonin auf dem kurzen Arm des Chromosom 11 lokalisiert. (2,3)

Das ursprüngliche Genprodukt ist das Präproparathormon, bestehend aus 115 AS. (4) Die überwiegend hydrophoben 25 AS der Präsequenz dienen dem Transport ins raue endoplasmatische Retikulum, wo sie mittels einer Peptidase entfernt werden. Durch proteolytische Abspaltung der restlichen 6 aminoterminalen AS im Golgi-Apparat wird das Proparathormon zum intakten PTH, das entweder in sekretorischen Vesikeln oder frei im Cytosol bis zur Sekretion gelagert wird (5-7).

Proteolyse des intakten PTH wird hauptsächlich durch den Gehalt an Extrazellulärkalzium bestimmt (8). So findet bei Hyperkalzämie bereits eine Spaltung in der Nebenschilddrüse statt, um die Sekretion des biologisch aktiven PTH den Erfordernissen anzupassen. Innerhalb des Blutkreislaufs hat intaktes PTH (1-84) eine Halbwertszeit von ungefähr 2 Minuten, ehe es entweder einer proteolytischen Spaltung in den Kupffer-Zellen der Leber (60-70%) unterzogen oder durch glomeruläre Filtration in den Nieren ausgeschieden wird (20-30%) (9,10). Die Aufnahme durch Zielzellen spielen hierbei nur eine untergeordnete Rolle (5).

Nach der raschen Proteolyse in der Leber gelangt vor allem das carboxyterminale PTH-Fragment in die Zirkulation zurück, das im gesunden Körper eine Halbwertszeit von 20-

40 Minuten aufweist. Diese kann allerdings bei Niereninsuffizienz noch stark ansteigen, da die Ausscheidung hauptsächlich durch glomeruläre Filtration erfolgt.

Obwohl nur die aminoterminal Region des PTH-Moleküls für dessen Bioaktivität benötigt wird, gibt es Hinweise auf einen Rezeptor, der spezifisch das carboxyterminale PTH-Fragment erkennt. (11) Ausserdem scheint der Carboxyterminus Einfluss auf die Osteoklastenaktivität und die Kollagen-Gen-Expression in Chondrozyten zu nehmen und wird bei der Abspaltung der Prosequenz benötigt. (5), (7), (12-17)

1.1.2 Regulation der Synthese und Sekretion

In vivo ist die extrazelluläre Kalziumkonzentration der wichtigste Regulationsparameter: Hypokalzämie führt zum einen über einen Ca^{2+} -Rezeptor zur PTH-Sekretion aus der Nebenschilddrüse, zum anderen hat es einen Anstieg von PTH-mRNA zu Folge. (18,19)

1,25(OH)₂D₃ besitzt auch eine negative Rückkopplung auf die PTH-Transskription (20). Mehrere Studien belegen darüber hinaus eindrucksvoll, dass die zusätzliche Injektion von 1,25(OH)₂D₃ die effektivsten Analoga zur PTH-Gen-Downregulation darstellen, was eine Therapiemöglichkeit im Falle eines sekundären Hyperparathyreoidismus ist. Des weiteren üben auch Phosphat, Glukokortikoide, cAMP, Proteinkinase A und C und Östrogene Einfluss auf die PTH-Genexpression aus. (21,22)

1.1.3 Physiologie und Pathophysiologie

Neben Calcitonin und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ist PTH der wichtigste Regulator des Kalziumhaushalts durch seine Wirkung auf Niere und Knochen. An der Niere steigert PTH die 1 α -Hydroxylase-Aktivität, wodurch vermehrt 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gebildet wird. Dies bewirkt an der Darmschleimhaut eine gesteigerte Kalziumreabsorption, eine verstärkte Kalzifizierung neuen Osteoids und eine renale Reabsorption von Kalzium und Phosphat. PTH verstärkt ebenfalls in der Niere die Kalziumreabsorption, hemmt jedoch die des Phosphats, um somit regulatorisch auf den

Phosphathaushalt einzuwirken. (23) Dies wird durch eine Reduktion der Oberflächenexpression des Natrium-abhängigen Kotransporters Npt2 erzielt.

Am Knochen wirkt das PTH auf kontroverse Weise:

1. Knochenkatabol: PTH bewirkt eine sofortige Freisetzung (<1 h) von Kalziumionen aus der Matrix. Es vermittelt aber auch Langzeit-Kalzium-Metabolismus, in dem es direkt Osteoblasten stimuliert, was wiederum eine Synthese und/oder Aktivierung von Osteoklasten-Differenzierungs-Faktoren (TRANCE, RANKL/ Osteoprotegerin Ligand) zur Folge hat. (24)

2. Knochenanabol: Mehrere Tiermodell- und Menschenstudien konnten eindrucksvoll darlegen, dass die intermittierende Gabe von PTH zu einer Massenumverteilung von kortikalen zu trabekulären Knochenanteilen führt, wie sich dies auch beim milden Hyperparathyreoidismus findet. (25 - 28)

Beim Überfunktionszustand der Nebenschilddrüse werden drei Formen unterschieden: dem relativ häufigen primären Hyperparathyreoidismus (pHPT) liegt eine autonome Überfunktion zugrunde. Der sekundäre Hyperparathyreoidismus (sHPT) dagegen entsteht durch reaktive PTH-Mehrsekretion aufgrund einer Hypokalzämie bei Niereninsuffizienz oder gastrointestinalen Absorptionsstörungen. Entwickelt sich im Verlauf eines sHPT eine Hyperkalzämie, so spricht man von einem tertiären HPT. Ursache hierfür ist aber nicht eine neu aufgetretene Autonomie, sondern ein Missverhältnis zwischen PTH-Sekretion und -Bedarf.

Die potentielle Rolle von PTH als einem der möglichen Toxine der Urämie ist von laufendem Interesse. Neben den klassischen Zielorganen Knochen und Niere wirkt es im Falle eines PTH-Exzesses auch auf Gehirn, Herz, glatte Muskulatur, Lungen, Erythrozyten, Lymphozyten, Pankreas, Nebennieren und Testes. (29)

Der Hypoparathyreoidismus entsteht meist durch iatrogene Schädigung, seltener idiopathisch (Autoimmungenese?) oder durch Aplasie (Di-George-Syndrom). Leitsymptom ist die hypokalzämische Tetanie mit dem typischen Trousseau-Zeichen. (30)

1.2 Parathormon-related-Protein (PTHrP)

1.2.1 Biosynthese und Metabolismus

Mit dem Parathormon-related-Protein (PTHrP) wurde 1987 das zweite Mitglied der Parathormonfamilie entdeckt. (31 - 33)

Das humane PTHrP wird von einem Gen, lokalisiert am kurzen Arm des Chromosoms 12, kodiert. (34) Das humane Gen für PTHrP ist mit 3 Promotoren, 9 Exons und einem komplexen Muster des Splicings weitaus komplizierter als das humane PTH-Gen. Dennoch weisen die Proteinstrukturen und die Ähnlichkeiten in der Genorganisation auf eine evolutionäre Verwandtschaft hin. Im Gegensatz zu PTH wird PTHrP jedoch von nahezu jeder Zelle und jedem Gewebe innerhalb des Körpers produziert. (32)

Der reifen PTHrP-Sequenz geht eine Präprosequenz, bestehend aus 36 zusätzlichen Aminosäuren, voraus. Durch alternatives RNA-Splicing entstehen drei Proteinisoformen aus 139, 141 oder 173 Aminosäuren, welche bis AS 139 identisch sind. Die Isoformen werden mittels einer Prohormon-Konvertase innerhalb der sezernierenden Zelle geschnitten. (35) Auf diese Weise entstehen das aminoterminele Fragment PTHrP(1-36), das zu einer Bindung an den klassischen PTH/PTHrP (=PTH1)-Rezeptor imstande ist, das „Midregion“-Fragment PTHrP(37-94) und das Carboxyterminale PTHrP-Peptid (107-139) (=Osteostatin). Daher ist PTHrP ein sogenanntes Polyhormon, ein Vorläufer von verschiedensten biologisch aktiven Peptiden, und gleicht in dieser Hinsicht dem Proopiomelanocortin aus der Hypophyse, dem ACTH, MSH, β -Lipotropin, und die Endorphine und Enkephaline entstammen. (35 - 37)

1.2.2 Regulation der PTHrP-Produktion

Für einige Faktoren konnte gezeigt werden, dass sie Einfluss auf die PTHrP-Expression nehmen. So stimuliert zum Beispiel das Prolaktin in laktierenden Mammæ die PTHrP-Translation, ebenso wie Östrogengaben und intrauterine Nidration. (38,39) In kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen senken Glukokortikoide und Vitamin D₃ die

PTHrP-Produktion, wohingegen Wachstumsfaktoren stimulierend wirken. Diese modulierenden Stoffe spielen eine teilweise wichtige Rolle in der Kontrolle der PTHrP-Produktion durch Tumore. Man versucht die PTHrP-Überproduktion der Tumorzellen durch Gabe von nicht-hyperkalzämischen Dosen Vitamin D₃-Analoge, die den Einfluss der Wachstumsfaktoren verhindern zu minimieren.

1.2.3 Physiologie und Pathophysiologie

PTHrP wurde 1982 als der verantwortliche Faktor für die Ausbildung des paraneoplastischen Syndroms der malignen Hyperkalzämie identifiziert, die 10-20% aller Tumorpatienten im Laufe ihrer Krankheit entwickeln. 1987 gelang schließlich die Isolierung des PTHrP aus verschiedenen Tumoren, die eine Hyperkalzämie verursachen. (31), (40 - 43) Bei Frauen neigt besonders das Mammakarzinom, bei Männern das Bronchialkarzinom vom Plattenepithel-Ca-Typ, zur Ausbildung einer Hyperkalzämie, die klinisch dem primären Hyperparathyreoidismus gleicht. Pankreasinselzelltumore, Phäochromozytome und das adulte T-Zell-Leukämie-Syndrom sezernieren PTHrP, ebenso wie es für einige Fälle des Multiplen Myeloms und der Sarkoidose vermutet wird.

Wahrscheinlich ist das PTHrP auch für die Ausbildung anderer Komorbiditäten bei Tumorerkrankungen wie z.B. Kachexie oder Knochenmetastasen verantwortlich. (44) So zeigten Patientinnen mit PTHrP-positivem Mamma-Ca eine weitaus größere Wahrscheinlichkeit für die Metastasierung in Knochen als die PTHrP-negativen Tumoren. (45) Neutralisierende Antikörper gegen PTHrP konnten die osteolytischen Metastasen reduzieren. (46)

Ganz im Gegensatz zur humoralen Tumorhyperkalzämie, in der PTHrP ein klassisches „endokrines“ Hormon darstellt, hat es unter normalen Umständen vorwiegend eine parakrin und /oder autokrin vermittelte Funktion.

Diese offensichtlich physiologischen Aufgaben erscheinen äußerst komplex und beinhalten:

- 1) Regulation transepithelialen Ca²⁺-Transport (Niere, Plazenta, Eileiter, Brustdrüse)
- 2) Relaxanz glatter Muskulatur (Gefäße, Intestinum, Uterus, Blase)

- 3) Regulation von Zellproliferation, Differenzierung
 4) Apoptose wichtiger bzw. notwendiger Entwicklungsfaktor
 (26), (35), (37), (47 - 55)

Eine detaillierte Information über Expression und Wirkung von PTHrP in verschiedensten Zellen und Geweben gibt Tabelle 1.1

Expression	Wirkung
<u>Mesenchym</u>	
Knorpel	Proliferation der Chondrozyten Inhibierung terminaler Differenzierung und Apoptose der Chondrozyten
Knochen	Stimulierung/Inhibierung der Knochenresorption
Glatte Muskulatur (vaskulär, Myometrium, Harnblase)	Freisetzung nach Dehnung; relaxiert glatte Muskulatur
Herzmuskel	Positiver chronotroper Stimulus; indirekt positiver inotroper Stimulus
Skelettmuskel	Unbekannt
<u>Epithel</u>	
Mamma	Induktion der Morphogenese der Einsprossung; Sekretion in Milch; evtl. Rolle bei Laktation
Epidermis	Unbekannt
Haarfollikel	Inhibierung von Anagen
Magen-/Darmtrakt	unbekannt
Zahnschmelz	Induktion von osteoklastischer Resorption des darüberliegenden Knochens
<u>Endokrines Gewebe</u>	
Nebenschilddrüse	Stimulation plazentaren Calciumtransports
Pankreas	Stimulation von Insulin Sekretion und Wachstum
Hypophyse	unbekannt
<u>Plazenta</u>	Calcium Transport ?
<u>ZNS</u>	freigesetzt von cerebellären Neuronen als Antwort auf L-Typ Calcium Kanäle; Rezeptoren im Cerebellum, Hippocampus und Hypothalamus

Tab. 1.1 Expression und vermutete Wirkung von PTHrP in den verschiedenen Geweben (36), (56)

Die aussagekräftigsten Einblicke in die Schlüsselfunktionen des PTHrP in der normalen Knorpel- und Knochenentwicklung ergaben Untersuchungen an Mäusen, in denen das PTHrP-Gen gezielt durch homologe Rekombination ausgeschaltet worden war. Im heterologen Zustand waren Aussehen, Verhalten und Fertilität unbeeinträchtigt. Im Laufe ihres Lebens entwickelten sie jedoch eine Osteopenie, trotz normaler Regulation des Ca^{2+} - und Phosphathaushalts. Wurden beide PTHrP-Allele gleichzeitig ausgeschaltet, starben die Tiere trotz gesunder Größe und Aussehen während oder kurz nach der Geburt. Eingehendere Untersuchungen ergaben multiple Skelettanomalien, sowie frühzeitige Reifung und Apoptose der Chondrozyten. Überexpression des PTHrP-Gens bewirkte hingegen eine unzureichende enchondrale Ossifikation. In der Regulation der enchondralen Knochenbildung steht PTHrP unter der Kontrolle des Morphogens Indian hedgehog. (50), (57,58),

PTHrP übernimmt auch in der Haut-, Haar- und Brustdrüsenentwicklung, ebenso wie bei der Zahneruption eine führende Rolle. Bei PTHrP-Knockout-Mäusen fehlt der Mutter-Kind-Kalziumgradient, was auf die Funktion als Hauptregulator des plazentaren Ca^{2+} -Transport hinweist. (59)

Neue Studien konnten zeigen, dass PTHrP auch intrakrin als nukleäres/nukleoläres Protein in bestimmten Geweben wirkt. Diese Lokalisation ist Zellzyklus abhängig, durch die mittlere Region (AS 88-106) vermittelt und involviert den Kernrezeptor Importin β 1. (60)

1.3 Tuberoinfundibularpeptid (TIP39)

Die Tatsache, dass der PTH2-Rezeptor in verschiedenen Gehirnnuclei exprimiert wird, aber im Gehirn keine mRNA kodierend für PTH detektiert werden kann, legt die Vermutung nahe, dass neben PTH ein weiterer Ligand für den PTH2-R existieren muss. Erste Hinweise für einen selektiven Liganden des PTH2-R im bovinen Hypothalamus gab es 1997 (61). 1999 gelang schließlich die Extraktion des „Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues“ (TIP 39) mit einem Molekulargewicht von 4504.5 g/mol. TIP 39 geht wahrscheinlich aus einem Propeptid hervor. Hinweise auf posttranslationale Modifikationen existieren aber nicht. (62,63)

Untersuchungen des PTH2-R-Verteilungsmusters im ZNS ermöglichen einen Einblick in die mögliche physiologische Rolle des TIP39. Zum einen könnte es in der Hypothalamus-Hypophysenhormon-Freisetzung involviert sein, zum anderen konnte eine starke Rezeptorexpression im Hinterhorn und Trigeminalganglion und -kern detektiert werden, deren Hauptaufgabe in der Schmerzweiterleitung liegt. Unterstützung findet diese These durch induzierte intrazelluläre cAMP-Erhöhung in diesen Neuronen, die eine potenzierte Nozizeption zur Folge hatte. Auch außerhalb des ZNS weisen verschiedene Organe eine relativ hohe PTH2-R-Expression auf: so könnte TIP39 auch die Somatostatin produzierenden D-Zellen der Pankreasinseln, die Ca^{2+} -Homöostase und kardiovaskuläre Funktion beeinflussen (64,65). Daneben scheint es in allen bislang untersuchten Spezies hochkonserviert zu sein, über den PTH-2 Rezeptor die Adenylatcyclase zu aktivieren und einen intrazellulären Calciumanstieg zur Folge zu haben. (66)

1.4 Rezeptoren für PTH und PTHrP

1.4.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Neben Ionenkanälen und über Enzymaktivierung wirkenden Rezeptoren stellen G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR) die größte Gruppe unter den Membranrezeptoren dar. Mehr als 1000 unterschiedliche GPCR wurden seit der Klonierung der ersten Rezeptoren vor mehr als einer Dekade identifiziert. Die chemische Vielfalt der endogenen Liganden ist sehr gross: Photonen, Ionen, kleinmolekulare Substanzen wie z.B. Katecholamine, aber auch die großen Glykoproteine.

Trotz des mannigfaltigen Ligandenspektrums weisen – basierend auf Hydrophobizitätsstudien - alle GPCR eine ähnliche Struktur und Signaltransduktion auf: eine singuläre Polypeptidkette durchspannt die Zellmembran genau siebenmal. Dadurch entstehen neben sieben Transmembranregionen (TM), eine unterschiedlich lange

extrazelluläre aminoternale Domäne, ein intrazellulärer Carboxyabschnitt und jeweils drei extra-und intrazelluläre Schleifen.

Heterotrimere G-Proteine (α, β, γ) bilden die funktionelle Verbindung zwischen extrazellulärem Signal und intrazellulärer Veränderung der second messenger und/oder der Ionenkonzentration. Der aktivierte Rezeptor katalysiert den Austausch des GDP im inaktiven gegen GTP im aktiven Zustand der α - Untereinheit. Dies bewirkt, dass die α - Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Komplex, der durch nicht-kovalente Kräfte zwischen beiden Untereinheiten zu einer funktionellen Einheit verbunden wird, wegdiffundiert und mit den für die biologische Antwort verantwortlichen Proteinen assoziiert. Die intrinsische GTPase-Aktivität der α - Untereinheit und deren Anlagerung an den $\beta\gamma$ -Komplex beendet die Aktivität des G-Proteins und damit die Signalübertragung. Auch den β - und γ -Untereinheiten werden zusätzliche Signalfunktionen zugesprochen. (67)

Die bis jetzt bekannten 23 verschiedenen G α - Untereinheiten werden in 4 Subfamilien (G_s, G_i, G_q, G_{12}) anhand ihrer Aminosäurenähnlichkeit unterteilt: G_s -Familie aktiviert Adenylatzyklase und Ca^{2+} und hemmt Na^+ -Kanäle, die Pertussistoxin-sensitive G_i -Familie hemmt cAMP und Ca^{2+} und stimuliert K^+ -Kanäle und die Pertussistoxin-insensitive G_q -Familie aktiviert die Phospholipase C. Der genaue Effekt der G_{12} -Familie ist bis dato noch unbekannt. (68 - 82, 283)

1.4.2 Die Familie der Sekretin-/ PTH/PTHrP-/ Calcitoninrezeptoren

Die Familie der Sekretinähnlichen Rezeptoren, auch als Klasse II der GPCR bezeichnet, umfasst beinahe 20 verschiedene Rezeptoren für eine Vielzahl von Neuropeptiden, zu denen auch die Rezeptoren für PTH und PTHrP gezählt werden.

Die charakteristischen Eigenschaften dieser Familie erstrecken sich neben einem langen extrazellulären Aminoterminus von durchschnittlich 100 AS, einer 30-60% Sequenzhomologie, die sich vor allem auf die transmembranären Regionen konzentriert, und mindestens zwei Glykosilierungsstellen, unter anderem auf die Konservierung acht extrazellulärer Cysteine, die durch Bildung von Disulfidbrücken entscheidenden Einfluss auf die Tertiärstruktur des Rezeptors haben. (83) Strukturelle Gemeinsamkeiten zu den beiden anderen Familien der GPCR bestehen außer der Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen des ersten und zweiten Extrazellulärschleife nicht.

Aufgrund der Tatsache, dass alle Rezeptoren dieser Familie via G_s -Einheit an den cAMP-/AC- Signalweg koppeln, dürften Erkenntnisse bezüglich der Ligandenaktivierung des PTH/PTHrP-Rezeptors auch auf die anderen Mitglieder dieser Gruppe übertragbar sein und vice versa. (84,85)

1.5 Der PTH-1 Rezeptor

1.5.1 Charakterisierung

Neben der Klonierung des PTH/PTHrP-Rezeptors (=PTH1-R) des Opossums im Jahre 1991 gelang auch die weiterer Säugetiere: der der Ratte, der Maus, des Schweins und der des Menschen, wobei der humane und der des Schweins mit 96% die größte Homologie zueinander zeigen. (54), (86 - 89)

Der humane PTH1-R besteht aus 593 AS und ist an den klassischen Zielorganen des Parathormons, Knochen und Niere, identisch. (90)

Mit Hilfe autoradiographischer Methoden und durch das Einsetzen polyklonaler Antikörper gegen Epitope des PTH1-R konnte dieser auch in Herz- und Skelettmuskel,

Haut, Mamma, Uterus, Plazenta, Ovar, Testis und Leber, sowie an Endothel und glatter Muskulatur lokalisiert werden. (91,92) Des Weiteren konnte auch eine Expressierung in Zellkernen detektiert werden, was die Vermutung nahe legt, dass PTH und/oder PTHrP eine gewisse Rolle in der nukleären Physiologie haben. (93) Außerdem ist der PTH1-R von lebenswichtiger Notwendigkeit, da die Ausschaltung seines Gens, beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 lokalisiert, bei der Maus zu multiplen Skelettfehlbildungen führt, die noch in utero letal sind.

(51), (84), (94 - 100)

1.5.2 Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung

Trotz einer nur kurzstreckigen Sequenzhomologie im aminoterminalen Abschnitt (1-13) bindet der PTH-1 Rezeptor den Liganden PTH, aber auch PTHrP mit gleicher Affinität. Bislang fand sich kein Hinweis auf eine weitere Interaktion des carboxyterminalen Endes bzw. der mittleren Region mit dem Rezeptor. (11), (98), (101 - 104) Das Peptid TIP 39 aktiviert den PTH1-R zwar nicht, wird aber mit einer moderaten Affinität gebunden (105)

Das Bindungsverhalten des hPTH1-R wird ausführlich unter 5.3 diskutiert

Stimulation von PTH1-R exprimierenden Zellen durch PTH(1-34) oder PTHrP(1-34) kann mindestens zwei intrazelluläre second-messenger-Signalwege aktivieren: über G_s die Adenylatzyklase mit anschließender cAMP-Akkumulation und Aktivierung der (cAMP-abhängigen) Proteinkinase A. Die Ankopplung an G_q bedingt die Aktivierung der Phospholipase C mit konsekutiver Akkumulation von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP_3). DAG hat die Aktivierung der Proteinkinase C zur Folge. IP_3 bindet über einen spezifischen Rezeptor ans endoplasmatisches Retikulum und setzt auf diese Weise Ca^{2+} -Ionen frei. (67), (106 - 129)

Über die physiologische Rolle dieser beiden Signalwege liegen zwar nur wenige Informationen vor, jedoch gibt es Hinweise auf die Signaltransduktionsmechanismen. (119)

Die Determinanten für den cAMP/PKA-Signalweg scheinen im Aminoterminus der Liganden PTH und PTHrP zu liegen. (130) Über die Aminosäuren, verantwortlich für Aktivierung des PLC/PKC-Signalweges, liegen dagegen kontroverse Ergebnisse vor: das PTH-Tetrapeptid mit den AS 28-32 war zur Stimulation der PKC-Aktivität in einer Ratten Osteosarkom Zelllinie imstande. (131-133) Zellen, transfiziert mit rekombinantem Ratten/human PTH1-R, zeigten zwar nach PTH(1-30)-Stimulation eine PLC-Aktivierung, jedoch blieb dies mit PTH(3-34) aus. (134)

Nach Untersuchungen mit PTH1-R-Mutationen zu urteilen scheinen der zweite und dritte intrazelluläre Loop über das G_q-Protein für die Aktivierung des PLC-Signalwegs notwendig zu sein und der dritte Intrazellulärloop zusätzlich über G_s an das AC-Signal.

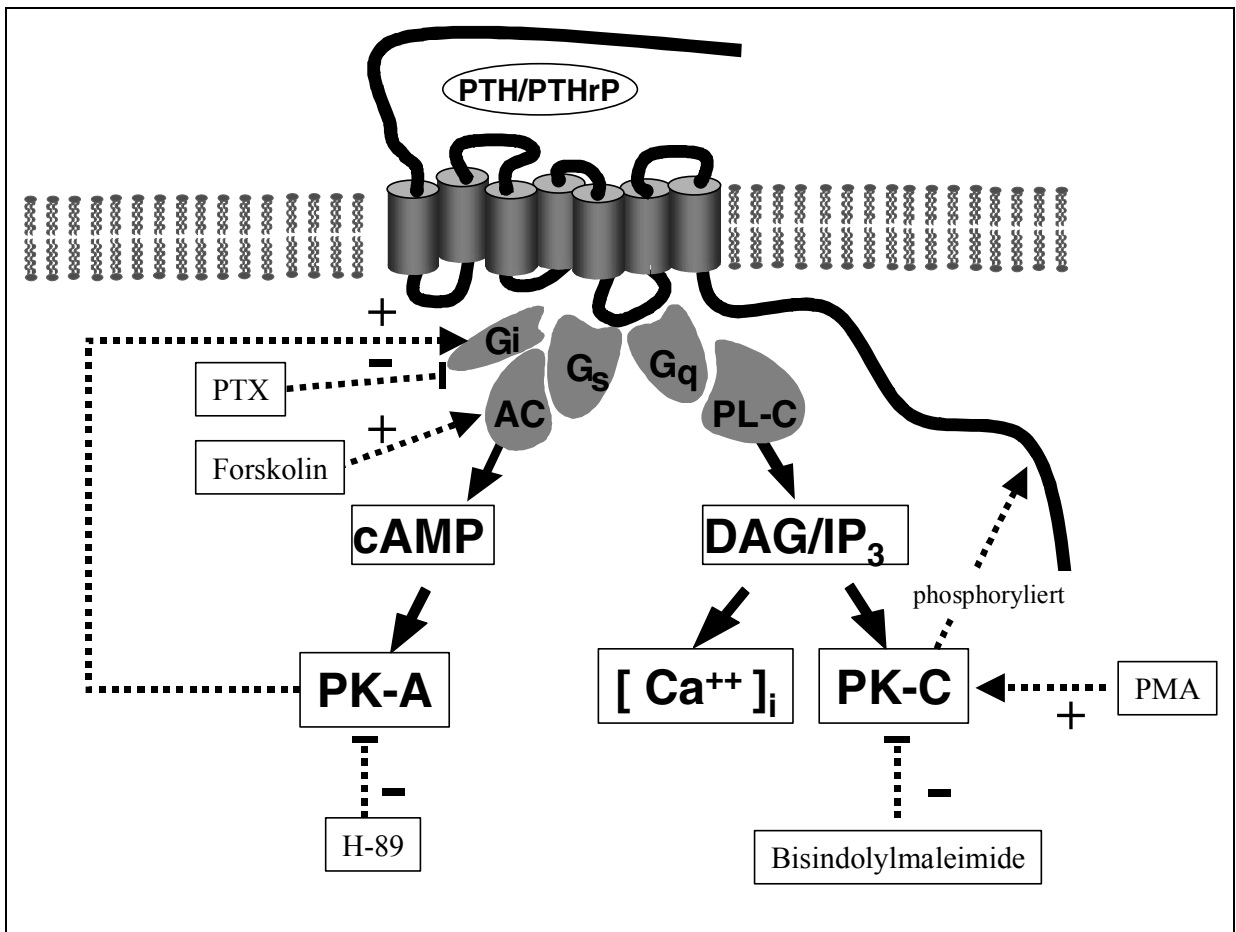


Abbildung 1.1
Schema der intrazellulären Signalübertragung des PTH/PTHrP-Rezeptors.

Durch Aktivierung des stimulierenden G-Proteins G_s wird die Adenylatcyclase (AC) stimuliert, welche intrazelluläres zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als „second messenger“ freisetzt. Ein zweiter Signalweg führt über das G-Protein G_q zur Aktivierung der Phospholipase C (PL-C), was zu einem Anstieg an intrazellulärem Diacylglycerol (DAG), Inositoltrisphosphat (IP_3) und Calcium führt. Über die nachfolgende Aktivierung z.B. der Proteinkinasen (PK-A, PK-C) werden zellspezifische biologische Antworten vermittelt. Die hemmenden Einflüsse des G-Proteins G_i auf die Adenylatcyclase werden durch PK-A verstärkt und durch Pertussistoxin (PTX) gehemmt.

1.5.3 Regulation der Signalübertragung

Desensibilisierung ist ein Anpassungsmechanismus in biologischen Systemen, der als Schutz vor Dauerstimulation mit nachfolgenden Schädigungen dient. Bei G-Proteinen läuft der Desensitivierungsprozess in mehreren Schritten ab, was letztendlich zu einer Downregulation der auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoranzahl führt:

- 1.) der Rezeptor wird von den G-Proteinen entkoppelt,
- 2.) es schließt sich eine intrazelluläre Sequestration an,
- 3.) Dephosphorylierung durch spezifische Phosphatasen mit anschließender Resensitivierung,
- 4.) Abbau von Proteinen und reduzierter stabiler mRNA.

Man unterscheidet bei der schnellen Desensitivierung die Agonisten-spezifische oder Homologe von der Agonisten-unspezifischen oder heterologen.

Zwei Arten von Proteinen spielen eine große Rolle in der homologen Desensitivierung: G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen (bis heute sind mindestens sechs kloniert), die den ligandenaktivierten Rezeptor an mehreren Ser- und Thr-Resten am intrazellulären C-Terminus phosphorylieren, was die Bindungsaffinität des Rezeptors für inhibitorische β -Arrestine erhöht, die durch ihre Bindung in einer maximalen homologen Desensitivierung mit Verhinderung der Anschaltung nachfolgender Signalwege resultiert. (135 - 142)

Die heterologe Desensitivierung ist durch die Phosphorylierung der second-messenger-abhängigen Kinasen, PKA und PKC, charakterisiert, die neben den agonisten-stimulierten auch die unaktivierten Rezeptoren einer Zelle betrifft. Dies führt nach Ligandenstimulation zu einem Wirkungsverlust sowohl des cAMP- als auch des PLC-Signalweges. (143 - 147)

Neueren Studien nach folgt bereits der alleinigen PTH-Bindung an den PTH1-R eine phosphorylierungsunabhängige Abschwächung des Signalverhaltens. (148 - 150)

Zusätzlich scheinen Regulatoren des G-Protein-Signallings (RGS-Proteine) in der Desensitivierung der G-Protein-Aktivierung von Bedeutung zu sein, da sie die intrinsische GTP Hydrolyse durch die $G\alpha$ -Untereinheit zu steigern vermögen. (151)

Die Ligandenbindung zieht auch eine Internalisierung des Rezeptors durch Endozytose nach sich, über deren Aktivierungsmechanismus allerdings noch kontrovers diskutiert wird. (137), (152 - 158)

1.6 Der PTH2-Rezeptor

1.6.1 Charakterisierung

Überraschend konnte 1995 ein weiterer Rezeptor für PTH kloniert werden, dessen Funktion jedoch auch heute noch weitgehend ungeklärt ist. (159) Das kodierende Gen wurde am langen Arm von Chromosom 2 lokalisiert. (160) Eine Mutation in diesem Genort wurde für eine Form der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) berichtet, aber in situ Hybridisierungen konnten keine PTH2-R-mRNA im oberen Motoneuron oder in Hirnstammotorkernen detektieren, wie es für ALS anzunehmen sein müsste.

Zum humanen PTH1-R besteht eine etwa 70%-ige Sequenzhomologie, wobei ca. 50% der Aminosäuren identisch sind, die sich auf weite Teile der transmembranösen Abschnitte sowie auf die drei intrazellulären Schleifen erstreckt.

Durch verschiedenste Lokalisationsmethoden versucht man die physiologische Bedeutung näher aufklären zu können. Erste Northern-Blot-Untersuchungen zeigten stärkste Expression im Gehirn, gefolgt von Pankreas, Testes und Plazenta. (161) Sensitivere in situ Hybridisierungstechniken lokalisierten in Rattengewebe den höchsten PTH2-R-mRNA-Gehalt im kardiovaskulären System und im exokrinen Pankreas. Eine starke Expression des PTH2-R zeigten auch Lunge, Herz und Gehirn, wohingegen besonders im Vergleich mit PTH1-R-mRNA nur äußerst geringe Mengen an PTH2-R-mRNA in der Niere detektiert werden konnte. (162) Aufgrund technischer Schwierigkeiten beim Arbeiten mit kalzifizierten Geweben konnte die PTH2-R-Verteilung im Knochen nicht untersucht werden. Mit Hilfe neuerer immunhistologischen Studien liess sich zudem der PTH2-R in verschiedenen Zellen endokriner Gewebe nachweisen, darunter parafollikulärer Schilddrüsenzellen und pankreatische D-Zellen.

