

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Beeinflussung der Signaltransduktion des humanen  
Parathormon (PTH)-2 Rezeptors mittels Einzel- und  
Kombinationsmutationen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Thomas Wobbe  
aus Würzburg  
Würzburg, Dezember 2007



Referent: Prof. Dr. B. Allolio

Korreferent: Prof. Dr. M. Herbert

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt.



*Für meine Familie*



# Inhaltsverzeichnis

Seite:

## **I Einleitung**

1.1	Mechanismen der Signaltransduktion	1
1.2	G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)	2
1.2.1	Signaltransduktion der GPCR	2
1.2.2	Rezeptorfamilien der GPCR	3
2	Liganden der PTH-Rezeptoren	4
2.1	Parathormon (PTH)	4
2.1.1	Metabolismus	4
2.1.2	Regulierung des Calciumhaushaltes	4
2.2	Parathyroid hormone related-protein (PTHrP)	5
2.3	Tuberoinfundibuläres Peptid von 39 Aminosäuren (TIP39)	6
3	Parathormonrezeptoren	7
3.1	PTH-1 Rezeptor (P1R)	7
3.1.1	Struktur und Ligandenbindung	7
3.1.2	Klinische und therapeutische Bedeutung des PTH-1	8
3.2	PTH-2 Rezeptor (P2R)	11
4	Der Thrombinrezeptor (PAR-1)	13
5	Zielsetzung	15

## **II Material und Methoden**

1	Material	16
1.1	Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur und Bioassays	16
1.2	Laborgeräte	18
2	Methoden	19
2.1	Zelllinien	19
2.1.1	HEK 293-Zellen, Wildtyp- und Hybridrezeptoren	19
2.1.2	Generierung von Hybridrezeptoren / Rezeptormutanten	20
2.2	DNA-Präparation	21
2.3	Zellkultur	22
2.3.1	Zellkulturtechniken	22

2.4	Bioassays	24
2.4.1	Bindungsstudien	24
2.4.2	Graphische und rechnerische Auswertung der Daten	27
2.4.3	Inositoltriphosphatmessung	28
2.4.4	Pharmakologische Hemmung der Proteinkinasen A und C	29
2.4.5	cAMP Messung	29
2.5	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Messung	30

### III Ergebnisse

1	Hybridrezeptoren des PTH-1 und PTH-2 Rezeptors	32
2	Bindungsexperimente	34
2.1	Bindungen mit dem Liganden hPTH (1-34) (unverdünnt)	34
2.2	Bindungen mit dem Liganden hPTH (1-34) (1:10 mit HEK-293 Zellen verdünnt)	37
2.3	Bindungen mit dem Liganden TIP39	40
3	Inositoltriphosphatmessungen (IP <sub>3</sub> )	41
3.1	Stimulation mit dem Liganden hPTH (1-34)	41
3.2	Stimulation mit dem Liganden TIP39	43
3.3	IP <sub>3</sub> Messung mit hPTH (1-34) und Proteinkinasenhemmung	44
4	Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> Ausschüttung nach Stimulation mit hPTH (1-34)	46
4.1	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Messungen am P1R	47
4.2	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Messungen am P2R und den Hybridrezeptoren	48
5	Messungen des cAMP Signals	52
5.1	cAMP Signalweg nach Stimulation mit hPTH (1-34)	53
5.2	cAMP Signalweg nach Stimulation mit TIP39	55

### IV Diskussion

1	Strukturelle und funktionelle Unterschiede des PTH-2 zum PTH-1 Rezeptor	58
2	HEK 293 E+ Zellen exprimieren Wildtyp- und Hybridrezeptoren	59
3	Beeinflussung der Ligandenbindungseigenschaft durch intrazelluläre Rezeptormutationen	60
4	Läßt sich durch Angleichung von Rezeptorabschnitten des PTH-1 Rezeptors auf den PTH-2 Rezeptor der IP <sub>3</sub> Signalweg beeinflussen?	61

5	Auswirkung einer Angleichung von intrazellulären Rezeptor-abschnitten des PTH-1 Rezeptors auf den PTH-2 Rezeptor auf das cAMP-Signal	66
6	Regulatorproteine induzieren eine Inaktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren	69

## **V Anhang**

1	Zusammenfassung	71
2	Abkürzungen	72
3	Literaturverzeichnis	73
	Publikationen	
	Curriculum Vitae	
	Danksagung	



# **I Einleitung**

## **1.1 Mechanismen der Signaltransduktion**

Jede Zelle benötigt zum Überleben die Fähigkeit, extrazelluläre Signale in intrazelluläre Antworten umzusetzen. Neben zahlreichen Reizmöglichkeiten findet sich auch eine Vielfalt an Signaltransduktionsmechanismen.

Zellen müssen dabei nicht nur auf Signale ihrer Nachbarzellen reagieren, sondern auch auf Reize, die von weiter entfernt liegender Gewebe kommen. Diese Rolle übernehmen Botenstoffe. Dazu gehören Neurotransmitter, Gewebshormone, Wachstumsfaktoren und Hormone. In neuronalen Systemen überwinden Neurotransmitter, wie zum Beispiel Noradrenalin oder Dopamin, an Synapsen eine kurze Strecke und zeigen eine schnelle Signalübertragung. Hormonelle Botenstoffe werden über die Blutbahn zu ihrem Ziel transportiert. Dieser Weg wird als endokrin bezeichnet. Gewebshormone werden innerhalb von Geweben vorgefunden. Diese legen zur Signalübermittlung einen kurzen Weg zurück. Dieser Übertragungsweg wird als parakrin bezeichnet. Beeinflusst der ausgeschiedene Botenstoff die ausscheidende Zelle selbst, so spricht man von einer autokrinen Signalübertragung.

Rezeptoren erkennen Botenstoffe und wandeln Signale in zelluläre Antworten um. Man unterscheidet vier Rezeptorklassen, von denen sich drei an der Zelloberfläche befinden und eine im Zellinneren lokalisiert ist.

Hormone, wie zum Beispiel Cortison, Schilddrüsen- und Sexualhormone haben intrazelluläre Rezeptoren als Zielstruktur. Die Botenstoffe translozieren in den Zellkern und regulieren dort durch Interaktion mit der DNA die Expression verschiedener Gene.

Membranständige Ionenkanal-Rezeptoren steuern den Ein- und Ausstrom von Ionen in oder aus der Zelle. Dies kann es zu einer Veränderung der Erregbarkeit der Zelle durch Änderung des Membranpotentials führen oder zur Aktivierung ionenabhängiger Enzyme in der Zelle.

Nicht nur Liganden können Ionenkanäle steuern, einige Kanäle reagieren auch auf Spannungsänderungen.

Enzymkinaserezeptoren gehören zu den membranständigen Enzymrezeptoren. Sie bestehen aus einer ligandenbindenden extrazellulären Domäne, einer membrangängigen Domäne und der enzymatisch aktiven intrazellulären Domäne. Die meisten dieser Rezeptoren, wie die für Wachstumsfaktoren oder Insulin, besitzen Tyrosinkinase-Eigenschaften. Hierbei kommt es

durch Phosphorylierungsvorgänge an Proteinen zu einer Signalkaskadenaktivierung. Zu dieser Gruppe gehören auch Rezeptoren, denen die intrazelluläre Kinasedomäne fehlt. Sie können aber nach Ligandenbindung andere membranständige Thyrosinkinasen binden und so deren enzymatische Aktivität beeinflussen. Ein weiteres Beispiel eines membranständigen Enzymrezeptors ist der Guanylylcyclaserezeptor, der anstelle der Kinasedomäne eine Guanylylcyclase trägt.

Den vierten Rezeptorklassenvertreter stellt die Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren dar:

### **1.2 G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)**

Die Mehrheit aller membranständigen Rezeptoren bilden die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), diese zeichnen sich durch eine Vielzahl von verschiedenen Liganden und Signalwegen aus. Guanosintriphosphat-bindende Proteine (G-Proteine) sind heterotrimere Proteine, die je aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bestehen. Zu dieser Gruppe wird unter anderem der PTH-Rezeptor gezählt, aber auch der Rhodopsin- und der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor gehören dazu. Gemein ist allen GPCR der strukturelle Aufbau. Sie besitzen einen extrazellulären N-Terminus, der je nach Rezeptorart unterschiedlich ausfallen kann. Kennzeichnend sind außerdem sieben hydrophobe  $\alpha$ -Helices, die in die Zellmembran eingelagert sind und durch sechs Schleifen, von denen je drei intra- und drei extrazellulär lokalisiert sind, miteinander verbunden sind. Daran schließt sich der intrazellulär gelegene C-Terminus an. Dessen Länge und die der sechs Schleifen variiert stark zwischen den Rezeptoren.

Über den N-Terminus und Teile der transmembranen Abschnitte wird der Ligand gebunden. Intrazelluläre Bereiche sind für die G-Protein Ankopplung und somit für die Aktivierung von verschiedenen Effektorproteinen zuständig (Strader, Fong et al. 1994; Wess 1997)

#### **1.2.1 Signaltransduktion der GPCR**

Der durch einen Liganden aktivierte Rezeptor katalysiert auf der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins den Austausch von GDP durch GTP. Nach GTP-Bindung an die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins dissoziiert der aus  $\alpha$ - und  $\beta/\gamma$ -Untereinheiten bestehende Komplex auseinander, um ihre jeweiligen Effektorsysteme zu beeinflussen.

Zur Beendigung des Effektes wird GTP wieder zu GDP hydrolysiert.

Die  $G\alpha_s$ -Untereinheiten führen zu einer Stimulation der Adenylatzyklase. Dadurch kommt es zur Bildung des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP). Dieser Botenstoff aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA) (Juppner 1994). Die  $G\alpha_i$ -Untereinheiten hemmen die Adenylatzyklaseaktivität und senken somit das cAMP.

Ein anderer Signalweg kann durch eine  $G\alpha_q$ -Untereinheit aktiviert werden. Dadurch wird die Aktivität der Phospholipase C (PLC) gesteigert. Hierbei entstehen die beiden Spaltprodukte Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) aus Phosphatidylinositolbisphosphat ( $PIP_2$ ). DAG aktiviert Proteinkinase C.  $IP_3$  führt über die Bindung an einen spezifischen Rezeptor, den  $IP_3$  Rezeptor ( $IP_3R$ ) zu einer  $Ca^{2+}$  Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum. (Abbildungen 3.1, 3.2, 4.1)

Die mittlerweile zahlreich bekannten  $G\alpha$ -Untereinheiten beeinflussen viele andere Proteine, wie verschiedene Ionenpumpen, Protonenpumpen, andere Phospholipasen und die cGMP-Phosphodiesterasen.

Die Variabilität ist auch bei den  $\beta/\gamma$ -Untereinheiten sehr groß. Sie wirken auf eine Vielzahl von Effektoren wie zum Beispiel Phospholipasen, Ionenkanäle und Rezeptorkinasen.

### 1.2.2 Rezeptorfamilien der GPCR

Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren umfasst fünf Klassen. Die Einteilung erfolgt durch Sequenzvergleiche und auf Grund ihrer biochemischen Eigenschaften. (Tabelle 1.1)

Rezeptorfamilie	Klasse	Gruppenmitglieder
Rhodopsin ähnliche Rezeptoren	I	Rezeptoren für Thrombin, Dopamin, Serotonin, Angiotensin, Melatonin, Cannabis und weitere
Sekretin ähnliche Rezeptoren	II	Rezeptoren für PTH/PTHrP, Sekretin, vasoaktives Peptid (VIP), Gonadotropes-Releasing-Hormon (GRH), Glukagon und weitere
Metabotrope Glutamat- und Pheromonrezeptoren	III	Rezeptoren für Calcium, Pheromone, Glutamat, GABA-B, Orphan GPCR-5
Fungale Pheromon-Rezeptoren	IV	<i>Fungale Pheromone der Spezien: Saccharomyces cerevisiae, Ustilago maydis</i>
cAMP Rezeptoren	V	<i>Spezie: Dictyostelium discoideum (Schleimpilz)</i>

Tabelle 1.1: Rezeptorfamilien in Klassen unterteilt.

Die Klasse II beinhaltet etwa 20 verschiedene Rezeptoren, neben dem Sekretin- (Hipkin, Sanchez-Yague et al. 1993) und Calcitonin-Rezeptor (Jobert, Zhang et al. 1998) gehört auch der PTH-Rezeptor in diese Familie. Ein Vergleich der Rezeptorsequenzen zeigt, dass alle einen großen extrazellulären N-Terminus besitzen, der eine wichtige Rolle bei der Ligandenaktivierung spielt. Die Aminosäuresequenzen weisen in den transmembranen Abschnitten eine große Identität auf. In ihrem extrazellulären Bereich finden sich acht Cysteinreste, von denen sechs konservierte Disulfidbrücken ausbilden und damit entscheidenden Einfluß auf die Tertiärstruktur des Rezeptors haben (Juppner 1994). Neben den strukturellen Merkmalen zeigen die Rezeptoren noch eine weitere Gemeinsamkeit, nämlich die Fähigkeit mehr als eine „second-messenger“- Signalkaskade zu aktivieren (Abou-Samra, Juppner et al. 1992; Bro and Olgaard 1997; Dobnig and Turner 1995).

Der PTH-1 Rezeptor (P1R) und der PTH-2 Rezeptor (P2R) gehören in die Klasse II der GPCR. Beide Rezeptoren und ihre Liganden sind Inhalt dieser Arbeit, auf die nun im Folgenden näher eingegangen wird.

## **2 Liganden der PTH-Rezeptoren**

### **2.1 Parathormon (PTH)**

#### **2.1.1 Metabolismus**

Das in den Nebenschilddrüsen produzierte und sezernierte Parathormon ist ein Peptidhormon bestehend aus 84 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 9,6 kDa. Es wird aus einem größeren Vorläufer, dem Pre-pro-PTH synthetisiert (Hendy, Kronenberg et al. 1981; Vasicek, McDevitt et al. 1983). Das intakte PTH (1-84) wird in die Blutbahn sezerniert und besitzt während der Zirkulation eine Halbwertszeit von wenigen Minuten (Bringhurst, Stern et al. 1988). Die Spaltung und Inaktivierung geschieht hauptsächlich in den Kupfer-Sternzellen der Leber (Habener, Rosenblatt et al. 1984).

#### **2.1.2 Regulierung des Calciumhaushaltes**

Die Regulierung des Calciumhaushaltes im Blut wird über das Zusammenwirken dreier Hormone kontrolliert. Dieses sind Vitamin D, Thyreocalcitonin und Parathormon. D-Vitamine sind eigentlich vom Cholesterin abgeleitete Hormone, die in ihrer Biosynthese von der UV-Strahlung abhängig sind. Das biologisch aktive D-Hormon, 1,25-

Dihydroxycholecalciferol stimuliert die intestinale Calciumresorption sowie die Calciummobilisierung am Knochen. Thyreocalcitonin wird in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet und bewirkt eine Hemmung der Osteoklastenaktivität. Außerdem erhöht es die Calcium-Ausscheidung über die Niere. Calcitonin hat in höherer Dosierung beim Menschen eine diuretische Wirkung. Daneben senkt Calcitonin den Phosphatspiegel im Blut durch Hemmung der Rückresorption von Phosphat im proximalen Tubulus der Niere (synergistische Wirkung zum Parathormon). Im Vergleich zu den anderen calciumregulierenden Hormonen Parathormon und 1,25 Dihydroxycholecalciferol scheint Calcitonin allerdings eine stark untergeordnete Rolle zu spielen. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass PTH die hämatopoetischen Stammzelllinien im Knochenmark reguliert (Kronenberg 2007). Die PTH-Sekretion ist vom Spiegel an Calciumionen im Serum abhängig, der nahezu konstant im Bereich von 1,1 bis 1,3 mM gehalten wird. Die Zellen der Nebenschilddrüse besitzen einen sogenannten „calcium-sensing-receptor“ (CaR) (Brown, Gamba et al. 1993). Die Rezeptoraktivierung geschieht hierbei direkt durch Calcium, das im Blut zirkuliert. Dieses bindet an den Rezeptor und ruft eine Aktivierung des Phospholipase C (PLC) Signaltransduktionsweges hervor. Als Botenstoff entsteht Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) (Emanuel, Adler et al. 1996). Dieser second messenger ist für die zelluläre Antwort, die Freisetzung von Parathormon verantwortlich (Racke and Nemeth 1993).

Am Knochen führt PTH nach einer Latenzphase von etwa 60 Minuten zu einer Calciummobilisierung. Daraufhin kommt es zu einer Aktivierung von Osteoklasten, die Protonen, die Protease Kathepsin sowie eine saure Phosphatase produzieren. Daraufhin wird der Knochen unterhalb der Osteoklasten bis auf eine Tiefe von etwa 70 µm resorbiert und frei werdende Calciumionen werden aufgenommen, um diese in den Extrazellularraum zu transportieren. An den Nieren ruft PTH eine Hemmung der Phosphatreabsorption und eine Verminderung der Calciumausscheidung hervor. Außerdem nimmt PTH Einfluß auf die Hydroxylierung von 25-Hydroxycholecalciferol zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol. Dadurch wird die Calciummobilisierung unterstützt. Beide Hormone stimulieren an der Dünndarmmukosa die Resorption von Calcium und Magnesium.

## **2.2 Parathyroid hormone related-protein (PTHrP)**

Bei der Suche nach einem verantwortlichen Faktor für Hyperkalcämien im Rahmen von malignen Erkrankungen, stieß man 1987 auf ein neues Peptid, bezeichnet als „parathyroid

hormone related-protein“ (PTHrP). Dieses wird in hohen Konzentrationen bei 10-20 % aller Tumorpatienten produziert und ist damit als das häufigste paraneoplastische Syndrom überhaupt zu sehen. Es wird zum Beispiel bei Plattenepithelkarzinomen beobachtet (Raue and Blind 1993). In geringen Mengen findet man PTHrP auch unter physiologischen Bedingungen in den unterschiedlichsten Organen des Körpers, wo es verschiedene Aufgaben erfüllt (Martin, Gillespie et al. 1995). Zum einen reguliert es das Knochen- und Knorpelwachstum (Karaplis, Luz et al. 1994; Murakami, Yamamoto et al. 1998), zum anderen ist es aber auch an der Entwicklung und an Umbauvorgängen verschiedener Organe beteiligt (Duan, De Luca et al. 1999). PTHrP zeigt autokrine und parakrine Wirkungsweisen in Gefäßwänden (Relaxation), in den Brustdrüsen (Yasuda, Shima et al. 1998) und im Pankreas (Kishi, Hagino et al. 1998; O'Dowd, Hnatowich et al. 1988; Urena, Iida-Klein et al. 1994).

PTH und PTHrP unterscheiden sich in ihrem Aminosäureaufbau. Nur im N-Terminus finden sich acht identische Aminosäuren. Im weiteren Verlauf der Sequenz sind keine Homologien nachweisbar (Lanske, Divieti et al. 1998). Allerdings zeigen die Rezeptoren eine ähnliche räumliche Struktur (Potts 2005). Beide binden an den PTH-1 Rezeptor (P1R) und aktivieren ihn (Juppner, Abou-Samra et al. 1991). PTH bindet und aktiviert außerdem den PTH-2 Rezeptor (P2R). Das Peptid PTHrP besitzt diese Fähigkeit nicht, es kann den PTH-2 Rezeptor nicht stimulieren und wirkt damit als Antagonist (Usdin, Gruber et al. 1995; Usdin, Hilton et al. 1999).

### **2.3 Tuberoinfundibuläres Peptid von 39 Aminosäuren (TIP39)**

Im Jahre 1999 konnte ein weiteres Peptid in die Familie des Parathormons aufgenommen werden. Das Tuberoinfundibuläre Peptid, bestehend aus 39 Aminosäuren (TIP39). Es wurde aus dem Hypothalamus des Rindes isoliert (Usdin, Hoare et al. 1999). Es wird vermutet, dass sich PTH, PTHrP und TIP39 aus einem Ursprungspeptid entwickelt haben. Dieses ist aber bisher noch unbekannt (John, Arai et al. 2002). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der Peptide, dann sind nur 9 der 39 Aminosäuren aus dem TIP39 Peptid identisch zum bovinen PTH (Usdin, Hoare et al. 1999). Zum hPTH sind es nur 8 Aminosäuren. Werden aber verwandte, ähnliche Aminosäuren mit einberechnet, dann erhöht sich der Grad an Homologie auf fast 50 % (Usdin, Wang et al. 2000).

TIP39 bindet an den PTH-1 und den PTH-2 Rezeptor. Allerdings wird nur der PTH-2 Rezeptor aktiviert. Dieses Verhalten konnte für den PTH-2 Rezeptor des Menschen, der

Ratte und des Zebrafisches gezeigt werden (Hoare, Rubin et al. 2000). TIP39 bindet schlechter als hPTH (1-34) am PTH-1 Rezeptor und wirkt antagonistisch auf die Signaltransduktion. Weder Inositoltriphosphat noch cAMP werden als Botenstoffe der Signaltransduktion nachgewiesen (Hansen, Jakob et al. 2002). Untersuchungen zur Funktion des neuen Peptids konnten zeigen, dass bei Zugabe von TIP39 zu präpariertem Hypothalamusgewebe nahezu alle Releasinghormone verstärkt ausgeschüttet wurden. Ausnahmen waren hierbei das Somatostatin und das TRH (= thyreotropin-releasing hormone) (Usdin, Dobolyi et al. 2003).

In Versuchen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass TIP39 bei der Verarbeitung nozizeptiver Informationen im Rückenmark eine entscheidende Rolle spielt (Usdin, Dobolyi et al. 2003).

Es wird derzeit davon ausgegangen, dass TIP39 der physiologische Ligand des PTH-2 Rezeptor ist und dass beide ein sogenanntes neuromodulatorisches System bilden. In diesem scheint die Beeinflussung des limbischen und des endokrinen Systems sowie die Verarbeitung der Gehörinformationen im Vordergrund zu stehen (Faber, Dobolyi et al. 2007) (Wang, Coolen et al. 2006).

### **3 Parathormonrezeptoren**

#### **3.1 PTH-1 Rezeptor (P1R)**

##### **3.1.1 Struktur und Ligandenbindung**

Der PTH-1 Rezeptor wurde 1991 erstmals vom Opossum kloniert (Juppner, Abou-Samra et al. 1991). Er gehört zur Klasse II der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und besteht aus 593 Aminosäuren. Der Rezeptor wird vor allem in der Niere und in den Knochen exprimiert, aber auch in der Herz- und Skelettmuskulatur, der Lunge, Leber, Plazenta, Mamma, Uterus, Ovar, Testes und Gehirn (Urena, Kong et al. 1993).

Die Peptide PTH (1-34) und PTHrP (1-34) aktivieren den PTH-1 Rezeptor (Juppner, Abou-Samra et al. 1991).

Für die Ligandenbindung sind drei Bereiche des PTH-1 Rezeptors von Bedeutung:

Einen der Zellmembran naher Abschnitt des N-Terminus und sein äußerstes Ende, sowie die dritte extrazelluläre Schleife (Carter, Shimizu et al. 1999; Lee, Gardella et al. 1994).

Die Liganden PTH und PTHrP induzieren eine komplexe Konformationsänderung im Bereich der transmembranösen Abschnitte. Dadurch werden zytoplasmatische Abschnitte für G-

Proteine besser zugänglich (Rolz, Pellegrini et al. 1999). Über diese schließen sich intrazelluläre Signalwege an. Beim PTH-1 Rezeptor sind es mindestens zwei: (Abbildung)

- 1.) Über Kopplung an die  $G\alpha_s$ -Untereinheit kommt es zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase (AC). Dabei akkumuliert cAMP, dass im weiteren die Proteinkinase A aktiviert (Juppner 1994).
- 2.) Die Ankopplung an die  $G\alpha_q$ -Untereinheit führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Die Spaltprodukte sind Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ). DAG aktiviert die Proteinkinase C,  $IP_3$  führt zur Calciumfreisetzung (Dunlay and Hruska 1990; Rasmussen 1986; Rasmussen 1986).

Der größte Anteil der zellulären, biologischen Antworten auf PTH wird durch cAMP ausgelöst. So auch die Regulation des Calciumspiegels im Blut und die Osteoklastenfunktion am Knochen (Goltzman 1999).

Welche Mechanismen der Aktivierung des PLC Signalweges zuzuschreiben sind, ist aktuell noch wenig bekannt.

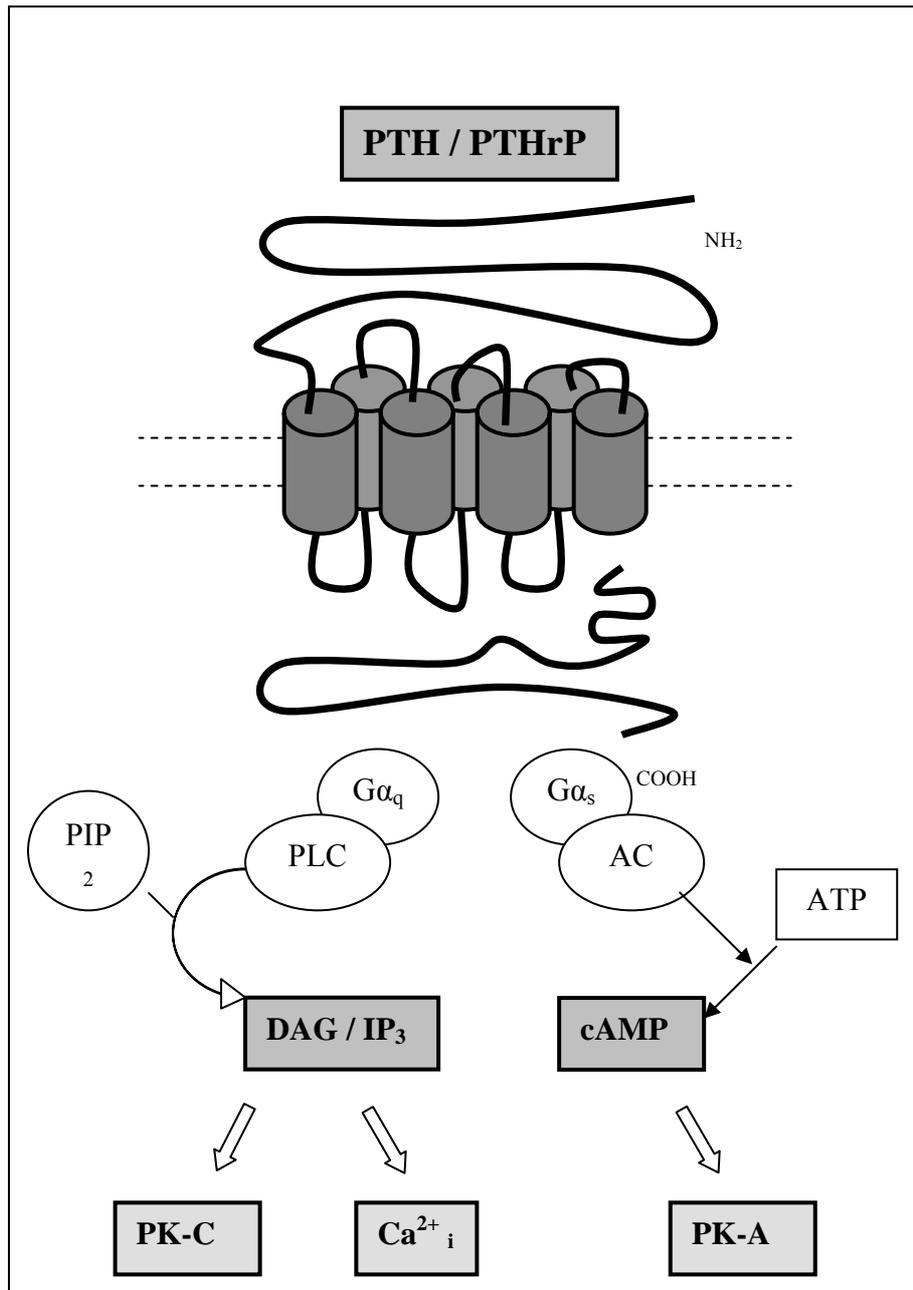
### **3.1.2 Klinische und therapeutische Bedeutung des PTH-1 Rezeptors**

Hinsichtlich seiner pharmakologischen und klinischen Aspekte hat der hPTH-1 Rezeptor in den vergangenen Jahren zunehmend an Interesse gewonnen. Die intermittierende Gabe von PTH bei Osteoporose hat einen entscheidenden therapeutischen Effekt. Eine tägliche subkutane Injektion von hPTH (1-34) zeigte einen osteoanabolen Effekt an Knochen von Ratten, Affen und Menschen (Cosman and Lindsay 1998; Dempster, Cosman et al. 1993; Hock 2001; Jerome, Burr et al. 2001; Marcus 2000). An postmenopausalen Frauen mit Osteoporose und vorbestehenden Wirbelkörperverformungen wurde durch die Applikation eines rekombinanten humanen Parathormonfragmentes (1-34) die Frakturgefährdung signifikant reduziert (Neer, Arnaud et al. 2001). Die Gabe von 20  $\mu$ g PTH (1-34) pro Tag senkte die Zahl neuer Wirbelkörperfrakturen um 65%. Dabei kam es zu einem Anstieg der Mineralsalzdichte von 9% an der Lendenwirbelsäule. Seit November 2003 ist PTH (Teriparatid) zur Behandlung der manifesten postmenopausalen Osteoporose zugelassen. Die Behandlung erfolgt über 18 Monaten und beschränkt sich im Einsatz der schweren und progredienten Form der Osteoporose. Die bisher verfügbaren Medikamente zur Behandlung einer Osteoporose sind Bisphosphonate und der selektive Östrogen-Rezeptor-Modulator Raloxifen, diese können den Knochenmassenverlust nur hemmen (Neer, Arnaud et al. 2001). Am Knochen der Maus konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Kombination von

Bisphosphonaten (Alendronat) mit hPTH (1-34) synergistische Effekte auf die Knochenstärke haben (Johnston, Andrews et al. 2007).

