

**Signaltransduktionsmechanismen in  
Orphan Rezeptor transfizierten  
CHO-Zellen**

**Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover**

**Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.**

**genehmigte Dissertation  
von Dipl.-Biologin Maike Sniehotta  
geboren am 18.07.1968 in Völklingen/Saarland**

**2003**

Referent: Prof. Dr. Walter H. Müller

Koreferent: PD Dr. Erik Maronde

Tag der Promotion: 12.02.2003



**Zusammenfassung:** Ziel dieser Dissertation war die Isolierung funktionell aktiver Liganden für die Orphan Rezeptoren GPR 7, GPR 8, PNR und p40 sowie die Charakterisierung ihrer Signaltransduktionsmechanismen. Mit Hilfe des SLC 1-Rezeptors und seinem Liganden MCH wurde in einer CHO-Zelllinie, die ein CRE-Element-reguliertes Luciferase-Reportergen trägt (CHO-CRE), ein Luciferase-Reportergen-Test etabliert. In Untersuchungen einer Stammhirn- und Gesamthirn-Peptidbank vom Schwein sowie einer humanen Hämofiltratbank auf darin enthaltene spezifische Liganden für die Orphan Rezeptor wurden mit Hilfe des Testsystems für den GPR 8-Rezeptor CRE-Promotor-Konstrukt aktivierende Substanzen detektiert. Durch chromatographische Trennmethode konnte ein Grossteil der inaktiven von den aktivierenden Substanzen abgetrennt werden. Eine Reindarstellung und damit eine Identifizierung konnte letztendlich nicht erreicht werden, da möglicherweise die Menge des eingesetzten Stammhirnmaterials und damit die Konzentration der stimulatorisch wirkenden Substanzen in der Peptidbank zu gering war.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zu den MCH-medierte Signaltransduktionsmechanismen des SLC 1-Rezeptors durchgeführt. Um die an der Signalweiterleitung des SLC 1-Rezeptors beteiligten G-Proteinen identifizieren zu können, wurden in MCH-Stimulationsexperimenten unter Verwendung pharmakologischer Inhibitoren die Aktivierung verschiedener „second messengers“ und Proteinkinase-Kaskaden untersucht. Die detektierte Kalzium-Freisetzung sowie eine festgestellte PKC-induzierte Phosphorylierung der p42/44 MAPK verlaufen ohne eine Beteiligung von  $G_q$ - bzw.  $G\beta\gamma$ -Proteinen möglicherweise über die Aktivierung von  $G_0$ -Proteine, deren Mechanismen und Funktion in diesem Zusammenhang bisher ungeklärt sind. Eine  $G_s$ -vermittelte Signalweiterleitung über PKA führte zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB sowie zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts. Neben diesem stimulatorischen Signaltransduktionsweg kommt es über die Kopplung des SLC 1-Rezeptors an  $G\alpha_i$ -Proteine zu inhibitorischen Effekten. Die  $G\alpha_i$ -Protein-medierte Signaltransduktion des MCH-Signals führte nachweisliche zur Verringerung einer Forskolin-induzierten Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts sowie der Phosphorylierung von CREB. Darüber hinaus wurde eine Aktivierung der p42/44 MAPK-Kaskade über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit der  $G_i$ -Proteine sowie die Beteiligung der p42/44 MAPK an der Aktivierung des CRE-Promotor-Konstruktes nachgewiesen. Diese Analysen zeigten, dass die Phosphorylierung von CREB durch positiv und negativ wirkende Signaltransduktionswege reguliert wird. Die Kopplung des SLC 1-Rezeptors nach Stimulation mit MCH erfolgt in dem untersuchten Zellsystem demnach über  $G_s$ - und  $G_i/G_0$ -Proteine.