1.6.2 Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung

Ebenso wie der PTH1-R spricht auch der PTH2-R auf zwei unterschiedliche Liganden an. Nur ist es in seinem Fall PTH und TIP39, die mit ungefähr gleicher Affinität an den PTH2-R binden und über Stimulation der G_s -Einheit eine intrazelluläre Aktivierung der AC/cAMP-Signalkaskade bedingen. Den zweiten intrazellulären Signalweg über G_q , PLC und IP_3 vermag keines der beiden Peptide zu aktivieren. Zur Bindung von PTHrP mit nachfolgender Signalkaskade ist der PTH2-R dagegen nicht imstande. (163,164)

Der Vergleich der Aktivierung von humanem und Ratten-PTH2-Rezeptor durch PTH erbrachte, dass es sich hierbei ebenfalls um einen leichten potentiellen Agonisten am Ratten-PTH2-Rezeptor handelt, was wiederum eine physiologisch wichtige Rolle eines endogenen Liganden für den hPTH2-R in den Hintergrund treten lässt und dagegen für TIP39 als den eigentlichen potentiellen Liganden spricht. (165)

Mittels PTH/PTHrP-Hybridliganden und Punktmutationen wurden die für die Bindungsselektivität verantwortlichen Epitope des PTH2-R weitgehend identifiziert, was unter 5.4 diskutiert wird.

1.7 Der PTH3-Rezeptor

1999 gelang die Klonierung eines weiteren Rezeptors für PTH vom Zebrafisch (zPTH-3R), welcher eine 61%-ige Homologie zum zPTH1-R aufweist, im Vergleich zum zPTH-2R allerdings eine geringere Ähnlichkeit bietet. FuguPTHrP und hPTHrP wird mit hoher Affinität gebunden, im Gegensatz zu hPTH, mit anschließender Aktivierung des cAMP/Ac-Signalwegs. Zu einer agonisten-induzierten IP_3 -Antwort ist der zPTH3-R nicht fähig. (166,167)

1.8 GPCR-Krankheiten

Gestörte GPCR Signaltransduktion kann sowohl aus quantitativen und/oder qualitativen Veränderungen der Rezeptoren und der G-Proteine resultieren, eingeschlossen veränderte Expressionsdichte oder posttranslationale Modifikationen. Eine Anzahl von Studien beschreiben alterierte Signaltransduktionen bei Hypertension und im Alter, deren pathophysiologische Signifikanz allerdings noch bewiesen werden muss.

Mutationen konnten ganz im Gegensatz dazu in G-Proteinen und GPCR eindeutig identifiziert werden, die eine Veränderung der Signalwege mit teilweise verheerenden pathophysiologischen Auswirkungen zur Folge haben.

Die Natur der Mutationen wird vereinfachend in „gain-of-function“ und „loss-of-function“ unterteilt. Loss-of-function-Mutationen blockieren die normale mRNA- und/oder Proteinsynthese und/oder Rezeptorfunktion und führen so zu einer verminderten Signalübertragung. Gain-of-function-Mutationen dagegen sind definitionsgemäß dominant. Schon heterozygote Keimbahnschädigungen führen zu einer klinischen Ausprägung mit verstärkter Signaltransduktion. (49), (168 - 173)

1.8.1 Chondrodysplasie vom Typ Blomstrand

Der autosomal-rezessive Chondrodysplasie vom Typ Blomstrand liegt ein Funktionsverlust des PTH1-R zugrunde, der durch vorzeitige Knochenreifung mit beschleunigter Chondrozytendifferenzierung meist noch in utero letal ist. Bisher konnten zwei unterschiedliche Punktmutationen für diese „loss-of-function“-Erkrankung identifiziert werden. Die eine führt durch verändertes maternales Splicing zu einer Deletion von 11 Aminosäuren in der 5. TM, wobei das väterliche Gen aus noch ungeklärten Gründen nicht exprimiert wird, was einen Nullphänotyp des PTH1-R zur Folge hat. Die andere Mutation tauscht Prolin an Position 132 gegen Leucin aus, was die Bindung von PTH und PTHrP an den Rezeptor verhindert. (174 - 177)

1.8.2 Chondrodysplasie vom Typ Jansen

Diese autosomal-dominante Erkrankung ist durch eine agonisten-unabhängige Aktivierung des cAMP-Signalweges des PTH1-R charakterisiert. Neben Zwergwuchs und einer abnormalen Regulation des enchondralen Knochenwachstums geht diese Krankheit mit einer schweren PTH/PTHrP-unabhängigen Hyperkalzämie und Hypophosphatämie einher.

Der Austausch von His223Arg, Thr410Pro und Ile458Arg konnten bisher als die zugrunde liegenden „Gain-of-function“-Mutationen identifiziert werden, wobei das Einbringen der Mutation His223Arg in transgene Mäuse einen den mit PTH1-R oder PTHrP überexprimierten Mäusen vergleichbaren Phänotypen hervorbrachte, was eine plausible Erklärung für die Skelettanomalien darstellt. (178 - 180)

1.8.3 Pseudohypoparathyreoidismus (PHP)

Der Pseudohypoparathyreoidismus(PHP) ist charakterisiert durch eine Resistenz gegen die Wirkung des PTH mit konsekutiver Hypokalzämie und Hyperphosphatämie kombiniert mit einer reaktiv erhöhten PTH-Serumkonzentration. Die Ursache dieser Erkrankung liegt nicht in einem Defekt des Rezeptors, sondern in einem mangelhaften intrazellulären Signalweg.

Verschiedene Unterformen werden hierbei beschrieben: Typ I mit fehlender cAMP-Antwort auf PTH und Typ II mit eingeschränkter Wirkung des PTH-induzierten intrazellulären cAMP-Anstiegs.

Dem PHP Ia liegt eine heterozygote „Loss-of-function“-Mutation im $G_s\alpha$ -Gen mit konsekutiv folgender ca. 50%-iger Reduktion der Expression der $G_s\alpha$ -Untereinheit, wodurch die cAMP-Antwort nach Hormonstimulation vermindert wird. Die Erkrankung kann mit Signaltransduktionsdefekten an weiteren GPCR einhergehen, unter ihnen auch für TSH und Gonadotropin. Oder sie wird kombiniert mit dem Syndrom der Albright'schen hereditären Osteodystrophie (AHO; Fettleibigkeit, Minderwuchs, Skelettanomalien) vorgefunden.

Beim Pseudopseudohypoparathyreoidismus findet sich dieser Phänotyp wie bei verminderter $G_s\alpha$ -Expression und AHO, allerdings ohne Hormonresistenz. (181)

Beim PHP Ib besteht eine ausschließliche Resistenz gegen PTH, ohne Entwicklungsanomalien oder Strukturdefekten im PTH1-R wie lange vermutet wurde. Das verantwortliche Gen konnte zwar inzwischen auf Chromosom 20q lokalisiert werden, die Ursache der verminderten cAMP-Produktion nach PTH ist jedoch noch nicht geklärt. (182,183)

Beim PHP II findet sich nach PTH-Stimulation eine normale intrazelluläre cAMP-Akkumulation, weswegen ein Defekt in der nachgeschalteten Signalkaskade vermutet wird.

2 Fragestellung

Der Mechanismus, welcher den GPCR eine Unterscheidung verschiedener Liganden ermöglicht, ist immer noch ungeklärt. Der GPCR für PTH und PTHrP (=PTH1-R) bindet PTH und das strukturell recht unterschiedliche PTHrP. Beide Liganden aktivieren mit etwa vergleichbarer Potenz eben diesen PTH1-R, indem sie sowohl an die intrazelluläre AC als auch an die PLC ankoppeln. Ein vor einigen Jahren überraschend kloniertes neues Mitglied der Sekretin/PTH/Calcitonin-Familie (= Familie B) der GPCR, der PTH2-R, antwortet jedoch nur nach Bindung von PTH bzw. TIP 39, nicht aber nach PTHrP, mit einem intrazellulären cAMP-Signal. Allerdings sind weder hPTH noch TIP39 in der Lage, eine intrazelluläre IP₃-Antwort auszulösen.

Welche strukturellen Gegebenheiten des PTH2-Rezeptors ermöglichen diese effiziente Ligandendiskriminierung?

Analysen der Rezeptor-Liganden-Interaktion und die Aufklärung dieses Komplexes sind ein Schlüsselement im Design spezifischer Rezeptoragonisten und –antagonisten mit bedeutendem therapeutischen Potential.

Eine hochkonservierte Eigenschaft aller Rezeptoren der Familie B der GPCR ist die Lokalisation von sechs extrazellulären Cysteinen, die sowohl zur Expression intakter Rezeptoren von Nöten sind als auch durch mögliche Disulfidbrückenbildung untereinander einen entscheidenden Einfluss auf das Bindungsverhalten ausüben.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass zwei Cysteine, präsent in der 3. Extrazellulärschleife des PTH2-R, nicht aber in der des PTH1-R, dessen Ligandenspezifität bedingen. Tatsächlich führte das Ausschalten eines entsprechenden Cysteins im Opossum-PTH2-R zu einem exprimierten Rezeptor, der PTHrP zu einem gewissen Grad binden und daraufhin auch den AC/cAMP-Signalweg aktivieren konnte.
(184)

Es liegt daher die Vermutung nahe, dass diese beiden Cysteine des PTH2-R entweder durch Disulfidbrückenbildung untereinander oder zu den restlichen Cysteinen in der extrazellulären Region die sterische Konfiguration der Rezeptoren und somit auch deren Bindungs- und Signalverhalten ändern können.

Auf diesen Ergebnissen und Annahmen basierend, war daher Gegenstand diesen Projekts zunächst das Einfügen verschiedener Punktmutationen in die cDNA des humanen PTH1-R. Es wurden Konstrukte konzipiert zur Einfügung beider Cysteine einzeln (Ala426Cys und Tyr443Cys) oder kombiniert (Ala426Cys/Tyr443Cys). Nach Expression der drei mutierten Rezeptoren und beider Wildtyp-Rezeptoren war Ziel, das Ligandenbindungsverhalten und somit die Expression intakter Rezeptoren an der Zelloberfläche zu untersuchen. Studien des Signalverhaltens bezüglich des AC/cAMP- und des PLC/IP₃- Signalwegs, ebenso wie Internalisierungsassays strebten dann die vollständige Charakterisierung der mutierten Rezeptoren an.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die laborüblichen Feinchemikalien wurden in p.A. Qualität, soweit nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Roche (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz) und Life Technologies (Eggenstein) bezogen.

Allgemeine Verbrauchsmaterialien waren von Greiner (Frickenhäuser), Falcon (New Jersey, U. S.A), Eppendorf (Hamburg), Sigma (Deisenhofen) und Life Technologies (Eggenstein).

3.1.2 Lösungen, Medien und Puffer

Alle gebräuchlichen Lösungen, Medien und Puffer wurden, soweit nicht anders erwähnt nach den Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. et al 1997) bzw. nach Sambrook et al. (1989) hergestellt.

3.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme:

BamHI	5'...G↓GATCC...3'	Invitrogen
EcoRI	5'...G↓AATTC...3'	Invitrogen
HindIII	5'...A↓AGCTT...3'	MBI Fermentas
NotI	5'...GC↓GGCCGC...3'	Invitrogen
NsiI (Mph1103I)	5'...ATGCA↓T...3'	Boehringer Mannheim
SacI	5'...GAGCT↓C...3'	MBI Fermentas
SapI	5'...GCTCTTCN↓NNN...3'	New England Biolabs
SplI (Pfl23I)	5'...C↓GTACG...3'	MBI Fermentas
SspBI (BsP1407I)	5'...T↓GTACA...3'	MBI Fermentas

Sonstige:

Pfu DNA Polymerase	Stratagene
Calf-Intestine-Alkaline-Phosphatase	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	Gibco BRL
RNase A	Sigma

3.1.4 Kits

Rapid DNA Ligation Kit	Boehringer Mannheim
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAfilter TM Plasmid Maxi Kit	Qiagen

3.1.5 Längen-/Gewichtsmarker

Φ X174 DNA/Hae III Markers	Promega
KB DNA-Ladder	Lifetech
Low DNA MASS TM -Ladder	Lifetech

3.1.6 Primer

Die aufgeführten Primer wurden für die PCR-Klonierung von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

A) PTH 1 SacI for:

5' ACCGGGTGCTGGGACTTGAGCTCCGGGAACAAAAAGTGGATC 3'

SacI

B) PTH 1 A->C rev:

Ala426Cys

5' CCAGAGCGTCCCTGAGACCTCGGTGTATGGTTGTACACATGAAGAC 3'

SspBI (=Bsp1407I)

C) PTH 1 A rev:

Ala426

5' CCAGAGCGTCCCTGAGACCTCGGTGTATGGTGTGGCCATGAAGAC 3'

D) PTH 1 SapI Y->C rev:

Tyr443Cys

5'
GAAGGAGTTGAAGAGCATCTCACAATGCATCTGGACTTGCCAGAGCGTCC
C 3'

SapI

NsiI (=Mph1103I)

E) PTH 1 SapI Y rev:

Tyr443

5'
GAAGGAGTTGAAGAGCATCTCATAGTGCATCTGGACTTGCCAGAGCGTCCC
3'

SapI

3.1.7 Vektoren

A) Expressionsvektor pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA, U.S.A.)

Der episomale Expressionsvektor pCEP 4 ist ein 10.4 kb schweres Plasmid, auf dem Epstein-Barr-Virus basierend. Neben dem EBV – Replikationsstartpunkt (oriP) und einem nukleären Antigen (EBNA-1), was eine extrachromosomale Replikation in humanen und primaten Zellen erlaubt, besitzt es einen CMV-Promotor (hohe Transkriptionsrate der jeweils eingefügten DNA) und eine ca. 60 Basenpaare große „multiple cloning site“. Durch sein Ampicillin-Resistenz-Gen wird eine Selektion in E.coli – Bakterien ermöglicht. Die Selektion in der Zellkultur erfolgt durch Hygromycin. Dieser Vektor kann sowohl für stabile als auch für transiente Infektionen benutzt werden.

B) pUC19 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Bei pUC19 handelt es sich um ein kleines (2.7 kb) high-copy-Plasmid, das von E.coli-Bakterien abgeleitet wurde. Seine hohe Kopierungseffizienz resultiert aus dem Ausschalten des *rop* Gens und einer Punktmutation im Replikon *rep* des Promotors pMB1. Es besitzt ebenfalls ein Ampicillin-Resistenz-Gen (*bla* (Ap^R)) und eine ca. 60 Basenpaare große Klonierungsstelle (185)

3.1.8 Peptide und Tracer

Die eingesetzten PTH-/PTHrP-Peptide wurden von der Firma Bachem (Heidelberg/Torrance, CA, U.S.A.) bezogen:

- hPTH (1-34) mit einem MW von 4117.8g/mol (#H-4835)
- rPTH (1-34) amid Nle^{8,21}Tyr³⁴ mit einem MW von 4037.2g/mol (#H-5525)
- PTHrP (1-34) amid mit einem MW von 4016.7 g/mol (#H-9095)
- PTHrP (1-86) mit einem MW von 9902.2 g/mol (#H-9815)

Für die Bindungsstudien wurde das PTHrP (1-86) (Bachem) von der Firma Immundiagnostik (Bensheim) mit ^{125}J radioaktiv markiert. Die Herstellung erfolgte nach der Chloramin-T-Methode mit anschließender Reinigung durch Gelfiltration auf Sephadex G25. Nach Angaben des Herstellers betrug die spezifische Aktivität des markierten Peptids zum Zeitpunkt der Herstellung $96.5 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

Der Großteil der Bindungsstudien wurde allerdings mit dem kommerziell vertriebenen [^{125}J]-rPTH (1-34) amid Nle^{8,21}Tyr³⁴ (#NEX 353) von NEN (Boston, MA, U.S.A.) durchgeführt. Die spezifische Aktivität betrug $529 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

3.1.9 Zelllinie HEK 293E+ (human embryonic kidney)

Humane embryonale Nierenzellen HEK-293 mit konstitutiver Expression des EBNA-1-Proteins des Epstein-Barr-Virus wurden von Invitrogen (San Diego, CA, U.S.A.) bezogen. Der CMV Promotor kontrolliert das EBNA-1 Gen, was zu einer hohen Expression führt. Vektoren mit einem EBV- Replikationsstartpunkt (oriP) – wie in dieser Arbeit pCEP4 - werden in diesen Zellen in hoher Anzahl exprimiert. Daneben beinhaltet das EBNA-1-Protein eine Neomycin-Resistenz, so dass ein Selektionsdruck durch Geneticin (G418 Sulfat) erfolgt.

3.1.10 Besondere Verbrauchsmaterialien

MYO- ^3H -Inositol #TRK 912 (mit Stabilizer PT 6-271, 37 MBq in 1ml)	Amersham
Sentivals #592928	Beckman Coulter Instruments
Szintillatorflüssigkeit	Beckman Coulter Instruments
Ready Protein #586604	
Ionenaustauscher AG 1-X8 Resin #140-1444	BioRad
Poly-Prep-Säulen #731-1550	BioRad
Hygromycin B #843555	Boehringer Mannheim

Bisindolylmaleimid-Derivat GF 109203X	Calbiochem
Isoquinolin-Sulfonamid-Derivat H-89	Calbiochem
6-Loch-Platten #3516	Costar
12-Loch-Platten #3513	Costar
cAMP-RIA-Kit #1117	Coulter-Immunotech (Krefeld)
Dulbecco`s modified Eagle Medium (DMEM) mit Glutamaxx #31966-021	GIBCO
Hepes-Puffer 1M #15630-056	GIBCO
LipofectAMINE TM Reagent #18324-020	GIBCO
Penicillin-Streptomycin(10 000 U/ml) #15140-122	GIBCO
Trypan Blue Stain 0.4% #15250-061	GIBCO
24-Loch-Platten #662160	Greiner
75 ml Gewebekulturflaschen #658170	Greiner
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (PBS) #H15-002	PAA-Labarotories, Linz
Fetales Kälberserum (FKS) #P30-1902	PAN
Vacuflo PV05013	Schleicher & Schüll, USA
Röhrchen für Bindungsassy #55.476	Sarstedt
Röhrchen für cAMP-Assay #55.532	Sarstedt
Albumin, bovine 99% (#A-7638) 98% (#A-7030)	Sigma
DMSO #D-2650	Sigma
Geneticin Solution (G418) #G-7034	Sigma
Isobutyl-Methylxanthin (IBMX) #I-7018	Sigma
Trypsin-EDTA-Solution #T-4299	Sigma

3.1.11 Laborgeräte

β-Counter LS 6000 IC	Beckmann
γ-Counter LB 2111	Berthold
Gelelektrophoresekammern:	
“Gel Electrophoresis Apparatus” #21087	GIBCO
“Gel Electrophoresis System” #1068BD	Life Technologies
“Sub-Cell” Model 192	BioRad
“Mini SubCell GT”	BioRad
Inkubator	Forma Scientific
Photospektrometer	Eppendorf
Thermocycler	Eppendorf
Vacuumpumpe #165 1754	BioRad
Wasserbad	Memmert
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge	Heraeus
Laborzentrifuge Rotanta 96 RC	Hettich
Tischzentrifuge	Eppendorf

3.1.12 Computerprogramme

Endnote 5.0	Bibliographie
Excel 2000	Tabellenkalkulation
Graph Pad Prism 3.0	Statistische Auswertung der Bioassays, graphische Darstellung
Word 2000	Textverarbeitung

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Strategien

Für die vorliegende Arbeit lagen die cDNAs der humanen PTH1- und PTH2-Rezeptoren subkloniert in dem episomalen Expressionsvektor pCEP4 vor. Der PTH1-Rezeptor, subkloniert in pCEP4, diente als Matrize im ersten Schritt der Überlappungs-Extensions-PCR. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden allerdings in den PTH1-Rezeptor, subkloniert in pUC19, eingefügt. Neben seiner bedeutend kleineren Größe, welche unter anderem eine höhere Transformationsrate begünstigt, zeichnet er sich durch seine Fähigkeit als „high-copy“-Plasmid aus, was große DNA-Ausbeuten ermöglicht. Zur Transfektion in Zelllinien eignet er sich nicht, weshalb die mutierten PTH1-Rezeptorsequenzen in den pCEP4-Vektor zurückkloniert wurden.

3.2.1.1 Klonierungen

Über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI wurde die cDNA des humanen PTH1-Rezeptors aus pCEP4 (insgesamt ca. 12kb) in den Polylinker von pUC19 (insgesamt ca. 4.6 kb) einkloniert.

hPTH1-R-pUC19 wurde anschließend zuerst mit SacI, nach Aufreinigung mittels des PCR-Purification-Kits mit HindIII verdaut und die so erhaltenen beiden DNA-Banden mit der Größe von 3700 bp und 900 bp auf einem Agarosegel aufgetrennt. Ein Restriktionsverdau mit SapI entfernte vom entstandenen 900 Basenpaare langen Insert eine 250-bp-Sequenz, das zweite Insert, das aus dem Schritt der PCR mit dem Einfügen der einzelnen Mutationen hervorging.

Nach der Ligation der beiden Inserts in pUC19 mit dem Rest des PTH1-Rezeptors wurden die mutierten cDNAs des PTH1-Rezeptors über NotI und SphI (=Pfl23II) in pCEP4 zurückkloniert.

3.2.1.2 Überlappungs-Extensions-PCR

Die „Overlap-Extension“-PCR wurde nach der Methode von Ho et al. (186) mit der nativen Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) in jeweils zwei Schritten durchgeführt, wobei der humane PTH1-Rezeptor im pCEP4-Vektor als Matrize diente. In der ersten Reaktion wurde ein 5`externer Primer mit einem an den Gegenstrang bindenden internen Primer kombiniert. Nach Aufreinigung und Extrahierung aus einem Agarosegel wurde in der zweiten Reaktion das erhaltene PCR-Produkt verlängert, indem der 5`externe Primer mit einem 3`antisense externen Primer kombiniert wurde, der eine 12 Aminosäuren lange komplementäre Sequenz zum Template aufwies. Das so gewonnene PCR-Fragment wurde erneut extrahiert, geschnitten und in pUC19 mit der PTH1-Rezeptor-DNA inkloniert.

3.2.1.3 Rezeptor-Mutanten

Die Mutante Ala426Cys tauscht am N-terminalen Ende der dritten Extrazellulärschleife des humanen PTH1-Rezeptors das Alanin gegen das entsprechende Cystein aus, präsent an Position 383 des PTH2-Rezeptors. Im ersten Schritt wurde der 42 Basenpaare lange 5`externe PTH1-SacI-for-Primer mit dem 45 Basenpaare langen internen Oligonukleotid PTH1-A->C rev kombiniert, das neben der Ala426Cys-Mutation noch eine stille Mutation mit einer zusätzlichen Schnittstelle für das Restriktionsenzym SspBI (=Bsp1407I) zur Erfolgskontrolle einfügte. In der zweiten Reaktion diente der PTH1-SapI-Y-rev, bestehend aus 51 Basenpaaren, als externer 3`antisense Primer. Das Produkt der letzten PCR-Reaktion wurde über die Schnittstellen SacI und SapI in pUC19 mit der PTH1-Rezeptor-cDNA inkloniert.

Die Mutante Tyr443Cys liegt dagegen am carboxyterminalen Ende der dritten Extrazellulärschleife und tauscht das Tyrosin gegen das entsprechende Cystein aus (Aminosäure 399 des PTH2-Rezeptors). Als interner Primer der ersten Reaktion diente hier das PTH1-A->C-rev-Oligonukleotid, ohne das Einfügen des Cysteins an Position 426, wohingegen der zweite externe Primer PTH1-SapI-Y->C-rev das Tyrosin zum

Cystein mutierte und auch hier eine zusätzliche Schnittstelle, NsiI (=Mph1103I), zur Verifizierung einfügte.

Die Doppelmutation Ala426Cys,Tyr443Cys kam durch das simultane Einfügen beider Mutationen zustande, indem sowohl der interne 3` PTH1-A->Y-rev als auch der externe 3`antisense PTH1-SapI-Y->C-rev-Primer verwendet wurden.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden über Agarose-Gele, an die eine Spannung angelegt wird, nach ihrer Größe aufgetrennt. Je nach der Länge der aufzutrennenden Fragmente wurden 0.8-2.5% Gele hergestellt. Hierzu wurden die entsprechenden Mengen an Agarose und 1xTBE in der Mikrowelle zum Sieden gebracht und nach Abkühlen auf ca. 50°C in das vorbereitete Schiff gegossen. Die DNA-Proben in 1x Puffer wurden unter Anlegen einer Spannung von 20-90 V mit 1xTBE als Laufpuffer aufgetrennt. Danach wurde das Gel für 10-30 Minuten in ein Ethidiumbromidbad gegeben. Die DNA-Banden ließen sich schliesslich unter UV-Licht sichtbar machen, da der DNA-interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht fluoresziert.

3.2.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Religation von linearisierter Vektor-DNA nach Restriktionsverdau in einer Ligationsreaktion zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen an den Enden der DNA-Stränge mittels calf intestine phosphatase (CIP) entfernt. Hierzu wurde zum Restriktionsansatz 5µl 10xReaktionspuffer gegeben und mit aqua dest. zu einem Gesamtvolumen von 49µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1µl CIP (1U/1µl) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde danach durch 15-minütige Inkubation bei 85°C deaktiviert.

3.2.2.3 Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Im Agarosegel aufgetrennte DNA-Banden können unter schwacher UV-Bestrahlung ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (für Fragmente von 70bp-10kb) aus der Agarose eluiert werden. Bei der Anwendung des Kits wird die Agarose in einem Hochsalzpuffer geschmolzen, die DNA an eine Silica-Membran gebunden und

mit ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird die DNA entweder in aqua dest. (für sofortige enzymatische Reaktionen) oder in TE (zur Aufbewahrung) eluiert.

3.2.2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation von DNA

Diese Techniken kommen zur Anwendung, wenn Proteine oder feste Moleküle aus wässrigen Lösungen entfernt, oder wenn DNA-Lösungen aufkonzentriert werden müssen. Das Protokoll eignet sich zur Aufreinigung von kleinen Volumina (<0.4ml) zu Konzentrationen von $\leq 1\text{mg/ml}$.

Die zu reinigende DNA-Lösung wurde hierzu mit aqua dest. auf 500 μl aufgefüllt. Nach Zugabe von einem Volumen Phenol wurden beide Phasen durch Invertieren gemischt und 2 Minuten zentrifugiert.

Proteine gehen hierbei in die Interphase über, während die DNA in der wässrigen Phase verbleibt.

Die obere wässrige Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ein Volumen Chloroform (CHCl_3 /Isopentanol 24:1) zugegeben, danach durch Invertieren gemischt und 2 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Zur Aufkonzentrierung und Entsalzung von DNA-Lösungen schließt sich nun die Ethanolfällung an.

Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natrium-Acetat pH 5.8 und zwei Volumen absolutem Ethanol wurde die Lösung durch Invertieren gemischt und eine Stunde bei -20°C inkubiert (wurde die DNA für eine Transfektion benötigt, erfolgte die Inkubation über Nacht). Anschliessend wurde das Gemisch für 30 Minuten zentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in der geeigneten Menge TE bzw. aqua dest. resuspendiert.

3.2.2.5 Ligation von linearen DNA-Fragmenten mit der T4-DNA-Ligase

DNA-Fragmente werden miteinander durch den Aufbau von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3' OH-Ende eines Fragmentes und dem 5' Phosphat-Ende des anderen Fragmentes verknüpft. Diese Reaktion wird von einer Ligase unter ATP-Verbrauch katalysiert. Dazu müssen die Enden der DNA-Fragmente entweder komplementäre einzelsträngige Überhänge (sticky ends) oder keine Überhänge (blunt ends) haben.

Mit der T4-Ligase wurde dephosphorylierte Vektor-DNA (enthält die bakterielle Ampicillinresistenz) mit phosphorylierter Insert-DNA zu einem replikationsfähigen zirkulären Plasmid ligiert.

Zur Anwendung kamen entweder die T4-DNA-Ligase (GibcoBRL) oder der Rapid-DNA-Ligation Kit (Boehringer Mannheim), wobei jeweils Vektor-DNA mit einem mindestens dreifachen molaren Überschuss an Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 20µl je nach Angaben des Herstellers für 1 Stunde bzw. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Bei der Ligation von zwei Inserts war das Vektor : 1.Insert : 2.Insert -Verhältnis ebenfalls 1:3:3.

3.2.2.6 Herstellung kompetenter E. coli DH5α-Zellen

Lösung I: 30mM Kaliumacetat

50mM Manganchlorid

100mM Rubidiumchlorid

10mM Calciumchlorid

15% Glycerin

Der pH-Wert von Lösung I wurde mit Essigsäure auf 5,8 eingestellt, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Lösung II: 10mM MOPS

75 mM Calciumchlorid

10mM Rubidiumchlorid

15% Glycerin

Lösung II wurde mit NaOH auf pH 7 eingestellt, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Die Herstellung kompetenter Bakterienzellen erfolgte nach Nishimura *et al.* (1990). Hierbei wurde 1ml einer bakteriellen Übernachtskultur in 100ml LB-Medium überführt und solange bei 37°C unter ständigem Schütteln (200U/min) inkubiert, bis sie in die mittlere logarithmische Phase Wachstumsphase gelangten (bei DH5 α entspricht dies einer OD₆₀₀ = 0.37; ca. 2-3h bei 100ml). Danach wurde die Kultur 10 min. auf Eis gestellt, bevor die Bakterien bei 4°C mit 4000 rpm für 5min. abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 30ml eiskalter Lösung I gelöst. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min. bei 4°C und 4000 rpm wurde das Pellet schließlich in 8 ml Lösung II gelöst und als 100 μ l-Aliquots bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.2.2.7 Transformieren von Bakterien

Bei der Transformation wird Plasmid-DNA in Bakterien aufgenommen, um diese zu vermehren. Durch ein auf dem Plasmid befindliches prokaryontisches Ampicillinresistenzgen gelangen in Nährmedium mit Ampicillin nur plasmidhaltige Bakterien zur Vermehrung.

Für die Transformation standen entweder kommerziell bezogene Subcloning Efficiency DH5 α TM Competent Cells (GibcoBRL) oder eigens zuvor kompetent gemachte DH5 α -Zellen (siehe 3.2.1.6) zur Verfügung. Die Bakterien (100 μ l pro Aliquot) wurden auf Eis aufgetaut. Zu der Bakteriensuspension wurden ca. 50 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis, wurden die Bakterien bei exakt 42°C für 90 sec. im Wasserbad erhitzt und anschließend für 2 min. auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900 μ l LB-Medium ohne Ampicillin wurde der Ansatz für 1h bei 37°C im Bakterienschüttler (ca.180U/min) inkubiert, um die Expression der Antibiotikaresistenz zu erlauben. Nach Zentrifugation bei 3750rpm für 10 min. wurde das Bakterienpellet nach Abnahme des Überstandes im verbleibenden 100 μ l LB-Medium wieder aufgenommen und auf ampicillinhaltigen Agarplatten

ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C im Bakterienbrutschrank über Nacht inkubiert.

3.2.2.8 Glycerolstocks von Bakterienstämmen

Um Bakterienstämme länger lagern zu können wurde 1ml einer Übernachtskultur mit 500 µl 87% sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C zur Lagerung eingefroren

3.2.2.9 Polymerase-Chain-Reaction (=PCR)

Die Reaktionen wurden auf Eis angesetzt, um falsche Primerbindung (misspriming) zu verhindern. Für den Thermocycler wurden 0.5 ml Reaktionsgefäße verwendet. Eine Überschichtung mit Mineralöl war hierbei nicht nötig, da der Deckel des Gerätes beheizt ist.

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1µl Template (≡ 500 ng DNA)

1µl Primer 1 (100 pmol/µl)

1µl Primer 2 (100 pmol/µl)

2µl dNTP (jeweils 10 mM)

5µl 10xPuffer

38µl aqua destillata

2µl native Pfu DNA Polymerase (2.5U/µl) als letztes zugeben!!

50µl

Die PCR wurde im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	95°C	45''		1x
Denaturierung	95°C	45''	}	
Annealing	60°C	45''	}	25x
Elongation	72°C	1'30	}	
Finale Extension	72°C	10'		1x
Konservierung	4°C	∞		

3.2.2.10 Plasmid-DNA Extraktion

3.2.2.10.1 Analytische Plasmid-DNA Isolierung (Mini-Präparation)

Die Methode der Plasmid-Isolierung durch alkalische Lyse wurde zur Analyse der nach einer DNA-Klonierung auf den Agarplatten ausgewachsenen Kolonien verwendet.

Hierzu wurden die Bakterien aus einer 1.5 ml Übernachtskultur abzentrifugiert und das Pellet in 100µl GTE-Puffer mit Lysozym durch Vortexen gelöst. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 200µl alkalische SDS hinzugegeben, invertiert und 5 min. auf Eis inkubiert. Die Bakterien werden so mittels Lysozym und SDS lysiert, was zu einer Denaturierung der Proteine führt. Durch den alkalischen pH der Lösung wird chromosomale und Plasmid-DNA denaturiert. Nach Zugabe von 150µl KAc (Neutralisationslösung) und 5-minütiger Inkubation auf Eis kann jedoch nur Plasmid-DNA renaturieren, da der hohe Salzgehalt der Lösung die Renaturierung von Proteinen und chromosomaler DNA verhindert. Diese präzipitieren und können durch Zentrifugation für 2 min. abgetrennt werden. Der Überstand wurde nun in ein frisches Eppendorf-Cap überführt und einer Ethanolpräzipitation (3.2.1.4) unterzogen. Das Pellet wurde in 50µl einer Lösung von 49.5µl 1xTE bzw. a.d. und 0.5µl RNaseA (0.1mg/ml) resuspendiert. Die DNA war nun rein genug für Probespaltungen, um zu ermitteln, welche der gepickten Klone die gewünschte Plasmid-DNA erhielten. Die

Restriktionsverdauungen erfolgten in der Regel mit 5µl Mini-DNA-Lösung und 0.5µl Enzym in einem Gesamtansatz von 20µl.