Die kontinuierliche Zufuhr an hPTH ruft den osteokatabolen Effekt des Hormons hervor (Neer, Arnaud et al. 2001). Welche Mechanismen für diesen paradoxen Effekt hierbei eine Rolle spielen ist bisher noch unbekannt (Qin, Raggatt et al. 2004). Als Beispiel für den verstärkten Knochenabbau (kataboler Effekt) kann der Primäre Hyperparathyreoidismus genannt werden. Kontinuierlich werden große Mengen an Parathormon aus einem autonomen Adenom der Nebenschilddrüse freigesetzt. Osteoklasten werden aktiviert und bauen den Knochen ab. Es kommt zu einer Osteoporose.

Eine Erkrankung, für die gezeigt werden konnte, dass die Erforschung der Signaltransduktionswege wichtig ist, ist der Pseudohypoparathyreoidismus. Hierbei liegt ein Defekt der nachgeschalteten Signalwege vor. Beim Typ 1 dieser Krankheit liegt eine verminderte cAMP Akkumulation vor. Die Schädigung liegt in der verminderten Produktion der  $G\alpha_s$ -Untereinheit vor. Der Typ 2 ist durch eine verminderte Wirksamkeit des Parathormon vermittelten cAMP Anstieg gekennzeichnet. Der Defekt wird hierbei in der dem cAMP nachgeschalteten Signalkaskade vermutet.



*Abbildung 3.1:* Darstellung der intrazellulären Signaltransduktionswege am PTH-1 Rezeptor. Die Liganden PTH und PTHrP führen zu einer Aktivierung von G-Proteinen. Das Protein Gα<sub>s</sub> stimuliert das Enzym Adenylatzyklase (AC), wodurch es zum Anstieg des aus ATP umgewandelten zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) kommt. Dieses aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA). Der zweite Signaltransduktionsweg wird über das aktivierte Protein Gα<sub>q</sub> eingeleitet. Dieses stimuliert das Enzym Phospholipase C (PLC). Es entstehen die Spaltprodukte Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) aus Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP<sub>2</sub>). Darüber hinaus kommt es zur intrazellulären Freisetzung von Calcium (Ca<sup>2+</sup>), das als „second-messenger“ fungiert. In dieser Signalkaskade wird außerdem die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Über die PKC und PKA werden zellspezifische biologische Antworten vermittelt. Des Weiteren existieren Rückkopplungsmechanismen zu den vorgeschalteten Enzymen AC und PLC. Diese werden von den Proteinkinasen phosphoryliert. Dabei kommt es zu einer Desensibilisierung.

### 3.2 PTH-2 Rezeptor (P2R)

Der PTH-2 Rezeptor wurde 1995 in Gehirnen von Rindern entdeckt und der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren Klasse II zugeordnet (Usdin, Gruber et al. 1995). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen des PTH-1 Rezeptors mit der des PTH-2 Rezeptors, dann lässt sich eine 70 %ige Sequenzähnlichkeit und eine 50 %ige Homologie feststellen. Der humane PTH-2 Rezeptor besitzt eine Länge von 550 Aminosäuren und ist damit um 43 Aminosäuren kleiner als der PTH-1 Rezeptor. Trotz ihrer Ähnlichkeit unterscheiden sie sich in ihrer Funktion, Verteilung und Reaktionsweise.

Während der PTH-1 Rezeptor hauptsächlich am Knochen und in der Niere exprimiert wird, findet sich der PTH-2 Rezeptor in großer Konzentration im Gehirn. Er ist in unterschiedlichen Hirnarealen nachweisbar. In größter Konzentration wird der PTH-2 Rezeptor in den hypothalamischen Kernen, aber auch im Bereich der Hinterhörner des Rückenmarks exprimiert. In vielen dieser Arealen ist der Rezeptor durch die Blut-Hirn Schranke für zirkulierende Proteine nicht zugänglich (Usdin, Hilton et al. 1999). Nachweisbar ist er auch in peripheren Organen, wie Pankreas, Magen und Nebenschilddrüse (Usdin, Bonner et al. 1996).

Der PTH-2 Rezeptor wird durch PTH aktiviert, dieses wird aber nur in geringer Konzentration im Gehirn nachgewiesen (Harvey and Fraser 1993). In Gehirnen von Ratten konnte die mRNA von PTH nicht dargestellt werden (Usdin 1997). Das Peptid PTHrP aktiviert den PTH-2 Rezeptor nicht (Usdin, Bonner et al. 1996; Usdin, Gruber et al. 1995). Als potentieller Aktivator für den PTH-2 Rezeptor gilt TIP39. Im Signaltransduktionsverhalten ergibt sich für TIP39 gegenüber PTH ein signifikanter Vorteil: Es kommt nach TIP39 Stimulation am PTH-2 Rezeptor der Ratte zu einem 2-fach höheren Anstieg des cAMP als durch PTH (Usdin, Wang et al. 2000).

Im Gegensatz zum PTH-1 Rezeptor kann der PTH-2 Rezeptor nach Aktivierung nur an den Adenylatzyklaseweg (AC) koppeln. Als Botenstoff wird nur cAMP gebildet (Abbildung 1.2). Weder PTH noch TIP39 können den PLC Signalweg aktivieren.  $IP_3$  kann nicht gemessen werden.

Dem PTH-2 Rezeptor wird eine Blutdruck regulierende Funktion zugeschrieben, da ein dilatativer Effekt in Zusammenhang mit TIP39 und PTH an renalen Gefäßen nachgewiesen werden konnte (Eichinger, Fiaschi-Taesch et al. 2002).

Mit Hilfe eines kürzlich entwickelten Ratten PTH-2 Rezeptor Antagonisten sollte es möglich sein weitere Erkenntnisse über die Funktion des PTH-2 Rezeptors zu erlangen (Kuo and Usdin 2007).

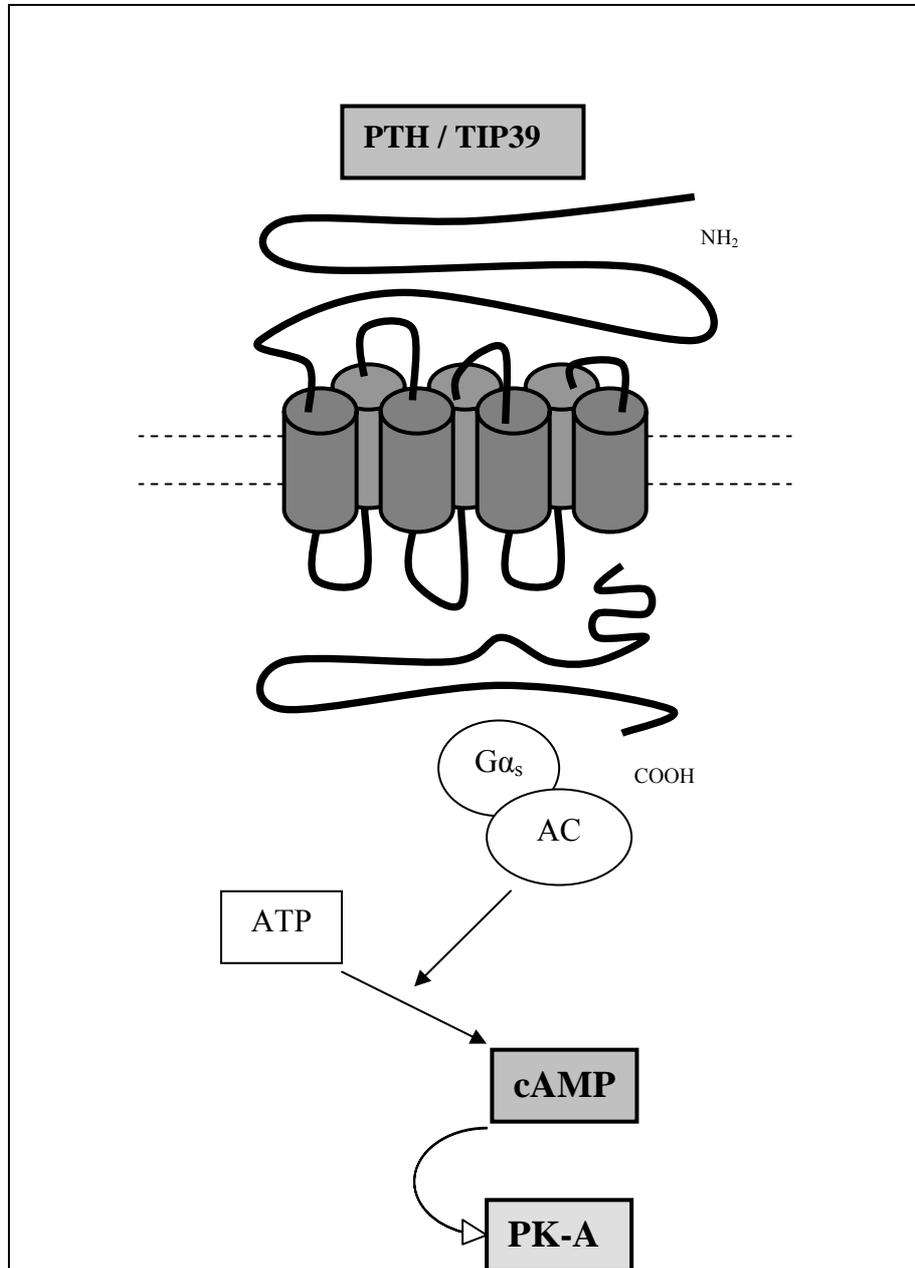


Abbildung 3.2: Darstellung der intrazellulären Signaltransduktionswege am PTH-2 Rezeptor. Die Liganden PTH und TIP39 führen zu einer Aktivierung des Protein  $G\alpha_s$ . Dieses stimuliert das Enzym Adenylatzyklase (AC), wodurch es zum Anstieg des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) kommt. Dieses aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA).

## 4 Der Thrombinrezeptor (PAR-1)

Der Thrombinrezeptor (PAR-1) wurde 1991 durch Coughlin und Kollegen kloniert (Coughlin 1993; Coughlin, Scarborough et al. 1992). Genau wie die Parathormonrezeptoren gehört auch der Thrombinrezeptor zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Der Rezeptor wird den Proteinase aktivierenden Rezeptoren zugeordnet. Nach Ligandenbindung kommt es zu einer enzymatischen Aktivierung, wobei der Rezeptor proteolysiert wird. Serinproteasen spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Über den PAR-1 konnten drei weitere Proteinase aktivierende Rezeptoren identifiziert werden: PAR-2 (al-Ani, Saifeddine et al. 1995), PAR-3 (Ishihara, Connolly et al. 1997) und PAR-4 (Xu, Andersen et al. 1998). Bis auf den PAR-2 werden alle Rezeptoren durch Thrombin aktiviert. Der PAR-1 findet sich hauptsächlich auf Thrombozyten, aber auch auf zahlreichen anderen Zellen, so auch auf Endothelzellen, Monozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen (Chackalamannil 2006). Über den Rezeptor wird Einfluß auf diverse biologische Funktionen wie beispielsweise die Thrombozytenaggregation und Wundheilung genommen (Davey and Luscher 1967).

Bezüglich der intrazellulären Signaltransduktion verhält sich der PAR-1 folgendermaßen:

1. Hemmung des cAMP Weges mit Hilfe inhibierender G-Proteine (Hung, Vu et al. 1992).
2. Stimulation der PLC Signalkaskade mit Bildung von  $IP_3$ . Dieses bindet an den Inositoltriphosphatrezeptor (IP3R), der sich auf der Membran des Endoplasmatischen Reticulums befindet und ruft eine Freisetzung von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  hervor. (Siehe Abbildung 4.1)

HEK 293-Zellen exprimieren PAR-1 auf ihrer Zelloberfläche. Die Aktivierung des Rezeptors geschieht PTH unabhängig. Dieses wurde in Experimenten zur intrazellulären  $Ca^{2+}$  Messung zu Nutzen gemacht. In der Darstellung des PLC-Weges diente der PAR-1 als Positivkontrolle gegenüber dem PTH-Rezeptor.

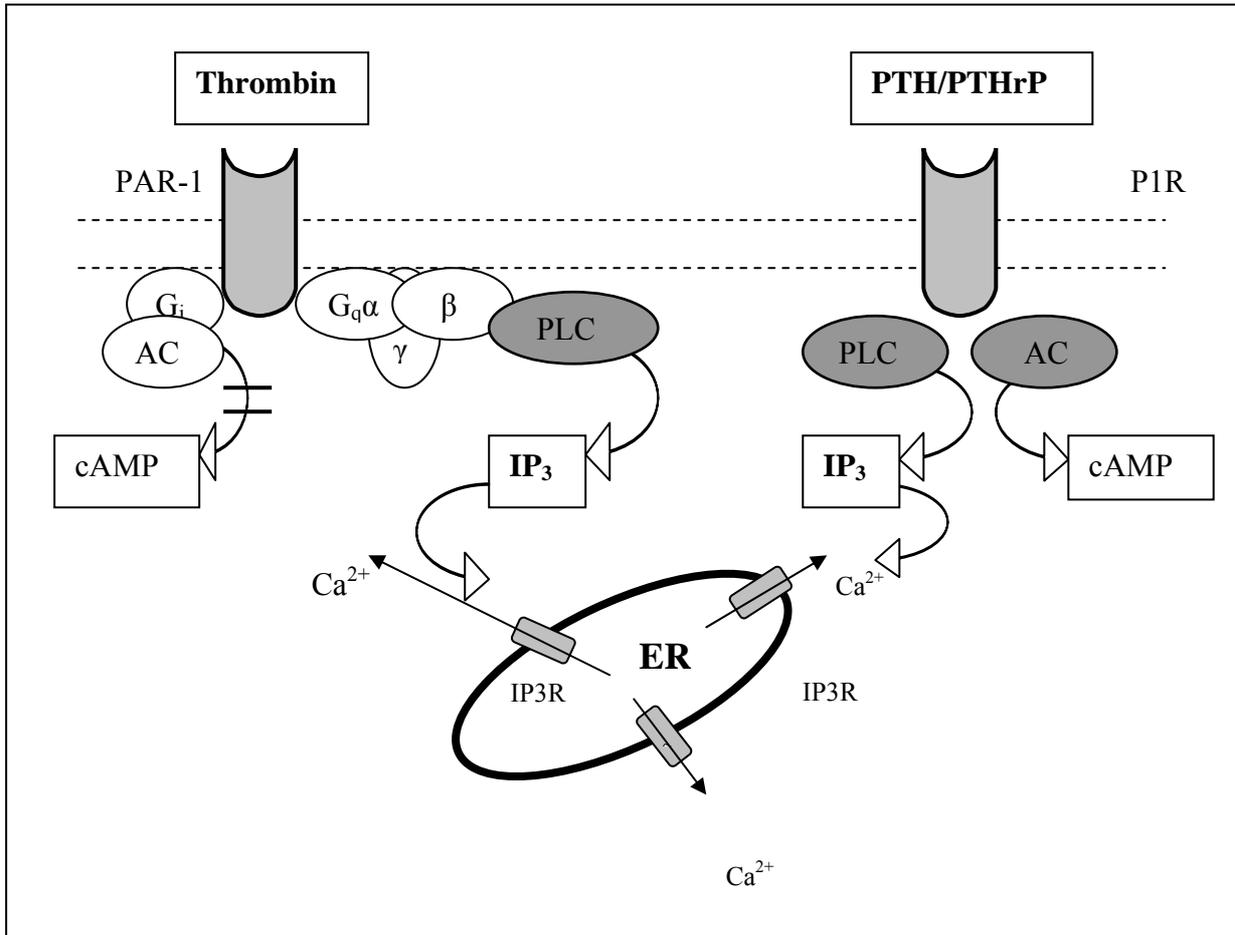


Abbildung 4.1: Übersichtsdarstellung des Ca<sup>2+</sup> Mobilisierungsmodells. Im linken Bereich die Aktivierung des Thrombinrezeptors (PAR-1) mit Hemmung des zyklischen Adenosin Monophosphat (cAMP) Weges und Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Das Spaltprodukt Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) bindet an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor (IP<sub>3</sub>R) des Endoplasmatischen Retikulums (ER), was eine intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Freisetzung zur Folge hat. Ergänzend wurde die Parathormonrezeptoraktivierung dargestellt. Am PTH-1 Rezeptor (P1R) findet dabei die Ca<sup>2+</sup> Mobilisierung aus dem ER ebenso über die Aktivierung der Phospholipase C statt. IP<sub>3</sub> ist der hierfür der verantwortliche Ligand am IP<sub>3</sub>R.

## 5 Zielsetzung

Der PTH-1 Rezeptor ist, im Zusammenhang mit seinem physiologischen Liganden PTH derzeit Gegenstand intensiver Forschung in der Therapie der Osteoporose. In den vergangenen fast 10 Jahren rückte allerdings der PTH-2 Rezeptor mit der Entdeckung des Liganden TIP39 verstärkt in das Rampenlicht der endokrinologischen Forschung.

Das genaue Verständnis über die Mechanismen der Signaltransduktion ist für zukünftige therapeutischen Ansatzwege von entscheidender Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein Rezeptorabschnitte des PTH-2 Rezeptors zu charakterisieren, die an der Signaltransduktion Einfluß haben. Hierfür sollen PTH-1/PTH-2 Rezeptorhybriden erstellt werden. Als molekulares Ausgangsmodell dient der PTH-1 Rezeptor. Für diesen konnte gezeigt werden, dass Bereiche der zweiten und dritten intrazellulären Schleife für die Ankopplung an den cAMP und den Inositoltriphosphatweg von Bedeutung sind. Bei weitreichender Rezeptorhomologie des PTH-1 und PTH-2 Rezeptors, finden sich beim Vergleich der Aminosäuresequenzen in diesen Schleifenabschnitten unterschiedliche Aminosäuren. Hier könnte die Ursache für die unterschiedliche Ankopplung an Signalwege zu finden sein. Der PTH-1 Rezeptor zeigt nach Ligandenbindung eine Aktivierung des cAMP und des Inositoltriphosphatweges. Der PTH-2 Rezeptor koppelt nur an den cAMP-Signalweg. Durch Veränderung kurzer Aminosäureabfolgen und einzelner Aminosäuren wird eine Angleichung des PTH-2 Rezeptors an den PTH-1 Rezeptor geschaffen. Hierbei handelt es sich um intrazelluläre Bereiche der zweiten und dritten Schleife sowie des C-Terminus, über die versucht werden soll die Aktivierung des Inositoltriphosphatweges des PTH-2 Rezeptors zu rekonstruieren.

## II Material und Methoden

### 1 Material

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

#### 1.1 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur und Bioassays

Expressionsvektor pCEP4	Invitrogen (San Diego, USA)
<b>Zellkultur:</b>	
Gewebekulturflaschen T75	Greiner (Frickenhausen)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax	Invitrogen
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech
PBS (steril)	PAN Biotech
Trypsin	Sigma (Steinheim)
Hepes	Invitrogen (Groningen, NL)
Pipetten (einzeln steril verpackt) 2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Falcon (New Jersey, USA)
Hygromycin B	Roche (Mannheim)
Lipofectamin	Invitrogen
Neubauer-Zählkammer	GLW
Trypanblau	Sigma (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Einfrieröhrchen 1,8 ml	Greiner (Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	Greiner
Mikropipetten P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson (Den Haag, Niederlande)

<b>Bioassays</b>	
<b>1.) Bindung</b>	
24- Loch Platten	Costar (Coming, NY, USA)
Serumröhrchen	Sarstedt
Küvetten (Plastik) 1ml	Sarstedt
Spritzen, Kanülen	Braun (Melsungen)
Nle <sup>8,18</sup> Tyr <sup>34</sup> hPTH (1-34) amid	Bachem (Heidelberg/Torrance, CA, USA)
[ <sup>125</sup> I]- Nle <sup>8,21</sup> Tyr <sup>34</sup> rPTH(1-34) amid	NEN (Boston, MA, USA)
TIP39	Immundiagnostik (Bensheim)
Natronlauge	Merck (Darmstadt)

<b>2.) Inositoltriphosphatmessung</b>	
6-Loch Platten	Costar
Myo-[ <sup>3</sup> H]-Insoitol, Myo-[2- <sup>3</sup> H]-Inositol	Amersham (Braunschweig)
Poly-Prep-Säulen	Bio-Rad (München)
Ionenaustauscher AG 1-X8 Resin	Bio-Rad
Ready Protein+ (Szintillatorflüssigkeit)	Beckmann Coulter (Krefeld)
Szintillatorröhrchen	Beckmann Coulter
Ammoniumsalz der Ameisensäure (Formic acid)	Sigma (Steinheim)
Borax (Natriumtetraborat)	Sigma
Natriumsalz der Ameisensäure (Sodium formate)	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA) <99% Reinheit	Sigma
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IMBX)	Sigma
Lithiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Isoquinolin-Sulfonamid-Derivat (H-89)	Calbiochem (La Jolla, CA, USA)
Bisindolylmaleimid-Derivat GF 109203X	Calbiochem
Sowie weitere Materialien, die auch in den anderen Versuchen Verwendung fanden	

<b>3.) cAMP-Messung</b>	
12-Loch-Platten	Costar
Bovines Serumalbumin (BSA) 95 % Reinheit	Sigma
Ethanol	T.J.Baker
cAMP Radio-Immunoassay	Beckmann Coulter
Sowie weitere Materialien, die auch in den anderen Versuchen Verwendung fanden	

<b>4.) Ca<sup>2+</sup>-Messung</b>	
Poly-L-Lysin	Sigma
Fluo-3-AM	Molecular Probes; Eugene, OR (USA)
Perfusorspritzenpumpen	PHD 2000; ZAK, Marktheidenfeld

## 1.2 Laborgeräte

Brutschrank TH30/SM30	Edmund Bühler (Hechingen)
Lichtmikroskop Leitz DMIL	Leica
<i>Sterile Werkbänke:</i>	
LaminAir® HB2472	Heraeus
SterilGARD®III Advance	The Baker Company
Laborzentrifuge Rotanta 96RC	Hettich (Tuttlingen)
Centrifuge 5415	Eppendorf
Gamma-Counter LB 2111	Berthold (Bad Wildbad)
Beta-Counter LS 6000 IC	Beckmann (München)
Vakuum-Pumpe	Bio-Rad
Konfokales Lasermikroskop	Bio-Rad MRC-1024
Magnetrührer	Labinco
Vortexer, Schüttler	GLW
Wasserbad	Memmert
FCS-2 Spülkammer	Bioprotechs Inc., Butter, Pa (USA)

## 2 Methoden

### 2.1 Zelllinien

#### 2.1.1 HEK 293-Zellen, Wildtyp- und Hybridrezeptoren

In Tabelle 2.1 sind die Zelllinien aufgeführt, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Die Wildtyp- (P1R, P2R) und Hybridrezeptoren (P2R-L2, P2R-L3, P2R-P1T, P2R-L2-L3, P2R-L2-L3-P1T) wurden in HEK293 E+ Zellen (Invitrogen San Diego, CA, USA) stabil transfeziert. Diese Ursprungszellen exprimieren konstitutiv das EBNA-1 Protein, das aus dem Epstein-Barr-Virus stammt.

Vorarbeiten (Martin Weber) und begleitende Arbeiten (Ulla Kehl), beschäftigten sich einerseits mit den molekularen Grundlagen und andererseits mit der Optimierung der Methoden (Assays) und bilden die Grundlage für diese Arbeit.

Die Generierung der Hybridrezeptoren wurden von Dr. Markus John (früher Universität Heidelberg, derzeit Novartis, Basel, Schweiz) und Dr. Ulla Kehl (früher Universität Würzburg, derzeit Novartis, Nürnberg, Deutschland) durchgeführt und freundlicherweise für die vorliegende Arbeit überlassen.

<b>Rezeptor-bezeichnung</b>	<b>Eingebrachter Rezeptorabschnitt</b>
P1R	humaner PTH-1 Rezeptor
P2R	humaner PTH-2 Rezeptor
P2R-L2	P2R mit Austausch der Aminosäuren DT->EK in der 2. intrazellulären Schleife (Position 272 und 273)
P2R-L3	P2R mit Austausch der Aminosäuren IW->LR in der 3. intrazellulären Schleife (Position 344 und 345)
P2R-P1T	P2R mit Austausch des C-Terminus des PTH-1 Rezeptors (Position 416)
P2R-L2-L3	Kombination aus L2 und L3
P2R-L2-L3-P1T	Kombination aus L2 und L3 und C-Terminus

*Tabelle 2.1:* Vorstellung der in stabile Zelllinien gebrachten Rezeptoren

### 2.1.2 Generierung von Hybridrezeptoren / Rezeptormutanten

Plasmide sind kleine, zirkuläre, autonom replizierende DNA-Moleküle, die in Bakterienzellen vorkommen können, aber nicht zur eigentlichen DNA des Bakteriums gehören, also extrachromosomal sind. Plasmide können mehrere Gene enthalten. Vermitteln diese Gene z.B. eine Antibiotika-Resistenz, kann daraus für das Wirtsbakterium ein Selektionsvorteil resultieren. Jedes Plasmid enthält mindestens eine DNA-Sequenz, die als „Origin of Replication“ (Startpunkt der DNA-Replikation) kurz „ori“ dient. Plasmide sind selbstreplizierend (replicons) und werden vererbt. Plasmide sind wichtige Werkzeuge der Molekularbiologie, Genetik, Biochemie und anderer biologischer und medizinischer Bereiche. Sie werden dann als Vektoren bezeichnet und dazu benutzt, um Gene zu vervielfältigen oder zu exprimieren. Bringt man die Gene in Plasmide ein, welche dafür sorgen das die eingebrachten Gene exprimiert werden (sogenannte Expressionsplasmide), so hat man eine Methode an der Hand, um die entsprechenden Genprodukte (z.B. Rezeptoren) in großen Mengen zu gewinnen.

Für die Erstellung der in der Tabelle 2.1 aufgeführten stabilen Zelllinien, wurde der Vektor pCEP4 (Invitrogen) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen 10,4 kb großer Expressionsvektor und besitzt den Cytomegalievirus (CMV)-Promotor. Dieser führt zu einer hohen Transkriptionsrate, der jeweils eingegebenen DNA. Außerdem trägt das Plasmid ein Hygromycin-B Resistenzgen, welches eine stabile Selektion von transfizierten Zellen erlaubt. Mit Hilfe molekularbiologischer Standardmethoden wurde für die Generierung von Hybridrezeptoren Plasmid DNA aus Bakterienzellen gewonnen (Mini-Präparation), vervielfältigt (Maxi-Präparation, siehe 2.2), ausgefällt und schließlich gereinigt. Im Rahmen eines sogenannten Restriktionsverdau wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen die DNA an spezifischen Zielsequenzen gespalten. Dabei handelt es sich meistens um sogenannte Palindrome mit einer Länge von 6 – 8 Basenpaaren. Anschließend erfolgte eine Aufspaltung der DNA-Fragmente in der Agarose-Gelelektrophorese und die Isolierung über spezielle Kits. In einem Ligationsansatz wird letztendlich ein Vektor mit einem DNA-Fragment zusammengefügt und anschließend in Bakterienzellen transformiert. Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) können DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Die Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech, Eberberg durchgeführt. Die Auswertung der gelieferten Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes „Gene Tools“.

Bei allen Hybridrezeptoren handelt es sich um mutierte PTH-2 Rezeptoren. Es wurden intrazelluläre Abschnitte durch entsprechende Epitope des PTH-1-Rezeptors ausgetauscht.

Am P2R-L2 wurden Rezeptormutationen an Position 272 und 273 in der zweiten intrazellulären Schleife durchgeführt. Es erfolgte ein Austausch der Aminosäuren Asparaginsäure (D) und Threonin (T) durch Glutaminsäure (E) und Lysin (K). Beim P2R-L3 wurden die beiden Aminosäuren Isoleucin (I) und Tryptophan (W) gegen Leucin (L) und Arginin (R) in der dritten intrazellulären Schleife an den Positionen 344 und 345 ausgetauscht. Zusätzlich wurde eine weitere Rezeptormutante, die beide Mutationen enthält generiert. Der P2R-L2-L3 stellt eine Kombination aus den Mutationen der intrazellulären Schleife zwei und drei dar. Am P2R-P1T wurde der gesamte intrazelluläre C-Terminus des PTH-2-Rezeptors durch den C-Terminus des PTH-1-Rezeptors ausgetauscht. Für den P2R-L2-L3-P1T wurde eine Kombination aus drei Mutationen vorgenommen. Hierfür wurde die zweiten und dritten intrazellulären Schleife (L2, L3) sowie der Austausch des C-Terminus gewählt.

## 2.2 DNA-Präparation

Um transiente und stabile Transfektionen durchführen zu können, wurde eine größere Menge an DNA benötigt. Dazu wurde eine Plasmid-Maxi-Präparation mit dem QIA-filter-Maxi-Kit durchgeführt. Zunächst wurde am Vortag (20-24 h) eine Übernachtskultur von E.coli Bakterien, die mit Rezeptor DNA transformiert worden waren angesetzt. Aus dieser wurden 100 ml in Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend abzentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge, Rotor GSA, 6000 rpm, 15 min.). Es folgte eine Resuspension in 10 ml Puffer P1, anschließend die Zellyse mit 10 ml Puffer P2 und die Präzipitation von genomischer DNA und Proteinen mit Puffer N3. Danach wurde die gesamte Lösung in eine Spritze mit Filter, die im Maxi-Prep-Kit mitgeliefert wurde, gegeben und 10 Minuten inkubiert. Nun erfolgte der Schritt, indem das Lysat vom Präzipitat getrennt wurde; unter Druck wird die Lösung durch den Filter gedrückt. In das klare Lysat wurden 12,5 ml Isopropanol gegeben und das Gemisch 30 Minuten bei 15.000 rpm (Beckmann-Zentrifuge, Rotor SS34) zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und die pelletierte DNA 1 mal mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen, 10 Minuten bei 15.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5415) zentrifugiert und getrocknet. Mittels 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris-Cl pH=8,0), 1 mM EDTA (pH=8,0)) wurde die DNA gelöst. Anschließend wurde die DNA-Ausbeute photometrisch bestimmt. Die Messung der Extinktion erfolgte im Bio-Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Da Proteine bei 280 nm das UV-Licht absorbieren, kann aus dem Quotienten (260 nm/ 280 nm) auf die Reinheit der DNA-Lösung geschlossen werden. Ergab dieser 1,8, dann lag reine DNA

vor. Bei Verunreinigungen lag der Quotient vermindert vor. Zur Messung wurde eine Verdünnung der DNA-Lösung von 1:69 in Wasser hergestellt. Als Referenzwert diente reines Wasser.

