

Julian Bösel  
Dr. med.

## **Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für Parathormon und Calcium: Modulation der Signaltransduktion durch Proteinkinasen**

Geboren am 22.07.1971 in Lübeck  
Reifeprüfung am 07.06.1991 in Timmendorfer Strand  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1993 bis WS 2000/20001  
Physikum am 15.03.1995 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg und London  
Praktisches Jahr in Heidelberg, Guatemala-Stadt und New York City  
Staatsexamen am 07.11.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Ziegler

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für Calcium und Parathormon (PTH) / PTH-related Protein (PTHrP) sind wichtige Schaltstellen der Calcium-Homöostase. Diese Funktion üben sie primär in den in die Calcium-Homöostase involvierten Organen wie Nebenschilddrüse, Knochen, Niere oder Darm aus, ihre Gesamtverbreitung im Organismus wie auch ihr Funktionsspektrum gehen jedoch deutlich darüber hinaus.

Die vorliegende Arbeit widmete sich dem Verständnis der Regulation einer intrazellulären Signalkaskade, die von beiden Rezeptoren aktiviert wird: der Phospholipase C (PLC)-vermittelten Akkumulation des intrazellulären Botenstoffs Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) mit nachfolgender Aktivierung von Proteinkinasen (PKs) und anderen Zellenzymen. Den Schwerpunkt der Untersuchung bildete das Phänomen der raschen Desensibilisierung, und hier insbesondere die Rezeptorphosphorylierung, vermittelt durch Proteinkinasen. Hierzu wurden der humane Calcium-Sensor und der Opossum-PTH/PTHrP-Rezeptor jeweils in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) exprimiert und ihre Signaltransduktion untersucht.

Beide G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren die Signalkaskade aus Phospholipase C (PLC) / Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) / Proteinkinase C (PKC). Darüberhinaus aktiviert der PTH/PTHrP-Rezeptor auch die Signalkaskade aus Adenylatzyklase (AC) / zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) / Proteinkinase A (PKA), die vom Calcium-Sensor vermutlich gehemmt wird. Für beide Rezeptoren wurde in dieser Arbeit durch selektive pharmakologische Hemmung von Proteinkinasen eindrücklich gezeigt, daß die Aktivierung der Proteinkinasen A und C die ligandeninduzierte Akkumulation von Inositolphosphaten hemmen. Der wahrscheinliche Mechanismus ist eine Rezeptorphosphorylierung, die das Ankoppeln des Rezeptors an seine intrazelluläre Signalkaskade im Sinne eines negativen "Feedback" hemmt, als eine Form von rascher Rezeptordesensibilisierung. PKC scheint dabei eine größere Rolle als PKA zu spielen, beim Calcium-Sensor war PKAs Hemmeffekt nur leicht signifikant. Gleichzeitige Blockade beider Proteinkinasen führte sowohl beim Calcium-Sensor als auch beim PTH/PTHrP-Rezeptor zu einer noch stärkeren IP-Signalsteigerung, die die Summe der Einzelblockade-Effekte übertraf. Dies deutet auf eine synergistische "Feedback"-Hemmung des stimulierten Rezeptors durch PKC und PKA hin, wobei sich Phosphorylierungsstellen der beiden Proteinkinasen vermutlich überschneiden.

In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, daß die ebenfalls PLC/IP<sub>3</sub>-aktivierte Calcium-Calmodulin-Kinase (CAMK) für die Regulation des PLC/IP<sub>3</sub>-Signalwegs im gewählten

Zellsystem keine Rolle spielt. Für den PTH/PTHrP-Rezeptor wurde außerdem untersucht, ob eine der  $\beta$ -adrenergen Rezeptorkinase entsprechende G-Protein-Rezeptor-gekoppelte Kinase (GRK) in die Desensibilisierung involviert ist. Hinweise dafür fanden sich aber nicht.

Im Falle des PTH/PTHrP-Rezeptors wurden die Angriffstellen der Proteinkinasen näher eingegrenzt. Durch Einsatz von Rezeptormutanten wie einer an Aminosäure 474 verkürzten und einer an Serin 485 punktmultierten Mutante konnte indirekt gezeigt werden, dass sich die PKA- und PKC-vermittelte Rezeptorphosphorylierung und Hemmung des PLC/IP<sub>3</sub>-Signalwegs wahrscheinlich primär am C-terminalen intrazellulären Rezeptorteil abspielt. Ein bedeutender Anteil dieser Phosphorylierung findet PKA-vermittelt an Serin 485 statt.

Am PTH/PTHrP-Rezeptor wurde außerdem die Bedeutung der ligandenstimulierten Phosphorylierung für die Desensibilisierung durch Rezeptorendozytose untersucht. Durch Proteinkinase-Hemmung konnte die Internalisierung leicht reduziert werden. Eine phosphorylierungsdefiziente Verkürzungsmutante zeigte ein geringeres Internalisierungsverhalten als der Wildtyp-Rezeptor, wobei unklar bleibt, ob dies an fehlenden Phosphorylierungsstellen oder an fehlenden Ankopplungsstellen für den Endozytose-Apparat liegt. Es ist anzunehmen, dass die Rezeptorinternalisierung des PTH/PTHrP-Rezeptors in HEK293-Zellen weitgehend unabhängig von Rezeptor-Phosphorylierung stattfindet.

Mutanten des Calcium-Sensors und PTH/PTHrP-Rezeptors mit selektiver Ausschaltung von potentiellen Proteinkinase-Angriffsstellen sollten bald ermöglichen, die Bedeutung der Rezeptorphosphorylierung für die intrazelluläre Signaltransduktion endgültig aufzuklären. Ein besseres Verständnis der Desensibilisierungsmuster beider Rezeptoren könnte einen wichtigen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung von Erkrankungen des Knochenstoffwechsels haben: Beim Calcium-Sensor für die Entwicklung und den Applikationsmodus von Calcimimetika und potentiellen Calcium-Sensor-Antagonisten sowie von osteoblastenstimulierenden Kationen wie Aluminium, beim PTH/PTHrP-Rezeptor v.a. für die Therapie der Osteoporose durch intermittierende PTH-Gabe, sowie durch Einsatz neuer knochenanaboler PTH/PTHrP-Analoga zur knochenbildungsfördernden Beeinflussung von Rezeptorsignalwegen.