Wurde die DNA zum Sequenzieren (kommerziell durch die Firma MWG Biotech) benötigt, kam der QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) zum Einsatz, da somit eine höhere Reinheit und Ausbeute (bis zu 20µg) erreicht werden konnte.

3.2.2.10.2 Quantitative Plasmid-DNA-Gewinnung: Maxi-Präparation über QIAGEN-Säulen

Zur Gewinnung größerer Mengen spezifischer Plasmid-DNA wurden Präparationen über sogenannte QIAfilter™ Plasmid Maxi Säulen durchgeführt. Die Plasmid-DNA bindet hierbei an eine Silicamatrix und wird nach zwei Waschschritten wieder eluiert. Die auf diese Weise gewonnene DNA ist relativ rein und lässt sich sehr gut für Transfektionen verwenden.

3.2.2.11 Restriktionsverdau von DNA

Die Spaltung von Plasmid- bzw. PCR-DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Anleitungen der Hersteller der Enzyme. Analytische Spaltungen wurden mit 0.5-1µg DNA in 20µl Reaktionsvolumen, präparative mit 2-5µg in 30µl durchgeführt. Um einen möglichst vollständigen Verdau zu gewährleisten, wurde Enzym in 2-5fachem Überschuss zugegeben und für 2h, teilweise auch über Nacht, inkubiert. Enzyme, die Star-Activity (unspezifisches Schneiden bei langer Inkubation, großer Enzymmenge oder falscher Salzkonzentration) aufweisen können, wurden nur für 1h inkubiert.

Für Doppelverdauungen wurde nach Möglichkeit ein Puffer ausgewählt, in dem nach den Tabellen der Hersteller beide Enzyme funktionierten. War dies nicht möglich, wurde die DNA zunächst mit einem Enzym verdaut, phenolisiert und mit Ethanol gefällt (3.1.2.4) bzw. mit Hilfe des PCR-Purification-Kit (Qiagen) aufgereinigt, und anschließend mit dem zweiten Enzym gespalten.

Trat der Fall ein, dass neben den Schnittstellen für die Klonierungsstrategien die benutzten Restriktionsendonukleasen auch innerhalb der zu klonierenden DNA-Fragmente Schnittstellen aufwiesen, wurde nach dem Prinzip des Partialverdaus vorgegangen: dieser wird durch eine Verdünnungsreihe des verwendeten Restriktionsenzym erreicht. Hierzu wurde die benötigte Menge an Plasmid-DNA und entsprechendem Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 100µl gelöst und auf Eis gestellt. Alle nachfolgenden Schritte wurden ebenfalls auf Eis durchgeführt. Nachdem der DNA-Puffer-Mix auf fünf E-Caps (30-20-20-20-10µl) aufgeteilt und zum ersten 4U an Enzym gegeben und vorsichtig vermischt worden war, wurde eine serielle Verdünnung durchgeführt, so dass Endvolumen von jeweils 20µl vorlagen. Nach 15-minütiger Inkubation 37°C-Wasserbad, wurden die Reaktionen durch Zugabe des 1xPuffers gestoppt. Mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese wurden die entstandenen Restriktionsprodukte aufgetrennt und die benötigte Bande eluiert.

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Zellkultur von humanen embryonalen Nierenzellen HEK-293

Humane embryonale Nierenzellen HEK- 293 (human embryonic kidney cells) mit konstitutiver Expression des EBNA-1 Proteins des Epstein-Barr-Virus (Invitrogen, San Diego, CA, U.S.A.) wurden in 75 ml Gewebekulturflaschen bei 5% CO₂ und 37°C im Begasungsbrutschrank in feuchter Atmosphäre kultiviert. Das verwendete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with Glutamax war dabei mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 20 mM HEPES- Puffer und 1 % Penicillin/ Streptomycin (10 000 U/ml) ergänzt. Unter diesen Bedingungen betrug die Verdopplungszeit ca. 24 - 36 h, so dass die Zellen alle 4- 5 Tage im Verhältnis 1:10 gesplittet und in frische Kulturflaschen überführt wurden. Hierbei wurden die Zellen in der Regel nach Abnahme des Kulturmediums einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Durch eine 0.05% Trypsin/0.02%EDTA-Lösung (2ml) wurden die Zellen gelöst. Diese Trypsinwirkung wurde durch 8 ml Kulturmedium abgestoppt und entweder für Versuche bzw. auf frische Kulturflaschen ausgesät.

3.2.3.2 Transfektion von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde in HEK-293-Zellen zur stabilen und zur transienten Proteinexpression transfiziert.

3.2.3.2.1 Stabile Transfektion mit Lipofektamin

Am Tag vor der Transfektion wurden in einer 6-Loch-Platte HEK-293-Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag zu 50-80% konfluent waren (i.d.R. 250000 Zellen/well). Die Zellen wurden nach einem Waschschrift mit serumfreien Medium (DMEM mit 20 mM HEPES- Puffer und 1% Penicillin/ Streptomycin) für 5 h mit einem Mix aus 900µl serumfreien Medium, 60 µl Lipofektin und 9µg DNA (gelöst in 20 µl sterilem Tris- EDTA- Puffer) pro Loch bei 37°C inkubiert. Zuvor war das serumfreie Medium mit Lipofektin für 30 min, nach Zugabe der DNA nochmals für 15 min vorinkubiert worden.

In den Expressionsvektor pCEP 4 ist unter anderem ein Gen eingebaut, das den Zielzellen Resistenz gegen Hygromycin verleiht. So konnten die Zellen im Anschluss für ca. zwei Wochen mit Hygromycin selektioniert werden, nachdem die erforderliche Hygromycin- Konzentration (250µg/ml) vorher durch Austestung mittels Absterbekurven an nicht transfizierten Zellen bestimmt worden war. Ein Teil der so transfizierten und selektionierten HEK 293- Zellen wurde wie oben beschrieben in Kultur genommen oder eingefroren.

3.2.3.2.2 Transiente Transfektion mit Lipofektamin

Die transiente Transfektion erfolgte weitestgehend nach dem Protokoll der stabilen Transfektion, allerdings wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- HEK-293-Zellen wurden bis zu einer 50-80%-Konfluenz in T75-Flaschen wachsen gelassen
- 3µg DNA wurde in 800µl serumfreien Medium gelöst

- 50µl Lipofectamin wurden mit 750µl serumfreien Medium vermischt
- beide Ansätze wurden zusammen für 30 min bei RT inkubiert, bevor sie für 5h bei 37°C auf die Zellen kamen
- 24h nach Medienwechsel wurden die Zellen abtrypsiniert, gezählt und für die entsprechenden Versuche ausgesät
- die sich anschließenden Versuche wurden in der Regel innerhalb eines Zeitraumes von 72 h post transfektionem durchgeführt

3.2.3.2.3 Transiente Transfektion mit FuGENE™ 6

FuGENE™6, ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, weist im Gegensatz zu den herkömmlichen Transfektionsmethoden und -reagenzien eine äusserst hohe Transfektionsrate auf, zeigt nahezu keine Zytotoxizität, funktioniert ausgesprochen gut in Gegenwart und in Abwesenheit von Serum und erfordert nur geringe Protokolloptimierung.

Ebenso wie bei der transienten Transfektion mit Lipofektin wurden HEK 293 in T75 bis zu einer 50-80% - Konfluenz wachsen gelassen. 15µl FuGENE™6 wurden direkt in 485µl Serum-freies Medium pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Das verdünnte Transfektionsreagenz wurde daraufhin tröpfchenweise zu 5µg DNA (gelöst in 25µl sterilfiltriertem 1xTE) hinzugefügt und für 30 min bei RT ruhen gelassen. Ohne einen vorherigen Medienwechsel wurde der FuGENE™6-DNA-Mix auf die Zellen gegeben und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen abtrypsiniert, gezählt und für die entsprechenden Versuche ausgesät.

3.2.3.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Um auf stabil transfizierte Zelllinien in niedrigen Passagen zurückgreifen zu können ohne eine wiederholte Transfektion durchführen zu müssen, wird ein Teil der Zellen nach Selektion in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren.

Nach Abtrypsinieren und Resuspendieren wurden die Zellsuspensionen bei 800rpm und 4°C für 6 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1.8 ml Einfriermedium (DMEM, 10% FCS, 7.5% DMSO beides sterilfiltriert, 1% Pen/Strep) resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und sofort auf Eis gestellt. Die Zellen wurden 24h bei -80°C gelagert, ehe sie in flüssigen Stickstoff gegeben wurden.

Das Auftauen erfolgte rasch in einem 37°C-Wasserbad. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde in ein größeres Falcon-Röhrchen überführt und langsam wurde das gewohnte Kulturmedium dazu pipettiert bis eine Gesamtmenge von 10ml erreicht war. Dadurch konnte das DMSO aus den Zellen diffundieren, ohne dass diese platzten. Nach Zentrifugation und Resuspendierung in normalem Kulturmedium wurden die Zellen in T75-Kulturflaschen überführt. Am nächsten Tag wurde der Überstand durch frisches Kulturmedium ersetzt und wie gewohnt subkultiviert.

3.3 Bindungsstudien

Die mit den mutierten Ala426Cys-, Tyr443Cys- bzw. doppelmutierten Rezeptoren ebenso wie mit den beiden Wildtyp-PTH-Rezeptoren transfezierte und nicht transfezierte HEK 293- Zellen wurden so in 24- Loch- Platten ausgesät (400000 Zellen/ml, 0,5 ml/ Loch), dass sie nach ca. 72 h konfluent waren. Nach Absaugen des Kulturmediums wurde pro Loch 0,5 ml Versuchsmedium (DMEM mit 5 % FKS, 0,5 % BSA (98%) und 10mM Hepes- Puffer) zugegeben und für 1 h bei 37°C vorinkubiert. Nach erneutem Absaugen des Überstandes wurden 150 µl Versuchsmedium in jedes Loch gegeben und die jeweilige Konzentration hPTH (1-34) bzw. PTHrP (1-34) als Triplikat in 30µl Versuchsmedium gelöst dazu pipettiert (z.B. 30 µl à 21 nM für eine Endkonzentration von 3 nM in 210µl Gesamtvolumen). Ebenfalls in 30µl Versuchsmedium wurde nun eine konstante Menge [¹²⁵J]- rPTH 1-34 amide von NEN (50 000 cpm/ Loch) zugegeben (die entsprechende Menge wurde jeweils am Versuchstag ermittelt) und bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Nach diesem Inkubationszeitraum wurden die Platten auf Eis gestellt, das Medium abgesogen und die Löcher dreimal mit 0,5 ml eiskaltem Versuchsmedium vorsichtig gewaschen, ehe die

Zellen mit 0,5 ml NaOH pro Loch lysiert wurden. Nach 30 min wurde das Lysat vorsichtig einmal auf- und abpipettiert und in Röhrchen überpipettiert. Letzter Vorgang wurde wiederholt und das gepoolte Lysat im Gamma- Counter für 2 min gemessen.

3.4 Internalisierungsstudien

HEK-293-Zellen, die stabil die beiden Wildtyp- und die drei mutierten Rezeptoren exprimierten, wurden so in 12-Loch-Platten ausgesät (250000 Zellen/ml; 1ml/Loch), dass sie nach 72 Stunden konfluent waren. Vor dem Experiment wurden die Zellen mit 1ml DHB (serumfreies Dulbecco's modified Eagle's Medium mit 20mM HEPES und 1% BSA) für 1h bei 37°C inkubiert. Nachdem die Platten 10 min bei RT geruht hatten, erfolgte eine Inkubation mit 475µl DHB, versetzt mit 50000cpm ¹²⁵J-rPTH (1-34)amide, für die angegebenen Zeiträume (z.B. 5-10-20-40 min). Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Platten auf Eis gestellt und zweimal mit 1ml eiskaltem PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen wurden, um freien Liganden zu entfernen. Die Zellen wurden für 2x5 min mit 0.5ml acid wash-Lösung (50mM Glycin, 0.1M NaCl, pH 3) inkubiert, um Radioligand, der an der Zelloberfläche spezifisch gebunden war, zu entfernen. Der Überstand wurde separat gesammelt und im γ-Counter als acid-wash-Fraktion gemessen. Die Zellen wurden mit 1ml 1M NaOH lysiert und die internalisierte Radioaktivität wurde ebenfalls gemessen.

Der Prozentsatz der Internalisierung wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{cpm internalisiert}}{\text{cpm internalisiert} + \text{cpm acid-wash}} \times 100$$

3.5 Messung der Aktivierung des AC/ cAMP – Signalweges

3.5.1 Akkumulation von cAMP

Zur Stimulation der intrazellulären cAMP- Produktion wurden die Rezeptor-transfezierten HEK 293-Zellen und nicht transfezierte Kontrollzellen in 12- Loch-Platten ausgesät (250 000 Zellen/ml, 1ml/ Loch) und ca. 72 h bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Dann wurde nach Absaugen des Mediums 1 ml/ Loch VersuchsmEDIUM (DMEM mit 1 mM IBMX 1 % BSA, 20 mM Hepes- Puffer) zugegeben, in dem die jeweiligen Versuchssubstanzen (z.B. 0 - 5 μ M hPTH 1-34, Triplikate pro Konzentration) gelöst waren. Nach Inkubation für 15 min bei 37°C wurde der Überstand abgesaugt und das intrazellulär akkumulierte cAMP durch Zugabe von 1ml 95%igem Ethanol (pH 3)/ Loch extrahiert. Nach 2 - bzw. 24 - stündiger Inkubation (2h bei 4°C, 24 h bei -20°C) und Überführung der Suspension in Röhrrchen wurde der Alkohol durch Eindampfen unter Stickstoff vollständig entfernt und das verbliebene cAMP mit 1ml/ Röhrrchen Assaypuffer des cAMP- RIA- Kits resuspendiert.

3.5.2 Messung von cAMP im Radio- Immuno- Assay

Das Prinzip des eingesetzten cAMP- RIA- Kit ist die Verwendung von mit monoklonalen Antikörpern gegen cAMP beschichteten Röhrrchen in denen eine konstante Menge [¹²⁵J]-cAMP durch das cAMP in der zu messenden Probe kompetitiv verdrängt wird. Die an den Antikörper gebundene Radioaktivität, die nach der Entfernung des Überstandes gemessen wird, ist also umgekehrt proportional zur cAMP-Konzentration in der Probe.

Nachdem die resuspendierten Proben mit Assaypuffer 1: 100 verdünnt worden waren, wurden 100 μ l der Verdünnung mit 500 μ l des Tracers (entspricht ca. 60 000 cpm/ Röhrrchen) in die mit Antikörpern beschichteten Röhrrchen pipettiert und für ca. 18 h bei 4°C inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde die an den Antikörper gebundene Radioaktivität im Gamma- Counter gemessen. Durch das Ermitteln einer Eichkurve unter Verwendung von cAMP- Standardkonzentrationen des RIA- Kits konnte daraus

unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die cAMP- Konzentration in der Probe berechnet werden.

3.6 Messung der Aktivierung des PLC/ IP₃ – Signalweges

HEK 293- Zellen, die jeweils einen der zu untersuchenden Rezeptoren exprimierten, wurden hierbei metabolisch radioaktiv vormarkiert:

Die Zellen wurden so in 6- Loch- Platten ausgesät (400 000 Zellen/ml, 1ml/ Loch), dass sie 72 h später konfluent waren. 24 h vor Versuchsbeginn wurde das Medium abgesaugt und 1 ml/ Loch Kulturmedium mit 2 µCi/ ml Myo- [³H]- Inositol zugegeben (entspricht 2 µl Myo- [³H]- Inositol/ml Kulturmedium). Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde der radioaktive Überstand abgesaugt und jedes Loch mit 1 ml Versuchsmedium (DMEM mit 10% FKS, 20 mM HEPES- Puffer, 1 % Penicillin/ Streptomycin und 10 mM Lithiumchlorid) gewaschen. Dabei wurde noch einmal für 15 min bei 37°C inkubiert und die Platten vorsichtig geschwenkt, bevor das Medium abgesaugt wurde.

In 1 ml/ Loch Versuchsmedium gelöst wurde nun die jeweilige Konzentration hPTH 1-34 als Triplikat zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml eiskalter Ameisensäure (20 mM) pro Loch gestoppt. Die Platten wurden daraufhin für 60 min bei 4°C inkubiert, der Überstand in je ein Röhrchen pipettiert und die Ameisensäure durch Zugabe von 75 µl verdünnter Ammoniumhydroxid - Lösung in jedes Röhrchen neutralisiert, nachdem zuvor die erforderliche Menge ermittelt worden war.

Gesamtinositolphosphat wurde dann von anderen [³H]- markierten Substanzen über Minigelchromatographiesäulen abgetrennt und im Betacounter gemessen: Poly – Prep - Säulen wurden mit 1,4 ml Ionenaustauscher AG 1 -X8 Resin (ca 0,5 g/ml, resuspendiert in aqua dest., mehrfach gewaschen) beschickt und bis zum Gebrauch feucht gehalten. Nachdem 60 µl jeder Probe in kleine Szintillatortröhrchen überführt worden waren, um nach Zugabe von 250µl Szintillatorflüssigkeit die Gesamtmenge der von den Zellen aufgenommenen Radioaktivität im Betacounter zu messen, wurde der restliche Inhalt der Röhrchen auf je eine Säule aufgetragen und vollständig durchlaufen gelassen. In jede Säule wurde daraufhin vorsichtig 3 - 4 mal je 8 ml Auswaschpuffer A (60 mM

Natriumsalz der Ameisensäure [4,08 g/l] und 5mM Borax [1,91 g/l]) gegeben. Dann wurde Gesamtinositolphosphat durch dreimalige Zugabe von 0,5 ml Elutionspuffer E (2M Ammoniumsalz der Ameisensäure [126,12 g/l] und 0,1 M Ameisensäure [4,2 ml/l]) pro Säule eluiert und getrennt in je einem Szintillatortröhrchen aufgefangen. Die Proben wurden dann nach Zugabe von jeweils 4,5 ml Szintillatorflüssigkeit für 5 min im Betacounter gemessen.

3.7 Pharmakologische Hemmung von Proteinkinasen

Isoquinolin-Sulfonamid-Derivat H-89 (Calbiochem) wurde als spezifische Hemmsubstanz der Proteinkinase A (PKA) eingesetzt (187), für das gezeigt werden konnte, dass es vor allem die PKA- abhängige Phosphorylierung des PTH 1- Rezeptors blockiert (188). Es wurde eine Konzentration von 30µM gewählt bei einer 60-minütigen Vorinkubationszeit bei 37°C. Die Stock-Konzentration betrug 3mM (1mg in 642µl Aqua dest. gelöst) und wurde 1:100 verdünnt.

Für die spezifische Hemmung der Proteinkinase C (PKC) wurde das Bisindolylmaleimid- Derivat GF 109203X verwendet, das effektiv die PKC- abhängige Phosphorylierung verhindert. (189) Die Konzentration betrug hier 6µM bei einer Inkubation von 60 Minuten bei 37°C. Die Stock-Konzentration von 3mM (250µg in 203µl DMSO) wurde folglich 1:500 verdünnt.

PKA und PKC bezeichnet dabei keine spezifische Kinase, sondern die jeweilige Gruppe der Isoenzyme.

3.8 Datenverarbeitung und Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Repräsentative Experimente sind in dieser Arbeit dargestellt. Die angegebenen Daten gelten für 1 Million Zellen. Am Versuchstag wurde daher für jede untersuchte Zelllinie eine Zellzählung an zusätzlich ausgesäten Zellen durchgeführt, um die gemessenen Werte auf 1 Million Zellen beziehen zu können. Die Experimente wurden als

Triplikatabbestimmungen durchgeführt, wobei die Werte als Mittelwert \pm SEM (Standard error of mean) angegeben sind.

Aus den Bindungsstudien wurden zum einen die Expressionsdichte der an der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren sowie die Bindungsaffinitätskonstante K_D ermittelt. Zum anderen wurde unter der Annahme der Konkurrenz der unmarkierten und radioaktiv markierten Peptide um eine Bindungsstelle (one site competition) aus den Verdrängungskurven die IC_{50} berechnet.

Durch die Messwerte der Rezeptor- tragenden Zelllinien wurde mit dem Computerprogramm Prism unter der Annahme einer nicht linearen Regression eine Ausgleichskurve gelegt.

Bei den Messungen von akkumulierten second messengern wurde dazu von einer sigmoidalen Dosis- Wirkungs- Kurve mit variabler Steigung ausgegangen und die entsprechende Option in Prism bei der Erstellung der Ausgleichskurven gewählt (sigmoidal dose response [variable slope]).

Alle Abbildungen bezüglich der Datenverarbeitung, die Berechnung der Parameter B_{max} , K_D , IC_{50}/EC_{50} und die Signifikanzberechnungen (zweiseitiger t- test) wurden auf einem Macintosh Computer mit dem Programm Graph Pad Prism 3.0 für Macintosh (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, U.S.A.) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Bindungsstudie an den Wildtyprezeptoren PTH1-R und PTH2-R sowie den einzelne Aminosäuren mutierten Ala426Cys-R, Tyr443Cys-R und der Doppelmutante Ala426,Tyr443Cys-R

Nach Konstruktion der mutierten Rezeptor-cDNA wurde die cDNA der Mutanten und die der beiden Wildtyprezeptoren P1R und P2R in den Vektor pCEP4 subkloniert und stabil in humane embryonale Nierenzellen HEK 293 transfeziert und expremiert. Als erstes wurden an diesen Zelllinien Bindungsstudien durchgeführt, um den Nachweis der Rezeptorexpression an der Zelloberfläche zu erbringen. Aus diesen Radio-Rezeptor-Assays wurde dann die Bindungsaffinitätskonstante (K_D) und die Expressionsdichte der Rezeptoren an der Zelloberfläche (B_{max}) ermittelt.

Wie unter 3.3 *Bindungsstudien* beschrieben wurden HEK-293-Zellen, die entweder mit Ala426Cys-, Tyr443Cys-, Ala426,Tyr443Cys-, PTH1- oder PTH2-Rezeptor stabil transfeziert waren, mit [125 J]-rPTH(1-34)amid als Tracerpeptid und steigenden Mengen (0 bis 3 μ M) an unmarkiertem hPTH(1-34) bzw. PTHrP(1-34) als kompetitiven Liganden inkubiert, um die spezifische Bindung zu messen. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurden dabei nicht transfezierte HEK-293-Zellen mituntersucht.

Der Versuchsaufbau wurde so gewählt, dass die beiden potentiellen Liganden hPTH(1-34) und PTHrP(1-34) an den einzelnen Zelllinien miteinander verglichen werden konnten. Um den zeitlichen Versuchsablauf exakt einhalten zu können, wurden die Bindungsstudien in zwei Etappen durchgeführt. Dies bedeutet, dass für den ersten Versuch je zwei Platten mit PTH1-, PTH2-Rezeptor oder der Doppelmutante Ala426,Tyr443Cys ausgesät wurden und im Radio-Rezeptor-Assay mit jeweils den gleichen ansteigenden Konzentrationen an hPTH(1-34) bzw. PTHrP(1-34) untersucht wurden.

Bindung von radioaktiv markierten Peptiden an einen Rezeptor ist normalerweise reversibel und temperaturabhängig. Unter 37°C ist die Menge der membrangebundenen Radioaktivität höher als unter 4°C (Kühlschrank). Allerdings ist bei höheren

Temperaturen im nachfolgenden Schritt der Verlust an abgewaschener Radioaktivität ebenfalls grösser. Die nachfolgend aufgeführten Bindungsstudien wurden an stabil transfezierten Zellen bei Raumtemperatur durchgeführt.

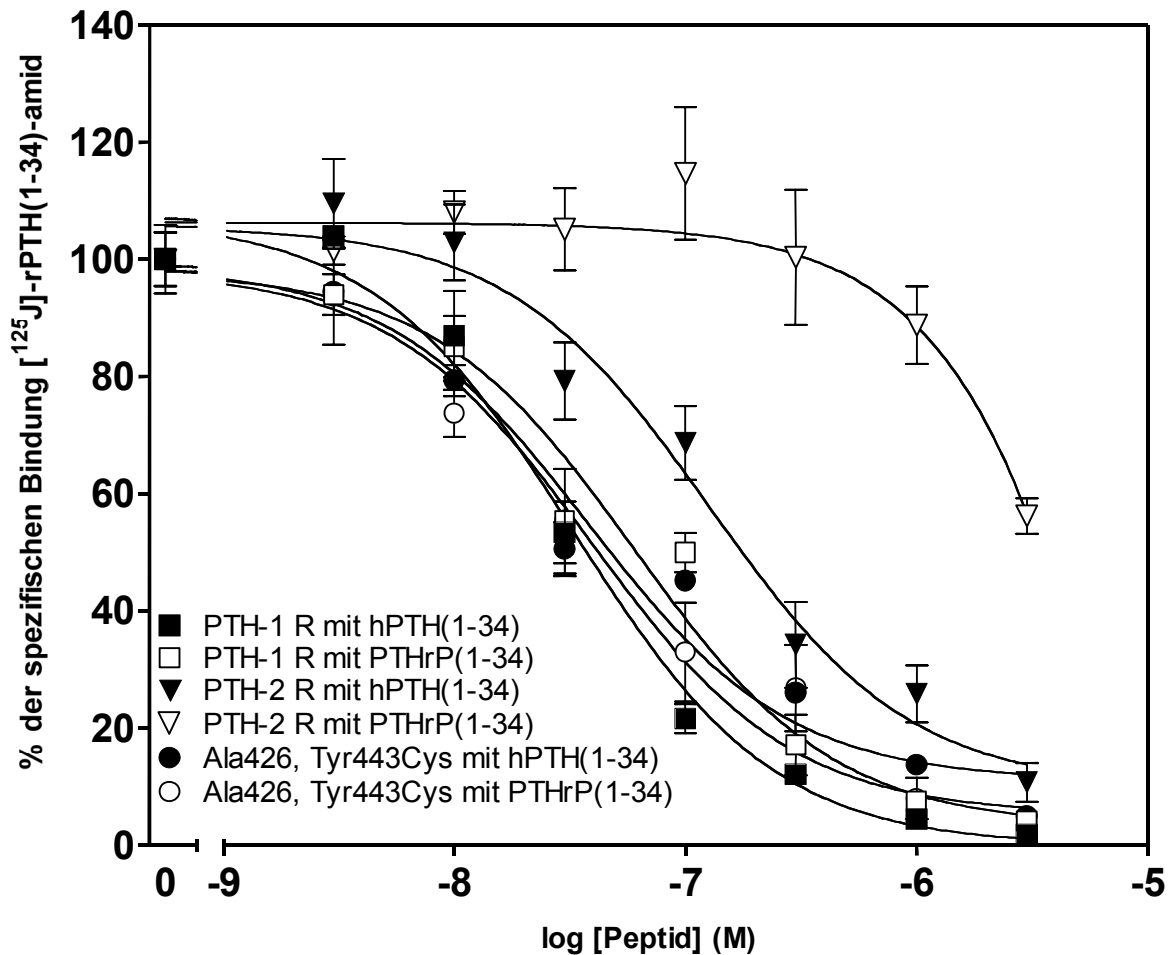


Abbildung 4.1 Spezifische Bindung von $[^{125}\text{J}]\text{-rPTH(1-34)amid}$ an mit PTH-1 R, PTH-2 R und der Doppelmutante Ala426, Tyr443Cys stabil transfezierten HEK 293-Zellen.

Wie unter 3.3 beschrieben wurde eine konstante Menge Tracer $[^{125}\text{J}]\text{-rPTH(1-34)amid}$ in Abhängigkeit der steigenden Konzentrationen an den kompetitiven Liganden hPTH(1-34) und PTHrP(1-34) verdrängt. Datenverarbeitung und Kurveninterpretation siehe Material und Methoden 3.3 und 3.8

Ein charakteristischer Parameter der Bindungsaffinität eines Radioliganden an den Rezeptor ist die benötigte Konzentration an Radioligand, welcher an 50% der zur Verfügung stehenden, sättigbaren Bindungsstellen bindet. Dies wird indirekt durch die

verschiedenen Konzentration an kompetitiven, unmarkierten Liganden ermittelt. Die Konzentration an unmarkiertem, nativem Ligand, welche benötigt wird zu einer 50%-igen Verdrängung an den zur Verfügung stehenden Bindungsstellen (IC_{50}) wird normalerweise als Annäherung an die Dissoziationskonstante K_i (Konzentration an benötigtem Radioligand zur Bindung an 50% der Bindungsstellen) angenommen. Die IC_{50} wird durch steigende Konzentrationen an unmarkiertem Peptid in Anwesenheit einer konstanten Menge an Radioligand ermittelt. Solange die Konzentration an zugegebenem Radioligand zwischen 1-10% der Dissoziationskonstante liegt hat er einen zu vernachlässigenden Einfluss an halbmaximalen Inhibition.

Aus den Verdrängungskurven der Zelllinien wurden folgende IC_{50} -Werte ermittelt:

Rezeptor	Kompetitiver Ligand	IC_{50} -Wert (nM)
PTH1-Rezeptor	hPTH(1-34)	32,64 (23,26 – 45,80)
PTH2-Rezeptor	hPTH(1-34)	126,80 ^a (70,17 – 230,10)
Ala426,Tyr443Cys-Rezeptor	hPTH(1-34)	37,63 (25,22 – 56,14)
PTH1-Rezeptor	PTHrP(1-34)	59,68 (35,63 – 99,97)
PTH2-Rezeptor	PTHrP(1-34)	31850 ^b (11697-87450)
Ala426,Tyr443Cys-Rezeptor	PTHrP(1-34)	39,01 (22,79 – 66,76)

Tabelle 4.1 IC_{50} -Werte der Verdrängungskurven aus Abbildung 4.1

Die Daten sind angegeben als Mittelwerte mit einem Vertrauensintervall von 95 % (in Klammern)

^a = signifikant erhöht im Vergleich zum IC_{50} - Wert des PTH-1 Rezeptors ($p < 0,05$) für den kompetitiven Liganden hPTH(1-34)

^b = signifikant erhöht im Vergleich zum IC_{50} - Wert des PTH-1 Rezeptors ($p < 0,01$) für den kompetitiven Liganden PTHrP(1-34)

In der nächsten Bindungsstudie wurden der PTH1-Rezeptor und die beiden einzelnen Mutationen Ala426Cys und Tyr443Cys auf die gleiche Weise mit hPTH(1-34) und PTHrP(1-34) als kompetitivem Liganden untersucht.