Die Ausbeute bei der Maxi-Präparation lag zwischen 500 µg/ml und 900 µg/ml.

### **2.3 Zellkultur**

HEK 293E+-Zellen (Invitrogen, Groningen, Niederlande) wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Begasungsbrutschrank in feuchter Atmosphäre in T75-Gewebekulturflaschen kultiviert. Als Nährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax verwendet. Es wurde mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 20 mM HEPES-Puffer versetzt.

Die Zellen besitzen eine Verdopplungszeit von 24 Stunden, so dass nach 3-4 Tagen etwa eine 90 %ige Konfluenz erreicht wurde. In einem Verhältnis von 1:10 wurden die Zellen gesplittet. Vorgegangen wurde dabei folgendermaßen: Das verbrauchte Medium wurde zunächst entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin vom Flaschenboden abgelöst. Dann wurde das Trypsin mit 8 ml frischem Medium (DMEM + FCS) inaktiviert. 1 ml der Zellen wurden in neue Kulturflaschen überführt und mit 9 ml Medium aufgefüllt.

#### **2.3.1 Zellkulturtechniken**

##### **1.) Bestimmung der Zellzahl:**

Die Zellzahl wurde in Neubauer Zählkammern bestimmt. Die abtrypsinisierten Zellsuspensionen wurden in einem Verhältnis von 1:1 oder bei vielen Zellen 1:3 (100 µl : 300 µl) mit Trypanblau (Sigma) gemischt. Tote Zellen wurden blau angefärbt und bei der Zellzählung nicht berücksichtigt.

Ein Deckglas wurde auf die Neubauerkammer so aufgesetzt, dass die Newton'schen Ringe zu sehen sind. Mit einer Pipette wurde seitlich das Zell-Trypanblau-Gemisch luftblasenfrei eingebracht.

Die Zellen wurden in vier großen Quadraten, bestehend aus 16 Feldern ausgezählt und der Mittelwert = X gebildet.

Berechnung der Zellzahl pro Milliliter: 1:1 ->  $X \cdot 2 \cdot 10.000$  und 1:3 ->  $X \cdot 4 \cdot 10.000$ .

## **2.) *Transfektion von Zellen nach der Lipofektamin-Methode:***

Bei dieser Methode gehen positiv geladene Lipide (Lipofektamin) mit der negativ geladenen DNA eine spontane Verbindung ein. Der lipophile und positiv geladene Komplex kann nun an die negativ geladene und hydrophobe Zellmembran binden.

Hierfür wurden HEK293-Zellen verwendet, die in ihren Kulturflaschen eine 40 bis 50 %ige Konfluenz aufwiesen. Sie wurden zunächst dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend mit 8 ml serumfreiem Medium überschichtet.

### *Vorbereitung der zu transfezierenden DNA:*

In sterilen 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurde 100 µl serumfreies Medium und 3 µg DNA/Flasche miteinander vermischt. In einem weiteren sterilen Reaktionsgefäß wurde 100 µl serumfreies Medium mit 20 µl Lipofektamin versetzt. Die beiden vorbereiteten Lösungen wurden schließlich zusammengebracht und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl serumfreiem Medium wurde das Gemisch vorsichtig und tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nun wurden die Zellen fünf Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgten zwei Waschschrte mit PBS, um das überschüssige Lipofektamin und tote Zellen zu beseitigen. Anschließend wurde 10 ml Medium mit 10 % FCS hinzugegeben, die Zellen über Nacht kultiviert und nach 18 Stunden in Loch-Platten ausgesät.

Sollten stabil transfezierte Zellen hergestellt werden, so erfolgte am nächsten Tag eine Behandlung der Zellen mit 250 µg/ml Hygromycin B. Der hier verwendete Expressionsvektor pCEP4 trägt ein Resistenzgen für Hygromycin, so dass nur die Zellen unter der Antibiotikabehandlung überleben konnten, die den Vektor mit Hilfe der Lipofektamin-Methode aufgenommen hatten. In Abständen von 3-4 Tagen und über einen Zeitraum von 4 Wochen wurde die Behandlung an den Zellen durchgeführt bis schließlich nur noch HEK 293-Zellen mit dem gewünschten Rezeptor vorlagen. Erst nach dieser Zeit konnten Versuche mit den nun stabil transfezierten Zellen durchgeführt werden. Sie befanden sich dann häufig schon in der 17.-20. Passage. Es wurde ein Test-Bindungsversuch durchgeführt. Erwiesen sich die Zellen als reaktionsfähig, wurden 5 bis 10 Flaschen zum Einfrieren verwendet.

Sollten Versuche mit transient transfezierten Zellen durchgeführt werden, so erfolgte 1 bzw. 2 Tage nach der Transfektion eine Aussaat in Lochplatten.

## **3.) *Einfrieren von Zellen:***

Waren die Zellen zu etwa 80 % in den T75 Flaschen konfluent, so wurden sie abtrypsiniert, zentrifugiert (800 rpm, 0°C, 8 min) und pelletiert. Das überschüssige Medium wurde entfernt und das Pellet mit 1,8 ml kaltem Einfriermedium (70 % Medium, 20 % FCS, 10 % DMSO)

resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in auf Eis stehende Kryoröhrchen überführt und schnellst möglich bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Am nächsten Tag erfolgte die Einbringung in flüssigem Stickstoff für die dauerhaft Lagerung.

#### **4.) Auftauen von Zellen:**

Die Kryo-Einfrierröhrchen mit den Zellen wurden in einem  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad möglichst schnell aufgetaut, dann in ein vorbereitetes Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurde langsam und tropfenweise 8 ml Kulturmedium auf die Zellsuspension gegeben, zur langsamen Verdünnung des Einfriermediums. Danach erfolgte eine Zentrifugation (800 rpm,  $20^{\circ}\text{C}$ , 8 min), eine Resuspension in 10 ml Kulturmedium und eine anschließende Überführung in Gewebekulturflaschen. Nach 24 Stunden im Brutschrank ein Mediumwechsel durchgeführt.

## **2.4 Bioassays**

### **2.4.1 Bindungsstudien**

Das Prinzip der Bindungsstudie ist die Darstellung einer kompetitiven Verdrängungsreaktion am Rezeptor. Hierbei konkurrieren radioaktiv markiertes und nicht radioaktives PTH um den Rezeptor.

Stabil oder transient transfezierte Zellen wurden mit einer Dichte von 250.000 bis 300.000 Zellen / Loch in 24-Loch-Platten ausgesät. Nach 48 - 72 Stunden Inkubation im Brutschrank waren die Zellen dann zu 100 % konfluent und hatten durch ihre Dichte einen erhöhten Zell-Zell-Kontakt, so dass sie sich nicht während der kommenden zahlreichen Waschschriffe ablösten. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit Versuchsmedium (DMEM mit Glutamax, versetzt mit 5 % FCS und 0,5 % BSA) eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  vorinkubiert.

Verdünnungskonzentrationen: In 30  $\mu\text{l}$  Versuchsmedium wurden unterschiedliche Konzentrationen an hPTH (1-34) oder TIP39 in sieben-facher Konzentration angesetzt. Diese wurde als 10 mM Stammlösung in 10 mM Essigsäure und 1 % BSA angesetzt. Für eine Endkonzentration von  $1\mu\text{M}$  betrug die Konzentration der zugegebenen 30  $\mu\text{l}$   $7\mu\text{M}$ .

Nach der Vorinkubationszeit mit Versuchsmedium wurde dieses abgesaugt und 150  $\mu\text{l}$  Versuchsmedium in die Löcher pipettiert. Anschließend wurden die unterschiedlichen nicht radioaktiv markierten PTH- oder TIP39-Konzentrationen in einer Menge von 30  $\mu\text{l}$  auf die

Zellen gegeben. Ebenso wurde in 30 µl gelöst eine konstante Menge an radioaktivem Peptid, das [<sup>125</sup>I]- Nle<sup>8,21</sup>Tyr<sup>34</sup>rPTH (1-34) amid (50.000 cpm/ Loch) dazupipettiert. Dieses musste schnell geschehen, da das nicht radioaktive Parathormon bereits binden konnte. Die unterschiedlichen Konzentrationen an nicht-markiertem PTH wurden in Triplikaten angesetzt. Das Endvolumen im Loch betrug 210 µl. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur über 1 Stunde. Anschließend wurden die Loch-Platten mit den Zellen auf Eis gestellt und zweimal mit 0,5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden sie mit 0,5 ml 1 M NaOH lysiert und in vorbereitete Serumröhrchen überführt. Letzter Vorgang wurde wiederholt und das Lysat im Gamma-Counter gemessen. Im Anschluss wurde noch die genaue Zellzahl/Loch bestimmt. Eigens dafür wurden auf einer Extra-24 Loch-Platte für die jeweilige Zelllinie mit ausgesät. So konnten die ermittelten Werte aus dem Gamma-Counter mittels Excel auf 1 Millionen Zellen normiert werden.

#### **2.4.2) Graphische und rechnerische Auswertung der Daten**

Für jede Rezeptor-transfezierte Zelllinie wurde mit dem Programm Graph Pad Prism<sup>TM</sup> 4.0 für Macintosh (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) mit nicht linearer Regression eine Ausgleichskurve durch die Messwerte gelegt. Bei der Erstellung wurde von der Konkurrenz um eine Bindungsstelle ausgegangen. Dafür wurde die entsprechende Option „one-site-competition“ gewählt. Aus der Verdrängungskurve können mit Hilfe des Programms Prism die IC/EC<sub>50</sub>-Werte der jeweiligen Zelllinie ermittelt werden. IC<sub>50</sub>-Werte werden bei den Bindungsexperimenten berechnet, EC<sub>50</sub>-Werte für den cAMP-Assay und den Inositol-Assay. Zur Berechnung der Expressionsdichte B<sub>max</sub> und Bindungsaffinität K<sub>d</sub> sind die IC/EC<sub>50</sub>-Werte entscheidend.

##### **1.) IC/EC<sub>50</sub>-Werte:**

$$Y = \text{unspezifisch} + \frac{(\text{gesamt} - \text{unspezifisch})}{1 + 10^{\log(\text{PTH}) - \log \text{IC}_{50}}}$$

PTH: Konzentrationen an unmarkiertem Parathormon

Y: cpm (counts per minute), abhängig von unterschiedlichen PTH Konzentrationen

gesamt: cpm bei Abwesenheit von PTH

unspezifisch: cpm bei einer sättigenden PTH Konzentration

IC<sub>50</sub>: Konzentration an unmarkiertem PTH, das die Hälfte der spezifischen Bindungsstellen besetzt (nM)

**2.) Gleichung nach Cheng und Prusoff:**

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{(\text{Radioligand})}{K_d}}$$

K<sub>i</sub>: Affinitätskonstante

(Radioligand): Konzentration an radioaktiv markiertem PTH (nM)

K<sub>d</sub>: Gleichgewichts-Dissoziationskonstante

Unter der Annahme, dass radioaktives PTH und unmarkiertes PTH die gleiche Affinität zum Rezeptor besitzen, so gilt:

$$K_d = K_i = IC_{50} - (\text{Radioligand})$$

**3.) Spezifische Bindung:**

Ist die Bindung eines Liganden am Rezeptor reversibel, folgt sie dem Gesetz der Massenerhaltung. Im Falle des Gleichgewichts gilt:

$$Y = \frac{B_{\max} \times X}{K_d + X}$$

Y: spezifische Bindung (gesamt unspezifisch) (cpm)

X: Konzentration des Radioliganden (nM)

B<sub>max</sub>: bei völliger Sättigung gebundene Stoffmenge (nM)

**4.) Rezeptorzahl:**

Unter den Voraussetzungen wie in den Gleichungen 2. und 3. dargestellt und dass 1 mol aus  $6,022 \times 10^{23}$  Teilchen besteht, ergibt sich folgende Formel für die Gesamtzahl der Rezeptoren/Zelle

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

Zellzahl: am Versuchstag ermittelte Anzahl an Zellen pro Loch

$B_0$ : spezifisch gebundene Counts (gesamt-unspezifisch)

**5.) Radioligandenkonzentration:**

$$\text{Radioligand} = \frac{C(\text{cpm})/Y(\text{cpm/fmol})}{V(\text{ml})} \times \frac{0.001 (\text{pmol/fmol})}{0.001 (\text{l/ml})}$$

C: gemessene cpm

V: Volumen der Lösung (Bindungsexperimente: 210  $\mu$ l)

Y: Spezifische Aktivität des Radioliganden (Umrechnung siehe 6.)

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

(1 Ci entspricht  $2,22 \times 10^{12}$  Zerfällen pro Minute)

$$Y(\text{cmol/fmol}) = Z(\text{Ci / mmol}) \times 2,22 \times E$$

Z: spezifische Aktivität des Radioliganden in Ci/mmol

E: Effizienz des Counters (1 = 100%). Berthold LB2111  $\gamma$ -Counter mit einer Effizienz von 75% (= 0,75)

### 2.4.3 Inositoltriphosphatmessung

Die Zelllinien wurden in 6-Loch-Platten mit einer Dichte von 400.000 Zellen pro Loch sowie 1ml Kulturmedium ausgesät. Wie schon bei den Bindungsexperimenten, wurden auch hier Triplikate bestimmt. 24 h vor Versuchsbeginn wurde das Medium abgesaugt und eine Beladung der Zellen mit 2  $\mu\text{Ci/ml}$  Myo- $[\text{}^3\text{H}]$ -Inositol vorgenommen. Dieses entspricht 2 $\mu\text{l}$  Myo- $[\text{}^3\text{H}]$ -Inositol / ml Kulturmedium. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde der radioaktive Überstand abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Versuchsmedium (DMEM, 10 % FCS, 20 mM Hepes-Puffer, 10 mM Lithiumchlorid) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Versuchsmedium, das mit den jeweiligen Konzentrationen an PTH und TIP39 versetzt wurde, 1 h bei 37°C/ 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Konzentrationen wurden 1000 nM oder 3000 nM verwendet.

Nach einer 1-stündigen Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und 1 ml 20 mM eiskalte Ameisensäure, zur Lyse der Zellen, zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation von 1 Stunde bei 4°C. Dann wurde der Überstand in Glasröhrchen überführt und Na<sub>4</sub>OH (1:10 verdünnt) zugegeben, bis eine Neutralisation (pH-Wert von 7 bis 8) erreicht wurde.

*Die Anionen-Austausch-Chromatographie:*

Hierbei werden die akkumulierten Gesamtinositole von anderen  $[\text{}^3\text{H}]$ -markierten Substanzen über Minigelchromatographiesäulen, sogenannte Poly-Prep-Säulen (BioRad) abgetrennt. Verwendet wurde hierfür der Ionenaustauscher AG1-X8 Resin. 0,5 g Resin wurden in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und mehrfach gewaschen. Mit 1,4 ml wurden dann die Polyprepsäulen beladen. Es durften dabei keine Luftblasen eingebracht werden. Bis zum Gebrauch mussten die Säulen feucht gehalten werden.

Bevor das Zelllysate aus den Glasröhrchen auf die Säulen gegeben werden konnte, um diese vollständig zu durchlaufen, wurden zunächst 60  $\mu\text{l}$  jeder Probe in kleine Szintillatorröhrchen überführt und mit 250  $\mu\text{l}$  Szintillatorflüssigkeit vermengt. Hierbei konnte die Gesamtmenge der von den Zellen aufgenommenen Radioaktivität im Beta-Counter festgestellt werden (= 1. Fraktion). Anschließend wurden nun die Säulen mit dem restlichen Zelllysate in sechs Durchgängen mit je 4 ml Waschpuffer (60 mM [4,08 g/l] Natriumsalz der Ameisensäure, 5 mM [1,91 g/l] Borax ) gewaschen.

Die radioaktiven Gesamtinositole wurden mit 0,5 ml Elutionspuffer E (2 mM Ammoniumsalz der Ameisensäure und 0,1 M Ameisensäure) zwei mal eluiert, wobei das zweite Eluat als Kontrolle diente (= 3. Fraktion). Dieser Wert sollte möglichst klein ausfallen, um sicher zu

gehen, dass alles radioaktive Inositol im ersten Eluat vorlag (= 2. Fraktion). Nach Zugabe von 4,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ready Protein+) wurden die Proben für jeweils 5 min im Beta-Counter gemessen.

#### **2.4.4 Pharmakologische Hemmung der Proteinkinasen A und C**

Um eine möglicherweise sehr geringe, aber signifikante PTH abhängige Inositolproduktion der Hybridrezeptoren nicht zu übersehen, wurde die Inositoltriphosphatmessung durch einen weiteren Schritt ergänzt.

Es wurden hierfür zwei spezifische Hemmstoffe der Proteinkinasen A und C (PKA und PKC) verwendet. Für die PKA wurde das Isoquinolin-Sulfonamid-Derivat H-89 als hemmende Substanz eingesetzt. Dadurch konnte die PKA abhängige Phosphorylierung des PTH-1 Rezeptors blockiert werden. Das Bisindolylmaleimid-Derivat GF 109203X kann die PKC spezifisch hemmen, dadurch wird die PKC abhängige Phosphorylierung des Rezeptors verhindert. Es wurden mit der PKA und PKC keine spezifischen Kinasen gehemmt, sondern jeweils die ganze Gruppe der Isoenzyme.

Folgende *Konzentrationen* wurden für die Proteinkinaseinhibitoren verwendet:

30  $\mu\text{M}$  H-89 und 6  $\mu\text{M}$  GF 109203X.

Es wurden beide Substanzen dem Versuchsmedium zugeführt. Es wurde das Gemisch für 1 h bei 37°C vorinkubiert, bevor der eigentliche Versuch folgte.

#### **2.4.5 cAMP Messung**

Zur Bestimmung des intrazellulären cAMPs (zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat) wurden die Zellen mit einer Dichte von 350.000 Zellen / Loch in 12-Loch-Platten ausgesät. Nach einer Inkubation von 48 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> und Erreichen einer möglichst hohen Konfluenz, wurden die Zellen, nach Absaugen des Kulturmediums, 1 h mit 1 ml Versuchsmedium (DMEM mit Glutamax, 1 % BSA (95%), 1 mM IBMX, 20 mM HEPES-Puffer) vorinkubiert. In dieser Zeit wurden unterschiedliche Konzentrationen für hPTH (1-34) oder TIP39 erstellt. Folgende Konzentrationen wurden dafür gewählt:

0  $\mu\text{M}$  (Kontrolle), 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ . Für 15 min bei 37°C/ 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml 95 %igen Ethanol (pH=3) und anschließender Inkubation bei 4°C für 2 h lysiert. Der Überstand, der nun unter anderem das gelöste cAMP

enthielt, wurde in Glasröhrchen überführt. Die Röhrchen konnten nun entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder gleich unter Begasung mit  $\text{N}_2$  im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  abgedampft werden. Das nun lyophilisierte cAMP wurde in 1 ml Assay-Puffer, der im cAMP-RIA-Kit mitgeliefert wurde, gelöst. Auch hier ist ein Einfrieren der Röhrchen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  möglich.

Messung des cAMP im *Radio-Immuno-Assay* (RIA):

Das Prinzip des eingesetzten cAMP-RIA-Kits ist die Verwendung von Röhrchen, die mit monoklonalen Antikörpern gegen cAMP beschichtet sind. Hierbei wird eine konstante Menge an [ $^{125}\text{I}$ ]-cAMP zugegeben, die durch das cAMP in der zu messende Probe kompetitiv verdrängt wird. Die an den Antikörper gebundene Radioaktivität, die nach der Entfernung des Überstandes gemessen wird, ist somit umgekehrt proportional zur cAMP-Konzentration in der Probe.

Nach Herstellung einer Verdünnung im Verhältnis 1:20 wurden 100  $\mu\text{l}$  dieser Verdünnung in Antikörperbeschichtete Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  mit [ $^{125}\text{I}$ ]-cAMP erfolgte eine 18 stündige Inkubation bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Nach Absaugen des Überstandes wurde das gebundene Radioaktivität im  $\gamma$ -Counter gemessen.

Mit dem Kit wurden Standardkonzentrationen geliefert, woraus eine Eichkurve erstellt werden konnte. Damit konnte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die cAMP-Konzentration der Proben bestimmt werden.

## 2.5 [ $\text{Ca}^{2+}_i$ ] Messung

Nach Stimulation mit PTH kommt es über den Inositoltriphosphatweg zu einer Freisetzung von intrazellulärem Kalzium. Für die Messung wurden die Zellen in einer Dichte von etwa 50.000 Zellen/ml auf poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesät. Um das Wachstum der Zellen in der Fläche einzuschränken, wurde ein Ring von 1 cm Durchmesser auf die Fläche gesetzt. Die Deckgläser wurden in Petrischalen gelegt und mit Nährmedium (500  $\mu\text{l}$  DMEM-Medium + 10%FCS + HEPES) für 48 Stunden im Brutschrank ( $37^{\circ}\text{C}$  / 5%  $\text{CO}_2$ ) inkubiert. Bei einer etwa 50 %igen Konfluenz konnten die Zellen für den Versuch verwendet werden.

*Versuchsdurchführung:*

30 min vor Versuchbeginn wurde das Nährmedium aus den Schalen abgesaugt und die Zellen drei mal mit Puffer C (25 mM HEPES, 0,4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM KCl, 150 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM D-Glukose (pH 7,4))gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 $\mu\text{M}$

Fluo-3-acetoxymethylester (Fluo-3 AM) beladen und 30 min im Brutschrank (37°C / 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Hinterher wurden die Zellen drei mal mit Puffer C gewaschen, um das extrazelluläre Fluo-3 und nicht adhäsive Zellen zu beseitigen. Die Platten wurden in eine luftdichte, Temperatur kontrollierbare (30°C) FCS-2 Perfusionskammer eingespannt und auf dem Mikroskoptisch befestigt. Zur Darstellung und Registrierung der Zellveränderungen dient ein konfokales Lasermikroskop. Dieses bestand aus einem Krypton-Argon-Laser sowie einem Computer und der dazu gehörenden BioRad „Laser Sharp-Aquisition“ Software. Mit Hilfe des Programms konnten am Bildschirm 20 Zellen und der schwarze Hintergrund (Baseline I<sub>0</sub>) markiert werden. Gemessen wurde die Substanz Fluo-3 AM bei einer Wellenlänge von 486 nm. Die intrazellulären Veränderungen der Calciumkonzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wurden als relative Veränderungen der Fluo-3 assoziierten Fluoreszenzintensität gegenüber dem Hintergrund (Baseline I<sub>0</sub>) dargestellt und als Zahlenwerte präsentiert.

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an hPTH (1-34) (1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM, gelöst in Puffer C und 1% BSA) stimuliert. Außerdem wurde in Puffer C gelöstes Thrombin (2U) verwendet, das als Positivkontrolle dienen sollte.

Alle Perfusorlösungen (Puffer C, PTH, Thrombin) wurden mittels Spritzenpumpen mit einer Durchflussrate von 500 µl/min über Teflon-Schläuche in das System eingebracht. Die Perfusionsdauer während des Versuchs wurde für Puffer C auf etwa drei Minuten, für PTH oder Thrombin auf eine Minute beschränkt. Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten, die das Computerprogramm in Zahlenwerte darstellen konnte, wurden anschließend mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Office) in einem Diagramm erfasst. Aus den 20 Einzelkurven wurden Mittelwertkurven gebildet.

### III Ergebnisse

#### 1 Hybridrezeptoren des PTH-1 und PTH-2 Rezeptors

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen des PTH-1 Rezeptors mit der des PTH-2 Rezeptors, dann findet sich eine etwa 45%ige Sequenzhomologie. Zahlreiche Aminosäureabschnitte sind identisch oder weisen große Gemeinsamkeiten auf. Der PTH-2 Rezeptor zeigt im Gegensatz zum PTH-1 Rezeptor allerdings keine Ankopplung an den Phospholipase C Signalweg. Für die zweite Schleife des PTH-1 Rezeptors der Ratte wurde eine Aminosäure-Abfolge („EKKY“) gefunden, die für die Ankopplung an den Phospholipase C Signalweg von entscheidender Bedeutung ist (Iida-Klein, Guo et al. 1997). Auch für die dritte Schleife konnten Bereiche identifiziert werden, die für die Aktivierung von Inositoltriphosphat wichtig sind (Huang, Chen et al. 1996).

Mit einer schrittweisen Angleichung der PTH-2 Rezeptorsequenz an die des PTH-1 Rezeptors sollte eine Ankopplung an den Phospholipase C Signalweg rekonstruiert werden. Hierfür wurden unterschiedliche Rezeptormutanten generiert (Abbildung 1.1):

In der zweiten intrazellulären Schleife wurde an Position 272 und 273 ein Austausch der Aminosäuren Asparaginsäure (D) und Threonin (T) zu Glutaminsäure (E) und Lysin (L) vorgenommen (DT->EK). Daraus ergab sich die Mutante P2R-L2.

In der dritten intrazellulären Schleife erfolgte an Position 344 und 345 ein Austausch der Aminosäuren Isoleucin (I) und Thryptophan (W) zu Leucin (L) und Arginin (R) (IW->LR). Die Mutante wird P2R-L3 genannt.

Der etwa 150 Aminosäuren lange C-Terminus (T440-Ende) wurde vollständig ausgetauscht, da die Aminosäureunterschiede wesentlich größer sind. Die Mutante wird im Folgenden P2R-P1T genannt.

Außerdem wurden Kombinationen aus den einzelnen Mutationen generiert:

Die Mutationen aus Schleife zwei und drei wird als P2-L2-L3 und die Kombination aus allen drei Mutationen P2R-L2-L3-P1T.

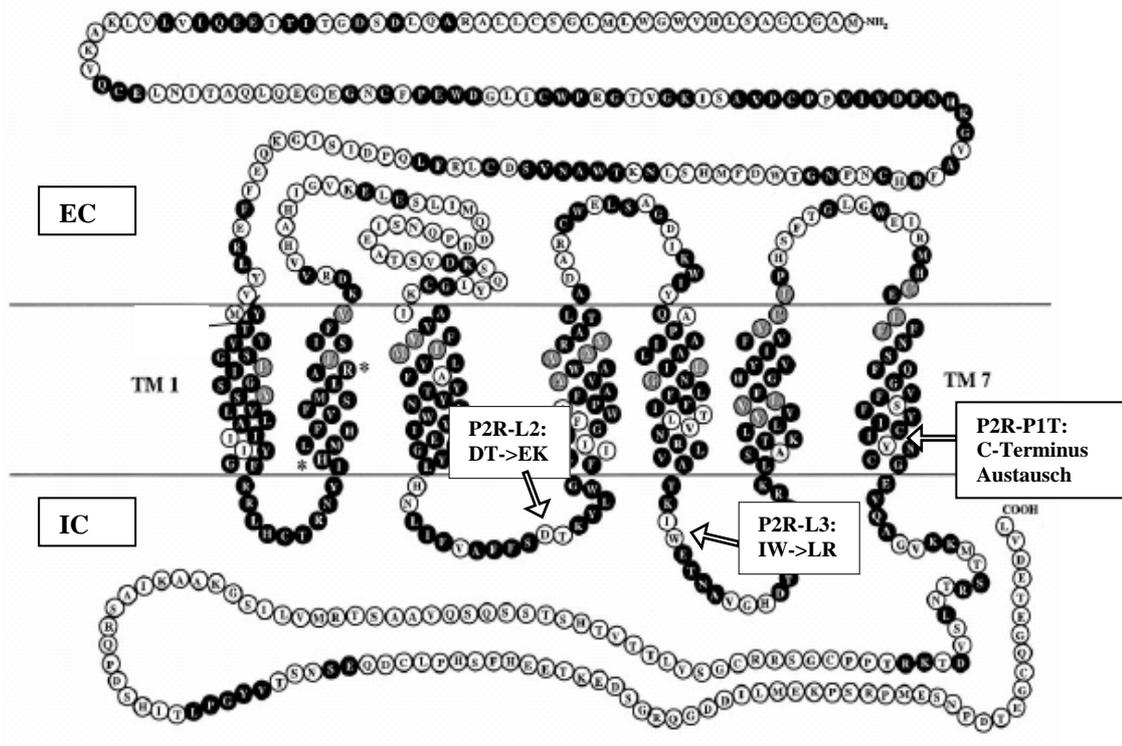


Abbildung 1.1: Darstellung des PTH-2 Rezeptors in seiner Aminosäuresequenz. Die Blockpfeile deuten auf die intrazellulären Abschnitte hin, an denen Mutationen zu einer schrittweisen Angleichung des P2R an den P1R führten. Es sind die einzelnen Mutationen in der zweiten (P2R-L2: DT->EK) und dritten (P2R-L3: IW->LR) Schleife sowie der Austausch des C-Terminus an Position 416 (P2R-P1T) dargestellt.

Lage der sieben Transmembrandomänen (TM 1-7) und die verbindenden intrazellulären (IC) und extrazellulären (EC) Schleifen sind hier dargestellt. Anlehnung der Abbildung an Turner et al.

