



**Effekte von Parathormon auf die
Struktur und Komplexierung des
Parathormonrezeptors 1**

**Effects of parathyroid hormone on the
structure and complexation of
parathyroid hormone receptor 1**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
MD/PhD-Programm

vorgelegt von

Dr. med. Johann Christoph Klenk

aus

Gießen

Würzburg 2009

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Jörg Schultz

1. Betreuer: Prof. Dr. Martin J. Lohse

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Müller

3. Betreuer: Prof. Dr. Karl-Norbert Klotz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Effekte von Parathormon auf die Struktur und Komplexierung des Parathormonrezeptors 1“ selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled “Effects of parathyroid hormone on the structure and complexation of parathyroid hormone receptor 1” is the result of my own work. I did not receive any help or support from third parties, i.e. commercial consultants or others. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I verify that this thesis, neither in identical nor in similar form has not yet been submitted as a part of another examination process.

I confirm that the information which I have given in this application is complete and true.

Würzburg,

Inhalt

1	Einleitung.....	9
1.1	Überblick.....	9
1.2	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	9
1.2.1	Signaltransduktion über G-Proteine.....	10
1.2.2	Klassifizierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren	12
1.3	Der PTH/PTHrP-Rezeptor.....	14
1.3.1	Allgemeine Struktur des PTH1-Rezeptors.....	14
1.3.2	Liganden des PTH1-Rezeptors	17
1.3.3	Bindung von PTH und Rezeptoraktivierung	19
1.3.4	Signaltransduktion des PTHR	20
1.3.5	Physiologie des Parathormons	20
1.3.6	Klinische Anwendung des Parathormons.....	22
1.4	β -Arrestin.....	22
1.4.1	Interaktion des PTHR mit β -Arrestin.....	24
1.5	PDZ-Proteine	25
1.5.1	Der Natrium/Protonen-Austauscher regulierende Faktor (NHERF).....	26
1.5.2	Die Interaktion von NHERF-Proteinen mit dem PTHR	28
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	30
2	Material und Methoden	31
2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	31
2.2	Antikörper.....	31
2.3	Plasmide.....	32
2.4	Enzyme.....	32
2.5	Bakterienstämme	32
2.6	Eukaryotische Zelllinien.....	33

2.7	Puffer und Medien	33
2.7.1	Puffer für molekularbiologische Arbeiten.....	33
2.7.2	Puffer für proteinchemische Arbeiten.....	34
2.7.3	Medien für Bakterien	35
2.7.4	Medien für eukaryotische Zellen.....	35
2.8	Gentechnische Methoden.....	35
2.8.1	DNA Präparation.....	35
2.8.2	Polymerasekettenreaktion	35
2.8.3	DNA-Gelelektrophorese.....	36
2.8.4	Restriktionshydrolyse von DNA.....	36
2.8.5	Ligation von DNA	36
2.8.6	Transformation von E.coli-Stämmen	37
2.9	Zellkulturtechniken	37
2.9.1	Kultivierung von E. coli.....	37
2.9.2	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	38
2.9.3	Transfektion von Zelllinien	38
2.9.4	Generierung stabil exprimierender Zelllinien	39
2.10	Proteinchemische Methoden.....	39
2.10.1	Coomassie-Färbung	39
2.10.2	SDS-PAGE.....	40
2.10.3	Herstellung eines Antiserums gegen den C-Terminus des PTHR	40
2.10.4	Isolierung von Zellmembranen.....	41
2.10.5	Solubilisierung von Proteinen	41
2.10.6	Dot-Blot.....	42
2.10.7	Western-Blot.....	42
2.10.8	Immundetektion	42
2.10.9	Immunpräzipitation	43
2.10.10	Enzymatische Deglykosilierung des PTHR.....	44

2.10.11	[³⁵ S]-Markierung von Proteinen und Fluorographie	44
2.11	Mikroskopische Techniken	46
2.11.1	Immunfluoreszenz	46
2.11.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	46
2.11.3	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Messungen	47
2.12	Bioinformatik und Laborsoftware	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Untersuchungen über den Langzeiteffekt von Parathormon auf den PTH-Rezeptor	49
3.1.1	Agonisten führen zu einer Internalisierung des PTHR.....	49
3.1.2	Längere Aktivierung des PTHR führt zu einer Massenzunahme des Proteins	52
3.1.3	Die PTH-vermittelte Massenzunahme des PTHR ist unabhängig von Glykosylierung, SUMOylierung oder Ubiquitinierung	56
3.1.4	PTH stabilisiert das PTHR Protein und verhindert seinen Abbau.....	59
3.1.5	Der PTHR wird in der extrazellulären Domäne gespalten	61
3.1.6	Die Spaltung des PTHR wird durch eine Zink-abhängige Metalloprotease vermittelt	63
3.1.7	PTH verhindert die Spaltung des PTHR durch dessen Internalisierung	66
3.2	Interaktion des PTH-Rezeptors mit NHERF und β-Arrestin.....	69
3.2.1	NHERF1 bildet einen konstitutiven Komplex mit dem PHTR in lebenden Zellen.....	69
3.2.2	NHERF1 interagiert direkt mit β-Arrestin2.....	72
3.2.3	PTH induziert eine Konformationsänderung im ternären Komplex	73
3.2.4	NHERF1 beschleunigt die Interaktion von β-Arrestin2 mit dem PTHR	75
4	Diskussion	78
4.1	Der PTHR wird in der Ektodomäne proteolytisch gespalten	78
4.1.1	Die proteolytische Spaltung der PTHR Ektodomäne	80
4.1.2	Charakterisierung der Protease.....	81

4.1.3	Gemeinsamkeiten zwischen PTHR und TSHR.....	82
4.1.4	Die biologische Bedeutung der Spaltung der PTHR-Ektodomäne.....	84
4.2	Die Interaktion des PTHR mit β -Arrestin2 und NHERF1.....	86
4.2.1	Der PTHR bildet einen ternären Komplex mit β -Arrestin2 und NHERF1..	86
4.2.2	NHERF1 beschleunigt die Rekrutierung von β -Arrestin2 an den PTHR	87
5	Zusammenfassung	89
6	Anhang	91
6.1	Abkürzungen.....	91
6.2	Sequenzvergleiche	93
7	Literaturverzeichnis.....	95
8	Publikationsverzeichnis	110
	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Überblick

Die Funktion multizellulärer Organismen erfordert, dass eine Vielzahl von Zelltypen mit den unterschiedlichsten biologischen Aufgaben koordiniert miteinander agieren, um so die physiologische Homöostase des Organismus aufrecht zu erhalten. Dies setzt die Fähigkeit voraus, extrazelluläre Stimuli zu empfangen und darauf spezifisch reagieren zu können. Zu den extrazellulären Mediatoren, welche die zellulären Aktivitäten modulieren und koordinieren, gehören Hormone, Neurotransmitter, kleine Peptide und Proteine, Ionen, Lipide sowie sensorische Reize wie Licht, Gerüche und Pheromone. Diese Mediatoren interagieren in der Regel über spezifische Rezeptoren, welche im Zellinneren oder auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, um charakteristische zelluläre Antworten hervorzurufen.

1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) bilden die größte Familie der Oberflächenrezeptoren [1]. Über 3% des menschlichen Genoms kodieren für diese Rezeptorenklasse und stellen ca. 1-5% aller zellulären Proteine [2-4]. Dementsprechend existiert eine große Anzahl von Liganden für die einzelnen Rezeptoren. Hierzu zählen unter anderem diverse Geruchs- und Geschmacksstoffe, Neuropeptide und niedermolekulare Substanzen wie Acetylcholin oder Adrenalin bis hin zu einzelnen Photonen, die den retinalen G-Protein-gekoppelten Rezeptor Rhodopsin aktivieren können. Aufgrund ihrer Vielfalt und großen Bedeutung in der interzellulären Kommunikation bilden GPCRs interessante Ziele für pharmakologische Beeinflussung, was zur Entwicklung einer Vielzahl von Medikamenten geführt hat, die in die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion eingreifen.

Trotz der Vielfalt und unterschiedlichen Funktionen besitzen GPCRs ein evolutionär hochkonserviertes gemeinsames Strukturmerkmal. Die Grundstruktur des Rezeptors wird durch sieben hydrophobe Domänen gebildet, welche die Plasmamembran in Form von α -Helices alternierend durchspannen. Verbunden sind die Helices durch je drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen. (Abbildung 1) [5-7]. Die

Einleitung

transmembranären Helices und der extrazelluläre N-Terminus des Rezeptors sind für die Bindung des Liganden verantwortlich. Der intrazelluläre C-Terminus und insbesondere die dritte zytoplasmatische Schleife vermitteln die Kopplung an G-Proteine, die für die Weiterleitung des Signals im Zellinneren verantwortlich sind [1, 6].

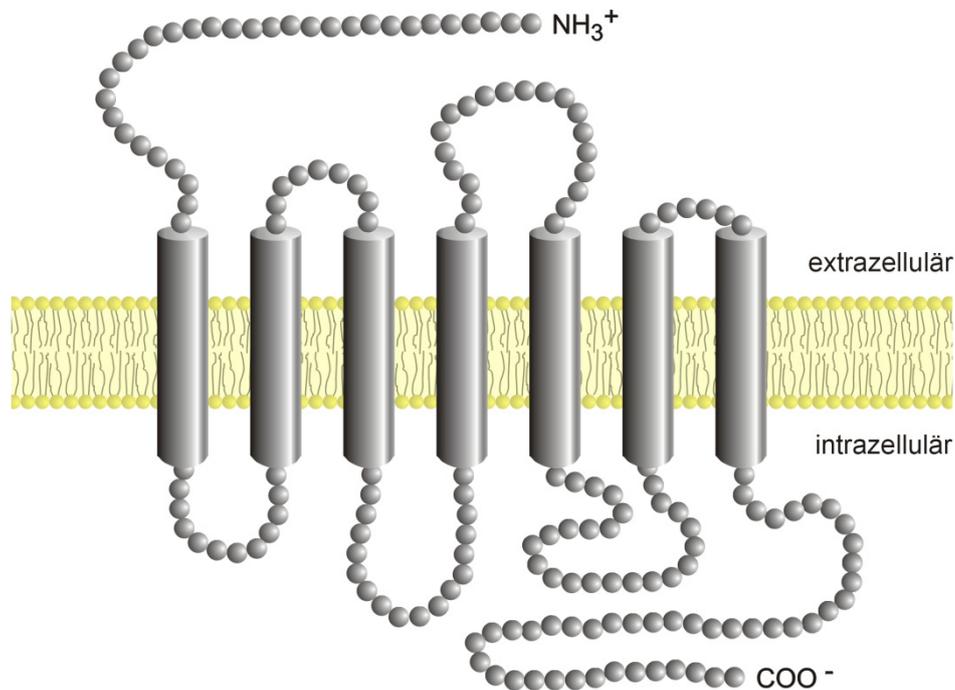


Abbildung 1 | **G-Protein-gekoppelter Rezeptor.** Die Grundstruktur des G-Protein-gekoppelten Rezeptors wird durch sieben α -Helices gebildet, welche die Zellmembran durchspannen. Die Helices sind durch intra- und extrazytoplasmatische Schleifen miteinander verbunden. Das N-terminale Ende des Rezeptors befindet sich im Extrazellulärraum und bildet bei manchen Rezeptoren die Interaktionsstelle für Liganden. Der intrazelluläre C-Terminus des Rezeptors und Teile der intrazytoplasmatischen Schleifen stehen mit dem G-Protein in Kontakt. Durch die Bindung eines Agonisten erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors über die Plasmamembran hinweg, welche das G-Protein aktiviert.

1.2.1 Signaltransduktion über G-Proteine

Die Besonderheit der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besteht darin, dass sie ihr Signal nicht direkt weitergeben, sondern dies über zwischengeschaltete, intrazelluläre Botenstoffe (sog. „second messengers“) erfolgt, welche durch Effektorenzyme oder Ionenkanäle bereitgestellt werden. Die Kommunikation zwischen Rezeptor und Effektor erfolgt hierbei durch heterotrimere G-Proteine, welche an den Rezeptor binden und nach Aktivierung das Signal an den Effektor weitergeben. Diese mehrstufige Signalkaskade ermöglicht es dem Organismus, durch die unterschiedliche Kombination einzelner weniger Komponenten eine größtmögliche Anzahl an verschiedenen Variationen des

Signalwegs zu generieren. Weiterhin führt eine Signalkaskade zu einer enormen Verstärkung des ursprünglichen Signals. So kann ein einzelner Rezeptor im selben Zyklus mehrere G-Proteine aktivieren, die dann jeweils wiederum Effektorenzyme beeinflussen. Pro Aktivierungszyklus produziert jeder Effektor einige tausend Moleküle eines second messengers, welche schließlich den gewünschten zellulären Effekt auslösen.

Das Verbindungsglied zwischen Sieben-Helix-Rezeptoren und nachgeschalteten Effektoren bilden die heterotrimeren G-Proteine, welche aus drei Proteinuntereinheiten bestehen: einer α -Untereinheit (39-52 kDa), die Guaninnukleotide binden und GTP hydrolysieren kann, einer β -Untereinheit (35-36 kDa) und einer γ -Untereinheit (6-8 kDa). Die β - und die γ -Untereinheit bilden gemeinsam eine funktionelle Einheit, da sie sich nur unter denaturierenden Bedingungen voneinander trennen lassen. Obwohl es viele verschiedene Genprodukte für jede Untereinheit gibt (über 20 α -, 6 β - und 12 γ -Genprodukte sind bekannt) und durch Kombination dieser Untereinheiten theoretisch entsprechend viele heterotrimere G-Proteine möglich sind, unterscheidet man grundsätzlich vier verschiedene Hauptgruppen von G-Proteinen: G_s , G_i , G_q und G_{12}/G_{13} , die durch Unterschiede in der α -Untereinheit determiniert werden und je nach Klasse spezifische Gewebeverteilung und verschiedene Effektoren besitzen [8, 9].

G-Proteine sind molekulare Zeitschalter. Sie können von einem inaktiven Grundzustand durch einen Stimulus in den aktiven Zustand übergehen, der für eine bestimmte Zeitspanne beibehalten wird, um anschließend wieder in den inaktiven Zustand zu wechseln. Im inaktiven Zustand liegt die α -Untereinheit GDP-gebunden vor und ist mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit assoziiert. Nach Stimulation des Rezeptors durch einen geeigneten Agonisten erfolgt eine transmembranäre Konformationsänderung des Rezeptors. Das G-Protein bindet an den Agonisten-Rezeptor-Komplex (nicht aber an unbesetzte Rezeptoren). Dies führt zur Freisetzung des von der α -Untereinheit gebundenen GDP. Da GTP im Vergleich zu GDP intrazellulär in wesentlich höheren Konzentrationen vorliegt, kommt es zu einer raschen Bindung von GTP an $G\alpha$. Das G-Protein befindet sich nun im aktiven Zustand: die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziieren und können jeweils bestimmte Effektormoleküle beeinflussen. Gleichzeitig wird die Hydrolasefunktion der α -Untereinheit aktiviert, die GTP zu GDP spaltet, worauf $G\alpha$ inaktiviert wird. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, der die Dauer der aktiven Phase des G-Proteins determiniert. $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ reassoziieren anschließend und nehmen so den inaktiven Ausgangszustand wieder ein (Abbildung 2) [8].

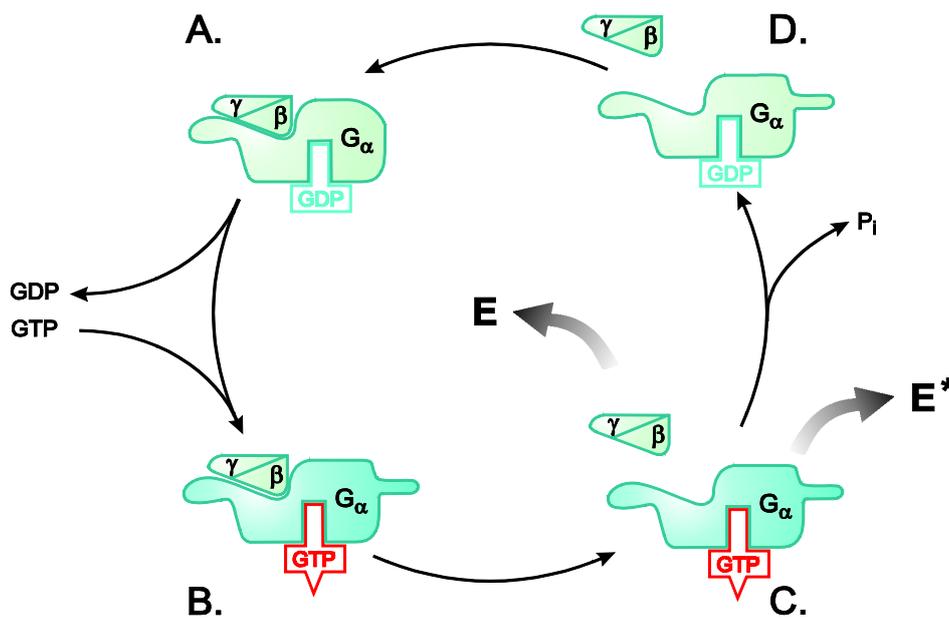


Abbildung 2 | **Schematischer Mechanismus der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion.** **A** | Im inaktiven Zustand liegt das G-Protein in der heterotrimeren Form (G α β γ) vor. **B** | Nachdem ein Agonist selektiv an seinen Rezeptor gebunden hat, wird das G-Protein durch Konformationsänderung des Rezeptors fest an diesen gebunden und es erfolgt die Aktivierung des G-Proteins. Dies hat den Austausch von GDP durch GTP und **C** | die anschließende Dissoziation von G α und G β γ zur Folge, welche nun unabhängig voneinander Effektoren (E, E') beeinflussen können. **D** | Nach Hydrolyse von GTP durch die intrinsische G α -GTPase erfolgt die Abschaltung von G α und die Reassoziierung mit G β γ .

1.2.2 Klassifizierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Die Einteilung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in verschiedene Familien erfolgt anhand von Sequenzvergleichen und auf Grund der unterschiedlichen Liganden, welche die Rezeptoren binden [10]. Dabei unterscheidet man sechs große Familien, die ihrerseits in Unterfamilien aufgegliedert sind. Die Rezeptoren der Klasse I bis III kommen ausschließlich im Bereich der Metazoa vor. Die Klassen IV und V beinhalten verschiedene Pheromonrezeptoren von Pilzen. Die cAMP-Rezeptoren des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* bilden die Klasse VI.

Die Klasse I (Rhodopsin-ähnliche) ist die größte Untergruppe und besteht aus Rezeptoren mit sehr unterschiedlichen Liganden. Darunter fallen neben Rhodopsin Rezeptoren für biogene Amine, Neurotransmitter und Glykoprotein hormone. Die Sequenzhomologie innerhalb dieser Gruppe ist sehr gering und beschränkt sich auf wenige Aminosäuren in der intrazellulären Hälfte der Transmembrandomänen. Diese Aminosäuren besitzen große Auswirkungen auf die Struktur und Funktion der

Rezeptoren. Das D(E)RY-Motiv am zytoplasmatischen Ende der 3. Transmembrandomäne ist bei allen Mitgliedern der Klasse 1 hoch konserviert. Ein weiteres konserviertes Motiv von Rezeptoren der Klasse 1 ist das NPXXY-Motiv am Ende der 7. Transmembrandomäne vor dem Übergang zum intrazellulären C-Terminus. Beide Motive stabilisieren den inaktiven Zustand des Rezeptors und spielen eine Rolle in der Rezeptoraktivierung [11, 12]. Die meisten Rezeptoren der Klasse 1 besitzen darüber hinaus innerhalb des C-Terminus einen oder mehrere Cysteinreste, die palmitoyliert werden. Durch diese zusätzliche Membranverankerung wird eine 4. intrazelluläre Schleife gebildet, die den C-Terminus in einen proximalen und distalen Bereich teilt. Diese zusätzliche Membranverankerung scheint zwar nicht für die G-Protein-Aktivierung benötigt zu werden, stellt aber bei manchen Rezeptoren die Voraussetzung zu Kopplung an „alternative Signalwege“ über die MAP-Kinasen dar [13, 14].

Die Klasse II beinhaltet ungefähr 20 verschiedene Rezeptoren, mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Peptidhormonen und Neuropeptiden als Liganden. Hierzu gehören Rezeptoren für Sekretin, vasoaktives-intestinales Peptid (VIP), Wachstumshormon-freisetzendes-Hormon, Glukagon, Calcitonin und Parathormon (PTH). Charakteristisch für diese Familie ist eine große, extrazelluläre N-terminale Domäne von 100 bis 190 Aminosäuren, welche eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung spielt. Innerhalb dieser Domäne finden sich bis zu vier konservierte Asparaginreste, die komplex N-glykosyliert werden. Daneben besitzen Rezeptoren dieser Guppe acht konservierte Cysteinreste, die untereinander durch Disulfidbrücken verbunden sind. Diese Disulfidbrücken sind für die Struktur der Ektodomäne und die Funktion der Rezeptoren essentiell [15, 16].

Die Klasse III der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist durch einen extrem langen N-terminalen Bereich von 500 - 600 Aminosäuren gekennzeichnet. Diese Familie umfasst Rezeptoren, wie z.B. den metabotropen Glutamatrezeptor, den Kalzium-Rezeptor oder Pheromonrezeptoren. Außer einer Disulfidbrücke zwischen der zweiten und dritten extrazellulären Schleife finden sich keine konservierten Aminosäuren mit den Klassen I und II.

1.3 Der PTH/PTHrP-Rezeptor

1.3.1 Allgemeine Struktur des PTH1-Rezeptors

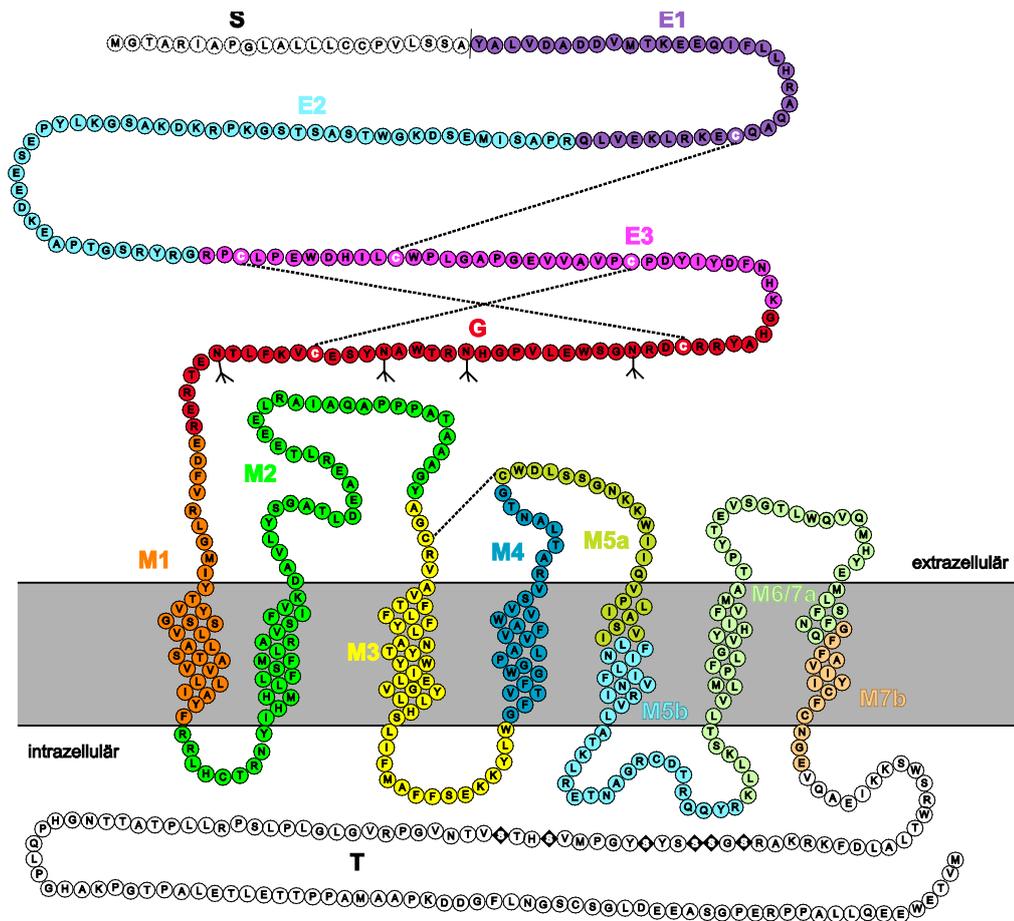
Der Parathormon-Rezeptor Typ 1 gehört zur Gruppe II der GPCRs. Erstmals wurde der Rezeptor aus dem Opossum (*Didelphis virginiana*) kloniert und charakterisiert [17]. Homologe Proteine wurden beim Menschen und anderen Primaten, höheren Säugetieren wie Kuh, Hund, Ratte, Maus, sowie bei Amphibien und Fischen identifiziert. Die Sequenzhomologie zum humanen PTH1-Rezeptor ist mit dem Rezeptor vom Schwein, Hund und Rind am größten (95 %), gefolgt von Maus und Ratte (90 %) und dem Rezeptor des Opossum (79 %). Der humane PTHR besteht aus 593 Aminosäuren und wird in dieser Variante am höchsten in Zellen des Knochens und der Niere exprimiert. Daneben wird der Rezeptor in geringerem Ausmaß in Herz- und Skelettmuskel, Haut, Uterus, Plazenta, Mamma, Ovar, Testis und Leber exprimiert [18]. Das Gen für den humanen PTHR liegt auf Chromosom 3p in der Region 3p21.1-3p24.2 [19]. Es erstreckt sich über ca. 20 kb genomischer DNA und besteht aus 14 kodierenden Exons. Die Exons S, E1, E2, E3 und G kodieren für die relativ lange N-terminale extrazelluläre Domäne des Rezeptors, die als gemeinsames Merkmal aller GPCRs der Gruppe II bei Säugetieren zu finden ist. Die Exons M1-M7 kodieren für die Transmembrandomänen und die verbindenden intra- und extrazellulären Schleifen. Das größte Exon T kodiert für den langen intrazellulären C-Terminus des Rezeptors (Abbildung 3A) [20].

Die Ektodomäne des PTHR besteht aus ca. 190 Aminosäuren. Die ersten 22 Aminosäuren stellen das Signalpeptid, welches während der Rezeptorreifung abgespalten wird [21]. Asparagin 151, 161, 166 und 176 werden N-glykosidisch glykosiliert [17, 22]. Drei Disulfidbrücken erstrecken sich zwischen Cystein 48 und 117, Cystein 131 und 170 und Cystein 108 und 148 und sind essentiell für die Ausbildung der Struktur der Ektodomäne und für die Bindung des Liganden. Die kürzlich gelungene Strukturaufklärung der isolierten Ektodomäne zeigt, dass diese aus einer dreilagigen α - β - β - α Konformation besteht, welche eine längliche Tasche für die Ligandenbindung bildet [23, 24] (Abbildung 3B).

Im C-Terminus des Rezeptors finden sich sechs Serinseitenketten, die nach Aktivierung des Rezeptors durch G-Protein-Rezeptor Kinasen (GRKs) phosphoryliert werden. GRKs bilden eine Familie von sieben Proteinkinasen, die als bevorzugtes Substrat GPCRs phosphorylieren. Die Substratspezifität wird über den konservierten N-Terminus der

Kinase gebildet, der für die Bindung an aktivierte GPCRs verantwortlich ist. Die Phosphorylierung des Rezeptors führt zu dessen Entkopplung von seinem G-Protein und zur nachfolgenden Internalisierung. Diese wird durch die Anlagerung von β -Arrestin vermittelt. Hierbei handelt es sich um multifunktionale Adapterproteine, die eine Reihe von Interaktionen von GPCRs mit anderen Signal- und Strukturmolekülen vermitteln. Die Internalisierung des Rezeptors erfolgt durch die gleichzeitige Interaktion von β -Arrestin mit dem Clathrin-Endozytoseapparates (vgl. Kap. 1.4)[25, 26].

A



B

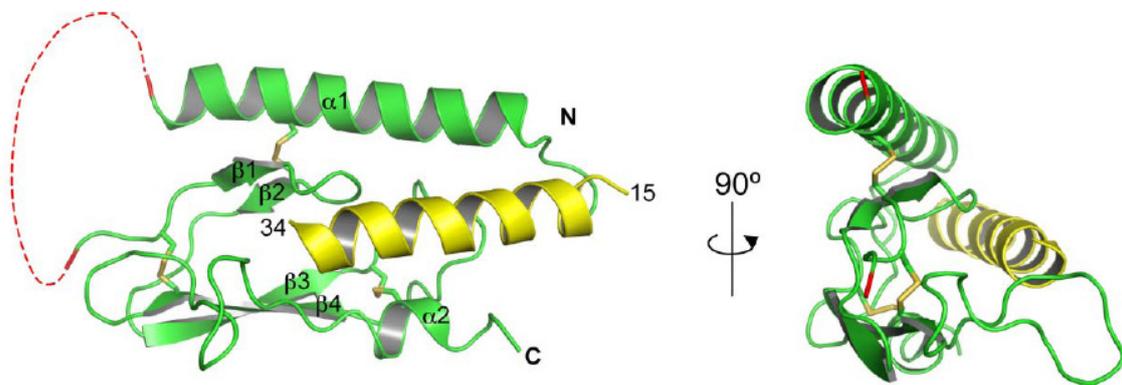


Abbildung 3 | **Struktur des PTHR.** **A** | Primärstruktur des PTHR. Die einzelnen Exons sind farbig hinterlegt und die extrazellulären, transmembranären und zytoplasmatischen Domänen sind gekennzeichnet. Exon S kodiert das Signalpeptid; Exons E1, E2, E3 und G kodieren die N-terminale Ektodomäne; Exon M1-M7 kodieren die sieben Transmembrandomänen und die intra- und extrazellulären Schleifen; Exon T kodiert den langen intrazellulären C-Terminus. Disulfidbrücken sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Positionen der N-glykosidischen Polysaccharidmodifikationen an Asparagin 151, 161, 166 und 176 sind durch verzweigte Linien gekennzeichnet. Phosphorylierungsstellen sind schwarz hinterlegt (modifiziert nach [20]). **B** | Dreidimensionale Struktur der PTHR Ektodomäne (grün) mit PTH(15-34) (gelb). Der N-Terminus des PTHR bildet eine dreiblättrige α - β - α Konformation, wodurch eine längliche Falte entsteht, in die der Ligand binden kann. Der Bereich zwischen Gln57 und Gly105 ist unstrukturiert und besteht aus der kodierenden Sequenz von Exon E2 (gestrichelte rote Linie) (aus [24]).

1.3.2 Liganden des PTH1-Rezeptors

Parathormon ist ein 84 Aminosäuren langes Polypeptid, das in der Nebenschilddrüse gebildet wird. Wie viele andere sekretorische Proteine wird PTH als 115 Aminosäuren langes Prä-Pro-Hormon (Prä-Pro-PTH) synthetisiert [27-29]. Das 25 Aminosäuren lange Signalpeptid wird nach Translokation des Prä-Pro-Hormons im endoplasmatischen Retikulum durch eine Signalpeptidase abgespalten, woraus ein 90 Aminosäuren langes Pro-PTH resultiert. Im Golgi-Apparat werden die verbleibenden 6 Aminosäuren der Pro-Sequenz abgespalten, und das intakte PTH bestehend aus 84 Aminosäuren (PTH[1-84]) wird in sekretorische Granula verpackt und gespeichert (Abbildung 4). Die Sekretion von PTH ist abhängig vom extrazellulären Kalziumspiegel. Erniedrigte Kalziumspiegel führen zur Aktivierung des kalziumsensitiven Rezeptors, ein GPCR, der auf der Oberfläche der Hauptzellen der Nebenschilddrüse sitzt. Durch eine G_q-vermittelte Freisetzung intrazellulären Kalziums wird die Exozytose des Hormons aus den Speichervesikeln ausgelöst. PTH(1-84) ist unter *in vitro* Bedingungen in Zellkultur relativ stabil und behält über 72 h seine volle Aktivität [30]. In der Zirkulation hingegen beträgt die Halbwertszeit von intaktem PTH nur wenige Minuten, da das Hormon in den Kupffer-Sternzellen der Leber und in geringerem Umfang in der Niere gespalten wird [31, 32]. In einigen Speichervesikeln der Nebenschilddrüse wird PTH schon vor der Sekretion durch Cathepsine gespalten. Hierbei entstehen vor allem PTH(37-84) und kurze N-terminale Fragmente [33]. Der Spaltprozess ist von der extrazellulären Kalziumkonzentration abhängig und stellt somit einen weiteren Feedback-Mechanismus der extrazellulären Erfordernisse dar. Sowohl die in der Nebenschilddrüse als auch die in der Peripherie entstandenen PTH-Fragmente gelangen wieder in den Blutkreislauf. Während die N-terminalen Fragmente nicht nachweisbar sind, zirkulieren die C-terminalen Fragmente für mehrere Stunden im Kreislauf. Die physiologische Bedeutung dieser Fragmente ist unklar. Eventuell wirken diese Fragmente auf einen noch unbekanntem Rezeptor [34, 35].

Neben PTH bindet ein weiteres Polypeptid an den PTHR. Das PTH-related Protein (PTHrP) besitzt keine einheitliche Struktur, sondern kommt aufgrund mehrerer Promotoren und alternativen Splicings in verschiedenen Isoformen vor. Diese sind 139-173 Aminosäuren lang und unterscheiden sich in ihren C-Termini [36]. Sowohl intaktes als auch das aminoternale PTHrP(1-36) bindet mit vergleichbarer Affinität an den PTHR wie PTH(1-34) und löst dieselben Effekte aus [37]. Im Gegensatz zur Wirkung

Einleitung

unterscheiden sich die Primärstrukturen von PTH und PTHrP stark. Ausschließlich die ersten 13 Aminosäuren weisen mit 8 identischen Aminosäuren eine relativ hohe Homologie auf. Die vergleichbare Wirkung beider Hormone entsteht durch die vergleichsweise ähnlichen Sekundärstrukturen und die vergleichbare Art der Bindung von PTH und PTHrP [38]. Im Gegensatz zu PTH wird PTHrP von einer Reihe von Organen und Zellen synthetisiert und sezerniert. So bilden Zellen der Schilddrüse, Magenschleimhaut, Knochenmark und einige neuroendokrine Zellen PTHrP. Die Sekretion von PTHrP scheint keiner direkten Regulation zu unterliegen [39] und der primäre Wirkmechanismus ist wahrscheinlich parakrin. Besondere Bedeutung kommt PTHrP während der Entwicklung und Differenzierung von fötalem Gewebe, insbesondere bei der Skelettbildung, zu [37, 40]. Darüber hinaus wird es von etlichen meist soliden Tumoren sezerniert und führt zum Syndrom der Tumorhyperkalzämie. Dieses paraneoplastische Syndrom äußert sich durch eine Hyperkalzämie und Hyperkalziurie [41].