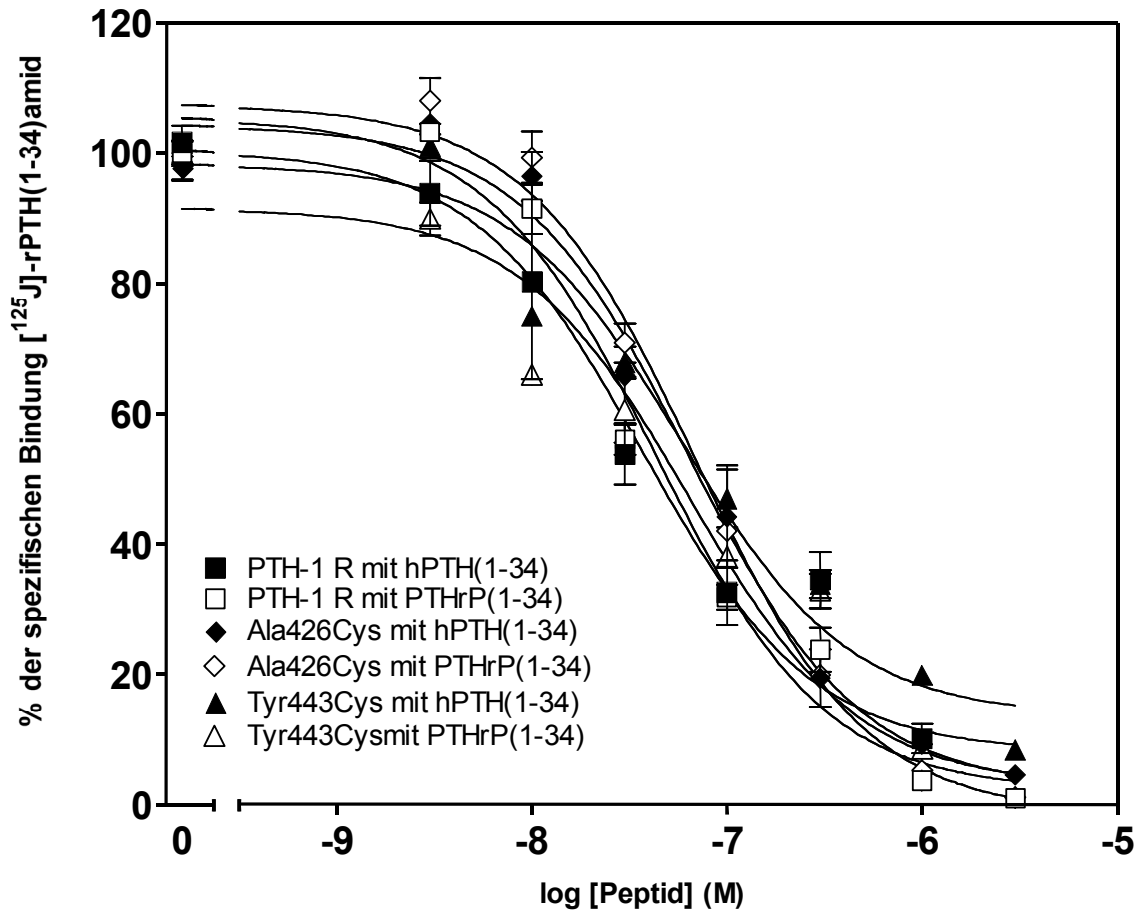


Abbildung 4.2 Spezifische Bindung von [¹²⁵J]-rPTH(1-34)amid an mit PTH-1 R und den Singelmutanten Ala426Cys bzw. Tyr443Cys stabil transfezierten HEK 293-Zellen
in Abhängigkeit der steigenden Konzentrationen an den kompetitiven Liganden hPTH(1-34) und PTHrP(1-34)

Aus den Verdrängungskurven der Zelllinien wurden folgende IC₅₀-Werte ermittelt:

Rezeptor	Kompetitiver Ligand	IC ₅₀ -Wert (nM)
PTH1-Rezeptor	hPTH(1-34)	36,63 (18,68 – 71,18)
Ala426Cys-Rezeptor	hPTH(1-34)	63,55 (44,88 – 89,98)
Tyr443Cys-Rezeptor	hPTH(1-34)	57,79 (37,99 – 87,93)
PTH1-Rezeptor	PTHrP(1-34)	42,73 (31,12 – 58,69)
Ala426Cys-Rezeptor	PTHrP(1-34)	68,94 (52,21 – 91,03)
Tyr443Cys-Rezeptor	PTHrP(1-34)	64,00 (36,48 – 112,30)

Tabelle 4.2 IC₅₀-Werte der Verdrängungskurven aus Abbildung 4.2

Die Daten sind angegeben als Mittelwerte mit einem Vertrauensintervall von 95 % (in Klammern)

Aus diesen Daten der kompetitiven Bindungsstudie konnte die Bindungsaffinitätskonstante K_D und Expressionsdichte der Rezeptoren an der Zelloberfläche bestimmt werden. Dabei wurden für die einzelnen Rezeptoren folgende Werte ermittelt:

Rezeptor	Bindungsaffinitätskonstante K _D (nM)	Expressionsdichte (Rezeptoren/ Zelle)
PTH1-Rezeptor	24,8	0,74 * 10 ⁶ (0,11 - 1,37 * 10 ⁶)
PTH2-Rezeptor	385,2	1,85 * 10 ⁶ (1,14 – 2,56 * 10 ⁶)
Ala426Cys-Rezeptor	103,8	1,34 * 10 ⁶ (1,16 – 1,53 * 10 ⁶)
Tyr443Cys-Rezeptor	62,4	0,60 * 10 ⁶ (0,52 – 0,68 * 10 ⁶)
Ala426,Tyr443Cys-Rezeptor	53,8	0,40 * 10 ⁶ (0,36 – 0,44 * 10 ⁶)

Tab 4.3 Bindungsaffinitätskonstante K_D und Expressionsdichte der stabil transfezierten Rezeptoren

Die Daten sind angegeben als Mittelwerte mit einem Vertrauensintervall von 95 % (in Klammern)

Die Aktivierung des PLC/ IP₃ – Signalweges wurde hauptsächlich an transient transfizierten Zelllinien untersucht, weshalb auch an diesen mehrere Bindungsstudien durchgeführt wurden, um von einer Expression der beiden Wildtyp- und der punkt- bzw. doppelmutierten Rezeptoren mit untereinander vergleichbarer Rezeptordichte ausgehen zu können. Der Radio-Rezeptor-Assay erfolgte ebenfalls mit [¹²⁵J]-rPTH(1-34)amid als Tracerpeptid und steigenden Mengen (0 bis 3µM) an unmarkiertem hPTH(1-34). Die Inkubation mit radioaktivem und unmarkiertem Peptid erfolgte hierbei über einen Zeitraum von 3 Stunden auf Eis bei 0°C, um die unspezifische Bindung möglichst gering zu halten.

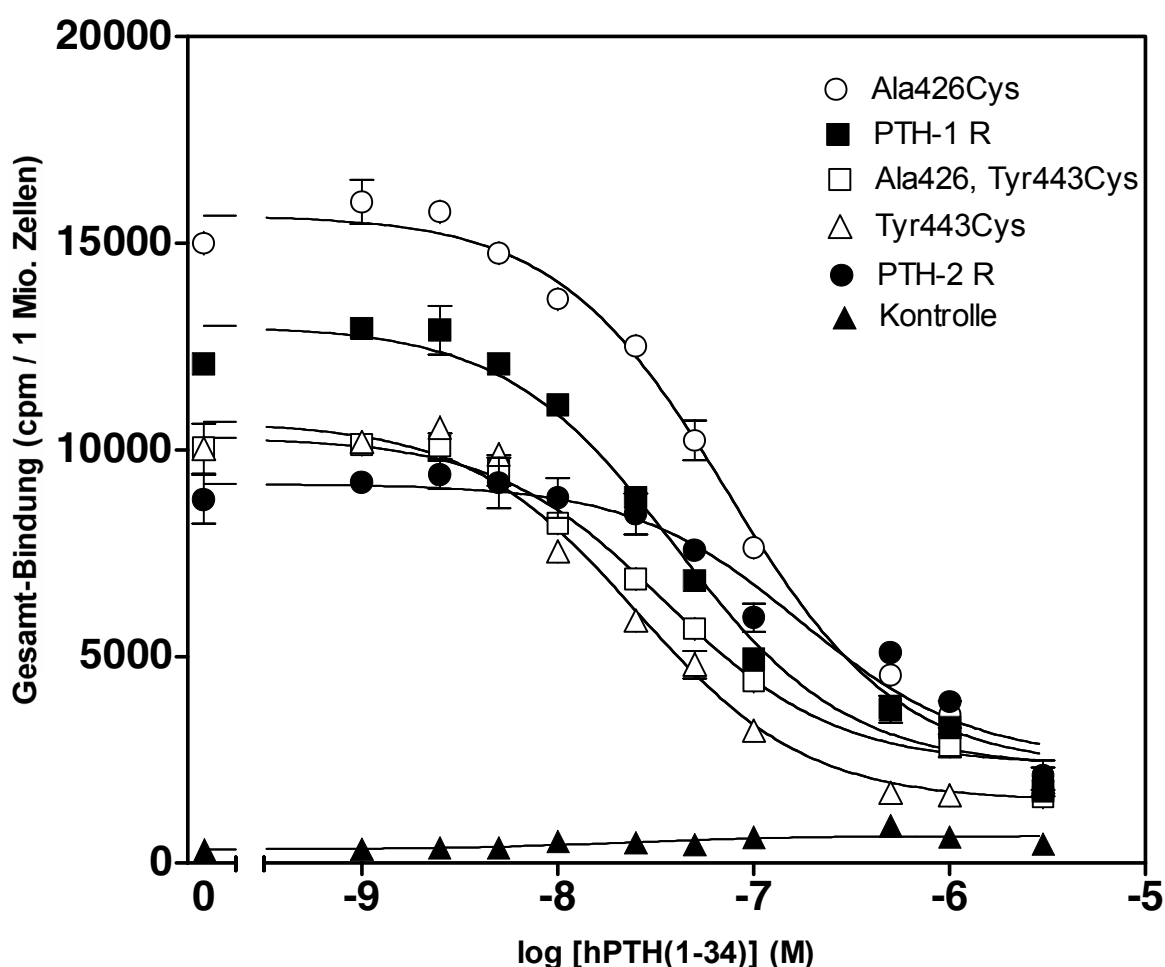


Abbildung 4.3 Kompetitive Bindung an HEK 293-Zellen, transient transfiziert mit PTH-1 R, PTH-2 R, den Ala426Cys bzw. Tyr443Cys punktmultierten und dem Ala426, Tyr443Cys doppelmutierten Rezeptoren im Vergleich zu nicht transfizierten HEK 293-Kontrollzellen.

Das Tracerpeptid [¹²⁵J]-rPTH(1-34)amid wurde durch steigenden Mengen (0 bis 3µM) an unmarkiertem hPTH(1-34) bei einer 3-stündigen Inkubation auf Eis bei 0°C verdrängt

Aus dieser Bindungsstudie, wie auch aus der Studie an stabil transfezierten HEK-293 Zellen, errechnete sich ein signifikant (p < 0,05) nach rechts verschobener IC₅₀ – Wert für PTH-2 R im Vergleich zum PTH-1 R für die Bindung von hPTH(1-34) bei ansonsten vergleichbaren Ergebnissen für die mutierten Rezeptoren.

Mit Ausnahme von Ala426Cys, wo der IC₅₀ – Wert über dem des PTH-1 R lag, liegen die übrigen Cystein-Mutationen zwischen denen des PTH1-R und des PTH2-R.

Rezeptor	IC ₅₀ -Wert (nM)
PTH1-Rezeptor	39,69 (31,85 – 49,46)
PTH2-Rezeptor	198,7 ^a (106,80 – 369,60)
Ala426Cys-Rezeptor	75,65 (62,91 – 90,97)
Tyr443Cys-Rezeptor	26,17 (20,60 – 33,24)
Ala426,Tyr443Cys-Rezeptor	35,18 (27,60 – 44,85)

Tabelle 4.4 IC₅₀-Werte der Verdrängungskurven aus Abbildung 4.3

Die Daten sind angegeben als Mittelwerte mit einem Vertrauensintervall von 95 % (in Klammern)

^a = signifikant erhöht im Vergleich zum IC₅₀ – Wert des PTH-1 Rezeptors (p < 0,05)

Alle Rezeptorkonstrukte waren auch bei der transienten Transfektion in vergleichbarer Menge auf der Zelloberfläche exprimiert mit einer Dichte von $0,4 - 1,4 \times 10^6$ pro Zelle.

Rezeptor	Bindungsaffinitätskonstante K_D (nM)	Expressionsdichte (Rezeptoren/ Zelle)
PTH1-Rezeptor	88,24	$0,70 * 10^6$ ($0,66 - 0,74 * 10^6$)
PTH2-Rezeptor	165,20	$0,89 * 10^6$ ($0,79 - 0,99 * 10^6$)
Ala426Cys-Rezeptor	148,90	$1,40 * 10^6$ ($1,30 - 1,40 * 10^6$)
Tyr443Cys-Rezeptor	652,60	$0,40 * 10^6$ ($0,37 - 0,46 * 10^6$)
Ala426,Tyr443Cys-Rezeptor	123,50	$0,63 * 10^6$ ($0,60 - 0,67 * 10^6$)

Tab 4.5 Bindungsaffinitätskonstante K_D und Expressionsdichte der transient transfizierten Rezeptoren

Die Daten sind angegeben als Mittelwerte mit einem Vertrauensintervall von 95 % (in Klammern)

Die Bindungsstudien mit TIP 39 sind Gegenstand einer anderen Arbeit und werden daher hier nicht gesondert erwähnt.

4.2 Internalisierungsstudien

HEK-293-Zellen, die stabil die beiden Wildtyp- und die drei mutierten Rezeptoren exprimierten, wurden wie unter 3.4 beschrieben in einem Versuchsaufbau untersucht und der Prozentsatz der Internalisierung berechnet.

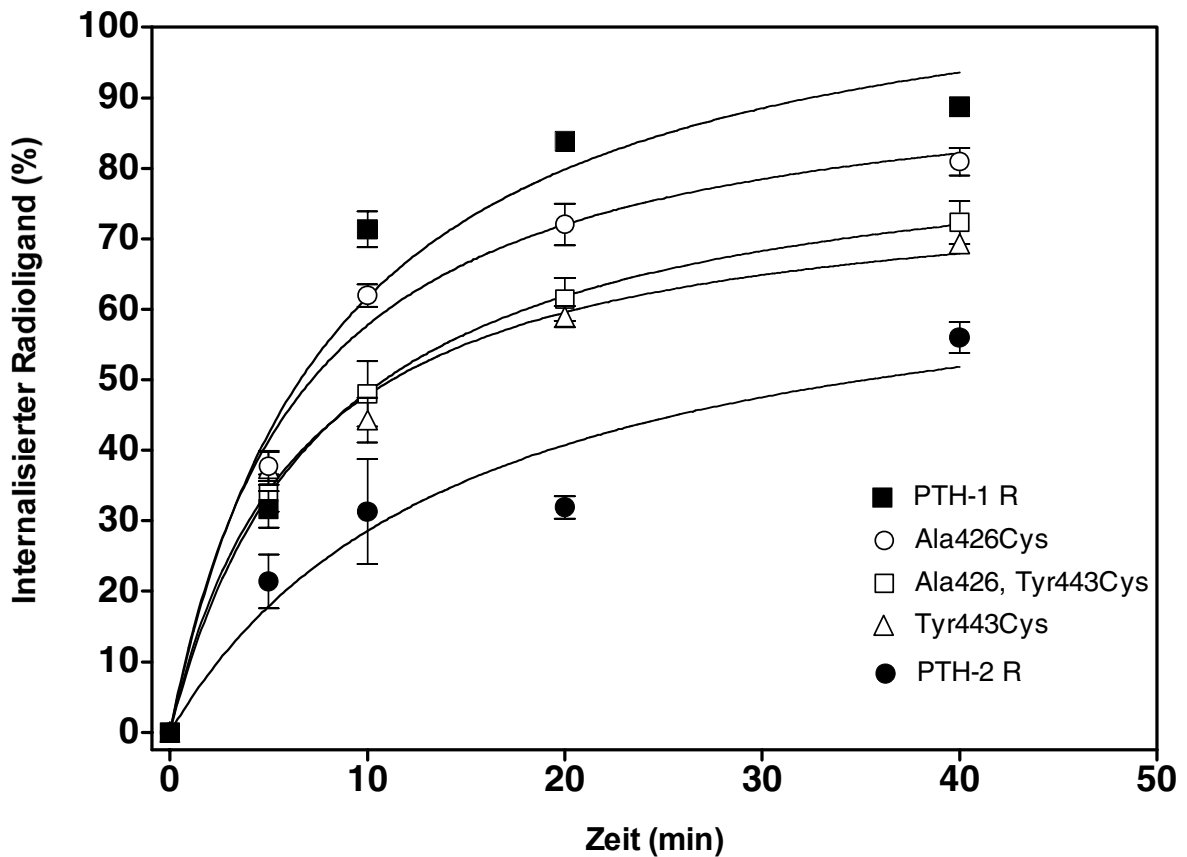


Abbildung 4.4 Zeitlicher Verlauf der Internalisierung von ^{125}J -rPTH (1-34)amide an den Wildtyp- und punkt-/bzw. doppelmutierten Rezeptoren.

Nach 20-minütiger Inkubation wird beim PTH-1 R ein durchschnittliche maximale Internalisierung von 70% erreicht, beim PTH-2 R hingegen nur 38%. Die mutierten PTH1-Rezeptoren liegen nach 20 Minuten zwar unter den Werten des WT-PTH-1R, allerdings nicht signifikant (Ala426 Cys 60%, Tyr443Cys 53% und Ala426, Tyr443Cys 54%). Dies sind die gemittelten Werte mehrerer Internalisierungsstudien, Abbildung 4.4. entspricht einem charakteristischen Beispiel.

Nach 2,5 Minuten ist kein signifikanter Unterschied der Internalisierung der einzelnen Rezeptoren messbar.

4.3 cAMP-Signalweg des Ala426Cys-, Tyr443Cys- und Ala426,Tyr443Cys-Rezeptors

Nach Bindung eines agonistisch wirkenden Liganden an einen Rezeptor wird normalerweise der Rezeptor aktiviert und die intrazelluläre Kaskade in Gang gesetzt. Daher sollte im Idealfall eine quantitative Korrelation zwischen Ligandenbindung und Liganden-induzierter zellulärer Antwort zu finden sein. Wenn man die kaskadenartige Signaltransduktion mit nachfolgend wiederholter Amplifikation der Signalantwort vernachlässigt, sollte idealerweise eine zur 50%igen Besetzung der zur Verfügung stehenden Rezeptoren benötigte Ligandenkonzentration (IC_{50}) der Konzentration an Peptid entsprechen, welche zur halbmaximalen Stimulation der Zellantwort (EC_{50}) benötigt wird. Sollte der EC_{50} -Wert eines Liganden niedriger als dessen IC_{50} -Wert liegen, kann dies bedeuten, dass die Bindungsstellen des radioaktiv markierten Liganden nicht mit den Stellen des natürlichen Liganden gleichzusetzen sind, welcher die intrazelluläre, biologische Kaskade der Zellantwort aktiviert. Dieser Fall kann aber auch auftreten, wenn die Konzentration der markierten Peptide über der Dissoziationskonstante der jeweiligen Bindungsreaktion liegt. Ein anderer Erklärungsansatz ist sicherlich auch, wenn nur ein Bruchteil der zur Verfügung stehenden, auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren für eine maximale Zellantwort occupiert werden muss. In diesem Fall ist von überzähligen Rezeptoren zu sprechen. Dies kann insbesondere in Expressionssystemen geschehen, wo – wie in unserem Fall - ein Rezeptor-Protein überexprimiert wird. Die Menge an exprimierten Rezeptoren kann die Anzahl an Rezeptoren übersteigen, welche zur Ankopplung an die endogene Transduktionskaskade benötigt wird. Dies scheint bei den vorliegenden Versuchen mit Ankopplung an die cAMP-Kaskade der Fall zu sein, da die EC_{50} -Werte bis zu 1000fach unter den IC_{50} -Werten liegen.

Nach Stimulation mit hPTH(1-34) bzw. PTHrP(1-34) wurde das cAMP-Signal von stabil transfezierten HEK-293-Zellen gemessen, welche entweder einen der beiden

Wildtyp-Rezeptoren P1R bzw. P2R oder die punkt-/doppelmutierten Ala426Cys-, Tyr443Cys- und Ala426, Tyr443Cys-Rezeptoren exprimierten.

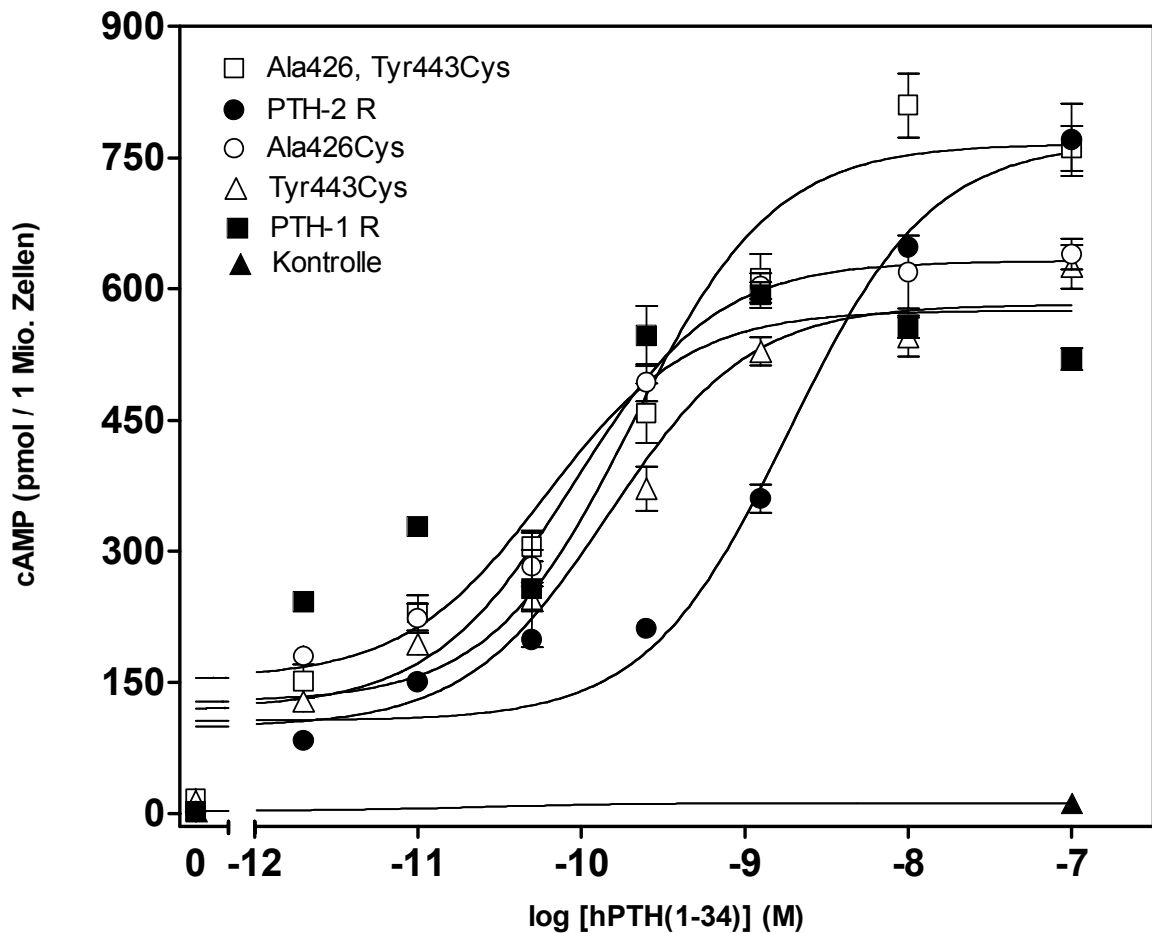


Abbildung 4.5 Akkumulation von intrazellulärem cAMP in Abhängigkeit der Stimulation mit hPTH(1-34)

HEK 293-Zellen mit den beiden Wildtyp-Rezeptoren und den punkt- bzw. doppelmutierten Rezeptoren wurden wie unter 3.5 Messung der Aktivierung des AC/cAMP-Signalweges beschrieben für 15 Minuten mit hPTH(1-34) in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert

Stimulation mit hPTH(1-34) erzeugte in allen rezeptortransfuzierten HEK-293-Zellen eine PTH-abhängige intrazelluläre Akkumulation von cAMP. Die Zelllinien, welche mit dem Wildtyp-PTH-1- und den punkt-/doppelmutierten Rezeptoren transfuziert waren, zeigten einen vergleichbaren halbmaximalen Effekt (EC_{50}), wohingegen der der PTH-2-Rezeptor-transfuzierten Zellen signifikant nach rechts ($p < 0,01$) verschoben war. Nach

maximaler Stimulation erreichten die mit den mutierten PTH-Rezeptoren transfizierten HEK-293-Zellen ein ca. 20% (Ala426Cys-R, Tyr443Cys-R) bzw. 46% (Ala426, Tyr443Cys-R) höheres maximales cAMP-Signal als die Zellen mit dem PTH-1-Rezeptor. Die PTH-2-Rezeptor transfizierte Zelllinie akkumulierte ebenfalls bis zu 48% mehr an cAMP. Hier muss allerdings die mehr als 2,5-fach höhere Expressionsdichte des PTH-2 R in der stabilen Transfektion berücksichtigt werden (PTH-2 R $1,85 \cdot 10^6$ versus PTH-1 R $0,74 \cdot 10^6$)

Rezeptor	EC ₅₀ -Wert (nM)
PTH1-Rezeptor	0,065 (0,001 - 0,275)
PTH2-Rezeptor	1,86 ^a (1,130 – 3,071)
Ala426Cys-Rezeptor	0,091 (0,050 – 0,165)
Tyr443Cys-Rezeptor	0,148 (0,082 – 0,264)
Ala426,Tyr443Cys-Rezeptor	0,208 (0,116 – 0,375)

Tabelle 4.6 EC₅₀-Werte der hPTH(1-34)-abhängigen Akkumulation von intrazellulärem cAMP aus Abbildung 4.5

Die Daten sind angegeben als Mittelwerte mit einem Vertrauensintervall von 95 % (in Klammern)

^a = signifikant erhöht versus EC₅₀ - Wert des PTH-1 Rezeptors (p < 0,01)

Die Stimulation mit PTHrP(1-34) zeigte in den Zelllinien, transfiziert entweder mit dem PTH-1-oder den mutierten Rezeptoren, eine ähnliche Dosis-Wirkungs-Kurve. Die mit dem PTH-2-Rezeptor transfizierten Zellen waren jedoch zu keiner cAMP-Akkumulation fähig (p < 0,0001).

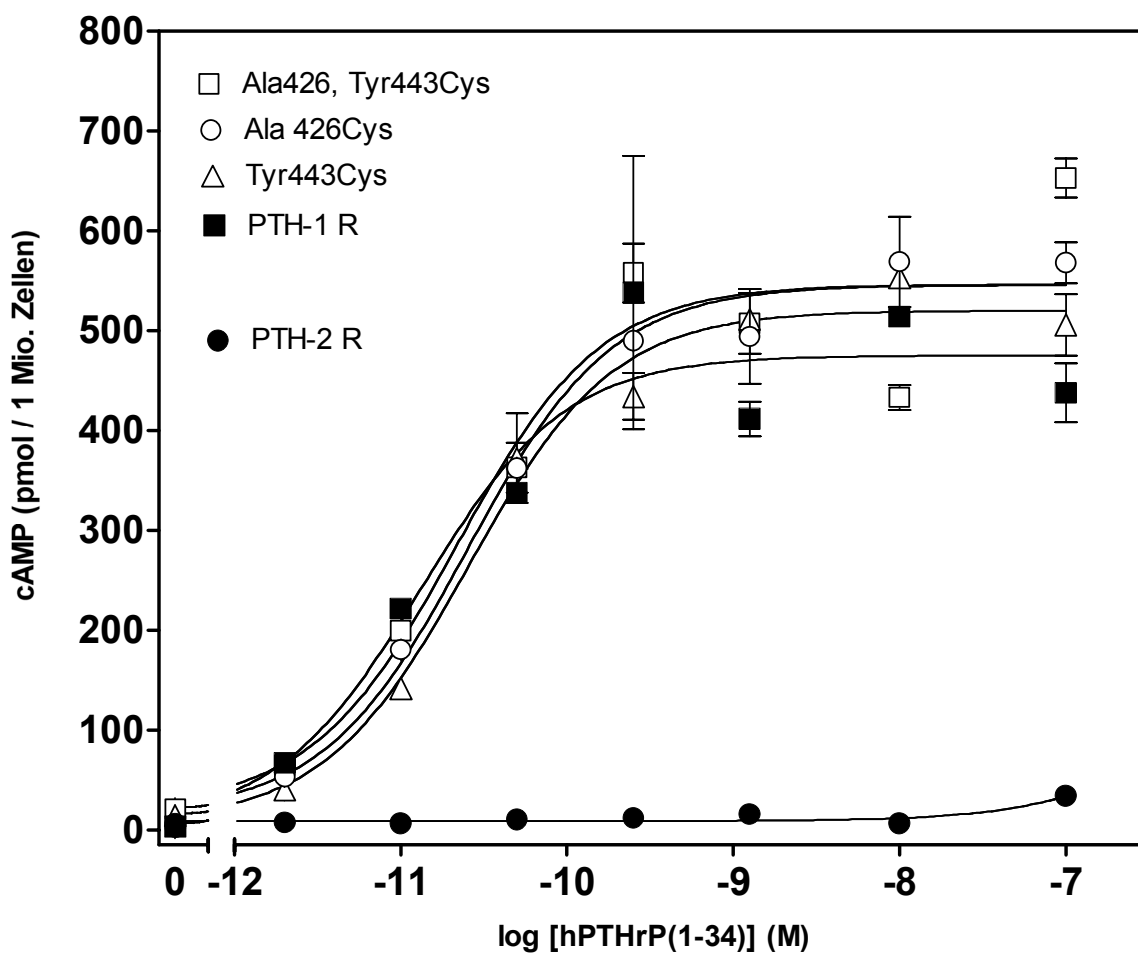


Abbildung 4.6 hPTHrP(1-34) abhängige Akkumulation von intrazellulärem cAMP

HEK 293-Zellen mit den beiden Wildtyp-Rezeptoren und den punkt- bzw. doppelmutierten Rezeptoren wurden wie unter 3.5 Messung der Aktivierung des AC/cAMP-Signalweges beschrieben für 15 Minuten mit hPTHrP(1-34) in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert

Rezeptor	EC ₅₀ -Wert (nM)
PTH1-Rezeptor	0,012 (0,004 – 0,038)
PTH2-Rezeptor	k.A.
Ala426Cys-Rezeptor	0,024 (0,015 – 0,040)
Tyr443Cys-Rezeptor	0,024 (0,016 – 0,036)
Ala426,Tyr443Cys-Rezeptor	0,020 (0,009 – 0,042)

Tabelle 4.7 EC₅₀-Werte der PTHrP(1-34)-abhängigen Akkumulation von intrazellulärem cAMP aus Abbildung 4.6

Die Daten sind angegeben als Mittelwerte mit einem Vertrauensintervall von 95 % (in Klammern)

Das neu entdeckte TIP39 wurde in separaten cAMP-Signaltransduktionsstudien mit den beiden Liganden hPTH(1-34) und PTHrP(1-34) an Zelllinien, transfiziert mit dem PTH-1-, PTH-2- und dem doppelmutiertem Ala426, Tyr443Cys-Rezeptor, verglichen.

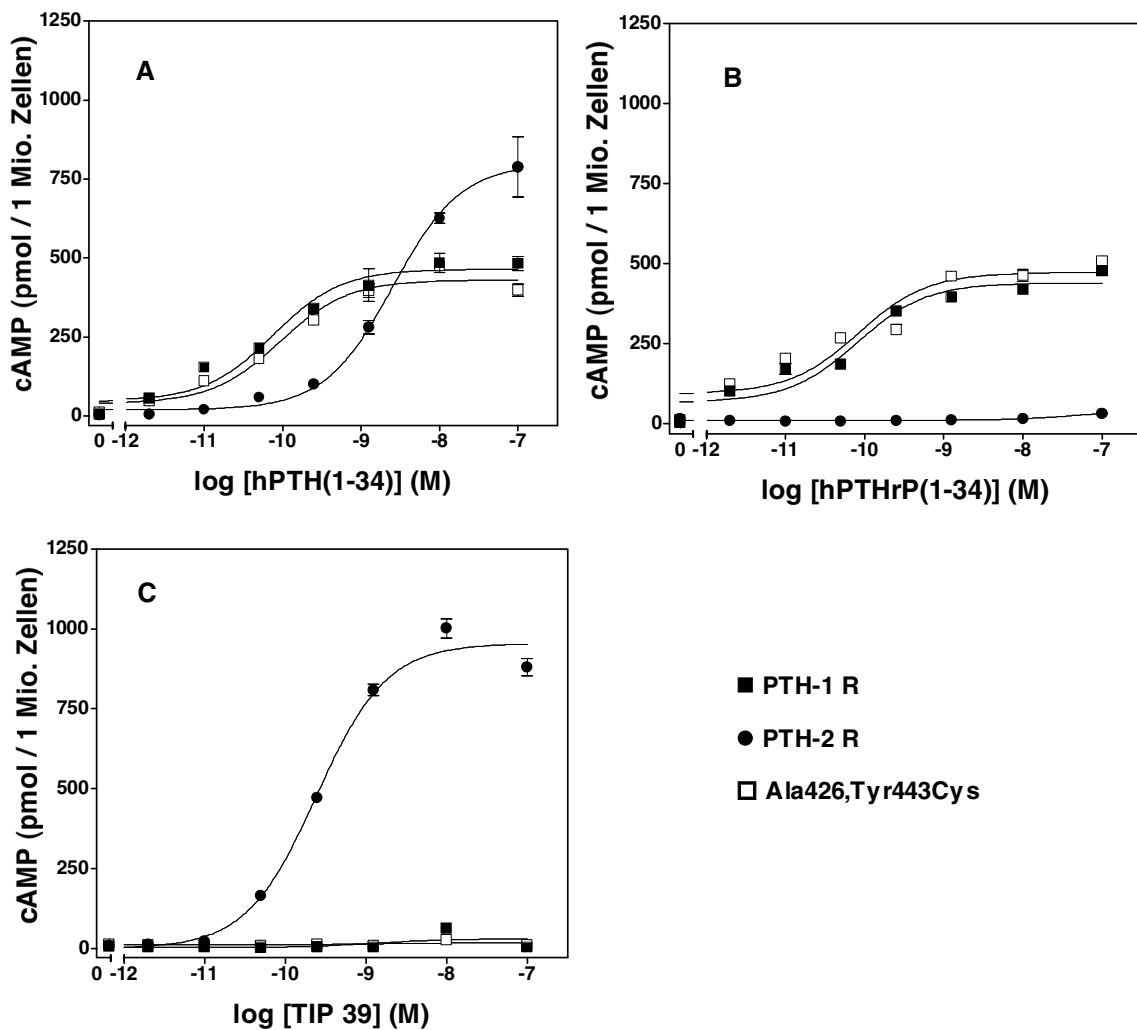


Abbildung 4.7 Vergleich der intracellulären cAMP-Akkumulation in PTH-1R, PTH-2R und doppelmutierten Ala426,Tyr443Cys-R exprimierenden HEK293-Zelllinien

Bei der PTH-2-Rezeptor-Zelllinie ergab die Stimulation mit TIP39 ($EC_{50} = 0,243$ [0,191 – 0,309]) eine gegenüber der Stimulation mit hPTH(1-34) ($EC_{50} = 2,529$ [1,672 – 3,826]) signifikant nach links verschobene Dosis-Wirkungs-Kurve ($p < 0,01$). Dagegen erzeugte TIP39 bei den PTH-1- und den doppelmutierten Rezeptor-Zellen keine intrazelluläre cAMP-Akkumulation.

Rezeptor	Ligand	EC ₅₀ -Wert (nM)
PTH1-Rezeptor	hPTH(1-34)	0,076 (0,042 – 0,139)
	PTHrP(1-34)	0,083 (0,042 – 0,152)
	TIP 39	k.A.
PTH2-Rezeptor	hPTH(1-34)	2,529 (1,672 – 3,826)
	PTHrP(1-34)	k.A.
	TIP 39	0,243 ^a (0,191 – 0,309)
Ala426,Tyr443Cys-Rezeptor	hPTH(1-34)	0,092 (0,060 – 0,143)
	PTHrP(1-34)	0,092 (0,056 – 0,141)
	TIP 39	k.A.