## 2 Bindungsexperimente

### 2.1 Bindungen mit dem Liganden hPTH (1-34) (unverdünnt)

Kompetitive Bindungsexperimente, bei denen radioaktiv markiertes [ $^{125}\text{I}$ ]-Nle<sup>8,21</sup>-Tyr<sup>34</sup>-rat PTH(1-34) und hPTH(1-34) als Liganden verwendet wurden, konnten zeigen, dass alle Rezeptormutanten auf der Zelloberfläche präsentiert wurden (Abbildung 2.1). Die Bindung an die Rezeptoren ist dosisabhängig. Je mehr nicht radioaktives hPTH (1-34) zu einer konstant bleibenden Menge an radioaktivem PTH hinzugegeben wurde, um so mehr ließ sich vom radioaktiven Peptid verdrängen. Logarithmisch dargestellt resultiert ein steiler Kurvenverlauf aus diesen Werten. Dieser ist abhängig von verschiedenen Parametern, wie zum Beispiel der Expressionsdichte der Rezeptoren und der Bindungsaffinität. Mit Hilfe der Bindungen konnten  $\text{IC}_{50}$  Werte ermittelt werden, die Auskunft über die Affinität des Peptids an den Rezeptor geben (Tabelle 2.1).

Der Kurvenverlauf der Wildtyprezeptoren unterscheidet sich zu dem der Hybridrezeptoren nur gering. Die Verdrängungskurve des P1R ist am weitesten nach links verschoben. Hier zeigt sich eine bessere Affinität des Liganden zum Rezeptor.

*Ergänzung zu den folgenden Abbildungen:*

Die Wildtyp- und Hybridrezeptoren wurden immer komplett in einem Experiment untersucht. Die Darstellung in zwei getrennten Abbildungen (A und B) wurde zur besseren Übersicht gewählt. Alle weiteren Bindungsabbildungen werden in gleicher Weise dargestellt.

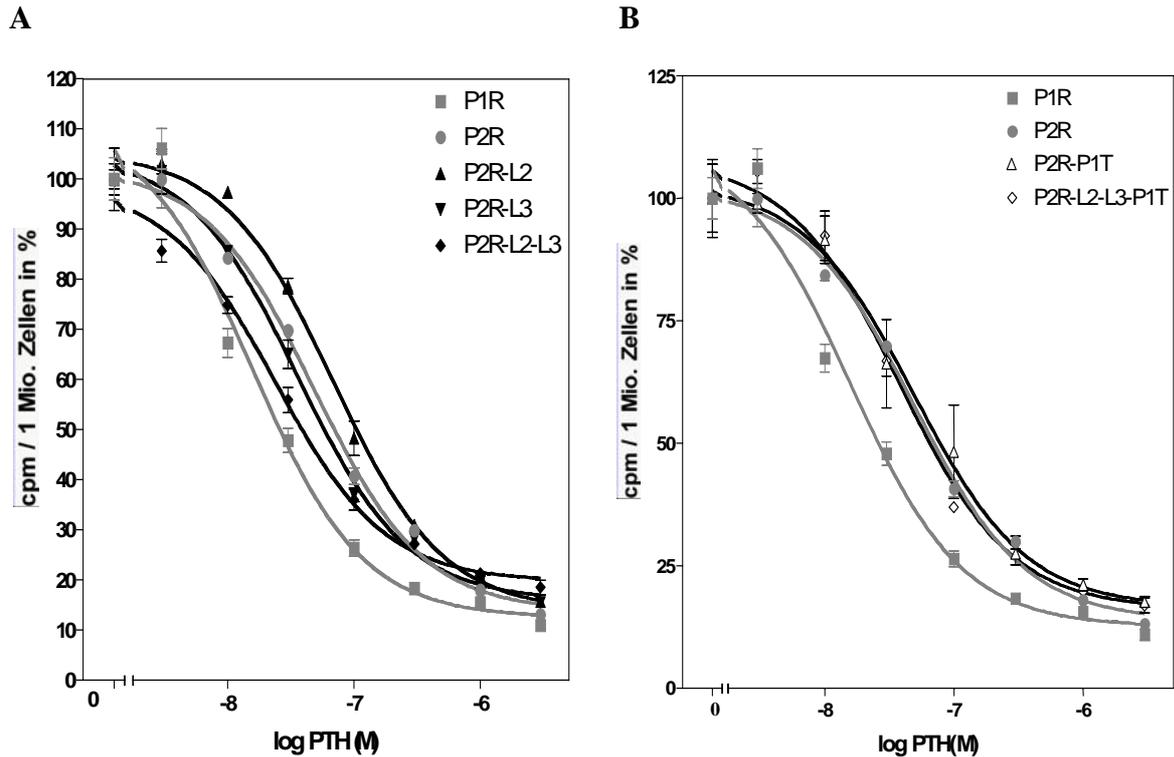


Abbildung 2.1: Kompetitive Bindungsstudie mit den Wildtyprezeptoren P1R und P2R und den Hybridrezeptoren nach PTH-Stimulation (unverdünn). Dargestellt sind Verdrängungskurven aus einem Bindungsexperiment (n = 17). Als Liganden wurden radioaktiv markiertes [ $^{125}$ I]-Nle<sup>8,21</sup>-Tyr<sup>34</sup>-rat PTH(1-34) amid und hPTH (1-34) verwendet. HEK 293 E+ Zellen wurden mit der cDNA der Hybridrezeptoren und der Wildtyprezeptor-DNA stabil transfiziert. Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte (+/- SEM) aus einer Triplikatbestimmung. Darstellung in einer Kurve mittels einer nichtlinearen Regression. Auf der X-Achse sind logarithmisch dargestellt die hPTH(1-34) Konzentrationen. Die auf der Y-Achse gezeigten Zerfälle pro Minute (cpm) in Prozent entsprechen dem gebundenen [ $^{125}$ I]-rPTH (1-34).

**A:** Vergleich der Wildtyprezeptoren P1R und P2R (grau) mit den Hybridrezeptoren P2R-L2, P2R-L3 und P2R-L2-L3.

**B:** Vergleich der Wildtyprezeptoren P1R und P2R (grau) mit den Hybridrezeptoren P2R-P1T und P2R-L2-L3-P1T

Aus den kompetitiven Verdrängungsexperimenten kann die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub> Wert) ermittelt werden (Tabelle 2.1). Die mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism<sup>TM</sup> 4.0 ermittelten IC<sub>50</sub> Werte lagen für die Wildtyprezeptoren weit über den in der Literatur angegebenen Werten (P1R: 3 – 6 nM, P2R: 10 – 20 nM) (Gardella, Luck et al. 1996; Gardella, Luck et al. 1996). Die Verdrängungskurven sind für die Wildtyp- und die Hybridrezeptoren alle nach rechts verschoben. Die Ursache ist in einer unphysiologisch hohen Rezeptorexpression auf den einzelnen Zellen zu suchen (Tabelle 2.2).

Rezeptor	IC <sub>50</sub> Wert (nM)
<b>P1R</b>	25 ± 6
<b>P2R</b>	89 ± 30
<b>P2R-L2</b>	92 ± 21
<b>P2R-L3</b>	65 ± 30
<b>P2R-L2-L3</b>	57 ± 20
<b>P2R-P1T</b>	41 ± 8
<b>P2R-L2-L3-P1T</b>	56 ± 23

*Tabelle 2.1: Errechnete IC<sub>50</sub> Werte für die Wildtyprezeptoren P1R und P2R und die Hybridrezeptoren. Die Werte wurden mit Hilfe des Programm Graph Pad Prism™ 4.0 ermittelt und beziehen sich auf die in Abbildung 2.1 dargestellte kompetitive Verdrängungskurve, die sich aus Triplikatbestimmungen ergeben hatte (n = 17).*

Für den Wildtyp P1R konnte gezeigt werden, dass dieser die größte Affinität zum Liganden hPTH (1-34) besitzt. Unter den Bedingungen der hohen Rezeptordichte zeigt der P2R eine deutlich schlechtere Affinität. Die errechneten IC<sub>50</sub> Werte der Hybridrezeptoren liegen innerhalb oder unterhalb des für den Wildtyp P2R dargestellten Bereichs (41 – 92 nM). Die schlechteste Affinität zum Liganden zeigt die Rezeptormutante P2R-L2 und die beste der P2R-P1T.

Rezeptoren	Expressionsdichte Rez./Zelle in Mio.	K <sub>D</sub> (nM)
<b>P1R</b>	8,3 ± 3,1	31,3 ± 16,8
<b>P2R</b>	22,4 ± 12,1	90,9 ± 29,5
<b>P2R-L2</b>	18,4 ± 8,9	96,5 ± 19,2
<b>P2R-L3</b>	15,8 ± 13,8	62,2 ± 27,4
<b>P2R-L2-L3</b>	10,2 ± 6,2	56,9 ± 20,3
<b>P2R-P1T</b>	7,6 ± 4,9	41,4 ± 14,9
<b>P2R-L2-L3-P1T</b>	11,2 ± 5,9	56,2 ± 24,1

*Tabelle 2.2: Errechnete Expressionsdichte der Rezeptoren auf einer Zelle und die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K<sub>d</sub>. Die Werte wurden an Hand der Formeln wie im Kapitel (Material Methoden) 2.4.2 berechnet und beziehen sich auf die in Abbildung 2.1 dargestellte kompetitive Verdrängungskurve, die sich aus Triplikatbestimmungen ergeben hatten (n = 17).*

Auf das Bindungsverhalten der Rezeptoren haben die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_d$  und die Expressionsdichte der Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen Einfluß. (Tabelle 2.2) Hierbei zeigte der Wildtyprezeptor P2R die höchste Expressionsdichte auf und der Hybridrezeptor P2R-P1T die niedrigste. Der Wildtyprezeptor P1R hatte etwa halb so viele Rezeptoren auf der Zelloberfläche wie der P2R und gleich viele wie der P2R-P1T. Der P1R und der P2R-P1T zeigten ähnliche Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_d$  sowie auch die niedrigsten  $EC_{50}$  Werte und damit die höchste Affinität zum Liganden hPTH (1-34). Alle weiteren Rezeptormutanten hatten zwischen 1 und 1,8 Millionen Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

Eine ähnliche Expressionsdichte an Rezeptoren auf der Zelloberfläche ist entscheidend für die Aussagekraft der Versuche zum Signaltransduktionsverhalten. Eine niedrige Rezeptorzahl könnte für einen abgeschwächten oder nicht angekoppelten Signalweg verantwortlich sein.

### **2.2 Bindungen mit dem Liganden hPTH (1-34) (1:10 mit HEK-293 Zellen verdünnt)**

Um das Phänomen einer Rechtsverschiebung der Verdrängungskurven durch eine zu hohe Rezeptorexpression auf den einzelnen Zellen zu reduzieren, wurden die Zellen vor der Aussaat mit nicht transfezierten HEK-293 E+ Zellen 1:10 verdünnt. Im Gesamtansatz wird so die Menge der vorhandenen Rezeptoren pro Loch reduziert. Die rechnerische Voraussetzung für die Berechnung der Expressionsdichte, dass die Konzentration des radioaktiven Liganden im Ansatz durch die Bindung an den Rezeptor nicht wesentlich verändert wird, ist somit wieder hergestellt (Abbildung 2.2). Im Vergleich zu den Bindungsexperimenten im Kapitel 2.1 kam es hierbei zu einer deutlichen Linksverschiebung der Verdrängungskurven auf der X-Achse.

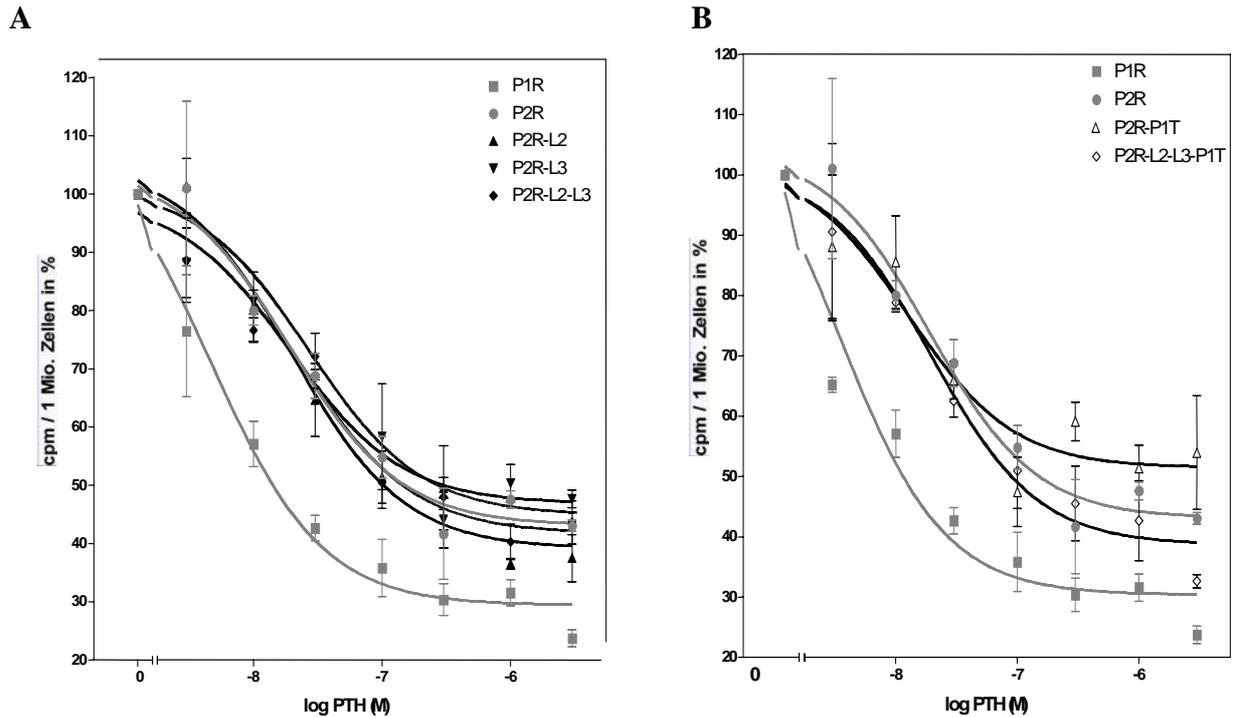


Abbildung 2.2: Kompetitive Bindungsstudie mit den Wildtyprezeptoren P1R und P2R und den Hybridrezeptoren nach PTH-Stimulation. Die Zellen wurden vor der Aussaat mit nicht transfizierten HEK 293 E+ Zellen im Verhältnis 1:10 verdünnt. Als Liganden wurden radioaktiv markiertes [ $^{125}$ I]-Nle<sup>8,21</sup>-Tyr<sup>34</sup>-rat PTH(1-34) amid und hPTH (1-34) verwendet. HEK 293 E+ Zellen wurden mit der cDNA der Hybridrezeptoren und der Wildtyprezeptor-DNA stabil transfiziert. Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte (+/- SEM) aus einer Triplikatbestimmung. Darstellung in einer Kurve mittels einer nichtlinearen Regression. Auf der X-Achse sind logarithmisch dargestellt die hPTH(1-34) Konzentrationen. Die auf der Y-Achse gezeigten Zerfälle pro Minute (cpm) in Prozent entsprechen dem gebundenen [ $^{125}$ I]-rPTH (1-34).

**A:** Vergleich der Wildtyprezeptoren P1R und P2R (grau) mit den Hybridrezeptoren P2R-L2, P2R-L3 und P2R-L2-L3.

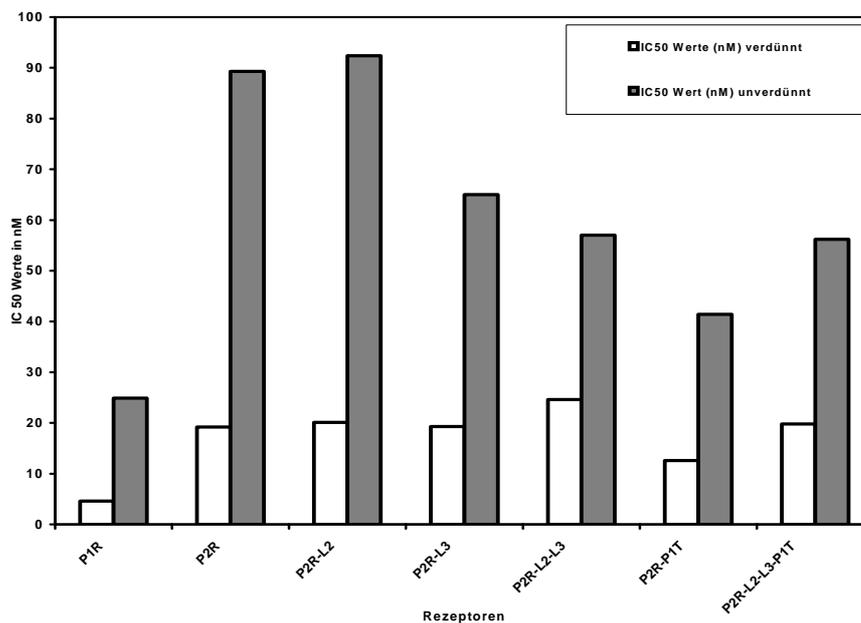
**B:** Vergleich der Wildtyprezeptoren P1R und P2R (grau) mit den Hybridrezeptoren P2R-P1T und P2R-L2-L3-P1T

Die Linksverschiebung der Verdrängungskurven spiegelt sich auch in den  $IC_{50}$  Werten wieder. Die Werte der Wildtyprezeptoren P1R (5 nM) und P2R (19 nM) sind nun mit den Angaben aus der Literatur (siehe Kapitel 2.1) vergleichbar. Die  $IC_{50}$  Werte der Hybridrezeptoren (13 – 25 nM) liegen innerhalb des für den P2R angegebenen Bereichs. Die Kombinationsmutante P2R-L2-L3 zeigt eine etwas schlechtere Affinität zum Liganden ( $IC_{50}$  25 nM) als die übrigen Hybridrezeptoren (Tabelle 2.3). Die Expressionsdichte an Rezeptoren pro Zelle fiel bei den Bindungsexperimenten mit einer HEK 293 E+ Verdünnung gleich hoch aus wie bei den unverdünnten. Pro Zelle zwischen 1,1 und 2,6 Millionen Rezeptoren.

Die Abbildung 2.3 vergleicht die IC<sub>50</sub> Werte aus den Bindungsexperimenten mit und ohne zur Verdünnung zugegebenen HEK 293 E+ Zellen.

Rezeptoren	IC <sub>50</sub> Werte (nM)
<b>P1R</b>	5
<b>P2R</b>	19
<b>P2R-L2</b>	20
<b>P2R-L3</b>	19
<b>P2R-L2-L3</b>	25
<b>P2R-P1T</b>	13
<b>P2R-L2-L3-P1T</b>	20

*Tabelle 2.3: Errechnete IC<sub>50</sub> Werte für die Wildtyprezeptoren P1R und P2R und die Hybridrezeptoren. Die Zellen wurden vor der Aussaat mit nicht transfizierten HEK 293 E+ Zellen im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Werte wurden mit Hilfe des Programm Graph Pad Prism™ 4.0 ermittelt und beziehen sich auf die in Abbildung 2.2 dargestellte kompetitive Verdrängungskurve, die sich aus Triplikatbestimmungen ergeben hatte (n = 2).*



*Abbildung 2.3: Zusammenfassung der errechneten IC<sub>50</sub> Werte aus den Tabellen 2.1 und 2.3 für die Wildtyprezeptoren (P1R, P2R) und die Hybridrezeptoren in einem vergleichenden Säulendiagramm. Die weiß ausgefüllten Säulen entsprechen den IC<sub>50</sub> Werten aus den Bindungen mit nicht transfizierten HEK 293 E+ Zellen im Verhältnis 1:10. Die grau ausgefüllten Säulen entsprechen den IC<sub>50</sub> Werten aus den kompetitiven Bindungsexperimenten in denen alle Zellen Hybrid- oder Wildtyprezeptoren tragen. Die verschiedenen Rezeptoren sind auf der X-Achse aufgeführt, die IC<sub>50</sub> Werte auf der Y-Achse. Die Standardabweichungen sind hier nicht aufgeführt.*

### 2.3 Bindungen mit dem Liganden TIP39

Da der P2R nicht nur hPTH, sondern auch TIP39 bindet, wurden kompetitive Bindungsstudien mit dem Peptid TIP39 an den Wildtyp- und Hybridrezeptoren durchgeführt. Auch in diesen Bindungsexperimenten wurde das Problem der Rechtsverschiebung der Verdrängungskurven durch eine zu hohe Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche deutlich. Auf die Darstellung in einer Abbildung wurde verzichtet. Die Zellen wurden, wie schon in den Bindungen mit hPTH (1-34) gezeigt (Kapitel 2.2), vor der Aussaat mit nicht transfezierten HEK 293 E+ Zellen im Verhältnis 1:10 verdünnt. Als nicht radioaktiv markierter Ligand wurde TIP39 verwendet.

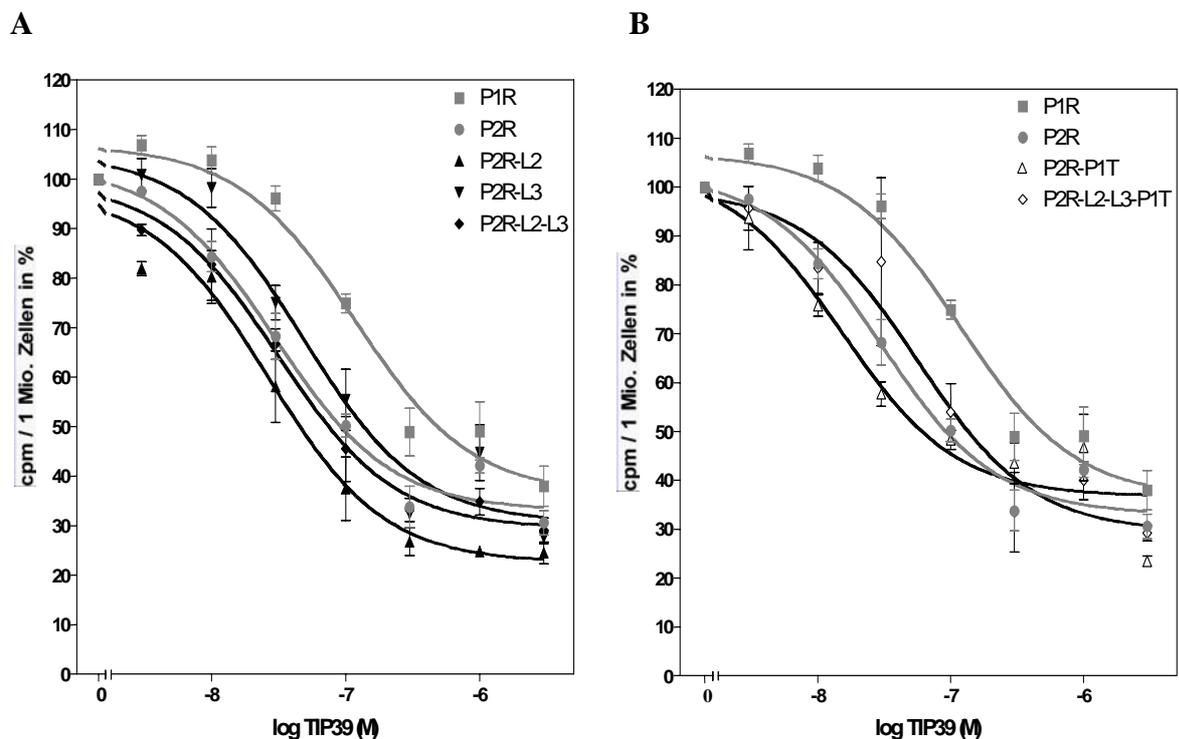


Abbildung 2.4: Kompetitive Bindungsstudie mit den Wildtyprezeptoren P1R und P2R und den Hybridrezeptoren nach TIP39-Stimulation. Die Zellen wurden vor der Aussaat mit nicht transfezierten HEK 293 E+ Zellen im Verhältnis 1:10 verdünnt. Als Liganden wurden radioaktiv markiertes  $[^{125}\text{I}]\text{-Nle}^{8,21}\text{-Tyr}^{34}\text{-rPTH}(1-34)$  amid und TIP39 verwendet. HEK 293 E+ Zellen wurden mit der cDNA der Hybridrezeptoren und der Wildtyprezeptor-DNA stabil transfeziert. Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus einer Triplikatbestimmung. Darstellung in einer Kurve mittels einer nichtlinearen Regression. Auf der X-Achse sind logarithmisch dargestellt die TIP39 Konzentrationen. Die auf der Y-Achse gezeigten Zerfälle pro Minute (cpm) in Prozent entsprechen dem gebundenen  $[^{125}\text{I}]\text{-rPTH}(1-34)$ . (n = 2)

**A:** Vergleich der Wildtyprezeptoren P1R und P2R (grau) mit den Hybridrezeptoren P2R-L2, P2R-L3 und P2R-L2-L3.

**B:** Vergleich der Wildtyprezeptoren P1R und P2R (grau) mit den Hybridrezeptoren P2R-P1T und P2R-L2-L3-P1T

In der kompetitiven Verdrängungskurve (Abbildung 2.4) wird gezeigt, dass TIP39 den radioaktiv markierten Liganden [<sup>125</sup>I]-Nle<sup>8,21</sup>-Tyr<sup>34</sup>-rat PTH(1-34) vom Rezeptor verdrängen kann. An Hand der IC<sub>50</sub> Werte (Tabelle 2.4) kann gezeigt werden, dass die Bindung von TIP39 an den P2R ähnlich erfolgt wie es für hPTH in Kapitel 2.2 dargestellt wird. Wie schon in früheren Arbeiten nachgewiesen (Hansen, Jakob et al. 2002), zeigt der P1R gegenüber TIP39 eine deutlich schlechtere Bindungsaffinität als gegenüber hPTH (1-34) (IC<sub>50</sub> 116 nM (TIP39) vs. 5 nM (PTH)) . Die Verdrängungskurve ist weit nach rechts verschoben. TIP39 wirkt am P1R als kompetitiver Antagonist. Die Affinität der Hybridrezeptoren zu TIP39 ist mit denen des Wildtyprezeptors P2R vergleichbar.

Rezeptoren	IC <sub>50</sub> Werte (nM)
<b>P1R</b>	116
<b>P2R</b>	30
<b>P2R-L2</b>	26
<b>P2R-L3</b>	48
<b>P2R-L2-L3</b>	31
<b>P2R-P1T</b>	15
<b>P2R-L2-L3-P1T</b>	56

*Tabelle 2.4: Errechnete IC<sub>50</sub> Werte für die Wildtyprezeptoren P1R und P2R und die Hybridrezeptoren. Die Zellen wurden vor der Aussaat mit nicht transfizierten HEK 293 E+ Zellen im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Werte wurden mit Hilfe des Programm Graph Pad Prism<sup>TM</sup> 4.0 ermittelt und beziehen sich auf die in Abbildung 2.4 dargestellte kompetitive Verdrängungskurve, die sich aus Triplikatbestimmungen ergeben hatte. (n = 2)*

### 3 Inositoltriphosphatmessungen (IP<sub>3</sub>)

#### 3.1 Stimulation mit dem Liganden hPTH (1-34)

Um die Aktivierung des Phospholipase C Wegs nachzuweisen, kann man Botenstoffe wie das Inositoltriphosphat oder Ca<sup>2+</sup> als Nachweisparameter verwenden. Dieser Signalweg kann beim P1R über die Liganden hPTH (1-34) aktiviert werden. Weder eine Stimulation mit hPTH (1-34) noch mit TIP39 führt am P2R zu einer Aktivierung des G<sub>αq</sub> Proteins und damit zu einer Ankopplung an den PLC Signalweg. Mit Hilfe von Hybridrezeptoren, die sich vom P1R und P2R ableiten, soll versucht werden den PLC Signalweg wieder herzustellen. Die Wildtyp- und Hybridrezeptoren werden hier mit dem Liganden hPTH (1-34) stimuliert.

Am P1R kann ein fast 5-facher Anstieg an akkumulierten Gesamtinositolen gegenüber dem Basalwert nachgewiesen werden ( $p \leq 0.05$ ) (Abbildung 3.1). In der Dosis-Wirkungskurve für den P1R zeigt sich ein  $EC_{50}$  Wert von 58 nM, der mit Werten aus der Literatur vergleichbar ist (Castro, Dicker et al. 2002) (Abbildung 3.2).

Die Angleichungen der zweiten (P2R-L2) und auch der dritten intrazellulären Schleife (P2R-L3) führt nicht zu einer messbaren Akkumulation von  $IP_3$ . Der Austausch des kompletten intrazellulär gelegenen C-Terminus des P2R gegen den des P1R (P2R-P1T), zeigt ebenfalls nach einer Stimulation mit hPTH (1-34) keine Akkumulation von  $IP_3$ . Selbst die Kombinationen aus einzelnen Hybridrezeptoren (P2R-L2-L3 und P2R-L2-L3-P1T), die eine drastische Angleichung an den P1R aufweisen (beim P2R-L2-L3-P1T ~ 90 %ige Sequenzhomologie zum P1R), konnte ebenfalls der PLC Signalweg mit der Akkumulation von  $IP_3$  nicht nachgewiesen werden.

