

Kaweh Scheida

Dr.med.

Die Regulation des cAMP-Signalweges des Rezeptors für Parathormon

Geboren am 13.03.1972 in Heidelberg

Reifeprüfung am 07.06 1991 in Remscheid

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992 bis WS 1998

Physikum am 17.08.1994 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 28.04.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Ziegler

Der Rezeptor für Parathormon (PTH) und PTH-related Protein (PTHrP) ist der Startpunkt einer intrazellulären Signalkaskade bei der Regulation des Calcium- und Knochenstoffwechsels. Der PTH-Rezeptor überträgt sein Signal in der Zelle über zwei Signaltransduktionswege: Den Adenylatcyclase / zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) / Proteinkinase A (PK-A) Weg und den Phospholipase C / intrazelluläres Calcium / Proteinkinase C (PK-C) Weg. Der Signalweg über die Adenylatcyclase und cAMP zur PK-A unterliegt einer raschen Herunterregulation (Desensitisierung) bei anhaltender Rezeptorstimulation u.a. durch Rezeptorphosphorylierung.

Zunächst wurde der Mechanismus der Rezeptor-Desensitisierung an UMR-106 Zellen, einer gut erforschten osteoblastenähnlichen Zelllinie eines Reattenosteosarkoms, untersucht. Eine pharmakologische Hemmung der PK-A (mit H-89), nicht jedoch eine Modulation der PK-C, führte zu einem signifikanten Anstieg der ligandeninduzierten cAMP-Antwort gegenüber der Kontrolle. Dieser Anstieg war auch bei gleichzeitiger Hemmung der cAMP-abbauenden

Phosphodiesterase (PDEs) zu erkennen. Es ist anzunehmen, daß eine PK-A-Aktivierung also möglicherweise eine direkte, gegenregulatorische Herunterregulation der Signaltransduktion bewirkt.

Wir versuchten nun, diese Ergebnisse auf eine humane embryonale Nierenzelllinie (HEK-293) in welche der Opossum PTH/PTHrP-Rezeptor stabil transfiziert wurde (293-OK-WT Zellen), zu übertragen. Für diese Zelllinie sprachen ihre Robustheit, die hohe Anzahl der exprimierten PTH/PTHrP-Rezeptoren und die Möglichkeit, Rezeptormutationen z.B. zur Lokalisation von Phosphorylierungsstellen zu untersuchen.

Wie auch bei den UMR-106 Zellen reagierten die 293-OK-WT Zellen auf PTH-Stimulation und Hemmung der PK-A mit einem vermehrten Anstieg des cAMP. Eine gleichzeitige Hemmung der PDEs mit IBMX zeigte, daß ein Teil des cAMP-Anstiegs durch Hemmung der PDEs bedingt war, die PK-A-induzierte Desensibilisierung jedoch in der 293-OK-WT Zelllinie erfolgte.

Nach Expression einer Verkürzungsmutante (T3) in der HEK-Zelllinie (293-OK-T3), bei der nahezu das gesamte carboxyterminale intrazellulär gelegene Rezeptorende ab Aminosäure 474 fehlte, konnten wir bei Hemmung der PK-A und C, einen ligandeninduzierten cAMP-Anstieg, vergleichbar dem Wildtyp (WT), feststellen. Im direkten Vergleich der beiden Zelllinien zeigte sich jedoch bei den 293-OK-T3 Zellen eine signifikante Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve. Durch Hemmung der Proteinkinasen wurde dieser Unterschied aufgehoben. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die T3-Mutante aufgrund des fehlenden C-terminalen Rezeptorendes und den darin vermuteten Phosphorylierungsstellen nicht mehr phosphoryliert und damit der Rezeptor nicht mehr desensibilisiert wird. Die Hemmung der Proteinkinasen war dieser Hypothese entsprechend auch unwirksam bezüglich einer Dosis-Wirkungskurve der 293-OK-T3 Zellen. Eine Abschaltung des cAMP-Signalweges, wie sie bei UMR-106 Zellen bereits nachgewiesen wurde, lies sich in den HEK-Zellen jedoch nicht demonstrieren. Gründe hierfür könnten zum einen die hohe Rezeptorzahl der 293-OK-WT/T3 Zellen oder aber eine unvollständige Entfernung von Liganden vor einer zweiten Stimulation sein.

Bei Stimulation des Rezeptors mit hohen Dose lagen bei vielen Versuchen die cAMP-Konzentrationen unter dem cAMP-Maximum, welches bei mittleren Dosen erreicht wurde („hook“-Effekt). Wir konnten zeigen, daß dieser Effekt durch Hemmung eines inhibitorischen G-Proteins (G_i) mit Pertussistoxin aufgehoben wird. Wahrscheinlich wird bei hohen Ligandenkonzentrationen beim PTH/PTHrP-Rezeptor neben G_s auch G_i mitaktiviert und hierdurch die Adenylatcyclase (AC) und die cAMP-Bildung wieder gehemmt.

Bei Vorinkubation mit PTH über 24h konnte eine Dosisabhängige Verminderung der cAMP-Antwort bei Reexposition mit PTH in 293-OK-WT/T3 Zellen nachgewiesen werden. Ob eine Entkopplung der AC , eine Abnahme der Bindungsaffinität, eine Internalisierung der Rezeptoren oder eine Hemmung der Rezeptor-Neusynthese für diesen Effekt verantwortlich ist, konnte nicht geklärt werden.

Um die Versuchsergebnisse auf den humanen Rezeptor zu übertragen, wurde der PTH1-Rezeptor und der hiermit verwandte PTH2-Rezeptor stabil in HEK-293 Zellen exprimiert. Der PTH2-Rezeptor erkannte hierbei selektiv PTH, PTHrP aktivierte den Rezeptor jedoch erst in sehr hohen Konzentrationen. Ansonsten zeigten sich bei weiteren Versuchen im Vergleich zu den 293-OK-WT Zellen keine signifikanten Unterschiede, so daß sich die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Opossum PTH-Rezeptor auf den humanen Rezeptor übertragen lassen sollten.

Weitere Versuche mit verfeinerten Rezeptormutanten sind nötig, um die Regulation/Abschaltung der Signalwege des PTH/PTHrP-Rezeptors zu verstehen und so schließlich Ansatzstellen zu pharmakologischen Manipulationen dieser Signalwege zu ermitteln.