Tabelle 4.8 Vergleich der EC₅₀-Werte der hPTH(1-34)-, PTHrP(1-34)- und TIP39-abhängigen Akkumulation von intrazellulärem cAMP aus Abbildung 4.8

Die Daten sind angegeben als Mittelwerte mit einem Vertrauensintervall von 95 % (in Klammern)

^a = signifikant erniedrigt versus EC₅₀-Wert des PTH2-R für hPTH(1-34) (p < 0,01)

4.4 IP-Signalweg des Ala426Cys-, Tyr443Cys- und Ala426,Tyr443Cys-Rezeptors

Untersucht wurde das Inositolphosphat-Signal von transient transfizierten HEK-293-Zellen, die entweder einen der beiden Ursprungsrezeptoren P1R bzw. P2R oder die punkt-/doppelmultierten Ala426Cys-, Tyr443Cys- und Ala426, Tyr443Cys-Rezeptoren exprimierten. In unseren Studien mit stabil transfizierten HEK-293-Zellen war die Rezeptordichte vergleichbar mit der der transient transfizierten Zelllinien, allerdings fanden keine direkt vergleichbaren Bindungsstudien transient versus stabil (in dieser Arbeit nur mit stabil transfizierten HEK-293-Zellen) statt.

4.4.1 IP-Anstieg nach Stimulation mit hPTH(1-34)

Wie zu erwarten war, zeigte nach hPTH(1-34)-Stimulation die Zelllinie, transfiziert mit dem P1R, einen etwa vierfachen Anstieg der Inositolphosphat -Akkumulation über dem Basalwert ($EC_{50} = 20,60$ [3,8 – 111,7]). Ebenso erreichten die Zellen mit den punktmultierten Rezeptoren ein ca. 3,5-fach (Tyr443Cys) bis 4-fach (Ala426Cys) höheres IP-Signal nach Maximalstimulation mit $3\mu\text{M}$ hPTH(1-34).

Dagegen zeigten die Zelllinien, welche den doppelmultierten Rezeptor Ala426,Tyr443Cys ($p = 0,0004$) oder den P2R ($p = 0,0005$) exprimierten, selbst nach einstündiger Stimulation mit $3\mu\text{M}$ hPTH(1-34) keinen IP-Anstieg über dem Basalwert.

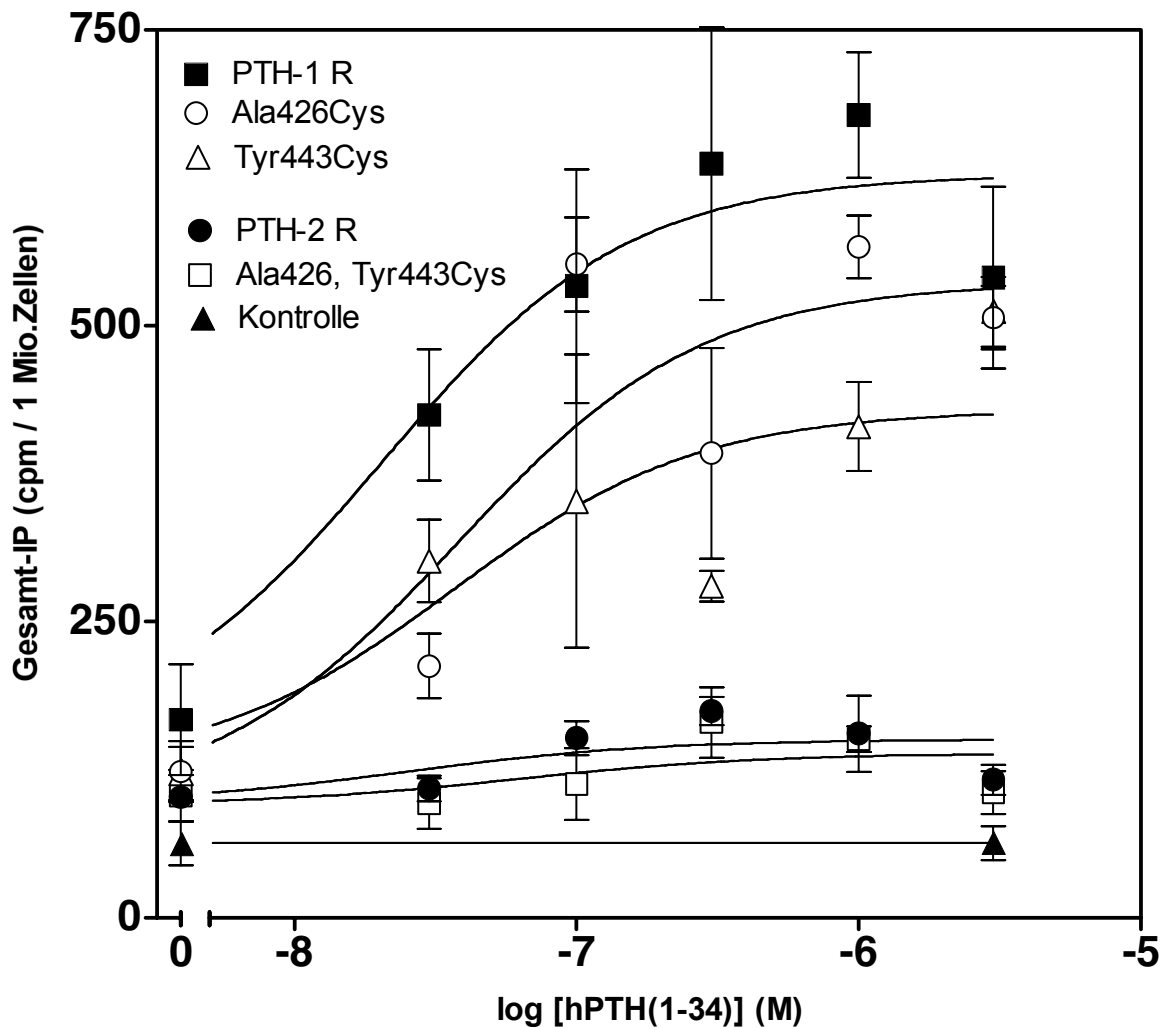


Abbildung 4.8 hPTH(1-34)abhängige Akkumulation von intrazellulärem Inositolphosphat.

Wie unter 3.6 Messung der Aktivierung des PLC/ IP_3 - Signalweges beschrieben wurden HEK 293-Zellen, welche mit den PTH 1-R, PTH 2-R, Ala426Cys-, Tyr443Cys- und Ala426, Tyr443Cys-Rezeptoren transfeziert waren, für 1 Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen an hPTH(1-34) stimuliert

4.4.2 IP-Anstieg nach Stimulation mit PTHrP(1-34)

Die maximale IP-Antwort schien bei dem PTH-1-Rezeptor hier schon nach Stimulation mit $1\mu\text{M}$ PTHrP(1-34) erreicht, nach welcher sich ein zehnfacher Anstieg an intrazellulärem Inositolphosphat messen liess. Der Ala426Cys-Rezeptor zeigte hier eine

cirka dreifache maximale IP-Antwort. Dagegen wurde bei dem Tyr443Cys-Rezeptor nur noch etwas mehr als der doppelte maximale Anstieg gemessen, wobei der EC_{50} Wert signifikant unter dem von P1R lag ($p = 0,01$).

Auch nach Stimulation mit PTHrP(1-34) waren weder der P2R ($p < 0,0001$) noch der Ala426,Tyr443Cys-Rezeptor ($p < 0,0001$) zu einem IP-Signal fähig.

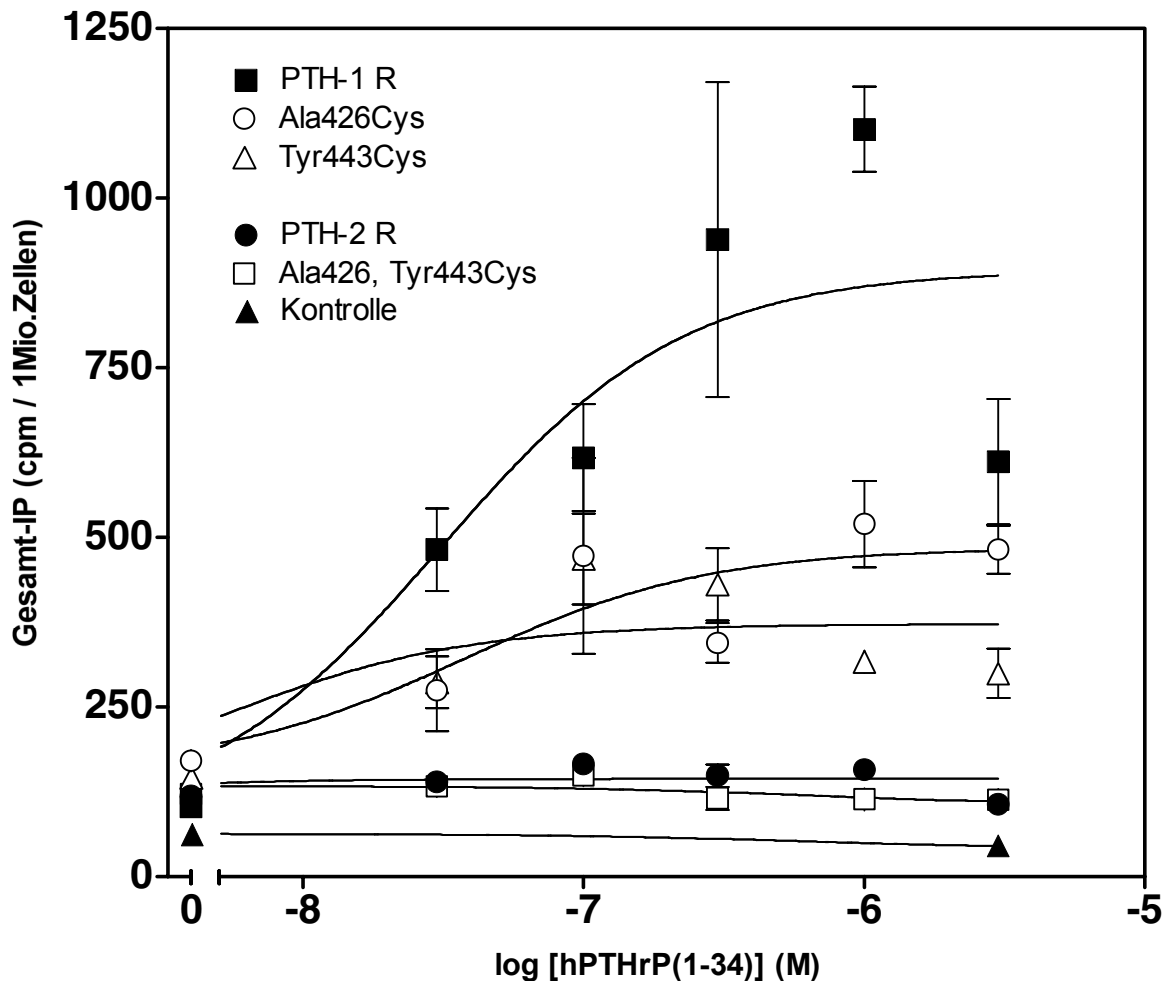


Abbildung 4.9 hPTHrP(1-34)abhängige Akkumulation von intrazellulärem Inositolphosphat.

Wie unter 3.6 Messung der Aktivierung des PLC/ IP_3 - Signalweges beschrieben wurden HEK 293-Zellen, welche mit den PTH 1-R, PTH 2-R, Ala426Cys-, Tyr443Cys- und Ala426,Tyr443Cys-Rezeptoren transfiziert waren, für 1 Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen an hPTHrP(1-34) stimuliert

4.4.3 IP-Antwort nach Blockierung der einzelnen Proteinkinasen

Um möglicherweise ein nur sehr geringes IP-Signal des doppelmutierten Ala426, Tyr443Cys-Rezeptors nach Stimulation mit dem Agonisten hPTH(1-34) nicht zu übersehen, wurde der Versuchsablauf zusätzlich mit einer einstündigen Vorinkubation mit den spezifischen Hemmstoffen von PKA (H-89) und PKC (GF109203X) ergänzt. (187), (189)

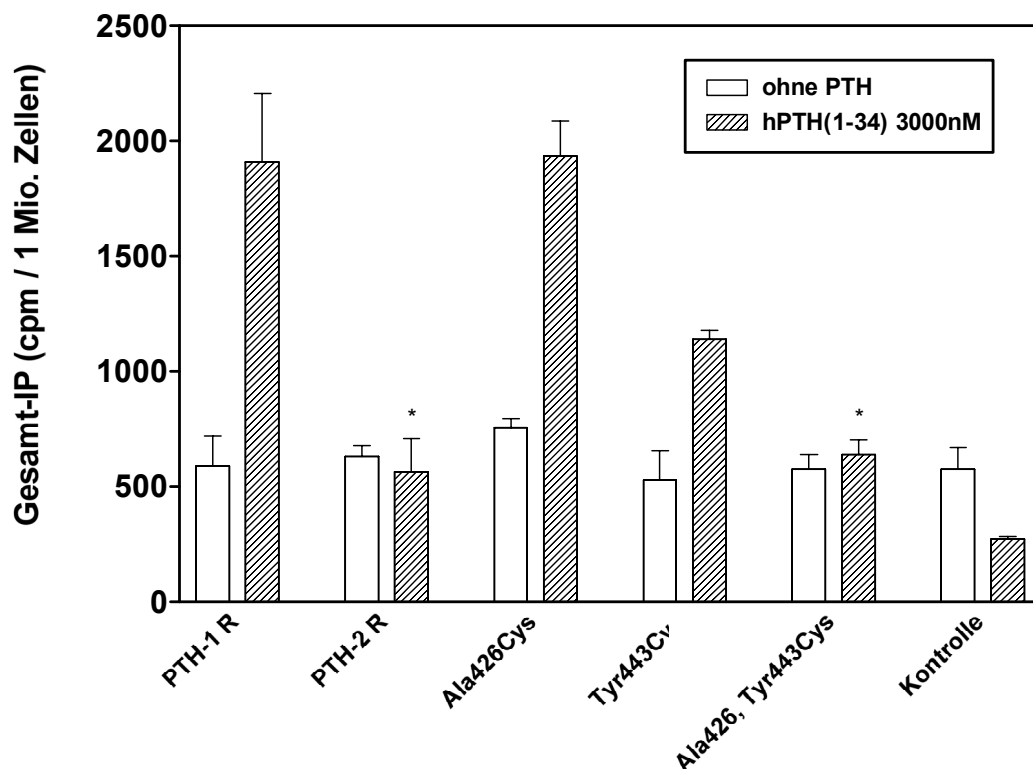


Abbildung 4.10 hPTH(1-34) abhängige Akkumulation von intrazellulärem Inositolphosphat nach Hemmung der Proteinkinasen A und C.

Wie unter 3.7 Pharmakologische Hemmung von Proteinkinasen beschrieben erfolgte vor der Inkubation mit hPTH(1-34) eine einstündige Vorinkubation mit den Inhibitoren H-89 (30 μ M) und GF109203X (6 μ M)
(*** p = 0,0005)

Hierbei zeigte zwar der P1R nach Stimulation mit hPTH (1-34) nicht den erwarteten zehnfachen IP-Anstieg über dem Basalwert, sondern ebenfalls wieder einen cirka vierfachen, doch weder der P2R noch der Ala426, Tyr443Cys ergaben eine IP-Antwort.

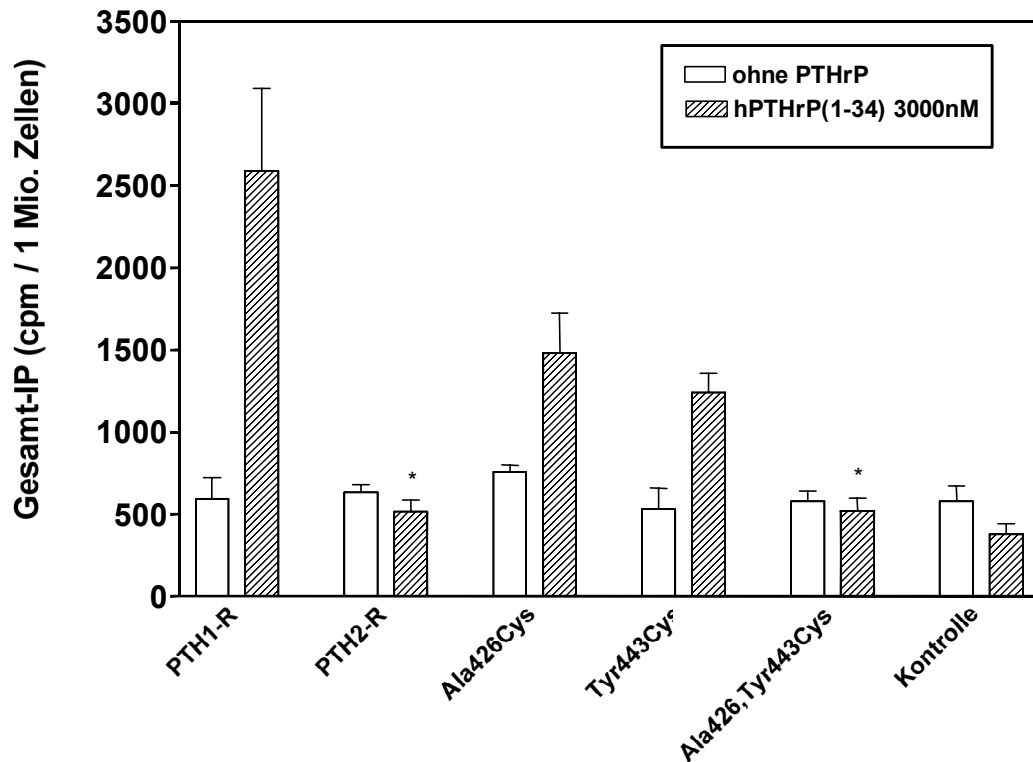


Abbildung 4.11 hPTHrP(1-34) abhängige Akkumulation von intrazellulärem Inositolphosphat nach Hemmung der Proteinkinasen A und C.

Wie unter 3.7 Pharmakologische Hemmung von Proteinkinasen beschrieben erfolgte vor der Inkubation mit hPTHrP(1-34) eine einstündige Vorinkubation mit den Inhibitoren H-89 (30 μM) und GF109203X (6 μM)
 *** $p < 0,0001$

Auch nach Stimulation mit PTHrP(1-34) zeigten diese beiden Rezeptoren keine IP-Akkumulation.

5 Diskussion

5.1 Aktuelle Studie

5.1.1 Bindung

Unter der Hypothese, dass zwei Cysteine in der dritten Extrazellulärschleife des PTH-2 Rezeptors dessen Ligandenspezifität von hPTH - möglicherweise auch von TIP39 - bedingen, wurden in der vorliegenden Arbeit durch Punktmutationen entweder einzeln oder kombiniert zwei extrazelluläre Cysteine in den PTH-1 Rezeptor eingeführt: Ala426>Cys, Tyr443>Cys und Ala426, Tyr443>Cys. Die Transfektion dieser wie auch der Wildtyp-Rezeptoren in HEK 293-Zellen führte zu einer stabilen Expression funktionsfähiger Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Eine Änderung des Bindungsverhaltens mit einem sogenannten Switch zum PTH-2 Rezeptor wurde nicht gesehen, sondern alle mutierten Rezeptoren zeigten eine vergleichbare Bindung, insbesondere von PTHrP. Das Bindungsverhalten von TIP39 (potenter Agonist am PTH-2R), was v.a. Gegenstand einer anderen Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe war, wurde durch Einfügen der beiden Cysteine in den PTH-1 R nicht verändert. TIP39 bindet an PTH-1R mit einer moderaten Affinität ($IC_{50} \approx 10^{-7} - 10^{-6}$ M), wohingegen es am PTH-2R mit einer höheren Affinität mit einer IC_{50} von ca. 10^{-8} bindet, vergleichbar mit der von hPTH. (190) An der Doppelmutante wurde eine Affinität im Bereich von $IC_{50} \approx 10^{-6}$ gemessen. (191)

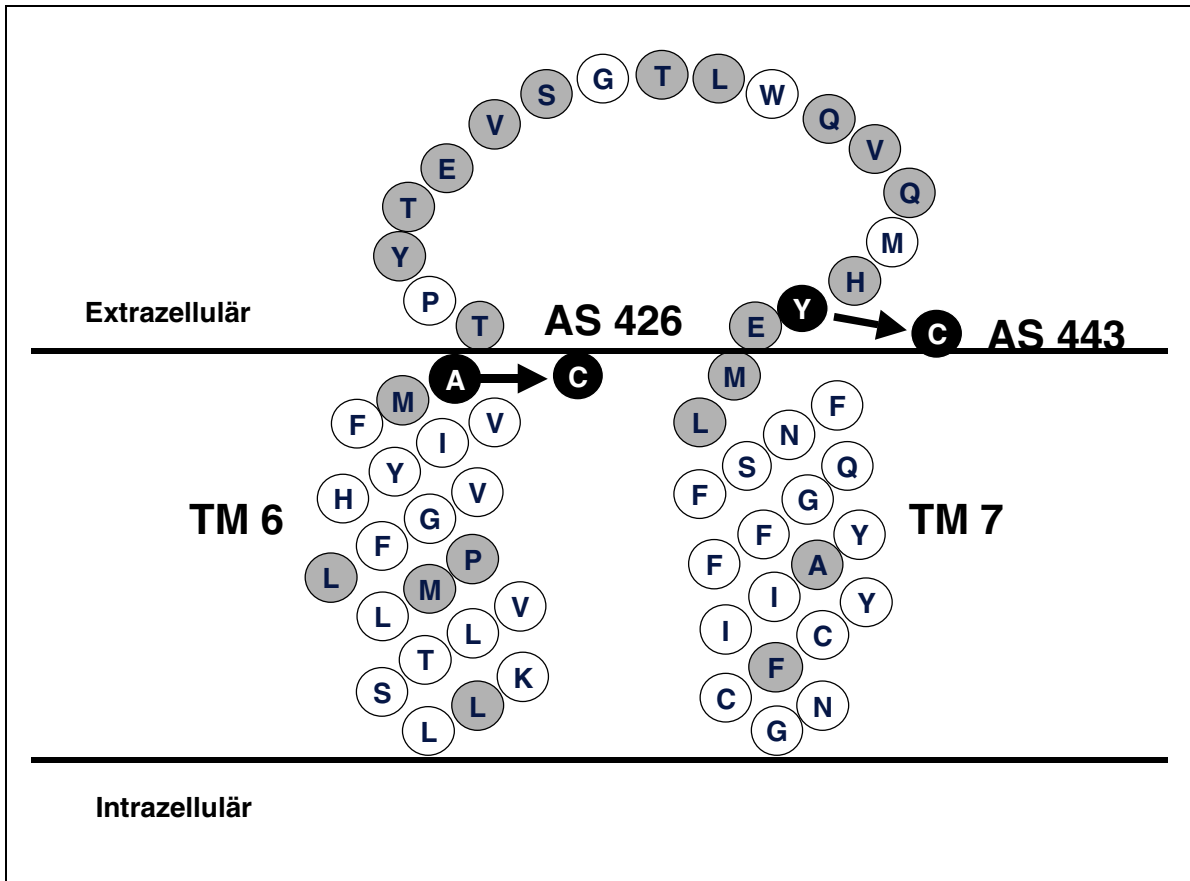


Abbildung 5.1

Darstellung der sechsten und siebten transmembranären Domäne mit dem dritten Extrazellulärloop aus der Sequenz des hPTH1-R.

Grau unterlegte AS stellen die Homologien zwischen hPTH1- und hPTH2-Rezeptor dar. Schwarz unterlegte AS markieren die vorgenommenen Mutationen im PTH1-R zu den entsprechenden AS des hPTH2-R: Ala426Cys-Mutation, Tyr443Cys-Mutation und die Doppelmutation Ala426, Tyr443Cys.

5.1.2 Internalisierung

Im Gegensatz zur Rezeptor-vermittelten Endozytose von Macromolekülen wie z.B. LDL oder Transferrin, welche der nutritiven Zellversorgung mit Cholesterol bzw. Eisen dienen, ist die Funktion der Internalisierung von signaltransduzierenden Rezeptoren und deren Liganden weniger klar. Sequestrierung durch liganden-induzierte Internalisierung verhindert eine erneute Aktivierung durch hydrophile Liganden und somit eine Überstimulation des Rezeptors. Allerdings bedeutet Rezeptor -Internalisierung auch

zugleich Desensitizierung, wobei hierfür Ser-, Thr- und Tyr-Reste des (PTH)/PTHrP-Rezeptors als Schlüsselemente für die Phosphorylierung identifiziert werden konnten (192). Die Mutation der Aminosäure Tyrosin zu Cystein an Position 443 des hPTH1-R bewirkte zwar eine Reduktion der Internalisierung (nach 20 Minuten: Tyr443Cys 53% im Vergleich zum hPTH-1 Rezeptor mit 70%), allerdings nicht signifikant, so dass dies am Internalisierungsprozess nicht entscheidend beteiligt sein dürfte. Der internalisierte Anteil von PTH-2 Rezeptor lag nach 20 Minuten bei 38%. Interessant wäre, diese Internalisierungsstudien an den vorliegenden Zelllinien auch mit den jeweiligen Antagonisten durchzuführen, um genaueren Einblick zu erhalten.

5.1.3 AC/cAMP-Signalweg

Die Stimulation mit hPTH(1-34) erzeugte in allen rezeptortransfuzierten HEK-293-Zellen eine PTH-abhängige vergleichbare intrazelluläre Akkumulation von cAMP.

PTHrP(1-34) rief in den Zelllinien, transfuziert entweder mit dem PTH-1-oder den mutierten Rezeptoren eine ähnliche Dosis-Wirkungs-Kurve hervor, ohne signifikante Änderung der maximalen intrazellulären cAMP-Antwort oder des halbmaximalen Effekts (EC_{50}), insbesondere war keine Änderung der Ligandenspezifität erkennbar.

TIP 39 aktivierte weder am humanen PTH-1 Rezeptor noch an der Doppelmutante Ala426, Tyr443Cys die intrazelluläre cAMP-Akkumulation und wirkt somit als ein Antagonist. Am PTH-2 Rezeptor kommt es hingegen bereits in 10-fach geringeren Konzentrationen von TIP 39 als von hPTH zu einer cAMP-Bildung (Agonist) (190). Das Einfügen der beiden extrazellulären Cysteine hatte hierauf keinen entscheidenden Einfluss.

5.1.4 PLC-/IP₃-Signalweg

Sehr überraschend waren die Ergebnisse der Assays zur Untersuchung der intrazellulären PLC/IP₃-Signalantwort, zumal bislang die hierfür verantwortlichen

Rezeptorepitope nur im Intrazellulärraum selbst und nicht in den transmembranären Regionen bzw. gar im Extrazellulärraum identifiziert werden konnten.

So zeigte selbst nach Inhibition mit den spezifischen Hemmstoffen von PKA (H-89) und PKC (GF109203X) weder der PTH-2 Rezeptor – wie zu erwarten war – allerdings auch nicht der doppelmutierte Ala426,Tyr443Cys Rezeptor eine Akkumulation von intrazellulärem Inositoltrisphosphat. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des PLC-IP₃-Signalwegs u.a. auch abhängig von der Rezeptordichte ist. (193 - 195). Da in der vorliegenden Arbeit die gemessene Rezeptordichte der transienten Transfektion bei den Wildtyp-Rezeptoren wie auch bei der Doppelmutation allerdings vergleichbar war (Ala426, Tyr443Cys $0,63 * 10^6$, PTH-1 R $0,70 * 10^6$, PTH-2 R $0,89 * 10^6$), sollte dies mit diesem Ergebnis nicht interferieren.

5.2 Wichtige Strukturen in Ligand und Rezeptor, welche die Ankopplung an den PLC-Signalweg bedingen

Schon seit längerem ist bekannt, dass die Determinanten für den cAMP/PKA-Signalweg im Aminoterminus von PTH und PTHrP liegen. Über die Aminosäuren, die verantwortlich für Aktivierung des PLC/PKC-Signalwegs sind, liegen dagegen kontroverse Ergebnisse vor: PTH-Tetrapeptid mit den AS 28-32 war zur Stimulation der PKC-Aktivität in einer Ratten Osteosarkom Zelllinie imstande. (131 - 133)

Zellen, transfiziert mit rekombinantem Ratten/human PTH1-R, zeigten zwar nach PTH(1-30)-Stimulation eine PLC-Aktivierung (196), jedoch blieb dies mit PTH(3-34) aus.(197)

Aber selbst das hPTH (1-28)-Analoge ruft neben einer AC- auch eine PLC- Antwort hervor, der Austausch von Serin an Position 1 gegen Glycin hingegen führt zu einer verminderten PLC-Aktivität bei noch vollständig erhaltenem AC-Signalweg. Somit ist auch der äußerste Aminoterminus des PTH kritisch für die PLC-Aktivierung.(198)

Verantwortliche Epitope auf Rezeptorseite für die Ankopplung an die intrazellulären Signalwege wurden bisher nur im Intrazellulärraum selbst und nicht in den transmembranären Regionen bzw. gar im Extrazellulärraum identifiziert.

Nach Untersuchungen mit PTH1-R-Mutationen zu urteilen scheinen der zweite und dritte intrazelluläre Loop über das G_q-Protein an den PLC-Signalweg zu koppeln (199,200) und die dritte Intrazellulärschleife zusätzlich über G_s an das AC-Signal.(201)

5.3 Die Komplexität des Bindungsverhaltens des PTH1-Rezeptors

Die strukturelle Basis der Bindungsmechanismen der beiden potenten Liganden des PTH1-R, PTH und PTHrP sowie die anschliessend induzierte Rezeptorkonformationsänderung wurde zahlreichen intensiven Studien unterzogen, die notwendige Regionen sowohl in den Liganden als auch im Rezeptor selbst identifiziert haben, welche für die extrazelluläre Bindung und das anschließende intrazelluläre Signal benötigt werden.

Verschiedenste Mutageneseuntersuchungen (chimäre, punktmutierte oder verkürzte Rezeptoren und Liganden) lieferten eine Fülle von indirekten Hinweisen auf die Rezeptor-Hormon-Interaktion, die mit Hilfe von photoreaktiven PTH und PTHrP-Analoga in sogenannten photo-affinity-cross-linking-Studien Unterstützung fanden. (202 - 205)

Demnach scheinen an der komplexen Wechselwirkung vor allem drei Rezeptordomänen teilzuhaben: äußerste und juxtamembranäre aminoterminaler Region, Extrazellulärschleifen und Transmembrandomänen. (110), (184), (202), (206 - 211), (275)

Struktur-Funktions-Studien der Hormone und ihrer Analoga legen ein einfaches Schema für die Liganden-Rezeptor-Interaktion nahe: der C-terminale Abschnitt der Liganden (AS 15-34) scheint die wichtigste Bindungsdomäne des Peptids zu sein, die in Wechselwirkung mit der äußersten aminoterminalen Region des Rezeptors tritt (AS23 des PTHrP mit dem Rezeptorabschnitt [23-40]; AS 19 von PTH und PTHrP mit dem extrazellulären Ende der TM2 des PTH1-R). (212 - 216), (280)

Dieser C-Terminus wird darüber hinaus auch als relevant für die Aktivierung der Proteinkinase C vermutet. (131 - 134)

Die Hauptaktivierungsdomäne liegt im aminoterminalen Abschnitt (AS1-14) des Liganden, der mit dem Rezeptor an den membrandurchspannenden Helices inklusive der Extrazellulärloops interagiert.(217 - 221), (279)

Dieser Abschnitt konnte sogar noch auf eine kürzere Sequenz im Aminoterminus der Liganden eingegrenzt werden, wobei die Region der ersten 5 AS als höchst kritisch für die Aktivierung sowohl des PTH1-R als auch des PTH2-R gilt. Bereits eine Deletion nach der zweiten AS führte zu einem wesentlich schwächeren cAMP-Signal, ohne hingegen die Bindungsaffinität zu beeinträchtigen. Damit übereinstimmend ist PTHrP (5-36) ein potenter Antagonist an beiden PTH-Rezeptoren.(222)

Biochemische Photoaffinity-cross-linking-Studien mit photoreaktiven PTH- und PTHrP-Analoga ergänzen Mutageneseuntersuchungen, indem sie direkte bimolekulare Liganden-Rezeptoren-Interaktionen lokalisieren, die auf einzelne bzw. nur wenige AS eingegrenzt werden können. Diese Methode identifizierte bis jetzt insgesamt vier Kontaktstellen im PTH1-R: AS 1 des Liganden tritt mit Met 425 des Rezeptors in TM 6 am Beginn der 3. Extrazellulärschleife(223), AS 13 mit dem Abschnitt [Glu182-Met189] am juxtamembranären Ende des N-Terminus. Mutationen in diesem Abschnitt weisen daraufhin, dass die Seitenkette des Lys 13 des PTH eine Wechselwirkung mit Arg 186 eingeht.(224,225) Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte eine weitere Arbeitsgruppe, die eine Interaktion der hydrophoben AS Phe 184 und Leu 187 mit AS 14 des PTH vermutet.(226)

AS 23 (Phe in PTHrP) tritt mit einem 18 AS langen Abschnitt (AS 23-40) am Aminoterminus des PTH1-R in Kontakt. Nachfolgende Mutagenesestudien grenzten die Kontaktstellen auf nur noch zwei einzelne AS ein: Thr 33 und Glu 37.(227)

Erst kürzlich gelang der erste Beweis einer vierten Kontaktstelle, nämlich eine Interaktion zwischen der Hauptbindungsdomäne des PTH mit dem ersten Extrazellulärloop. (228) Die Nähe zwischen Lys 27 im PTH und Leu 261 des PTH1-R lieferten zusätzliche neue Einblicke in die Natur der bimolekularen Rezeptor-Liganden-Interaktion und unterstreicht eindeutig die Bedeutung der Extrazellulärschleifen in der PTH-PTH1-R-Wechselwirkung. (229) Die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzen und redefinieren das auf Experimente basierende Modell des PTH-PTH1-R-Komplexes. Die beiden relativ benachbarten Aminosäuren 23 und 27 des Liganden interagieren mit weitestfernten Domänen des Rezeptors: Aminoterminus und erstem Extrazellulärloop.