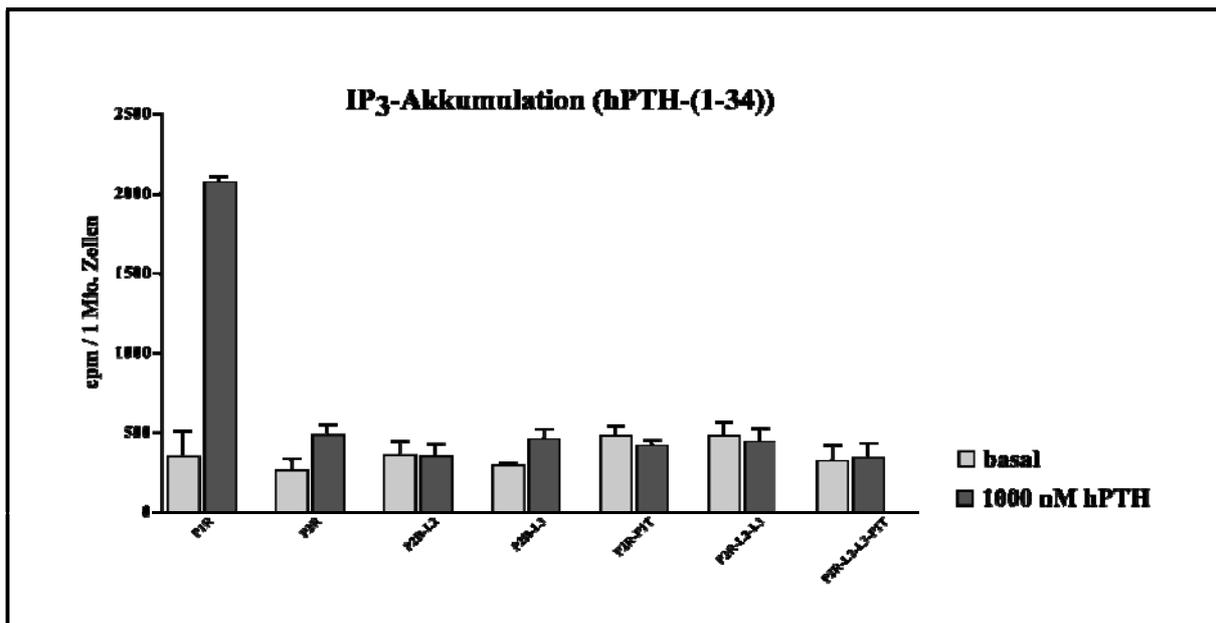


Abbildung 3.1: Darstellung von akkumuliertem, radioaktiv markiertem  $IP_3$  nach Stimulation mit hPTH (1-34) an Wildtyp- und Hybridrezeptor exprimierenden Zellen. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 2  $\mu$ Ci/ml Myo- $^3$ H-Inositol inkubiert. Auf der X-Achse sind jeweils zwei Säulen für jede Rezeptor tragende Zelllinie aufgeführt. Die erste Säule stellt immer den Basalwert dar. Die zweite Säule entspricht den gemessenen  $IP_3$  Werten unter einer Maximalstimulation mit 1000 nM hPTH (1-34) ( $n = 15$ ). Auf der Y-Achse ist die auf 1 Million Zellen umgerechnete Zählrate (cpm) aufgeführt, die der Akkumulation von radioaktiv markiertem Gesamtinositoltriphosphat entspricht. Jeder Wert wurde in Triplikaten bestimmt (+/- SD).

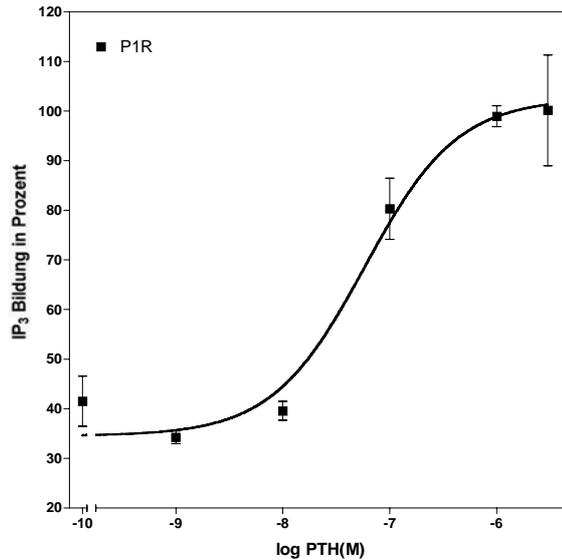


Abbildung 3.2: Darstellung von akkumuliertem, radioaktiv markiertem IP<sub>3</sub> nach Stimulation mit hPTH (1-34) an Wildtyprezeptor P1R exprimierenden Zellen. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 2 µCi/ml Myo-[<sup>3</sup>H]-Inositol inkubiert. Auf der X-Achse sind logarithmisch die hPTH (1-34) Konzentrationen dargestellt. Auf der Y-Achse ist die Zählrate(cpm) in Prozent der maximalen Stimulation aufgeführt, die der Akkumulation von radioaktiv markiertem IP<sub>3</sub> entspricht. Jeder Wert wurde in Triplikaten bestimmt (+/- SD).

### 3.2 Stimulation mit dem Liganden TIP39

Da der P2R neben hPTH auch TIP39 bindet, wurden die Wildtyprezeptoren und die daraus abgeleiteten Hybridrezeptoren auch hinsichtlich der Aktivierung des Phospholipase C Wegs nach Stimulation mit TIP39 untersucht (Abbildung 3.4). Am P1R konnte die antagonistische Wirkung von TIP39 hinsichtlich des PLC Signalweges reproduziert werden (Hansen, Jakob et al. 2002). Eine Akkumulation von IP<sub>3</sub> ist nach Stimulation mit TIP39 nicht nachweisbar.

Der Wildtyprezeptor P2R und die untersuchten Hybridrezeptoren zeigten nach einer Stimulation mit TIP39 keine statistisch signifikante Akkumulation der Gesamtinositolphosphate (P2R und P2R-L2-L3-P1T; p = 0,1).

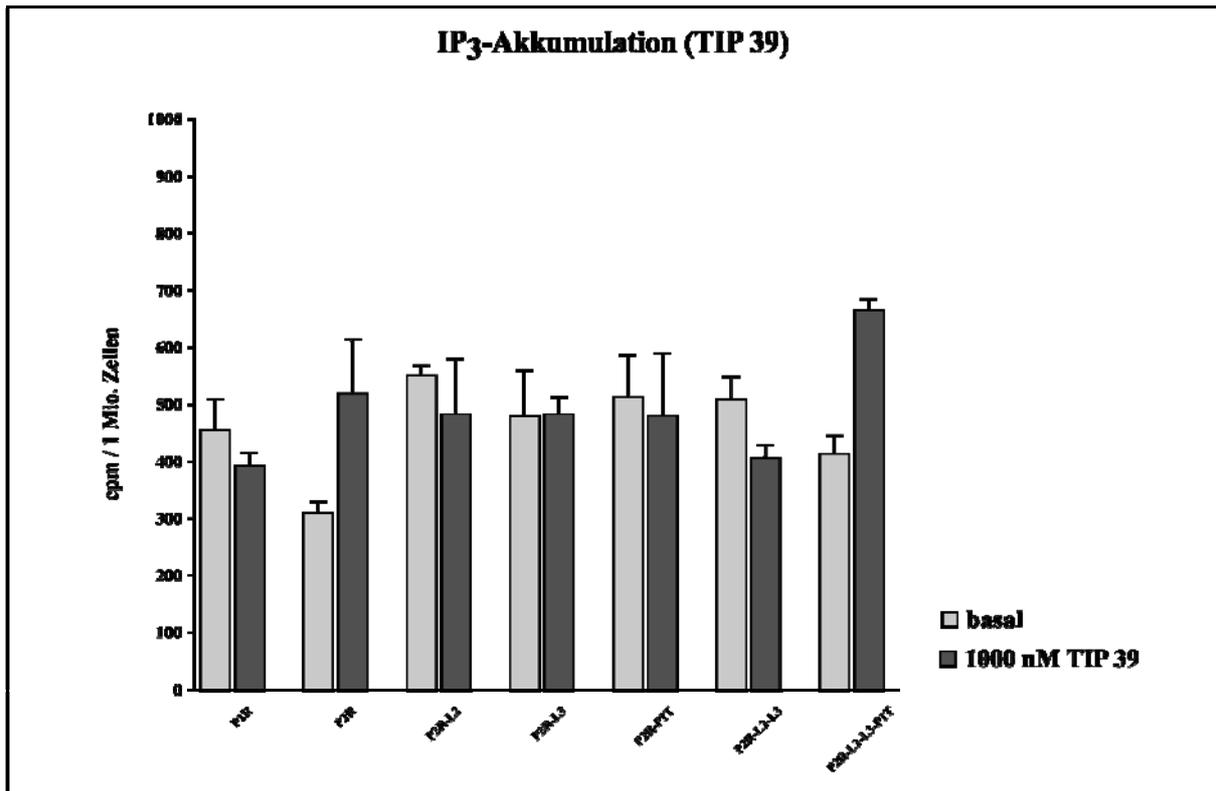


Abbildung 3.4: Darstellung von akkumuliertem, radioaktiv markiertem IP<sub>3</sub> nach Stimulation mit TIP39 an Wildtyp- und Hybridrezeptor exprimierenden Zellen. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 2 µCi/ml Myo-[<sup>3</sup>H]-Inositol inkubiert. Auf der X-Achse sind jeweils zwei Säulen für jede Rezeptor tragende Zelllinie aufgeführt. Die erste Säule stellt immer den Basalwert dar. Die zweite Säule entspricht den gemessenen IP<sub>3</sub> Werten unter einer Maximalstimulation mit 1000 nM TIP39 (n = 3). Auf der Y-Achse ist die auf 1 Million Zellen umgerechnete Zählrate (cpm) aufgeführt, die der Akkumulation von radioaktiv markiertem Gesamtinositoltriphosphat entspricht. Jeder Wert wurde in Triplikaten bestimmt (+/- SD).

### 3.3 IP<sub>3</sub> Messung mit hPTH (1-34) und Proteinkinasehemmung

Mit Hilfe einer pharmakologischen Hemmung der Proteinkinasen A und C kann eine Verstärkung des Phospholipase C Signaltransduktionsweg hervorgerufen werden. Durch Hemmung dieser regulierenden Rückkopplungsenzyme kommt es dabei im Rahmen des Stimulationsprozesses zu einem fünf- bis zehnfachen Anstieg für Gesamtinositolphosphate, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die verwendeten Substanzen sind H-89 (PKA Hemmer) und GF 109203X (PKC Hemmer). Dieser Effekt stellt sich in Abbildung 3.5 dar. Die Akkumulation von radioaktiv markiertem IP<sub>3</sub> nach Stimulation mit 1000 nM hPTH (1-34) fällt hier am P1R mit einem etwa 10-fachen Anstieg gegenüber dem Basalwert auf. Vergleicht man die akkumulierte Radioaktivität des P1R mit der wie sie in Abbildung 3.1 (IP<sub>3</sub> Messung

ohne Proteinkinaseinhibitoren) gemessen wurde, dann zeigt sich eine Verstärkung des Signals um den achtfachen Wert (von ~2.000 cpm auf ~16.000 cpm).

Für die Hybridrezeptoren kann trotz der verwendeten Proteinkinaseinhibitoren keine IP<sub>3</sub> Akkumulation beobachtet werden.

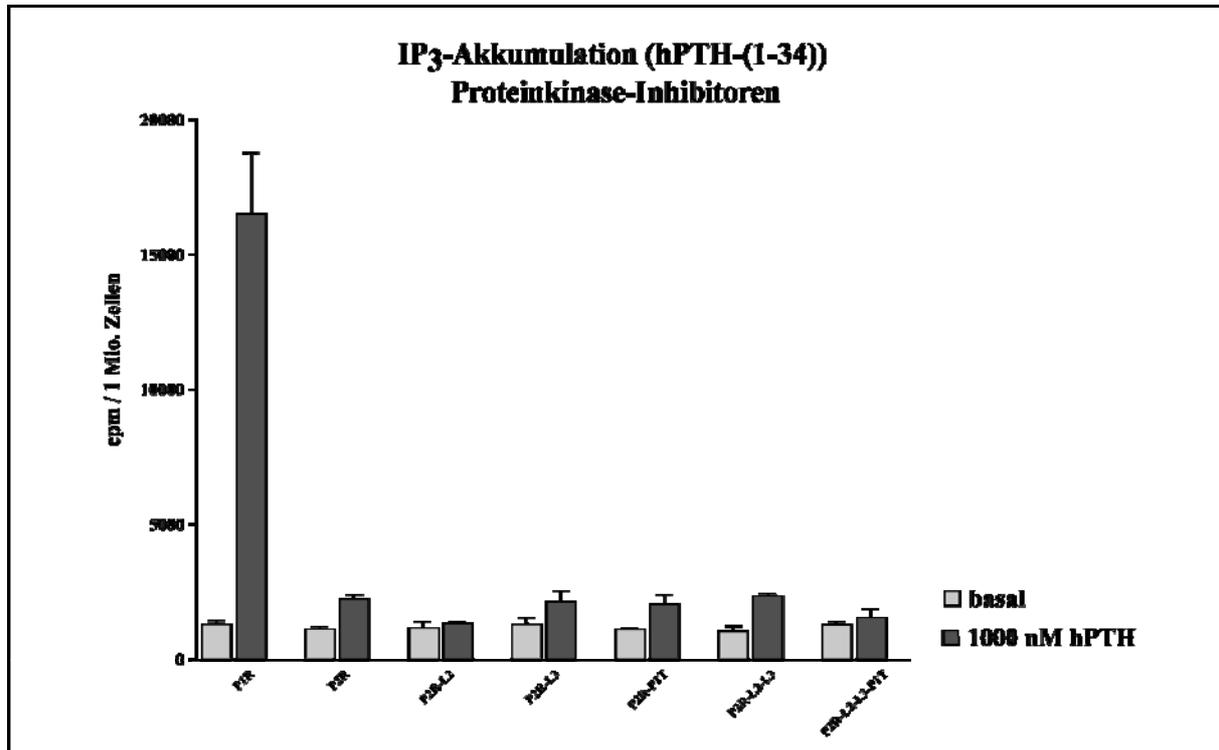


Abbildung 3.5: Darstellung von akkumuliertem, radioaktiv markiertem IP<sub>3</sub> nach Vorbehandlung mit Proteinkinaseinhibitoren und Stimulation mit hPTH (1-34) an Wildtyp- und Hybridrezeptor exprimierenden Zellen. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 2 µCi/ml Myo-[<sup>3</sup>H]-Inositol inkubiert. Am Versuchstag erfolgte eine einstündige Vorinkubation mit 30 µM (H-89) und 6 µM GF 109203X. Auf der X-Achse sind jeweils zwei Säulen für jede Rezeptor tragende Zelllinie aufgeführt. Die erste Säule stellt immer den Basalwert dar. Die zweite Säule entspricht den gemessenen IP<sub>3</sub> Werten unter einer Maximalstimulation mit 1000 nM hPTH (1-34). Auf der Y-Achse ist die auf 1 Million Zellen umgerechnete Zählrate (cpm) aufgeführt, die der Akkumulation von radioaktiv markiertem Gesamtinositoltriphosphat entspricht. Jeder Wert wurde in Triplikaten bestimmt (+/- SD).

#### 4 Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ Ausschüttung nach Stimulation mit hPTH (1-34)

Alternativ zur  $\text{IP}_3$  Meßmethode kann zur Überprüfung der Aktivierbarkeit des PLC Signalweges auch der Anstieg von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  nachgewiesen werden. Die Wildtyprezeptoren P1R, P2R und die Hybridrezeptoren wurden für diese Meßmethode mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3AM beladen und mit hPTH (1-34) stimuliert. Die sich darstellende Fluoreszenz entspricht einer Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration, dieser geht eine intrazellulären Akkumulation von  $\text{IP}_3$  voraus (Abbildung 4.1).

Zur Kontrolle, dass es sich bei den verwendeten Zellen auch nach mehreren Wasch- und Stimulationsschritten um lebende Zellen handelt, wurden diese am Ende des Versuchs mit zwei Einheiten (U/ml) Thrombin stimuliert. Hierbei kommt es über die Aktivierung des Thrombinrezeptors zu einer Freisetzung intrazellulären Calciums [ $\text{Ca}^{2+}$ ] und zu einer Fluoreszenz (62).

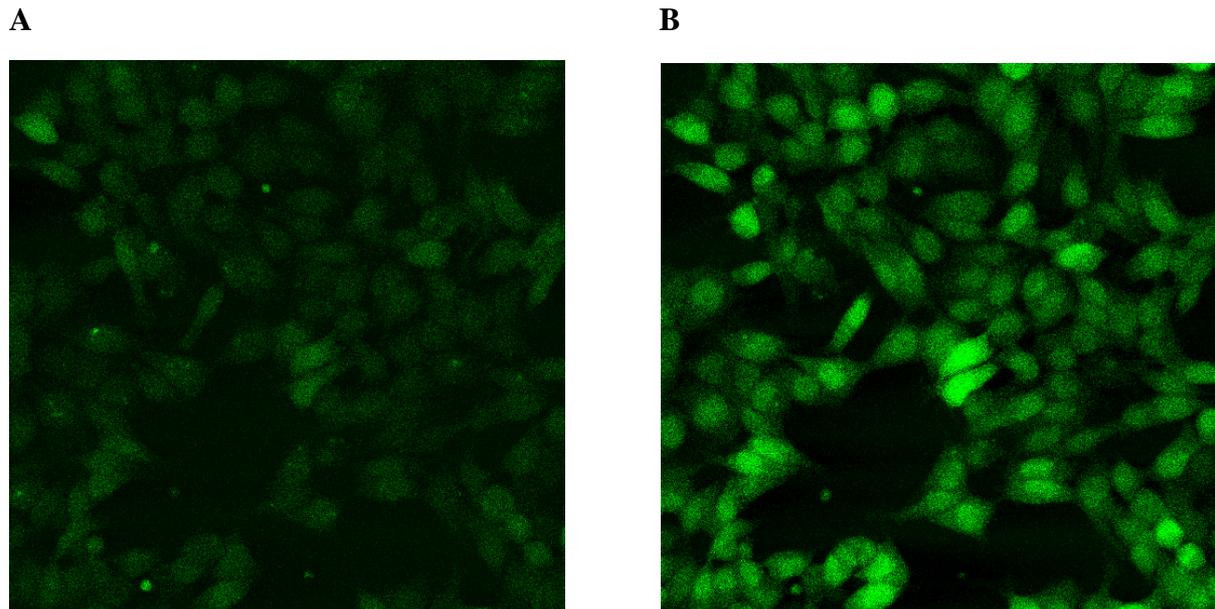


Abbildung 4.1: Darstellung von P1R tragenden HEK 293 E+ Zellen mit Hilfe des konfokalen Mikroskopes. Die Zellen wurden vor Versuchbeginn mit Fluo-3AM beladen und mit hPTH (1-34) stimuliert.

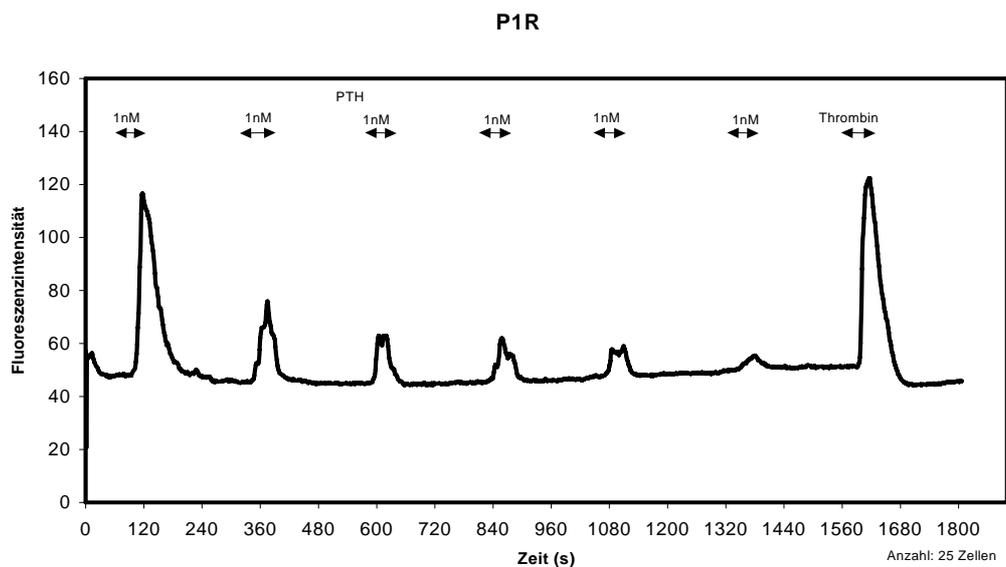
**A:** P1R tragende Zellen werden nur mit Puffer C umspült.

**B:** P1R tragende Zellen werden mit hPTH (1-34) stimuliert. Nach einer Aktivierung des PLC Signalweges akkumuliert  $\text{IP}_3$ , das eine intrazelluläre Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Endoplasmatischen Retikulum hervorruft.

## 4.1 $[Ca^{2+}]_i$ Messungen am P1R

Schon eine geringe hPTH (1-34) Konzentration von nur 1 nM führte am P1R zu einer Fluoreszenz. Die Fluo-3AM assoziierte Fluoreszenzaktivität entspricht der Freisetzung von intrazellulären  $Ca^{2+}$  (Abbildung 4.2 und 4.3). Die Abbildungen zeigen, dass es nach mehrfachen Stimulationen des P1R mit gleichbleibend niedrigen hPTH Konzentrationen (1 nM) oder auch ansteigenden Konzentrationen (1 – 1000 nM) zu einer Abnahme des Signals kommt. Ursächlich hierfür ist die Desensibilisierung des Rezeptors. Durch die Phosphorylierung des Rezeptors durch Proteinkinasen und der Bindung von  $\beta$ -Arrestin wird der Rezeptor in einem inaktiven Zustand gehalten, so dass die repetitiven Stimulationen auch in höheren hPTH Dosierungen zu keiner adäquaten Signaltransduktion führt. Eine am Ende des Versuchs durchgeführte Stimulation mit Thrombin zeigt eine etwa gleich hohe intrazelluläre  $Ca^{2+}$  Freisetzung wie die der ersten hPTH Stimulation.

A: Abbildungsbeschreibung auf Seite 49



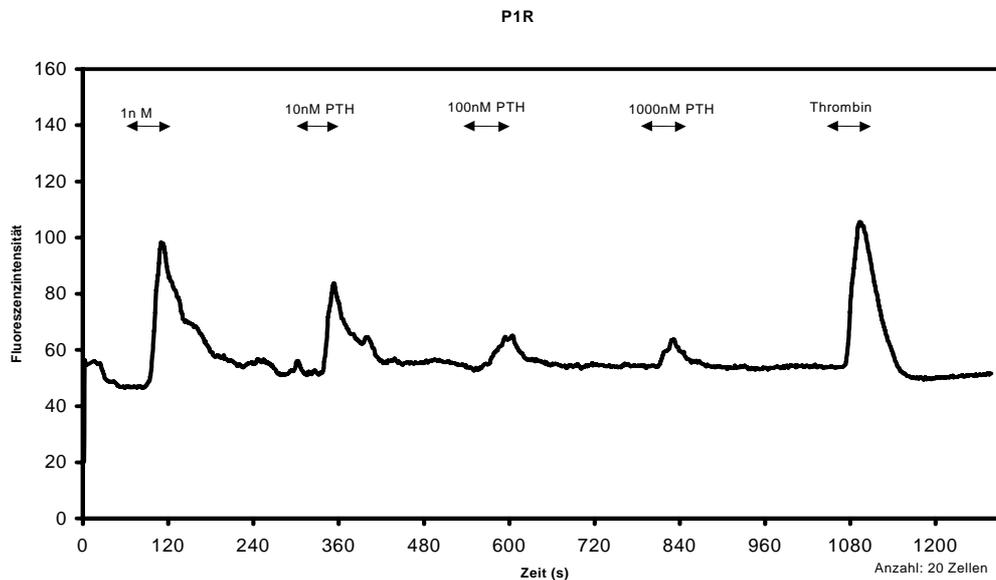
**B:**

Abbildung 4.2: Freisetzung von intrazellulären Calcium  $[Ca^{2+}]_i$ , die der Fluoreszenzintensität entspricht, an P1R exprimierenden HEK 293E+ Zellen. Die Zellen wurden 60 Sekunden mit hPTH (1-34) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in der Perfusionskammer mit Puffer C für zwei Minuten gewaschen. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt. Am Ende wurden die Zellen mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert, um die Funktionstüchtigkeit und ein Überleben auch nach zahlreichen Wasch- und Stimulationsschritten nachzuweisen. Auf der y-Achse sind Intensitätswerte aufgeführt, die an keine Einheit gebunden sind. Die x-Achse stellt den Zeitverlauf in Sekunden gemessen dar.

**A:** Darstellung einer Mittelwertkurve von 25 Zellen, die vor dem Versuchsbeginn mit Fluo-3AM markiert wurden. Sie wurden sechs mal mit 1 nM PTH stimuliert.

**B:** Darstellung einer Mittelwertkurve von 20 Zellen, die vor dem Versuchsbeginn mit Fluo-3AM markiert wurden. Sie wurden mit PTH in ansteigender Dosierung (1-1000 nM) stimuliert.

## 4.2 $[Ca^{2+}]_i$ Messungen am P2R und den Hybridrezeptoren

Messungen zum Nachweis eines aktivierten PLC Signalweges nach hPTH Stimulationen hatten gezeigt, dass es weder beim P2R noch bei den Hybridrezeptoren zu einer  $IP_3$  Akkumulation kam. Auch sehr hohe Dosen an hPTH (1-34) führten am Wildtyprezeptor P2R zu keiner messbaren Calciumfreisetzung (Abbildung 4.3). Das es sich bei dem Experiment um funktionstüchtige und lebende Zellen handelt, beweist der gemessene Calciumanstieg nach Applikation von Thrombin.

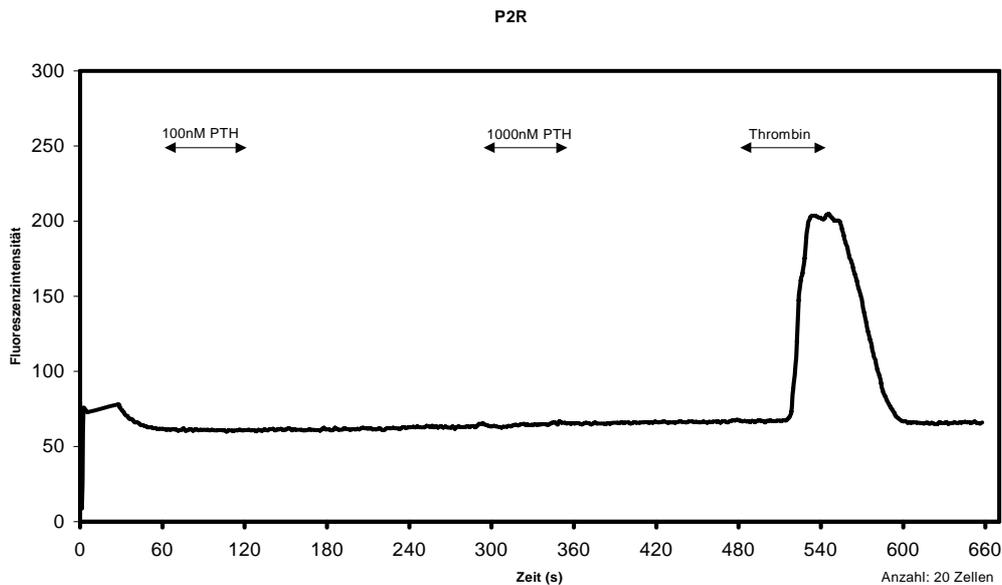


Abbildung 4.3: Freisetzung von intrazellulären Calcium  $[Ca^{2+}]_i$ , die der Fluoreszenzintensität entspricht, an P2R exprimierenden HEK 293E+ Zellen. Die Zellen wurden 60 Sekunden mit 100 nM hPTH (1-34) stimuliert. Anschließend wurde die Zellen in der Perfusionskammer mit Puffer C für drei Minuten gewaschen und mit 1000 nM PTH ein weiteres mal stimuliert. Am Ende wurden die Zellen mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert, um die Funktionstüchtigkeit und ein Überleben auch nach zahlreichen Wasch- und Stimulationsschritten nachzuweisen. Die Kurve stellt sich aus Mittelwerten von 20 unabhängigen Zellen zusammen. Auf der y-Achse sind Intensitätswerte aufgeführt, die an keine Einheit gebunden sind. Die x-Achse stellt den Zeitverlauf in Sekunden gemessen dar.

Wie auch schon die Messungen zur  $IP_3$  Akkumulation gezeigt hatten, kommt es auch bei allen Hybridrezeptor tragenden Zellen zu keiner Aktivierung des PLC Signalweges. Es konnte für keinen der unterschiedlichen Rezeptoren nach einer Stimulation mit hPTH (1-34) ein Calciumsignal gemessen werden (Abbildungen 4.4 – 4.8). Ein Funktionsnachweis der Zellen wurde durch eine Stimulation mit Thrombin nachgewiesen.