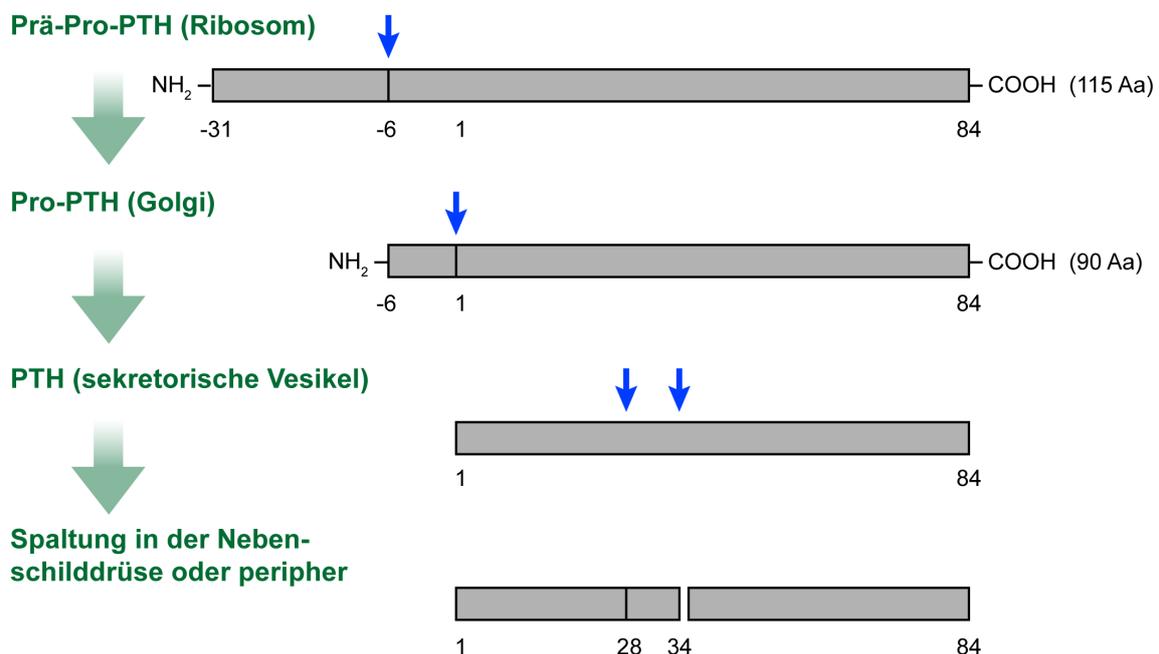


Abbildung 4 | **Prozessierung von PTH.** Von dem in Ribosomen synthetisierten 115 Aa langen Prä-Pro Hormon wird im ER das 25 Aa große Signalpeptid abgespalten. Nach Translokation in den Golgi Apparat werden von dem so entstandenen Pro-PTH weitere 6 Aa am N-Terminus entfernt, wodurch das komplette PTH(1-84) entsteht. Dieses wird in sekretorischen Vesikeln der Nebenschilddrüse zwischengespeichert. Sowohl sezerniertes PTH also auch gespeichertes PTH wird durch Cathepsine in weitere Fragmente gespalten. Prädilektionsstellen für diese Spaltung sind die Positionen 27 und 36. Die resultierenden Fragmente besitzen teilweise ebenfalls biologische Aktivität.

1.3.3 Bindung von PTH und Rezeptoraktivierung

Die aminoterminalen Peptide PTH(1-34) und PTHrP(1-36) binden mit hoher Affinität an den PTH-Rezeptor und führen zu einer kompletten Signalantwort [42]. Die Bindung und Aktivierung des Rezeptors durch PTH besteht aus zwei Schritten und dauert ca. 1 s [43, 44]. Die Bindung von PTH an den Rezeptor wird durch die N-terminale Ektodomäne vermittelt. Sowohl durch Mutationsanalysen an Liganden und dem Rezeptor als auch durch die Strukturaufklärung der Ektodomäne des PTHR zusammen mit PTH(15-34) sind die für die Bindung verantwortlichen Bereiche des Rezeptors und des Liganden gut charakterisiert [24, 42]. Wie oben beschrieben bildet die Ektodomäne des PTHR eine dreilagige α - β - β - α Konformation aus, wodurch eine längliche Tasche entsteht, in die der helixförmige Abschnitt 15-34 von PTH bindet. Nach der initialen Bindung des Liganden, die relativ schnell erfolgt ($\tau = 140$ ms), schließt sich die Aktivierung des Rezeptors mit einer langsameren Kinetik an ($\tau = 1$ s) [45]. Für die Aktivierung des Rezeptors ist die Interaktion des N-terminalen Bereichs des Liganden mit juxtamembranen N-terminalen Bereichen des Rezeptors und mit nahe der Transmembrandomäne 6 (TM6) liegenden Bereichen der dritten extrazellulären Schleife von Bedeutung [16, 46]. Der Bereich von Aminosäure 1 bis 14 des PTH bildet die Schlüsseldomäne für die Aktivierung des G_s -Signalwegs [42], wobei die Aminosäuren 1 bis 9 eine entscheidende Rezeptor-Aktivierungsdomäne darstellen. Für die Aktivierung des PLC/PKC-Signalweges scheinen sowohl N-terminale Bereiche des Liganden als auch Abschnitte am C-Terminus von PTH(1-34) bedeutsam zu sein [47]. So führte die Deletion der ersten beiden Aminosäuren von PTH zu einer Verminderung der Inositolphosphatantwort [48]. Allerdings war das Tetrapeptid PTH(29-32) alleine in der Lage eine PKC-Aktivierung auszulösen [49]. Die PTH-Fragmente (3-34), PTH (7-34) und PTHrP (7-34) binden zwar mit hoher Affinität an den Rezeptor, können aber keine Signalantwort auslösen. Diese Fragmente bezeichnet man als kompetitive Antagonisten [50].

Die Aktivierung des Rezeptors durch seine Liganden bewirkt vermutlich eine komplexe Konformationsänderung der Transmembrandomänen und der verbindenden intra- und extrazellulären Schleifen, so dass die zytoplasmatischen Abschnitte für G-Proteine zugänglicher werden [51]. Durch die Aktivierung kommt es vor allem zu einer Verschiebung der relativen Lage von Transmembrandomäne 3 (TM3) zu Transmembrandomäne 6 (TM6) [52]. Dies entspricht den Konformationsänderungen, die

Einleitung

für die Aktivierung von Klasse 1 Rezeptoren festgestellt wurden [53]. Darüber hinaus könnten auch Bereiche in den Zytoplasma-nahen Abschnitten der Transmembrandomänen 2, 6 und 7 eine Rolle für die Aktivierung des Rezeptors spielen. Hier finden sich jeweils Punktmutationen, die zum Krankheitsbild der Chondrodysplasie vom Typ Jansen führen, welche durch die konstitutive Aktivierung des PTHR gekennzeichnet ist [54, 55]. Die genauen Zusammenhänge zwischen den Mutationen und der Aktivierung des Rezeptors sind aber unklar.

1.3.4 Signaltransduktion des PTHR

Der PTHR gehört zu den multimodalen GPCRs. Nach der Aktivierung durch PTH schließen sich mindestens zwei intrazelluläre Signalwege an. Die Kopplung an das stimulierende G-Protein G_s führt zu einer Aktivierung der Adenylylzyklase (AC), welche die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. Daran schließt sich die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) an [56]. Dies ist der primäre Signalweg des PTHR und wird für die durch PTH und PTHrP vermittelte Regulation des Serumkalziumspiegels und deren Wirkung am Knochen verantwortlich gemacht [57]. Neben der Aktivierung von G_s stimuliert der PTHR über G_q die Phospholipase $C\beta$ (PLC) [58, 59]. Dies führt zu Freisetzung von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP_3) und der nachfolgenden Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) bzw. der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum [60]. Die biologische Rolle des PKC-Signalweges ist bis zum heutigen Zeitpunkt unklar.

Neben den klassischen Signalwegen über G-Proteine kann der PTHR auch direkt MAP-Kinasekaskaden über β -Arrestin aktivieren (s. Kap. 1.4.1).

1.3.5 Physiologie des Parathormons

Parathormon und die biologisch aktive Form des Vitamin D, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, sind die primären Regulatoren der Kalziumhomöostase beim Menschen und allen terrestrischen Wirbeltieren. Während Vitamin D für die langfristige Regulation des Kalziumspiegels verantwortlich ist, kann PTH die Kalziumkonzentration im Serum innerhalb weniger Minuten beeinflussen. Niedrige Kalzium-Plasmaspiegel steigern im Sinne eines Feedback-Mechanismus die Synthese von PTH in und Sekretion aus den Nebenschilddrüsen [61]. Diese schnellen Adaptionsvorgänge werden über mindestens drei Mechanismen ermöglicht: in der Niere stimuliert PTH die tubuläre Reabsorption

von Kalzium im distalen Nephron über gesteigerte parazelluläre Diffusion und aktive Transportmechanismen [62, 63]. Letztere erfolgen über den erhöhten Einbau von spannungsabhängigen Kalziumkanälen in die apikale Membran des Tubulusepithels und eine gesteigerte Aktivität basolateraler Kalziumpumpen [64, 65].

Neben der direkten kalziumresorbierenden Wirkung an der Niere trägt PTH auch indirekt durch gesteigerte Vitamin D Syntheseraten zu einer gesteigerten Resorption von Kalzium im Darm und zur Erhöhung der Kalzium-Plasmaspiegel bei. PTH induziert die Expression der mikrosomalen 1α -Hydroxylase in der Niere. Das Enzym katalysiert die Umwandlung des Vitamin D Vorläufers 25-Hydroxyvitamin D₃ in die aktive Form 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Dieser Vorgang verläuft allerdings zeitlich verzögert und trägt somit nicht zu den schnellen Effekten der Kalziumregulation von PTH bei.

Das zweite wichtige Zielorgan von PTH ist der Knochen. Hier steigert PTH die Resorption von mineralisiertem Knochenmaterial. So werden täglich ca. 500 mg Kalzium zwischen Knochen und Plasma transferiert, was 25-50% des gesamten Kalziums im Plasma entspricht [66]. Obwohl Osteoklasten die einzigen Zellen sind, die zum Abbau von Knochen befähigt sind, scheint die Hauptwirkung von PTH über Osteoblasten vermittelt zu werden, die den PTHR stark exprimieren. Der Nachweis des PTHR in Osteoklasten hingegen ist immer noch umstritten. Der knochenresorbierende Effekt von PTH geht offenbar auf eine gesteigerte Reifung von Vorläuferzellen der Makrophagenreihe zu Osteoklasten durch parakrine Stimuli im Knochen zurück und wird hauptsächlich über den Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) reguliert. Dieses Protein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren wird PTH abhängig von Osteoblasten sezerniert und bindet an den entsprechenden Rezeptor RANK, der von Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert wird, und induziert so die Osteoklastenreifung [67]. Neben der osteokatabolen Wirkung kann PTH auch eine osteoanabole Funktion ausüben. Dieser erstmals von Selye [68] beschriebene Effekt wird ausschließlich durch intermittierende Gabe von PTH hervorgerufen und ist mechanistisch immer noch nicht vollständig geklärt. Entscheidend ist offenbar eine durch kurzzeitige PTH Stimuli hervorgerufene Zunahme reifer Osteoblasten in den Knochenresorptionszonen vor allem an der Spongiosa des Knochens. Im Vordergrund scheint die cAMP- und PKA-vermittelte Aktivierung anti-apoptotischer Signalwege im Osteoblasten zu stehen, was zu einer Zunahme der Osteoblastenzahl führt. Darüber hinaus bewirken kurze PTH Pulse die Enddifferenzierung mesenchymaler Stammzellen, was zu einer weiteren

Einleitung

Zunahme der Osteoblasten führt. Somit werden die resorptiven Effekte des PTH zugunsten erhöhter Knochenaufbauarten verschoben.

1.3.6 Klinische Anwendung des Parathormons

Osteoporose ist die häufigste Knochenerkrankung im höheren Lebensalter. Circa 30% aller postmenopausalen Frauen entwickeln eine klinisch relevante primäre Osteoporose. Sekundäre Osteoporose ist eine häufige Nebenwirkung der langfristigen Behandlung mit Glukokortikoiden. Klassische Behandlungsoptionen der Osteoporose beinhalten die Gabe von Vitamin D₃ und Kalzium, Bisphosphonaten, Calcitonin oder Östrogenpräparaten und selektive Östrogenrezeptormodulatoren. Alle diese Therapien verlangsamten jedoch nur den Prozess der Knochenresorption und führen allenfalls zu einer geringfügigen Zunahme der Knochendichte. Eine Option den progressiven Knochenschwund pharmakologisch umzukehren ergab sich durch die Entdeckung der osteoanabolen Wirkung von PTH [68]. Die intermittierende Gabe von PTH(1-84) oder von PTH(1-34) führt bei der Ratte, dem Affen oder beim Menschen zu einer gesteigerten Knochenbildung [69-76]. Daraus folgte die Entwicklung von rekombinantem PTH(1-34) zur Therapie der manifesten Osteoporose. Eine große Plazebo-kontrollierte, randomisierte Studie wurde an postmenopausalen Frauen mit manifester Osteoporose durchgeführt. Hier erhöhte die tägliche Gabe von 20 oder 40 µg PTH(1-34) die Knochendichte um 10-14% und reduzierte die Frakturwahrscheinlichkeit um 65-69% [76]. Seit 2003 ist PTH(1-34) zur Behandlung der schweren Osteoporose unter der Bezeichnung Teriparatid in Deutschland zugelassen. Aufgrund einer erhöhten Rate von Knochtumoren unter Gaben von PTH(1-34) nach zwei Jahren im Tierversuch wurde die maximale Therapiedauer mit Teriparatid auf 18 Monate beschränkt [77].

1.4 β -Arrestin

β -Arrestine sind multifunktionale, zytosolische Adapterproteine, die die Aktivität von GPCRs beeinflussen und Interaktionen zu einer Reihe weiterer Signalmoleküle herstellen (Abbildung 5). Vier Isoformen von Arrestin sind bekannt. Während Arrestin 1 und 4 (visual arrestin und cone arrestin) nur in der Retina gefunden werden, werden β -Arrestin 1 und 2 (= Arrestin 2 und 3) ubiquitär in allen Zellen exprimiert. Ursprünglich wurden Arrestine als Regulatoren aktivierten Rhodopsins bzw. aktivierter β_2 -adrenerger Rezeptoren (β_2 AR) identifiziert, woraus sich der Name ableitet [78, 79]. Dieses Konzept wurde mittlerweile auf fast alle GPCRs übertragen. Nach der Aktivierung wird der

Rezeptor durch spezifische Kinasen schnell phosphoryliert. Diese Phosphatreste dienen als Erkennungsstruktur für die Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor-C-Terminus und Teile der intrazellulären Schleifen [80]. Es kommt zu einer sterischen Blockade der Interaktion des Rezeptors mit G-Proteinen und somit zu einem Erliegen des Signals [81-83]. Dieser Vorgang wird Desensibilisierung genannt. Eine weitere wichtige Funktion von β -Arrestinen zur Abschaltung G-Protein vermittelter Signale ist die Interaktion mit AP2 und Clathrin, die beide Bestandteil des Clathrin-Endozytosekomplexes sind [84, 85] (Abbildung 5). Auf diese Weise werden aktivierte GPCRs in sog. Clathrin-coated pits überführt und über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Der endozytierte Rezeptor kann zwei verschiedene Wege nehmen: Vielfach werden Rezeptoren in den Endosomen dephosphoryliert und an die Zelloberfläche zurücktransportiert und stehen somit für einen weiteren Aktivierungsvorgang zur Verfügung (sog. Rezeptor-Recycling) [86]. Manche Rezeptoren werden hingegen aus dem frühen Endosom in den lysosomalen Abbaukomplex der Zelle überführt und abgebaut. Dies führt zu einer langfristigen Herabregulation der Rezeptormenge und zu einer Abschwächung des Signals [87, 88].

GPCRs werden anhand ihres Interaktionsmusters mit Arrestinen in zwei Gruppen eingeteilt: Gruppe A Rezeptoren, wie der β_2 AR, interagieren nur transient mit β -Arrestin. Schon kurz nach der Assoziation mit den Clathrin-coated Pits dissoziieren der Rezeptor und Arrestin. Diese Rezeptoren kehren sehr schnell an die Zelloberfläche zurück. Zu den Rezeptoren der Klasse B gehören u.a. der Angiotensin 1-Rezeptor, der Protease-aktivierte Rezeptor 2 und der PTHR. Gruppe B GPCRs bilden starke Komplexe mit β -Arrestin und internalisieren gemeinsam. Dies führt zu einer langsameren Recyclingrate [89]. Neben der Rolle der Rezeptordesensibilisierung und Internalisierung stellen β -Arrestine die Verbindung zwischen GPCRs und „nicht-klassischen“ Signalwegen her (Abbildung 5). β -Arrestin bindet direkt Komponenten der MEK/ERK/RAF Signalkaskade und Komponenten des JNK-Signalwegs, aktiviert diese und stellt so neben der Transaktivierung über Rezeptor-Tyrosinkinase einen zweiten Weg dar, wie GPCRs MAP-Kinase Signalwege aktivieren können. Darüber hinaus beeinflusst β -Arrestin andere Kinase-Signalwege, wie die PI3-Kinase oder Akt. Eine weitere wichtige Funktion der β -Arrestin ist die direkte Modulation der Gentranskription durch Interaktion mit NF κ B, MDM2, STAT1 oder der Histon-Acteyltransferase p300 [90, 91]. Neben GPCRs beeinflussen β -Arrestine auch eine Reihe anderer Rezeptorsysteme [92].

1.4.1 Interaktion des PTHR mit β -Arrestin

Die Aktivierung des PTHR führt zu einer raschen dosisabhängigen Phosphorylierung durch Serin-/ Threonin-Proteinkinasen (PKA und PKC) am C-Terminus des Rezeptors [93, 94]. In diesen Phosphorylierungsprozess sind auch weitere „Second-Messenger“-unabhängige Kinasen, wie z.B. die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase-2 (GRK-2) involviert [26, 95]. Sechs Serinreste wurden identifiziert, die für die Abschaltung und Internalisierung des Rezeptors verantwortlich sind (Abbildung 3A) [26]. Die Interaktion von β -Arrestin mit dem PTHR wird vermutlich durch eine Konformationsänderung des Rezeptors hervorgerufen, die unterschiedlich von der Konformation des Rezeptors ist, welche zur Aktivierung des G-Proteins führt [96]. Obwohl die Phosphorylierung des Rezeptors für eine feste Bindung von β -Arrestin benötigt wird, scheint eine initiale Interaktion beider Proteine schon am unphosphorylierten Rezeptor stattzufinden. Diese wird durch Determinanten im C-Terminus des Rezeptors vermittelt [95]. Wie genau die Phosphorylierungs-unabhängige Interaktion vermittelt wird, ist aber unklar.

Wie oben beschrieben zählt der PTHR zu den Gruppe B-Rezeptoren und bildet einen stabilen Komplex mit β -Arrestin 1 und 2, die den Rezeptor desensibilisieren. Der Desensibilisierung schließt sich ein rascher Internalisierungsprozess des Rezeptors an [26, 97]. Nach der erfolgten Endozytose des Rezeptors erscheint dieser, nach Durchlaufen eines intrazellulären Recyclingprozesses, als resensibilisierter (dephosphorylierter) Rezeptor an der Membranoberfläche, oder wird in den Lysosomen degradiert [98-100].

Physiologisch scheint β -Arrestin2 eine Rolle bei PTH-vermittelten Effekten im Knochen zu spielen. Die intermittierender PTH Gabe führte bei β -Arrestin2 KO Mäuse zu einer deutlich schwächeren Knochenbildung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Zwar war die Rate der Knochenneubildung in beiden Gruppen gleich, jedoch fand sich in den KO-Tieren gleichzeitig eine erhöhte Knochenresorptionsrate, wodurch es netto zu einer reduzierten Knochenmasse kam [101, 102]. Der Effekt von β -Arrestin2 wird hierbei offenbar durch die Regulation der Expression von Genen der p38- MAPK- und NF κ B-Signalwege vermittelt, wodurch die Reifung der Osteoklasten unterdrückt wird [102, 103]. Somit scheint β -Arrestin2 eine wichtige Rolle im PTH-regulierten Gleichgewicht zwischen osteoblastärem Knochenaufbau und osteoklastärer Knochenresorption zu spielen.

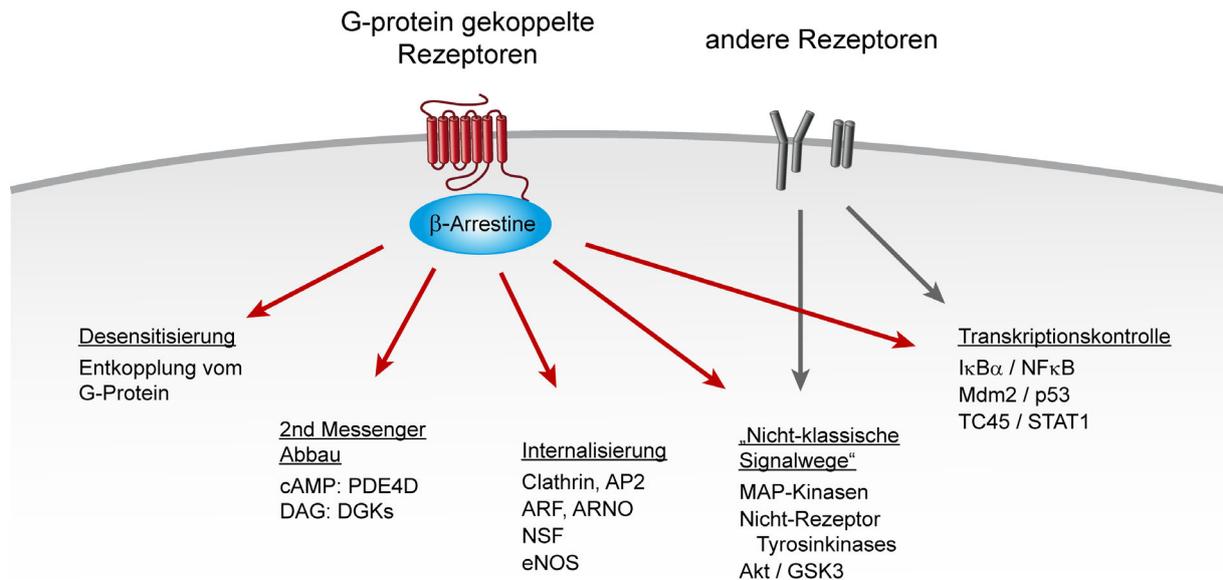


Abbildung 5 | **Funktionen von β -Arrestinen.** β -Arrestine sind multifunktionale Adapterproteine. Sie binden an aktivierte GPCRs und führen so zu einer Abschaltung des G-Protein-Signals. Durch Interaktion mit Clathrin und AP2 vermitteln sie die Endozytose der Rezeptoren. Darüber hinaus interagieren β -Arrestine mit einer Reihe von anderen Signalmolekülen und ermöglichen so die Ausbildung von Signalkomplexen an GPCRs aber auch an anderen Rezeptoren.

1.5 PDZ-Proteine

Anhand von Sequenzähnlichkeiten zwischen dem postsynaptic density protein PSD-95/SAP90 [104], dem Septate-Junction-Protein Discs-large von *Drosophila melanogaster* und dem epithelialen Tight-Junction Protein ZO-1 [105] wurde das Akronym für PDZ-Domänen abgeleitet. Diese Domänen sind Module für Proteininteraktionen. Sie kommen als einzelne oder als repetitive Domänen in hauptsächlich zytoplasmatischen Adapterproteinen vor, die für den Aufbau großer Signalkomplexe verantwortlich sind. PDZ-Domänen repräsentieren ca. 0,2-0,5% aller sequenzierten offenen Leserahmen aus Metazoa-Genomen und sind damit die häufigsten Interaktionsmodule [106, 107]. Sie lassen sich anhand ihrer modularen Organisation in drei große Familien einteilen: die erste Gruppe besteht aus Proteinen, die ausschließlich PDZ-Domänen enthalten. Diese können in zwei bis hin zu mehr als zehn Kopien vorliegen. MAGUK (membrane-associated guanylate kinases)-Proteine bestehen aus mehreren PDZ-Domänen, einer SH3-Domäne und eine Guanylatkinase-Domäne und bilden die zweite Familie. Proteine der dritten Familie enthalten sowohl PDZ-Domänen als auch eine Reihe anderer

Einleitung

Protein-Domänen wie Ankyrin, LIM-, L27-, C2 PH-, WW-, DEP- und LRR-Domänen [108].

PDZ-Domänen binden spezifisch an kurze ca. 5 Aminosäuren lange Motive, die meistens im C-Terminus von Proteinen zu finden sind. Besonders häufig finden sich PDZ-Liganden in Transmembranrezeptoren und -kanälen [109]. Anhand der Ligandenspezifität unterscheidet man vier verschiedene Klassen an PDZ-Proteinen (Tabelle 1) [110]. Jede PDZ-Domäne besteht aus 80-100 Aminosäuren, welche eine globuläre Struktur aus sechs β -Faltblättern und zwei α -Helices bilden. Diese bilden eine erweiterte Tasche, in die Liganden binden und über eine β -Faltblatt-Addition den Komplex zusätzlich stabilisieren [111]. Die N- und C-Termini der PDZ-Domäne liegen in enger räumlicher Nachbarschaft und ermöglichen damit eine Inkorporation dieser Domänen in Proteine ohne deren restliche Struktur zu kompromittieren [112]. Im Gegensatz zu den meisten anderen Protein-Protein-Interaktionen sind Interaktionen mit PDZ-Proteinen in der Regel konstitutiv. Allerdings gibt es einzelne Beispiele, die eine Regulation der PDZ-Interaktion durch Phosphorylierung nahelegen [113, 114]. Neben der Interaktion mit C-Termini können PDZ-Domänen untereinander dimerisieren und mit Lipiden interagieren und erweitern so die Möglichkeit zur Ausbildung von großen Proteinnetzwerken [108].

1.5.1 Der Natrium/Protonen-Austauscher regulierende Faktor (NHERF)

Der Natrium/Protonen-Austauscher regulierende Faktor NHERF besteht aus zwei PDZ-Domänen und einer C-terminalen Ezrin/Radixin/Moesin (ERM)-Domäne. Aufgrund ihrer Domänenstruktur sind diese Proteine sowohl in der Lage einen oder zwei PDZ-Liganden zu binden als auch mit Adapterproteinen aus der Gruppe der Ezrin/Radixin/Moesin-Proteine zu interagieren und darüber Proteine am Aktin-Zytoskelett zu verankern (Abbildung 6). Zwei Isoformen wurden beschrieben: NHERF1, auch als Ezrin-bindendes Protein 50 (EBP50) bekannt, und NHERF2, welches auch als E3KARP bezeichnet wird. Beide Proteine werden differentiell in verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert, wobei besonders hohe Expressionslevel in polarisierten Epithelien gefunden werden [115, 116]. Die physiologische Bedeutung der NHERF-Proteine wurde erstmals im Zusammenhang mit der hormonellen Regulation des Natrium/Protonen-Austauschers 3 (NHE3) in epithelialen Zellen der Niere und des Darms beschrieben. Hier fixiert NHERF u.a. NHE3 am Aktin-Zytoskelett unterhalb der apikalen Zellmembran und vermittelt die Ausbildung eines Signalkomplexes mit PKA, was letztlich zu einem reduzierten

Austausch von Natrium und Protonen führt [115]. NHERF1 ist zudem für die Lokalisation des Natrium/Phosphat-Kotransporters 2a (Npt2a) im proximalen Tubulus der Niere verantwortlich [117]. Mäuse, die eine Deletion von NHERF1 in der Niere trugen, erlitten einem massiven renalen Phosphatverlust [118]. Eine Studie an Patienten mit Nephrolithiasis und Knochendemineralisierung zeigte, dass fast alle Patienten, deren Symptome mit einer erhöhten Phosphatausscheidung einhergingen, eine Mutation im NHERF1-Gen aufwiesen, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führten [119]. PTH induziert die Internalisierung des Npt2a, was zu einer verminderten Phosphatwiederaufnahme aus dem Primärharn führt. Der Internalisierung geht die Phosphorylierung der ersten PDZ-Domäne voraus, die durch die Aktivierung des PTHR vermittelt wird. Dadurch dissoziiert Npt2a von NHERF1 und wird internalisiert [120]. Dies unterstreicht die wichtige Rolle, die NHERF bei der Wiederaufnahme von Phosphat spielt.

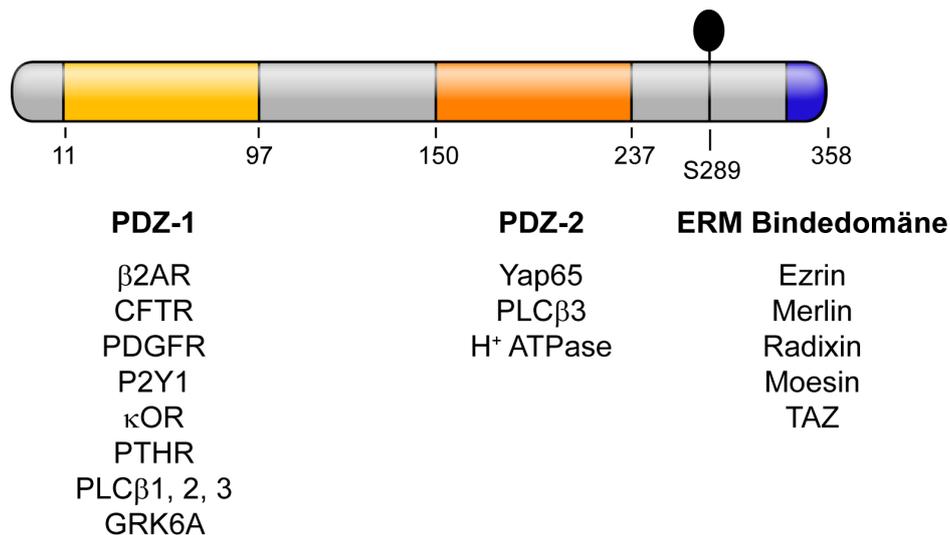


Abbildung 6 | **Domänenstruktur und Interaktionen von NHERF1.** Schematische Organisation von NHERF1. Gezeigt sind die 1. (gelb) und die 2. (orange) PDZ-Domäne sowie die ERM-Bindedomäne (blau) mit den jeweiligen interagierenden Proteinen. Serin 289 wird konstitutiv durch GRK6A phosphoryliert [121].

Die Interaktion von NHERF mit etlichen anderen Membranproteinen wurde beschrieben [122]. Insbesondere spielt NHERF1 eine Rolle als Adapterprotein für GPCRs. Die erste Interaktion von NHERF1 mit einem Rezeptor wurde für den β₂AR demonstriert. Hierbei handelt es sich um eine der wenigen Interaktionen des Adapterproteins, die nicht konstitutiv sondern Agonisten-abhängig ist [113]. Die Assoziation von NHERF1 ist Voraussetzung für das Recycling des Rezeptors zurück zur Zelloberfläche [123]. Darüber hinaus vermittelt NHERF1 den inhibitorischen Effekt des

Einleitung

β_2 AR auf den epithelialen Na^+/H^+ -Austausch in der Bürstensaummembran der Niere [113]. Ähnlich wie für den β_2 AR vermittelt NHERF1 das Recycling des κ -Opioidrezeptors [124]. Die Rolle der Interaktion von NHERF mit dem P2Y₁ Rezeptor ist unklar [125].

Klasse	C-terminale Sequenz	Interagierendes Protein	PDZ -Protein
Klasse I			
X-S oder T-X-V	E-S-D-V	NMDA-Rezeptor Untereinheit 2A, B	PSD-95 (PDZ2)
	E-T-D-V D-S-W-V	Shaker K ⁺ Kanal p0071 δ -Catenin	Erbin
X-S oder T-X-L	D-S-S-L	β_2 -adrenerger Rezeptor	NHERF
	E-T-V-M	PTHrP	
	Q-T-R-L	GKAP	Shank pr ProSAP
Klasse II			
X- Ψ -X- Ψ	E-Y-Y-V	Neurexin	CASK
	E-F-Y-A	Syndecan	CASK, Syntenin
	S-V-E-V	EphB2	PICK1
	D-V-P-V	ErbB2	Erbin
Klasse III			
X-D oder E-X- Ψ	V-D-S-V	Melatoninrezeptor	nNOS
	G-E-P-L	KIF17	mLIN10 oder Mint1 oder X11

Tabelle 1 | **Klassifikation der PDZ-Proteine anhand der Ligandenspezifität.** Die C-terminale Sequenz entspricht den letzten vier Aminosäuren des Liganden. Ψ , hydrophobe Aminosäure; X, nicht-spezifizierte Aminosäure [110]

1.5.2 Die Interaktion von NHERF-Proteinen mit dem PTHR

Neben den indirekten Effekten, die NHERF Proteine auf die Wirkung von PTH haben, spielen diese Adapterproteine auch eine Rolle bei der Regulation des PTHR. Der PTHR bindet sowohl an NHERF1 als auch an NHERF2. Die C-terminale Aminosäuresequenz E-T-V-M, die einem Klasse 1 PDZ-Liganden entspricht, interagiert mit NHERF2 über dessen zweite PDZ-Domäne [126]. Für NHERF1 sind die Daten widersprüchlich. Die Interaktion des PTHR mit PDZ1 scheint gesichert. Sun et al. beschreiben daneben die Interaktion des Rezeptors mit PDZ2 von rekombinantem NHERF1, was aber in anderen Arbeiten nicht bestätigt wurde [127, 128]. Neben dem Tetrapeptid ETVM sind zwei Glutamatreste an Position -2 und -3 des PDZ-Liganden essentiell für die Interaktion des PTHR mit NHERF [127]. NHERF Proteine beeinflussen sowohl das Trafficking als auch die Signaleigenschaften des PTHR. Mahon et al. zeigten, dass es in Gegenwart von NHERF2 zu einer reduzierten Aktivierung der G_s/AC/cAMP-Signalkaskade und einer

gesteigerten Aktivierung von PLC durch den PTHR kommt. Dieser Effekt scheint über $G_{i/o}$ -Proteine vermittelt zu werden [126].

Weiterhin führt NHERF1 zu einer Vernetzung des PTHR mit dem Aktinskelett. Dies hat Auswirkungen auf die Mobilität und das Internalisierungsverhalten des Rezeptors. In Gegenwart von NHERF1 war die laterale Mobilität des PTHR auf der Zelloberfläche stark eingeschränkt, was mit einer Kolo-kalisation des Rezeptors mit Stressfasern des Zytoskeletts korrelierte [129]. Während der volle Agonist PTH(1-34) innerhalb weniger Minuten zu einer kompletten Internalisierung des PTHR führt, waren Liganden, die den Rezeptor nicht oder nur unvollständig aktivierten, nur in Zellen ohne NHERF1-Expression in der Lage, eine Rezeptorinternalisierung hervorzurufen [130, 131].

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die physiologische Wirkung von PTH am Knochen hängt entscheidend von dessen Applikationsform und Wirkdauer ab. So vermag intermittierend appliziertes exogenes PTH die knochenabbauende Wirkung des endogenen PTH umzukehren und somit einen osteoanabolen Effekt auszuüben. Wie genau diese beiden unterschiedlichen Wirkungen desselben Hormons auf molekularer Ebene ablaufen ist immer noch nicht verstanden. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Effekt langwirksames PTH auf das Rezeptorprotein selbst hat. Ein Schwerpunkt sollte dabei auf der Frage liegen, wie PTH die Lokalisation des Rezeptors sowie dessen Stabilität und Integrität beeinflussen kann.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte die Komplexierung des PTHR mit zwei Adapterproteinen untersucht werden. Die Interaktion des PTHR mit β -Arrestin2 und NHERF1 spielt eine entscheidende Rolle für die Funktion des Rezeptors und für nachgeschaltete Signalkaskaden. Obwohl die Interaktion beider Proteine mit dem PTHR schon seit längerem bekannt ist, ist nach wie vor unklar, in wie weit beide Adapterproteine zusammen die Funktion des Rezeptors regulieren können. Ziel dieses Teils der Arbeit war es, die genaueren Mechanismen der Interaktion zwischen PTHR, β -Arrestin2 und NHERF1 zu erforschen. Dabei sollte ein besonderes Augenmerk auf den Mechanismus der Phosphorylierungs-unabhängigen Interaktion von β -Arrestin2 mit dem PTHR gelegt werden, welcher immer noch unverstanden ist.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle eingesetzten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität von Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen), Applichem (Darmstadt) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Radiochemikalien stammten von Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim), Restriktionsenzyme von New England Biolabs (Frankfurt am Main), DNA-Polymerasen von New England Biolabs und Eppendorf (Hamburg), DNA-Größenstandards von New England Biolabs und Proteingrößenstandards von peqlab (Erlangen). Oligonukleotide wurden bei biomers.net (Ulm), Peptide bei Gramsch Laboratories (Schwabhausen) synthetisiert oder von Bachem (Weil am Rhein) bezogen. Geschützte Warennamen (Warenzeichen) sind in dieser Arbeit nicht gesondert kenntlich gemacht.

2.2 Antikörper

Epitop	Spezies	Eigenschaft	Bezugsquelle/ Referenz
β-Aktin	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich
β-Arrestin2 (H9)	Kaninchen	polyklonal	Santa-Cruz
Flag M2	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich
Flag M2-Sepharosekonjugat	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich
Flag	Kaninchen	polyklonal	Rockland (Gilbertsville)
HA	Kaninchen	polyklonal	Stefan Schulz, Würzburg/ Jena [132]
HA.11 (16B12)	Maus	monoklonal	Covance
HA Sepharosekonjugat	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich
NHERF1	Kaninchen	polyklonal	Covance
PTHR-CT (1781)	Kaninchen	polyklonal	diese Arbeit, [133]

Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus-IgG und gegen Kaninchen-IgG waren von Dianova (Hamburg), Carbocyanin (Cy2, Cy3)-gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus-IgG und gegen Kaninchen-IgG waren von Jackson Immunoresearch Lab (Suffolk).

2.3 Plasmide

Name	Referenz
HA-PTHR in pcDNA3	diese Arbeit
Flag-HA-PTHR in pcDNA3	diese Arbeit
HA-NHERF1-YFP in pcDNA3.1	P. Friedman
PTHR-CFP in pcDNA3	J.P. Vilaradaga
β -Arrestin2-YFP in pcDNA3	C. Krasel
β -Arrestin2-CFP in pcDNA3	C. Krasel
Flag- β -Arrestin2 in pCMV5	diese Arbeit
NHERF1 in pcDNA3	diese Arbeit
Flag-Ubiquitin in pcDNA3	[134]
Flag-SUMO1 in pCMV2	[134]

2.4 Enzyme

<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase (Taq)	Eppendorf
<i>Thermococcus litoralis</i> DNA Polymerase (Vent)	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
N-Glykosidase F (PNGase F)	Roche
Endoglukosidase H (Endo H)	New England Biolabs
Acetyl-Neuraminyl Hydrolase (Neuraminidase)	New England Biolabs

2.5 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
E.coli XL1 blue	endA1, hsdR17 (rK- mK+), supE44, lambda-, recA1, gyrA1, gyrA96, relA1, (lac-), (F', proAB, lacqZAM15, Tn10[tetR])	Stratagene

2.6 Eukaryotische Zelllinien

Name	Beschreibung
HEK293T-Zellen	Humane embryonale Nierenepithelzellen
CHO-K1-Zellen	Epithelzellen aus dem Ovar des chinesischen Hamsters
ROS 17 / 2.8-Zellen	Eine aus der Ratte stammende Osteosarkom-Tumorzelllinie.

Stabile Zelllinien

Name	Eingebrachtes Gen	Basierend auf	Quelle
CHO-PTHR	humaner PTH Rezeptor	CHO K1	diese Arbeit
CHO-HA-PTHR	Humaner PTH Rezeptor mit HA-Tag in Exon E2	CHO K1	diese Arbeit
CHO-Flag-HA-PTHR	Humaner PTH Rezeptor mit Flag-Tag am N-Terminus und HA-Tag in Exon E2	CHO K1	diese Arbeit
ROS-HA-PTHR	Humaner PTH Rezeptor mit HA-Tag in Exon E2	ROS 17 / 2.8	diese Arbeit
CHO N10	Kaninchen NHERF-1 in Tetrazyklin-induzierbarem Expressionsvektor	CHO K1	P. Friedman [129]

2.7 Puffer und Medien

2.7.1 Puffer für molekularbiologische Arbeiten

<u>10x DNA-Ladepuffer:</u>	100 mM EDTA
	30% (v/v) Glycerol
	0,05% (w/v) Bromphenolblau
	0,05% (w/v) Xylencyanol

Material und Methoden

10x TAE: 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA

2.7.2 Puffer für proteinchemische Arbeiten

5x SDS-Laemmli-Puffer: 250 mM Tris-HCl, pH 6,8
5% (w/v) SDS
1% (w/v) DTT
40% (w/v) Glycerol
0,005% Bromphenolblau

PBS: 137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄
pH 7,4

PBS-T: PBS
0,1 % (v/v) Tween 20

Radio-Immunoprecipitation-
Assay (RIPA) Puffer: 150 mM NaCl
50 mM Tris, pH 7,5
5 mM EDTA
1% (v/v) Nonidet P40
0,5% (w/v) Na-Deoxycholat
0,1% (w/v) SDS

10x SDS Laufpuffer: 248 mM Tris-HCl, pH 8,2
1,92 M Glycin
1% (w/v) SDS

Transferpuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 8,3
150 mM Glycin
20% (v/v) Methanol

Blockpuffer: 5% (w/v) Milchpulver
100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 7,4
0,1% (v/v) Tween 20

2.7.3 Medien für Bakterien

LB-Medium: 1% Bacto-Trypton
0,5% Hefe-Extrakt
1% NaCl
pH 7,2

Bei der Herstellung von Agarplatten wurden dem LB-Medium 1,5% (w/v) Agar hinzugegeben.

2.7.4 Medien für eukaryotische Zellen

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) – mit 4,5 g/l Glukose
+ 10% fötales Kälberserum (FCS)
+ 1% Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)

Dulbecco's modified eagle's medium/Ham's F12 (1:1, DMEM/F12)
+ 10% fötales Kälberserum (FCS)
+ 1% Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)

2.8 Gentechnische Methoden

2.8.1 DNA Präparation

Präparative DNA Aufreinigung aus *E.coli* wurde mit dem „Plasmid Maxi Kit“ von Qiagen (Hilden) durchgeführt.

2.8.2 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation von codierenden Sequenzen aus cDNA Plasmiden, zur Einführung von Punktmutationen und zur Insertion längerer DNA Fragmente wurde die Vent- (*Thermococcus litoralis*) Polymerase mit 3'-5' Exonukleasefunktion oder die Taq- (*Thermophilus aquaticus*)-Polymerase verwendet.

Material und Methoden

200 μM Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP)
0,5 μM 5' Primer
0,5 μM 3' Primer
10 μl Pfu- oder Taq-Polymerasepuffer (10x)
2,5 U DNA-Polymerase
ad 50 μl ddH₂O

Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für 30" je Zyklus, die Elongation bei 72°C für 1 min/ 750 bp. Die Hybridisierungstemperatur wurde ca. 6-10°C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Primer gewählt. Alle PCRs wurden mit 25 Zyklen durchgeführt.

2.8.3 DNA-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Gelsystemen in 1%iger oder 1,5%iger Agarose in TAE (mit 0,1% Ethidiumbromid) bei konstanter Spannung (80-120 V) aufgetrennt. Zum Beladen wurden die Proben mit 10x DNA- Ladepuffer versetzt. Die Darstellung der DNA-Fragmente erfolgte unter UV-Licht ($\lambda=365$ nm) durch Fluoreszenz von interkaliertem Ethidiumbromid. Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden die gewünschten Banden ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAQuick Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend den Anweisungen des Herstellers gereinigt.

2.8.4 Restriktionshydrolyse von DNA

Der Verdau von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer. Eine vollständige Restriktion von Plasmid-DNA wurde über 2 h bei 37°C mit 2-10 Enzymeinheiten pro μg DNA in wässriger Lösung durchgeführt. Sofern keine Gelelektrophorese erfolgte, wurde die geschnittene DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

2.8.5 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase in wässriger Lösung entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden jeweils verschiedene Verhältnisse des Vektors zum Insert gewählt, um das optimale Ligationsverhältnis zu erhalten.

2.8.6 Transformation von E.coli-Stämmen

Transformation mit Hitzeschock

100 µl kompetenter Bakterien wurden mit 0,1 µg DNA gemischt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 30 s durchgeführt. Danach wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und mit 900 µl LB-Medium 50 min lang bei 37°C inkubiert. 100 µl der Bakteriensuspension wurden auf Agarplatten mit geeigneter Antibiotikaresistenz ausplattiert.

Chemische Transformation mit KCM

Ca. 100 pg DNA (in 10 µl H₂O) wurden mit 90 µl KCM-Puffer und 100 µl kompetenter Bakterien auf Eis gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis und 10 min Inkubation bei RT wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und 50 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die Zellen wurden 3 min bei 2.700 x g pelletiert (Microfuge 5417, Eppendorf) und das Pellet auf Agarplatten mit geeigneter Antibiotikaresistenz ausplattiert.

KCM-Puffer: 100 mM KCl
 30 mM CaCl₂
 50 mM MgCl₂

2.9 Zellkulturtechniken

2.9.1 Kultivierung von E. coli

E.coli-Kulturen wurden entweder direkt als Einzelkolonie oder als Vorkultur angeimpft.

Für den Ansatz einer Vorkultur wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 500 µg Ampicillin (100 mg/ml) zur Selektion angeimpft und ca. sechs Stunden in einem Thermoschüttler bei 37°C inkubiert.

Die Einzelkolonie oder die Vorkultur wurde dann in 200 ml LB-Medium mit 20 mg Ampicillin in einem 1l-Schüttelkolben bei 37°C in einem Rotationsschüttler (Adolf-Kühner AG, Birsfelden) über Nacht angezogen.

Agarplatten wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.9.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle Nährmedien wurden mit 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin versetzt. HEK-293T-Zellen wurden bei 37°C und 7% CO₂ in DMEM kultiviert. CHO- und ROS-Zellen wurden in DMEM/F12 Medium bei 5% CO₂ kultiviert. Stabile Zelllinien wurden unter Zugabe der entsprechenden Selektionsmarker gezogen.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium von den konfluent gewachsenen Monolayern abgesaugt und die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA; PAN) abgelöst. Die Reaktion wurde mit dem gleichen Volumen Medium gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden resuspendiert und im gewünschten Verhältnis auf neue Kulturschalen (Nunc, Langenselbold) verteilt.

Zur Weiterzucht wurden HEK-293T-Zellen im Verhältnis 1:5, ROS- und CHO- Zellen im Verhältnis 1:10-1:20 über zwei Tage passagiert.

2.9.3 Transfektion von Zelllinien

Kalziumphosphatpräzipitation

Zur Transfektion von HEK-293T-Zellen eignet sich die Kalziumphosphatpräzipitation nach Chen [135], die auf der Bildung von Kalzium-Phosphat-DNA-Komplexen besteht, welche von den Zellen phagozytiert werden. 3-6 h vor Transfektion wurden HEK-Zellen in einem Verhältnis von 1:3 auf 10 cm²-Schalen oder 6-Loch-Platten gesplittet.

Es wurden folgende Transfektionsansätze benutzt:

	pro Loch einer 6-Lochplatte	pro 10 cm ² -Schale
DNA	1-3 µg	10-20 µg
ddH ₂ O	135 µl	450 µl
2,5 M CaCl ₂	15 µl	50 µl
2x BBS	150 µl	500 µl

Der Ansatz wurde gut geschüttelt, um dadurch die Präzipitation von Kalziumphosphat und Plasmid-DNA zu induzieren. Nach 10-20 min wurde der Ansatz gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Diese wurden für 12 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen, mit neuem Medium versetzt und

weitere 24 h bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert. Die Transfektionseffizienz betrug in der Regel 50-70%.

2x BBS Puffer: 280 mM NaCl
 1,5 mM Na₂HPO₄ x H₂O
 50 mM BES (pH 6,95)

Transfektion mit Lipofectamin

CHO- und ROS-Zellen wurden mit Lipofectamin (Invitrogen) transfiziert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Transfektionseffizienz betrug in der Regel 40-60% für CHO- und 20-40% für ROS-Zellen.

2.9.4 Generierung stabil exprimierender Zelllinien

Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 1 mg/ml Geneticin (G418) selektioniert. Das hier verwendete Plasmid pcDNA3 trägt ein Resistenzgen gegen Geneticin, was das Überleben von Zellen ermöglicht, die dieses Plasmid integriert haben. Die Selektion wurde für 2-3 Wochen fortgesetzt. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen. Im Anschluß wurden Zellen durch geeignete Verdünnung in 96-Loch-Platten vereinzelt und zu klonalen Zelllinien herangezogen. Die weitere Kultivierung erfolgte in der Regel in Kulturmedium mit 0,2-0,5 mg/ml Geneticin. Die Überprüfung der Expression und Auswahl einzelner Klone erfolgte mittels Dot-Blot, Immunfluoreszenz oder im Falle fluoreszierender Genprodukte durch direkte Fluoreszenzmikroskopie.

2.10 Proteinchemische Methoden

2.10.1 Coomassie-Färbung

Zur Darstellung von Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel wurde die Coomassie-Färbung angewandt. Dieser hydrophobe blaue Farbstoff bindet Proteine unspezifisch und an die meisten Proteine gleich gut. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Lösung für ca. 20 min, anschließend wurde das Gel für ca. 1 Stunde entfärbt.

Material und Methoden

Coomassie-Lösung: 40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
0,1% (w/v) Coomassie Blue R250

Entfärber: *idem*, jedoch ohne Coomassie Blue R250

2.10.2 SDS-PAGE

SDS-Gelelektrophorese mit Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli [136] durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Elektrophoresesystem Protean 4 Mini der Firma Bio-Rad (Gelmaße 10x8 cm) benutzt. Zu analysierende Proteinproben wurden mit SDS-Laemmli-Probenpuffer versetzt, 20 min bei 60°C inkubiert und nach Gelauftrag in vertikaler Laufkammer (SDS-Laufpuffer als Kathoden- und Anodenpuffer) mit konstanter Spannung (200 V) aufgetrennt.

Zur Herstellung eines Gels wurden verwendet:

Sammelgel (4%): 250 µl 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
20 µl 10% (w/v) SDS
125 µl Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8% [w/v])
1,25 ml ddH₂O
2 µl Tetramethylethyldiamin
10 µl Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (10%)

Trenngel (10%): 2,0 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
80 µl 10% (w/v) SDS
2,7 ml Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8% [w/v])
3,3 ml ddH₂O
4 µl Tetramethylethyldiamin
40 µl Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (10%)

2.10.3 Herstellung eines Antiserums gegen den C-Terminus des PTHR

Polyklonale Antiseren gegen den C-Terminus des humanen PTHR wurden hergestellt. Hierzu wurde ein Peptid, welches den letzten 21 Aminosäuren des humanen PTHR entsprach, synthetisiert (Gramsch Laboratories, Schwabhausen). Die Sequenz des Peptids war CEEASGPERPPALLQEEWETVM. Das Peptid wurde mit HPLC gereinigt

und über das N-terminale Cystein und einen Succinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl)-Cyclohexan-1-Carboxylat-Linker an Keyhole Limpet Hemocyanin gekoppelt. Das Konjugat wurde 1:1 mit Freudschem Adjuvans gemischt und zur Immunisierung von drei Kaninchen (1781-1783) verwendet. Die Tiere wurden 4x im Abstand von 4 Wochen immunisiert. Seren wurden 2 Wochen nach der jeweiligen Immunisierung, beginnend mit der 2. Immunisierung, gewonnen. Die Herstellung des anti-PTHR-CT-Antiserums wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Stefan Schulz (Universität Jena) durchgeführt.

2.10.4 Isolierung von Zellmembranen

Zur Isolierung von Zellmembranen wurden konfluent gewachsene Zellen mit PBS gewaschen und bei -20°C gelagert. Zur Präparation wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 5 ml eiskaltem 5/2 Puffer pro 20 cm Zellkulturschale gelöst. Anschließend wurden die Zellen mit einem Hochleistungsdispergierer (Ultra-Turrax T25, Jahnke & Kunkel, Staufen) für 2x 15 s bei maximaler Stufe auf Eis aufgebrochen. Um Zellkerne und intakte Zellen zu entfernen, wurde das Homogenat für 10 min bei 1000 x g in einem JA-17 Rotor mit einer Avanti J25 Zentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld) zentrifugiert. Die Membranfraktion wurde aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation für 40 min bei 100.000 x g in einem 70 Ti Rotor in einer Optima LE 70 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) gewonnen. Das Pellet wurde in 5/2-Puffer mit einem Glashomogenisator resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5/2-Puffer: 5 mM Tris, pH 7,5
 2 mM EDTA

2.10.5 Solubilisierung von Proteinen

Für die direkte biochemische Analyse von Proteinen wurden konfluent gewachsene Monolayer mit SDS-Laemmlipuffer lysiert. Pro Loch einer 12-Loch-Schale wurden 200 µl Puffer verwendet, pro Loch einer 6-Loch-Schale 400 µl. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die lysierten Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, und DNA-Präzipitate wurden durch 5 kurze Ultraschallstöße (Sonikator Soniplus HD 200; Brandelin, Berlin) zerstört. Im Anschluss wurden die Proben für 20 min bei 60°C erhitzt und kurz abzentrifugiert.

Material und Methoden

Zur Verwendung für Immunpräzipitation und enzymatischen Reaktionen wurden Zellen aus einer 10 cm Schale oder Membranpräparationen (2 mg Gesamtprotein) mit 1 ml RIPA-Puffer unter Zusatz eines Proteaseinhibitor-Cocktails (1 mM PMSF, 10 µg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, 30 µg/ml Benzamidin, 1 mg/ml Leupeptin) für 30 min bei 4°C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden für 30 min bei 20.000 x g in einer EBA 12R Kühlzentrifuge (Hettich, Tuttlingen) abzentrifugiert. Der Überstand wurde für weitere Versuche verwendet.

2.10.6 Dot-Blot

Die Expressionskontrolle von stabilen Zellklonen aus 96-Loch-Platten erfolgte mittels Dot-Blot. Dazu wurden die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen und durch Zugabe von 20 µl RIPA-Puffer 20 min auf Eis lysiert. Die Lysate wurden mit Hilfe eines Dot-Blot Mikrofiltrationsapparates (Bio-Dot, Bio-Rad) auf in 100% Methanol äquilibrierte PVDF-Membranen (Immobilon-P, Millipore, Schwalbach) punktförmig immobilisiert, getrocknet und mit Blockpuffer über Nacht abgesättigt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte durch Immundetektion mittels spezifischer Antikörper.

2.10.7 Western-Blot

In SDS-Gelen aufgetrennte Proteine wurden durch elektrischen Strom auf PVDF-Membranen transferiert. Dazu wurde ein Sandwich bestehend aus drei Lagen Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel), SDS-Gel, in 100% Methanol äquilibrierte PVDF-Membran und drei Lagen Filterpapier aufgebaut. Der Transfer der Proteine wurde in einer Transferkammer der Firma Bio-Rad bei konstanter Stromstärke von 350 mA durchgeführt. Die Transferzeit wurde abhängig von der Gelstärke und der Proteingröße gewählt und betrug in der Regel 70 min.

2.10.8 Immundetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen die PVDF-Membran für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht in Blockpuffer geschwenkt. Danach wurde der Primärantikörper in der geeigneten Verdünnung (1:500-1:5000) in Blockpuffer zugegeben und bei 4°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T für jeweils 10-15 min wurde der in Blockpuffer verdünnte Sekundärantikörper (1:10,000) zugegeben

und wiederum eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen für jeweils 10-15 min in PBS-T entfernt.

Für den Nachweis mittels Chemolumineszenz wurde ECL Plus (GE Healthcare, München) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion erfolgte durch Belichtung von Röntgenfilmen (Fujifilm, Düsseldorf) mit unterschiedlichen Belichtungszeiten. Die Filme wurden mit einem Epson Perfection V700 Scanner (Epson, Meerbusch) im Durchlichtmodus digitalisiert.

„Strippen“ von Membranen

Um auf einer Western-Blot-Membran mehrere verschiedene Proteine nachweisen zu können, wird der gebundene Sekundärantikörper von der PVDF-Membran entfernt, bzw. das Detektionenzym deaktiviert und anschließend mit einer anderen Antikörperspezies inkubiert. Dazu wurde die Membran 30 min lang in Strippuffer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS-T wurde die Membran 1 h lang in Blockpuffer inkubiert und mit den gewünschten Antikörpern inkubiert wie oben beschrieben.

Strippuffer: 25 mM Glycin-HCl, pH 2,5
 0,1% (w/v) SDS

2.10.9 Immunpräzipitation

Proteine aus Zellen oder aus Membranpräparationen wurden wie oben beschrieben in 1 ml RIPA-Puffer solubilisiert. 900 µl des Lysats wurden mit 25 µl anti-HA- oder anti-Flag-gekoppelter Sepharose für 2 h bei 4°C inkubiert. Für die Immunpräzipitation von NHERF1 wurden 900 µl Lysat zunächst für 1 h bei 4°C mit 2 µl anti-NHERF1-Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden 25 µl gewaschene und mit 0,1% BSA über Nacht abgesättigte Protein-A Sepharose (GE Healthcare) zugegeben und erneut 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Sepharose durch kurze Zentrifugation bei 2000xg pelletiert und 3-5 x mit RIPA-Puffer gewaschen. Die präzipitierten Proteine wurden mit 20 µl 2x SDS-Ladepuffer bei 60°C für 20 min eluiert oder direkt für die enzymatische Deglykosylierung verwendet (s. 2.10.10).

2.10.10 Enzymatische Deglykosilierung des PTHR

PTHR wurde aus CHO-HA-PTHR Zellen präzipitiert wie beschrieben. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine mit 20 µl Denaturierungspuffer bei Raumtemperatur 40 min lang eluiert und denaturiert. Vor der enzymatischen Deglykosilierung wurden die Eluate 10-fach mit Reaktionspuffer verdünnt: Für den Verdau mit Endoglykosidase H (Endo H) wurde Puffer E, mit N-Glykosidase F (PNGase F) wurde Puffer P, und mit Neuraminidase wurde Puffer N verwendet. Die Enzyme wurden in den folgenden Konzentrationen verwendet: 250 U/ml Endo H (New England Biolabs), 5 U/ml PNGase F (Roche, Mannheim) oder 50 U/ml Neuraminidase (New England Biolabs). Die Reaktionen wurden für 12 h bei 37°C durchgeführt und anschließend durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet.

Denaturierungspuffer: 1% (w/v) SDS
50 mM Natriumphosphat (pH 7,5)
50 mM EDTA

Reaktionspuffer E: 50 mM Natriumphosphat (pH 5,5)
50 mM EDTA
0,5 % (w/v) β-Dodecylmaltosid
1 % (w/v) β-Mercaptoethanol

Reaktionspuffer P: 50 mM Natriumphosphat (pH 7,5)
50 mM EDTA
1 % Triton-X 100
1 % (w/v) β-Mercaptoethanol

Reaktionspuffer N: 50 mM Natriumphosphat (pH 6,5)

Alle Puffer waren mit Proteaseinhibitor-Cocktails (1 mM PMSF, 10 µg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, 30 µg/ml Benzamidin, 1 mg/ml Leupeptin) versetzt.

2.10.11 [³⁵S]-Markierung von Proteinen und Fluorographie

Die „Pulse-Chase“-Technik ermöglicht die Darstellung und Quantifizierung des Metabolismus von Proteinen. Hierbei macht man sich den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren in neu gebildete Proteine über einen kurzen Zeitraum zunutze. Für einen

definierten Zeitraum werden Zellen in Medium kultiviert, welches zuvor mit radioaktiv markierten Aminosäuren (meist [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein) versetzt wurde. Die Aminosäuren diffundieren schnell in das Zytosol und markieren den zellulären Aminosäurepool, so dass alle neu gebildeten Proteine radioaktiv markiert werden (sog. „Pulse“). Anschließend werden die freien radioaktiven Aminosäuren ausgewaschen und die Zellen in Medium mit einem Überschuss an nicht-markiertem Methionin und Cystein zur schnelleren Verdrängung der markierten Aminosäuren über definierte Zeiträume kultiviert. Verfolgt man nun die radioaktiv markierte Menge eines bestimmten Proteins durch sequentielle Aufarbeitung und Immunpräzipitation zu bestimmten Zeitpunkten, lassen sich durch Bestimmung der verbleibenden Aktivität genaue Aussagen über den Metabolismus machen (sog. „Chase“). Dabei korreliert die Stärke des radioaktiven Signals direkt mit dem Anteil des in der Zelle noch vorhandenen Proteins, das während des „Pulse“ markiert worden ist.

CHO-HA-PTHr-Zellen wurden auf 5 cm Zellkulturschalen subkonfluent kultiviert. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und mit Methionin/Cystein-freiem DMEM-Medium 1 h lang inkubiert. Zur radioaktiven Markierung wurden die Zellen dann für 1 h bei 37°C mit 2 ml Methionin/Cystein-freiem DMEM-Medium inkubiert, das zuvor mit 150 µCi/ml [³⁵S]-markiertem Methionin und Cystein versetzt worden war (*EXPRE [³⁵S] protein labeling mix*, Perkin Elmer). Anschließend wurde das Markierungsmedium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Ein Teil der Zellen wurde zur Ermittlung der markierten Proteine zum Zeitpunkt 0 in eiskaltem PBS gewaschen, abgekratzt und als Pellet bei -80°C verwahrt. Alle weiteren Zellen wurden mit 5 ml warmem Medium mit je 2 mM Methionin und Cystein bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden in 1 ml PBS gewaschen und ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss wurden die Zellpellets in 750 µl kaltem RIPA-Puffer resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Solubilisierter PTHr wurde immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt (s. 2.10.9 und 2.10.2). Die Gele wurden in Coomassie-Blau gefärbt, in Fluorographie-Verstärkerlösung (Amplify, GE Healthcare) imprägniert und anschließend getrocknet. Zur Fluorographie wurden die Gele auf einer Imagingplatte 3-10 Tage gelagert. In einem Phosphoimager (PMI Phosphor Imager, Bio-Rad) wurden die Imagingplatten ausgelesen und mit der zugehörigen Software quantitativ ausgewertet.

2.11 Mikroskopische Techniken

2.11.1 Immunfluoreszenz

CHO oder HEK Zellen wurden über Nacht auf runden Deckgläschen (\varnothing 18 mm) kultiviert. Nach Inkubation mit entsprechenden Liganden wurden die Zellen in Zamboni-Fixierlösung 40 min lang bei Raumtemperatur fixiert und mehrere Male mit PBS gewaschen. Die fixierten Zellen wurden dann durch eine 3-minütige Inkubation in einem eiskalten 1:1 Methanol/H₂O-Gemisch und eine weitere 3-minütige Inkubation in eiskaltem Methanol permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen 3-5x für je 5 min mit PBS gewaschen und in PBS (+0,25% [w/v] BSA) für 5 min inkubiert. Als Primärantikörper wurde monoklonaler anti-HA-Antikörper (1:1000) oder ein polyklonales PTHR-CT Antiserum (1:2000) in PBS (+0,25% [w/v] BSA) gelöst und für 1 h mit den Zellen inkubiert. Nach 3-maligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit Cy2 gekoppeltem anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper oder anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper (1:200 in PBS + 0,25% [w/v] BSA) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen erneut 3x gewaschen und die Deckgläschen mit Fluomount Eindeckmittel (Dako, Hamburg) auf Objektträgern montiert.

Zamboni-Fixierlösung: 0,2 % (w/v) Pikrinsäure
 4% (w/v) Paraformaldehyd
 100 mM Natriumphosphat, pH 7,4

2.11.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

HEK- oder CHO-Zellen wurden auf runden 24 mm Deckgläschen kultiviert und direkt in einer Attofluor-Messkammer (Invitrogen) in Tyrodepuffer mikroskopiert. Auf Deckgläschen fixierte Zellen wurden zuvor auf Objektträger montiert (s. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Für die konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde ein Leica TCS SP2 mit einem Krypton/Argon-Laser und einem Diodenlaser verwendet. Für alle Aufnahmen wurde ein 63x1,4 Öl-Immersionsobjektiv benutzt. Alle Aufnahmen wurden in einem Format von 1024x1024 Pixeln bei 400 Hz durchgeführt und mit der LASAF-Software (Leica) aufgezeichnet und ausgewertet.

Folgende Exzitations- und Emissionsparameter wurden für die Messungen der einzelnen Farbstoffe verwendet:

Farbstoff	Anregung (nm)	Bandpassfilter (nm)
Cy2, GFP	488	500-560
Cy3	514	545-585
CFP	436	460-500
YFP	514	520-550

Tyrodepuffer: 137 mM NaCl
 5,4 mM KCl
 2 mM CaCl₂
 1 mM MgCl₂
 10 mM HEPES, pH 7.3

2.11.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Messungen

HEK- oder CHO-Zellen wurden auf Poly-D-Lysin (Sigma-Aldrich)-beschichteten Deckgläschen (Ø 24 mm) kultiviert und zur Messung in einer Attofluor-Messkammer montiert und mit Tyrodepuffer überschichtet. FRET-Messungen wurden auf einem Inversmikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Jena) durchgeführt, das mit einem 100x Öl-Immersionsobjektiv (Plan-Neofluar 100x/1,3 Oil) sowie einem dualen Emissionssystem (TILL Photonics, Gräfeling) ausgerüstet war. Die Anregung der Zellen erfolgte mit einem Polychrome IV Monochromator (TILL Photonics) bei 436 ± 10 nm unter Verwendung eines DCLP 505 nm-Strahlteilers. Das Signal einer gesamten Zelle wurde nach einem Doppel-Emissionsprotokoll gemessen. Hierzu wurden die Emissionsintensitäten von YFP bei 535 ± 15 nm und von CFP bei 480 ± 20 nm unter Verwendung eines DCLP 505 nm Strahlteilers mit Photodioden (TILL Photonics) aufgenommen, mit einem AD Konverter (Digidata 1322A, Axon Instruments) digitalisiert und mit Clampex 8.1 Software (Axon Instruments) aufgezeichnet. Um Agonisten-abhängige FRET Änderungen zu messen, wurden die Zellen kontinuierlich mit Tyrodepuffer umspült und Agonist wurde mittels eines Computer-gesteuerten Magnetventil-Superperfusionssystem (ALA-VM8, ALA Scientific Instruments) zugegeben. Dargestellt wurden die einzelnen Kanäle sowie der Quotient von Akzeptor- zu Donor-Emission. Das Durchbluten des Donors in den Akzeptorkanal wurde zuvor

bestimmt und vom Akzeptorsignal abgezogen. Um die Falschanregung des Akzeptors durch die Donor-Anregung zu bestimmen, wurde am Ende jedes Experiments die direkte Anregung des Akzeptors gemessen und von dieser der prozentuale Anteil der Anregung des Akzeptors allein bei Donor-Exzitation subtrahiert. Für die Berechnung der FRET-Ratio wurde die korrigierte Akzeptorfluoreszenz durch die Donorfluoreszenz geteilt.

FRET zwischen CFP und YFP wurde zusätzlich mittels Donor (CFP)-Dequenchen nach Photobleichen des Akzeptors (YFP) gemessen. Durch das Bleichen des Akzeptors eines FRET-Paars erhöht sich bei bestehendem Resonanz-Energie-Transfer die Emissionsintensität des Donors. Diese Methode erlaubt es, auch FRET aus vorgebildeten Proteinkomplexen zu quantifizieren. Nach einer initialen Aufzeichnung der Emissionen von CFP und YFP bei Anregung von 436 nm nach dem Doppel-Emissionsprotokoll wurde YFP durch kontinuierliche Beleuchtung für 5 min bei 480 nm gebleicht. Im Anschluß wurde erneut die Emissionsintensität von CFP und YFP bei 436 nm-Anregung gemessen und daraus einerseits der Anteil des YFP-Bleichens und andererseits der prozentuale Anstieg der CFP-Fluoreszenz berechnet. Das Bleichen von CFP während des Experiments wurde in parallelen Messungen bei alleiniger Expression des jeweiligen CFP-Konstrukts ermittelt und entsprechend hierfür korrigiert.

Alle in dieser Arbeit aufgeführten FRET-Messungen wurden im Rahmen einer Kooperation von Thorsten Vetter (Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg) durchgeführt.

2.12 Bioinformatik und Laborsoftware

Sequenzvergleiche und Homologiesuchen wurden mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) durchgeführt [137]. Plasmidkarten sowie Sequenzalignments mit dem ClustalW-Algorithmus [138] wurden mit BioEdit (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) durchgeführt.

Statistische Datenauswertung und Ausgleichsrechnung wurden mit Prism 4.0 (Graphpad Software, La Jolla) oder mit Origin Pro 8.0 (OriginLab, Northampton) bewerkstelligt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen über den Langzeiteffekt von Parathormon auf den PTH-Rezeptor

Der physiologische Effekt von Parathormon am Knochen ist abhängig von der Dauer und der Konzentration, in der das Hormon am den Rezeptor vorliegt. Während kontinuierliche und niedrig-konzentrierte Dosen zu einer Knochenresorption und nachfolgenden Kalziumfreisetzung führen, bewirkt eine intermittierende und hochdosierte Gabe von Parathormon den Aufbau von Knochen. Die kurzfristigen Effekte von PTH auf das Signalverhalten des PTHR sind einer Vielzahl von Studien intensiv untersucht worden. Hingegen ist über den Einfluss, den PTH auf den Rezeptor selber und auf dessen Internalisierung hat, nur wenig bekannt.