Auf der Basis der strukturellen Gegebenheiten des PTH(1-34) bzw. PTH(1-21) formt die C-terminale Region des Hormons eine sekundäre α -Helix und positioniert so die AS 23 und 27 in die entsprechenden Richtungen.(228), (280), (282)

Die Hauptaktivierungsdomäne liegt aber im aminoterminalen Abschnitt des Liganden (AS 1-14), der mit der juxtamembranären Region des extrazellulären Aminoterminus (AS 13 des PTH mit 173Phe-189Met des Rezeptors, vermutlich R186), sowie mit der dritten extrazellulären Schleife (AS 1 des PTH mit 425Met des Rezeptors) in Kontakt tritt.

Schlüsselstellen für die Ligandenbindung oder Rezeptorfunktion im PTH1-R bzw. PTH2-R und den Hormonen PTH und PTHrP finden sich in Tabelle 5.1. aufgelistet.

PTH-1 Rezeptor	Ligand	Funktion
Thr ³³ ; Gln ³⁷	(7-34) Region	
Trp ⁴³⁷ , Gln ⁴⁴⁰	Ser ¹ und Val ²	
Ser ³⁷⁰ , Ile ³⁷¹ , Thr ⁴²⁷	Arg ² in PTH	Spezifität
Leu ²⁸⁹ , Ile ³⁶³	Ile ⁵ in PTH	Ligandenselektivität
	AS 1, 2 in PTH	cAMP/PKA-Signal
	N-Terminus des PTH	Phospholipase C/PKC
Lys ²⁴⁰ (in TM2)	AS 19 in PTH und PTHrP	
Crosslinking-Studien		
Aminosäuren(23-40)-Region	Bpa ²³ (Trp in hPTH, Phe in hPTHrP)	
Arg ¹⁸⁶	Bpa ¹³ (Lys in hPTH und PTHrP)	
Met ⁴²⁵	Bpa ¹ (Ser in hPTH, Ala in hPTHrP)	
PTH-2 Rezeptor	Ligand	Funktion
Ile ²⁴⁴ , Tyr ³¹⁸	His ⁵ in PTHrP	Ligandenselektivität
Ile ²⁴⁴ , Tyr ³¹⁸ , Cys ³⁹⁷		cAMP-Akkumulation nach PTHrP = Ligandenspezifität
	Phe ²³ in PTHrP (Trp in PTH)	Bindung an PTH-2 R mit hoher Affinität

Tabelle 5.1 Auswahl einiger wichtiger Aminosäuren und Epitope für die Interaktion im PTH-1 Rezeptor bzw. PTH-2 Rezeptor und den Liganden PTH, PTHrP

Soweit korrelieren die Ergebnisse der Mutageneseuntersuchungen mit denen der Photoaffinity –Studien des PTH1-R und auch Daten anderer GPCR-II-Rezeptoren zeigen eine gewisse Ähnlichkeit in ihren Liganden-Rezeptor-Interaktionen.(230)

Weitaus schlechter aufgeklärt ist die sich der Aktivierung anschließende Konformationsänderung der transmembranären Region einschliesslich der extra- und intrazellulären Schleifen, welche als Schlüsselement im Signaltransduktionsmechanismus der GPCR vermutet wird. (231) Es gibt Hinweise, dass polare AS in der 2. TM das Bindungsverhalten, aber auch das Signalverhalten entscheidend mitbeeinflussen. (232), (202) Sicher ist hierbei die Interaktion des polaren Arg233 in TM2 mit Gln451 in TM7, die die Konformation des Rezeptors sowohl im aktiven als auch im inaktiven Zustand stabilisieren dürften. (233) Das Ergebnis der Interaktion von TM 2 und 7 stimmt überein mit anderen topologischen Modellen. (234-237), (238) Aber auch Trp 437 und Gln 440 in der 3. Extrazellulärschleife beeinflussen die Ligandenbindung. (207)

Sowohl die transmembranären Regionen als auch die Extrazellulärschleifen scheinen demnach an der Formation einer Ligandenbindungstasche beteiligt zu sein.

Ergebnisse der Liganden-Rezeptor-Interaktion in Studien des PTH1-Rezeptors können womöglich in gewissem Maß auf andere Rezeptoren der Klasse II der G-Proteingekoppelten-Rezeptoren übertragen werden, was Untersuchungen mit Chimärenrezeptoren und – Liganden unterstreichen.

Daneben werden Antagonisten des PTH-1 Rezeptors als potentieller therapeutischer Nutzen im Hinblick auf maligne Hypercalcaemie (HHM) oder Hyperparathyreoidismus diskutiert, wie z.B. bTIP (7-39) oder mTIP (7-39). (239)

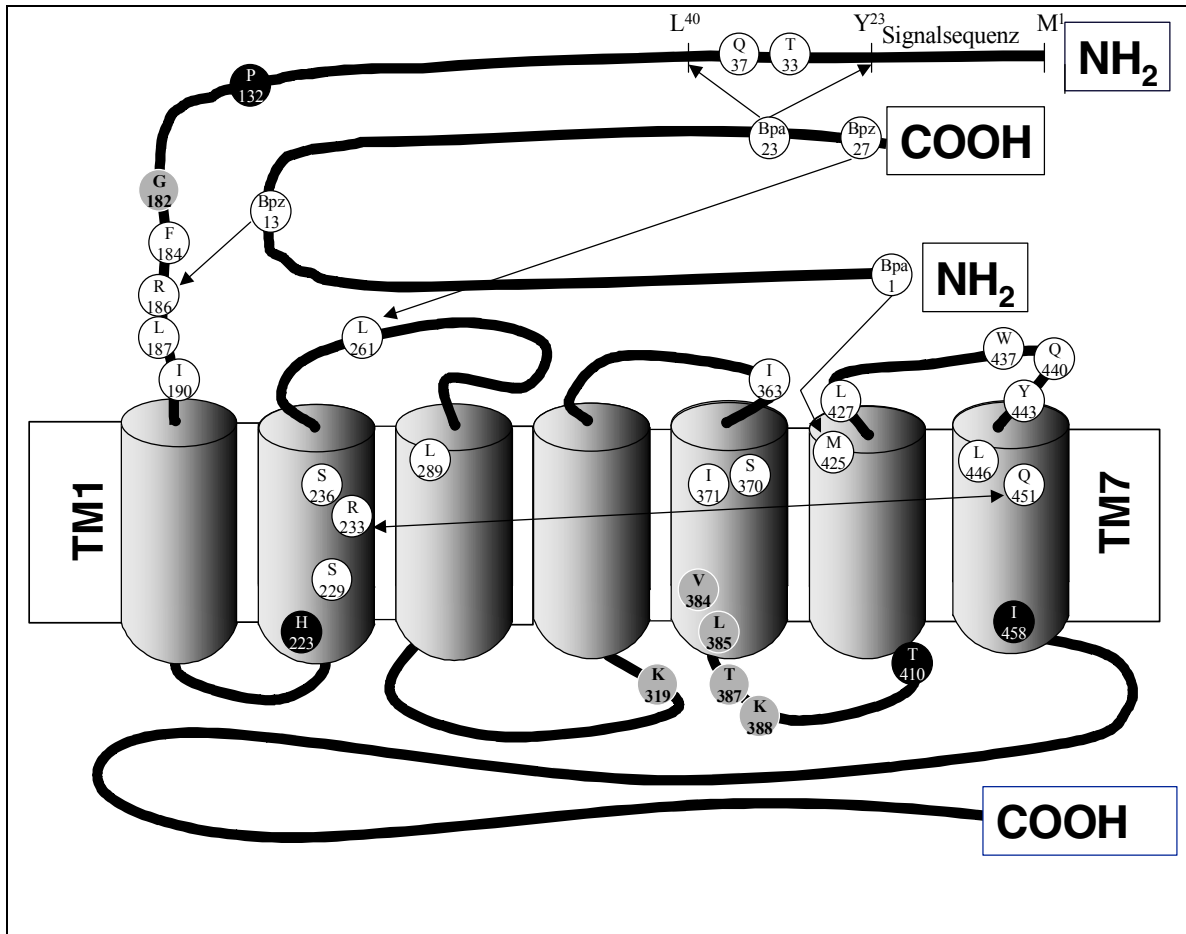


Abbildung 5.2

Schematische Darstellung wichtiger AS für die Interaktion von PTH1-Rezeptor und PTH oder PTHrP als Ligand, welche mit Hilfe von Mutagenese oder photochemischen Cross-linking-Studien detektiert wurden und eine wichtige Rolle in der Ligandenbindung bzw. Rezeptorfunktion spielen.

Rezeptoraminosäuren und -position entsprechen der Sequenz des hPTH1-Rezeptors.

Schwarz unterlegte Aminosäuren des Rezeptors markieren die Aminosäuren, welche bei PTH1-R- Mutationen die Chondroplasia Typ Blomstrand (P132, loss-of-function) bzw. Typ Jansen (H223, T410, I458, gain-of-function) zur Folge haben.

Grau unterlegte Rezeptoraminosäuren markieren wichtige Epitope des PTH1-R, welche für die Kopplung an den AC-(G182) bzw. PLC-Signalweg benötigt werden.

Die vier Positionen im Liganden, welche durch photoreaktive Benzophenon-Gruppen ersetzt wurden für photochemical-crosslinking-Studien, sind markiert. Die Pfeile zu den korrespondierenden AS im Rezeptor oder Regionen geben die möglichen Verbindungsstellen an.

5.4 Wie gelingt dem PTH2-Rezeptor seine Ligandenspezifität?

Über die biologische Bedeutung des PTH2-Rezeptors ist zwar bis jetzt nur wenig bekannt, doch dank seiner einzigartigen Ligandenspezifität gibt es Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand.

Mit Hilfe von PTH/PTHrP-Hybridliganden konnten die für die Bindungsselektivität des PTH2-R verantwortlichen Epitope weitgehend identifiziert werden. So ermöglichte die Substitution von Phe 23 gegen Trp (im PTH) eine Bindung von PTHrP an den PTH2R. (240) Kombiniert mit dem Austausch von His 5 gegen Ile führte dies sogar zu einer Ankopplung an den nachgeschalteten cAMP/AC-Signalweg. (240,241)

Durch gezielte Punktmutationen des PTH2-R gegen die entsprechenden AS des PTH1-R fanden sich auf Rezeptorseite Epitope für die Ligandenspezifität im Bereich der drei Extrazellulärschleifen und der transmembranären Regionen. Der Austausch von Ile 244 gegen Leu 289 (extrazelluläres Ende von TM 3) und Tyr 318 gegen Ile 363 (C-Terminus der 2. Extrazellulärschleife) führte im PTH2-Rezeptor nach Stimulation mit PTHrP zu einem signifikant erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel. (184), (242)

Die Daten beider Mutationen weisen auf eine Interaktion mit AS 5 des Liganden hin. (242)

Weitere Determinanten lassen die Ergebnisse einer anderen Arbeit vermuten. Eine cAMP-Antwort nach PTHrP-Bindung erzeugte auch vor allem der Austausch von Cys 397 gegen Tyr 443 (TM 7) und F400L, wobei beide Mutationen kombiniert am stärksten an die Adenylatcyclase koppelten. (184)

Die Tatsache, dass durch den Austausch des Cysteins an Position 397 im PTH2-Rezeptor gegen das entsprechende Tyrosin des PTH1-Rezeptors der so mutierte PTH2-R zu einer Bindung von PTHrP mit anschließender Aktivierung des cAMP/AC-Signalwegs fähig war, stützt die Hypothese der vorliegenden Arbeit.

Daneben scheinen auch Bereiche im aminoterminalen extrazellulären Rezeptorabschnitt die Ligandenselektivität des PTH2-R entscheidend mitzuprägen. (184), (208,209), (242)

Mit Hilfe dieser Ergebnisse der PTH-Rezeptoren ebenso wie auch die verwandter Rezeptoren (Rhodopsin) und derer Liganden lassen sich molekulare Modelle der Rezeptor-Liganden-Interaktion erstellen: die Ligandenselektivität des PTH2-R, vor allem die mangelnde Bindung von His5-Analoga, scheint unter anderem auf

ungünstigen sterischen Verhältnissen der dritten extrazellulären Schleife zu basieren, die durch sperrige aromatische Seitenketten (z.B. F386 und F 401) am extrazellulären Ende von TM 6 und TM 7 hervorgerufen zu werden. Der Ersatz dieser Aminosäuren durch kleinere, hydrophobe Aminosäuren (Leu, Val, Ala) könnte die Bindungstasche vergrößern und somit dem PTH2-R eine Bindung von His 5 ohne sterische Hindernisse ermöglichen.(243)

Trotz großer extrazellulärer Strukturunterschiede zwischen beiden Rezeptoren für das Parathormon zeigt der PTH2-R bei der Bindung von PTH eine dem PTH1-R vergleichbare Liganden-Rezeptor-Interaktion. Durch Photoaffinity-cross-linking-Studien konnte gezeigt werden, dass auch hier die erste Aminosäure des Liganden in Wechselwirkung mit dem Rezeptor am Übergang von TM 6 zum 3. Extrazellulärloop (innerhalb Ser 364 bis Met 395, vermutlich V 380) tritt und AS 13 das C-terminale Ende des Aminoterminus [Glu 138 – Met 147] kontaktiert.(244)

Um die physiologische Rolle des PTH-2 Rezeptors besser untersuchen und verstehen zu können sind Untersuchungen u.a. mit Antagonisten, welche mit hoher Affinität an den Rezeptor binden, von grossem Vorteil. (245)

5.5 Disulfidbrückenbildungen im Extrazellulärraum der Rezeptoren

Eine hochkonservierte Eigenschaft aller Rezeptoren der Klasse II der GPCR ist die Lokalisation von acht Cysteinen im extrazellulären Abschnitt: die ersten sechs befinden sich in der aminoterminalen Domäne und jeweils eines in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife. Diese Cysteine üben einen entscheidenden Einfluss auf die Expressionsfähigkeit intakter Rezeptoren und somit auch auf deren Bindungsverhalten aus.(246 - 254, 278)

Schon seit längerem ist die Existenz einer Disulfidbrücke zwischen dem Cystein an Position 281 (1. Extrazellulärschleife) und dem Cystein an Position 331 (Aminoterminus der 2. Extrazellulärschleife) bekannt. (206) Interessanterweise ist diese Eigenschaft nicht nur dem PTH1-Rezeptor oder gar der Secretin/PTH/Calcitonin-Familie vorbehalten, sondern in nahezu allen GPCR (schätzungsweise 92%) anzutreffen.(255 - 260, 271, 273)

Im Jahr 2000 gelang der Nachweis, dass auch die sechs aminoterminalen Cysteine des PTH1-R ein bestimmte Disulfidbrückenbildung aufweisen: Cys 131 und Cys 170, Cys 106 und Cys 146, Cys 48 und Cys 117 gehen jeweils eine kovalente Bindung untereinander ein (261).

Das selbe Disulfidbrückenmuster konnte 2002 ebenfalls für den GLP1-Rezeptor nachgewiesen werden: ausgehend vom C-terminalen Ende des Aminoterminus in Richtung der ersten Aminosäure interagieren auch hier das erste Cystein mit dem dritten, das zweite mit dem fünften und das vierte mit dem sechsten. (262) Auch die Corticotropin-releasing Faktor Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 β folgen diesem Muster. (276, 284-286). Die letztgenannten Studien, u.a. auch die NMR-Studien legen nahe, dass nicht-glykosylierte amino-terminale Fragmente weder mit der Plasmamembran noch mit einer intakten transmembranären Rezeptordomäne verbunden sind.

Insgesamt lassen diese Studien auf eine ausgeprägte Homologie unter den Rezeptoren der Klasse II der GPCR bezüglich ihrer extrazellulären dreidimensionalen Struktur schließen.

Die einzigen Studien, welche andere Muster der Disulfidbrückenbildung nahe legen sind Studien mittels funktioneller Einzel- und Doppelmutationen (Corticotropin-releasing Faktor 1 Rezeptor *Qi et al.* (286), Sekretin Rezeptor *Lisenbee et al.* (274)).

Studienart	Rezeptor	Disulfidbrücken	Referenz
Einzel-/Doppelmutationen	CRFR1	1-3, 2-6, 4-5	286
Einzel-/Doppelmutationen	SecR	1-3, 2-6, 4-5	274
Biochemisch Cross-Linking	CRFR1	1-3, 2-5, 4-6	284
Biochemisch Cross-Linking	CRFR2 β	1-3, 2-5, 4-6	285
NMR	CRFR2 β	1-3, 2-5, 4-6	287
Biochemisch Cross-Linking	PTHR1	1-3, 2-5, 4-6	261
Biochemisch Cross-Linking	GLP-1R	1-3, 2-5, 4-6	262

Tabelle 5.2 Disulfidbrückenbildung der Klasse II der G-protein-gekoppelten Rezeptoren

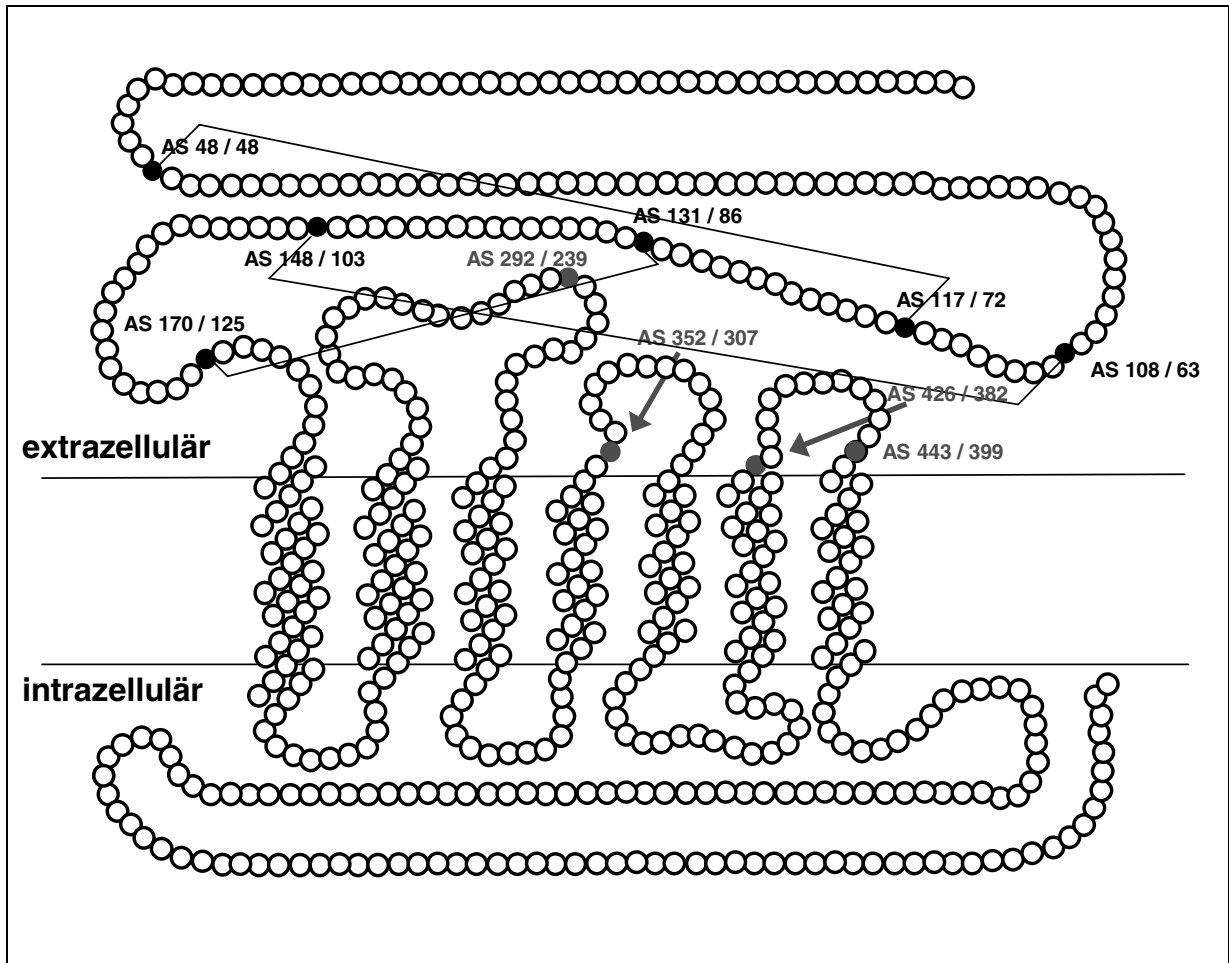


Abbildung 5.3 Schematische Darstellung der konservierten Cysteine im extrazellulären Teil des hPTH1(PTHrP)- und des hPTH2-Rezeptors.

Die ersten Zahlen geben die Position im hPTH1-R, die zweiten Zahlen die korrespondierende Position im hPTH2-R an. Die ersten sechs Cysteine bilden untereinander Disulfidbrücken, welche die Linien untereinander markieren.

Wie bei bislang allen GPCR führte auch die Mutation von Cys 118 (1. Extrazellulärschleife) und Cys197 (2. Extrazellulärschleife) im Chemokine-Rezeptor CCR6 zu einer Abnahme der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche, Aufhebung der intrazellulären Signalantwort und zu einer Abnahme der internalisierten Rezeptoren. Das Ausschalten der beiden weiteren Cysteine (Cys36 am N-terminalen Abschnitt und Cys 288 in der 3. Extrazellulärschleife) hatte hingegen keinen signifikanten Effekt auf Rezeptorexpression oder -funktion. Anstelle der Ausbildung einer Disulfidbrücke dieser beiden Cysteine gelang der direkte Nachweis freier SH-Gruppen. Demzufolge scheint

der Chemokin-Rezeptor CCR6 nur eine Disulfidbrücke zwischen erstem und zweiten Extrazellulärloop zu bilden, welche für eine adäquate Konformation funktionsfähiger Rezeptoren benötigt wird. (263, 277) Auch beim humanen neuronalen Cannabinoid Rezeptor scheinen lediglich zwei Cysteine (Cys 257 und 264) für eine ausreichende Rezeptorexpression und – funktion benötigt zu werden. (270)

Spezifisch für den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor scheinen eine Disulfidbrücke zwischen Cys18 und Cys274 sowie die dritte Extracellulärschleife für die Rezeptoraktivierung und –internalisierung eine Rolle zu spielen, ähnlich wie auch bei den Rezeptoren für Bradykinin, Endothelin und Purin. (272)

5.6 PTH – PTHrP – TIP 39: ein Strukturvergleich

Sowohl intaktes PTHrP (1-86) als auch das aminoternale Fragment PTHrP (1-34) binden mit annähernd gleicher Affinität wie PTH an die PTH1-Rezeptoren, exprimiert von Nieren- und Knochenzellen, und lösen dieselben Signalwege aus. (264,265)

Die Sequenzhomologie zwischen PTH und PTHrP beschränkt sich auf die 13 aminoternalen Aminosäuren, von denen 8 identisch sind. Die Domäne, die für die Bindung beider Peptide an den PTH1-R verantwortlich ist, scheint hingegen im C-terminalen Abschnitt 14-34 zu liegen, in dem jedoch lediglich drei AS homolog sind. (213)

Bei einem Sequenzvergleich der drei Peptide PTH, PTHrP und TIP39 finden sich nur noch 5 AS, welche identisch sind. TIP39 ähnelt eher dem PTH, da 7 der 19 C-terminalen AS des bovinen TIP39 mit nahezu allen klonierten PTH-Sequenzen gleich sind. Die Wichtigkeit der N-terminalen AS des PTH und PTHrP für die Aktivierung der rezeptornachgeschalteten Signalwege ist schon seit langem bekannt. (266,267) Die hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen TIP(3-8) und PTH(1-6) legt daher die Vermutung nahe, dass diese Hormonabschnitte eine ähnliche Aufgabe besitzen. Bisherigen Studien zufolge ist das verkürzte TIP39 (7-39)- Analog ein hochpotenter selektiver PTH-1-R-Antagonist, wohingegen die Affinität an den PTH-2 R verloren geht. Die N-terminalen AS des TIP39 kontrollieren dessen Spezifität an beiden PTH-Rezeptoren. (105), (239), (268), (281)

Neben Photoaffinity-cross-linking-Studien und Mutageneseprojekten mit Liganden und Rezeptoren spielt die Aufklärung der Tertiärstruktur mittels Hochauflösungs-NMR, CD und Computersimulation eine bedeutende Rolle im Verständnis der Liganden-Rezeptor-Interaktion.

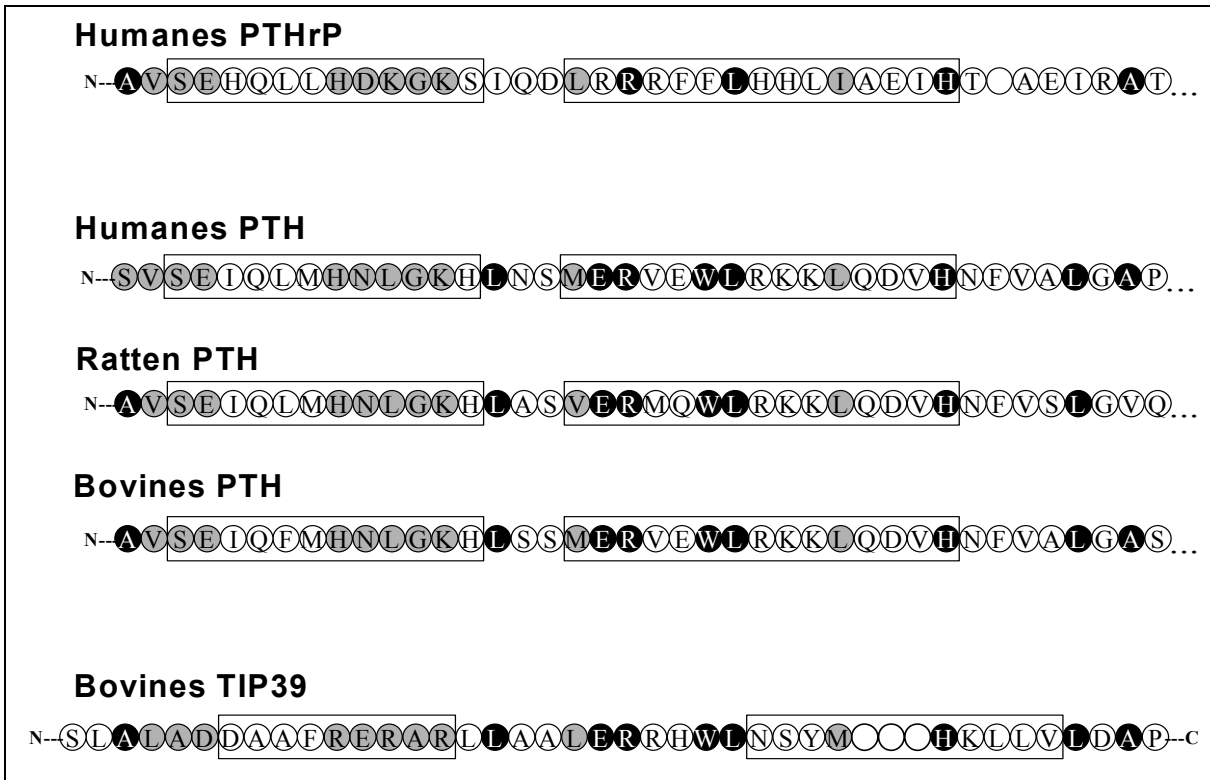


Abbildung 5.4
Sequenzvergleich der aminoterminalen Enden des hPTHrP, hPTH, rPTH und bPTH sowie komplette Sequenz des bovinen TIP39.

Homologe AS sind in schwarz, konservierte AS in grau unterlegt. Die rechteckigen Umrandungen stellen α -helikale Peptiddomänen dar.

Ähnlich wie bei PTH (1-34) besteht auch TIP 39 aus zwei stabilen α -Helices an den N- und C-Termini, die durch eine Region ohne Sekundärstruktur getrennt werden. Die N-terminale Helix zeigt eine hohe strukturelle und sequentielle Ähnlichkeit mit PTH, was auf eine ähnliche Funktion in der Rezeptoraktivierung deuten lässt. Die C-terminale Helix hingegen unterscheidet sich in Grösse und Amphipathie, was einen unterschiedlichen Bindungsmodus der beiden Peptide untermauert. (269)

Insgesamt stellt sich die Frage, inwieweit Inositol selbst eine Rückkopplung auf intrazellulärer Ebene auf die Signalkaskade hat.

Daneben sollte in einem nächsten Schritt die Disulfidbrückenbildung der in dieser Arbeit mutierten PTH-Rezeptoren untersucht werden. Dies kann zum Beispiel zum einen durch NMR-Spektroskopie oder molekulare dynamische Simulation erfolgen, zum anderen können Versuche mit einer reduzierenden Substanz (z.B. Thiosulfonat oder 2-Nitro-5-Thiosulobenzolsäure) durchgeführt werden mit anschliessend chromatographischer Analyse (bei 220 und 423nm) (261). Insbesondere wird die Frage aufgeworfen, ob und inwiefern die Disulfidbrückenbildung von extrazellulären Cysteinen beeinflusst wird.

6 Zusammenfassung

Die Mechanismen der Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung von GPCR in der Unterfamilie der Sekretin-/Parathormon Rezeptoren sind bislang nicht vollständig verstanden. Am PTH-1 Rezeptor wird sowohl nach Bindung des Liganden PTH als auch von PTHrP, nicht aber nach Stimulation mit TIP 39, die intrazelluläre Kaskade mit Aktivierung von cAMP- und IP₃-Signal ausgelöst. Der PTH-2 Rezeptor antwortet jedoch nur nach Bindung von PTH bzw. TIP 39 – was den potenteren Agonisten von beiden darstellt – mit einer intrazellulären Akkumulation von cAMP. Keines der beiden Peptide stimuliert die intrazelluläre IP₃- Antwort des PTH-2 Rezeptors. PTHrP aktiviert dagegen am PTH-2 Rezeptor keinen der Signalwege.

In einer Arbeit von P.R. Turner konnte 1998 gezeigt werden, dass das Ausschalten eines Cysteins in der dritten extrazellulären Schleife des Opossum-PTH2-R zu einem erfolgreich exprimierten Rezeptor führte, der PTHrP zu einem gewissen Grad binden und daraufhin auch den AC/cAMP-Signalweg aktivieren konnte. (184)

Als Basis dieser Arbeit wurde die Tatsache herangezogen, dass zwei Cysteine (eines davon äquivalent mit dem u.a. ausgeschalteten Cystein an Position 397 des Opossum-PTH-2 Rezeptors in der Arbeit von P.R. Turner) in der 3. Extrazellulärschleife des PTH2-R präsent sind, nicht jedoch in der des PTH1-R, dessen Ligandenspezifität bedingen. Daher wurden in diesem Projekt zuerst die Mutationen in die cDNA des humanen PTH1-R eingefügt: entweder beide Cysteine einzeln (Ala426Cys und Tyr443Cys) oder kombiniert (Ala426Cys/ Tyr443Cys).

Die Transfektion dieser wie auch der Wildtyp-Rezeptoren in HEK 293-Zellen führte zu einer stabilen Expression funktionsfähiger Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Eine Änderung des Bindungsverhaltens der Liganden konnte dabei jedoch ausgeschlossen werden. Alle mutierten Rezeptoren zeigten eine vergleichbare Bindung, insbesondere auch von PTHrP. Das Bindungsverhalten von TIP39, was v.a. Gegenstand einer anderen Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe war, wurde durch Einfügen der beiden Cysteine in den PTH-1 R ebenfalls nicht verändert.

Stimulation mit hPTH(1-34) erzeugte in allen receptortransfuzierten Zelllinien eine vergleichbare intrazelluläre Akkumulation von cAMP.

PTHrP(1-34) rief in den Zelllinien, transfuziert entweder mit dem PTH-1- oder den mutierten Rezeptoren, eine ähnliche Dosis-Wirkungs-Kurve hervor, ohne signifikante Änderung der maximalen intrazellulären cAMP-Antwort oder des halbmaximalen Effekts (EC_{50}), insbesondere war keine Verschiebung der Ligandenspezifität erkennbar. TIP 39 aktiviert weder am humanen PTH-1 Rezeptor noch an der Doppelmutante Ala426, Tyr443Cys die intrazelluläre cAMP-Akkumulation und wirkt somit als ein Antagonist. Die Hypothese der Funktion dieser beiden Cysteine konnte somit falsifiziert werden unter der Annahme, dass sich die beiden Aminosäuren im Kontext der jeweiligen Rezeptoren ähnlich verhalten.

Überraschend waren hingegen die Ergebnisse der Untersuchung der intrazellulären PLC/IP₃-Signalantwort, zumal bislang hierfür verantwortliche Rezeptorepitope nur im Intrazellulärraum selbst und nicht in den transmembranären Regionen oder im Extrazellulärraum identifiziert werden konnten. Hier zeigte die Doppelmutation Ala426, Tyr443Cys selbst nach Hemmung der spezifischen Hemmstoffe von PKA (H-89) und PKC (GF109203X) keine Akkumulation von intrazellulärem Inositoltrisphosphat – wie auch die Zellen transfuziert mit dem PTH-2 Rezeptor bekanntermaßen zu keiner intrazellulären IP₃-Antwort befähigt sind. Ein denkbarer Mechanismus könnte zum Beispiel eine leichte Verschiebung der an den beiden Cysteinresten anliegenden transmembranären Regionen TM 1-3 sowie 4-5 sein, die eine veränderte Rezeptorankopplung von Signalmolekülen an der Zellinnenseite bewirken könnten.

Inwieweit es sich hierbei um eine möglicherweise durch Disulfidbrückenbildung untereinander oder zu anderen Epitopen in der extrazellulären Region geänderte sterische Konfiguration des Rezeptors an sich handelt oder eine extrazellulär gelegene Schlüsselstelle für die Aktivierung des intrazellulären PLC-/IP₃-Signalwegs vorliegt müssen weitere Untersuchungen klären, evtl. auch photo chemical crosslinking. Insbesondere stellt sich auch die Frage, welchen therapeutischen Nutzen dies in der Therapie der Osteoporose haben könnte.

7 Literaturverzeichnis

1. **Nutley MT, Parimi SA, Harvey S 1995** Sequence analysis of hypothalamic parathyroid hormone messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 136(1):5600-5607.
2. **Mayer H, Breyel E, Bostock C, Schmidtke J 1983** Assignment of the human parathyroid hormone gene to chromosome 11. *Hum. Genet.* 64:283-285.
3. **Zabel BU, Kronenberg, HM, Bell GI, Shows TB 1985** Chromosome mapping of genes on the short arm of human chromosome 11: Parathyroid hormone is at 11p15 together with the genes for insulin, c-Harvey-ras 1, and beta-hemoglobin. *Cytogenet. Cell Genet.* 39:200-205.
4. **Habener JF, Rosenblatt M, Kemper B, Kronenberg HM, Rich A, Potts JT Jr 1978** Pre-parathyroid hormone; amino acid sequence, chemical synthesis, and some biological studies of the precursor region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(6):2616-2620.
5. **Lorraine AF, Bilezikian JP 1999** Parathyroid Hormone: Structure, Function and Dynamic Actions. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP (ed.) *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism.*, 1. Auflage ed. Academic Press, pp 187-202.
6. **Habener JF, Rosenblatt M, Potts JT Jr. 1984** Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol Rev* 64(3):985-1053.
7. **Kronenberg HM, Bringham FR, Segre GV, Potts JT Jr. 1994** Parathyroid hormone biosynthesis and metabolism. *The Parathyroids: Basics and Clinical Concepts* :125-137.
8. **Habener JF, Kemper B, Potts JT Jr. 1975** Calcium-dependent intracellular degradation of parathyroid hormone: a possible mechanism for the regulation of hormone stores. *Endocrinology* 97(2):431-441.
9. **Bringham FR, Stern AM, Yotts M, Mizrahi N, Segre GV, Potts JT Jr. 1988** Peripheral metabolism of PTH: fate of biologically active amino terminus in vivo. *Am J Physiol* 255(6 Pt 1):E886-893.
10. **MacGregor RR, Jilka RL, Hamilton JW 1986** Formation and secretion of fragments of parathormone. Identification of cleavage sites. *J Biol Chem* 261(4):1929-1934.

11. **Inomata N, Akiyama M, Kubota N, Jüppner H 1995** Characterization of a novel parathyroid hormone (PTH) receptor with specificity for the carboxyl-terminal region of PTH-(1-84). *Endocrinology* 136:4732-4740.
12. **Kaji H, Sugimoto T, Kanatani M, et al. 1994** Carboxyl-terminal PTH fragments stimulate osteoclast-like cell formation and osteoclastic activity. *Endocrinology* 134:1897-1904.
13. **Erdmann S, Müller W, Bahrami S, et al. 1996** Differential effects of parathyroid hormone fragments on collagen gene expression in chondrocytes. *J Cell Biol* 135:1179-1191.
14. **Nasu M, Sugimoto T, Kaji H, et al. 1998** Carboxyl-terminal parathyroid hormone fragments stimulate type-1 procollagen and insulin-like growth factor-binding protein-5 mRNA expression in osteoblastic UMR-105 cells. *Endocrinology* 45:229-234.
15. **Jüppner H, Brown EM, Kronenberg HM 1999** Parathyroid Hormone. In: Favus MJ (ed.) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphie, pp 80-87.
16. **Hendy GN, Kronenberg HM, Potts JT Jr., Rich A 1981** Nucleotide sequence of cloned cDNAs encoding human preproparathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12):7365-7369.
17. **Mrkic B, Forgo J, Murer H, Helmle-Kolb C 1992** Apical and basolateral Na/H exchange in cultured murine proximal tubule cells (MCT): effect of parathyroid hormone (PTH). *J Membr Biol* 130(3):205-217.
18. **Silver J, Russel J, Sherwood LM 1985** Regulation by vitamin D metabolites of messenger ribonucleic acid for preproparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (82):4270-4273.
19. **Nagata N 1995** Factors regulating parathyroid hormone and the mechanism of signal transduction. *Nippon Rinsho* 53(4):817-821.
20. **Russel J, Lettieri D, Sherwood LM 1986** Suppression by 1,25(OH)2D3 of transcription of the pre-proparathyroid hormone gene. *Endocrinology* 119:2864-2866.
21. **Abou-Samra AB, Goldsmith PK, Xie LY, Jüppner H, Spiegel AM, Segre GV 1994** Down-regulation of parathyroid (PTH)/PTH-related peptide receptor immunoreactivity and PTH binding in opossum kidney cells by PTH and dexamethasone. *Endocrinology* 135(6):2588-2594.

22. **Martin KJ, Akhtar I, Gonzalez EA 2004** Parathyroid hormone: new assays, new receptors. *Seminars in Nephrology* 24(1).
23. **Stein G, Ritz E 1998** Störungen des Kalziumhaushalts. In: Classen/Diehl/Kochsiek (ed.) *Innere Medizin*, 4. Auflage ed. Urban und Schwarzenberg, pp 1350-1356.
24. **Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki SI et al. 1998** Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(7):3597-3602.
25. **Morley P, Whitfield JF, Willick GE 1997** Anabolic effects of parathyroid hormone on bone. *Trends Endocrinol Metabol* 8:225-231.
26. **Duan Y, De Luca V, Seeman, E. 1999** Parathyroid hormone deficiency and excess: similar effects on trabecular bone but differing effects on cortical bone. *J Clin Endocrinol Metab* 84(2):718-722.
27. **Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R 1993** Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev* 14:690-709.
28. **Fukushima T, Nitta T, Furuichi H, Izumo N, Fukuyama T, Nakamuta H, Koida M 2000** Bone anabolic effects of PTH(1-34) and salmon calcitonin in ovariectomy- and ovariectomy-steroid-induced osteopenic rats: a histomorphometric and biomechanical study. *Jpn J Pharmacol* 82(3):240-246.
29. **Bro S, Olgaard K 1997** Effects of excess PTH on nonclassical target organs. *Am J Kidney Dis* 30(5):606-620.
30. **Allolio B, Minne HW 1998** Nebenschilddrüsenerkrankungen (Überfunktionszustände, Unterfunktionszustände). In: Classen/Diehl/Kochsiek (ed.) *Innere Medizin*, 4. Auflage ed. Urban und Schwarzenberg, pp 830-838.
31. **Broadus AE, Mangin M, Ikeda K, Insogna KL, Weir EC, Burtis WJ, Stewart AF 1988** Humoral hypercalcemia of cancer. Identification of a novel parathyroid hormone-like peptide. *N Engl J Med* 319(9):556-563.
32. **Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger H, Wettenhall RE, Kemp BE, Suva LJ, Rodda CP, Ebeling PR, Hudson PJ, Zajac JD, Martin TJ 1987** Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(14):5048-5052.
33. **Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall RE, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jagger H, Rodda CP, Kemp BE, Rodriguez H, Chen EY,**

- Hudson PJ, Martin TJ, Wood WI. 1987** A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 237(4817):893-896.
34. **Mangin M, Webb AC, Dreyer BE, Posillico JT, Ikeda K, Weir EC, Stewart AF, Bander NH, Milstone L, Barton DE, Francke U, Broadus AE 1988** Identification of a cDNA encoding a parathyroid hormone-like peptide from a human tumor associated with hypercalcemia of malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85:597.
35. **Karaplis AC, Golzmann D 1999** PTHrP: Of Molecules, Mice, and Men. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism* :203-213.
36. **Strewler GJ, Nissenson RA 1999** Parathyroid Hormone-Related Protein. In: Favus MJ (ed.) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Lippicott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 88-91.
37. **Wysolmerski JJ, Stewart, A. F. 1998** The physiology of parathyroid hormone-related protein: an emerging role as a developmental factor. *Annu. Rev. Physiol.*: 431-460.
38. **Thiede MA, Rodan GA 1988** Expression of a calcium-mobilizing parathyroid hormone-like peptide in lactating mammary tissue. *Science* 242(4876):278-280.
39. **Kanatani M, Sugimoto T, Takahashi Y, Kaji H, Kitazawa R, Chihara K 1998** Estrogen via the estrogen receptor blocks cAMP-mediated parathyroid hormone (PTH)-stimulated osteoclast formation. *J Bone Miner Res* 13(5):854-862.
40. **Broadus AE, Stewart AF 1994** Parathyroid hormone-related protein: structure, processing, and physiologic actions. In: Bilezikian JP (ed.) *The parathyroids: basic and clinical concepts*. Raven Press, New York, pp 259-294.
41. **Raue F, Blind E 1993** Parathormone-related-protein: Ein neues calciumregulierendes Hormon und seine Bedeutung für die Tumorhypercalzämie. *Dtsch Med Wochenschr* 118:916-920.
42. **Blind E 1994** Humoral hypercalcemia of malignancy: Role of parathyroid hormone-related protein. In: Raue F (ed.) *Hypercalcemia of malignancy*. Springer-Verlag, Berlin.
43. **Raue F, Blind E 1993** Ein neuer Tumormarker bei der Tumorhyperkalzämie. *Deutsches Aerzteblatt* 51/52:3439-3441.

44. **Etsuro O 2000** Parathyroid hormone-related protein as a potential target of therapy for cancer-associated morbidity. *Cancer, Supplement* :2909-2911.
45. **Bundred NJ, Ratcliffe WA, Walker RA, Coley S, Morrison JM, Ratcliffe JG 1991** Parathyroid hormone related protein and hypercalcaemia in breast cancer. *Br Med J* 303:1506-1509.
46. **Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, Boyce BF, Yoneda T, Mundy GR 1996** Evidence for a causal role of parathyroid hormone related protein in breast cancer mediated osteolysis. *J Clin Invest* 98:1544-1548.
47. **Care AD, Abbas SK, Harnmeyer J, Boivin R 1999** The relaxant effects of parathyroid hormone-related protein (1-34) on ovine reticulo-ruminal smooth muscle in vivo. *Exp Physiol* 84(4):665-675.
48. **Guise TA, Mundy, G.R. 1996** Physiological and pathological roles of parathyroid hormone-related peptide. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5(4):307-315.
49. **Jüppner H 2000** Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development. *Pediatr Nephrol* 14(7):606-611.
50. **Karp SJ, Schipani E, St-Jaques B, Hunzelman J, Kronenberg H 2000** Indian hedgehog coordinates enchondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development* 127:543-548.
51. **Schipani E, Lanske B, Hunzelman J, Luz A, Kovacs CS, Lee K, Pirro A, Kronenberg HM 1997** Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochronal bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proc. Natl. Acad.* 94:13689-13694.
52. **Lanske B, Amling M, Neff L, Guiducci J, Baron R, Kronenberg HM 1999** Ablation of the PTHrP gene or the PTH/PTHrP receptor gene leads to distinct abnormalities in bone development. *J Clin Invest* 104(4):399-407.
53. **Lanske B, Kronenberg HM 1998** Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and parathyroid hormone (PTH)/PTHrP receptor. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8(3-4):297-320.
54. **Schipani E, Karga H, Karaplis AC, Potts JT Jr., Kronenberg HM, Segre GV, Abou-Samra AB, Jüppner H 1993** Identical complementary

- desoxyribonucleic acids encode a human renal and bone parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *Endocrinology* 132(5):2157-2165.
55. **Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF 1996** Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 76(1):1270-1273.
 56. **Strewler GJ 2000** The physiology of parathyroid hormone-related protein. *N. Engl. J. Med.* 342(3):177-185.
 57. **Karaplis AC 2001** PTHrP: novel roles in skeletal biology. *Curr Pharm Des* 7(8):655-670.
 58. **Karaplis AC, Goltzman D 2000** PTH and PTHrP effects on the skeleton. *Rev Endocr Metab Disord* 1(4):331-431.
 59. **Kovacs CS, Lanske B, Hunzelman JL, Guo J, Karaplis AC, Kronenberg HM 1996** Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26):15233-15238.
 60. **Lam MHC, Thomas RJ, Martin TJ, Gillespie MT, Jans DA 2000** Nuclear and nucleolar localization of parathyroid hormone-related protein. *Immunology and Cell Biology* 78:395-402.
 61. **Usdin TB 1997** Evidence for a parathyroid hormone-2 receptor selective ligand in the hypothalamus. *Endocrinology* 138(2):831-834.
 62. **Usdin TB, Hoare SR, Wang T, Mezey E, Kowalak JA 1999** TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus. *Nat Neurosci* 2(11):941-943.
 63. **Usdin TB, Wang T, Hoare SR, Mezey E, Palkovits M 2000** New members of the parathyroid hormone/parathyroid hormone receptor family: the parathyroid hormone 2 receptor and tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Front Neuroendocrinol* 21(4):349-383.
 64. **Usdin TB, Hoare SJR, Wang T, Mezey E, Kowalak JA 1999** TIP 39 a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus. *Nature neuroscience* 2(11):941-943.
 65. **Usdin TB 2000** The PTH2 receptor and TIP39: a new peptide-receptor system. *Trends Pharmacol Sci* 21(4):128-130.

66. **Della Penna K, Kinose F, Sun H, Koblan KS, Wang H 2003**
Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39): molecular structure and activity for parathyroid hormone 2 receptor. *Neuropharmacology* 44(1):141-153.
67. **Myung CS, Yasuda H, Liu WW, Harden K, Garrison JC 1999** Role of Isoprenoid lipids on the heterotrimeric G Protein subunit in determining effector activation. *J Biol Chem* 274(23):16595-16603.
68. **Bourne HR, Sanders DA, McCormick F 1991** The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349(6305):117-127.
69. **Hintgen CM, Waite KJ, Vasko MR 1995** Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. *J Neurosci* 15:5411-5419.
70. **Cui M, Nicol GD 1995** Cyclic AMP mediates the prostaglandin E2-induced potentiation of bradykinin excitation in rat sensory neurons. *Neuroscience* 66(2):459-466.
71. **Liu M, Simon MI 1996** Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G-protein-mediated phospholipase C. *Nature* 382(6586):83-87.
72. **Wess J 1997** G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *Faseb J* 11(5):346-354.
73. **Hollenberg MD, Compton SJ 2002** International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacological Reviews* 54:203-217.
74. **Neves SR, Ram PT, Iyengar R 2002** G Protein pathways. *Science* 296:1636-1639.
75. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1995**
Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage ed. VCH Verlagsgesellschaft mbH, pp 869-910.
76. **Hamm HE 1998** The many faces of G Protein Signaling. *J Biol Chem* 273(2):669-72.
77. **Gether U 2000** Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G-protein-coupled receptors. *Endocrine Reviews* 21(1):90-113.
78. **Gudermann T, Nürnberg B, Schultz G 1995** Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med* 73:51-63.

79. **Gudermann T, Nürnberg B, Schultz G 1995** Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction Part 2. G proteins: structure and function. *J Mol Med* 73:123-132.
80. **Tate CG, Grisshammer R 1996** Heterologous expression of G-protein-coupled receptors. *TIBTECH* 14:426-430.
81. **Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D 1994** Structure and function of G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 63:101-132.
82. **Baldwin JM 1993** The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *Embo J* 12(4):1693-703.
83. **Jüppner H. 1994** Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/ parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient family of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3(4):371-378.
84. **Bilezikian JP 1995** Calcium and Bone Metabolism. In: L BK (ed.) *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, 2.Auflage ed. J.B. Lippincott Company.
85. **Segre GV, Goldring SR 1993** Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagonlike peptide 1, growth hormone-releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *TEM* 4(10):309-314.
86. **Jüppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF Jr., Hock J, Potts JT Jr., Kronenberg HM, et al. 1991** A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 254(5034):1024-1026.
87. **Abou- Samra AB, Jüppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Urena P, Richards J, Bonventre JV, Potts JT Jr., Kronenberg HM, Segre GV 1992** Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: A single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2732-2736.
88. **McCuaig KA, Clarke JC, White JH 1994** Molecular cloning of the gene encoding the mouse parathyroid hormone/ parathyroid hormone-related peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5051-5055.

89. **Smith DP, Zhang XY, Frolik CA, Harvey A, Chandrasekhar S, Black EC, Hsiung HM 1996** Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Biochem Biophys Acta* 1307(3):339-347.
90. **Langub MC, Monier-Faugere MC, Qi Q, Geng Z, Koszewski NJ, Malluche HH 2001** Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide type 1 receptor in human bone. *J Bone Miner Res* 16(3):448-456.
91. **Urena P, Kong XF, Abou-Samra AB, Jüppner H, Kronenberg HM, Potts JT Jr., Segre GV 1993** Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology* 133(2):617-623.
92. **Jiang B, Morimoto S, Yang J, Niinoabu T, Fukuo K, Ogihara T 1998** Expression of parathyroid hormone/ parathyroid hormone-related protein receptor in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Pharmacol* 31(Suppl1):S142-144.
93. **Watson PH, Fraher LJ, Natale BV, Kisiel M, Hendy GN, Hodsmann AB 2000** Nuclear localization of the type 1 parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in MC3T3-E1 cells: association with serum-induced cell proliferation. *Bone* 26(3):221-225.
94. **Mannstadt M, Druke TB 1997** [Parathyroid hormone receptors: from cloning to physiological, physiopathological and clinical implications (editorial)]. *Nephrologie* 18(1):5-10.
95. **Mannstadt M, Jüppner H, Gardella TJ 1999** Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol* 277(5 Pt 2):F665-675.
96. **Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LHK, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Jüppner H, Segre GV, Kronenberg HM 1996** PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273(5275):663-666.
97. **Jüppner H 1995** Functional properties of the PTH/PTHrP receptor. *Bone* 17(2 Suppl):39S-42S.
98. **Nissenson RA, Diep D, Strewler GJ 1988** Synthetic peptides comprising the amino-terminal sequence of a parathyroid hormone-like protein from human

- malignancies. Binding to parathyroid hormone receptors and activation of adenylate cyclase in bone cells and kidney. *J Biol Chem* 263:12866-12871.
99. **Karpf DB, Arnaud CD, Bambino T, Duffy D, King KL, Winer J, Nissenson RA 1988** Structural properties of the renal parathyroid hormone receptor: hydrodynamic analysis and protease sensitivity. *Endocrinology* 123(6):2611-2620.
 100. **Karpf DB, Bambino T, Alford G, Nissenson RA 1991** Features of the renal parathyroid hormone-parathyroid hormone-related protein receptor derived from structural studies of receptor fragments. *J Bone Miner Res* 6(2):173-182.
 101. **Pines M, Adams AE, Stueckle S, Besalle R, Rashti-Behar V, Chorev M, Rosenblatt M, Suva LJ 1994** Generation and characterization of human kidney cell lines expressing recombinant human PTH/PTHrP receptor: lack of interaction with a C-terminal human PTH peptide. *Endocrinology* 135(4):1713-1716.
 102. **Jüppner H, Abou-Samra AB, Uneno S, Gu WX, Potts JT, Jr., Segre GV 1988** The parathyroid hormone-like peptide associated with humoral hypercalcemia of malignancy and parathyroid hormone bind to the same receptor on the plasma membrane of ROS 17/2.8 cells. *J Biol Chem* 263(18):8557-8560.
 103. **Monticelli L, Mammi S, Mierke DF 2002** Molecular characterization of a ligand-tethered parathyroid hormone receptor. *Biophysical chemistry* 95:165-172.
 104. **Lanske B, Divieti P, Kovacs CS, Pirro A, Landis WJ, Krane SM, Bringhurst FR, Kronenberg HM 1998** The parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mediates actions of both ligands in murine bone. *Endocrinology* 139(12):5194-5204.
 105. **Hoare SR, Clark JA, Usdin TB 2000** 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* 275(35):27274-27283.
 106. **Potts JT Jr., Jüppner H 1997** Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in calcium homeostasis, bone metabolism, and bone development: the proteins, their genes, and the receptors. In: Krane LVAvioli and SM Krane(ed.) *Metabolic Bone Disease*. Academic, New York, pp 51-94.

107. **Takasu H, Guo J, Bringham FR 1999** Dual signaling and ligand selectivity of the human PTH/PTHrP receptor. *J Bone Miner Res* 14(1):11-20.
108. **Fujimori A, Cheng SL, Avioli LV, Civitelli R 1992** Structure-function relationship of parathyroid hormone: activation of phospholipase-C, protein kinase-A and -C in osteosarcoma cells. *Endocrinology* 130(1):29-36.
109. **Coleman DT, Bilezikian JP 1990** Parathyroid hormone stimulates formation of inositol phosphates in a membrane preparation of canine renal tubular cells. *J Bone Miner Res* 5(3):299-306.
110. **Fukayama S, Royo M, Sugita M, Imrich A, Chorev M, Suva LJ, Rosenblatt M, Tashjian AH Jr. 1998** New insights into interactions between the human PTH/PTHrP receptor and agonist/antagonist binding. *Am J Physiol* 274(2 Pt 1):E297-303.
111. **Fukayama S, Schipani E, Jüppner H, Lanske B, Kronenberg HM, Abou-Samra AB, Bringham FR 1994** Role of protein kinase-A in homologous down-regulation of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acid in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology* 134(4):1851-1858.
112. **Zhu X, Gilbert S, Birnbaumer M., Birnbaumer L 1994** Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density. *Mol Pharmacol* 46:460-469.
113. **Offermanns S, Iida-Klein A, Segre GV, Simon MI 1996** G alpha q family members couple parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide and calcitonin receptors to phospholipase C in COS-7 cells. *Mol Endocrinol* 10(5):566-574.
114. **Dunlay R, Hruska K 1990** PTH receptor coupling to phospholipase C is an alternate pathway of signal transduction in bone and kidney. *Am J Physiol* 258(2 Pt 2):F223-231.
115. **Gardella TJ, Rubin D, Abou-Samra AB, Keutmann HT, Potts JT Jr., Kronenberg HM, Nussbaum SR 1990** Expression of human parathyroid hormone-(1-84) in *Escherichia coli* as a factor X-cleavable fusion protein. *J Biol Chem* 265(26):15854-15859.
116. **Babich M, King KL, Nissenson RA 1989** G protein-dependent activation of a phosphoinositide-specific phospholipase C in UMR-106 osteosarcoma cell membrane. *J Bone Miner Res* 4(4):549-556.

117. **Abou-Samra AB, Jüppner H, Westerberg D, Potts JT Jr., Segre GV 1989** Parathyroid hormone causes translocation of protein kinase-C from cytosol to membranes in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* 124(3):1107-1113.
118. **Quarles LD, Siddhanti SR 1996** Guanine nucleotide binding-protein coupled signaling pathway regulation of osteoblast-mediated bone formation. *J Bone Miner Res* 11(10):1375-1383.
119. **Turner PR, Mefford S, Christakos S, Nissenson RA 2000** Apoptosis mediated by activation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP). *Mol Endocrinol* 14(2):241-254.
120. **Friedman PA, Coutermarsh BA, Kennedy SM, Gesek FA 1996** Parathyroid hormone stimulation of calcium transport is mediated by dual signaling mechanisms involving protein kinase A and protein kinase C. *Endocrinology* 137(1):13-20.
121. **Friedman PA, Gesek FA, Morley P, Whifield JF, Willick GE 1999** Cell-specific signaling and structure-activity relations of parathyroid hormone analogs in mouse kidney cells. *Endocrinology* 140(1):301-309.
122. **Voß M, Weernink PAO, Haupenthal S, Möller U, Cool RH, Bauer B, Camonis JH, Jakobs KH, Schmidt M 1999** Phospholipase D stimulation by receptor tyrosine kinases mediated by protein kinase C and a Ras/Ral signaling cascade. *J Biol Chem* 274(49):34691-34698.
123. **Pines M, Fukayama S, Costas K, Meurer E, Goldsmith PK, Xu X, Muallem S, Behar V, Chorev M, Rosenblatt M, Tashjian AH Jr., Suva LJ 1996** Inositol 1-, 4-, 5-trisphosphate-dependant Ca²⁺ signaling by the recombinant human PTH/PTHrP-receptor stably expressed in a human kidney cell line. *Bone* 18: 381-389.
124. **Schwindinger WF, Fredericks J, Watkins L, Robinson H, Bathon JM, Pines M, Suva LJ, Levine MA 1998** Coupling of the PTH/PTHrP receptor to multiple G-proteins. Direct demonstration of receptor activation of G_s, G_{q/11}, and G_{i(1)} by [α -³²P]GTP- γ -azidoanilide photoaffinity labeling. *Endocrine* 8(2):201-209.
125. **Liggett SB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Hnatowich M 1991** Coupling of a mutated form of the human beta 2-adrenergic receptor to G_i and G_s. Requirement for multiple cytoplasmic domains in the coupling process. *J Biol Chem* 266(8):4816-4821.

126. **van Leeuwen JPTM, Bos MP, Herrmann-Erlee MPM 1989** Modulatory function of protein kinase C in activation of ornithine decarboxylase and in cAMP production in rat osteoblasts. *Journal of cellular physiology* 138:548-554.
127. **Asaoka Y, Nakamura S, Yoshida K, Nishizuka Y 1992** Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends Biochem Sci* 17(10):414-417.
128. **Bringham FR, Jüppner H, Guo J, Urena P, Potts JT Jr., Kronenberg HM, Abou-Samra AB, Segre GV 1993** Cloned, stably expressed parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptors activate multiple messenger signals and biological responses in LLC-PK1 kidney cells. *Endocrinology* 132(5):2090-2098.
129. **Short AD, Taylor CW 2000** Parathyroid hormone controls the size of the intracellular Ca²⁺ stores available to receptors linked to inositol trisphosphate formation. *J Biol Chem* 275(3):1807-1813.
130. **Takasu H, Gardella TJ, Luck MD, Potts JT Jr., Bringham FR 1999** Amino-terminal modifications of human parathyroid hormone (PTH) selectively alter phospholipase C signaling via the type 1 PTH receptor: implications for design of signal-specific PTH ligands. *Biochemistry* 38(41):13453-13460.
131. **Gagnon L, Jouishomme H, Whitfield JF, Durkin JP, Mac Lean S, Neugebauer W, Willick G, Rixon RH, Chakravarthy B 1993** Protein kinase C-activating domains of parathyroid hormone-related protein. *J. Bone Miner. Res.* 8:497-503.
132. **Jouishomme H, Whitfield JF, Charkravarthy JP, Durkin JP, Gagnon L, Isaacs RJ, Mac Lean S, Neugebauer W, Willick G, Rixon RH 1992** The protein kinase-C activation domain of the parathyroid hormone. *Endocrinology* 130:53-59.
133. **Jouishomme H, Whitfield JF, Gagnon L, MacLean S, Isaacs R, Chakravarthy B, Durkin J, Neugebauer W, Willick G, Rixon RH 1994** Further definition of the protein kinase C activation domain of the parathyroid hormone. *J. Bone Miner. Res.* 9:943-949.
134. **Takasu H, Bringham FR 1998** Type-1 parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptors activate phospholipase C in response to carboxyl-truncated analogs of PTH(1-34). *Endocrinology* 139(10):4293-4299.

135. **Fukayama S, Kong G, Benovic JL, Meurer E, Tashjian AH Jr. 1997** Beta-adrenergic receptor kinase-1 acutely regulates PTH/PTHrP receptor signalling in human osteoblastlike cells. *Cell Signal* 9(6):469-474.
136. **Fukayama S, Tashjian AH Jr., Bringham FR 1992** Mechanisms of desensitization to parathyroid hormone in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology* 131(4):1757-1769.
137. **Ferrari SL, Behar V, Chorev M, Rosenblatt M, Bisello A 1999** Endocytosis of ligand-human parathyroid hormone receptor 1 complexes is protein kinase C-dependent and involves beta-arrestin2. *J Biol Chem* 274(42):29968-29975.
138. **Maioli E, Fortino V 2004** The complexity of parathyroid hormone-related protein signalling. *Cell Mol Life Sci* 61(3):257-262.
139. **Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, Caron MG 1996** G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* 74(10):1095-1110.
140. **Ferguson SS, Zhang J, Barak LS, Caron MG 1998** Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci* 62(17-18):1561-1565.
141. **Mundell SJ, Benovic JL 2000** Selective regulation of endogenous G protein-coupled receptors by arrestins in HEK293 cells. *J Biol Chem* 275(17):12900-12908.
142. **Malecz N, Bambino T, Bencsik M, Nissenson RA 1998** Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization. *Mol Endocrinol* 12(12):1846-56.
143. **Quarles LD, Haupt DM, Davidai G, Middleton JP 1993** Prostaglandin F₂ alpha-induced mitogenesis in MC3T3-E1 osteoblasts: role of protein kinase-C-mediated tyrosine phosphorylation. *Endocrinology* 132(4):1505-1513.
144. **Guo J, Liu BY, Bringham FR 1997** Mechanisms of homologous and heterologous desensitization of PTH/PTHrP receptor signaling in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 273(2 Pt 1):E383-393.
145. **Blind E, Bambino T, Huang Z, Blizotes M, Nissenson RA 1996** Phosphorylation of the cytoplasmic tail of the PTH/PTHrP receptor. *J Bone Miner Res* 11(5):578-586.

146. **Blind E, Bambino T, Nissenson RA 1995** Agonist-stimulated phosphorylation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology* 136(10):4271-4277.
147. **Qian F, Leung A, Abou-Samra A 1998** Agonist-dependent phosphorylation of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *Biochemistry* 37(18):6240-6246.
148. **Dicker F, Quitterer U, Winstel R, Honold K, Lohse MJ 1999** Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10):5476-5481.
149. **Villardaga JP, Frank M, Krasel C, Dees C, Nissenson RA, Lohse MJ 2001** 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* 276(36):33435-43.
150. **Villardaga JP, Lin I, Nissenson RA 2001** Analysis of parathyroid hormone (PTH)/secretin receptor chimeras differentiates the role of functional domains in the PTH/PTH-related peptide (PTHrP) receptor on hormone binding and receptor activation. *Mol Endocrinol* 15(7):1186-1199.
151. **Miles RR, Sluka JP, Santerre RF, Hale LV, Bloem L, Boguslawski G, Thirunavukkarasu K, Hock JM, Onyia JE 2000** Dynamic regulation of RGS2 in bone: potential new insights into parathyroid hormone signaling mechanisms. *Endocrinology* 141(1):28-36.
152. **Ikeda K, Sugimoto T, Fukase M, Fujita T 1991** Protein kinase C is involved in PTH-induced homologous desensitization by directly affecting PTH receptor in the osteoblastic osteosarcoma cells. *Endocrinology* 128(6):2901-2906.
153. **Huang Z, Bambino T, Chen Y, Lameh J, Nissenson RA 1999** Role of signal transduction in internalization of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology* 140(3):1294-1300.
154. **Bergwitz C, Abou-Samra AB, Hesch RD, Jüppner H 1994** Rapid desensitization of parathyroid hormone dependent adenylate cyclase in perfused human osteosarcoma cells (SaOS-2). *Biochem Biophys Acta* 1222(3):447-456.

155. **Lund KA, Opresko LK, Starbuck C, Walsh BJ, Wiley HS 1990** Quantitative analysis of the endocytotic system involved in hormone-induced receptor internalization. *J Biol Chem* 265(26):15713-15723.
156. **Flannery PJ, Spurney RF 2001** Domains of the parathyroid hormone (PTH) receptor required for regulation by G protein-coupled receptor kinases (GRKs). *Biochem Pharmacol* 62(8):1047-1058.
157. **Huang Z, Chen Y, Nissenson RA 1995** The cytoplasmic tail of the G-protein-coupled receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein contains positive and negative signals for endocytosis. *J Biol Chem* 270:151-156.
158. **Ralston SH 1987** The pathogenesis of humoral hypercalcaemia of malignancy. *Lancet* 2(8573):1443-1446.
159. **Usdin TB, Gruber C, Bonner TI 1995** Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem* 270(26):15455-15458.
160. **Usdin TB, Modi W, Bonner TI 1996** Assignment of the human PTH2 receptor gene (PTHR2) to chromosome 2q33 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 37(1):140-141.
161. **Usdin TB, Bonner TI, Harta G, Mezey E 1996** Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat. *Endocrinology* 137(10):4285-4297.
162. **Usdin TB, Hilton J, Vertesi T, Harta G, Segre G, Mezey E 1999** Distribution of the parathyroid hormone 2 receptor in rat: immunolocalization reveals expression by several endocrine cells. *Endocrinology* 140(7):3363-3371.
163. **Behar V, Pines M, Nakamoto C, Greenberg Z, Bisello A, Stueckle SM, Bessalle R, Usdin TB, Chorev M, Rosenblatt M, Suva LJ 1996** The human PTH2 receptor: binding and signal transduction properties of the stably expressed recombinant receptor. *Endocrinology* 137(7):2748-2757.
164. **Usdin TB, Bonner TI, Hoare SR 2002** The parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor. *Receptors Channels* 8(3-4):211-218.
165. **Hoare SR, Bonner TI, Usdin TB 1999** Comparison of rat and human parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor activation: PTH is a low potency partial agonist at the rat PTH2 receptor. *Endocrinology* 140(10):4419-4425.