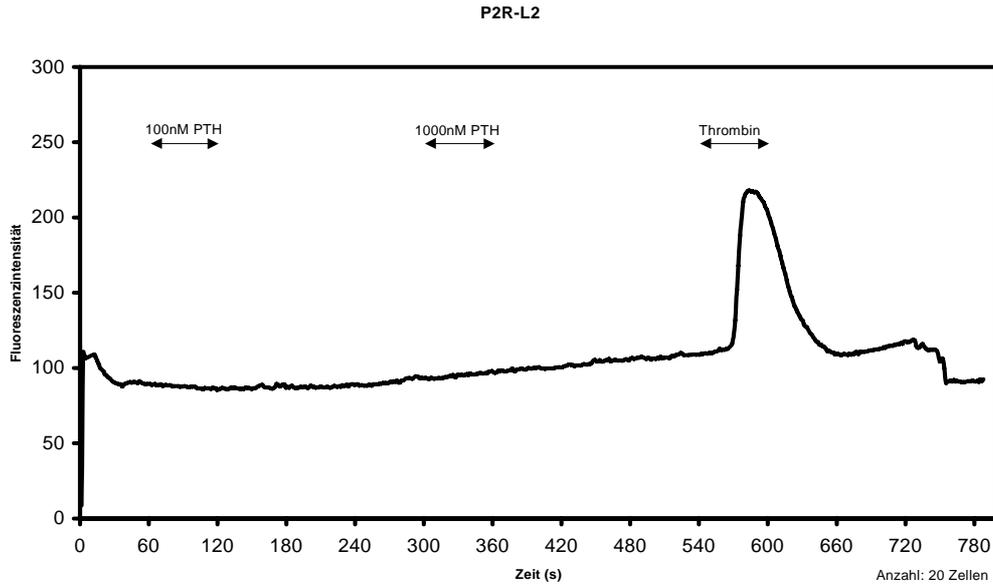


Abbildung 4.4: Freisetzung von intrazellulären Calcium  $[Ca^{2+}]_i$ , die der Fluoreszenzintensität entspricht, an P2R-L2 exprimierenden HEK 293E+ Zellen. Die Zellen wurden 60 Sekunden mit 100 nM hPTH (1-34) stimuliert, anschließend mit Puffer C ca. drei Minuten gewaschen und mit 1000 nM PTH ein weiteres mal stimuliert. Am Ende wurden die Zellen mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert, um die Funktionstüchtigkeit und ein Überleben auch nach zahlreichen Wasch- und Stimulationsschritten nachzuweisen. Die Kurve stellt sich aus Mittelwerten von 20 unabhängigen Zellen zusammen. Auf der y-Achse sind Intensitätswerte aufgeführt, die an keine Einheit gebunden sind. Die x-Achse stellt den Zeitverlauf in Sekunden gemessen dar.

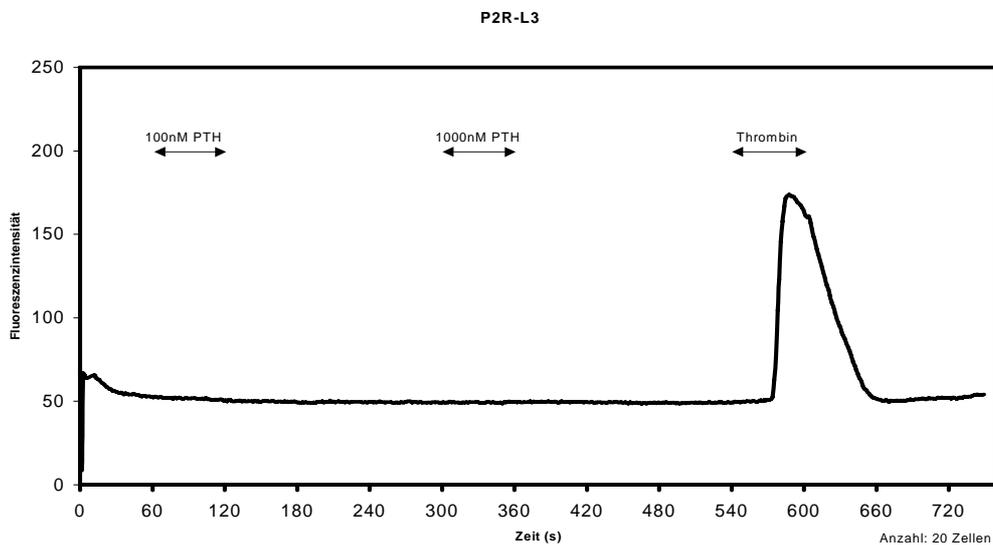


Abbildung 4.5: Freisetzung von intrazellulären Calcium  $[Ca^{2+}]_i$ , die der Fluoreszenzintensität entspricht, an P2R-L3 exprimierenden HEK 293E+ Zellen. Die Zellen wurden 60 Sekunden mit 100 nM hPTH (1-34) stimuliert, daraufhin drei Minuten mit Puffer C gewaschen und schließlich mit 1000 nM PTH ein weiteres mal stimuliert. Am Ende wurden die Zellen mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert, um die Funktionstüchtigkeit und ein Überleben auch nach zahlreichen Wasch- und Stimulationsschritten nachzuweisen. Die Kurve stellt sich aus Mittelwerten von 20 unabhängigen Zellen zusammen. Auf der y-Achse sind Intensitätswerte aufgeführt, die an keine Einheit gebunden sind. Die x-Achse stellt den Zeitverlauf in Sekunden gemessen dar.

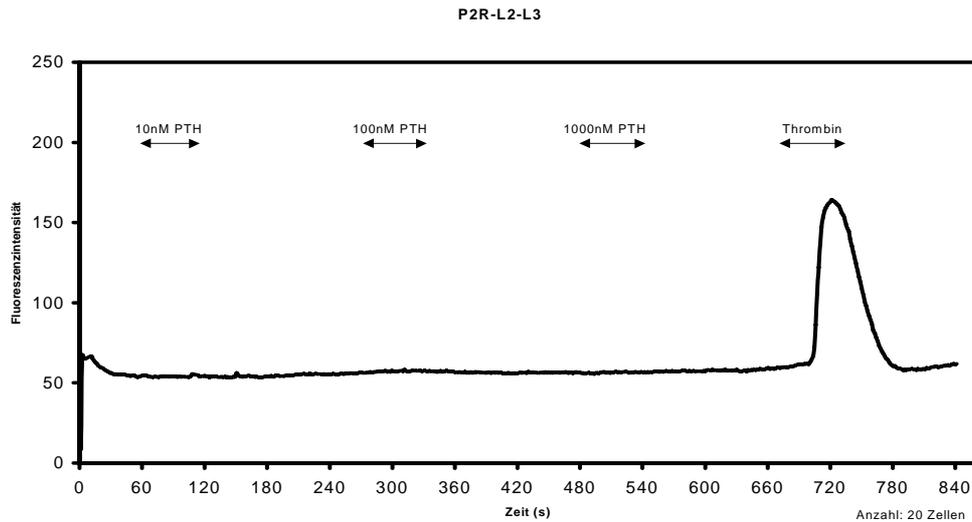


Abbildung 4.6: Freisetzung von intrazellulären Calcium  $[Ca^{2+}]_i$ , die der Fluoreszenzintensität entspricht, an P2R-L2-L3 exprimierenden HEK 293E+ Zellen. Die Zellen wurden 60 Sekunden mit 10 nM hPTH (1-34) stimuliert, drei Minuten mit Puffer C gewaschen und anschließend mit 100 nM PTH stimuliert. Im Folgenden wurden die Zellen für zwei Minuten mit Puffer C gewaschen und abschließend 1000 nM PTH appliziert. Um die Funktionstüchtigkeit und ein Überleben auch nach zahlreichen Wasch- und Stimulationsschritten nachzuweisen, wurden die Zellen mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert. Die Kurve stellt sich aus Mittelwerten von 20 unabhängigen Zellen zusammen. Auf der y-Achse sind Intensitätswerte aufgeführt, die an keine Einheit gebunden sind. Die x-Achse stellt den Zeitverlauf in Sekunden gemessen dar.

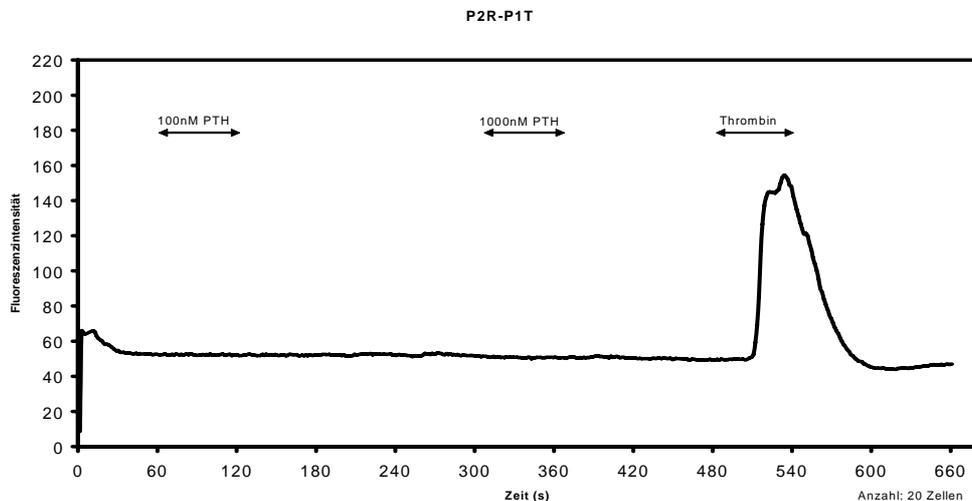


Abbildung 4.7: Freisetzung von intrazellulären Calcium  $[Ca^{2+}]_i$ , die der Fluoreszenzintensität entspricht, an P2R-P1T exprimierenden HEK 293E+ Zellen. Die Zellen wurden 60 Sekunden mit 100 nM hPTH (1-34) stimuliert. Anschließend wurde die Zellen für drei Minuten mit Puffer C gewaschen und mit 1000 nM PTH ein weiteres mal stimuliert. Am Ende wurden die Zellen mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert, um die Funktionstüchtigkeit und ein Überleben auch nach zahlreichen Wasch- und Stimulationsschritten nachzuweisen. Die Kurve stellt sich aus Mittelwerten von 20 unabhängigen Zellen zusammen. Auf der y-Achse sind Intensitätswerte aufgeführt, die an keine Einheit gebunden sind. Die x-Achse stellt den Zeitverlauf in Sekunden gemessen dar.

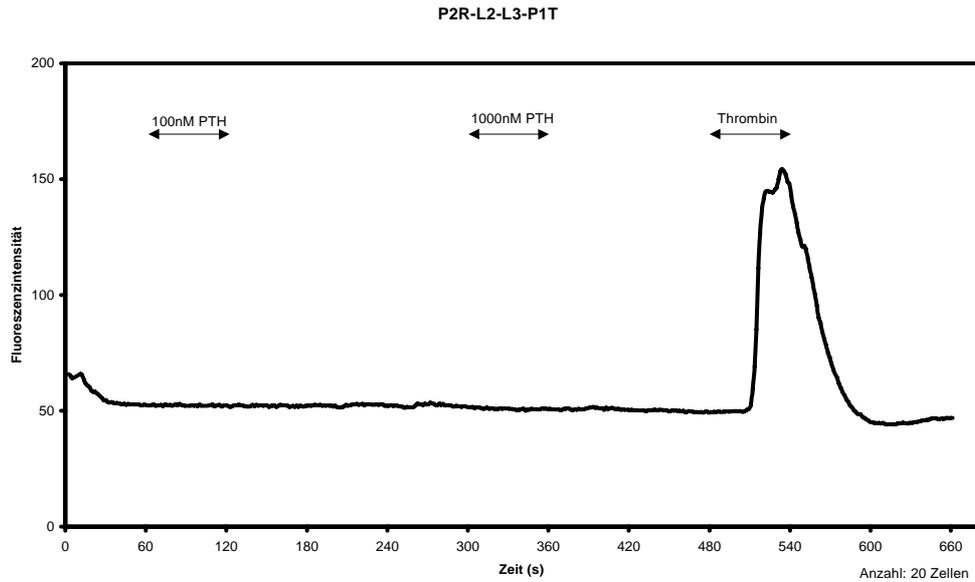


Abbildung 4.8: Freisetzung von intrazellulären Calcium [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub>, die der Fluoreszenzintensität entspricht, an P2R-L2-L3-P1T exprimierenden HEK 293E+ Zellen. Die Zellen wurden 60 Sekunden mit 100 nM hPTH (1-34) stimuliert. Anschließend wurde die Zellen in der Perfusionskammer mit Puffer C für etwa drei Minuten gewaschen und mit 1000 nM PTH ein weiteres mal stimuliert. Am Ende wurden die Zellen mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert, um die Funktionstüchtigkeit und ein Überleben auch nach zahlreichen Wasch- und Stimulationsschritten nachzuweisen. Die Kurve stellt sich aus Mittelwerten von 20 unabhängigen Zellen zusammen. Auf der y-Achse sind Intensitätswerte aufgeführt, die an keine Einheit gebunden sind. Die x-Achse stellt den Zeitverlauf in Sekunden gemessen dar.

## 5 Messungen des cAMP Signals

Von Lida-Klein et al. wurde gezeigt, dass durch Mutationen in der zweiten intrazellulären Schleife des P2R der Ratte die Ankopplung an den PLC Signalweg gehemmt wird. Der cAMP Signalweg zeigt keine wesentlichen Beeinflussung (Lida-Klein, Guo et al. 1997). Negativen Einfluß auf beide Signalwege haben Mutationen in der N-terminalen Region der dritten intrazellulären Schleife des Opossum P1R (Huang, Chen et al. 1996). Basierend auf diesen Untersuchungen wurden die für diese Arbeit generierten Hybridrezeptoren hinsichtlich der cAMP Akkumulation nach Stimulation mit den Liganden hPTH (1-34) und TIP39 untersucht.

## 5.1 cAMP Signalweg nach Stimulation mit hPTH (1-34)

Die Wildtyp- und Hybridrezeptoren wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an hPTH (1-34) stimuliert und die cAMP Akkumulation gemessen (Abbildung 5.1).

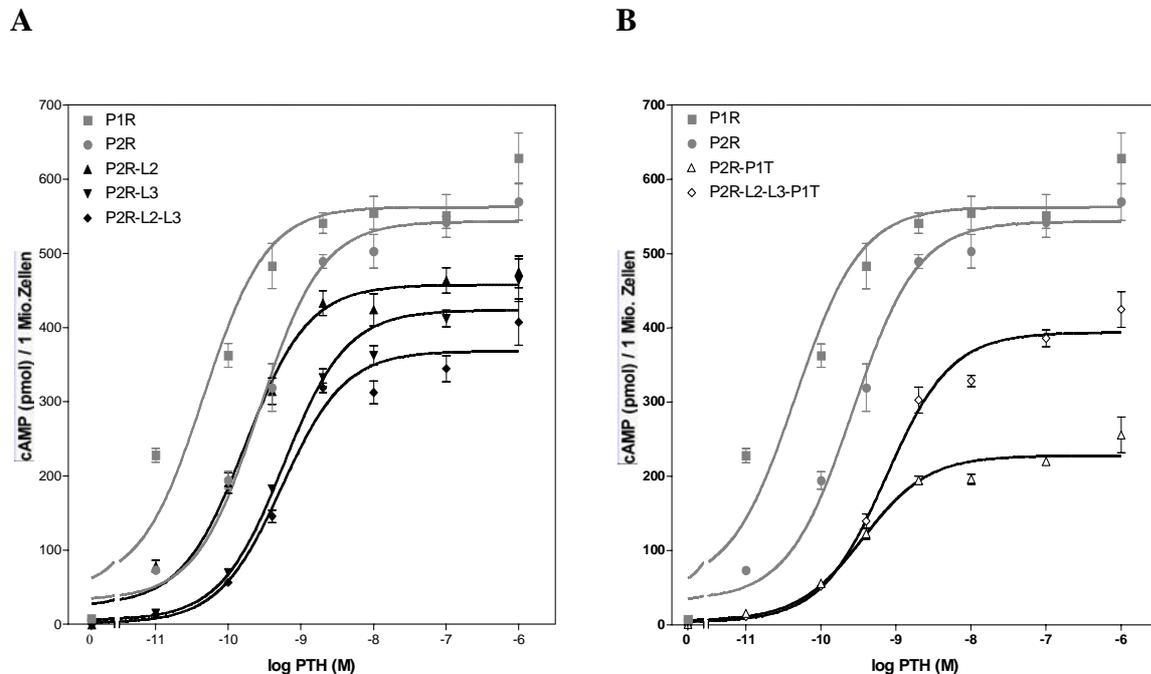


Abbildung 5.1: cAMP Akkumulation nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an hPTH (1-34). Vergleich der Wildtyprezeptoren P1R und P2R mit den Hybridrezeptoren. Dargestellt sind representative Stimulationskurven aus sechs Experimenten ( $n = 6$ ). Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte ( $\pm$  S.E) aus einer Tripletbestimmung.

**A:** Vergleich der Hybridrezeptoren P2R-L2, P2R-L3 und der Kombination P2R-L2-L3 mit den Wildtyprezeptoren P1R und P2R

**B:** Vergleich der Hybridrezeptoren P2R-P1T und P2R-L2-L3-P1T mit den Wildtyprezeptoren P1R und P2R

Für die Wildtyprezeptoren P1R und P2R konnte bei einer Stimulation mit hPTH jeweils ein etwa 10-facher Anstieg gegenüber den Basalwerten nachgewiesen werden. Sie zeigen eine ähnlich hohe maximale cAMP Akkumulation (Tabelle 5.2). Hinsichtlich der cAMP Signalantwort zeigt sich, dass sich der P1R besser stimulieren ließ als der P2R. Die Kurve des P1R liegt weiter nach links verschoben als die des P2R. Dieser signifikante Effekt ( $p \leq 0,005$ ) zeigt sich auch bei Vergleich der  $EC_{50}$  Werte, die für den P1R etwa 10-fach niedriger liegen als für den P2R (Tabelle 5.1).

Rezeptoren	EC <sub>50</sub> Werte, hPTH
<b>P1R</b>	0,03 ± 0,02
<b>P2R</b>	0,36 ± 0,21 *
<b>P2R-L2</b>	0,28 ± 0,17
<b>P2R-L3</b>	0,93 ± 0,58 * <sup>+</sup>
<b>P2R-L2-L3</b>	0,81 ± 0,41 * <sup>+</sup>
<b>P2R-P1T</b>	0,52 ± 0,36 *
<b>P2R-L2-L3-P1T</b>	1,12 ± 0,52 * <sup>#</sup>

*Tabelle 5.1: Halbmaximale Effekte (EC<sub>50</sub> Werte) der unterschiedlichen Hybridrezeptoren im Vergleich zu den Wildtyprezeptoren P1R und P2R nach einer Stimulation mit hPTH (1-34). Darstellung der Mittelwerte aus sechs Experimenten (+/- S.D.) (n = 6). Signifikant erhöhte EC<sub>50</sub> Werte im Vergleich zum P1R (\* p < 0,005) und P2R (<sup>+</sup> p < 0,01) zeigen der P2R-L3, P2R-L2-L3 und (<sup>#</sup> p < 0,001) P2R-L2-L3-P1T.*

Die Hybridrezeptoren zeigen nach einer Stimulation mit hPTH (1-34) gegenüber den Wildtyprezeptoren einen nach rechts verschobenen cAMP Kurvenverlauf und EC<sub>50</sub> Werte, die eher mit dem P2R übereinstimmen als mit dem P1R. Der Kurvenverlauf, der EC<sub>50</sub> Wert und auch die maximale cAMP Akkumulation des P2R-L2 sind zu den Werten des Wildtyprezeptors P2R nicht signifikant verändert (p = 0,4). Für den P2R-L3 mit der Mutation in der dritten intrazellulären Schleife ist nicht nur der Kurvenverlauf nach rechts verlagert, sondern auch der halbmaximale Effekt (EC<sub>50</sub> Wert) erhöht. Die Maximalwerte für cAMP liegen noch unter denen des P2R-L2 und sind gegenüber dem P2R signifikant vermindert. Die Kombination aus den Mutationen der zweiten und dritten intrazellulären Schleife (P2R-L2-L3) zeigt gegenüber dem P2R eine weiter nach rechts verschobene Stimmulationskurve und eine Verschlechterung bezüglich der halbmaximalen Werte (EC<sub>50</sub> Werte). Ebenso ist eine weitere Reduzierung für die maximale akkumulierte Menge an cAMP zu sehen.

Rezeptoren hPTH (1-34)	Maximalwerte für cAMP (pmol)	max. cAMP im Vergleich zum P2R (%)	max. cAMP im Vergleich zum P1R (%)
<b>P1R</b>	787 ± 215	-	100
<b>P2R</b>	662 ± 172	100	-
<b>P2R-L2</b>	558 ± 128	84	71 *
<b>P2R-L3</b>	509 ± 146	77 *	65 *
<b>P2R-L2-L3</b>	411 ± 82	62 *	52 *
<b>P2R-P1T</b>	240 ± 138	36 **	30 **
<b>P2R-L2-L3-P1T</b>	459 ± 74	69 *	58 *

*Tabelle 5.2: Darstellung der maximalen cAMP Werte der unterschiedliche Hybridrezeptoren und Wildtyprezeptoren P1R und P2R nach einer Stimulation mit hPTH (1-34) sowie eine Gegenüberstellung des maximal akkumulierten cAMP (%) im Vergleich zum P2R und P1R. Die Maximalwerte stammen aus sieben cAMP Experimenten (S.E.) (n = 7). Bis auf den Hybridrezeptor P2R-L2 zeigen alle Rezeptoren im Vergleich zum P2R eine signifikant erniedrigte cAMP Akkumulation (\* p < 0,05, \*\* p < 0,005). Im Vergleich zum P1R liegen alle Hybridrezeptoren bezüglich ihrer maximalen cAMP Akkumulation erniedrigt vor (\* p < 0,05, \*\* p < 0,005).*

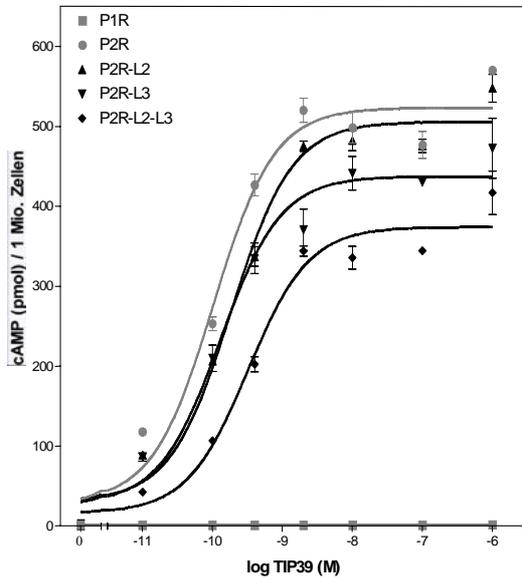
Der Austausch des C-Terminus (P2R-P1T) hat eine drastische Veränderung der Stimulationskurve zur Folge. Die halbmaximalen Werte (EC<sub>50</sub> Werte) liegen gegenüber denen des P2R gering erhöht vor, allerdings ist die maximale cAMP Akkumulation extrem verringert. Die Maximalwerte für akkumuliertes cAMP des P2R-P1T reduzieren sich gegenüber denen der Wildtyprezeptoren P1R und P2R um etwa ⅔. Bemerkenswert ist der Effekt, dass eine Kombination aus allen drei Mutationen (P2R-L2-L3-P1T) das cAMP Signal wieder deutlich verbessern konnte. Die maximale cAMP Akkumulation des P2R-L2-L3-P1T konnte gegenüber dem P2R-P1T etwa verdoppelt werden. Der halbmaximale Effekt (EC<sub>50</sub> Wert) des P2R-L2-L3-P1T liegt im Vergleich zum P2R signifikant erhöht vor.

## 5.2 cAMP Signalweg nach Stimulation mit TIP39

Die Wildtyp- und Hybridrezeptoren wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen für TIP39 stimuliert und die cAMP Akkumulation gemessen (Abbildung 5.2).

Wie schon Hoare, S. R. zeigen konnte (Hoare, Clark et al. 2000) und in Abbildung 5.2 bestätigt, ist der cAMP Signalweg am P1R nach einer TIP39 Stimulation nicht aktivierbar.

A



B

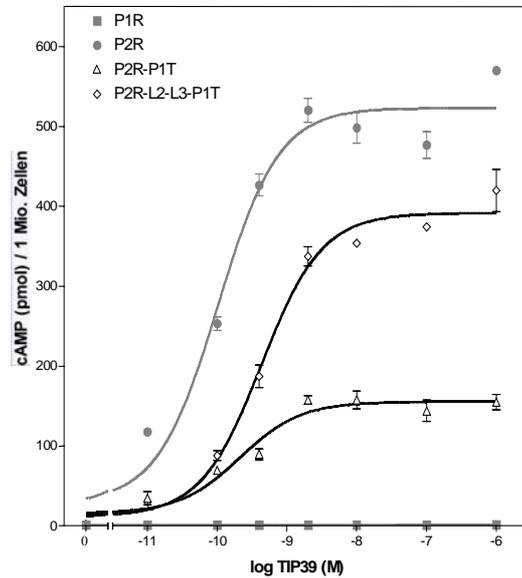


Abbildung 5.2: cAMP Akkumulation nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an TIP39. Vergleich der Wildtyprezeptoren P1R und P2R mit den Hybridrezeptoren. Dargestellt sind representative Stimulationskurven aus drei Experimenten ( $n = 3$ ). Die Kurvenpunkte sind Mittelwerte ( $\pm$  S.E) aus einer Tripletbestimmung.

**A:** Vergleich der Hybridrezeptoren P2R-L2, P2R-L3 und der Kombination P2R-L2-L3 mit den Wildtyprezeptoren P1R und P2R

**B:** Vergleich der Hybridrezeptoren P2R-P1T und P2R-L2-L3-P1T mit den Wildtyprezeptoren P1R und P2R

Wird der P2R mit dem Peptid TIP39 stimuliert, dann kommt es im Vergleich zur Stimulation mit hPTH (1-34) zu einer Linksverschiebung der Kurve und zu einer Reduzierung der halbmaximalen Effekte ( $EC_{50}$  Werte) (Tabelle 5.3). TIP39 ist höchstwahrscheinlich als der physiologischer Ligand des P2R zu sehen. Den Verdacht unterstützt ein Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven nach Stimulation mit hPTH und TIP39. Die Stimulation mit TIP39 am P2R bewirkt im Vergleich zur Stimulation mit hPTH eine Linksverschiebung der Kurve und eine Verringerung der  $EC_{50}$  Werte ( $EC_{50}$ : hPTH 0,36 nM  $\pm$  0,2;  $EC_{50}$ : TIP39 0,1 nM  $\pm$  0,1). Die maximale akkumulierte cAMP Menge wird bei Vergleich der Peptide nicht wesentlich verändert (Tabelle 5.4).

Rezeptoren	EC <sub>50</sub> Werte (nM), TIP39
<b>P1R</b>	-
<b>P2R</b>	0,10 ± 0,09
<b>P2R-L2</b>	0,15 ± 0,12
<b>P2R-L3</b>	0,16 ± 0,04
<b>P2R-L2-L3</b>	0,27 ± 0,13
<b>P2R-P1T</b>	0,11 ± 0,14
<b>P2R-L2-L3-P1T</b>	0,31 ± 0,18

*Tabelle 5.3: Halbmaximale Effekte (EC<sub>50</sub> Werte) der unterschiedlichen Hybridrezeptoren im Vergleich zu den Wildtyprezeptoren P1R und P2R nach einer Stimulation mit TIP39. Darstellung der Mittelwerte aus drei Experimenten (+/- S.D.) (n = 3). Im Vergleich zum P2R zeigen sich für die Hybridrezeptoren keine signifikanten Unterschiede.*

Die Hybridrezeptoren mit den Mutationen in der zweiten (P2R-L2) und dritten (P2R-L3) intrazellulären Schleife zeigen in Hinblick auf ihren Kurvenverlauf, des halbmaximalen Effekts (EC<sub>50</sub>) und bezüglich ihrer maximalen cAMP Akkumulation eine enge Anlehnung an die Eigenschaften des P2R. Die Aktivierung der Kombination dieser beiden Mutationen (P2R-L2-L3) mit TIP39 zeigt wie nach einer hPTH Stimulation eine reduzierte maximale cAMP Akkumulation im Vergleich zum Wildtyprezeptor P2R. Allerdings zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve des P2R-L2-L3 einen ähnlichen Verlauf wie die des P2R und auch die EC<sub>50</sub> Werte werden nicht signifikant verändert.

Der komplette Austausch des C-Terminus (P2R-P1T) führt nach Stimulation mit TIP39, wie schon nach einer Stimulation mit hPTH zu sehen, zu einer deutlich verminderten maximalen cAMP Akkumulation. Der halbmaximale Effekt (EC<sub>50</sub> Wert) bleibt gegenüber dem Wildtyprezeptor P2R gleich. Die Kombination aller Mutationen (P2R-L2-L3-P1T) zeigt gegenüber dem Wildtyprezeptor P2R ebenfalls keine signifikante Veränderung der EC<sub>50</sub> Werte ( $p \geq 0,03$ ). Die maximale cAMP Akkumulation des P2R-L2-L3-P1T fällt auch nach einer Stimulation mit TIP39 höher aus als die des P2R-P1T.

Rezeptoren TIP39-Stim.	Maximalwerte für cAMP (pmol)	max. cAMP im Vergleich zum P2R (%)
<b>P2R</b>	555 ± 67	100
<b>P2R-L2</b>	461 ± 83	83
<b>P2R-L3</b>	438 ± 66	79 *
<b>P2R-L2-L3</b>	401 ± 45	72 *
<b>P2R-P1T</b>	137 ± 22	25 *
<b>P2R-L2-L3-P1T</b>	418 ± 30	75 *

*Tabelle 5.4: Darstellung der maximalen cAMP Werte der unterschiedliche Hybridrezeptoren und Wildtyprezeptoren P1R und P2R nach einer Stimulation mit TIP39 sowie eine Gegenüberstellung des maximal akkumulierten cAMP (%) im Vergleich zum P2R und P1R. Die Maximalwerte stammen aus drei cAMP Experimenten (S.E.) (n = 3). Bis auf den Hybridrezeptor P2R-L2 zeigen alle Rezeptoren im Vergleich zum P2R eine signifikant erniedrigte cAMP Akkumulation (\*p<0,005).*

## IV Diskussion

### 1 Strukturelle und funktionelle Unterschiede des PTH-2 zum PTH-1 Rezeptor

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Signaltransduktion der Parathormonrezeptoren PTH-1 und PTH-2. Der PTH-1 Rezeptor vermittelt Signale sowohl über den Adenylatzylaseweg als auch über den Phospholipase C Weg. Trotz einer weitreichenden Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz des PTH-2 Rezeptors zum PTH-1 Rezeptor (45 % identisch und 70 % ähnlich), fehlt diesem die Ankopplung an den Phospholipase C Signaltransduktionsweg. Vorarbeiten konnten Rezeptorabschnitte darstellen, die für die Signaltransduktion des PTH-1 Rezeptors von entscheidender Bedeutung sind. Es handelte sich hierbei um Mutationen in den intrazellulären Schleifen, die zu einer Abschwächung des AC- oder PLC Signalweges geführt hatten (Huang, Chen et al. 1996). In dieser Arbeit sollte das Gegenteil erreicht werden: Es wurden Hybridrezeptoren generiert, die über eine gezielte Angleichung von intrazellulären Sequenzabschnitten des PTH-2 Rezeptors

an die des PTH-1 Rezeptors, zu einer Ankopplung des PTH-2 Rezeptors an den PLC Weg führen sollte.

Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich neben ihrer Signaltransduktion auch in ihrer Aktivierbarkeit. So kann der PTH-1 Rezeptor durch PTH und PTHrP, aber nicht durch TIP39 aktiviert werden (Gardella and Juppner 2000). Der PTH-2 Rezeptor wird dagegen von PTH und TIP39 aktiviert, aber nicht durch PTHrP. Der PTH-2 Rezeptor und TIP39 werden vorwiegend im Gehirn und im Rückenmark expremiert, wo sie vermutlich für die Regulation der hypothalamischen Releasinghormone, für die Schmerzverarbeitung und über das limbische System für das Sexualverhalten der Männer verantwortlich sind (Usdin, Dobolyi et al. 2003; Wang, Coolen et al. 2006). TIP39 zeigt eine bessere Affinität zum PTH-2 Rezeptor als PTH und aktiviert ihn selektiv. An den PTH-1 Rezeptor kann TIP39 zwar binden, diesen aber nicht aktivieren (Usdin, Wang et al. 2000). Auf Grund dieser Aspekte ist TIP39 höchstwahrscheinlich der physiologische Ligand des PTH-2 Rezeptors (Faber, Dobolyi et al. 2007; Hoare, Clark et al. 2000; Usdin, Gruber et al. 1995).

## **2 HEK 293 E+ Zellen expremieren Wildtyp- und Hybridrezeptoren**

Die generierten Hybridrezeptoren wurden mit Hilfe des episomale Transfektionsvektor pCEP4 stabil in HEK293 E+ Zellen transfeziert. Die verwendeten HEK 293-Zellen bilden die für die Signaltransduktion notwendigen G-Proteine sowie die Enzyme die an der Signaltransduktion beteiligt sind (AC, PLC). Da es sich bei diesen Zellen um embryonale Zellen handelt und sie nur wenig ausdifferenziert sind, muss davon ausgegangen werden, dass sie sich in ihren Zelleigenschaften von Zellen mit einer physiologischen Expression der PTH Rezeptoren, wie humanen Knochen- oder Nierenzellen (PTH-1) und Nervenzellen (PTH-2) stark unterscheiden. Dennoch bieten HEK 293 E+ Zellen ein möglicherweise gutes Zellsystem, um derartige Untersuchungen durchführen zu können, da es sich um ein homologes, humanes Modell handelt.

Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293 E+) unterstützen die konstitutive Expression des „Epstein Barr Nuclear Antigene 1“ (EBNA 1) aus dem Epstein-Barr-Virus (EBV) bei der Replikation von Plasmiden. Das geschieht dadurch, dass die Plasmide den sogenannten „origin of replication“ des EBV tragen (Zhu, Gilbert et al. 1994). Dieses stellt ein Resistenzgen dar, so dass mit Hilfe eines Antibiotikums die Nichtträger ausselektioniert werden können. Das Virusfragment ist in den pCEP4 Vektor eingebaut, wodurch es neben der

stetigen Antigenpräsentation auch zu einer großen Rezeptorzahlexpression kommt. Hierbei kann es zu einer hohen Expressionsdichte kommen. In der vorliegenden Arbeit lag die Rezeptorzahl pro Zelle durchschnittlich zwischen 700.000 und 2,5 Millionen. Diese hohe Zahl an Rezeptoren ist für die Experimente zur Signaltransduktion durchaus wünschenswert, da Versuche mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ( $\beta_{1+2}$  adrenerge Rezeptoren, Vasopressinrezeptor Typ 2) zeigen konnten, dass dieses entscheidend für die Ankopplung an den Phospholipase C Wege ist (Hoare, de Vries et al. 1999). Unter physiologischen Bedingungen liegen die Rezeptorzahlen nicht so hoch vor, wie bei den generierten PTH Wildtyp- und Hybrid-Zellreihen. Opossumieren-Zellen oder Osteosarkomzellen exprimieren durchschnittlich gerade einmal 10.000 PTH-1 Rezeptoren pro Zelle. Die Vergleichbarkeit der *in vivo* zu den *in vitro* Bedingungen ist somit immer in Frage zu stellen.

### **3 Beeinflussung der Ligandenbindungseigenschaft durch intrazelluläre Rezeptormutationen**

Mit den stabil in HEK 293 E+ Zellen transfezierten Wildtyp- und Hybridrezeptoren wurden kompetitive Verdrängungsstudien vorgenommen, um ihre Bindungseigenschaften beurteilen zu können.

Die in der Literatur angegebenen  $IC_{50}$  Werte für die Wildtyprezeptoren liegen für den PTH-1 Rezeptor zwischen 4 und 6 nM (Gardella, Luck et al. 1996) und für den PTH-2 Rezeptor zwischen 10 und 20 nM. Die hier ermittelten  $IC_{50}$  Werte lagen durchschnittlich für die Wildtyprezeptoren um den Faktor fünf erhöht vor. Ursächlich hierfür scheint die Verwendung des pCEP4- Expressionsvektors zu sein, da es in dem verwendeten Zellsystem (HEK 293 E+) zu einer stark erhöhten Expression der Rezeptor-DNA kommt. Für die Berechnung der  $IC_{50}$  Werte wird vorausgesetzt, dass die zugegebene Menge an radioaktiv markiertem Liganden, durch die Bindung an den Rezeptor nicht verändert wird. Diese Annahme gilt nicht mehr, wenn eine zu hohe Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche vorliegt. Folglich kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Bindungskurve. Dieses konnte nicht nur für die Wildtyprezeptoren nachgewiesen werden, sondern auch für die Hybridrezeptoren. Zur Unterbindung dieses Phänomens wurden die Zellen vor der Aussaat mit nicht transfezierten HEK 293 E+ Zellen im Verhältnis 1:10 verdünnt. Hierdurch konnten für die Wildtyprezeptoren  $IC_{50}$  Werte erzielt werden, die mit denen aus der Literatur vergleichbar waren (P1R: 5 nM, P2R: 19 nM). Die  $IC_{50}$  Werte der Hybridrezeptoren reduzierten sich durch die Verdünnung um den Faktor vier.

Bei den Bindungsexperimenten die ohne eine Verdünnung mit nicht transfizierten HEK 293 E+ Zellen durchgeführt worden waren, zeigten sich die ermittelten  $IC_{50}$  Werte der Hybridrezeptoren inhomogen aber in Anlehnung an die Werte des PTH-2 Rezeptors. Anhand der Verdünnungsexperimente konnte deutlich gezeigt werden, dass die Affinität von hPTH (1-34) bei den Hybridmutanten nicht von der des PTH-2 Rezeptors abweicht. Die berechneten  $IC_{50}$  Werte lagen für die Hybridrezeptoren zwischen 15 nM und 56 nM. Gleiches konnte für die mit TIP39 durchgeführten Bindungsexperimente dargestellt werden. Auch hierbei wichen die Hybridrezeptoren in ihren Bindungseigenschaften nicht wesentlich von denen des PTH-2 Rezeptors ab.

Da sich die Bindungseigenschaften der Hybridrezeptoren nicht wesentlich von denen des Wildtyprezeptors PTH-2 unterscheiden, kann ein verändertes Signalverhalten nicht mit dem Liganden Bindungsverhalten in Zusammenhang gebracht werden, sondern am ehesten eine Folge der eingebrachten Rezeptormutationen .

#### **4 Lässt sich durch Angleichung von Rezeptorabschnitten des PTH-1 Rezeptors auf den PTH-2 Rezeptor der $IP_3$ Signalweg beeinflussen?**

Eine geringe Konzentration von  $10^{-9}$  M PTH reicht aus, um am PTH-1 Rezeptor eine Aktivierung des  $IP_3$  Weges nachzuweisen (Iida-Klein, Guo et al. 1995). Dieses konnte in den Messungen zur Freisetzung von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  nach Stimulation mit hPTH (1-34) reproduziert werden. Der PTH-2 Rezeptor kann nicht an den  $G_q$  Protein vermittelten PLC Signalweg koppeln. In den Experimenten zur Messung der akkumulierten Gesamtinositole konnte beim PTH-2 Rezeptor erst nach einer Stimulation mit  $10^{-6}$  M PTH eine Aktivierung des  $IP_3$  Weges gemessen werden. Hierbei kam es zu einem vergleichsweise geringen Anstieg um das 1,5-fache gegenüber dem Basalwert. Für den PTH-1 Rezeptor konnte ein sechsfacher Anstieg nachgewiesen werden. Eine Vorbehandlung mit Proteinkinaseinhibitoren führte für den PTH-2 Rezeptor nach einer Stimulation mit  $10^{-6}$  M PTH zu einer Verdopplung gegenüber dem gemessenen Basalwert. Beim PTH-1 Rezeptor kam es unter gleichen Stimulationsbedingungen zu einem 13-fachen Anstieg gegenüber dem Basalwert. Jede Rezeptorveränderung am Wildtyp PTH-2 Rezeptor in Form von Hybridrezeptoren, die zur Ankopplung an den  $IP_3$  Signalweg dienen, sollte die gemessene Menge an akkumulierten Gesamtinositolen des PTH-2 Rezeptors signifikant übertreffen.

Bei dem Krankheitsbild der Jansen`s metaphysären Chondrodysplasie führen Mutationen im Bereich der ersten transmembranen Schleife des PTH-1 Rezeptors zu der klinischen Ausprägung der Krankheit. Die Patienten zeigen dabei den charakteristischen kurzgliedrigen Zwergenvuchs, eine verzögerte Ossifikation und eine Hyperkalzämie. Die Erkrankung wird autosomal dominant vererbt. Der für die Ausprägung verantwortliche Bereich liegt im Übergang von der ersten intrazellulären Schleife zum zweiten transmembranösen Abschnitt. Hierbei werden drei unterschiedliche Mutationen verantwortlich gemacht. Eine dieser PTH-1 Rezeptor Mutationen ( $H^{223} \rightarrow R$ ) führt zu einem kompletten Verlust der Inositolantwort bei Parathormonstimulation (Schipani, Jensen et al. 1997; Schipani, Kruse et al. 1995). Vergleicht man die Aminosäuren mit denen des PTH-2 Rezeptors in diesem Rezeptorabschnitt, so zeigen sie sich als identisch zu einander. Deshalb kann dieser Bereich als mitverantwortlicher Abschnitt für die  $IP_3$ -Signaltransduktion am PTH-2 Rezeptor ausgeschlossen werden. Allerdings muss man davon ausgehen, dass auch diesen offensichtlich versteckten Abschnitten durch Konformationsänderungen des Rezeptors eine zusätzliche Verantwortung in der selektiven Aktivierung einzelner Signalwege zuzuschreiben ist.

Bei der sogenannten Ollier`s-disease, einer Chondromatose ist eine Mutation am extrazellulären Anteil des PTH-1 Rezeptors (R150C) für die Ausprägung zahlreicher aber gutartiger Knorpelwucherungen verantwortlich. In seltenen Fällen kann es zu einer malignen Entartung kommen, im Sinne eines Chondrosarkoms. Eine Beeinflussung des Calciumspiegels liegt nicht vor. Messungen zur Signaltransduktion können, wie schon bei dem Krankheitsbild der Jansen`s metaphysären Chondrodysplasie nachgewiesen, eine Aktivierung des  $IP_3$  Weges nicht nachweisen. Der Basalspiegel für cAMP liegt im Vergleich zum Wildtyprezeptor PTH-1 deutlich erniedrigt vor. In wieweit eine solche Punktmutation am PTH-2 Rezeptor dessen Signaltransduktion beeinflusst ist bisher nicht untersucht (Gensure, Gardella et al. 2005; Hopyan, Gokgoz et al. 2002). Veränderungen extrazellulärer Rezeptorabschnitte gingen in die Untersuchungen zur Aktivierung der Signalwege nicht mit ein.

Mit Hilfe zahlreicher Mutationen in der zweiten transmembranen Schleife des PTH-1 Rezeptors konnte ein intrazellulär gelegener Abschnitt von vier Epitopen ( $EKKY^{317-320}$ ) ausgemacht werden, der einen entscheidenden Einfluß auf die  $IP_3$ -Signaltransduktion hat (Iida-Klein, Guo et al. 1997). Wird diese Region durch die Aminosäureabfolge „DSEL“ ersetzt, so verliert der Rezeptor die Fähigkeit an den  $IP_3$  Signalweg zu koppeln. Der Adenylatzyklaseweg bleibt unbeeinflusst. Beim Abschnittsvergleich zum PTH-2 Rezeptor fiel auf, dass zwei der vier Positionen zu denen des PTH-1 Rezeptors identisch waren ( $KY^{319-320}$ ).

Der sich vom PTH-2 Rezeptor unterscheidende Abschnitt wurde zu dem des PTH-1 Rezeptors ausgetauscht (DT<sup>272-273</sup>→EK). Die generierte Rezeptormutante P2R-L2 stellt eine Angleichung dieses Bereichs der zweiten intrazellulären Schleife des PTH-2 Rezeptors an den PTH-1 Rezeptor dar. Allerdings führt weder eine Stimulation mit hPTH noch mit TIP39 zu einer Ankopplung an den IP<sub>3</sub> Signalweg.

An Mitgliedern der Klasse II der G-Protein gekoppelten Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass die dritte transmembranen Schleife für die Ankopplung an verschiedene Signaltransduktionswege von großer Wichtigkeit ist. Am PTH-1 Rezeptor des Opossum konnten hier Regionen detektiert werden, die für die G<sub>q</sub> Signalweg Aktivierung verantwortlich sind. Hierbei wurde das Verfahren des so genannten „tandem-alanine-scanning“ verwendet (Huang, Chen et al. 1996). Es wurden dabei Gruppen von jeweils vier Aminosäuren ausgewählt und alle gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Für zwei dieser Gruppen konnte gegenüber dem Wildtyp PTH-1 Rezeptor ein deutlich abgeschwächtes IP<sub>3</sub> Signal festgestellt werden: „ETNA<sup>385-388</sup>→AAAA“ und „TKLR<sup>381-384</sup>→AAAA“. Die Aminosäureabfolge „ETNA<sup>385-388</sup>“ des PTH-1 Rezeptors stimmt mit der des PTH-2 Rezeptors genau überein, so dass hier keine Veränderung nötig war. In der Aminosäureabfolge „TKLR<sup>381-384</sup>“ unterscheiden sich die beiden Rezeptoren. In der Arbeit von Z. Huang (Huang, Chen et al. 1996) konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Aminosäuren „L<sup>383</sup>“ und „R<sup>384</sup>“ keinen direkten Einfluß auf den PLC Signalweg haben, allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass gegebenenfalls erst ein Zusammenspiel mehrerer Aminosäuren eines Bereiches eine Signalveränderung ausmacht. So wurden für die Rezeptormutante P2R-L3 die beiden Aminosäuren aus dem PTH-2 Rezeptor „IW<sup>344-345</sup>“ zu „LR<sup>383-384</sup>“ des PTH-1 Rezeptors ausgetauscht. Auch für diese Rezeptormutante war es nicht möglich eine Ankopplung an den IP<sub>3</sub> Signalweg zu erzielen.

Für den PTH-1 Rezeptor konnte gezeigt werden, dass die Helices der TM3 und TM6 über verschiedene Aminosäuren in Verbindung stehen. Änderungen einzelner Aminosäuren in diesen Schleifen führte zu einer negativen Beeinflussung der G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub> Protein Ankopplung (Vilardaga, Frank et al. 2001). Unter der Überlegung, dass es möglicherweise nur durch Zusammenwirken der zweiten und dritten intrazellulären Schleife zu einer entsprechenden Signaltransduktion kommt, wurde die Kombinationsrezeptormutante P2R-L2-L3 generiert. Weder eine Stimulation mit PTH noch mit TIP39 führte zu einer IP<sub>3</sub> Akkumulation.

Der C-Terminus des PTH-1 Rezeptors liegt mit seiner Schleife komplett intrazellulär und hat einen großen Einfluß auf das Signaltransduktionsverhalten. So konnte gezeigt werden, dass eine Stützung ab der Position 474 des Opossum PTH-1 Rezeptors zu einer 5-fach höheren IP<sub>3</sub>

Signalantwort geführt hatte. Eine C-terminale Amputation ab der Position 480 des humanen PTH-1 Rezeptors zeigte eine Verdopplung der akkumulierten Gesamtinositole, aber keine Veränderung im cAMP Verhalten (Castro, Dicker et al. 2002). Dagegen zeigte die gleiche Mutation des C-Terminus des Ratten PTH-1 Rezeptors eine verbesserte cAMP Antwort und eine unveränderte Aktivierung des PLC Signalwegs (Iida-Klein, Guo et al. 1995).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus des PTH-1 Rezeptors mit dem  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Austauscher regulierenden Faktor 2 (NHERF2) interagiert. Die Anwesenheit von NHERF2 veränderte das Signaltransduktionsverhalten am PTH-1 Rezeptor von cAMP zugunsten der  $\text{IP}_3$  Signalantwort (Mahon, Donowitz et al. 2002; Tovey, Dedos et al. 2006). Hierdurch kommt es zu einem Anstieg der  $\text{IP}_3$  Signalantwort und zu einer Reduktion der maximal gemessenen cAMP Akkumulation. Verantwortlich hierfür ist eine PDZ2 Domäne, die ihre Aktivierung über eine Sequenz des C-Terminus erhält. Dieser am PTH-1 verantwortliche Rezeptorbereich unterscheidet sich grundlegend in seiner Sequenz von der des PTH-2 Rezeptors. So könnte es sein, dass der PTH-2 Rezeptor NHERF2 nicht aktivieren kann und es somit zu keiner  $\text{IP}_3$  Akkumulation kommt. Unter dieser Vorstellung wurde eine Rezeptormutante erstellt, bei der der gesamte C-terminale Abschnitt des PTH-2 Rezeptors durch die Sequenz des PTH-1 Rezeptor ausgetauscht wurde. Aber auch die daraus resultierende Rezeptormutante P2R-P1T brachte keinen messbaren Anstieg der Gesamtinositole. Mit dieser Mutation wurde die PDZ2 Domäne mit übertragen und dadurch eine NHERF2 Aktivierung ermöglicht. Allerdings kann dieses Protein nicht allein für die  $\text{G}_q$  Aktivierung verantwortlich gemacht werden kann. Die Aktivierung von NHERF2 am P2R-P1T wurde in dieser Arbeit auch nicht nachgewiesen.

Für einen weiteren Hybridrezeptor, bei dem es zu einer drastischen Angleichung des intrazellulären Bereichs an den PTH-1 Rezeptor kam, nämlich die Kombination aller Einzelmutanten (P2R-L2-L3-P1T), konnte ebenfalls keine  $\text{G}_q$  Signalankopplung nachgewiesen werden.

Neben den Wildtyprezeptoren wurden auch die Hybridrezeptoren einem empfindlicheren Verfahren unterzogen, um die Ergebnisse der Inositoltriphosphatmessungen zu bestätigen. Die Zellen wurden hierzu vor den Messungen der akkumulierten Gesamtinositole mit Proteinkinaseinhibitoren (PKA und PKC) behandelt. Der Effekt auf die Wildtyprezeptoren PTH-1 und PTH-2 wurde zu Beginn des Abschnitts bereits erwähnt. Eine Verdopplung der gemessenen  $\text{IP}_3$  Signalantwort gegenüber dem Basalwert, wie sie beim PTH-2 Rezeptor gezeigt werden konnte, wurde bei den Hybridrezeptoren nicht nachgewiesen. Die

Vorbehandlung mit PKA- und PKC Inhibitoren kann bei den Hybridrezeptoren eine Ankopplung an den IP<sub>3</sub> Signalweg nicht induzieren.

Da das Protein TIP39 als der physiologische Ligand des PTH-2 Rezeptors zu sehen ist (Faber, Dobolyi et al. 2007), wurden die Wildtyp- und Hybridrezeptoren mit diesem auf eine mögliche Aktivierung des IP<sub>3</sub>Weges getestet. Für den PTH-1 Rezeptor ist der antagonistische Effekt von TIP39 auf die Akkumulation von IP<sub>3</sub> bekannt (Hansen, Jakob et al. 2002) und konnte hierbei reproduziert werden. Sowohl für den PTH-2 Rezeptor, als auch für die Hybridrezeptoren konnte unter einer Stimulation von TIP39 keine Aktivierung des PLC Signalwegs nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung der Aktivierung des G<sub>q</sub> gekoppelten Signalweges wurde eine weitere sensitive Methode verwandt. Die Messung des intrazellulär ausgeschütteten Calciums unter einer Stimulation mit hPTH (1-34), wurde an den Wildtyp- und Hybridrezeptoren durchgeführt. An Osteoblastenzelllinien und an HEK293 E+ Zellen, die den PTH-1 Rezeptor auf der Zelloberfläche präsentierten, konnte gezeigt werden, dass es nach einer PTH Stimulation G<sub>q</sub> Protein vermittelt zu einer Freisetzung von intrazellulärem Calcium kommt. Hierfür bindet IP<sub>3</sub> an den IP<sub>3</sub> Rezeptor (Buckley, Wagstaff et al. 2001; Short and Taylor 2000). Für den PTH-1 Rezeptor konnte schon ab einer Konzentration von 10<sup>-9</sup> M PTH ein deutlicher Anstieg des intrazellulär freigesetzten Calciums gemessen werden. Dieser fiel gleich hoch aus, wie die PTH-1 Rezeptor unabhängige Positivkontrolle mit Thrombin. Weder für den PTH-2 Rezeptor noch für die Hybridrezeptoren konnte unter verschiedenen Konzentrationen an hPTH eine Fluoreszenz und damit eine Freisetzung von intrazellulärem Calcium nachgewiesen werden. Die PTH-Rezeptor unabhängige Zell-Funktionskontrolle über die Applikation von Thrombin fiel immer positiv aus.

Die Messung der intrazellulären Calcium Freisetzung und die Meßmethode der akkumulierten Gesamtinositole zeigen übereinstimmend, dass die vom PTH-2 Rezeptor abgeleiteten Hybridrezeptoren, nach einer Stimulation mit hPTH oder TIP39, nicht an den IP<sub>3</sub> Signalweg ankoppeln konnten. Auf eine Stimulation mit TIP39 wurde bei der Meßmethode zur intrazellulären Calcium Freisetzung verzichtet. Sollte eine Calciumfreisetzung in PTH-2 Rezeptor tragenden HEK293 E+Zellen G<sub>q</sub> vermittelt sein, so sollte, wie schon in den Experimenten zum IP<sub>3</sub> Signalweg gezeigt, auch TIP39 keinen Einfluß darauf haben. Überdacht werden sollte jedoch das Zellmodel. An Knochen-, Nierenzellen und Zellen der glatten Muskulatur konnte gezeigt werden, dass PTH einen extrazellulären Calciumeinstrom über den G<sub>s</sub> vermittelten Signalweg hervorruft (Barry, Gesek et al. 1998). Die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern erfolgt über bisher ungeklärte Mechanismen

(Tovey, Goraya et al. 2003). Wie eine Calciummobilisation in PTH-2 Rezeptor tragenden Zellen vermittelt wird, ist bisher ebenfalls unbekannt.

In einer Arbeit von Vildarga (Vilardaga, Frank et al. 2001) konnte gezeigt werden konnte, dass das Zusammenwirken mehrerer Teilsequenzen für die Aktivierung von Signalwegen ursächlich zu sein scheint. Es sind dafür nicht nur cytosolische Abschnitte verantwortlich, sondern auch solche die innerhalb der Transmembranabschnitten zu finden sind. So sind vermutlich einzelne Aminosäuren für die Stabilisierung der Rezeptorkonformation verantwortlich und darüber hinaus auch für die Ankopplung an die unterschiedlichen Signalwege.

## **5 Intrazelluläre Angleichung von Rezeptorabschnitten des PTH-1 Rezeptors auf den PTH-2 Rezeptor beeinflussen das cAMP-Signal**

Die intrazelluläre Angleichung von Rezeptorabschnitten des PTH-1 Rezeptors auf den PTH-2 Rezeptor konnten die Ankopplung an den IP<sub>3</sub> Signalweg nicht beeinflussen. Anhand der generierten Hybridrezeptoren konnte über das Zusammenspiel unterschiedlicher, intrazellulärer Regionen für die Ankopplung an den cAMP Signalweg neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Ein Vergleich der Wildtyprezeptoren PTH-1 und PTH-2 zeigt, dass die maximal gemessenen cAMP Akkumulation etwa gleich hoch ausfällt. Der Ligand hPTH (1-34) kann den PTH-1 Rezeptor besser stimulieren als den PTH-2 Rezeptor. Dieser Effekt wird beim Vergleich der halbmaximalen Effekte (EC<sub>50</sub> Werte) deutlich, da diese für den PTH-1 Rezeptor um den Faktor 10 niedriger vorliegen, als beim PTH-2 Rezeptor. In anderen Arbeiten wurden ähnliche Effekte beobachtet (Behar, Pines et al. 1996), allerdings verwiesen diese auf eine erniedrigte Rezeptorzahl für den PTH-2 Rezeptor. Dieses liegt in der vorliegenden Arbeit aber nicht vor, wie die Ergebnisse der Bindungsstudien zeigen konnten. Für die hierbei verwendeten Zellen mit den PTH-2 Rezeptoren wurde eine deutlich höhere Expressionsdichte ermittelt als für die, die den PTH-1 Rezeptor präsentierten. Diese lag durchschnittlich mehr als doppelt so hoch.

In den Arbeiten von A. Lida-Klein und Z. Huang konnte gezeigt werden, welchen Einfluß intrazelluläre Abschnitte der zweiten und dritten Schleife des PTH-1 Rezeptors auf das Signaltransduktionsverhalten haben. So führte in der zweiten intrazellulären Schleife eine Abwandlung der Aminosäureabfolge „EKKY<sup>317-320</sup>“ zu „DSEL<sup>317-320</sup>“ nur zu einer

Beeinträchtigung der Ankopplung an den IP<sub>3</sub> Signalweg, aber nicht zu einer Beeinflussung des cAMP Signalweges (Iida-Klein, Guo et al. 1997). Der in dieser Arbeit generierte Hybridrezeptor P2R-L2 und der Wildtyp PTH-2 Rezeptor zeigen eine Übereinstimmung in der Messung des maximal akkumulierten cAMP und auch im halbmaximalen Effekt (EC<sub>50</sub>). Mutationen in der zweiten intrazellulären Schleife haben keinen Einfluß auf die Ankopplung an das G<sub>s</sub> Protein.

Vorarbeiten am PTH-1 Rezeptor zeigten, dass die dritte interzelluläre Schleife einen wesentlichen Einfluß auf die Ankopplung an den cAMP Signalweg hat (Huang, Chen et al. 1996). Hierbei hat man das schon in Abschnitt vier dargestellte Verfahren des so genannten „tandem-alanine-scanning“ verwendet. Das heißt, dass Aminosäureabschnitte durch die Aminosäure Alanin ausgewechselt wurden. Die Mutation der „TKLR<sup>381-384</sup>“ Sequenz zu „AAAA“ reduzierte nicht nur das maximal akkumulierte cAMP gegenüber dem Wildtyp PTH-1 Rezeptor um die Hälfte, sondern verringerte auch den halbmaximale Effekt. Gleiches wurde auch für die Einzelmutationen „T<sup>381</sup>“ und „K<sup>382</sup>“ beobachtet. Die Einzelmutationen „L<sup>383</sup>“ und „R<sup>384</sup>“ zeigten sich in den cAMP Messung in Anlehnung an ihren Wildtyprezeptor. Für die in dieser Arbeit generierte Rezeptormutante P2R-L3 wurde die PTH-1 Rezeptorsequenz „LR<sup>383-384</sup>“ der dritten intrazellulären Schleife mit dem entsprechenden Abschnitt des PTH-2 Rezeptors gleichgesetzt. Hierbei kam es zwar zu einer geringen Reduzierung des maximal akkumulierten cAMP, aber zu einem deutlich schlechteren halbmaximalen Effekt gegenüber dem Wildtyp PTH-2 Rezeptor.