3.1.1 Agonisten führen zu einer Internalisierung des PTHR

Viele GPCRs werden nach ihrer Aktivierung durch einen Agonisten rasch internalisiert. Ein solcher Effekt ist für den PTHR ebenfalls beschrieben [97]. Zunächst wurde der zeitabhängige Effekt von verschiedenen PTH-Fragmenten auf die Internalisierung des PTHR untersucht. Hierzu und für die folgenden Experimente wurde zunächst eine monoklonale CHO-Zelllinie generiert, die den humanen HA-markierten PTHR stabil exprimiert (im folgenden CHO-HA-PTH R Zellen genannt). Vier verschiedene PTH-Peptide wurden verwendet: PTH(1-34) und PTH(1-14) besitzen eine ähnliche Potenz wie PTH(1-84) bei der Aktivierung der Adenylylzyklase und der PKC [139]. PTH(1-31) aktiviert ebenfalls die Adenylylzyklase, aber nicht die PKC [49]. PTH(7-34) ist ein reiner Antagonist für die klassischen Signalkaskaden des PTHR [140]. Zunächst wurde der PTHR für 30 min mit den jeweiligen Liganden in sättigenden Konzentrationen inkubiert, und die Lokalisation des PTHR wurde mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Im Gegensatz zu unstimulierten Zellen, in denen der PTHR hauptsächlich an der Zelloberfläche exprimiert ist, fand nach Behandlung der Zellen mit den agonistischen Peptiden PTH(1-34), PTH(1-31) und PTH(1-14) schon nach 30 min eine vollständige Internalisierung des Rezeptors in intrazelluläre Vesikel statt. Mit PTH(7-34) hingegen war keine nennenswerte Internalisierung des Rezeptors zu detektieren (Abbildung 7A). Um zu untersuchen, in welchem Umfang der Rezeptor über die Zeit internalisiert wird, wurde die Färbung des PTHR mittels Immunfluoreszenz an unpermeabilisierten und

Ergebnisse

permeabilisierten Zellen verglichen. Aufgrund des im PTHR-N-Terminus lokalisierten HA-Epitops kann membranständiger Rezeptor sowohl in permeabilisierten als auch unpermeabilisierten Zellen detektiert werden. Internalisierter Rezeptor hingegen ist nur in permeabilisierten Zellen nachzuweisen, welche von den Antikörpern penetriert werden können. In unstimulierten Zellen ohne oder mit Permeabilisierung ließ sich der PTHR im gleichen Ausmaß an der Zelloberfläche anfärben (Abbildung 7B, Kontrolle). Nach 0,5-6 h Inkubation mit PTH(1-34) war kein Signal mehr auf der Zelloberfläche zu detektieren. In permeabilisierten Zellen hingegen fand sich ein deutliches Signal in intrazellulären Vesikeln (Abbildung 7B, PTH[1-34]). Nach Stimulation mit PTH(7-34) war auch über einen Zeitraum von 6 h kein Rezeptor im Inneren der permeabilisierten Zellen nachzuweisen, sondern ausschließlich auf der Zelloberfläche (Abbildung 7B, PTH[7-34]).

Dies zeigt, dass der Rezeptor durch PTH(1-34) nahezu vollständig internalisiert wird und über den gesamten Zeitraum in intrazellulären Kompartimenten verbleibt, wohingegen PTH(7-34) auch nach sechsstündiger Inkubation den Rezeptor nicht zu internalisieren vermochte.

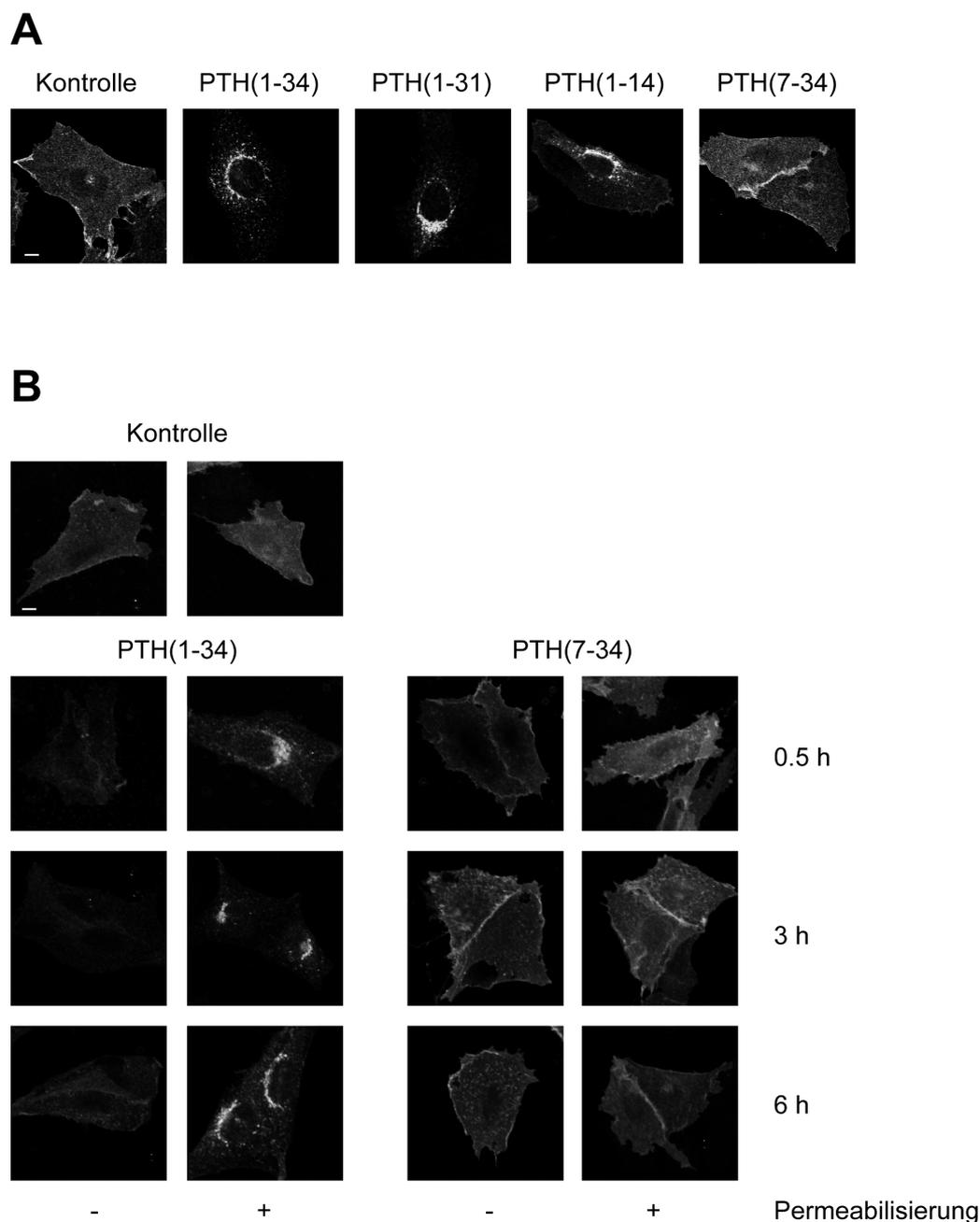


Abbildung 7 | **Internalisierung des PTHR durch PTH(1-34), PTH(1-31), PTH(1-14) oder PTH(7-34).**
A | CHO-HA-PTHR Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert und mit 100 nM PTH(1-34), 1 μ M PTH(1-31), 3 μ M PTH(1-14) oder 1 μ M PTH(7-34) für 30 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen Maus anti-HA Antikörper gefolgt von einem Cy2-markiertem anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper angefärbt. Der HA-PTHR wurde mit konfokaler Mikroskopie dargestellt. Der weiße Balken entspricht 5 μ m. **B** | CHO-HA-PTHR-Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert und mit 100 nM PTH(1-34) oder 1 μ M PTH(7-34) für 30 min, 3 h oder 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert. Zur Darstellung von intrazellulären Rezeptoren wurden die Zellen mit Methanol permeabilisiert. Zur Darstellung von Rezeptoren nur auf der Zelloberfläche wurden die Zellen nicht permeabilisiert. Die Anfärbung erfolgte wie oben beschrieben.

3.1.2 Längere Aktivierung des PTHR führt zu einer Massenzunahme des Proteins

Im Weiteren sollten die direkten Effekte der verschiedenen PTH-Peptide auf den PTHR über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Hierzu wurden CHO-HA-PTH-R-Zellen mit sättigenden Konzentrationen von PTH(1-34), PTH(1-14), PTH(1-31) oder PTH(7-34) bis zu 12 h lang inkubiert. Nach direktem Aufschluss der Zellen wurde der PTHR im Western-Blot mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop detektiert. Typisch für ein Glykoprotein imponierte der PTHR als breite Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa im unstimulierten Zustand. Interessanterweise nahm aber das Molekulargewicht mit andauernder Gegenwart von jedem der drei Agonisten über den gesamten Zeitraum des Versuchs stetig zu. Darüber hinaus nahm die Signalstärke im Western-Blot ebenfalls zu, was eine steigende Proteinmenge des Rezeptors nahelegt (Abbildung 8A). Im Gegensatz hierzu war weder eine Zunahme der Proteinmasse noch der Proteinmenge des PTHR nach Behandlung mit dem Antagonisten PTH(7-34) feststellbar (Abbildung 8B). Diese Effekte waren nicht nur in CHO-Zellen zu finden sondern auch in einem Zellmodell, das der endogenen Situation des PTHR im Knochen mehr ähnelt: Osteosarcomzellen aus der Ratte (ROS 17/2.8), eine Zelllinie mit ossären Merkmalen, die in geringem Umfang den PTHR auch endogen exprimiert, wurden stabil mit HA-PTH transfiziert. Analog zu den CHO-Zellen wurde über 0-12 h mit 100 nM PTH(1-34) stimuliert und die PTHR Expression im Western-Blot kontrolliert. Ganz ähnlich nahmen auch hier mit längerer Inkubationsdauer die Molekülmasse und die Proteinmenge des PTHR zu (Abbildung 8C).

Die bisher beschriebenen Experimente wurden mit einem modifizierten Rezeptor durchgeführt, welcher zur besseren Detektierbarkeit mit einem HA-Epitop in der Ektodomäne versehen war. Obwohl gezeigt wurde, dass diese Modifikation in der extrazellulären Domäne des Rezeptors keine Auswirkungen auf die Ligandenbindung und die Signaleigenschaften zu haben scheint [16, 141], konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass das HA-Epitop die hier erhobenen Befunde verursachen oder beeinflussen könnte. Daher sollte die PTH-induzierte Massen- und Mengenzunahme des PTHR an Wildtyp-Rezeptoren ohne Modifikation überprüft werden. Leider standen zum Zeitpunkt der Datenerhebung keine kommerziellen Antikörper gegen den humanen PTHR zur Verfügung, die eine Detektion des Rezeptors im Western-Blot mit ausreichender Sensitivität und Spezifität ermöglicht hätten.

Deshalb wurde ein Antiserum gegen ein Epitop im C-Terminus des humanen PTHR generiert (anti-PTH-CT) [133]. Ein Peptid mit der Sequenz EEASGPERPPALLQEEWETVM, entsprechend den letzten 21 Aminosäuren des humanen PTHR, wurde synthetisiert (Gramsch Laboratories), an Keyhole Limpet Hemocyanin gekoppelt und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Spezifität der resultierenden Antiseren wurde initial in Dot-Blot Experimenten überprüft. Für die weiteren Versuche wurde das Antiserum von Kaninchen Nr. 1781 nach der dritten Immunisierung verwendet. Die Spezifität des Antiserums wurde durch Immunfluoreszenz und Western-Blot weiter überprüft. Hierzu wurden untransfizierte CHO-Zellen oder CHO-HA-PTH- Zellen unstimuliert gelassen oder für 30 min mit 100 nM PTH(1-34) stimuliert. Die Zellen wurden fixiert und permeabilisiert. Die Lokalisation des PTHR wurde mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen das HA-Epitop oder des anti-PTH-CT-Antiserums dargestellt. Mit beiden Antikörpern fand sich in den untransfizierten Zellen keine signifikante Anfärbung der Zellen. In den unstimulierten CHO-HA-PTH- Zellen war eine deutliche und für beide Antikörper vergleichbare Anfärbung an der Zellmembran zu detektieren, welche sich nach Stimulation mit PTH(1-34) in intrazelluläre Vesikel verlagerte. Dies ist vereinbar mit der spezifischen Anfärbung des PTHR und einer PTH-induzierten Internalisierung des Rezeptors (Abbildung 9A). Im Western-Blot von Lysaten aus CHO-HA-PTH- Zellen fand sich mit beiden Antikörpern eine prominente Bande bei ca. 90 kDa. In untransfizierten CHO-Zellen hingegen war keine Bande zu detektieren (Abbildung 9B). Zusammen demonstriert dies, dass das hier generierte anti-PTH-CT-Antiserum mit hoher Sensitivität und Spezifität den PTHR detektiert. Dies war vergleichbar mit der Sensitivität und Spezifität eines kommerziellen anti-HA Antikörper gegen das N-terminale HA-Epitop des Rezeptors.

Um zu überprüfen, ob die PTH-induzierte Massenzunahme auch am Wildtyp PTHR hervorgerufen werden kann, wurden CHO-Zellen, die den humanen Wildtyp-PTH oder HA-PTH stabil exprimierten, für 12 h mit PTH(1-34) inkubiert. Anschließend wurde der PTHR mit dem anti-PTH-CT Antiserum im Western-Blot detektiert. Sowohl HA-PTH als auch Wildtyp-PTH wurden von dem Antiserum bei ca. 90 kDa hochspezifisch nachgewiesen. Nach Behandlung mit PTH(1-34) zeigte sich bei beiden Rezeptoren eine Zunahme der Proteinmenge und -menge (Abbildung 10). Dies zeigt, dass das HA-Epitop keinen Einfluss auf die PTH-induzierte Mengen- und Massenzunahme des PTHR hat.

Ergebnisse

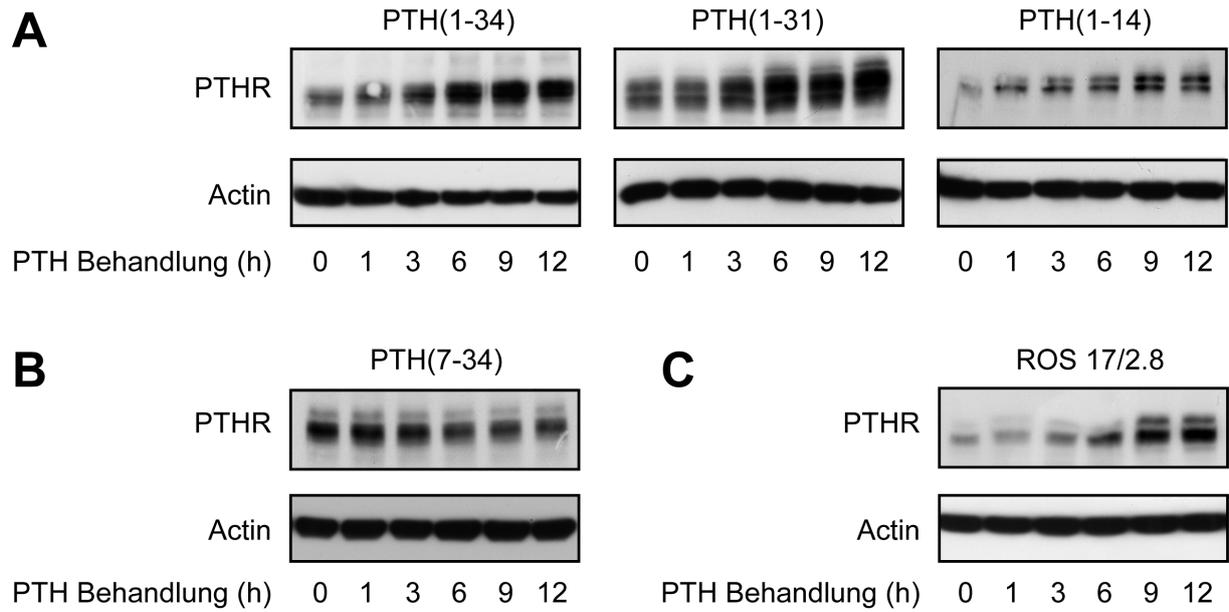


Abbildung 8 | **PTH(1-34), PTH(1-31) und PTH(1-14) bewirken Massenzunahme des PTHR.** A-B | CHO-HA-PTH Zellen wurden mit 100 nM PTH(1-34), 3 μ M PTH(1-14), 1 μ M PTH(1-31) oder 1 μ M PTH(7-34) über die angegebenen Zeitintervalle stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinlysate über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Elektrotransfer der Proteine auf PVDF-Membranen wurde der PTHR mit einem anti-HA Antikörper im Western-Blot detektiert. C | ROS 17/2.8 Zellen, die den HA-PTHR stabil exprimierten, wurden mit 100 nM PTH(1-34) für die angegebenen Zeitintervalle stimuliert. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben verarbeitet.

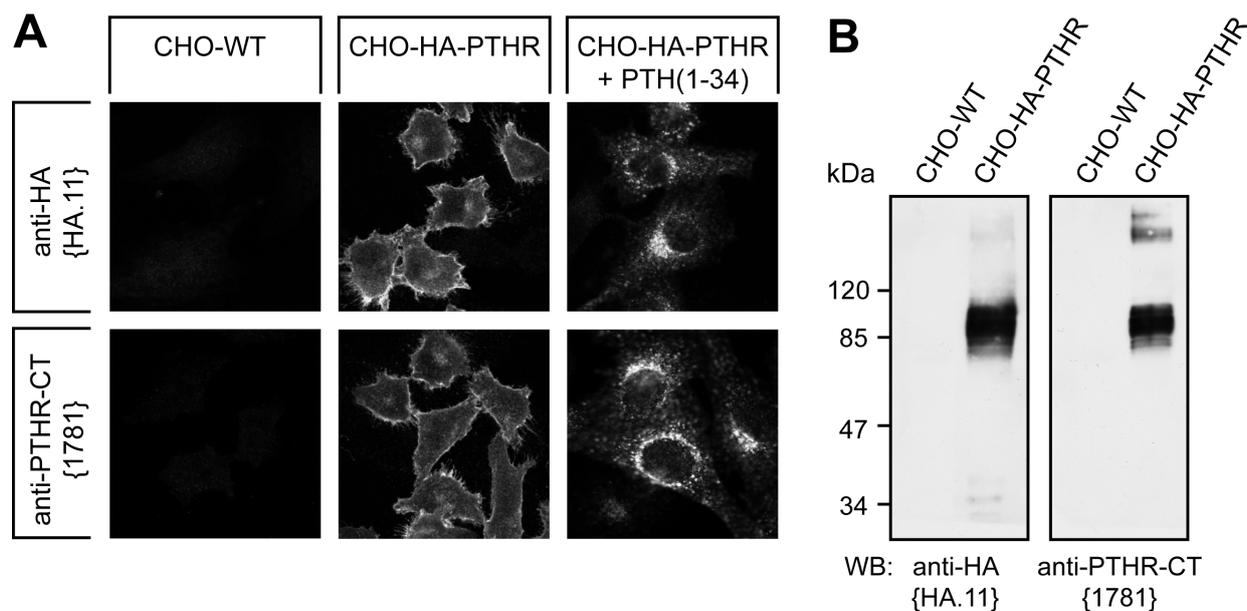


Abbildung 9 | **Charakterisierung des anti-PTHR-CT-Serums.** **A** | Untransfizierte CHO-Zellen oder CHO-HA-PTHR-Zellen wurden wie angegeben mit 100 nM PTH(1-34) für 30 min inkubiert, fixiert und permeabilisiert. Der PTHR wurde mit einem monoklonalen Maus anti-HA Antikörper {HA.11} (obere Reihe) oder mit einem Antikörper, der gegen den C-Terminus des humanen PTHR gerichtet ist (anti-PTHR-CT {1781}), markiert. Der Nachweis erfolgte durch Anfärbung mit einem Cy2-markiertem Sekundärantikörper und Konfokalmikroskopie. **B** | Untransfizierte CHO-Zellen oder CHO-HA-PTHR-Zellen wurden lysiert und die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der PTHR wurde mit anti-HA-Antikörper oder mit anti-PTHR-CT-Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen. Der Molekularmassenstandard ist auf der linken Seite angegeben.

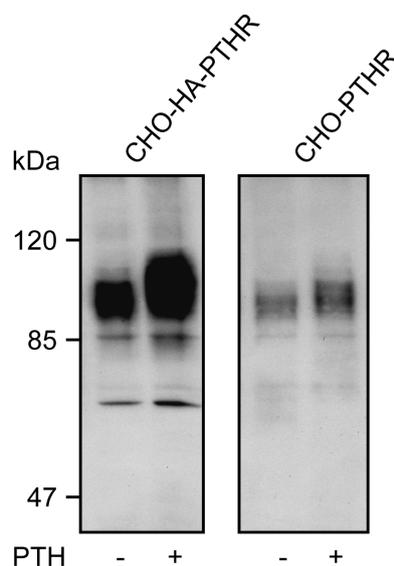


Abbildung 10 | **PTH-induzierte Massenzunahme des humanen Wildtyp-PTHR.** CHO Zellen, die HA-PTHR oder PTHR stabil exprimierten, wurden mit 100 nM PTH(1-34) 12 h lang inkubiert und wie oben beschrieben verarbeitet. Der PTHR wurde im Western-Blot mit anti-PTHR-CT Antikörpern detektiert. Der Molekularmassenstandard ist auf der linken Seite angegeben.

3.1.3 Die PTH-vermittelte Massenzunahme des PTHR ist unabhängig von Glykosilierung, SUMOylierung oder Ubiquitinierung

Die Massenzunahme eines Proteins wird häufig durch posttranslationale Modifikationen verursacht. Dazu zählen die Glykosilierung, Phosphorylierung, Methylierung, Lipidierung und die Modifikation mit Polypeptiden wie die Ubiquitinierung und SUMOylierung. Wie eingangs beschrieben trägt der PTHR vier komplexe N-Glykosidketten an Asp151, Asp161, Asp166 und Asp176 [17, 142]. Klassischerweise erfolgt die Glykosilierung eines Membranproteins zunächst im endoplasmatischen Retikulum über den kotranslationalen Transfer eines Kern-Oligosaccharids von Dolichol an die Asparaginseitenkette. Anschließend folgt die Reifung des Proteins im Golgi-Apparat, wozu u.a. die Prozessierung der Oligosaccharide gehört. Zunächst werden die mannosereichen Zuckerketten gekürzt und durch weitere Saccharide erweitert. So entstehen komplex verzweigte Zuckerketten mit endständigen Galaktosen und Sialinsäuren. Ein korrekter Reifungsprozess ist der limitierende Schritt in der Rezeptorbiosynthese und essentiell für die Membranlokalisation vieler Rezeptoren. Einige Rezeptoren und Rezeptormutanten reifen nur unvollständig aus und werden daher zu einem großen Teil im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten. Es wird vermutet, dass dies auf eine unzureichende Faltung des Rezeptorproteins zurückzuführen ist [143, 144]. Die unvollständige Reifung resultiert in unterschiedlichen Glykosilierungsmustern der Rezeptoren, was letztlich ein geringeres Molekulargewicht der unreifen Form im Vergleich zur reifen Rezeptorform zur Folge hat. Für den Vasopressin 2-Rezeptor und δ -Opioidrezeptor wurde gezeigt, dass bestimmte membrangängige Liganden den Reifungsprozess und somit die Verteilung des Rezeptors an die Zelloberfläche verbessern können [145, 146]. Es lag daher nahe zu untersuchen, ob ein ähnlicher Mechanismus für den hier vorliegenden Fall einer PTH-induzierten Größen- und Mengenzunahme des PTHR vorliegen könnte. Wie oben beschrieben unterscheidet sich das Glykosilierungsmuster der reifen und unreifen Rezeptoren, womit eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Glukosidasen einhergeht. PNGase F spaltet β -Aspartylglykosylamin-Bindungen und entfernt somit sämtliche N-glykosidischen Oligosaccharidketten. Endo H hingegen spaltet selektiv unprozessierte Mannose-reiche Oligosaccharide von Glykoproteinen und ist daher nur an Zuckerresten des unreifen Rezeptors aktiv [147, 148].

HA-PTHR wurde aus unbehandelten Zellen und aus Zellen, die zuvor für 12 h mit PTH(1-34) inkubiert wurden, immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden mit Endo H, Neuraminidase oder PNGase F verdaut und PTHR wurde im Western-Blot detektiert. Es zeigte sich, dass weder Neuraminidase noch Endo H einen Einfluss auf den unbehandelten sowie den stimulierten Rezeptor hatten (Abbildung 11, Spuren 2-3 und 6-7). Nach dem Verdau mit PNGase F konnte der unbehandelte PTHR als Banden mit einem M_R von 49.000, 57.000 und 60.000 detektiert werden. PTH-behandelter PTHR stellte sich hingegen als einzelne Bande mit einem M_R von 60.000 dar (Abbildung 11, Spur 4 vs. 8). Dies zeigt deutlich, dass der Größenunterschied von unbehandeltem und PTH-behandeltem PTHR nicht aufgrund einer verbesserten Rezeptorreifung entsteht. Vielmehr weist der PNGase F-Verdau, der sämtliche N-glykosidischen Zuckerketten vom Protein entfernt, darauf hin, dass eine Glykosilierungs-unabhängige Modifikation vorliegen muss. Weiterhin zeigt der PNGase-Verdau, dass der Massenunterschied zwischen dem kleinsten Fragment des unbehandelten Rezeptors und dem PTH-behandelten Rezeptor ca. 10 kDa beträgt (Abbildung 11, Spur 4 vs. 8).

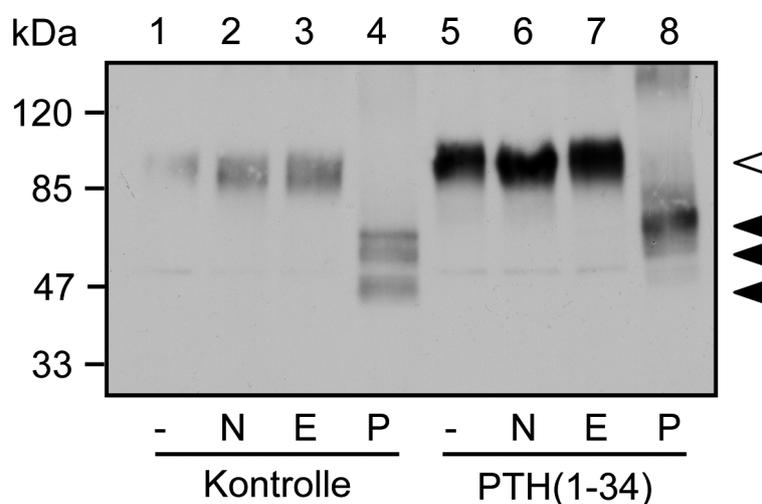


Abbildung 11 | **Der PTH-induzierte Größenunterschied des PTHR wird nicht durch Glykosilierung vermittelt.** CHO-HA-PTHR Zellen wurden wie angegeben für 12 h mit 100 nM PTH(1-34) behandelt. Die Zellen wurden lysiert und der PTHR wurde mit anti-HA-Agarose präzipitiert. Die Präzipitate wurden gewaschen und mit 50 U/ml Neuraminidase (N), 250 U/ml Endo H (E) oder 5 U/ml PNGase F (P) 12 h lang inkubiert. Die Reaktion wurde mit SDS-Probenpuffer beendet und die Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF Membranen transferiert. HA-PTHR wurde im Western-Blot detektiert. *Offene Pfeile* markieren den glykosilierten Rezeptor. *Geschlossene Pfeile* markieren die verschiedenen Rezeptorformen nach Deglykosilierung. Der Molekularmassenstandard ist auf der linken Seite angegeben.

Ergebnisse

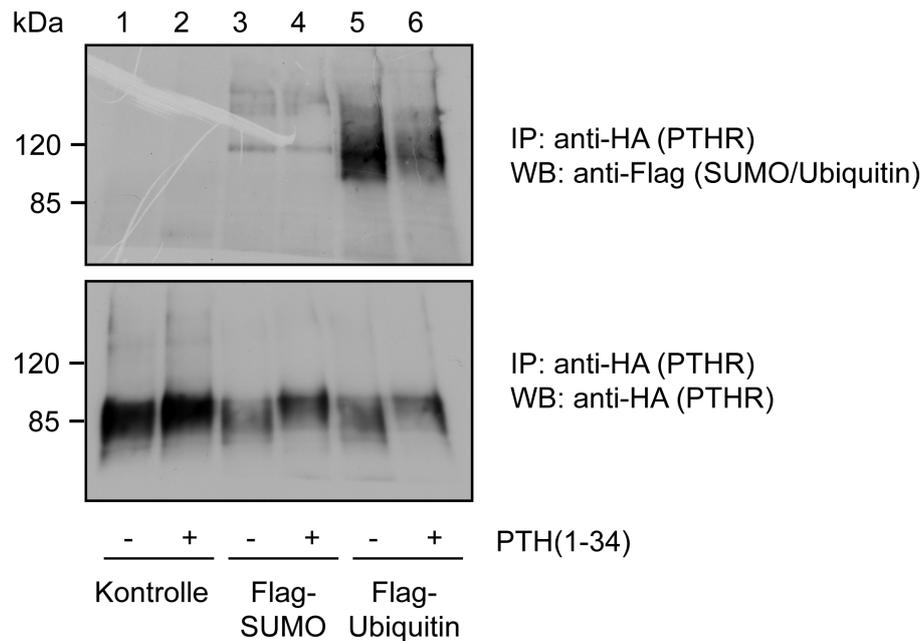


Abbildung 12 | **Der PTH-induzierte Größenunterschied des PTHR wird nicht durch SUMOylierung oder Ubiquitinierung des Rezeptors vermittelt.** CHO-HA-PTHR Zellen wurden mit Flag-Ubiquitin oder mit Flag-SUMO1 transient transfiziert. Sechsenddreißig h nach Transfektion wurden die Zellen wie angegeben mit 100 nM PTH(1-34) behandelt. Die Zellen wurden lysiert und der PTHR wurde mit anti-HA-Agarose präzipitiert. Die Präzipitate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt. Flag-Ubiquitin bzw. Flag-SUMO wurde mit monoklonalem anti-Flag Antikörper dargestellt (oberes Bild). Anschließend wurden die Membranen gestrippt, und der PTHR wurde mit anti-HA Antikörper dargestellt (unteres Bild). Der Molekularmassenstandard ist auf der linken Seite angegeben.

Neben der Glykosylierung kommen weitere posttranslationale Modifikationen in Frage. Ein relativ großer Massenunterschied von 10 kDa ist typisch für Modifikationen mit Proteinen aus der Ubiquitin-Familie. Hierunter fallen u.a. die Proteine Ubiquitin, SUMO und Nedd8 [149]. Die Modifikation erfolgt jeweils durch eine enzymatische Quervernetzung über die Lysin-Gruppe eines Proteins mit dem C-Terminus von Ubiquitin oder eines Ubiquitin-ähnlichen Proteins durch Ausbildung einer Isoeptidbindung [150]. Für eine Reihe von GPCRs ist die Modifikation mit Ubiquitin beschrieben. Allerdings handelt es sich hierbei meist um die Ausbildung von langen Polyubiquitinketten, die als hochmolekulare Makrokomplexe imponieren. Modifikation eines GPCRs mit einem einzelnen Ubiquitinmolekül können aber ebenfalls stattfinden [88, 151]. Um zu überprüfen, ob der PTHR ubiquitiniert oder SUMOyliert wird, wurde der Rezeptor mit Flag-SUMO1 oder Flag-Ubiquitin in CHO-Zellen koexprimiert. Nach einer 12-stündigen Inkubation mit PTH(1-34) wurde der PTHR immunpräzipitiert, und SUMO1 bzw. Ubiquitin wurde im Western-Blot mit einem anti-Flag Antikörper detektiert. Weder in unstimulierten noch in PTH-stimulierten Zellen konnte SUMOylierter PTHR nachgewiesen werden (Abbildung 12, Spur 3-4). Hingegen war eine deutliche Bande in

den Ubiquitin-transfizierten Zellen zu detektieren, was auf eine Ubiquitinierung des Rezeptors hinweist. Allerdings war das Signal schon in unstimulierten Zellen stark ausgeprägt und nahm mit PTH-Behandlung ab (Abbildung 12, Spur 5-6). Insofern scheint die Modifikation des PTHR mit Ubiquitin oder SUMO ebenfalls nicht ursächlich für die PTH induzierte Massenzunahme des Rezeptors zu sein.

3.1.4 PTH stabilisiert das PTHR Protein und verhindert seinen Abbau

Nachdem keine der bisher untersuchten posttranslationalen Modifikationen eine Erklärung für den Massenunterschied des Rezeptors zu geben schien, wurde der Reifungsprozess des PTHR in Pulse-Chase Experimenten untersucht. Dazu wurde der Rezeptor in CHO-HA-PTH-R-Zellen mit [³⁵S] Methionin/ Cystein markiert (Pulse) und der Verlauf seines Abbaus über verschiedene Zeiträume in Medium ohne radioaktive Aminosäuren ohne oder unter Zugabe von PTH(1-34) verfolgt (Chase). Im Anschluss wurde der Rezeptor immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE mittels Fluorographie dargestellt. Hier konnten zwei grundsätzliche Formen des PTHR identifiziert werden. Eine Bande wurde bei ca. 75 kDa detektiert, welche die vorherrschende Form direkt nach dem Pulse war. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um den Kernglykosylierten Rezeptor vor der Golgipassage. Eine zweite Bande trat ca. 1 h nach dem Chase auf und war nach 3 h maximal ausgeprägt. Diese Form hatte ein M_R von ca. 100.000 und stellt offenbar den reifen Rezeptor dar. Interessanterweise nahm die Masse dieser Bande ohne PTH über den Verlauf des Chase sukzessive ab, so dass sie letztendlich in einer M_R von 90.000 nach 12 h resultierte (Abbildung 13A). Im Gegensatz hierzu, fand eine solche Massenabnahme über 12 h in Gegenwart von PTH nicht statt (Abbildung 13B). Wenn die Zellen hingegen mit dem Antagonisten PTH(7-34) behandelt wurden, zeigte sich eine Massenabnahme vergleichbar mit der von unbehandelten Zellen (Abbildung 13C). Darüber hinaus ergab sich aus der Quantifizierung des [³⁵S]-PTH-R-Signals große Unterschiede in der Stabilität des Rezeptorproteins: ohne Liganden und mit PTH(7-34) betrug die Halbwertszeit des Rezeptors ca. 12 h bzw. 7 h betrug. PTH(1-34) hingegen erhöhte die Stabilität des Rezeptors deutlich, was sich in einer Halbwertszeit von ca. 62 h widerspiegelte (Abbildung 13D). Zusammenfassend erlauben diese Ergebnisse den Schluss, dass der PTHR nach seiner Synthese und Reifung einer Abnahme der molekularen Masse von 100 kDa auf 90 kDa unterliegt. Diese Reduktion führt letztlich zu einem raschen Abbau des Proteins. Durch den PTH(1-34) nicht aber durch PTH(7-34) wird dieser Prozess gehemmt und das Protein stabilisiert.

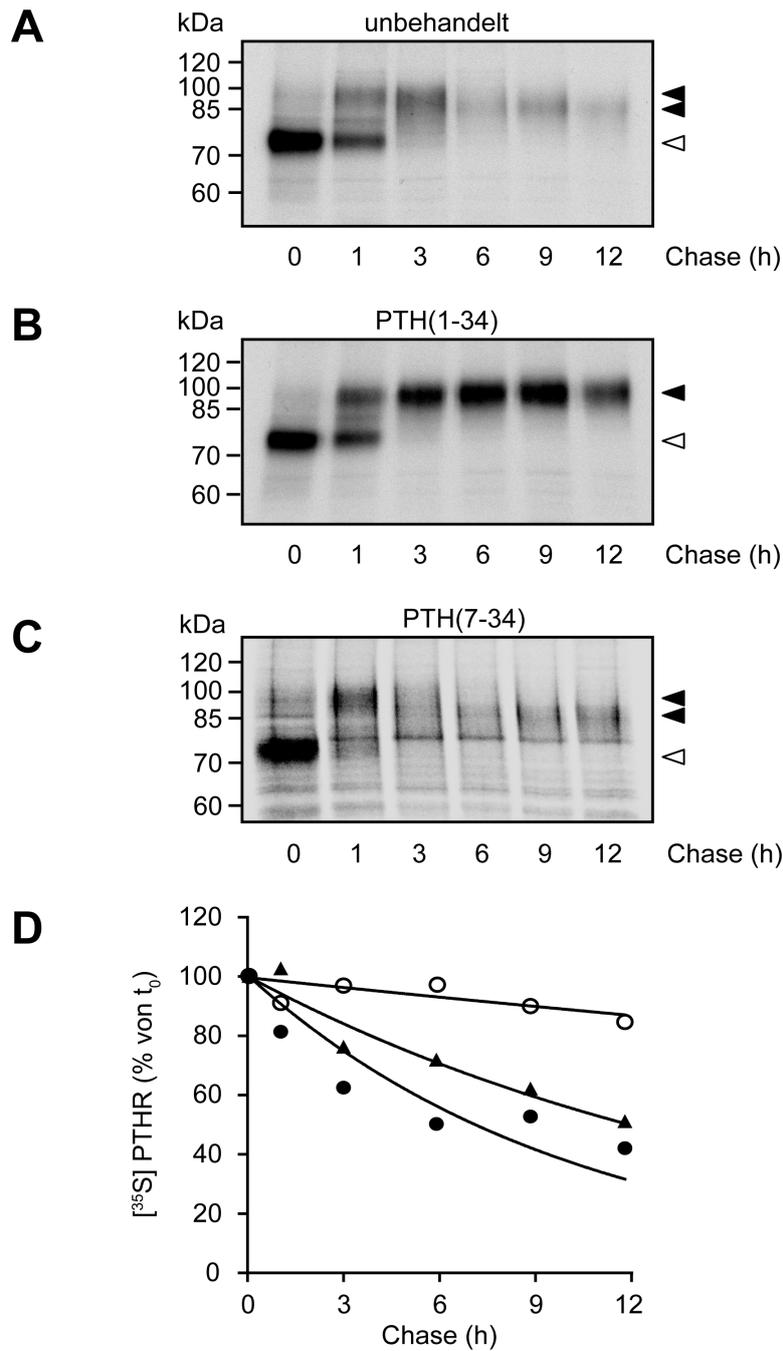


Abbildung 13 | **PTH stabilisiert die hoch-molekulare Form des PTHR.** **A-C** | CHO-HA-PTHR-Zellen wurden mit 150 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{35}S] Methionin/ Cystein für 1 h markiert (Pulse) und dann für 0-12 h in nicht-radioaktivem Medium kultiviert (Chase). Der Chase wurde ohne (A) oder unter Zugabe von 100 nM PTH(1-34) (B) oder 1 μM PTH(7-34) (C) im Medium durchgeführt. Die Zellen wurden lysiert, und der PTHR wurde mit anti-HA Agarose präzipitiert. Die Präzipitate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, getrocknet und mittels Fluorographie auf einem Phosphoimager analysiert. *Offene Pfeile* markieren den unreifen Rezeptor. *Geschlossene Pfeile* markieren die verschiedenen reifen Rezeptorformen. Molekularmassenstandards sind auf der linken Seite angegeben. **D** | Radioaktiv markierter PTHR wurde densitometrisch quantifiziert und als Prozent des Signals zum Zeitpunkt 0 nach der Pulse-Markierung dargestellt. Die Abbaukinetik wurde mit einer monoexponentialen Funktion ermittelt. Die Halbwertszeiten betragen: 12,2 h ohne PTH Behandlung, 62,0 h mit PTH(1-34) Behandlung und 7,2 h mit PTH(7-34) Behandlung während des Chase. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sind abgebildet. ▲, unbehandelt; ○, PTH(1-34); ●, PTH(7-34).

3.1.5 Der PTHR wird in der extrazellulären Domäne gespalten

Berücksichtigt man, dass posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, SUMOylierung oder Ubiquitinierung nicht für die veränderte elektrophoretische Mobilität des PTHR verantwortlich gemacht werden konnten, und dass die Masse des Rezeptors über die Zeit kontinuierlich abnahm, erscheint es möglich, dass der Rezeptor durch eine proteolytische Spaltung verändert wird. Am wahrscheinlichsten erscheinen in diesem Fall eine Spaltung im Bereich der C-terminalen intrazellulären Domäne oder der N-terminalen extrazellulären Domäne. Wie in Abbildung 8D gezeigt, konnte mit einem Antikörper, der gegen die letzten 21 Aminosäuren des PTHR C-Terminus gerichtet war, sowohl die niedrig- als auch die hochmolekulare Form des PTHR detektiert werden. Insofern erscheint eine Prozessierung im C-Terminus unwahrscheinlich. Das HA-Epitop, welches zur Detektion und Immunpräzipitation des PTHR verwendet wurde, liegt in der extrazellulären Domäne innerhalb des Exons E2 (Aa 93-101). Auch über dieses Epitop konnten beide Formen des PTHR gut detektiert werden (Abbildung 8). Insofern müsste eine potentielle Schnittstelle N-terminal des HA-Epitops gelegen sein. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde eine weitere Mutante des PTHR generiert, in die zusätzlich zu dem HA-Epitop an Position 93-101 ein Flag-Epitop direkt hinter der Signalsequenz (As 22) inseriert wurde (Abbildung 14).

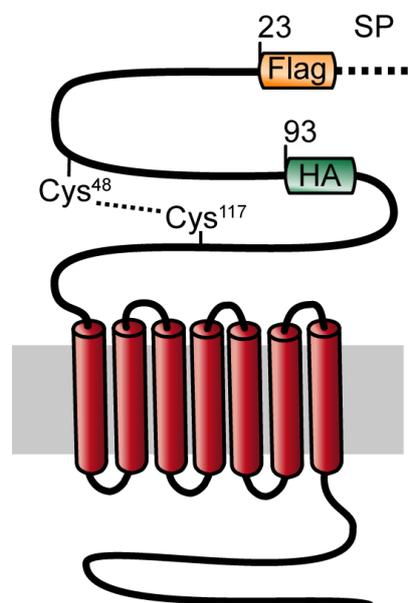


Abbildung 14 | **Darstellung des PTHR-Konstrukts mit zwei Epitop-Markierungen in der Ektodomäne.** Ein Flag-Epitop wurde unmittelbar hinter das Signalpeptid zwischen Aminosäure 22 und 23 eingefügt. Ein HA-Epitop wurde in den Bereich von Exon E2 eingefügt und ersetzte die Aminosäuren 93-101. Die Disulfidbrücke zwischen Cystein 48 und Cystein 117, die die Ektodomäne des PTHR stabilisiert, ist als gepunktete Linie dargestellt. SP: Signalpeptid (As 1-22)

Ergebnisse

Dieses Konstrukt wurde ebenfalls stabil in CHO-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden für 12 h mit PTH(1-34) behandelt und der PTHR wurde im Western-Blot mit anti-Flag- oder anti-HA-Antikörper detektiert. Wie schon in den vorherigen Versuchen war im anti-HA Blot eine Bande mit einem M_R von 90.000 in den unbehandelten Zellen und eine Bande mit einem M_R von 100.000 in den stimulierten Zellen erkennbar. Im Gegensatz dazu, detektierte der anti-Flag Antikörper nur eine einzelne Bande mit einem M_R von 100.000, die in den unstimulierten Zellen sehr schwach und in den stimulierten Zellen prominenter erschien (Abbildung 15A). Dies legt den Schluss nahe, dass in Abwesenheit von PTH der N-terminale Teil der PTHR Ektodomäne verloren geht und somit durch den Flag-Antikörper nicht mehr erkannt werden kann.

Wie eingangs beschrieben wird die Ektodomäne des PTHR durch drei Disulfidbrücken strukturiert. Eine dieser Disulfidbrücken erstreckt sich zwischen Cys48 und Cys117 [23, 24] (Abbildung 14) und verbindet somit den N-terminalen Teil zwischen den beiden Epitop-Tags mit dem Transmembranbereich des Rezeptors (vgl. Abbildung 11). Somit sollte diese Disulfidbrücke die Schnittstelle überspannen und in der Lage sein, das N-terminale Fragment unter nicht-reduzierenden Bedingungen am Rezeptor zu stabilisieren. Um dies zu untersuchen wurden erneut CHO-HA-PTHR Zellen mit und ohne PTH(1-34) behandelt. Für eine genauere Auftrennung im SDS-Gel wurden die Zellen zudem mit Tunicamycin vorbehandelt, um N-Glykosylierung zu blockieren. Zelllysate wurden in nicht-reduzierendem Laemmli-Puffer oder in Laemmli-Puffer, der 100 mM DTT als Reduktionsmittel enthielt, angefertigt, und der PTHR wurde im anti-HA-Western-Blot dargestellt. Unter reduzierenden Bedingungen wurde eine Bande bei 55 kDa in den unbehandelten Proben sowie eine Bande bei 65 kDa in den PTH-behandelten Proben detektiert, die jeweils gespaltenen und ungespaltenen Rezeptor entsprachen. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen hingegen stellte sich in beiden Proben nur eine einzelne Bande bei 65 kDa dar (Abbildung 15B). Dies erlaubt den Schluss, dass der N-Terminus des PTHR tatsächlich gespalten wird und dass das abgespaltene Fragment über eine Disulfidbrücke am Rezeptor fixiert ist.

Ergebnisse

Leupeptin [100 μM], NEM [50 mM], Pepstatin [10 μM], $\alpha 2$ -Makroglobulin [100 $\mu\text{g/ml}$]) hatten keinerlei Effekt auf die Spaltung des PTHR (Daten nicht gezeigt). Hingegen blockierten 4-8 mM 1,10 Phenanthrolin und 5-10 mM Diethyldithiocarbamat die Spaltung des PTHR. Der Effekt beider Inhibitoren war konzentrationsabhängig. Beide Substanzen gehören in die Gruppe der Metallchelatoren und hemmen Metalloproteasen, die als Kofaktor Zinkionen benötigen. Entsprechend unterdrückte die Zugabe von äquimolaren Konzentration von Zinkchlorid den Effekt der Proteaseinhibitoren (Abbildung 16).

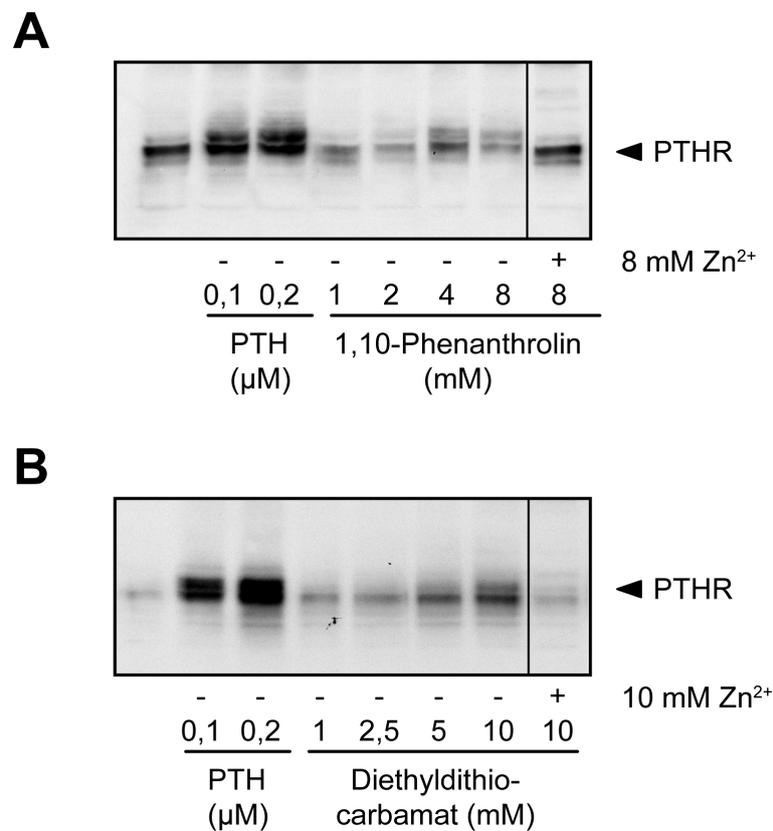


Abbildung 16 | **Hemmung der Spaltung des PTHR durch Zink-Chelatoren.** A-B | CHO-HA-PTHr-Zellen wurden für 8 h mit ansteigenden Konzentrationen von PTH(1-34), 1,10-Phenanthrolin (A) oder Diethyldithiocarbamat (B) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteinlysate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der PTHR wurde mit einem anti-HA Antikörper im Western-Blot detektiert.

Die meisten Metalloproteasen werden als inaktive Proenzyme in den extrazellulären Raum sezerniert. Neben der endogenen Aktivierung durch proteolytische Abspaltung des inhibitorischen Peptids des Proenzym, lassen sich Metalloproteasen chemisch durch Quecksilberverbindungen, wie beispielsweise P-Aminophenyl-Quecksilber-Acetat (APMA) aktivieren [152, 153]. Um zu untersuchen, ob APMA die PTH-vermittelten

Stabilisierung des PTHR durch Aktivierung zusätzlicher Proteasen unterdrücken würde, wurden CHO-HA-PTH-R-Zellen zunächst für 12 h mit PTH(1-34) vorbehandelt und anschließend für 6 h mit ansteigenden Konzentrationen von APMA inkubiert. Abbildung 17 zeigt, dass 200 μ M APMA den Effekt von PTH komplett umkehrte. Daher scheint eine Protease aus der Familie der Metalloproteasen die Spaltung des PTHR zu verursachen.

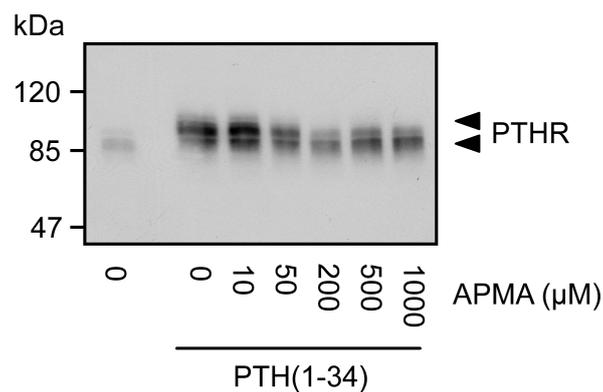


Abbildung 17 | **Aktivierung von Metalloproteasen verstärkt die Spaltung des PTHR.** CHO-HA-PTH-R Zellen wurden für 12 h mit 100 nM PTH(1-34) stimuliert. Ansteigende Konzentrationen von APMA wurde dem Medium zugefügt und die Zellen für weitere 6h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteinlysate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der PTHR wurde mit einem anti-HA Antikörper im Western-Blot detektiert. Der Molekularmassenstandard ist auf der linken Seite angegeben.

Eine genauere Bestimmung der verantwortlichen Protease erlaubte die Verwendung von spezifischeren Inhibitoren von Metalloproteasen. Um den Effekt der Inhibitoren besser ermitteln zu können, wurden die Hemmung der Spaltung des PTHR durch Pulse-Chase-Markierung ermittelt. Hierzu wurden CHO-HA-PTH-R-Zellen mit [35 S] Methionin/Cystein markiert. Der Chase von 9 h wurde unter Zugabe verschiedener Inhibitoren oder PTH(1-34) in Medium ohne radioaktive Aminosäuren durchgeführt. Fünf verschiedene Inhibitoren von Metalloproteasen wurden eingesetzt: GM6001 ist ein unselektiver Inhibitor für MMPs; MMP3-Inhibitor 2 ist selektiv für MMP3; Marimastat (BB2516) und TNF-484 sind Inhibitoren für verschiedene MMPs und TACE. Der Gewebsinhibitor der Metalloproteasen 1 (TIMP1) ist ein Glykoprotein, das von einer Reihe von Geweben als natürlicher Inhibitor von Matrixmetalloproteasen sezerniert wird. Im Anschluss wurde der Rezeptor immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE mittels Fluorographie dargestellt. Wie aus Abbildung 18 ersichtlich wird, hemmen alle synthetischen Inhibitoren die

Ergebnisse

Spaltung des PTHR mit vergleichbarer Effizienz wie PTH(1-34). Alleine TIMP1 zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf die PTHR-Spaltung.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass der PTHR durch eine Zink-abhängige Metalloprotease gespalten wird. Inhibitoren von Metalloproteasen können die Spaltung hemmen.

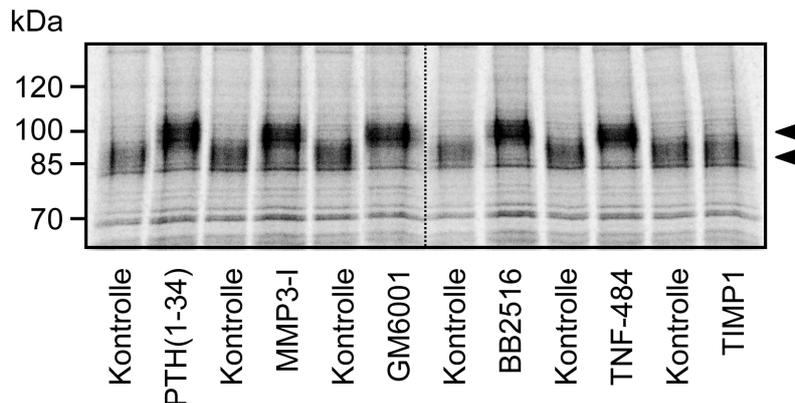


Abbildung 18 | **Hemmung der Spaltung des PTHR durch Inhibitoren von Metalloproteasen.** CHO-HA-PTH-R-Zellen wurden mit 150 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{35}S] Methionin/ Cystein für 1 h markiert (Pulse) und für 9 h in nicht-radioaktivem Medium kultiviert (Chase) unter Zugabe von 100 nM PTH(1-34), 20 μM MMP3-Inhibitor 2, 20 μM GM6001, 20 μM Marimastat (BB2516), 20 μM TNF-484 oder 40 nM TIMP1. Die Zellen wurden lysiert, und der PTHR wurde mit anti-HA-Agarose präzipitiert. Die Präzipitate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, getrocknet und mittels Fluorographie auf einem Phosphoimager analysiert. Die hohe- und die niedermolekulare Form des PTHR sind durch Pfeile gekennzeichnet. Molekularmassenstandards sind auf der linken Seite angegeben.

3.1.7 Agonisten verhindert die Spaltung des PTHR durch dessen Internalisierung

Wie aus Abbildung 8 ersichtlich wird, wurde die proteolytische Spaltung der PTHR Ektodomäne durch internalisierende Agonisten unterbunden. Der Antagonist PTH(7-34), der den Rezeptor nicht internalisierte, hatte hingegen keinen Effekt auf die Spaltung des PTHR. Dies legt zwei prinzipielle Mechanismen nahe, wie diese Liganden die Spaltung des Rezeptors beeinflussen können: Zum einen könnte die Interaktion der Protease mit dem Rezeptor durch einen Agonisten, aber nicht durch Antagonisten, sterisch behindert werden. Alternativ könnte auch die durch Agonisten hervorgerufene Internalisierung des Rezeptors diesen für extrazelluläre Proteasen nicht mehr verfügbar machen. Diese Hypothesen könnten durch eine effektive Unterdrückung der Agonisten-vermittelten Internalisierung des PTHR überprüft werden. Da diese Internalisierungshemmung für diese Experimente relative lange aufrecht erhalten

werden musste, schieden chemische Endozytosehemmer wie hochmolare Saccharose oder der Dynamin-Antagonist Dynasore aufgrund hoher Zell-Toxizität aus. Alternativ lässt sich die Clathrin-vermittelte Endozytose von Membranproteinen durch Überexpression von dominant-negativem Dynamin (Dyn^{K44A}) inhibieren [154]. Um eine ausreichend hohe Expressionsrate zu gewährleisten, wurden für diese Versuche rekombinante Adenoviren verwendet, die Gene für Wildtyp-Dynamin (Dyn^{WT}) oder Dyn^{K44A} enthielten. CHO-HA-PTH_R-Zellen wurden mit den entsprechenden Viren infiziert und 48 h nach der Infektion mit 100 nM PTH(1-34) für 30 min oder 12 h stimuliert. Zunächst wurde die zelluläre Lokalisation des PTH_R nach PTH-Stimulation durch Immunfluoreszenz bestimmt. In unstimulierten Zellen war der PTH_R in beiden Fällen an der Plasmamembran lokalisiert. Dreißig Minuten und 12 h nach Stimulation mit PTH(1-34) war der PTH_R in Dyn^{WT}-infizierten Zellen in einem Ausmass internalisiert, welches vergleichbar mit dem von nicht-infizierten Zellen war (Abbildung 19A, obere Reihe, vgl. Abbildung 7). Die Expression von Dyn^{K44A} hingegen unterdrückte die PTH(1-34)-induzierte Internalisierung des Rezeptors auch über einen Zeitraum von 12 h komplett (Abbildung 19A, untere Reihe). Um zu Überprüfen, ob durch Hemmung der Endozytose der PTH_R auch in Gegenwart von PTH(1-34) gespalten wird, wurden Dyn^{WT}- oder Dyn^{K44A}-infizierte Zellen für 30 min oder 12h mit PTH(1-34) stimuliert und die Molekülmasse des PTH_R im reduzierenden SDS-PAGE durch Western-Blot bestimmt. Während in Dyn^{WT}-infizierten Zellen die Stimulation des PTH_R über 12 h zu einer deutlichen Proteinmassenzunahme des Rezeptors führte, unterblieb dieser Effekt komplett in Dyn^{K44A}-infizierten Zellen (Abbildung 19B).

Somit erscheint die durch PTH-Agonisten verursachte Inhibition der PTH_R-Spaltung durch dessen Internalisierung erklärbar zu sein. Inhibiert man die Internalisierung wird der Rezeptor trotz Gegenwart von PTH gespalten. Dies zeigt weiter, dass die Ektodomäne von PTH_R an der Plasmamembran einer sukzessiven Spaltung durch extrazelluläre Proteasen unterliegt.

Ergebnisse

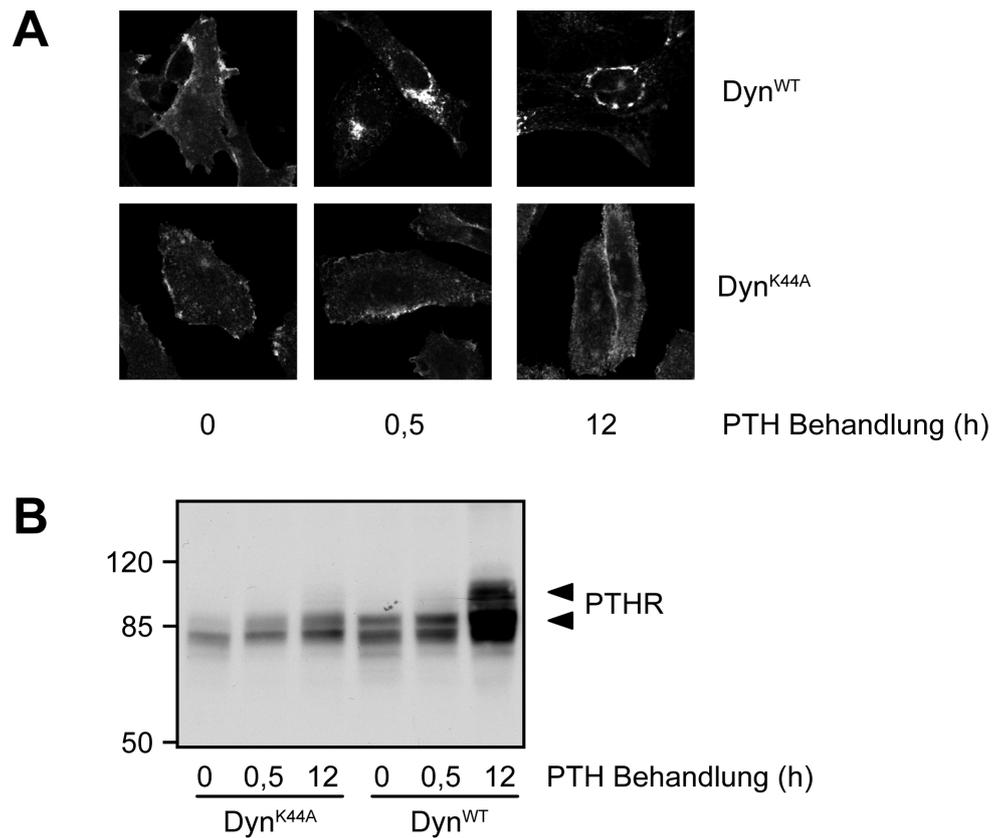


Abbildung 19 | **PTH verhindert die Spaltung des PTHR durch dessen Internalisierung.** CHO-HA-PTH_R-Zellen wurden mit Adenoviren, die Expressionsplasmide für DynaminK44A (Dyn^{K44A}) oder Wildtyp Dynamin (Dyn^{WT}) trugen, infiziert. Sechsenddreißig Stunden nach der Infektion wurden die Zellen für 0,5 oder 12 h mit 100 nM PTH(1-34) stimuliert. **A** | Die infizierten Zellen wurden lysiert, die Proteinlysate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der PTHR wurde mit einem anti-HA Antikörper im Western-Blot detektiert. **B** | Die infizierten Zellen wurden auf Deckgläschen fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen Maus anti-HA Antikörper gefolgt von einem Cy2-markiertem anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper angefärbt. Der HA-PTH_R wurde mit konfokaler Mikroskopie dargestellt. Die hohe- und die niedermolekulare Form des PTHR sind durch Pfeile gekennzeichnet. Molekularmassenstandards sind auf der linken Seite angegeben.

3.2 Interaktion des PTH-Rezeptors mit NHERF und β -Arrestin

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Charakterisierung der Interaktion des PTHR mit den Adapterproteinen NHERF1 und β -Arrestin2.

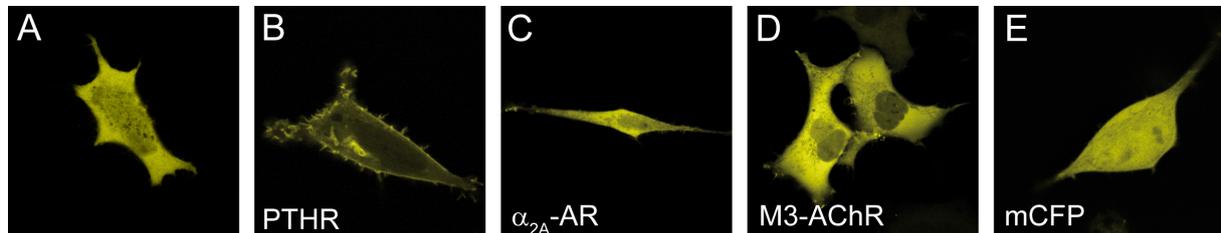


Abbildung 20 | **Der PTHR bildet einen konstitutiven Komplex mit NHERF1 an der Zellmembran.** HEK293-T Zellen wurden mit YFP-NHERF1 alleine (A) oder in Kombination mit PTHR (B), α _{2A}-Adrenozeptor (C), M3-Acetylcholinrezeptor (D) oder membrangebundenem CFP (E) transfiziert. Die zelluläre Verteilung von YFP-NHERF1 wurde mittels konfokaler Mikroskopie dargestellt.

3.2.1 NHERF1 bildet einen konstitutiven Komplex mit dem PTHR in lebenden Zellen

In einer Reihe von biochemischen Befunden wurde die Interaktion von NHERF1 mit dem C-Terminus des PTHR gezeigt, welche über die letzten 4 Aminosäuren (ETVM) des PTHR und der ersten PDZ Domäne von NHERF1 vermittelt werden. Diese Befunde resultierten hauptsächlich aus Yeast-two-Hybrid-Experimenten, Überlagerungs-Experimenten mit gereinigten Proteinen und Koimmunpräzipitation [126, 131]. Um die Relevanz dieser Interaktion in lebenden Zellen zu belegen, wurden HEK-293T Zellen mit YFP-markiertem NHERF1 (YFP-NHERF1) alleine oder in Kombination mit PTHR transfiziert. Als Kontrolle wurde NHERF1 mit α _{2A}-Adrenozeptor (α _{2A}-AR) oder dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor 3 (M3-AChR) kotransfiziert. Beide Rezeptoren enthalten keine Konsensussequenz für PDZ-Liganden in ihrem C-Terminus, und entsprechend wurde bisher keine Interaktion dieser Rezeptoren mit NHERF gefunden [155]. Die Lokalisation von NHERF1 wurde durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. In Zellen, die NHERF1 alleine exprimierten, fand sich eine gleichmäßige Verteilung des YFP-Signals in der Zelle, entsprechend einer primär zytoplasmatischen Lokalisation von NHERF1. Bei Koexpression mit dem PTHR war eine ausgeprägte Verschiebung von NHERF1 aus dem Zytoplasma an die Plasmamembran festzustellen. Da diese Translokation unabhängig von Agonisten war, lässt dies auf eine konstitutive Interaktion beider Proteine schließen. Dies entspricht den biochemischen Befunden aus

Ergebnisse

anderen Arbeiten [126]. Im Gegensatz zum PTHR führte die Expression weder von α_{2A} -AR noch von M3-AChR zu einer räumlichen Umverteilung von NHERF1 (Abbildung 20).

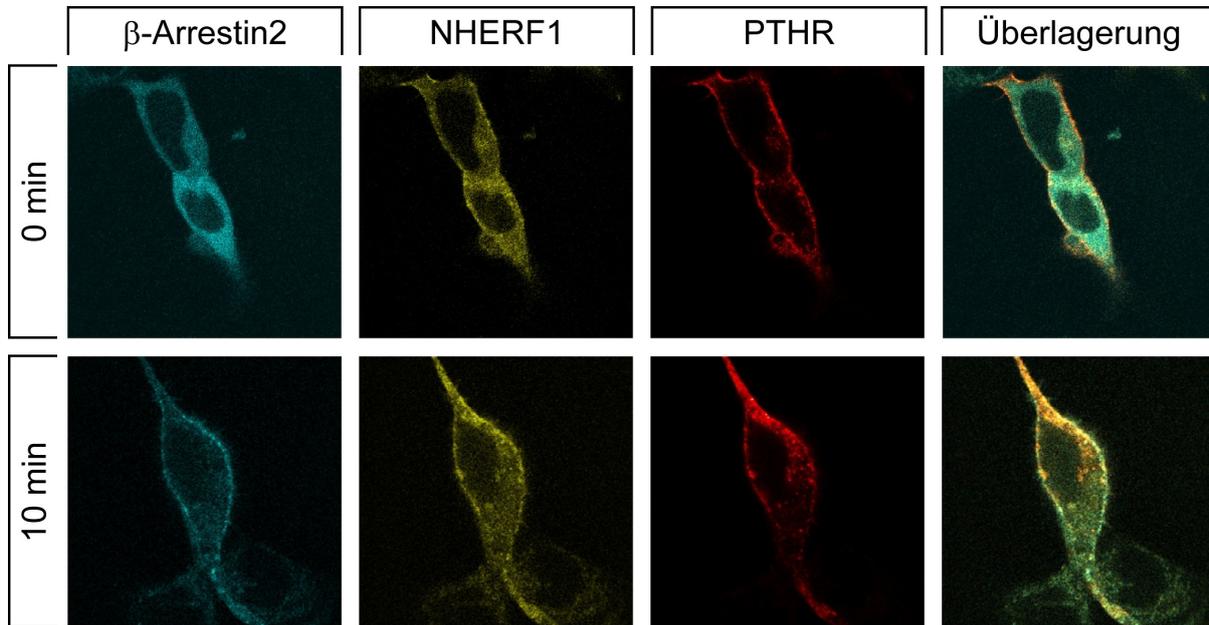


Abbildung 21 | **Simultane Interaktion von NHERF1 und β -Arrestin2 mit dem PTHR.** HEK-293T Zellen wurden mit β Arr2-CFP, NHERF1-YFP und HA-PTHR transfiziert. Der PTHR wurde mit einem Maus anti-HA Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper angefärbt. Die Zellen wurden anschließend in den angegebenen Intervallen mit 100 nM PTH(1-34) stimuliert. β -Arrestin (cyan), NHERF1 (gelb) und der PTHR (rot) wurden mittels konfokaler Mikroskopie dargestellt.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob und wie die Agonist-abhängige Translokation von β -Arrestin an den PTHR die Interaktion von NHERF1 mit dem PTHR beeinflusst. Hierzu wurden β Arr2-CFP, YFP-NHERF1 und ein HA-PTHR in HEK293-T Zellen koexprimiert. Der PTHR wurde in lebenden Zellen mittels Antikörper gegen das HA-Epitop und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern angefärbt, und alle drei exprimierten Proteine wurden mittels konfokaler Mikroskopie dargestellt. Während β -Arrestin2 in unstimulierten Zellen gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vorlag, fand sich NHERF1 als zarter Saum an der Plasmamembran in Kolokalisation mit dem PTHR. Dieser Effekt war nicht ganz so stark ausgeprägt wie in den vorherigen Experimenten, was höchstwahrscheinlich durch eine etwas stärkere Gesamtexpression von NHERF1 zu erklären war. Nach Stimulation der Zellen mit PTH(1-34) für 10 min nahm die Lokalisation an der Plasmamembran von β -Arrestin2 stark und von NHERF1 mäßig zu. In der Überlagerung fand sich entsprechend eine Kolokalisation beider Proteine mit dem PTHR (Abbildung 21).

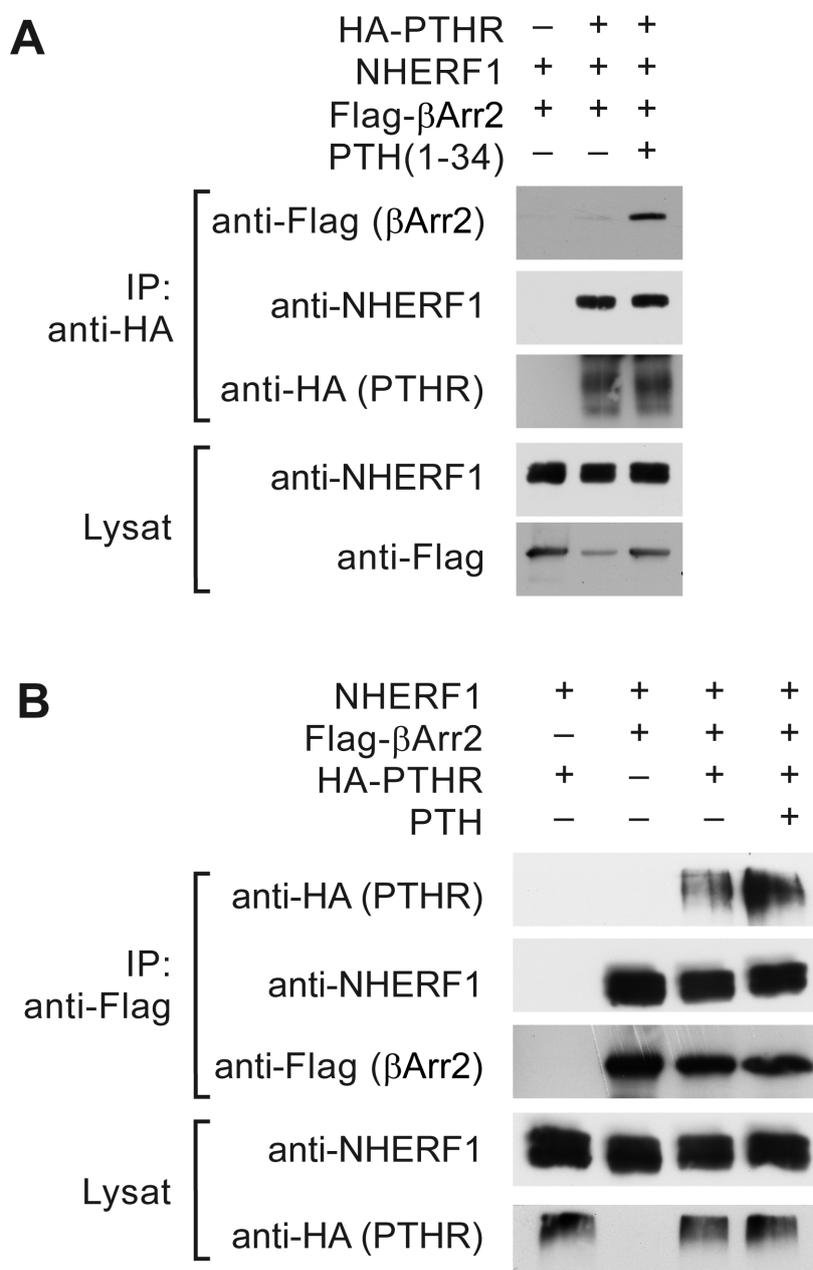


Abbildung 22 | **PTHR, NHERF1 und β -Arrestin2 bilden einen ternären Komplex.** HEK-293T Zellen wurden transient mit HA-PTHR, NHERF1 und Flag- β Arr2 transfiziert. Sechsenddreißig h nach der Transfektion wurden die Zellen für 10 min mit 100 nM PTH (1-34) stimuliert, mit DSP quervernetzt und lysiert. **A** | PTHR wurde mit anti-HA Agarose präzipitiert. **B** | β -Arrestin wurde mit anti-Flag-Agarose präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF Membranen transferiert. PTHR wurde mit einem anti-HA Antikörper, β -Arrestin2 mit einem anti-Flag-Antikörper und NHERF1 mit einem anti-NHERF1-Antikörper im Western-Blot dargestellt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Befunde zeigten, dass β -Arrestin2 und NHERF1 mit dem PTHR assoziieren. Um diese Ergebnisse biochemisch zu bestätigen, wurden HA-PTHR, Flag- β -Arrestin2 und NHERF1 in HEK-293T Zellen koexprimiert. Die Zellen wurden für 10 min mit PTH(1-34) stimuliert, und anschließend wurde der PTHR über das HA-Epitop immunopräzipitiert. NHERF1 und Flag- β -Arrestin2 wurden im Western-Blot mit anti-NHERF bzw. anti-Flag Antikörpern detektiert. In Übereinstimmung mit den mikroskopischen Befunden präzipitierte NHERF1 in gleichen Mengen zusammen mit dem PTHR, sowohl unter Basalbedingungen als auch nach Rezeptoraktivierung. Im Gegensatz dazu war β -Arrestin2 im unstimulierten Zustand kaum zu detektieren. Nach Aktivierung des PTHR hingegen nahm das immunreaktive Signal stark zu (Abbildung 22A). Wenn unter denselben Transfektionsbedingungen Flag- β -Arrestin2 aus HEK-293T Zellen mit einem anti-Flag-Antikörper präzipitiert und HA-PTHR oder NHERF1 im Western-Blot detektiert wurden, stellte sich ein ähnliches Bild da: nur geringe Mengen des PTHR konnten aus unstimulierten Zellen kopräzipitiert werden, was eine schwache Interaktion unter Basalbedingungen andeutet. Stimulierte man die Zellen mit PTH(1-34) nahm die Menge an PTHR stark zu. NHERF1 zeigte eine gleichbleibend starke Kopräzipitation mit β -Arrestin2, unabhängig von der Rezeptoraktivierung. Interessanterweise konnte NHERF1 auch aus Zellen kopräzipitiert werden, die keinen PTHR exprimierten. Dies deutet auf eine direkte Interaktion zwischen β -Arrestin2 und NHERF1 in Abhängigkeit vom PTHR hin (Abbildung 22B).

3.2.2 NHERF1 interagiert direkt mit β -Arrestin2

Die Bindung von β -Arrestin2 und NHERF1 an den PTHR wird über Teile des C-Terminus des Rezeptors vermittelt. Aufgrund der engen räumlichen Nähe, die beide interagierenden Proteine bei simultaner Bindung an den Rezeptor eingehen müssen, erscheint eine direkte Interaktion zwischen β -Arrestin2 und NHERF1 möglich. Um dies zu überprüfen wurde Flag- β -Arrestin2 zusammen mit NHERF1 in HEK-293T Zellen koexprimiert. Die Präzipitation von Flag- β -Arrestin2 mit einem Flag-Antikörper resultierte in einer starken Kopräzipitation von NHERF1 (Abbildung 23, oberer Teil). Genauso kopräzipitierte β -Arrestin2 wenn NHERF1 mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert wurde (Abbildung 23, unterer Teil). Dies zeigt, daß auch in Abwesenheit des PTHR eine direkte Interaktion zwischen NHERF1 und β -Arrestin2 stattfindet.

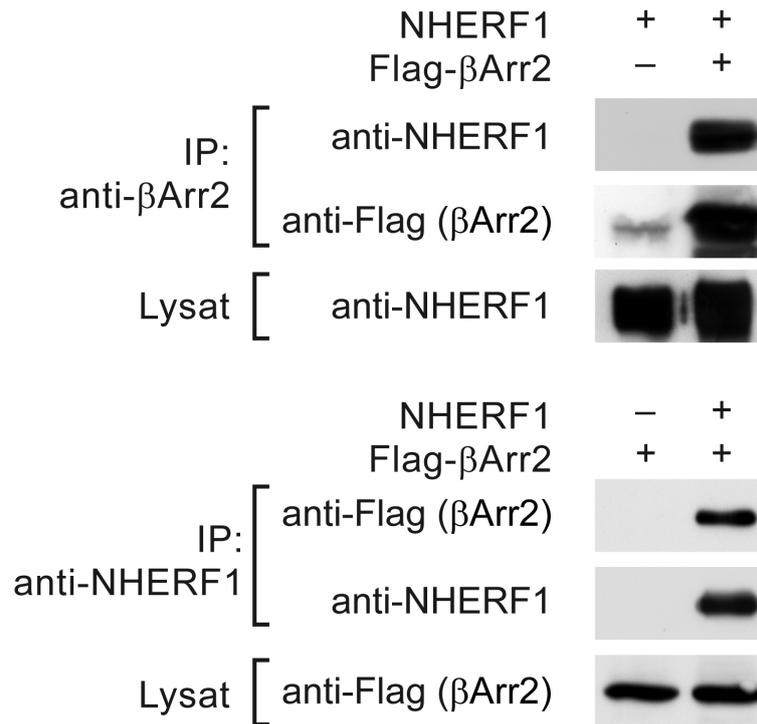


Abbildung 23 | **NHERF1 interagiert direkt mit β -Arrestin2.** HEK-293T Zellen wurden transient mit NHERF1 und Flag- β Arr2 transfiziert. Sechsenddreißig h nach der Transfektion wurden die Zellen mit DSP quervernetzt und lysiert. β -Arrestin wurde mit anti-Flag-Agarose präzipitiert (oberes Bild). β -Arrestin wurde mit anti-NHERF-Antikörper präzipitiert (unteres Bild). Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF Membranen transferiert. β -Arrestin2 wurde mit einem anti-Flag-Antikörper und NHERF1 mit einem anti-NHERF1-Antikörper im Western-Blot dargestellt.

3.2.3 PTH induziert eine Konformationsänderung im ternären Komplex

Um die Assoziation des ternären Komplexes von PTHR, β -Arrestin2 und NHERF1 weiter zu untersuchen, wurden FRET-Messungen zwischen den einzelnen Komponenten durchgeführt. Die mikroskopischen und biochemischen Ergebnisse zeigten, dass wenigstens zwischen dem PTHR und NHERF1 eine konstitutive Interaktion vorliegen könnte. Um sowohl die konstitutive als auch eine Agonist-induzierte Interaktion zu messen, wurde daher FRET durch Dequenching des Donors nach Photobleichen des Akzeptors bestimmt (vgl. Kap. 2.11.3). PTHR-CFP oder β Arr2-CFP wurden als Donor benutzt und YFP-NHERF oder β Arr2-YFP dienten als Akzeptor. Kombinationen aus jedem Donor- und jedem Akzeptorprotein wurden in HEK-293T Zellen exprimiert wie in Abbildung 24 dargestellt. Bei der Kombination von β Arr2-CFP und NHERF1-YFP wurde

Ergebnisse

zusätzlich nicht-fluoreszierender PTHR kotransfiziert, um Agonist-abhängige FRET-Änderungen zu untersuchen. Zur Ermittlung unspezifischer FRET-Paarungen wurden jeweils β Arr2-CFP gegen eCFP und PTHR-CFP gegen membran-gebundenes CFP (mCFP) ausgetauscht. Im Vergleich zu den Kontrollpaaren konnte in unstimulierten Zellen für jede Kombination der FRET-Partner eine erhöhte Emissionsintensität des Donor-Fluorophors gemessen werden (Abbildung 24, graue gegen weiße Balken). Dies weist darauf hin, dass sowohl der PTHR mit β -Arrestin2 als auch der PTHR mit NHERF1 und NHERF1 mit β -Arrestin2 konstitutive Interaktionen eingehen. Die Stimulation des PTHR mit PTH(1-34) erhöhte die F_{CFP} in allen drei Fällen, was sich entweder durch eine verstärkte Ausbildung des Komplexes oder durch eine Umordnung vorbestehender Komplexe erklären lässt.

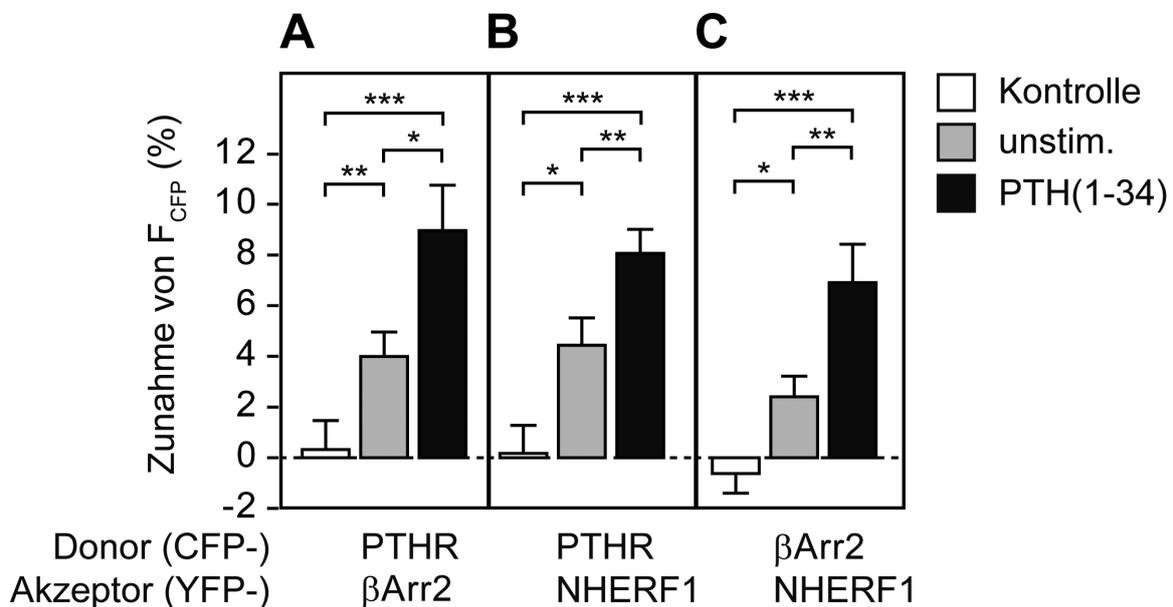


Abbildung 24 | **PTH induziert eine Konformationsänderung im ternären Komplex aus PTHR, β -Arrestin2 und NHERF1.** A-C | HEK-293T Zellen wurden wie angegeben mit den FRET-Donoren PTHR-CFP, β Arr2-CFP, und CFP oder mCFP und den FRET-Akzeptoren YFP-NHERF1 oder β Arr2-YFP transient transfiziert. In C wurde zusätzlich HA-PTHR koexprimiert. FRET zwischen den einzelnen FRET-Paaren wurde durch Donor-Dequenzen nach Akzeptor-Photobleichen in unstimulierten Zellen (graue Balken) und in Zellen, die 10 min lang mit 1 μ M PTH(1-34) (schwarze Balken) stimuliert worden waren, ermittelt. FRET wurde als relative Änderung der F_{CFP} nach 5 min Photobleichen von YFP mit 480 nm ermittelt. Die weißen Balken geben unspezifischen FRET zwischen dem jeweiligen Akzeptor und mCFP (A-B) bzw. CFP (C) an. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SE aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einer einfaktoriellem Varianzanalyse gefolgt von einem Newman-Keuls-Test ermittelt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

3.2.4 NHERF1 beschleunigt die Interaktion von β -Arrestin2 mit dem PTHR

In einem weiteren Ansatz sollte die funktionelle Relevanz des ternären Komplexes geklärt werden. Dazu wurde untersucht, ob NHERF1 die PTH-induzierte Interaktion von β -Arrestin2 mit dem PTHR beeinflusst. Hierfür wurden die Kinetiken der PTH-vermittelten Interaktion von PTHR, NHERF1 und β -Arrestin2 mittels FRET-Messungen in lebenden Zellen untersucht. Zunächst wurde die Kinetik der Interaktion von β -Arrestin2 mit dem PTHR in Ab- und Anwesenheit von NHERF1 gemessen. Für diese Messungen wurde ein CHO-Zellsystem mit Tetrazyklin-induzierbarer NHERF1 Expression (CHO-N10) verwendet. Diese Zellen enthalten zwei stabil transfizierte Plasmide. Ein Plasmid kodiert NHERF1 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und zweier tet-Operatoren. Das andere Plasmid kodiert einen Tetrazyklin-Repressor der aus dem Tet-Operon von *E.coli* abgeleitet ist. Der Repressor unterdrückt die Expression des gewünschten Gens auf dem ersten Plasmid. Nach Zugabe von Tetrazyklin wird die Bindung des Repressors vermindert, und somit lässt sich die Expression des gewünschten Gens konzentrationsabhängig regulieren (Abbildung 25).

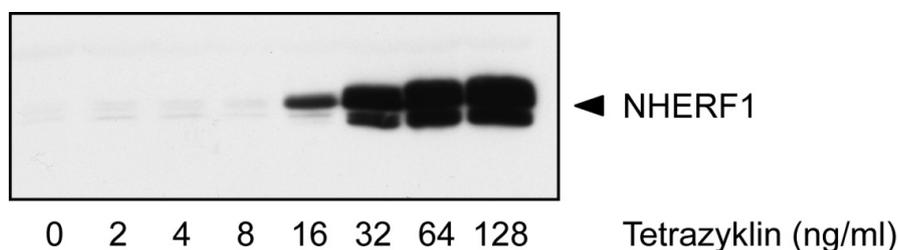


Abbildung 25 | **Induktion der NHERF1-Expression durch Tetrazyklin in CHO-N10 Zellen.** Die Expression von NHERF1 wurde in CHO-N10 Zellen 12 h lang mit den angegebenen Konzentrationen von Tetrazyklin induziert. Im Anschluß wurden die Zellen lysiert. Die Proteine wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. NHERF1 wurde im Western-Blot mit anti-NHERF1-Antikörpern detektiert.

CHO-N10 Zellen wurden transient mit PTHR-CFP und β Arr2-YFP transfiziert. Für die folgenden Messungen wurde PTH(1-14) in sättigenden Konzentrationen verwendet, da dieser Agonist im Gegensatz zu PTH(1-34) auswaschbar ist. FRET-Quotienten wurden gemessen während die Zellen kontinuierlich mit einem Mikroperfusionsapparat überspült wurden. Nach der Zugabe von PTH(1-14) nahmen die F_{CFP} ab und die F_{YFP} zu, was einer Zunahme des ratiometrischen FRET entspricht (Abbildung 26A). Die Induktion von NHERF1 resultierte in einer beschleunigten Assoziation von β -Arrestin2

Ergebnisse

an den PTHR. Das maximale FRET blieb aber gleich (Abbildung 26B, Inset). Die Regressionsanalyse beider Datensätze ergab die beste Übereinstimmung mit einer biphasischen Exponentialfunktion, wobei die schnelle Komponente eine Halbwertszeit von ca. 5 s und die langsame Komponente eine Halbwertszeit von ca. 90 s aufwies. Die Expression von NHERF1 erhöhte den Anteil der schnellen Komponente bei gleichzeitiger Verringerung des Anteils der langsamen Komponente ohne Änderung der einzelnen Halbwertszeiten (Abbildung 26C, Tabelle 2). Die maximale FRET-Amplitude blieb entsprechend in beiden Fällen gleich (Abbildung 26B, Inset; Tabelle 2). Dies zeigt, dass β -Arrestin2 mit dem PTHR mit einer biphasischen Kinetik interagiert. NHERF1 erhöht den Anteil der schnellen Komponente und führt damit insgesamt zu einer schnelleren Assoziation von β -Arrestin2 mit dem PTHR.

	ohne NHERF		mit NHERF	
	Amplitude (Δ FRET)	Halbwertszeit (s)	Amplitude (Δ FRET)	Halbwertszeit (s)
schnelle Komponente	$0,09 \pm 0,01$	4,7 (3-11)	$0,17 \pm 0,01$	4,9 (3,4-8,3)
langsame Komponente	$0,39 \pm 0,01$	89 (81-98)	$0,31 \pm 0,01$	96 (82-115)

Amplituden \pm SE

Halbwertszeiten mit 95% CI (in Klammern)

Tabelle 2 | **Einfluß von NHERF1 auf die Kinetik der β -Arrestin2-Translokation an den PTHR**

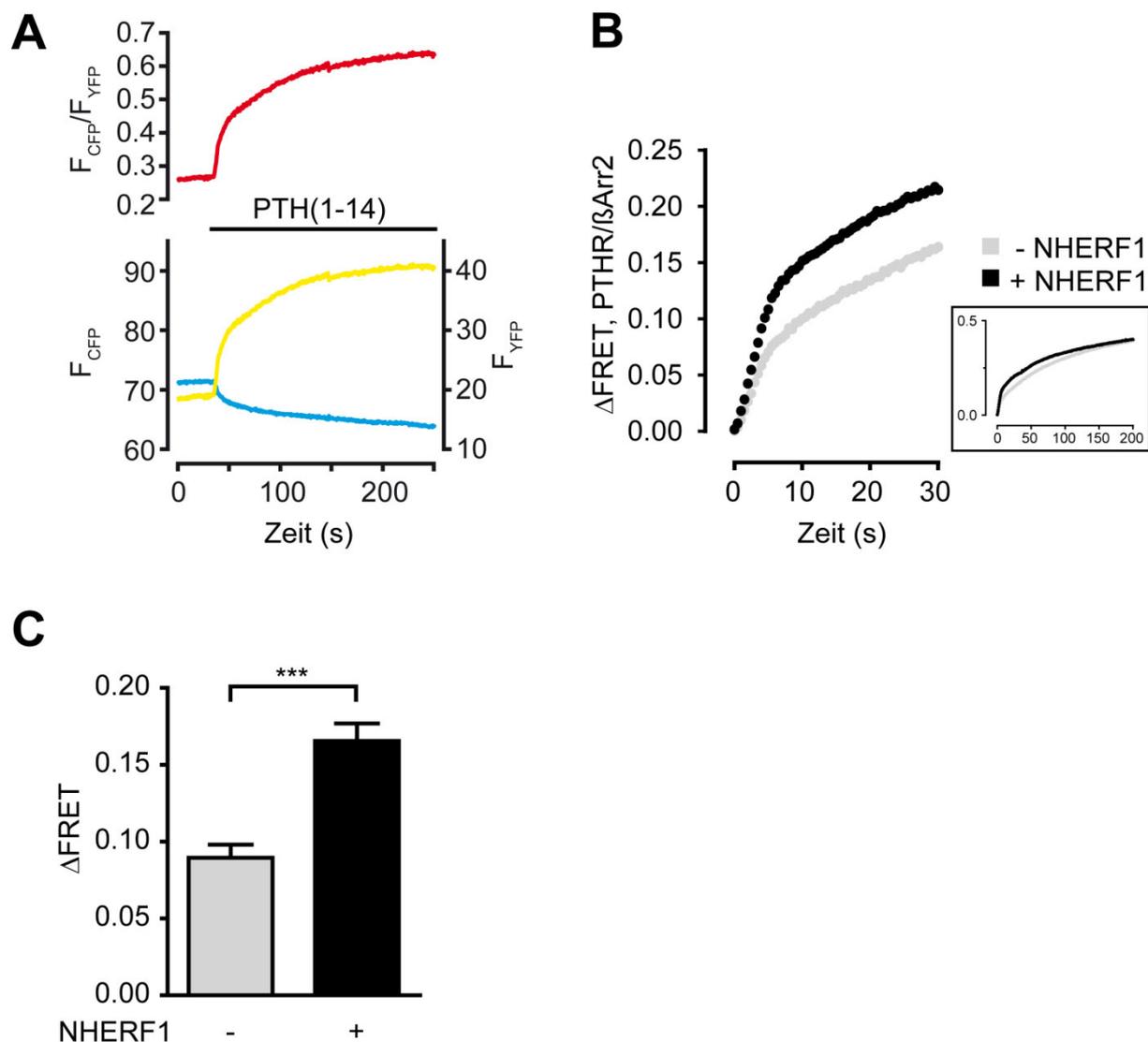


Abbildung 26 | **NHERF1 beschleunigt die Rekrutierung von β -Arrestin2 an den PTHR.** **A** | Um die Agonist-abhängige Rekrutierung von β -Arrestin2 an den PTHR zu messen, wurden auf Deckgläschen kultivierte CHO-N10 Zellen transient mit PTHR-CFP und β Arr2-YFP transfiziert. Die Zellen wurden in einer Mikroskopierkammer mit einem Mehrkanal-Superperfusionssystem mit FRET-Puffer kontinuierlich umspült. Zur Stimulation wurde FRET-Puffer mit 3 μ M PTH(1-14) verwendet (schwarzer Balken). Dargestellt wurden die Emissionen eines repräsentativen Experiments bei 480 nm (blau) und bei 535 nm (gelb) nach Anregung bei 436 nm sowie das ratiometrische FRET (rot). **B** | Zwölf Stunden vor dem Experiment wurde die Expression von NHERF1 mit 50 nM Tetrazyklin induziert. FRET wurde zwischen PTHR-CFP und β Arr2-YFP ohne NHERF1 (graue Kurve) und mit NHERF1 (schwarze Kurve) gemessen. Die Abbildung zeigt gemittelte Kurven der FRET-Änderung (F_{YFP}/F_{CFP}) von 13-14 Experimenten. In der Zusatzabbildung sind dieselben Daten auf einer erweiterten Zeitachse dargestellt, um das maximale FRET-Signal zu zeigen. **C** | Die maximale Geschwindigkeit der β -Arrestin-Rekrutierung an den PTHR wurde durch Anpassung einer biphasischen Kinetik an die Daten berechnet. Die Amplituden der schnellen Komponente sind dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (***, $p < 0,001$).

4 Diskussion

4.1 Der PTHR wird in der Ektodomäne proteolytisch gespalten

Entscheidend für den Effekt, den PTH auf den Knochenmetabolismus hat, ist die Dauer, die das Hormon auf den PTHR einwirkt. Während kontinuierliche Spiegel, wie sie physiologisch vorliegen, zu einem Abbau der Knochenmatrix und zu einer Freisetzung von Kalzium führen, haben kurze Pulse von PTH einen anabolen Effekt auf den Knochenmetabolismus. Dieser schon seit 80 Jahren bekannte Effekt wird seit einiger Zeit unter der Verwendung von rekombinantem PTH(1-34) zur Behandlung der Osteoporose eingesetzt. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zwischen beiden Effekten sind aber immer noch nicht vollständig verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der direkte Effekt langwirkenden PTHs auf den PTHR untersucht. In Zellen, die den PTHR stabil exprimierten, induzierte die Behandlung mit agonistischen PTH-Peptiden über mehrere Stunden einen Anstieg der Molekülmasse des Rezeptors sowie eine Zunahme der Proteinmenge des Rezeptors. PTH(7-34), das keine G-Proteinaktivierung hervorruft, hatte keinen Einfluss auf die PTHR-Masse und Stabilität. Der Effekt war initial am humanen PTHR festgestellt worden, der ein HA-Epitop in der Ektodomäne enthielt. Durch die Generierung eines Antiserums gegen den C-Terminus des humanen PTHR war es möglich, auch den Wild-Typ PTHR zu untersuchen, wo sich derselbe Effekt von PTH nachweisen ließ. Insofern kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der PTH-vermittelten Massenänderung des Rezeptors nicht um ein durch das HA-Epitop hervorgerufenes Phänomen handelt.

Unklar war, wie diese Massenänderung verursacht wurde. Der scheinbare Massenunterschied zwischen den beiden Rezeptorformen betrug ca. 10 kDa. Dass dies durch die simple Bindung des Liganden hervorgerufen wird, erscheint unwahrscheinlich. Bei einem Molekulargewicht von rund 4000 Da von PTH(1-34) müssten 2-3 Moleküle des Hormons an einen Rezeptor binden. Zudem spricht die langsame Kinetik des Effekts ebenfalls gegen einen direkten Ligandeneffekt.

Einige GPCRs akkumulieren während ihrer Reifung im endoplasmatischen Retikulum als unreife Rezeptorformen. Diese unvollständige Reifung der Rezeptoren liegt vermutlich an einer fehlerhaften Faltung eines Teils der Proteine nach deren Synthese. Charakteristisch für die unreifen Rezeptorformen ist ein abweichendes

Glykosilierungsmuster, das mit in einer im Vergleich zum reifen Rezeptor reduzierten Molekülmasse einhergeht. Bestimmte membranpermeable Liganden können, vermutlich über eine intrazelluläre Stabilisierung der Rezeptorkonformation, die Rezeptorreifung verbessern. Dieser sog. molekulare Chaperoneffekt wurde u.a. für den δ -Opioidrezeptor und den Vasopressin 2 Rezeptor beschrieben [145, 146]. Die naheliegende Vermutung, dass es sich bei der hier beschriebenen ligandeninduzierten Massenzunahme des PTHR ebenfalls um einen Chaperoneffekt durch PTH handeln könnte, ließ sich jedoch nicht bestätigen. Die für inkomplett glykosilierte Proteine charakteristischen Glykosilierungsmuster in Form von endständigen Endo-H sensiblen Mannoseresten ließen sich nicht für den PTHR nachweisen. Zudem war der Massenunterschied zwischen beiden Rezeptorformen auch nach vollständiger Entfernung aller Zuckerreste durch PNGase F präsent. Auch andere posttranslationale Modifikationen des Rezeptors waren nicht ursächlich für den Massenunterschied. Zwei Vertreter aus der Familie der Ubiquitin-ähnliche Proteine wurden überprüft, die eine Massenzunahme von ca. 10 kDa erklären könnten. Während eine Modifikation des Rezeptors mit SUMO1 generell nicht nachgewiesen werden konnte, kopräzipitierte Ubiquitin mit dem PTHR. Die Ubiquitinierung intrazellulärer Lysinreste spielt bei einigen GPCRs eine Rolle in der postendozytotischen Sortierung in Endosomen und dem Recycling der Rezeptoren zur Zelloberfläche [156]. Für den PTHR ist diese Modifikation zuvor noch nicht beschrieben worden. Eine Erklärung für den Massenunterschied des PTHR lieferte diese Entdeckung jedoch nicht, da es keine Agonisten-induzierte Zunahme der ubiquitinierten Rezeptorfraction gab. Im Gegenteil nahm die Ubiquitinierung nach Behandlung mit PTH eher ab (Abbildung 12). Die Bedeutung der Ubiquitinierung des PTHR erfordert daher weitere Untersuchungen.

Einen entscheidenden Hinweis für die Klärung des PTH-induzierten Massenshift am PTHR lieferte die Untersuchung der Rezeptorreifung und Rezeptorstabilität durch metabolische Markierung im Pulse-Chase Versuch. Nach der Pulse-Markierung imponierte der vollständige gereifte Rezeptor sowohl ohne als auch mit Zugabe von PTH mit einer Molekülmasse von ca. 100 kDa. Interessanterweise nahm die Molekülmasse in den nicht stimulierten oder in PTH(7-34)-stimulierten Zellen aber über die Zeit sukzessive ab, so dass sie nach 12 h nur noch ca. 90 kDa betrug. Dies entspricht der Masse, die der Rezeptor im Western-Blot unter basalen Bedingungen besitzt. Im Gegensatz dazu wurde dieser Massenverlust durch Zugabe von PTH(1-34) ins Kulturmedium während des Chase verhindert. Insofern handelt es sich bei der durch

Diskussion

PTH verursachten scheinbaren Massenzunahme offenbar vielmehr um die Stabilisierung des Rezeptors auf einer initial höheren Molekülmasse. Durch eine Verschiebung des Verhältnisses zugunsten der höhermolekularen Form entsteht im Western-Blot aus kompletten Zelllysaten der Eindruck einer Massenzunahme des Rezeptors. Die Pulse-Chase Experimente bestätigten zudem die vermutete Mengenzunahme des Rezeptorproteins durch Agonisten. Die Behandlung mit PTH(1-34) erhöhte die Gesamtstabilität des Rezeptors gemessen als $t_{1/2}$ um den Faktor 5-6.

4.1.1 Die proteolytische Spaltung der PTHR Ektodomäne

Die glykosilierungsunabhängige Abnahme der Proteinmasse lässt auf eine proteolytische Prozessierung des PTHR schließen. Es erscheint unwahrscheinlich, dass der Rezeptor innerhalb der Transmembrandomänen gespalten wird, da diese Bereiche aufgrund ihrer kompakten Struktur für eine Protease kaum zugänglich sind. Auch eine Spaltung innerhalb des C-Terminus ist unwahrscheinlich, da sowohl die hochmolekulare als auch die niedrigmolekulare Form des Rezeptors mit einem Antikörper detektiert werden konnten, der gegen die letzten 21 Aminosäure des PTHR C-Terminus gerichtet war. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich um eine Prozessierung der Ektodomäne handeln könnte. Die Verwendung einer zweifach Epitop-markierten Rezeptormutante erlaubte es, die membrannahen und distalen Bereiche der Ektodomäne des PTHR zu untersuchen. Hier zeigte sich, dass nur das am äußersten N-Terminus befindlich Flag-Epitop verloren ging, während das HA-Epitop im Bereich von Exon E2 mit den Transmembrandomänen verbunden blieb.

Der Verlust des N-terminalen Fragments war nur unter reduzierenden Bedingungen sichtbar. Dies weist darauf hin, dass eine Disulfidbrücke beide Teile des Rezeptors zusammenhält. Die extrazelluläre Domäne des PTHR wird durch drei Disulfidbrücken stabilisiert. Diese erstrecken sich zwischen Cystein 48 und 117, Cystein 131 und 170 und Cystein 108 und 148 [23, 24]. Ausgehend von den Positionen des Flag- und des HA-Epitops kann somit nur die Disulfidbrücke zwischen Cystein 48 und 117 für die Fixierung des N-terminalen Fragments in Frage kommen. Obwohl die genaue Lage der Spaltstelle nicht ermittelt werden konnte, erlaubt dies eine weitere Einschränkung der ungefähren Position. Entsprechend müsste die Spaltung zwischen den Aminosäuren 49 bis 92 erfolgen, wobei die Größe des N-terminalen Fragments von ca. 10 kDa auf einen distaleren Bereich schließen lässt. Der Abschnitt des Rezeptors, in dem die Spaltstelle vermutet wird, bildet in der Kristallstruktur der Ektodomäne eine flexible

unstrukturierte Schleife (Abbildung 3) [24]. Diese Konformation könnte insofern im Gegensatz zum sehr kompakten Rest der Ektodomäne den Angriff einer Protease begünstigen.

4.1.2 Charakterisierung der Protease

Um die für die Spaltung des PTHR verantwortliche Protease zu identifizieren, wurden mehrere Proteaseinhibitoren aus verschiedenen Klassen eingesetzt. Inhibitoren von Serin-, Aspartat- oder Cysteinproteasen zeigten keine Wirkung. Mit 1,10-Phenanthrolin und Diethyldithiocarbamat konnte hingegen die Spaltung partiell inhibiert werden. Beide Substanzen sind Chelatoren für Metallionen mit hoher Affinität für Zink und hemmen so Zink-abhängige Metalloproteasen. Entsprechend ließ sich die Wirkung von beiden Inhibitoren durch äquimolare Mengen an Zink-Ionen unterdrücken. Einen weiteren Hinweis darauf, dass eine Metalloprotease für die Spaltung des PTHR verantwortlich sein könnte, lieferte die Untersuchung mit APMA. Diese Substanz aktiviert *in vitro* und *in vivo* Metalloproteasen. Die Aktivierung der Proenzyme durch APMA führte zu einer verstärkten Spaltung der Ektodomäne des PTHR, die sich nicht mehr durch PTH verhindern ließ. Die große Familie der Zink-Endoproteasen wird in die Gruppen der Thermolysine und die Metzinkine eingeteilt. Letztere werden in weitere Untergruppen unterteilt (Abbildung 27). Bei den Astazinen handelt es sich um große oligomere Proteasen wie z.B. Meprin A und B, die Wachstumsfaktoren und Polypeptide spalten [157]. Die Serralysine sind bakterielle Proteasen, die von *Serratia*, *Erwinia* und *Pseudomonas* freigesetzt werden [158]. Adamalysine oder auch ADAMs (A Disintegrin-AND-Metalloprotease) besitzen eine Disintegrin- und eine Metalloprotease-Domäne, so dass diese Proteine sowohl Adhäsions- und Fusions- als auch proteolytische Aktivität aufweisen können [159]. Die Matrixmetalloproteasen (MMPs) sind für den regulierten Ab- und Umbau der Extrazellulärmatrix verantwortlich [160]. In der Superfamilie der Metzinkine wurde die Beteiligung der ADAMs und der MMPs an der Spaltung zellulärer Transmembranproteine gezeigt.

Eine genauere Identifizierung der für die Spaltung des PTHR verantwortlichen Protease war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die Wirksamkeit von Hydroxamat-Proteaseinhibitoren GM6001, BB2516, MMP3-Inhibitor 2 und TNF484 lässt jedoch darauf schließen, dass es sich zumindest um eine Protease aus der Gruppe der MMPs oder der ADAM Proteine handelt. Die verwendeten Inhibitoren hemmen die MMPs 1, 2 und 3 und TACE sowie einzeln die MMPs 7, 8, 9, 13 und 14. Allerdings ist aufgrund der

hohen Homologie der Metalloproteasen und der relativ hohen verwendeten Inhibitor-Konzentrationen die Hemmung weiterer Proteasen möglich. Eine genauere Zuordnung ließe sich durch die Herabregulation einzelner Proteasen mittels RNA-Interferenz oder durch die Verwendung von Zelllinien, die defizitär für die Expression einzelner Proteasen sind, bewerkstelligen. Darüber hinaus ist nicht ausgeschlossen, dass mehrere Mitglieder aus der Gruppe der Metalloproteasen die Spaltung des PTHR katalysieren können.

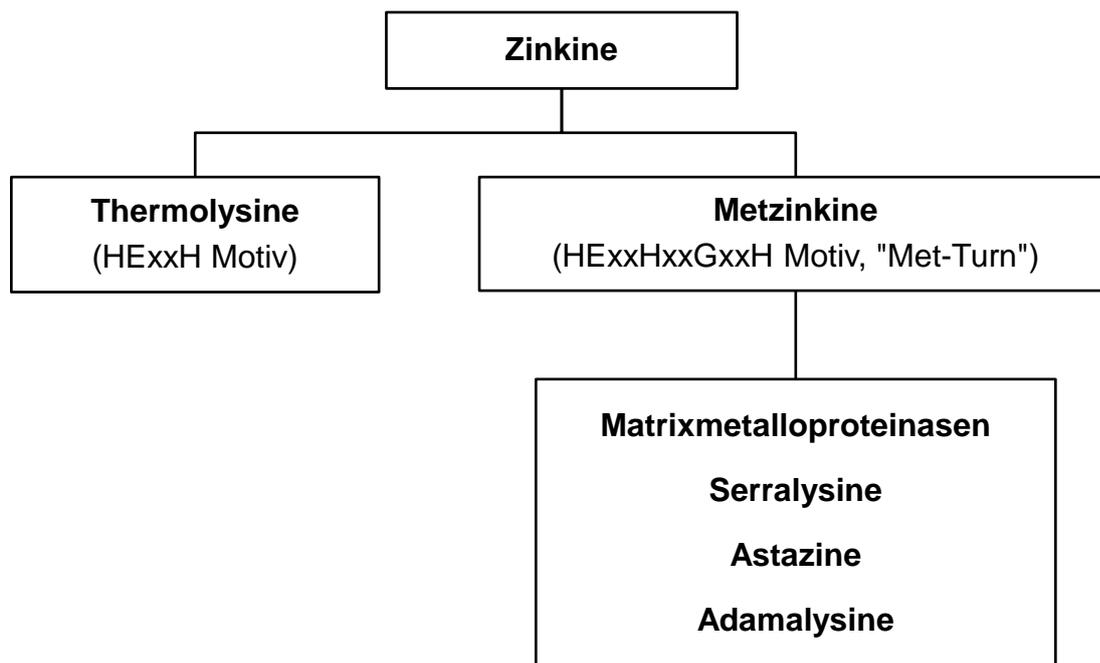


Abbildung 27 | **Einteilung der Zink-abhängigen Metalloproteasen.** Bei allen Vertretern handelt es sich um Endopeptidasen, welche ihre proteolytische Aktivität extrazellulär mit Hilfe eines im aktiven Zentrum befindlichen Zink-Ions entwickeln. Die Gruppe der Thermolysine besitzt ein gemeinsames HExxH-Motiv. Alle Enzyme aus der Gruppe der Metzinkine besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal die Aminosäuresequenz HExxHxxGxxH in der Zinkbindungsregion, sowie eine konservierte 1,4- β -Schleife, welche ein konserviertes Methionin enthält (Met-Turn) [161].

4.1.3 Gemeinsamkeiten zwischen PTHR und TSHR

Der TSHR ist ein weiterer GPCR, dessen Ektodomäne durch eine Protease gespalten wird. Dieser Rezeptor gehört zu den Glykopeptidrezeptoren den GPCRs der Gruppe 1 und besitzt große Gemeinsamkeiten mit dem Rezeptor für Luteotropin und Gonadotropin (LHCGR) und dem Follitropin-Rezeptor (FSHR). Diese Rezeptoren besitzen eine sehr große extrazelluläre Domäne und weisen eine große Ähnlichkeit der

Primärstruktur auf. Die Ausnahme bildet ein Abschnitt von 50 Aminosäuren in der Ektodomäne des TSHR, der in den beiden anderen Rezeptoren nicht vorkommt [162]. Wadsworth beschrieb zuerst, dass dieser Abschnitt des TSHR nicht für die Ligandenbindung benötigt wird [162]. In einer Reihe anderer Arbeiten wurde darauf gezeigt, dass dieser Abschnitt tatsächlich vom Rezeptor abgespalten wird, so dass der Rezeptor aus einer Transmembrandomäne (β -Untereinheit) und einer α -Untereinheit besteht. [163, 164]. Letztere vermittelt die Bindung des Hormons. Beide Untereinheiten sind über mehrere Disulfidbrücken verbunden. Die Rolle, die diese Spaltung für die Funktion und Biologie des Rezeptors spielt, ist nach wie vor unklar. Diskutiert werden u.a. der Einfluss der isolierten β -Untereinheit bei der Entstehung des Morbus Basedow, oder dass die α -Untereinheit eine konstitutive Aktivität der β -Untereinheit unterdrücken könnte [165]. Ebenfalls unklar ist, welche Protease für die Spaltung verantwortlich ist. Vermutlich handelt es sich um ein membranständiges Enzym aus der Familie der Metalloproteasen, jedoch keine Matrixmetalloproteinase oder TACE [166, 167]. Ergebnisse aus einem genetischen Screening legen nahe, dass ADAM10 für die Spaltung verantwortlich sein könnte [168].

Interessanterweise finden sich hierzu bemerkenswerte Analogien beim PTHR. Auch der PTHR besitzt eine relativ große Extrazellulärdomäne, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist. Der Vergleich der Primärsequenzen von GPCRs der Gruppe 2 zeigt, dass der Bereich von Ser61 bis Gly105 des PTHR in keinem anderen Mitglied der PTH/Sekretin/Calcitonin Rezeptor Familie zu finden ist (Abbildung 29). Dieser Abschnitt, scheint, wie oben diskutiert, die Spaltstelle im PTHR zu enthalten. Insofern besitzen beide Rezeptoren (PTHR und TSHR) sowohl was ihren molekularen Aufbau, ihre evolutionäre Stellung innerhalb der Rezeptorklasse als auch ihre posttranslationale Prozessierung angeht, große Gemeinsamkeiten.

Weshalb diese Abschnitte sowohl beim TSHR als auch beim PTHR als einzige Vertreter ihrer Gruppe erhalten geblieben ist, obwohl sie für die Funktion des Rezeptors scheinbar bedeutungslos sind, ist unklar. Die aufwendige Prozessierung dieser Bereiche in beiden Rezeptoren lässt aber darauf schließen, daß evtl. weitere bisher unbekannt Funktionen sowohl durch die Spaltung als auch durch das abgespaltene Peptid hervorgehen könnten.

4.1.4 Die biologische Bedeutung der Spaltung der PTHR-Ektodomäne

Die Spaltung der extrazellulären Domäne reduzierte die Gesamtstabilität des Rezeptorproteins. Obwohl dieser Befund aus den hier gezeigten Daten nicht ganz zu erklären ist, ist die wahrscheinlichste Möglichkeit, dass die N-terminale Domäne für die Stabilisierung und Integrität des gesamten Rezeptors wichtig ist. Eine weitere Frage stellte sich auch nach der Art und Weise, wie PTH die Spaltung verhindern kann. Eine Möglichkeit wäre eine direkte Interferenz des gebundenen Liganden mit der Angriffsstelle der Protease. Da aber auch PTH(1-14), welches nur die Transmembranregion und nicht die N-terminale Domäne des PTHR bindet, die Spaltung blockierte, erschien diese Erklärung unwahrscheinlich [169]. Vielmehr verhindert die Internalisierung des Rezeptors, welche von Agonisten hervorgerufen wird, die Spaltung, indem der Rezeptor von der Zelloberfläche entfernt wird. Alle drei PTH-Analoga, welche die Spaltung inhibierten, führten auch zu einer Internalisierung des Rezeptors. Das nicht internalisierende PTH(7-34) hatte hingegen auch keinen Einfluss auf die Rezeptorspaltung. Einen direkten Hinweis hierauf lieferte die Untersuchung der PTHR-Spaltung nach Blockade der Internalisierung durch dominant-negatives Dynamin, wo trotz Gegenwart von PTH(1-34) der Rezeptor gespalten wurde. Diese Erklärung läuft dem klassischen Konzept zuwider, dass eine prolongierte Exposition mit Agonisten langfristig zu einer Herunterregulation der Rezeptormenge führt, um überschießende Signale zu verhindern. Hier scheinen vielmehr „ungenutzte“ Rezeptoren ohne Agonistenkontakt nach einiger Zeit gespalten und sukzessive degradiert zu werden, was somit zu einer reduzierten Antwort auf PTH führen kann. Ebenfalls in diesem Kontext steht eine kürzlich erschienene Arbeit, die zeigt, dass PTH im Gegensatz zu PTHrP eine persistierende Aktivierung des cAMP-Signalwegs über den PTHR induziert. Ferrandon et al. demonstrieren hier, dass der PTHR von PTH(1-34) aktiviert wird und dann zusammen mit G_s und der Adenylylzyklase als aktiver Komplex internalisiert und somit das Signal intrazellulär aufrecht erhalten wird. PTHrP(1-36) hingegen vermochte den Rezeptor nicht zu internalisieren und führte nur zu einer transienten Aktivierung der cAMP-Signalkaskade an der Plasmamembran [170]. Ein ähnliches Phänomen wurde ebenfalls für den TSH-Rezeptor beobachtet [171]. Dies unterstreicht die Bedeutung der Signalübertragung internalisierter Rezeptoren und ist darüber ein weiterer Hinweis auf die Ähnlichkeiten der Rezeptoren für PTH und TSH in Hinblick auf ihre Prozessierung und ihre Signaleigenschaften.

Weitere Experimente sind nötig, um die biologische Bedeutung der Spaltung der PTHR Ektodomäne zu charakterisieren. Wie auch für den TSHR gilt es, aus den mehr als 40 derzeit bekannten Metalloproteasen diejenige zu ermitteln, die für diesen Effekt verantwortlich ist. Jedoch scheinen MMPs eine wichtige Rolle für die Wirkung von PTH im Knochenmetabolismus zu spielen: MMPs sind grundsätzlich für den Abbau von extrazellulärer Matrix verantwortlich. Im Knochen spielen sie eine wichtige Rolle für Resorptions- und Umbauprozesse der Knochensubstanz [172-174]. PTH reguliert die Expression von MMP2, 9 und 13. Dies scheint in erster Linie mit den Knochenresorptiven Eigenschaften von PTH in Verbindung zu stehen, da die Inhibition dieser Metalloproteasen zu einer erhöhten Knochenmasse führte [175-178]. Zudem verstärkt der Gewebsinhibitor der Metalloproteasen 1 (TIMP1) den osteogenen Effekt von intermittierend appliziertem PTH durch die Reduktion der Osteoklastenaktivität [179, 180]. Diese Arbeiten zeigen, daß PTH direkt die Expression und Wirkung von Metalloproteasen beeinflusst. Die vorliegende Arbeit demonstriert hingegen, dass auch die Wirkung von PTH am PTHR durch Metalloproteasen reguliert wird.

4.2 Die Interaktion des PTHR mit β -Arrestin2 und NHERF1

Die funktionelle Vielfalt der GPCRs macht sie zu den wichtigsten Rezeptoren in mehrzelligen Organismen. Dabei wird zunehmend klar, dass nicht nur die unterschiedlichen Rezeptortypen für die Vielzahl der vermittelten Effekte verantwortlich sind, sondern dass zusätzlich bestimmte intrazelluläre Adapterproteine die Rezeptoren beeinflussen und so zu einer weiteren Diversifizierung der Signaleigenschaften beitragen. Adapterproteine stellen die Verbindung zwischen Rezeptoren einerseits und unterschiedlichen anderen Proteinen oder Proteinkomplexen andererseits her. Dazu gehören u.a. Bestandteile des Zytoskeletts und des Endozytoseapparates sowie Enzyme und Proteine aus verschiedenen Signalakaskaden. So kommt es zu Ausbildung großer Multiproteinkomplexe, sog. Signalosome, die z.T. eine starke zelluläre Kompartimentalisierung und Zell- oder Gewebespezifität aufweisen. In diesem Zusammenhang wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Rolle der Adapterproteine β -Arrestin2 und NHERF1 am PTHR untersucht.

4.2.1 Der PTHR bildet einen ternären Komplex mit β -Arrestin2 und NHERF1

β -Arrestin2 bindet aktivierungsabhängig an den PTHR und vermittelt die Desensibilisierung und Endozytose des Rezeptors [97, 181]. NHERF1 hingegen interagiert konstitutiv mit dem Rezeptor [126] und beeinflusst sowohl dessen Signalverhalten als auch dessen Mobilität in der Zellmembran und die Endozytose. Beide Adapterproteine interagieren mit Abschnitten des intrazellulären C-Terminus des PTHR. Darüber hinaus wird die Bindung von β -Arrestin durch die aktive Konformation des Rezeptors in den intrazellulären Schleifen getriggert und durch Phosphorylierung von bis zu sechs Serinresten im C-Terminus des Rezeptors stabilisiert. Unklar war aber bisher, ob und inwieweit sich beide Adapterproteine gegenseitig beeinflussen und welche Wirkung dies auf die Interaktion mit dem PTHR hat. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass der PTHR im Gegensatz zu GPCRs, die keinen C-terminalen PDZ-Liganden besitzen, eine starke konstitutive Interaktion mit NHERF1 eingeht. Dieser Befund wird durch die Kopräzipitation von NHERF1 mit dem PTHR gestützt. In Photobleichexperimenten zwischen PTHR und NHERF1 wurde ein starkes basales FRET-Signal gemessen, was ebenfalls für eine konstitutive Interaktion spricht. Allerdings ließ sich hier im Gegensatz zu den mikroskopischen und biochemischen Untersuchungen durch Stimulation mit PTH eine Zunahme des FRET-Signals

hervorrufen. Dies lässt darauf schließen, dass - in Übereinstimmung mit vorherigen Befunden - keine nennenswerte zusätzliche Rekrutierung von NHERF1 durch den aktivierten Rezeptor stattfindet. Erklärbar wäre dieser Befund allerdings durch eine Umlagerung des schon gebundenen NHERF1 am Rezeptor, so dass auch die Fluorophore näher aneinander gelangen. β -Arrestin liegt primär zytosolisch vor und transloziert durch Aktivierung des PTHR an die Zellmembran. Die Prä-Assoziation des Rezeptors mit NHERF1 scheint diesen Vorgang nicht zu beeinträchtigen, wie aus der Kolokalisation aller drei Proteine nach Rezeptoraktivierung ersichtlich wird. Vielmehr kommt es zur Ausbildung eines Komplexes zwischen diesen Proteinen. Dabei handelt es sich aber nicht ausschließlich um die unabhängige Interaktion beider Adapterproteine jeweils mit dem PTHR. Die direkte Koimmunpräzipitation von NHERF1 und β -Arrestin2 legt eine Interaktion beider Proteine auch ohne eine gemeinsame Verbindung über den Rezeptor nahe. Diese hier neu entdeckte Wechselwirkung erlaubt offenbar die Ausbildung eines festen ternären Proteinkomplexes.

4.2.2 NHERF1 beschleunigt die Rekrutierung von β -Arrestin2 an den PTHR

Die Interaktion von β -Arrestin2 mit dem PTHR ist primär abhängig von der Rezeptoraktivierung, wohingegen NHERF1 hauptsächlich ständig gebunden am Rezeptor vorliegt. Dies legt die Vermutung nahe, dass NHERF1 die Rekrutierung von β -Arrestin beeinflussen könnte. Um dies zu überprüfen wurde die Kinetik der β -Arrestin2-Rekrutierung in Ab- und Anwesenheit von NHERF1 mit FRET bestimmt. Erstaunlicherweise fand sich eine deutliche Beschleunigung der β -Arrestininteraktion durch NHERF1. Die Assoziationskinetik von β -Arrestin konnte hierbei am besten mit einem biphasischen Modell abgebildet werden. Die Halbwertszeiten beider Phasen wurden durch NHERF1 nicht beeinflusst. Hingegen erhöhte NHERF1 den Anteil der schnellen gegenüber der langsamen Komponente, was zu einer Beschleunigung der β -Arrestinrekrutierung um den Faktor 2 führte.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass NHERF1 als ein gemeinsamer Adapter für β -Arrestin und den PTHR fungiert, was zur Ausbildung eines ternären Komplexes führt. Ohne NHERF1 liegt β -Arrestin2 hauptsächlich zytosolisch vor. Nach der Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer Translokation von β -Arrestin aus dem Zytosol an die Plasmamembran, wo es an den Rezeptor bindet. Dieser Vorgang wird durch die langsame Kinetik mit einer Halbwertszeit von ca. 90 s in dem

Diskussion

hier vorgestellten Modell widerspiegelt. In Gegenwart von NHERF1 hingegen wird ein Teil von β -Arrestin2 durch direkte Interaktion mit NHERF1 an die Membran verschoben. Durch die Aktivierung des PTHR kommt es zu einer Umlagerung innerhalb des Rezeptorkomplexes, wodurch Bindungsstellen für β -Arrestin freigelegt werden. Gleichzeitig erfolgt eine Umlagerung des NHERF1- β -Arrestin2 Komplexes am Rezeptor, so dass β -Arrestin2 aufgrund der engen räumlichen Nähe sehr schnell mit dem Rezeptor interagieren kann (Abbildung 28). Diese würde die ausgeprägte schnelle Komponente mit einer Halbwertszeit von unter 5 s erklären.

Zusammengenommen weisen diese Befunde daraufhin, dass NHERF1 über β -Arrestin auch einen Einfluss auf die Desensibilisierung des PTHR haben kann. Dies erscheint insofern interessant, da NHERF1 – im Gegensatz zum ubiquitär vorkommenden β -Arrestin – zell- und gewebsspezifisch exprimiert wird [116, 131] und könnte eine Erklärung für Zelltyp-abhängigen Unterschiede der Signaleigenschaften des PTHR bieten.

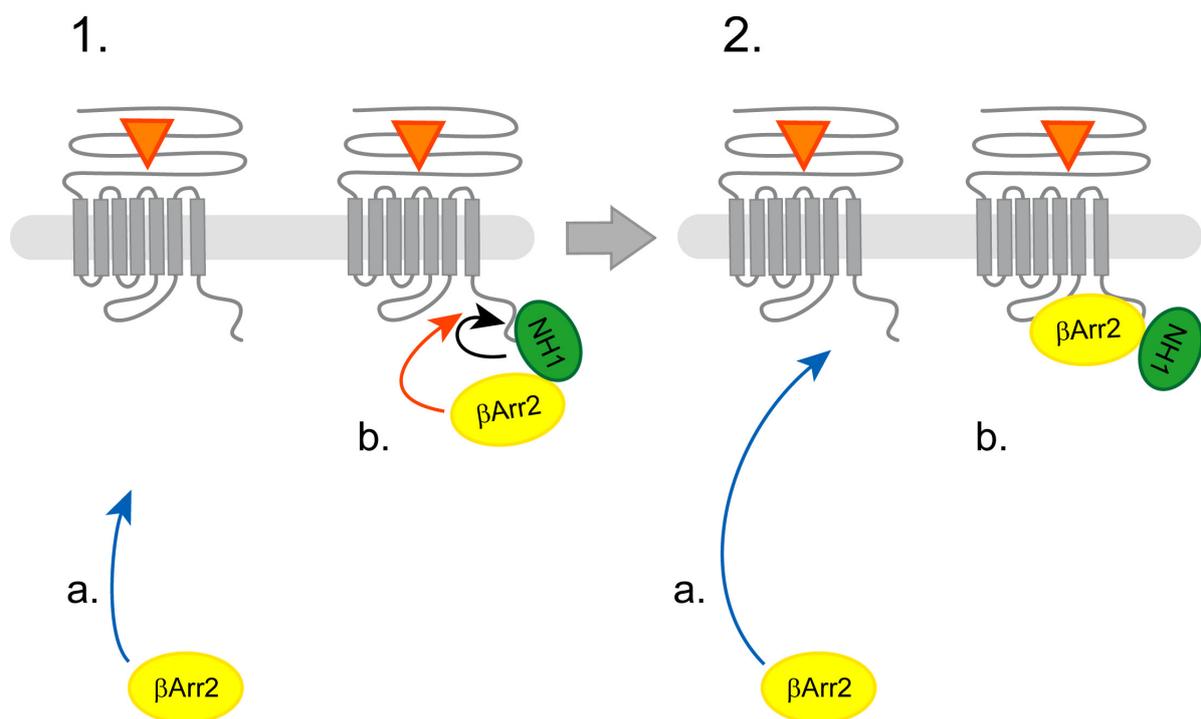


Abbildung 28 | **Modell des ternären Komplexes aus PTHR, NHERF1 und β -Arrestin2.** Nach Rezeptoraktivierung transloziert β -Arrestin2 (gelb) aus dem Zytosol an den PTHR (a, langsame Kinetik). In Gegenwart von NHERF1 (grün) liegt ein kleiner Teil des β -Arrestins am PTHR präassoziiert vor. Durch die Rezeptoraktivierung kommt es zu einer Umlagerung von NHERF1, und β -Arrestin kann rasch direkt mit dem Rezeptor interagieren (b, schnelle Komponente).

5 Zusammenfassung

Der Parathormonrezeptor Typ 1 (PTHr) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor der Gruppe 2 und wichtigster Regulator des Kalziumstoffwechsels.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine neuartige posttranslationale Modifikation des PTHr in Form einer proteolytischen Spaltung der Ektodomäne identifiziert, charakterisiert und deren Regulation beschrieben. Nach langanhaltender Stimulation des Rezeptors mit Agonisten – aber nicht mit Antagonisten – wurde eine Massen- und Mengenzunahme des Rezeptorproteins beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor unter basalen Bedingungen einer Spaltung unterliegt. Der Massenunterschied entsteht durch die proteolytische Spaltung der Ektodomäne des PTHr, was nachfolgend die Stabilität des Rezeptors beeinträchtigt. Die Spaltung erfolgte innerhalb einer unstrukturierten Schleife der Ektodomäne, welche die Bereiche für die Ligandenbindung miteinander verbindet. Hierbei handelt es sich um eine Region, die im Vergleich zu anderen Gruppe 2-Rezeptoren spezifisch für den PTHr ist. Das durch die Spaltung entstandene N-terminale Fragment bleibt durch eine Disulfidbrücke mit dem Transmembranteil des Rezeptors verbunden. Durch Versuche mit verschiedenen Proteaseinhibitoren konnte die verantwortliche Protease der Familie der zinkabhängigen extrazellulären Proteasen zugeordnet werden. Diese Ergebnisse beschreiben einen Mechanismus wie die Homöostase des PTHr reguliert sein könnte.

In einem zweiten Abschnitt wurde die Interaktion der Adapterproteine NHERF1 und β -Arrestin2 mit dem PTHr untersucht. Beide Proteine interagierten unabhängig mit dem Rezeptor, wobei NHERF1 über eine PDZ-Domäne konstitutiv an den C-Terminus des Rezeptors bindet. β -Arrestin2 hingegen bindet nach Aktivierung des Rezeptors und führt zur Desensibilisierung des Rezeptors. Mittels biochemischer und mikroskopischer Methoden konnte gezeigt werden, dass beide Proteine gemeinsam einen ternären Komplex mit dem PTHr bilden, welcher durch die direkte Interaktion zwischen NHERF1 und β -Arrestin2 vermittelt wird. Dies hat zur Folge, dass β -Arrestin im basalen Zustand durch NHERF1 an den Rezeptor gekoppelt wird. Durch Analyse der Assoziationskinetik mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Messungen zeigte sich, dass diese Kopplung zu einer zweifach erhöhten Rekrutierungsgeschwindigkeit von β -Arrestin2 an den PTHr führt. Somit stellt unterstützt NHERF1 die β -Arrestin2-vermittelte Desensibilisierung des PTHr.

Summary

The Parathyroid hormone receptor type 1 (PTHr) belongs to the class 2 of G-protein coupled receptors (GPCRs) and is the main regulator of calcium homeostasis of the body.

The first part of the dissertation describes a novel mechanism of receptor regulation based on a proteolytic cleavage of the receptor's extracellular domain. Prolonged stimulation with PTH led to an apparent increase in molecular mass and in stability of the PTHr. Biochemical analysis of the receptor protein revealed that the PTHr undergoes posttranslational cleavage. Agonistic but not antagonistic PTH-peptides prevented this cleavage, thereby stabilizing the molecular mass and also increasing the half life of the receptor. The cleavage was shown to occur within an unstructured stretch of the extracellular domain of the receptor, which connects two parts required for ligand binding and which is unique in the PTHr amongst all class 2 GPCRs. The cleaved N-terminal fragment was further connected by a disulfide bridge and could only be released by reducing agents. By testing a panel of different protease inhibitors, a protease belonging to the family of zinc-dependent metalloproteases could be identified to be responsible for the PTHr cleavage. Thus, these findings describe a new mechanism how PTHr homeostasis may be regulated.

In the second part, the interaction between the adaptor proteins NHERF1 and β -arrestin2 with the PTHr was assessed. Both proteins interacted independently with the receptor. While NHERF1 formed a constitutive interaction with the PTHr C-terminus, β -arrestin2-binding required activation of the receptor. Using biochemical and microscopic methods it was shown that both proteins formed a ternary complex with the receptor. This complex was mediated by a direct interaction between NHERF1 and β -arrestin2 which has been identified in this work. As a consequence, NHERF1 leads to a coupling of β -arrestin2 close to the PTHr. Association kinetics of β -arrestin2 with the PTHr measured by fluorescent resonance energy transfer were two-fold increased in the presence of NHERF, suggesting that the ternary complex facilitates the desensitization of the PTHr by β -arrestin2.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
95% CI	Konfidenzintervall von 95%
AC	Adenylylzyklase
ADAM	A Disintegrin-And-Metalloprotease
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFP	cyan fluorescent protein = blau fluoreszierendes Protein
Cy2	Cyanin 2
Cy3	Cyanin 3
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	double-strand DNA = Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
EBP50	Ezrin-binding-protein 50
EC ₅₀	halbmaximale effektive Wirkkonzentration
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
F _{CFP}	Fluoreszenzintensität im CFP-Kanal (bei 480 nm)
FCS	fötales Kälberserum
FRET	fluorescence resonance energy transfer
F _{YFP}	Fluoreszenzintensität im YFP-Kanal (bei 535 nm)
GDP	Guanosindiphosphat
G _{i/o}	inhibierendes G-Protein
GPCR	G-protein coupled receptor= G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosintrisphosphat (GTP)-bindendes Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
G _s	stimulierendes G-Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintrisphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
IP	Inositolphosphat
IP ₃	Inositoltrisphosphat
kb	1000 Basenpaare
kDa	1000 Dalton
KO	knock out
M3-AChR	M3 Acetylcholinrezeptor
MAGUK	membrane-associated guanylate kinase = membrangebundene Guanlyatzyklase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mCFP	Membrangebundenes CFP mit Lipidanker
min	Minute

Anhang

M_R	relative Molekülmasse
ms	Millisekunde
MW	molecular weight = Molekülmasse
Npt2a	Natrium-Protonen-Kotransporter 2a
OD	optische Dichte
PCR	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PDZ	Adapterdomäne, erstmals gefunden in den Proteinen PSD95/SAP90, Discs large und Zonula occludentes-1
PKA	Proteinkinase A (cAMP abhängige Proteinkinase)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Primer	DNA-Oligonukleotid
PTH	Parathormon
PTHR	PTH1-Rezeptor
PTHrP	Parathyroid hormone-related peptide
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit SDS
SE	standard error = Standardfehler
second messenger	sekundärer intrazellulärer Botenstoff
TACE	tumor necrosis factor- α converting enzyme
TM	Transmembrandomäne
YFP	yellow fluorescent protein = gelb fluoreszierendes Protein
TSH	Thyreotropin
TSHR	Thyreotropin-Rezeptor
α_{2A} -AR	α_{2A} adrenerger Rezeptor
β_2 AR	β_2 adrenerger Rezeptor
β Arr2	β -Arrestin2
κ OR	κ -Opioidrezeptor
w/v	Gewicht/Volumen
v/v	Volumen/Volumen
mA	Milliampere
V	Volt

6.2 Sequenzvergleiche

PTH1R		10	20	30	≈
PTH1RMGTARIAPGLALLLCCPVLSS.....				AYALVDADDVMTK
PTH2RMAGLGASLHVWGLMLGSCLLARA.....				QLDSDGTITI
CALCRMRFTFTSRCLALFLLLNHPTPILP.....				AFSNQTYPTI
CALCRLMEKKCTLNFLVLLPFFMILVTA.....				ELEESPEDSI
CRHR1MGGHPQLRLVKALLLLGLNPVSA.....				
CRHR2bMRGPGSPGLLYVPHLLLCLLCLLPPPLQYAAG.....				QSQMPK
GIPRMTTSPILQLLLRLSLCGLLLQRAET.....				GSKGQTA
GCGRMPPCQPQRPLLLLLLLACQPQVPSA.....				QVM
GLP1RMAGAPGLRLALLLLGMVGRAGP.....				RPQGATV
GLP2R	..MKLGSSRAGPGRGSAGLLPGVHELPMGIPAPWGTSPLSFHRKCSLWAPGRPFLTLVLLVSIKQVTGS				
GHRHRMDRRMWGAHVFCVLSPLPTVLG.....				HMHPEC
SCTRMRPHLSPPLOQLLLPVLLACAAHSTGA.....				LPRLC
VIPR1MRPPSPLPARWLCVLAGALAWALGPAGGQA.....				ARLQEEC
VIPR2MRTLLPALLTCWLLAPVNS.....				IHPEC
PACR1MAGVVHVSLAALLLLPMAPAMHS.....				DC

PTH1R		40	50	60	70	80	90
PTH1R	EEQ.....IFLLHRAQAQCEKRLKEVLQR						PASIMESDKGWTSASTSGKPRKDKASGKLYPESEEDKE
PTH2R	EEQ.....IVLVLKAKVQCELNITAQLQ.....						EGEGN..
CALCR	EPKPFlyVVGRKKMDAQYK.CYDRMQQLPAYQ.....						GEGP..
CALCRL	QLG.....VTRNKIMTAQYECYQKIMQDPIQQ.....						AEGV..
CRHR1SLQ..DQHCES.LSLASN.....						ISG..
CRHR2b	DQP.....LWALLEQY..CHT.IMTLTN.....						LSGPY..
GIPR	G.....ELYQRWERYRRECQETLAAAEP.....						
GCGR	D.....FLFEKWKLYGDQCHHNLSSLPPP.....						
GLP1R	SLW.....ETVQKWREYRRCQRSLTEDPPPA.....						
GLP2R	LLE.....ETTRKWAQYKQACLRLDLKEPSG.....						
GHRHR	D.....FITQLREDESACLQAAEE.....						
SCTR	D.....VLQVLWEEQDQCLQELSRQGTG.....						
VIPR1	D.....YVQMIEVQHKQCLEEAQ.....						
VIPR2RFHLEIQEEETKCAEL.....						
PACR1IFKKEQAMCLEKIQRANE.....						

1

PTH1R		100	110	120	130	140
PTH1R	APTGSRYRGRPCLPEWDHI.LCWPLGAPGEVVAVPCPDYIY..DF.....					NHK
PTH2RCFPEWDGL.ICWPRGTVCKISAVPCPPYIY..DF.....					NHK
CALCRYCNRTWDGW.LCWDDTPAGVLSYQFCPDYFP..DF.....					DPS
CALCRLYCNRTWDGW.LCWNDVAAGETSMQLCPDYFQ..DF.....					DPS
CRHR1LQCNASVDLIGTCWPRSPAGQLVVRPCPAFFYGVRY.....					NTT
CRHR2bSYCNTTLQIGTCWPRSAAGALVERPCPEYFNGVKY.....					NTT
GIPRSGLACNGSFDMY.VCWDAAPNATARASCWPYLPWHHH.....					VAA
GCGRTELVCNRTFDKY.SCWPDTPANTTANISCWPYLPWHHK.....					VQH
GLP1RTDLFCNRTFDEY.ACWPDGEPSFVNVSCPWYLPWASS.....					VPQ
GLP2RIFCNGTFDQY.VCWPHSSPG.NVSVPCPSYLPWWESE.....					ESS
GHRHR	..MPNTTLGCPATWDGL.LCWPTAGSGEWTLP.CPDDFFSHFS.....					SES
SCTR	.DLGTEQVPGCEGMWDNI.SCWPSVPCRMVEVECPFRFLRMLT.....					SRN
VIPR1	...LENETIGCSKMWDNL.TCW PATPRGQVVVLA CPLIFKLFS.....					SIQ
VIPR2	.LRSQTEKHKACSGVWDNI.TCW RPANVGETVTVP CPKVF SNFY.....					SKA
PACR1	.LMGFNDSSPGCPGMWDNI.TCW KPAHVGEMLVLS CP E LFRIFNPDQVWETETIGESDFGDSNSLDSLSDM					

2 3 4

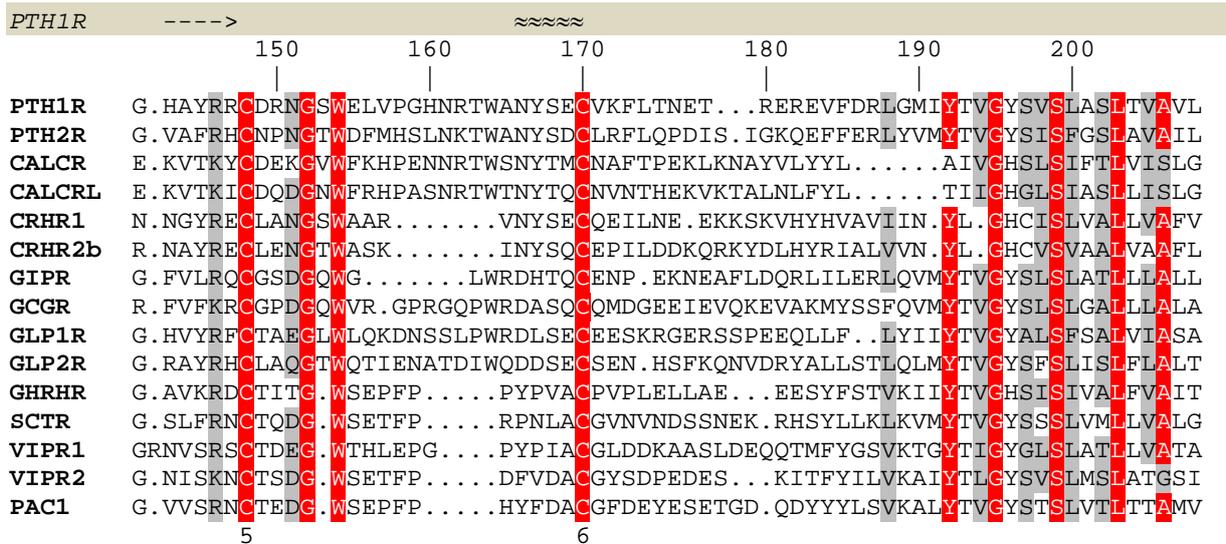


Abbildung 29 | Sequenzvergleich der Extrazellulärdomänen von Klasse II GPCRs. Die Aminosäuresequenzen von 15 Klasse B GPCRs wurden mit Clustal W zugeordnet. Sequenzkonservierung wurde mit einer PAM250 Matrix ermittelt. Identische Aminosäuren sind rot und ähnliche Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die Nummerierung in der Unterschrift bezeichnet die in Klasse B GPCRs konservierten Cysteine. Die Sekundärstruktur des PTHR ist jeweils in der ersten Zeile angegeben (-->: β -Faltblatt, \approx α -Helix). Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Sequenz des PTH1R. Der unstrukturierte Bereich der PTHR Ektodomäne ist grün hinterlegt. PTH1R, Parathormonrezeptor Typ 1; PTH2R, Parathormonrezeptor Typ 2; CALC, Kalzitoninrezeptor; CALCRL, Kalzitoninrezeptor-ähnlicher Rezeptor; CRHR1, Corticotropin-releasing Hormone 1 Rezeptor; CRHR2b, Corticotropin-releasing Hormone 2 Rezeptor (Isoform b); GIPR, Gastric inhibitory polypeptide Rezeptor; GCGR, Glukagonrezeptor; GLP1R, Glucagon-like Peptid 1 Rezeptor; GLP2R, Glucagon-like Peptid 2 Rezeptor; GHRHR, Somatoliberinrezeptor; SCTR, Sekretinrezeptor; VIPR1, Vasoaktives intestinales Peptid Rezeptor 1; VIPR2, Vasoaktives intestinales Peptid Rezeptor 2; PACR1, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide Rezeptor 1.

7 Literaturverzeichnis

1. Wess, J., *G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition*. FASEB J, 1997. **11**(5): p. 346-354.
2. Bockaert, J. and J.P. Pin, *Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success*. EMBO J, 1999. **18**(7): p. 1723-9.
3. Hermans, E., *Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors*. Pharmacol Ther, 2003. **99**(1): p. 25-44.
4. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
5. Lefkowitz, R.J., *The superfamily of heptahelical receptors*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(7): p. E133-6.
6. Strader, C.D., et al., *The family of G-protein-coupled receptors*. FASEB J, 1995. **9**(9): p. 745-754.
7. Strader, C.D., et al., *Structure and function of G protein-coupled receptors*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 101-132.
8. Gilman, A.G., *G proteins: transducers of receptor-generated signals*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 615-49.
9. Hamm, H.E., *The Many Faces of G Protein Signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**(2): p. 669-72.
10. Kolakowski, L.F., *GCRDb: a G-protein-coupled receptor database*. Receptors Channels, 1994. **2**(1): p. 1-7.
11. Wilbanks, A.M., et al., *Apparent loss-of-function mutant GPCRs revealed as constitutively desensitized receptors*. Biochemistry, 2002. **41**(40): p. 11981-9.
12. Palczewski, K., et al., *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor*. Science, 2000. **289**(5480): p. 739-45.
13. Cramer, H., et al., *Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G(alpha)q*. Eur J Biochem, 2001. **268**(20): p. 5449-59.
14. Jin, H., et al., *Palmitoylation occurs at cysteine 347 and cysteine 351 of the dopamine D(1) receptor*. Eur J Pharmacol, 1999. **386**(2-3): p. 305-12.

15. Gaudin, P., et al., *Role of cysteine residues in the N-terminal extracellular domain of the human VIP 1 receptor for ligand binding. A site-directed mutagenesis study.* Ann N Y Acad Sci, 1996. **805**: p. 585-589.
16. Lee, C., et al., *Role of the extracellular regions of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor in hormone binding.* Endocrinology, 1994. **135**(4): p. 1488-1495.
17. Jüppner, H., et al., *A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide.* Science, 1991. **254**(5034): p. 1024-1026.
18. Urena, P., et al., *Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues.* Endocrinology, 1993. **133**(2): p. 617-23.
19. Gelbert, L., et al., *Chromosomal localization of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor gene to human chromosome 3p21.1-p24.2.* J Clin Endocrinol Metab, 1994. **79**(4): p. 1046-8.
20. Kong, X.F., et al., *The rat, mouse and human genes encoding the receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide are highly homologous.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **200**(3): p. 1290-1299.
21. Shimada, M., et al., *Purification and characterization of a receptor for human parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide.* J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31774-31780.
22. Bisello, A., et al., *Role of glycosylation in expression and function of the human parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor.* Biochemistry, 1996. **35**(49): p. 15890-15895.
23. Grauschopf, U., et al., *The N-terminal fragment of human parathyroid hormone receptor 1 constitutes a hormone binding domain and reveals a distinct disulfide pattern.* Biochemistry, 2000. **39**(30): p. 8878-87.
24. Pioszak, A.A. and H.E. Xu, *Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(13): p. 5034-5039.
25. Tawfeek, H.A.W., F. Qian, and A.B. Abou-Samra, *Phosphorylation of the receptor for PTH and PTHrP is required for internalization and regulates receptor signaling.* Mol Endocrinol, 2002. **16**(1): p. 1-13.
26. Malecz, N., et al., *Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization.* Mol Endocrinol, 1998. **12**(12): p. 1846-1856.

27. Habener, J.F., et al., *Pre-parathyroid hormone; amino acid sequence, chemical synthesis, and some biological studies of the precursor region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(6): p. 2616-2620.
28. Hendy, G.N., et al., *Nucleotide sequence of cloned cDNAs encoding human preproparathyroid hormone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7365-7369.
29. Vasicek, T.J., et al., *Nucleotide sequence of the human parathyroid hormone gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(8): p. 2127-2131.
30. Rickard, D.J., et al., *Intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) as well as a non-peptide small molecule agonist of the PTH1 receptor inhibits adipocyte differentiation in human bone marrow stromal cells*. Bone, 2006. **39**(6): p. 1361-1372.
31. Martin, K.J., et al., *The peripheral metabolism of parathyroid hormone*. N Engl J Med, 1979. **301**(20): p. 1092-1098.
32. Bringhurst, F.R., et al., *Peripheral metabolism of PTH: fate of biologically active amino terminus in vivo*. Am J Physiol, 1988. **255**(6 Pt 1): p. E886-E893.
33. Hashizume, Y., et al., *Cysteine proteinases in rat parathyroid cells with special reference to their correlation with parathyroid hormone (PTH) in storage granules*. J Histochem Cytochem, 1993. **41**(2): p. 273-82.
34. Friedman, P.A., *PTH revisited*. Kidney Int Suppl, 2004(91): p. S13-S19.
35. Friedman, P.A. and W.G. Goodman, *PTH(1-84)/PTH(7-84): a balance of power*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(5): p. F975-F984.
36. Yasuda, T., et al., *Characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. Functional and evolutionary aspects*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7720-7725.
37. Lanske, B., et al., *The parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mediates actions of both ligands in murine bone*. Endocrinology, 1998. **139**(12): p. 5194-5204.
38. Pioszak, A.A., et al., *Structural basis for parathyroid hormone-related protein binding to the parathyroid hormone receptor and design of conformation-selective peptides*. J Biol Chem, 2009.
39. Weckmann, M.T., et al., *Regulation of parathyroid hormone-related protein secretion and mRNA expression in normal human keratinocytes and a squamous carcinoma cell line*. Exp Cell Res, 1997. **232**(1): p. 79-89.

40. Guise, T.A., et al., *Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis*. J Clin Invest, 1996. **98**(7): p. 1544-1549.
41. Ralston, S.H., *The pathogenesis of humoral hypercalcaemia of malignancy*. Lancet, 1987. **2**(8573): p. 1443-1446.
42. Gardella, T.J. and H. Jüppner, *Interaction of PTH and PTHrP with their receptors*. Rev Endocr Metab Disord, 2000. **1**(4): p. 317-329.
43. Vilardaga, J.-P., et al., *Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(7): p. 807-812.
44. Gardella, T.J. and H. Jüppner, *Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor*. Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(5): p. 210-217.
45. Castro, M., et al., *Turn-on switch in parathyroid hormone receptor by a two-step parathyroid hormone binding mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 16084-16089.
46. Carter, P.H., et al., *The hydrophobic residues phenylalanine 184 and leucine 187 in the type-1 parathyroid hormone (PTH) receptor functionally interact with the amino-terminal portion of PTH-(1-34)*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 31955-31960.
47. Shimizu, M., J.T. Potts, and T.J. Gardella, *Minimization of parathyroid hormone. Novel amino-terminal parathyroid hormone fragments with enhanced potency in activating the type-1 parathyroid hormone receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21836-21843.
48. Takasu, H., et al., *Amino-terminal modifications of human parathyroid hormone (PTH) selectively alter phospholipase C signaling via the type 1 PTH receptor: implications for design of signal-specific PTH ligands*. Biochemistry, 1999. **38**(41): p. 13453-13460.
49. Jouishomme, H., et al., *Further definition of the protein kinase C activation domain of the parathyroid hormone*. J Bone Miner Res, 1994. **9**(6): p. 943-9.
50. Nutt, R.F., et al., *Removal of partial agonism from parathyroid hormone (PTH)-related protein-(7-34)NH₂ by substitution of PTH amino acids at positions 10 and 11*. Endocrinology, 1990. **127**(1): p. 491-493.
51. Gether, U., *Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors*. Endocr Rev, 2000. **21**(1): p. 90-113.

52. Sheikh, S.P., et al., *Similar structures and shared switch mechanisms of the beta2-adrenoceptor and the parathyroid hormone receptor. Zn(II) bridges between helices III and VI block activation.* J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17033-17041.
53. Farrens, D.L., et al., *Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin.* Science, 1996. **274**(5288): p. 768-70.
54. Schipani, E., K. Kruse, and H. Jüppner, *A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia.* Science, 1995. **268**(5207): p. 98-100.
55. Schipani, E., et al., *Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia.* N Engl J Med, 1996. **335**(10): p. 708-714.
56. Jüppner, H., *Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient family of G protein-coupled receptors.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 1994. **3**(4): p. 371-378.
57. Goltzman, D., *Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules.* J Bone Miner Res, 1999. **14**(2): p. 173-177.
58. Offermanns, S., et al., *G alpha q family members couple parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide and calcitonin receptors to phospholipase C in COS-7 cells.* Mol Endocrinol, 1996. **10**(5): p. 566-574.
59. Pines, M., et al., *Inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca²⁺ signaling by the recombinant human PTH/PTHrP receptor stably expressed in a human kidney cell line.* Bone, 1996. **18**(4): p. 381-9.
60. Dunlay, R. and K. Hruska, *PTH receptor coupling to phospholipase C is an alternate pathway of signal transduction in bone and kidney.* Am J Physiol, 1990. **258**(2 Pt 2): p. F223-F231.
61. Mayer, G.P., J.F. Habener, and J.T. Potts, Jr., *Parathyroid hormone secretion in vivo. Demonstration of a calcium-independent nonsuppressible component of secretion.* J Clin Invest, 1976. **57**(3): p. 678-83.
62. Agus, Z.S., et al., *Effects of parathyroid hormone on renal tubular reabsorption of calcium, sodium, and phosphate.* Am J Physiol, 1973. **224**(5): p. 1143-8.
63. Greger, R., F. Lang, and H. Oberleithner, *Distal site of calcium reabsorption in the rat nephron.* Pflugers Arch, 1978. **374**(2): p. 153-7.

Literaturverzeichnis

64. Bouhtiauy, I., D. Lajeunesse, and M.G. Brunette, *The mechanism of parathyroid hormone action on calcium reabsorption by the distal tubule*. *Endocrinology*, 1991. **128**(1): p. 251-8.
65. Bacskai, B.J. and P.A. Friedman, *Activation of latent Ca²⁺ channels in renal epithelial cells by parathyroid hormone*. *Nature*, 1990. **347**(6291): p. 388-91.
66. Degroot, L. and J.L. Jameson, *Endocrinology*. 5 ed. Vol. 2. 2005: Elsevier Saunders.
67. Teitelbaum, S.L., *Bone resorption by osteoclasts*. *Science*, 2000. **289**(5484): p. 1504-8.
68. Selye, H., *On the stimulation of new bone formation with parathyroid extract and irradiated ergosterol*. *Endocrinology*, 1932. **16**(547).
69. Brommage, R., et al., *Daily treatment with human recombinant parathyroid hormone-(1-34), LY333334, for 1 year increases bone mass in ovariectomized monkeys*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(10): p. 3757-3763.
70. Dempster, D.W., et al., *Anabolic actions of parathyroid hormone on bone*. *Endocr Rev*, 1993. **14**(6): p. 690-709.
71. Frolik, C.A., et al., *Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure*. *Bone*, 2003. **33**(3): p. 372-379.
72. Horwitz, M.J., et al., *Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(2): p. 569-575.
73. Lindsay, R., et al., *Effects of a one-month treatment with PTH(1-34) on bone formation on cancellous, endocortical, and periosteal surfaces of the human ilium*. *J Bone Miner Res*, 2007. **22**(4): p. 495-502.
74. Pettway, G.J., et al., *Anabolic actions of PTH (1-34): use of a novel tissue engineering model to investigate temporal effects on bone*. *Bone*, 2005. **36**(6): p. 959-970.
75. Sone, T., et al., *A small dose of human parathyroid hormone(1-34) increased bone mass in the lumbar vertebrae in patients with senile osteoporosis*. *Miner Electrolyte Metab*, 1995. **21**(1-3): p. 232-235.
76. Neer, R.M., et al., *Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(19): p. 1434-1441.

77. Body, J.J., et al., *A randomized double-blind trial to compare the efficacy of teriparatide [recombinant human parathyroid hormone (1-34)] with alendronate in postmenopausal women with osteoporosis.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(10): p. 4528-35.
78. Wilden, U., S.W. Hall, and H. Kühn, *Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(5): p. 1174-8.
79. Lohse, M.J., et al., *beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function.* Science, 1990. **248**(4962): p. 1547-50.
80. Gurevich, V.V. and E.V. Gurevich, *The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors.* Pharmacol Ther, 2006. **110**(3): p. 465-502.
81. Lohse, M.J., *Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization.* Biochim Biophys Acta, 1993. **1179**(2): p. 171-188.
82. Lohse, M.J., et al., *Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems.* J Biol Chem, 1992. **267**(12): p. 8558-64.
83. Krupnick, J.G., V.V. Gurevich, and J.L. Benovic, *Mechanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin.* J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 18125-31.
84. Krupnick, J.G., et al., *Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus.* J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 15011-6.
85. Goodman, O.B., et al., *Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor.* Nature, 1996. **383**(6599): p. 447-450.
86. Pippig, S., S. Andexinger, and M.J. Lohse, *Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization.* Mol Pharmacol, 1995. **47**(4): p. 666-676.
87. Lefkowitz, R.J., et al., *Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization.* Adv Pharmacol, 1998. **42**: p. 416-20.
88. Hanyaloglu, A.C. and M. von Zastrow, *Regulation of GPCRs by Membrane Trafficking and Its Potential Implications.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007.

89. Oakley, R.H., et al., *Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 17201-10.
90. Gurevich, E.V. and V.V. Gurevich, *Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways*. Genome Biol, 2006. **7**(9): p. 236.
91. DeWire, S.M., et al., *Beta-arrestins and cell signaling*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 483-510.
92. Lefkowitz, R.J., K. Rajagopal, and E.J. Whalen, *New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors*. Mol Cell, 2006. **24**(5): p. 643-652.
93. Blind, E., et al., *Phosphorylation of the cytoplasmic tail of the PTH/PTHrP receptor*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(5): p. 578-586.
94. Qian, F., A. Leung, and A. Abou-Samra, *Agonist-dependent phosphorylation of the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor*. Biochemistry, 1998. **37**(18): p. 6240-6246.
95. Dicker, F., et al., *Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5476-5481.
96. Vilardaga, J.P., et al., *Differential conformational requirements for activation of G proteins and the regulatory proteins arrestin and G protein-coupled receptor kinase in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33435-33443.
97. Ferrari, S.L., et al., *Endocytosis of ligand-human parathyroid hormone receptor 1 complexes is protein kinase C-dependent and involves beta-arrestin2. Real-time monitoring by fluorescence microscopy*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 29968-29975.
98. Ferguson, S.S., et al., *Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization*. Life Sci, 1998. **62**(17-18): p. 1561-1565.
99. McDonald, P.H. and R.J. Lefkowitz, *Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions*. Cell Signal, 2001. **13**(10): p. 683-689.
100. Lefkowitz, R.J., *G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18677-80.

101. Bouxsein, M.L., et al., *beta-Arrestin2 regulates the differential response of cortical and trabecular bone to intermittent PTH in female mice*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(4): p. 635-43.
102. Ferrari, S.L., et al., *Bone response to intermittent parathyroid hormone is altered in mice null for beta-Arrestin2*. Endocrinology, 2005. **146**(4): p. 1854-62.
103. Bianchi, E.N. and S.L. Ferrari, *beta-Arrestin2 Regulates Parathyroid Hormone Effects on a P38 MAPK and NFkappaB Gene Expression Network in Osteoblasts*. Bone, 2009.
104. Tsunoda, S., J. Sierralta, and C.S. Zuker, *Specificity in signaling pathways: assembly into multimolecular signaling complexes*. Curr Opin Genet Dev, 1998. **8**(4): p. 419-22.
105. Kennedy, M.B., *Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(9): p. 350.
106. Schultz, J., et al., *SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 5857-64.
107. Schultz, J., et al., *SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 231-4.
108. Nourry, C., S.G.N. Grant, and J.-P. Borg, *PDZ domain proteins: plug and play!* Sci STKE, 2003. **2003**(179): p. RE7.
109. Kornau, H.C., et al., *Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95*. Science, 1995. **269**(5231): p. 1737-1740.
110. Jeleń, F., et al., *PDZ domains - common players in the cell signaling*. Acta Biochim Pol, 2003. **50**(4): p. 985-1017.
111. Harrison, S.C., *Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains*. Cell, 1996. **86**(3): p. 341-3.
112. Harris, B.Z. and W.A. Lim, *Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 18): p. 3219-3231.
113. Hall, R.A., et al., *The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 626-630.
114. Hegedus, T., et al., *C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(3): p. 454-61.

115. Weinman, E.J., D. Steplock, and S. Shenolikar, *CAMP-mediated inhibition of the renal brush border membrane Na⁺-H⁺ exchanger requires a dissociable phosphoprotein cofactor*. J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 1781-6.
116. Reczek, D., M. Berryman, and A. Bretscher, *Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family*. J Cell Biol, 1997. **139**(1): p. 169-179.
117. Mahon, M.J., et al., *Na⁺/H⁺ exchanger-regulatory factor 1 mediates inhibition of phosphate transport by parathyroid hormone and second messengers by acting at multiple sites in opossum kidney cells*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(11): p. 2355-2364.
118. Shenolikar, S., et al., *Targeted disruption of the mouse NHERF-1 gene promotes internalization of proximal tubule sodium-phosphate cotransporter type IIa and renal phosphate wasting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11470-5.
119. Karim, Z., et al., *NHERF1 mutations and responsiveness of renal parathyroid hormone*. N Engl J Med, 2008. **359**(11): p. 1128-1135.
120. Weinman, E.J., et al., *Parathyroid hormone inhibits renal phosphate transport by phosphorylation of serine 77 of sodium-hydrogen exchanger regulatory factor-1*. J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3412-3420.
121. Hall, R.A., et al., *G protein-coupled receptor kinase 6A phosphorylates the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger regulatory factor via a PDZ domain-mediated interaction*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24328-24334.
122. Voltz, J.W., E.J. Weinman, and S. Shenolikar, *Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation*. Oncogene, 2001. **20**(44): p. 6309-6314.
123. Cao, T.T., et al., *A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor*. Nature, 1999. **401**(6750): p. 286-290.
124. Li, J.G., C. Chen, and L.Y. Liu-Chen, *Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50/Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (EBP50/NHERF) blocks U50,488H-induced down-regulation of the human kappa opioid receptor by enhancing its recycling rate*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27545-52.
125. Hall, R.A., et al., *A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8496-8501.
126. Mahon, M.J., et al., *Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger regulatory factor 2 directs parathyroid hormone 1 receptor signalling*. Nature, 2002. **417**(6891): p. 858-861.

127. Mahon, M.J. and G.V. Segre, *Stimulation by parathyroid hormone of a NHERF-1-assembled complex consisting of the parathyroid hormone I receptor, phospholipase Cbeta, and actin increases intracellular calcium in opossum kidney cells.* J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23550-23558.
128. Sun, C. and D.F. Mierke, *Characterization of interactions of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 with the parathyroid hormone receptor and phospholipase C.* J Pept Res, 2005. **65**(3): p. 411-7.
129. Wheeler, D., et al., *NHERF-1 and the Cytoskeleton Regulate the Traffic and Membrane Dynamics of G Protein-coupled Receptors.* J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 25076-25087.
130. Wang, B., et al., *NHERF1 regulates parathyroid hormone receptor membrane retention without affecting recycling.* J Biol Chem, 2007. **282**(50): p. 36214-36222.
131. Sneddon, W.B., et al., *Activation-independent parathyroid hormone receptor internalization is regulated by NHERF1 (EBP50).* J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43787-43796.
132. Pfeiffer, M., et al., *Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization.* J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19762-72.
133. Lupp, A., et al., *Immunohistochemical Identification of the PTHR1 Parathyroid Hormone Receptor in Normal and Neoplastic Human Tissues.* Eur J Endocrinol, 2009. **in revision.**
134. Klenk, C., et al., *SUMO-1 controls the protein stability and the biological function of phosphatidylinositol 3-kinase.* J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8357-64.
135. Chen, C. and H. Okayama, *High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA.* Mol Cell Biol, 1987. **7**(8): p. 2745-52.
136. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
137. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool.* J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
138. Chenna, R., et al., *Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3497-500.
139. Shimizu, N., J. Guo, and T.J. Gardella, *Parathyroid hormone (PTH)-(1-14) and -(1-11) analogs conformationally constrained by alpha-aminoisobutyric acid mediate full agonist responses via the juxtamembrane region of the PTH-1 receptor.* J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 49003-49012.

140. Goldring, S.R., et al., *Differential effects of parathyroid hormone responsive cultured human cells on biological activity of parathyroid hormone and parathyroid hormone inhibitory analogues*. *Biochemistry*, 1985. **24**(2): p. 513-8.
141. Castro, M., et al., *Dual regulation of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling by protein kinase C and beta-arrestins*. *Endocrinology*, 2002. **143**(10): p. 3854-3865.
142. Zhou, A.T., I. Assil, and A.B. Abou-Samra, *Role of asparagine-linked oligosaccharides in the function of the rat PTH/PTHrP receptor*. *Biochemistry*, 2000. **39**(21): p. 6514-6520.
143. Parodi, A.J., *Protein glucosylation and its role in protein folding*. *Annu Rev Biochem*, 2000. **69**: p. 69-93.
144. Petäjä-Repo, U.E., et al., *Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(6): p. 4416-4423.
145. Morello, J.P., et al., *Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(7): p. 887-895.
146. Petäjä-Repo, U.E., et al., *Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation*. *EMBO J*, 2002. **21**(7): p. 1628-1637.
147. Petäjä-Repo, U.E., et al., *Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(18): p. 13727-13736.
148. Maley, F., et al., *Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases*. *Anal Biochem*, 1989. **180**(2): p. 195-204.
149. Hochstrasser, M., *Origin and function of ubiquitin-like proteins*. *Nature*, 2009. **458**(7237): p. 422-9.
150. Yeh, E.T., L. Gong, and T. Kamitani, *Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles*. *Gene*, 2000. **248**(1-2): p. 1-14.
151. Wojcikiewicz, R.J., *Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways*. *Trends Pharmacol Sci*, 2004. **25**(1): p. 35-41.

152. Galazka, G., et al., *APMA (4-aminophenylmercuric acetate) activation of stromelysin-1 involves protein interactions in addition to those with cysteine-75 in the propeptide*. *Biochemistry*, 1996. **35**(34): p. 11221-11227.
153. Santavicca, M., et al., *Characterization of structural determinants and molecular mechanisms involved in pro-stromelysin-3 activation by 4-aminophenylmercuric acetate and furin-type convertases*. *Biochem J*, 1996. **315 (Pt 3)**: p. 953-958.
154. van der Blik, A.M., et al., *Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation*. *J Cell Biol*, 1993. **122**(3): p. 553-63.
155. Weinman, E.J., et al., *The association of NHERF adaptor proteins with g protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases*. *Annu Rev Physiol*, 2006. **68**: p. 491-505.
156. Marchese, A., et al., *G Protein-Coupled Receptor Sorting to Endosomes and Lysosomes*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008. **48**: p. 601-629.
157. Bond, J.S., et al., *The structural genes, MEP1A and MEP1B, for the alpha and beta subunits of the metalloendopeptidase meprin map to human chromosomes 6p and 18q, respectively*. *Genomics*, 1995. **25**(1): p. 300-3.
158. Baumann, U., et al., *Three-dimensional structure of the alkaline protease of Pseudomonas aeruginosa: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif*. *EMBO J*, 1993. **12**(9): p. 3357-64.
159. Killar, L., et al., *Adamalysins. A family of metzincins including TNF-alpha converting enzyme (TACE)*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **878**: p. 442-52.
160. Nagase, H., *Matrix Metalloproteinases*, in *Zinc Metalloproteinases in Health and Disease*, N.M. Hooper, Editor. 1996, Taylor and Francis: London.
161. Bode, W., F.X. Gomis-Ruth, and W. Stockler, *Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'*. *FEBS Lett*, 1993. **331**(1-2): p. 134-40.
162. Wadsworth, H.L., et al., *An insertion in the human thyrotropin receptor critical for high affinity hormone binding*. *Science*, 1990. **249**(4975): p. 1423-1425.
163. Loosfelt, H., et al., *Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(9): p. 3765-3769.
164. Tanaka, K., et al., *Subunit structure of thyrotropin receptors expressed on the cell surface*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(48): p. 33979-33984.

165. Vassart, G. and S. Costagliola, *A physiological role for the posttranslational cleavage of the thyrotropin receptor?* Endocrinology, 2004. **145**(1): p. 1-3.
166. de Bernard, S., et al., *Sequential cleavage and excision of a segment of the thyrotropin receptor ectodomain.* J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 101-107.
167. Couet, J., et al., *Shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. Involvement of a matrix metalloprotease.* J Biol Chem, 1996. **271**(8): p. 4545-4552.
168. Kaczur, V., et al., *Cleavage of the human thyrotropin receptor by ADAM10 is regulated by thyrotropin.* J Mol Recognit, 2007. **20**(5): p. 392-404.
169. Luck, M.D., P.H. Carter, and T.J. Gardella, *The (1-14) fragment of parathyroid hormone (PTH) activates intact and amino-terminally truncated PTH-1 receptors.* Mol Endocrinol, 1999. **13**(5): p. 670-80.
170. Ferrandon, S., et al., *Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis.* Nat Chem Biol, 2009. **5**(10): p. 734-42.
171. Calebiro, D., et al., *Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors.* PLoS Biol, 2009. **7**(8): p. e1000172.
172. Andersen, T.L., et al., *A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells.* Bone, 2004. **35**(5): p. 1107-1119.
173. Delaissé, J.M., et al., *Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles.* Clin Chim Acta, 2000. **291**(2): p. 223-234.
174. Delaissé, J.-M., et al., *Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities.* Microsc Res Tech, 2003. **61**(6): p. 504-513.
175. Kawashima-Ohya, Y., et al., *Effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide on expressions of matrix metalloproteinase-2, -3, and -9 in growth plate chondrocyte cultures.* Endocrinology, 1998. **139**(4): p. 2120-7.
176. Luo, X.H., et al., *Parathyroid hormone inhibits the expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) in osteoblast-like MG-63 cells.* J Bone Miner Metab, 2004. **22**(1): p. 19-25.
177. Peeters-Joris, C., K. Hammani, and C.F. Singer, *Differential regulation of MMP-13 (collagenase-3) and MMP-3 (stromelysin-1) in mouse calvariae.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1405**(1-3): p. 14-28.
178. Porte, D., et al., *Both AP-1 and Cbfa1-like factors are required for the induction of interstitial collagenase by parathyroid hormone.* Oncogene, 1999. **18**(3): p. 667-78.

179. Geoffroy, V., et al., *In vivo inhibition of osteoblastic metalloproteinases leads to increased trabecular bone mass*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(5): p. 811-822.
180. Merciris, D., et al., *Over-expression of TIMP-1 in osteoblasts increases the anabolic response to PTH*. Bone, 2007. **40**(1): p. 75-83.
181. Wang, B., et al., *NHERF1 Regulates Parathyroid Hormone Receptor Desensitization; Interference with beta-arrestin Binding*. Mol Pharmacol, 2009.

8 Publikationsverzeichnis

Zeitschriftenbeiträge

Klenk, C., Vetter, T., Zürn, A., Vilardaga, J.-P., Friedman, P.A., Wang, B., Lohse, M.J. (2010). *NHERF1, β -arrestin, and the parathyroid hormone receptor form a ternary signaling complex.* in Revision (Originalarbeit).

Zürn, A., Klenk, C., Zabel, U., Reiner, S., Lohse, M.J., Hoffmann, C. (2010). *Site-specific, orthogonal labeling of proteins in intact cells with two small biarsenical fluorophores.* Bioconj Chem, in Druck (Originalarbeit).

Lupp, A., Klenk, C., Röcken, C., Evert, M., Mawrin, C., Schulz, S. (2010) *Immunohistochemical identification of the PTHR1 parathyroid hormone receptor in normal and neoplastic human tissues.* Eur J Endocrinol, in Druck (Originalarbeit).

Klenk, C., Schulz, S., Calebiro D., Lohse, M.J. (2010). *Agonist-regulated cleavage of the extracellular domain of parathyroid hormone receptor type 1.* J Biol Chem 285, 8665-74 (Originalarbeit).

Hommers, L., Klenk, C., Dees, C., Lohse, M.J., Bünemann, M. (2010). *G Proteins in Reverse Mode – Receptor-mediated GTP release inhibits G protein and effector function.* J Biol Chem 285, 8227-33 (Originalarbeit).

Lohse, M.J., Klenk, C. (2008). *Blocking them all: beta-arrestins inhibit cellular signaling.* Mol Cell 31, 619-621. (Editorial)

Klenk, C., Humrich, J., Quitterer, U., Lohse, M.J. (2006). *SUMO-1 controls the protein stability and the biological function of phosducin.* J Biol Chem 281, 8357-64 (Originalarbeit)

Konferenzbeiträge

Klenk, C., Lohse, M.J.: *Effects of longterm-acting PTH on the PTHR – Is PTH a molecular chaperone?* 49. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 10.-12. März 2008, Vortrag

Klenk, C., Lohse, M.J.: *Parathyroid hormone acts as a pharmacological chaperone on the parathyroid hormone receptor.* Experimental Biology 2008, San Diego, CA (USA), 5.-9. April 2008, Poster

Klenk, C., Vetter, T. Vilardaga, J.P., Lohse, M.J.: *NHERF1 Forms a Ternary Complex with Parathyroid Hormone Receptor 1 and β -Arrestin2.* 50. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 10-12. März 2009, Vortrag

Danksagung

Ein besonderer Dank ergeht an:

- Prof. Dr. Jörg Schultz für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.
- Prof. Dr. Martin J. Lohse für die Bereitstellung des Themas und die fachliche Betreuung dieser Arbeit.
- Michaela Hoffmann für exzellente technische Assistenz und die Aufrechterhaltung des Labors.
- Dr. Davide Calebiro für die Bereitstellung der Dynamin-Adenoviren und für die vielen sehr hilfreichen Diskussionsbeiträge.
- Allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmakologie für ihre Unterstützung zum Gelingen dieses Projekts.
- Prof. Dr. Wolfgang Garten und Dr. Olga Dolnik (Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg) für sehr hilfreiche Diskussionen zur Frage der Metalloproteasen und für die freundliche Bereitstellung verschiedener Proteaseinhibitoren.
- Prof. Dr. Thomas Gardella (Endocrine Unit, Harvard Medical School) für die freundliche Bereitstellung von PTH(1-14).
- Meiner Freundin Monika und meinen Eltern für ihre Unterstützung während dieser Arbeit.

Kooperationen

Folgende in dieser Arbeit angegebenen Ergebnisse wurden im Rahmen einer Kooperation von Dr. Thorsten Vetter (Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg) erhoben:

- Konfokale Mikroskopie zur Darstellung der Interaktion von NHERF1, β -Arrestin2 und dem PTHR
- sämtliche FRET-Messungen und Photobleich-Experimente

Die Generierung des anti-PTHr-CT Antikörpers wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Stefan Schulz (Institut für Pharmakologie, Universität Jena) durchgeführt.