166. **Rubin DA, Jüppner H 1999** 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* 274(40):28185-28190.
167. **Rubin DA, Hellman P, Zon LI, Lobb CJ, Bergwitz C, Jüppner H 1999** 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* 274(33):23035-23042.
168. **Lefkowitz RJ 1996** G protein-coupled receptors and receptor kinases: from molecular biology to potential therapeutic applications. *Nature Biotechnology* 14:283-286.
169. **Chuang TT, Iacovelli L, Salles M, De Blasi A 1996** G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *TIPS* 17:416-421.
170. **Schnabel P, Böhm M 1995** Mutations of signal-transducing G proteins in human disease. *J Mol Med* 73:221-228.
171. **Arvanitakis L, Geras-Raaka E, Gershengorn MC 1998** Constitutively signaling G-protein-coupled receptors and human disease. *TEM* 9(1):27-31.
172. **Spiegel AM 1996** GENETIC BASIS OF ENDOCRINE DISEASE: Mutations in G proteins and G protein-coupled receptors in endocrine disease. *J Clin Endo Metab* 81(7):2434-2442.
173. **Spiegel AM 2000** G protein defects in signal transduction. *Hormone Research* 53(Suppl. 3):17-22.
174. **Zhang P, Jobert AS, Couvineau A, Silve C 1998** A homozygous inactivating mutation in the parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor causing Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3365-3368.
175. **Karaplis AC, He B, Nguyen MT, Young ID, Semeraro D, Ozawa H, Amizuka N 1998** Inactivating mutation in the human parathyroid hormone receptor type 1 gene in Blomstrand chondrodysplasia. *Endocrinology* 139(12):5255-5258.
176. **Karperien M, van der Harten HJ, van Schooten R, Farih-Sips H, den Hollander NS, Kneppers SL, Nijweide P, Papapoulos SE, Lowik CW 1999** A

- frame-shift mutation in the type I parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor causing Blomstrand lethal osteochondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 84(10):3713-3720.
177. **Jobert AS, Zhang P, Couvineau A, Bonaventure J, Roume J, Le Merer M, Silve C 1998** Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone related peptide in Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Invest* 102:34-40.
178. **Schipani E, Kruse K, Jüppner H 1995** A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science* 268(5207):98-100.
179. **Schipani E, Jensen GS, Pincus J, Nissenson RA, Gardella TJ, Jüppner H 1997** Constitutive activation of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling pathway by parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptors mutated at the two loci for Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *Mol Endocrinol* 11(7):851-858.
180. **Schipani E, Langman C, Hunzelman J, Le Merrer M, Loke KY, Dillon MJ, Silve C, Jüppner H 1999** A novel parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mutation in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 84(9):3052-3057.
181. **Spiegel AM 1999** Hormone resistance caused by mutations in G proteins and G protein-coupled receptors. *J Pediatr Endocrinol Metab* 12(Suppl 1):303-309.
182. **Schipani E, Weinstein LS, Bergwitz C, Iida-Klein A, Kong XF, Stuhmann M, Kruse K, Whyte MP, Murray T, Schmidtke J, et al., 1995** Pseudohypoparathyroidism type Ib is not caused by mutations in the coding exons of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 80(5):1611-1621.
183. **Bettoun JD, Minagawa M, Kwan MY, Lee HS, Yasuda T, Hendy GN, Goltzman D, White JH 1997** Cloning and characterization of the promoter regions of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene: analysis of deoxyribonucleic acid from normal subjects and patients with pseudohypoparathyroidism type 1b. *J Clin Endocrinol Metab* 82(4):1031-1040.
184. **Turner PR, Mefford S, Bambino T, Nissenson RA 1998** Transmembrane residues together with the amino terminus limit the response of the parathyroid

- hormone (PTH) 2 receptor to PTH- related peptide. *J Biol Chem* 273(7):3830-3837.
185. **Yanisch-Perron C, Viera J, Messing J 1985** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp 18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
 186. **Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR 1989** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59.
 187. **Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H 1990** 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-isoquinolinesulfo (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 256(9):5267-5272.
 188. **Blind E. 1998** Signaltransduktion des Parathormon-Rezeptors, Habilitation.
 189. **Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand- Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, et al. 1991** The bisindolyleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266(24):15771-15781.
 190. **Hansen IA, Jakob O, Wortmann S, Arzberger T, Allolio B, Blind E 2002** Characterization of the human and mouse genes encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues, a ligand of the parathyroid hormone family. *Journal of Endocrinology* 174:95-102.
 191. **Jakob O, Endress EM, Heindel U, Allolio B, Blind E 2001** Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) interacts both with the human PTH-1 receptor (P1R) and the human PTH-2 receptor (P2R). *Osteologie*.
 192. **John MR, Bösel J, Breit S, Wickert H, Ziegler R, Blind E 2001** Changing serine-485 to alanine in the opossum parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor enhances PTH stimulation of phospholipase C in a stably transfected human kidney cell line: a useful model for PTH-analog screening? *Bone* 28(2):182-186.
 193. **Iida-Klein A, Guo J, Xie LY, Jüppner H, Potts JT Jr., Kronenberg HM, Bringham FR, Abou-Samra AB, Segre GV 1995** 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* 270(15):8458-8465.
194. **Guo J, Iida-Klein A, Huang X, Abou-Samra AB, Segre GV, Bringham FR 1995** Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor density modulates activation of phospholipase C and phosphate transport by PTH in LLC-PK1 cells. *Endocrinology* 136(9):3884-3891.
 195. **Tonn O, Kriegbaum S, Braitmaier A, Schafer W, Esswein A, Dony C, Kaluza K, Honold K 2000** Expression-level dependent activation of recombinant human parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: effect of human parathyroid hormone (1-34), (1-31), and (28-48). *J Recept Signal Transduct Res* 20(2-3):133-151.
 196. **Takasu H, Bringham FR 1998** Type-1 parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptors activate phospholipase C in response to carboxyl-truncated analogs of PTH-(1-34). *Endocrinology* 139:4293-4299.
 197. **Takasu H, Guo J, Bringham FR 1999** Dual signaling and ligand selectivity of the human PTH/PTHrP receptor. *J Bone Miner Res* 14(1):11-20.
 198. **Takasu H, Gardella TJ, Luck MD, Potts JT Jr., Bringham FR 1999** Amino-terminal modifications of human parathyroid hormone (PTH) selectively alter phospholipase C signaling via the type 1 PTH receptor: implications for design of signal-specific PTH ligands. *Biochemistry* 38(41):13453-13456.
 199. **Iida-Klein A, Guo J, Drake MT, Kronenberg HM, Abou-Samra AB, Bringham FR, Segre GV 1995** Structural requirements of parathyroid hormone; parathyroid hormone-related peptide receptors for phospholipase C activation and regulation of phosphate uptake. *Miner Electrolyte Metab* 21(1-3):177-179.
 200. **Iida-Klein A, Guo J, Takemura M, Drake MT, Potts JT Jr., Abou-Samra A, Bringham FR, Segre GV 1997** Mutations in the second cytoplasmic loop of the rat parathyroid hormone receptor results in selective loss of PTH-stimulated phospholipase C activity. *J Biol Chem* 272(11):6882-6889.
 201. **Huang Z, Chen Y, Pratt S, Chen TH, Bambino T, Nissenson RA, Shoback DM 1996** 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* 271(52):33382-33389.

202. **Turner PR, Bambino T, Nissenson RA 1996** A putative selectivity filter in the G-protein-coupled receptors for parathyroid hormone and secretin. *J Biol. Chem.* 271:9205-9208.
203. **Behar V, Bisello A, Bitan G, Rosenblatt M, Chorev M 2000** Photoaffinity cross-linking identifies differences in the interactions of an agonist and an antagonist with the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor. *J Biol Chem* 275(1):9-17.
204. **Pellegrini M, Bisello A, Rosenblatt M, Chorev M, Mierke DF 1998** Binding domain of human parathyroid hormone receptor: from conformation to function. *Biochemistry* 37(37):12737-12743.
205. **Hoare SRJ, De Vries G, Usdin TB 1999** Measurement of agonist and antagonist ligand- binding parameters at the human parathyroid hormone type 1 receptor: Evaluation of receptor states and modulation by guanine nucleotide. *J Pharmacol Exp Ther* 289(3):1323-1333.
206. **Lee C, Gardella TJ, Abou-Samra AB, Nussbaum SR, Segre GV, Potts JT Jr., Kronenberg HM, Jüppner H 1994** Role of the extracellular regions of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor in hormone binding. *Endocrinology* 135(4):1488-1495.
207. **Lee C, Luck MD, Jüppner H, Potts JT Jr., Kronenberg HM, Gardella TJ 1995** Homolog-scanning mutagenesis of the parathyroid hormone (PTH) receptor reveals PTH-(1-34) binding determinants in the third extracellular loop. *Mol Endocrinol* 9(10):1269-1278.
208. **Jüppner H, Schipani E, Bringham FR, McLure I, Keutmann HT, Potts JT Jr., Kronenberg HM, Abou-Samra AB, Segre GV, Gardella TJ 1994** The extracellular amino-terminal region of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor determines the binding affinity for carboxyl-terminal fragments of PTH-(1-34). *Endocrinology* 134:879-884.
209. **Clark JA, Bonner TI, Kim AS, Usdin TB 1998** Multiple regions of ligand discrimination revealed by analysis of chimeric parathyroid hormone 2 (PTH2) and PTH/PTH-related peptide (PTHrP) receptors. *Mol Endocrinol* 12(2):193-206.
210. **Xie LY, Abou-Samra AB 1998** Epitope tag mapping of the extracellular and cytoplasmic domains of the rat parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *Endocrinology* 139(11):4563-4567.

211. **Gardella TJ, Jüppner H, Wilson AK, Keutmann HT, Abou-Samra AB, Segre GV, Bringham FR, Potts JT Jr., Nussbaum SR, Kronenberg HM 1994** Determinants of [Arg2]PTH-(1-34) binding and signaling in the transmembrane region of the parathyroid hormone receptor. *Endocrinology* 135:1186-1194.
212. **Mannstadt M, Luck MD, Gardella TJ, Jüppner H 1998** Evidence for a ligand interaction site at the amino-terminus of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor from cross-linking and mutational studies. *J Biol Chem* 273(27):16890-16896.
213. **Caulfield MP, McKee RL, Goldman ME, Duong LT, Fisher JE, Gay CT, DeHaven PA, Levy JJ, Roubini E, Nutt RF, et al. 1990** 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* 127(1):83-87.
214. **Schermer DT, Bradley MS, Bambino T.H., Nissenson R.A., Strewler G.J. 1994** Functional properties of a synthetic chicken parathyroid hormone-related protein 1-36 fragment. *J Bone Miner. Res.* 9:1041-1046.
215. **Gardella TJ, Wilson AK, Keutmann HT, Oberstein R, Potts JT Jr., Kronenberg H, Nussbaum SR 1993** Analysis of parathyroid hormone's principal receptor-binding region by site-directed mutagenesis and analog design. *Endocrinology* 132:2024-2030.
216. **Nussbaum SR, Rosenblatt M, Potts JT Jr. 1980** Parathyroid hormone . renal receptor interactions. Demonstration of two receptor-binding domains. *J Biol. Chem.* 255:10183-10187.
217. **Gardella TJ, Luck MD, Wilson AK, Keutmann HT, Nussbaum SR, Potts JT Jr., Kronenberg HM 1995** Parathyroid hormone (PTH)-PTH-related peptide hybrid peptides reveal functional interactions between 1-14 and 15-34 domains of the ligand. *J Biol Chem* 270:6584-6588.
218. **Luck MD, Carter PH, Gardella TJ 1999** The (1-14) fragment of parathyroid hormone (PTH) activates intact and amino-terminally truncated PTH-1 receptors. *Mol.Endocrinol.* 13(5):670-680.
219. **Cohen FE, Strewler GJ, Bradley MS, Carlquist M, Nilsson M, Ericsson M, Ciardelli TL, Nissenson, RA 1991** Analogues of parathyroid hormone modified

- at positions 3 and 6. Effects on receptor binding and activation of adenylyl cyclase in kidney and bone. *J Biol. Chem.* 266(3):1997-2004.
220. **Shimizu M, Potts JT Jr., Gardella TJ 2000** Minimization of parathyroid hormone: novel amino-terminal parathyroid hormone fragments with enhanced potency in activating the type-1 parathyroid hormone receptor. *J Biol. Chem.* 275(29):21836-21843.
221. **Shimizu M, Carter PH, Gardella TJ 2000** Autoactivation of type-1 parathyroid hormone receptors containing a tethered ligand. *J Biol Chem* 275(26):19456-19460.
222. **Carter PH, Jüppner H, Gardella TJ 1999** Studies of the N-terminal region of a parathyroid hormone-related peptide (1-36) analog: receptor subtype-selective agonists, antagonists, and photochemical crosslinking agents. *Endocrinology* 140(11):4972-4981.
223. **Bisello A, Adams AE, Mierke DF, Pellegrini M, Rosenblatt M, Suva LC, Chorev M 1998** Parathyroid hormone- receptor interactions identified directly by photocross-linking and molecular modeling studies. *J Biol Chem* 273:22498-22505.
224. **Zhou A, Bessale R, Bisello A, Nakamoto C, Rosenblatt M, Suva LJ, Chorev M 1997** Direct mapping of an agonist-binding domain within the parathyroid hormone / parathyroid hormone-related protein receptor by photoaffinity crosslinking. *Biochemistry* 94:3644-3649.
225. **Adams A, Bisello A, Chorev M, Rosenblatt M, Suva LC 1998** Arginine 186 in the extracellular N-terminal region of the human parathyroid hormone 1 receptor is essential for contact with position 13 of the hormone. *Mol. Endocrinol* 12:1673-1683.
226. **Carter PH, Shimizu M, Luck MD, Gardella TJ 1999** The hydrophobic residues phenylalanine 184 and leucine 187 in the type-1 parathyroid hormone (PTH) receptor functionally interact with the aminoterminal portion of PTH-(1-34). *J Biol Chem* 274(45):31955-31960.
227. **Mannstadt M, Luck MD, Gardella TJ, Jüppner H 1998** Evidence for a ligand interaction site at the amino-terminus of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor from cross- linking and mutational studies. *J Biol Chem* 273(27):16890-16896.

228. **Greenberg Z, Bisello A, Mierke DF, Rosenblatt M, Chorev M 2000** Mapping the bimolecular interface of the parathyroid hormone (PTH)-PTH1 receptor complex: spatial proximity between Lys 27 (of the hormone principal binding domain) and Leu 261 (of the first extracellular loop) of the human PTH1 receptor. *Biochemistry* 39(28):8142-8152.
229. **Piserchio A, Bisello A, Rosenblatt M, Chorev M, Mierke DF 2000** Characterization of parathyroid hormone/receptor interactions: structure of the first extracellular loop. *Biochemistry* 39(28):8153-8160.
230. **Dong M, Wang Y, Pinon D, Hadac E, Miller L 1999** Demonstration of a direct interaction between residue 22 in the carboxyl-terminal half of secretin and the amino-terminal tail of the secretin receptor using photoaffinity labeling. *J Biol. Chem.* 274:903-909.
231. **Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, Khorana HG 1996** Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* 274:768-770.
232. **Turner PR, Bambino T, Nissenson RA 1996** Mutations of neighboring polar residues on the second transmembrane helix disrupt signaling by the parathyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol* 10:132-139.
233. **Gardella TJ, Luck MD, Fan MH, Lee CW 1996** Transmembrane residues of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor that specifically affect binding and signaling by agonist ligands. *J Biol Chem* 271(21):12820-12825.
234. **Donnelly D. 1997** The arrangement of the transmembrane helices in the secretin receptor family of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* 409:431-436.
235. **Henderson R, Baldwin JM, Ceska TA, Zemlin F, Beckmann E, Downing KH 1990** Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol. Biol.* 213:899-929.
236. **Schertler G, Villa C, Henderson R 1993** Projection structure of rhodopsin. *Nature* 362:770-772.
237. **Zhou W, Flanagan C, Ballesteros J, Konvicka K, Davidson J, Weinstein H, Millar R, Sealfon S 1994** A reciprocal mutation supports helix 2 and helix 7 proximity in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol. Pharmacol.* 45:165-170.

238. **Huang R, Yu H, Strader C, Fong T 1994** Interaction of the substance B with the second and the seventh transmembrane domains of the neurokinin-1 receptor. *Biochemistry* 33(10):3007-3013.
239. **Hoare SR, Usdin TB 2002** Specificity and stability of a new PTH1 receptor antagonist, mouse TIP(7-39). *Peptides* 23(5):989-998.
240. **Gardella TJ, Luck MD, Jensen GS, Usdin TB, Jüppner H 1996** Converting parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) into a potent PTH-2 receptor agonist. *J Biol Chem* 271(33):19888-19893.
241. **Behar V, Nakamoto C, Greenberg Z, Bisello A, Suva LJ, Rosenblatt M, Chorev M 1996** Histidine at position 5 is the specificity "switch" between two parathyroid hormone receptor subtypes. *Endocrinology* 137(10):4217-4224.
242. **Bergwitz C, Jusseaume SA, Luck MD, Jüppner H, Gardella TJ 1997** Residues in the membrane-spanning and extracellular loop regions of the parathyroid hormone (PTH)-2 receptor determine signaling selectivity for PTH and PTH-related peptide. *J Biol Chem* 272(46):28861-28868.
243. **Rölz C, Pellegrini M, Mierke DF 1999** Molecular characterization of the receptor-ligand complex for parathyroid hormone. *Biochemistry* 38(20):6397-6405.
244. **Behar V, Bisello A, Rosenblatt M, Chorev M 1999** Direct identification of two contact sites for parathyroid hormone (PTH) in the novel PTH-2 receptor using photoaffinity cross-linking. *Endocrinology* 104(9):4251-4261.
245. **Goold CP, Usdin TB, Hoare SR 2001** Regions in rat and human parathyroid hormone (PTH) 2 receptors controlling receptor interaction with PTH and with antagonist ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 299(2):678-690.
246. **Karpf DB, Bambino T, Alford G, Nissenson RA 1991** Features of the renal parathyroid hormone-parathyroid hormone-related protein receptor derived from structural studies of receptor fragments. *J Bone Miner. Res* 6:173-182.
247. **Qi LJ, Leung AT, Xiong Y, Marx KA, Abou-Samra AB 1997** Extracellular cysteines of the corticotropin-releasing factor receptor are critical for ligand interaction. *Biochemistry* 36(41):12442-12448.
248. **Cook JV, Eidne KA 1997** An intramolecular disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the gonadotropin-releasing hormone receptor is essential for binding and activation. *Endocrinology* 138(7):2800-2806.

249. **Cook JV, McGregor AL, Lee T, Milligan G, Eidne KA 1996** A disulfide bonding interaction role for cysteines in the extracellular domain of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *Endocrinology* 137(7):2851-2858.
250. **D`Angelo DD, Eubank JJ, Davis MG, Dorn GW 1996** Mutagenic analysis of platelet thromboxane receptor cysteines: Roles in ligand binding and receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 271(11):6233-6240.
251. **Hoffmann C, Moro S, Nicholas RA, Harden TK, Jacobson KA 1999** The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y1 receptor in surface expression and activation processes. *J Biol Chem* 274(21):14639-14647.
252. **Schülein R, Zühlke K, Oksche A, Hermosilla R, Furkert J, Rosenthal W 2000** The role of conserved extracellular cysteine residues in vasopressin V2 receptor function and properties of two naturally occurring mutant receptors with additional extracellular cysteine residues. *FEBS Letters* 466:101-106.
253. **Moro S, Hoffmann C, Jacobson KA 1999** Role of the extracellular loops of G protein-coupled receptors in ligand recognition: a molecular modeling study of the human P2Y1 receptor. *Biochemistry* 38:3498-3507.
254. **Zhang P, Johnson PS, Zollner C, Wang W, Wang Z, Montes AE, Seidleck BK, Blaschak CJ, Surratt CK 1999** Mutation of human mu opioid receptor extracellular "disulfide cysteine" residues alters ligand binding but does not prevent receptor targeting to the cell plasma membrane. *Brain Res Mol Brain Res* 72(1):195-204.
255. **Baldwin JM 1994** Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 6:180-190.
256. **Savarese TM, Wang CD, Fraser CM 1992** Site-Directed Mutagenesis of the Rat m1 Muscarinic Acetylcholine Receptor. Conserved Cysteines in Receptor Function. *J Biol Chem* 267:11439-11448.
257. **Davidson FF, Loewen PC, Khorana HG 1994** Structure and function in Rhodopsin: Replacement by Alanines of the Intrad Cysteines 110 and 187, Components of a conserved Disulphide Bond in Rhodopsin Affects the Light-Activated Meta II State. *Proc Natl Acad Sci USA* .91(9):4029-33.
258. **Dixon RAF, Sigal IS, Candelore MR, Register RB, Scattergood W, Rands E, Strader CD 1987** Structural features required for ligand binding to the beta-adrenergic Receptor. *EMBO J* 6:3269-3275.

259. **Karnik SS, Sekmar TP, Chen HB, Khorana HG 1988** Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8459-8463.
260. **Karnik SS, Khorana HG 1990** Assembly of functional rhodopsin requires a disulfide bond between cysteine 110 and 187. *J Biol Chem* 265:17520-17524.
261. **Grauschopf U, Lilie H, Honold K, Wozny M, Reusch D, Esswein A, Schaefer W, Rücknagel KP, Rudolph R 2000** The N-terminal fragment of Human Parathyroid Hormone Receptor 1 constitutes a Hormone Binding Domain and reveals a distinct Disulfide Pattern. *Biochemistry* 39:8878-8887.
262. **Bazarsuren A, Grauschopf U, Wozny M, Reusch D, Hoffmann E, Panzer S, Rudolph R 2002** In vitro folding, functional characterisation, and disulfide pattern of the extracellular domain of the GLP-1 receptor. *Biophysical Chemistry* 96:305-318.
263. **Ai LS, Liao F 2002** Mutating the four extracellular cysteines in the chemokine receptor CCR6 reveals their differing roles in receptor trafficking, ligand binding, and signaling. *Biochemistry* 41:8332-8341.
264. **Jüppner H, Abou-Sambra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF Jr., Hock J, Potts JT Jr., Kronenberg HM, et al. 1991** A G-Protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 254(5034):1024-1026.
265. **Lanske B, Divieti CS, Kovacs CS, Pirro A, Landis WJ, Krane SM, Bringham FR, Kronenberg HM 1998** The parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mediates actions of both ligand in murine bone. *Endocrinology* 139(12):5194-5205.
266. **Rosenblatt M, Callahan, E. N., Mahaffey, J. E., Pont, A., Potts, J. T. Jr 1977** Parathyroid hormone inhibitors. Design, synthesis, and biologic evaluation of hormone analogues. *J. Biol. Chem* 252:5847-5851.
267. **Horiuchi N, Holick MF, Potts JT Jr., Rosenblatt M 1983** A parathyroid hormone inhibitor in vivo: design and biological evaluation of a hormone analog. *Science* (1053-1055).
268. **Hoare SR, Rubin DA, Jüppner H, Usdin TB 2000** Evaluating the ligand specificity of zebrafish parathyroid hormone (PTH) receptors: comparison of PTH, PTH-related protein, and tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Endocrinology* 141(9):3080-3086.

269. **Piserchio A, Usdin T, Mierke DF 2000** Structure of Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues. *J. Biol. Chem* 275(35):27284-27290.
270. **Fay JF, Dunham TD, Farrens DL 2005** Cysteine Residues in the Human Cannabinoid Receptor: Only C257 and C264 Are Required for a Functional Receptor, and Steric Bulk at C386 Impairs Antagonist SR141716A Binding. *Biochemistry* 44 (24): 8757-8769.
271. **Dong M, Pinon DI, Asmann YW, Miller LJ 2006** Possible endogenous agonist mechanism for activation of secretin family G protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* Mar 10 [Epub ahead of print].
272. **Correa SA, Pignatari GC, Ferro ES; Pachero NA, Costa-Netto CM, Pesquero JB, Oliviera L, Paiva AC, Shimuta SI 2006** Role of the Cys(18)-Cys(274) disulfide bond and of the third extracellular loop in the constitutive activation and internalization of angiotensin II type 1 receptor. *Regul. Pept.* Apr 18 [Epub ahead of print].
273. **Tanuj Sapra K, Park PS, Filipek S, Engel A, Muller DJ, Palczewski K 2006** Detecting molecular interactions that stabilize native bovine rhodopsin. *J. Mol. Biol.* 358(1):255-269.
274. **Lisenbee CS, Dong M, Miller LJ 2005** Paired cysteine mutagenesis to establish the pattern of disulfide bonds in the functional intact secretin receptor. *J. Biol. Chem.* 280(13):12330-12338.
275. **Shimizu N, Dean T, Tsang JC, Khatri A, Potts JT Jr 2005** Novel parathyroid hormone (PTH) antagonists that bind to the juxtamembrane portion of the PTH/PTH-related protein receptor. *J. Biol. Chem.* 280(3):1797-1807.
276. **Klose J, Fechner K, Beyermann M, Krause E, Wendt N, Bienert M, Rudolph R, Rothmund S 2005** Impact of N-terminal domains for corticotropin-releasing factor (CRF) receptor-ligand interactions. *Biochemistry* 44(5):1614-1623.
277. **Limatola C, Di Bartolomeo S, Catalano M, Trettel F, Fucile S, Castellani L, Eusebi F 2005** Cysteine residues are critical for chemokine receptor CXCR2 functional properties. *Exp. Cell Res.* 307(1):65-75.
278. **Bhattacharayya R, Pal D, Chakrabarti P 2004** Disulfide bonds, their stereospecific environment and conservation in protein structures. *Prot. Eng.* 17(11):795-808.

279. **Shimizu N, Dean T, Khatri A, Gardella TJ 2004** Amino-terminal parathyroid fragment analogs containing α,α -di-alkyl amino acids at positions 1 and 3. *J. Bone Miner. Res.* 19(12):2078-2086.
280. **Gensure RC, Shimizu N, Tsang J, Gardella TJ 2003** Identification of a contact site for residue 19 of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein analogs in transmembrane domain two of the type 1 PTH receptor. *Mol. Endocrinol.* 17(12):2647-2658.
281. **Jonsson KB, John MR, Gensure RC, Gardella TJ, Jüppner H 2001** Tuberoinfundibular peptide 39 binds to the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor, but functions as an antagonist. *Endocrinology* 142(2):704-709.
282. **Dean T, Linglart A, Mahon MJ, Bastepe M, Jüppner H, Potts JT Jr., Gardella TJ 2006** Mechanisms of ligand binding to the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor: selectivity of a modified PTH(1-15) radioligand for $G\alpha_s$ -coupled receptor conformations. *Mol. Endocrinol.* 20(4): 931-943.
283. **Hill SJ 2006** G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br. J. Pharmacol.* 147(S1): 27-37.
284. **Perrin MH, Fischer WH, Kunitake KS, Craig AG, Koerber SC, Cervini LA, Rivier JE, Groppe JC, Greenwald J, Nielsen SM, Vale WW 2001** Expression, purification, and characterization of a soluble form of the first extracellular domain of the human type 1 corticotropin releasing factor receptor. *J. Biol. Chem.* 276(34):31528-31534
285. **Perrin MH, DiGrucio MR, Koerber SC, Rivier JE, Kunitake KL, Bain DL, Fischer WH, Vale WW 2003** A soluble form of the first extracellular domain of mouse type 2 β corticotropin-releasing factor receptor reveals differential ligand specificity. *J. Biol. Chem.* 278(18):15595-15600.
286. **Qi LJ, Leung AT, Xiong Y, Marx KA, Abou-Samra AB 1997** Extracellular cysteines of the corticotropin-releasing factor receptor are critical for ligand interaction. *Biochemistry* 36(41): 12442-12448.
287. **Grace CRR, Perrin MH, DiGrucio MR, Miller CL, Rivier JE, Vale WW 2004** NMR structure and peptide hormone binding site of the first extracellular domain of a type B1 G protein-coupled receptor. *PNAS* 101(35): 12836-12841

Abkürzungen, alphabetisch

AC, Adenylatzyklase

AS, Aminosäuren

B_{max} , Rezeptorexpressionsdichte

Bpa, para-Benzoyl-L-Phenylalanin

BSA, bovines Serumalbumin

cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat

cpm, counts per minute

CRF1/2 β , Corticotropin-releasing Faktor Rezeptor Typ 1

DAG, Diacylglycerol

DMEM, Dulbecco`s Modified Eagle Medium

DNA, Desoxyribonucleinsäure

EC₅₀, halbmaximale effective Wirkkonzentration

FKS, fötales Kälberserum

G-Protein, Guanosintrisphosphat (GTP)- bindendes Protein

G_i, inhibierendes G-Protein

G_s, stimulierendes G-Protein

GLP-1R, Glukagon-like Peptid 1 Rezeptor

GPCR, G-Protein gekoppelte Rezeptoren

GTP, Guanosintrisphosphat

HEK 293-Zellen, human embryonal kidney cells, humane embryonale Nierenzellen

hPTH, humanes Parathormon

hPTHrP, humanes Parathormon-related-Protein

IBMX, Isobutyl-Methylxanthin

IC₅₀, halbmaximale effektive Hemmkonzentration

IP, Inositolphosphat

IP₃, Inositoltrisphosphat

K_D, Bindungsaffinitätskonstante

MW, molecular weight, Molekulargewicht

PCR, polymerase chain reaction, Polymeraseketten-Reaktion

PK-A, Proteinkinase A (=cAMP-abhängige Proteinkinase)

PK-C, Proteinkinase

PL-C, Phospholipase C

PTH, Parathormon
PTHrP, Parathormon-related-Protein
PTH1-R, PTH/PTHrP-Rezeptors
PTX, Pertussistoxin
RIA, Radioimmunoassay
rpm, Umdrehungen pro Minute
RT, Raumtemperatur
rPTH, Rattenparathormon
SecR, Sekretin Rezeptor
TIP39, tuberoinfundibularpeptide of 39 residues
TM, Transmembrandomäne
WT, Wildtyp (-Rezeptor)
ZNS, zentral nervöses System
zPTH-3R, PTH-3 Rezeptor des Zebrafisches

Publikationen

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 ligand specificity. (Vortrag)
44. Symposium DGE und 35. Jahrestagung DDG, München, 2000

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

O. Jakob, **E.M. Endress**, U. Heindel, B. Allolio, E. Blind
Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) interacts both with the human PTH1-
receptor (P1R) and the human PTH-2 receptor (P2R).
Osteologie 2001, Wiesbaden, 2001

G. Kägi, **E.M. Endress**, B. Weder
Volume flow rate evaluation in patients with internal carotid artery stenosis.
Cardiovasc 2005; 6: S13

E.M. Endress, J. Siegle, B. Tettenborn
Congenital aplasia of the internal carotid artery.
Schweiz Arch Neurol Psych 2005; 156: 388

E.M. Endress, J. Siegle, B. Tettenborn
Congenital aplasia of the internal carotid artery.
Akt Neurol S4/2005; 32: 277

S. Müller, **E.M. Endress**, D. Schött, S. Hägele-Link, B. Tettenborn
An anti-Hu syndrome preceding a carcinoma of the vocal cords.
Poster SNG-Tagung, Interlaken, Schweiz, Oktober 2006

Lebenslauf

Name	Eva-Maria Endress
Anschrift	Pilatusrain 7 CH- 6210 Sursee
Geburtsdatum	27. Mai 1975
Geburtsort	Würzburg
Familienstand	ledig
Schulbildung	
09/1981 - 07/1985	Grundschule, Schweinfurt
09/1985 - 07/1992	Celtis-Gymnasium, Schweinfurt
08/1992 - 06/1993	Bev-Facey-Highschool, Edmonton Canada Abschluss: Graduation
09/1993 - 06/1995	Olympia-Morata-Gymnasium, Schweinfurt Abschluss: Abitur, Grosses Latinum
Hochschulbildung	
11/1995 - 05/2002	Julius-Maximilians-Universität Würzburg: Studiengang Humanmedizin
09/1997	Physikum
09/1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/99 - 08/02	Promotionsarbeit in der Sektion Endokrinologie, Medizinische Klinik der Universität Würzburg, Ärztlicher Direktor Professor Dr. med. G. Ertl
Praktische Erfahrung	
1998 - 2000	Famulaturen (Allgemeinmedizin, Anästhesie, Innere Medizin)
03 - 04/2000	Famulatur im Palmerston North Hospital, Neuseeland, Abteilung Innere Medizin
04 - 07/2001	Erstes Tertial des Praktischen Jahres: Chirurgie, Hospital of Castlebar, Irland

07 - 11/2001	Zweites Tertial des Praktischen Jahres: Neurologie, Kantonsspital, St. Gallen, Schweiz
12/2001 - 03/2002	Drittes Tertial des Praktischen Jahres: Innere Medizin, Poliklinik, Universitätsspital, Würzburg
Berufstätigkeit	
08/2002 - 10/2006	Assistenzärztin, Klinik für Neurologie, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz
seit 11/2006	Assistenzärztin, Psychiatriezentrum Luzern-Stadt, Luzern, Schweiz