

**Charakterisierung von
Somatostatinrezeptor-Subtyp 4
interagierenden Proteinen
in der Ratte (*Rattus norvegicus*)**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Marcus Christenn
aus Schillingsfürst

Würzburg 2005

Eingereicht am:.....

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:.....

2. Prüfer:.....

3. Prüfer:.....

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

meinen Eltern und Geschwistern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von Juli 1999 bis März 2005 im
Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie
der Universität Hamburg unter Anleitung
von Prof. Dietmar Richter angefertigt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dietmar Richter danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit am Institut für Zellbiochemie und klinischen Neurobiologie der Universität Hamburg, vor allem nach dem Weggang meines ersten Betreuers.

Ein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Hildburg Beier (Institut für Biochemie, Würzburg) für ihre Bereitschaft, meine Arbeit gegenüber der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Würzburg zu vertreten.

Für die Begutachtung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Dietmar Richter und Frau Prof. Dr. Hildburg Beier.

Für die qualifizierte und freundschaftliche Betreuung dieser Arbeit, vor allem auch für die zahlreichen Ratschläge beim Zusammenschreiben möchte ich mich bei PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp bedanken.

Hans-Hinrich Hönck und Günther Ellinghausen danke ich für die Präparation der *Xenopus* Oocyten.

Den Mitarbeitern des Service-Labors, Agata Blaszczyk-Wewer, Sönke Harder und Dr. Fritz Buck danke ich für die Sequenzierungen der verschiedenen Klone, sowie für die Synthese der zahlreichen Oligonukleotide und Peptide. Ein besonderer Dank geht darüber hinaus an Fritz und Sönke für die Durchführung der Massenspektroskopie.

Für die Unterweisung in die verschiedenen immunhistochemischen Methoden, sowie für die Präparation der Hippocampus-Neuronen danke ich Dr. Matthias Schreff.

Dr. Stefan Kindler (Institut für Zellbiochemie und klinischen Neurobiologie, Hamburg) danke ich für die verschiedenen GST-Fusionsproteine, sowie den PSD-95-Klon.

Dr. Stefan Schulz (Universität Magdeburg) danke ich für die beiden SSTR-Antikörper.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes bedanke ich mich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken. Ohne ihre Unterstützung während des gesamten Studiums und der Zeit in Hamburg wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Charakterisierung von Somatostatinrezeptor-Subtyp 4 interagierenden Proteinen in der Ratte (*Rattus norvegicus*)“ selbstständig angefertigt 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.

Würzburg, den

Marcus Christenn

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	IV
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	V
1. Einleitung	1
2. Material	15
2.1 Chemikalien	15
2.2 Enzyme	16
2.3 Vektoren	16
2.4 Antikörper	17
2.4.1 Primäre Antikörper	17
2.4.2 Sekundäre Antikörper	17
2.5 cDNA Bibliotheken	17
2.6 Oligonukleotide	18
2.6.1 Allgemeine PCR- und Sequenzierungsprimer	18
2.6.2 Spezifische Primer für PCR- und Sequenzierungsreaktionen	18
2.6.2.1 SSTR4-Konstrukte	18
2.6.2.2 PSD95-Konstrukte	18
2.7 Peptide	18
2.8 Fertigsysteme	19
2.9 Puffer, Lösungen und Medien	20
2.9.1 Puffer und Lösungen	20
2.9.2 Medien	23
2.9.2.1 Medien für die Zellkultur	23
2.9.2.2 Medien für Bakterien	23
2.9.2.3 Medien für Hefen	24
2.10 Bakterien- und Hefestämme	25
2.10.1 Bakterienstämme	25
2.10.2 Hefestämme	25
2.10.3 Zelllinien	25
2.11 Versuchstiere	25
2.12 Sonstiges Zubehör	26
2.13 Geräte	26
3. Methoden	28
3.1 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	28
3.1.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	28
3.1.2 Auftrennung von RNA-Molekülen in Formalingelen	29
3.2 Fällung von Nukleinsäuren	29
3.3 Phenol/Chloroform-Extraktion	29
3.4 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	30
3.4.1 Photometrische Messung	30
3.4.2 Analytische Agarose-Gelelektrophorese	30
3.5 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	30
3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31

3.7	Glätten von Einzelstrangüberhängen	31
3.8	Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	32
3.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	32
3.10	Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren	32
3.10.1	Klonierung von DNA-Fragmenten mit Einzelstrangüberhängen	32
3.10.2	Klonierung von DNA-Fragmenten mit überhängendem Deoxyadenosinrest	33
3.10.3	Klonierung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden	33
3.11	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	34
3.11.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.11.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.11.2.1	Selektion durch Antibiotikaresistenz	34
3.11.2.2	Selektion durch α -Kompletierung (Blau-Weiß-Selektion)	35
3.12	Isolierung von Plasmid-DNA	36
3.12.1	TELT-Lyse	36
3.12.2	Alkalische Extraktionsmethode für Plasmid-DNA	36
3.12.2.1	Qualitative Präparation von Plasmid-DNA	36
3.12.2.2	Quantitative Plasmid-Präparation über Säulenchromatographie	37
3.13	DNA-Sequenzanalyse	37
3.14	Reinigung synthetisch hergestellter Oligonukleotide	37
3.15	Spezifische Amplifizierung von Nukleinsäuren durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
3.16	<i>In vitro</i> Transkription mit T7 RNA-Polymerase	39
3.17	Kultivierung von HEK293-Zellen	40
3.18	Transfektion von kultivierten HEK293-Zellen nach der Calciumphosphat- Methode	40
3.19	Membranpräparation aus HEK293-Zellen	41
3.20	Immuncytochemischer Nachweis von Proteinen in kultivierten HEK293-Zellen	41
3.21	Immuncytochemie auf kultivierten Hippocampus-Neuronen	42
3.22	Mikroskopie	42
3.23	Proteinbestimmung nach Bradford	43
3.24	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	43
3.25	Coomassie-Färbung	44
3.26	Western Blot-Analyse	45
3.27	Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen	45
3.28	Kopplung von Peptiden an aktivierte Sepharose oder Agarose	46
3.28.1	Kopplung von Peptiden an NHS-Sepharose	46
3.28.2	Kopplung von Peptiden an Iodacetyl-aktivierte Agarose	47
3.29	Aufreinigung von IgG-Antikörpern aus Antiserum	47
3.29.1	Präzipitation von IgG-Antikörpern mit Ammoniumsulfat	47
3.29.2	Aufreinigung von IgG-Antikörpern mittels Protein A/G-Agarose	48
3.30	Immobilisierung von Antikörpern	48
3.30.1	Kopplung von Antikörpern an NHS-Sepharose	48
3.30.2	Kopplung von Antikörpern an Protein A/G-Agarose	48
3.31	Präparation von Proteinextrakten aus murinen Geweben	49
3.31.1	Präparation einer P2-Membranfraktion	49
3.31.2	Anreicherung von Glykoproteinen mittels WGA-Agarose	49
3.32	Immunpräzipitation	50
3.32.1	Immunpräzipitation aus transfizierten HEK293-Zellen	50
3.32.2	Immunpräzipitation aus Rattengehirn	51
3.33	Peptid-Affinitätschromatografie	51
3.33.1	Affinitätschromatografie mit rekombinanten Proteinen	51

3.33.2	Affinitätschromatografie mit solubilisierten Membranfraktionen.....	51
3.34	Massenspektroskopie	52
3.35	Hefe-Zwei-Hybrid-System	52
3.35.1	Eingesetzte Selektionsmarker	53
3.35.2	Transformation von Hefezellen	54
3.35.3	Hefe-Zwei-Hybrid-Screen	55
3.35.3.1	Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mittels sequentieller Transformation	55
3.35.3.2	Hefe-Zwei-Hybrid-Screen durch <i>Mating</i>	56
3.35.4	Galactosidase-Tests	56
3.35.4.1	α -Galactosidase-Platten-Test	57
3.35.4.2	β -Galactosidase-Filter-Test	57
3.35.5	Herstellung von Plasmid-Segregaten	57
3.35.5.1	Herstellung von Plasmid-Segregaten durch natürlichen Verlust	58
3.35.5.2	Herstellung von Plasmid-Segregaten durch Cycloheximid-Selektion	58
3.35.6	Plasmidisolierung aus Hefezellen	58
3.36	Messung von Ionenkanälen an injizierten <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	59
3.37	<i>reversed phase</i> -HPLC	60
4.	Ergebnisse.....	61
4.1	Identifizierung SSTR4-interagierender Proteine mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.....	61
4.1.1	Herstellung des Köderplasmids und Durchführung der Hefe-Zwei-Hybrid-Screens	61
4.1.2	Untersuchung der Interaktionen in transient transfizierten HEK293-Zellen.....	64
4.2	Affinitätschromatografische Aufreinigung SSTR4-interagierender Proteine	66
4.2.1	Herstellung der Affinitätsmatrix	66
4.2.2	Durchführung der Affinitätschromatografie.....	68
4.3	Interaktion von SSTR4 und PSD-95 in transfizierten HEK293-Zellen	71
4.4	<i>In vivo</i> Interaktion von SSTR4 und PSD-95	73
4.4.1	Koimmunpräzipitation von SSTR4 und PSD-95 aus Rattengehirn-Lysaten.....	73
4.4.2	Nachweis der Interaktion von PSD-95 und SSTR4 in kultivierten Hippocampus-Neuronen.....	75
4.5	Identifikation der für die Interaktion mit dem SSTR4 verantwortlichen PDZ-Domäne von PSD-95.....	77
4.5.1	Aufreinigung der GST-Fusionsproteine.....	77
4.5.2	Durchführung des Bindungsexperiments	78
4.6	Affinitätschromatographie mit immobilisierten Peptiden der Somatostatinrezeptor Suptypen 1 bis 4.....	81
4.7	Einfluß der Interaktion von PSD-95 und SSTR4 auf die Agonisten-induzierte Internalisierung des Rezeptors.....	82
4.8	Einfluß von PSD-95 auf die Kopplung von rSSTR4 an GIRK1 in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	85
5.	Diskussion.....	88
6.	Zusammenfassung.....	102
Summary	103	
7.	Literaturverzeichnis.....	104
Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit.....	128	
Lebenslauf.....	129	
Anhang.....	130	

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1:	Schematische Darstellung eines GPCRs der Familie A innerhalb der Zellmembran.....	1
Abbildung 2:	Schematischer Ablauf der Desensitisierung und Resensitisierung	4
Abbildung 3:	Primärstruktur von Somatostatin und Cortistatin aus Mensch und Ratte.....	10
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des Somatostatinrezeptors Subtyp 4 aus <i>Rattus norvegicus</i>	12
Abbildung 5:	Lokalisierung des rSSTR4 und der im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen identifizierten möglichen Interaktionspartner in transfizierten HEK293-Zellen.	65
Abbildung 6:	Vergleich der C-Termini der SST4-Rezeptoren aus Mensch, Ratte und Maus.....	66
Abbildung 7:	HPLC-Chromatogramme der ersten Kopplung des SSTR4-Peptids an SulfoLink- Agarose.....	67
Abbildung 8:	Analyse der affinitätschromatografischen Aufreinigung	68
Abbildung 9:	Ergebnis der massenspektroskopischen Analyse	70
Abbildung 10:	Kolokalisierung von PSD-95 und SSTR4 in transfizierten HEK293-Zellen.....	71
Abbildung 11:	Koimmunpräzipitation von SSTR4 und PSD-95 aus transfizierten HEK293-Zellen.....	72
Abbildung 12:	Koimmunpräzipitation von SSTR4 und PSD-95 aus Rattengehirn.....	74
Abbildung 13:	Expression von PSD-95 und SSTR4 in kultivierten Hippocampus-Neuronen.....	75
Abbildung 14:	Lokalisierung von PSD-95 und SSTR4 in kultivierten Hippocampus-Neuronen.....	76
Abbildung 15:	Aufreinigung rekombinater GST-Fusionsproteine am Beispiel von PSD-95.PDZ1- GST und PSD-95.PDZ3-GST	78
Abbildung 16:	Sequenzen der m Bindungstest eingesetzten C-terminalen Peptide	79
Abbildung 17:	Identifizierung der mit SSTR4 interagierenden PDZ-Domäne von PSD-95	80
Abbildung 18:	Analyse der affinitätschromatografischen Aufreinigung.....	81
Abbildung 19:	Einfluß der Interaktion von PSD-95 und SSTR4 auf die Agonisten-induzierte Inter- nalisation des Rezeptors.	83
Abbildung 20:	Einfluß von PSD-95 auf die Agonisten-induzierte Internalisierung der Rezeptor- mutante rSSTR4.T331A.....	84
Abbildung 21:	Strom-Zeit-Kurven von GIRK1- und SSTR4- bzw. PSD-95-, GIRK1- und SSTR4- exprimierender <i>Xenopus</i> Oozyten nach SST-14-Stimulierung.....	86
Abbildung 22:	Einfluß von PSD-95 auf die GIRK1-Aktivierung von SSTR4.....	87
Abbildung 23:	Aufbau der PDZ-Domänen von PSD-95 und PSD-93.....	89
Abbildung 24:	Organisation postsynaptischer Komplexe durch PSD-95	99
Tabelle 1:	GPCRs der Familie A, die eine C-terminale Erkennungssequenz für eine PDZ- Domäne der Klasse 1 aufweisen.....	8
Tabelle 2:	Im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierte Klone.....	62

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celcius
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
A	Adenosin
Acc.Nr.:	Nummer des Datenbankeintrages unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
A _x	Absorption bei der Wellenlänge x nm
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumine)
C	Cytidin
cAMP	zyklisiertes AMP (engl.: cyclic AMP)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dd H ₂ O	doppelt destiliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verbessertes GFP (engl.: enhanced green fluorescend protein)
engl.	englisch
<i>et al.</i>	<i>et alteres</i>
EtOH	Ethanol

FCS	Fötale Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FF	schnelle Flußrate (engl.: fast flow)
g	Gramm
G	Guanosin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: green fluorescent protein)
GKAP	Guanylatkinase assoziiertes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (engl.: G-protein-coupled receptor)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie (engl.: human embryonic kidney)
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl-]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])
HRP	Meerrettich Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase)
IPTG	1-Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KiE	Kallikrein-Inhibitor Einheit
l	Liter
M	Mol/l
mA	Milliampere
MAGUK	membranassoziierte Guanylatkinase
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NGS	normalisiertes Ziegeserum (engl.: normal goat serum)
NHS	N-Hydroxy-succinimid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor
NP-40	Nonidet P-40
NT7	N-terminaler T7-Tag
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaktion)
PDZ	PSD-95, disk large, ZO-1

PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	postsynaptische Dichte
PSD-95	PSD-Protein von 95 kDa
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QDO	Vierfach- <i>Dropout</i>
RACE	Schnelle Amplifikation von cDNA-Enden (engl.: rapid amplification of cDNA ends)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit nachfolgender Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
s. Abb.	siehe Abbildung
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
s. Kap.	siehe Kapitel
SAP90	synapsenassoziiertes Protein von 90 kDa
SAPAP	SAP90/PSD-95 assoziiertes Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecylsulfate)
SST-14	Somatostatin-14
SST-28	Somatostatin-28
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	Tributylphosphin
TDO	Dreifach- <i>Dropout</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLCK	1-Chlor-3-tosylamido-7-amino-2-heptanon
TRH	Thyrotropin freisetzendes Hormon (engl.: Thyrotropin releasing Hormon)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TritonX-100	Polyethylenglykol-mono-[p-(1,1,3,3,-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
u	Enzymeinheit (engl.: unit)

U	Uridin
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (engl.: volume per volume)
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: weight per volume)
WGA	Weizenkeim-Agglutinin (engl.: wheat germ agglutinin)
X- α Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galaktopyranosid
X- β Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1. Einleitung

Auf zellulärer Ebene entsteht bei höheren Organismen das Problem, auf welche Art und Weise ein extrazelluläres Signal die Zellmembran passieren kann, um intrazellulär einen biologisch sinnvollen Effekt zu erzielen. Neben Signalen, die auf Grund ihrer chemischen Natur die Zellmembran ohne größere Probleme passieren können, gibt es eine Vielzahl von Reizen, für die die Zellmembran ohne zusätzliche Hilfsmittel eine unüberwindliche Barriere darstellen würde. Deshalb enthält die Zellmembran Proteine, die durch die Membran reichen und so entweder ein Passieren der Membran ermöglichen (z.B. Ionenkanäle), oder aber das Signal nach innen weiterreichen, ohne dass das extrazelluläre Signal direkt ins Zellinnere gelangen muß.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln die Weitergabe von Informationen durch die Zellmembran

Zu der größten Gruppe dieser Transmembranproteine zählen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) (Strader *et al.*, 1994; 1995; Helmreich und Hofmann, 1996).

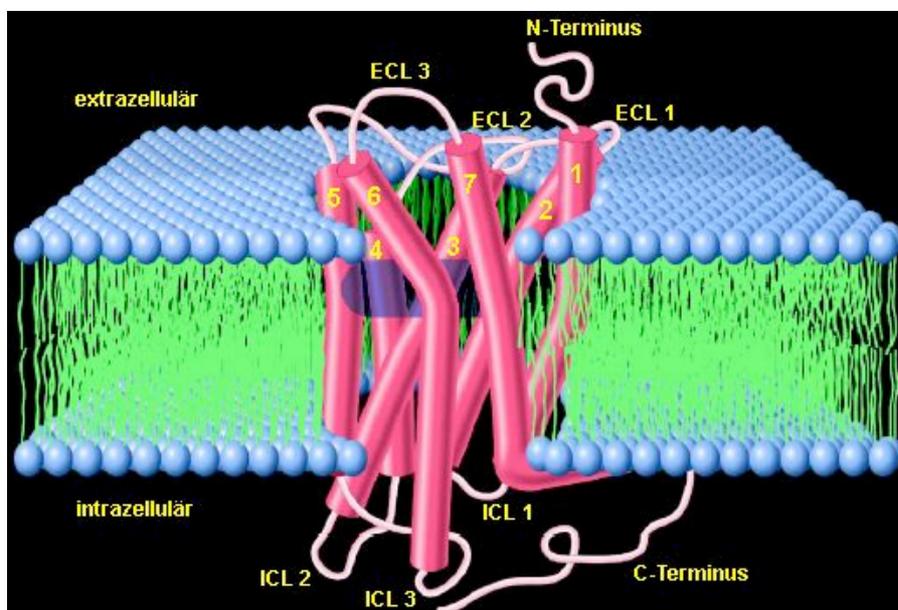


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines GPCRs der Familie A innerhalb der Zellmembran.

Die Darstellung wurde von der Kristallstruktur des Rhodopsins abgeleitet. Die Transmembranomänen sind als Zylinder dargestellt. Die jeweiligen extrazellulären (ECL) und intrazellulären (ICL) Schleifen sind entsprechend markiert. Die Bindungsregion des Retinals ist dunkel unterlegt. Aus Kristiansen, 2004.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind Membranproteine mit einem extrazellulären N-Terminus, einem cytoplasmatischen C-Terminus und mit sieben Transmembrandomänen, die durch drei intrazelluläre Schleifen (ICL) und drei extrazelluläre Schleifen (ECL) miteinander verbunden sind (Dohlman et al., 1991; Baldwin, 1993; Ballesteros und Weinstein, 1994).

In Vertebraten umfaßt die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren 1000 – 2000 Mitglieder, darin sind etwa 1000 Odorant- und Pheromonrezeptoren enthalten (Bockaert und Pin, 1999). *Caenorhabditis elegans* enthält circa 1100 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, deren Gene etwa 5 % des Genoms ausmachen (Bargmann, 1998). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurden ebenfalls in Pflanzen (Plakidou-Dymock *et al.*, 1998), Hefen (Dohlman *et al.*, 1991), *Dyctostelium discoideum* (Devrotes, 1994), sowie in Protozoen und frühen Metazoen (Vernier *et al.*, 1995; New und Wong, 1998) nachgewiesen.

Die Auswahl der Stimuli, die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erkannt werden, ist vielfältig. Sie reicht von Licht und Ca^{2+} -Ionen über Geruchsstoffe, Pheromone, Nukleotiden und Prostaglandinen, sowie Aminosäuren und Peptiden bis hin zu großen Proteinen. Wegen der Vielzahl von unterschiedlichen Agonisten kann kein gemeinsamer Interaktionsbereich mit den extrazellulären Bereichen der Rezeptoren festgelegt werden. Allerdings läßt sich für ähnliche Liganden der Interaktionsbereich grob eingrenzen.

Die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren (Familie A) werden beispielsweise durch kleine Liganden, wie etwa Catecholamine oder Nukleotide, durch Peptide und durch Glykoproteine aktiviert. Die kleinen Liganden binden in eine Einbuchtung, die von den Transmembrandomänen (TM-) III bis VI gebildet wird. Im Falle des Rhodopsins ist das Retinal an dieser Stelle kovalent mit dem Rezeptor verknüpft (Bockaert und Pin, 1999). Peptide treten mit den extrazellulären Schleifen und dem N-Terminus der Rezeptoren in Wechselwirkung (Bockaert und Pin, 1999). Die Glykoproteine binden an einen besonders langen N-Terminus, anschließend kommt es durch Interaktion mit den extrazellulären Schleifen ECL1 und ECL3 zur Rezeptoraktivierung (Ji und Ji, 1995).

Die Hauptaufgabe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besteht in der Informationsweiterleitung von extrazellulären Stimuli an intrazelluläre *second Messenger*, die dann durch die Zelle als sinnvolles Signal interpretiert werden. Dieser Prozeß umfaßt die Kopplung des durch Agonistenbindung aktivierten Rezeptors an eine Vielzahl von Effektorsystemen durch Interaktion mit heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteinen (G-Proteine).

G-Proteine sind aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammengesetzt (Neer, 1995; Hamm und Gilchrist, 1996; Neer und Smith, 1996). Die α -Untereinheit gehört zur Superfamilie der GTPasen, die durch sehr ähnliche, an GTP-Bindung und GTP-Hydrolyse beteiligte Strukturelemente gekennzeichnet ist (Bourne, 1995). Die β - und γ -Untereinheiten bilden ein stabiles Heterodimer. Im inaktiven, abgeschalteten Zustand liegt das G-Protein in der GDP-gebundenen Form vor. Die Bindung des Agonisten an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor führt zu einer Rezeptorkonformation, die den Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins fördert. Dies erlaubt die Trennung des G-Proteins in seine G_{α} - und $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten (Birnbaumer, 1992; Clapham und Neer, 1993; Neer, 1995; Surya *et al.*, 1998). Nachfolgend regulieren die aktivierten G_{α} - und $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten die Aktivität von Effektorenzymen oder Ionenkanälen (Neer, 1995; Gautam *et al.*, 1998).

Neben der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion ermöglicht die Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch seinen Agonisten weitere molekulare Prozesse, z.B. Rezeptordesensibilisierung, Rezeptorendozytose oder Informationsweiterleitung durch G-Protein-unabhängige Signaltransduktionswege (Lefkowitz, 1993; Ferguson *et al.*, 1996; Ferguson und Garon, 1998; Krupnick und Benovic, 1998; Hall *et al.*, 1999; Luttrell *et al.*, 1999; Schöneberg *et al.*, 1999). Die Aktivität eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors resultiert aus dem Zusammenspiel von molekularen Mechanismen, die zum einen die Signalweiterleitung vermitteln, zum anderen Desensibilisierung und Resensibilisierung des Rezeptors steuern.

Rezeptordesensibilisierung, das Abnehmen der Rezeptoraktivierbarkeit, stellt einen bedeutenden *Feedback*-Mechanismus dar, der vor akuter als auch chronischer Rezeptorüberstimulierung schützt. Allerdings führt die Desensibilisierung auch zu einer Reduzierung von therapeutischen Effekten von Rezeptoragonisten, die als Pharmaka eingesetzt werden (z.B.: Ungerer *et al.*, 1993; Gros *et al.*, 1997). Die Desensibilisierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors ist ein Ergebnis verschiedenster Mechanismen. So kommt es zu einer Entkopplung des Rezeptors vom heterotrimeren G-Protein durch Rezeptorphosphorylierung (z.B.: Bouvier *et al.*, 1988; Hausdorff *et al.*, 1989; Lohse *et al.*, 1990a, b). Membranständige Rezeptormoleküle werden internalisiert und in intrazelluläre Kompartimente transportiert (z.B.: Hermans *et al.*, 1997; Trejo und Coughlin, 1998; Oakley *et al.*, 1999; Anborgh *et al.*, 2000). Die Gesamtzahl der Rezeptoren wird reduziert, durch Senkung des mRNA-Spiegels, Verringerung der Proteinsynthese oder durch lysosomalen

Abbau von Rezeptoren (z.B.: Doss *et al.*, 1981; Hadcock und Malbon, 1988; Valiquette *et al.*, 1990, 1993; Jockers *et al.*, 1999; Pak *et al.*, 1999). Der Zeitrahmen dieser Prozesse reicht von Sekunden (Phosphorylierung) über Minuten (Endozytose) und Stunden (Absenkung der Rezeptorzahl) (Ferguson, 2001).

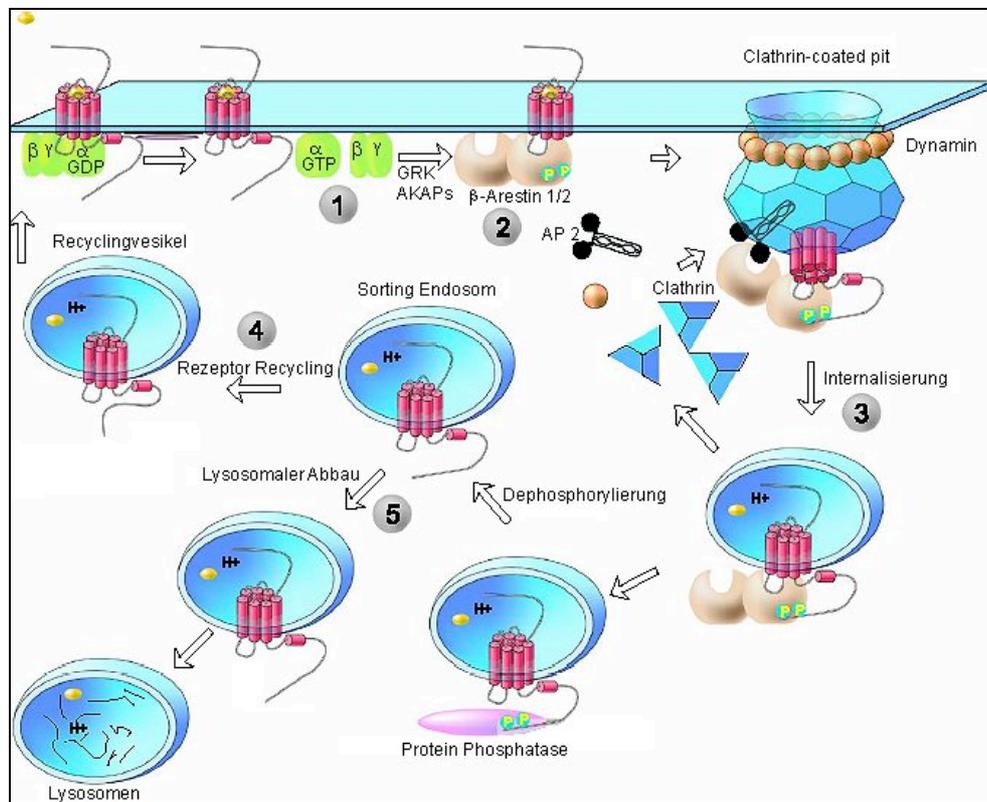


Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Desensibilisierung und Resensibilisierung

Die Aktivierung eines GPCR führt zur Trennung des G-Proteins (1) und nachgeschaltet zur Aktivierung oder Inhibierung spezifischer Signaltransduktionswege. Die Desensibilisierung wird durch Phosphorylierung des GPCR durch GRK (2) gefolgt von der Bindung von β -Arrestin und anschließender Clathrin-vermittelter Endozytose des Rezeptors (3) erreicht. Der Rezeptor wird danach entweder zurück zur Plasmamembran transportiert (4) oder zur Degradation in die Lysosomen transportiert. Aus Kristiansen, 2004.

Drei Proteinfamilien sind an der Regulation der Rezeptordesensibilisierung beteiligt, *second Messenger*-abhängige Kinasen (z.B. Proteinkinase A und Proteinkinase C), G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und Arrestine. Während *second Messenger*-abhängige Kinasen nicht nur Agonisten-aktivierte Rezeptoren phosphorylieren sondern auch Rezeptoren, die noch nicht einem Agonisten ausgesetzt waren (Hausdorff *et al.*, 1989; Lohse *et al.*, 1990a), phosphorylieren G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen selektiv nur Agonisten-aktivierte Rezeptoren (Lefkowitz, 1993). Arrestine binden nun an phosphorylierte Rezeptoren und bewirken eine Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein (Benovic *et al.*, 1988; Lohse *et al.*, 1990b; Pippig *et al.*, 1993).

Die physiologische Bedeutung der Rezeptorresensibilisierung liegt in der Aufrechterhaltung der normalen Homeostase innerhalb des Gewebes, da eine irreversible oder langanhaltende Desensibilisierung zu einem Zustand führen würde, in der die Zelle nicht mehr angemessen auf extrazelluläre Stimuli reagieren kann. Die Resensibilisierung eines Rezeptors wird erreicht durch Dephosphorylierung des internalisierten Rezeptors in Endosomen und nachfolgendem Rücktransport zur Zellmembran (Pitcher *et al.*, 1992; Pippig *et al.*, 1995).

Das Spektrum von Kombinationen aus Desensibilisierung und Resensibilisierung ist vielfältig. Es umfaßt:

1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die nach Agonistenstimulierung nicht internalisieren, wie etwa der β_3 -adrenerge Rezeptor (β_3 AR) (Jockers *et al.*, 1996),
2. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die ohne β -Arrestinbindung internalisieren und nach Dephosphorylierung wieder an die Zelloberfläche transportiert werden, wie etwa der β_2 -adrenerge Rezeptor (β_2 AR) (Oakley *et al.*, 1999, 2000; Anborgh *et al.*, 2000),
3. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die in einem Komplex mit β -Arrestin internalisieren und nach Dephosphorylierung und Dissoziation des β -Arrestins wieder an die Zelloberfläche transportiert werden, wie etwa der Neurokinin 1 Rezeptor (Grady *et al.*, 1995; McConalogue *et al.*, 1999),
4. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die in einem Komplex mit β -Arrestin internalisieren und dann entweder in Endosomen verbleiben oder in Lysosomen transportiert werden, wie etwa der Angiotensin II Typ 1A Rezeptor ($AT_{1A}R$) (Anborgh *et al.*, 2000) oder der Proteinase-aktivierte Rezeptor 2 (PAR2) (Dery *et al.*, 1999; Trejo und Coughlin 1999).

Intrazelluläre interagierende Proteine modifizieren die Rezeptorfunktion

Neben den heterotrimeren G-Proteinen wurden immer mehr Proteine identifiziert, die intrazelluläre Bereiche eines Rezeptors binden und diesen an G-Protein-unabhängige Signaltransduktionswege koppeln, oder über diesen Weg die posttranslationale Modifizierung und Sortierung eines Rezeptors steuern (z.B.: Ross und Wilkie, 2000; Bockaert *et al.*, 2004).

Ein Beispiel für die wichtige Rolle interagierender Proteine für die Modifizierung und Rezeptorsortierung ist die Wechselwirkung von RAMP 1 und RAMP 2 mit dem CRL-Rezeptor (*calcitonin receptor-like*), einem Protein mit 7 Transmembrandomänen, das eine 55 %ige Identität zum Calcitoninrezeptor aufweist (Chang *et al.*, 1993; Njuki *et al.*, 1993).

RAMP 1 und RAMP 2 regulieren nicht nur den Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche, sondern beeinflussen die Glykosylierung des Rezeptors und sein pharmakologisches Profil (McLatchie *et al.*, 1998). Weder RAMP 1 noch CRLR werden an der Zelloberfläche nachgewiesen, wenn sie allein exprimiert werden (McLatchie *et al.*, 1998). Nach Koexpression lassen sich beide Proteine an der Zellmembran nachweisen, der Rezeptor weist dann eine andere Glykosylierung als in Abwesenheit von RAMP 1 auf (McLatchie *et al.*, 1998). Zudem wird der CRLR durch CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) stimuliert (McLatchie *et al.*, 1998). Koexpression von RAMP 2 und CRLR führt ebenso zu einer Lokalisierung an der Zellmembran, wobei der Rezeptor eine andere Glykosylierung als nach Koexpression mit RAMP 1 aufweist (McLatchie *et al.*, 1998). In diesem Fall wird durch Adrenomedullin und nicht durch CGRP die Produktion von cAMP stimuliert (McLatchie *et al.*, 1998). Der Rezeptor wird zwar in Gegenwart von RAMP 1 oder RAMP 2 unterschiedlich glykosyliert, aber die Bindungseigenschaften des CRL-Rezeptors werden nur durch die Interaktion mit RAMP 1 bzw. RAMP 2 bestimmt (Hilairet *et al.*, 2001). RAMP 1 und RAMP 2 sind zwei notwendige aber nicht ausreichende Proteine für die volle Funktionalität des CRL-Rezeptors. RCP (*receptor component protein*) ist ein weiteres, etwa 20 kDa großes intrazelluläres Protein, das für die Funktion des CRLR als Adrenomedullin- bzw. CGRP-Rezeptor essentiell ist (Luebke *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2001). Es fungiert anders als die RAMPs nicht als Chaperon, sondern koppelt den CRL-Rezeptor an Proteine der nachgeschalteten Signalkaskade. In einer Zelllinie, die RCP antisense RNA stabil exprimiert und somit kein RCP-Protein bildet, wurde weder die Lokalisierung von RAMP 2 und CRLR an der Zelloberfläche noch die Affinität für CGRP durch das Fehlen von RCP beeinflusst (Evans *et al.*, 2000). Allerdings konnte eine Reduktion der durch CGRP stimulierten cAMP-Produktion nachgewiesen werden (Evans *et al.*, 2000). Für einen funktionalen CGRP- bzw. Adrenomedullin-Rezeptor ist somit ein Komplex aus drei Proteinen notwendig: CRLR; RAMP 1 bzw. RAMP 2 oder 3; und RCP (Evans *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2001).

Der Einfluß interagierender Proteine auf die intrazelluläre Signalweiterleitung ist vielfältig. Er reicht von der Modifizierung der GTPase-Aktivität der G_{α} -Untereinheit des G-Proteins über die Kopplung des Rezeptors an nachgeschaltete Signaltransduktionswege wie etwa durch RCP bis hin zur Bildung größerer Proteinkomplexe, die sowohl einzelne Teile einer Signalkaskade in räumliche Nähe bringen, als auch eine Vernetzung unterschiedlicher Signaltransduktionswege erlauben.

Homer/Vesl-Proteine (*VASP/Ena-related gene upregulated during seizure and LTP*) verknüpfen beispielsweise bestimmte G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit G-Protein-unabhängigen Signaltransduktionswegen und können gleichzeitig zur Ausbildung größerer Proteinkomplexe beitragen. Sie gehören zu einer Proteinfamilie, die mit metabotropen Glutamat-Rezeptoren der Gruppe 1 (mGluR1 α , mGluR5) interagieren (Brakeman *et al.*, 1997). Die Proteinfamilie umfaßt fünf Mitglieder: Homer 1a, 1b, 1c, Homer 2 und Homer 3, wobei bis auf Homer 1a alle Vertreter dieser Proteinfamilie neben eine EVH1-Domäne (*ena/VASP homology1*) auch eine C-terminales *Coiled-coil* Motif (CC-Homer) aufweisen, das die Ausbildung von Homo- und Heterodimeren erlaubt (Xiao *et al.*, 1998). Sowohl der mGluR1 α als auch der mGluR5 weisen im C-terminalen Bereich ein prolinreiches Motiv (PPSPF) auf, das die Bindung zu der EVH1-Domäne der Homer-Proteine vermittelt (Tu *et al.*, 1998). Dasselbe Motiv findet sich auch beim IP₃-Rezeptor (IP₃R) und dem Ryanodin-Rezeptor und es wurde gezeigt, dass die CC-Homer sowohl mit dem mGluR1 α als auch mit dem IP₃R assoziiert sind (Tu *et al.*, 1998). Homer 1a konkurriert dagegen mit den anderen Vertretern dieser Gruppe um die Bindung an die mGluR und kann eine Unterbrechung des Komplexes auslösen. Das führt zu einer Inhibition der mGluR-induzierten Ca²⁺-Freisetzung durch den IP₃R in Purkinje Zellen (Xiao *et al.*, 1998). Des Weiteren steuert diese Interaktion in Neuronen die Agonisten-unabhängige Rezeptoraktivität des mGluR1a bzw. mGluR5, da die Interaktion von Homer 1a mit mGluR1a bzw. mGluR5 eine konstitutive Aktivität der Rezeptoren in Neuronen induziert (Ango *et al.*, 2001). Die Homer-Proteine wurden ebenfalls als Interaktionspartner der Shank-Proteinfamilie identifiziert (Tu *et al.*, 1999). Dadurch werden die Homer-Proteine über GKAP und PSD-95 mit den NMDA-Rezeptoren (NMDARs) verknüpft, was zu einer Vernetzung zwischen metabotropen und ionotropen (NMDARs) Glutamatrezeptoren an glutamatergen Synapsen führt (Tu *et al.*, 1999). Daneben beeinflussen Homer-Proteine die Sortierung der mGlu-Rezeptoren, da Homer 1b eine Retention im endoplasmatischen Retikulum bewirkt, während Homer 1a eine Insertion des reifen Rezeptors in die Zellmembran erlaubt (Roche *et al.*, 1999).

PDZ-Domänen sind wichtige Protein-Interaktionsmodule

Betrachtet man die C-Termini G-Protein-gekoppelter Rezeptoren der Familie A, so findet man, dass 1/10 (30 von etwa 280) einer Erkennungssequenz für eine PDZ-Domäne der Klasse 1 entsprechen. PDZ-Domänen sind Protein-Interaktionsmodule, die eine wichtige

Rolle bei der Zielfindung von Proteinen und der Zusammenstellung von Proteinkomplexen spielen.

-Amine:						
α_{1d} AR		DYSNLR ETDI *	P23944	-		-
β_1 AR		RQGF SSES SKV *	P18090	PSD-95		Hu <i>et al.</i> , 2000
	<i>H.sapiens:</i>	RPGF ASE SKV *	P08588	GIPC		Hu <i>et al.</i> , 2003
				CNrasGEF		Pak <i>et al.</i> , 2002
				MAGI-2		Xu <i>et al.</i> , 2001
β_2 AR		RNCNT ND SPL *	P10608	-		-
	<i>H.sapiens:</i>	RNC ST ND SL L *	P07550	NHERF		Hall <i>et al.</i> , 1998a
5-HT _{2A} R		ETV NE KV SCV *	P14842	PSD-95		Xia <i>et al.</i> , 2003
	<i>M.musculus:</i>	ETV NE KV SCV *	P35363	PSD-95, MPP-3, CIPP, MAGI-2, SAP97		Bécamel <i>et al.</i> , 2004
5-HT _{2B} R		DK VE DQV SYI *	P30994	-		-
5-HT _{2C} R		NV V SER ISSV *	P08909	MUPP1		Bécamel <i>et al.</i> , 2001
	<i>M.musculus:</i>	NV V SER ISSV *	P34968	PSD-95, MPP-3, Veli-3 SAP102, SAP97, MAGI-2		Bécamel <i>et al.</i> , 2002 Bécamel <i>et al.</i> , 2004
-Peptide:						
CCR5		T G E Q E V S T G L *	O08556	-		-
C3AR		S K R N H M S T D V *	O55197	-		-
CXCR2		S S S A N T S T T L *	P35407	-		-
CXCR5		S E N A T S L T T F *	P34997	-		-
GALR1		T P P S T N C T H V *	Q62805	-		-
SSTR1		G T C A S R I S T L *	P28646	-		-
SSTR2		L L N G D L Q T S I *	P30680	Shank1, Shank2		Zitzer <i>et al.</i> , 1999a, b
SSTR3		G D K A S T L S H L *	P30936	-		-
	<i>H.sapiens:</i>	K S S T M R I S Y L *	P32745	MUPP1		Liew, 2004
SSTR4		R V P F T K T T T F *	P30937	-		-
SSTR5		A N G L M Q T S R I *	P30938	PIST, PDZK1		Wente, 2004
V1BR		G E A T M E T S I F *	P48974	-		-
-Nukleotide:						
P2Y ₁ R		E F K Q N G D T S L *	P49651	-		-
	<i>H.sapiens:</i>	E F K Q N G D T S L *	P47900	NHERF		Hall <i>et al.</i> , 1998b
-Hormone:						
TSHR		I S E E Y T Q T A L *	P21463	-		-
-Cannabinoide:						
CB ₂ R		P N K A G Q S T L L *	Q9QZN9	-		-
-Lysosphingolipide:						
SIP ₂ R		P T F L E G N T V V *	P47752	-		-
LPA ₁ R		G V H S N D H S V V *	P61794	PDZ-RhoGEF, LARG		Yamada <i>et al.</i> , 2005
LPA ₂ R		N G R P L M D S T L *	Q9JL06	PDZ-RhoGEF, LARG		Yamada <i>et al.</i> , 2005
-Prostanoide:						
EPIR		S S R H S G F S H L *	P70597	-		-
-Orphan GPCR:						
Olfactory receptor-like Protein 19		M C K K Q I P S F L *	P23272	-		-
Chemokine receptor-like 1 (DEZ)		S V N E K E T S T L *	O35786	-		-
Chemokine receptor-like 2 (GPR30)		Q S D V K F S S A V *	O08878	-		-
GPR6		P F R S R S P S E V *	P51651	-		-
GPR12		S Q R A R S P S D V *	P30951	-		-
GPR56		S S G S T S S R I *	Q8K3V3	-		-
MAS Protoonkogen		G N T V S I E T V V *	P12526	-		-
Mas-related GPCR G		G G I S L P M S R V *	Q7TN39	-		-

Tabelle 1: GPCRs der Familie A, die eine C-terminale Erkennungssequenz für eine PDZ-Domäne der Klasse 1 aufweisen

Angegeben sind jeweils der Name, die Sequenz des C-Terminus sowie die Nummer des Datenbankeintrages des Rezeptors der Ratte. Identifizierte Interaktionspartner wurden mit dem entsprechenden Literaturzitat angegeben. Falls die Interaktion nicht in der Ratte nachgewiesen wurde, ist die entsprechende Spezies, sowie die die Sequenz des C-Terminus und die Nummer des Datenbankeintrages des orthologen Rezeptors angegeben. Die Aminosäuren, die mit dem PDZ-Klasse 1 Konsensusmotif übereinstimmen (Hung und Sheng, 2002), sind gelb unterlegt.

Der Name PDZ ist ein Akronym aus den Bezeichnungen für die drei Proteine, in denen PDZ-Domänen erstmals identifiziert wurden: dem postsynaptischen Protein **P**SD-95/SAP90 (Cho *et al.*, 1992), dem *Drosophila*-Protein **d***iscs-large* (Woods und Bryant, 1991) und dem *tight junction*-Protein **Z**O-1 (Itoh *et al.*, 1991). Alternativ wurden PDZ-Domänen auch als DHR-Domäne (*discs-large homology region*) or GLGF-repeat (nach einer konservierten Gly-Leu-Gly-Phe Sequenz innerhalb der Domäne) bezeichnet (Kennedy, 1995).

Seit ihrer Identifizierung sind PDZ-Domänen in einer Vielzahl von Proteinen von verschiedensten Organismen identifiziert worden (Ponting, 1997). PDZ-Domänen bestehen aus 80 bis 100 Aminosäuren und weisen eine sehr konservierte Struktur auf. PDZ-Domänen binden an C-terminale Peptide oder an β -*hairpin* Strukturen (Ponting und Phillips, 1995; Kennedy, 1995; Fanning und Anderson, 1996; Saras und Heldin, 1996; Songyang *et al.*, 1997). Aufgrund der Sequenz der C-terminalen Peptidliganden werden sie in drei Klassen eingeteilt (Hung und Sheng, 2002):

1. PDZ-Domäne Klasse 1: bindet an Liganden, die dem Konsensus -X-S/T-X- Φ entsprechen (Φ = hydrophobe Aminosäure; X= beliebige Aminosäure),
2. PDZ-Domäne Klasse 2: bindet an Liganden, die dem Konsensus -X- Φ -X- Φ entsprechen,
3. PDZ-Domäne Klasse 3: bindet an Liganden, die dem Konsensus -X-D/E-X- Φ entsprechen.

Somatostatin und seine Rezeptoren

Somatostatin wurde ursprünglich als hypothalamisches neuroendokrines Hormon entdeckt und basierend auf seiner Fähigkeit, die Freisetzung von Wachstumshormon (Somatotropin) aus Zellen des Hypophysenvorderlappens zu hemmen, charakterisiert (Brazeau *et al.*, 1973). Dem entsprechend wird es alternativ auch als SRIF (*somatotropin release-inhibiting factor*) bezeichnet. Es läßt sich im gesamten ZNS sowie in zahlreichen nichtneuralen Geweben nachweisen. In der Peripherie ist Somatostatin ein Inhibitor sowohl endokriner Sekretion, z.B. von Wachstumshormonen, Insulin und Glukagon, als auch exokriner Sekretion, z.B. von Magensäure und Enzymen des Pankreas (Reichlin, 1983a, b). Außerdem kann es die Differenzierung und Proliferation von normalen und Tumorzellen regulieren (Mascardo und Sherlin, 1982; Reichlin, 1983a, b; Kokudo *et al.*, 1992; Douziech

et al., 1999; Patel, 1999). Im zentralen Nervensystem agiert Somatostatin als Neurotransmitter und Neuromodulator mit physiologischen Effekten auf neuroendokrine, kognitive und motorische Prozesse (Reichlin, 1983a, b; Epelbaum, 1986; Epelbaum *et al.*, 1994; Gillies, 1997). Dementsprechend wurden Störungen der somatostatinerger Neurotransmission bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen einschließlich der senilen Demenz vom Alzheimer-Typ (Davies *et al.*, 1980; Krantic *et al.* 1992; Grouselle *et al.*, 1998), Morbus Parkinson (Beal *et al.*, 1988a; Epelbaum *et al.*, 1988; Strittmatter *et al.*, 1996), Morbus Huntington (Aronin *et al.*, 1983; Beal *et al.*, 1988b), HIV-Encephalitis (Fox *et al.*, 1997) und Epilepsie (Robbins *et al.*, 1991; Schwarzer *et al.*, 1996) beobachtet.

Somatostatin tritt in zwei biologisch aktiven Formen auf, dem zyklischen Tetradecapeptid Somatostatin-14 (SST-14) und dem N-terminal verlängerten Somatostatin-28 (SST-28) (Pradayrol *et al.*, 1980). Beide stammen von einem gemeinsamen Präprohormon ab, dem 116 AS langen Präprosomatostatin (Goodman *et al.*, 1980; Montminy *et al.*, 1984, Warren und Shields, 1984). Dieses wird nach Abspaltung eines Signalpeptids in das 94 AS lange Prosomatostatin überführt (Shen *et al.*, 1982), das gewebsspezifisch in Somatostatin-28 oder Somatostatin-14 prozessiert wird (Sevarino *et al.*, 1987).

Sowohl in Ratten als auch in Menschen konnte die Existenz eines nahe verwandten Peptids nachgewiesen werden, das auf Grund seines Verteilungsmuster im CNS und seiner hemmenden Wirkung auf die Aktivität von Pyramidenzellen der Hirnrinde als Cortistatin (CST) bezeichnet wurde (DeLecea *et al.*, 1996).

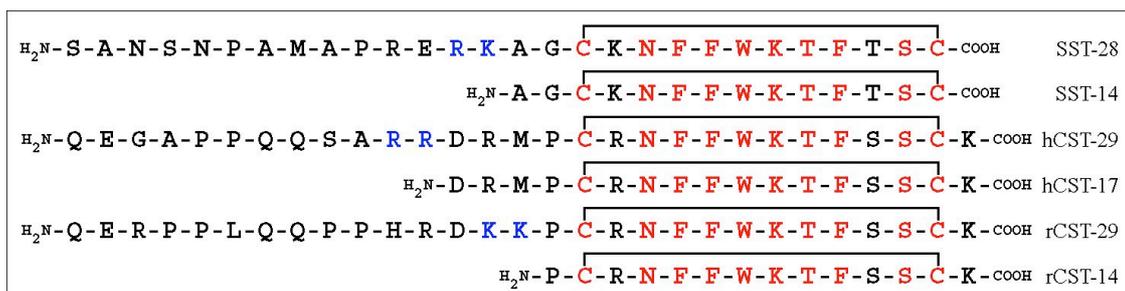


Abbildung 3: Primärstruktur von Somatostatin und Cortistatin aus Mensch und Ratte.

Die blaumarkierten Aminosäuren in der Sequenz von SST-28 und CST-29 kennzeichnen jeweils basische Aminosäurepaare, die als Erkennungsstellen für Proteasen bei der proteolytische Prozessierung fungieren. Die konservierten Aminosäuren sind rot dargestellt.

Cortistatin tritt ebenso in zwei biologisch aktiven Formen auf, dem langen CST-29 und der verkürzten Variante, dem CST-17 beim Menschen (Fukusumi *et al.*, 1997) bzw. dem CST-14 bei Ratte und Maus (DeLecea *et al.*, 1997). Cortistatin weist im Gegensatz zu Soma-

tostatin ein sehr diskretes Verteilungsmuster auf, das sich auf den Cortex und den Hippocampus beschränkt. Zwischen Somatostatin und Cortistatin besteht ein messbarer Unterschied in der Wirkung auf den REM-Schlaf: während Somatostatin bei Ratten die Dauer verlängert, wirkt Cortistatin verkürzend (DeLecea *et al.*, 1996).

Bislang wurden je fünf Rezeptoren in Menschen, Ratte und Maus für Somatostatin identifiziert (Meyerhof *et al.*, 1991, 1992; Yamada *et al.*, 1992a, b, 1993; Kluxen *et al.*, 1992; Bruno *et al.*, 1992; O'Carroll *et al.*, 1992, 1994; Corness *et al.*, 1993; Demchychyn *et al.*; 1993; Rohrer *et al.*, 1993; Vanetti *et al.*, 1992, 1993; Yasuda *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1993; Matsumoto *et al.*, 1994). Mit Ausnahme des SSTR2 besitzen die Somatostatin-Rezeptorsubtypen in den kodierenden Bereichen ihrer Gene keine Introns. Für den SSTR2-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass durch C-terminales alternatives Spleißen zwei Isoformen SSTR2A und SSTR2B entstehen (Vanetti *et al.*, 1992, 1993). Die Spleißvarianten unterscheiden sich lediglich in Länge und Aminosäuresequenz ihrer C-Termini. Sie zeigen deshalb gleiche Liganden-Bindungseigenschaften, variieren aber hinsichtlich der G Proteinkopplung und Desensibilisierung (Vanetti *et al.*, 1993).

Alle Somatostatinrezeptoren binden Somatostatin und Cortistatin mit hoher Affinität, wobei jedoch die Rezeptorsubtypen SSTR1-SSTR4 ähnlich hohe Affinitäten für SST-14 und SST-28 haben, während der SSTR5 eine höhere Affinität für SST-28 aufweist (O'Carroll *et al.*, 1992). Auf Grund der Bindungsaffinität zu dem synthetischen Agonisten Octreotid werden die SSTRs in zwei Gruppen eingeteilt. Während die SRIF2-Rezeptoren (SSTR1 und SSTR4) Octreotid nicht binden, zeigen die SRIF1-Rezeptoren (SSTR2, SSTR3 und SSTR5) eine hohe Affinität zu diesem Liganden (Hannon *et al.*, 2002)

Alle fünf Rezeptorsubtypen werden in extrazellulären Bereichen glykosyliert. So läßt sich beispielsweise aus der Aminosäuresequenz des Somatostatin-Rezeptorsubtyps 4 der Ratte (rSSTR4) (Bruno *et al.*, 1992) ein Molekulargewicht von 42 kDa ableiten. Tatsächlich konnte aber gezeigt werden, dass der native rSSTR4 im *Western* Blot ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa vor bzw. 50 kDa nach enzymatischer Deglykosylierung aufweist (Schreff *et al.*, 2000). Die Somatostatin-Rezeptorsubtypen weisen im Bereich des N-Terminus und der zweiten extrazellulären Schleife bis zu vier Konsensusmotive (Asn-X-Ser/Thr; Kornfeld und Kornfeld, 1985) für eine N-Glykosylierung auf. So kann der rSSTR4 am Asparagin in Position 21 und der hSSTR4 am Asparagin in Position 24 im Rahmen der posttranslationalen Modifizierung glykosyliert werden.

Betrachtet man den C-terminalen Bereich der Somatostatin-Rezeptorsubtypen, so fällt auf, dass mit Ausnahme des Subtyps 3 alle eine putative Palmitoylierungsstelle aufweisen: ein Cystein, welches von zwei Leucinresten flankiert wird. Die Bedeutung dieses Motivs für die Kopplung an intrazelluläre Effektoren wurde von O'Dowd *et al.* (1989) am Beispiel des β_2 -adrenergen Rezeptor (β_2 AR) und von Hukovic *et al.* (1998) am Beispiel des humanen SSTR5 gezeigt. Die Auswechslung eines Cysteins gegen eine andere Aminosäure führt jeweils zu einem nicht palmitoylierten Rezeptor mit deutlich reduzierter Kopplung an intrazelluläre Effektoren. Davon sind auch Agonisten-induzierte Desensitisierung und Internalisierung betroffen. So könnte ein kovalent an das Cystein in Position 323 gebundener Palmitoylsäurerest den C-Terminus des rSST4-Rezeptors zusätzlich in der Zellmembran verankern.

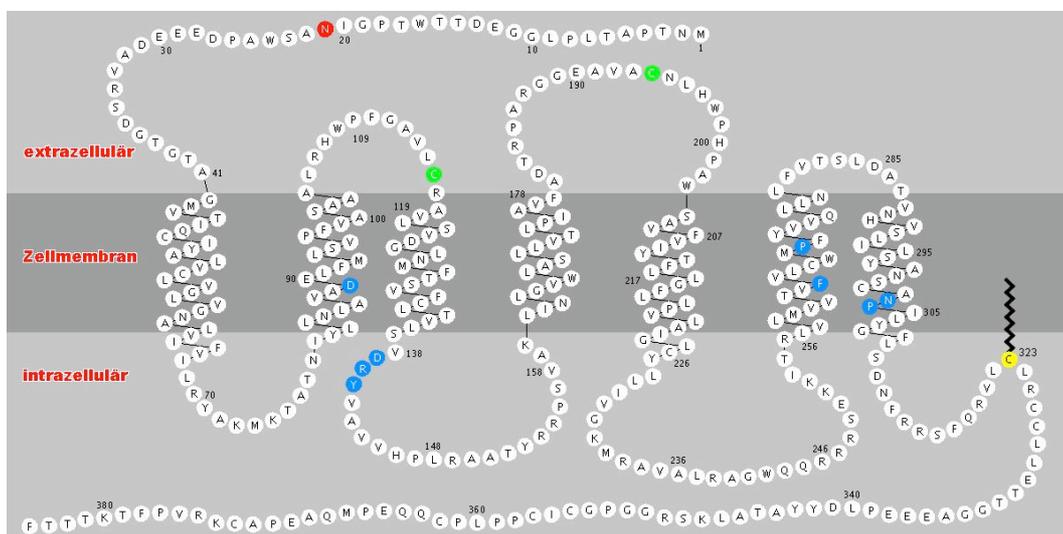


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz des Somatostatinrezeptors Subtyp 4 aus *Rattus norvegicus*.

Die konservierten Aminosäuren der G Protein.-gekoppelten Rezeptoren der Familie A wurden blau unterlegt. Zwei Cysteinreste, die extrazellulär eine Disulfidbrücke ausbilden, sind grün unterlegt. Eine mögliche N-Glykosylierungsstelle ist rot unterlegt. Eine putative Palmitoylierungsstelle ist gelb unterlegt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Mittels heterologer Expression der rekombinanten Somatostatinrezeptoren in verschiedenen Zellkultursystemen wurden deren intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen ausführlich untersucht. Die Somatostatin-Rezeptorsubtypen sind überwiegend über Pertussistoxin (PTX) -sensitive aber auch -insensitive heterotrimere G-Proteine an intrazelluläre Effektorsysteme gekoppelt. Alle Rezeptorsubtypen vermitteln über einen PTX-sensitiven Mechanismus die Hemmung der Adenylatzyklase und somit eine Abnahme der basalen und Forskolin-stimulierten cAMP-Produktion (Kaupmann *et al.*, 1993;

Strnad *et al.*, 1993; Bito *et al.*, 1994; Garcia und Myers, 1994; Siehler und Hoyer, 1999). Außerdem aktivieren alle Subtypen Phosphotyrosin-Phosphatasen (PTP) (Pan *et al.*, 1992; Colas *et al.*, 1992; Buscail *et al.*, 1994; Florio *et al.*, 1994; Reardon *et al.*, 1997). Exprimiert man die Somatostatin-Rezeptorsubtypen rSSTR2, rSSTR3, rSSTR4 und rSSTR5 in *Xenopus*-Oozyten, koppeln sie funktional an G-Protein-gekoppelte einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (GIRK 1), nicht jedoch der rSSTR1 (Kreienkamp *et al.*, 1997). Dagegen konnte bisher nur für den rSSTR4 eine Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂) mit nachfolgender Arachidonsäurefreisetzung demonstriert werden, wenn man ihn in CHO-Zellen exprimiert (Bito *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1994). Stabil in CHO-Zellen exprimiert, führt SSTR4 ebenfalls über einen Src- und Ras-abhängigen Mechanismus zu einer transienten Stimulation der MAP-Kinase und über einen Proteinkinase C (PKC)-abhängigen Reaktionsweg zu einer langandauernden Aktivierung der MAP-Kinase (Bito *et al.*, 1994; Sellers, 1999). Sowohl die Aktivierung der PLA₂ als auch eine Aktivierung der Mitogen-aktivierte (MAP)-Kinase werden über einen PTX-sensitiven Mechanismus vermittelt und können auch durch Wortmannin, einen Inhibitor der Phosphatidyl-inositol-3-Kinase (PI₃K), abgeblockt werden (Sakanaka *et al.*, 1994). Neben SSTR4 führt auch der SSTR1 zu einer Aktivierung der MAP-Kinase (Florio *et al.*, 1999).

Verschiedene Studien erbrachten Hinweise für eine Desensibilisierung und Internalisierung von nativen (Morel *et al.*, 1986; Koenig *et al.*, 1997; Sarret *et al.*, 1999) und rekombinanten (Hukovic *et al.*, 1996; Hipkin *et al.*, 1997; Nouel *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 1997a, b; Kreienkamp *et al.*, 1998; Stroh *et al.*, 2000b) Somatostatinrezeptoren. Es wurden jedoch deutliche Unterschiede in Muster und Effizienz der Internalisierung beobachtet: Für die Rezeptorsubtypen SSTR2a, SSTR2b, SSTR3 und SSTR5 konnte eine schnelle und effiziente Agonist-abhängige Internalisierung nachgewiesen werden. Der SSTR1-Rezeptor wird in Abhängigkeit vom untersuchten Zelltyp zwar nach Ligandenbindung desensibilisiert aber nur spärlich internalisiert. Während der humane SST4-Rezeptor (hSSTR4) nach SST-14 Behandlung in CHO-Zellen internalisiert wurde (Hukovic *et al.*, 1996), konnte für den in HEK293-Zellen exprimierten Ratten-SSTR4-Rezeptor (rSSTR4) weder eine Agonist-abhängige Phosphorylierung und Desensibilisierung noch Internalisierung nachgewiesen werden (Roth *et al.*, 1997a, b). In Mutagenesestudien zeigte sich, dass der rSSTR4 im Gegensatz zum hSSTR4 ein negativ regulatorisches Sequenzelement enthält. Dieses konnte durch C-terminale Deletion entfernt oder durch Mutation eines Threonins an Position 331 zu Alanin unterbrochen werden, was zur Folge hat, dass der Rezeptor nach Agonisten-

stimulierung zwar internalisiert wurde aber nicht wieder an die Zelloberfläche zurück transportiert wird (Kreienkamp *et al.*, 1998). Das Fehlen einer funktionellen Desensibilisierung des rekombinanten rSST4-Rezeptors konnte durch Koexpression des Rezeptors mit einem G-Protein-gekoppelten einwärtsgerichteten Kaliumkanal (GIRK) in *Xenopus* Oozyten bestätigt werden: ein durch Exposition mit SST-14 aktivierter Kaliumstrom war langandauernd und nahm nach Auswaschung des Agonisten nur langsam ab (Kreienkamp *et al.*, 1998). In einem anderen Experiment ließ sich nach intracerebroventrikulärer Gabe von 1 µg SST-14 für den rSSTR2a eine schnelle Internalisierung nachweisen, während für den rSSTR4 dieses Verhalten nicht beobachtet wurde (Schreff *et al.*, 2000).

Ziel dieser Arbeit

Mehrere Studien zeigen, dass die Somatostatinrezeptor-Subtypen sehr unterschiedlich an intrazelluläre Signaltransduktionssysteme koppeln, selbst wenn dies über ähnliche Effektormoleküle geschieht. Dies deutet auf zusätzliche intrazelluläre Faktoren hin, die das subtypspezifische Signalverhalten bestimmen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Proteine identifiziert werden, die intrazellulär mit dem Somatostatinrezeptor-Subtyp 4 interagieren und so seine physiologischen Effekte beeinflussen.

2. Material

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht aufgeführt sind, wurden von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in p.A. Qualität bezogen.

3-Aminotriazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acrylamid	Serva, Heidelberg
N-Acetyl-Glucosamin	Lancaster Synthesis, Frankfurt
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicilin	Ratiopharm, Ulm
Bacitracin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Pepton	Difco, Detroit, USA
BioGel [®] -10	Biorad, München
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Broad Range Molekulargewichtsmarker	New England Biolabs, Frankfurt
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CHAPS	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt,
Coomassie G-250	Serva, Heidelberg
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -D-Deoxymaltosid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxinukleotide	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
FCS	Biother, Kelkheim
Geneticin [®]	Invitrogen, Karlsruhe
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutathion Sepharose 4B FF	Amersham Pharmarcia Biotech, Freiburg
Glyceringelantine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hefe-Extrakt	Difco, Detroit, USA
Hefe-Stickstoffbasis	Difco, Detroit, USA
HEPES	ICN Biomedicals, Eschwege
IPTG	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Serva, Heidelberg
Molekulargewichtsstandard III	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Natriumdeoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	ICN Biomedicals, Eschwege

NHS-Sepharose FF	Amersham Pharmarcia Biotech, Freiburg
Pepstatin A	Serva, Heidelberg
PMSF	Roth, Karlsruhe
Poly D-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein A/G Sepharose	Santa Cruz, Heidelberg
<i>Rainbow Full Range</i> Proteingewichtstandard	Amersham Pharmarcia Biotech, Freiburg
SDS	Roth, Karlsruhe
Sephadex G25	Amersham Pharmarcia Biotech, Freiburg
Sulfolink Coupling Gel	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Somatostatin 14	Bachem, Heidelberg
TLCK	Serva, Heidelberg
Tributylphosphin (200 mM in N-Methyl-2-pyrrolidon)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trasylol	Bayer, Leverkusen
WGA-Agarose	Alexis Deutschland, Grünberg

2.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Roche Diagnostics, Mannheim
Desoxyribonuklease I, RNase-frei (DNase I)	Roche Diagnostics, Mannheim
Lysozym	Serva, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	Life Technologies, Eggenstein New England Biolabs, Bad Schwalbach Roche Diagnostics, Mannheim, Roche Diagnostics, Mannheim
Ribonuklease A, (RNase A)	
Ribonukleaseinhibitor (RNAsin)	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
RNA-Polymerase (T3/T7)	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Polymerase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Polynukleotidkinase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin	Invitrogen, Life Technologies,
Vent®-Polymerase	New England Biolabs, Bad Schwalbach

2.3 Vektoren

pACT 2	BD Biosciences, Heidelberg
pAS 2.1	BD Biosciences, Heidelberg
pBluescript SK(+)	Stratagene, Heidelberg,
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe

pEGFP-C2	BD Biosciences, Heidelberg
pGEMHE	Liman <i>et al.</i> , 1992
pGEX4T2	Amersham Pharmarcia Biotech, Freiburg
pQE30	Qiagen, Hilden
pQE40	Qiagen, Hilden
PSD-95-pEGFP-C1	Dr. Stefan Kindler, Hamburg
NT7-rSSTR4-pcDNA3	Roth <i>et al.</i> , 1997a
NT7-rSSTR4.T331A-pcDNA3	Roth <i>et al.</i> , 1997a

2.4 Antikörper

2.4.1 Primäre Antikörper

Kaninchen-anti-rSSTR1, Antiserum	Dr. S. Schulz, Magdeburg
Kaninchen-anti-rSSTR4-C, Antiserum	Dr. S. Schulz, Magdeburg
Kaninchen-anti-rSSTR4-N, Antiserum	VTH/UKE, Hamburg
Kaninchen-anti-rSSTR5, Antiserum	VTH/UKE, Hamburg
Maus-anti-EGFP, monoklonaler Antikörper	Covance Inc., Prince Town, USA
Maus-anti-myc-tag, monoklonaler Antikörper	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Maus-anti-PSD95, monoklonaler Antikörper Klon K28/85.2	Upstate, Charlottesville, USA
Maus-anti-PSD95, monoklonaler Antikörper Klon K28/43	Upstate, Charlottesville, USA
Maus-anti-T7-tag, monoklonaler Antikörper	Novagen, Schwalbach

2.4.2 Sekundäre Antikörper

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert	Amersham Pharmarcia Biotech, Freiburg
Ziege-Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	Amersham Pharmarcia Biotech, Freiburg
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Cy2 konjugiert	Dianova, Heidelberg
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Cy3-konjugiert	Dianova, Heidelberg
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy2-konjugiert	Dianova, Heidelberg
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy3 konjugiert	Dianova, Heidelberg

2.5 cDNA Bibliotheken

Rattengehirn cDNA-Bibliothek pretransformiert in <i>S. cerevisiae</i> Y187	BD Biosciences, Heidelberg
Rattengehirn cDNA-Bibliothek	BD Biosciences, Heidelberg

2.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind in 5' → 3'-Richtung aufgeführt. Die Angaben zu den Nukleotidpositionen der einzelnen Oligonukleotide beziehen sich jeweils auf die publizierte DNA-Sequenz. Zusätzlich angefügte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen dargestellt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (Universitätskrankenhaus Eppendorf) mit Hilfe eines DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems) synthetisiert.

2.6.1 Allgemeine PCR- und Sequenzierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz
<i>M13 Sequencing Primer</i>	GTAAAACGACGGCCAGT
<i>M13 Reverse Sequencing Primer</i>	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA
<i>SP6 Universal Primer</i>	ATTTAGGTGACACTATAG
<i>T3 Promoter Primer</i>	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
<i>T7 Universal Primer</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGA

2.6.2 Spezifische Primer für PCR- und Sequenzierungsreaktionen

2.6.2.1 SSTR4-Konstrukte

Rattus norvegicus Somatostatinrezeptor 4: Acc.Nr.: NM_013036 (Bruno *et al.*, 1992).

Bezeichnung	Sequenz	Restriktionsenzym	Position
993-for	ATCCATGGACAACCTCCGACGCTCTTTCC	Nco I	993 - 1013
TGA-rev	AAGGATCCCTCAGAAAGTAGTGGTCTTGGTG	BamH I	1192 - 1213

2.6.2.2 PSD95-Konstrukte

Rattus norvegicus PSD-95: Acc.Nr.: X66474 (Kistner *et al.*, 1993).

Bezeichnung	Sequenz	Restriktionsenzym	Position
ATG-for	GAATTC AACATG GACTGTCTCTGTATAGTG	EcoR I	200 - 223
PDZ1-for	ATGGATCCGGGGAATTGGAGTATGAGGAG	BamH I	377 - 397
PDZ1-rev	AACTCGAGTGATCTCCATGACCTTTTCGG	Xho I	665 - 685
PDZ3-for	TTGGATCCCTCGGCGCTACTCCCCTGTGG	BamH I	1073 - 1094
PDZ3-rev	AACTCGAGTGAGCTGTTCCCGAAGATCATG	Xho I	1415 - 1435
1644-for	AGACCGACGACATTGGCTTCATTC	-	1644 - 1667
TGA-rev	AAGCTTATCAGAGTCTCTCTCGGGCTGGG	Hind III	2359 - 2381

2.7 Peptide

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Peptide aufgeführt. Angegeben ist jeweils der im Weiteren verwendete Name für das Peptid und seine Aminosäuresequenz,

sowie das Protein, von dem die Peptidsequenz abgeleitet wurde (Proteinname, Spezies, Datenbank-Nummer, Literaturzitat).

GKAP	IYIPEAQTRL	Genemed Syntheses, San Francisco, USA		
Guanylatkinase-assoziiertes Protein		Ratte	P97836	Kim <i>et al.</i> 1997
GC	KKVCYNIGTMFLRETSL	Dr. Sönke Behrends, Hamburg		
Guanylatzyklase, alpha-2 Kette		Ratte	Q9WVI4	Koglin und Behrends 2000
NMDA	KKLSSIESDV	Genemed Syntheses, San Francisco, USA		
NMDA-Rezeptor Subtyp 2B		Ratte	NP_036706	Monyer <i>et al.</i> 1992
SSTR1	GTCASRISTL	Genemed Syntheses, San Francisco, USA		
Somatostatinrezeptor Subtyp 1		Ratte	P28646	Meyerhof <i>et al.</i> 1991
SSTR2	LLNGDLQTSI	Genemed Syntheses, San Francisco, USA		
Somatostatinrezeptor Subtyp 2		Ratte	P30680	Kluxen <i>et al.</i> 1992
SSTR3	KASTLSHL	Genemed Syntheses, San Francisco, USA		
Somatostatinrezeptor Subtyp 3		Ratte	P30936	Meyerhof <i>et al.</i> 1992
SSTR4	CVPFTKTTTTF	Dr. Friedrich Buck, Hamburg		
Somatostatinrezeptor Subtyp 4		Ratte	P30937	Bruno <i>et al.</i> 1992
TRH	DPVLVHMDIL	Dr. Friedrich Buck, Hamburg		
TRH-Rezeptor Subtyp 1		Ratte	Q01717	de la Pena <i>et al.</i> 1992

2.8 Fertigsysteme

Produkt

CONCERT™ Rapid Plasmid Purification System

ECL

High Pure Plasmid Isolation Kit

Nucleobond AX

pCR-Script™ Amp SK(+) Cloning Kit

QIAEX II Gel Extraction Kit

Qiagen Plasmid Midi Kit

Quick Spin™ Columns

SuperScript™ Preamplification System

Hersteller

Life Technologies, Eggenstein

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Roche Diagnostics, Mannheim

Macherey-Nagel, Düren

Stratagene, Heidelberg

Qiagen, Hilden

Qiagen, Hilden

Roche Diagnostics, Mannheim

Qiagen, Hilden

Produkt	Hersteller
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TRIZOL®-Reagent	Life Technologies, Eggenstein

2.9 Puffer, Lösungen und Medien

2.9.1 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen, Puffer und Medien wurden mit doppelt demineralisiertem Wasser hergestellt.

Acrylamidlösung	30 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	N-N'-Bis-Acrylamid
5x Agarosegel-Ladepuffer	30 % (w/v)	Glycerin
	40 mM	Tris/HCl, pH 8
	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
Antibiotika (Stammlösungen)		
Ampicillin	100 mg/ml	in 1 M Tris/HCl, pH 7,9
Kanamycin-Sulfat	30 mg/ml	in Ethanol
Tetrazyklin	5 mg/ml	in Ethanol
10x Barth	880 mM	NaCl
	10 mM	KCl
	24 mM	NaHCO ₃
	100 mM	HEPES, pH 7,6
	8,2 mM	MgSO ₄
	3,3 mM	Ca(NO ₃) ₂
	4,1 mM	CaCl ₂
Barth-Medium	1/10 (v/v)	10x Barth
	50 µg/ml	Tetrazyklin
	100 µg/ml	Gentamycin
Blockierlösung	5 % (w/v)	fettarmes Milchpulver in TBS-T
Blotpuffer	20 % (v/v)	Methanol
	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris
	0,02 % (w/v)	SDS
Bradfordreagenz	50 % (v/v)	H ₃ PO ₄
	25 % (v/v)	Ethanol
	0,1 % (w/v)	Coomassie G-250
Coomassie-Färbelösung	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,1 % (w/v)	Coomassie G-250

Coomassie-Entfärbelösung	25 % (v/v)	Methanol
	7,5 % (v/v)	Essigsäure
DOC-Puffer	50 mM	Tris/HCl, pH 9,0
	1 % (w/v)	Natriumdeoxycholat
	50 mM	NaF
	20 µM	ZnCl ₂
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	100 µM	PMSF
	1 µg/ml	Pepstatin A
	20 KiE/ml	Trasylol
Glukose-Stammlösung	100 µg/ml	Bactitracin
	40 % (w/v)	Glukose
GSH-Elutionspuffer	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM	red. Glutathion
2x HBS	280 mM	NaCl
	50 mM	HEPES, pH 7,05
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
High-Kalium (hK)	2 mM	NaCl
	96 mM	KCl
	1 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
	5 mM	HEPES, pH 7,5
Homogenisierungspuffer	50 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	EGTA
	200 µg/ml	Bacitracin
	250 µM	PMSF
	200 ki.E./ml	Trasylol
	10 µg/ml	Leupeptin
	2 µg/ml	Pepstatin A
Hypotonischer Puffer	5 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	1 mM	EGTA
	5 mM	MgCl ₂
	10 µg/ml	Leupeptin
	2 µg/ml	Pepstatin A
	200 µg/ml	Bacitracin
	250 µM	PMSF
	200 ki.E./ml	Trasylol
5x Lämmli-Probenpuffer	50 % (v/v)	Glycerin
	10 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	7,5 % (w/v)	SDS
	300 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	0,25 % (w/v)	Coomassie G-250
Tris-Glycin-Laufpuffer	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris/HCl, pH
	0,1 % (w/v)	SDS

Lysepuffer	50 mM 50 mM	Tris/HCl, pH 7,5 NaCl
ND 96	96 mM 2 mM 1 mM 1,8 mM 5 mM	NaCl KCl MgCl ₂ CaCl ₂ HEPES, pH 7,4
Paraformaldehydlösung	4 % (w/v)	Paraformaldehyd in PBS
PBS	137 mM 8,8 mM 2,7 mM 0,7 mM	NaCl Na ₂ HPO ₄ KCl KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Proteaseinhibitoren (Stammlösungen)		
Bacitracin	100 mg/ml	in H ₂ O
Leupeptin	10 mg/ml	in H ₂ O
Pepstatin A	1 mg/ml	in EtOH
PMSF	0,1 M	in Isopropanol
Trasylol (=Aprotinin: 20 µg/ml)	20000 KiE/ml	in H ₂ O
Ringer	115 mM 2,5 mM 1,8 mM 5 mM	NaCl KCl CaCl ₂ HEPES, pH 7,65
RIPA-Puffer	150 mM 50 mM 1 % (v/v) 0,5 % (w/v) 0,1 % (w/v) 5 mM 1 µg/ml 0,2 mM	NaCl Tris/HCl, pH 8.0 NP-40 Natriumdeoxycholat SDS EDTA Pepstatin A PMSF
Salt-Solution	1,2 M 0,06 M	NaCl MgCl ₂
STE-Puffer	10 mM 150 mM 1mM	Tris/HCl, pH 7,4 NaCl EDTA
TAE	100 mM 5 mM	Tris/Acetat, pH 8,0 EDTA
TBS-T	150 mM 50 mM 0,05 % (v/v)	NaCl Tris/HCl, pH 7,9 Tween-20
TELT-Lysepuffer	50 mM 62,6 mM 2,5 mM 0,4 % (v/v)	Tris/HCl, pH 7,5 EDTA LiCl Triton X-100

RF I	30 mM	KOAc, pH 5,8
	50 mM	MnCl ₂
	100 mM	RbCl
	10 mM	CaCl ₂
	15 % (v/v)	Glycerin
RF II	10 mM	MOPS, pH 7,0
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	RbCl
	15 % (v/v)	Glycerin
Trypsin	0,25 mM	Trypsin
	1 mM	EDTA
Versene-Puffer	137 mM	NaCl
	8,8 mM	Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4
	2,7 mM	KCl
	0,7 mM	KH ₂ PO ₄
	1 mM	EDTA
Z-Puffer	60 mM	Na ₂ HPO ₄
	40 mM	NaH ₂ PO ₄
	10 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄
	0,27 % (v/v)	β-Mercaptoethanol

2.9.2 Medien

2.9.2.1 Medien für die Zellkultur

HEK293-Medium	DMEM mit	1g/l Glukose
	10 % (v/v)	FCS (inaktiviert; 30 Min, 56°C)
	100 U/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
Selektionsmedium	HEK-Medium	
	500 µg/ml	G418-Sulfat

2.9.2.2 Medien für Bakterien

LB-Medium	10 g/l	Bacto-Pepton
	10 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefe-Extrakt pH 7,5
Antibiotikazusatz (s. Kap.3.11.2.1):	100 µg/l	Ampicillin
	oder 30 µg/l	Kanamycin-Sulfat
LB-Platten	10 g/l	Bacto-Pepton
	10 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefe-Extrakt
	15 g/l	Bacto-Agar, pH 7,5

Selektionsplatten:

Antibiotikaselektion (s. Kap.3.11.2.1):	100 µg/l oder 30 µg/l	Ampicillin Kanamycin-Sulfat
Blau-Weiß-Selektion (s. Kap.3.11.2.2):	0,84 M 0,24 M	IPTG X-Gal
SOC-Medium	2 % 0,5 % 10 mM 10 mM 20 mM	Bacto-Trypton Hefe-Extrakt MgCl ₂ MgSO ₄ Glucose

2.9.2.3 Medien für Hefen

YPD-Medium	20 g/l 10 g/l 20 g/l 20 g/l	Difco-Pepton Hefe-Extrakt Bacto-Agar Glukose pH 5,8
SD-Medium	6,7 g/l 20 g/l 20 g/l	Difco-Hefe-Stickstoffbasis Bacto-Agar Glukose pH 5,8
SD-Selektionsmedium	6,7 g/l 20 g/l 100 ml/l 20 g/l	Difco-Hefe-Stickstoffbasis Bacto-Agar 10x Aminosäurelösung Glukose pH 5,8

Die Aminosäure, die als Selektionsmarker dienen soll, wird beim Ansetzen der 10x Aminosäurelösung nicht zugesetzt. (s. Kap. 3.35)

10x Aminosäurelösung	200 mg/l 200 mg/l 135 mg/l 300 mg/l 1000 mg/l 300 mg/l 200 mg/l 500 mg/l 2000 mg/l 200 mg/l 300 mg/l 200 mg/l 1500 mg/l	L-Adenin-hemisulfat L-Argenin-HCL L-Histidin-HCl L-Isoleucin L-Leucin L-Lysin-HCl L-Methionin L-Phenylalanin L-Threonin L-Tryptophan L-Tyrosin L-Uracil L-Valin
----------------------	---	---

2.10 Bakterien- und Hefestämme

2.10.1 Bakterienstämme

E. coli

BL21:	<i>F', ompT, hsdSB (r_B⁻, m_B⁻), gal, dcm.</i>	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
CAG626:	<i>F', lon, lacZ8am), trp(am), pho(am) subC(ts), mal(am) rpsL</i>	New England Biolabs, Bad Schwalbach
JM107:	<i>F', traD36, lacI^f, Δ(lacZ)M1,5 proA⁺B⁺/e14(McrA-), Δ(lac-proAB), thi, gyrA96(Nal^r), endA1, hsdR17(r_K⁻, m_K⁺), relA1, supE44</i>	New England Biolabs, Bad Schwalbach
TOP10F':	<i>F' {lacI^f Tn10(Tet^R)}, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔlacX74, Φ80lacZΔM15, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe

2.10.2 Hefestämme

S. cerevisiae

AH109:	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1::GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ.</i>	(James <i>et al.</i> , 1996) BD Biosciences Heidelberg
CG-1945:	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-807, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh^r2, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3::GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ.</i>	(Feilotter <i>et al.</i> , 1994) BD Biosciences Heidelberg
Y187:	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-807, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, mef, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1.</i>	(Harper <i>et al.</i> , 1993) BD Biosciences Heidelberg

2.10.3 Zelllinien

HEK293	ATCC, Rockville, USA
--------	----------------------

2.11 Versuchstiere

<i>Mus musculus</i>	Die Mäuse entstammten der Tierzucht des UKE, Hamburg.
<i>Rattus norvegicus</i> ,	Die Ratten entstammten der Tierzucht des UKE, Hamburg.
<i>Xenopus laevis</i>	Die afrikanischen Krallenfrösche stammten aus der Tierzucht des UKE, Hamburg.

2.12 Sonstiges Zubehör

Dialyse-Schläuche	Serva, Heidelberg
Faltenfilter	Schleicher und Schuell, Dassel
Glasfaser-Mikrofilter GF/C, 25 mm Ø	Whatman, Maidstone, England
Hybond™-N Nylonmembran	Amersham Pharmarcia Biotech, Freiburg
Hybond™-C Nitrozellulosemembran	Amersham Pharmarcia Biotech, Freiburg
3MM Papier (Whatman-Papier)	Whatman, Maidstone, England
NAP™-5 Säulen	Amersham Pharmarcia Biotech, Freiburg
Parafilm® "M"	American National Can, Greenwich, USA
Röntgenfilme X-OMAT AR	Kodak, Rochester, USA
Cronex 5 Medical X-Ray Film	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien

2.13 Geräte

Gerät	Hersteller, Typ
Agarosegelkammern	Amersham Pharmarcia Biotech, Freiburg
Blotapparatur	BioRad, München, Mini Trans-Blot Transfer Cell BioRad, München, Semy Dry Transfer Cell
CO ₂ -Inkubator	Labotect, Göttingen, Forma Scientific Incubator
DNA-Sequenzatoren	Applied Biosystems, Weiterstadt, DNA Sequencer 373 Applied Biosystems, Weiterstadt, DNA Sequencer 377
DNA-Synthesizer	Applied Biosystems, Weiterstadt, DNA Synthesizer 394
Elektrophoresekammer	BioRad, München, Mini-Protean II System
ELISA-Reader	Flow Laboratories, Mannheim, Titertek Multiskan Plus
Geldokumentationsanlage	Cybertech, Berlin
Heizblock	Eppendorf, Hamburg, Thermomixer compact
HPLC-System	Applied Biosystems, Weiterstadt, 130A Separation System
Kühlzentrifugen	Sorvall/du Pont, Bad Homburg, Sorval RC-5B Heraeus Sepatech, Hannover, Minifuge T
Mikroskope:	Leitz, Wetzlar Fluovert Leitz, Wetzlar, Aristoplan Zeiss, Eching, Axiovert 100
Netzgerät	Pharmacia, Freiburg, Constant Power Supply 3000/150

Gerät	Hersteller, Typ
pH-Meter	Knick, Berlin, Calimatic 761
Photometer	Pharmacia, Freiburg, GeneQuant
Sterilbank	Flow Laboratory, Mannheim
Szintillationszähler	Wallac, Turku, Finnland, Wallac1409
Thermocycler	Perkin Elmer, Weiterstadt, Gene-Amp PCR System 2400 Perkin Elmer, Weiterstadt, Gene-Amp PCR System 9600
Tischzentrifuge	Biometra, Göttingen, T-Gradient Eppendorf, Hamburg, Centrifuge 5415C Eppendorf, Hamburg, Centrifuge 5804R
Ultraturrax	Wesarg Medizintechnik, Hamburg
UV-Fixiergerät	Stratagene, Heidelberg, UV Stratalinker 1800
UV-Tisch	Herolab, Wiesloch, UVT 28 M
Wasserbäder	GFL, Burgwedel, Deutschland

3. Methoden

Alle nicht mit Literaturreferenzen versehenen Methoden basieren auf den in Sambrook *et al.* (1989) veröffentlichten Protokollen. Die verwendeten Lösungen sind, soweit sie nicht im Text aufgeführt wurden, in Abschnitt 2.9 aufgelistet.

3.1 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren beruht auf dem Wanderungsverhalten der negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle im elektrischen Feld. Da DNA- und RNA-Moleküle eine konstante Ladungsdichte aufweisen, ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld in erster Näherung ihrer Größe proportional, vorausgesetzt, dass die Bildung von Sekundärstrukturen vermieden werden kann.

3.1.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Agarosegele können zur Analyse und Aufreinigung von doppelsträngiger DNA eingesetzt werden. Die Elektrophorese wird unter pH-neutralen Bedingungen durchgeführt, unter denen DNA-Moleküle eine negative Gesamtladung haben. Sie wandern im Spannungsfeld in Richtung der Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt, neben der Agarosekonzentration und der angelegten Spannung, von der Konformation und der Länge der DNA ab. Bei einer angelegten Spannung von maximal 5 V/cm Elektrodenabstand verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit linearer doppelsträngiger DNA umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl an Basenpaaren. Damit kann, bei gleichzeitig aufgetrenntem Längenstandard, die Länge eines DNA-Fragmentes bestimmt werden. Die Agarose (% w/v = Gelkonzentration) wird in 1x TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer dient, geschmolzen und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Zum Formen von Proben Taschen wird ein Gelkamm entsprechender Größe (Probenvolumina von 10 - 50 µl) an die jeweilige Position eingesetzt. Das erstarrte Gel wird in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die aufzutrennenden Proben werden mit Ladepuffer versetzt, in die Taschen gefüllt und schließlich durch Anlegen einer Spannung von 100 V aufgetrennt. Das Bandenmuster kann aufgrund der Fluoreszenz des Ethidiumbromids, welches zwischen GC-Paaren der Nukleinsäuren interkaliert, im langwelligen UV-Durchlicht (356 nm) sichtbar gemacht und photographiert werden. Die Nachweisgrenze ethidiumbromidgefärbter Agarosegele liegt mit ca. 10 ng DNA sehr niedrig.

3.1.2 Auftrennung von RNA-Molekülen in Formalingelen

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA-Molekülen wurden denaturierende, Formaldehyd-haltige Agarosegele verwendet. Für die Herstellung der 1 %igen Gele wurden 1,5 g Agarose in 110 ml DEPC-behandeltem Wasser durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf 60°C 25 ml deionisiertes Formaldehyd und 15 ml 10x MOPS hinzugegeben. Die RNA wurde zum Auftragen auf das Gel in 12 µl H₂O gelöst und mit 4 µl 5x RNA-Ladepuffer, 2 µl 10x MOPS und 1 µl Ethidiumbromid versetzt. Die Elektrophorese erfolgte unter konstanter Spannung von 100 V mit 1x MOPS als Tankpuffer.

3.2 Fällung von Nukleinsäuren

Die Ausfällung von Nukleinsäuren mit Ethanol beruht auf der Tatsache, dass die Alkalisalze von Nukleinsäuren in einer 70 %igen Ethanol-Lösung unlöslich sind, da eine ausreichende Hydratisierung der ionischen Phosphatgruppen der Nukleinsäuremoleküle nicht mehr gegeben ist. Durch Zugabe von gut löslichen Salzen zu der Nukleinsäurelösung erhöht sich dieser Effekt noch. Vor der Fällung wird die Nukleinsäurelösung mit 0,1 Vol 7,5 M NH₄OAc bzw. 3 M NaOAc, pH 5,2 versetzt, falls nicht schon genügend einwertige Kationen in der Lösung vorhanden sind. Die Nukleinsäuren werden mit dem 2,5-fachen Bettvolumen 96,5 %igem Ethanol versetzt und üN bei -20°C oder alternativ 1 h bei -80°C vollständig ausgefällt. Nach Zentrifugation (20000 g, 4°C, 20 min) wird der Überstand verworfen, das Pellet in kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wird das Präzipitat getrocknet und anschließend in destilliertem Wasser oder in TE aufgenommen.

3.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Inaktivierung und Beseitigung von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen wird eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dabei werden gleiche Volumenteile an wässriger Lösung und equilibriertem Phenol gründlich vermischt. Um die Phasentrennung zu beschleunigen, wird kurz zentrifugiert (20000 g, 5 min, RT). Die wässrige Oberphase wird mehrmals mit Phenol/Chloroform (1:1) behandelt, bis keine Interphase mehr sichtbar ist. Schließlich werden Phenolreste durch eine identisch durchgeführte Extraktion mit Chloroform entfernt und die Nukleinsäuren mit Ethanol aus der wässrigen Phase präzipitiert (s. Kap. 3.2).

3.4 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

3.4.1 Photometrische Messung

Jede Substanz besitzt ein spezifisches Absorptionsspektrum, so dass durch Messung der optischen Dichte im geeigneten Spektralbereich die Konzentration einer Lösung bestimmt werden kann. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Extinktion direkt proportional zur Konzentration und Schichtdicke der Lösung.

Für die Bestimmung der optischen Dichte einer Nukleinsäure-Lösung wird eine geeignete Verdünnung in einer Quarzküvette gegen das verwendete Lösungsmittel als Blindwert vermessen. Es wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Bei einer Einstrahlung von 260 nm entspricht die optische Dichte OD_{260} von 1 näherungsweise einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA und 20 $\mu\text{g/ml}$ an Desoxy-Oligonukleotiden.

3.4.2 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

(Sharp *et al.*, 1973)

Bei geringen Nukleinsäure-Mengen ist die photometrische Bestimmung der Konzentration (s. Kap. 3.4.1) ungeeignet. In solchen Fällen wird die Lösung mit unbekanntem Nukleinsäuregehalt in Anwesenheit einer Vergleichsprobe bekannter Konzentration einer Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap.3.1) unterzogen. Unter UV-Licht wird die Intensität der Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids in beiden Proben und dementsprechend die Nukleinsäure-Menge abgeschätzt.

3.5 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsenzyme waren Endonukleasen vom Typ II (Yuan, 1981). Die große Mehrzahl dieser Restriktionsenzyme spaltet doppelsträngige DNA inmitten oder unmittelbar neben einer spezifischen Erkennungssequenz von 4 bis 8 Nukleotiden Länge und zweifacher Symmetrie. Werden die Phosphodiesterbindungen der beiden Stränge an der gleichen Stelle gespalten, so entstehen glatte Enden. Wird hingegen versetzt geschnitten, so tragen die entstehenden Fragmente 3'- oder 5'-überhängende kohäsive Enden. Die hydrolytische DNA-Spaltung wird nach den Angaben der Restriktionsenzym-Hersteller

durchgeführt, von denen auch die verwendeten Puffer bezogen wurden. Je nach Anzahl, Größe und Mengenbedarf an erwartetem Fragment werden 1 – 10 µg DNA eingesetzt. Pro 1 µg Plasmid-DNA werden 1 U des jeweiligen Enzyms eingesetzt. Das Gesamtvolumen wird so gewählt, dass das Volumen der eingesetzten Enzymlösung 1/10 des Reaktionsansatzes nicht überschreitet. Nach einer Inkubationszeit von 1 – 16 h bei der jeweils optimalen Temperatur (25 - 50°C) wird die Hydrolyse durch Hitze-Inaktivierung bei 65°C für 20 min oder durch Zugabe von 1/5 Volumen 5x Agarosegel-Ladepuffer beendet. Muß ein Plasmid mit zwei Enzymen gespalten werden, die unterschiedliche Pufferanforderungen stellen, so wird zunächst nur mit einer Endonuklease gespalten und der Ansatz nach Ethanolpräzipitation (s. Kap. 3.2) in dem Puffer resuspendiert, in dem dann die zweite Restriktionsspaltung durchgeführt wird.

3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

(QIAEX II Gel Extraction Kit)

Ein möglichst kleines Gelstück mit dem zu isolierenden Fragment wird unter UV-Licht ausgeschnitten, gewogen und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit dem dreifachen Volumen QX1-Puffer und je nach DNA-Menge mit 10 - 30 µl QIAEX II-Suspension versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 50°C wird die QIAEX II-Matrix abzentrifugiert (20000 g, 30 s, RT). Um Agarosereste zu entfernen, wird das Pellet in 0,5 ml Puffer QX1 resuspendiert und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Es folgt das zweimalige Waschen des Pellets durch Resuspendierung in 0,5 ml Puffer PE und Zentrifugation wie oben beschrieben. Danach wird das Pellet für 10 Min bei RT getrocknet. Zur Elution der DNA wird das Pellet in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 resuspendiert und 5 Min bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Abschließend wird die QIAEX II-Matrix abzentrifugiert (20000 g, 30 s, RT) und der Überstand vorsichtig abgenommen.

3.7 Glätten von Einzelstrangüberhängen

Für die direkte Klonierung eines PCR-Produkts (s. Kap. 3.15) oder für die Klonierung eines DNA-Fragmentes in einen Vektor mit glatten Enden müssen die Einzelstrangüberhänge entfernt werden. Das entsprechende DNA-Fragment wird in 50 mM Tris-Cl, pH: 8,8 in Gegenwart von je 2,5 mM dNTPs mit 5 U T4-DNA-Polymerase (1 U/µl) für 45 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wird danach direkt für die Phosphorylierung (s. Kap. 3.8) eingesetzt.

3.8 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von zwei oder mehreren DNA-Fragmenten werden phosphorylierte 5'-Enden benötigt. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide, wie sie für die PCR benutzt werden, und DNA-Fragmente, deren Einzelstrangüberhänge zuvor geglättet wurden (s. Kap. 3.7), besitzen diese Phosphatgruppen nicht und müssen vor einer Ligation phosphoryliert werden. Man bereitet nachfolgenden Ansatz:

x μ l DNA-Fragment
5 μ l 10x T4-PNK-Puffer
2,5 μ l 10 mM ATP-Lösung
1U T4-Poylnukleotid-Kinase (1 U/ μ l)
ad 50 μ l ddH₂O

Nach Inkubation bei 37°C für 1 h sind die Phosphatgruppen angefügt. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion (s. Kap. 3.3) und anschließender Ethanol-fällung (s. Kap. 3.2) können die DNA-Fragmente für die Ligation eingesetzt werden.

3.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei der Ligation (s. Kap. 3.10) die Religation des linearisierten Vektors zu vermeiden, wird die noch vorhandene 5'-Phosphatgruppe an beiden Seiten der Schnittstelle durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten.

1-5 μ g linearisierter Vektor werden mit 7 μ l ddH₂O und 1 μ l 0,1 M Tris-HCl, pH: 8,0 versetzt. Nach Zugabe von 1 μ l alkalischer Phosphatase (0,1 E/ μ l) wird für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit gibt man 40 μ l 0,1 M Tris-HCl, pH: 8,0 hinzu und führt eine Phenol/Chloroform-Extraktion durch. Nach anschließender Ethanol-fällung kann der dephosphorylierte Vektor für die Ligation eingesetzt werden.

3.10 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren

3.10.1 Klonierung von DNA-Fragmenten mit Einzelstrangüberhängen

10 ng linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA werden mit der doppelten Molzahl an isoliertem und gereinigtem Fragment versetzt. In den Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 30 μ l werden 6 μ l 5x Ligationspuffer (250 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM ATP) und 1 U T4 DNA-Ligase gegeben. Nach einer Inkuba-

tion von 1 h bei RT oder ∞ bei 16 °C wird der gesamte Ansatz zur Transformation von kompetenten Bakterien (s. Kap. 3.11.2) eingesetzt.

3.10.2 Klonierung von DNA-Fragmenten mit überhängendem Deoxyadenosinrest

(Shuman 1994; TOPO-TA Cloning-Kit)

Einige hitzebeständige DNA-Polymerasen erzeugen unabhängig vom Template ein 3'-Ende mit einem einzelnen überhängenden Deoxyadenosinrest. Dies macht sich der TOPO-TA Cloning-Kit zunutze, indem der mitgelieferte Vektor an der Insertionsstelle am jeweiligen 3'-Ende einen Überhang von einem einzelnen Deoxythymidinrest aufweist und so die Ligationsrate steigert. Zudem ist an beiden Enden des linearisierten Vektors ein Molekül Topoisomerase I über einen Tyrosinrest (Tyr-272) kovalent mit dem 3'-Phosphat des Deoxythymidin-Überhangs verbunden. PCR-Produkte mit überhängendem 3'-Deoxyadenosin können nun an den Vektor binden. Die freie 5'-OH-Gruppe des PCR-Produktes greift dann die Phosphor-Tyrosin-Bindung an, wobei eine Phosphordiesterbindung zwischen dem Vektor und dem PCR-Produkt geknüpft und die Topoisomerase I freigesetzt wird. Für die eigentliche Reaktion bereitet man nachfolgenden Ansatz:

0,5 bis 4 μ l PCR-Produkt
1 μ l Salt-Solution
ad 5 μ l ddH₂O
1 μ l pCR[®]II-TOPO-Vektor

Man mischt den Ansatz vorsichtig und inkubiert für 5 Min bei RT. Anschließend werden 2 μ l dieser TOPO-Reaktion zu mitgelieferten 100 μ l kompetenter TOP10F'-Bakterien pipettiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (30 s, 42°C) läßt man die Zellen kurz auf Eis stehen. Abschließend gibt man 250 μ l SOC-Medium zu der Transformation und plattiert 50 μ l des Gesamtansatzes auf LB-Amp-Platten aus.

3.10.3 Klonierung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden

10 ng linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA werden mit der fünffachen Molzahl an isoliertem und gereinigtem Fragment versetzt. In den Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 30 μ l werden zudem 6 μ l 5x Ligationspuffer (250 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM ATP) und 1 U T4 DNA-Ligase gegeben. Nach einer Inkubation ∞ bei 16 °C wird der gesamte Ansatz zur Transformation von kompetenten Bakterien (s. Kap. 3.11.2) eingesetzt.

3.11 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*

3.11.1 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

(Hanahan 1983)

5 ml LB-Medium inklusive 15 µg/ml Tetracyclin für die Herstellung kompetenter *E.coli*-Top10F⁺, bzw. 170 µg/ml Chloramphenicol für die Herstellung kompetenter *E.coli*-BL21 werden mit einer Kolonie des entsprechenden *E.coli*-Stammes angeimpft und üN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese üN-Kultur wird in 200 ml LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Bakterien läßt man 10 min auf Eis abkühlen, anschliessend werden die Zellen 5 min bei 4°C mit 3000 g pelletiert und in 60 ml RF I resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das Zellpellet in 8 ml RF II aufgenommen, in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Durch Retransformation einer definierten Menge eines Plasmids wird die Transformationsrate der Zellen überprüft. Die Rate sollte bei mindestens 1x10⁶ Transformanten/µg Plasmid liegen.

3.11.2 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

(Hanahan, 1983)

Zur Transformation werden auf Eis aufgetaute kompetente *E.coli*-Zellen verwendet. Der gesamte Ligationsansatz (s. Kap. 3.10) wird auf Eis zu 100 µl Zellsuspension gegeben. Man mischt vorsichtig und inkubiert 30 min auf Eis. Durch einen Hitzeschock (90 s, 42°C) werden die an der Zelloberfläche haftenden Plasmide in die Bakterien aufgenommen. Nach 10 min Inkubation auf Eis, wird der Ansatz mit 900 µl vorgewärmten (37°C) LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Bakterien mit einem Drygalski-Spatel auf LB-Agarplatten ausplattiert, die Antibiotika (s. Kap. 3.11.2.1) enthalten. Zuvor bestreicht man die auf RT adaptierten LB-Agarplatten mit einer Mischung aus 40 µl 2 % (w/v) IPTG und 40 µl 2 % (w/v) X-Gal. Sowohl die Antibiotika als auch IPTG und X-Gal dienen der Selektion der transformierten Bakterien. Nach Inkubation üN bei 37°C zeigen sich Kolonien. Zur Selektion der Bakterienkolonien werden zwei Verfahren eingesetzt:

3.11.2.1 Selektion durch Antibiotikaresistenz

Zur Transformation eingesetzte Plasmide, die eine Ampicillinresistenz (Amp^R) vermitteln, exprimieren eine β-Lactamase. Dieses Enzym ist in der Lage, Ampicillin oder andere

β -Lactam-Antibiotika durch Spaltung des β -Lactamringes zu inaktivieren. Bakterien, die kein Plasmid enthalten, werden durch Ampicilin im Medium an ihrem Wachstum gehindert, da Ampicilin die Biosynthese der Zellwand inhibiert. Ampicilin wird in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ verwendet.

Zur Transformation eingesetzte Plasmide, die eine Kanamycinresistenz (Kan^{R}) vermitteln, exprimieren eine Aminoglycosid-Phosphotransferase. Dieses Enzym ist in der Lage, Kanamycin-Sulfat und verwandte Antibiotika so zu modifizieren, dass die Interaktion des Antibiotikums mit dem Bakterienribosom unterbunden wird. Bakterien, die kein Plasmid enthalten, werden durch Kanamycin-Sulfat im Medium an ihrem Wachstum gehindert, da Kanamycin-Sulfat die ribosomale Translokation inhibiert. Kanamycin-Sulfat wird in einer Endkonzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ verwendet.