An Hand von Hybridmutationen, bei denen Kombinationsmutationen an der zweiten und dritten Schleife gesetzt worden waren, konnte eine wesentliche Beeinflussung des cAMP Signals beobachtet werden. So führt der Austausch der zweiten und dritten intrazellulären Schleife des Glukagon-Rezeptors gegen die erste Schleife des Dopamin-Rezeptors zu einer deutlichen Reduktion des cAMP Signals. Die Kombination beider Mutationen führt zu einem kompletten Verlust der G<sub>s</sub> Protein Ankopplung (Cypess, Unson et al. 1999). Der in dieser Arbeit verwendete Hybridrezeptor P2R-L2-L3 stellt eine Kombination aus den Einzelmutationen der zweiten und dritten intrazellulären Schleife des PTH-2 Rezeptors dar. Hierbei kommt es im Vergleich zum Wildtyprezeptor zu einer deutlichen Reduzierung des maximal akkumulierten cAMP und einer Verschlechterung des halbmaximalen Effektes. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass für die G<sub>s</sub> Protein Ankopplung eine Kooperativität verschiedener Bereiche eines Rezeptors verantwortlich ist. Diese Überlegung wird bekräftigt durch die Beeinflussung des cAMP Signalweg, die mit der Rezeptormutante P2R-L2-L3-P1T hervorgerufen werden konnte. Bei der Einzelmutante P2R-P1T wurde ein Austausch des C-

Terminus des PTH-2 durch den des PTH-1 Rezeptors vorgenommen. Dadurch wurde das maximal akkumulierte cAMP Signal deutlich, um etwa 65 %, gegenüber dem Wildtyp PTH-2 Rezeptor reduziert. Die Kombination aller Einzelmutationen im P2R-L2-L3-P1T führte interessanterweise zu einer gebesserten Ankopplung an das G<sub>s</sub> Protein. Gegenüber dem PTH-2 Rezeptor zeigte sich hinsichtlich des maximal akkumulierten cAMP eine nur etwa 35 %-ige Reduktion. Das durch den Austausch des C-Terminus induzierte Signaldefizit, konnte durch eine Kombination mit den Mutationen der zweiten und dritten intrazellulären Schleifen teilweise wieder ausgeglichen werden. Diese Beobachtung lässt den Schluß zu, dass eine Interaktion zwischen den beiden intrazellulären Schleifen und dem C-Terminus besteht, die mit einer hPTH (1-34) Stimulation zu einer Beeinflussung des G<sub>s</sub> Protein gekoppelten cAMP Signals führt.

Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurden die Versuche auch hinsichtlich einer Stimulation mit dem Liganden TIP39 durchgeführt. Wie Vorarbeiten bereits zeigen konnten lässt sich der cAMP Signalweg des PTH-1 Rezeptors mit TIP39 nicht aktivieren (Hoare, Clark et al. 2000). Am PTH-2 Rezeptor konnte gezeigt werden, dass es im Vergleich zur Stimulation mit hPTH zu einer Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve nach links kommt. Das Peptid TIP39 agiert höchstwahrscheinlich als physiologischer Ligand am PTH-2 Rezeptor. Die sich vom PTH-2 Rezeptor ableitenden Hybridrezeptoren zeigten im Wesentlichen ähnliche Effekte wie mit einer hPTH Stimulation gesehen wurden. Sehr auffällig war jedoch die veränderte Beeinflussung des cAMP Signalweges durch Austausch des C-Terminus vom PTH-1 Rezeptor auf den PTH-2 Rezeptor. Hinsichtlich der maximalen cAMP Akkumulation konnte am P2R-P1T gegenüber dem PTH-2 Rezeptor ein um 75 % reduziertes Signal gemessen werden. Dagegen zeigte die Kombinationsmutante P2R-L2-L3-P1T nach Stimulation mit TIP39 eine drastisch verbesserte Ankopplung an den cAMP Signalweg. Gegenüber dem Wildtyp PTH-2 Rezeptor liegt hinsichtlich des maximal akkumulierten cAMP eine Reduzierung um gerade einmal 17 % vor. Eine hPTH Stimulation zeigte am P2R-L2-L3-P1T die Wiederherstellung des cAMP Signals nicht so deutlich wie sie mit einer TIP39 Stimulation sichtbar sind.

Unklar bleibt, ob es sich hierbei um einen Liganden spezifischen Effekt handelt. Inwieweit TIP39 am P2R-L2-L3-P1T weitreichende Konformationsänderungen induziert, die zu einer verbesserten G<sub>s</sub> Protein Ankopplung führt, wurde hier nicht weiter untersucht.

Zusammenfassend kann durch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse gezeigt werden, dass Veränderungen von Aminosäuren am Wildtyp- PTH-2 Rezeptor in Form von

Hybridrezeptoren, den cAMP Signalweg abschwächen und eine Ankopplung an den nicht vorkommenden  $G_q$  vermittelten Signalweg, nicht erreicht werden konnte. Jeder Aminosäureaustausch hatte jedoch einen Effekt auf die Ankopplung an G Proteine.

## **6 Regulatorproteine induzieren eine Inaktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren**

Um den Rezeptor vor einer dauerhaften Aktivierung zu schützen und in einen wieder stimulierbaren Zustand zurückzuführen, bedarf es einer Reduzierung der über G-Proteine gekoppelten „second messenger“ Signale und einer Verminderung der Rezeptorzahl.

So erfolgt auf eine G-Protein gekoppelte Rezeptoraktivierung zunächst eine Phase der *Desensibilisierung* mit anschließender *Internalisierung* und *Resynthesierung*. Für den Desensibilisierungsschritt wird der Rezeptor phosphoryliert und es kommt zu einer Translokation von Regulatorproteinen, den  $\beta$ -Arrestinen, aus dem Zytosol an die Zellmembran. Der entstehende Rezeptor-Arrestin-Komplex ist für die anstehende Internalisierung notwendig. Es erfolgt eine Hemmung der G-Proteine mit einer nachfolgenden Reduzierung der Signaltransduktion (Gems and Partridge 2001; Guarente and Kenyon 2000). Mittels Clathrin gebundener Vesikel erfolgt die anschließende Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptor-Arrestin-Komplexes hervor. Intrazellulär schließt sich nach Abspaltung des Liganden ein Recyclingverfahren an, dass zu einer Resynthesierung des Rezeptors mit erneuter Präsentation auf der Zelloberfläche führt. Für den PTH-1 Rezeptor konnte das Regulatorprotein  $\beta$ -Arrestin-2 für eine schnelle Desensibilisierung mit Abnahme des cAMP Signals und einer Internalisierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes verantwortlich gemacht werden (Bisello, Manen et al. 2004). Dieser ist  $\beta$ -Arrestin unabhängig.

Für den PTH-1 Rezeptor konnte der Einfluß von Regulatorproteinen in den Messung zur Freisetzung von Calcium nach hPTH Stimulation auf indirektem Wege nachgewiesen werden. Hierfür wurden Mehrfachstimulationen in kurzen Zeitabständen durchgeführt. Die deutliche Abnahme des Signals schon nach der zweiten Stimulation, spiegelt die Desensibilisierung des Rezeptors wieder. Dieses geschieht unabhängig von ansteigenden PTH-Konzentrationen. Unter weiteren Stimulationen nimmt die Fluoreszenz und damit die Freisetzung von intrazellulärem Speicher weiter ab. Das bedeutet, dass sich der Rezeptor in einem inaktiven Zustand befindet und somit keine Signaltransduktion gemessen werden kann.

Für den PTH-2 Rezeptor und für die in dieser Arbeit generierten Hybridrezeptoren konnte keine  $G_q$  Protein vermittelte Freisetzung von  $Ca^{2+}$  nachgewiesen werden. Welcher Regulationsmechanismus für die Desensibilisierung am PTH-2 Rezeptor verantwortlich ist, ist bisher unbekannt.

## V Anhang

### 1 Zusammenfassung

Parathormon (PTH) aktiviert am PTH-1 Rezeptor (P1R) mindestens zwei Signalwege: Über Guanosintriphosphat-bindende Proteine ( $G_s$ ) kommt es intrazellulär zu einem Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA).  $G_q$  Protein-vermittelt erfolgt eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und ein intrazellulärer Anstieg des Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ). Der verwandte PTH-2 Rezeptor (P2R) wird einerseits durch seinen vermutlich physiologischen Liganden, das tuberoinfundibuläre Peptid (TIP39), und andererseits durch PTH aktiviert. Im Gegensatz zum P1R zeigt der P2R nur eine Ankopplung an den cAMP Signalweg und keine an den PLC Signalweg.

Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass intrazelluläre Abschnitte der zweiten und dritten Schleife sowie Bereiche des C-Terminus des P1R für die Aktivierung des PLC Signalweges verantwortlich sind. In der vorliegenden Dissertation erfolgte eine stufenweise Angleichung intrazellulärer Abschnitte des P2R an den P1R. Die generierten Hybridrezeptoren wurden hinsichtlich ihres Signaltransduktionsverhaltens untersucht. Mit der Bestimmung der akkumulierten Gesamtinositole und des intrazellulären Calciums  $[Ca]_i$  konnte gezeigt werden, dass trotz einer 95%-igen Übereinstimmung der intrazellulären Aminosäuresequenzen der P2R-Hybridrezeptoren mit denen des P1R, die Ankopplung an den PLC Signalweg nicht übertragen werden kann. Diese Ergebnisse wurden für Stimulationen mit PTH und TIP39 nachgewiesen. Durch Hemmung der Proteinkinasen A und C konnte, wie erwartet, am P1R ein verstärktes  $IP_3$  Signal beobachtet werden. Eine Aktivierbarkeit des PLC Signalweges wurde auch hierbei für die Hybridrezeptoren nicht gesehen.

Für die Aktivierung des cAMP Signalweges der Hybridrezeptoren konnte beobachtet werden, dass diese sich weitestgehend in Anlehnung zum P2R verhalten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass für eine effiziente Ankopplung an den cAMP Signalweg alle aus dem P1R in den P2R eingefügten Teilabschnitte (zweite, dritte Schleife und C-Terminus) zusammenwirken. Der Hybridrezeptor, an dem alle drei Teilabschnitte ausgetauscht wurden, führte zu einer signifikant besseren Ankopplung an den cAMP Signalweg, als die Einzelmutation des C-Terminus. Die Messung zum cAMP Signalweg wurden mit den Liganden TIP39 und PTH durchgeführt. Für die Aktivierung des  $G_s$  Protein-vermittelten cAMP Signalweg am P1R oder P2R sind daher vermutlich Interaktionen verschiedener Rezeptorabschnitte verantwortlich. Insgesamt konnten in dieser Arbeit weitere wichtige Erkenntnisse bezüglich unterschiedlicher Aspekte der Signaltransduktion des P1R und des P2R gewonnen werden.

## 2 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
AC	Adenylatzyklase
AS	Aminosäure(n)
B <sub>max</sub>	maximale Bindung an den Rezeptor
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cpm	counts per minute, Zerfälle pro Minute
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaR	calcium-sensing-receptor
C-Terminus	Carboxylterminus
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	halbmaximale effektive Wirkkonzentration
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	fötale Kälberserum
G-Protein	Guanosintrisphosphat ( GTP )-bindendes Protein
G <sub>α<sub>i</sub></sub>	inhibierendes G-Protein
G <sub>α<sub>s</sub></sub>	stimulierendes G-Protein
GPCR	G Protein gekoppelter Rezeptor
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintrisphosphat
h	Stunde
HEK 293 E+ Zellen	human embryonal kidney cells, humane embryonale Nierenzellen
hPTH	humanes PTH
hPTHrP	humanes PTHrP
IBMX	Isobutyl-Methylxanthin
IC <sub>50</sub>	halbmaximale effektive Hemmkonzentration
IP	Inositolphosphat
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
IP3R	Inositoltrisphosphat Rezeptor
kb	kilo Basenpaare
K <sub>D</sub>	Bindungsaffinitätskonstante
min	Minute
MW	Molekulargewicht
N-Terminus	Amino-Terminus
PAR-1	Proteinase aktivierender Rezeptor, Thrombinrezeptor
PKA	Proteinkinase A (cAMP-abhängige Proteinkinase)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Plasmid	Klonierungsvektor
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon-related-Protein
PTH-1 Rezeptor, P1R	Parathormon-1 Rezeptor
PTH-2 Rezeptor, P2R	Parathormon-2 Rezeptor
RIA	Radioimmunoassay

rPTH	Rattenparathormon
TIP39	tuberoinfundibular peptide of 39 residues, aus 39 AS aufgebautes tuberoinfundibuläres Peptid
TM	Transmembrandomäne
U	units = Einheiten
WT	Wildtyp (-Rezeptor)

### 3 Literaturverzeichnis

- Abou-Samra, A. B., H. Juppner, et al. (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 U S A **89**(7): 2732-2736.
- al-Ani, B., M. Saifeddine, et al. (1995). "Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH<sub>2</sub>, in rat vascular and gastric smooth muscle." Can J Physiol Pharmacol **73**(8): 1203-1207.
- Barry, E. L., F. A. Gesek, et al. (1998). "Distinct calcium channel isoforms mediate parathyroid hormone and chlorothiazide-stimulated calcium entry in transporting epithelial cells." J Membr Biol **161**(1): 55-64.
- Behar, V., M. Pines, et al. (1996). "The human PTH<sub>2</sub> receptor: binding and signal transduction properties of the stably expressed recombinant receptor." Endocrinology **137**(7): 2748-2757.
- Bisello, A., D. Manen, et al. (2004). "Agonist-specific regulation of parathyroid hormone (PTH) receptor type 2 activity: structural and functional analysis of PTH- and tuberoinfundibular peptide (TIP) 39-stimulated desensitization and internalization." Mol Endocrinol **18**(6): 1486-1498.
- Bringhurst, F. R., A. M. Stern, et al. (1988). "Peripheral metabolism of PTH: fate of biologically active amino terminus in vivo." Am J Physiol **255**(6 Pt 1): E886-893.
- Bro, S. and K. Olgaard (1997). "Effects of excess PTH on nonclassical target organs." Am J Kidney Dis **30**(5): 606-620.
- Brown, E. M., G. Gamba, et al. (1993). "Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid." Nature **366**(6455): 575-580.
- Buckley, K. A., S. C. Wagstaff, et al. (2001). "Parathyroid hormone potentiates nucleotide-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> release in rat osteoblasts independently of G<sub>q</sub> activation or cyclic monophosphate accumulation. A mechanism for localizing systemic responses in bone." J Biol Chem **276**(12): 9565-9571.
- Carter, P. H., M. Shimizu, et al. (1999). "The hydrophobic residues phenylalanine 184 and leucine 187 in the type-1 parathyroid hormone (PTH) receptor functionally interact with the amino-terminal portion of PTH-(1-34)." J Biol Chem **274**(45): 31955-31960.
- Castro, M., F. Dicker, et al. (2002). "Dual regulation of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling by protein kinase C and beta-arrestins." Endocrinology **143**(10): 3854-3865.

- Chackalamannil, S. (2006). "Thrombin receptor (protease activated receptor-1) antagonists as potent antithrombotic agents with strong antiplatelet effects." *J Med Chem* **49**(18): 5389-5403.
- Cosman, F. and R. Lindsay (1998). "Is parathyroid hormone a therapeutic option for osteoporosis? A review of the clinical evidence." *Calcif Tissue Int* **62**(6): 475-480.
- Coughlin, S. R. (1993). "Thrombin receptor structure and function." *Thromb Haemost* **70**(1): 184-187.
- Coughlin, S. R., R. M. Scarborough, et al. (1992). "Thrombin receptor structure and function." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**: 149-154.
- Cypess, A. M., C. G. Unson, et al. (1999). "Two cytoplasmic loops of the glucagon receptor are required to elevate cAMP or intracellular calcium." *J Biol Chem* **274**(27): 19455-19464.
- Davey, M. G. and E. F. Luscher (1967). "Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets." *Nature* **216**(5118): 857-858.
- Dempster, D. W., F. Cosman, et al. (1993). "Anabolic actions of parathyroid hormone on bone." *Endocr Rev* **14**(6): 690-709.
- Dobnig, H. and R. T. Turner (1995). "Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells." *Endocrinology* **136**(8): 3632-3638.
- Duan, Y., V. De Luca, et al. (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.
- Dunlay, R. and K. Hruska (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.
- Eichinger, A., N. Fiaschi-Taesch, et al. (2002). "Transcript expression of the tuberoinfundibular peptide (TIP)39/PTH2 receptor system and non-PTH1 receptor-mediated tonic effects of TIP39 and other PTH2 receptor ligands in renal vessels." *Endocrinology* **143**(8): 3036-3043.
- Emanuel, R. L., G. K. Adler, et al. (1996). "Calcium-sensing receptor expression and regulation by extracellular calcium in the AtT-20 pituitary cell line." *Mol Endocrinol* **10**(5): 555-565.
- Faber, C. A., A. Dobolyi, et al. (2007). "Distribution of tuberoinfundibular peptide of 39 residues and its receptor, parathyroid hormone 2 receptor, in the mouse brain." *J Comp Neurol* **502**(4): 563-583.
- Gardella, T. J. and H. Juppner (2000). "Interaction of PTH and PTHrP with their receptors." *Rev Endocr Metab Disord* **1**(4): 317-329.
- Gardella, T. J., M. D. Luck, et al. (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**(22): 12820-12825.
- Gardella, T. J., M. D. Luck, et al. (1996). "Converting parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) into a potent PTH-2 receptor agonist." *J Biol Chem* **271**(33): 19888-19893.
- Gems, D. and L. Partridge (2001). "Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture." *Curr Opin Genet Dev* **11**(3): 287-292.
- Gensure, R. C., T. J. Gardella, et al. (2005). "Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors." *Biochem Biophys Res Commun* **328**(3): 666-678.
- Goltzman, D. (1999). "Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules." *J Bone Miner Res* **14**(2): 173-177.

- Guarente, L. and C. Kenyon (2000). "Genetic pathways that regulate ageing in model organisms." *Nature* **408**(6809): 255-262.
- Habener, J. F., M. Rosenblatt, et al. (1984). "Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism." *Physiol Rev* **64**(3): 985-1053.
- Hansen, I. A., O. Jakob, et al. (2002). "Characterization of the human and mouse genes encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues, a ligand of the parathyroid hormone receptor family." *J Endocrinol* **174**(1): 95-102.
- Harvey, S. and R. A. Fraser (1993). "Parathyroid hormone: neural and neuroendocrine perspectives." *J Endocrinol* **139**(3): 353-361.
- Hendy, G. N., H. M. Kronenberg, et al. (1981). "Nucleotide sequence of cloned cDNAs encoding human preproparathyroid hormone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12): 7365-7369.
- Hipkin, R. W., J. Sanchez-Yague, et al. (1993). "Agonist-induced phosphorylation of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor expressed in a stably transfected cell line." *Mol Endocrinol* **7**(7): 823-832.
- Hoare, S. R., J. A. Clark, et al. (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.
- Hoare, S. R., G. de Vries, et al. (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.
- Hoare, S. R., D. A. Rubin, et al. (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.
- Hock, J. M. (2001). "Anabolic actions of PTH in the skeletons of animals." *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2**(1): 33-47.
- Hopyan, S., N. Gokgoz, et al. (2002). "A mutant PTH/PTHrP type I receptor in enchondromatosis." *Nat Genet* **30**(3): 306-310.
- Huang, Z., Y. Chen, et al. (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/Ca<sup>2+</sup> signal transduction pathways." *J Biol Chem* **271**(52): 33382-33389.
- Hung, D. T., T. K. Vu, et al. (1992). "Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation." *J Clin Invest* **89**(4): 1350-1353.
- Iida-Klein, A., J. Guo, et al. (1997). "Mutations in the second cytoplasmic loop of the rat parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor result in selective loss of PTH-stimulated phospholipase C activity." *J Biol Chem* **272**(11): 6882-6889.
- Iida-Klein, A., J. Guo, et al. (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.
- Ishihara, H., A. J. Connolly, et al. (1997). "Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans." *Nature* **386**(6624): 502-506.
- Jerome, C. P., D. B. Burr, et al. (2001). "Treatment with human parathyroid hormone (1-34) for 18 months increases cancellous bone volume and improves trabecular architecture in ovariectomized cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)." *Bone* **28**(2): 150-159.
- Jobert, A. S., P. Zhang, et al. (1998). "Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia." *J Clin Invest* **102**(1): 34-40.

- John, M. R., M. Arai, et al. (2002). "Identification and characterization of the murine and human gene encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues." *Endocrinology* **143**(3): 1047-1057.
- Johnston, S., S. Andrews, et al. (2007). "The effects of combination of alendronate and human parathyroid hormone(1-34) on bone strength are synergistic in the lumbar vertebra and additive in the femur of C57BL/6J mice." *Endocrinology* **148**(9): 4466-4474.
- 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.
- Jüppner, H., A. B. Abou-Samra, et al. (1991). "A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide." *Science* **254**(5034): 1024-1026.
- Karaplis, A. C., A. Luz, et al. (1994). "Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene." *Genes Dev* **8**(3): 277-289.
- Kishi, T., H. Hagino, et al. (1998). "Bone responses at various skeletal sites to human parathyroid hormone in ovariectomized rats: effects of long-term administration, withdrawal, and readministration." *Bone* **22**(5): 515-522.
- Kronenberg, H. M. (2007). "PTH regulates the hematopoietic stem cell niche in bone." *Adv Exp Med Biol* **602**: 57-60.
- Kuo, J. and T. B. Usdin (2007). "Development of a rat parathyroid hormone 2 receptor antagonist." *Peptides* **28**(4): 887-892.
- Lanske, B., P. Divieti, et al. (1998). "The parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mediates actions of both ligands in murine bone." *Endocrinology* **139**(12): 5194-5204.
- Lee, C., T. J. Gardella, et al. (1994). "Role of the extracellular regions of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor in hormone binding." *Endocrinology* **135**(4): 1488-1495.
- Mahon, M. J., M. Donowitz, et al. (2002). "Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 2 directs parathyroid hormone 1 receptor signalling." *Nature* **417**(6891): 858-861.
- Marcus, R. (2000). "Anabolic therapies." *Clin Lab Med* **20**(3): 623-637, viii.
- Martin, T. J., M. T. Gillespie, et al. (1995). "Multiple sites of synthesis and action of parathyroid hormone-related protein." *Miner Electrolyte Metab* **21**(1-3): 123-128.
- Murakami, T., M. Yamamoto, et al. (1998). "Transforming growth factor-beta1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells." *Biochem Biophys Res Commun* **252**(3): 747-752.
- Neer, R. M., C. D. Arnaud, et al. (2001). "Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis." *N Engl J Med* **344**(19): 1434-1441.
- O'Dowd, B. F., M. Hnatowich, et al. (1988). "Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human beta 2-adrenergic receptor. Localization of regions involved in G protein-receptor coupling." *J Biol Chem* **263**(31): 15985-15992.
- Potts, J. T. (2005). "Parathyroid hormone: past and present." *J Endocrinol* **187**(3): 311-325.
- Qin, L., L. J. Raggatt, et al. (2004). "Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism." *Trends Endocrinol Metab* **15**(2): 60-65.
- Racke, F. K. and E. F. Nemeth (1993). "Cytosolic calcium homeostasis in bovine parathyroid cells and its modulation by protein kinase C." *J Physiol* **468**: 141-162.
- Rasmussen, H. (1986). "The calcium messenger system (1)." *N Engl J Med* **314**(17): 1094-1101.
- Rasmussen, H. (1986). "The calcium messenger system (2)." *N Engl J Med* **314**(18): 1164-1170.

- Raue, F. and E. Blind (1993). "[Parathyroid hormone-related protein. A new calcium regulating hormone and its significance in tumor-associated hypercalcemia]." Dtsch Med Wochenschr **118**(24): 916-920.
- Rolz, C., M. Pellegrini, et al. (1999). "Molecular characterization of the receptor-ligand complex for parathyroid hormone." Biochemistry **38**(20): 6397-6405.
- Schipani, E., G. S. Jensen, et al. (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.
- Schipani, E., K. Kruse, et al. (1995). "A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia." Science **268**(5207): 98-100.
- Short, A. D. and C. W. Taylor (2000). "Parathyroid hormone controls the size of the intracellular Ca(2+) stores available to receptors linked to inositol trisphosphate formation." J Biol Chem **275**(3): 1807-1813.
- Strader, C. D., T. M. Fong, et al. (1994). "Structure and function of G protein-coupled receptors." Annu Rev Biochem **63**: 101-132.
- Tovey, S. C., S. G. Dedos, et al. (2006). "Signalling from parathyroid hormone." Biochem Soc Trans **34**(Pt 4): 515-517.
- Tovey, S. C., T. A. Goraya, et al. (2003). "Parathyroid hormone increases the sensitivity of inositol trisphosphate receptors by a mechanism that is independent of cyclic AMP." Br J Pharmacol **138**(1): 81-90.
- Urena, P., A. Iida-Klein, et al. (1994). "Regulation of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acid by glucocorticoids and PTH in ROS 17/2.8 and OK cells." Endocrinology **134**(1): 451-456.
- Urena, P., X. F. Kong, et al. (1993). "Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues." Endocrinology **133**(2): 617-623.
- Usdin, T. B. (1997). "Evidence for a parathyroid hormone-2 receptor selective ligand in the hypothalamus." Endocrinology **138**(2): 831-834.
- Usdin, T. B., T. I. Bonner, et al. (1996). "Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat." Endocrinology **137**(10): 4285-4297.
- Usdin, T. B., A. Dobolyi, et al. (2003). "Emerging functions for tuberoinfundibular peptide of 39 residues." Trends Endocrinol Metab **14**(1): 14-19.
- Usdin, T. B., C. Gruber, et al. (1995). "Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor." J Biol Chem **270**(26): 15455-15458.
- Usdin, T. B., J. Hilton, et al. (1999). "Distribution of the parathyroid hormone 2 receptor in rat: immunolocalization reveals expression by several endocrine cells." Endocrinology **140**(7): 3363-3371.
- Usdin, T. B., S. R. Hoare, et al. (1999). "TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus." Nat Neurosci **2**(11): 941-943.
- Usdin, T. B., T. Wang, et al. (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.
- Vasicek, T. J., B. E. McDevitt, et al. (1983). "Nucleotide sequence of the human parathyroid hormone gene." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(8): 2127-2131.
- Vilardaga, J. P., M. Frank, et al. (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): 33435-33443.

- Wang, J., L. M. Coolen, et al. (2006). "Neurons containing tuberoinfundibular peptide of 39 residues are activated following male sexual behavior." Neuropeptides **40**(6): 403-408.
- 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.
- Xu, W. F., H. Andersen, et al. (1998). "Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6642-6646.
- Yasuda, H., N. Shima, et al. (1998). "Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3597-3602.
- Zhu, X., S. Gilbert, et al. (1994). "Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density." Mol Pharmacol **46**(3): 460-469.

## **Publikationen**

### **Vorträge**

- U. Heindel, **T. Wobbe**, M. Weber, M. John, E. Blind  
„Characterization of PTH receptor epitopes involved in inositol phosphate signaling using chimeric PTH-1/PTH-2 receptor hybrid constructs“  
46. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Göttingen, 2002

### **Posterpräsentationen**

- U. Heindel, **T. Wobbe**, M. Weber, E. Blind  
„Charakterisierung für den Inositolphosphat-Signalweg notwendige Abschnitte des PTH-Rezeptors mittels PTH1R/PTH2R-Hybridkonstrukten“  
Alumni-Treffen der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg, Würzburg 2002

# Curriculum Vitae

## *Daten zur Person:*

Thomas Wobbe  
Geboren am: 13.08.1976 in Lemgo  
Wohnhaft in: Schiestlstr. 11, 97080 Würzburg  
Verheiratet mit Sandra Wobbe-Vaccotti,  
Tochter Lucia Wobbe

## *Ausbildung:*

1982-1984	Grundschule, Oldenburg
1984-1987	Grundschule, Tettngang
1987-1996	Gymnasium, Tettngang
1996	Abitur
08/1996-09/1997	Zivildienst im Rettungsdienst beim Roten Kreuz, Bodenseekreis

## *Hochschulausbildung:*

04/1998 – 05/2004	Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
04/2000	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
04/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)
04/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)
05/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)

## *Berufstätigkeit:*

Seit 07/2004	Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universitätsklinik Würzburg.
--------------	---



## Danksagung

*Ich danke*

- Herrn Priv. Doz. Dr. med. Eberhard Blind für die Themenstellung, die Bereitstellung aller technischen und materiellen Mittel, die Betreuung über große räumliche und zeitliche Distanzen. Danke auch für das Vertrauen und die Bereitschaft mich aus allen Positionen heraus zu unterstützen.
- Frau Dr. Ulla Kehl für ihre Betreuung im Labor und für ihre unvergessliche Bereitschaft die Rohfassung meiner Arbeit zu korrigieren. Sie hat es möglich gemacht, dass aus einer Geschichte eine Dissertation geworden ist.
- Meinem Freund Herrn Farhad Daneschwar, der mich bei der Durchführung dieser komplexen Experimente tatkräftig unterstützt hat.
- Frau Susanne Meyer (MTA) für ihre unvergessliche Hilfe bei den Experimenten.
- Herrn Prof. Dr. med. B. Allolio für die Möglichkeit in seinem Endokrinologischen Labor arbeiten zu dürfen und die prompte Bereitschaft die Referentenfunktion zu übernehmen. Vor Beginn meiner Arbeit klärte mich Prof. Allolio darüber auf, dass man für eine Doktorarbeit im Labor nur eine Fähigkeit mitbringen müsse, eine sehr große Frustrationstoleranz. Nach sieben Jahren Doktorarbeit weiß ich nun, was er mir sagen wollte. Ein unvergessliches Lebenslehrstück für mich.
- Meinem Freund Herrn Falk Hauptmann, Herrn Priv. Doz. P. Tass und dem Anästhesiologischen Labor für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Vermittlung theoretischer Grundlagen und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente zur Messung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Herrn Prof. Dr. med. M. Herbert, der freundlicherweise die Korreferentenfunktion übernommen hatte und mich dem Ziel der Promotion tatkräftig unterstützte.
- Meinen Eltern, die mich nicht nur finanziell, sondern auch moralisch unterstützt haben. Ihr unermesslicher Stolz über meine Promotion macht mich sehr glücklich.
- Meiner Frau Sandra und meiner Tochter Lucia für alle Liebe, Zeit und Rücksicht, die mir entgegen gebracht wurden. Ich danke Euch, dass Ihr meinen Frust und Trauer ertragen habt und mich immer wieder aufgebaut habt. Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft!