

UNTERSUCHUNGEN ZUR DIMERISIERUNG VON
SOMATOSTATIN-REZEPTOREN MIT ANDEREN
G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Magdalena Lausch

geb. am 06.04.1968 in Posen (Polen)

Gutachter: Prof. Dr. Volker Höllt

Privatdozent Dr. Hans-Jürgen Kreinekamp

Prof. Dr. Andreas Gardemann

Eingereicht am 17.12.03

Verteidigung am 05.07.04

für Adrian und David

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Allgemeine Einführung.....	1
1.2	Somatostatin und synthetische Analoga.....	3
1.3	Vorkommen der Somatostatin-Rezeptoren.....	5
1.4	Molekularbiologie und Struktur der Somatostatin-Rezeptoren.....	6
1.5	Signaltransduktion der Somatostatin-Rezeptoren.....	9
1.6	Dimerisierung von Rezeptoren.....	11
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit.....	13
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	15
2.1	Klonierung von Rezeptoren.....	15
2.2	Herstellung und Kultivierung von transfizierten HEK293-Zellen.....	18
2.3	Antikörper und Affinitätsreinigung.....	20
2.4	Verwendete Liganden.....	22
2.5	Immunzytochemie und Konfokalmikroskopie.....	23
2.6	Quantitative Messung der Internalisierung mittels ELISA.....	24
2.7	Messung der Rezeptoraktivität mit ERK1/ERK2 Assay.....	25
2.8	Studien an isolierten Rezeptorproteinen.....	26
2.8.1	<i>Zellaufarbeitung und Zellyse.....</i>	26
2.8.2	<i>Proteinbestimmung.....</i>	27
2.8.3	<i>Isolierung der Glykoproteine mittels Weizenkeimlecitin.....</i>	28
2.8.4	<i>Koimmunpräzipitation von Homo- bzw. Heteromeren.....</i>	28
2.8.5	<i>Detektion der gelösten Proteine.....</i>	29
2.9	Direkter Nachweis von Dimerisierung in lebenden Zellen mittels BRET.....	31
2.10	Datenverarbeitung.....	32
3	ERGEBNISSE.....	33
3.1	Charakterisierung von Somatostatin-Rezeptoren in HEK293-Zellen.....	33
3.2	Homodimerisierung des sst2A-Rezeptors.....	35
3.2.1	<i>Koimmunpräzipitation des sst2A-Homodimers.....</i>	37
3.2.2	<i>Nachweis von sst2A-Homodimeren in lebenden Zellen.....</i>	39

3.3	Heterodimerisierung von sst2A mit anderen GPCR der Klasse I	41
3.3.1	<i>Somatostatin-Rezeptoren sst1, sst3-Myc, sst4-HA und sst5 können mit sst2A-T7 koimmunpräzipitiert werden</i>	41
3.3.2	<i>Somatostatin-Rezeptor sst2A heterodimerisiert mit MOR1-Rezeptor, der zur Opiat-Rezeptor-Familie der Klasse I von GPCR gehört</i>	45
3.4	Heterodimerisierung des sst2A-T7 Rezeptors mit Klasse II GPCR.....	47
3.4.1	<i>Rezeptoren für das Vasoaktive Intestinal-Peptid VPAC1 und VPAC2</i>	47
3.4.2	<i>Neurotensin-Rezeptoren (NT1 und NT2)</i>	48
3.5	Heterodimerisierung des sst2-T7 mit Klasse III GPCR	50
3.6	Funktionelle Untersuchungen des sst2A-T7-sst4-HA Heterodimers	51
3.6.1	<i>Internalisierung der sst2A-T7- und sst4-T7- Rezeptoren in HEK293-Zellen</i>	51
3.6.2	<i>Internalisierung von sst2A und sst4 nach einer Koexpression in HEK293-Zellen</i>	55
3.6.3	<i>Messung der agonisten-induzierten Aktivierung von ERK1 und 2 (ERK1/2)</i>	57
3.7	Funktionelle Untersuchungen der Heterodimere sst2A-MOR1	59
3.7.1	<i>Internalisierung der Rezeptoren sst2A und MOR1 sowie der koexprimierten sst2A-MOR1 in HEK293-Zellen</i>	59
3.7.2	<i>Cross-Desensitisierung von ERK1/2 bei sst2A-MOR1-Heterodimeren</i>	62
4	DISKUSSION	65
4.1	Dimerisierungsstudien.....	66
4.2	Funktionelle Konsequenzen der Heterodimerisierung von sst2A-sst4- und sst2A-MOR1 Rezeptoren.....	71
4.3	Schlussbetrachtung.....	74
5	LITERATUR	78
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	89
7	ANHANG	91
7.1	Abkürzungen und Dimensionen.....	91
7.2	Lebenslauf	94
7.3	Wissenschaftliche Vorleistungen	95
7.4	Danksagung.....	96

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Einführung

In dieser Arbeit wurden Somatostatin-Rezeptoren der Ratte untersucht, die zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) der Klasse I gehören, bei denen die Signalweiterleitung durch Somatostatin ausgelöst wird. Sowohl beim Menschen als auch bei anderen Säugetieren sind fünf Rezeptor-Subtypen (sst1-sst5) bekannt, wobei die Nummerierung der Rezeptoren die Reihenfolge ihrer Entdeckung widerspiegelt (Hoyer et al., 1995; Yamada et al., 1992a, b, 1993; Rohrer et al., 1993; Xu et al., 1993).

Rezeptoren sind verantwortlich für die Erkennung und Weiterleitung der Signale durch Transmitter im Organismus. Zahlreiche Pharmaka, die therapeutisch bzw. diagnostisch eingesetzt werden, erzielen ihre pharmakologischen Effekte über Rezeptoren, die entweder intrazellulär im Zytoplasma bzw. Zellkern oder verankert in der Plasmamembran vorkommen können. Durch Bindung von Pharmaka an intrazelluläre Rezeptoren kann beispielsweise die Gentranskription reguliert werden.

Membranständige Rezeptoren sind funktionell in drei Gruppen unterteilt: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (z.B. Somatostatin-, Opioid-, GABA_B-Rezeptoren), ligandengesteuerte Ionenkanäle (z.B. GABA_A-, Glutamat-Rezeptoren) sowie enzym-assoziierte Rezeptoren (z.B. Rezeptoren mit Guanylatzyklase-Aktivität oder Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen).

G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR) stellen eine äußerst zahlreiche (mehr als 1000 verschiedene) und pharmakologisch bedeutsame Rezeptor-Familie dar. Daher ist die Erforschung dieser Rezeptoren eine wichtige Grundlage für eine effiziente Wirkstoffentwicklung.

Rezeptoren) ist durch einen großen extrazellulären N-Terminus [ca. 100 Aminosäuren (AS)] charakterisiert, der einige Cysteine enthält und somit für die Ausbildung von Disulfidbrücken verantwortlich ist. Die metabotropen Neurotransmitter-Rezeptoren (GABA_B, mGluR, Kalzium-Rezeptoren) der *Klasse III* (Abb. 1C) enthalten einen noch längeren N-Terminus (500-600 AS) als die Rezeptoren der Klasse II. Schließlich gehören die Pheromonrezeptoren zur *Klasse IV*, die cAMP-Rezeptoren (*Dictyostelium*) bilden dagegen die Klasse V.

1.2 Somatostatin und synthetische Analoga

Somatostatin ist ein natürlicher Ligand der Somatostatin-Rezeptoren. Es hemmt die Freisetzung des Wachstumshormons Somatotropin ebenso wie die Freisetzung von Insulin, Glukagon, Gastrin, Sekretin und anderen Peptidhormonen, wodurch es sich an der physiologischen Regulation des Metabolismus beteiligt. Darüber hinaus wirkt es als Neurotransmitter bzw. Neuromodulator im zentralen Nervensystem und steuert dabei die motorische Aktivität und kognitive Funktionen. Somatostatin ist ein zyklisches Peptidhormon, welches aus 14 (ss-14) oder 28 Aminosäuren besteht (ss-28). Wie bei anderen Peptidhormonen entstehen beide Formen infolge einer gewebespezifischen posttranslationalen Prozessierung aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül, dem Preprosomatostatin (Montminy et al., 1984; Shen und Rutter, 1984; Patel et al., 1997).

Somatostatin kommt nahezu in jedem Gewebe in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Große Mengen können im zentralen und peripheren Nervensystem, im Pankreas und im Darm nachgewiesen werden. Hingegen sind kleinere Mengen in Schilddrüse, Speicheldrüse, Nebenniere, Niere, Prostata und der Plazenta zu finden (Patel 1999; Reichlin, 1983). Auch zwischen den beiden Peptid-Formen gibt es eine ungleiche Verteilung, denn die kürzere ss-14-Form ist am weitesten verbreitet. Die Frage, ob diese beiden Isoformen biologisch gleichermaßen relevant sind oder ob sie unterschiedliche Bedeutung haben, kann heute noch nicht eindeutig beantwortet werden. Im Gehirn wurden beispielsweise beide Formen von Somatostatin nachgewiesen (Patel, 1999). Unklar ist jedoch hier, ob beide Varianten in separaten Neuronen vorkommen und

unterschiedliche Aufgaben übernehmen oder zusammen koexprimiert werden und deshalb gemeinsame Aufgaben erfüllen (Patel, 1999). Die Affinität der beiden Somatostatin-Formen ist zu ihren Rezeptoren zumindest bei einem Subtyp (sst5) ungleich (vgl. 1.4).

Therapeutisch kann in das Somatostatin-regulierende System bei endokrinen gastrointestinalen Tumoren eingegriffen werden. Das System wird aber auch mit Epilepsie, Morbus Alzheimer und endogenen Depressionen in Verbindung gebracht. Der schnelle Zerfall ($t_{1/2} = 3$ Minuten) des natürlichen Somatostatins erschwert jedoch den medikamentösen Einsatz. Durch die Entwicklung von synthetischen, peptidischen Somatostatin-Analoga wie z.B. dem Oktreotid lässt sich die Aktivität des Peptides auf 2-3 h verlängern, bei SOM-230 beträgt die Halbwertszeit sogar 20 Stunden. Die Analoga weisen jedoch unterschiedliche Präferenzen hinsichtlich der Somatostatin-Rezeptorbindung auf (Coy und Taylor 1996). Beispielsweise zeigten Oktreotid (SMS201-995) und Seglitid (Mk578) keine Affinität zu sst1 und sst4, eine mittlere Affinität zu sst3 und zu sst5 und eine sehr hohe zu sst2 (Lamberts et al., 1996). Diese deutlichen Affinitätsunterschiede führten, bevor alle fünf Somatostatin-Rezeptoren bekannt waren, zur Annahme, dass es mindestens zwei Arten der Rezeptoren geben müsse: SRIF I (*somatropin release inhibiting factor receptors*) und SRIF II. Heutzutage werden die fünf Somatostatin-Rezeptoren immer noch in zwei derartige Gruppen eingeteilt (Hoyer et al., 1995). Zur Gruppe I gehören Rezeptoren, die biologisch stabile Liganden wie Oktreotid binden (sst2, sst3, sst5) und zur Gruppe II solche, die Oktreotide nicht binden (sst1 sowie sst4).

Darüber hinaus wurden auch nicht-peptidische Analoga entwickelt, die gezielt subtypspezifisch an die Rezeptoren binden. Sie sind wichtige Werkzeuge für die Erforschung der funktionellen Eigenschaften von einzelnen Somatostatin-Rezeptoren (Lamberts et al., 1996; Rohrer et al., 1998).

Erwähnenswert ist, dass sowohl beim Menschen als auch bei Nagetieren das Neuropeptid Cortistatin entdeckt wurde, dem zum Teil dieselben biologischen Funktionen wie dem Somatostatin zugewiesen werden. Der Name "Cortistatin" leitet sich von seiner hemmenden Wirkung auf Pyramidenzellen der Hirnrinde ab (de Lecea

et al., 1996). Cortistatin entsteht aus dem Vorläuferpeptid Preprocortistatin. Aus diesem bildet sich nach posttranslationaler proteolytischer Prozessierung bei Nagetieren das Cortistatin-14 (CST-14) oder beim Menschen das CST-17 bzw. das N-terminal verlängerte Cortistatin-29 (CST-29). Cortistatin kann hoch effektiv an alle fünf Somatostatin-Rezeptoren binden (Shihler et al., 1998). Die genaue biologische Funktion von Cortistatin ist jedoch immer noch umstritten (Spier und de Lecea, 2000; Dalm et al., 2003).

1.3 Vorkommen der Somatostatin-Rezeptoren

Der Nachweis von Somatostatin-Rezeptoren spielt eine wichtige Rolle für die Diagnostik und Behandlung vieler Krankheiten, insbesondere bei neuroendokrinen Tumoren. Mittels molekularbiologischer Techniken wie *Northern-Blots*, In-situ-Hybridisierung und RT-PCR ließ sich das mRNA-Expressionsmuster aller fünf Somatostatin-Rezeptoren bei verschiedenen Spezies weitgehend beschreiben. Die humanen Somatostatin-Rezeptoren sind, ähnlich wie das Somatostatin, in vielen Organen vorhanden (Patel, 1999), und oft kommen mehrere Subtypen zusammen im selben Gewebe vor. Bisher ist sst2 in der Hypophyse des Menschen zusammen mit sst5, im Pankreas zusammen mit sst1 und sst3, im gastrointestinalen Trakt mit sst1 und im Zentralen Nervensystem zusammen mit sst1 und sst4 gefunden worden. Im Hirn von Ratte und Maus konnten alle Subtypen außer sst5 nachgewiesen werden (Dournaud et al., 1996; Dournaud et al., 1998; Händel et al., 1999; Helboe et al., 1998a, b; Helboe et al., 1999; Schindler et al., 1997; Schindler et al., 1998a; Schindler et al., 1999; Schulz et al., 1998 a, b; Stroh et al., 1999). Sst1 ist ausschließlich in Axonen nachgewiesen worden und somit in präsynaptische Mechanismen involviert. Die Subtypen sst2A und sst2B kommen dagegen vorwiegend im somatodendritischen Kompartiment vor, wodurch sie eher bei postsynaptischen Prozessen eine Rolle spielen (Schulz et al., 1998 a, b). Darüber hinaus wurde der sst2A-Subtyp in enterochromaffin-ähnlichen Zellen und Nervenfasern identifiziert, sst2B hingegen in der Magenschleimhaut (Schindler, 1998a b, 1999; Allen et al., 2003).

Die Somatostatin-Rezeptoren sind demnach im gesunden Organismus organ- bzw. gewebespezifisch verteilt. In Tumorzellen gibt es allerdings ein heterogenes Expressionsmuster der Subtypen (Fehmann et al., 1996). Der sst2-Rezeptor ist in 90% aller Karzinoid-Fälle vorhanden, sst5 bei 80% aller endokriner pankreatischer Tumore (de Herder und Lamberts, 2002). Interessanterweise kommen nur bei etwa der Hälfte aller Patienten mit Insulin produzierenden Tumoren sst2 und sst5 gemeinsam vor. Insgesamt zeigt sich jedoch eine starke Dominanz des sst2-Rezeptors (Dutour et al., 1998; de Herder und Lamberts, 2002).

Darüber hinaus sind auch Mischpopulationen der Somatostatin-Rezeptoren mit anderen GPCR bekannt. Beispielsweise ließ sich der sst2A-Subtyp im Locus coeruleus, kolokalisiert mit dem μ -Opiat-Rezeptor, nachweisen (Pfeiffer, 2002).

Die mögliche Bedeutung der gemeinsamen Existenz verschiedener Rezeptoren (hier Somatostatin-Rezeptoren) kann pharmakologische Konsequenzen haben. Diesen wird im Kapitel 1.6 (Dimerisierung) nachgegangen.

1.4 Molekularbiologie und Struktur der Somatostatin-Rezeptoren

Die humanen Somatostatin-Rezeptoren werden von einzelnen Genen kodiert, die auf separaten Chromosomen lokalisiert sind (Bruno et al., 1992; Kluxen et al., 1992; O'Carroll et al., 1992; Rohrer et al., 1993; Vanetti et al., 1993; Yamada et al., 1992a, b; Yasuda et al., 1992). Die Rezeptoren beinhalten 356 bis 391 Aminosäuren und sind untereinander 39%-57% homolog (Patel, 1999). Die Aminosäure-Sequenz YANSCANPI/VLY in der siebten Transmembrandomäne ist bei allen fünf Rezeptoren hoch konserviert und daher ein typisches Merkmal dieser Rezeptor-Familie (Patel, 1999).

Wie bereits im Kapitel 1.2 erwähnt, zeigen alle Rezeptor-Subtypen bis auf sst5 eine gleich starke Affinität sowohl gegenüber ss-14 als auch ss-28 (Panetta et al., 1994). Der sst5-Rezeptor bevorzugt hingegen nur Somatostatin ss-28 (Roosterman et al., 1997; Roth et al., 1997b). Die Tatsache, dass der sst5-Rezeptor im Dünndarm und Dickdarm das GLP-1 (*glucagon like peptide*) gerade über ss-28 und nicht über ss-14 hemmt

(Chisolm and Greenberg, 2002), weist zumindest bei diesem Rezeptor auf eine gewisse Aufgabenteilung zwischen beiden Somatostatin-Formen hin. Interessanterweise reicht eine einzige Aminosäuresubstitution im sst5-Rezeptor aus, um seine Affinität zu ss-14 zu erhöhen (Ozenberger and Hadcock, 1995). Darüber hinaus wurde eine Mutation des humanen sst5-Rezeptors bei Acromegalie-Patienten in Pro¹⁰⁹Ser gefunden, die für die Aufhebung der antiproliferativen Wirkung bei der Behandlung mit Somatostatin-Analoga verantwortlich gemacht wird (Ballare et al., 2001). Polymorphismen, die sich bei demselben Subtyp nachweisen ließen (SNP6 Leu⁴⁸Met in der ersten Transmembrandomäne und SNP11 Pro³³⁵Leu im C-Terminus), sollen dagegen bei BPAD (*bipolar affective disorder*) eine Rolle spielen (Nyegaard et al., 2002). Ein weiterer Polymorphismus des sst5, der von physiologischer Bedeutung sein könnte, wurde von Sasi et al. (1998) beschrieben.

Bei den Rezeptoren sst1, sst3, sst4 und sst5 fehlen die Introns. Bislang wurde ein Intron beim sst2-Rezeptor-Gen von Ratte und Maus gefunden. Durch alternatives Spleißen der prä-mRNA können bei diesen Spezies zwei Produkte entstehen. Diese unterscheiden sich in der Länge (sst2A länger, sst2B kürzer, siehe Abb. 2) und in der Aminosäuresequenz ihrer C-Termini (Vanetti et al., 1992; Vanetti et al., 1993; Sarret et al., 1998; Schindler et al., 1998). Beide Isoformen besitzen gleich große Affinität zu den Liganden, variieren aber hinsichtlich der Desensibilisierung (siehe 1.5) (Vanetti et al., 1993).

Somatostatin-Rezeptoren bestehen (Abb. 2) aus sieben hydrophoben, α -helikalen Transmembrandomänen (I-VII) und den daraus resultierenden extra- sowie intrazellulären Schleifen (β -Blätter). Der extrazelluläre Teil ist für die Erkennung und Bindung der Liganden verantwortlich und enthält konservierte Cystein-Reste, welche sehr wahrscheinlich in die Ausbildung von Disulfidbrücken involviert sind und zur Stabilisierung der extrazellulären Domäne dienen (Abb. 2). Der intrazelluläre Bereich ist dagegen an der Kopplung der G-Proteine beteiligt. Des Weiteren besitzen die Rezeptoren im cytoplasmatischen C-Terminus sowie in der zweiten und dritten intrazellulären Schleife Konsensus-Sequenzen für die Proteinkinasen A (PKA), C (PKC) und die Calmodulinkinase II.

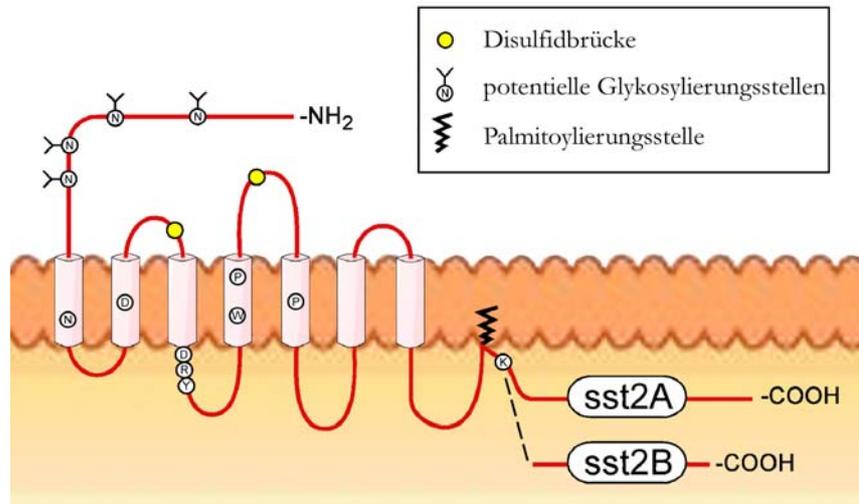


Abb. 2: Schematische Darstellung des Somatostatin-Rezeptors sst2 der Ratte. Die sieben Transmembrandomänen sind als Zylinder dargestellt und enthalten die für die GPCR-Klasse I charakteristischen, hoch konservierten Aminosäuresequenzen (die eingekreisten Buchstaben). Im N-Terminus sind die potentiellen Glykosylierungsstellen jeweils an einem Asparaginrest positioniert (Y). Die potentiellen Disulfidbrücken an den Cysteinresten zwischen der zweiten und dritten extrazellulären Schleife sind als gelbe Punkte dargestellt. Unterhalb der dritten Transmembrandomäne ist das typische DRY-Motiv zu sehen. Die Palmitoylierungsstelle ist durch die schwarze Zickzackkurve gekennzeichnet. Die beiden Spleißvarianten sst2A und sst2B unterscheiden sich in der Länge des C-Terminus. Der sst2A-Rezeptor ist um 24 Aminosäuren länger als der sst2B.

Bei humanen sst1-, sst2-, sst4- und sst5- Rezeptoren kommen ebenso wie im N-Terminus typische Cysteine vor, welche die potenziellen Palmitoylierungsstellen widerspiegeln (Abb. 2, kleine Zickzackkurve). Sie fehlen beim (h)sst3, bei dem der C-Terminus länger als bei den übrigen Subtypen ist.

Das berechnete Molekulargewicht der Rezeptoren liegt zwischen 39 und 45 kDa. Aufgrund der Glykosylierung auf der extrazellulären Seite kann sich das Molekulargewicht des Rezeptors vergrößern. Experimentell konnte dieses bei sst1, sst2 und sst5 durch enzymatische Deglykosylierung bewiesen werden (McLawhon et al., 1983; Liu-Chen et al., 1993; Chen et al., 1995; Patel, 1999; Pfeiffer et al., 2001). Das Molekulargewicht kann je nach Spezies oder Gewebe variieren. Dies lässt sich mit gewebespezifischen Glykosylierungen der Rezeptoren erklären. Im endoplasmatischen Retikulum werden die Zuckerreste beim Kohlenhydratstoffwechsel gewebespezifisch an die Asparaginreste (Y in der Abb. 2) der N-Termini von Rezeptoren glykosydisch angeheftet. Sie werden im Golgi-Apparat abgewandelt, um bei der Exozytose

automatisch auf die Außenseite der Plasmamembran zu gelangen. Die extrazellulären Kohlenhydrate können als Unterscheidungsmerkmale für die Zelle dienen. Experimentell werden sie oft für die Isolierung der Rezeptoren mittels Weizenkeimlecitin (WGA) verwendet.

Die Sequenzen der humanen Rezeptoren ähneln den jeweiligen Sequenzen anderer Spezies. So ist zum Beispiel der humane sst1 zu 94-99% homolog zum sst1 von Ratte und Maus, der sst2 zu 93-96% zum sst2 von Ratte, Maus und Rind, der sst4 zu 86% zum sst4 der Ratte (Demchyshyn et al., 1993) und der sst3 sowie der sst5 zu 82-83% zum sst3 bzw. zum sst5 von Nagetieren.

Trotz der vielen Gemeinsamkeiten im Hinblick auf Bau und Homologie der Sequenzen gibt es einige wichtige Unterschiede zwischen den Spezies sowie den einzelnen Subtypen, die sich vor allem in der Signalkaskade bemerkbar machen (siehe 1.5).

1.5 Signaltransduktion der Somatostatin-Rezeptoren

Die Signaltransduktion beginnt bei allen GPCR mit einer selektiven Ligandenbindung an der extrazellulären Seite der Membran. Über eine Konformationsänderung des Rezeptors wird das Signal an das G-Protein (GTP-sensitives Bindungsprotein) im intrazellulären Teil der Membran weitergegeben (Bourne, 1991). Als Folge bindet ein Guanosin triphosphat-Molekül (GTP) an das G-Protein und schaltet dadurch Signalkaskaden an. Dabei leiten im Zellinneren klassische Botenstoffe wie zum Beispiel cAMP (*zyklisches Adenosinmonophosphat*) und MAP-Kinasen (*mitogen aktivierte Protein-Kinasen*) das Signal über verschiedene Mechanismen an ihre Zielmoleküle weiter (Hamm, 1998).

Eine andauernde Aktivierung eines GPCR führt zur Desensibilisierung. Diese geht oft mit einer Internalisierung (Endozytose), einem Recycling sowie einer Down-Regulierung des Rezeptors einher. Die Desensibilisierung bewirkt eine Abnahme der Empfindlichkeit der Rezeptoren auf Liganden. Die homologe Desensibilisierung benötigt dabei eine Agonistenbindung und eine G-Protein-Aktivierung, die zur Phosphorylierung des

Rezeptors durch G-protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) führt. Nach der Phosphorylierung durch GRK und Anlagerung von β -Arrestin-Molekülen wird der Rezeptor vom G-Protein entkoppelt und somit funktionell desensibilisiert (Lefkowitz, 1998; Ferguson, 2001). Die heterologe Desensibilisierung kann unabhängig von der Ligandenbindung durch Phosphorylierung über die klassischen *second-messenger*-abhängigen Kinasen erfolgen (Chuang et al., 1996). Während der Internalisierung lagern sich Adapter des AP-2-Komplexes und Clathrin in Form der sogenannten Stachelsaumgrübchen (*clathrin-coated pits*) an den Komplex (Lefkowitz, 1998; Ferguson, 2001; Claing et al., 2002), wodurch die Zahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche abnimmt. Dieser Prozess dauert meistens nur wenige Minuten. Down-Regulation bewirkt eine Degradation der Rezeptoren in Lysosomen und kann einige Stunden bis Tage dauern (Ferguson, 2001). Im Sinne eines *Recyclings* dephosphoryliert dagegen die Proteinphosphatase 2A die oben beschriebenen Komplexe, wonach eine Abspaltung der Liganden erfolgt (Bünemann und Hosey, 1999; Lefkowitz, 1998; Smalley et al., 2000).

Signaltransduktion bei Somatostatin-Rezeptoren. Alle fünf Somatostatin-Rezeptoren bewirken eine Hemmung der Adenylatzyklase über ein heterotrimeres, pertussistoxin-sensitives G_i -Protein (Patel et al., 1994). Die darauf folgende Signaltransduktion der jeweiligen Rezeptoren ist jedoch nicht identisch (Patel et al., 1995; Patel et al., 1996). Alle Subtypen aktivieren die Phosphotyrosin-Phosphatasen (PTP). Die antiproliferative Wirkung von sst1, sst2, sst4 und sst5 wird aber über PTP-abhängige MAPK-Modulation erreicht, die mit der Induktion des Retinoblastomasuppressor-Proteins (Rb-Protein) und der p21-Aktivierung einhergeht. Im Gegensatz zur Antiproliferation reguliert der sst3-Rezeptor über PTP die Apoptose. Dabei hat die PTP-abhängige Aktivierung des Suppressors p53 die Aktivierung des Bax-Proteins (*pro apoptotic protein*) zur Folge, was mit einem programmierten Zelltod endet (Sharma und Sirkant, 1998). Die Subtypen sst2 und sst5 aktivieren die Phospholipase C (Akbar et al., 1994; Chen et al., 1997), der sst4-Rezeptor dagegen die Phospholipase A_2 (Schweitzer, 1990; Sakanaka et al., 1994).

Auch die Ziele der unterschiedlichen Signaltransduktionen sind verschieden. Die Rezeptoren sst2 und sst5 inhibieren die Sekretion des Wachstumshormons

Somatotropin. Der sst5-Rezeptor hemmt die Sekretion von Insulin. An der Immunantwort und der Sekretion des Glukagons ist der sst2-Rezeptor beteiligt.

Darüber hinaus wurde bei sst1, sst2, sst3 und sst5 eine homologe Desensibilisierung (Unempfindlichkeit der Rezeptoren auf ihre Liganden) beschrieben. Bemerkenswert ist, dass bei sst2B die Desensibilisierung später auftritt als bei sst2A (Vanetti et al., 1993). Bei dem sst4-Rezeptor der Ratte ließ sich hingegen bislang keine Agonist-abhängige Desensibilisierung nachweisen (Roth et al., 1997a, b).

Die Desensibilisierung wird oft durch Internalisierung der Rezeptoren beeinflusst. Innerhalb der Somatostatin-Rezeptoren treten jedoch einige Unterschiede in Muster und Effizienz der Internalisierung auf. Es ist bekannt, dass die humanen sst2, sst3, sst4 und sst5 einer raschen Agonist-induzierten Internalisierung (Endozytose) unterliegen (Patel, 1999). Bisher wurde keine Internalisierung für den sst4 der Ratte beschrieben (Roth et al., 1997b; Roosterman et al., 1997), obwohl sie für den humanen sst4 bereits bewiesen wurde (Hukovic et al., 1996; Smalley et al., 2001). In der Diagnostik dienen radioaktiv markierte Somatostatin-Analoga zur präoperativen Szintigraphie von Tumoren, deren klinische Relevanz oft auf Internalisierung der Rezeptoren beruht (Lamberts et al., 1993; Hurst und Modlin, 1993).

1.6 Dimerisierung von Rezeptoren

Bei der Dimerisierung unterscheidet man zwischen Homodimeren, die sich unter zwei Rezeptoren gleicher Art bilden, und Heterodimeren, die sich unter verschiedenen Rezeptorarten formen. Auch höher molekulare Formationen der Dimere, wie Tetramere oder Oligomere, sind bekannt (Maggio et al., 1993a, b; Hebert et al., 1996; Romano et al., 1996; Fukushima et al., 1997; Cvejic und Devi, 1997; Nimchinsky et al., 1997).

Homodimere wurden *in vitro* beispielsweise biochemisch mittels Koimmunpräzipitation bei den sst2- und sst3-Rezeptoren der Ratte (Pfeiffer, 2001) oder auch bei 5HT_{1A}-, 5HT_{1B}- und 5HT_{1D}-Serotonin-Rezeptoren (Salim et al., 2002) nachgewiesen. Bei humanen sst5 ließen sich Homodimere in intakten Zellen biophysikalisch mit Hilfe von FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) nachweisen. Der humane sst1 bildet

unter denselben Bedingungen wie sst5 keine Homodimere. Wider Erwarten entstehen aber mit (h)sst5 Heterodimere (Rocheville et al., 2000b) sowie Heterodimere auch zwischen dem (h)sst5 und dem Dopamin-Rezeptor D2 (Rocheville et al., 2000a). Mittels BRET-Technik (Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer) ließen sich in intakten Zellen Homodimere bzw. Heterodimere zwischen den Oxytocin- und Vasopressin-Rezeptoren V1 und V2 nachweisen (Terrillon et al., 2003). Die Dimerisierung ist demnach unter den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ein häufiger, aber kein genereller Vorgang.

Eine Dimerisierung von GPCR bringt oft eine Veränderung von Rezeptoreigenschaften mit sich. Die Heterodimerisierung von sst2 und sst3 bewirkt eine Inaktivierung des sst3 (Pfeiffer et al., 2001). Zwischen μ - und δ -Opiat-Rezeptoren führt die Heterodimerisierung zur Entstehung einer neuen Bindungsseite und zur Veränderung der G-Protein-Kopplungseigenschaften (George et al., 2000). Die Heterodimerisierung der sst5-D2-Rezeptoren führt zur Steigerung der Agonisten-Affinität (Rocheville 2000a). Für die GABA_B-Rezeptoren R1 und R2 ist die Dimerisierung sogar essentiell, denn nur die heteromere Form ist für ihre biologische Aktivität verantwortlich (Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1998; White et al., 1998; Ng et al., 1999). Ähnliche Befunde ließen sich beim T1-Taste-Rezeptor zeigen (Nelson et al., 2001).

Die Dimerisierung lässt sich durch eine Bindung der Liganden beeinflussen. Beispielsweise wird das Dimer des δ -Rezeptors durch eine Agonisten-Bindung destabilisiert (Cvejic und Devi, 1997). Dagegen liegt der β_2 -adrenerge Rezeptor zwar konstitutiv als Dimer vor, lässt sich jedoch mit einer Agonisten-Stimulation zusätzlich stabilisieren (Angers et al., 2000). Bei Somatostatin-Rezeptoren ist bisher der Einfluß von Agonisten auf die Dimerisierung ungeklärt.

Der exakte Mechanismus der Dimerisierung ist bei den GPCR noch nicht vollständig erforscht. Bisher sind mehrere Modelle der Dimerisierung bekannt. Bei den meisten Dimeren können vermutlich einige Varianten der Interaktion gleichzeitig vorkommen (kovalente Disulfidbrücken, Windung der jeweiligen C-Termini- und Transmembran-Interaktionen). Bei Homodimeren der Serotonin-Rezeptoren 5-HT_{1D} und 5HT_{1A} (Salim et al., 2002) sowie bei Heterodimeren aus dem Kalzium-Rezeptor (CaR) und dem metabotropen Glutamat-Rezeptor 5 (mGluR5) sind Disulfidbrücken an der

Dimerisierung beteiligt (Romano et al., 1996; Bai et al., 1998; Ward et al., 1998; Pace et al., 1999). Hingegen ist bei der Dimerisierung des heteromeren GABA_B-Rezeptors (R1 mit R2) (Margeta-Mitrovic et al., 2000) sowie des homomeren δ -Opioid-Rezeptors (Cvejic und Devi 1997) die Windung der C-Termini involviert. Allerdings zeigten Galvez et al. (2001), dass beim GABA-Rezeptor die Windung nicht allein für die Heterodimerisierung verantwortlich sein kann. Die Dimerisierung beim β_2 -adrenergen und Dopamin-Rezeptor D2 erfolgt dagegen über die Transmembrandomänen (Hebert et al., 1996; Ng et al., 1996).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ausgehend vom heutigen Kenntnisstand über Heterodimerisierung der GPCR sollte im ersten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob der Somatostatin-Rezeptor sst2A in der Lage ist, möglicherweise in Abhängigkeit vom phylogenetischen Verwandtschaftsgrad, mit Rezeptoren verschiedener Klassen von GPCR zu heterodimerisieren. Anschließend sollten exemplarisch an zwei Heterodimer-Beispielen die daraus resultierenden physiologischen Konsequenzen ermittelt werden.

Der sst2A-Rezeptor der Ratte wurde dafür allein und in Gegenwart von anderen GPCR in HEK293-Zellen exprimiert. Als erstes sollte die Existenz der Homodimere sst2A-sst2A und Heterodimere sst2A-MOR1 mit Hilfe von Koimmunpräzipitation und BRET-Analysen (Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer) nachgewiesen werden. Die BRET-Analyse erlaubt einen direkten biophysikalischen Nachweis der Heterodimerisierung in lebenden Zellen und gehört zu den Techniken, die der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen dienen. Die Koimmunpräzipitation ist im Gegensatz zur BRET eine biochemische Methode, mit der sich die Dimerisierung an isolierten Rezeptoren nachweisen lässt.

Anschließend sollte geklärt werden, bei welchen der untersuchten Rezeptorkombinationen (sst2AT-X) sich mittels Koimmunpräzipitation (Ko-IP, siehe 2.8.4) Heterodimere isolieren lassen. Als potentielle Koimmunpräzipitationsspartner wurden Somatostatin-Rezeptoren (sst1 sst3, sst4 und sst5) und ein μ -Opioid-Rezeptor

(MOR1), die zur Klasse I der GPCR gehören, verwendet. Außerdem wurden zusätzlich noch einige Vertreter anderen GPCR-Klassen ausgewählt, die phylogenetisch von den Somatostatin-Rezeptoren weiter entfernt sind. Für die Klasse II wurden die Vasoactiven Intestinal-Peptid-Rezeptoren VPAC1 und VPAC2, die Neurotensin-Rezeptoren NT1 und NT2 sowie für die Klasse III die metabotropen Glutamat-Rezeptoren mGluR1 und mGluR5 verwendet. Mit Hilfe von WGA-Analysen sollten im Immunoblot die Rezeptoren identifiziert werden. Die Koimmunpräzipitation sollte mittels Sepharosekügelchen durchgeführt werden, an denen monoklonale Antikörper kovalent gebunden sind. Nach einer Auftrennung im SDS-PAGE und *Western-Blot* sollten alle untersuchten Rezeptoren mit ihren spezifischen Antikörpern detektiert werden. Zu erwarten war eine selektive Koimmunpräzipitation, die mit der phylogenetischen Entfernung der Rezeptoren drastisch abnimmt.

Ferner sollte im Fall einer positiven Koimmunpräzipitation exemplarisch an zwei Beispielen untersucht werden, ob sich möglicherweise als Konsequenz der Heterodimerisierung die funktionellen Eigenschaften eines oder beider Partner verändern. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob sich das Internalisierungsmuster der Somatostatin-Rezeptoren bei einer Koexpression mit einem anderen Rezeptor in einer Zelle verändert. Die Internalisierungsstudien sollten immunzytochemisch mittels Konfokalmikroskopie ausgewertet werden. Zur Unterstützung sollte bei der ausgesuchten heteromeren Kombination die Internalisierung mit Hilfe von ELISA quantifiziert werden. Ergänzend sollte ein eventueller Einfluss der Heterodimerisierung auf die Signaltransduktion, die mit einer Aktivierung von MAP-Kinasen einhergeht, mit geeignetem Assay bestimmt werden.

Als Modellsystem wurden HEK293-Zellen („*human embryonic kidney*“) verwendet, die stabil oder transient mit den jeweiligen Rezeptoren transfiziert wurden. Sie sind leicht unter Laborbedingungen zu halten und ein etabliertes Standardmodell. Die Morphologie der Zellen erlaubt den künstlich transfizierten Rezeptoren eine natürliche Lage an der Zellmembran. Dies vereinfacht die Visualisierung der Rezeptoren unter dem Mikroskop und lässt viele Beobachtungen zu (zum Beispiel die Internalisierung). Darüber hinaus ist die molekularbiologische Grundlage für die von Somatostatin-Rezeptoren induzierte Signalkaskade in diesem Modellsystem bereits gut untersucht.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Die in dieser Studie verwendeten HEK293-Zellen (Graham et al., 1977) stammen aus menschlichen embryonalen Nierenzellen (ACC305 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Abt. Menschliche und Tierische Zellkulturen). Endogen ließen sich bei dieser Zelllinie bisher keine Somatostatin-, Opioid-, Vasoaktiven Intestinal-Peptid-, Neurotensin-, oder metabotropen Glutamat-Rezeptoren detektieren. Daher wurde die DNA der Rezeptoren in *E. coli* Bakterien vermehrt und in die eukaryontischen HEK293-Zellen transfiziert. Die transfizierten Somatostatin-Rezeptoren wurden mit Hilfe der Immunzytochemie und der Laser-Scan-Mikroskopie lokalisiert und auf mögliche Veränderungen im Internalisierungsmuster untersucht (siehe 2.5). Die Internalisierung wurde mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, siehe 2.6) quantifiziert. Ferner wurde die Rezeptoraktivität im MAP-Kinase-Assay (siehe 2.7) bestimmt. Durch die Anreicherung der isolierten Rezeptoren mit Weizenkeimlecitin-Sepharose-Kügelchen wurden die mittleren molekularen Größen der Rezeptoren bestimmt (WGA siehe 2.8.3). Die Interaktionen zwischen den Somatostatin- und anderen Rezeptoren wurden dagegen biochemisch durch Koimmunpräzipitation (siehe 2.8.4) oder in einigen Fällen biophysikalisch durch BRET (Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer; siehe 2.9) nachgewiesen.

2.1 Klonierung von Rezeptoren

DNA-Fragmente mit den Somatostatin-Rezeptor-Subtypen sst1, sst2A-T7, sst3-MYC, sst4-HA und sst5 waren bereits in ein Plasmid pcDNA3 einkloniert und wurden von Herrn Dr. H. J. Kreienkamp (Universität Hamburg) bereitgestellt. Die Plasmide der Vasoaktiven Intestinal-Peptid-Rezeptoren VPAC1 und VPAC2, der Neurotensin-

Rezeptoren NT1 und NT2 sowie der metabotropen Glutamat-Rezeptoren mGluR1 und mGluR5 wurden von Magalie Waelbroeck (Brüssel, Belgien), David Shire (Sanoti-Synthelabor, Labège, Frankreich) und Biomol (Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Plasmide sind autonom replizierende zirkuläre DNA-Moleküle und besitzen Gene, die als Marker für die Selektion der plasmidhaltigen Bakterien (z.B. Ampicillin-Phosphotransferase) dienen und für die stabile Transfektion von Säugetierzellen (z.B. Hygromycin-B-Phosphotransferase oder Neomycin-Phosphotransferase) sorgen. Das DNA-Fragment für das T7-Epitop wurde an die DNA-Sequenz für den N-Terminus des sst2- und des sst4-Rezeptors mittels PCR an den Expressionsvektor angefügt. Diese T7-Antikörpersequenz ist gegen 11 Aminosäuren (MASMTGGQQMG) gerichtet, die sich im T7-Capsid-Protein befinden. Dabei entsprechen die letzten beiden Aminosäuren Leucin und Lysin (AAGCTT) gleichzeitig einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym HindIII. Alternativ wurde ein ebenfalls N-terminales HA-Epitop eingefügt, welches der YPYDVPDYA-Aminosäure-Sequenz entspricht und Teil des menschlichen Influenza-Hämagglutinin ist. Die Rezeptoren wurden durch Dideoxy-Sequenzierung identifiziert.

Die DNA wurde in *E. coli* XL-1 Bakterien amplifiziert. Für die Transformation wurde die Kalziumchlorid-Methode nach Mandel und Higa (1970) sowie die Elektroporations-Methode verwendet.

CaCl₂ Methode. Die Bakterien besitzen ein eingebautes Ampicillin-Resistenz-Gen, das für die Selektion benötigt wird. Hierfür wurden 20 µl einer Bakterien-Stammlösung in 10 ml LB Medium (10 g/l Lennox L Broth Base, Life Technologies Schottland) aufgenommen und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 100 µl dieser Bakterien-Suspension entnommen, in 10 ml LB-Medium überführt und weitere 2 h bei 37 °C geschüttelt. Für einen Transformationsansatz wurden daraus 2 ml entnommen und 30 Sekunden bei 14000 U/min in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 1 ml gekühltem 70 mM CaCl₂ resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien nochmals 30 Sekunden zentrifugiert, in 200 µl eiskaltem Kalziumchlorid erneut resuspendiert und mit der oben beschriebenen Plasmid-DNA (maximal 50 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µg Plasmid-DNA) versetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Nach

einem kurzen Hitzeschock (2 Minuten bei 42 °C im Wasserbad) wurden die Bakterien wieder auf Eis gestellt. Schließlich wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Da nicht alle Bakterien die fremde DNA aufnehmen, ist eine anschließende Selektion der Bakterien erforderlich, die unten ausführlich beschrieben wird.

Elektroporation. Die *E. coli* Bakterienzellen wurden aus einer frischen „über Nacht“-Kultur in 600 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und unter ständiger Agitation bei 37 °C inkubiert, bis sie die logarithmische Wachstumsphase erreicht hatten. Anschließend wurden die Zellen auf 50-ml-Flakons verteilt und 15 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend bei $3000 \times g$ (Erdbeschleunigung $9,81 \text{ m/s}^2$) bei 4 °C 15 Minuten zentrifugiert. Zum Waschen wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit eiskaltem, sterilem Wasser aufgefüllt. Diese Waschprozedur wurde zweimal wiederholt, wobei im letzten Schritt die Zellen in Wasser resuspendiert wurden. Danach wurden die Bakterienzellen in 3 ml ebenfalls eiskaltem, sterilem 10% Glycerol vorsichtig resuspendiert und 15 Minuten bei 4 °C und $3000 \times g$ zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 3 ml 10% Glycerol (steril und eiskalt) resuspendiert, aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Zu 100 μl der elektrokompenten, eiskalten Bakterien-Zellen wurden 100 ng DNA zugegeben. Die Lösung wurde sogleich in vorgekühlte Küvetten überführt und einem kurzen elektrischen Impuls (GENE PULSER II, Bio Rad) ausgesetzt. Durch kurze Hochspannungsimpulse entstehen Löcher in den Bakterienmembranen, durch welche die fremde DNA in die Zelle aufgenommen werden kann. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und Inkubation bei 37 °C und permanenter Agitation (etwa 1 h) sind die Bakterien für eine Selektion bereit.

Selektion der transformierten Bakterien. Schließlich wurden 100 μl der DNA-Bakterienlösung, unabhängig von der zuvor benutzten Transformationsmethode, auf ampicillinhaltige Agarplatten (32g/l Lennox L Agar, Life Technologies) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die so gewachsenen einzelnen Kolonien ließen sich leicht mit einem autoklavierten Zahnstocher in 2 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführen. Lediglich die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, konnten sich über Nacht bei 37 °C und unter Schütteln vermehren (Chung et al., 1989).

DNA-Isolierung. Aus diesen Bakterienkulturen wurden die Plasmide durch Anionenaustausch-Chromatographie mit einem kommerziell erhältlichen Qiafilter Plasmid Mini Kit bzw. Midi (Qiagen, Hilden) gewonnen. Die isolierte DNA wurde durch eine enzymatische Restriktion und durch Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente auf einem Agarosegel überprüft. Anhand der Größe der DNA-Fragmente im Gel, die mit einem DNA-Größenmarker (Precision Protein Standards, Bio-Rad) verglichen wurden, konnten die positiv transformierten Klone ermittelt werden. Diese wurden über Nacht unter permanenter Agitation (bei 37 °C) in 50 ml LB-amp-Medium vermehrt. Etwa 18 h später erfolgte die DNA-Isolierung in größerem Maßstab (Qiafilter Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden). Die gewonnene DNA wurde für die unter 2.2 beschriebenen Transfektionen verwendet.

2.2 Herstellung und Kultivierung von transfizierten HEK293-Zellen

Nach der Vermehrung der DNA in *E. coli* Bakterien (Transformation) und Präzipitation wurde diese in die HEK293-Zellen transfiziert und die Zellen wurden für die Experimente kultiviert. Für die stabile Transfektion wurde die modifizierte Kalzium-Phosphat-Methode (CaPO₄) genutzt, für die transiente Transfektion dagegen die Lipofektamin-Methode.

Stabile Transfektion erfolgte nach einer modifizierten CaPO₄-Methode (Chen und Okayama, 1988). Hierfür wuchsen die HEK293-Zellen unter Standardbedingungen über Nacht in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen. Am nächsten Tag wurde ein antibiotikafreies DMEM Medium (*Dulbecco's modified Eagle-Medium*, Life Technologies, Eggenstein) zugegeben, die DNA-Lösung [7 µl DNA (1 µg/ml), 2,5 M CaCl₂ × 2H₂O, 135 µl Aqua bidest.] vorbereitet und auf die Zellen kreisförmig und vorsichtig pipettiert. Die Zellen wuchsen über Nacht, bei 35 °C unter 3% CO₂-Atmosphäre und zwei darauf folgende Tage bei 37 °C unter 10% CO₂-Atmosphäre. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von Geneticinsulfat (500 µg/ml Medium) bei einfach transfizierten Zellen oder Neomycin (500 µg/ml Medium) zusammen mit Hygromycin

(300 µg/ml) bei doppelt transfizierten Zellen. Somit überlebten nur Zellen, welche die Plasmid-DNA in die eigene chromosomale DNA aufgenommen hatten. Diese DNA kann dann stabil auf nachfolgende Zell-Generationen weitergegeben werden. Die Transfektion wurde mit Hilfe immunzytochemischer Verfahren, des Immunoblots und der Radioligandenbindung geprüft. Positive Zellen, die den gewünschten Rezeptor-Subtyp bzw. Subtypen exprimieren, wurden unter Selektions-Bedingungen weiter kultiviert.

Transiente Transfektion. Die HEK293-Zellen wurden hierbei mit Plasmiden (Rezeptoren und Mutanten) mit kommerziell erhältlichem Lipofektamin ("Lipofectamine 2000 reagent", Invitrogen life technologies) transfiziert. Eine Selektion der positiven Klone war in diesem Fall nicht erforderlich. Für die Koimmunpräzipitation (siehe 2.8.4) wuchsen die sst2T7-Zellen über Nacht in Schalen mit 10 cm Durchmesser in antibiotikafreiem DMEM-Medium. Für die immunzytochemische Färbung wuchsen dagegen die sst2AT7 bzw. die untransfizierten HEK293-Zellen ebenfalls in antibiotikafreiem Medium, aber direkt auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen in einer Platte mit 12 Vertiefungen. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion nach Protokoll des Herstellers. Nach etwa 48 h war die optimale Expression der transfizierten DNA erreicht. Die Transfektion wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung und des Immunoblots überprüft.

Zellkultur. Zellen mit den stabil transfizierten Rezeptor-Subtypen wuchsen als Monolayer in 25 cm² oder 75 cm² Kulturflaschen bei 37 °C und 10 % CO₂-Atmosphäre im Brutschrank. Als Medium wurde dabei DMEM verwendet (*Dulbecco's modified Eagle Medium*, Life Technologies, Eggenstein). Für die einfach transfizierten HEK293-Zellen war ein Neomycinanalog G418 (Geneticinsulfat, 500 µg/ml, Life Technologies, Eggenstein) erforderlich, dem 10%-iges FKS (Fötales Kälberserum) zugesetzt wurde. Bei zweifach transfizierten HEK293-Zellen wurde außer G418 zusätzlich Hygromycin 300 µg/ml (Pierce) zugegeben. Transient transfizierte Zellen wuchsen hingegen stets in DMEM ohne Antibiotika mit 10%-igem FKS direkt in Gefäßen, die für die jeweiligen Experimente benötigt waren. Andere Reaktionsgefäße sind bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen aufgeführt. Untransfizierte HEK293-Zellen wurden in DMEM mit Streptomycin (100U/ml), Penicillin (100U/ml) und 10%-igem FKS kultiviert. Bei

Zellen, die für MAP-Kinase Assay bestimmt waren, wurde die FKS-Konzentration auf 0,5% reduziert. Während der durchgeführten Stimulationen wurde RPMI1640-Medium (*Roswell Park Memorial Institute*) ohne Antibiotika und ohne FKS verwendet.

2.3 Antikörper und Affinitätsreinigung

Bei vielen der hier durchgeführten Experimente handelt es sich um immunologische Nachweisreaktionen. Dafür wurden kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper verwendet, sowie speziell erzeugte polyklonale Antikörper, die in der Tabelle 1 zusammengefasst sind. Diese wurden, vor allem für die Koimmunpräzipitationsstudien, affinitätsgereinigt.

Affinitätsreinigung. Die Peptidsynthese und die Antiserengewinnung der polyklonalen spezifischen Antikörper vom IgG-Typ (γ Immunglobuline), die jeweils gegen das C-terminale Ende der fünf Somatostatin-Rezeptoren sowie gegen die Epitope T7 des HA gerichtet sind, wurden von Gramsch Laboratories (Schwabhausen) durchgeführt. Die gelieferten polyklonalen Antiseren wurden anschließend mit Hilfe von Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinigung erfolgte über ein *SulfoLink-Kit* (Pierce, USA). Dieses Kit enthält ein Kopplungsgel, welches spezifisch an die Sulfhydrylgruppe des Antigen-Peptides bindet, an das sich der zu reinigende Antikörper anlagert. Für die Reinigung wurden 2 ml der *SulfoLink*-Gelsuspension in die Säulen gegeben und mit 12 ml Kopplungspuffer equilibriert. Anschließend wurde das reduzierte Peptid (1-10 mg in Probenpräparationpuffer) in die Säule pipettiert und 15 Minuten bei RT (Raumtemperatur) geschüttelt und 30 Minuten ohne Agitation inkubiert. Nach dem Durchlaufen des Peptides wurde das Gel mit 6 ml Kopplungspuffer gewaschen und mit 2 ml Cysteinpuffer versetzt. Durch 15-minütiges Schütteln und 30-minütige Inkubation ohne Schütteln lassen sich die nichtspezifischen Bindungsstellen abblocken. Danach wurde die Säule mit 16 ml Waschpuffer und mit 16 ml 0,05 % Natriumazid gewaschen.

Tabelle 1 Verwendete Antikörper. (IP: Immunoblot, ERK1/2: mitogen aktivierte Kinasen, IP: Immunpräzipitation, IB: Immunoblot, IZ: Immunzytochemie, ms: Maus, rb: Kaninchen, rt: Ratte, poly: polyklonal, mono: monoklonal)

Bezeichnung	Verwendungszweck	Antigensequenz	Konz.	Typ	Hersteller
rb 5605	IP, IB, IZ	ESGGVRNGTCASRISTL am C-Terminus des sst1	1-10 µg/ml	poly	Gramsch Laboratories, Schwabhausen
rb 6291	IP, IB, IZ	ETQRTLLNGDLQTSI am C-Terminus des sst2A	1-10 µg/ml	poly	Gramsch Laboratories, Schwabhausen
rb 7986	IP, IB, IZ	TAGDKASTLSHL am C-Terminus des sst3	1-10 µg/ml	poly	Gramsch Laboratories, Schwabhausen
rb 6002	IP, IB, IZ	CQQEPVQAEPGCKQVPFT KTTTF am C-Terminus des sst4	1-10 µg/ml	poly	Gramsch Laboratories, Schwabhausen
rb 6003	IP, IB, IZ	QATLPTRSCEANGLMQT RSI am C-Terminus des sst5	1-10 µg/ml	poly	Gramsch Laboratories, Schwabhausen
rb T7	IP, IB, IZ	MASMTGGEEMG des Eingefügten T7-Epitops am N-Terminus eines Rezeptors	1-10 µg/ml	poly	Gramsch Laboratories, Schwabhausen
ms T7	IP, IB, IZ	MASMTGGEEMG des Eingefügten T7-Epitops am N-Terminus eines Rezeptors	1:1000	mono	Novagen
rb HA	IP, IB, IZ	YPYDVDPDYA des Eingefügten HA-Epitops am N-Terminus eines Rezeptors	1:1000	poly	Gramsch Laboratories, Schwabhausen
rt HA	IP, IB, IZ	YPYDVDPDYA des Eingefügten HA-Epitops am N-Terminus eines Rezeptors	1-10 µg/ml	mono	Gramsch Laboratories, Schwabhausen
ms ERK1/2 phosphoryliert	IB	Phospho-Theonin ²⁰² , Phospho-Tyrosin ²⁰⁴	1:1000	mono	New England Biolabs
rb ERK2	IB	die Antigensequenz ist nicht angegeben	1:1000	poly	Santa Cruz Biotechnology
rt mGluR1	IB	die Antigensequenz ist nicht angegeben	1:1000	mono	Phar Mingen
rb mgluR5	IB	LIIRDYTQSSSSL im C-Terminus des mGluR5	1:2000	mono	Chemicon, USA
rb 9020	IB	TRVSPGARRSSSFQAE VLV am C-Terminus des VPAC1	1 µg/ml	poly	Gramsch Laboratories, Schwabhausen
rb 9023	IB	LQFHRGSRAQSFLQTE TSVI am C-Terminus des VPAC2	1 µg/ml	poly	Gramsch Laboratories, Schwabhausen
rb 9036	IB	KADSVSSNHTLSSNATRE TLY am C-Terminus des NT1	1 µg/ml	poly	Gramsch Laboratories, Schwabhausen
rb 9039	IB	PQSPTLMDTASGFGDPPE TRT am C-Terminus des NT2	1 µg/ml	poly	Gramsch Laboratories, Schwabhausen

Nach einer Equilibrierung mit 6 ml PBS erfolgte bei RT eine einstündige Inkubation des Gels mit 1 ml Serum. Schließlich wurde die Säule mit 16 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte die Elution des gereinigten Antikörpers mit Eluierungspuffer in je 8 Fraktionen zu 1 ml. Nach einer Neutralisation mit 50 µl 1 M Tris-HCl (Tris-hydroxymethylaminomethan, pH 9,5) wurde der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die Eluatfraktionen mit dem höchsten Protein- bzw. IgG-Gehalt wurden in PBS über Nacht bei 4 °C dialysiert und aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt.

Die Spezifität und der Titer der affinitätsgereinigten Antiseren wurde mit den jeweiligen Peptiden durch das Dot-Blot-Verfahren überprüft.

2.4 Verwendete Liganden

Je nach Fragestellung wurden die Zellen mit unterschiedlichen Substanzen behandelt, die in der Tabelle 2 zusammengefasst sind.

Tabelle 2 Benötigte Liganden

Substanz	Bezeichnung	Herkunft
selektiver Ligand: für sst2	L-779,976	Merck Research Laboratories, Rathway, USA
selektiver Ligand für sst4	L-803,087	Merck Research Laboratories, Rathway, USA
Ligand der Somatostatin-Rezeptoren (sst1 - 5) Somatostatin 1-14	ss-14	Sigma, Deisenhofen
selektiver Ligand für MOR1	DAMGO [D-Ala ² ,N-Me-Phe ⁴ ,-Glyo ⁵]-enkephalin	Perkin Elmer Life Sciences
selektiver Ligand für endogene LPA-Rezeptoren	LPA (<i>lysophosphatic acid</i>)	Sigma, Deisenhofen

2.5 Immunzytochemie und Konfokalmikroskopie

Die Immunzytochemie erlaubt Visualisierung der Lokalisation von Proteinen in den Zellen. Hier wurden die Liganden-induzierten räumlichen Änderungen von Rezeptoren (Internalisierung) in HEK293-Zellen überprüft. Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen (Durchmesser 22 mm/Vertiefung) wurden zunächst mit Deckgläschen und Poly-L-Lysin beschichtet. Die HEK293-Zellen wuchsen über Nacht in diesen Vertiefungen unter Standardbedingungen.

Abhängig von der Fragestellung wurden die Zellen mit entsprechenden Substanzen wie Somatostatin und Rezeptor-Subtyp-selektiven Liganden 30 Minuten behandelt. Weiter wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 40 Minuten mit Zamboni-Lösung (4% Paraformaldehyd, 0,2% Pikrinsäure in Phosphatpuffer, pH 6,9) fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TPBS (10 mM Phosphatpuffer, 137 mM NaCl, 0,05% Thimerosal, pH 7,4) erfolgte die Permeabilisierung durch eiskaltes 50%-iges und 100%-iges Methanol (jeweils 3 Minuten). Schließlich wurden die Zellen 3 Minuten mit 1%-igem und dann 1 h mit 3%-igem Ziegen Serum (Gibco) in TPBS gewaschen, um die putativen unspezifischen Bindungsstellen zu besetzen. Die Zellen wurden dann über Nacht mit den primären Antikörpern inkubiert (1% Ziegen Serum in TPBS, 1 µg/ml). Es folgten drei Waschschrte mit TPBS und eine zweistündige Inkubation mit den sekundären Antikörpern (Cy3- 1:400; Cy5- 1:400, Dianova). Anschließend wurden die Deckgläschen mit den darauf fixierten Zellen durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit DPX Einschlussmittel (Sigma, Steinheim) auf den Objektträgern eingebettet. Nach einigen Stunden Trocknen wurden die Präparate mittels konfokaler Mikroskopie ausgewertet.

Um eine konstitutive Internalisierung zu umgehen, wurde die Markierungs-Methode modifiziert. Die Inkubation mit primären Antikörpern (2 µg/ml) erfolgte 2 h bei 4 °C, unmittelbar vor der Stimulation mit Liganden und anschließender Fixierung mit Zamboni-Lösung. Danach wurden die Zellen mit Methanol permeabilisiert, die unspezifischen Bindungen mit Ziegen Serum geblockt und 2 h in sekundärem Antikörper inkubiert. Nach der Entwässerung und dem Einbetten in DPX wurden die Präparate mikroskopisch ausgewertet.

Die Präparate wurden mittels eines konfokalen Krypton/Argon *Laser Scan* Mikroskops (Leica TCS-NT, Wetzlar) ausgewertet. Die Detektion von Cyanin 3.18 (Cy3), das für einfache Fluoreszenz-Markierungen verwendet wurde, erfolgte bei einer Anregung von 568 nm und einem 570-630 nm Bandpass-Emissionsfilter. Für die Doppelmarkierungen wurde außer Cy3 das Fluorochrom Cyanin 5.18 (Cy5) eingesetzt. Dabei wurde Cy5 bei einer Anregung von 647 nm und einem 665 nm Langpass-Emissionsfilter detektiert.

2.6 Quantitative Messung der Internalisierung mittels ELISA

Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) erlaubt eine immunologische, quantitative Messung der Internalisierung über eine enzymatische Farbreaktion.

Für diese Versuche wuchsen die Zellen über Nacht in einer Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturplatte (24 Vertiefungen) in dem entsprechenden Medium. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit primären Antikörpern (2 µg/ml) inkubiert (2 h bei 4 °C) und je nach Experiment, mit Somatostatin oder Rezeptor-selektiven Liganden (siehe Tabelle 2) behandelt (bei 37 °C). Dann wurde zweimal mit PBS gewaschen und mit Zamboni-Lösung 40 Minuten fixiert. Nach nochmaligem Waschen folgte für 1,5 h die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (POD). Anschließend wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen. Für die nächsten 20-30 Minuten wurden 250 µl Entwicklungslösung (ABTS Solution, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) pro Vertiefung aufgetragen und 2 h unter leichter Agitation bei RT inkubiert. Weiter wurden jeweils 200 µl entnommen und in Mikrotiterplatten überführt. So ließ sich die Farbreaktion aufgrund einer Absorptionsabnahme fotometrisch ermitteln (Bio-Rad, Modell 450, Mikroplatte Reader). Dies erlaubt eine quantitative Messung der Internalisierung, die mit der Liganden-induzierten Abnahme der Antikörper (somit auch mit der Anzahl der Rezeptoren) an der Zelloberfläche einhergeht.

2.7 Messung der Rezeptoraktivität mit ERK1/ERK2 Assay

Neben der Internalisierung löst eine Stimulation der GPCR mit den Liganden weitere Reaktionskaskaden aus. Unter anderem werden kurz nach der Stimulation mit Rezeptorspezifischen Liganden (Tabelle 2) die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK 1 und 2) aktiviert, die sich an der Signalweitergabe vom Zytosol in den Zellkern beteiligen. Diese Proteinkinasen, auch MAP-Kinase 1 und 2 genannt, gehören zu den Serin/Threonin-Kinasen. Es ist bei vielen der GPCR bereits beschrieben, dass nach einer Ligandenbindung die MAP-Kinasen 1,2 transient innerhalb von wenigen Minuten an diesen beiden Stellen phosphoryliert werden (Yang et al., 1997; Polakiewicz et al., 1998; Luttrell et al., 1999).

Um die phosphorylierten ERK1/2 nach einer Stimulation der Somatostatin-Rezeptoren zu erfassen, wurden Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Die transfizierten HEK293-Zellen wuchsen über Nacht in 0,5% FKS-Medium, damit die Zellteilungsrate und somit die endogene Phosphorylierung beider ERK niedrig bleibt. Am nächsten Tag wurden die Zellen 2 h in serumfreien Medium (RPMI, vgl. 2.2 *Zellkultur*) inkubiert und entsprechend mit Liganden behandelt. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen, 250 µl heißer SDS-Probenpuffer (70 °C; 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerol; 100 mM DL-Dithiothreitol; 0,005% Bromphenolblau) zur Zellyse zugegeben und 5 Minuten bei 9 °C erhitzt und anschließend 5 Minuten bei 14.000 × g zentrifugiert. Dann erfolgte die Auftrennung der Proteine aus dem Überstand über eine Gelelektrophorese, der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und die Detektion im *Western-Blot* der ERK-Proteine, was in Kapitel 2.8.5 ausführlich beschrieben ist. Die Liganden-induzierte Phosphorylierung von ERK wurde schließlich im Immunoblot mit dem phosphospezifischen Antikörper detektiert. Außerdem wurde der totale Gehalt von nicht-aktivierten ERK2 in der Zelle mit nicht-phosphospezifischen Antikörpern quantifiziert.

2.8 Studien an isolierten Rezeptorproteinen

Für einen biochemischen Nachweis der Dimere ist es erforderlich, die Rezeptorproteine aus der Membran zu lösen. Hierzu wurden zwei Methoden verwendet. Bei der ersten ließen sich die Glykoproteine, zu denen die meisten GPCR zählen, mit Hilfe von Weizenkeimlecitin-Kügelchen (WGA) aus dem Proteingemisch isolieren und auf Mono- oder Dimere untersuchen. Mittels Immunpräzipitation (IP) sowie Koimmunpräzipitation (Ko-IP) ließ sich zwischen Homo- und Heterodimeren unterscheiden. Um die putativen Dimerisierungsbindungen zu stabilisieren, wurden die Zellen vor der Zellyse 30 Minuten bei 37 °C mit chemischen Crosslinkern wie Dithiobis (succinidyl-propionate) (DSP Pierce, Rockford) oder Bi(sulfosuccinimidyl)suberate (BS³ Pierce, Rockford) behandelt, die naheliegende Proteine (bis 1,2 nm) vernetzen. Crosslinker sind homobifunktionale N-Hydroxysuccinimid-Ester, die mit den primären Aminen von Peptiden und Proteinen reagieren. Eine so kurze Entfernung ist bei Rezeptoren, die miteinander Dimere bilden, zu erwarten. Die Bindung zwischen den Dimeren kann jedoch instabil sein und bei der Aufarbeitung zerfallen. Mit Crosslinkern lassen sich solche schwachen Bindungen stabilisieren.

Um eventuelle liganden-induzierte Dimerisierungen zu erzielen, wurden die Zellen vor der Lyse mit Somatostatin oder Rezeptor-selektiven Liganden 30 Minuten bei 37 °C behandelt.

2.8.1 Zellaufarbeitung und Zellyse

Die Zellaufarbeitung wurde entweder nach einer HEPES- oder RIPA-Methode durchgeführt. Für die HEPES-Methode wuchsen die HEK293-Zellen in 18 cm² großen Schalen unter Standardbedingungen, bis sie etwa 90% Konfluenz erreicht hatten. Zunächst wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 5 ml Homogenisierungspuffer [10 mM Tris, 5 mM EDTA, 3 mM EGTA (Ethylenglykol-bis-(β -Aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure) und 250 mM Sucrose], zu dem Proteinaseinhibitoren zugegeben wurden (10 μ g/ml Leupeptin; 1 μ g/ml Pepstatin A; 1 μ g/ml Aprotinin; 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 μ g/ml Bacitracin), 30 Minuten bei permanenter Agitation auf Eis gelöst. Nach dem Abschaben aus den

Schalen und nach 3-minütiger Homogenisierung (Braun, Melsungen) erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei $500 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Dabei wanderten ausschließlich Zellkerne und nicht aufgeschlossene Zellen nach unten. Der Überstand wurde abgenommen und bei $20.000 \times g$ zentrifugiert. Bei dieser Geschwindigkeit gehen die Membranbestandteile in das Pellet über. Das Pellet wurde 1 Stunde unter Schütteln bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in Hepespuffer [15 mM NaCl, 2 mM Hepes (2-[4-(Hydroxyethyl)-1-piperanzyl]-ethansulfonsäure), 5 mM EDTA, 3 mM EGTA, 4 mg/ml n-Dodecyl- β -Maltosid, ebenfalls mit Proteinase-Hemmer] lysiert. Der nachfolgende letzte Zentrifugationsschritt (30 Minuten bei $20.000 \times g$ bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$) dient dazu, die nicht gelösten Membranreste zu beseitigen. Die gelösten Proteine samt der Rezeptoren befinden sich im Überstand und können für die WGA (2.8.3) bzw. Immunpräzipitation (2.8.4) verwendet werden.

Bei der RIPA-Methode wuchsen dagegen die Zellen in 10 cm^2 Schalen, bis sie etwa 60-70% Konfluenz erreicht hatten. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml eiskaltem RIPA Puffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH7,4; 5 mM EDTA; 1% Nonidet P-40; 0,5% Na-Deoxycholat; 0,1% SDS) in den Schalen lysiert, sofort abgeschabt, in Eppendorfgefäße überführt und 40 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt. Danach erfolgte eine einstündige Zentrifugation bei $18.000 \times g$ bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Im Überstand befinden sich die gelösten Proteine, die für die WGA bzw. Immunpräzipitation weiterverwendet wurden.

2.8.2 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration nach der Lyse erfolgte mit der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode. Dieses indirekte Verfahren beruht auf der Reduktion von zweiwertigem zu einwertigem Kupfer durch das reduzierende Potential von Peptidbindungen. Die Bicinchoninsäure bindet dabei spezifisch mit dem zweiwertigen Kupfer einen Farbkomplex, der sein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat. Dies ermöglicht einen sensitiven, kolorimetrischen Nachweis von Proteinen. Die Intensität des Farbkomplexes wurde spektralphotometrisch gegen einen Leerwert gemessen und die Proteinkonzentrationen aus der Standardkurve, die zuvor mit einem Standard aus Rinderserumalbumin (BSA) angelegt wurde, errechnet.

2.8.3 Isolierung der Glykoproteine mittels Weizenkeimlecitin

Membranglykoproteine können leicht aus dem Lysat mittels Weizenkeimlecitin-Sepharose-Kügelchen (WGA) isoliert werden. Die meisten Membranproteine besitzen viele Glykosylierungsstellen, an welche die WGA binden können. Auf 1 ml Lysat kommen 100 µl Weizenkeimlecitin, das an Sepharose-Kügelchen gekoppelt ist. Die WGA binden über Nacht bei 4 °C permanenter Agitation an die Glykoproteine. Nach kurzem Zentrifugieren bei $14.000 \times g$ bilden die Aggregate ein Sediment, welches fünfmal mit kaltem Detergenzpuffer (je nach Zellaufarbeitungsmethode, HEPES oder RIPA Puffer) gewaschen wurde. Die gereinigten Proteine wurden in 100 µl Probenpuffer durch Erhitzen für 20 Minuten bei 65 °C von den Kügelchen gelöst. Danach folgte die Auftrennung und Antikörpermarkierung der Proteine, was im Kapitel 2.8.5 beschrieben ist. Nach der Auswertung lassen sich mit Hilfe von WGA Monomere von Dimeren unterscheiden.

2.8.4 Koimmunpräzipitation von Homo- bzw. Heteromeren

Man kann auch direkt aus der Zell-Lösung die gesuchten Rezeptoren (Antigene) immunpräzipitieren. Dies ist mit Hilfe von Protein-A-Sepharose-Kügelchen möglich, an denen primäre Antikörper gebunden sind, welche gegen die gesuchten Proteine gerichtet sind. Für die Präzipitation wurden zwei Methoden (HEPES und RIPA) verwendet.

Bei der ersten Methode (HEPES) wurden die affinitätsgereinigten Antikörper (10 µg/ml) an Protein-A-Sepharose-Kügelchen (100 µl) bei 4 °C im Schüttler gekoppelt (ca. 4 h). Nach kurzer Zentrifugation wurden die nichtgebundenen Antikörper abpipettiert, der Überstand von der Zellaufarbeitung (s.o.) zugegeben und weiter über Nacht bei 4 °C geschüttelt.

Hingegen wurde bei der Präzipitation in der zweiten Methode (RIPA) 1 ml des Überstandes zu 30 µl Agarosekügelchen, an denen T7-Antikörper bereits kovalent gebunden waren (Novagen), zugegeben und 3 Stunden bei 4 °C geschüttelt.

Die Sepharose-Antikörper-Komplexe lösen die Rezeptoren aus dem Lysat über Nacht bei 4 °C unter Schütteln heraus. Dabei findet eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung statt. Am nächsten Tag wurden die Kügelchen, wie oben beschrieben, durch Wärme (20 Minuten bei 65 °C) von den Proteinen getrennt.

Die isolierten Proteine aus 2.8.3 und 2.8.4 wurden nach Lyse im Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 20% Glycerol; 100 mM DL-Dithiothreitol; 0,005% Bromphenolblau) sowie nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran übertragen und mittels spezifischer Antikörper die Lumineszenz der Rezeptor-Banden bestimmt, was im folgenden Kapitel beschrieben ist. Der Unterschied zu WGA liegt darin, dass man hier zwischen Homo- und Heterodimeren differenzieren kann, weil man gezielt mit spezifischen Antikörpern die Rezeptoren isoliert und detektiert.

2.8.5 Detektion der gelösten Proteine

Auftrennung der Proteine mit SDS-PAGE. Das hier verwendete SDS (Sodiumdodecylsulfat) bildet einen negativ geladenen SDS-Proteinkomplex mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis. Die Quartärstruktur der Proteine ist dadurch unterbunden, sodass die Komplexe im elektrischen Feld zur Anode wandern. Dabei trennt der Siebeffekt eines porösen Polyacrylamidgels die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf.

Hierfür wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem Tris-HCL-Glycin-Puffersystem mit Hilfe des "Protean II Elektrophoresesystems" (Biorad) verwendet. Je nach Größe der Rezeptorproteine waren die Konzentration des Acrylamids bei längeren, feinporigen Trenngelen 8%-, 10%- bzw. 12%-ig. Dagegen blieb die Konzentration der kürzeren weitporigen Sammelgele, die mit Probenaschen versehen waren, für alle Anwendungen gleich. Die Proteinproben wurden in einem SDS-Probenpuffer gelöst und in die Taschen aufgetragen. Dieser Probenpuffer enthielt 10 mM DTT (DL-Dithiothreitol), welches die Denaturierung der Proteine unterstützt, indem es die Disulfidbrücken spaltet. Neben den Proben wurde stets ein Protein-Größenmarker („Precision Protein Standards“, BioRad; „Roti-Mark“, Roth) aufgetragen, der später einen Vergleich der Molekulargewichte erlaubte. Die Elektrophorese erfolgte nach dem Auftragen der Proben bei 200 V, bis die sichtbare Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

Western-Blot. Im halbtrockenen Blotverfahren liegen Gel und immobilisierte Membran zwischen Filterpapieren, welche in Transferpuffern getränkt wurden. Diese Schichten sind in zwei horizontale Graphitplatten-Elektroden (unten Anode, oben Kathode) eingeschlossen (Towbin, 1979).

Auf die Anode wurden luftblasenfrei 3 Lagen von Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel), Nitrozellulosemembran (HybondTM ECLTM Nitrocellulose, Amersham Pharmacia, Biotech) und das Gel, alle in Anodenpuffer I getränkt (3 mM Tris, 20% Methanol) gelegt. Anschließend wurden 6 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer II (25 mM Tris, 20% Methanol), und 9 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenpuffer (40 mM 6-Aminocapronsäure), darauf gelegt. Die Blotapparatur wird mit der Kathodenplatte geschlossen. Der Transfer erfolgt bei konstantem Strom (0,85 mA pro cm² Gelfläche) über 1,5 h. Um unspezifische Bindungen zu blocken, wird die Membran 1 h lang in 5%-igem fettfreiem Milchpulver in PBS-Tween (0,1%) inkubiert und mehrmals in PBS-Tween gewaschen.

Detektion. Zunächst wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran durch eine Inkubation in einer Lösung aus 5% fettfreiem Milchpulver in PBS-Tween (PBS, pH 7,4; 0,1% Tween 20) für eine Stunde bei RT blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C. Nach mehrmaligem Waschen wurde für 2 h der Meerrettich-Peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper zugegeben (1:5000 in PBS-Tween rb und ms POD-Amersham; rt POD, Dianonva), der sich über eine verstärkte Chemilumineszenz („enhanced chemiluminescence“, ECL Amersham Pharmacia) auf ECL-empfindlichen Filmen detektieren ließ.

Mit einem Entkopplungs-Puffer (*stripping buffer*; 62,5 mM Tris, pH 6,7; 100 mM β -Mercaptoethanol; 2% SDS) ließen sich die primären und sekundären Antikörper von der Nitrozellulosemembran entfernen. Dieselben Proteine wurden dann mit weiteren Antikörpern erneut detektieren. Dafür wurde die Membran nach der ersten Detektion mehrmals mit PBS-Tween gewaschen, bei 55 °C in Entkopplungspuffer inkubiert und anschließend nochmals mit PBS-Tween gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit Milchpulver und primären sowie POD-konjugierten sekundären Antikörpern.

In dem unter 2.8.5 beschriebenen Verfahren konnten die mittels WGA (2.8.3) und Immunpräzipitation (2.8.4) isolierten Proteine sowie die ERK1/2 Aktivität (2.7) ermittelt werden.

2.9 Direkter Nachweis von Dimerisierung in lebenden Zellen mittels BRET

Das BRET-System setzt sich aus den Grundkomponenten der Renilla Luciferase (Rluc) und dem *green fluorescent protein* (GFP) zusammen. Die zu untersuchenden Rezeptoren, an welche die Rluc bzw. das GFP inkloniert wurden, standen bereits zur Verfügung. Die Anregung der Emission der Rluc erfolgt durch die Zugabe des Substrates DeepBlueC, einem Coelenterazine-Derivat. Dadurch emittiert das Rluc-Protein bei 400 nm blaues Licht. Im Fall einer Rezeptor-Rezeptor Interaktion (z.B. Dimerisierung) kommt es zur Übertragung von dieser Energie auf den mit Rluc fusionierten Interaktionspartner GFP und damit verbunden zur Anregung der Emission von GFP. Diese Energie wird als grüne Fluoreszenz bei 505 nm messbar. Das BRET Signal ergibt sich aus dem Verhältnis der Emissionen von GFP und Rluc (505 nm/ 400 nm). Als positive Referenz diente ein von der Firma Pacard Bioscience bereitgestellter Kontrollvektor, der die Proteine Rluc und GFP über einen kurzen Peptidlinker miteinander verbindet. Die Detektion und Quantifizierung des BRET-Signals bei einer positiven Protein-Protein-Interaktion erfolgt mittels *Fusion Microplate Analyser* (Packard Bioscience). Hier wurde die Homodimerisierung von sst2A-sst2A sowie die Heterodimerisierung von sst2AMOR1 in lebenden HEK293-Zellen nachgewiesen.

Für die oben beschriebenen BRET-Analysen wuchsen die HEK293-Zellen in einer Platte mit 12 Öffnungen unter Standardbedingungen und wurden mit den Plasmiden (sst2A-T7-GFP, sst2A-T7-Rluc, MOR1-GFP und MOR1-Rluc) nach Protokoll mit Lipofektamin transfiziert (2.2). Als Hintergrund-Kontrolle dienten untransfizierte HEK293-Zellen, als Negativkontrolle Zellen, die mit Rluc und Rezeptor oder GFP und Rezeptor transfiziert wurden. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion vorsichtig

mit PBS gewaschen, in PBS-EDTA (200 µl) in Eppendorfgläser resuspendiert und kurz abzentrifugiert. Das Pellet, das aus lebenden Zellen besteht, wurde in 1,5 ml BRET-Puffer (Dubecco's PBS, Life technologies, mit 2 µg/ml Aprotinin mit Glukose) erneut resuspendiert. Anschließend wuchsen die Zellen in der Suspension 30 Minuten bei 37 °C und unter 10% CO₂-Atmosphäre weiter. Danach wurden die Zellen in eine spezielle BRET-Platte mit 96 Öffnungen überführt. Die Lumineszenz-Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl des Substrates DeepBlueC (25 µM) gestartet. Unmittelbar danach erfolgte die Messung bei folgenden 410/515 nm Filterpaaren: 370-450 nm für Luciferase-Emission und 485-545 nm für GFP-Emission. Das BRET²Signal errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{BRET}^2\text{Signal} = (\text{Nettowert } 505 \text{ nm} - \text{Wert der untransfizierten Kontrolle}) / (\text{Nettowert } 400 \text{ nm} - \text{Wert der untransfizierten Kontrolle}).$$

2.10 Datenverarbeitung

Jeder Versuch wurde mindestens dreimal durchgeführt. Die immunzytochemischen Bilder wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms *Photoshop 5.5* (Adobe) zusammengestellt. Die Daten der BRET-Analyse sowie aus ELISA- und ERK1/2-Assays wurden mit dem Computerprogramm *GraphPad prism 3.0 Software* durch nichtlineare Regression ermittelt.

Die phosph-ERK1/2 Banden auf den ECL-empfindlichen Filmen aus Desensibilisierungsstudien wurden densitometrisch mit Hilfe des Computerprogrammes *NIH-Image 1.57* analysiert. Dafür wurden drei Doppelbestimmungen durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des gepaarten *Student's t--test*. Für $P < 0,05$ wurde das Ergebnis als signifikant gewertet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung von Somatostatin-Rezeptoren in HEK293-Zellen

Zunächst wurde die Expression der Somatostatin-Rezeptoren sst1, sst2A, sst3, sst4 und sst5 der Ratte in HEK293-Zellen überprüft. Um die Lokalisierung der Rezeptoren in einer Zelle zu ermitteln, wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt und anschließend konfokalmikroskopisch analysiert. Diese Studien zeigten ein selektives Markierungsmuster mit Rezeptor-spezifischen, affinitätsgereinigten Antikörpern.

Darüber hinaus wurden die Rezeptoren durch eine Anreicherung der N-glykosylierten Membranproteine mittels Weizenkeimlecitin-Sepharose-Kügelchen (WGA, siehe 2.8.3) isoliert. Die anschließenden *Western-Blot* Analysen ergaben subtyp-spezifische Bandenmuster der Monomere und einiger Homodimere.

Repräsentative Ergebnisse von mindestens drei *Western-Blot* Analysen sowie von immunzytochemischen Studien sind in Abb. 3 zusammengefasst.

Die mittlere molekulare Größe des sst1-Rezeptors liegt nach Detektion mit dem C-terminalen 5605-Antikörper bei 70 kDa (Kilodalton) und entspricht damit einem Monomer (Abb. 3A). Homodimere, die etwa in der Höhe der doppelten mittleren molekularen Größe der Monomere zu erwarten wären (ca.140 kDa), ließen sich hier nicht detektieren. Die im Mikroskop beobachtete immunzytochemische Färbung wurde mit demselben 5605-Antikörper durchgeführt und zeigte eine vorwiegend membranständige Lokalisierung der sst1-Rezeptoren.

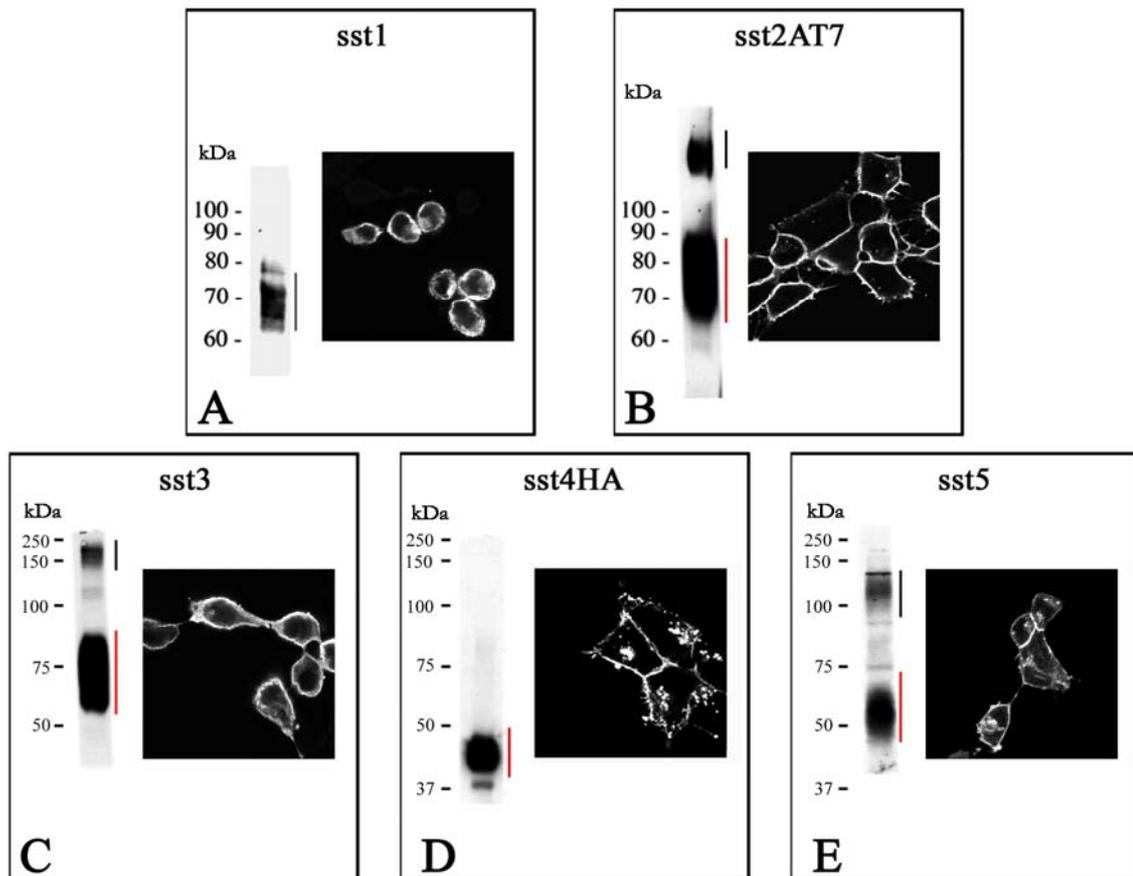


Abb. 3: *Western-Blot* nach Anreicherung mit WGA und nach 8%-iger SDS-PAGE. Der Größenmarker (kDa) dient zur Identifizierung der molekularen Größen. Mittels Immunzytochemie wurden Somatostatin-Rezeptoren in HEK293-Zellen lokalisiert. Monomere sind mit roten Balken gekennzeichnet, die Homodimere dagegen mit schwarzen Balken. **A:** sst1-exprimierende Zellen nach WGA von sst1 und die dazugehörige Lokalisierung der Rezeptoren in der Zelle nach einer Detektion mit sst1-spezifischen Antikörper (5605). **B:** sst2A-T7-exprimierende Zellen detektiert mit T7-tag-Antikörper. **C:** sst3-exprimierende Zellen nachgewiesen mit dem sst3 (7986) Antikörper **D:** sst4-HA-exprimierende Zellen detektiert mit dem N-terminalen HA-Antikörper. **E:** sst5-exprimierende Zellen, nach Detektion mit sst5-spezifischem Antikörper (6003).

Für die Charakterisierung des sst2A-Subtyps wurde entweder der gegen die N-terminale-tag-Sequenz des sst2-T7-Rezeptors gerichtete T7-Antikörper (Abb. 3B) oder der gegen die C-terminale Sequenz gerichtete 6291-Antikörper verwendet (nicht in der Abb.). Anders als beim sst1-Rezeptor sind nach WGA im Immunoblot beim sst2A-T7-Rezeptor sowohl Mono- (75 kDa) als auch Homodimere (ca. 160 kDa) sichtbar. Die immunzytochemische Markierung der Zellen zeigt eine eindeutig membranständige Lokalisierung der sst2A-T7-Rezeptoren.

Der sst3-Rezeptor (Abb. 3C) entspricht hinsichtlich der mittleren molekularen Größe etwa dem sst2A-T7-Rezeptor und ist als Monomer bei 75 kDa sowie als Homodimer bei 160 kDa mit dem Antikörper, der spezifisch gegen die C-terminale Sequenz des sst3 gerichtet ist, detektierbar. Nach einer immunzytochemischen Färbung mit demselben Antikörper ist der sst3-Somatostatin-Rezeptor ebenfalls an der Zellmembran lokalisiert. Die mittlere molekulare Größe des sst4-HA-Rezeptors ist im Vergleich zu anderen Somatostatin-Rezeptoren sehr klein (Abb. 3D). Sowohl mit einem HA-Antikörper, der gegen die N-terminale HA-Sequenz gerichtet ist (Abb. 3D), als auch mit einem gegen die C-terminale Sequenz gerichteten Antikörper (nicht in der Abb.) lässt sich dieser Rezeptor als Monomer bei ca. 40 kDa nachweisen. Homodimere, die bei 80 kDa zu erwarten wären, wurden nicht beobachtet.

Die Detektion des isolierten sst5-Rezeptors erfolgte im Immunoblot mittels eines gegen den C-Terminus gerichteten sst5-spezifischen Antikörpers. Dieser Rezeptor ist in Form eines Monomers bei 55 kDa und eines Homodimers bei 110 kDa isolierbar. Die immunzytochemische Färbung mit demselben Antikörper zeigt, dass dieser Rezeptor vorwiegend in der Plasmamembran, aber auch intrazellulär lokalisiert ist.

Bei den hier zusammengefassten Befunden sind bei sst1 und sst4 ausschließlich Monomere zu sehen. Daneben wurden konstitutive Homodimere sst2A-sst2A, sst3-sst3 und sst5-sst5 nachgewiesen.

3.2 Homodimerisierung des sst2A-Rezeptors

Hier wurde speziell die Homodimerisierung der sst2A-Rezeptoren genauer untersucht. Eine Zelllinie von sst2A exprimierenden HEK293-Zellen wurde erzeugt, deren Rezeptoren N-terminal die T7- bzw. HA-tag-Sequenzen (Verhältnis 1:1) trugen. Dadurch konnte die Existenz der konstitutiven Homodimere an isolierten Rezeptoren mittels Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden.

Koimmunpräzipitation (Ko-IP). Die Methode der Koimmunpräzipitation ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt. Eine positive Ko-IP ist einer negativen

Ko-IP gegenüber gestellt. In der Abbildung 4A oben sind zwei benachbarte Rezeptoren (grün und rot) in einer Plasmamembran gezeigt. Zur Vereinfachung wurden dabei die räumlichen Strukturen nicht berücksichtigt. Mit dem T7-Antikörper, der an den Sepharose-Kügelchen kovalent gebunden ist, kann nur der Rezeptor präzipitiert werden, der die T7-tag-Sequenz trägt (hier der blassrote sst2A-T7-Rezeptor). Wenn der benachbarte, andere Rezeptor (blassgrün) ein Heteromer mit dem sst2A-T7-Rezeptor bildet, können beide zusammen mit dem sst2A-T7-Rezeptor isoliert werden. Nach einer Detektion im Immunoblot mit dem T7-Antikörper (Abb. 4A unten rechts, dunkelrote Banden) sind die kopräzipitierten Heteromere zu sehen, die sich durch einen Vergleich mit einem Größenmarker identifizieren lassen. Beispielsweise liegen bei ca. 150 kDa Heterotetramere **sst2A-T7-X-sst2A-T7-X**, die nach der Zellyse im 1%-igem SDS-Probepuffer in die Homodimere **sst2A-T7-sst2A-T7** und **X-X** oder in die Monomere **sst2A-T7** und **X** dissoziieren können (in der Abbildung nur Monomere). Das kopräzipitierte Heterodimer **sst2A-T7-X** (dunkelrot) liegt bei ca. 90 kDa und kann, ähnlich wie das Tetramer, in die daraus resultierenden Monomere **sst2A-T7** oder **X** dissoziieren. Mit dem anti-T7 lassen sich aber nur die Banden der **sst2A-T7**-Monomere nachweisen. Dementsprechend sind nach einer Detektion mit dem X-spezifischen-Antikörper (dunkelgrüne Banden) dieselben Heteromere **sst2A-T7-X** bzw. die dissoziierten Homodimere **X-X** oder Monomere **X** zu sehen.

Wenn kein anderer Rezeptor koimmunpräzipitiert wurde, lassen sich nur die **sst2A-T7**-Rezeptoren mit dem T7-Antikörper nachweisen (Abb. 4B unten rechts, rote Detektion). Ob dieser Rezeptor Homodimere oder Homotetra- bzw. Oligomere mit sich selbst bildet, kann anhand des Größenmarkers überprüft werden. Dagegen ergibt die Detektion mit X-Antikörper (grün) keine Immunbanden im *Western-Blot* (Abb. 4B unten links).

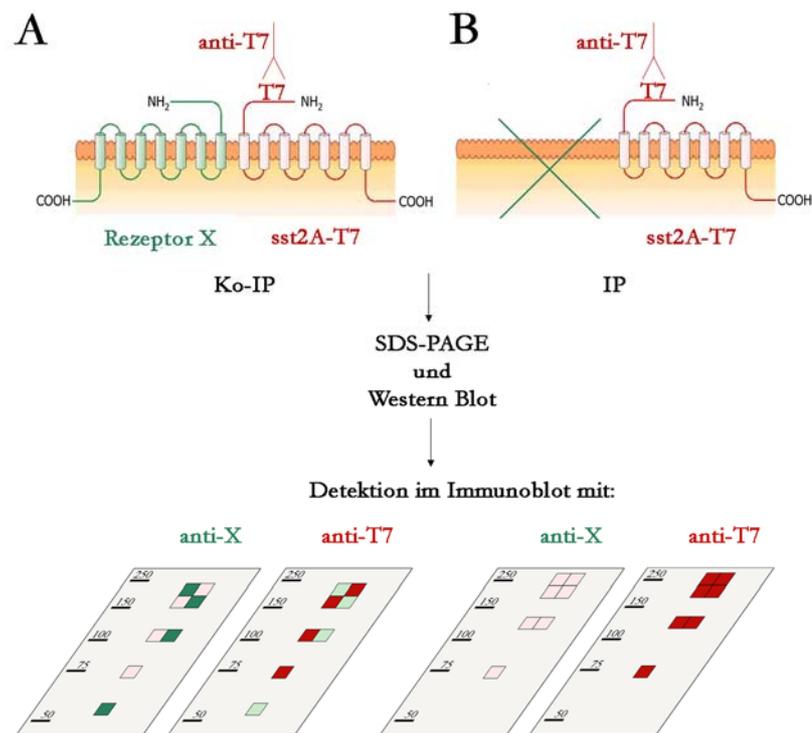


Abb. 4: Schematische Darstellung einer Koimmunpräzipitation von zwei Rezeptoren (hellrot und hellgrün). An Sepharose-Kügelchen sind monoklonale T7-Antikörper kovalent gebunden. Diese Antikörper sind spezifisch gegen einen Rezeptor gerichtet (hier: gegen sst2A-T7, rot). Nach mehrstündiger Inkubation von Sepharose-Antikörper-Komplexen mit dem Zelllysate lassen sich die Rezeptoren isolieren (dunkelrote sst2A-T7 Rezeptormoleküle), welche an die Antikörper spezifisch binden. **A:** Dabei können zusammen mit den Rezeptoren sst2A-T7 (rot) auch andere, mit sst2A-T7 interagierende Proteine X, z.B. Rezeptormoleküle (grün), kopräzipitiert werden. Die isolierten Proteine werden während der SDS-PAGE nach molekularen Größen zusammen mit dem Größenmarker aufgetrennt. Nach *Western-Blot* lassen sich die präzipitierten Rezeptoren mit ECL-System detektieren und anhand der molekularen Größe identifizieren. Detektion mit einem Antikörper, der gegen die interagierenden Rezeptoren X (dunkelgrün) gerichtet ist, zeigt (unten links) ausschließlich die koimmunpräzipitierten Proteine (dunkelgrün). Nur die dunkelgrünen Banden schwärzen in diesem Fall den ECL Film. Hätte keine Ko-IP stattgefunden, wäre hier keine Schwärzung zu sehen (sie wären im Schema hellgrün geblieben). Die eigentlich präzipitierten Rezeptoren (unten rechts) lassen sich mit dem T7-Antikörper, der gegen sst2A-T7 gerichtet ist, nachweisen (dunkelrot). **B:** Wenn keine Ko-IP stattgefunden hat, lassen sich nur die präzipitierten Homooligo- bis Monomer-Rezeptoren mit dem T7-Antikörper nachweisen (dunkelrot). Eine Detektion mit X-Antikörper ergibt keine Banden im *Western-Blot* (keine grünen Rezeptoren vorhanden, die hellroten Rezeptoren bleiben unsichtbar).

3.2.1 Koimmunpräzipitation des sst2A-Homodimers

Für die Ko-IP wurden sst2A-T7 und sst2A-HA koexprimierende HEK293-Zellen verwendet. Nach Detektion im Immunoblot mit einem T7-Antikörper (Abb. 5, Spur 1) ist eine Bande mit einer mittleren molekularen Größe bei 75 kDa zu sehen und spiegelt die sst2AT7-Monomere wider. Eine zweite Bande liegt bei 150 kDa und entspricht der

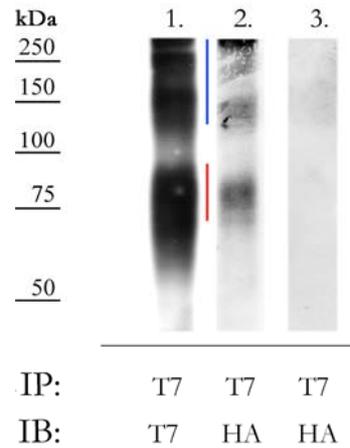


Abb. 5: Koimmunpräzipitation der in HEK293-Zellen koexprimierten sst2A-T7- und sst2A-HA-Rezeptoren im 10%-igen SDS-PAGE und Immunoblot mit T7- (*Spur 1*) bzw. HA-Antikörper (*Spur 2*). Der sst2A-HA-Rezeptor lässt sich aufgrund der Bildung von „Heterodimeren“ (eigentlich Homodimere) mit dem Rezeptor sst2A-T7 isolieren. Blaue Balken markieren Dimere, rote Balken dagegen Monomere. *Spur 3:* sst2A-T7-Rezeptoren wurden nach der Zelllyse im RIPA-Puffer mit den ebenso lysierten sst2A-HA-Zellen zusammengemischt, der Ko-IP mittels sst2A-T7 unterworfen und mit dem HA-Antikörper detektiert.

doppelten molekularen Größe eines Monomeres. Sie beinhaltet die Heterodimere sst2A-T7-sst2A-HA (eigentlich Homodimere, da es sich um zwei Rezeptoren der selben Art handelt, die mit unterschiedlichem Epitop-*tag* markiert sind).

Die Detektion derselben Probe mit dem HA-Antikörper, der gegen das HA-Epitop der sst2A-HA-Rezeptoren selektiv gerichtet ist, bestätigt die Existenz von konstitutiven Homodimeren sst2A-T7sst2A-HA in den HEK293-Zellen. Es sind sst2A-HA-Monomere (75 kDa) und Homodimere (150 kDa) die mit dem sst2A-T7-Rezeptor koimmunpräzipitiert worden (Abb. 5, Spur 2).

Um Dimerisierung während der Aufarbeitung ausschließen zu können, wurden Zellmembranextrakte aus sst2A-T7-exprimierenden HEK293-Zellen mit den aus sst2A-HA-exprimierenden Zellen gemischt. Aus dem Gemisch wurden mit dem Sepharose-T7-Komplex Rezeptoren immunpräzipitiert. Nach Detektion mit dem HA-Antikörper, der an die sst2A-HA-Rezeptoren spezifisch bindet, waren erwartungsgemäß keine Monomere bzw. Dimere zu sehen (Abb. 5, Spur 3).

Darüber hinaus konnte nach einer Behandlung der sst2A-T7-sst2A-HA-Zellen (Abb. 6, dritte Spur) mit dem *Crosslinker* BS³ eine deutliche Zunahme der detektierten Homodimere auf Kosten der Monomere beobachtet werden. Die Substanz tritt in intermolekulare Wechselwirkungen mit den primären Aminen der Rezeptorproteine, die nicht weiter als 1,2 nm voneinander entfernt sind. Dadurch können solche Interaktionen wie die Dimerisierung zusätzlich stabilisiert werden.

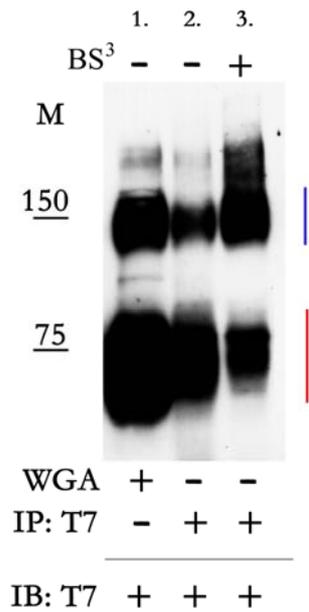


Abb. 6: Zunahme der Bildung der Homodimere unter Einfluss vom BS³-Crosslinker. Die sst2A-T7-exprimierenden HEK293-Zellen wurden einer 8%-igen SDS-PAGE unterworfen und im Immunoblot mit einem T7-Antikörper detektiert. *Spur 1:* WGA von sst2-T7-exprimierenden Zellen. *Spur 2:* Immunpräzipitation des unbehandelten sst2A-T7-Rezeptors. *Spur 3:* Immunpräzipitation von sst2A-T7 nach einer Behandlung mit BS³ (2 mM).

3.2.2 Nachweis von sst2A-Homodimeren in lebenden Zellen

Die Koimmunpräzipitation ist nur an isolierten Proteinen möglich. Es stellt sich daher die Frage, ob die Existenz der sst2A-sst2A-Homodimere in lebenden Zellen bestätigt werden kann.

Für den Nachweis der Homodimere in HEK293-Zellen wurden BRET-Analysen (Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer) durchgeführt. Dafür wurden die HEK293-Zellen mit den Plasmiden sst2A-GFP und sst2A-Rluc transient transfiziert. Als Negativkontrolle wurde entweder Rluc- oder GFP-Plasmid in Gegenwart von sst2A angewendet sowie für die Positivkontrolle Rluc-GFP ohne Rezeptor. Durch Zugabe des Substrates DeepBlueC, das mit Rluc fusioniert, wird die Emission von RLuc angeregt (Abb. 7B). Bei einer Proteininteraktion (Dimerisierung) wird die Energie auf den mit GFP fusionierten Dimerisierungspartner übertragen, sodass die Emission von GFP angeregt wird (Abb. 7C). Aus dem Verhältnis der beiden Emissionen (Luciferase und GFP) ergibt sich das BRET-Signal.

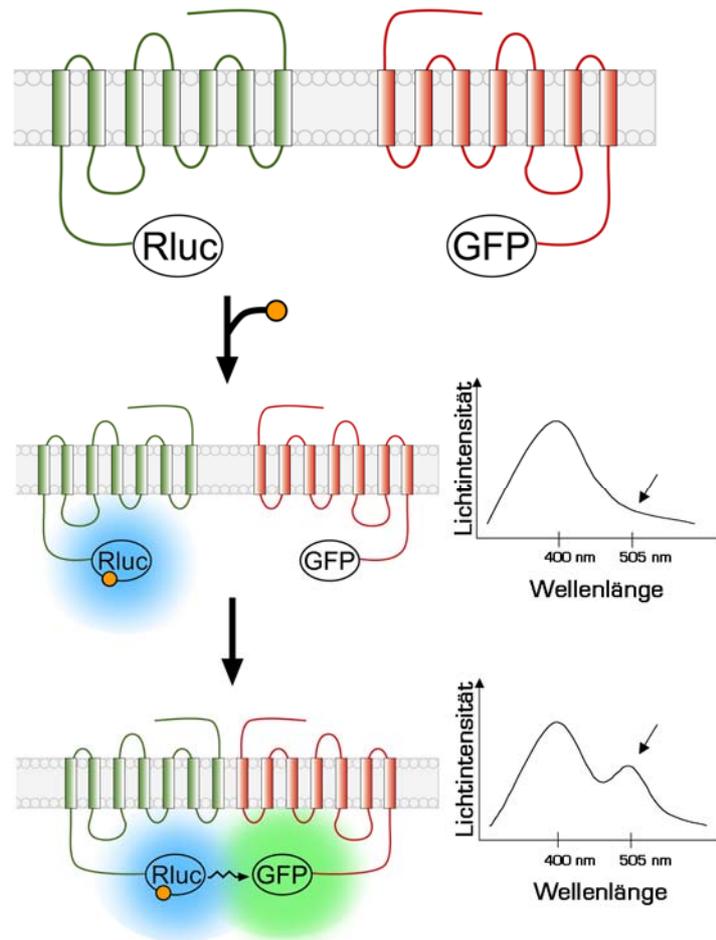


Abb. 7: BRET-Schema. **A.** Rezeptoren liegen in der Plasmamembran. Ein Rezeptor (grün) ist mit dem Rluc versehen, der andere (rot) mit GFP. **B.** Nach Zugabe des DeepBlueC luminesziert Rluc bei 470 nm (Maximum der Kurve). **C.** Im Fall einer Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren wird diese Lumineszenz auf GFP übertragen (Fusionsprotein). Dies wird durch das Auftreten einer dimerspezifischen Fluoreszenz bei 530 nm messbar (zweites Maximum der Kurve). Die Übertragung ist streng von der Entfernung zwischen den Rezeptoren abhängig (< 1 nm).

Nach Koexpression von sst2A-Rluc mit sst2A-GFP und Zugabe des Substrates DeepBlueC zeigten die errechneten BRET²-Signale, dass die Homodimerisierung des sst2A-Rezeptors auch in lebenden HEK293-Zellen konstitutiv stattfindet. Dabei zeigte sich ein deutlicher Energie-Transfer zwischen den beiden Rezeptoren (Abb. 8, roter Balken), der nur bei einer Rezeptor-Rezeptor-Interaktion z.B. bei der Dimerisierung möglich ist.

Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Rluc-Vektor und sst2A-Rezeptor ohne GFP transfiziert waren und nur marginalen Energie-Transfer zeigten (Abb. 8, oranger Balken). Für die Positivkontrolle wurde in die Zellen ein Rluc-GFP-Plasmid transfiziert.

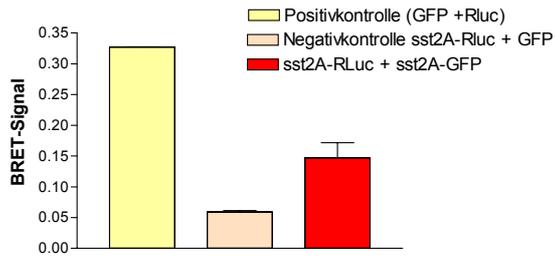


Abb. 8: Nachweis von Homodimeren sst2A in lebenden HEK293-Zellen. **Gelber Balken:** BRET²-Positivkontrolle (Rluc-GFP). **Oranger Balken:** Negativkontrolle (sst2A-Rezeptor und Rluc-Sequenz). **Roter Balken:** konstitutive Dimerisierung des sst2A-Rluc mit sst2A-GFP.

3.3 Heterodimerisierung von sst2A mit anderen GPCR der Klasse I

3.3.1 Somatostatin-Rezeptoren sst1, sst3-Myc, sst4-HA und sst5 können mit sst2A-T7 koimmunpräzipitiert werden

Die konstitutive Bildung von Homodimeren beim sst2A-Rezeptor gibt den Anlass zu vermuten, dass dieser Subtyp mit anderen Somatostatin-Rezeptoren, die zur selben Familie gehören, heterodimerisieren könnte. Dafür wurden sst2-T7 exprimierende HEK293-Zellen zusätzlich mit sst1, sst3, sst4 und sst5-Rezeptor-DNA transient oder stabil transfiziert und einer Koimmunpräzipitation unterworfen (Abb. 9).

Detektion der mittels sst2A-T7 koimmunpräzipitierten Somatostatin-Rezeptoren sst1, sst3, sst4 und sst5. Anhand des Immunoblots lassen sich mit den dazugehörigen Antikörpern breite Banden mit einer mittleren molekularen Größe für alle Heterodimere ermitteln. Diese molekularen Größen, die diese Heterodimere charakterisieren, resultieren aus der Summe des sst2A-T7-Monomers und des sst1-, sst3-, sst4- bzw. sst5-Monomers, die zuvor in WGA-Studien ermittelt wurden (Abb. 9 Spuren 2 bis 5: sst1-sst2A-T7 bei 150 kDa, sst3-Myc-sst2A-T7 bei 155 kDa, sst4-HA-sst2A-T7 bei 115 kDa sowie sst5-sst2A-T7 bei 135 kDa). Außerdem wurden zusätzliche Bandenmuster mit kleineren molekularen Größen detektiert (in Abb. 9 tiefer als die Banden der Heteromere). Diese spiegeln die Monomere sst1, sst3, sst4 und sst5 wider. Der verwendete präzipitierende Antikörper war spezifisch gegen das N-terminale T7-Epitop

gerichtet. Dieses wurde jedoch ausschließlich beim sst2A-T7-Rezeptor inkloniert. Daher muss es sich bei den tieferen Banden zwangsläufig um Monomere (sst1, sst3, sst4, sst5) handeln, die von ursprünglichen Heterodimeren dissoziierten. Diese Dissoziation kann durch Substanzen, die denaturierende (1% SDS) oder reduzierende Bedingungen (10 mM DTT) im Probenpuffer schaffen, hervorgerufen worden sein.

Die mittlere molekulare Größe der sst1-Monomeren-Bande liegt bei 70 kDa und wurde mit einem sst1-Antikörper nachgewiesen (Abb. 9, Spur 2). Die Bande der Heterodimere sst1-sst2A-T7 [(sst1) 70 kDa + (sst2AT7) 75 kDa = 145 kDa] breitet sich nach oben aus, was auf die Anwesenheit noch höherer molekularer Formationen als Dimere, z.B. Tetramere schließen lässt.

Der sst3-Rezeptor (Abb. 9, Spur 3) bildet eine breite Bande mit dem sst3-spezifischen Antikörper (mittlere molekulare Größe bei 75 kDa), die dem Monomer sst3 entspricht. Die dominante Bande mit der mittleren molekularen Größe bei 155 kDa [(sst3Myc) 75 kDa + (sst2AT7) 75 kDa = 155 kDa] entspricht den Heterodimeren sst3-Myc-sst2A-T7. Die Ausbreitung dieser Bande nach oben deutet ebenfalls auf oligomere Formationen hin. Die spezifische Bande bei 60 kDa stellt möglicherweise ein noch unvollständig glykosyliertes Monomer dar, dessen Molekulargewicht kleiner als das der Monomere ist.

Der Somatostatin-Rezeptor sst4-HA (Abb. 9, Spur 4) zeigt nach Detektion mit dem sst4-spezifischen Antikörper eine Bande bei 40 kDa, die den Monomeren sst4-HA entspricht. Die stabilen Heterodimere bilden eine Bande mit einer mittleren molekularen Größe bei 115 kDa [(sst4HA) 40 kDa + (sst2AT7) 75 kDa = 115 kDa].

Die koimmunpräzipitierten sst5-Rezeptoren (Abb. 9, Spur 5) ergaben nach Detektion mit dem sst5-spezifischen Antikörper ebenfalls zwei breite Banden mit unterschiedlichen mittleren molekularen Größen. Die Bande des Monomers liegt bei 55 kDa, die des stabil gebliebenen Heterodimers sst2A-T7-sst5 bei 130 kDa (sst5: 55 bis 75 kDa + sst2AT7: 75 kDa = 130 bis 150 kDa).

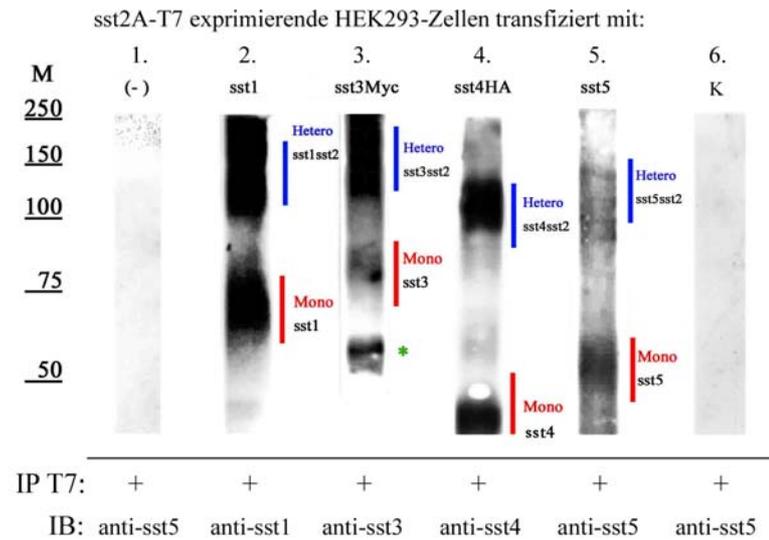


Abb. 9: Immunoblot nach Koimmunpräzipitation (Ko-IP) der Somatostatin-Rezeptor-Subtypen sst1, sst3, sst4 und sst5 mit dem sst2A-Rezeptor-Subtyp. Anhand des Protein-Größenmarkers (M) lassen sich im 10%-igen SDS-PAGE die Molekulargewichte (kDa) der Rezeptoren ermitteln. Blaue Balken bedeuten Heterodimere, rote Balken dagegen Monomere. **Spur 1:** Negativkontrolle, sst2A-T7-exprimierende HEK29-Zellen nach Ko-IP und *Western-Blot* mit dem 6003-Antikörper, der gegen sst5 gerichtet ist, detektiert. **Spur 2:** sst1-sst2A-T7-exprimierende HEK293-Zellen detektiert mit sst1-Antikörper 5605. **Spur 3:** sst2A-T7-sst3-Myc-exprimierende Zellen mit dem sst3-spezifischen Antikörper 7986 detektiert, mit (*) sind unvollständig glykosylierte sst3-Myc-Rezeptoren gekennzeichnet. **Spur 4:** sst2A-T7-sst4-HA-exprimierende Zellen mit dem 6002-Antikörper detektiert, der gegen den Rezeptor-Subtyp sst4 gerichtet ist. **Spur 5:** sst2A-T7sst5-exprimierende Zellen mit dem sst5-spezifischen Antikörper 6003 detektiert. **Spur 6:** zusätzliche Kontrolle der Antikörper, Lyse-Puffer mit Sepharose-T7-Komplex ohne Zelllysat, detektiert mit 6003.

Als Negativkontrolle (Abb. 9, Spur 1) dienten sst2A-T7-Rezeptoren exprimierende HEK293-Zellen, die nicht mit anderen Rezeptor-Arten weiter transfiziert waren. Wie erwartet, ergab die Detektion dieser Kontrollen mit Antikörper, der gegen die nicht vorhandenen anderen Rezeptor-Arten gerichtet war (gezeigt: anti-sst5), keine Rezeptor-Bande. Zusätzlich wurde das Hintergrundsignal überprüft, indem der Lyse-Puffer mit dem Sepharose-Kügelchen-T7-Komplex immunpräzipitiert und im *Western Blot* analysiert wurde. Der anschließende immunologische Nachweis mit einem gegen sst5 gerichteten Antikörper 6003 (Abb. 9, Spur 6) oder einem gegen sst4 gerichteten Antikörper 6002 (ohne Abb.) ergab ebenfalls keine unspezifischen Banden. Dies lässt auf eine hohe Spezifität des Verfahrens sowie der Antikörper schließen.

Detektion der präzipitierten sst2A-T7-Rezeptoren. Hier wurde die Expression des direkt präzipitierten sst2A-T7 kontrolliert. Dieselbe Nitrozellulosemembran, die in Abb. 9 gezeigt ist, wurde mittels Entkopplungs-Puffer von den gebundenen Antikörpern befreit und mit einem Antikörper inkubiert, der gegen das T7-Epitop des sst2AT7-Rezeptors gerichtet ist (Abb. 10).

Bei allen Proben waren sst2A-T7-Monomere sichtbar, die zum Teil aus der Dissoziation der Heterodimere resultieren müssen, aber auch direkt als Monomere präzipitiert wurden. Bei den Zellen, die mit sst1-, sst3- und sst5-Rezeptoren transfiziert waren, sind Di- oder sogar Oligomere zu sehen (zwischen 150 und 250 kDa). Aufgrund der überlappenden Größe der Homo- bzw. Heteromere kann man hier nur spekulieren, ob es sich hierbei um Heterotetramere handelt.

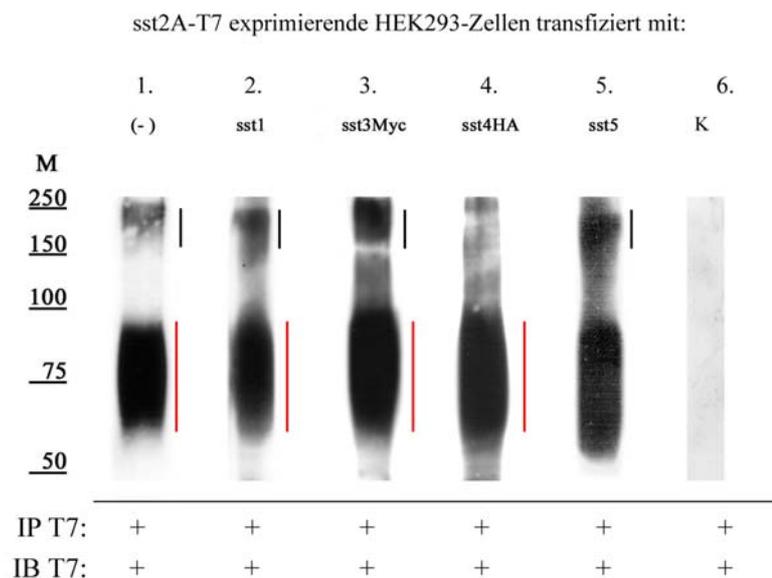


Abb. 10: Detektion des präzipitierten sst2AT7-Rezeptors, mit dessen Hilfe die Somatostatin-Rezeptor-Subtypen sst1, sst3, sst4 und sst5 koimmunpräzipitiert (Ko-IP) wurden (siehe Abb. 8) nach 10%-igem SDS-PAGE und *Western-Blot* mit dem sst2AT7-spezifischen Antikörper T7. Rote Balken bedeuten Monomere, schwarze Balken dagegen Heterooligomere, mit (*) sind dagegen unvollständig glykosylierte Rezeptoren dargestellt, die aus dem ER oder Golgi-Apparat stammen. **Spur 1:** Kontrolle, die die sst2AT7-exprimierenden Zellen beinhaltet. **Spur 2:** sst1sst2AT7-exprimierende HEK293-Zellen. **Spur 3:** sst3Mycsst2AT7-exprimierende Zellen. **Spur 4:** sst4Hasst2AT7-exprimierende Zellen. **Spur 5:** sst5sst2AT7-exprimierende HEK293-Zellen. **Spur 6:** Kontrolle (Zelllyse Puffer RIPA mit Sepharose-T7-Komplex)

Bei Zellen, die ausschließlich sst2A-T7 exprimierten (Abb. 10, Spur 1), ist eine breite Bande des monomeren sst2A-T7-Rezeptors zu sehen. Dagegen sieht man bei der Kontrolle, für die der Sepharose-T7 Komplex ohne Zellysat verwendet wurde, keine Banden (Abb. 10, Spur 6). Die Entstehung von unspezifischen Immunbanden, die aus der Interaktion zwischen den beiden Antikörpern (Sepharose-T7-Komplex und Detektions-Antikörper) hervorgeht, ist daher ausgeschlossen.

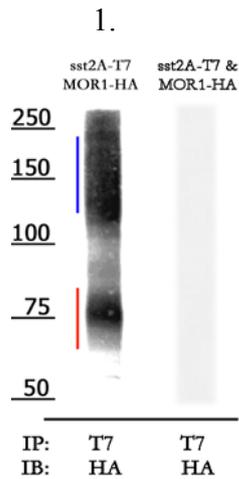
Die in diesem Abschnitt vorgestellten Experimente zeigen, dass die sst1, sst3, sst4 und sst5-Somatostatin-Rezeptor-Subtypen die Eigenschaft besitzen, mit dem sst2A-Rezeptor-Subtyp unter den hier gewählten Bedingungen Heterodimere zu bilden.

3.3.2 Somatostatin-Rezeptor sst2A heterodimerisiert mit MOR1-Rezeptor, der zur Opiat-Rezeptor-Familie der Klasse I von GPCR gehört

Aufgrund der Heterodimerisierung des sst2A mit den anderen Somatostatin-Rezeptoren wurde im nächsten Schritt dieser Arbeit die Heterodimerisierung von sst2A mit MOR1 (μ -Opioid-Rezeptor) untersucht. Dieser Rezeptor gehört zur Klasse I der GPCR, ist jedoch phylogenetisch weiter als die Somatostatin-Rezeptoren sst1, sst3, sst4 und sst5 von sst2A entfernt.

Koimmunpräzipitation (Ko-IP). Hierzu wurden HEK293-Zellen mit beiden, unterschiedlich markierten Rezeptoren (sst2A-T7 und MOR1-HA) koexprimiert. Die anschließende Ko-IP erfolgte wie oben beschrieben. Im Immunoblot wurden die Präzipitate mittels HA-Antikörper nachgewiesen (Abb. 11). Dabei sind zwei breite Banden zu sehen, eine monomere Bande der mittleren molekularen Größe von 75 kDa und eine heterodimere Bande bei 150 kDa (Abb. 11, Spur 1).

Aus Zellen, die erst nach der Lyse vermischt wurden, konnten dagegen keine MOR1-Rezeptoren detektiert werden (Abb. 11, Spur 2). Es beweist, dass die Dimerisierung nicht während des Experiments artifiziell, sondern zuvor in den intakten Zellen stattfand.



2.
Abb. 11: Koimmunpräzipitation des MOR1 mit dem sst2A-T7 aus HEK293-Zellen. Gezeigt ist Detektion im Immunoblot mit dem HA-Antikörper nach 12%-igem SDS-PAGE. **1.** koexprimierte sst2A-MOR1-Zellen. **2.** Zellen, die jeweils sst2A und MOR1A allein exprimiert haben, wurden nach der Lyse vermischt und der Koimmunpräzipitation unterworfen.

BRET-Analysen. Die im Immunoblot nach Ko-IP gezeigte Heterodimerisierung sst2A-MOR1 konnte auch in lebenden HEK293-Zellen mittels BRET nachgewiesen werden. Dazu wurden sst2A-Rluc- und MOR1-GFP-Plasmide verwendet.

Infolge der Heterodimerisierung von beiden Rezeptoren war eine deutliche Emission der von Rluc übertragenen Energie auf GFP nach Zugabe des Substrates DeepBlueC messbar (Abb. 12, roter Balken). Das errechnete Verhältnis (Rluc zu GFP) betrug etwa ein Drittel der Positivkontrolle (Abb. 12, gelber Balken). Die Negativkontrolle (Abb. 12, oranger Balken), die den MOR1 mit nur einem Fusionspartner, dem Rluc, enthielt, wies nur geringfügige Emission auf.

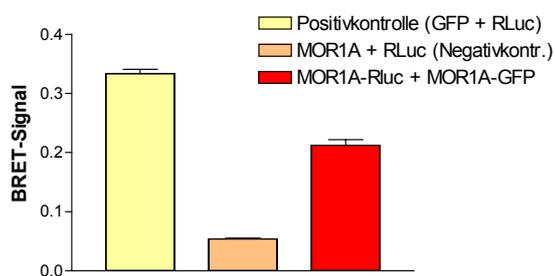


Abb. 12: BRET-Analysen: Heterodimerisierung des sst2A mit MOR1 in lebenden HEK293-Zellen. **Gelber Balken:** BRET²-Positivkontrolle (Rluc-GFP). **Oranger Balken:** Negativkontrolle (MOR1-Rezeptor und Rluc-Sequenz). **Roter Balken:** die konstitutive Dimerisierung des sst2A-Rluc und MOR1A-GFP.

3.4 Heterodimerisierung des sst2A-T7 Rezeptors mit Klasse II GPCR

Die bisher untersuchten Rezeptoren, die mit dem Somatostatin-Rezeptor sst2A heterodimerisierten, gehören derselben GPCR-Klasse an (Klasse I). Es ist daher zu vermuten, dass die Dimerisierung aufgrund der Sequenzhomologien innerhalb dieser Klasse möglich war. Um diese Abhängigkeit zu untersuchen, wurden die sst2A-T7 exprimierenden HEK293-Zellen zusätzlich mit Rezeptoren für das Vasoaktive Intestinal-Peptid (VPAC1- oder VPAC2-Rezeptor) sowie für Neurotensin NT1 und NT2, (Rezeptoren für einen Neuropeptidtransmitter) koexprimiert.

3.4.1 Rezeptoren für das Vasoaktive Intestinal-Peptid VPAC1 und VPAC2

Die Analyse der VPAC1-Rezeptoren exprimierenden HEK293-Zellen im *Western-Blot* ergab nach Detektion mit anti-VPAC1-Antikörper ein Monomer, das etwa bei 70 kDa liegt und ein Homodimer bei etwa 140 kDa (Abb. 13, Spur 1). Obwohl beide Rezeptoren unterschiedlichen GPCR-Klassen angehören, konnte VPAC1 mit dem sst2A-T7-Rezeptor (Abb. 13, Spur 2) koimmunpräzipitiert werden. Aufgrund der breiten immunreaktiven Bande kann man vermuten, dass es sich hier um oligomere Formationen handelt

VPAC2 ließ sich sowohl nach Anreicherung der N-glykosylierten Membranproteine mit WGA als auch nach Ko-IP bei 80 kDa mit dem VPAC2-spezifischen Antikörper ausschließlich als Monomer nachweisen (Abb. 13, Spalte 3 und 4). Während der Ko-IP muss jedoch das VPAC2-Monomer ursprünglich als Heterodimer isoliert worden und ähnlich wie VPAC2 beim SDS-PAGE in zwei verschiedene Monomere dissoziiert sein (VPAC2 der mittleren molekularen Größe bei 80 kDa in der Abb. 13 und sst2-T7 bei 75 kDa nicht abgebildet). Der Nachweis von sst2A-T7 nach Entfernung der VPAC-Antikörper (mit einem Entkopplungspuffer) und Detektion mittels T7-Antikörper zeigte korrelierend dazu außer den Heterodimeren zusätzlich Monomer-Banden bei 75 kDa (nicht in der Abb.).

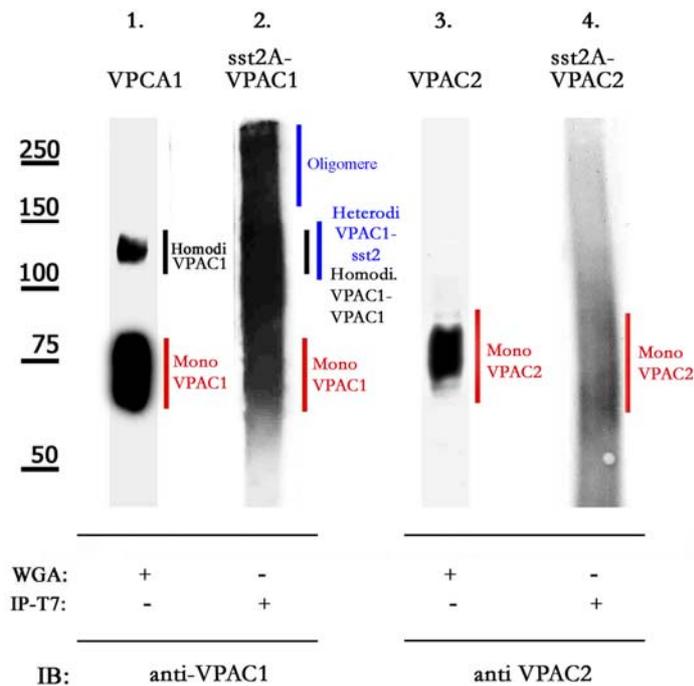


Abb. 13: WGA-Analysen der VPAC1- und VPAC2-Rezeptoren sowie die Koimmunpräzipitation (Ko-IP) von VPAC1- und VPAC2-Rezeptoren mit dem sst2A-T7-Rezeptor in 10%-igem SDS-PAGE und *Western-Blot*. Rote Balken markieren Monomere; blaue Heterodi- und Oligomere. **Spur 1:** Die WGA-Analysen von VPAC1-exprimierenden HEK293-Zellen nach Detektion mit dem VPAC1-spezifischen Antikörper 9020. **Spur 2:** sst2A-T7-VPAC1-exprimierende HEK293-Zellen nach Ko-IP und Immunoblot mit 9020-Antikörper detektiert. **Spur 3:** WGA aus VPAC2-exprimierenden Zellen nach Detektion mit 9023-Antikörper, der spezifisch an VPAC2-Rezeptoren bindet. **Spur 4:** VPAC2-Rezeptoren nach einer Ko-IP aus VPAC2-sst2A-T7-exprimierenden HEK293-Zellen und Detektion mit dem Antikörper 9023.

3.4.2 Neurotensin-Rezeptoren (NT1 und NT2)

Die Anreicherung des Zellmembranextraktes von NT2-exprimierenden HEK293-Zellen an Weizenkeimlecitin (WGA) und anschließende *Western-Blot*-Analyse ergab eine immunreaktive Bande der mittleren molekularen Größe bei 50 kDa, die den NT1-Monomeren entspricht, und eine zweite bei 100 kDa, die von den Homodimeren (NT1-NT1) stammt (Abb. 14, Spur 1). Koimmunpräzipitationsstudien zeigten bei 50 kDa dissoziierte Monomere und bei 100 kDa dissoziierte Homodimere (Abb. 14, Spur 2). Darüber hinaus deutet sich im 130-kDa-Bereich eine Heterodimer-Bande an (sst2A-T7-NT1).

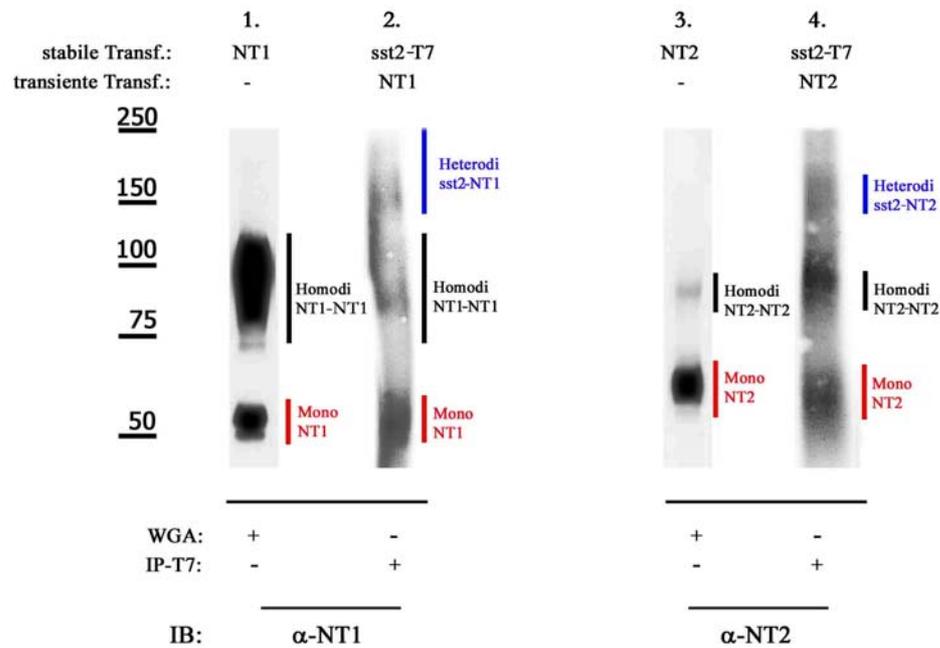


Abb. 14: Koimmunpräzipitation von NT1- und NT2-Rezeptoren mit dem sst2A-T7-Rezeptor nach 10%-igem SDS-PAGE und *Western-Blot*. Rote Balken markieren Monomere, schwarze Homodimere, blaue Heterodimere. **Spur 1:** WGA von NT1-exprimierenden HEK293-Zellen detektiert mit Antikörper 9036, der gegen die C-terminale Sequenz des NT1-Rezeptors gerichtet ist. **Spur 2:** Ko-IP von NT1 aus NT1-sst2A-T7- exprimierenden HEK293-Zellen ebenfalls mit dem Antikörper 9036 nachgewiesen. **Spur 3:** Die Molekulargröße von NT2 wurde nach WGA mit dem 9039 Antikörper ermittelt, der gegen den C-Terminus des NT2-Rezeptors spezifisch gerichtet ist. **Spur 4:** Ko-IP von NT2 mit dem sst2A-T7-Rezeptor aus NT2-sst2A-T7-exprimierenden HEK293-Zellen und Immunoblot mit 9039 Antikörper.

Die WGA-Analysen von NT2-exprimierenden Zellen ergaben im Immunoblot mit dem NT2-spezifischen Antikörper eine Bande des NT2-Rezeptors der mittleren molekularen Größe bei 60 kDa (Abb. 14, Spur 3). Nach Koimmunpräzipitation ist das Signal der dissoziierten Monomere NT2 und Homodimere NT2-NT2 sowie eines Heterodimers bei ca. 150 kDa zu sehen (Abb. 14, Spur 4), die aus dissoziierten Heterooligomeren resultieren.

Die Experimente zeigen, dass auch phylogenetisch weiter entfernte GPCR-Arten, wie VPAC1- und VPAC2- sowie NT1- und NT2-Rezeptoren, sich mit dem sst2A-Somatostatin-Rezeptor-Subtyp koimmunpräzipitieren lassen.

3.5 Heterodimerisierung des sst2-T7 mit Klasse III GPCR

In diesem Abschnitt sollte geklärt werden, ob der Somatostatin-Rezeptor sst2A in der Lage ist, auch mit phylogenetisch noch weiter entfernten Rezeptor-Klassen als den bisher untersuchten (A und B), z.B. Klasse III, zu heterodimerisieren. Als Vertreter der Klasse III von GPCR wurden die metabotropen Glutamat-Rezeptor-Subtypen mGluR1 und mGluR5 gewählt.

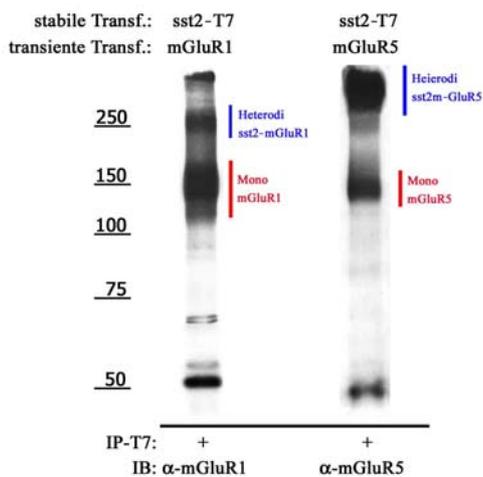


Abb. 15: Koimmunpräzipitation (Ko-IP) von mGluR1 bzw. mGluR5 mittels sst2A-T7 im 10%igen SDS-PAGE und *Western-Blot*. Blaue Balken markieren Heterodi- bzw. - Oligomere, rote Balken zeigen die jeweiligen Monomere. **Spur 1:** Ko-IP von mGluR1 aus HEK293-Zellen die mGluR1-sst2A-T7-exprimierten im Immunoblot mit dem mGluR1-spezifischen Antikörper mGluR1 **Spur 2:** Ko-IP von mGluR5 aus HEK293-Zellen, die mGluR5-sst2A-T7-exprimierten, nachgewiesen mit dem mGluR5-spezifischen Antikörper.

Die Koimmunpräzipitationsstudie zeigte, dass sich bei einer Expression der Glutamat-Rezeptoren mit dem Somatostatin-Rezeptor-Subtyp sst2A-T7 auch diese als Heterodimere isolieren lassen (Abb. 15). Die ursprünglichen Heterodimere bzw. Oligomere dissoziieren wie bei den anderen GPCR-Arten in die einzelnen Monomer-Moleküle.

Im Immunoblot mit mGluR1-spezifischem Antikörper liegen bei der Zelllinie sst2A-T7-mGluR1 die zerfallenen mGluR1-Monomere der mittleren molekularen Größe bei 150 kDa und die intakten Heterodimere mGluR1-sst2A-T7 bei 250 kDa (Abb. 15, Spur 1). Offensichtlich ist bei über 250 kDa zusätzlich eine hochmolekulare Bande von Oligomeren zu sehen.

Das Monomer mGluR5 aus der Zelllinie sst2A-T7-mGluR5 ist nach Detektion mit dem mGluR5-spezifischen-Antikörper bei der mittleren Größe von 150 kDa präsent (Abb. 15, Spur 2). Die dominante immunreaktive Bande, die sich über 250 kDa befindet, ist den Oligomeren zuzuordnen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen eine konstitutive Heterodimerisierung für die untersuchten Rezeptor-Kombinationen sst2A-X (X = sst1, sst2, sst3, sst4, sst5, VPAC1, VPAC2, NT1, NT2, mGluR1 und mGluR5), die sich mittels Ko-IP isolieren ließen. Sie deuten darauf hin, dass die Dimerisierung ein ubiquitärer Vorgang bei den GPCR sein könnte. Die ursprünglichen Heterodimere sind im Probepuffer zum Teil in die jeweiligen Monomere dissoziiert. Bei VPAC2- und sst2A-T7-koexprimierenden HEK293-Zellen waren ausschließlich dissoziierte Monomere zu sehen.

3.6 Funktionelle Untersuchungen des sst2A-T7-sst4-HA Heterodimers

Um zu überprüfen, ob bei den hier gefundenen Kombinationen die Heterodimerisierung zur physiologischen Veränderung der Rezeptoreigenschaften führt, wurden funktionelle Untersuchungen zunächst am Beispiel von sst2A-T7-sst4-HA durchgeführt.

3.6.1 Internalisierung der sst2A-T7- und sst4-T7- Rezeptoren in HEK293-Zellen.

Um den Vergleich zwischen einzeln (sst2A-T7, sst4-T7) und doppelt transfizierten HEK293-Zellen (sst2A-T7-sst4-HA) zu ermöglichen, wurde zunächst die subzelluläre Lokalisierung und Internalisierung der sst2A-T7- und sst4-T7-Rezeptoren bestimmt. Die Internalisierung kann durch eine andauernde Aktivierung der Rezeptoren induziert werden, wodurch die Rezeptoren von der Zelloberfläche in den Intrazellularraum endozytiert werden. Nach einer immunzytochemischen Markierung lassen sich solche Vorgänge mittels Konfokalmikroskopie beobachten.

Immunzytochemische Bestimmung der Internalisierung. Die subzelluläre Verteilung der beiden Rezeptoren war unterschiedlich (Abb. 16). In der Abwesenheit von Agonisten waren nur die sst2A-Rezeptoren an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 16A), wohingegen der sst4-Rezeptor sich auch intrazellulär befand (Abb. 16F). Vermutlich handelt sich beim sst4 um eine konstitutive Internalisierung.

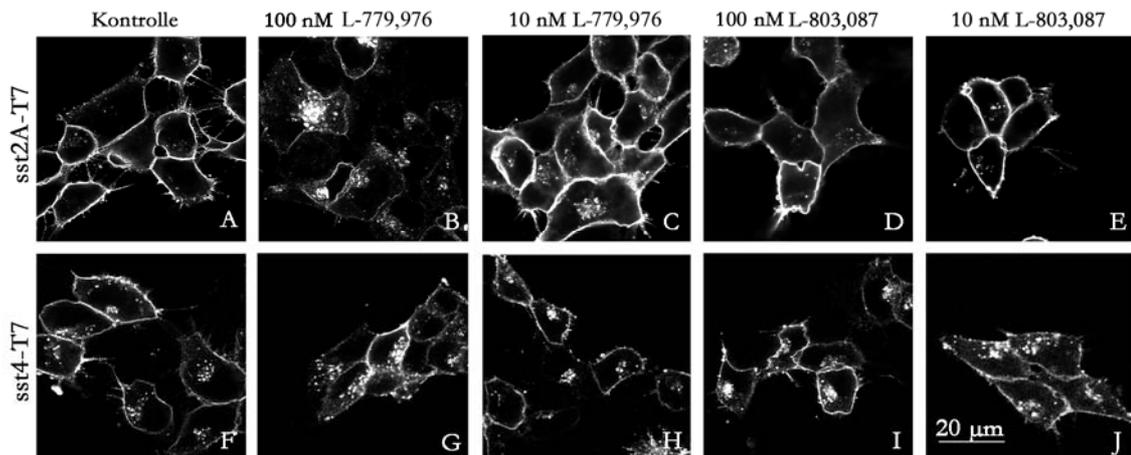


Abb. 16: Internalisierung des sst2A-T7-bzw. sst4-T7-Subtyps in HEK293-Zellen. Die Stimulation mit Liganden erfolgte 30 Minuten bei 37 °C. Immunzytochemische Markierung an fixierten Zellen. **A-E:** Immunzytochemische Markierung des sst2AT7-Rezeptors mittels sst2-selektiven, C-terminalen Antikörpers 6291 in sst2AT7-exprimierenden HEK293-Zellen **F-J:** sst4-T7-exprimierende HEK293-Zellen, mit Hilfe des sst4-spezifischen Antikörpers 6002 wurde der sst4-T7-Subtyp nachgewiesen **A** und **F:** unbehandelte Kontrollen. **B, G:** (0,1 µM) und **C, H:** (10 nM) Stimulation mit dem sst2-selektiven Liganden L-779,976. **D, I:** (0,1 µM) und **E, J:** (10 nM) Behandlung mit sst4-selektivem Agonisten L-803,087.

Der sst2A-T7-Rezeptor kumuliert ausschließlich nach Stimulation mit dem sst2-selektiven Agonisten L-779,976 (0,1 µM) infolge einer Agonisten-induzierten Endozytose (Internalisierung) im Zellinneren (Abb. 16B). Mit der Abnahme der Agonistenkonzentration (10 nM) verringert sich das Ausmaß der Internalisierung (Abb. 16C).

In Anwesenheit des sst4-selektiven Agonisten L-803,087 (10 nM bis 100 nM) verändert sich die Lokalisation dagegen bei keinem der beiden Rezeptoren (Abb. 16, D, E, I, J). Das heißt, dass bei dem sst4 über die konstitutive Endozytose hinaus keine weitere Internalisierung des sst4-T7-Rezeptors durch den Agonisten L-803,087 erreicht werden konnte (Abb. 16, G bis J).

Quantifizierung der konstitutiven Internalisierung. Die konstitutive Internalisierung des sst4-T7-Rezeptors, die unabhängig von einer Stimulation erfolgt, ließ sich mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*) bestätigen (Abb. 17). Dazu wurden die sst4-T7-Zellen unbehandelt mit dem Antikörper T7 1 h bei 4 °C bzw. 37 °C inkubiert. Der Vergleich von beiden Temperaturen zeigte, dass etwa 30% der sst4T7-Rezeptoren bei 37 °C konstitutiv internalisieren.

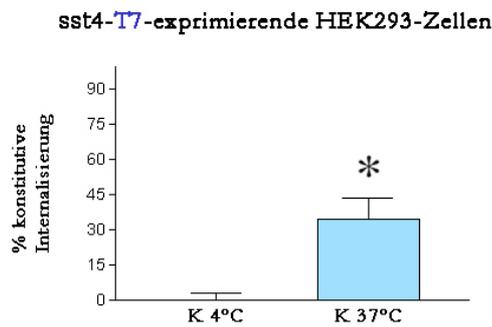


Abb. 17: Quantifizierung von konstitutiver Internalisierung der sst4-T7-Rezeptoren in HEK293-Zellen mittels ELISA. Unbehandelte sst4-T7-Zellen wurden nach Exposition mit dem N-terminalen T7-Antikörper eine Stunde entweder bei 4 °C (kein Balken) oder bei 37 °C (roter Balken) in DMEM-Medium inkubiert. Mit dem Stern ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kontrollen gekennzeichnet.

Temperatur-modifizierte immunzytochemische Markierungsmethode. Die Exposition mit primären, N-terminalen T7-Antikörpern erfolgte 1 h bei 4 °C an lebenden Zellen. Die niedrige Temperatur unterdrückt die konstitutive Internalisierung. Außerdem kann sich der Antikörper nur an die Oberfläche der Zellen anlagern, weil er aufgrund seiner Größe nicht in den Intrazellularraum gelangen kann. Dies ist erst infolge einer Agonisten-induzierten Endozytose möglich. Wenn daraufhin eine Stimulation mit Liganden folgt, kann man davon ausgehen, dass alle intrazellulär lokalisierten Rezeptoren infolge einer Liganden-induzierten Internalisierung endozytiert wurden.

Die Abb. 18 zeigt die repräsentativen Ergebnisse der modifizierten immunzytochemischen Markierung der sst4-T7 Rezeptoren. Im Wesentlichen sind die Rezeptoren in Ab- und Anwesenheit von Rezeptor-spezifischen Agonisten an der Membranoberfläche lokalisiert (Abb. 18, A bis F).

Bei genauerer Betrachtung kann man jedoch feststellen, dass sich eigentlich nur bei der 4°C-Kontrolle die Rezeptoren gänzlich an der Membran befinden (Abb. 18A). Bei allen anderen Proben beginnt allmählich die konstitutive Internalisierung (Abb. 18, B bis F), die sich mit sonst keinem der verwendeten Agonisten (sst4-selektiv L-803,087, oder sst2-selektiv L-779,976) induzieren ließ.

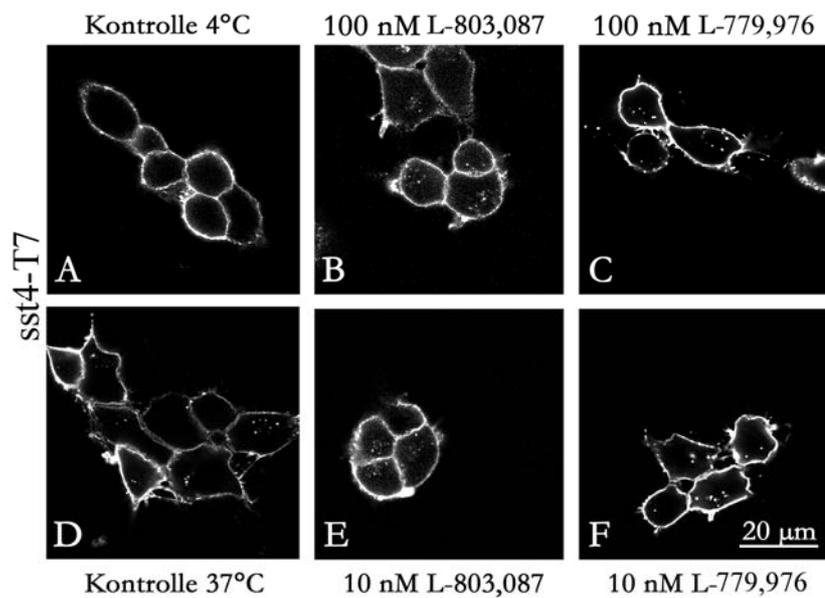


Abb. 18: Immunzytochemische Markierung der sst4T7-Rezeptoren an lebenden HEK293-Zellen bei 4 °C (*A* und *F*). Nach der Exposition mit dem N-terminalen T7-Antikörper, der gegen den T7-Epitop des sst4T7-Rezeptors spezifisch gerichtet ist, erfolgte eine Stimulation mit den Agonisten. *B*, *E*: 100 nM und 10 nM Exposition L-803,087 (sst4-selektiv.) *C*, *F*: Exposition mit 100 nM und 10 nM L-779,976 (sst2-selektiv.).

Quantifizierung der Internalisierung bei einzeln exprimierten sst2A- bzw. sst4-Rezeptoren. Diese Befunde konnten mit ELISA bestätigt und quantifiziert werden. Auch hier reagierte ausschließlich der sst2A-T7-Rezeptor auf seinen selektiven Agonisten L-779,976 (Abb. 19, blaue Balken) und internalisierte bis zu 60% (0,1 µM). Mit der Konzentrationsabnahme des sst2-selektiven Agonisten sank auch das Ausmaß der Internalisierung des sst2-Rezeptors (0,01 pM bis 10 mM, ohne Abb.). Die Exposition mit dem sst4-selektiven Agonisten L-803,087 ergab bei dem sst2A-T7-Rezeptor eine minimale Internalisierung. Die sst4-T7-exprimierenden HEK293-Zellen wurden dagegen durch die Agonisten-Stimulation nicht beeinflusst (Abb.19, grüne Balken).

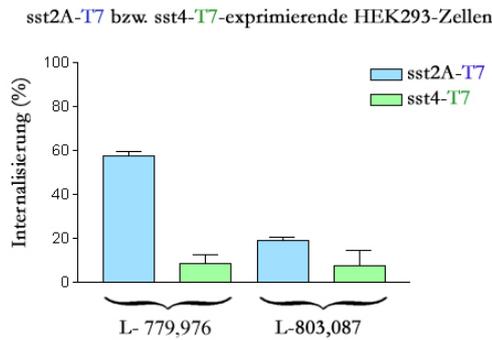


Abb. 19: Quantifizierung der Internalisierung von sst2A-T7 (blaue Balken) und sst4-T7 (grüne Balken) in HEK293-Zellen mittels ELISA nach Exposition mit dem sst2-spezifischen Agonisten L-779,976 (0,1 μ M) und mit dem L-803,087 (sst4-spezifisch; 0,1 μ M). Die Kontrolle ist gleich Null und daher nicht aufgezeichnet.

Abschließend kann man feststellen, dass die sst2A-T7-Rezeptoren in den HEK293-Zellen membranständig lokalisiert sind, und unter Standard-Bedingungen (37°C) nach Stimulation mit dem sst2-selektiven Agonisten 779,976 unterliegen sie einer Agonisten-induzierten Internalisierung. Der sst4-selektive Agonist L-803,087 bewirkt keine Internalisierung von sst2A. Dagegen ist der sst4-T7-Rezeptor unempfindlich gegenüber den getesteten Agonisten (L-779,976 oder L-803,087) und endozytiert konstitutiv. Diese konstitutive Internalisierung lässt sich durch Temperatursenkung auf 4 °C inhibieren.

3.6.2 Internalisierung von sst2A und sst4 nach einer Koexpression in HEK293-Zellen.

In diesem Abschnitt sollte geklärt werden, ob die Heterodimerisierung bei der Kombination sst2A-T7-sst4-HA eine Auswirkung auf die Internalisierung der beiden Subtypen hat. Dazu wurden die Rezeptoren mit unterschiedlichen Epitop-tags markiert und in HEK293-Zellen koexprimiert (sst2A-T7 und sst4-HA). Zum Nachweis wurde die modifizierte immunzytochemische Markierungsmethode verwendet.

Die sst2A-T7-sst4-HA-Zellen wurden mit subtypspezifischen Antikörpern, an denen die Fluorochrome Cy3 bzw. Cy5 gebunden sind, doppelmarkiert und mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt (Abb. 20). Die mikroskopische Analyse erfolgte mittels Konfokalmikroskopie bei 488 nm (T7 - grün) bzw. 630 nm (HA - rot). Beide Subtypen waren bei 4 °C in der Abwesenheit von Agonisten an der Membran der HEK293-Zellen lokalisiert (Abb. 20, A bis C).

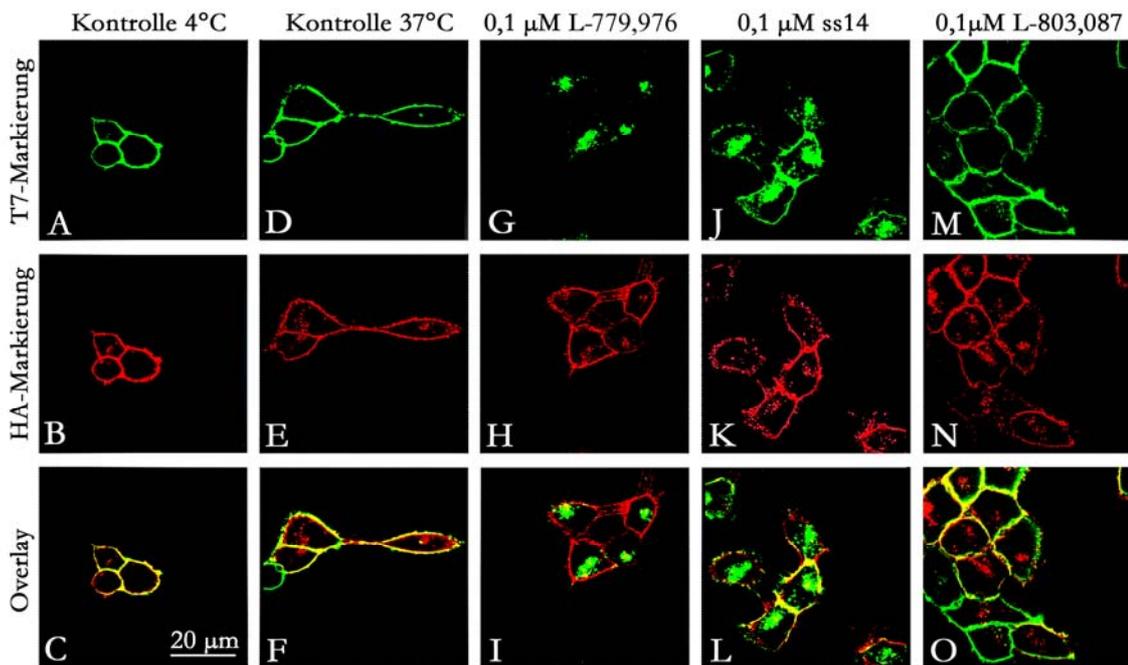


Abb. 20: Endozytose der sst2A-T7- und sst4-HA-Rezeptoren in sst2A-T7-sst4-HA koexprimierten HEK293-Zellen nach modifizierter Markierungsmethode bei 4 °C mit dem N-terminalen T7- bzw. HA-Antikörper. Die obere Reihe zeigt die mittels Cy3 markierten sst2A-T7-Rezeptoren (grün), die mittlere mittels Cy5 gefärbte sst4-T7-Rezeptoren (rot) und die untere stellt die Doppelmarkierung der beiden Rezeptor-Subtypen dar (gelb). Die Exposition mit Agonisten erfolgte 30 Minuten bei 37 °C. **A-C:** Unbehandelte sst2A-T7-sst4-HA-Zellen, bei 4 °C im Agonisten-freiem Medium 30 Minuten inkubiert. **D-F:** 37 °C-Kontrolle, bei der die Inkubation ebenso in Agonisten-freiem Medium erfolgte. **G-I:** Stimulation der Zellen mit dem sst2-selektiven Agonisten L-779,976 (0,1 µM). **J-L:** Behandlung mit Somatostatin ss-14 (0,1 µM). **M-O:** Inkubation mit dem sst4-selektiven Agonisten L-803,087 (0,1 µM).

Nach einer Inkubation der bereits markierten Rezeptoren bei 37 °C ohne Agonisten (Abb. 20, D bis G) waren die sst4-HA-Rezeptoren vereinzelt intrazellulär sichtbar, was auf eine beginnende konstitutive Internalisierung zurückzuführen ist. Die Mehrheit der Rezeptoren befindet sich jedoch an der Plasmamembran, so dass sich eine eventuelle Agonisten-induzierte Internalisierung des sst4-HA-Rezeptors bestimmen lässt. Die Stimulation der Zellen mit Agonisten wie Somatostatin und L-779,976 (sst2-selektiv) induzierte eine Internalisierung nur bei dem sst2A-T7-Rezeptor, nicht aber bei dem sst4-HA-Subtyp (Abb. 20, G bis L). Dagegen löste der Agonist L-803,087 (sst4-selektiv) bei keiner der beiden Rezeptor-Arten eine Internalisierung aus.

Quantifizierung der Internalisierung bei sst2A-sst4-Rezeptoren exprimierenden HEK293-Zellen. Um die Internalisierung in der Zelllinie sst2A-T7-sst4-HA zu quantifizieren, wurden ebenfalls ELISA-Experimente durchgeführt (Abb. 21). Die koexprimierten Zellen wurden zunächst mit T7- und HA-Antikörpern inkubiert und anschließend mit selektiven Liganden stimuliert.

Dabei induzierte der sst2-selektive Agonist L-779,976 ausschließlich die sst2AT7-Rezeptoren (Abb. 21, erster Balken, blau), während die sst4HA-Rezeptoren in Hinsicht auf die Internalisierung inaktiv blieben (Abb. 21, zweiter Balken, grün).

Der sst4-spezifische Agonist bewirkte keine Agonisten-induzierte Endozytose weder beim sst2A-T7- noch beim sst4-HA-Rezeptor.

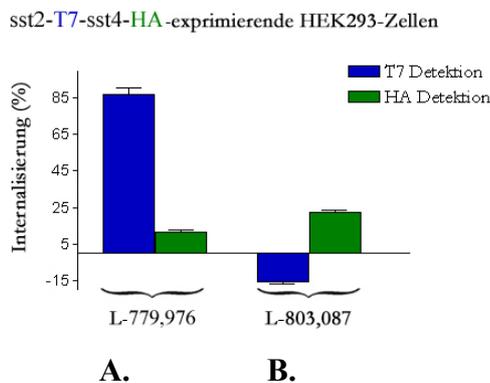


Abb. 21: Quantifizierung der Internalisierung von sst2A-T7- und sst4-HA-Rezeptoren, die in den HEK293-Zellen koexprimiert wurden. **Blaue Balken:** T7-Markierung **Grüne Balken:** HA-Markierung **A:** Stimulation mit sst2-selektivem Agonisten L-779,976 (0,1 μ M, 1 h) **B:** Stimulation mit dem sst4-selektiven L-803,087 Agonisten (0,1 μ M, 1 h).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Verhalten der kolokalisierten sst2A- und sst4-Rezeptoren in Bezug auf eine Agonisten-induzierte Internalisierung im Vergleich zu einzeln exprimierten sst2A und sst4 keine signifikante Änderungen ergab, obwohl sich beide Rezeptor-Subtypen miteinander kopräzipitieren ließen.

3.6.3 Messung der Agonisten-induzierten Aktivierung von ERK1 und 2 (ERK1/2)

Die mitogen-aktivierten Kinasen ERK1/2 werden gleich nach einer Aktivierung des Rezeptors durch Agonisten transient phosphoryliert. Aus diesem Grund wurde hier der Einfluss der Agonisten auf die ERK1/2 untersucht. Dabei wurden sst2A-T7- und sst4-

HA-koexprimierende HEK293-Zellen mit selektiven Liganden (Abb. 22) für 2, 5 oder 10 Minuten stimuliert. Danach wurde bei denselben Proben die Gesamtmenge an ERK2 ermittelt, um zu zeigen, dass die bereits vorhandenen ERK1/2 (Abb. 22.2. und 22.4.) infolge einer selektiven, Agonisten-induzierten Aktivierung phosphoryliert wurden (Abb. 22.1 und 22.3.).

Die Detektion der Kinasen erfolgte nach einer 12%-igen SDS-PAGE im Immunoblot (Abb. 22). Nach einem Vergleich mit dem Größenmarker kann eine Bande bei 42 kDa für ERK1 und 44 kDa für ERK2 bestimmt werden. Die Kontrolle der Gesamtmenge an ERK2 (Abb. 22, 2. und 22.4. Zeile) ergab eine ERK2-Bande bei 42 kDa mit konstanter Intensität. Daraus läßt sich schließen, dass in jedem Ansatz eine äquivalente Gesamtmenge an ERK2 vorhanden war. Eine Stimulation mit L-803,087 (sst4-selektiv) bewirkt eine deutlich sichtbare Phosphorylierung der ERK1/2 nach 5 Minuten, die nach 10 Minuten weiter steigt. Dagegen induzierte der L-779,976, der sst2-selektiv ist, schon nach 2 Minuten eine Phosphorylierung, die nach einem Maximum bei 5 Minuten abzuklingen beginnt.

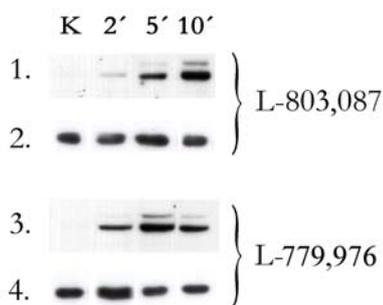


Abb. 22: Agonisten-induzierte Phosphorylierung der mitogen-aktivierten Kinase ERK1/2, analysiert im 12%-igen SDS-PAGE und Immunoblot durch 2-, 5-, 10-minütige Exposition sst2A-T7-sst4-HA in HEK293-Zellen. **1 und 3:** Agonisten-induzierte Phosphorylierung der ERK1/2. **2 und 4:** Gesamtmenge an ERK2 pro Ansatz. **1 und 2:** Stimulation mit dem sst4-selektiven Agonisten L-803,087 (1 μ M) **3 und 4:** Stimulation mit sst2-selektivem Agonisten L-779,976 (1 μ M).

Die Ergebnisse aus funktionellen Untersuchungen der als Heterodimere kopräzipitierten sst2A-sst4-Rezeptoren zeigen, dass diese Interaktion keine physiologischen Änderungen im Vergleich zu einzeln exprimierenden sst2A- bzw. sst4-Somatostatin-Rezeptoren mit sich bringt.

3.7 Funktionelle Untersuchungen der Heterodimere sst2A-MOR1

Weil die Heterodimerisierung von sst2A-T7-sst4-HA zu keiner Veränderung der physiologischen Rezeptoreigenschaften führte, wurde eine weitere heterodimere Kombination sst2A-MOR1 funktionellen Untersuchungen unterzogen.

3.7.1 Internalisierung der Rezeptoren sst2A und MOR1 sowie der koexprimierten sst2A-MOR1 in HEK293-Zellen

Zunächst wurde die subzelluläre Lokalisierung und Agonisten-abhängige Internalisierung der sst2A-T7- sowie der MOR1-HA-Rezeptoren in HEK293-Zellen bestimmt.

Dafür wurden die Zellen mit Rezeptor-selektiven Liganden stimuliert, immunocytochemisch mit T7 bzw. HA-Antikörper markiert und im Konfokal-Laser-Mikroskop ausgewertet (Abb. 23). Beide Rezeptoren befanden sich in der Abwesenheit von Agonisten an der Plasmamembran (Abb. 23 A, F) und endozytieren ausschließlich nach einer Stimulation mit eigenem Agonisten (Abb. 23 B, C, E, F).

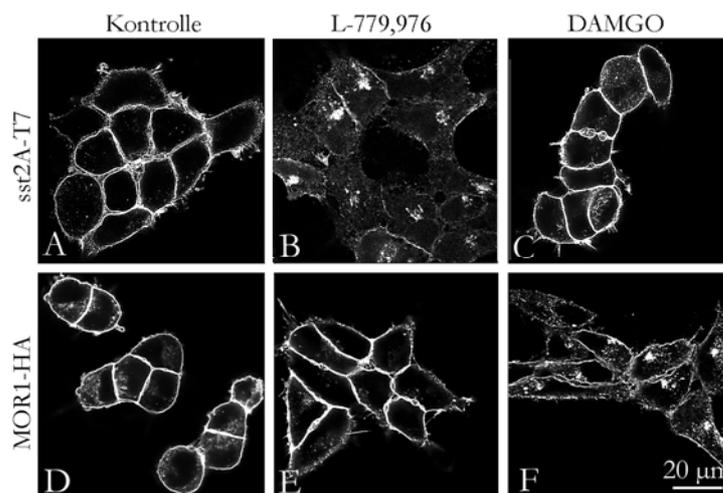


Abb. 23: Agonisten-induzierte Endozytose der sst2A-T7 und MOR1-Rezeptoren im Konfokalmikroskop **A bis C:** T7-Detektion **D bis F:** Detektion mit HA-Antikörper. **A, D:** unbehandelte Kontrollen **C, F:** 30-minütige Stimulation mit 1000 nM DAMGO (MOR1-selektiv) **D, G:** 30-minütige Stimulation mit 100 nM L-779,976 (sst2-selektiv).

Die Rezeptoren veränderten jedoch das Internalisierungsmuster bei einer Koexpression von sst2A-MOR1 in HEK293-Zellen (Abb. 24). Unbehandelt waren beide Rezeptoren, ähnlich wie die einzeln exprimierten, an der Membran kolokalisiert. Nach einer Stimulation mit L-779,976 (Abb. 24, D bis F) internalisierte jedoch sst2A zusammen mit MOR1, obwohl dieser Ligand, wie in Abb. 23 gezeigt, eindeutig sst2-spezifisch ist. Im Gegensatz dazu endozytierte MOR1 infolge einer Behandlung mit MOR1-spezifischem Liganden DAMGO, während sst2A an der Plasmamembran blieb (Abb. 24 G bis I).

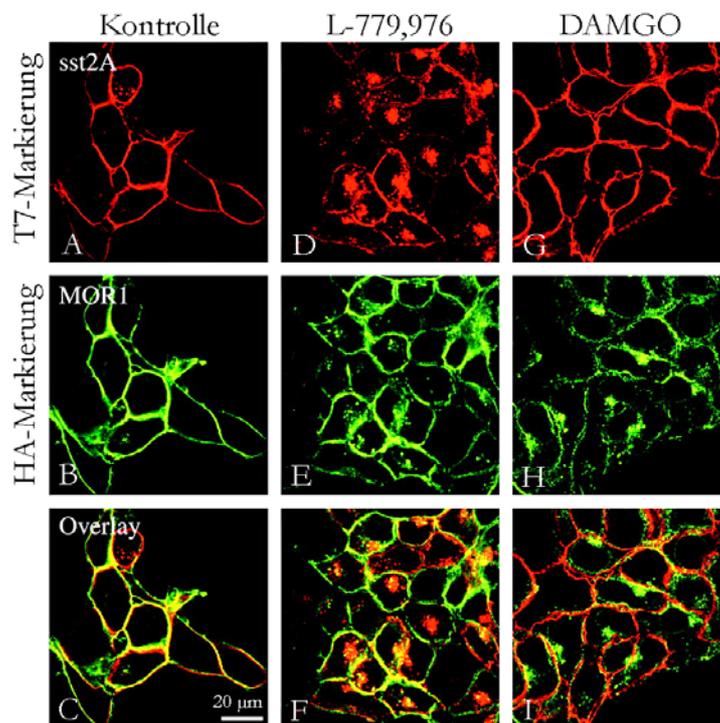


Abb. 24: Agonisten-induzierte Endozytose bei sst2A-MOR1-Heterodimeren im Konfokalmikroskop. Die Rezeptoren sind mit unterschiedlichem Epitop-*tag* markiert (sst2A mit T7-Epitop, MOR1 mit HA-Epitop), in HEK293-Zellen koexprimiert und mit den jeweiligen Antikörpern nachgewiesen. **A, D, G:** T7-Markierung. **B, E, H:** HA-Markierung. **C, F, I:** Overlay. **A bis C:** unbehandelte Kontrollen. **D bis F:** 30-minütige Stimulation mit sst2-selektivem Agonisten L-779,976 (100 nM). **G bis I:** 30-minütige Behandlung mit MOR1-selektivem Agonisten DAMGO (1000 nM).

Quantifizierung der Internalisierung mit Hilfe von ELISA. Die Veränderung des Internalisierungsmusters wurde mittels *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA) bestätigt (Abb. 27). Die Stimulation von sst2A-exprimierenden HEK293-Zellen mit dem sst2-selektiven Liganden (L-779,976) führte zu einer bis zu 50%-igen Abnahme der Rezeptoren an der Plasmamembran (Abb. 27A, erster, hellblauer Balken).

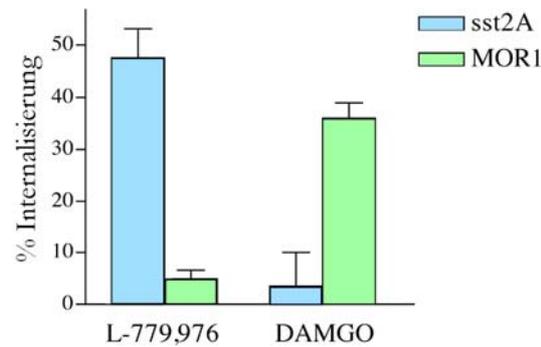
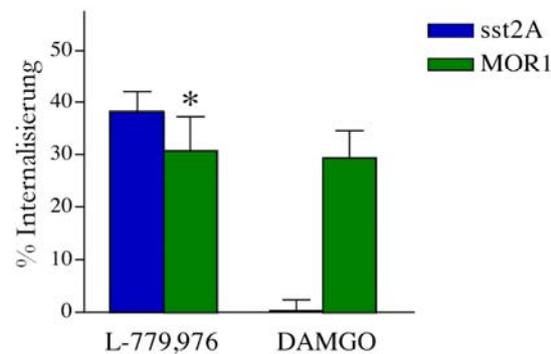
A sst2A-T7 bzw. MOR1-HA-exprimierende Zellen**B** sst2A-T7-MOR1-HA-koexprimierende Zellen

Abb. 25: Quantitative Analyse (ELISA) der Agonist-induzierten Endozytose von einzeln exprimierten sst2A- bzw. MOR1-Rezeptoren im Vergleich zu koexprimierten sst2A-MOR1-Heterodimeren. **A:** HEK293-Zellen wurden mit sst2A-T7 (hellblaue Balken) oder MOR1-HA (hellgrüne Balken) transfiziert und mit Agonisten stimuliert. **Balken 1-2:** (von links) ist die prozentuale Abnahme der Rezeptoren von der Plasmamembran dargestellt, nach 1 h Exposition mit sst2A-selektivem Agonisten L-779,976 (100 nM). **Balken 3-4:** nach 1 h Exposition mit MOR1-selektivem Agonisten DAMGO (1000 nM). **B:** Quantifizierung bei koexprimierten sst2A-T7-MOR1-HA. **Balken 1-2:** Stimulation mit L-779,976 (1 h, 100 nM). **Balken 3-4:** Exposition mit DAMGO (1 h, 1000 mM). Mit Stern ist ein signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen sst2A-T7-MOR1-HA und sst2AT7-Zellen.

Eine Behandlung der Zellen mit dem MOR1-selektiven Agonisten (DAMGO) löste keine Internalisierung beim sst2A-Rezeptor aus (Abb. 27A, zweiter, hellgrüner Balken). Umgekehrt hatte eine Stimulation mit DAMGO von MOR1-exprimierenden HEK293-Zellen eine 40%-ige Agonisten-induzierte Abnahme der Rezeptorzahl an der Membran zur Folge (Abb. 27A, vierter Balken, hellgrün), und sst2A verblieb an der Plasmamembran (Abb. 27A, dritter Balken, hellblau).

Korrelierend mit den immunzytochemischen Studien veränderte sich auch hier das Internalisierungsmuster des sst2A-Rezeptors bei einer Koexpression mit dem MOR1-Rezeptor (Abb. 27B). Infolge einer Behandlung mit dem sst2-spezifischen Liganden

internalisierten 40% der sst2A- und 30% der MOR1-Rezeptoren zusammen. Nach einer Stimulation mit DAMGO (MOR1-selektiv) internalisierte bis zu 30% ausschließlich der MOR1-Rezeptor (Abb. 27B, vierter Balken, dunkelgrün) und nicht der sst2A-Rezeptor (Abb. 27B, dritter Balken, dunkelblau).

Im Gegensatz zur sst2A-sst4-Kombination (siehe 3.6) veränderte sich das Internalisierungsmuster des sst2A in Gegenwart von MOR1 signifikant. Die Internalisierung des MOR1-Rezeptors blieb dabei unverändert.

3.7.2 Cross-Desensitisierung von ERK1/2 bei sst2A-MOR1-Heterodimeren

Eine Unempfindlichkeit von GPCR auf Agonisten ist auf eine Desensitisierung der Rezeptoren zurückzuführen. Um zu überprüfen, ob die Koexpression von sst2A-T7-MOR1-HA eine Auswirkung auf die Desensitisierung hat, wurden die Zellen in der Abwesenheit und Gegenwart von sst2A- und MOR1-spezifischen Agonisten 0,5, 1, 2, 4 und 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Substanzen ausgewaschen und die Zellen erneut kurz mit Agonisten oder mit LPA (*lysophosphatic acid*, stimuliert die endogenen LPA-G_i-Rezeptoren der Zellen) behandelt.

In der Abb. 28 sind die Ergebnisse nach 4 h Präinkubation mit Agonisten und anschließender 5-minütiger Stimulation zusammengefasst. Die Quantifizierung der Aktivierung von ERK1/2 (Abb. 28A, Spur 2 bis 7) ergab signifikante Unterschiede zwischen präinkubierten (mit DAMGO oder L-779,976) und nicht präinkubierten Rezeptoren. Nach Präinkubation mit DAMGO konnten die sst2A-Rezeptoren durch L-779,976 die ERK1/2 nicht mehr aktivieren und umgekehrt. Eine Präinkubation mit L-779,976 desensitisierte die MOR1-Rezeptoren, die danach durch DAMGO die ERK1/2 ebenfalls nicht mehr aktivieren konnten. Dabei blieb die Aktivierung der ERK1/2 beim dritten Rezeptor, der endogen exprimiert wird (LPA-Rezeptor), von der Präinkubation unbeeinflusst (Abb. 28, Spur 8 bis 10).

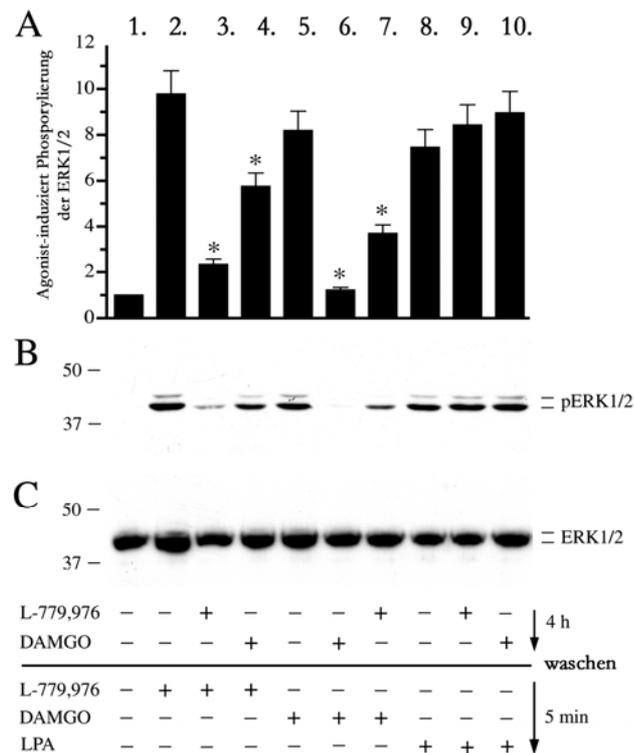


Abb. 26: Agonist-induzierte *Cross*-Desensitisierung der Phosphorylierung von EK1/2 bei sst2A-MOR1 Heterodimeren in HEK293-Zellen. Die Präinkubation (4 h) erfolgte mit 1000 nM DAMGO oder 100 nM L-779,976. Nach einem Waschschrift mit serumfreiem Medium wurden die Zellen 5 Minuten mit 1000 nM DAMGO, 100 nM L-779,976 oder 1000 nM LPA stimuliert. Nach Zelllyse wurden äquivalente Proteinmengen in der SDS-PAGE getrennt und im Immunoblot mit phospho-ERK1/2-spezifischem Antikörper (pERK1/2) bzw. mit ERK1-spezifischem Antikörper nachgewiesen. **A:** Densitometrische Quantifizierung. Dargestellt ist die x-fache Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Spur1). **B** Immunoblots von pERK1/2 und Gesamt-ERK1 sind rechts eingezeichnet. Die Position der molekularen Größe der Proteine sind links (kDa). Die Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen präinkubierten und nicht präinkubierten sst2A-T7-MOR1-HA Zellen.

Der dazu äquivalente Immunoblot (Abb. 28B) spiegelt eine signifikante *Cross*-Desensitisierung der Rezeptoren wider. Die Kontrolle der Gesamtmenge an ERK2 zeigen Banden mit konstanter Intensität (Abb. 28C), woraus sich schließen läßt, dass basal überall äquivalente Mengen an ERK1 vorhanden waren.

Die Experimente zeigten, dass bei einer Koexpression von sst2A mit MOR1 beide Rezeptoren *cross*-desensitisieren. Diese homologe *Cross*-Desensitisierung deutet auf veränderte Rezeptoreigenschaften hin, die aufgrund der Heterodimerisierung zustande kommen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass sst2A und MOR1 bei einer Koexpression in HEK293-Zellen koimmunpräzipitiert werden können. Beide Rezeptoren sind an der Plasmamembran kolokalisiert. Nach Stimulation der sst2A-MOR1-Rezeptoren mit MOR1-spezifischem Agonisten DAMGO verändert sich signifikant das Internalisierungsmuster des sst2A. Unter diesen Bedingungen erfolgt auch eine *Cross*-Desensibilisierung der beiden Rezeptoren. Im Gegensatz dazu wurden keine funktionellen Veränderungen der Rezeptoreigenschaften bei der Kombination sst2A-sst4 festgestellt, obwohl sich beide Rezeptoren koimmunpräzipitieren ließen und an der Plasmamembran kolokalisiert waren.

4 DISKUSSION

Eine Vielzahl von neueren Literaturbefunden zeigt, dass die Dimerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR unterteilt I-V in Klassen) für die Regulation ihrer Aktivität und für die Interaktion mit deren G-Proteinen eine wichtige Rolle spielen kann. Aus diesem Grund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Dimerisierung von sst2A (aus der Familie der Somatostatin-Rezeptoren, GPCR-Klasse I) sowie mit anderen GPCR verschiedener Klassen und exemplarisch mit den darauf folgenden funktionellen Konsequenzen.

Zunächst wurde die in HEK293-Zellen bereits bekannte Homodimerisierung des sst2A-Rezeptors (Pfeiffer et al., 2001) sowie die Heterodimerisierung von sst2A mit MOR1 (Opioid-Familie, auch μ -Opioid-Rezeptor genannt, GPCR-Klasse I) mittels Koimmunpräzipitation (Ko-IP) und BRET-Assay (Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer) nachgewiesen. Die Bestätigung der oben genannten Dimerisierung unterstützte die Annahme, dass der sst2A-Rezeptor in der Lage sein könnte, mit weiteren GPCR zu interagieren, wobei möglicherweise die phylogenetische Entfernung der Dimerisierungspartner eine Rolle spielt. Um dies zu klären, wurde erstmals systematisch untersucht, ob eine Interaktion des Somatostatin-Rezeptors sst2A mit einer breiten Palette von GPCR verschiedener Klassen mit unterschiedlichsten Verwandtschaftsgraden stattfinden kann. Dafür wurden die sst2A-Rezeptoren mit weiteren GPCR koexprimiert. Als potentielle Dimerisierungspartner wurden die eng verwandten Rezeptoren aus der Somatostatin-Familie (sst1, sst3, sst4 und sst5) verwendet. Außerdem wurden als Rezeptoren der Klasse II die Vasoaktiven Intestinal-Peptid-Rezeptoren (VPAC1 und VPAC2) und die Neurotensin-Rezeptoren (NT1 und NT2) eingesetzt. Als Vertreter der Klasse III dienten die metabotropen Glutamat-Rezeptoren mGluR1 und mGluR5.

Die Ergebnisse beruhen auf den Untersuchungen in menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen), welche die hier verwendeten Rezeptoren endogen nicht exprimieren. Dazu wurden die Zellen mit dem sst2AT7-Plasmid und mit weiteren Plasmiden der anderen Rezeptor-Arten transfiziert.

Ein Phänomen, das bei vielen unterschiedlichen GPCR-Dimeren oftmals beschrieben wurde, ist die dimerisierungsinduzierte Funktionsänderung der Rezeptoren (Jordan and Devi, 1999; Maggio et al., 1999; Abdalla et al., 2000, Rocheville et al., 2000a; Jordan et al., 2001; Pfeiffer et al., 2001; Pfeiffer et al., in Druck). Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden daher funktionelle Konsequenzen der Heterodimerisierung bei sst2A-sst4- und sst2A-MOR1-Zellen untersucht. Hierzu wurde die Agonisten-induzierte Endozytose sowie die Aktivierung der MAP-Kinasen (ERK1/2) von koexprimierten sst2A- sst4- und sst2A-MOR1-Rezeptoren mit den jeweils einzeln exprimierten Rezeptoren verglichen.

4.1 Dimerisierungsstudien

Um die Homo- bzw. Heterodimere bei GPCR nachzuweisen, wurde die Koimmunpräzipitation (Ko-IP) von isolierten Rezeptoren verwendet. Eine direkte Messung der Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen wurde mit Hilfe der biophysikalischen Technik BRET (Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer) durchgeführt.

Nachweis von Dimeren-GPCR in lebenden Zellen. In dieser Arbeit wurde eine konstitutive Homodimerisierung des sst2A-Rezeptors sowie die Heterodimerisierung mit dem MOR1 mittels BRET in lebenden HEK293-Zellen gezeigt. In beiden Fällen fand eine deutlich messbare Energieübertragung von einem Interaktionspartner zum anderen statt, die nur bei einer Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren möglich war. Diese Interaktion deutet auf eine Dimerisierung zwischen den jeweiligen Rezeptor-Kombinationen hin.

In der Literatur finden sich zunehmend Studien zur Dimerisierung verschiedener GPCR, die anhand der BRET-Methode an lebenden Zellen durchgeführt wurden. So z.B. ließ sich die bereits bewiesene konstitutive Homodimerisierung des β -adrenergen Rezeptors bestätigen (Angers et al., 2001). Beim Adenosin-Rezeptor (A2A) wurde Homo- und Heterodimerisierung mit dem Dopamin-Rezeptor (D2) nachgewiesen. Dabei zeigte man neben dem positiven BRET-Signal, dass die in die Rezeptor-DNA inklonierten BRET-Konstrukte (Rluc und GFP, welche Rezeptor-Rluc und Rezeptor-GFP ergeben) die Lokalisation der Rezeptoren in den Zellen wie auch die Ergebnisse von Ko-IP nicht beeinflussen (Kamiya et al., 2003). Ebenso wurden Homodimere beim δ - κ -Opioid-Rezeptor sowie Heterodimere beim δ -Opioid- mit κ -Opioid-Rezeptor gezeigt (McVey et al., 2001). Gleichfalls ließen sich Heterodimere zwischen den Oxytocin- mit den Vasopressin-Rezeptoren V1 oder V2 (Terrillon et al., 2003) nachweisen.

Es wurde mehrfach postuliert, dass die Dimerisierung ein konstitutiver Vorgang für GPCR sein könnte (McVey et al., 2001; Angers et al., 2001; Terrillon et al., 2003), obwohl sich bei einigen Rezeptor-Kombinationen keine Homo- oder Heterodimere nachweisen ließen. Beispielsweise wurde für den Rezeptor CXCR4 (Rezeptor des *stromal cell-derived factor SDF1 α* , ein Haupt-Ko-Rezeptor des HIV-1) eine konstitutive Homodimerisierung gezeigt, dafür aber keine Heterodimerisierung mit dem Rezeptor CCR5 (ein weiterer Haupt-Ko-Rezeptor des HIV-1-Rezeptors; Babrock et al., 2003). Einige Heterodimerisierungsstudien wurden mit BRET-verwandten Methoden wie dem pbFRET (*photobleaching fluorescence resonance energy transfer*) durchgeführt. Dabei wurden Heterodimere bei humanen sst5-Rezeptor mit dem sst1- als auch mit dem D2-Rezeptor gefunden, jedoch keine bei der Kombination von sst1 mit sst4 (Rocheville et al., 2000a, b).

Neben der konstitutiven Dimerisierung ist auch Agonisten-abhängige Oligomerisierung beispielsweise des Cholecystokin-Rezeptors (Cheng and Miller, 2001) beschrieben worden.

Koimmunpräzipitation des sst2A-Rezeptors mit anderen GPCR. Die hier durchgeführten Koimmunpräzipitationsstudien zeigten korrelierend mit den BRET-Analysen, dass der sst2A konstitutiv als Homodimer in den HEK293-Zellen vorliegt und sich als solcher

isolieren lässt. Ebenso wurden konstitutiv gebildete Heterodimere sst2A-MOR1 koimmunpräzipitiert. Für die systematische Durchmusterung der hier untersuchten Kombinationen von sst2A mit anderen der GPCR Klassen (I, II, III) wurde die Ko-IP angewandt. Als Vertreter der Klasse I wurden weitere Subtypen der Somatostatin-Rezeptoren verwendet, wie sst1, sst3, sst4 und sst5. Die Heterodimerisierung des sst2A mit sst3, welche mittels Ko-IP nachgewiesen wurde, war bereits bekannt und diente als Positivkontrolle. Die sst2A- wie sst3-Rezeptoren bilden demnach konstitutiv Homodimere, wenn sie allein in den HEK293-Zellen exprimiert werden. Dagegen kommt es bei einer Koexpression von beiden Rezeptor-Subtypen in der Zelle zur Ausbildung von konstitutiven Heterodimeren sst2A-sst3 (Pfeiffer et al., 2001), was in dieser Arbeit bestätigt wurde. Die Klasse II repräsentierten die Vasoaktiven Intestinal-Peptid-Rezeptoren VPAC1 und VPAC2, die Neurotensin-Rezeptoren NT1 und NT2, für die Klasse III stehen die metabotropen Glutamat-Rezeptoren mGluR1 und mGluR5. Dabei wurde vermutet, dass eventuell nur nahe verwandte Rezeptoren wie die anderen Somatostatin-Rezeptor-Subtypen mit dem sst2A-Rezeptor Heterodimere bilden, zumal die Homologie unter den GPCR-Klassen nicht generell vorhanden ist und meist nur einige Subfamilien betrifft (Gether 2000). Die humanen Somatostatin-Rezeptoren sind beispielsweise untereinander etwa 39%-57% homolog (Patel, 1999). Der sst2A und MOR1 weisen eine 38%-ige Homologie zueinander auf (Aicher et al., 2000a, b).

Mit der Ko-IP-Methode konnte bereits die Homodimerisierung des δ -Opioid-Rezeptors (Cevejic und Devi, 1997 und Heterodimerisierung des δ -Opioid-Rezeptors mit dem MOR1 (μ -Opioid-Rezeptor, Jordan und Devi, 1999) nachgewiesen werden. Es wurden ebenso Heterodimere aus dem β -adrenergen Rezeptor sowie δ -Opioid-Rezeptor und dem κ -Opioid-Rezeptor isoliert (Jordan et al., 2001). Des Weiteren ließ sich der Serotonin-Rezeptor 5HT_{1A} mit 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, EDG₁, EDG₃, GPR₂₆, und GABA_{B2} als Heterodimere aus HEK293-Zellen kopräzipitieren (Salim et al., 2002). Auch die Oxytocin- und Vasopressin-Rezeptoren V1a und V2 bildeten Homo- und Heterodimere in HEK293-Zellen (Terrillon et al., 2003).

Die Literaturdaten deuten darauf hin, dass die Dimerisierung weit verbreitet, jedoch nicht für alle GPCR obligatorisch ist. In dieser Studie hat der sst2A-Rezeptor bei einer Koexpression mit allen untersuchten GPCR unabhängig von dem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad konstitutiv Heterodimere gebildet.

Die isolierten Heterodimere dissoziieren in Monomere. Bei allen hier kopräzipitierten Rezeptoren wurde eine partielle Instabilität der Heterodimere nach Auflösung im Probenpuffer (1% SDS und 10 nM DTT) beobachtet. Die Dissoziation in Monomere deutet auf schwache nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den Rezeptor-Molekülen hin. Eine ähnliche Destabilisierung von Dimeren wurde zum Beispiel bei der Klasse III des metabotropen Glutamat-Rezeptors mGluR5 und des Kalzium-Rezeptors beschrieben, wo die Rezeptor-Homodimere unter dem Einfluss von DTT oder 2-Mercaptoethanol in Monomere zerfallen (Romano et al., 1996; Bai et al., 1998; Ward et al., 1998; Pace et al., 1999).

Wahrscheinlich wurden hier außer den zellmembranständigen, vollständig glykosylierten Rezeptoren auch unreife Rezeptoren präzipitiert. Unreife Rezeptoren wurden bereits bei Homodimeren sowie bei Heterodimeren der Oxytocin- und Vasopressin-Rezeptoren V1a und V2 koimmunpräzipitiert gefunden (Terillon et al., 2003). Zudem ist es für die GABA-B-Rezeptoren GBR1 und GBR2 typisch, im endoplasmatischen Retikulum zu heterodimerisieren und so an die Plasmamembran zu gelangen (Margeta-Mitrowitz et al., 2000). Aus diesem Grund kann man annehmen, dass die Dimerisierung der hier untersuchten Rezeptoren schon im endoplasmatischen Retikulum (ER) während der frühen Biosynthese stattfindet. Vielleicht sind solche unreifen Rezeptor-Dimere instabiler als die an der Plasmamembran. Damit könnte auch die partielle Instabilität der kopräzipitierten Heterodimere teilweise erklärt werden.

Um eine artifizielle Rezeptor-Rezeptor-Interaktion während der Zellyse oder Immunpräzipitation ausschließen zu können, wurden die sst2A-T7-Zellen mit den sst2-HA-Zellen erst nach der Lyse vermischt und equivalent zu koexprimierenden sst2A-T7-sst2A-HA-Zellen aufgearbeitet. Eine anschließende Detektion mit dem HA-Antikörper zeigte, dass keiner der sst2A-HA-Rezeptoren mit dem sst2A koimmunpräzipitiert wurde (keine Banden im *Western-Blot*). Dies beweist, dass die Dimerisierung in lebenden

Zellen vor der Lyse stattfindet. Darüber hinaus wurden für die Immunpräzipitation und den Nachweis Antikörper aus verschiedenen Spezies eingesetzt (T7 im Komplex in der Maus erzeugt, Detektions-Antikörper in Kaninchen, Ratte oder Meerschweinchen). Damit konnte man unspezifische Immunbanden, die aus der Interaktion der beiden Antikörpern resultieren, ausschließen (zwischen dem T7-Antikörper aus dem Komplex und dem Antikörper aus dem Immunoblot). Zusätzlich wurde der Sepharose-T7-Komplex ohne Zelllysate analog zu den Zellen bearbeitet und dem SDS-PAGE unterworfen. Dabei wurden im *Western-Blot* ebenfalls keine Banden beobachtet.

Modelle der Dimerisierung von GPCR. Es werden mehrere Modelle von Dimerisierungsarten bei den GPCR postuliert. Dabei sind meist die Transmembrandomänen (TM), die auf unterschiedliche Weisen interagieren können, involviert. Bei der Heterodimerisierung von Adenosin- (A2A) mit dem Dopamin-Rezeptor (D2) wurden Interaktionen zwischen der TM5 und TM6 des D2- sowie der TM4 des A2A postuliert (Canals et al., 2003). Bei dem C5a-Rezeptor sind hingegen die TM1 und 2 oder 4 für die Homodimerisierung verantwortlich (Klco et al., 2003). Die Interaktionen können durch Überlappung (Abb. 25B) oder Kontakt der TM entstehen (Abb. 25A). Letztere kommen beispielsweise bei Vasopressin-V2-Rezeptoren zwischen der TM5 und 6 vor (Schulz et al., 2000), dagegen beim α -Faktor-Rezeptor (*Saccharomyces cerevisiae*, GPCR-Klasse IV) zwischen der TM1 und 2 (Overton und Blumer, 2002). Im Gegensatz hierzu wurden für den muskarinergen- und β -adrenergen Rezeptor (Maggio et al., 1993a, Gouldson et al., 1997) die Überlappungsdimere als Modell vorgeschlagen (Abb. 25B).

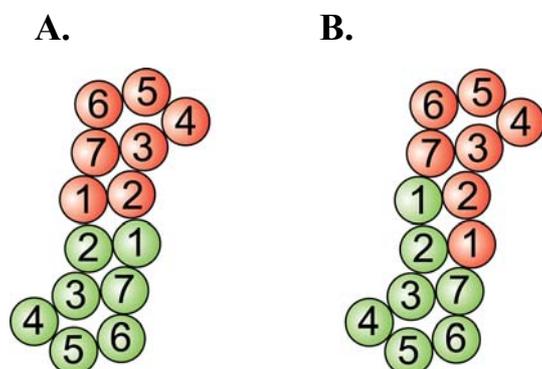


Abb. 27: Modell der möglichen Dimerisierungsarten (modifiziert nach Gouldson et al., 2000). **A:** Kontakt-dimere können sich vermutlich eher bei schwach interagierenden Dimeren ausbilden. Sie berühren sich zwar im 1TM und 2, überlappen jedoch nicht **B:** Überlappungsdimere. Die beteiligten Transmembrandomänen 1 und 2 (oder 5 und 6 nicht dargestellt) überlappen und führen zu stärkeren Interaktionen.

Darüber hinaus wird in der Literatur zunehmend die Vermutung aufgestellt, dass die Dimere die kleinste Einheit von hochmolekularen Oligomeren darstellen könnten. Beispielsweise wurden bei dem C5a-Rezeptor *higher order oligomers* oder ganze Bündel aus Rezeptoren an der Plasmamembran postuliert (Klco et al., 2003).

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde mittels *atomic-force microscopy* die Anordnung der Rhodopsin-Rezeptoren in der Plasmamembran (Liang et al., 2003) visualisiert (Abb. 26). Dabei wurde die Organisation und Topografie der Rezeptoren in Scheiben der Stäbchenzellen von der Maus gezeigt. Es stellte sich heraus, dass die meisten Rhodopsin-Rezeptor-Moleküle in einer Doppelreihe als Dimere in der Membran verankert und nur wenige als Monomere zu sehen sind. Wenn auch andere GPCR ähnliche Formationen bilden, könnte dies die ubiquitäre Heterodimerisierung von sst2A mit den hier untersuchten Rezeptoren erklären.

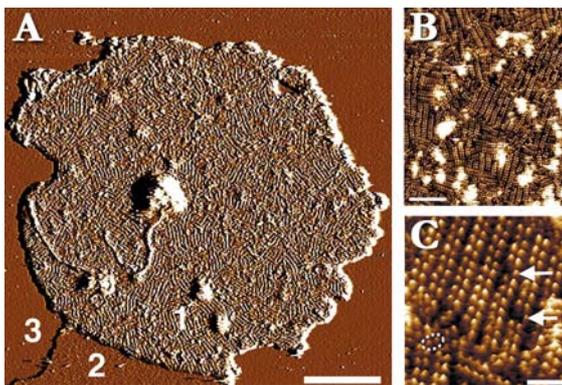


Abb. 28: (aus Liang et al., 2003) Topologie der Rhodopsin-Rezeptoren von nativen Scheiben der Stäbchenzellen in der Plasmamembran nach *atomic-force microscopy* (*Nanoscopy Multimode, Digital Instruments*). **A:** Sichtbar sind drei verschiedene Areale 1. Zytoplasmaseite der Scheibe, 2. Lipidseite 3. Glimmer. (Skalierung 200 nm) **B:** Reguläre Anordnung der Rhodopsin-Dimere (Skalierung 50 nm). **C:** Rhodopsin-Moleküle ragen aus der doppelten Lipidschicht der Membran etwa $1,4 \pm 0,2$ nm; ($n = 111$) heraus. Die Rezeptoren bilden Dimere (weisgestrichelte Ellipse) die in Doppelreihen angeordnet sind. Gelegentlich sind Monomere (weiße Pfeile) zu sehen (Skalierung 15 nm).

4.2 Funktionelle Konsequenzen der Heterodimerisierung von sst2A-sst4- und sst2A-MOR1 Rezeptoren

Die in der Literatur nachgewiesenen Heterodimerisierungen gehen meist mit einer Veränderung des physiologischen Verhaltens eines oder beider Rezeptoren einher. Es wurde gezeigt, dass die Heterodimerisierung der GABA_B1-GABA_B2- oder der D2-sst5-Rezeptoren einen neuen Rezeptor mit Erhöhung dessen Aktivität hervorbrachte (Jones

et al., 1998; Kaupmann et al., 1998; Kuner et al., 1999; Ng et al., 1999; Rocheville et al., 2000a). Die Dimerisierung des sst2A- mit dem sst3-Rezeptor hatte eine Inaktivierung eines der beteiligten Partner (sst3) zur Folge (Pfeiffer et al., 2001). Für den GABA_{B1}-GABA_{B2}-Rezeptor ist die Dimerisierung sogar für die Funktionalität des Rezeptors unbedingt notwendig (Jones et al., 1998). Aufgrund der Literaturbefunde wäre zu vermuten, dass es auch bei den hier gefundenen Heterodimeren physiologische Konsequenzen geben könnte. Die hier am Beispiel von sst2A-sst4 und sst2A-MOR1 in HEK293-Zellen durchgeführten funktionellen Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Heterodimerisierung nicht immer eine Änderung der Rezeptoreigenschaften zur Folge hat.

Agonisten-induzierte Endozytose (Internalisierung). Die einzeln exprimierten Rezeptor-Subtypen sst2A und sst4 unterscheiden sich funktionell im Internalisierungsmuster. So internalisiert und desensibilisiert der sst2A-Rezeptor der Ratte nach einer Stimulation mit seinem Agonisten rasch, während dies bei dem sst4-Subtyp der Ratte nicht nachgewiesen werden konnte (Roth et al., 1997a; Roosterman et al., 1997). Im C-Terminus des sst5 konnte eine Domäne gezeigt werden, die für die Desensibilisierung und Internalisierung verantwortlich ist (Hukovic et al., 1998). Der sst4-Rezeptor enthält dagegen in seinem C-Terminus einen Bereich, der eine Desensibilisierung und Internalisierung verhindert. Nach einer Deletion des Bereiches oder nach einer Mutation des Threonins³³¹ zu Alanin lässt sich eine Agonisten-stimulierte Internalisierung bei sst4 beobachten (Kreienkamp et al., 1998). Es wäre denkbar, dass durch die hier gezeigte Heterodimerisierung gerade dieser Bereich in irgendeiner Form abgeschirmt wird, so dass eine Endozytose doch stattfinden kann. Die hier durchgeführten experimentellen Studien zeigten jedoch, dass die sst2A- und sst4-Rezeptoren keinerlei Einfluss aufeinander hinsichtlich der Internalisierung haben, obwohl sie kolokalisiert an der Membran der HEK293-Zellen vorkommen und als Heterodimere kopräzipitiert werden können.

Aufgrund der hier gezeigten konstitutiven Internalisierung wäre es denkbar, dass der sst4 zu kurz an der Plasmamembran verweilt, als dass eine solche physiologische Änderung als Folge der Heterodimerisierung stattfinden kann. Außerdem ist es möglich, dass der sst4 der Ratte, ähnlich wie der humane sst4 (Smally et al., 2001) einem

schnellen Recycling unterliegt, wodurch die Anwesenheit des Rezeptors an der Plasmamembran noch zusätzlich verkürzt wird.

Dem stehen die hier vorgestellten Ergebnisse der Internalisierungsstudie an sst2A-MOR1-Rezeptoren entgegen. Bei einzeln exprimierten sst2A und MOR1 in den HEK293-Zellen befanden sich beide Rezeptoren in der Abwesenheit von Agonisten an der Plasmamembran und endozytierten nach einer Stimulation mit eigenem selektiven Agonisten. Im Fall einer Koexpression des sst2A-Rezeptors mit dem MOR1-Rezeptor internalisierten jedoch nach einer Exposition mit dem sonst sst2-selektiven Agonisten (L-779,976) beide Rezeptoren gleichzeitig. Das Muster der Endozytose blieb indessen nach Behandlung mit dem MOR1-selektiven Agonisten DAMGO ([D-Ala²,Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-enkephalin) bei beiden Rezeptoren unverändert.

Veränderungen der Internalisierung, die aus einer Dimerisierung der Rezeptoren resultieren, wurden bereits bei anderen Somatostatin-Rezeptor-Kombinationen beschrieben. Beispielsweise endozytierten sst2 bzw. sst3 der Ratte in HEK293-Zellen gewöhnlich nach Stimulation mit eigenem, selektiven Liganden (sst2-selektiv L-779,976 bzw. sst3-selektiv L-796,778) ähnlich schnell und stark. Im Gegensatz dazu veränderte sich bei einer Koexpression der beiden Subtypen in HEK293-Zellen das Internalisierungsmuster von sst3, aber nicht das von sst2. Der sst3-Rezeptor blieb inaktiv gegenüber dem sst3-spezifischen Agonisten, d.h. an der Membranoberfläche und sst2 internalisierte unverändert nach Stimulation mit sst2-selektivem Liganden (Pfeiffer et al 2001). Das pharmakologische Verhalten des sst3-Rezeptors hat sich bei den sst2-sst3-Zellen unter dem Einfluss von sst2 anscheinend verändert. Auch humane sst1-sst5-Rezeptor-Dimere haben eine erhöhte Agonisten-Potenz und -effizienz und ebenso eine Veränderung der Agonisten-induzierten Endozytose zur Folge (Rocheville, 2000b).

Die Heterodimerisierung zwischen dem MOR1 und dem δ -Opioid-Rezeptor hatte die Entstehung einer neuen Bindungsseite und eine Veränderung der G-Protein-Kopplungseigenschaften zur Folge (George et al., 2000). Dagegen entwickeln heterodimere κ - und δ -Opioid-Rezeptoren ähnliche Ligandenbindungs- und Signaleigenschaften wie der κ_2 -Rezeptor, der im Meerschweinchenhirn gefunden wurde (Zukin et al., 1998; Jordan und Devi, 1999).

Aktivierung der mitogen-aktiveren Proteinkinase ERK1 und ERK2 (ERK1/2). Eine andere Möglichkeit, die physiologische Funktion des Rezeptors zu ermitteln, ist die Messung einer Aktivierung von ERK1/2. Zwischen einzeln exprimierten sst2A- und sst4-Rezeptoren und den koexprimierten sst2A-sst4 konnte kein Unterschied festgestellt werden. Dies korreliert mit den Internalisierungsbefunden und bestätigt die Annahme, dass bei dieser Rezeptor-Kombination zumindest in HEK293-Zellen keine funktionelle Beeinflussung zwischen sst2A und sst4 stattfindet. Im Gegensatz dazu konnte der sst3-Rezeptor infolge der Heterodimerisierung mit sst2A nach einer Exposition mit dem sst3-selektivem Agonisten (L-796,778) die ERK1/2 nicht mehr aktivieren (Pfeiffer et al., 2001).

Die Koexpression von sst2A mit MOR1 führte zu einer *Cross*-Phosphorylierung (Pfeiffer et al., 2002) und, wie diese Studie gezeigt hatte, zur *Cross*-Desensibilisierung. Nach einer längeren Präinkubation (4 h) sowohl mit dem sst2A- als auch mit dem MOR1-selektiven Agonisten desensibilisieren beide Rezeptoren gleichzeitig. Möglicherweise als Folge der Heterodimerisierung verursacht die Aktivierung von einer der beiden Bindungstaschen der Liganden einen Konformationswechsel der Rezeptoren. Dies könnte eine *Cross*-Phosphorylierung erleichtern und zur *Cross*-Desensibilisierung von beiden Rezeptoren führen. Darüber hinaus wurde für den MOR1-Rezeptor eine weitere Heterodimerisierung mit dem NK1 (Substanz-P-Rezeptor) nachgewiesen, die ebenso mit einer Veränderung der Internalisierung der Rezeptoren und Resensibilisierung der ERK1/2-Aktivität verbunden ist (Pfeiffer et al., in Druck).

4.3 Schlussbetrachtung

Bei den Somatostatin-Rezeptoren gibt es zwei natürliche Liganden (ss-14 und ss-28), welche an die fünf Subtypen in verschiedenen Oligomeren binden können. Dazu kommen Cortistatin 14 und 29, die ebenso an die Somatostatin-Rezeptoren binden (Siehler et al., 1998; Dalm et al., 2003). Durch die Heterodimerisierung entsteht eine Vielfalt an Rezeptor-Kombinationen, die sich funktionell in den Signalkaskaden unterscheiden können. Vermutlich spielt der sst2A-Rezeptor dabei eine wichtige Rolle, weil dieser sowohl in Tumorzellen (Patel, 1999; de Herder und Lamberts, 2002) als

auch im Normalgewebe häufig vorkommt. Im Gegensatz dazu ist die Expression anderer Subtypen weniger dominant. Im ZNS und in der Peripherie wurden sst2A- und sst3-Subtypen nachgewiesen (Schulz et al., 1998a b; Händel et al., 1999; Patel 1999). Darüber hinaus wird sst2A mit sst5 in der Hypophyse und mit sst4 in kortikalen Pyramidenzellen koexprimiert (Schulz et al., 1998a; Schreff et al., 2000; Schulz et al., 2000). Obwohl sst4 und sst2B in denselben kortikalen Pyramidenzellen exprimiert werden, befindet sich der sst2B an der Plasmamembran des Somas und der Dendriten der Pyramidenzellen, wohingegen der sst4 eher intrazellulär lokalisiert ist (Schulz et al., 1998b; Schindler 1999). Die Dimerisierung setzt jedoch eine unmittelbare Nachbarschaft der Rezeptoren voraus. Aber an der Plasmamembran sind wegen der hier nachgewiesenen konstitutiven Internalisierung keine physiologischen Veränderungen der Rezeptoreigenschaften möglich. Andererseits gibt es Hinweise, dass es im anderen Gewebe doch zwischen sst2 und sst4 zur funktionellen Kopplung kommt, beispielsweise im Hippokampus der Maus (Moneta et al., 2002) oder beim humanen Prostatakrebs (Hansson et al., 2002). Es wäre daher denkbar, dass die physiologischen Konsequenzen der Heterodimerisierung bei sst2-sst4 spezies- oder zellartabhängig sind.

Möglicherweise spielt bei der Internalisierung in diesem Fall die Anwesenheitsdauer der Rezeptoren an der Plasmamembran eine Rolle. Wenn ein Rezeptor wie sst4 stark konstitutiv internalisiert, bleibt er vielleicht zu kurz an der Membran (Abb. 29, gelber Rezeptor), um von dem sst2A-Rezeptor beeinflusst zu werden bzw. diesen zu beeinflussen (Abb. 29, roter Rezeptor). Das könnte eine Ursache dafür sein, dass es bei der Kombination sst2A-sst4 zu keiner Änderung der Rezeptoreigenschaften kommt, obwohl sie sich als Heterodimere isolieren lassen. Dagegen internalisiert der MOR1 (Abb. 29, grüner Rezeptor) kaum konstitutiv, sondern erst nach einer Agonistenstimulation. Aus diesem Grund verweilen im nativen Zustand die MOR1-Rezeptoren wesentlich länger an der Plasmamembran als die sst4-Rezeptoren. Dies kann vielleicht zu einer stärkeren Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren führen, die die physiologischen Veränderungen der Rezeptoreigenschaften begünstigen kann. So eine Verstärkung der Interaktionen könnte, ähnlich wie bei den metabotropen Glutamat-Rezeptoren, durch intrazellulär interagierende Proteine (Homer) modifiziert werden (Xiao et al., 1998). Diese binden an die C-terminalen Enden der Rezeptoren und als bimodulare Adapter *crosslinken* sie miteinander oder mit anderen Proteinen. Dadurch

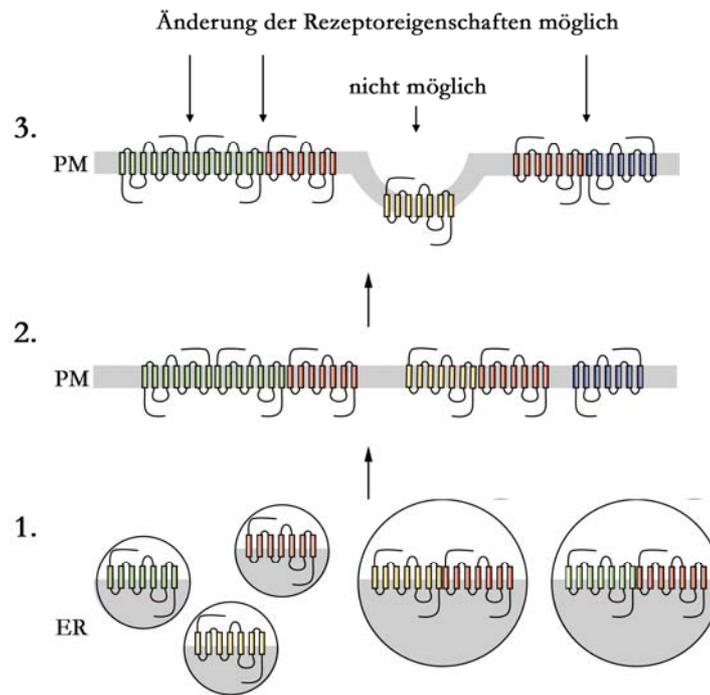


Abb. 29: Schematische Erklärung für die fehlenden physiologischen Konsequenzen beim sst2A-sst4-Heterodimer (sst2A - rot, sst4 - gelb, MOR1 - grün). **1:** Die Rezeptoren werden aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) als Mono- oder Dimere an die Plasmamembran (PM) in den Vesikeln befördert (die Größe der Vesikel hat hier keine Bedeutung). **2:** Dort bilden die Rezeptoren oligomere Formationen. **3:** Bei Rezeptoren, die wegen der konstitutiven Internalisierung zu kurz an der Membran verweilen, wie z.B. der hier untersuchte sst4 (gelb), hat die Heterodimerisierung für die Rezeptoreigenschaften keine funktionellen Folgen (Koimmunpräzipitation ist wahrscheinlich nur möglich, wenn die Dimerisierung im ER stattfindet). Anders bei heterodimeren sst2A-MOR1-Rezeptoren (rot-grün), bei denen eine Veränderung der Internalisierung und eine *Cross*-Desensibilisierung nachgewiesen wurde.

kann die postsynaptische Plastizität beeinflusst werden. Das würde für eine zellartspezifische Regulierung oder Verstärkung der Dimerisierung sprechen.

Es gibt eine ganze Reihe von Zellsystemen, in denen zwei oder mehr GPCR-Arten natürlicherweise koexprimiert werden. Dazu gehört beispielsweise die AtT20-Zelllinie (Hypophysentumor, Maus), bei welcher sst2 und sst5 kolokalisiert sind. Außerdem sind viele weitere Tumor-Zelllinien bekannt (z.B. pankreatische AR42J, Brustkrebs MCF7), die typischerweise mehrere Subtypen der Somatostatin-Rezeptoren gleichzeitig exprimieren. Bezugnehmend auf die hier vorgestellten Befunde reicht jedoch die Kolokalisation nicht aus, um auf eventuelle funktionelle Kopplungen zwischen den Rezeptoren schließen zu können.

Bei den sst2A-MOR1-Heterodimeren wurde in dieser Arbeit, im Gegensatz zu den sst2A-sst4-Heterodimeren, auch eine physiologische Konsequenz der Dimerisierung in den HEK293-Zellen gezeigt. Die Kombination sst2A-MOR1 ließ sich *in vivo* im Locus

Coeruleus nachweisen, wo ähnliche Folgen der Dimerisierung vermutet werden (Pfeiffer, 2002). Auch andere Studien deuten auf die Koexistenz und funktionelle Interaktionen zwischen sst2A und MOR1 hin (Schulz et al., 1998a, b).

Der MOR1-Rezeptor steht auch noch mit anderen GPCR in einer räumlichen und funktionellen Beziehung, wie beispielsweise mit dem NK1-Rezeptor, einem Haupt-Rezeptor der Substanz-P (Pfeiffer et al., in Druck) mit dem er auch *in vivo* kolokalisiert ist (Aicher et al., 2000a, b).

Ferner könnten auch genetische Faktoren für die Dimerisierung von Bedeutung sein, denn schon geringe Veränderungen der DNA- bzw. Aminosäuren-Sequenzen in der Rezeptor-Struktur könnten den Dimerisierungsvorgang beeinflussen. Beispielsweise könnte ein Polymorphismus, der sich bei dem humanen sst5-Subtyp im Zusammenhang mit BPAD (*bipolar affective disorder*) nachweisen ließ (Leu⁴⁸Met, Ala⁵²Val, Pro¹⁰⁹Ser und Pro³³⁵Leu), auch bei der Heterodimerisierung mit dem D2-Rezeptor eine Rolle spielen (Rocheville 2000a; Nyegaard et al., 2002).

Darüber hinaus zeigen Tumoren wie zum Beispiel Akromegalie (sst2 und sst5), die auf Oktreotid ansprechen, selbst nach langjähriger Behandlung keine Resistenz. Karzinoide dagegen, die vorwiegend sst2, sst1 und sst5 exprimieren, weisen nach 2-3 Jahren Behandlungsdauer Resistenzen auf. Verschiedene Dimerisierungsmöglichkeiten unter den Rezeptoren könnten die unterschiedliche Toleranzentwicklung bei den zwei Tumorarten erklären.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass bei den hier nachgewiesenen elf Heterodimer-Kombinationen eine konstitutive Dimerisierung mit dem sst2A-Rezeptor in HEK293-Zellen stattfindet. Die hier gewonnenen Erkenntnisse lassen die Vermutung zu, dass die GPCR in der Plasmamembran universell eine lange Doppelreihe aus Rezeptordimeren bilden, die schließlich oligomere Ketten ergeben. Infolgedessen kann diese physikalische Nähe der Rezeptoren zu verschiedenen physiologischen Konsequenzen führen, die je nach Dimerkombination individuell und unterschiedlich sind. Die Homologie der Dimerisierungspartner spielt dabei keine Rolle. Es ist daher zu vermuten, dass es weitere spezies- oder zellartsspezifische Mechanismen gibt, die die Heterodimerisierung und ihre Konsequenzen regulieren.

5 LITERATUR

- Aicher SA, Punnoose A, Goldberg A. mu-Opioid receptors often colocalize with the substance P receptor (NK1) in the trigeminal dorsal horn. *J Neurosci.* 2000(a);20:4345-54.
- Aicher SA, Sharma S, Cheng PY, Liu-Chen LY, Pickel VM. Dual ultrastructural localization of mu-opiate receptors and substance p in the dorsal horn. *Synapse.* 2000(b);36:12-20.
- Akbar M, Okajima F, Tomura H, Majid MA, Yamada Y, Seino S, Kondo Y. Phospholipase C activation and Ca²⁺ mobilization by cloned human somatostatin receptor subtypes 1-5, in transfected COS-7 cells. *FEBS Lett.* 1994;348:192-6.
- Allen JP, Hathway GJ, Clarke NJ, Jowett MI, Topps S, Kendrick KM, Humphrey PP, Wilkinson LS, Emson PC. Somatostatin receptor 2 knockout/lacZ knockin mice show impaired motor coordination and reveal sites of somatostatin action within the striatum. *Eur J Neurosci.* 2003;17:1881-95.
- Angers S, Salahpour A, Bouvier M. Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells. *Life Sci.* 2001;68:2243-50.
- Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairret S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:3684-9.
- Bai M, Trivedi S, Brown EM. Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem.* 1998;273:23605-10.
- Ballare E, Persani L, Lania AG, Filopanti M, Giammona E, Corbetta S, Mantovani S, Arosio M, Beck-Peccoz P, Faglia G, Spada A. Mutation of somatostatin receptor type 5 in an acromegalic patient resistant to somatostatin analog treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:3809-14.
- Breiterer DA. Morphine and somatostatin analogue reduce c-fos expression in trigeminal subnucleus caudalis produced by corneal stimulation in the rat. *Neuroscience.* 1997;77:863-74.
- Betoin F, Ardid D, Herbet A, Aumaitre O, Kemeny JL, Duchene-Marullaz P, Lavarenne J, Eschalier A. Evidence for a central long-lasting antinociceptive effect of vapreotide, an analog of somatostatin, involving an opioidergic mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;269:7-14.
- Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999;18:1723-9.
- Bourne HR, Sanders DA, McCromick F. The GPTase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 1991;349:117-127.

- Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:11151-5.
- Bünemann M, Hosey MM. G protein coupled receptor kinases as modulators of G protein signaling. *J Physiol (lond)*. 1999;517:5-23.
- Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, De Benedetti P, Goldberg SR, Fuxe K, Agnati LF, Woods AS, Ferre S, Lluís C, Bouvier M, Franco R. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization. Qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem*. 2003.
- Chan WW, Pasternak A, Yang L, Patchett AA, Smith RG, Chapman KT, Schaeffer JM. Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science*. 1998;282:737-40.
- Chen CA, Okayama H. Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques*. 1988;6:632-8.
- Chen L, Fitzpatrick VD, Vandlen RL, Tashjian AH Jr. Both overlapping and distinct signaling pathways for somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2 in pituitary cells. *J Biol Chem*. 1997;272:18666-72.
- Cheng ZJ, Harikumar KG, Holicky EL, Miller LJ. Heterodimerization of type A and B cholecystokinin receptors enhance signaling and promote cell growth. *J Biol Chem*. 2003 [in print].
- Chisholm C, Greenberg GR. Somatostatin-28 regulates GLP-1 secretion via somatostatin receptor subtype 5 in rat intestinal cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283:E311-7.
- Chuang TT, Iacovelli L, Sallese M, De Blasi A. G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17:416-421.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:2172-5.
- Claing C, Laporte SA, Caron GC, Lefkowitz RJ. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and β -arrestin proteins. *Progress in Neurobiol* 200;66:61-79.
- Coy DH, Taylor JE. Receptor-specific somatostatin analogs: correlations with biological activity. *Metabolism*. 1996;45:21-3.
- Cvejic S, Devi LA. Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem*. 1997;272:26959-64.
- Dalm VA, van Hagen PM, van Koetsveld PM, Langerak AW, van der Lely AJ, Lamberts SW, Hofland LJ. Cortistatin rather than somatostatin as a potential endogenous ligand for somatostatin receptors in the human immune system. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:270-6.
- De Herder WW, Lamberts SW. Somatostatin and somatostatin analogues: diagnostic and therapeutic uses. *Curr Opin Oncol*. 2002;14:53-7.

- De Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CL, Siggins GR, Henriksen SJ, Sutcliffe JG. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature*. 1996;381:242-5.
- Demchyshyn LL, Srikant CB, Sunahara RK, Kent G, Seeman P, Van Tol HH, Panetta R, Patel YC, Niznik HB. Cloning and expression of a human somatostatin-14-selective receptor variant (somatostatin receptor 4) located on chromosome 20. *Mol Pharmacol*. 1993;43:894-901.
- Dournaud P, Boudin H, Schonbrunn A, Tannenbaum GS, Beaudet A. Interrelationships between somatostatin sst2A receptors and somatostatin-containing axons in rat brain: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin. *J Neurosci*. 1998;18:1056-71.
- Dournaud P, Gu YZ, Schonbrunn A, Mazella J, Tannenbaum GS, Beaudet A. Localization of the somatostatin receptor SST2A in rat brain using a specific anti-peptide antibody. *J Neurosci*. 1996;16:4468-78.
- Dutour A, Kumar U, Panetta R, Ouafik L, Fina F, Sasi R, Patel YC. Expression of somatostatin receptor subtypes in human brain tumors. *Int J Cancer*. 1998;76:620-7.
- Fehmann HC, Arnold R. [Somatostatin receptors: a new pathway into the tumor] *Z Gastroenterol*. 1996;34:298-9.
- Ferguson SSG. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Ther*. 2001;53:1-24.
- Fukushima Y, Asano T, Saitoh T, Anai M, Funaki M, Ogihara T, Katagiri H, Matsuhashi N, Yazaki Y, Sugano K. Oligomer formation of histamine H2 receptors expressed in Sf9 and COS7 cells. *FEBS Lett*. 1997;409:283-6.
- Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prezeau L, Pin JP. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J*. 2001;20:2152-9.
- George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem*. 2000;275:26128-35.
- Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*. 2000;21:90-113.
- Gouldson PR, Reynolds CA. Simulations on dimeric peptides: evidence for domain swapping in G-protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans*. 1997; 25:1066-71.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977;36:59-74.
- Greenwood MT, Robertson LA, Patel YC. Cloning of the gene encoding human somatostatin receptor 2: sequence analysis of the 5'-flanking promoter region. *Gene*. 1995;159:291-2.
- Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem*. 1998;273:669-672.
- Händel M, Schulz S, Stanarius A, Schreff M, Erdtmann-Vourliotis M, Schmidt H, Wolf G, Höllt V. Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience*. 1999;89:909-26.

- Hansson J, Bjartell A, Gadaleanu V, Dizayi N, Abrahamsson PA. Expression of somatostatin receptor subtypes 2 and 4 in human benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *Prostate*. 2002;53:50-9.
- Hernandez-Delgado GP, Ventura Martinez R, Diaz Reval MI, Dominguez Ramirez AM, Lopez-Munoz FJ. Metamizol potentiates morphine antinociception but not constipation after chronic treatment. *Eur J Pharmacol*. 2002 ;441:177-83.
- Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem*. 1996;271:16384-92.
- Helboe L, Hay-Schmidt A, Stidsen CE, Moller M. Immunohistochemical localization of the somatostatin receptor subtype 2 (sst2) in the central nervous system of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Neurol*. 1999;405:247-61.
- Helboe L, Moller M, Norregaard L, Schiodt M, Stidsen CE. Development of selective antibodies against the human somatostatin receptor subtypes sst1-sst5. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;491:82-8.
- Helboe L, Stidsen CE, Moller M. Immunohistochemical and cytochemical localization of the somatostatin receptor subtype sst1 in the somatostatinergic parvocellular neuronal system of the rat hypothalamus. *J Neurosci*. 1998;18:4938-45.
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE, et al. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16:86-8.
- Hukovic N, Panetta R, Kumar U, Patel YC. Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1-5 (hSSTR1-5): subtype selective internalization or upregulation. *Endocrinology*. 1996;137:4046-9.
- Hukovic N, Panetta R, Kumar U, Rocheville M, Patel YC. 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*. 1998;273:21416-22.
- Hurst RD, Modlin IM. Use of radiolabeled somatostatin analogs in the identification and treatment of somatostatin receptor-bearing tumors. *Digestion*. 1993;54 Suppl 1: 88-91.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature*. 1998;396:674-9.
- Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*. 1999;399:697-700.
- Jordan BA, Trapaidze N, Gomes I, Nivarthi R, Devi LA. Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:343-8.
- Kamiya T, Saitoh O, Yoshioka K, Nakata H. Oligomerization of adenosine A2A and dopamine D2 receptors in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306: 544-9.

- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*. 1998;396:683-7.
- Klco JM, Lassere TB, Baranski TJ. C5a receptor oligomerization. I. Disulfide trapping reveals oligomers and potential contact surfaces in a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 2003;278:35345-53.
- Kluxen FW, Bruns C, Lubbert H. Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:4618-22.
- Koenig JA, Edwardson JM. Intracellular trafficking of the muscarinic acetylcholine receptor: importance of subtype and cell type. *Mol Pharmacol*. 1996;49:351-9.
- Kolakowski LF Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels*. 1994;21-7.
- Kreienkamp HJ, Roth A, Richter D. Rat somatostatin receptor subtype 4 can be made sensitive to agonist-induced internalization by mutation of a single threonine (residue 331). *DNA Cell Biol*. 1998;17:869-78.
- Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC. Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science*. 1999;283:74-7.
- Lamberts SW, de Herder WW, Hofland LJ. Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13:451-7.
- Lamberts SW, de Herder WW, Kwekkeboom DJ, vd Lely AJ, Nobels FR, Krenning EP. Current tools in the diagnosis of pituitary tumours. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1993;129 Suppl 1:6-12.
- Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. Somatostatin analogs: future directions. *Metabolism*. 1996;45:104-6.
- Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestin in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*. 1998;273:18677-18680.
- Liang Y, Fotiadis D, Filipek S, Saperstein DA, Palczewski K, Engel A. Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J Biol Chem*. 2003;278:21655-62.
- Liu-Chen LY, Chen C, Phillips CA. Beta-[3H]funaltrexamine-labeled mu-opioid receptors: species variations in molecular mass and glycosylation by complex-type, N-linked oligosaccharides. *Mol Pharmacol*. 1993;44:749-56.
- Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:177-83.
- Maggio R, Barbier P, Colelli A, Salvadori F, Demontis G, Corsini GU. G protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;291:251-7.
- Maggio R, Vogel Z, Wess J. Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:3103-7.

- Maggio R, Vogel Z, Wess J. Reconstitution of functional muscarinic receptors by co-expression of amino- and carboxyl-terminal receptor fragments. *FEBS Lett.* 1993;319:195-200.
- Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.* 1970;53:159-62.
- Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron.* 2000;27:97-106.
- McLawhon RW, Cermak D, Ellory JC, Dawson G. Glycosylation-dependent regulation of opiate (enkephalin) receptors in neurotumor cells. *J Neurochem.* 1983;41:1286-96.
- McVey M, Ramsay D, Kellett E, Rees S, Wilson S, Pope AJ, Milligan G. Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J Biol Chem.* 2001;276:14092-9. Epub 2001 Jan 22.
- Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Dournaud P, Dutar P, Billard JM, Carlo AS, Viollet C, Hannon JP, Fehlmann D, Nunn C, Hoyer D, Epelbaum J, Vezzani A. Somatostatin receptor subtypes 2 and 4 affect seizure susceptibility and hippocampal excitatory neurotransmission in mice. *Eur J Neurosci.* 2002;16:843-9.
- Montminy MR, Goodman RH, Horovitch SJ, Habener JF. Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:3337-40.
- Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS. Mammalian sweet taste receptors. *Cell.* 2001;106:381-90.
- Ng GY, Clark J, Coulombe N, Ethier N, Hebert TE, Sullivan R, Kargman S, Chateaufneuf A, Tsukamoto N, McDonald T, Whiting P, Mezey E, Johnson MP, Liu Q, Kolakowski LF Jr, Evans JF, Bonner TI, O'Neill GP. Identification of a GABAB receptor subunit, gb2, required for functional GABAB receptor activity. *J Biol Chem.* 1999;274:7607-10.
- Ng GY, O'Dowd BF, Lee SP, Chung HT, Brann MR, Seeman P, George SR. Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;227:200-4.
- Nimchinsky EA, Hof PR, Janssen WG, Morrison JH, Schmauss C. Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. *J Biol Chem.* 1997;272:29229-37.
- Nouel D, Gaudriault G, Houle M, Reisine T, Vincent JP, Mazella J, Beaudet A. 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.* 1997;138:296-306.
- Nyegaard M, Borglum AD, Bruun TG, Collier DA, Russ C, Mors O, Ewald H, Kruse TA. Novel polymorphisms in the somatostatin receptor 5 (SSTR5) gene associated with bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry.* 2002;7:745-54.
- O'Carroll AM, Lolait SJ, Konig M, Mahan LC. Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol Pharmacol.* 1992;42:939-46.

- Overton MC, Blumer KJ. The extracellular N-terminal domain and transmembrane domains 1 and 2 mediate oligomerization of a yeast G protein-coupled receptor. *J Biol Chem.* 2002;277:41463-72.
- Ozenberger BA, Hadcock JR. A single amino acid substitution in somatostatin receptor subtype 5 increases affinity for somatostatin-14. *Mol Pharmacol.* 1995;47:82-7.
- Pace AJ, Gama L, Breitwieser GE. Dimerization of the calcium-sensing receptor occurs within the extracellular domain and is eliminated by Cys → Ser mutations at Cys101 and Cys236. *J Biol Chem.* 1999;274:11629-34.
- Panetta R, Greenwood MT, Warszynska A, Demchyshyn LL, Day R, Niznik HB, Srikant CB, Patel YC. Molecular cloning, functional characterization, and chromosomal localization of a human somatostatin receptor (somatostatin receptor type 5) with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol Pharmacol.* 1994;45:417-27.
- Patel YC, Galanopoulou AS, Rabbani SN, Liu JL, Ravazzola M, Amherdt M. Somatostatin-14, somatostatin-28, and prosomatostatin[1-10] are independently and efficiently processed from prosomatostatin in the constitutive secretory pathway in islet somatostatin tumor cells (1027B2). *Mol Cell Endocrinol.* 1997(a);131:183-94.
- Patel YC, Greenwood M, Panetta R, Hukovic N, Grigorakis S, Robertson LA, Srikant CB. Molecular biology of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism.* 1996;45:31-8.
- Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB. The somatostatin receptor family. *Life Sci.* 1995;57:1249-65.
- Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, Panetta R, Srikant CB. All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994(a);198:605-12.
- Patel YC, Srikant CB. Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). *Endocrinology.* 1994(b);135:2814-7.
- Patel YC. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest.* 1997(b);20:348-67.
- Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20:157-98.
- Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Klutzny M, Kirscht S, Kreienkamp HJ, Höllt V, Schulz S. Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). *J Biol Chem.* 2001;276:14027-36.
- Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Laugsch M, Höllt V, Schulz S. Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem.* 2002;277:19762-72.
- Pfeiffer M, Kirscht S, Stumm R, Koch T, Wu D, Laugsch M, Schröder H, Höllt V, Schulz S (2003). Heterodimerization of substance P and mu-opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization. *J Biol Chem.* 2003 [in print].
- Polakiewicz RD, Schieferl SM, Dorner LF, Kansra V, Comb MJ. A mitogen-activated protein kinase pathway is required for mu-opioid receptor desensitization. *J Biol Chem.* 1998;273:12402-6.

- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* 1992;11:1-20.
- Reichlin S. Somatostatin (second of two parts). *N Engl J Med.* 1983(a);309:1556-63.
- Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med.* 1983(b);309:1495-501.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science.* 2000(a);288:154-7.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem.* 2000(b);275:7862-9.
- Rohrer L, Raulf F, Bruns C, Buettner R, Hofstaedter F, Schule R. Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:4196-200.
- Rohrer SP, Birzin ET, Mosley RT, Berk SC, Hutchins SM, Shen DM, Xiong Y, Hayes EC, Parmar RM, Foor F, Mitra SW, Degrado SJ, Shu M, Klopp JM, Cai SJ, Blake A, Chan WW, Pasternak A, Yang L, Patchett AA, Smith RG, Chapmann KT, Schaffner JM. Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science.* 1998;282:737-740.
- Romano C, Yang WL, O'Malley KL. Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem.* 1996;271:28612-6.
- Roosterman D, Roth A, Kreienkamp HJ, Richter D, Meyerhof W. Distinct agonist-mediated endocytosis of cloned rat somatostatin receptor subtypes expressed in insulinoma cells. *J Neuroendocrinol.* 1997;9:741-51.
- Roth A, Kreienkamp HJ, Meyerhof W, Richter D. 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.* 1997(a);272:23769-74.
- Roth A, Kreienkamp HJ, Nehring RB, Roosterman D, Meyerhof W, Richter D. Endocytosis of the rat somatostatin receptors: subtype discrimination, ligand specificity, and delineation of carboxy-terminal positive and negative sequence motifs. *DNA Cell Biol.* 1997(b);16:111-9.
- Sakanaka C, Ferby I, Waga I, Bito H, Shimizu T. 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.* 1994;205:18-23.
- Salim K, Fenton T, Bacha J, Urien-Rodriguez H, Bonnert T, Skynner HA, Watts E, Kerby J, Heald A, Beer M, McAllister G, Guest PC. Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation. *J Biol Chem.* 2002;277:15482-5.
- Sarret P, Botto JM, Vincent JP, Mazella J, Beaudet A. Preferential expression of sst2A over sst2B somatostatin receptor splice variant in rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology.* 1998;68:37-43.
- Sasi R, Puebla L, Khare S, Patel YC. Polymorphism in the 5' flanking region of the human somatostatin receptor subtype 5. *Gene.* 1998;214:45-9.

- Schindler M, Holloway S, Hathway G, Woolf CJ, Humphrey PP, Emson PC. Identification of somatostatin sst2(a) receptor expressing neurones in central regions involved in nociception. *Brain Res.* 1998(a);798:25-35.
- Schindler M, Humphrey PP, Lohrke S, Friauf E. Immunohistochemical localization of the somatostatin sst2(b) receptor splice variant in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 1999;90:859-74.
- Schindler M, Kidd EJ, Carruthers AM, Wyatt MA, Jarvie EM, Sellers LA, Feniuk W, Humphrey PP. Molecular cloning and functional characterization of a rat somatostatin sst2(b) receptor splice variant. *Br J Pharmacol.* 1998(b);125:209-17.
- Schindler M, Sellers LA, Humphrey PP, Emson PC. Immunohistochemical localization of the somatostatin SST2(A) receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience.* 1997;76:225-40.
- Schonbrunn A. Somatostatin receptors present knowledge and future directions. *Ann Oncol.* 1999;10 Suppl 2:S17-21.
- Schreff M, Schulz S, Handel M, Keilhoff G, Braun H, Pereira G, Klutzny M, Schmidt H, Wolf G, Höllt V. Distribution, targeting, and internalization of the sst4 somatostatin receptor in rat brain. *J Neurosci.* 2000;20:3785-97.
- Schulz A, Grosse R, Schultz G, Gudermann T, Schoneberg T. Structural implication for receptor oligomerization from functional reconstitution studies of mutant V2 vasopressin receptors. *J Biol Chem.* 2000;275:2381-9.
- Schulz S, Handel M, Schreff M, Schmidt H, Höllt V. Localization of five somatostatin receptors in the rat central nervous system using subtype-specific antibodies. *J Physiol Paris.* 2000(a);94:259-64.
- Schulz S, Pauli SU, Schulz S, Handel M, Dietzmann K, Firsching R, Höllt V. Immunohistochemical determination of five somatostatin receptors in meningioma reveals frequent overexpression of somatostatin receptor subtype sst2A. *Clin Cancer Res.* 2000(b);6:1865-74.
- Schulz S, Schmidt H, Handel M, Schreff M, Höllt V. Differential distribution of alternatively spliced somatostatin receptor 2 isoforms (sst2A and sst2B) in rat spinal cord. *Neurosci Lett.* 1998(a);257:37-40.
- Schulz S, Schreff M, Schmidt H, Handel M, Przewlocki R, Höllt V. Immunocytochemical localization of somatostatin receptor sst2A in the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci.* 1998(b);10:3700-8.
- Schweitzer P, Madamba S, Siggins GR. Arachidonic acid metabolites as mediators of somatostatin-induced increase of neuronal M-current. *Nature.* 1990;346:464-7.
- Sharma K, Srikant CB. Induction of wild-type p53, Bax, and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 1998;76:259-66.
- Shen LP, Rutter WJ. Sequence of the human somatostatin I gene. *Science.* 1984;224:168-71.
- Siehler S, Seuwen K, Hoyer D. [125I]Tyr10-cortistatin14 labels all five somatostatin receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998;357:483-9.

- Smalley KS, Feniuk W, Humphrey PP. Differential agonist activity of somatostatin and L-362855 at human recombinant sst4 receptors. *Br J Pharmacol.* 1998;125:833-41.
- Smalley KS, Koenig JA, Feniuk W, Humphrey PP. Ligand internalization and recycling by human recombinant somatostatin type 4 (h sst(4)) receptors expressed in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol.* 2001;132:1102-10.
- Spier AD, de Lecea L. Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;33:228-41.
- Stroh T, Kreienkamp HJ, Beaudet A. Immunohistochemical distribution of the somatostatin receptor subtype 5 in the adult rat brain: predominant expression in the basal forebrain. *J Comp Neurol.* 1999;412:69-82.
- Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C, Bouvier M. Oxytocin and Vasopressin V1a and V2 Receptors Form Constitutive Homo- and Heterodimers during Biosynthesis. *Mol Endocrinol.* 2003;17:677-91.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *1979;76:4350-4354.*
- Vanegas H, Tortorici V. Opioidergic effects of nonopioid analgesics on the central nervous system. *Cell Mol Neurobiol.* 2002;22:655-61.
- Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Höllt V. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *FEBS Lett.* 1992;311:290-4.
- Vanetti M, Vogt G, Höllt V. 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.* 1993;331:260-6.
- Vanetti M, Ziolkowska B, Wang X, Horn G, Höllt V. mRNA distribution of two isoforms of somatostatin receptor 2 (mSSTR2A and mSSTR2B) in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994;27:45-50.
- Ward DT, Brown EM, Harris HW. Related Articles, Disulfide bonds in the extracellular calcium-polyvalent cation-sensing receptor correlate with dimer formation and its response to divalent cations in vitro. *J Biol Chem.* 1998;273:14476-83.
- Wise A, Green A, Main MJ, Wilson R, Fraser N, Marshall FH. Calcium sensing properties of the GABA(B) receptor. *Neuropharmacology.* 1999;38:1647-56.
- Xiao B, Tu JC, Petralia RS, Yuan JP, Doan A, Breder CD, Ruggiero A, Lanahan AA, Wenthold RJ, Worley PF. Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron.* 1998;21:701-716.
- Xu Y, Song J, Bruno JF, Berelowitz M. Molecular cloning and sequencing of a human somatostatin receptor, hSSTR4. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993(a);193:648-52.
- Xu Y, Song J, Bruno JF, Berelowitz M. Molecular cloning and sequencing of a human somatostatin receptor, hSSTR4. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993(b);193:648-52.
- Yamada Y, Kagimoto S, Kubota A, Yasuda K, Masuda K, Someya Y, Ihara Y, Li Q, Imura H, Seino S, et al. Cloning, functional expression and pharmacological characterization of a fourth (hSSTR4) and a fifth (hSSTR5) human somatostatin receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;195:844-52.

- Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992(a);89:251-5.
- Yamada Y, Reisine T, Law SF, Ihara Y, Kubota A, Kagimoto S, Seino M, Seino Y, Bell GI, Seino S. Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase. *Mol Endocrinol*. 1992(b);6:2136-42.
- Yang H, Lu D, Raizada MK. Angiotensin II-induced phosphorylation of the AT1 receptor from rat brain neurons. *Hypertension*. 1997;30:351-7.
- Yasuda K, Rens-Domiano S, Breder CD. Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylylcyclase. *J Biol Chem*. 1992;267:20422-8.
- Zitzer H, Richter D, Kreienkamp HJ. Agonist-dependent interaction of the rat somatostatin receptor subtype 2 with cortactin-binding protein 1. *J Biol Chem*. 1999(a);274:18153-6.
- Zitzer H, Hönck HH, Bächner D, Richter D, Kreienkamp HJ. Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain. *J Biol Chem*. 1999(b);274:32997-33001.
- Zukin RS, Eghbali M, Olive D, Unterwald EM, Tempel A. Characterization and visualization of rat and guinea pig brain kappa opioid receptors: evidence for kappa 1 and kappa 2 opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:4061-4065.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Beim Menschen und anderen Säugetieren gibt es fünf Somatostatin-Rezeptor-Subtypen (sst1-sst5), die zur großen Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) der Klasse I (rhodopsin-ähnliche) gehören. Sie sind verantwortlich für die von Somatostatin ausgehende Signaltransduktion und sind an der Regulierung der Sekretion von Wachstums- und weiteren Peptidhormonen beteiligt.

Neuere Literaturbefunde zeigen, dass sowohl die Somatostatin-Rezeptoren als auch andere GPCR nicht nur als monomere Funktionseinheiten, sondern als dimere oder oligomere Einheiten existieren. Bisher wurden allerdings hauptsächlich phylogenetisch nahe verwandte Rezeptorkombinationen getestet. Daher wurde in dieser Arbeit erstmals die Heterodimerisierung von Somatostatin-Rezeptoren (sst2A) der Ratte mit verschiedenen GPCR systematisch untersucht. Hierfür wurden sst2A-exprimierende HEK293-Zellen zusätzlich mit den Subtypen sst1-5 sowie mit dem MOR1-Rezeptor, der ebenso zur Klasse I, jedoch zur Opioid-Familie gehört, transfiziert. Weiterhin wurden sst2A-Zellen mit Vertretern anderer GPCR-Klassen transfiziert (Vasoaktiven Intestinal-Peptid-Rezeptoren: VPAC1, VPAC2, Neurotensin-Rezeptoren: NT1, NT2 der Klasse II, metabotropen Glutamat-Rezeptoren: mGluR1 und mGluR5 der Klasse III). Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob Rezeptoren unter diesen Bedingungen miteinander dimerisieren und ob die phylogenetische Entfernung zwischen den Rezeptoren dabei eine Rolle spielt. Zunächst wurde die Homodimerisierung des sst2A-Rezeptors und die Heterodimerisierung von sst2A mit MOR1 in lebenden HEK293-Zellen mittels BRET (Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer) und an isolierten Rezeptoren durch Koimmunpräzipitation (Ko-IP) nachgewiesen. Ferner konnte nach Ko-IP im Immunoblot gezeigt werden, dass sich alle der hier untersuchten Kombinationen sst2A-T7-X (X= sst1, sst2, sst3, sst4, sst5, VPAC1, VPAC2, NT1, NT2, mGluR1 und mGluR5) unabhängig von der GPCR-Klasse mit dem sst2A-Subtyp als Heterodimere kopräzipitieren ließen (Ko-IP).

Darüber hinaus wurde exemplarisch bei den Heterodimeren sst2A-sst4 und sst2A-MOR1 nach dimerisierungsbedingten funktionellen Veränderungen gesucht, weil die in der Literatur bisher beschriebenen Heterodimere oft veränderte Rezeptoreigenschaften

zeigten. In dieser Arbeit wurde mittels Immunzytochemie und Konfokalmikroskopie die agonisten-induzierte Endozytose (Internalisierung) und im Immunoblot die Aktivierung der mitogen-aktivierten-Kinase ERK1 und ERK2 bestimmt.

Obwohl die Heterodimere sst2A-sst4 in Abwesenheit von Agonisten an der Plasmamembran kolokalisiert waren, verhielten sich beide Rezeptoren, verglichen mit der sst2- und sst4-Zelllinie, unverändert. Der sst2-Rezeptor internalisierte ausschließlich nach Exposition mit dem sst2-selektiven Liganden L-779,976 und blieb von dem sst4 selektiven Liganden L-803,087 unbeeinflusst. Dagegen internalisierte der sst4-Rezeptor lediglich konstitutiv, unabhängig von einer Stimulation. Auch im Fall der Aktivierung von ERK1/2 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen einzeln exprimierten sst2A- und sst4-Rezeptoren und den koexprimierten sst2A-sst4-Rezeptoren festgestellt werden, obwohl sich diese als Heterodimere mittels Ko-IP isolieren ließen.

Im Gegensatz dazu veränderte sich signifikant das Internalisierungsmuster von sst2A nach einer Koexpression mit MOR1 im Vergleich zu einzeln exprimierten sst2A-Zellen. In der Abwesenheit von Agonisten befanden sich die einzeln exprimierten sst2A- und MOR1-Rezeptoren an der Plasmamembran. Sie endozytierten ausschließlich nach einer Stimulation mit eigenen spezifischen Agonisten. Bei der Koexpression von beiden Rezeptoren internalisierte MOR1 weiterhin nur nach Behandlung mit MOR1-selektiven DAMGO ([D-Ala²,Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-enkephalin) unverändert. Jedoch nach einer Stimulation mit dem sst2A-spezifischen Liganden L-779,976 internalisierten beide Rezeptoren zusammen. Darüber hinaus wurde eine *Cross*-Desensibilisierung der Aktivierung von ERK1/2 bei dieser Kombination nachgewiesen. Dabei desensibilisierten signifikant beide Rezeptoren nach einer Präinkubation (4 h) mit L-779,976 oder DAMGO und konnten anschließend mit den eigenen Agonisten nicht mehr stimuliert werden.

Die Experimente zeigen, dass Heterodimerisierung des sst2A ein häufiges Phänomen ist, jedoch nicht immer zur Modulation der Rezeptoreigenschaften führen muss. Dabei spielt der phylogenetische Verwandtschaftsgrad vermutlich keine Rolle. Wahrscheinlich bilden alle GPCR in der Plasmamembran lange oligomere Doppelketten, aus denen unterschiedliche physiologische Konsequenzen resultieren können. Möglicherweise gibt es zusätzliche gewebe- bzw. zellspezifische Mechanismen, die die Heterodimerisierung und ihre Konsequenzen regulieren.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen und Dimensionen

Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-sulfonat)
AMP, ADP, ATP	Adenosin-5'-mono-, -di-, triphosphat
AS	Aminosäuren
BBS	BES-gepufferte Lösung
BCA	Bicinchoninsäure
BES	N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminosulfonsäure
°C	Grad Celsius
ca.	cirka
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	kombinatorische Desoxyribonukleinsäure (<i>copy</i> DNA)
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxyterminus
Cy3	Cyanin 3.18
Cy5	Cyanin 5.18
DAMGO	[D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly-ol ⁵]-Enkephalin
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	extrazellulär regulierte <u>K</u> inase

et al.	und Kollegen
fmol	Femtomol
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
g	Gravitationskonstante (9,81 m/s ²)
G418	Geneticinsulfat
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GDP, GTP	Guanosin-5'-di-, -triphosphat
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEK293-Zellen	humane embryonale Nieren-293 Zellen
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl-1-piperazinyl)]-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertoni
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure, Boten-Ribonukleinsäure
N	Normal
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-Terminus	Aminoterminus
OD _{x nm}	Optische Dichte bei $\lambda = x$ nm

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer Logarithmus der Protonenkonzentration
POD	Meerrettich-Peroxidase
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss14	Somatostatin 14
ss28	Somatostatin 28
sst1-ss5	Somatostatin-Rezeptor 1 bis 5
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TPBS	Tris- und Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
V	Volt
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

7.2 Lebenslauf

Name:	Magdalena, Maria Laugsch, geb. Czechoska
Geboren:	06.04.68 in Posen/Polen
Staatsangehörigkeit:	polnisch
15.10.01 bis 16.12.03	Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg: <i>Untersuchungen zur Dimerisierung von Somatostatin-Rezeptoren mit anderen G-Proteingekoppelten Rezeptoren</i>
15.04.01 bis 30.05.03	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
01.10.00 bis 01.04.01	Mitarbeiterin der Abteilung: Forschung und Entwicklung bei esparma GmbH, Magdeburg,
02.06.99 bis 05.06.00	Anfertigung der Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Universität zu Köln: <i>Vergleichende Untersuchungen zur Embryogenese von Nematoden der Familie Rhabditidae: zygotische Transkription, Teilungspolarität und Darm-Spezifikation</i> , Abschluss Diplom
15.10.95 bis 05.06.00	Hauptstudium der Biologie an der Universität zu Köln, mit den Schwerpunkten: Genetik, Zoologie, Organische Chemie
15.10.93 bis 30.09.95	Grundstudium der Biologie an der Technischen Universität zu Braunschweig, Abschluss: Vordiplom
15.10.92 bis 30.09.93	Studium der Mineralogie an der Universität Hannover
01.09.91 bis 25.06.92	Studienkolleg an der Universität Hannover, Abschluss: Feststellungsprüfung für die Zulassung zum Studium an den Deutschen Hochschulen
01.09.89 bis 30.04.90	Deutsch-Intensiv-Sprachkurs: Gesellschaft zur Förderung Berufsspezifischer Ausbildung e.V., Hannover
01.09. 88	Einreise in die Bundesrepublik Deutschland
01.09.81 bis 25.05.87	Sportgymnasium Posen, Polen, Abschluss: Abitur
01.09.75 bis 30.06.81	Staatliche Ballettschule Posen, Polen

7.3 Wissenschaftliche Vorleistungen

Veröffentlichungen

1. M. Pfeiffer, T. Koch, H. Schröder, **M. Laugsch**, Volker Höllt and Stefan Schulz (2002) Heterodimerisation of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalisation and desensitization. *J Biol Chem* 277:19762-72
2. Pfeiffer M, Kirscht S, Stumm R, Koch T, Wu D, **Laugsch M**, Schröder H, Höllt V, Schulz S (2003). Heterodimerization of substance P and mu-opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization. *J Biol Chem*. 2003 [in print]
3. **M. Laugsch** and Einhard Schierenberg (2003) Differences in maternal supply and early development of closely related nematode species. [manuscript submitted to *International Journal of developmental Biology*].

Posterpräsentationen

1. **M.Laugsch**, M. Pfeiffer T. Koch, H. Schröder, Volker Höllt and Stefan Schulz (2002) Consequences of heterodimerisation of opioid and somatostatin receptors; *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*; Supplement 1 to Vol.365: R 21

7.4 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Volker Höllt danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die Ermöglichung meiner Dissertation und die hilfreichen Diskussionen.

Vor allem aber danke ich Herrn Dr. Stefan Schulz, der das Thema in seinem Ursprung formulierte und mir anvertraute. Er stand mir bei allen theoretischen sowie praktischen Problemen hilfreich zur Seite. Die anregenden und konstruktiven Diskussionen sowie die Betreuung meiner Arbeit waren mir immer von großer Hilfe.

Für die Einarbeitung in die biochemischen Analysen möchte ich mich bei Frau Dr. Manuela Pfeiffer und bei Frau Evelyn Kahl für die Einführung in die Zellkultur bedanken. Zudem schulde ich Herrn Dr. Thomas Koch großen Dank für die Einweihung in die speziellen Geheimnisse der Molekularbiologie und für viele hilfreiche Tipps. Für die praktische Unterstützung bei meiner Arbeit danke ich Diana Gericke und Dana Mayer, die mir gerade in solchen Momenten hilfreich waren, wenn man am liebsten vier Hände gehabt hätte.

Kolleginnen und Kollegen des Institutes, insbesondere Sandra, Sabrina, Andrea, Lars und Uta, gilt mein Dank für die kommunikative und lustige Arbeitsatmosphäre.

Allen meinen Freunden, vor allem Diana Gericke, Kerstin Borgwardt, Veronika Knapstein und Karen Schröder gilt mein besonderer Dank für die Aufmunterungen, Tipps zur Textverarbeitung oder Korrekturen des Textes. Winfried Weiler danke ich für das unermüdliche und schnelle Korrekturlesen des ganzen Manuskriptes. Für die tiefgehenden Diskussionen, die mir geholfen haben, mich immer wieder von neuem zu motivieren, danke ich Susanne Ammon-Treiber. Mein Dank für die freundschaftliche Hilfe bei medizinischen Fachproblemen und gegenseitige Unterstützung in "guten und in schlechten Zeiten", gilt auch Katharina Bartsch und Antje Widera. Bei Jutta Meier möchte ich mich dafür bedanken, dass sie in den für mich „schwierigen Zeiten“ zum großen Teil die Betreuung und Organisation des MuLiNa-Projektes übernommen hat, wodurch ich mich besser auf meine Dissertation konzentrieren konnte. An dieser Stelle danke ich Conny und Ronald Schmidt für die Hilfeleistung, sei es bei Kinderbetreuung, als „PC-Ausleih“ oder „Computer-Notdienst“. Ohne deren Unterstützung wäre mir die Beendigung meiner schriftlichen Arbeit nicht möglich.

Meinem Freund David Heinze danke ich nicht nur für die grafische Unterstützung, sondern auch für seinen Zuspruch, unserem Sohn Adrian für seine Geduld und für die Kraft, die er mir allein durch sein Dasein gegeben hat.

Besonders dankbar bin ich meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung, die mir einige Sorgen, vor allem in den letzten Zügen der Arbeit, ersparte.

Hiermit versichere ich, dass ich zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen habe und dass ich die hier beigefügte Arbeit selbständig angefertigt habe. Die dabei verwendeten Hilfsmittel und Quellen habe ich vollständig angegeben.

Magdeburg, den 16.12.03