3.11.2.2 Selektion durch α -Kompletierung (Blau-Weiß-Selektion)

Das Wirtsbakterium *E. coli* TOP10F⁺ trägt eine Deletion im Galactose-Operon, die dazu führt, dass lediglich der C-terminale Teil der β -Galactosidase exprimiert werden kann. Dieser ist alleine nicht katalytisch aktiv. Auf dem Plasmid befinden sich zwei Regionen, wobei eine für den N-Terminus der β -Galactosidase und die andere für die Kontrollregion des Galactosidase-Operons kodieren. In Anwesenheit eines Induktors (IPTG) werden die entsprechenden Gene dereprimiert und die transformierte Bakterienzelle kann aus dem exprimierten N-Terminus und C-Terminus der β -Galactosidase eine katalytisch aktive Assoziation bilden. Diese kann X- β -Gal spalten, wobei ein Indigoderivat (blauer Farbstoff) als Reaktionsnebenprodukt freigesetzt wird. Beide Regionen (N-Terminus und Kontrollregion) sind auf dem Plasmid durch die Vielfach-Klonierungsstelle getrennt, so dass es nach dem Einbau von Fremd-DNA (erfolgreiche Ligation) zu einer Insertionsinaktivierung des Gens für den N-Terminus der β -Galactosidase kommt. Bakterien, die ein solches rekombinantes Plasmid tragen, können X- β -Gal nicht umsetzen und erscheinen somit als weiße Kolonie. Nachfolgend sind häufig verwendete Vektoren und ihre Selektionsmarker aufgeführt (siehe auch Anhang):

	Amp^{R}	Kan^{R}	Blau-Weiß
pACT2.1	+	-	-
pAS2	+	-	-
pBlueskriptSK+	+	-	+
pcDNA3-NT7	+	-	-
pCR II-TOPO	+	+	+
pEGFP-C1, C2	-	+	-
pGEX4T2	+	-	-
pGEMHE	+	-	-

3.12 Isolierung von Plasmid-DNA

3.12.1 TELT-Lyse

(Holmes und Quigley, 1981)

Mit sterilen Zahnstochern werden einzelne Bakterienkolonien von Selektions-agarplatten in 3 ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotikakonzentration überführt und üN bei 37°C inkubiert. Je 1,5 ml dieser Übernachtskulturen werden 5 min bei RT mit 20000 g abzentrifugiert. Die pelletierten Bakterien werden in 250 µl TELT-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 25 µl 10 mg/ml Lysozym 5 min bei 0°C inkubiert. Anschließend erfolgt eine Denaturierung für 2 min bei 95°C. Danach wird die Suspension 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend 20 min bei 0°C mit 20000 g abzentrifugiert. Das Pellet, das genomische DNA, Proteine sowie Zellwandreste enthält, wird mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernt. Der Überstand wird mit 250 µl Isopropanol versetzt und bei 20000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das so erhaltene Präzipitat wird schließlich mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, wie zuvor zentrifugiert und in 50 µl TE oder H₂O aufgenommen. Die mit dieser Methode isolierte Plasmid-DNA wurde für Restriktions- und Sequenzanalysen sowie Ligationen weiterverwendet.

3.12.2 Alkalische Extraktionsmethode für Plasmid-DNA

(Birnboim und Doly, 1979)

3.12.2.1 Qualitative Präparation von Plasmid-DNA

(CONCERT™ Rapid Plasmid Purification System)

Zur Minipräparation von Plasmid-DNA wurde das „CONCERT™ Rapid Plasmid Purification System“ verwendet. Zunächst wird die Bakterienkultur alkalisch lysiert. Nach Neutralisierung erfolgt die Absorption der DNA aus dem geklärten Lysat bei einer hohen Salzkonzentration an eine Silikagel-Membran.

Mit sterilen Zahnstochern werden einzelne Bakterienkolonien von Selektions-Agarplatten in 3 ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotikakonzentration überführt und üN bei 37°C inkubiert. Es werden 3 ml Übernachtskultur nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Plasmid-DNA wird in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert. Die mit dieser Methode isolierte Plasmid-DNA wurde für Restriktions- und Sequenzanalysen sowie Ligationen weiterverwendet.

3.12.2.2 Quantitative Plasmid-Präparation über Säulenchromatographie

(Qiagen Plasmid Midi Kit)

100 - 250 ml einer Übernachtskultur in LB mit entsprechendem Antibiotikum wurden abzentrifugiert (3000 g, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert, mit 10 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) versetzt und genau 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem 10 ml gekühlter Puffer P3 (3 M KOAc pH 5,5) hinzugefügt und gründlich, aber vorsichtig gemischt worden war, erfolgte eine Inkubation bei 0°C für 20 min. Während der folgenden Zentrifugation (10000 g, 20 min, 4°C) wurde die Chromatographiesäule (Qiagen midi tip 100) mit 2 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, 0,15 % Triton X-100, pH 7,0) equilibriert. Der Zentrifugationsüberstand wurde durch einen Faltenfilter gegossen und auf die Säule aufgetragen. Es folgten zwei Waschungen der Säule mit je 10 ml Puffer QC (1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 7,0), worauf bereits die DNA mit 5 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15 % Ethanol, pH 8,5) von der Säule eluiert werden konnte. Nach Zugabe von 0,7 Volumenteilen Isopropanol wurde die DNA durch Zentrifugation (10000 g, 30 min, 4°C) pelletiert. Schließlich wurde das Präzipitat mit 5 ml kaltem 70 %igen Ethanol gewaschen, erneut wie zuvor zentrifugiert und nach kurzem Trocknen in 200 µl TE bzw. H₂O gelöst. Die Nukleinsäure-Konzentration wurde nach photometrischer Messung (s. Kap. 3.4.1) auf 1 µg/µl eingestellt.

3.13 DNA-Sequenzanalyse

Alle rekombinanten Klone, die PCR-amplifizierte DNA-Fragmente enthielten, und cDNA-Klone wurden zusätzlich sequenzanalytisch untersucht. Dies erfolgte im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) mit einem 377 ABI PRISM™ Sequenzierungsautomat (Applied Biosystems). Für die Sequenzierung wurden jeweils 400-500 ng DNA und 15 pmol eines Startermoleküls in einem Volumen von 12 µl eingesetzt.

3.14 Reinigung synthetisch hergestellter Oligonukleotide

Die Reinigung der synthetisch hergestellten Oligonukleotide erfolgt über NAP-5 Säulen, die Sephadex G-25 enthalten. Die Oligonukleotide werden in 550 µl H₂O gelöst und 5 min bei 20000 g zentrifugiert. Die Säule wird mit 3 Säulenvolumen H₂O äquilibriert (≈ 10 ml),

anschließend werden 500 µl der DNA-Lösung auf die Säule pipettiert. Die Elution der Oligonukleotide erfolgt mit 1 ml H₂O.

Alternativ werden die gelösten und zentrifugierten Oligonukleotide nach Zugabe von 55 µl 3 M NaOAc, pH 5,2 und 1 ml 96,5 % Ethanol üN bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (20000 g, 4°C, 20 min) wird der Überstand verworfen, das Pellet in kaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und erneut wie oben zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wird das Präzipitat getrocknet und anschließend in destilliertem Wasser aufgenommen. Die Konzentration der Oligolösung wird photometrisch bestimmt (s. Kap. 3.4.2)

3.15 Spezifische Amplifizierung von Nukleinsäuren durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels dieser Methode ist es möglich, eine bestimmte DNA-Sequenz spezifisch zu amplifizieren. Man benötigt dazu eine thermostabile DNA-Polymerase. Aufgrund der geringen Fehlerrate der hitzestabile Vent®-Polymerase, isoliert aus dem *E.coli*-Stamm der *Pyrococcus* Spezies GB-D, wurde diese Polymerase eingesetzt. Die Kenntnis der Randsequenzen der zu amplifizierenden DNA ist ebenfalls nötig, da nach diesen Randsequenzen Oligonukleotide synthetisiert werden, die zum jeweiligen 3'-Ende des entsprechenden DNA-Stranges komplementär sind. Diese DNA-Stücke dienen der DNA-Polymerase als Startsequenz. Die Reaktion wird in einem Thermocycler automatisiert durchgeführt. Die Polymerasekettenreaktion besteht aus einem Zyklus von drei Einzelreaktionen. Zuerst wird die DNA bei 94°C denaturiert. Anschließend findet bei einer tieferen Temperatur die Hybridisierung der Startsequenz mit der DNA-Vorlage statt und im dritten Schritt entsteht bei einer Temperatur von 72°C durch die eigentliche Polymerasereaktion wieder doppelsträngige DNA. Theoretisch wird die Anzahl der DNA-Moleküle bei jedem Durchgang verdoppelt. Es wurde folgender Ansatz zu einem Gesamtvolumen von 100 µl pipettiert:

10 ng Plasmid-DNA
10 pmol Oligonukleotid 1
10 pmol Oligonukleotid 2
0,5 mM Desoxynukleotide (dNTP's)
10 µl 10x Thermopolpuffer
ad 99 µl ddH₂O
1 µl Vent®-Polymerase (2 U/µl)

Als Kontrolle dient jeweils ein Ansatz ohne Matrizen-DNA. Die Ansätze werden ohne die Polymerase zusammengemischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Erst dann erfolgt die Zugabe des Enzyms.

Folgende Zyklusparameter wurden gewählt:

Denaturierung: 94°C, 30 s
Hybridisierung: 55-65°C, 1 min
Elongation: 72°C; (je nach Länge des zu amplifizierenden
Fragmentes)
Zyklusanzahl: 30 - 35

Am Ende der Kettenreaktion inkubiert man 10 min bei 72°C. Alle während der Kettenreaktion durch Syntheseabbrüche erzeugten, unvollständigen DNA-Sequenzen erhalten so die Möglichkeit, vervollständigt zu werden. Abschließend wird der Ansatz auf 4°C gekühlt. Die Annealing-Temperatur (Anlagerung der Primer) wird ausgehend von der Schmelztemperatur (T_m) der als Primer verwendeten Oligonukleotide gewählt. Für die Abschätzung der Schmelztemperatur gilt:

$$T_m = 4 \times N_{(G+C)} + 2 \times N_{(A+T)} \quad (N: \text{Anzahl der jeweiligen Basen})$$

3.16 *In vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase

(Krieg und Melton, 1984)

Das zu transkribierende DNA-Fragment wurde so in einen Vektor kloniert, dass der kodierende Strang von einem T7 Promotor aus abgelesen werden kann. Der Vektor wird dann mit einem geeigneten Restriktionsenzym hinter dem 3'-Ende des insertierten Fragmentes linearisiert (s. Kap. 3.5), über Phenol/Chloroform-Extraktion (s. Kap. 3.3) gereinigt und schließlich in 20 μ l DEPC-H₂O aufgenommen. Für einen Transkriptionsansatz werden etwa 3 μ g des linearisierten Plasmids eingesetzt. Folgende Komponenten werden zusammengegeben:

10 μ l 5x Transkriptionspuffer
5 μ l 0,1M DTT
2,5 μ l BSA (2 mg/ml)
2,5 μ l Rnasin
5 μ l Nukleotid-Mix
(je 0,5 mM UTP, ATP, CTP und 0,05 mM GTP),
5 μ l 5 mM Cap-Struktur Analog
3 μ g DNA-Template
3 μ l RNA-Polymerase (T3, bzw. T7)

Der Ansatz wird 2 h bei 37°C inkubiert. Um die restliche DNA zu degradieren, werden 1 μ l RQ-DNase dazugegeben und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Ansatz wird zur Beseitigung von Enzymen und Puffern mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit 0,1 Vol 7,5 M NH₄OAc und dem 2,5-fachem Vol. EtOH für 30 min bei -70°C gefällt. Anschlie-

ßend wird die RNA durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 4°C mit 20000 g sedimentiert, zweimal mit 100 µl 70 %igem EtOH (mit DEPC-H₂O) gewaschen, auf Eis getrocknet und in 10 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung sowie die Überprüfung der Intaktheit der RNA erfolgt mit Hilfe eines RNase-freiem Agarosegels

3.17 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 wird in 10 cm² Zellkulturschalen bei 37°C in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Alle 3 Tage wechselt man das gesamte Medium (s. Kap. 2.9.2.1) und einmal pro Woche werden die Zellen geteilt. Dazu nimmt man das alte Medium ab, wäscht die Zellen zweimal mit je 10 ml 1x PBS und inkubiert die HEK293-Zellen mit 2 ml einer 0,25 %igen Trypsin-Lösung für 1 min bei RT. Die Trypsin-Lösung wird abgesaugt und man gibt 8 ml 1x PBS hinzu. Die Zellen werden durch 1-2 maliges Klopfen abgelöst und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellen werden dann 1:10 auf neue Kulturschalen aufgeteilt.

3.18 Transfektion von kultivierten HEK293-Zellen nach der Calciumphosphat-Methode

(Chen und Okayama, 1987)

Ein Tag vor der Transfektion werden die HEK293-Zellen 1:6 geteilt. Für die Transfektion werden dabei jeweils 10 µg Plasmid mit 64 µl 2M CaCl₂-Lösung in einem Gesamtvolumen von 500 µl ddH₂O gemischt. Dieser Ansatz wird anschliessend langsam zu 500 µl HBS-Lösung getropft, während mit einer Pasteurpipette Luftblasen erzeugt werden. Zur Ausbildung des Präzipitates wird der Ansatz für etwa 10-20 min bei RT inkubiert und dann mit Hilfe einer Pipette vorsichtig auf die Kulturschale getropft. Nach einer Inkubation von 3-12 h wird das Medium gewechselt und die Zellen weitere 1-2 Tage kultiviert. Die transfizierten Zellen werden entweder für einen immunocytochemischen Nachweis oder für die Immunpräzipitation verwendet. Sollten die Zellen die eingefügten Proteine stabil exprimieren, werden die Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches das Resistenzgen für den Abbau von Geneticin® (G418-Sulfat) trägt. Geneticin® ist ein Neomycin-Sulfat-Analog, das die Funktion der 80S-Untereinheit des Ribosoms inhibiert und so die Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen unterbindet. Das Resistenzgen codiert für eine Aminoglycosid-Phosphotransferase, die das Antibiotikum so modifiziert, dass eine Interaktion mit dem Ribosom unterbleibt.

Die Zellen werden nach 24 h in normalem HEK293-Medium in Selektionsmedium überführt. Nach etwa 5 Tagen wird erneut das Medium gewechselt. Die Selektion ist nach etwa 10 Tagen abgeschlossen, wenn der Großteil der HEK293-Zellen abgestorben ist. Die verbleibenden HEK293-Zellen haben das transfizierte Plasmid in ihr Genom integriert und sind damit resistent gegenüber Geneticin®.

3.19 Membranpräparation aus HEK293-Zellen

Zur Isolierung von Membranproteinen transfizierter oder nicht-transfizierter HEK293-Zellen werden mindesten zwei konfluent gewachsene 10 cm Zellkulturschalen verwendet. Die Zellen werden mit eiskaltem Versene-Puffer gespült und mit 8 ml Versene-Puffer durch Inkubation bei 37°C abgelöst. Die Zellen werden sedimentiert (3 min, 4°C, 500 g), in 5 ml hypotonem Puffer resuspendiert und in einem Potter durch 20-maliges Auf- und Abbewegen homogenisiert. Die Zellkerne und -trümmer werden durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C mit 1000 g aus dem Homogenat entfernt. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen. Das verbleibende Pellet wird erneut in 3 ml hypotonem Puffer aufgenommen, gepottert und erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 1000 g). Aus den vereinigten Überständen werden die Membranen abzentrifugiert (30 min, 10000 g, 4°C). Die so gewonnenen Membranen werden zur Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

3.20 Immuncytochemischer Nachweis von Proteinen in kultivierten HEK293-Zellen

Transient transfizierte Zellen werden nach 24 h wie unter 3.17 beschrieben abgelöst, auf Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläser (Inkubation mit 300 µl 0,1 mg/ml Poly-D-Lysin-Lösung; 10 min; RT; dreimal mit Wasser waschen, lufttrocknen) in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und für weitere 2 Tage kultiviert. Nach dieser Zeit wird das Medium mit dem gleichen Volumen (500 µl/Loch) 4 %iger Paraformaldehydlösung versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Lösung durch 500 µl/Loch 4 %iger Paraformaldehydlösung ersetzt und nochmals 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden dann dreimal mit 1x PBS gespült. Durch Inkubation mit 1 % Triton X-100 in 1x PBS für 5 min bei RT werden die Zellen permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden unspezifische Bindungsstellen auf den Zellen durch Inkubation in 2 % FCS/PBS für 1 h bei RT blockiert. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper (Maus-anti-T7-TagTM-

Antikörper 1:10000, Maus-anti-myc-Tag-Antikörper 1:5000, oder Kaninchen-anti-SSTR4-Seren 1:2500 in jeweils 2 % FCS/PBS) erfolgt üN bei 4°C. Die Zellen werden am nächsten Tag fünfmal mit 1x PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-Maus Cy3TM-Konjugat 1:600, bzw. anti-Kaninchen Cy2TM-Konjugat 1:600 in jeweils 2 % FCS/PBS) erfolgt für 1 bis 2 h lichtdicht bei RT. Anschliessend wird fünfmal mit 1x PBS gewaschen. Zur Analyse mit Hilfe des konfokalen Laserscan-Mikroskopes werden die Zellen auf den Deckgläschen in Glyceringelantine eingebettet und lichtgeschützt aufbewahrt.

3.21 Immuncytochemie auf kultivierten Hippocampus-Neuronen

Die Neurone wurden von Dr. Matthias Schreff (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Hamburg) kultiviert und mit Paraformaldehyd fixiert. Permeabilisiert werden die Zellen mit 0,3 % Triton X-100 in PBS für 5 min bei RT und anschließend fünfmal mit 1 ml PBS gewaschen. Nach ein- bis zweistündiger Blockierung mit 2 % NGS in 1x PBS werden die Präparate mit den jeweiligen Erstantikörpern (verdünnt mit 2 % NGS in 1x PBS) für zwei Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wäscht man die Zellen fünfmal mit 1x PBS und inkubiert abgedunkelt für eine Stunde mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (anti-Maus Cy3TM-Konjugat 1:600, bzw. anti-Kaninchen Cy2TM-Konjugat 1:600 in jeweils in 2 % NGS in 1x PBS) bei RT. Abschließend wird fünfmal mit 1x PBS gewaschen. Zur Analyse mit Hilfe des konfokalen Laserscan-Mikroskopes werden die Zellen auf den Deckgläschen in Glyceringelantine eingebettet und lichtgeschützt aufbewahrt.

3.22 Mikroskopie

Durch Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mittels Laserstrahlen unter Verwendung spezifischer Filter entsprechend der Fluorophore können die Proteine im Mikroskop analysiert werden. Für die Auswertung der GFP- bzw der Cy2- und der Cy3-Fluoreszens werden nachfolgende Einstellungen bzw. Filter verwendet:

konfokales Laserscan Mikroskop (Zeiss LSM Inverted 410 Axiovert):

Cy2/GFP	Argon-Laser	Extinktion bei 488 nm	Emmissions-Filter 510-525 nm
Cy3	Helium-Neon-Laser	Extinktion bei 543 nm	Emmissions-Filter 570 nm

Aristoplan-Fluoreszenzmikroskop (Leitz):

Cy2/GFP	L5-Filter	Extinktion bei 488 nm	Emmissions-Filter 505 nm
Cy3	N2.1-Filter	Extinktion bei 515-560 nm	Emmissions-Filter 580 nm

Die Spezifität der Fluoreszenz und die Überprüfung der Trennung der beiden Fluorophore mit Hilfe der Filter wird an doppelmakierten Zellen untersucht, die nur eines der beiden Antigene exprimierten.

3.23 Proteinbestimmung nach Bradford

(Bradford, 1976)

Diese Methode beruht auf der elektrostatischen Bindung von Coomassie Blau G250 an die freien Aminogruppen von Proteinen. Der Farbstoff tritt sowohl in roter als auch in blauer Form auf, wobei sich die rote Form nach Bindung an das Protein zu der blauen Form umwandelt. Dies hat eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm zur Folge. Die hohe Empfindlichkeit dieses Testes beruht auf dem hohen Extinktionskoeffizienten des Protein-Farbstoff-Komplexes.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wird in einem Endvolumen von 100 μl durchgeführt. Es wird eine Standardreihe an definierten Proteinkonzentrationen von 0-10 μg BSA/ μl in H_2O erstellt. Jeweils 10 μl der zu vermessenden Proteinlösung sowie die Ansätze der Standardreihe werden in einer 96-Loch Titerplatte mit jeweils 90 μl Bradfordreagenz versetzt, gemischt und etwa 5 min bei RT inkubiert. Anschließend mißt man photometrisch die Extinktionen der Proben im Titertek Multiscan bei einer Wellenlänge von 600 nm. Als Referenzlösung dient eine Lösung aus 10 μl ddH₂O und 90 μl Bradford-Stammlösung. Mittels linearer Regression der Messwerte der Standardreihe wird eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden.

3.24 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Bei diesem Verfahren zur Auftrennung von Proteinen handelt es sich um ein diskontinuierliches Gelsystem. Es besteht aus einem niederprozentigem Sammel- und einem höherprozentigem Trenngel. Das Sammelgel bewirkt eine Fokussierung der Proteinbanden, wäh-

rend das Trenngel eine Auftrennung der Proteine gemäß ihrer Molekulargewichte bewirkt. Der optimale Trennbereich wird über die Wahl der Polyacrylamid-Konzentration bestimmt. Die Verwendung von β -Mercaptoethanol im Probenpuffer bewirkt die Reduktion vorhandener Disulfidbrücken.

Die Geldimensionen betragen 8,0 cm x 7,3 cm x 0,15 cm, wobei das obere Sammelgel etwa 25 % des Gesamtvolumens ausmacht. Die Trenngele wurden in Abhängigkeit von den zu trennenden Proteinen 8 – 15 %ig eingesetzt. Für die Herstellung der Gele wurden folgende Lösungen benutzt:

	<u>Sammelgel</u>		<u>Trenngel</u>		
	5 ml/Gel	8 %	10 %	12 %	15 %
Acrylamidgehalt	3 %	8 %	10 %	12 %	15 %
H ₂ O	1,4 ml	4,6 ml	4,0 ml	3,3 ml	2,3 ml
Acrylamidlösung (30 %)	0,33 ml	2,7 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
0,5M Tris/HCl, pH 6,8	1,25 ml	-	-	-	-
1,5M Tris/HCl, pH 8,8	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS (10 %)	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
APS (10 %)	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	7,5 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l

Die Proben werden mit 1/5 Vol. 5x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Für die Elektrophorese werden die auf Eis abgekühlten Proben neben 5 μ l Proteinmolekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen. Die Proteine werden schließlich bei einer konstanten Spannung (Sammelgel: 100V; Trenngel: 150V) mit SDS-Laufpuffer in der Mini-Protean II Elektrophoresezelle aufgetrennt. Zur Größenabschätzung werden vorgefärbte Protein-Molekulargewichtsstandards verwendet (*Full Range Rainbow Marker*, Amersham-Pharmacia oder *Broad Range Marker*, New England Biolabs).

3.25 Coomassie-Färbung

Nach der Elektrophorese werden die SDS-Gele für 20 min bei RT in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Der nicht gebundene Farbstoff wird mit Hilfe der Coomassie-Entfärbelösung entfernt. Das Gel wird abschließend unter Hitzeeinwirkung zwischen zwei Zellophan-Folien getrocknet.

3.26 Western Blot-Analyse

Die Immobilisierung der durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. Kap. 3.24) aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgt mit Hilfe einer Mini-Trans-Blot Apparatur oder dem *Semi-Dry* Verfahren (*Semy Dry Transfer Cell*, BioRad).

Nach der SDS-PAGE wird das Gel kurz im Blotpuffer äquilibriert und der Blot mit Whatmann-Papier und der entsprechenden Nitrozellulosemembran zusammengebaut. Der Transfer erfolgt in der Mini-Trans-Blot Apparatur bei 4°C und konstanter Spannung (30 V üN oder 100 V 1 h) bzw. bei RT, 10 V, 1 h unter Anwendung des Semy-Dry Verfahrens. Nach beendetem Transfer wird die Membran 30 min bei RT in Blockierlösung geschüttelt, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu minimieren. Anschließend wird mit dem ersten Antikörper, der ebenfalls in Blockierlösung verdünnt wird, für 2 h bei RT oder ü.N. bei 4°C inkubiert. Dann wird die Membran dreimal je 10 min mit TBS-T gewaschen und mit dem zweiten ebenfalls in Blockierlösung 1:2500 verdünnten Antikörper (Schaf-anti-Maus-HRP-Konjugat oder Esel-anti-Kaninchen-HRP-Konjugat) 1h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wird die Immundetektion mit Hilfe des ECL-Reagenz (*Enhanced Chemiluminescence*) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Chemilumineszenzsignal wird auf einem Röntgenfilm festgehalten.

3.27 Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen

Die Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* als Fusionsprotein mit Gluthathion S-Transferase (GST) erlaubt eine schnelle Aufreinigung aus dem bakteriellen Lysat durch Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose. Der GST-Anteil aus *Schistosoma japonicum* hat eine Größe von 26 kDa und bewahrt nach Expression in *E.coli* seine enzymatische Aktivität, falls die Aufreinigung unter nichtdenaturierenden Bedingungen stattfindet. Die Expression wird durch Zugabe von IPTG induziert. Für die Herstellung von GST-Fusionsproteinen werden die gewünschten DNA-Abschnitte in den Vektor pGEX4T-2 kloniert. Die eigentliche Expression wird in *E.coli* BL21- oder *E.coli* CAG626-Zellen durchgeführt. 200 ml LB/Amp-Medium werden mit einer 5 ml Übernachtskultur des entsprechenden Plasmids in *E.coli* BL21- oder *E.coli* CAG626-Zellen angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wird die Proteinexpression induziert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C werden die Bakterien abzentrifugiert (15 min, 5000 g, 4°C) und einmal mit STE-Puffer gewaschen. Die Zellen werden in 10 ml STE mit Protease-Inhibitoren (10 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml

Pepstatin A, 100 µg/ml Bacitracin, 100 µM PMSF, 20 KiE/ml Trasylol) gelöst. Durch Zugabe von 100 µl Lysozym (10 mg/ml), gefolgt von einer 20 minütigen Inkubation auf Eis werden die Bakterien lysiert. Nach Zugabe von 2 ml Triton X-100 (10 % in PBS) wird das Bakterienlysat 20 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wird durch Zentrifugation (30 min, 20000 g, 4°C) geklärt und der Überstand auf 1 ml Gluthation-Sepharose gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 4°C wird die Sepharose fünfmal mit 10 ml STE gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch Inkubation mit 4 ml GSH-Elutionspuffer für 30 min bei 4°C. Anschließend wird abzentrifugiert (5 min, 1000 g, 4°C). Der Überstand wird abgenommen und die Sepharose erneut eluiert. Qualität und Quantität der aufgereinigten Proteine wird durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. Kap. 3.24) und anschließende Coomassie-Färbung (s. Kap. 3.25) überprüft.

3.28 Kopplung von Peptiden an aktivierte Sepharose oder Agarose

Für die Immobilisierung von synthetischen Peptiden an eine feste Matrix werden zwei unterschiedlich aktivierte Matrix-Typen verwendet, zum einen NHS-aktivierte Sepharose und zum anderen Iodacetyl-aktivierte Agarose. Die NHS-aktivierte Sepharose erlaubt die Kopplung über die primäre Aminogruppe des N-Terminus des Peptides, wobei aber auch Aminosäuren koppeln, die in ihrer Seitenkette eine primäre Aminogruppe besitzen (Lysin, Arginin). An Iodacetyl-aktivierte Agarose können Peptide mit freier Sulfhydryl-Gruppe (Cystein) gekoppelt werden. Dabei muß jedoch sichergestellt sein, dass das Peptid nicht über eine Disulfidbrücke dimerisiert ist, da dann eine Kopplung unmöglich ist. Aus diesem Grund wird die Kopplung in Gegenwart von Tributylphosphin (TBP) nach der Methode von Rüegg und Rudinger (1977) durchgeführt, da mit TBP eine reduktive Spaltung von Cystinbrücken möglich ist und gleichzeitig die Kopplung reduzierter Peptide an die Matrix erfolgen kann. Alternativ können Mercaptane zur Reduktion eingesetzt werden. Da diese aber ebenfalls mit der Iodacetyl-aktivierten Agarose reagieren, müssen sie vor der Kopplung abgetrennt werden.

3.28.1 Kopplung von Peptiden an NHS-Sepharose

(NHS-*activated* Sepharose 4 FF, AffiGel 15)

3 mg Peptid werden in 1 ml Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 7,5) gelöst. 1,5 ml Sepharose-Suspension werden dreimal mit 10 ml eiskalter 0,1 M HCl und ein-

mal mit 10 ml Kopplungspuffer gewaschen. Nach Zugabe der Peptidlösung inkubiert man üN bei 4°C. Anschließend wird die Suspension abzentrifugiert (2 min, 1000 g, 4°C). Der Überstand wird abpipettiert und die Matrix dreimal mit 10 ml 0,5 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 gefolgt von 10 ml 0,5 M NaCl, 0,1 M NaOAc pH 4,0 gewaschen, um noch vorhandene NHS-Gruppen zu hydrolysieren. Die Matrix wird zur weiteren Verwendung in 1 Vol 1x PBS mit 20 % (v/v) iso-Propanol gelagert. Die Effizienz der Kopplung wird mittels HPLC (s. Kap. 3.37) ermittelt.

3.28.2 Kopplung von Peptiden an Iodacetyl-aktivierte Agarose

(SulfoLink Coupling Gel)

2 mg Peptid werden in SulfoLink-Kopplungspuffer (5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,0) gelöst. 1 ml Agarose-Suspension wird dreimal mit 10 ml SulfoLink-Kopplungspuffer gewaschen. Die Peptidlösung wird zu der Matrix gegeben und die Suspension mit SulfoLink-Kopplungspuffer auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Um mögliche Peptid-Dimere zu reduzieren, gibt man 80 ml 200 mM Tributylphosphin in N-Methyl-2-pyrrolidon hinzu. Man inkubiert 1 h bei RT. Die Suspension wird abzentrifugiert (2 min, 1000 g, 4°C) und nach Entfernen des Überstandes mit 0,05 M Cystein in SulfoLink-Kopplungspuffer versetzt. Man inkubiert 30 min bei RT, um noch vorhandene Iodacetyl-Gruppen abzublocken. Die Matrix wird abzentrifugiert (2 min, 1000 g, 4°C) und nach Entfernen des Überstandes dreimal mit 10 ml 1 M NaCl gewaschen. Die Matrix wird zur weiteren Verwendung in 1 Vol 1x PBS mit 20 % (v/v) iso-Propanol gelagert. Die Effizienz der Kopplung wird mittels HPLC (s. Kap. 3.37) ermittelt.

3.29 Aufreinigung von IgG-Antikörpern aus Antiserum

3.29.1 Präzipitation von IgG-Antikörpern mit Ammoniumsulfat

Unter gleichmäßigem Rühren gibt man 1 ml gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung zu 2 ml Antiserum. Man inkubiert 4 h bei 4°C auf einem Rotator und zentrifugiert dann ab (20 min, 20000 g, 4°C). Das Pellet wird in 2 ml 33 %iger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gevortext und wie oben zentrifugiert. Nach Lösen des Pellets in 200 μl 1x PBS dialysiert man 48 h bei 4°C gegen 4 l 1x PBS, wobei der Puffer dreimal ausgetauscht wird. Nach der Dialyse werden die IgG-Antikörper bei -20°C gelagert.

3.29.2 Aufreinigung von IgG-Antikörpern mittels Protein A/G-Agarose

(modifiziert nach Ey *et al.*, 1978)

1 ml Antiserum wird mit 6 M NaCl auf eine Endkonzentration von 3,3 M NaCl eingestellt und nach Zugabe von 200 μ l 1 M NaBO₃-Lösung, pH 8,9 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Anschließend gibt man die Lösung über eine Protein A/G-Agarose-Säule. Nachdem das Serum durch die Säule gelaufen ist, wird die Säule 10-mal mit jeweils 1 ml 3 M NaCl, 50 mM NaBO₃-Lösung, pH 8,9 gewaschen. Anschließend wäscht man 10-mal mit jeweils 1 ml 3 M NaCl, 10 mM NaBO₃-Lösung, pH 8,9 und eluiert dann 10-mal mit 500 μ l 100 mM Glycin, pH 3. Die Fraktionen, die die Immunglobuline enthalten, werden mittels *Western* Blot identifiziert und vereinigt. Abschließend dialysiert man 48 h bei 4°C gegen 4 l 1x PBS, wobei der Puffer dreimal ausgetauscht wird. Nach der Dialyse werden die IgG-Antikörper bei -20°C gelagert.

3.30 Immobilisierung von Antikörpern

3.30.1 Kopplung von Antikörpern an NHS-Sepharose

(NHS-*activated* Sepharose 4 FF)

1 mg aufgereinigte IgG-Fraktion (s. Kap. 3.29) werden in 1 ml Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 7,5) gelöst. 1 ml Matrix werden dreimal mit 10 ml eiskalter 0,1 M HCl und einmal mit 10 ml Kopplungspuffer gewaschen. Nach Zugabe der IgG-Lösung zu der Matrix inkubiert man ∞ bei 4°C. Anschließend wird die Matrix abzentrifugiert (1000 g, 2 min, 4°C). Der Überstand wird abpipettiert und die Matrix dreimal mit 10 ml 0,5 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 gefolgt von 10 ml 0,5 M NaCl, 0,1 M NaOAc pH 4,0 gewaschen, um noch vorhandene NHS-Gruppen zu hydrolysieren. Die Matrix wird zur weiteren Verwendung in 1 Vol 1x PBS mit 20 % (v/v) iso-Propanol gelagert.

3.30.2 Kopplung von Antikörpern an Protein A/G-Agarose

50 μ g Protein A/G-Agarose werden mit 4 μ g aufgereinigte IgG-Fraktion (s. Kap. 3.29) versetzt und 2 h bei RT in 1 ml Kopplungspuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM Na₂EDTA, 0,5 % NP-40, pH 8,0) inkubiert. Die Matrix wird abzentrifugiert (1000 g, 3 min, 4°C). Anschließend wäscht man zweimal mit 1 ml 100 mM NaBO₃-Lösung, pH 9,0 und zentrifugiert die Matrix ab (1000 g, 3 min, 4°C) und resuspendiert dann die Matrix in 1 ml 20 mM Dimethylpimelimidat in 100 mM NaBO₃-Lösung, pH 9,0. Nach 30 min Inku-

bation bei RT zentrifugiert man die Matrix ab (1000 g, 3 min, 4°C) und wäscht zweimal mit je 1 ml 3 M NaCl, 100 mM NaBO₃, pH 9,0. Anschließend inkubiert man die Matrix 30 min in 1 ml 200 mM Ethanolamin, 100 mM NaBO₃, pH 9,0 und wäscht dann einmal mit 1 ml 1 x PBS, einmal mit 1 ml 200 mM Glycin, pH 2,5 und abschließend einmal mit 1 ml 1 x PBS. Die Matrix wird in 100 µl 1 x PBS resuspendiert.

3.31 Präparation von Proteinextrakten aus murinen Geweben

Die Versuchstiere werden mit CO₂ betäubt und anschließend dekapitiert. Die Organentnahme erfolgt direkt im Anschluß. Die entnommenen Gewebe werden entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

3.31.1 Präparation einer P2-Membranfraktion

(modifiziert nach Rao und Steward, 1991)

20 Mäusegehirne werden in 40 ml eiskaltem Lysegspuffer (10 mM Tris, 5 mM Na₂EDTA, 3 mM Na₂EGTA, pH 7,4) homogenisiert. Durch Zentrifugation (2000 g, 1 min, 4°C) werden die Zellkerne und die nichtlysierten Zellen abgetrennt. Das Pellet wird erneut in 10 ml eiskaltem Lysepuffer homogenisiert und abzentrifugiert (2000 g, 1 min, 4°C). Die vereinigten Überstände werden erneut zentrifugiert (23000 g, 5 min, 4°C). Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Pellet in 10 ml Lysepuffer aufgenommen. Abschließend wird die Suspension erneut homogenisiert und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

3.31.2 Anreicherung von Glykoproteinen mittels WGA-Agarose

(modifiziert nach Schreff *et al.*, 2000)

Um aus einer solubilisierten Membranpräparation die Glykoproteine partiell anzureichern, wird die Bindung ihrer Kohlenhydratanteile an Weizenkeim-Agglutinin (WGA, *wheat germ agglutinin*) ausgenutzt.

Ein Rattenhirn wird in Homogenisierungspuffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM Na₂EDTA, 3 mM Na₂EGTA, 250 mM Sucrose, pH 7,4) lysiert. Um Zellkerne und unaufgeschlossene Zellen abzutrennen, zentrifugiert man das Homogenat (1000 g, 5 min, 4°C). Die im Überstand befindlichen Membranen werden anschließend durch Zentrifugation (20000 g, 30 min, 4°C) pelletiert. Das Pellet wird dann in Lyse-Puffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM Na₂EDTA, 3 mM Na₂EGTA, 4 mg/ml n-Dodecyl-β,d-Maltosid, 100 µM

PMSF, 1 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Leupeptin, 20 KiE/ml Trasylol, 100 µg/ml Bacitracin, pH 7,4) resuspendiert und 1 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Nichtlösliche Bestandteile werden abzentrifugiert (20000 g, 30 min, 4°C) und der Überstand mit 100 µl WGA-Agarose versetzt. Man inkubiert 1 h bei 4°C und zentrifugiert die WGA-Agarose anschließend ab (500 g, 2 min, 4°C). Die WGA-Agarose wird fünfmal mit kaltem Lyse-Puffer gewaschen. Die Elution der adsorbierten Glykoproteine erfolgt durch 30 min Inkubation bei RT mit 500 µl Lyse-Puffer, der zusätzlich 0,5 M N-Acetyl-D-Glukosamin enthält. Die Elution wird einmal wiederholt. Die vereinigten Eluat werden anschließend für die Immunpräzipitation (s. Kap. 3.32) verwendet.

3.32 Immunpräzipitation

Sowohl aus lysierten HEK293-Zellen als auch aus lysierten Rattengehirnen wird mit Hilfe von immobilisierten Antikörpern die Immunpräzipitation von Proteinen durchgeführt.

3.32.1 Immunpräzipitation aus transfizierten HEK293-Zellen

HEK293-Zellen werden 2-3 Tage nach der Transfektion (s. Kap. 3.18) zweimal mit PBS gewaschen und anschließend zur Lyse der Zellen mit 1 ml RIPA-Puffer pro Kulturschale versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die DNA und unlöslichen Zellbestandteile werden durch Zentrifugation (20000 g, 15 min, 4°C) entfernt. Von dem Überstand werden jeweils 90 µl abgenommen und nach Zugabe von 20 µl 5 x Lämmli-Puffer aufgeköcht. Der restliche Überstand wird mit 20 µl eines entsprechenden immobilisierten Antikörpers versetzt und 2 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Der immobilisierte Antikörper wird abzentrifugiert (1000 g, 2 min, 4°C) und das Pellet fünfmal mit RIPA-Puffer gewaschen. Abschließend wird das Pellet in 40-100 µl 1 x Lämmli-Puffer aufgenommen und 5 min gekocht. Die Analyse von Lysat und Präzipitat erfolgt mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kap. 3.24) und *Western* Blot (s. Kap. 3.26). Alternativ kann zur Immunpräzipitation auch eine Membranpräparation aus transfizierten HEK293-Zellen (s. Kap. 3.18) verwendet werden. Das Pellet einer Membranpräparation aus 2 konfluenten Zellkulturschalen wird in 600 µl Lyse-Puffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM Na₂EDTA, 3 mM Na₂EGTA, 25 mM CHAPS, 100 µM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Leupeptin, 20 KiE/ml Trasylol, 100 µg/ml Bacitracin, pH 7,4) resuspendiert und 2 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Nichtlösliche Bestandteile werden abzentrifugiert (14000 g, 30 min, 4°C). Die weitere Aufarbeitung des Überstandes erfolgt wie oben.

3.32.2 Immunpräzipitation aus Rattengehirn

Die Immunpräzipitation aus Rattengehirn wird mit WGA-Eluaten (s. Kap. 3.31.2) durchgeführt. Jeweils 500 µl WGA-Eluat werden mit 50 µl eines immobilisierten Antikörpers versetzt und 2 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Der immobilisierte Antikörper wird abzentrifugiert (1000 g, 2 min, 4°C) und das Pellet fünfmal in Lyse-Puffer (150 mM NaCl, 20 mM Hepes, 5 mM Na₂EDTA, 3 mM Na₂EGTA, 4 mg/ml n-Dodecyl-β,d-Maltosid, 100 µM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Leupeptin, 20 KiE/ml Trasylol, 100 µg/ml Bacitracin, pH 7,4) gewaschen. Abschließend wird das Pellet in 50 µl 1 x Lämmli-Puffer aufgenommen und 5 min gekocht. Die Analyse von WGA-Eluat und Präzipitat erfolgt mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kap. 3.24) und *Western* Blot (s. Kap. 3.26).

3.33 Peptid-Affinitätschromatografie

Die Affinitätschromatografie wird sowohl mit solubilisierten Membranfraktionen als auch mit aufgereinigten rekombinanten Proteinen durchgeführt. Als Affinitätsmatrix werden die an SulfoLink-Agarose oder NHS-Sepharose immobilisierten Peptide (s. Kap. 3.28) verwendet.

3.33.1 Affinitätschromatografie mit rekombinanten Proteinen

Die Affinitätschromatografie wird mit 2 - 5 µg aufgereinigten rekombinanten Proteinen durchgeführt. Diese werden in 1 ml RIPA-Puffer verdünnt und mit je 25 µl der entsprechenden Affinitätsmatrix versetzt. Man inkubiert 1 h bei 4°C auf einem Rotator und zentrifugiert die Matrix dann ab (1000 g, 2 min, 4°C). Das Pellet wird fünfmal mit je 1,5 ml RIPA-Puffer gewaschen und. Nach Abzentrifugation der Affinitätsmatrix (1000 g, 2 min, 4°C) werden die gebundenen Proteine durch Aufkochen des Pellets in je 50 µl 1 x Lämmli-Puffer eluiert. Die Analyse erfolgt nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Anfärbung der Gele mit Coomassie-Lösung.

3.33.2 Affinitätschromatografie mit solubilisierten Membranfraktionen

(modifiziert nach Husi und Grant, 2001)

Je 500 µl P2-Membranfraktion (s. Kap. 3.31.1) werden mit 10 ml DOC-Puffer oder mit 500 µl 4 % SDS (w/v) inkubiert. Die Solubilisierung der Membranfraktion mit DOC-Puffer erfolgt für 1 h bei 4°C. Die Inkubation mit 2 % SDS wird für 30 min bei RT durchgeführt. Danach erfolgt eine Verdünnung der SDS-Konzentration auf 0,2 % SDS durch Zugabe von

9 ml RIPA-Puffer. Anschließend inkubiert man für 1 h bei 4°C. Beide Ansätze werden zentrifugiert (20000 g, 30 min, 4°C), um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Die Überstände werden mit je 100 µl der Affinitätsmatrix versetzt und für 1 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Nach Abzentrifugation der Matrix (1000 g, 2 min, 4°C) und mehrmaligem Waschen mit dem entsprechenden Puffer werden die gebundenen Proteine durch Aufkochen des Pellets in je 50 µl 1 x Lämmli-Puffer eluiert. Die Analyse erfolgt nach gelelektrophoretischer Auftrennung (s. Kap. 3.24) durch Anfärbung der Gele mit Coomassie-Lösung (s. Kap. 3.25).

3.34 Massenspektroskopie

Massenspektroskopische Untersuchungen sind von dem Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie durchgeführt worden.

Hierfür werden die zu untersuchenden Proteinbanden aus den coomassiegefärbten Polyacrylamid-Gelen ausgeschnitten und intensiv gewässert. Anschließend werden sie im Gel nach der Methode von Shevchenko *et al.* (1996) mit Trypsin verdaut. Nachdem die Peptide extrahiert und über ZipTip_{µ-C18} Säulen (Millipore) gereinigt und konzentriert worden sind, werden sie schließlich mit einem ESI-QToF2 Massenspektrometer (MicroMass, Manchester, UK) analysiert. Die hieraus resultierenden Daten werden mit dem Programm *Mascot MS/MS Ion Search* ausgewertet.

3.35 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System beruht auf der Aufspaltung eines transkriptionellen Aktivatorproteins in einen Teil, der die Bindung an spezifische DNA-Motive (*cis*-regulatorische Elemente) erlaubt, und in einen Teil, der die transkriptionelle Aktivierung vermittelt. Die im Hefe-Zwei-Hybrid-System eingesetzten Hefestämme sind defizient für das entsprechende Aktivatorprotein. In dieser Arbeit wurde das GAL4-Hefe-Zwei-Hybrid-System der Firma Invitrogen eingesetzt, bei dem das Aktivatorprotein GAL4 für die transkriptionelle Regulation der eingesetzten Reportergene verantwortlich ist (Fields und Song, 1989; Chien *et al.*, 1991). Sowohl die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (GAL4-BD) als auch die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) werden durch verschiedene Vektoren kodiert. Die GAL4-BD ist C-terminal mit der für das Köderprotein kodierenden cDNA verbunden. Die cDNA-Bibliothek, in der mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems nach Interaktionspartnern gesucht wird, ist N-terminal an das Gen für die GAL4-AD ligiert.

Nach Kotransfektion in Hefen werden die Proteine exprimiert. Kommt es zu einer Interaktion eines Proteins der cDNA-Bibliothek mit dem Köderprotein wird das GAL4-Protein rekonstituiert und kann die Transkription verschiedener Reportergene aktivieren.

3.35.1 Eingesetzte Selektionsmarker

Die Selektion wird durch das Weglassen von bestimmten Aminosäuren im Medium oder den SD-Platten erreicht, für die in dem entsprechenden Hefestamm, der verwendet wurde, keine endogene Synthesemöglichkeit besteht. Bei den Selektionsmarkern wird zwischen Transformationsmarkern (Anwesenheit des Plasmids in der Hefezelle) und den Interaktionsmarkern (durch Interaktion aktivierte Reportergene) unterschieden.

Sowohl das Plasmid, das für das Köderprotein kodiert (Köderplasmid), als auch das Plasmid, das die cDNA-Klone enthält, ist mit unterschiedlichen Transformationsmarkern ausgestattet. Als Transformationsmarker werden eingesetzt:

pAS2.1 (Köderplasmid):

- TRP1: kodiert für ein Enzym der Tryptophansynthese und erlaubt ein Wachstum bei Abwesenheit von Tryptophan (-Trp).
- CYH^S2: dominantes Wildtypallel des L29-Proteins des Hefe-Ribosoms, das sensitiv gegenüber Cycloheximid ist. Cycloheximid verhindert ein Wachstum, da es die Polypeptidelongation während der Translation inhibiert. (s. Kap. 3.35.5).

pACT2 (enthält die cDNA-Klone):

- LEU2: kodiert für ein Enzym der Leucinsynthese und erlaubt ein Wachstum bei Abwesenheit von Leucin (-Leu).

Da aus dem gemeinsamen Vorhandensein des Köderplasmids und eines cDNA-Klons in einer Hefezelle noch nicht auf eine Interaktion geschlossen werden kann, gibt es zusätzlich noch Interaktionsmarker.

Als Reportergene (Interaktionsmarker) werden eingesetzt:

- ADE2: kodiert für ein Enzym der Adeninsynthese und erlaubt ein Wachstum bei Abwesenheit von Adenin (-Ade).
- HIS3: kodiert für ein Enzym der Histidinsynthese und erlaubt ein Wachstum bei Abwesenheit von Histidin (-His).
- LacZ: kodiert für das Enzym β -Galaktosidase und ermöglicht eine Farbselektion bei Anwesenheit von X- β -Gal (s. Kap. 3.25.4).
- MEL1: kodiert für das Enzym α -Galaktosidase und ermöglicht eine Farbselektion bei Anwesenheit von X- α -Gal (s. Kap. 3.35.4).

Zusätzlich kann 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) eingesetzt werden, ein kompetitiver Inhibitor des HIS3-Proteins aus Hefe. 3-AT wird verwendet, um das durch basale Expression des HIS3-Proteins hervorgerufene Hintergrundwachstum in SD/-His-Medium oder auf SD/-His-Platten zu unterdrücken (Fields, 1993; Durfee *et al.*, 1993). Die zur Inhibition nötige Menge an 3-AT muß für jeden Hefestamm individuell bestimmt werden.

Die eingesetzten Hefestämme (siehe auch Kap. 2.10.2) erlauben den Einsatz unterschiedlicher Selektionsmarker:

CG1945	HIS3 (50 mM 3-AT), LacZ, LEU2, TRP1, CYH ^{S2} .
AH109	ADE2, HIS3 (35 mM 3-AT), MEL1, LacZ, LEU2, TRP1.
Y187	MEL1, LacZ, LEU2, TRP1.

3.35.2 Transformation von Hefezellen

(Gietz und Woods, 1994)

Für die Transformation werden 50 ml YPD mit 6 ml einer ün-Kultur von AH109- oder CG1945-Hefezellen angeimpft und bei 30°C geschüttelt bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 erreicht hat. Die Zellsuspension wird abzentrifugiert (5 min, 1000 g, 4°C). Nach dem Abgießen des Überstandes werden die Zellen in 50 ml H₂O resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend werden die Zellen einmal mit 1 ml 100 mM LiOAc gewaschen und dann mit 100 mM LiOAc auf eine Endkonzentration von 2x 10⁷ Zellen/ml eingestellt. Jeweils 50 µl dieser Zellsuspension werden abzentrifugiert (5 min, 1000 g, 4°C) und das Zellpellet für die Transformation verwendet. Für die eigentliche Transformation pipettiert man nachfolgenden Ansatz in der angegebenen Reihenfolge:

240 µl	50 %iges (w/v) PEG 3350
36 µl	1 M LiOAc
25 µl	Lachsspermien-DNA (2 mg/ml)
50 µl	ddH ₂ O und Plasmid-DNA (bis zu 10 µg)

Anschließend wird die Mischung für 1 min gevortext und dann für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock (30 min, 42°C) werden die Zellen abzentrifugiert (30 s, 5000 g, 4°C) in 1 ml H₂O resuspendiert und auf SD-Selektionsplatten ausgestrichen. Nach erfolgter Transformation werden die positiven Hefeklone auf den entsprechenden SD-Selektionsplatten weiterkultiviert, da ohne Selektion das entsprechend Plasmid mit der Zeit verlorengeht. Der Phenotyp des jeweils transformierten Hefestammes wird durch Ausplattieren auf YPD-Platten und entsprechenden SD-Selektionsplatten (-Trp, -Leu, -Trp/-Ade, -Trp/-His) überprüft.

3.35.3 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

Der eigentliche Hefe-Zwei-Hybrid-Screen wurde auf zwei verschiedene Arten und Weisen durchgeführt, zum einen durch sequentielle Transformation, zum anderen durch *Mating*. Bei der sequentiellen Transformation wird zuerst das Köderplasmid in Hefen transformiert und anschließend die cDNA. Bei einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen durch *Mating* werden zwei Hefestämme mit unterschiedlichem *Mating*-Typ (MATa oder MAT α) eingesetzt. Sowohl das Köderplasmid als auch die cDNA-Bibliothek werden in einen der Hefestämme transformiert. Beim *Mating* bildet sich aus den haploiden Einzelstämmen ein diploider Hefestamm, bei dem jede Hefezelle sowohl das Köderplasmid als auch ein Plasmid aus der cDNA-Bibliothek enthält.

3.35.3.1 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mittels sequentieller Transformation

(Gietz und Woods, 1994)

Der Hefestamm *S. cerevisiae* CG1945 wurde für diese Variante des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens verwendet. Das Köderplasmid wird in die Hefen transformiert (s. Kap. 3.35.2) und die Transformanten auf SD/-Trp-Platten ausplattiert. Mit einer Impföse wird eine einzelne Hefekolonie von einer SD/-Trp-Platte in 6 ml SD/-Trp-Medium überführt und üN bei 30°C inkubiert. Für die Vorkultur werden 50 ml SD/-Trp-Medium mit dieser üN-Kultur angeimpft und 30 h bei 30°C geschüttelt. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 2000 g, 4°C) und in 50 ml YPD mit 10 µg/ml Kanamycin-Sulfat resuspendiert. Man schüttelt die Zellen bei 30°C bis eine Zellzahl von etwa 2×10^7 Zellen/ml erreicht ist (3–4 h). Die Suspension wird wie oben abzentrifugiert in 25 ml ddH₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 3 ml 100 mM LiOAc resuspendiert und 15 min bei 30°C inkubiert und erneut abzentrifugiert. Für die eigentliche Transformation pipettiert man nachfolgenden Ansatz in der angegebenen Reihenfolge zu dem Zellpellet:

2400 µl 50 %iges (w/v) PEG 3350
360 µl 1 M LiOAc
500 µl Lachsspermien-DNA (2 µg/µl)
100 µl cDNA-Bibliothek (0,5 µg/µl)
240 µl ddH₂O

Anschließend wird die Mischung für 2 min gevortext und dann für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock (30 min, 42°C) werden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1000 g, 4°C) in 10 ml H₂O resuspendiert und jeweils 500 µl auf SD/-His (+50 mM 3-AT)/-Leu/-Trp-Platten (TDO-Platten) ausplattiert und für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert und die gewachsenen Kolonien dann auf neue TDO-Platten überführt. Zur Kontrolle der

Transformationseffizienz werden aus jedem Transformationsansatz 1 bzw. 10 µl auf SD/-Trp/-Leu-Platten ausplattiert. Das ermöglicht die Bestimmung der Transformationsrate und die Abschätzung der untersuchten Interaktionen.

3.35.3.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen durch *Mating*

(*Pretransformed MATCHMAKER Libraries User Manual*, BD Biosciences)

Die Hefestämme *S. cerevisiae* AH109 und Y187 wurden für diese Variante des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens benutzt. Das Köderplasmid wird in AH109 transformiert (s. Kap. 3.35.2) und die Transformanten auf SD/-Trp-Platten ausplattiert. Mit einer Impföse wird eine einzelne Hefekolonie von einer SD/-Trp-Platte in 6 ml SD/-Trp-Medium überführt und üN bei 30°C inkubiert. Für die Vorkultur werden 50 ml SD/-Trp-Medium mit dieser üN-Kultur angeimpft und etwa 30 h bei 30°C geschüttelt. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1000 g, 4°C) und mit SD/-Trp-Medium auf ein Zellzahl von etwa 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. 5 ml dieser Zellsuspension werden zusammen mit 1 ml einer in *S. cerevisiae* Y187 vortransformierten Rattengehirn cDNA-Bibliothek (*Pretransformed MATCHMAKER Library*, BD Biosciences) in einen 2 l Erlenmeyer-Kolben zu 45 ml 2x YPD-Medium mit 3‰(w/v) Adenin-Hemisulfat und 10 µg/ml Kanamycin-Sulfat (YPDA/Kan) pipettiert und für 24 h bei 30°C und 50 UpM inkubiert. Der *Mating*-ansatz wird abzentrifugiert (10 min, 1000 g, 4°C) und die Zellen werden in 10 ml 0,5x YPDA/Kan vorsichtig resuspendiert. Anschließend wird diese Zellsuspension auf insgesamt 50 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp-Platten (QDO-Platten) ausgestrichen. Die Platten werden für 7-14 Tage bei 30°C inkubiert und die gewachsenen Kolonien dann auf neue QDO-Platten überführt. Zur Titerbestimmung der Hefestämme Y187 und AH109 sowie zur Bestimmung der *Mating*-Effizienz und der Anzahl der untersuchten Klone wird die Zellsuspension schrittweise verdünnt und auf entsprechende Selektionsplatten ausgestrichen.

3.35.4 Galactosidase-Tests

Die beiden Reportergene MEL1 und lacZ erlauben die schnelle Überprüfung der Stärke einer möglichen Proteininteraktion. Dabei wird jeweils eine Galactosidase exprimiert (s. Kap. 3.35.1), die in Gegenwart des entsprechenden Substrates in den Selektionsplatten oder dem Reaktionspuffer eine Blaufärbung hervorruft.

3.35.4.1 α -Galactosidase-Platten-Test

Einzelne Kolonien des *Mating*-Experimentes (s. Kap. 3.35.3.2) werden auf QDO-Platten ausgestrichen, die zusätzlich 5 mg/ml X- α -Gal enthalten. Nach einigen Tagen Inkubation bei 30°C entstehen Kolonien, die abhängig von der Stärke der Proteininteraktion eine unterschiedliche Expression von α -Galactosidase aufweisen und damit eine unterschiedliche Blaufärbung.

3.35.4.2 β -Galactosidase-Filter-Test

Die zu untersuchenden Hefe-Klone werden auf Replikplatten ausgestrichen und für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert. Auf die gewachsenen Kolonien legt man für ca. 5 min einen Nitrozellulose-Filter und drückt diesen leicht an. Anschließend wird der Filter vorsichtig abgezogen, so dass die Kolonien auf dem Filter haften bleiben. Durch Eintauchen des Filters in flüssigen Stickstoff werden die anhaftenden Kolonien permeabilisiert. Anschließend wird der Filter kurz an der Luft getrocknet und danach mit der Kolonien-seite nach oben auf ein mit Z-Puffer getränktes Whatmanpapier gelegt und bis zur Blaufärbung der ersten Kolonien bei 30°C inkubiert.

3.35.5 Herstellung von Plasmid-Segregaten

Die Hefen enthalten nach dem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen sowohl das Köderplasmid als auch ein Plasmid aus der cDNA-Bibliothek. Um bei der nachfolgenden Identifizierung der Interaktionspartner (Plasmide aus der cDNA-Bibliothek) die Zahl der zu untersuchenden Klone zu reduzieren, wird vor der Plasmidisolierung aus den Hefe-Klonen (s. Kap. 3.35.6) auf eine Segregation des Köderplasmides selektiert. Da die für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen eingesetzten Vektoren alle mit einer Ampicillin-Resistenz ausgestattet sind, ist dies in *E.coli* aufwendiger.

Für die Herstellung von Plasmid-Segregaten wird auf den natürlichen Verlust des unselektierten Plasmids zurückgegriffen. Lässt man Hefen für mehrere Generationen auf SD-Platten wachsen, die die als Selektionsmarker eingesetzte Aminosäure enthalten, so tritt bei etwa 10 - 20 % der nachfolgenden Generation ein Verlust des unselektierten Plasmides auf. Zusätzlich kann eine Cycloheximid-Selektion durchgeführt werden. Die ist allerdings nur in cycloheximidresistenten Hefestämmen möglich (z.B.: CG1945). Diese tragen eine Mutation in einem ribosomalen Protein (CYH2), das zu der Resistenz gegenüber Cyclohe-

ximid führt. Das Köderplasmid enthält das dominante Wildtypallel dieses ribosomalen Proteins, das sensitiv gegenüber Cycloheximid ist. Hefezellen, die sowohl das sensitive als auch das resistente CYH2-Allel tragen, werden in ihrem Wachstum durch Cycloheximid behindert (Guthrie und Fink, 1991).

3.35.5.1 Herstellung von Plasmid-Segregaten durch natürlichen Verlust

Man impft 3 ml SD/-Leu-Medium mit einer Hefekolonie an und inkubiert unter Schütteln 1-2 Tage bei 30°C. Anschließend wird ein Aliquot dieser Flüssigkultur auf SD/-Leu-Platen ausgestrichen und für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert.

3.35.5.2 Herstellung von Plasmid-Segregaten durch Cycloheximid-Selektion

Man impft 3 ml SD/-Leu-Medium mit einer Hefekolonie an und inkubiert unter Schütteln 1-2 Tage bei 30°C. Anschließend wird ein Aliquot dieser Flüssigkultur auf SD/-Leu-Platen ausgestrichen, die 1 µg/ml Cycloheximid enthalten. Man inkubiert für 4-5 Tage bei 30°C bis erste Kolonien sichtbar sind.

3.35.6 Plasmidisolierung aus Hefezellen

(modifiziert nach Robzyk und Kassier, 1992)

3 ml SD/-Leu-Medium werden mit der zu untersuchenden Hefekolonie angeimpft und üN bei 30°C geschüttelt. 2 ml dieser üN-Kultur werden abzentrifugiert (5 min, 5000 g, 4°C) und das Pellet in 100 µl STET-Puffer resuspendiert. Man gibt etwa 0,2 g Glasperlen (425-600 microns, Sigma) hinzu, vortext den Ansatz für 5 min und gibt dann weitere 100 µl STET-Puffer dazu. Anschließend erfolgt eine Denaturierung für 3 min bei 95°C. Danach wird die Suspension 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend 10 min bei 0°C mit 20000 g abzentrifugiert. 120 µl des Überstandes werden nach Zugabe von 60 µl 7,5 M NH₄OAc für 1 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wird erneut wie oben abzentrifugiert und 120 µl des Überstandes mit 240 µl 4°C kaltem 96,5 %igem Ethanol versetzt. Man inkubiert diesen Ansatz 30 min bei -70°C, zentrifugiert erneut wie oben ab und wäscht das Pellet mit 300 µl 70 %igem Ethanol. Das DNA-Pellet wird in 100 µl H₂O aufgenommen und abschließend mit Hilfe des QIAEX II Agarose Gel Extraktion Kits entsalzt. Dazu versetzt man das Eluat mit 100 µl Puffer QX1-Puffer und mit 10 µl QIAEX II-Suspension. Nach einer Inkubation von 5 min bei 50°C wird die QIAEX II-Matrix abzentrifugiert (20000 g,

30 s, RT). Es folgt das zweimalige Waschen des Pellets durch Resuspendierung in 0,5 ml Puffer PE und Zentrifugation wie oben. Danach wird das Pellet für 10 min bei RT getrocknet. Zur Elution der DNA wird das Pellet in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 resuspendiert und 5 min bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Abschließend wird die QIAEX II-Matrix abzentrifugiert (20000 g, 30 s, RT) und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die so gewonnene DNA wird zur Transformation kompetenter *E.coli* TOP10F' eingesetzt (s. Kap. 3.12.2). Nach erfolgreicher Transformation und Plasmidisolation aus *E.coli* TOP10F' wird die isolierte DNA durch Sequenzierung bzw. durch einen Verdau mit Restriktionsendonukleasen weiter charakterisiert.

3.36 Messung von Ionenkanälen an injizierten *Xenopus*-Oozyten

(Methfessel *et al.*, 1986; Kreienkamp *et al.*, 1997)

Durch *in vitro*-Transkription (s. Kap. 3.16) von entsprechenden cDNA-Plasmiden wird *sense*-mRNA hergestellt, die für die Injektion in Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* eingesetzt wird. Die zu analysierenden Proteine werden in den injizierten Oozyten während einer Inkubationszeit von bis zu einer Woche exprimiert. Das System erlaubt die direkte Messung von Rezeptoren, die an G-Proteine vom Typ Gq/11 koppeln, da nach Agonistenstimulierung durch Aktivierung von Phospholipase C über den Inositolphosphatweg die Freisetzung von Ca²⁺ initiiert wird. Die Messung von Rezeptoren, die an G-Proteine vom Typ Gi koppeln, wird durch Koexpression eines Kalium-Kanals möglich, da es nach Expression der GIRK 1-Untereinheit (*G-Protein gated inwardly rectifying potassium channel*) und Assoziation mit einer endogen vorhandenen Untereinheit zur Ausbildung eines funktionellen Kalium-Kanals kommt. Durch Agonistenstimulierung des Rezeptors kommt es durch das G_{βγ}-Heterodimer des G-Proteins zur Öffnung des Kalium-Kanals. Das Prinzip des Messverfahrens besteht nun darin, dass das Membranpotential konstant gehalten wird und die durch die Membran fließenden Ionenströme gemessen werden. Dazu wird eine Oocyte mit zwei Glas-Mikrokapillarelektroden (Spitzendurchmesser 5–10 µm, Widerstand 2–10 MΩ, Elektrolytlösung 3 M KCl) angestochen, von denen die eine zur Messung des konstant auf etwa -60 mV gesetzten Membranpotentials dient, die andere den zur Beibehaltung des gewählten Potentials erforderlichen Strom vermittelt. Bei konstantem Membranpotential fließt dann durch diese Elektrode in umgekehrter Richtung genau soviel Strom wie über die gesamte Membranoberfläche der Oocyte.

Die Messung des durch Gq/11 erzeugten Stroms erfolgt in ND 96-Medium, während die Messung des durch Gi erzeugten Stroms in HK-Medium (*high kalium*) erfolgt. Durch Zugabe einer hohen Konzentration an K^+ -Ionen wird der Diffusionsgradient für K^+ -Ionen aufgehoben. Nach Erreichen des Gleichgewichts erhöht die Zugabe von Agonisten die Leitfähigkeit der Membran für K^+ -Ionen durch Öffnung der Kalium-Kanäle.

Pro Oozyte werden ca. 50 nl (0,04 ng/nl) der *in vitro* transkribierten RNA-Lösung injiziert. Als Nährmedium diente 1 x Barth, versetzt mit den Antibiotika Gentamycin, Penicillin und Streptomycin zu jeweils 100 $\mu\text{g/ml}$. Die injizierten Oocyten werden im Brutschrank bei 19°C aufbewahrt und das Nährmedium täglich gewechselt.

3.37 reversed phase-HPLC

Die Verifizierung der Peptidkopplungen (s. Kap. 3.28) erfolgte mit Hilfe der *reversed phase*-HPLC, die jeweils mit Aliquots der Peptidlösungen vor und nach der Kopplungsreaktion durchgeführt wurde. Die Trennung erfolgte auf einer Vydac 300 C18-Säule (100 x 2,1 mm; 5 μm Porengröße). Als Lösungsmittel wurde 0,1 % TFA in Wasser (Puffer A) und 0,085 % TFA in 70 % Acetonitril (Puffer B) verwendet, wobei ein Gradient von 2 - 80 % Puffer B über 60 min bei einer Flußrate 200 $\mu\text{l/min}$ angelegt wurde. Die Detektion der Peptide erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 210 nm.

4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung SSTR4-interagierender Proteine mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Ziel dieser Arbeit war es, neue Interaktionspartner für den Somatostatinrezeptor Subtyp 4 aus *Rattus norvegicus* zu finden. Zu diesem Zweck wurde in einem ersten Ansatz auf das Hefe-Zwei-Hybrid-System (s. Kap. 3.35) zurückgegriffen.

4.1.1 Herstellung des Köderplasmids und Durchführung der Hefe-Zwei-Hybrid-Screens

Das im Hefesystem eingesetzte Köderplasmid wurde über PCR unter Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide hergestellt. Als Matrize für die PCR diente die cDNA des SSTR4 der Ratte. Durch enzymatische Spaltung über die Restriktionsschnittstellen BamH I und Nco I wurde das DNA-Fragment, das für den C-Terminus des rSSTR4 kodiert, gerichtet in das Köderplasmid pAS2.1 inkloniert (siehe Anhang).

Der eigentliche Hefe-Zwei-Hybrid-Screen wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt, zum einen durch sequentielle Transformation (s. Kap. 3.35.3.1), zum anderen durch *Mating* (s. Kap. 3.35.3.2). Bei der sequentiellen Transformation wurde zuerst das Köderplasmid in Hefen transformiert und auf SD/-Trp-Platten selektioniert. Anschließend wurde die cDNA-Bibliothek in Form von Plasmiden (Rattengehirn cDNA-Bibliothek) in einen SSTR4-exprimierenden Hefeklon transformiert. Bei der Methode, die sich der Verpaarung zweier Hefestämme mit unterschiedlichem *Mating*-Typ (MATa oder MAT α) zur Herstellung von Kotransformanten bedient, ist nur die Transformation des Köderplasmids in einen Hefestamm mit entsprechendem *Mating*-Typ nötig, da die cDNA-Bibliothek als Suspension transformierter Hefezellen eingesetzt wird (MATCHMAKER Rattengehirn cDNA-Bibliothek pretransformiert in *S. cerevisiae* Y187). Beim eigentlichen *Mating* bildet sich aus den beiden haploiden Einzelstämmen ein diploider Hefestamm, bei dem jede Hefezelle sowohl das Köderplasmid als auch ein Plasmid aus der cDNA-Bibliothek enthält. In beiden Fällen wurde nach der Ausplattierung auf entsprechenden Selektionsplatten und einer Inkubationszeit von bis zu 14 Tagen bei 30°C eine Auswahl der entstandenen Hefe-

kolonien auf entsprechenden Replikaplaten ausgestrichen. Nach etwa 7 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die Hefekolonien auf ihre Fähigkeit zur Expression von β -Galaktosidase überprüft. Im sogenannten β -Galaktosidase-Test (s. Kap. 3.35.4.1) färben sich Kolonien mit einer funktionellen Interaktion blau. Aus diesen Hefeklonen wurden nach Herstellung von Plasmidsegregaten (s. Kap. 3.35.5) die enthaltene Plasmid-DNA isoliert und in kompetente *E. coli* transformiert (s. Kap. 3.11.2). Die Plasmid-DNA wurde aus den transformierten Bakterien mit Hilfe der alkalischen Lyse (s. Kap. 3.12.2.1) isoliert.

Zur Überprüfung der Interaktion mit rSSTR4 wurden die isolierten Plasmide aus der cDNA-Bibliothek und das eingesetzte Köderplasmid in den Hefestamm *S. cerevisiae* CG 1945 bzw. AH 109 kotransformiert, auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen und etwa 7 Tage bei 30°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde parallel eine Kotransfektion der isolierten Plasmide und des Leervektors pAS 2-1 durchgeführt. Waren nach 7 Tagen nur Kolonien auf den Selektionsplatten der Transformation mit dem eingesetzten Köderplasmid nachweisbar, wurde das zur Retransformation eingesetzte Plasmid sequenziert (s. Kap. 3.13) und die Sequenz mit cDNAs bekannter Proteine aus der Datenbank verglichen.

Insgesamt wurden 7 unabhängige Hefe-Zwei-Hybrid-Screens durchgeführt. Die Methode der sequentiellen Transformation wurde bei 6 Screens eingesetzt, wobei jeweils 50 μ g cDNA verwendet wurden. Ein Screen wurde mittels *Mating* durchgeführt. Insgesamt wurden $8,5 \times 10^6$ Klone untersucht. 335 Klone wurden von den Selektionsplatten gepickt. Davon erwiesen sich 160 Klone im β -Galaktosidase-Test als positiv und färbten sich blau. Nach Retransformation mit dem eingesetzten Köderplasmid erwiesen sich 30 Klone als positiv und wurden sequenziert.

Protein	Länge des Proteins	Zahl der unabhängigen Klone	Offenes Leseraster der cDNA-Klone
rZFP105	524 AS	7	AS 328 - 524
rZFP61	555 AS	1	AS 71 - 555
rNIPK	349 AS	1	AS 63 - 349

Tabelle 2: Im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierte Klone.

Dargestellt sind die im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierten möglichen Interaktionspartner des rSSTR4. Angegeben ist der Name des Proteins und seine Länge, sowie die Zahl der unabhängigen Klone und Länge des übersetzten cDNA-Inserts.

Nach dem Vergleich der Sequenzen mit der Datenbank zeigte sich, dass 9 dieser Klone für 3 verschiedene Proteine kodierten, die sich in demselben Leserahmen wie die GAL4 Aktivierungsdomäne (GAL4 AD) befanden (s. Tab. 2). Diese wurden nachfolgend untersucht. Die restlichen cDNA-Klone kodierten für Proteine, die nicht im gleichen Leserahmen wie die GAL4 Aktivierungsdomäne waren. In Hefen wurde somit das entsprechende GAL4 AD-Fusionsprotein nicht exprimiert. Das beobachtete Wachstum der Hefeklone auf den Selektionsplatten ist daher nicht auf eine Interaktion des Proteins mit dem C-Terminus des rSSTR4 zurückzuführen.

Für das Zinkfingerprotein rZFP105 wurden insgesamt 7 Klone gefunden, die jedoch alle identisch waren. Das orthologe Protein aus *Mus musculus* mZFP105 wird während der Spermatogenese im Hoden exprimiert (Przyborski *et al.*, 1998). Es besitzt 11 C₂H₂-Zinkfinger Domänen, die die Bindung des Proteins an DNA vermitteln (Przyborski *et al.*, 1998). Das humane Ortholog hZNF35 ist in einer Reihe von humanen Zelllinien exprimiert und wirkt dort als transkriptioneller Aktivator (Pannuti *et al.*, 1988; Lanfranccone *et al.*, 1992). Das Gen für hZNF35 ist auf dem Chromosomenabschnitt 3p21-22 lokalisiert (Donti *et al.*, 1990; Lanfranccone *et al.*, 1992), der häufig bei Tumoren umgelagert wird (Kok *et al.*, 1987; Zbar *et al.*, 1987; Sato *et al.*, 1991; Ehlen und Dubeau 1990).

Ein weiterer Klon kodierte für das Zinkfingerprotein rZFP61. Das orthologe Protein aus *Mus musculus* wurde in der Augenlinse, Leber, Herz, Niere, Milz und Gehirn von neugeborenen Mäusen nachgewiesen (Brady und Piatigorsky, 1994). Es weist eine KRAB-Domäne (Krueppel-associated box) und acht C₂H₂-Zinkfinger Domänen auf (Brady und Piatigorsky, 1994). Die KRAB-Domäne besteht aus etwa 75 Aminosäuren. Sie kann in zwei Subregionen aufgeteilt werden, die KRAB A und B Box, die durch einen variablen Spacer verbunden sind (Bellefroid *et al.*, 1991). Die Funktion der bisher bekannten Proteine, die eine KRAB-Domäne enthalten, umfaßt transkriptionelle Repression der Promotoren von RNA-Polymerase I, II und III, Bindung und *Splicing* von RNA und die Kontrolle von Funktionen des Zellkerns. Die KRAB-Domäne fungiert dabei als transkriptioneller Repressor (Margolin *et al.*, 1994; Witzgall *et al.*, 1994; Peng *et al.*, 2000; Urrutia, 2003). KRAB-Zinkfingerproteine bilden möglicherweise die größte Gruppe von Transkriptionsfaktoren innerhalb des menschlichen Genoms (Mark *et al.*, 1999).

Für die Kinase rNIPK (*neuronal cell death inducible putative kinase*) wurde ein Klon gefunden. Das Protein wird im Rahmen des programmierten Zelltods von neuronalen PC6-3 Zellen exprimiert (Mayumi-Matsuda *et al.*, 1999). Es besitzt eine Proteinkinase Domäne,

deren Kinaseaktivität bis jetzt nicht nachgewiesen werden konnte (Mayumi-Matsuda *et al.*, 1999). Das orthologe Protein TRB3 (*tribbles homolog 3*) aus *Mus musculus* interagiert mit der Proteinkinase B (PKB) und inhibiert die PKB-vermittelte Insulin-Signaltransduktion (Du *et. al.*, 2003). Diese Ergebnisse konnten allerdings in Rattenhepatocyten nicht reproduziert werden (Iynedjian, 2004).

Für die weiteren Untersuchungen wurden die cDNA-Klone in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-C2 umklontiert (siehe Anhang). Dieser Vektor enthält das Gen für eine GFP-Variante aus *Aequorea victoria* unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und erlaubt die Expression eines autofluoreszierenden Fusionsproteins in eukaryotischen Zellen.

4.1.2 Untersuchung der Interaktionen in transient transfizierten HEK293-Zellen

Da das Hefe-Zwei-Hybrid-System auch falsch-positive Ergebnisse liefern kann, mußten die in diesem System gefundenen Interaktionen in einem anderen System bestätigt werden. Hierzu wurden transient transfizierte HEK293-Zellen verwendet, die sowohl den Rezeptor exprimieren als auch die identifizierten Proteine als EGFP-Fusionsproteine. Kommt es nun auch in diesem System zu einer Proteininteraktion, so kann diese z.B. durch Kolo-kalisierung beider Proteine in der Immuncytochemie nachgewiesen werden. Für die Transfektion (s. Kap. 3.22) wurde ein mit einem N-terminalen T7-Tag versehenes rSSTR4-Konstrukt (NT7-rSSTR4-pcDNA3) verwendet (siehe Anhang). Es erlaubt den Nachweis des Rezeptors in der Immuncytochemie mit Hilfe eines monoklonalen anti-T7-Antikörpers.

Neben der Kotransfektion des Rezeptorplasmids und der entsprechenden EGFP-Konstrukte wurde zur Kontrolle sowohl der Rezeptor als auch das entsprechende EGFP-Konstrukt allein in HEK293-Zellen transfiziert. Die Transfektion der HEK293-Zellen wurde mit jeweils 10 µg der entsprechenden Plasmide durchgeführt. Von jedem Transfektionsansatz wurde nach 3 Tagen jeweils ein Teil der Zellen für die Immuncytochemie ausplattiert (s. Kap. 3.24). Dabei zeigte sich, dass beide Zinkfingerproteine sowohl nach Kotransfektion mit dem Rezeptorkonstrukt als auch nach Einzeltransfektion im Zellkern lokalisiert waren. Eine Kolo-kalisierung der beiden Proteine mit dem membranständigen Rezeptor, in der Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz als gelber Bereich gekennzeichnet, konnte nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 5). Das Protein rNIPK zeigte dagegen eine

cytoplasmatische Verteilung. Nach Kotransfektion mit dem Rezeptor ließ sich allerdings keine Kollokalisierung mit SSTR4 an der Zellmembran nachweisen (s. Abb. 5).

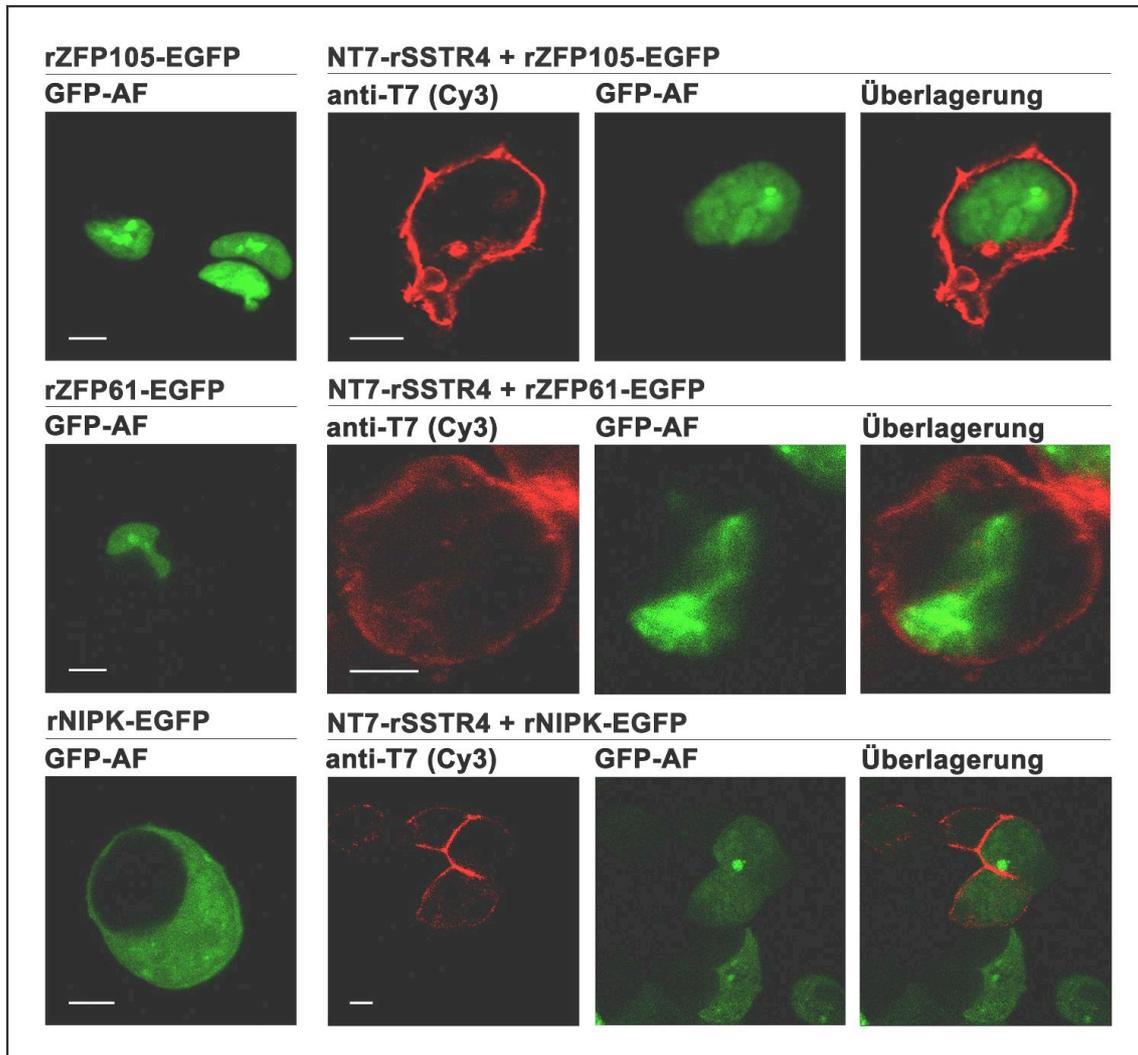


Abbildung 5: Lokalisierung des rSSTR4 und der im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen identifizierten möglichen Interaktionspartner in transfizierten HEK293-Zellen.

HEK293-Zellen wurden mit den aufgeführten Konstrukten transient transfiziert. Der Nachweis von NT7-SSTR4 erfolgt mit einem Maus-anti-T7-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus-IgG-Antikörper [anti-T7 (Cy3): rot], der Nachweis der EGFP-Fusionsproteine erfolgt über die Autofluoreszenz des EGFP-Anteils [GFP-AF: grün]. Für die Aufnahmen wurde ein Laserscanmikroskop verwendet. Der Balken entspricht 5 µm.

Aus den Lysaten der Zellen, die sowohl NT7-SSTR4 als auch ein EGFP-Fusionsprotein exprimierten, konnte mit dem Maus-anti-T7-Antikörper keines der EGFP-Fusionsproteine koimmunpräzipitiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierten möglichen Interaktionspartner sind somit als nicht spezifisch einzustufen.

4.2 Affinitätschromatografische Aufreinigung SSTR4-interagierender Proteine

Da mit Hilfe der Hefe-Zwei-Hybrid-Technik keine Interaktionspartner identifiziert werden konnten, wurden in einem zweiten Ansatz versucht, interagierende Proteine durch Affinitätschromatografie mit einem immobilisierten Peptid aufzureinigen. Diese wurden dann nach Elution von der Matrix und gelelektrophoretischer Auftrennung massenspektroskopisch identifiziert.

4.2.1 Herstellung der Affinitätsmatrix

Vergleicht man die C-Termini der Somatostatinrezeptoren Subtyp 4 aus Mensch, Ratte und Maus miteinander, so fällt auf, dass sich die Rezeptoren in nur wenigen Aminosäuren unterscheiden. Die letzten vier C-terminalen Aminosäuren, -T-T-T-F_{COO}⁻, sind bei allen drei Rezeptoren identisch und entsprechen dem Konsensusmotif für einen Liganden einer PDZ-Domäne der Klasse 1, X-S/T-X-Φ (Hung und Sheng, 2002), wobei X für eine beliebige und Φ für eine hydrophobe Aminosäure steht.

hSSTR4	FLSDNFRRSFQRVLCCLLE GAGGAE EEPLDYATA
rSSTR4	FLSDNFRRSFQRVLCCLLE TTGGAE ^{EE} PLDYATA
mSSTR4	FLSDNFRRSFQRVLCCLLE TTGGAE ^{EE} PLDYATA
	TM 7
hSSTR4	LKS KGGAGC MC PPL KCQ Q EAL Q PEP GR KRI PL TR TTTF
rSSTR4	LKS RGG PG C IC PPL PC Q Q EP M Q AEP A CK RV P FT K TTTF
mSSTR4	LKS RGG AG C IC PPL PC Q Q EP V Q AEP G CK Q V P FT K TTTF
	Peptid SSTR4: C V P F T K T T T F

Abbildung 6: Vergleich der C-Termini der SST4-Rezeptoren aus Mensch, Ratte und Maus.

Dargestellt ist ein Sequenzvergleich der C-terminalen Bereiche der drei homologen Rezeptoren und des vom mSSTR4 und rSSTR4 abgeleiteten Peptids SSTR4. Rot dargestellte Aminosäuren sind zwischen den Spezies variabel. Teile der Transmembrandomäne 7 (TM 7) sind Gelb unterlegt. Das Cystein, das zur Kopplung des Peptids an die Affinitätsmatrix benötigt wird, ist Grün unterlegt.

Das für die Affinitätschromatografie benötigte synthetische Peptid wurde von den letzten 9 C-terminalen Aminosäuren des mSSTR4 und rSSTR4 abgeleitet. Zusätzlich wurde ein N-terminales Cystein angefügt, das für die Kopplung des Peptids an die Agarose benutzt

wurde. Das Peptid wurde im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie von Dr. Fritz Buck synthetisiert. Die Kopplungsreaktionen wurden mit 3 mg Peptid pro 1 ml SulfoLink-Agarose durchgeführt. Vor und nach der einstündigen Inkubation mit SulfoLink-Agarose wurde jeweils ein Aliquot des Reaktionsansatzes mittels *reversed phase* HPLC (s. Kap.3.37) analysiert.

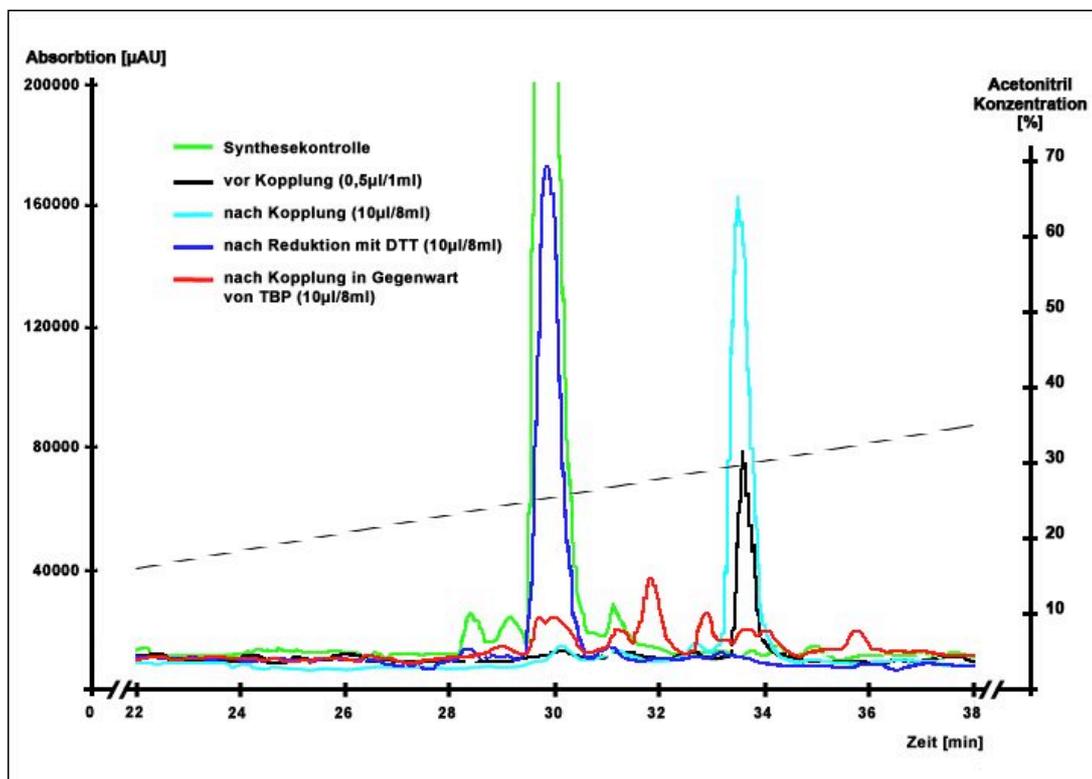


Abbildung 7: HPLC-Chromatogramme der ersten Kopplung des SSTR4-Peptids an SulfoLink-Agarose.

Dargestellt sind jeweils die Chromatogramme der HPLC-Läufe, die nach der Synthese des Peptids (Synthesekontrolle) und mit Aliquots der ersten Kopplungsreaktion durchgeführt wurden. Die Chromatografie erfolgte über eine C₁₈-Säule. Als Lösungsmittel wurde 0,1 % TFA in Wasser (Puffer A) und 0,085 % TFA in 70 % Acetonitril (Puffer B) verwendet, der Gradient wurde als gestrichelte Linie dargestellt. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 210 nm.

Ein Vergleich der Chromatogramme des ersten Kopplungsexperiments zeigte, dass das Peptid nicht an die Matrix gekoppelt hatte. Zudem wies das Peptid verglichen mit dem HPLC-Lauf, der nach der Synthese durchgeführt wurde (Synthesekontrolle), eine andere Retentionszeit auf. Nachdem 10 µl des ersten Kopplungsüberstandes mit 10 µl 1 M DTT 30 min bei 37°C reduziert wurden, konnte eine Verschiebung der Retentionszeit beobachtet werden. Dies zeigt, dass das Peptid nach Ausbildung eine Disulfidbrücke als Dimer vorlag, und deshalb nicht koppeln konnte. Der erste Kopplungsüberstand wurde deshalb mit Tributylphosphin (TBP) in N-Methyl-2-pyrrolidon versetzt und erneut 1 h bei RT in-

kubiert. In der anschließend mit einem Aliquot durchgeführten HPLC zeigte sich, dass das mit TBP reduzierte Peptid nahezu vollständig an die SulfoLink-Agarose gekoppelt hatte. Aus diesem Grund wurde im Weiteren die Kopplung in Gegenwart von TBP nach der Methode von Rüegg und Rudinger (1977) durchgeführt.

4.2.2 Durchführung der Affinitätschromatografie

Die Affinitätschromatografie wurde nach der Methode von Husi und Grant (2001) durchgeführt. Eine P2-Membranpräparation (s. Kap. 3.35.1) aus Mäusegehirn wurde entweder mit 1 % Na-Deoxycholat oder mit 2 % SDS solubilisiert. Während die Solubilisierung mit 2 % SDS die meisten nichtkovalenten Protein-Protein-Interaktionen zerstört, bleiben bei einer Inkubation mit 1 % Na-Deoxycholat auch größere Proteinkomplexe erhalten (Husi und Grant, 2001). Um nach Inkubation mit 2 % SDS eine Bindung interagierender Proteine an die immobilisierten Peptide zu ermöglichen, wurde der SDS-Ansatz mit RIPA-Puffer auf eine SDS-Konzentration von 0,4 % verdünnt.

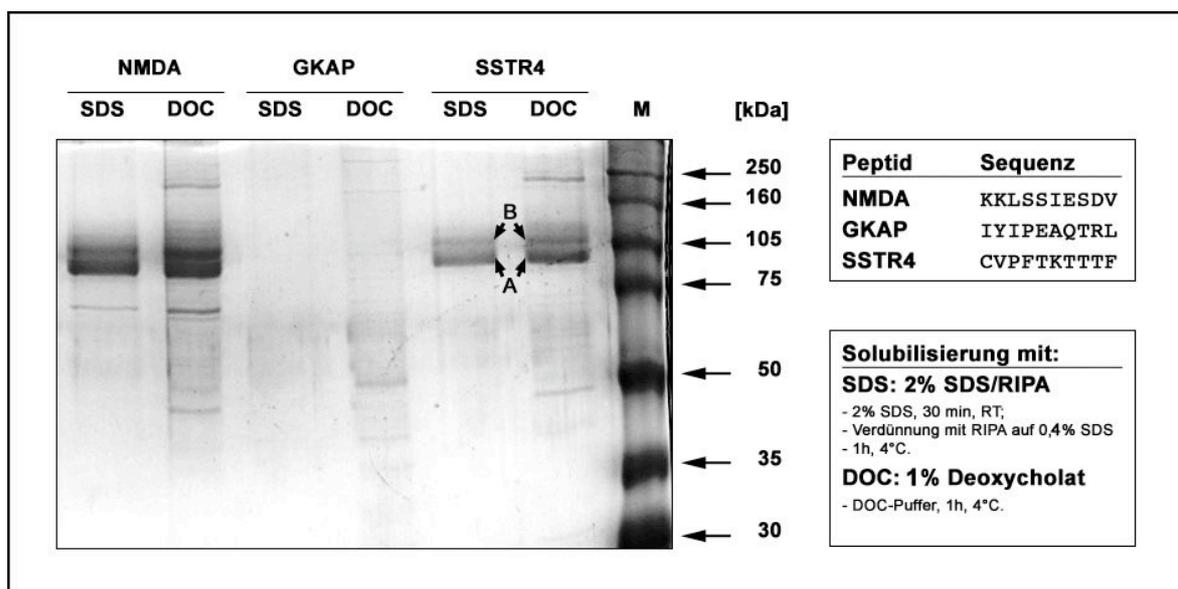


Abbildung 8: Analyse der affinitätschromatografischen Aufreinigung

Mäusegehirn-Membranen wurden entweder mit SDS oder DOC-Puffer solubilisiert und anschließend mit den immobilisierten Peptiden inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden die präzipitierten Proteine gelelektrophoretisch auf einem 10 % Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgt mittels Coomassie-Färbung. Die Banden A und B wurden weiter untersucht.

Die nicht gelösten Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die Überstände mit den immobilisierten Peptiden versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C wurden die Präzipitate intensiv gewaschen, in Probenpuffer aufgeköcht und gelelektrophore-

tisch aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Coomassie-Färbung (s. Abb. 8). Die Proteinbanden A und B wurden ausgeschnitten und nach einem Trypsin-Verdau massenspektroskopisch analysiert (s. Abb. 9). Neben dem SSTR4-Peptid wurden zur Kontrolle C-terminale Peptide von GKAP und der NMDA-Rezeptor Untereinheit 2B (NMDAR-2B) verwendet. Beide besitzen ebenfalls eine Erkennungssequenz für eine PDZ-Domäne der Klasse 1. Das NMDAR-2B-Peptid wurde bereits von Husi und Grant (2001) eingesetzt, um den NMDA-Rezeptorkomplex aufzureinigen. Der C-Terminus von GKAP/SAPAP bindet an die PDZ-Domäne von Shank 1 (Naisbitt *et al.*, 1999).

Nach Solubilisierung sowohl mit Na-Deoxycholat als auch mit SDS konnten mit dem immobilisierten SSTR4-Peptid zwei Proteine bei etwa 90 bzw. 100 kD präzipitiert werden (s. Abb. 8). Diese wurden als PSD-95 (90 kD Bande) und PSD-93 (100 kD Bande) identifiziert (s. Abb. 9). Beide Proteine gehören zur Familie der membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUK). Diese enthalten ein bis drei PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne (Src Homologie-3) und eine Guanylatkinase-ähnliche Domäne, die aber keine katalytische Funktion hat, sondern als Interaktionsdomäne fungiert (z.B.: Kim *et al.*, 1997; Brenman *et al.*, 1998). PSD-95 und PSD-93 werden in hoher Konzentration in der postsynaptischen Dichte von exzitatorischen Neuronen gefunden und interagieren dort u.a. mit dem NMDAR-2B (Kornau *et al.*, 1995). Nach Solubilisierung mit Na-Deoxycholat ließ sich deshalb auch der NMDAR-2B im Präzipitat nachweisen (Proteinbande bei etwa 180 kD). Der NMDAR-2B kopräzipitierte in diesem Fall mit den Proteinen PSD-95 und PSD-93, da diese Interaktion bei der Solubilisierung mit Na-Deoxycholat nicht unterbrochen wird. Eine direkte Interaktion mit dem SSTR4-Peptid kann aber ausgeschlossen werden, da sich der NMDAR-2B nicht im Präzipitat der Solubilisierung mit SDS nachweisen ließ.

Nach Solubilisierung mit Na-Deoxycholat als auch mit SDS präzipitiert das NMDAR-2B-Peptid ebenfalls PSD-95 und PSD-93. Dagegen lässt sich der NMDAR-2B im Präzipitat auch nur nach Solubilisierung mit Na-Deoxycholat nachweisen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Husi und Grant (2001).

Bei der Präzipitation mit dem GKAP-Peptid konnte weder PSD-95 noch PSD-93 im Coomassie gefärbtem Gel nachgewiesen werden.

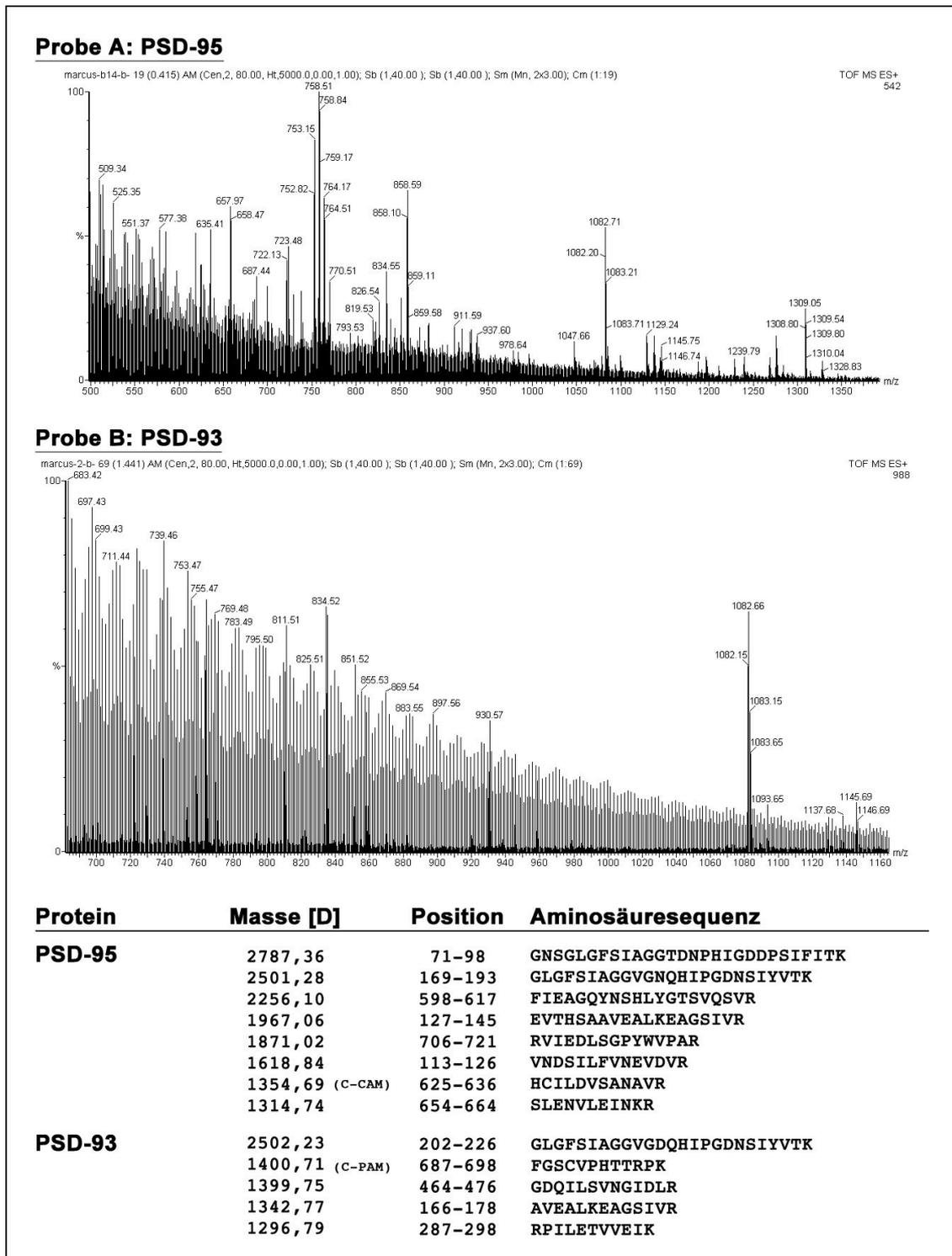


Abbildung 9: Ergebnis der massenspektroskopischen Analyse

Dargestellt sind die Massenspektren der Proteinbanden A und B der SDS-Aufreinigung (s. Abb. 8) nach Trypsin-Verdau. Die Sequenz einzelner tryptischer Peptide wurde mittels Tandem-MS bestimmt. Aufgeführt sind die Massen der tryptischen Peptide in Dalton [D], sowie deren Position und Aminosäuresequenz (PSD-93: Acc.Nr.: AAK64496; PSD-95: Acc.Nr.: NP_031890). C-PAM: Cystein-Acrylamid-Addukt; C-CAM: Carboxyamidomethyl-cystein.

4.3 Interaktion von SSTR4 und PSD-95 in transfizierten HEK293-Zellen

Um die Interaktion zwischen rSSTR4 und rPSD-95 in einem zellulären System zu untersuchen, wurde rPSD-95 entweder in untransfizierte HEK293-Zellen oder in HEK293-Zellen transfiziert, die den mit einem N-terminalen T7-Tag versehenen rSSTR4-Rezeptor stabil exprimieren. PSD-95 wurde als cDNA eingesetzt, die für ein EGFP-Fusionsprotein kodiert (siehe Anhang).

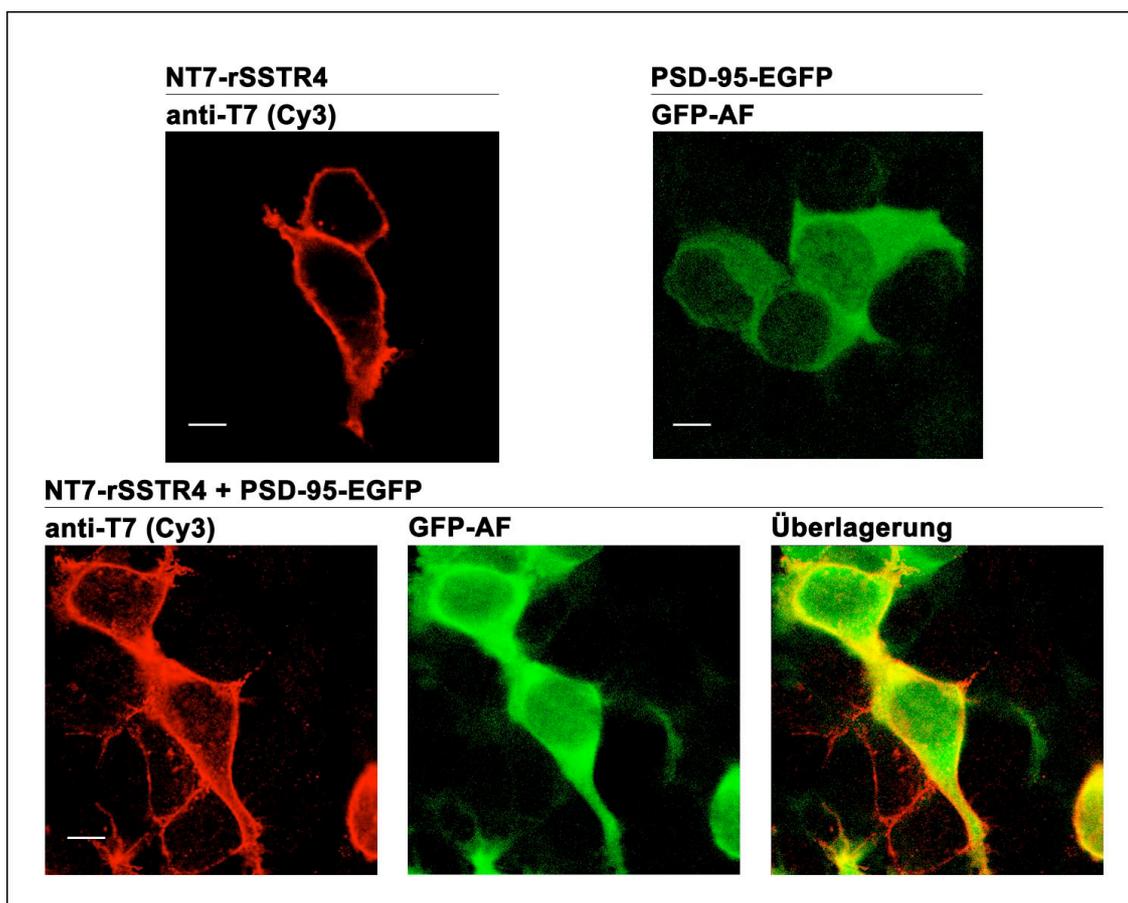


Abbildung 10: Kolokalisierung von PSD-95 und SSTR4 in transfizierten HEK293-Zellen.

PSD-95-EGFP wurde in HEK293-Zellen transfiziert, die NT7-SSTR4 stabil exprimieren. Der Nachweis von NT7-SSTR4 erfolgt mit einem Maus-anti-T7-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus-IgG-Antikörper [anti-T7 (Cy3): rot], der Nachweis von PSD-95-EGFP erfolgt über die Autofluoreszenz des EGFP-Anteils [GFP-AF: grün]. Die gelbe Färbung in der Überlagerung stellt die Kolokalisierung von SSTR4 und PSD-95 dar. Für die Aufnahmen wurde ein Laserscanmikroskop verwendet. Der Balken entspricht 5 µm.

Die Detektion in der Immuncytochemie erfolgte über die Autofluoreszenz des EGFP-Epitops, während im *Western* Blot ein Maus-anti-EGFP-Antikörper zum Nachweis benutzt wurde. Der Nachweis des Rezeptors erfolgt im *Western* Blot und in der Immuncytochemie

mit Hilfe eines Maus-anti-T7-Antikörpers. Jeder Transfektionsansatz wurde ausplattiert. Nach 3 Tagen wurde jeweils ein Teil der Zellen für die Immunocytochemie entnommen und der Rest für die Koimmunpräzipitation eingesetzt. Wurden die HEK293-Zellen mit rPSD-95-EGFP allein transfiziert, so zeigte das Protein in der Immunocytochemie eine diffuse cytoplasmatische Verteilung. Nach Koexpression mit rSSTR4 findet man eine partielle Kolokalisierung beider Proteine an der Zellmembran, wobei der Großteil des EGFP-Fusionsproteins weiterhin eine diffuse cytoplasmatische Verteilung zeigt (s. Abb. 10).

Um nachzuweisen, dass diese Kolokalisierung von SSTR4 und PSD-95 in den transfizierten HEK293-Zellen auch tatsächlich auf einer Interaktion beider Proteine beruht, wurde eine Koimmunpräzipitation beider Proteine aus lysierten HEK293 Zellen versucht. Die transfizierten Zellen wurden hierzu mit RIPA-Puffer lysiert.

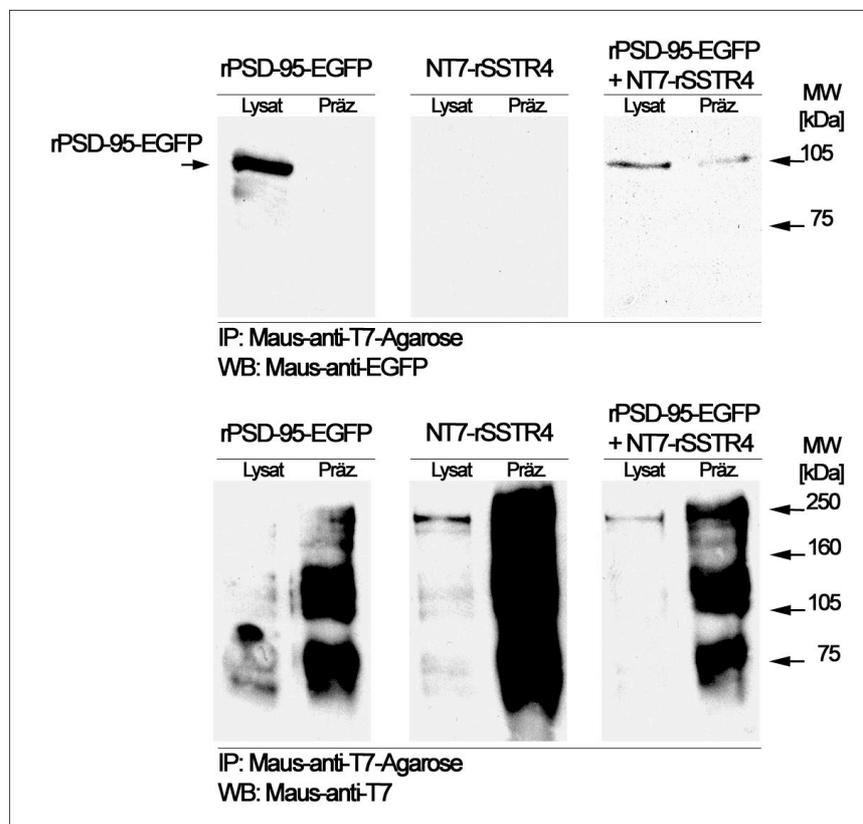


Abbildung 11: Koimmunpräzipitation von SSTR4 und PSD-95 aus transfizierten HEK293-Zellen

HEK293-Zellen, die entweder NT7-SSTR4 und PSD-95-EGFP, oder NT7-SSTR4 bzw. PSD-95-EGFP allein exprimieren wurden mit RIPA-Puffer lysiert. Die Immunpräzipitation (IP) aus den geklärten Lysaten erfolgte mit Maus-anti-T7-Agarose. Im *Western Blot* (WB) wurde PSD-95-EGFP mit Hilfe eines Maus-anti-EGFP-Antikörpers, gefolgt von einem anti-Maus-IgG-Antikörper-HRP-Konjugat detektiert. NT7-SSTR4 wurde mit Hilfe eines Maus-anti-T7-Antikörpers, gefolgt von einem anti-Maus-IgG-Antikörper-HRP-Konjugat nachgewiesen.

Nach Präzipitation der Proteine mit kovalent an Agarose gekoppelter Maus-anti-T7 Antikörper wurden Lysat und Präzipitat im *Western Blot* analysiert. Aus dem Lysat der Zellen, die sowohl NT7-rSSTR4 als auch PSD-95-EGFP exprimieren, konnte mit Hilfe des Maus-anti-T7-Antikörpers PSD-95-EGFP präzipitiert werden. PSD-95-EGFP ließ sich im Lysat der Zellen, die nur PSD-95-EGFP exprimieren, zwar nachweisen, es wurde aber mit dem Maus-anti-T7-Antikörper nicht präzipitiert (s. Abb. 11).

Der SSTR4 konnte im Zelllysat nicht nachgewiesen werden, obwohl die Zellen in der Immunocytochemie eine deutliche Expression des Rezeptors zeigten. Im Präzipitat ließ sich ebenfalls keine klare Bande detektieren, sondern nur ein breites Antikörpersignal. Dieses Detektionsproblem tritt häufig bei überexprimierten GPCRs auf (Roth, 1997; Stroh *et al.*, 2000a; Wente, 2004).

4.4 *In vivo* Interaktion von SSTR4 und PSD-95

Um zu zeigen, dass die Interaktion zwischen rSSTR4 und PSD-95 auch *in vivo* stattfindet, wurde sowohl eine Koimmunpräzipitation des Komplexes aus SSTR4 und PSD-95 aus Rattengehirn-Lysaten versucht, als auch eine immunocytochemische Analyse an kultivierten Hippocampus-Neuronen durchgeführt.

4.4.1 Koimmunpräzipitation von SSTR4 und PSD-95 aus Rattengehirn-Lysaten

Vor der Koimmunpräzipitation mußte in Vorversuchen ein Protokoll zur Lyse der Rattengehirne und Solubilisierung beider Proteine etabliert werden, das eine mögliche Interaktion nicht zerstört. Letztlich wurde auf das Protokoll von Schreff *et al.* (2000) zurückgegriffen. Aus einem Rattengehirn wurde nach Homogenisierung und Abtrennung der Kerne und der nichtlysierten Zellen aus dem Überstand die Membranfraktion durch Zentrifugation pelletiert. Dieses Membranpellet wurde in Gegenwart von Dodecyl- β -Maltosid als Detergenz solubilisiert. Da der rSSTR4 N-terminal glykosyliert wird, kann er zusammen mit anderen Glykoproteinen aus dem geklärten Überstand durch Inkubation mit Weizenkeim-Agglutinin, gekoppelt an Agarose (WGA-Agarose) partiell aufgereinigt werden. Die Elution der Glykoproteine erfolgte mit 500 mM N-Acetyl-D-Glukosamin in Gegenwart von Dodecyl- β -Maltosid.

Der im Allgemeinen für die Cytochemie verwendete Antikörper erkennt den C-Terminus des rSSTR4 (Schreff *et al.*, 2000). Da aber C-terminal interagierende Proteine das Antikörperepitop maskieren könnten, wurde die Immunpräzipitation des SSTR4 mit einem Antikörper durchgeführt, der in Kaninchen gegen den N-Terminus des Rezeptors (α -rS4N) erzeugt wurde. Dieser wurde an NHS-Sepharose immobilisiert, ebenso wie ein nichtverwandter Kontrollantikörper, der ebenfalls aus Kaninchen stammt. In beiden Fällen wurde die IgG-Fraktion eingesetzt, die zuvor durch Ammoniumsulfatfällung (s. Kap. 3.33.1) aus Gesamtserum gewonnen wurde. Im *Western* Blot wurde der SSTR4 mit dem α -rS4N-Antikörper nachgewiesen, die Detektion von PSD-95 erfolgte mit einem monoklonalen Maus-anti-PSD-95-Antikörper (Klon K28/86.2), der im *Western* Blot neben PSD-95 auch PSD-93 und SAP97 erkennt (Niethammer *et al.*, 1996).

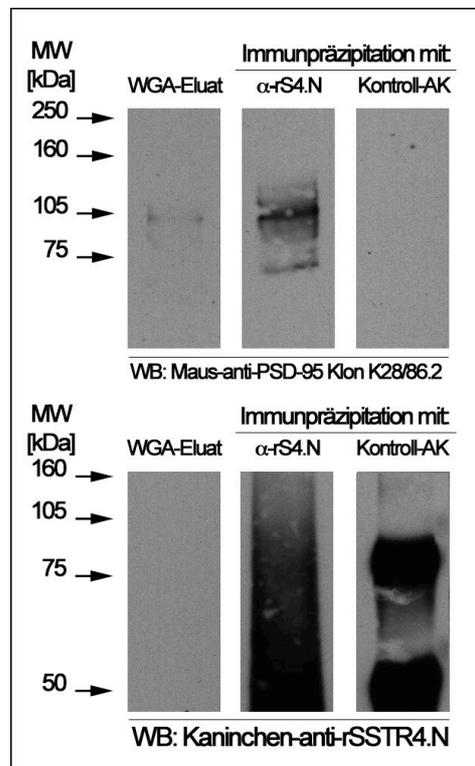


Abbildung 12: Koimmunpräzipitation von SSTR4 und PSD-95 aus Rattengehirn

Rattengehirn-Membranen wurden mit Dodecyl- β -Maltosid solubilisiert. Aus dem geklärten Überstand wurde mit Hilfe von WGA-Agarose die enthaltenen Glycoproteine aufgereinigt. Nach Elution mit N-Acetyl-D-Glukosamin (WGA-Eluat) erfolgte die Immunpräzipitation mit den angegebenen immobilisierten Antikörpern. Im *Western* Blot (WB) wurde PSD-95 mit Hilfe des Maus-anti-PSD-95-Antikörpers Klon K28/86.2, gefolgt von einem anti-Maus-IgG-Antikörper-HRP-Konjugat detektiert. SSTR4 wurde mit Hilfe des Kaninchen-anti-rSSTR4.N-Antikörpers, gefolgt von einem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper-HRP-Konjugat nachgewiesen. Insgesamt wurden von dem WGA-Eluat je 40 μ l für den *Western* Blot und jeweils 460 μ l für die Immunpräzipitation verwendet.

Die Analyse der präzipitierten Proteine im *Western* Blot zeigte, dass sich SSTR4 und PSD-95 bzw. PSD-93 miteinander kopräzipitieren lassen. Im WGA-Eluat konnte PSD-95 in sehr geringen Mengen (verglichen mit einer solubilisierten Membranfraktion) detektiert werden. Mit dem α -rS4N-Antikörper wurden PSD-95 und PSD-93 präzipitiert, während dies mit dem Kontrollantikörper nicht gelang.

Der rSSTR4 ließ sich im WGA-Eluat nicht nachweisen. Im α -rS4N-Präzipitat war nur ein breites Antikörpersignal erkennbar, was auf eine unvollständige Dissoziation des Antikörper-Rezeptor-Komplexes während der Denaturierung zurückzuführen ist. Im Kontrollpräzipitat ließen sich lediglich zwei Antikörperbanden nachweisen, die durch Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers (anti-Kaninchen-IgG) mit dem zur Präzipitation eingesetzten Antikörper aus Kaninchen entstanden sind.

4.4.2 Nachweis der Interaktion von PSD-95 und SSTR4 in kultivierten Hippocampus-Neuronen

Vor der immunocytochemischen Analyse an kultivierten Hippocampus-Neuronen wurde überprüft, ob beide Proteine in diesem Modellsystem exprimiert werden. Dazu wurde jeweils eine definierte Anzahl von Neuronen am ersten, dritten, siebten und vierzehnten Tag nach der Präparation mit RIPA-Puffer lysiert. Die Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und im *Western* Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert.

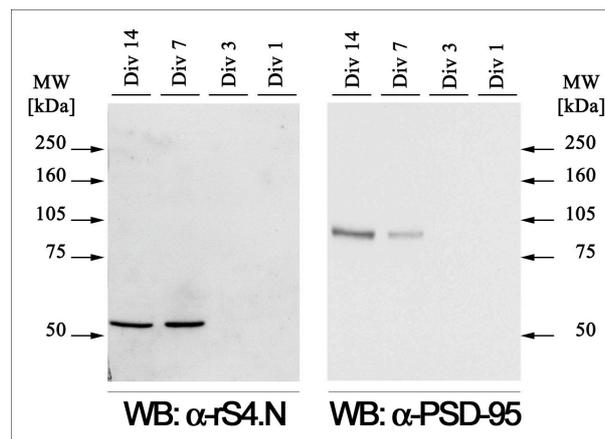


Abbildung 13: Expression von PSD-95 und SSTR4 in kultivierten Hippocampus-Neuronen

Kultivierte Neuronen wurde an den aufgeführten Tagen nach ihrer Präparation lysiert. Im *Western* Blot (WB) wurde PSD-95 mit Hilfe des Maus-anti-PSD-95-Antikörpers Klon K28/43 gefolgt, von einem anti-Maus-IgG-Antikörper-HRP-Konjugat detektiert. SSTR4 wurde mit Hilfe des Kaninchen-anti-rSSTR4.N-Antikörpers, gefolgt von einem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper-HRP-Konjugat nachgewiesen.

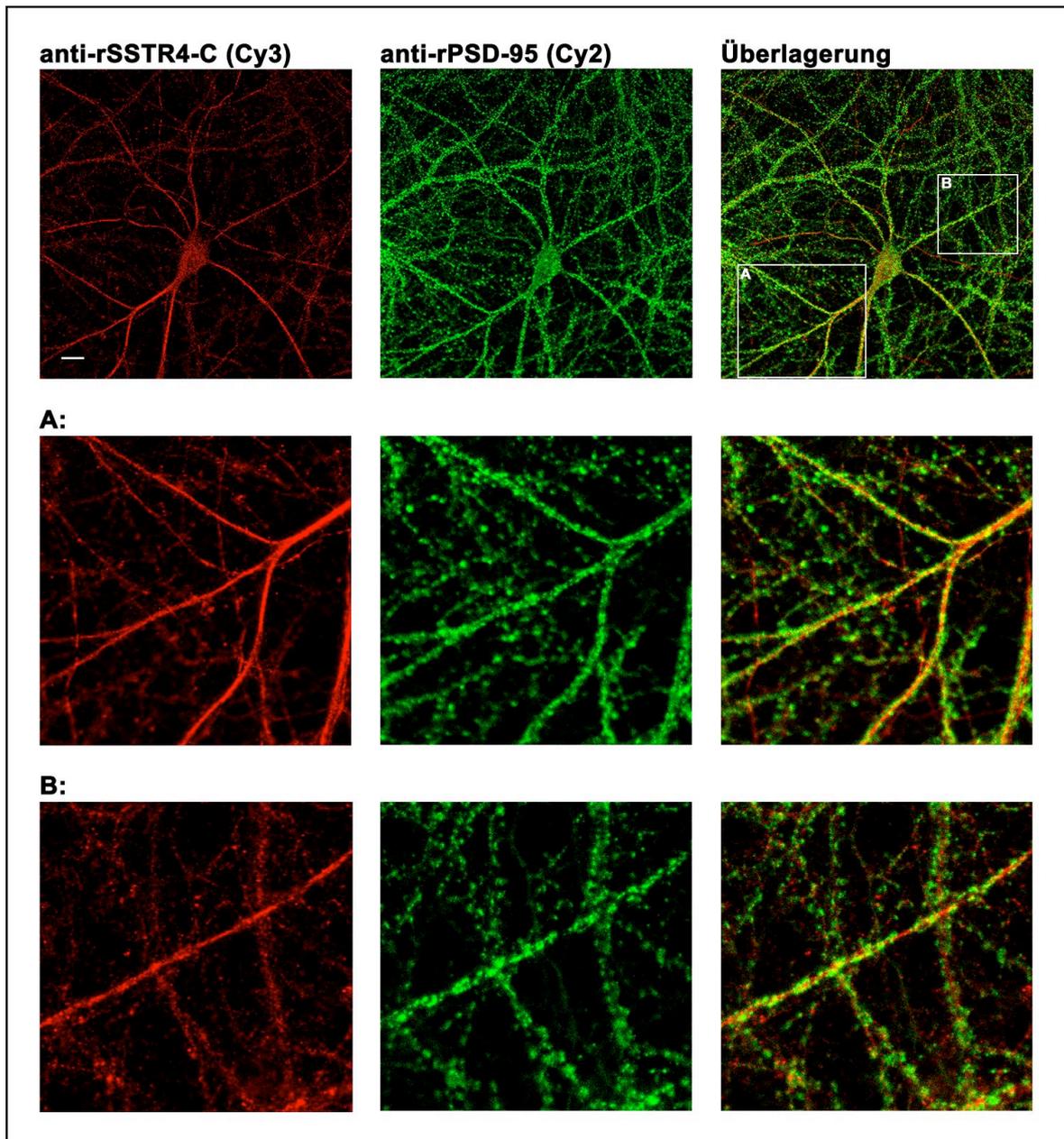


Abbildung 14: Lokalisierung von PSD-95 und SSTR4 in kultivierten Hippocampus-Neuronen

Der Nachweis von SSTR4 in 14 Tage alten Hippocampus-Neuronen erfolgte über den Kaninchen-anti-rSSTR4-C-Antikörper und einen daran bindenden Cy3-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG Antikörper [anti-rSSTR4-C (Cy3): rot]. PSD-95 wurde mit Hilfe eines Maus-anti-PSD-95 Antikörpers (Klon K28/43) und eines daran bindenden Cy2-gekoppelten Anti-Maus-IgG Antikörpers nachgewiesen [anti-rPSD-95 (Cy2): grün]. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laserscannmikroskop gemacht. Die Ausschnitte A und B zeigen jeweils einen vergrößerten Ausschnitt. Der Balken entspricht 5 μm .

Sowohl PSD-95 als auch SSTR4 lassen sich in kultivierten Hippocampus-Neuronen ab Tag 7 nach ihrer Präparation (Div 7) nachweisen. Die Expression nimmt bei beiden Proteinen bis zum 14. *in vitro* Tag zu. Für die Immunocytochemie wurden daher kultivierte Hip-

pocampus-Neurone am 14. Tag nach der Präparation fixiert und die Lokalisierung der endogenen Proteine mit spezifischen Antikörpern untersucht.

Der Nachweis von SSTR4 erfolgte über einen polyklonalen Antikörper, der in Kaninchen gegen den C-Terminus des rSSTR4 erzeugt wurde (α -rS4C), und einen daran bindenden Cy3-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG Antikörper. PSD-95 wurde mit Hilfe eines Maus-anti-PSD-95 Antikörpers (Klon K28/43) und eines daran bindenden Cy2-gekoppelten Anti-Maus-IgG Antikörpers nachgewiesen. Der monoklonale anti-PSD-95-Antikörper erkennt nur PSD-95, nicht aber PSD-93 oder SAP-97 (Kim *et al.*, 1995). Der anti-rS4C Antikörper wurde für die Immuncytochemie nur 1:1000 verdünnt, der anti-PSD-95 Antikörper nur 1:25.

PSD-95-Immunreaktivität konnte in zahlreichen definierten Aggregaten entlang der Dendriten nachgewiesen werden. Dieses punktförmige Muster ist auf die Anreicherung von PSD-95 in den postsynaptischen Dichten zurückzuführen (Kornau *et al.*, 1995). Der SSTR4 kolokalisiert partiell mit diesen PSD-95-Aggregaten, was auf eine Interaktion dieser beiden Proteine *in vivo* hindeutet. Im Gegensatz zu PSD-95 ist die SSTR4-Immunreaktivität aber auch im gesamten Cytoplasma der Dendriten verteilt, so dass sicher ein Teil des Rezeptors nicht mit PSD-95 assoziiert ist (s. Abb. 14).

4.5 Identifikation der für die Interaktion mit dem SSTR4 verantwortlichen PDZ-Domäne von PSD-95

Da PSD-95 drei PDZ-Domänen enthält, stellt sich die Frage, welche der drei PDZ-Domänen die Interaktion vermittelt. Dazu wurde die Affinitätschromatografie mit aufgereinigten Fusionsproteinen der einzelnen PDZ-Domänen wiederholt.

4.5.1 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Zur Herstellung der GST-Fusionsproteine wurden die jeweiligen DNA-Bereiche, die für die 1. bzw. 3. PDZ-Domäne kodieren, in den Vektor pGEX-4T2 kloniert. Weiterhin wurde ein Konstrukt hergestellt, das die 1. bis 3. PDZ-Domäne umfaßt. Die eigentliche Expression der Fusionsproteine wird in *E. coli* CAG626-Zellen durchgeführt. Die Reinigung erfolgt durch Affinitätschromatografie an Glutathion-Sepharose. Die Analyse der aufgereinigten

Proteine in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zeigte, dass in jedem Fall eine ausreichende Menge GST-Fusionsprotein exprimiert und gereinigt werden konnte.

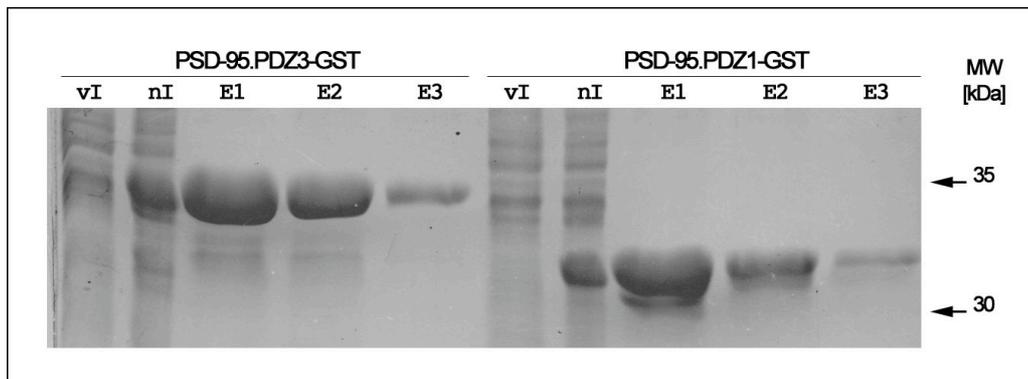


Abbildung 15: Aufreinigung rekombinater GST-Fusionsproteine am Beispiel von PSD-95.PDZ1-GST und PSD-95.PDZ3-GST

200 ml LB-Amp Medium wurden mit dem entsprechenden plasmidtragenden Klon angeimpft. Die Kultur wurde bei einer $OD_{600} = 0,5$ mit IPTG für 2 h induziert und anschließend pelletiert. Nach Lyse der Zellen erfolgt die Reinigung der Fusionsproteine mit Glutathionsepharose (s. Kap. 3.31). Je 50 μ l Aliquots wurden für die SDS-PAGE eingesetzt. Der Nachweis der Proteine erfolgt mittels Coomassie-Färbung. Abkürzungen: vI = vor Induktion; nI = nach Induktion, E1 = Eluat 1; E2 = Eluat 2; E3 = Eluat 3.

Die GST-Fusionsproteine der 2. PDZ-Domäne (PSD-95.PDZ2-GST) sowie des gesamten Proteins (PSD-95.ORF-GST) wurden von Dr. Stefan Kindler, Universität Hamburg zur Verfügung gestellt.

4.5.2 Durchführung des Bindungsexperiments

Das Bindungsexperiment wurde mit den in Abbildung 16 dargestellten immobilisierten Peptiden durchgeführt. Neben Peptiden, die den C-Termini der Somatostatinrezeptor Subtypen 1 bis 4 entsprechen, wurden C-terminale Peptide von GKAP, NMDAR-2B, der Guanylatzyklase $\alpha 2$ -Untereinheit und des TRH-Rezeptors Subtyp 1 verwendet. Sowohl der C-Terminus der NMDA-Rezeptor 2B-Untereinheit (Kornau *et al.*, 1995) als auch der C-Terminus der Guanylatzyklase $\alpha 2$ -Untereinheit (Russwurm *et al.*, 2001) interagieren mit PSD-95. Die Bindung an die Guanylatzyklase $\alpha 2$ -Untereinheit wird hauptsächlich durch die dritte, aber auch durch die zweite PDZ-Domäne von PSD-95 vermittelt (Russwurm *et al.*, 2001), während der C-Terminus der NMDA-Rezeptor 2B-Untereinheit an die erste und zweite PDZ-Domäne von PSD-95 bindet (Kornau *et al.*, 1995). Das GKAP-Peptid enthält zwar eine Erkennungssequenz für eine PDZ-Domäne der Klasse 1, bindet aber darüber nicht an PSD-95 (s. Abb. 8). Der C-Terminus des TRH-Rezeptor Subtyp 1 enthält

keine Erkennungssequenz für eine PDZ-Domäne der Klasse 1. Das Aspartat an der Stelle des konservierten Serin oder Threonin in der Konsensussequenz sollte eine Bindung an eine PDZ-Domäne der Klasse 1 unterbinden.

Protein	Abk.	Sequenz
Guanylatkinase-assoziiertes Protein	GKAP	IYIPEAQTRL
Guanylatzyklase, α 2-Untereinheit	GC	KKVCYNIGTMFLRETSL
NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2B	NMDA	KKLSSIESDV
Somatostatinrezeptor Subtyp 1	SSTR1	GTCASRISTL
Somatostatinrezeptor Subtyp 2	SSTR2	LLNGDLQTSI
Somatostatinrezeptor Subtyp 3	SSTR3	KASTLSHL
Somatostatinrezeptor Subtyp 4	SSTR4	CVPFTKTTTF
TRH-Rezeptor Subtyp 1	TRH	DPVVLVHM ^S IL

Konsensusmotif für einen Liganden einer PDZ-Domäne der Klasse 1: **x₁S₂x₃**
(nach Hung und Sheng, 2002)

Abbildung 16: Sequenzen der im Bindungstest eingesetzten C-terminalen Peptide

Dargestellt ist die Sequenz der C-terminalen Peptide. Die Aminosäuren, die dem Konsensusmotif für einen PDZ-Domäne Klasse I Liganden entsprechen, sind gelb unterlegt. Abweichende Aminosäuren sind rot dargestellt.

Das an SulfoLink-Agarose gekoppelte SSTR4-Peptid und die an NHS-Sepharose immobilisierten Peptide NMDA, SSTR1, SSTR2, SSTR3, GC, GKAP und TRH wurden mit den entsprechenden GST-Fusionsproteine und zur Kontrolle mit GST inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden die Präzipitate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgt mittels Coomassie-Färbung (s. Abb. 17).

Das GST-Fusionsprotein des gesamten Proteins (PSD-95.ORF-GST) und das der 1. bis 3. PDZ-Domäne (PSD-95.PDZ123-GST) läßt sich sowohl mit dem NMDA- und dem GC-Peptid als auch mit dem SSTR4- und dem SSTR1-Peptid präzipitieren (s. Abb. 17). Während das GC-Peptid hauptsächlich mit der 2. und der 3. PDZ-Domäne interagiert, läßt sich für das NMDA-, das SSTR1- und das SSTR4-Peptid eine Interaktion mit der 1. und 2. PDZ-Domäne nachweisen, nicht aber mit der 3. PDZ-Domäne (s. Abb. 17). Die 2. PDZ-Domäne bindet unspezifisch an das SSTR2-Peptid. Dagegen kann das GST-Fusionsprotein des gesamten Proteins und das der 1. bis 3. PDZ-Domäne nicht mit diesem Peptid präzipitiert werden.

Sowohl mit dem GKAP-Peptid, als auch mit dem SSTR3- und dem TRH-Peptid läßt sich weder eine der drei PDZ-Domänen, noch das gesamte PSD-95 präzipitieren. Das zur Kontrolle eingesetzte GST ließ sich mit keinem der eingesetzten Peptide präzipitieren, so dass die beobachteten Interaktionen durch die entsprechende PDZ-Domäne vermittelt werden.

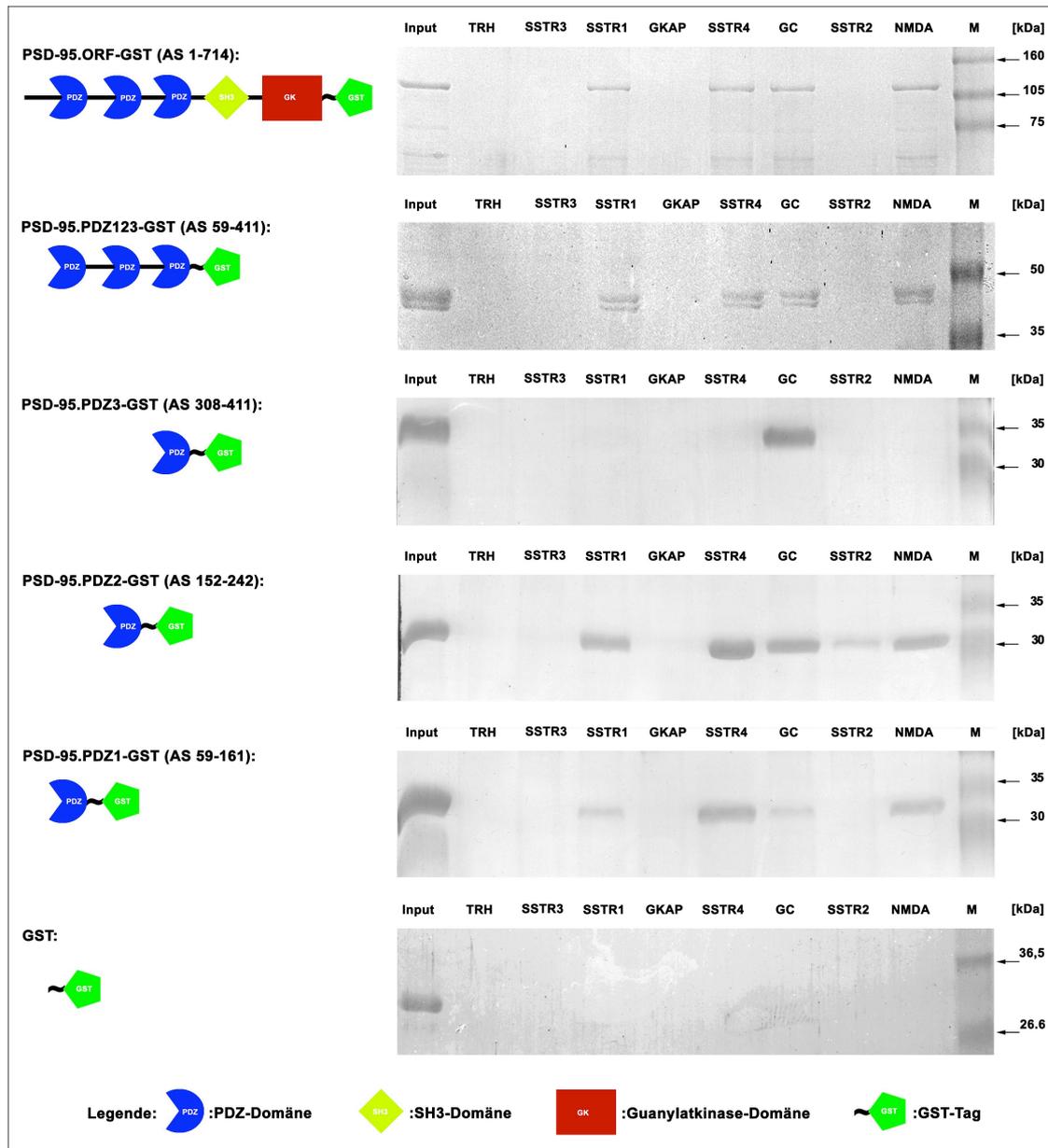


Abbildung 17: Identifizierung der mit SSTR4 interagierenden PDZ-Domäne von PSD-95

Die jeweils angegebenen Peptide wurden mit den entsprechenden Fusionsproteinen inkubiert. Nach mehrmaligen Waschschritten wurden die Präzipitate gelelektrophoretisch aufgetrennt und die enthaltenen Proteine mittels Coomassie-Färbung nachgewiesen. Die verwendeten Fusionsproteine sind links schematisch dargestellt. Der Input entspricht jeweils der für die Präzipitation eingesetzten Proteinmenge.

Die längeren Konstrukte binden in allen Fällen schlechter als die einzelnen Domänen, eventuell bedingt durch die komplexen intra- und intermolekularen Wechselwirkungen des PSD-95-Moleküls (Hsueh und Sheng, 1999; McGee und Bredt, 1999; Shin *et al.*, 2000; Tavares *et al.*, 2001; Christopherson *et al.*, 2003).

4.6 Affinitätschromatographie mit immobilisierten Peptiden der Somatostatinrezeptor Suptypen 1 bis 4

Bei der Identifizierung der für die Interaktion verantwortlichen PDZ-Domäne zeigte sich, dass auch der C-Terminus des SSTR1 mit dem PSD-95 Protein interagieren kann (s. Abb. 17). Um nachzuweisen, dass dies auch mit nativem PSD-95 gelingt, wurde eine Affinitätschromatografie mit den immobilisierten Peptiden SSTR1, SSTR2, SSTR3 und SSTR4 durchgeführt. Eine P2-Membranpräparation (s. Kap. 3.35.1) aus Rattengehirnen wurde mit 1 % Na-Deoxycholat solubilisiert. Die Solubilisate wurden mit den angegebenen Peptiden inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der gebundenen Proteine durch SDS-PAGE und der Nachweis der Proteine durch Coomassie-Färbung.

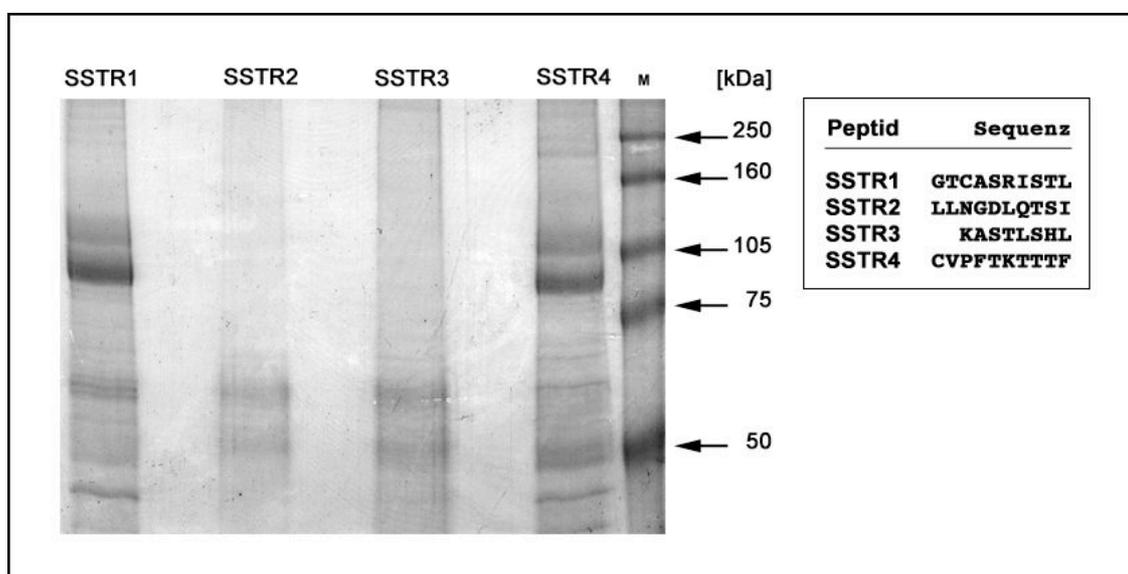


Abbildung 18: Analyse der affinitätschromatografischen Aufreinigung

Rattengehirn-Membranen wurden mit DOC-Puffer solubilisiert und anschließend mit den immobilisierten Peptiden inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden die präzipitierten Proteine gelektrophoretisch auf einem 10 % Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgt mittels Coomassie-Färbung.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, lassen sich auch mit dem SSTR1-Peptid PSD-95 und PSD-93 aus solubilisierten Gehirn-Membranen präzipitieren, während dies mit den SSTR2- und SSTR3-Peptid nicht gelingt.

4.7 Einfluß der Interaktion von PSD-95 und SSTR4 auf die Agonisten-induzierte Internalisierung des Rezeptors

Im Gegensatz zu den anderen Subtypen wird der Somatostatinrezeptor Subtyp 4 nach Agonistenstimulierung nicht internalisiert, wenn er in HEK293-Zellen exprimiert wird (Kreienkamp *et al.*, 1998). Dieser Befund konnte von Schreff *et al.* (2000) in frontalen Rattenhirnschnitten und in einer neuronalen Primärkultur bestätigt werden.

Der Einfluß von PSD-95 auf die Agonisten-induzierte Internalisierung des SSTR4 wurde an HEK293-Zellen untersucht, die den NT7-rSSTR4 stabil exprimieren. Diese wurden mit PSD-95-EGFP transfiziert. Der Agonist (Somatostatin-14) wurde jeweils 1h vor der Fixierung in einer Konzentration von 1µM zu den Zellen gegeben.

Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, befindet sich der Rezeptor hauptsächlich an der Zellmembran (s. Abb. 19). Nach einstündiger Stimulierung mit 1µM SST-14 ändert sich diese Lokalisierung des Rezeptors nicht (s. Abb. 19). Nach Transfektion von PSD-95-EGFP kommt es zur partiellen Kolo-kalisierung beider Proteine an der Zellmembran, wobei jedoch der Hauptteil der EGFP-Fluoreszenz wiederum diffus im Cytoplasma lokalisiert ist (s. Abb. 19). Nach Agonistenstimulierung bleibt der Rezeptor weiterhin an der Zellmembran lokalisiert (s. Abb. 19). PSD-95 beeinflusst also nicht die Agonisten-induzierte Internalisierung des SSTR4. Umgekehrt läßt sich auch keine Veränderung der PSD-95-Verteilung nach SST-14 Behandlung nachweisen.

In vorangegangenen Mutageneseversuchen konnte gezeigt werden, das der C-terminale Bereich des rSSTR4 ein negativ regulatorisches Element für die Rezeptorinternalisierung enthält (Kreienkamp *et al.*, 1998). Durch Mutation eines Threonins (T331) kann der rSSTR4 sensitiv gegenüber Agonisten-induzierter Internalisierung gemacht werden. Der Rezeptor wird dann zwar internalisiert, kehrt aber nach Auswaschen des Liganden nicht wieder an die Zellmembran zurück (Kreienkamp *et al.*, 1998).

Um zu überprüfen, ob PSD-95 auf das Internalisierungsverhalten der T331A-Mutante des rSSTR4 einen Einfluß hat, wurde PSD-95-EGFP in HEK293-Zellen transfiziert, die das Konstrukt NT7-rSSTR4.T331A stabil exprimieren. SST-14 wurde jeweils 1h vor der Fixierung in einer Konzentration von 1µM zu den Zellen gegeben.

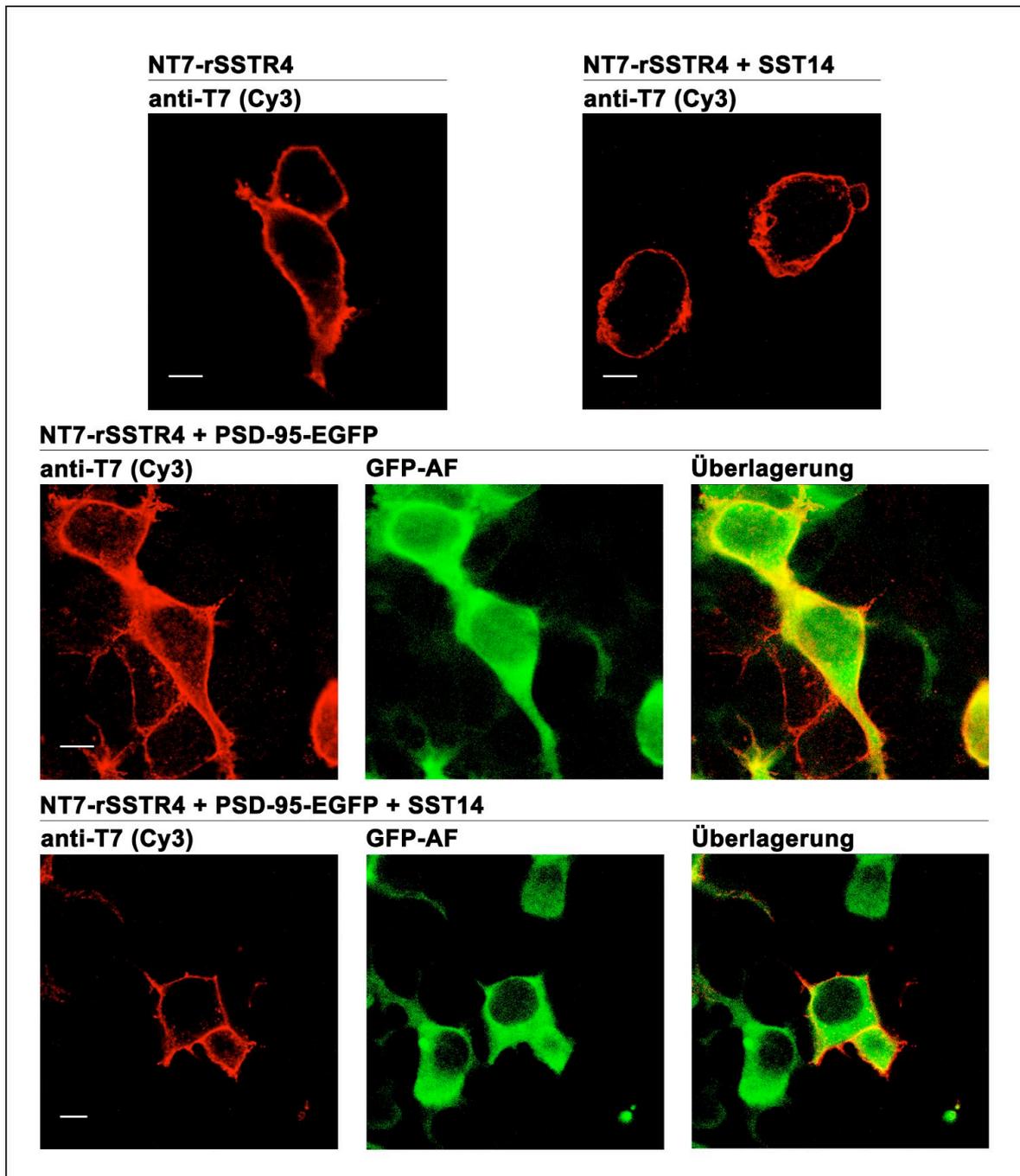


Abbildung 19: Einfluß der Interaktion von PSD-95 und SSTR4 auf die Agonisten-induzierte Internalisierung des Rezeptors.

HEK293-Zellen, die das Konstrukt NT7-rSSTR4 stabil exprimieren, wurden mit PSD-95-EGFP transfiziert. Etwa 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, oder 1 h mit $1\mu\text{M}$ SST-14 behandelt und dann fixiert (+SST-14). Der Nachweis von NT7-SSTR4 erfolgt mit einem Maus-anti-T7-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus-IgG-Antikörper [anti-T7 (Cy3): rot], der Nachweis von PSD-95-EGFP erfolgt über die Autofluoreszenz des EGFP-Anteils [GFP-AF: grün]. Die gelbe Färbung in der Überlagerung stellt die Kolokalisierung von SSTR4 und PSD-95 dar. Für die Aufnahmen wurde ein Laserscannmikroskop verwendet. Der Balken entspricht $5\mu\text{m}$.

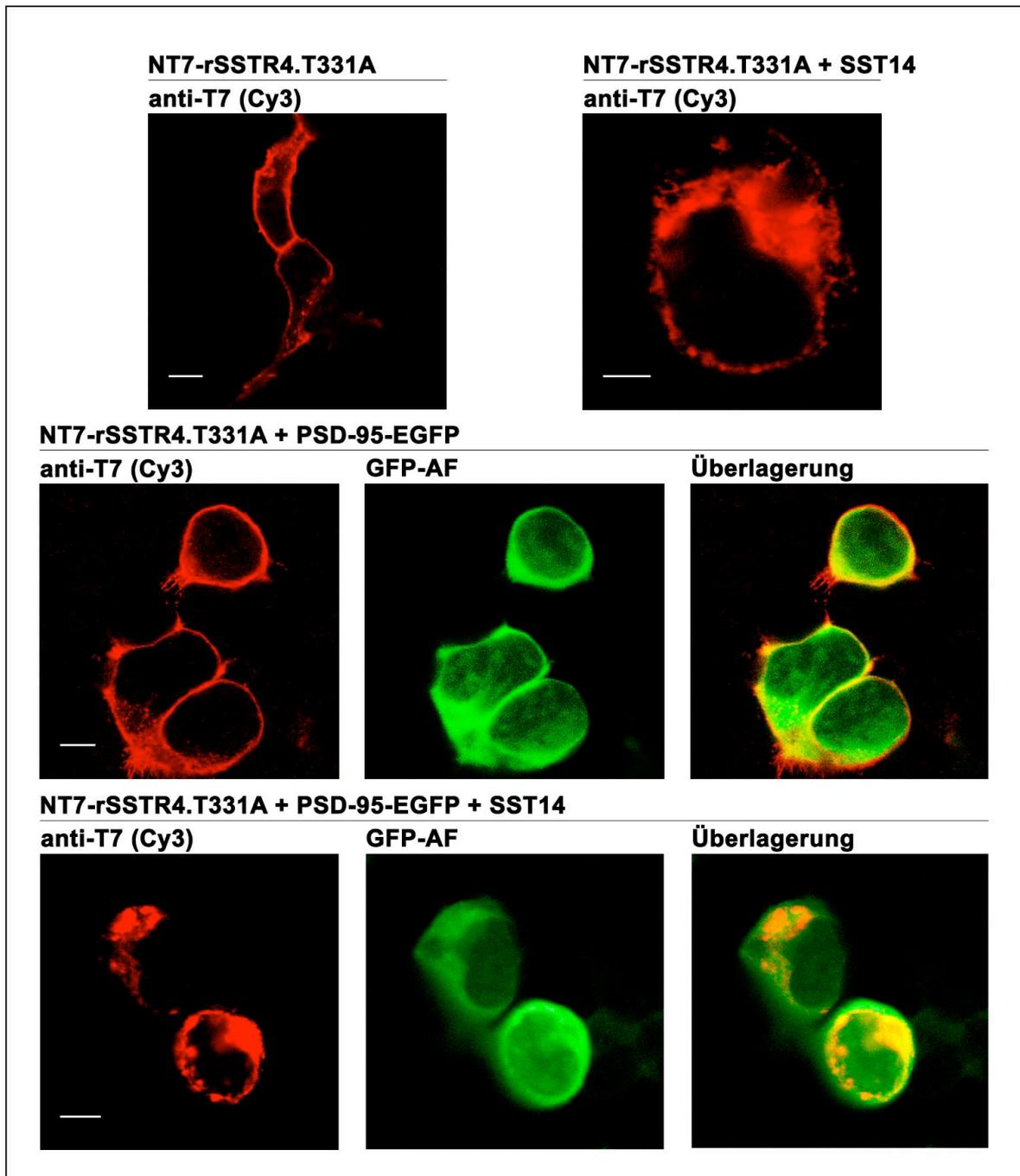


Abbildung 20: Einfluß von PSD-95 auf die Agonisten-induzierte Internalisierung der Rezeptormutante rSSTR4.T331A.

HEK293-Zellen, die das Konstrukt NT7-rSSTR4.T331A stabil exprimieren, wurden mit PSD-95-EGFP transfiziert. Etwa 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, oder 1 h mit $1\mu\text{M}$ SST-14 behandelt und dann fixiert (+SST-14). Der Nachweis von NT7-SSTR4.T331A erfolgt mit einem Maus-anti-T7-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus-IgG-Antikörper [anti-T7 (Cy3): rot], der Nachweis von PSD-95-EGFP erfolgt über die Autofluoreszenz des EGFP-Anteils [GFP-AF: grün]. Die gelbe Färbung in der Überlagerung stellt die Kolo-kalisierung von SSTR4.T331A und PSD-95 dar. Für die Aufnahmen wurde ein Laserscannmikroskop verwendet. Der Balken entspricht $5\mu\text{m}$.

Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, befindet sich auch die NT7-SSTR4.T331A Mutante hauptsächlich an der Zellmembran (s. Abb. 20). Nach einstündiger Stimulierung mit 1 μ M SST-14 internalisierte der NT7-rSSTR4.T331A (s. Abb. 20). Der Großteil des Rezeptors läßt sich dann in intrazellulären Kompartimenten nachweisen. Nach Transfektion von PSD-95-EGFP kommt es zur teilweisen Kolo-kalisierung beider Proteine an der Zellmembran (s. Abb. 20). Nach Agonistensimulierung internalisiert der Rezeptor, während die Lokalisierung von PSD-95 unverändert bleibt. (s. Abb. 20).

Betrachtet man die Lokalisierung des überexprimierten PSD-95-EGFP-Fusionsproteins in Gegenwart von NT7-rSSTR4 oder NT7-rSSTR4.T331A, so ist es in beiden Fällen hauptsächlich diffus im Cytoplasma verteilt. Diese Verteilung ändert sich weder nach Stimulierung des NT7-rSSTR4 oder NT7-rSSTR4.T331A mit SST-14, noch nach Internalisierung der T331A-Mutante.

4.8 Einfluß von PSD-95 auf die Kopplung von rSSTR4 an GIRK1 in *Xenopus laevis* Oozyten

Da PSD-95 keinen Einfluß auf die Agonisten-stimulierte Desensibilisierung und Internalisierung des rSSTR4 hat, stellte sich die Frage, ob PSD-95 die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion des Rezeptors beeinflusst.

Der rSSTR4 koppelt, wie alle Somatostatinrezeptoren, an Pertussistoxin-sensitive G-Proteine vom G_i/G_o -Typ (Bito *et al.*, 1994; Patel, 1999; Møller *et al.*, 2003). In neuronalen und neuroendokrinen Zellen bewirkt SST-14 eine Hyperpolarisierung der Zellmembran durch Aktivierung von G-Protein-gekoppelten einwärtsgerichteten Kaliumkanälen (GIRK-Kanäle) (Shen *et al.*, 1992). Diese Aktivierung wird direkt durch die heterotimeren G-Proteine vom G_i/G_o -Typ vermittelt (Jan und Jan, 1997), wobei das freie $G_{\beta\gamma}$ -Dimer für die Aktivierung verantwortlich ist (Huang *et al.*, 1995).

Ein heterologes Testsystem, in dem die Kopplung von SSTRs an GIRK-Kanäle untersucht werden kann, sind Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Exprimiert man den mGIRK1 in den Oozyten, bildet dieser nach Assoziation mit einer endogen vorhandenen GIRK-Untereinheit einen funktionellen Kalium-Kanal. Für die Somatostatinrezeptoren 2 bis 5 der Ratte, nicht aber für den rSSTR1, konnte eine funktionale Kopplung an den Kanal nachgewiesen werden (Kreienkamp *et al.*, 1997). Die Aktivierung des

GIRK1 durch SST-14 erfolgt in einer konzentrationsabhängigen Weise (Kreienkamp *et al.*, 1997).

Um zu Überprüfen, ob PSD-95 diese Kopplung beeinflusst, wurden *in vitro* transkribierte cRNAs (s. Kap. 3.16) von SSTR4 und GIRK1 bzw. SSTR4, GIRK1 und PSD-95 in *Xenopus*-Oozyten injiziert. Die zu analysierenden Proteine werden in den injizierten Oozyten während einer Inkubationszeit von bis zu einer Woche exprimiert. Die Messung der Liganden-induzierten Ströme erfolgt mit Hilfe der *whole cell voltage clamp*-Methode. Dabei wird eine Oocyte mit zwei Glas-Mikrokapillarelektroden (Spitzendurchmesser 5–10 μm , Widerstand 2–10 $\text{M}\Omega$, Elektrolytlösung 3 M KCl) angestochen, von denen die eine zur Messung des konstant auf etwa -60 mV gesetzten Membranpotentials dient, die andere den zur Beibehaltung des gewählten Potentials erforderlichen Strom vermittelt. Bei konstantem Membranpotential fließt dann durch diese Elektrode in umgekehrter Richtung genau soviel Strom wie über die gesamte Membranoberfläche der Oocyte.

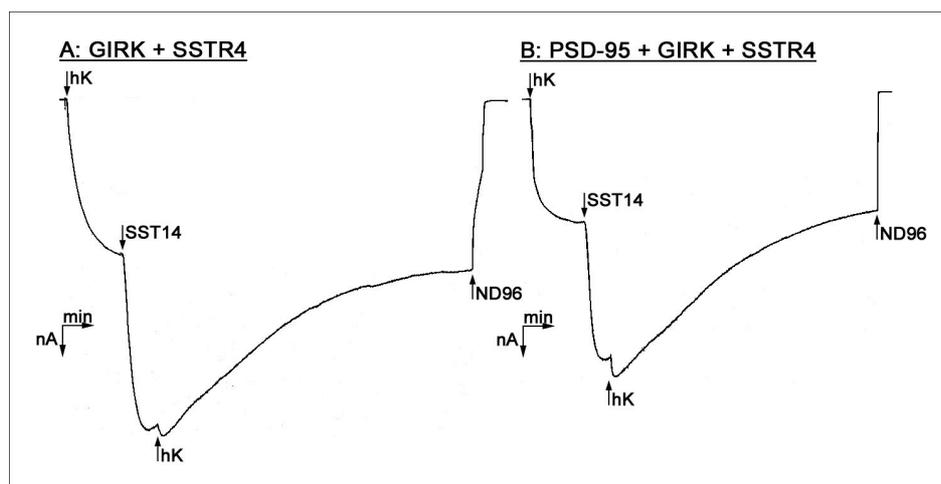


Abbildung 21: Strom-Zeit-Kurven von GIRK1- und SSTR4- bzw. PSD-95-, GIRK1- und SSTR4-exprimierender *Xenopus* Oozyten nach SST-14-Stimulierung.

Xenopus Oozyten wurden jeweils mit 4ng cRNA von GIRK1 und SSTR4 (A) bzw. PSD-95, GIRK1 und SSTR4 (B) injiziert. Nach zwei bis drei Tage erfolgt die Messung der Liganden-induzierten Kaliumströme. Dazu wurde die Oocyte in ND-96-Medium bei -60V geklemmt. Nach Wechsel zu hK-Medium (hK) erfolgt Stimulierung mit 1 μM SST-14 in hK (SST-14). Nach Erreichen eines Plateau-Wertes der Spannung wird der Ligand durch erneutes Spülen mit hK-Medium ausgewaschen (hK). Die Pfeile entsprechen jeweils 40 nA bzw. 2 min.

Nach Agonistenstimulierung des exprimierten Rezeptors kommt es durch das $G_{\beta\gamma}$ -Heterodimer des G-Proteins zur Öffnung des Kalium-Kanals und damit zur Veränderung des Membranpotentials. Diese Änderung des Membranpotentials wird als Strom-Zeit-Kurve aufgenommen (s. Abb. 21). Die Expression von PSD-95 wurde nach beendeter Messung im *Western Blot* verifiziert, wobei jeweils die gesamte Oocyte in 100 μl 1 x

Laemmli-Probenpuffer aufgeköcht wurde. PSD-95 wurde mit Hilfe eines Maus-anti-PSD-95 Antikörpers (Klon K28/43) und eines daran bindenden HRP-gekoppelten Anti-Maus-IgG Antikörpers nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

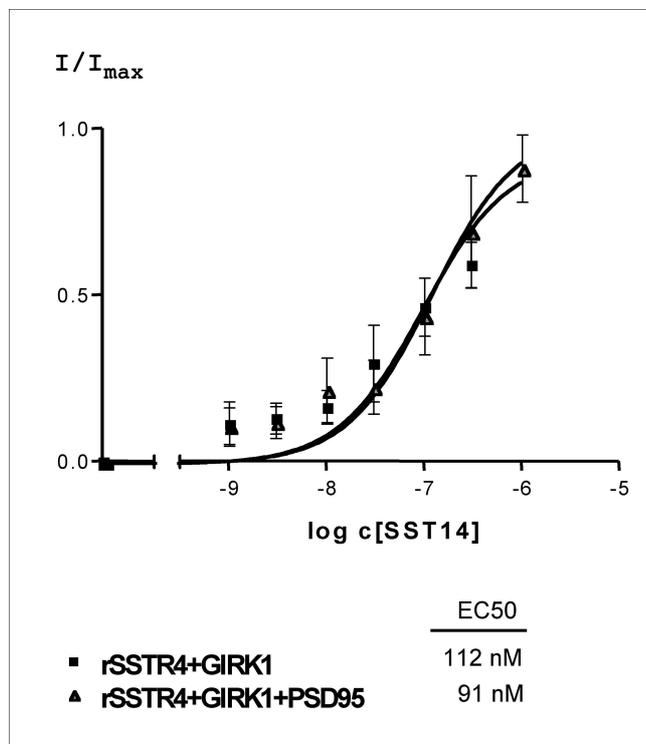


Abbildung 22: Einfluß von PSD-95 auf die GIRK1-Aktivierung von SSTR4

Oozyten wurden mit den angegebenen cRNAs injiziert. Zur Messung des Kalium-Einstroms wurden die Oozyten in hK-Medium auf -60 mV geklemmt. Die Antwort der Oozyten auf SST-14 ist als Funktion der eingesetzten SST-14 Konzentration (1×10^{-9} bis 1×10^{-6} M) dargestellt. Jede Oozyte wurde mit den angegebenen SST-14 Konzentrationen inkubiert, jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei Oozyten. I = gemessener Strom; I_{\max} = Maximal erzeugte Stromstärke durch 1×10^{-6} M SST-14.

Aus der konzentrationsabhängigen Aktivierung des GIRK1 durch SST-14 an SSTR4 ergibt sich eine halbmaximale Stimulation (EC_{50}) des Kalium-Stroms von 112 nM bei Abwesenheit von PSD-95 bzw. 91 nM bei Anwesenheit von PSD-95. Anpassung der Stromabnahme an eine einphasige exponentielle Abklingkurve ergab eine Halbwertszeit von 6,77 min für SSTR4 und GIRK1 bzw. 6,71 min für PSD-95, GIRK1 und SSTR4.

PSD-95 beeinflusst also weder die Agonisten-abhängige Stimulierung des GIRK1-Signals durch den SSTR4, noch die Kinetik der Abnahme des Signals. Eine direkte Interaktion von PSD-95 und GIRK1 war nicht erwartet worden, da Nehring *et al.* (2000) zeigen konnten, das PSD-95 nicht mit GIRK1 oder GIRK2 interagiert.

5. Diskussion

Die physiologischen Effekte von Somatostatin werden durch eine Familie von fünf G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (SSTR1 bis SSTR5) vermittelt. Diese wirken in G-Protein-abhängiger Weise sowie vermutlich auch über andere interagierende intrazelluläre Proteine (z.B. Schwärzler *et al.*, 2000) auf nachgeschaltete Signaltransduktionswege. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der orthologen Rezeptoren eines Subtyps aus Mensch, Maus, und Ratte, so findet man eine Sequenzähnlichkeit von 81 - 98 %, während bei einem Aminosäurevergleich verschiedener Subtypen miteinander sich eine Sequenzähnlichkeit von 39 - 57 % zeigt (Meyerhof, 1998). Allerdings fällt auf, dass die C-Termini von SSTR1, SSTR2a, SSTR3, SSTR4 und SSTR5 alle eine Erkennungssequenz für eine PDZ-Domäne der Klasse 1 enthalten. Um für den rSSTR4 neue intrazelluläre Interaktionspartner zu identifizieren, wurde eine Affinitätschromatografie mit einem immobilisierten Peptid, das diese Erkennungssequenz enthält, durchgeführt. Es konnten zwei mögliche Interaktionspartner identifiziert werden:

1. PSD-95 (*Postsynaptic density protein of 95 kDa*) ist auch bekannt als SAP90 (*Synapse-associated protein of 90 kDa*) oder DLG4 (*disc large homolog 4*) und gehört zur MAGUK-Proteinfamilie. Das Protein besitzt 3 PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne (Src Homologie-3) und eine Guanylatkinase-ähnliche (GK) Domäne. Die PDZ-Domänen sind Proteininteraktionsmodule, die an C-terminale Peptide oder an β -hairpin Strukturen binden (Ponting und Phillips, 1995; Kennedy, 1995; Fanning und Anderson, 1996; Saras und Heldin, 1996; Songyang *et al.*, 1997). Die SH3-Domäne dient ebenfalls der Proteininteraktion und bindet an prolinreiche Sequenzen (Pawson, 1994, 1995; Cohen *et al.*, 1995; Sudol, 1998). Die GK-Domäne ist homolog zur Guanylatkinase aus *S. cerevisiae* (Berger *et al.*, 1989). Die Aminosäuren, die zur Bindung von GMP benötigt werden, sind teilweise konserviert, während die Aminosäuren, die zur Bindung von ATP benötigt werden, fehlen (Cho *et al.*, 1992; Kistner *et al.*, 1993). Die GK-Domäne besitzt aber keine GMP-Bindungseigenschaften und ebenso keine Kinaseeigenschaften (Kistner *et al.*, 1995; Olsen und Bredt, 2002).
2. PSD-93 (*Postsynaptic density protein of 93 kDa*) ist auch bekannt als Chapsyn-110 (*Channel-associated protein of synapses of 110 kDa*) oder DLG2 (*disc large homolog 2*)

und gehört ebenfalls zur MAGUK-Proteinfamilie. Die Domänenstruktur ist identisch zu der des PSD-95 (Kim *et al.*, 1995, 1996; Brenman *et al.*, 1996).

PSD-93 ist zu ~70 % identisch mit PD-95 (Brenman *et al.*, 1996). Vergleicht man die PDZ-Domänen miteinander, so zeigt sich, dass die PDZ-Domänen 1 und 2 untereinander einen höheren Grad an Identität aufweisen als mit PDZ-Domäne 3, obwohl es sich bei allen um Typ 1 PDZ-Domänen handelt (Lim *et al.*, 2002; s. Abb. 23).

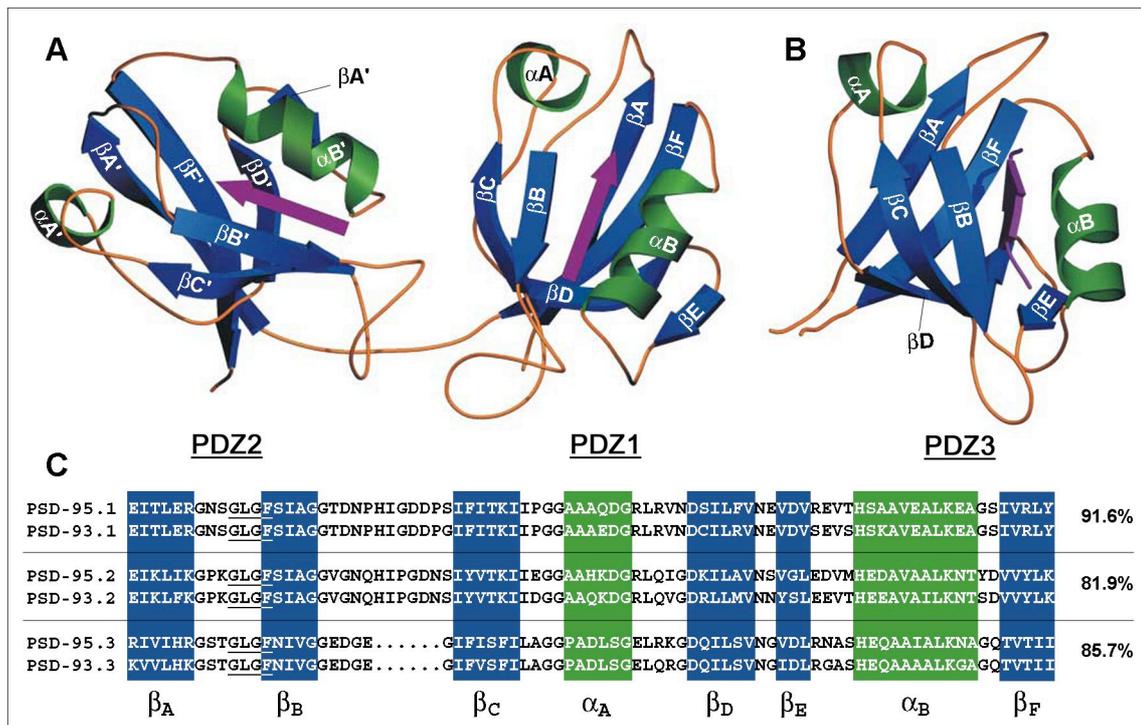


Abbildung 23: Aufbau der PDZ-Domänen von PSD-95 und PSD-93

Strukturmodell der 1. und 2. (A) bzw. 3. (B) PDZ-Domäne von PSD-95 (α -Helices in grün, β -Faltblätter in blau) im Komplex mit einem C-terminalen Peptid (violett) (aus Kim und Sheng, 2004). C: Sequenzvergleich der jeweiligen PDZ-Domänen von PSD-95 und PSD-93. Die Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm SIM (<http://www.expasy.org/tools/simprot.html>) erstellt (Huang und Miller, 1991). Die Prozentangaben geben die Sequenzidentität der jeweiligen PDZ-Domänen an. Das konservierte GLGF-Motiv ist unterstrichen dargestellt. Die Zuordnung der Strukturelemente erfolgte gemäß Lim *et al.* (2002).

Die Interaktion von PSD-95 mit dem SSTR4-Peptid wird durch die erste und zweite PDZ-Domäne vermittelt (s. Abb. 17). Die dritte PDZ-Domäne bindet dagegen nicht an das SSTR4-Peptid. Obwohl die PDZ-Domänen von PSD-95 sich in Sequenz und Struktur ähneln, zeigen sie unterschiedliche Präferenzen für ihre Bindungspartner, wobei jedoch die genauen Gründe für die Bindungsspezifität der einzelnen PDZ-Domänen nicht bekannt sind (Piserchio *et al.*, 2004). NMR-Studien der ersten PDZ-Domäne (Piserchio *et al.*, 2002) und der zweiten PDZ-Domäne (Tochio *et al.*, 2000) von PSD-95 deuten darauf hin,

dass die Schleife zwischen dem zweiten und dem dritten β -Faltblatt (Abbildung 23: β_B bzw. β_C) eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung spielt und einen Einfluß auf die Ligandenspezifität hat (Piserchio *et al.*, 2004). Wie in Abbildung 23.C zu erkennen ist, unterscheidet sich hier die dritte PDZ-Domäne von der ersten und zweiten PDZ-Domäne deutlich. Die dritte PDZ-Domäne von PSD-95 und PSD-93 besitzt andere Bindungseigenschaften als die erste und zweite PDZ-Domäne. Deshalb binden Proteine, die mit der ersten und zweiten PDZ-Domäne interagieren, nicht oder nur schwach an die dritte PDZ-Domäne (Lim *et al.*, 2002). Die Untersuchungen an den einzelnen PDZ-Domänen berücksichtigen nicht die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen PDZ-Domänen, die möglicherweise einen Einfluß auf die Bindungsspezifität haben. So konnten Long *et al.* (2003) zeigen, dass die PDZ-Domäne 1 und 2 von PSD-95 eine eingeschränkte Drehbarkeit gegeneinander aufweisen und die Ligandenbindungsstelle beider PDZ-Domänen so angeordnet ist, dass vorzugsweise dimere Liganden gebunden werden. Eine Verlängerung der Region zwischen den beiden PDZ-Domänen reduziert die Bindungsaffinität zu dimeren Liganden und beeinträchtigt die *Cluster*-Bildung von membranständigen Interaktionspartnern. Die PDZ-Domänen 1 und 2 müssen also als funktionelle Einheit angesehen werden (Long *et al.*, 2003). Die Wechselwirkungen zwischen den PDZ-Domänen beeinflusst wahrscheinlich auch die Interaktion mit dem SSTR2-Peptid. Dieses bindet zwar an die zweite PDZ-Domäne, nicht jedoch an Fusionsproteine, die entweder nur die drei PDZ-Domänen enthalten oder den gesamten offenen Leserahmen von PSD-95 (s. Abb. 17), so dass eine Interaktion des SSTR2 mit PSD-95 *in vivo* ausgeschlossen werden kann.

Betrachtet man PSD-93, so fällt auf, dass der Bereich zwischen der zweiten und dritten PDZ-Domäne 75 Aminosäuren länger ist als in PSD-95, während der Bereich, der die erste und zweite PDZ-Domänen PSD-93 umfaßt, einen hohen Grad der Identität zu PSD-95 aufweist (Brenman *et al.*, 1996). Daher kann man vermuten, dass der SSTR4 ebenso mit der funktionellen Einheit der 1. und 2. PDZ-Domäne von PSD-93 interagiert.

Die Interaktion von SSTR4 mit PSD-95 wurde in HEK293-Zellen weiter charakterisiert. Der Rezeptor wurde dazu stabil in HEK293-Zellen transfiziert. Unabhängig von der Expression von PSD-95 weist er eine größtenteils membranständige Lokalisierung auf. PSD-95 ist in Abwesenheit des Rezeptors diffus in der Zelle verteilt (s. Abb. 10). Nach Transfektion in Zellen, die den SSTR4 stabil exprimieren, kommt es zu partieller Kolokalisierung mit dem Rezeptor an der Zellmembran. Der Hauptteil des überexprimierten PSD-95 ist jedoch weiterhin diffus in der Zelle verteilt und läßt sich keinem speziellen

Zellkompartiment zuordnen. Da PSD-95 mit einem N-terminalen EGFP-Fusionsanteil in HEK293-Zellen exprimiert wird, findet die für die Membranlokalisierung wichtige Palmitoylierung von N-terminalen Cysteinen nicht statt (Craven *et al.*, 1999; Topinka und Bredt, 1998). Deshalb verbleibt der Anteil des PSD-95, der nicht mit dem Rezeptor interagiert, im Cytoplasma. Das beide Proteine in HEK293-Zellen miteinander interagieren wird dadurch belegt, dass sich beide Proteine aus lysierten Zellen koimmunpräzipitieren lassen (s. Abb. 11).

Die *in vivo*-Interaktion wurde zunächst in kultivierten Hippocampus-Neuronen überprüft. Beide Proteine werden in diesen Neuronen ab dem 7 Tag in Kultur exprimiert (s. Abb. 13). Immuncytochemische Untersuchungen an Neuronen, die 14 Tage in Kultur gehalten wurden, zeigen, dass PSD-95 in zahlreichen definierten Aggregaten entlang der Dendriten vorkommt (s. Abb. 14). Das dabei beobachtete punktförmige Muster ist auf die Anreicherung von PSD-95 in den postsynaptischen Dichten zurückzuführen (Kornau *et al.*, 1995; Fukaya und Watanabe, 2000). Der SSTR4 kolokalisiert partiell mit diesen PSD-95-Aggregaten, was auf eine Interaktion dieser beiden Proteine *in vivo* hindeutet. Im Gegensatz zu PSD-95 scheint der SSTR4 aber größtenteils im gesamten Cytoplasma der Dendriten verteilt zu sein, was sich mit Ergebnissen von Schreff *et al.* (2000) deckt. Um die direkte Interaktion von PSD-95 und SSTR4 im Rattengehirn nachzuweisen, wurde eine Koimmunpräzipitation von PSD-95 mit dem Antikörper durchgeführt, der gegen den extrazellulären Bereich des Rezeptors gerichtet ist. PSD-95 konnte im Präzipitat nachgewiesen werden, ebenso wie PSD-93 (s. Abb. 12). Dies zeigt, dass PSD-95 mit dem SSTR4 auch *in vivo* interagiert.

Die Somatostatinrezeptoren der Ratte zeigen eine subtypspezifische Lokalisierung im Rattengehirn. Der SSTR1 läßt sich hauptsächlich in Axonen nachweisen (Helboe *et al.*, 1998), während die beiden SSTR2-Isoformen (Dournaud *et al.*, 1996, 1998; Schulz *et al.*, 1998a, b; Schindler *et al.*, 1998a, b) und der SSTR4 (Schreff *et al.*, 2000) größtenteils in Dendriten zu finden sind. Der SSTR3 läßt sich in neuronalen Zilien nachweisen (Händel *et al.*, 1999), während der SSTR5 im zentralen Nervensystem nur eine untergeordnete Rolle spielt (Stroh *et al.*, 1999). In einer immunhistochemischen Studie konnten Schreff *et al.* (2000) den SSTR4 in vielen Regionen des Vorderhirns, einschließlich des cerebralen Cortex, des Hippocampus, dem Striatum, der Amygdala und des Hypthalamus nachweisen. Eine Kolokalisierung der SSTR4-Immunreaktivität mit Immunreaktivität gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 läßt auf intrazellulären Transport des SSTR4-Proteins in die Dendriten der markierten Neurone schließen. In den untersuchten Gehirnregionen wur-

de die SSTR4-Immunreaktivität durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ausschließlich in dendritischen Bereichen beobachtet, wo sie überwiegend postsynaptische Bereiche symmetrischer Synapsen markiert. Im Bereich des Hippocampus konnte der SSTR4 zudem an einigen asymmetrischen Synapsen nachgewiesen werden.

Die Einteilung von Synapsen in zwei Kategorien geht auf Gray (1959) zurück, der auf Grund von strukturellen Charakteristika der pre- und der postsynaptischen Seite Typ 1- und Typ 2-Synapsen unterschied. Diese Einteilung wurde von Colonnier (1969) erweitert, wobei er eine Einteilung in asymmetrische (Gray Typ 1) und symmetrische (Gray Typ 2) vornahm. Asymmetrische Synapsen zeichnen sich durch eine besonders dicke postsynaptische Dichte (PSD) aus und die presynaptischen Vesikel haben eine runde Form. Symmetrische Synapsen besitzen keine stark ausgeprägte PSD und die presynaptischen Vesikel besitzen eine charakteristische ovale Form. Asymmetrische Synapsen sind meistens exzitatorisch, symmetrische Synapsen sind dagegen meist inhibitorisch (Gershon *et al.*, 1985).

PSD-95 läßt sich in vielen Regionen des Vorderhirns, einschließlich des cerebralen Cortex, des Hippocampus, dem Striatum und der Amygdala nachweisen (Hunt *et al.*, 1996; Fukaya und Watanabe, 2000). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten Aoki *et al.* (2001) PSD-95 und PSD-93 hauptsächlich an der postsynaptischen Membran von asymmetrischen Synapsen nachweisen. Darüberhinaus fand sich eine Immunreaktivität an presynaptischen Membranbereichen und in cytoplasmatischen Bereichen von Axonen und Dendriten. PSD-95 und PSD-93 konnten nicht an der postsynaptischen Membran von symmetrischen Synapsen nachgewiesen werden. Da PSD-95 und PSD-93 nicht in inhibitorischen Synapsen lokalisiert ist, beschränkt sich eine mögliche Interaktion von PSD-95 bzw. PSD-93 mit dem SSTR4 wohl auf die SSTR4-immunreaktiven asymmetrischen Synapsen im Hippocampus, sowie die cytoplasmatischen Bereiche von Dendriten. Da der für die Detektion des Rezeptors verwendete Antikörper den C-Terminus des rSSTR4 erkennt (Schreff *et al.*, 2000), ist nicht auszuschließen, dass eine Interaktion mit PSD-95 den Nachweis von SSTR4 erschwert, da Antikörperepitope nicht mehr zugänglich sind. Die Schwierigkeit bei der Detektion dieser Proteine zeigt sich darin, dass ein immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von PSD-95 in Mäusegehirnschnitten eine Proteasebehandlung der Schnitte verwendet, um die Immundetektion von postsynaptischem PSD-95 zu erleichtern (Fukaya und Watanabe, 2000). Ohne diese Vorbehandlung weist PSD-95 hauptsächlich eine diffuse dendritische Lokalisierung auf (Fukaya und Watanabe, 2000). In Zusammenarbeit mit Dr. Mathias Schreff wurde dieses Protokoll auf Rattengehirnschnitten

angewandt, allerdings konnte nach Proteasevorbehandlung der rSSTR4 weder mit dem Antikörper α -rS4-C noch mit dem Antikörper α -rS4-N detektiert werden.

Somatostatin wird häufig zusammen mit dem inhibitorischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) ausgeschüttet, etwa im Hippocampus oder der Amygdala (Vezzani und Hoyer, 1999; McDonald und Mascagni, 2002; Saha *et al.*, 2002). Somatostatin beeinflusst allerdings nicht die GABA-Rezeptor-vermittelte inhibitorische Signalweiterleitung, sondern reguliert vielmehr die exzitatorische Signalweiterleitung (Tallent und Siggins, 1997; 1999). Somatostatin inhibiert dabei presynaptisch die Glutamatfreisetzung (Boehm und Betz, 1997) und aktiviert gleichzeitig postsynaptisch zahlreiche K^+ -Kanäle. Somatostatin diffundiert dabei vom Ort seiner Freisetzung (inhibitorische Axonendung) zu postsynaptischen Bereichen exzitatorischer Synapsen oder nichtsynaptischen Bereichen (Hökfelt, 1991). So verstärkt Somatostatin unter anderem den M-Strom (I_M) über einen Arachidonsäure-vermittelten Signaltransduktionsweg (Moore *et al.*, 1988; Schweitzer *et al.*, 1990; 1993), wobei es nach Aktivierung von Phospholipase A_2 und 5-Lipoxygenase zur Bildung von Leukotrien C_4 kommt, welches direkt I_M aktiviert (Schweitzer *et al.*, 1990; 1993). Bito *et al.* (1994) und Sakanaka *et al.* (1994) konnte eine funktionelle Kopplung des SSTR4 an diesen Signaltransduktionsweg nachweisen, so dass der Somatostatineffekt auf den I_M wohl durch den SSTR4 vermittelt wird. Der I_M hat eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der neuronalen Signalweiterleitung, da er die unterschwellige elektische Erregbarkeit von Neuronen sowie deren Empfindlichkeit gegenüber synaptischem *Input* reguliert (Brown und Adams, 1980; Adams und Brown, 1982). Der I_M wird durch die K^+ -Kanal-Untereinheiten KCNQ2 und KCNQ3 vermittelt (Wang *et al.*, 1998). Cooper *et al.* (2000) konnten das Heterodimer aus KCNQ2 und KCNQ3 in verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns nachweisen, so z.B. im Hippocampus, wo beide Untereinheiten im Soma und den Dendriten von pyramidalen Neuronen vorkommen. Das Heterodimer konnte aus solubilisierten Membranfraktionen koimmunpräzipitiert werden, jedoch waren weder PSD-95 oder NMDA-Rezeptor-Untereinheiten noch andere K^+ -Kanäle im Präzipitat nachweisbar (Cooper *et al.*, 2000). Das KCNQ2/KCNQ3-Heterodimer ist demnach nicht mit dem PSD-95/NMDAR-Komplex assoziiert (Cooper *et al.*, 2000).

Ebenfalls über einen Arachidonsäure-vermittelten Signaltransduktionsweg erhöht Somatostatin einen Spannungs-unabhängigen K^+ -leak-Strom ($I_{K(L)}$) (Schweitzer *et al.*, 1998). $I_{K(L)}$ -Ströme beeinflussen die Erregbarkeit von Neuronen durch Steuerung des Ruhepotentials (Goldstein *et al.*, 2001). Erhöhte $I_{K(L)}$ -Ströme stabilisieren ein Neuron bei hyperpolarisi-

sierter Spannung und erhöhen den Schwellenwert für die Entstehung eines Aktionspotentials, während die Inhibierung dieser Ströme eine Depolarisierung und damit Entstehung eines Aktionspotentials erlauben (Goldstein *et al.*, 2001). $I_{K(L)}$ -Ströme werden durch eine Familie von K^+ -Kanälen vermittelt, den KCNK-Kanälen (Lesage und Lazdunski, 2000; Goldstein *et al.*, 2001; Bayliss *et al.*, 2003). In Säugern sind bisher 11 KCNK-Untereinheiten identifiziert worden (Goldstein *et al.*, 2001; Bayliss *et al.*, 2003). Die Beteiligung der einzelnen Untereinheiten an den beobachteten Effekten im Gehirn ist bisher noch nicht geklärt.

Ein weiterer Effekt von Somatostatin ist die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten einwärtsgerichteten K^+ -(GIRK)-Kanälen (Mihara *et al.*, 1987; Inoue *et al.*, 1988; Tsumi *et al.*, 1990, Takano *et al.*, 1997; Sodickson und Bean, 1998). Die Aktivierung wird durch G-Proteine des Gi/Go-Typs vermittelt (Jan und Jan, 1997), wobei das freie $G_{\beta\gamma}$ -Dimer direkt an den Kanal bindet und ihn aktiviert (Logothetis *et al.*, 1987; Reuveny *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1995). Die Kanäle sind Tetramere und werden durch die Kir3.x-Untereinheiten (Kir3.1 bis Kir3.4) gebildet (Dascal *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1993; Lesage *et al.*, 1994; 1995) wobei die Kir3.1- bis Kir3.3-Untereinheiten in vielen Gehirnregionen exprimiert werden (Karschin *et al.*, 1994; 1996; Karschin und Karschin, 1997). Koexpression von Kir3.1 und Kir3.2 bzw. Kir3.3 ergibt jeweils einen funktionellen Kanal, der einige der Charakteristika der nativen Kanäle zeigt (Lesage *et al.*, 1994; 1995; Velimirovic *et al.*, 1996; Jelacic *et al.*, 1999). Allerdings gibt es auch Hinweise für die Existenz eines Kir3.2/Kir3.3-Kanals (Jelacic *et al.*, 2000; Torrecilla *et al.*, 2002) und die Bildung von Kir3.2-Homomeren (Inanobe *et al.*, 1999). Murer *et al.* (1997) konnten in einer immunhistochemischen Studie die Kir 3.1- und Kir 3.2-Untereinheiten an distalen Axonendungen und an verschiedenen, möglicherweise postsynaptischen Bereichen auf neuronalen Somata und dendritischen Fortsätzen nachweisen. Eine Studie von Inanobe *et al.* (1999) an Dendriten dopaminerger Neuronen der *Substantia nigra* zeigt allerdings, dass weder PSD-95 noch SAP97 mit Kir3.2-Untereinheiten in postsynaptischen Bereichen koaggregieren. Eine direkte Interaktion von Kir3-Untereinheiten mit den PDZ-Domänen von PSD-95 ist jedenfalls auszuschließen, da Nehring *et al.* (2000) zeigen konnten, dass die C-Termini der Kir3-Untereinheiten nicht an PSD-95 binden, im Gegensatz zu den C-Termini von Kir2.1 und Kir2.2, die jeweils mit der zweiten PDZ-Domäne interagieren.

Durch die postsynaptische Aktivierung von K^+ -Kanälen bewirkt Somatostatin jeweils eine Hyperpolarisierung des Neurons. Dies erhöht den Schwellenwert für die Entstehung eines

Aktionspotentials. Es fehlen allerdings bislang Untersuchungen mit subtypspezifischen Agonisten zu diesen Somatostatineffekten, die die Beteiligung einzelner Rezeptorsubtypen klären könnten. Zudem ist zum Teil die molekulare Zusammensetzung der K^+ -Kanäle nicht bekannt, die von Somatostatin in den einzelnen Hirnregionen aktiviert werden.

Durch die Interaktion mit PSD-95 wird der SSTR4 in physikalische Nähe zu bestimmten Zielproteinen gebracht, über die nachfolgend die Somatostatineffekte weitervermittelt werden. Obwohl bei einigen dieser Zielproteine gezeigt worden ist, dass sie nicht direkt mit PSD-95 interagieren, kann eine indirekte Interaktion mit dem PSD-95/SSTR4-Komplex über intermediäre Proteine nicht ausgeschlossen werden.

Die Liste der mit PSD-95 bzw. PSD-93 interagierenden Proteine läßt sich in drei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe umfaßt Proteine, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, wie Rezeptoren, Ionenkanäle und Zelladhäsionsmoleküle. Zu dieser Gruppe gehören die ionotropen Glutamatrezeptoren. Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn, daher sind Glutamatrezeptoren an vielen Prozessen der Informationsweiterleitung beteiligt. Ihre Modulation im Rahmen der synaptischen Plastizität beeinflußt Prozesse, wie Lernen und Gedächtnis, Ausbildung und Aufrechterhaltung synaptischer Kontakte sowie die Schmerzperzeption (Bliss und Collingridge, 1993; Woolf und Salter, 2000), und Fehlfunktionen führen zu verschiedensten neurologischen Defekten (Doble, 1999). Ionotrope Glutamatrezeptoren lassen sich in die NMDA-, AMPA-, Kainat- und δ -Subtypen unterteilen (Wollmuth und Sobolevsky, 2004). PSD-95 bindet durch die erste und zweite PDZ-Domäne an die C-Termini der NMDA-Rezeptoruntereinheit 2 (NR 2a, b) (Kornau *et al.*, 1995; Niethammer *et al.*, 1996). In transfizierten Zellen kommt es in Gegenwart von PSD-95 zur Clusterbildung an der Zellmembran (Kornau *et al.*, 1995; Niethammer *et al.*, 1996). Entfernt man die C-terminale PDZ-Erkennungssequenz des NR2b-Rezeptor so erhöht dies die Internalisierung in kultivierten Neuronen (Roche *et al.*, 2001). In Untersuchungen an Mäusen, denen PSD-95 fehlt, konnte gezeigt werden, dass PSD-95 an der durch NMDA-Rezeptoren vermittelten synaptischen Plastizität beteiligt ist. Während die Expression der Untereinheiten und die Lokalisierung des Rezeptors an Synapsen unverändert blieb, war die durch NMDA-Rezeptoren vermittelte synaptische Plastizität deutlich beeinflußt, was zu einem reduzierten Lernverhalten der Mäuse führte (Migaud *et al.*, 1998). Die durch PDZ-Domänen vermittelte Interaktion von PSD-95 mit dem Transmembranprotein Stargazin führt zu einer Rekrutierung des Proteins in Synapsen, wo es mit AMPA-Rezeptoren (AMPA) interagiert (Chen *et al.*, 2000). Diese Interaktion ist für die

Bildung funktioneller AMPA-Rezeptoren an der Zellmembran entscheidend (Chen *et al.*, 2000). Die Überexpression von PSD-95 in kultivierten Hippocampus Neuronen erhöht die Zahl der synaptisch lokalisierten AMPA-Rezeptoren (El-Husseini *et al.*, 2000b). Der Einfluß von Somatostatin auf die exzitatorische Glutamat-vermittelte Signaltransduktion ist abhängig vom untersuchten Rezeptorsubtyp. So konnten Lanneau *et al.* (1998) zeigen, dass in kultivierten Hypothalamusneuronen der Maus die Aktivierung des SSTR2 mit einem subtypspezifischen Agonisten zu einer Reduzierung der Glutamat-induzierten Ströme führt, während die Stimulierung des SSTR1 mit einem subtypspezifischen Agonisten zu einer Erhöhung der Glutamat-induzierten Ströme führt. In beiden Fällen wurde der Glutamateffekt durch AMPA/KA-Rezeptoren vermittelt. Während die SSTR2-vermittelte Inhibition durch Inkubation mit PTX blockiert wird, hat PTX auf die SSTR1-vermittelte Stimulierung keinen Einfluß, was auf die Beteiligung unterschiedlicher G-Proteine schließen läßt (Lanneau *et al.*, 1998). Ein ähnlicher stimulierender Effekt auf die Glutamat-induzierten Ströme konnte für den SSTR4 in der CA1-Region (Moneta *et al.*, 2002) bzw. CA3-Region (Cammalleri *et al.*, 2004) des Hippocampus von Mäusen gezeigt werden. Spezifische Stimulierung des SSTR4 erzeugte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Erhöhung der Glutamat-induzierten Ströme. Allerdings beobachteten Moneta *et al.* (2002) eine SSTR2-Abhängigkeit dieses Effektes, da in SSTR2 *knock out* Mäusen der SSTR4-vermittelte Effekt deutlich reduziert war. Im Gegensatz dazu konnten Cammalleri *et al.* (2004) keinen Einfluß des SSTR2 auf den SSTR4-vermittelte Effekt beobachten. Dieser Unterschied resultiert möglicherweise aus den verschiedenen Regionen des Hippocampus, der für die Untersuchungen verwendet wurde.

Die zweite Gruppe umfaßt Proteine der Signaltransduktion. PSD-95 interagiert mit einer Vielzahl intrazellulärer Signalmoleküle, darunter GTPase aktivierende Proteine (GAP: *GTPase-activating protein*), Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF: *guanine nucleotide exchange factor*) und GTPase interagierende Proteine der kleine G-Proteine Ras, Rac und Rho (z.B.: Zhang *et al.*, 1999; Penzes *et al.*, 2001), so beispielsweise auch verschiedene Komponenten der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade. Die Tyrosinkinase Src bindet an die SH3- und die GK-Domäne (Tezuka *et al.*, 1999; Kalia und Salter, 2003). Src aktiviert über den GRB/SOS-Proteinkomplex das kleine G-Protein Ras, das nach Austausch von GDP gegen GTP an die Kinase Raf bindet (Finkbeiner und Greenberg, 1996). Raf phosphoryliert nachfolgend MAPK/ERK-Kinasen (Vojtek und Der, 1998; Morrison und Cutler, 1998). PSD-95 interagiert mit den Proteinen SynGAP (Kim

etal., 1998; Chen *etal.*, 1998) und MAGUIN (Yao *etal.*, 1999). SynGAP ist ein Ras-GTPase aktivierendes Protein (Kim *etal.*, 1998; Chen *etal.*, 1998) und MAGUIN interagiert u.a. mit Raf (Yao *et al.*, 2000), so dass die in der Signalkaskade nacheinander geschalteten Proteine durch PSD-95 in räumliche Nähe gebracht werden. Ob PSD-95 die Aktivierung der einzelnen Komponenten beeinflusst, ist nicht bekannt. Für den SSTR4 konnte eine funktionelle Kopplung an die Src-vermittelte Aktivierung der Raf-Kinase nachgewiesen werden (Sellers, 1999). Allerdings erfolgt die Src-vermittelte Aktivierung nur nach akuter Stimulierung des SSTR4, während eine länger andauernde Stimulierung des SSTR4 zu einer Proteinkinase C-abhängigen Aktivierung von Raf führt (Sellers, 1999). Die Aktivierung der Proteinkinase C erfolgt entweder über Phospholipase C oder über Phosphoinositol-3-Kinase (Sellers, 1999).

Die dritte Gruppe umfaßt Proteine, die mit dem Cytoskelett verknüpft sind, oder weitere Gerüstproteine, wie die Proteine der GKAP/SAPAP-Familie. GKAP (Guanylatkinase-assoziiertes Protein) interagiert mit der GK-Domäne und verknüpft PSD-95 mit Mitgliedern der Shank-Proteinfamilie (*SH3 and ankyrin repeat-containing protein*) (Kim *et al.*, 1997). Diese fungieren ebenso als Gerüstproteine und interagieren ihrerseits über verschiedene Domänen mit einer Vielzahl von Proteinen (Sheng und Kim, 2000). PSD-95 wird somit in ein größeres Netzwerk von Proteinen integriert. Durch die Interaktion mit CRIPT (Niethammer *et al.*, 1998), APC (Matsumine *et al.*, 1996) und MAP1a (Brenman *et al.*, 1998) ist PSD-95 direkt mit dem Cytoskelett verbunden. Die Interaktion wird jeweils durch unterschiedliche Domänen von PSD-95 vermittelt [CRIPT: 3. PDZ-Domäne (Niethammer *et al.*, 1998); APC: 1. und 2. PDZ-Domäne (Matsumine *et al.*, 1996); MAP1a: GK-Domäne (Brenman *et al.*, 1998)]. Da PSD-95 gleichzeitig auch mit einigen Regulatoren der kleinen GTPasen interagiert, die die Anordnung und Dynamik von F-Actin beeinflussen, dem Hauptbestandteil des Cytoskeletts in dendritischen Fortsätzen (Hering und Sheng, 2001), läßt sich ein Einfluß von PSD-95 auf die Morphologie der dendritischen Fortsätze vermuten. Überexpression von PSD-95 führt zu einer vermehrten Ausbildung von dendritischen Fortsätzen in kultivierten Hippocampus Neuronen (El-Husseini *et al.*, 2000b). PSD-95 interagiert ebenfalls mit Kif1B α , einem Motorprotein der Kinesin-Superfamilie, das spezifisch für Dendriten ist. Diese Interaktion wird durch die 1. und 2. PDZ-Domäne von PSD-95 vermittelt (Mok *et al.*, 2000). PSD-95 fungiert in diesem Zusammenhang als Linker zwischen dem Motorprotein und der zu transportierenden Fracht, wie etwa GTPasen, Transmembranproteinen oder anderen Gerüstproteinen (Mok *et al.*, 2000).

Für die Ausbildung höhermolekularer Komplexe ist eine Multimerisierung von PSD-95 nötig. Zum einen bewirkt GKAP eine Multimerisierung durch Interaktion mit der GK-Domäne von PSD-95 und PSD-93 sowie SAP102 und SAP97 (Kim *et al.*, 1997). Zum anderen bilden PSD-95 und PSD-93 Homo- und Heteromultimere durch intermolekulare Disulfidbrücken am N-Terminus (Hsueh und Sheng, 1999), durch Interaktion der SH3- und der GK-Domäne (McGee und Brecht, 1999; Shin *et al.*, 2000; Tavares *et al.*, 2001) oder durch Interaktion über die palmitoylierten N-terminalen Bereiche (Christopherson *et al.*, 2003). Für die synaptische Lokalisierung von PSD-95 und Gruppierung der assoziierten Rezeptoren an der Zellmembran ist diese Palmitoylierung von N-terminalen Cysteinen ebenfalls notwendig (Craven *et al.*, 1999; Topinka und Brecht, 1998). Eine Depalmitoylierung bewirkt die Auflösung von synaptischen PSD-95-Clustern und reduziert die Zahl an synaptischen AMPA-Rezeptoren (El-Husseini *et al.*, 2000a). Diese Depalmitoylierung wird durch Glutamatrezeptoraktivität reguliert (El-Husseini *et al.*, 2000a). Daneben kommt es durch synaptische Aktivität zu einem Abbau von PSD-95 über einen Ubiquitin-vermittelten Weg (Colledge *et al.*, 2003; Pak und Sheng, 2003), wobei entweder eine direkte Ubiquitylierung von PSD-95 stattfindet (Colledge *et al.*, 2003) oder aber ein Abbau des PSD-95-assoziierten Proteins SPAR über einen Ubiquitin-vermittelten Weg zu einer Reduzierung von PSD-95 führt (Pak und Sheng, 2003).

Die Hauptaufgabe der PSD-95-Proteinfamilie und anderer postsynaptischer Gerüstproteine besteht in der Organisation größerer Proteinkomplexe, die neben Transmembranproteinen auch nachgeschaltete Effektorproteine enthalten. Durch die räumliche Integration an der Zellmembran wird ein effizientes Zusammenwirken ermöglicht. Gleichzeitig kann die Zusammensetzung des Komplexes aktivitätsabhängig reguliert werden, wobei zum einen spezifische Komponenten vermehrt in den Komplex integriert werden und so z.B. zu einer Erhöhung der lokalen Signaltransduktion führen. Andererseits ist aber auch die Reduzierung der Signaltransduktion bis hin zur Abschaltung einzelner synaptischer Kontakte möglich. Durch die Interaktion mit Teilen des Cytoskeletts wird die Möglichkeit geschaffen, aktivitätsabhängig die Neubildung, Aufrechterhaltung oder Eliminierung synaptischer Kontakte zu regulieren. Durch die Interaktion mit anderen Gerüstproteinen erfolgt eine Verknüpfung mit anderen cytoplasmatischen Proteinkomplexen (Sheng und Sala, 2001).

Der SSTR4 gehört zur Gruppe der transmembranständigen Interaktionspartner von PSD-95. Durch die Interaktion mit PSD-95 werden interagierende Proteine, wie Ionenka-

näle oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermehrt an die Zellmembran rekrutiert, unter anderem durch eine Reduzierung der Agonisten-induzierten Internalisierung.

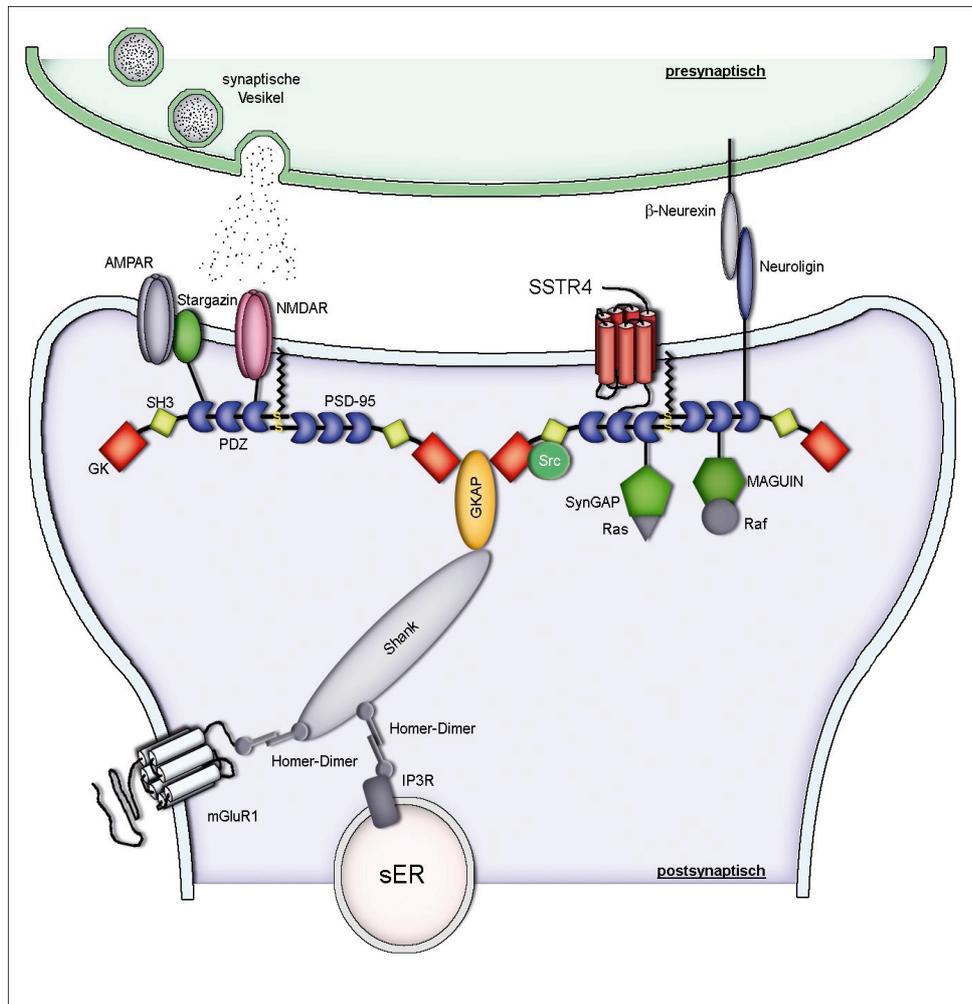


Abbildung 24: Organisation postsynaptischer Komplexe durch PSD-95

Modell der Organisation von verschiedenen synaptischen Proteinen durch PSD-95. Nur eine kleine Auswahl von interagierenden Proteinen ist dargestellt. Neben GPCRs, wie der SSTR4, werden auch Ionenkanäle direkt (z.B. NMDAR) oder indirekt über andere Proteine (AMPA über Stargazin) in der postsynaptischen Membran mit nachgeschalteten Proteinen der Signaltransduktion verknüpft. Dies geschieht ebenfalls durch direkte Interaktion (z.B. Src) oder über intermediäre Proteine wie SynGAP oder MAGUIN. Die Interaktion mit anderen Gerüstproteinen, wie Shank (siehe Einleitung), erlaubt die Ausbildung größerer Protein-Netzwerke. PSD-95 multimerisiert durch verschiedenste Prozesse und ermöglicht so eine gleichzeitige Bindung unterschiedlicher Proteine. Indirekte Interaktionen sind grau dargestellt. Nähere Erläuterungen im Text.

So interagiert PSD-95 beispielsweise mit dem 5-HT_{2a}-Rezeptor (Bécamel *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2003) oder dem β 1-adrenergen Rezeptor (Hu *et al.*, 2000), zwei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Familie A. Die Interaktion reduziert im Fall des β 1-adrenergen Rezeptors die Agonisten-induzierte Internalisierung des Rezeptors, während die Agonisten-induzierte Desensibilisierung nicht beeinflusst wird (Hu *et al.*, 2000). Für den 5-HT_{2a}-

Rezeptor konnte diese Inhibierung der Agonisten-induzierte Internalisierung auch nachgewiesen werden. Zudem erhöht PSD-95 die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion in transfizierten HEK-293-Zellen, während die Agonisten-induzierte Desensibilisierung ebenfalls unbeeinflusst bleibt (Xia *et al.*, 2003). Der rSSTR4 internalisiert allerdings weder *in vivo* (Schreff *et al.*, 2000) noch in transfizierten HEK293-Zellen (Kreienkamp *et al.*, 1998) nach Agonistenstimulierung. Diese Eigenschaft ändert sich auch nicht in der Anwesenheit von PSD-95 (s. Abb. 19). Die rSSTR4.T331A-Mutante internalisiert dagegen nach einstündiger Agonistenstimulierung, jedoch unabhängig von der Anwesenheit von PSD-95 (s. Abb. 20). Exprimiert man den rSSTR4 zusammen mit dem einwärtsgerichtenden K⁺-Kanal Kir3.1 (GIRK1) in *Xenopus laevis* Oozyten, so beobachtet man nach Agonistenstimulierung einen starken einwärtsgerichteten K⁺-Strom, der nach dem Auswaschen des Liganden nur langsam abnimmt (Kreienkamp *et al.*, 1998). Koexpression von PSD-95 ändert dieses Verhalten des rSSTR4 nicht (s. Abb. 21). Die Abnahme des Agonisten-induzierten K⁺-Stroms wird durch Koexpression von PSD-95 ebenfalls nicht verändert.

Da sowohl PSD-95 bzw. PSD-93 auch eine cytoplasmatische Verteilung, wie der SSTR4 zeigen, läßt sich über einen möglichen Einfluß von PSD-95 bzw. PSD-93 auf den Transport von SSTR4 in dendritische Bereiche spekulieren. In diesem Zusammenhang ist die Interaktion von PSD-95 mit Kif1B α von Interesse, einem Motorprotein der Kinesin-Superfamilie, das spezifisch für Dendriten ist. Die Assoziierung von Motorproteinen mit Gerüstproteinen erlaubt den Transport von größeren Komplexen, da Gerüstproteine über ihre Proteininteraktionsdomänen mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren. Weiterhin wäre es denkbar, dass über eine PDZ-Domänen vermittelte Interaktion des Motor-PDZ-Protein-Frachtkomplexes am Zielort eine Integration in bestehende Komplexe erleichtert wird. So könnte PSD-95 beispielsweise über eine Interaktion mit Cytoskelett-assoziierten Proteinen wie CRIPT (Niethammer *et al.*, 1998) oder mit intrazellulären Bereichen von Zelladhäsionsmolekülen wie Neuroligin (Irie *et al.*, 1997) an der Zielsynapse verankert werden. In *Caenorhabditis elegans* konnte ein Komplex aus PDZ-Proteinen (CASK/LIN2-LIN7-LIN10) identifiziert werden, der für die basolaterale Sortierung von Rezeptortyrosinkinasen wichtig ist (Kaeck *et al.*, 1998).

Neben einem möglichen Einfluß auf den Transport und Sortierung des SSTR4 ermöglicht die Interaktion mit PSD-95 eine räumliche Organisation von nacheinander geschalteten Signalmolekülen, wie etwa Teilen der MAPK-Kaskade. Daneben ermöglicht die räumliche Organisation verschiedener Signalsysteme durch PSD-95 eine gegenseitige Beeinflussung. So werden beispielsweise AMPA-Rezeptoren durch Tyrosin-Phosphorylierung durch die

Src-Kinasefamilie reguliert (Hayashi und Huganier, 2004). Diese Phosphorylierung beeinflusst neben dem Transport zur Zelloberfläche auch die Internalisierung des Rezeptors (Hayashi und Huganier, 2004). Zudem erhöht die Tyrosin-Phosphorylierung die exzitatorische Signaltransduktion der AMPA-Rezeptoren (Soderling und Derkach, 2000). Während der normalen synaptischen Signalweiterleitung sind NMDA-Rezeptoren inaktiv, wegen einer spannungsabhängigen-Blockade des Kanals durch ein Mg^{2+} -Ion. Eine verstärkte postsynaptische Depolarisierung ist notwendig, um den Mg^{2+} -Block des NMDA-Rezeptors zu entfernen. Die nachfolgende Aktivität der NMDA-Rezeptoren ist für Prozesse der synaptischen Plastizität notwendig, spielt aber auch bei pathologischen Prozessen wie Schmerzperzeption und Epilepsie eine wichtige Rolle (Soderling und Derkach, 2000; Salter und Kalia, 2004). Epilepsie zeichnet sich durch eine abnormale Hypererregbarkeit in verschiedensten Hirnregionen aus. Die Temporallappenepilepsie (TLE) betrifft u.a. den Hippocampus (Sloviter, 1994). In Patienten mit TLE konnte man in Teilen des Hippocampus einen selektiven Verlust von Neuronen nachweisen, die Somatostatin enthalten (de Lanerolle *et al.*, 1989; Mathern *et al.*, 1995). Zudem zeigt die Somatostatin-*knock out*-Maus stärkere epileptische Anfälle als der Wildtyp (Buckmaster *et al.* 2002) und eine intracerebrale Injektion von Somatostatin reduziert epileptiforme Aktivität nach Kainat-Behandlung im Hippocampus (Tallent und Siggins, 1997; 1999; Vezzani und Hoyer, 1999). Intracerebrale Injektion von Kainat in Ratten stellt ein Tiermodell für TLE dar. Deshalb überraschen die Ergebnisse von Moneta *et al.* (2002) bzw. Cammalleri *et al.* (2004), die eine Erhöhung der epileptiformen Aktivität, nach Injektion eines SSTR4-spezifischen Agonisten vor Kainat-Behandlung zeigen konnten. In beiden Fällen wurde jedoch keine Aussage über den Signaltransduktionsweg gemacht, der die Verstärkung der Glutamat-Signalweiterleitung durch den SSTR4 vermittelt. Ein möglicher Kandidat wäre die Tyrosin-Kinase Src, die durch den SSTR4 aktiviert werden kann, und die zu einer Erhöhung der Glutamat-Signalweiterleitung durch Phosphorylierung der entsprechenden Rezeptoren führt. Zudem reduziert die Verwendung eines Inhibitors der Src-Kinasefamilie deutlich die epileptiforme Aktivität im Tierversuch (Sanna *et al.*, 2000). Der SSTR4 wäre dann durch seine Interaktion mit PSD-95 in ein Netzwerk integriert, das die Signalweiterleitung an exzitatorischen Synapsen reguliert.

Um die Bedeutung der SSTR4/PSD-95-Interaktion für Regulation der Somatostatin-vermittelten Effekte weiter zu untersuchen, ist in jedem Fall eine Aufschlüsselung der Beteiligung der Rezeptorsubtypen an den Somatostatin-vermittelten Effekten notwendig. Weiterhin würde eine verbesserte Methode der immunhistochemischen Lokalisierung von PSD-95 und SSTR4 eine Analyse der SSTR4-vermittelten Effekte erleichtern.

6. Zusammenfassung

Somatostatin ist ein regulatorisches Peptid, das eine Vielzahl von biologischen Prozessen innerhalb des Körpers beeinflusst. Die Wirkung von Somatostatin wird auf zellulärer Ebene über eine Familie von fünf G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelt, die entweder in G-Protein-abhängiger Weise oder vermutlich auch über andere interagierende intrazelluläre Proteine auf nachgeschaltete Signaltransduktionswege wirken. Der Somatostatinrezeptor Subtyp 4 (SSTR4) wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert und wirkt dort inhibierend auf die exzitatorische Signalweiterleitung. Es sind aber auch stimulierende Effekte des SSTR4 bekannt.

Um das subtypspezifische Signalverhalten des SSTR4 weiter zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Proteine gesucht, die intrazellulär mit dem SSTR4 interagieren und so seine physiologischen Effekte beeinflussen. In einem ersten Ansatz konnten drei mögliche Interaktionspartner mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems identifiziert werden, die aber in nachfolgenden Untersuchungen als unpezifisch eingestuft wurden. Mit Hilfe einer Affinitätschromatografie wurden dann zwei Proteine identifiziert, die spezifisch mit dem SSTR4 interagieren. Sowohl PSD-95 als auch PSD-93 (*Postsynaptic density protein of 95 kDa bzw. 93kDa*) wurden mit einem immobilisierten Peptid präzipitiert, das die neun C-terminalen Aminosäuren des SSTR4 enthält. Die Interaktion des SSTR4 mit PSD-95 wurde im Weiteren näher charakterisiert. In einem Bindungsexperiment mit rekombinaten Proteinen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion durch die 1. und 2. PDZ-Domäne von PSD-95 vermittelt wird. In humanen embryonalen Nieren-Zellen (HEK293), die den SSTR4 stabil exprimieren, konnte PSD-95 mit dem Rezeptor koimmunpräzipitiert werden. Nach Koexpression von PSD-95 und SSTR4 findet man eine partielle Kollokalisierung beider Proteine an der Zellmembran, wobei aber der Großteil des PSD-95 weiterhin eine diffuse zytoplasmatische Verteilung zeigt. Die Interaktion wurde *in vivo* sowohl immunhistochemisch in kultivierten Hippocampus-Neuronen als auch durch Koimmunpräzipitation beider Proteine aus Rattengehirn-Lysaten nachgewiesen. Die Interaktion von PSD-95 mit dem SSTR4 beeinflusst weder die Agonisten-induzierte Internalisierung des Rezeptors in HEK293-Zellen, noch die Kopplung des Rezeptors an einen G-Protein-gekoppelten einwärtsgerichtenden Kaliumkanal in Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*.

Durch die Interaktion mit PSD-95 wird der SSTR4 in physikalische Nähe zu bestimmten Zielproteinen gebracht, über die nachfolgend die Somatostatineffekte weitervermittelt werden. So ermöglicht die Interaktion vermutlich eine Integration des SSTR4 in den postsynaptischen

Komplex aus PSD-95 und Glutamatrezeptoren, wo der SSTR4 die bereits beschriebenen regulatorischen Effekte auf die Glutamat-vermittelte exzitatorische Signaltransduktion ausüben kann.

Summary

Somatostatin is a regulatory peptid, which affects a multiplicity of biological processes within the body. The effects of Somatostatin are mediated by a family of five G-protein-coupled receptors, which act on several downstream signaltransduction pathways either in a G-protein-dependent way or probably in a G-protein-independent manner via intracellular interacting proteins. The somatostatin receptor subtyp 4 (SSTR4) is mainly expressed in brain, where it inhibits the excitatory neurotransmission. In addition, excitatory effects of SSTR4 have also been published.

In order to examine the subtype specific signalling of SSTR4, I tried to identify intracellular proteins which interact directly with the SSTR4 and affect its physiological effects. Using the yeast two-hybrid system I identified three possible interaction partners for SSTR4, which were however classified as non-specific in subsequent experiments. In a second approach two proteins which interact with SSTR4 could be identified by affinity-chromatography. Both proteins PSD-95 and PSD-93 (*Postsynaptic density protein of 95 kDa and 93kDa*) were precipitated specifically with an immobilized peptid that contains the nine C-terminal amino acids of SSTR4. The interaction of the SSTR4 with PSD-95 was further characterized. In a binding experiment with recombinant proteins I could show that the interaction is mediated by the 1st and 2nd PDZ-domain of PSD-95. In human embryonic kidney cells (HEK293) which stably express SSTR4, PSD-95 could be coprecipitated with the receptor. After coexpression of PSD-95 and SSTR4 both proteins are partially colocalized at the plasma membrane. The majority of the PSD-95 however shows a diffuse cytoplasmic distribution. The *in vivo* interaction was proven by immunohistochemistry on cultivated hippocampal neurons and by coimmunoprecipitation of both proteins from rat brain lysates. The interaction of PSD-95 with SSTR4 affected neither the agonist induced internalisation of the receptor in HEK293 cells, nor the coupling of the receptor to a G-protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel in oocytes obtained from the african clawed frog *Xenopus laevis*.

By the interaction with PSD-95, SSTR4 is brought into physical proximity to certain target proteins which mediate the effects of somatostatin. Thus the interaction probably allows an integration of SSTR4 into the postsynaptic complex of PSD-95 and glutamergic receptors, where SSTR4 could regulate the glutamat-mediated excitatory signaltransduction.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, PR. und Brown, DA. (1982):** Synaptic inhibition of the M-current: slow excitatory postsynaptic potential mechanism in bullfrog sympathetic neurones. *J. PHYSIOL.* **332**; 263-272.
- Anborgh, PH.; Dale, L.; Seachrist, J. und Ferguson, SSG. (2000):** Differential regulation of β_2 -adrenergic and angiotensin II type 1A receptor trafficking and resensitization: Role of carboxyl-terminal domains. *MOL. ENDOCRINOL.* **14**; 2040-2053.
- Ango, F.; Prezeau, L.; Müller, T.; Tu, JC.; Xiao, B.; Worley, PF.; Pin, JP.; Bockaert, J. und Fagni, L. (2001):** Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *NATURE* **411**; 962-965.
- Aoki, C.; Miko, I.; Oviedo, H.; Mikeladze-Dvali, T.; Alexandre, L.; Sweeney, N. und Breddt, DS. (2001):** Electron microscopic immunocytochemical detection of PSD-95, PSD-93, SAP-102, and SAP-97 at postsynaptic, presynaptic, and nonsynaptic sites of adult and neonatal rat visual cortex. *SYNAPSE* **40**; 239-257.
- Aronin, N.; Cooper, PE.; Lorenz, LJ.; Bird, ED.; Sagar, SM.; Leeman, SE. und Martin, JB. (1983):** Somatostatin is increased in the basal ganglia in Huntington disease. *ANN. NEUROL.* **13**; 519-526.
- Baldwin, JM. (1993):** The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **12**; 1693-1703.
- Ballesteros, JA. und Weinstein, H. (1994):** Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *METHODS NEUROSCI.* **25**; 366-428.
- Bargmann, C. (1998):** Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *SCIENCE* **282**; 2028-2033.
- Bayliss, DA.; Sirois, JE. und Talley, EM. (2003):** The TASK family: two-pore domain background K^+ channels. *MOL. INTERV.* **3**; 205-219.
- Beal, MF.; Clevens, RA. und Mazurek, MF. (1988a):** Somatostatin and neuropeptide Y immunoreactivity in Parkinson's disease dementia with Alzheimer's changes. *SYNAPSE* **2**; 463-467.
- Beal, MF.; Mazurek, MF.; Ellison, DW.; Swartz, KJ.; McGarvey, U.; Bird, ED. und Martin, JB. (1988b):** Somatostatin and neuropeptide Y concentrations in pathologically graded cases of Huntington's disease. *ANN. NEUROL.* **23**; 562-569.
- Bécamel, C.; Figge, A.; Poliak, S.; Dumuis, A.; Peles, E.; Bockaert, J.; Lübbert, H. und Ullmer, C. (2001):** Interaction of serotonin 5-hydroxytryptamine type 2C receptors with PDZ10 of the multi-PDZ domain protein MUPP1. *J. BIOL. CHEM.* **276**; 12974-12982.
- Bécamel, C.; Alonso, G.; Galéotti, N.; Demey, E.; Jouin, P.; Ullmer, C.; Dumuis, A.; Bockaert, J. und Marin, P. (2002):** Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT(2C) receptors: a proteomic approach. *EMBO J.* **21**; 2332-2342.
- Bécamel, C.; Gavarini, S.; Chanrion, B.; Alonso, G.; Galéotti, N.; Dumuis, A.; Bockaert, J. und Marin, P. (2004):** The serotonin 5-HT2A and 5-HT2C receptors interact with specific sets of PDZ proteins. *J. BIOL. CHEM.* **279**; 20257-20266.

- Bellefroid, E.J.; Poncelet, D.A.; Lecocq, P.J.; Revelant, O. und Martial, J.A. (1991):** The evolutionarily conserved Krüppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins; *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **88**; 3608-3612.
- Benovic, J.L.; Bouvier, M.; Caron, M.G. und Lefkowitz, R.J. (1988):** Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors. *ANNU. REV. CELL BIOL.* **4**; 405-428.
- Berger, A.; Schiltz, E. und Schulz, G.E. (1989):** Guanylate kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization.; crystallization and preliminary X-ray analysis.; amino acid sequence and comparison with adenylylate kinases. *EUR. J. BIOCHEM.* **184**; 433-443.
- Birnbaumer, L. (1992):** Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *CELL* **71**; 1069-1072.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; *NUCLEIC ACIDS RES.* **7**; 1513-1523.
- Bito, H.; Mori, M.; Sakanaka, C.; Takano, T.; Honda, Z.; Gotoh, Y.; Nishida, E. und Shimizu, T. (1994):** Functional coupling of SSTR4, a major hippocampal somatostatin receptor, to adenylylate cyclase inhibition, arachidonate release, and activation of mitogen-activated protein kinase cascade. *J. BIOL. CHEM.* **269**: 12722-12730.
- Bliss, T.V. und Collingridge, G.L. (1993):** A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *NATURE* **361**; 31-39.
- Bockaert, J. und Pin, J.P. (1999):** Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**; 1723-1729.
- Bockaert, J.; Roussignol, G.; Bécamel, C.; Gavarini, S.; Joubert, L.; Dumuis, A.; Fagni, L. und Marin, P. (2004):** GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions. *BIOCHEM. SOC. TRANS.* **32**; 851-855.
- Boehm, S. und Betz, H. (1997):** Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *J. NEUROSCI.* **17**; 4066-4075.
- Bourne, H.R. (1995):** Trimeric G proteins: surprise witness tells a tale. *SCIENCE* **270**: 933-934.
- Bouvier, M.; Hausdorff, W.P.; De Blasi, A.; O'Dowd, B.F.; Kobilka, B.K.; Caron, M.G. und Lefkowitz, R.J. (1988):** Removal of phosphorylation sites from the β_2 -adrenergic receptor delays the onset of agonist-promoted desensitization. *NATURE* **333**; 370-373.
- Bradford, M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *ANAL. BIOCHEM.* **72**; 248-254.
- Brady, J.P. und Piatigorsky, J. (1994):** A mouse cDNA encoding a protein with zinc-fingers and a KRAB domain shows similarity to human profilaggrin; *GENE.* **149**; 299-304.
- Brakeman, P.R.; Lanahan, A.A.; O'Brien, R.; Roche, K.; Barnes, C.A.; Huganir, R.L. und Worley, P.F. (1997):** Homer: A protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *NATURE* **386**; 284-288.
- Brazeau, P.; Vale, W.; Burgus, R.; Ling, N.; Butcher, M.; Rivier, J. und Guillemin, R. (1973):** Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *SCIENCE* **179**; 77-79.

- Brenman, JE.; Christopherson, KS.; Craven, SE.; McGee, AW. und Breddt, DS. (1996):** Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J. NEUROSCI.* **16:** 7407-7415.
- Brenman, JE.; Topinka, JR.; Cooper, EC.; McGee, AW.; Rosen, J.; Milroy, T.; Ralston, HJ. und Breddt, DS. (1998):** Localization of PSD-93 to dendritic microtubules and interaction with microtubule-associated protein 1A. *J. NEUROSCI.* **18:** 8805-8813.
- Brown, DA. und Adams, PR. (1980):** Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *NATURE* **28;** 673-676.
- Bruno, JF.; Xu, Y.; Song, J. und Berelowitz, M. (1992):** Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **89;** 11151-11155.
- Buckmaster, PS.; Otero-Corchon, V.; Rubinstein, M. und Low, MJ. (2002):** Heightened seizure severity in somatostatin knockout mice. *EPILEPSY RES.* **48;** 43-56.
- Buscail, L.; Delesque, N.; Esteve, JP.; Saint-Laurent, N.; Prats, H.; Clerc, P.; Bell, G.I.; Robberecht, P.; Liebow, C.; Schally, AV.; Vayasse, N. und Susini, C. (1994):** Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **91;** 2315-2319.
- Cammalleri, M.; Cervia, D.; Langenegger, D.; Liu, Y.; Monte, MD.; Hoyer, D. und Bagnoli, P. (2004):** Somatostatin receptors differentially affect spontaneous epileptiform activity in mouse hippocampal slices. *EUR. J. NEUROSCI.* **20;** 2711-2721.
- Chang, YH.; Chang, NC.; Chen, WM. und Chang AC. (1993):** Molecular characterization of a murine homologue of alpha 2C4 adrenoceptor subtype gene. *BIOCHEM. MOL. BIOL. INT.* **29;** 467-474.
- Chen, C. und Okayama, H. (1987):** High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid. *DNA MOL. CELL. BIOL.* **7;** 2745-2752.
- Chen, HJ.; Rojas-Soto, M.; Oguni, A. und Kennedy, MB. (1998):** A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 Syn-GAP) inhibited by CaM kinase II. *NEURON* **20;** 895-904.
- Chen, L.; Chetkovich, DM.; Petralia, RS.; Sweeney, NT.; Kawasaki, Y.; Wenthold, R.J.; Breddt, DS. und Nicoll, RA. (2000):** Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *NATURE* **408;** 936-943.
- Chien, CT.; Bartel, PL.; Sternglanz, R. und Fields, S. (1991):** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest; *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **88;** 9578-9582.
- Cho, KO.; Hunt, CA. und Kennedy, MB. (1992):** The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *NEURON* **9;** 929-942.
- Christopherson, KS.; Sweeney, NT.; Craven, SE.; Kang, R.; El-Husseini, AD. und Breddt, DS. (2003):** Lipid- and protein-mediated multimerization of PSD-95: implications for receptor clustering and assembly of synaptic protein networks. *J. CELL SCI.* **116;** 3213-3219.
- Clapham, DE. und Neer, E.J. (1993):** New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *NATURE* **365;** 403-406.

- Cohen, GB.; Ren, R. und Baltimore, D. (1995):** Modular binding domains in signal transduction. *CELL* **80**; 237-248.
- Colas, G.; Cambillau, C.; Buscail, L.; Zeggari, M.; Esteve, JP.; Lautre, V.; Thomas, F.; Vaysse, N. und Susini, C. (1992) :** Stimulation of a membrane tyrosine phosphatase activity by somatostatin analogues in rat pancreatic acinar cells. *EUR. J. BIOCHEM.* **207**; 1017-1024.
- Colledge, M.; Snyder, EM.; Crozier, RA.; Soderling, JA.; Jin, Y.; Langeberg, LK.; Lu, H.; Bear, MF. und Scott JD. (2003):** Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *NEURON* **40**; 595-607.
- Colonnier, M. (1968):** Synaptic pattern on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *BRAIN RESEARCH* **9**; 268-287.
- Cooper, EC.; Aldape, KD.; Abosch, A.; Barbaro, NM.; Berger, MS.; Peacock, WS.; Jan, YN. und Jan, LY. (2000):** Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **97**; 4914-4919.
- Corness, JD.; Demchyshyn, LL.; Seeman, P.; Van Tol, HH.; Srikant, CB.; Kent, G.; Patel, YC. und Niznik, HB. (1993):** A human somatostatin receptor (SSTR3), located on chromosome 22, displays preferential affinity for somatostatin-14 like peptides. *FEBS LETT.* **321**; 279-284.
- Craven, SE.; El-Husseini, AE. und Brecht DS. (1999):** Synaptic targeting of the postsynaptic density protein PSD-95 mediated by lipid and protein motifs. *NEURON* **22**; 497-509.
- Dascal, N.; Lim, NF.; Schreibmayer, W.; Wang, W.; Davidson, N. und Lester, HA. (1993):** Expression of an atrial G-protein-activated potassium channel in *Xenopus* oocytes. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **90**; 6596-6600.
- Davies, P.; Katzmann, R. und Terry, RD. (1980):** Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementia. *NATURE* **288**; 279-280.
- de la Pena, P.; Delgado, LM.; del Camino, D. und Barros, F. (1992):** Two isoforms of the thyrotropin-releasing hormone receptor generated by alternative splicing have indistinguishable functional properties. *J. BIOL. CHEM.* **267**; 25703-2578.
- de Lanerolle, NC.; Kim, JH.; Robbins, RJ. und Spencer, DD. (1989):** Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *BRAIN RES.* **495**; 387-395.
- DeLecea, L.; Criado, JR.; Prospero-Garcia, O.; Gautvik, KM., Schweitzer, P.; Danielson, PE.; Dunlop, CLM.; Siggins, GR.; Henriksen, SJ. und Sutcliffe, JG. (1996):** A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *NATURE* **381**; 242-245.
- DeLecea, L.; Del Rio.; JA.; Criado, JR.; Alcantara, S.; Morales, M.; Danielson, PE., Henriksen, SJ.; Soriano, E. und Sutcliffe, JG. (1997):** Cortistatin is expressed in distinct subset of cortical interneurons. *J. NEUROSCI.* **17**:5868-5880.
- Demchyshyn, LL.; Srikant, CB.; Sunahara, RK.; Kent, G.; Seeman, P.; Van Tol, HH.; Panetta, R.; Patel, YC. und Niznik, HB. (1993) :** Cloning and expression of a human somatostatin-14-selective receptor variant (somatostatin receptor 4) located on chromosome 20. *MOL. PHARMACOL.* **43**; 894-901.

- Dery, O.; Thoma, MS.; Wong, H.; Grady, EF. und Bunnnett, NW. (1999):** Trafficking of proteinase-activated receptor-2 and β -arrestin-1 tagged with green fluorescent protein. β -Arrestin-dependent endocytosis of a proteinase receptor. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 18524-18535.
- Devreotes, P. (1994):** G protein-linked signaling pathways control the developmental program of *Dictyostelium*. *NEURON* **12**; 235-241.
- Doble, A. (1999):** The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *PHARMACOL. THER.* **81**; 163-221.
- Dohlman, HG.; Thorner, J.; Caron, MG. und Lefkowitz, RJ. (1991):** Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *ANNU. REV. BIOCHEM.* **60**; 653-688.
- Donti, E.; Lanfrancone, L.; Huebner, K.; Pascucci, A.; Venti, G.; Pengue, G.; Grignani, F.; Croce, CM.; Lania, L. und Pelicci, PG. (1990):** Localization of the human HF10 finger gene on a chromosome region (3p21-22) frequently deleted in human cancers. *HUM. GENET.* **84**; 391-395.
- Doss, RC.; Perkins, JP. und Harden TK. (1981):** Recovery of β -adrenergic receptors following longterm exposure of astrocytoma cells to catecholamine. *J. BIOL. CHEM.* **256**; 12281-12286.
- Dournaud, P.; Gu, YZ.; Schonbrunn, A.; Mazella, J.; Tannenbaum, GS. und Beaudet, A. (1996):** Localization of the somatostatin receptor SST2A in rat brain using a specific anti-peptide antibody. *J. NEUROSCI.* **16**; 4468-4478.
- Dournaud, P.; Boudin, H.; Schonbrunn, A.; Tannenbaum, GS. und Beaudet, A. (1998):** Interrelationships between somatostatin sst2A receptors and somatostatin-containing axons in rat brain: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin. *J. NEUROSCI.* **18**; 1056-1071.
- Douziech, N.; Calvo, E.; Coulombe, Z.; Muradia, G.; Bastien, J.; Aubin, RA.; Lajas, A. und Morisset, J. (1999):** Inhibitory and stimulatory effects of somatostatin on two human pancreatic cancer cell lines: a primary role for tyrosine phosphatase SHP-1. *ENDOCRINOLOGY* **140**; 765-777.
- Du, K.; Herzig, S.; Kulkarni, RN. und Montminy, M. (2003):** TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *SCIENCE* **300**; 1574-1577.
- Durfee, T.; Becherer, K.; Chen, PL.; Yeh, SH.; Yang, Y.; Kilburn, AE.; Lee, WH. und Elledge, SJ. (1993):** The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit; *GENES DEVEL.* **7**; 555-569.
- Ehlen, T. und Dubeau, L. (1990):** Loss of heterozygosity on chromosomal segments 3p, 6q and 11p in human ovarian carcinomas. *ONCOGENE* **5**; 219-223.
- El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA. und Brecht DS. (2000a):** PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *SCIENCE* **290**; 1364-1368.
- El-Husseini, AE.; Craven, SE.; Chetkovich, DM.; Firestein, BL.; Schnell, E.; Aoki, C. und Brecht, DS.; (2000b):** Dual palmitoylation of PSD-95 mediates its vesiculotubular sorting, postsynaptic targeting, and ion channel clustering. *J. CELL BIOL.* **148**; 159-172.
- Epelbaum, J. (1986):** Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *PROG. NEUROBIOL.* **27**; 63-100.

- Epelbaum, J.; Javoy-Agid, F.; Enjalbert, A.; Krantic, S.; Kordon, C. und Agid, Y. (1988):** Somatostatin concentrations and binding sites in human frontal cortex are differentially affected in Parkinson's disease associated dementia and in progressive supranuclear palsy. *J. NEUROL. SCI.* **87**; 167-174.
- Epelbaum, J.; Dournaud, P.; Fodor, M. und Viollet, C. (1994):** The neurobiology of somatostatin. *CRIT. REV. NEUROBIOL.* **8**; 25-44.
- Evans, BN.; Rosenblatt, MI.; Mnayer, LO.; Oliver, KR. und Dickerson, IM. (2000):** CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J. BIOL. CHEM.* **275**; 31438-31443.
- Ey, PL.; Prowse, SJ. und Jenkin, CR. (1978):** Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose; *IMMUNOCHEMISTRY* **15**; 429-436.
- Fanning, AS. und Anderson, JM. (1996):** Protein-protein interactions: PDZ domain networks. *CURR. BIOL.* **6**; 1385-1388.
- Feilotter, HE.; Hannon, GJ; Ruddell, CJ. und Beach, D. (1994):** Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *NUCLEIC ACIDS RES.* **22**; 1502-1503.
- Ferguson, SSG. (2001):** Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *PHARMACOL. REV.* **53**; 1-24.
- Ferguson, SSG. und Caron, MG. (1998):** G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *SEMIN. CELL. DEV. BIOL.* **9**; 119-127.
- Ferguson, SSG.; Barak, LS.; Zhang, J. und Caron, MG. (1996):** G protein-coupled receptor regulation: Role of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *CAN. J. PHYSIOL. PHARMACOL.* **74**; 1095-1110.
- Fields, S. (1993):** The two-hybrid system to detect protein-protein interactions; *METHODS: A COMPANION TO METH. ENZYMOL.* **5**; 116-124.
- Fields, S. und Song, O. (1989):** A novel genetic system to detect protein-protein interactions; *NATURE* **340**; 245-246.
- Finkbeiner, S. und Greenberg, ME. (1996):** Ca²⁺-dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, plasticity. *Neuron* **16**; 233-236.
- Florio, T.; Rim, C.; Hershberger, RE.; Loda, M. und Stork, PJ. (1994):** The somatostatin receptor SSTR1 is coupled to phosphotyrosine phosphatase activity in CHO-K1 cells. *MOL. ENDOCRINOL.* **8**; 1289-1297.
- Florio, T.; Yao H.; Carey, KD.; Dillon, TJ. und Stork, PJ. (1999):** Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1). *MOL. ENDOCRINOL.* **13**; 24-37.
- Fox, L.; Alford, M.; Achim, C.; Mallory, M. und Masliah, E. (1997):** Neurodegeneration of somatostatin-immunoreactive neurons in HIV encephalitis. *J. NEUROPATHOL. EXP. NEUROL.* **56**; 360-368.
- Fukaya, M. und Watanabe, M. (2000):** Improved immunohistochemical detection of postsynaptically located PSD-95/SAP90 protein family by protease section pretreatment: a study in the adult mouse brain. *J. COMP. NEUROL.* **426**; 572-586.

- Fukusumi, S.; Kitada, C.; Takekawa, S.; Kizawa, H.; Sakamoto, J.; Miyamoto, M.; Hinuma, S.; Kitano, K. und Fujino, M. (1997):** Identification and characterization of a novel human cortistatin-like peptide. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* **232**; 157-163.
- Garcia, PD. und Myers, RM. (1994):** Pituitary cell line GH3 expresses two somatostatin receptor subtypes that inhibit adenylyl cyclase: functional expression of rat somatostatin receptor subtypes 1 and 2 in human embryonic kidney 293 cells. *MOL. PHARMACOL.* **45**; 402-409.
- Gautam, N.; Downes, GB.; Yan, K. und Kisselev, O. (1998):** The G-protein $\beta\gamma$ complex. *CELL SIGNAL.* **10**; 447-455.
- Gershon, MD.; Schwartz, JH. und Kandel, ER. (1985):** Morphology of chemical synapses and patterns of interconnections. In: Kandel, ER. und Schwartz, JH. (Editoren): Principles of neural science, 2nd Edition, Elsevier Science Publishing Inc., New York, Amsterdam, 132-146.
- Gietz, RD. und Woods, RA. (1994):** High Efficiency transformation in Yeast. In: Johnston JA. (Editor) Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches, Oxford University Press; 121-134.
- Gillies, G. (1997):** Somatostatin: the neuroendocrine story. *TRENDS PHARMACOL. SCI.* **18**; 87-95.
- Goldstein, SA.; Bockenhauer, D.; O'Kelly, I. und Zilberberg, N. (2001):** Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *NAT. REV. NEUROSCI.* **2**; 175-184.
- Goodman, RH.; Jacobs, JW.; Chin, WW.; Lund, PK.; Dee, PC. und Habener, JF. (1980):** Nucleotide sequence of a cloned structural gene coding for a precursor of pancreatic somatostatin. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.* **77**; 5869-5873.
- Grady, EF.; Garland, AM.; Gamp, PD.; Lovett, M.; Payan, DG. und Bunnett, NW. (1995):** Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK1 receptor. *MOL. BIOL. CELL.* **6**; 509-524.
- Gray, EG (1959):** Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J. ANAT.* **93**; 420-433.
- Gros, R.; Benovic, JL.; Tan, CM. und Feldman, RD. (1997):** G protein-coupled receptor kinase is increased in hypertension. *J. CLIN. INVEST.* **99**; 2087-2093.
- Grouselle, D.; Winsky-Sommerer, R.; David, JP.; Delacourte, A.; Dournaud, P.; und Epelbaum, J. (1998):** Loss of somatostatin-like immunoreactivity in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying the apolipoprotein epsilon 4 allele. *NEUROSCI. LETT.* **255**; 21-24.
- Guthrie, C. und Fink, GR. (1991):** Guide to yeast genetics and molecular biology; *METH. ENZYMOL.* **194**; 1-932.
- Hadcock, JR. und Malbon, CC. (1988):** Down regulation of β -adrenergic receptors: Agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **85**; 5021-5025.
- Hall, RA.; Premont, RT.; Chow, CW.; Blitzler, JT.; Pitcher, JA.; Claing, A.; Stoffel, RH.; Barak, LS.; Shenolikar, S.; Weinman, EJ.; Grinstein, S. und Lefkowitz, R.J. (1998a):** The β_2 -adrenergic receptor interacts with the Na^+/H^+ -exchanger regulatory factor to control Na^+/H^+ exchange. *NATURE* **392**; 626-630.

- Hall, RA.; Ostedgaard, LS.; Premont, RT.; Blitzer, JT.; Rahman, N.; Welsh, MJ. und Lefkowitz, RJ. (1998b):** 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. USA* 95: 8496-8501.
- Hall, RA.; Premont, RT. und Lefkowitz, RJ. (1999):** Heptahelical receptor signaling: Beyond the G protein paradigm. *J. CELL BIOL.* 145; 927-932.
- Hamm, HE. und Gilchrist, A. (1996):** Heterotrimeric G proteins. *CURR. OPIN. CELL BIOL.* 8; 189-196.
- Hanahan, D. (1983):** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids; *J. MOL. BIOL.* 166; 557-580.
- Händel, M.; Schulz, S.; Stanarius, A.; Schreff, M.; Erdtmann-Vourliotis, M.; Schmidt, H.; Wolf, G. und Höllt, V. (1999):** Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *NEUROSCIENCE* 89; 909-926.
- Hannon, JP.; Nunn, C.; Stolz, B.; Bruns, C.; Weckbecker, G.; Lewis, I.; Troxler, T.; Hurth, K. und Hoyer, D. (2002):** Drug design at peptide receptors: somatostatin receptor ligands. *J. MOL. NEUROSCI.* 18; 15-27.
- Harper, JW.; Adami, GR.; Wie, N.; Keyomarsi, K. und Elledge, SJ. (1993):** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *CELL* 75; 805-816.
- Hausdorff, WP.; Bouvier, M.; O'Dowd, BF.; Irons, GP.; Caron, MG. und Lefkowitz, RJ. (1989):** Phosphorylation sites on two domains of the β_2 -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. BIOL. CHEM.* 264; 12657-12665.
- Hayashi, T. und Huganir, RL. (2004):** Tyrosine phosphorylation and regulation of the AMPA receptor by SRC family tyrosine kinases. *J. NEUROSCI.* 24; 6152-6160.
- Helboe, L.; Stidsen, CE. und Moller, M. (1998):** Immunohistochemical and cytochemical localization of the somatostatin receptor subtype sst1 in the somatostatinergic parvocellular neuronal system of the rat hypothalamus. *J. NEUROSCI.* 18; 4938-4945.
- Helmreich, EJ. und Hofmann, KP. (1996):** Structure and function of proteins in G protein-coupled signal transfer. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 1286; 285-322.
- Hering, H. und Sheng, M. (2001):** Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *NAT. REV. NEUROSCI.* 2; 880-888.
- Hermans, E.; Vanisberg, MA.; Geurts, M. und Maloteaux, JM. (1997):** Downregulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons. *NEUROCHEM. INT.* 31; 291-299.
- Hilairet, S.; Foord, S.M.; Marshall, F.H. und Bouvier, M. (2001):** Protein-protein interaction and not glycosylation determines the binding selectivity of heterodimers between the calcitonin receptor-like receptor and the receptor activity-modifying proteins. *J. BIOL. CHEM.* 276; 29575-29581.
- Hipkin, RW.; Friedman, J.; Clark, RB.; Eppler, CM. und Schonbrunn, A. (1997):** Agonist-induced desensitization, internalization, and phosphorylation of the sst2A somatostatin receptor. *J. BIOL. CHEM.* 272; 13869-13876.
- Hökfelt, T. (1991):** Neuropeptides in perspective: the last ten years. *NEURON* 7; 867-879.

- Holmes, DS. und Quigley, M. (1981):** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids; *ANAL. BIOCHEM.* **114**; 193-197.
- Hsueh, YP. und Sheng, M. (1999):** Requirement of N-terminal cysteines of PSD-95 for PSD-95 multimerization and ternary complex formation.; but not for binding to potassium channel Kv1.4. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 532-536.
- Hu, LA.; Tang, Y.; Miller, WE.; Cong, M.; Lau, AG.; Lefkowitz, RJ. und Hall, RA. (2000):** beta 1-adrenergic receptor association with PSD-95. Inhibition of receptor internalization and facilitation of beta 1-adrenergic receptor interaction with N-methyl-D-aspartate receptors. *J. BIOL. CHEM.* **275**; 38659-38666.
- Hu, LA.; Chen, W.; Martin, NP.; Whalen, EJ.; Premont, RT. und Lefkowitz, RJ. (2003):** GIPC interacts with the beta1-adrenergic receptor and regulates beta1-adrenergic receptor-mediated ERK activation. *J. BIOL. CHEM.* **278**; 26295-26301.
- Huang, CL.; Slesinger, PA.; Casey, PJ.; Jan, YN. und Jan, LY. (1995):** Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *NEURON* **15**; 1133-1143.
- Huang, X. und Miller, W. (1991):** A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm. *ADV. APPL. MATH.* **12**; 337-357.
- Hukovic, N.; Panetta, R.; Kumar, U. und Patel, YC. (1996):** Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1-5 (hSSTR1-5): subtype selective internalization or upregulation. *ENDOCRINOLOGY* **137**; 4046-4049.
- Hukovic, N.; Panetta, R.; Kumar, U.; Rocheville, M. und Patel, YC. (1998):** The cytoplasmic tail of the human somatostatin receptor type 5 is crucial for interaction with adenylyl cyclase and in mediating desensitization and internalization. *J. BIOL. CHEM.* **273**; 21416-21422.
- Hung, AY. und Sheng, M. (2002):** PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J. BIOL. CHEM.* **277**; 5699-5702.
- Hunt, CA.; Schenker, LJ. und Kennedy, MB. (1996):** PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses. *J. NEUROSCI.* **16**; 1380-1388.
- Husi, H. und Grant, SG. (2001):** Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain; *J. NEUROCHEM.* **77**; 281-291.
- Inanobe, A.; Yoshimoto, Y.; Horio, Y.; Morishige, KI.; Hibino, H.; Matsumoto, S.; Tokunaga, Y.; Maeda, T.; Hata, Y.; Takai, Y. und Kurachi, Y. (1999):** Characterization of G-protein-gated K⁺ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J. NEUROSCI.* **19**; 1006-1017.
- Inoue, M.; Nakajima, S. und Nakajima, Y. (1988):** Somatostatin induces an inward rectification in rat locus coeruleus neurones through a pertussis toxin-sensitive mechanism. *J. PHYSIOL.* **407**; 177-198.
- Irie, M.; Hata, Y.; Takeuchi, M.; Ichtchenko, K.; Toyoda, A.; Hirao, K.; Takai, Y.; Rosahl, TW. und Südhof, TC. (1997):** Binding of neuroligins to PSD-95. *SCIENCE* **277**; 1511-1515.

- Itoh, M.; Yonemura, S.; Nagafuchi, A.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (1991):** A 220-kD undercoat-constitutive protein: its specific localization at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J. CELL BIOL.* **115**; 1449-1462.
- Iynedjian, PB. (2004):** Lack of evidence for a role of TRB3/NIPK as inhibitor of PKB-mediated insulin signaling in primary hepatocytes. *BIOCHEM. J.* **386**: 113-118.
- James, P.; Halladay, J. und Craig, EA. (1996):** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *GENETICS* **144**; 1425-1436.
- Jan, LJ. und Jan, YN. (1997):** Receptor-regulated ion channels. *CURR. OPIN. CELL. BIOL.* **9**; 155-160.
- Jelacic, TM.; Sims, SM. und Clapham, DE. (1999):** Functional expression and characterization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels containing GIRK3. *J. MEMBR. BIOL.* **169**; 123-129.
- Jelacic, TM.; Kennedy, ME.; Wickman, K. und Clapham, DE. (2000):** Functional and biochemical evidence for G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels composed of GIRK2 and GIRK3. *J. BIOL. CHEM.* **275**; 36211-36216.
- Ji, I. und Ji, TH. (1995):** Differential roles of exoloop 1 of the human follicle-stimulating hormone receptor in hormone binding and receptor activation. *J. BIOL. CHEM.* **270**; 15970-15973.
- Jockers, R.; Da Silva, A.; Strosberg, AD.; Bouvier, M. und Marullo, S. (1996):** New molecular and structural determinants involved in β_2 -adrenergic receptor desensitization and sequestration: Delineation using chimeric β_3/β_2 -adrenergic receptors. *J. BIOL. CHEM.* **271**; 9355-9362.
- Jockers, R.; Angers, S; Da Silva, A.; Benaroch, P.; Strosberg, AD.; Bouvier, M. und Marullo, S (1999):** β_2 -Adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 28900-28908.
- Kaech, SM.; Whitfield, CW. und Kim, SK. (1998):** The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *CELL* **94**; 761-771.
- Kalia, LV. und Salter, MW. (2003):** Interactions between Src family protein tyrosine kinases and PSD-95. *NEUROPHARMACOLOGY* **45**; 720-728.
- Karschin, A.; Wischmeyer, E.; Davidson, N. und Lester, HA. (1994):** Fast inhibition of inwardly rectifying K⁺ channels by multiple neurotransmitter receptors in oligodendroglia. *EUR. J. NEUROSCI.* **6**; 1756-1764.
- Karschin, C.; Dissmann, E.; Stühmer, W. und Karschin, A. (1996):** IRK(1.3) and GIRK(1.4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J. NEUROSCI.* **16**; 3559-3570.
- Karschin, C. und Karschin, A. (1997):** Ontogeny of Gene Expression of Kir Channel Subunits in the Rat. *Mol. CELL. NEUROSCI.* **10**; 131-148.
- Kaupmann, K.; Bruns, C.; Hoyer, D.; Seuwen, K. und Lübbert, H. (1993)** Distribution and second messenger coupling of four somatostatin receptor subtypes expressed in brain. *FEBS LETT.* **331**; 53-59.
- Kennedy, MB. (1995):** Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *TRENDS BIOCHEM. SCI.* **20**: 350.

- Kim, E. und Sheng, M. (2004):** PDZ domain proteins of synapses. *NAT. REV. NEUROSCI.* **5**; 771-781.
- Kim, E.; Niethammer, M.; Rothschild, A.; Jan, YN. und Sheng, M. (1995):** Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *NATURE* **378**; 85-88.
- Kim, E.; Cho, KO.; Rothschild, A. und Sheng, M. (1996):** Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *NEURON* **17**; 103-113.
- Kim, E.; Naisbitt, S.; Hsueh, YP.; Rao, A.; Rothschild, A.; Craig, AM. und Sheng, M. (1997):** GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase- like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J. CELL BIOL.* **136**; 669-678.
- Kim, JH.; Liao, D.; Lau, LF. und Huganir, RL. (1998):** SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95: SAP90 protein family. *NEURON* **20**; 683-691.
- Kistner, U.; Wenzel, BM.; Veh, RW.; Cases-Langhoff, C.; Garner, AM.; Appeltauer, U.; Voss, B.; Gundelfinger, ED. und Garner, CC. (1993):** SAP90.; a rat presynaptic protein related to the product of the Drosophila tumor suppressor gene dlG-A. *J. BIOL. CHEM.* **268**; 4580-4583.
- Kistner, U.; Garner, CC. und Linial, M. (1995):** Nucleotide binding by the synapse associated protein SAP90. *FEBS LETT.* **359**; 159-163.
- Kluxen, FW.; Bruns, C. und Lübbert, H. (1992):** Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor cDNA. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **89**; 4618-4622.
- Koenig, JA.; Edwardson, JM. und Humphrey, PP. (1997) :** Somatostatin receptors in Neuro2A neuroblastoma cells: ligand internalization. *BR. J. PHARMACOL.* **120**; 52-59.
- Koglin, M. und Behrends, S. (2000):** Cloning and functional expression of the rat alpha(2) subunit of soluble guanylyl cyclase. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* **1494**; 286-289.
- Kok, K.; Osinga, J.; Carritt, B.; Davis, MB.; van der Hout, AH.; van der Veen AY.; Landsvater, RM.; de Leij, LF.; Berendsen, HH.; Postmus, PE.; Poppema, S. und Buys, CHCM. (1987):** Deletion of a DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer. *NATURE* **330**; 578-681.
- Kokudo, N.; Kothary, PC.; Eckhauser, FE.; Nakamura, T. und Raper, SE. (1992):** Inhibition of DNA synthesis by somatostatin in rat hepatocytes stimulated by hepatocyte growth factor or epidermal growth factor. *AM. J. SURG.* **163**; 169-173.
- Kornau, HC.; Schenker, LT.; Kennedy, MB. und Seeburg, PH. (1995):** Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *SCIENCE* **269**; 1737-1740.
- Kornfeld, R. und Kornfeld, S. (1985):** Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *ANNU. REV. BIOCHEM.* **54**; 631-664.
- Krantic, S.; Robitaille, Y. und Quirion, R. (1992) :** Deficits in the somatostatin SS1 receptor subtype in frontal and temporal cortices in Alzheimer's disease. *BRAIN RES.* **573**; 299-304.
- Kreienkamp, HJ.; Hönck, HH. und Richter, D. (1997):** Coupling of rat somatostatin receptor subtypes to a G-protein gated inwardly rectifying potassium channel (GIRK 1). *FEBS LETT.* **419**: 92-94.

- Kreienkamp, HJ.; Roth, A. und Richter, D. (1998):** Rat somatostatin receptor subtype 4 can be made sensitive to agonist-induced internalization by mutation of a single threonine (residue 331). *DNA CELL BIOL.* **17**; 869-878.
- Krieg, PA. und Melton, DA. (1984):** Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs; *NUCLEIC ACIDS RES.* **12**; 7057-7070.
- Kristiansen, K. (2004):** Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *PHARMACOL. THER.* **103**; 21-80.
- Krupnick, JG. und Benovic, JL. (1998):** The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *ANNU. REV. PHARMACOL. TOXICOL.* **38**; 289-319.
- Kubo, Y.; Baldwin, TJ.; Jan, YN. und Jan, LY. (1993):** Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *NATURE* **362**; 127-133.
- Laemmli, UK. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *NATURE* **227**; 680-685.
- Lanfrancone, L.; Pengue, G.; Pandolfi, PP.; Salcini, AE.; Giacomucci, A.; Longo, L.; Donti, E.; De Luca, P.; La Mantia, G. und Pelicci, PG. (1992):** Structural and functional organization of the HF10 human zinc finger gene (ZNF35) located on chromosome 3p21-p22. *GENOMICS* **12**; 720-728.
- Lanneau, C.; Viollet, C.; Faivre-Bauman, A.; Loudes, C.; Kordon, C.; Epelbaum, J. und Gardette, R. (1998):** Somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2 elicit opposite effects on the response to glutamate of mouse hypothalamic neurones: an electrophysiological and single cell RT-PCR study. *EUR. J. NEUROSCI.* **10**; 204-212.
- Lefkowitz, RJ. (1993):** G protein-coupled receptor kinases. *CELL* **74**; 409-412.
- Lesage, F. und Lazdunski, M. (2000):** Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *AM. J. PHYSIOL. RENAL. PHYSIOL.* **279**; F793-801.
- Lesage, F.; Duprat, F.; Fink, M.; Guillemare, E.; Coppola, T.; Lazdunski, M. und Hugnot, JP. (1994):** Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K⁺ channels in the brain. *FEBS LETT.* **353**; 37-42.
- Lesage, F.; Guillemare, E.; Fink, M.; Duprat, F.; Heurteaux, C.; Fosset, M.; Romey, G.; Barhanin, J. und Lazdunski, M. (1995):** Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *J. BIOL. CHEM.* **270**; 28660-28667.
- Liew, CW. (2004):** Regulation der epithelialen *tight junctions* durch den humanen Somatostatinrezeptor-subtyp 3. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg. 1-99.
- Lim, IA.; Hall, DD. und Hell, JW. (2002):** Selectivity and promiscuity of the first and second PDZ domains of PSD-95 and synapse-associated protein 102. *J. BIOL. CHEM.* **277**; 21697-21711.
- Liman, ER.; Tytgat, J. und Hess, P. (1992):** Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *NEURON* **9**; 861-871.
- Logothetis, DE.; Kurachi, Y.; Galper, J.; Neer, EJ. und Clapham, DE. (1987):** The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *NATURE* **325**; 321-326.

- Lohse, MJ.; Benovic, JL.; Caron, MG. und Lefkowitz, RJ. (1990b):** Multiple pathways of rapid β_2 -adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J. BIOL. CHEM.* **265**; 3202-3209.
- Lohse, MJ; Benovic, JL; Codina, J.; Caron, MG. und Lefkowitz, RJ. (1990a):** β -arrestin: A protein that regulates β -adrenergic receptor function. *SCIENCE* **248**; 1547-1550.
- Long, JF.; Tochio, H.; Wang, P.; Fan, JS.; Sala, C.; Niethammer, M.; Sheng, M. und Zhang, M. (2003):** Supramodular structure and synergistic target binding of the N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95. *J. MOL. BIOL.* **327**; 203-214.
- Luebke, AE.; Dahl, GP.; Roos, BA. und Dickerson, IM. (1996):** Identification of a protein that confers calcitonin gene-related peptide responsiveness to oocytes by using a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator assay. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **93**; 3455-3460.
- Luttrell, LM.; Daaka, Y. und Lefkowitz, RJ. (1999):** Regulation of tyrosine kinase cascades by G protein-coupled receptors. *CURR. OPIN. CELL BIOL.* **11**; 177-183.
- Margolin, JF.; Friedman, JR.; Meyer, WK.; Vissing, H.; Thiesen, HJ. und Rauscher, FJ. (1994):** Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **91**; 4509- 4513.
- Mark, C.; Abrink, M. und Hellman, L. (1999):** Comparative analysis of KRAB zinc finger proteins in rodents and man: evidence for several evolutionarily distinct sub-families of KRAB zinc finger genes. *DNA CELL BIOL.* **18**; 381- 396
- Mascardo, RN. und Sherline, P. (1982):** Somatostatin inhibits rapid centrosomal separation and cell proliferation induced by epidermal growth factor. *ENDOCRINOLOGY* **111**; 1394-1396.
- Mathern, GW.; Babb, TL.; Pretorius, JK.; Melendez, M. und Levesque, MF. (1995):** The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *EPILEPSY RES.* **21**; 133-147.
- Matsumine, A.; Ogai, A.; Senda, T.; Okumura, N.; Satoh, K.; Baeg, GH.; Kawahara, T.; Kobayashi, S.; Okada, M.; Toyoshima, K. und Akiyama, T. (1996):** Binding of APC to the human homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *SCIENCE* **272**; 1020-1023.
- Matsumoto, K.; Yokogoshi, Y.; Fujinaka, Y.; Zhang, C. und Saito, S. (1994):** Molecular cloning and sequencing of porcine somatostatin receptor 2. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* **199**; 298-305.
- Mayumi-Matsuda, K.; Kojima, S.; Suzuki, H. und Sakata, T. (1999):** Identification of a novel kinase-like gene induced during neuronal cell death. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* **258**; 260-264.
- McConalogue, K.; Dery, O.; Lovett, M.; Wong, H.; Walsh, JH.; Grady, EF. und Bunnnett, NW. (1999):** Substance P-induced trafficking of β -arrestins. The role of β -arrestins in endocytosis of the neurokinin-1 receptor. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 16257-16268.
- McDonald, AJ. und Mascagni, F. (2002):** Immunohistochemical characterization of somatostatin containing interneurons in the rat basolateral amygdala. *BRAIN RES.* **943**; 237-244.

- McGee, AW. und Bredt, DS. (1999):** Identification of an intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 17431-17436.
- McLatchie, LM.; Fraser, NJ.; Main, MJ.; Wise, A.; Brown, J.; Thompson, N.; Solari, R.; Lee, MG. und Foord, SM. (1998):** RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *NATURE* **393**; 333-339.
- Methfessel, C.; Witzemann, V.; Takahashi, T.; Mishina, M.; Numa, S. und Sakmann, B. (1986):** Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels; *PFLÜGERS ARCH.* **407**; 577-588.
- Meyerhof, W. (1998):** The elucidation of somatostatin receptor functions: a current view. *REV. PHYSIOL. BIOCHEM. PHARMACOL.* **133**; 55-108.
- Meyerhof, W.; Paust, HJ.; Schönrock, C. und Richter, D. (1991):** Cloning of a cDNA encoding a novel putative G-protein-coupled receptor expressed in specific rat brain regions. *DNA CELL BIOL.* **10**; 689-694.
- Meyerhof, W.; Wulfsen, I.; Schönrock, C.; Fehr, C. und Richter, D. (1992):** Molecular cloning of a somatostatin-28 receptor and comparison of its expression pattern with that of somatostatin-14 receptor in rat brain. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **89**; 10267-10271
- Migaud, M.; Charlesworth, P.; Dempster, M.; Webster, C.; Watabe, M.; Makhinson, M.; He, Y.; Ramsay, MF.; Morris, RG.; Morrison, JH.; O'Dell, TJ. und Grant, SG. (1998):** Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *NATURE* **396**; 433-439.
- Mihara, S.; North, RA. und Surprenant, A. (1987):** Somatostatin increases an inwardly rectifying potassium conductance in guinea-pig submucous plexus neurones. *J. PHYSIOL.* **390**; 335-355.
- Mok, H.; Shin, H.; Kim, S.; Lee, JR.; Yoon, J. und Kim, E. (2002):** Association of the kinesin superfamily motor protein KIF1B α with postsynaptic density-95 (PSD-95), synapse-associated protein-97, and synaptic scaffolding molecule PSD-95/discs large/zona occludens-1 proteins. *J. NEUROSCI.* **22**; 5253-5258.
- Møller, LN.; Stidsen, CE.; Hartmann, B. und Holst, JJ. (2003):** Somatostatin receptors. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA.* **1616**; 1-84.
- Moneta, D.; Richichi, C.; Aliprandi, M.; Dournaud, P.; Dutar, P.; Billard, JM.; Carlo, AS.; Viollet, C.; Hannon, J.; Fehlmann, D.; Nunn, C.; Hoyer, D.; Epelbaum, J. und Vezzani, A. (2002):** Somatostatin receptor subtypes 2 and 4 affect seizure susceptibility and hippocampal excitatory neurotransmission in mice. *EUR. J. NEUROSCI.* **16**; 843-849.
- Montminy, MR.; Goodman, RH.; Horovitch, J. und Habener, JF. (1984):** Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.* **81**; 3337-3340.
- Monyer, H.; Sprengel, R.; Schoepfer, R.; Herb, A.; Higuchi, M.; Lomeli, H.; Burnashev, N.; Sakmann, B. und Seeburg, PH. (1992):** Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *SCIENCE* **256**; 1217-1221.
- Moore, SD.; Madamba, S.; Joels, M. und Siggins, GR. (1988):** Somatostatin augments the M-current in hippocampal neurons. *SCIENCE* **239**; 278-280.

- Morel, G.; Pelletier, G. und Heisler, S. (1986):** Internalization and subcellular distribution of radiolabeled somatostatin-28 in mouse anterior pituitary tumor cells. *ENDOCRINOLOGY* **119**; 1972-1979.
- Mori, M.; Bito, H.; Sakanaka, C.; Honda, Z.; Kume, K.; Izumi, T. und Shimizu, T. (1994):** Activation of mitogen-activated protein kinase and arachidonate release via two G protein-coupled receptors expressed in the rat hippocampus. *ANN. NY ACAD. SCI.* **744**; 107-125.
- Morrison, DK. und Cutler RE., Jr.(1998):** The complexity of Raf-1 regulation. *CURR. OPIN. CELL BIOL.* **9**; 174-179.
- Murer, G.; Adelbrecht, C.; Lauritzen, I.; Lesage, F.; Lazdunski, M.; Agid, Y. und Raisman-Vozari, R. (1997):** An immunocytochemical study on the distribution of two G-protein-gated inward rectifier potassium channels (GIRK2 and GIRK4) in the adult rat brain. *NEUROSCIENCE* **80**; 345-357.
- Naisbitt, S.; Kim, E.; Tu, JC.; Xiao, B.; Sala, C.; Valtschanoff, J.; Weinberg, RJ.; Worley, PF. und Sheng, M. (1999):** Shank.; a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *NEURON* **23**; 569-582.
- Neer, EJ. (1995):** Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *CELL* **80**; 249-257.
- Neer, EJ. und Smith, TF. (1996):** G protein heterodimers: new structures propel new questions. *CELL* **84**; 175-178.
- Nehring, R.; Wischmeyer, E.; Doring, F.; Veh, RW.; Sheng, M. und Karschin, A. (2000):** Neuronal inwardly rectifying K⁺ channels differentially couple to PDZ proteins of the PSD-95/SAP90 family. *J. NEUROSCI.* **20**; 156-162.
- New, D. und Wong, J. (1998):** The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in protozoa and ancestral metazoa. *BIOL. SIGNALS RECEPT.* **7**; 98-108.
- Niethammer, M.; Kim, E. und Sheng, M. (1996):** Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J. NEUROSCI.* **16**; 2157-2163
- Niethammer, M.; Valtschanoff, JG.; Kapoor, TM.; Allison, DW.; Weinberg, TM.; Craig, AM. und Sheng, M. (1998):** CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. *NEURON* **20**; 693-707.
- Njuki, F.; Nicholl, CG.; Howard, A.; Mak, JC.; Barnes, PJ.; Girgis, SI. und Legon, S. (1993):** A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *CLIN. SCI.* **85**; 385-388.
- Nouel, D.; Gaudriault, G.; Houle, M.; Reisine, T.; Vincent, JP.; Mazella, J. und Beaudet, A. (1997):** Differential internalization of somatostatin in COS-7 cells transfected with SST1 and SST2 receptor subtypes: a confocal microscopic study using novel fluorescent somatostatin derivatives. *ENDOCRINOLOGY* **138**; 296-306.
- Oakley, RH.; Laporte, SA.; Holt, JA.; Barak, LS. und Caron, MG. (1999):** Association of β -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 32248-32257.

- Oakley, RH.; Laporte, SA.; Holt, JA.; Caron, MG. und Barak, LS. (2000):** Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. BIOL. CHEM.* **275**; 17201-17210.
- O'Carroll, AM.; Lolait, SJ.; Konig, M. und Mahan, LC. (1992):** Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. *MOL. PHARMACOL.* **42**; 939-946.
- O'Carroll, AM.; Raynor, K.; Lolait, SJ. und Reisine, T. (1994) :** Characterization of cloned human somatostatin receptor SSTR5. *MOL. PHARMACOL.* **46**; 291-298.
- O'Dowd, BF.; Hnatowich, M.; Caron, MG.; Lefkowitz, RJ. und Bouvier, M. (1989):** Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J. BIOL. CHEM.* **264**; 7564-7569.
- Olsen, O. und Bredt, DS. (2003):** Functional analysis of the nucleotide binding domain of membrane-associated guanylate kinases. *J. BIOL. CHEM.* **278**; 6873-6878.
- Pak, DT. und Sheng, M. (2003):** Targeted protein degradation and synapse remodeling by an inducible protein kinase. *SCIENCE* **302**; 1368-1373.
- Pak, Y.; O'Dowd, BF.; Wang, JB. und George, SR. (1999):** Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 27610-27616.
- Pak, Y.; Pham, N. und Rotin, D. (2002):** Direct binding of the beta1 adrenergic receptor to the cyclic AMP-dependent guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF leads to Ras activation. *MOL. CELL BIOL.* **22**; 7942-7952.
- Pan. MG.; Florio, T. und Stork, PJ. (1992):** G protein activation of a hormone-stimulated phosphatase in human tumor cells. *SCIENCE* **256**; 1215-1217.
- Pannuti, A.; Lanfrancone, L.; Pascucci, A.; Pelicci, PG.; La Mantia, G. und Lania, L. (1988):** Isolation of cDNAs encoding finger proteins and measurement of the corresponding mRNA levels during myeloid terminal differentiation. *NUCLEIC ACIDS RES.* **16**; 4227-4237.
- Patel, YC. (1999):** Somatostatin and its receptor family. *FRONT NEUROENDOCRINOL.* **20**; 157-198.
- Pawson, T. (1994):** SH2 and SH3 domains in signal transduction. *ADV. CANCER RES.* **64**; 87-110.
- Pawson, T. (1995):** Protein modules and signalling networks. *NATURE* **373**; 573-580.
- Peng, H.; Begg, GE.; Harper, SL.; Friedman, JR.; Speicher, DW. und Rauscher, FJ. (2000):** Biochemical analysis of the Kruppel-associated box (KRAB) transcriptional repression domain. *J. BIOL. CHEM.* **275**; 18000-18010.
- Penzes. P.; Johnson, RC.; Sattler, R.; Zhang, X.; Huganir, RL.; Kambampati, V.; Mains, RE. und Eipper, BA. (2001):** The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *NEURON* **29**; 229-242.
- Pippig, S.; Andexinger, S.; Daniel, K.; Puzicha, M.; Caron, MG.; Lefkowitz, RJ, und Lohse, MJ. (1993):** Overexpression of β -arrestin and β -adrenergic receptor kinase augment desensitization of β_2 -adrenergic receptors. *J. BIOL. CHEM.* **268**; 3201-3208.

- Pippig, S.; Andexinger, S. und Lohse, MJ. (1995):** Sequestration and recycling of β_2 -adrenergic receptors permit resensitization. *MOL. PHARMACOL.* **47**; 666-676.
- Piserchio, A.; Pellegrini, M.; Mehta, S.; Blackman, SM.; Garcia, EP.; Marshall, J. und Mierke, DF. (2002):** The PDZ1 domain of SAP90. Characterization of structure and binding. *J. BIOL. CHEM.* **277**; 6967-6973.
- Piserchio, A.; Salinas, GD.; Li, T.; Marshall, J.; Spaller, MR. und Mierke, DF. (2004):** Targeting specific PDZ domains of PSD-95; structural basis for enhanced affinity and enzymatic stability of a cyclic peptide. *CHEM. BIOL.* **11**; 469-473.
- Pitcher, JA.; Inglese, J.; Higgins, JB.; Arriza, JL.; Casey, PJ.; Kim, C.; Benovic, JL.; Kwatra, MM.; Caron, MG. und Lefkowitz, RJ. (1992):** Role of $\beta\gamma$ subunits of G proteins in targeting the β -adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *SCIENCE* **257**; 1264-1267.
- Plakidou-Dymock, S., Dymock, D. und Hooley, R. (1998):** A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *CURR. BIOL.* **8**; 315-324.
- Ponting, CP. (1997):** Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *PROTEIN SCI.* **6**; 464-468.
- Ponting, CP. und Phillips, C. (1995):** DHR domains in syntrophins, neuronal NO synthases and other intracellular proteins. *TRENDS BIOCHEM. SCI.* **20**; 102-103.
- Pradayrol, L.; Jornvall, H.; Mutt, V. und Ribet, A. (1980):** N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS LETT.* **109**; 55-58.
- Prado, M.; Evans, B.; Oliver, KR. und Dickerson, IM. (2001):** Role of the CGRP-receptor component protein (RCP) in adrenomedullin receptor function. *PEPTIDES* **22**; 1773-1781.
- Przyborski, SA.; Knowles, BB.; Handel, MA.; Gurwitch, SA. und Ackerman SL. (1998):** Differential expression of the zinc finger gene Zfp105 during spermatogenesis. *MAMM. GENOME* **9**; 758-762.
- Rao, A. und Steward, O. (1991):** Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specializations are locally synthesized: analysis of proteins synthesized within synaptosomes. *J. NEUROSCI.* **11**; 2881-2895.
- Reardon, DB.; Dent, P.; Wood, SL.; Kong, T. und Sturgill, TW. (1997):** Activation *in vitro* of somatostatin receptor subtypes 2, 3, or 4 stimulates protein tyrosine phosphatase activity in membranes from transfected Ras-transformed NIH 3T3 cells: coexpression with catalytically inactive SHP-2 blocks responsiveness. *MOL. ENDOCRINOL.* **11**; 1062-1069.
- Reichlin, S. (1983a):** Somatostatin. *N. ENGL. J. MED.* **309**; 1495-1501.
- Reichlin, S. (1983b):** Somatostatin (second of two parts). *N. ENGL. J. MED.* **309**; 1556-1563.
- Reuveny, E.; Slesinger, PA.; Inglese, J.; Morales, JM.; Iniguez-Lluhi, JA.; Lefkowitz, RJ.; Bourne, HR.; Jan, YN. und Jan, LY. (1994):** Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits. *NATURE* **370**; 143-146.
- Robbins, RJ.; Brines, ML.; Kim, JH.; Adrian, T.; de Lannerolle, N, Welsh, MS. und Spencer, DD. (1991):** A selective loss of somatostatin in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *ANN. NEUROL.* **29**; 325-332

- Robzyk, K. und Kassir, Y. (1992):** A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *NUCLEIC ACIDS RES.* **20**; 3790.
- Roche, KW.; Tu, JC.; Petralia, RS.; Xiao, B.; Wenthold, RJ. und Worley, PF. (1999):** Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 25953-25957.
- Roche, KW.; Standley, S.; McCallum, J.; Dune Ly, C.; Ehlers, MD. und Wenthold, RJ. (2001):** Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *NAT. NEUROSCI.* **4**; 794-802.
- Rohrer, L.; Raulf, F.; Bruns, C.; Buettner, R.; Hofstaedter, F. und Schule, R. (1993):** Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **90**; 4196-4200.
- Ross, EM. und Wilkie, TM. (2000):** GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *ANNU. REV. BIOCHEM.* **69**; 795-827.
- Roth, A. (1997):** Internalisierung und Desensibilisierung der Somatostatin-Rezeptor-Subtypen der Ratte. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg. 1-120.
- Roth, A.; Kreienkamp, HJ.; Meyerhof, W. und Richter, D. (1997a):** Phosphorylation of four amino acid residues in the carboxyl terminus of the rat somatostatin receptor subtype 3 is crucial for its desensitization and internalization. *J. BIOL. CHEM.* **272**; 23769-23774.
- Roth, A.; Kreienkamp, HJ.; Nehring, RB.; Roosterman, D.; Meyerhof, W. und Richter, D. (1997b) :** Endocytosis of the rat somatostatin receptors: subtype discrimination, ligand specificity, and delineation of carboxy-terminal positive and negative sequence motifs. *DNA. CELL BIOL.* **16**; 111-119.
- Rüegg, UT. und Rudinger, J. (1977):** Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine; *METHODS ENZYMOL.* **47**; 111-116.
- Russwurm, M.; Wittau, N. und Koesling, D. (2001):** Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J. BIOL. CHEM.* **276**; 44647-44652.
- Saha, S.; Henderson, Z. und Batten, TF. (2002):** Somatostatin immunoreactivity in axon terminals in rat nucleus tractus solitarius arising from central nucleus of amygdala: coexistence with GABA and post-synaptic expression of sst2A receptor. *J. CHEM. NEUROANAT.* **24**; 1-13.
- Sakanaka, C.; Ferby, I.; Waga, I.; Bito, H. und Shimizu, T. (1994):** On the mechanism of cytosolic phospholipase A2 activation in CHO cells carrying somatostatin receptor: wortmannin-sensitive pathway to activate mitogen-activated protein kinase. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* **205**; 18-23.
- Salter, MW. und Kalia, LV. (2004):** Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *NAT. REV. NEUROSCI.* **5**; 317-328.
- Sambrook, J.; Fritsch, EF. und Maniatis, T. (1998):** Molecular cloning: a laboratory hand-book, 2nd edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

- Sanna, PP.; Berton, F.; Cammalleri, M.; Tallent, MK.; Siggins, GR.; Bloom, FE. und Francesconi, WA. (2000):** role for Src kinase in spontaneous epileptiform activity in the CA3 region of the hippocampus. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **97**; 8653-8657.
- Saras, J. und Heldin, CH. (1996):** PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *TRENDS BIOCHEM. SCI.* **21**; 455-458.
- Sarret, P.; Nouel, D.; Dal Farra, C.; Vincent, JP.; Beaudet, A. und Mazella, J. (1999):** Receptor-mediated internalization is critical for the inhibition of the expression of growth hormone by somatostatin in the pituitary cell line AtT-20. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 19294-19300.
- Sato, T.; Akiyama, F.; Sakamoto, G.; Kasumi, F. und Nakamura, Y. (1991):** Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. *CANCER RES.* **51**; 5794-5799.
- Schindler, M.; Holloway, S.; Hathway, G.; Woolf, CJ.; Humphrey, PP. und Emson, PC. (1998a):** Identification of somatostatin sst2 (a) receptor expressing neurones in central regions involved in nociception. *BRAIN RES.* **798**; 25-35.
- Schindler, M.; Holloway, S.; Humphrey, PP.; Waldvogel, H.; Faull, RL.; Berger, W. und Emson, PC. (1998b):** Localization of the somatostatin sst2(a) receptor in human cerebral cortex, hippocampus and cerebellum. *NEUROREPORT* **9**; 521-525.
- Schöneberg, T.; Schultz, G. und Gudermann, T. (1999):** Structural basis of G protein coupled receptor function. *MOL. CELL. ENDOCRINOL.* **151**; 181-193.
- Schreff, M.; Schulz, S.; Händel, M.; Keilhoff, G.; Braun, H.; Pereira, G.; Klutzny, M.; Schmidt, H.; Wolf, G. und Höllt, V. (2000):** Distribution, targeting, and internalization of the sst4 somatostatin receptor in rat brain; *J. NEUROSCI.* **20**; 3785-3797.
- Schulz, S.; Schmidt, H.; Händel, M.; Schreff, M. und Höllt, V. (1998a):** Differential distribution of alternatively spliced somatostatin receptor 2 isoforms (sst2A and sst2B) in rat spinal cord. *NEUROSCI. LETT.* **257**; 37-40.
- Schulz, S.; Schreff, M.; Schmidt, H.; Händel, M.; Przewlocki, R. und Höllt V. (1998b):** Immunocytochemical localization of somatostatin receptor sst2A in the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *EUR. J. NEUROSCI.* **10**; 3700-3708.
- Schwarzer, C.; Sperk, G.; Samanin, R.; Rizzi, M.; Gariboldi, M. und Vezzani, A. (1996):** Neuropeptides-immunoreactivity and their mRNA expression in kindling: functional implications for limbic epileptogenesis. *BRAIN. RES. BRAIN. RES. REV* **22**; 27-50.
- Schwärzler, A.; Kreienkamp, HJ. und Richter, D. (2000):** Interaction of the somatostatin receptor subtype 1 with the human homolog of the Shk1 kinase-binding protein from yeast. *J. BIOL. CHEM.* **275**; 9557-9562.
- Schweitzer, P.; Madamba, S. und Siggins, GR. (1990):** Arachidonic acid metabolites as mediators of somatostatin-induced increase of neuronal M-current. *NATURE* **346**; 464-467.
- Schweitzer, P.; Madamba, S.; Champagnat, J. und Siggins, GR. (1993):** Somatostatin inhibition of hippocampal CA1 pyramidal neurons: mediation by arachidonic acid and its metabolites. *J. NEUROSCI.* **13**; 2033-2049.
- Schweitzer, P.; Madamba, SG. und Siggins, GR. (1998):** Somatostatin increases a voltage-insensitive K⁺ conductance in rat CA1 hippocampal neurons. *J. NEUROPHYSIOL.* **79**; 1230-1238.

- Sellers, LA. (1999):** Prolonged activation of extracellular signal-regulated kinase by a protein kinase C-dependent and N17Ras-insensitive mechanism mediates the proliferative response of Gi/o-coupled Somatostatin sst4 receptors. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 24280-24288.
- Sevarino, KA.; Felix, R.; Banks, CM.; Low, MJ.; Montminy, MR.; Mandel, G. und Goodman, RH. (1987):** Cell-specific processing of preprosomatostatin in cultured neuroendocrine cells. *J. BIOL. CHEM.* **262**; 4987-4993.
- Sharp, PA.; Sugden, B. und Sambrook, J. (1973):** Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose - ethidium bromide electrophoresis; *BIOCHEMISTRY* **12**; 3055-3063.
- Shen, KZ.; North, RA. und Surprenant, A. (1992):** Potassium channels opened by noradrenaline and other transmitters in excised membrane patches of guinea-pig submucosal neurones. *J. PHYSIOL.* **445**; 581-599.
- Shen, LP.; Pictet, RL. und Rutter, WJ. (1982):** Human somatostatin I: sequence of the cDNA. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.* **79**; 4575-4579.
- Sheng, M. und Kim, E. (2000):** The Shank family of scaffold proteins. *J. CELL SCI.* **113**; 1851-1856.
- Sheng, M. und Sala, C. (2001):** PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *ANNU. REV. NEUROSCI.* **24**; 1-29.
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O. und Mann, M. (1996):** Mass spectrometric sequencing of proteins in silver-stained polyacrylamide gels. *ANAL. CHEM.* **68**; 850-858.
- Shin, H.; Hsueh, YP.; Yang, FC.; Kim, E. und Sheng, M. (2000):** An intramolecular interaction between Src homology 3 domain and guanylate kinase-like domain required for channel clustering by postsynaptic density-95/SAP90. *J. NEUROSCI.* **20**; 3580-3587.
- Shuman, S. (1994):** Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. BIOL. CHEM.* **269**; 32678-32684.
- Siehler, S. und Hoyer, D. (1999):** Characterisation of human recombinant somatostatin receptors 3. Modulation of adenylate cyclase activity. *NAUNYN. SCHMIEDEBERGS ARCH. PHARMACOL.* **360**; 510-521.
- Sloviter, RS. (1994):** The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *ANN. NEUROL.* **35**; 640-654.
- Snow, BE.; Hall, RA.; Krumins, AM.; Brothers, GM.; Bouchard, D.; Brothers, CA, Chung, S.; Mangion, J.; Gilman, A.G.; Lefkowitz, R.J. und Siderovski, DP. (1998):** GTPase activating specificity of RGS12 and binding specificity of an alternatively spliced PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domain. *J. BIOL. CHEM.* **273**; 17749-17755.
- Soderling, TR. und Derkach, VA. (2000):** Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *TRENDS NEUROSCI.* **23**; 75-80.
- Sodickson, DL. und Bean, BP. (1998):** Neurotransmitter activation of inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons: interactions among multiple receptors. *J. NEUROSCI.* **18**; 8153-8162.
- Songyang, Z.; Fanning, AS.; Fu, C.; Xu, J.; Marfatia, SM.; Chishti, AH.; Crompton, A.; Chan, AC.; Anderson, JM. und Cantley, LC. (1997):** Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *SCIENCE* **275**; 73-77.

- Strader, CD.; Fong, TM.; Tota, MR.; Underwood, D. und Dixon, RA. (1994):** Structure and function of G protein-coupled receptors. *ANNU. REV. BIOCHEM.* **63**; 101-132.
- Strader, CD.; Fong, TM.; Graziano, MP. und Tota, MR. (1995):** The family of G protein-coupled receptors. *FASEB J.* **9**; 745-754.
- Strittmatter, M.; Hamann, GF.; Strubel, D.; Cramer, H. und Schimrigk, K. (1996):** Somatostatin-like immunoreactivity, its molecular forms and monoaminergic metabolites in aged and demented patients with Parkinson's disease--effect of L-Dopa. *J. NEURAL. TRANSM. GEN. SECT.* **103**; 591-602
- Strnad, J.; Eppler, CM.; Corbett, M. und Hadcock, JR. (1993):** The rat SSTR2 somatostatin receptor subtype is coupled to inhibition of cyclic AMP accumulation. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* **191**; 968-976.
- Stroh, T.; Kreienkamp, HJ. und Beaudet, A. (1999):** Immunohistochemical distribution of the somatostatin receptor subtype 5 in the adult rat brain: predominant expression in the basal forebrain. *J. COMP. NEUROL.* **412**; 69-82.
- Stroh, T.; Jackson, AC.; Sarret, P.; Dal Farra, C.; Vincent, JP.; Kreienkamp, HJ.; Mazella, J. und Beaudet, A. (2000a):** Intracellular dynamics of sst5 receptors in transfected COS-7 cells: maintenance of cell surface receptors during ligand-induced endocytosis. *ENDOCRINOLOGY* **141**; 354-365.
- Stroh, T.; Jackson, AC.; Dal Farra, C.; Schonbrunn, A.; Vincent, JP. und Beaudet, A. (2000b):** Receptor-mediated internalization of somatostatin in rat cortical and hippocampal neurons. *SYNAPSE* **38**; 177-186.
- Sudol, M. (1998):** From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. *ONCOGENE* **17**; 1469-1474.
- Surya, A.; Stadel, JM. und Knox, BE. (1998):** Evidence for multiple, biochemically distinguishable states in the G protein-coupled receptor, rhodopsin. *TRENDS PHARMACOL. SCI.* **19**; 243-247.
- Takano, K.; Yasufuku-Takano, J.; Kozasa, T.; Nakajima, S. und Nakajima, Y. (1997):** Different G proteins mediate somatostatin-induced inward rectifier K⁺ currents in murine brain and endocrine cells. *J. PHYSIOL.* **502**; 559-567.
- Tallent, MK. und Siggins, GR. (1997):** Somatostatin depresses excitatory but not inhibitory neurotransmission in rat CA1 hippocampus. *J. NEUROPHYSIOL.* **78**; 3008-3018.
- Tallent, MK. und Siggins, GR. (1999):** Somatostatin acts in CA1 and CA3 to reduce hippocampal epileptiform activity. *J. NEUROPHYSIOL.* **81**; 1626-1635.
- Tatsumi, H.; Costa, M.; Schimerlik, M. und North, RA. (1990):** Potassium conductance increased by noradrenaline, opioids, somatostatin, and G-proteins: whole-cell recording from guinea pig submucous neurons. *J. NEUROSCI.* **10**; 1675-1682.
- Tavares, GA.; Panepucci, EH. und Brunger, AT. (2001):** Structural characterization of the intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *MOL. CELL.* **8**; 1313-1325.
- Tezuka, T.; Umemori, H.; Akiyama, T.; Nakanishi, S. und Yamamoto, T. (1999):** PSD-95 promotes Fyn-mediated tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **96**; 435-440.

- Tochio, H.; Hung, F.; Li, M.; Bredt, DS. und Zhang, M. (2000):** Solution structure and backbone dynamics of the second PDZ domain of postsynaptic density-95. *J. MOL. BIOL.* **295**; 225-237.
- Topinka, JR. und Bredt, DS. (1998):** N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel Kv1.4. *NEURON* **20**; 125-134.
- Torrecilla, M.; Marker, CL.; Cintora, SC.; Stoffel, M.; Williams, JT. und Wickman, K. (2002):** G-protein-gated potassium channels containing Kir3.2 and Kir3.3 subunits mediate the acute inhibitory effects of opioids on locus ceruleus neurons. *J. NEUROSCI.* **22**; 4328-4334.
- Trejo, J. und Coughlin, SR. (1999):** The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 2216-2224.
- Tu, JC.; Xiao, B.; Yuan, JP.; Lanahan, AA.; Leoffert, K.; Li, M.; Linden, DJ. und Worley, PF. (1998):** Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *NEURON* **21**; 717-726.
- Tu, JC.; Xiao, B.; Naisbitt, S.; Yuan, JP.; Petralia, RS.; Brakeman, P.; Doan, A.; Aakalu, K.; Lanahan, AA.; Sheng, M. und Worley, PF. (1999):** Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *NEURON* **23**; 583-592.
- Ungerer, M.; Böhm, M.; Elce, JS.; Erdmann, E. und Lohse, MJ. (1993):** Altered expression of β -adrenergic receptor kinase and β_1 -adrenergic receptors in the failing heart. *CIRCULATION* **87**; 454-463.
- Urrutia, R. (2003):** KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *GENOME BIOL.* **4**; 231-240.
- Valiquette, M.; Bonin, H. und Bouvier, M. (1993):** Mutation of tyrosine-350 impairs the coupling of the beta 2-adrenergic receptor to the stimulatory guanine nucleotide binding protein without interfering with receptor down-regulation. *BIOCHEMISTRY* **32**; 4979-4985.
- Valiquette, M.; Bonin, H.; Hnatowich, M.; Caron, MG.; Lefkowitz, RJ. und Bouvier, M. (1990):** Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human β_2 -adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **87**; 5089-5093.
- Vanetti, M.; Kouba, M.; Wang, X.; Vogt, G. und Höllt, V. (1992):** Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *FEBS LETT.* **311**; 290-294.
- Vanetti, M.; Vogt, G. und Höllt, V. (1993):** The two isoforms of the mouse somatostatin receptor (mSSTR2A and mSSTR2B) differ in coupling efficiency to adenylate cyclase and in agonist-induced receptor desensitization. *FEBS LETT.* **331**; 260-266.
- Velimirovic, BM.; Gordon, EA.; Lim, NF.; Navarro, B. und Clapham, DE. (1996):** The K⁺ channel inward rectifier subunits form a channel similar to neuronal G protein-gated K⁺ channel. *FEBS LETT.* **379**; 31-37.
- Vernier, P.; Cardinaud, B.; Valdenaire, O.; Philippe, H. und Vincent, JD. (1995):** An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family. *TRENDS PHARMACOL. SCI.* **16**; 375-381.

- Vezzani, A. und Hoyer, D. (1999):** Brain somatostatin: a candidate inhibitory role in seizures and epileptogenesis. *EUR. J. NEUROSCI.* **11**; 3767-3776.
- Vojtek, AB. und Der, CJ. (1998):** Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J. BIOL. CHEM.* **273**; 19925-19928.
- Wang, HS.; Pan, Z.; Shi, W.; Brown, BS.; Wymore, RS.; Cohen, IS.; Dixon, JE. und McKinnon, D. (1998):** KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *SCIENCE* **282**; 1890-1893.
- Warren, T.G. und Shields, D. (1984):** Expression of preprosomatostatin in heterologous cells: biosynthesis, posttranslational processing, and secretion of mature somatostatin. *CELL* **39**; 547-555.
- Wente, W. (2004):** Funktionelle Untersuchungen von Somatostatinrezeptor-5 interagierenden Proteinen in der Maus (*Mus musculus*). Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg. 1-117.
- Witzgall, R.; O'Leary, E.; Leaf, A.; Onaldi, D. und Bonventre, J.V. (1994):** The Krüppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **91**; 4514- 4518.
- Wollmuth, LP. und Sobolevsky, AI. (2004):** Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *TRENDS NEUROSCI.* **27**; 321-328.
- Woods, DF. und Bryant, PJ. (1991):** The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *CELL* **66**; 451-464.
- Wolf, CJ. und Salter, MW. (2000):** Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *SCIENCE* **288**; 1765-1769.
- Xia, Z.; Gray, JA.; Compton-Toth, BA. und Roth, BL.; (2003):** A direct interaction of PSD-95 with 5-HT_{2A} serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. *J. BIOL. CHEM.* **278**; 21901-21908.
- Xiao, B.; Tu, JC.; Petralia, RS.; Yuan, JP.; Doan, A.; Breder, CD.; Ruggiero, A.; Lanahan, AA.; Wenthold, RJ. und Worley, PF. (1998):** Homer regulates the association of group 1 metabotropic receptors with multivalent complexes of Homer-related, synaptic proteins. *NEURON* **21**; 701-716.
- Xu, J.; Paquet, M.; Lau, AG.; Wood, JD.; Ross, CA. und Hall, RA. (2001):** β 1-adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-2). Differential regulation of receptor internalization by MAGI-2 and PSD-95. *J. BIOL. CHEM.* **276**; 41310-41317.
- Xu, Y.; Song, J.; Bruno, JF. und Berelowitz, M. (1993):** Molecular cloning and sequencing of a human somatostatin receptor, hSSTR4. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* **193**; 648-652.
- Yamada, T.; Ohoka, Y.; Kogo, M. und Inagaki, S. (2005):** Physical and functional interactions of the lysophosphatidic acid receptors with PDZ domain-containing RhoGEFs. *J. BIOL. CHEM.* Mar 8; [Internet-Publikation vor der gedruckten Ausgabe]
- Yamada, Y.; Post, SR.; Wang, K.; Tager, HS.; Bell, GI. und Seino, S. (1992a):** Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **89**; 251-255.

- Yamada, Y.; Reisine, T.; Law, SF.; Ihara, Y.; Kubota, A.; Kagimoto, S.; Seino, M.; Seino, Y.; Bell, GI. und Seino, S. (1992b):** Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase. *MOL. ENDOCRINOL.* **6**; 2136-2142.
- Yamada, Y.; Kagimoto, S.; Kubota, A.; Yasuda, K.; Masuda, K.; Someya, Y.; Ihara, Y.; Li, Q.; Imura, H.; Seino, S. und Seino, Y. (1993):** Cloning, functional expression and pharmacological characterization of a fourth (hSSTR4) and a fifth (hSSTR5) human somatostatin receptor subtype. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* **195**; 844-852.
- Yao, I.; Hata, Y.; Ide, N.; Hirao, K.; Deguchi, M.; Nishioka, H.; Mizoguchi, A. und Takai, Y. (1999):** MAGUIN, a novel neuronal membrane-associated guanylate kinase-interacting protein. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 11889-11896.
- Yao, I.; Ohtsuka, T.; Kawabe, H.; Matsuura, Y.; Takai, Y. und Hata, Y. (2000):** Association of membrane-associated guanylate kinase-interacting protein-1 with Raf-1. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* **270**; 538-542.
- Yasuda, K.; Rens-Domiano, S.; Breder, CD.; Law, SF.; Saper, CB.; Reisine, T. und Bell, GI. (1992):** Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylylcyclase. *J. BIOL. CHEM.* **267**; 20422-20428.
- Yuan, R. (1981):** Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases; *ANNU. REV. BIOCHEM.* **50**; 285-319.
- Zbar, B.; Brauch, H.; Talmadge, C. und Linehan, M. (1987):** Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *NATURE* **327**; 721-724.
- Zitser, H.; Hönck, HH.; Bächner, D.; Richter, D. und Kreienkamp, HJ. (1999a):** Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 32997-33001.
- Zitser, H.; Richter, D. und Kreienkamp, HJ. (1999b):** Agonist-dependent interaction of the rat somatostatin receptor subtype 2 with cortactin-binding protein 1. *J. BIOL. CHEM.* **274**; 18153-18156.

Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit

Konferenzbeiträge

Birgül, N.; **Christenn, M.**; Xu, L.; Methner, A.; Reinscheid, R.; Bächner, D.; Kreienkamp, HJ.; Richter, D. (1999): Identification of novel orphan G-protein coupled receptors and their ligands in flies and man. 19th Blankenese Conference: Advances in Molecular Neurobiology. Hamburg, Deutschland.

Christenn, M.; Buck, F.; Richter, D. und Kreienkamp, HJ. (2002): Interaction of the murine somatostatin receptor 4 with the PSD-95/SAP90 proteins. 22nd Blankenese conference: Brain Function and Dysfunction: Somatostatin and Related Peptides and their Cognate Receptors, Hamburg, Deutschland.

Buck, F.; **Christenn, M.**; Richter, D. und Kreienkamp, HJ. (2002): Affinity purification using short synthetic peptides: a tool for the study of protein complex formation in neurons. 1st World HUPO congress, Versailles, Frankreich. Zusammenfassung des Posters publiziert in: *MOL. CELL. PROTEOMICS* **1**; A3.

Buchbeiträge:

Kreienkamp, HJ.; Liew, CW.; Bächner, D.; Mameza, MG.; Soltau, M.; Quitsch, A.; **Christenn, M.**; Wente, W.; Richter, D. (2004): Physiology of somatostatin receptors: from genetics to molecular analysis. in Srikant, CB. (Editor): Somatostatin. Endocrine Updates Vol. 24. Kluwer Academic Publishing, Niederlande.

Manuskript in Vorbereitung:

Christenn, M.; Schulz, S.; Kindler, S.; Buck, F.; Richter, D. und Kreienkamp, HJ.: Interaction of brain somatostatin receptors with the PDZ domains of PSD-95.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Marcus Christenn
Geburtsdatum: 11. September 1969
Geburtsort: Schillingsfürst, Kreis Ansbach

Schulbildung:

1976 - 1980 Grundschule Stenzelbergschule, Königswinter
1980 - 1986 Realschule Oberpleis, Königswinter
12. Juli 1986 Fachoberschulreife
1986 - 1989 Gymnasium am Oelberg, Königswinter
26. Mai 1989 allgemeine Hochschulreife

Grundwehrdienst:

1989 - 1990 Zentraler Sanitätsdienst der Bundeswehr

Studium:

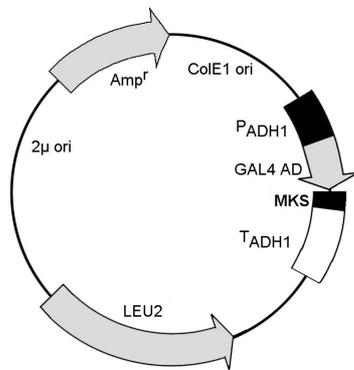
WS 1990/91 - WS 1992/93 Grundstudium im Fach Chemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
10. Februar 1993 Vordiplom
SS 1993 - WS 1996/97 Hauptstudium im Fach Chemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
April - Dezember 1996 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Hildburg Beier, Institut für Biochemie, Universität Würzburg
Thema: Versuche zur Identifizierung einer Selenocystein-spezifischen tRNA aus *Chlamydomonas reinhardtii*
21. Januar 1997 Diplom

Doktorarbeit:

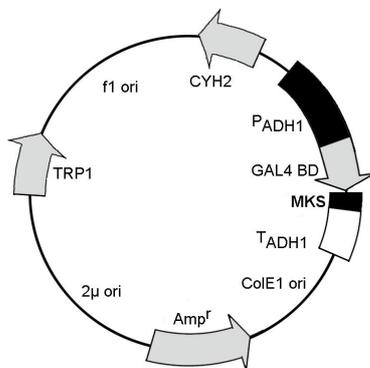
seit Juli 1997 Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Universität Hamburg
Juli 1997 - August 1999 in der Arbeitsgruppe von Dr. Rainer Reinscheidt
seit August 1999 in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp
Thema: Charakterisierung von Somatostatinrezeptor-Subtyp 4 interagierenden Proteinen in der Ratte (*Rattus norvegicus*)

Anhang

Nachfolgend sind häufig benutzte Vektoren und Konstrukte aufgeführt:



pACT2 (Acc.Nr.: U29899) enthält die cDNA-Bibliothek, die im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen eingesetzt wurde, als Fusionskonstrukt mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4 AD). Die Expression des Fusionsproteins wird in Hefen durch den Promoter des Alkoholdehydrogenase 1-Gens aus *S. cerevisiae* (P_{ADH1}) kontrolliert. Die Transkription in Hefen wird durch das ADH1-Transkriptions-Stop-Signal (T_{ADH1}) beendet. LEU2: kodiert für ein Enzym der Leucinsynthese und erlaubt ein Wachstum bei Abwesenheit von Leucin.

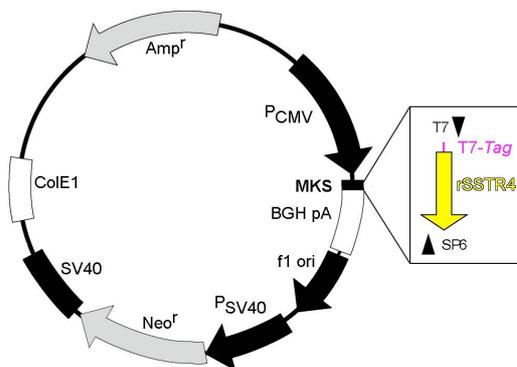


pAS2.1 (Acc.Nr.: U30497) enthält das Köderkonstrukt, das in den Hefe-Zwei-Hybrid-Screens eingesetzt wurde. TRP1: kodiert für ein Enzym der Tryptophansynthese und erlaubt ein Wachstum bei Abwesenheit von Tryptophan.

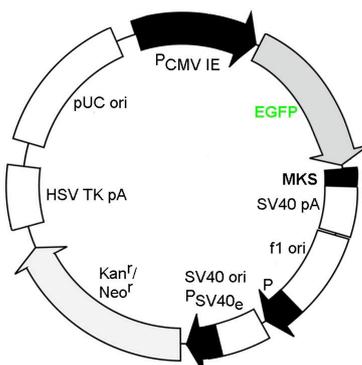
CYH2: dominantes Wildtypallel des L29-Proteins des Hefe-Ribosoms, das sensitiv gegenüber Cycloheximid ist. (s. Kap. 3.35.5)

GAL4 BD: GAL4-Bindungsdomäne.

MKS: multiple Klonierungsstelle.

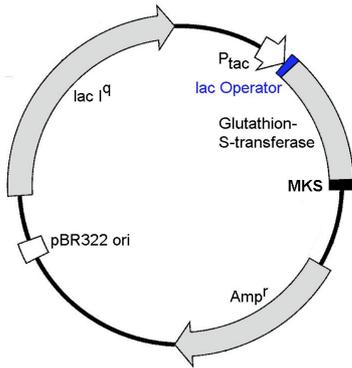


NT7-rSSTR4-pcDNA3: eukaryotischer Expressionsvektor, der den gesamten offenen Leserahmen des rSSTR4 (Acc.Nr.: NM_013036: nt 59 bis 1213) enthält. Zusätzlich wurde noch ein kurzes DNA-Fragment angehängt, das für die 11 N-terminalen Aminosäuren des Hauptcapsidproteins 10A (MASMTGGQMG) des Bakteriophagen T7 kodiert (*T7-Tag*). Die Expression des Fusionsproteins wird durch den CMV-Promoter (P_{CMV}) kontrolliert.

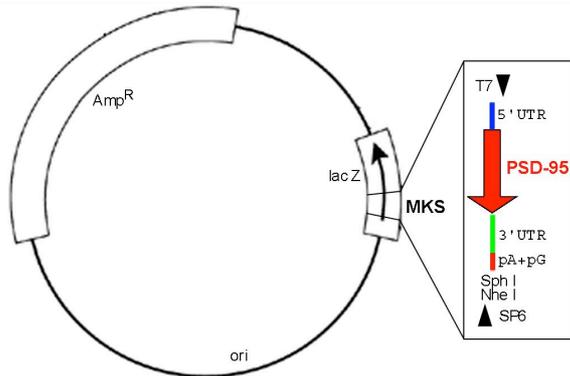


pEGFP-C1, -C2: eukaryotische Expressionsvektoren, die ein Gen für eine GFP-Variante aus *Aequorea victoria* unter der Kontrolle eines CMV-Promotors enthalten. Dies erlaubt die Expression eines autofluoreszierenden Fusionsproteins in eukaryotischen Zellen. C1 und C2 unterscheiden sich in der multiblen Klonierungsstelle und bezeichnen verschiedenen offenen Leserahmen des GFP-Gens.

Acc.Nr.: U55763 (pEGFP-C1); U57606 (pEGFP-C1).



pGEX-4T2: (Acc.Nr.: U13854) prokaryotischer Expressionsvektor, der ein Gen für die Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* enthält. Die Expression des entsprechenden Proteins wird durch den tac-Promotor (P_{tac}) kontrolliert. Der Vektor enthält zusätzlich das Gen für den lac-Repressor, der in Abwesenheit von Lactose oder IPTG die Expression des GST-Fusionsproteins reprimiert.



PSD-95-pGEMHE enthält den gesamten offenen Leserahmen von rPSD-95 (Acc.Nr.: X66474, nt 203 bis 2380). Zusätzlich enthält er Teile der 5'- und 3'-UTR des β -Globin-Gens aus *Xenopus leavis*. Nach *in vitro* Transkription mit T7-RNA-Polymerase wird die cRNA zur Injektion von *Xenopus leavis* Oozyten verwendet.