**Schlagworte:** Orphan Rezeptoren GPR 7, GPR 8, PNR, p40, Ligandenscreening, SLC 1, MCH, Signaltransduktion

**Abstract:** The subject of this work was the isolation of functionally active ligands for the orphan receptors GPR 7, GPR 8, PNR and the characterisation of their signal transduction mechanisms. Using the SLC 1 receptor and its known ligand MCH a reporter gene assay was established in CHO-cells containing a CRE-regulated luciferase-reporter gene (CHO-CRE). A ligand screening was accomplished using a porcine brainstem and hole brain peptide library as well as a human hemofiltrate peptide library. In the porcine brainstem peptide library substances were found which activate the CRE-promotor construct in CHO-cells expressing the GPR 8 receptor. Chromatographic techniques led to separation of a majority of the inactive substances from the active ones. The quantity of the assigned brainstem material was possibly too small, so that the concentration of the stimulatory working substances was not sufficient for its purification to homogeneity and identification.

In the second part of this work the mechanisms of the MCH mediated SLC 1 receptor signalling were investigated. In order to identify the G-proteins taking part in intracellular signal transduction, different second messengers and protein kinase cascades were characterized with the aid of pharmacological activators and inhibitors. A participation of  $G_q$ - and/or  $G\beta\gamma$ -proteins for the detected calcium release as well as a PKC induced phosphorylation of the p42/44 MAPK could not be verified. The calcium release and PKC induced phosphorylation of the p42/44 MAPK was probably caused by  $G_0$ -proteins, whose mechanisms and function in this context are yet unknown.  $G_s$ -protein mediated signal transduction via PKA led to the phosphorylation of the transcription factor CREB and concentration-dependent activation of the CRE-promotor construct. The parallel coupling of the SLC 1 receptor to  $G\alpha_i$ -proteins resulted in a decrease of a forskolin induced activation of the CRE-promotor construct and the phosphorylation of CREB. The  $G_i$ -protein coupling continues via the  $\beta\gamma$ -subunit to the activation of the p42/44 MAPK cascade. p42/44 MAPK participates in the induction of the CRE-promotor construct. These analyses indicates that the phosphorylation of CREB is regulated by positive and negative signal transduction pathways. Thus, in the investigated cell system the coupling of the SLC 1 receptor following stimulation with MCH was mediated by  $G_s$ - and  $G_i/G_0$ -proteins.

**Keywords:** orphan receptors GPR 7, GPR 8, PNR, p40, ligand screening, SLC 1, MCH, signal transduction

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	„adenylate cyclase“ (Adenylat Zykklase)
AK	Antikörper
APS	Ammonium-Persulfat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CDP	2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor) Tricyclo[3.3.1.1.3,7]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat
CRE	„cAMP-responsive element“
CREB	„CRE-binding protein“
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	Aqua bidestillata
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	<i>et altera</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EK	Einzelklon
g	Erdbeschleunigung
h	„hour“ (Stunden)
HPLC	„high performanc liquid chromatography“ (Hochleistungsflüssig-chromatographie)
HRP	„horseradish-peroxidase“ (Meerrettich-Peroxidase)
i.c.v	intracerebroventriculare
inhib.	inhibitorischer
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Ko.	Kontrolle
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Vollmedium
M	Molar
MCH	„melanin-concentrating hormon“
min	minuten
n.b.	nicht bekannt
MK	Mischklon
NEB	New England Biolabs
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“ (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	„polymerase chain reaction2 (Polymerasekettenreaktion)

PD 98059	[2'-Amino-3'-methoxyflavone]
pH	<i>potenium hydrogenii</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rel.	relativer
Rp-8-CPT-cAMPS	Rp-8-(4-Chlorophenylthio)-Adenosin-3',5'-cyclic Monophosphorothioat, Rp-Isomer
RLU	„relativ light units“
RNA	„riboncleic acid2 (Ribonukleinsäure)
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SB 203580	[4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-Methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)- 1 <i>H</i> -imidazole]
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	„saline-sodium citrat“
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSR	„template suppression reagent“
vgl.	vergleiche
U	„units“ (definierte Einheiten)
üN	über Nacht
wt	Wildtyp

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
1.1. G-PROTEIN GEKOPPELTE REZEPTOREN.....	6
1.2. STRUKTUR VON G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN .....	6
1.3. REGULATION G-PROTEIN-GEKOPPELTER REZEPTOREN .....	9
1.4. SIGNALTRANSDUKTION ÜBER HETEROTRIMERE G-PROTEINE .....	10
1.4.1. Aktivierung des Adenylat Cyclase/PKA-Signalwegs .....	11
1.4.2. Aktivierung der Phosphoinositol/tid-Signalwege .....	11
1.4.3. Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase Signalwege.....	12
1.5. ORPHAN GPCRS.....	13
1.6. DIE ORPHAN REZEPTOREN GPR 7, GPR 8, PNR UND p40 .....	15
1.6.1. GPR 7 und GPR 8 .....	15
1.6.2. PNR .....	16
1.6.3. p40.....	16
1.7. MELANIN-CONCENTRATING HORMONE (MCH) .....	16
1.7.1. Rezeptor-Spezifität von MCH.....	18
1.8. DIE MCH-SPEZIFISCHEN REZEPTOR-SUBTYPEN SLC 1 / MCHR1, MCHR2 UND SLT .....	19
1.8.1. Der SLC 1- Rezeptor / MCHR1-Subtyp.....	19
1.8.2. Der MCHR2-Subtyp .....	20
1.8.3. Der SLT-Subtyp .....	20
1.9. GEWEBE- UND HÄMOFILTRAT-PEPTIDBANKEN ALS QUELLE BIOLOGISCH AKTIVER SUBSTANZEN .....	21
1.10. ZIEL DER ARBEIT .....	22
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
2.1. MATERIALIEN, ORGANISMEN UND KULTURBEDINGUNGEN .....	23
2.1.1. Herstellung und Sterilisation von Lösungen .....	23
2.1.2. Geräte und Apparaturen .....	23
2.1.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	24
2.1.4. Enzyme und Reagenziensätze .....	24
2.1.5. Oligonukleotide .....	26
2.1.6. Größenstandarts.....	27
2.1.7. Verwendete Peptidbänke .....	28
2.1.8. Genutzte Datenbanken, Software und Statistik.....	28
2.2. KLONIERUNG UND SEQUENZIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN .....	29
2.2.1. Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	29
2.2.2. Gelelektrophoretische Trennung von DNA.....	30
2.2.3. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	31

2.2.4.	<i>Ligation</i> .....	31
2.2.5.	<i>Herstellung transformationskompetenter Zellen</i> .....	31
2.2.6.	<i>Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli-Zellen</i> .....	32
2.2.7.	<i>Mini-Präparation von Plasmid-DNA</i> .....	33
2.2.8.	<i>Sequenzierung von DNA</i> .....	33
2.2.8.1.	<i>Aufreinigung von Sequenzierproben durch DNA-Präzipitation</i> .....	34
2.3.	ARBEITEN MIT RNA UND NORTHERN BLOT ANALYSEN .....	35
2.3.1.	<i>Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen</i> .....	35
2.3.2.	<i>Photometrische Messung</i> .....	36
2.3.3.	<i>Elektrophoretische Auftrennung von RNA</i> .....	36
2.3.4.	<i>Kapillarblot</i> .....	37
2.3.5.	<i>Northern Hybridisierung mit DIG-markierten cDNA-Sonden</i> .....	38
2.4.	KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN .....	40
2.4.1.	<i>Allgemeine Zellkulturbedingungen</i> .....	40
2.4.2.	<i>Transfektion von Zellen</i> .....	42
2.4.3.	<i>Stimulation von Zellen</i> .....	43
2.5.	BIOTESTS .....	45
2.5.1.	<i>Luciferase-Reportergen-Test</i> .....	45
2.5.2.	<i>Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Messungen (FLIPR™)</i> .....	45
2.6.	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN .....	46
2.6.1.	<i>Umkehrphasen/Reversed-Phase-HPLC</i> .....	46
2.6.2.	<i>Kationen- und Anionenaustausch-HPLC</i> .....	48
2.6.2.1.	<i>Entsalzung von Fraktionen der Kationen- und Anionenaustausch-Chromatographie</i> .....	48
2.7.	PROTEINCHEMISCHE METHODEN .....	49
2.7.1.	<i>Probenvorbereitung</i> .....	49
2.7.2.	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)</i> .....	49
2.7.3.	<i>Immuno-Blot Analyse (Western Blot)</i> .....	51
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>54</b>
3.1.	ETABLIERUNG DES LUCIFERASE-REPORTERGEN-TESTS .....	54
3.1.1.	<i>Optimierung der Transfektionseffizienz</i> .....	54
3.1.2.	<i>Prüfung der Funktionalität der MCH-Rezeptor tragenden CHO-CRE-Zellen im Luciferase-Reportergen-Test</i> .....	56
3.1.3.	<i>Expressionsanalyse von GRP 7, GPR 8, PNR und p40 mittels Northern Blot</i> .....	57
3.2.	DETEKTION VON ORPHAN REZEPTOREN AKTIVIERENDEN LIGANDEN .....	59
3.2.1.	<i>Screening der Stammhirn-Peptidbank vom Schwein</i> .....	59
3.2.1.1.	<i>Konzentrationsabhängigkeit der CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden Fraktionen</i> .....	61
3.2.1.2.	<i>Verfahren zur Trennung von CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden Substanzen aus der Stammhirn-Peptidbank</i> .....	61



3.2.2.	„Screening“ der Gesamthirn- und Hämofiltrat-Peptidbank.....	68
3.2.3.	Inhibition der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion durch NPW .....	68
3.3.	CHARAKTERISIERUNG DER SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE DES MCH-REZEPTORS .....	70
3.3.1.	cAMP als „second messenger“ .....	70
3.3.2.	Ca <sup>2+</sup> -Messung im FLIPR.....	73
3.3.3.	Untersuchung der MAP Kinase Kaskade .....	77
3.3.3.1.	Induktion von p42/44 MAP Kinase durch MCH .....	77
3.3.3.2.	Phospholipase C-regulierte Aktivierung der MAPK-Kaskade.....	78
3.3.3.3.	Gβγ <sub>i</sub> -Protein-regulierte Aktivierung der MAPK-Kaskade .....	80
3.3.4.	cAMP/PKA-induzierten Aktivierung von MAPK.....	81
3.3.5.	Untersuchung der pCREB-induzierten Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts .....	82
3.3.5.1.	Involvierung von MAPK an der Phosphorylierung von CREB .....	83
3.3.5.2.	Involvierung Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-Kinase an der Aktivierung von CREB .....	84
3.3.5.3.	Involvierung von C/EBP an der Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts .....	85
3.3.6.	Interaktion zwischen pMAPK und p38 Kaskaden .....	85
4.	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>86</b>
4.1.	SPEZIFITÄT DES „SCREENING“-SYSTEMS.....	86
4.2.	REINIGUNG CRE-PROMOTOR-KONSTRUKT INDUZIERENDER SUBSTANZEN FÜR GPR 8 .....	88
4.2.1.	Identifizierung von NPW als Ligand für GPR 7 und GPR 8 .....	89
4.2.2.	Klassifizierung von p40 und PNR in nicht GPCR Membranprotein-Familien.....	90
4.3.	CHARAKTERISIERUNG DER SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE DES MCH-REZEPTORS .....	91
4.3.1.	Beteiligung stimulatorischer und inhibitorischer G-Proteine an der Signalweiterleitung des SLC 1-Rezeptors.....	91
4.3.2.	Phosphoinositol/tid-Metabolismus-unabhängige Signaltransduktion des MCH-Rezeptors in ..... CHO-CRE-SLC 1-Zellen .....	93
4.3.3.	cAMP/Proteinkinase A aktiviert die MAP Kinase 42/44-Kaskade.....	94
4.3.4.	Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts durch CREB.....	95
4.3.5.	Vernetzung zwischen p42/44 MAP Kinase- und p38 MAP Kinase-Kaskade.....	96
5.	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>97</b>
6.	<b>LITERATUR</b> .....	<b>98</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. G-Protein gekoppelte Rezeptoren

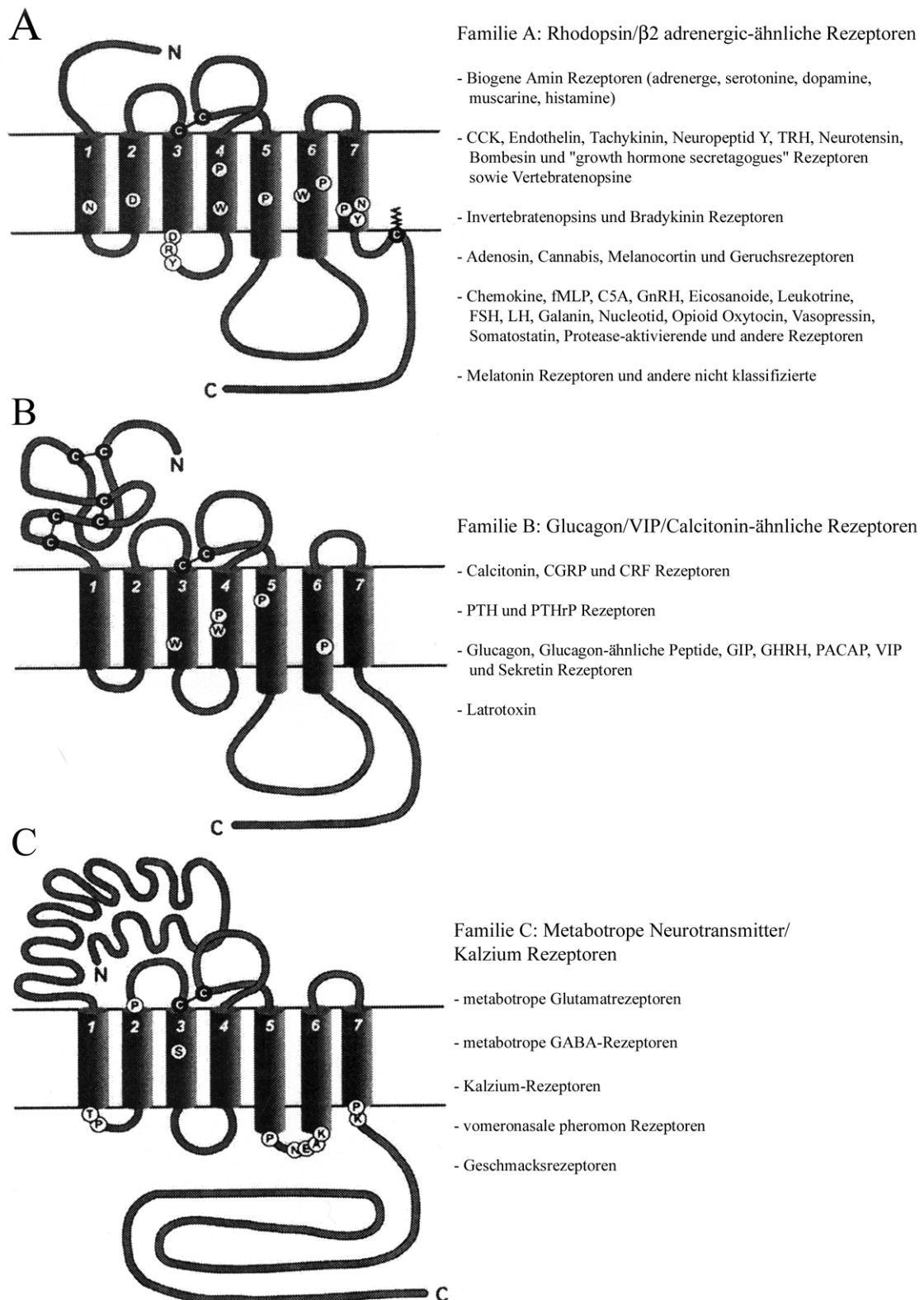
Bei der interzellulären Kommunikation werden extrazelluläre Signale von der Zelle registriert und in intrazelluläre Reaktionen umgesetzt. Bei einer Vielzahl von Signalwegen erfolgt diese Umsetzung des extrazellulären Stimulus mit Hilfe eines Transmembranrezeptors. Transmembranrezeptoren sind integrale Membranproteine, die eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre oder cytosolische Domäne aufweisen. Die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) wird charakterisiert durch sieben  $\alpha$ -helicale Transmembrandomänen (ATTWOOD & FINDLAY, 1994), die von 20 - 30 hydrophoben Aminosäuren gebildet werden. Eine Vielzahl von Hormonen, Neurotransmittern, Chemokinen, biogenen Aminen, Peptiden, Proteinen, Lipiden, Nukleotiden, exzitatorischen Aminosäuren, Ionen sowie sensorische Reize wie Licht-, Geruchs- oder Geschmackssignale zählen zu den natürlichen Stimulatoren/Liganden der GPCRs (STRADER *et al.*, 1994; FLOWER, 1999).

## 1.2. Struktur von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Trotz der Vielzahl verschiedener Agonisten, die über GPCRs die unterschiedlichsten Signaltransduktionswege aktivieren, besitzen die GPCRs eine erstaunliche strukturelle Ähnlichkeit. Dabei zeigen die hydrophoben Transmembranelemente die höchsten Sequenzhomologien, während die Aminosäuresequenzen der hydrophilen Schleifen zwischen den verschiedenen Rezeptoren stärker variieren. Die Transmembrandomänen sind durch drei extra- und drei intrazelluläre Domänen unterschiedlicher Grösse miteinander verbunden (Abb. 1). Durch Kristallisation und Röntgenstrukturanalysen des GPCRs Rhodopsin konnte die postulierte Struktur von sieben dicht gepackten Transmembranhelices verifiziert werden (PALCZEWSKI *et al.*, 2000). Im N-terminalen extracytosolischen Bereich fast aller GPCRs sind Konsensus-Sequenzen (Asn-Xaa-Ser/Thr) für eine N-Glykosylierung vorzufinden (STILES *et al.*, 1984). Die extrazellulären Schleifen enthalten vielfach konservierte Cysteinreste, die über Disulfidbrücken wahrscheinlich die Konformation der extrazellulären Domänen stabilisieren (STRADER *et al.*, 1994). Im C-terminalen, cytosolischen Bereich ist für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor ( $\beta_2$ -AR) eine posttranslationale Modifikation in Form einer Palmitoylierung nachgewiesen worden (O'DOWD *et al.*, 1989). Diese Palmitoylierung erfolgt an einem Cysteinrest und dient möglicherweise der Membranverankerung des C-terminalen Bereiches.

GPCRs werden aufgrund der bestehenden Unterschiede in der Aminosäuresequenz (PROBST *et al.*, 1992) in sechs verschiedene Familien eingeteilt. Die drei grössten Familien, dargestellt

in Abbildung 1, werden von den „Rhodopsin/ $\beta_2$ -adrenergic“-ähnlichen Rezeptoren (Familie A), Glucagon-ähnlichen Rezeptoren (Familie B) und den metabotropen Neurotransmitter Rezeptoren (Familie C) gebildet. Die Pheromonrezeptoren der Hefen bilden die kleineren Familien D (STE2 Rezeptoren) und E (STE3 Rezeptoren). Eine weitere Familie (F) beinhaltet cAMP-Rezeptoren, deren Existenz bisher nur in dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* nachgewiesen wurde. Die Familie der „Rhodopsin/ $\beta_2$ -adrenergic“-ähnlichen Rezeptoren stellt die Grösste und am besten untersuchte Klasse der GPCRs dar. Sie wird in weitere sechs Gruppen unterteilt, deren Rezeptoren alle ein konserviertes Asp-Arg-Tyr (DRY) Motiv an der cytosolischen Seite der dritten Transmembrandomäne besitzen (Abb. 1A) (PROBST *et al.*, 1992; GETHER, 2000). Das charakteristische Merkmal der vier Gruppen der Familie B (Glucagon/VIP/Calcitonin-ähnliche Rezeptoren) ist der aus ~ 100 Aminosäuren bestehende N-Terminus. Dieser beinhaltet mehrere Cysteine, die ein Netzwerk aus Disulfidbrücken bilden (Abb. 1B). Die fünf Gruppen der Rezeptor-Familie C (Metabotrope Neurotransmitter/Kalzium Rezeptoren) sind durch einen aussergewöhnlich langen, aus 500 - 600 Aminosäuren bestehenden N-Terminus gekennzeichnet (Abb. 1C). Gemeinsam ist ihnen darüber hinaus die sehr kleine dritte cytosolische Schleife mit dem hochkonservierten Asn-Glu-Ala-Lys (NEAK) Motiv.



**Abbildung 1:** Darstellung der Hauptfamilien der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Einteilung in GPCR-Familien und Gruppen nach GETHER (2000). Hochkonservierte Aminosäuren sind dargestellt als schwarze Buchstaben in weissen Kreise. Disulfidbrücken bildende Cysteine sind dargestellt als schwarze Kreise mit weissen Buchstaben.

### 1.3. Regulation der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die Signalübertragung wird durch Ligandenbindung an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor eingeleitet. Die Bindung des Liganden verursacht eine Konformationsänderung des Rezeptors durch die das Signal an die Innenseite der Membran weitergegeben und dort das nachgeschaltete Glied der Signalübertragung, das G-Protein, aktiviert wird (SIMON *et al.*, 1991; STRADER *et al.*, 1994; PALCZEWSKI *et al.*, 2000).

Da G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in viele verschiedene wichtige Prozesse involviert sind, bestehen unterschiedliche Mechanismen der Steuerung der GPCR-Signale. Trotz anhaltender Einwirkung eines extrazellulären Signals ist oftmals eine zeitabhängige Abnahme der zellulären Reaktionen zu beobachten. Diese Abschwächung des Signals ist bekannt als Desensibilisierung. Es handelt sich um einen Mechanismus, mit dem sowohl eine kurzfristige als auch eine langfristige Regulation der Rezeptoraktivität möglich ist. Diese Desensibilisierung kann direkt an den Rezeptoren oder an den G-Proteinen erfolgen. Eine Schlüsselreaktion der Desensibilisierung ist die Phosphorylierung von Ser/Thr-Resten der cytoplasmatischen Domäne des Rezeptors durch spezifische Proteinkinasen. Die Phosphorylierung der GPCRs kann durch die „second messenger“-abhängigen Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC) in Form einer negativen Rückkopplung oder durch die „second messenger“-unabhängigen G-Protein Rezeptor Kinasen (GRKs) erfolgen (HAUSDORFF *et al.*, 1990; INGLESE *et al.*, 1993; LEFKOWITZ, 1993). GRKs phosphorylieren spezifisch Rezeptoren, die einen Agonisten gebunden haben (DOHLMANN *et al.*, 1991; PREMONT *et al.*, 1995). Diese Phosphorylierung des Rezeptors kann zur Schaffung einer spezifischen Bindungsstelle für Proteine führen, die als Arrestine bezeichnet werden. Die Bindung von Arrestin, Dynamin oder anderen noch unbekannt Proteinen an den phosphorylierten Rezeptor entkoppelt diesen von der Wechselwirkung mit den nachgeschalteten G-Proteinen (BÜNEMANN & HOSEY, 1999). Beispielsweise dient die Arrestinbindung an dem phosphorylierten Rhodopsin-Rezeptor der schnellen Abschwächung der Signalübertragung beim Sehvorgang unter Bedingungen andauernder Lichtreizung. Der entkoppelte Rezeptor/Ligand-Komplex wird internalisiert, in Endosomen transportiert, in denen durch eine Änderung des pH-Wertes der Ligand vom Rezeptor dissoziiert. Der Rezeptor wird entweder zurück an die Zelloberfläche transportiert oder, wie der Ligand, im Lysosom abgebaut. Für die Endocytose der Rezeptoren sind verschiedene Mechanismen beschrieben. Eine Dynamin-abhängige Internalisierung mit Arrestin als Adapter und der Bildung von Clathrin-„coated pits“ wurde bei  $\beta_2$ -AR und  $\mu$ -Opioid (MOR) Rezeptoren beschrieben (ZHANG *et al.*, 1996). Für den Bradykinin 2 Rezeptor (BK2R) ist eine Dynamin-abhängige Endocytose mittels Caveolae publiziert (DE WEERD & LEEB-LUNDBERG, 1997). Darüber hinaus werden in der Literatur noch andere Dynamin-unabhängige Rezeptorendocytosen postuliert (ZHANG *et al.*, 1996; MÉNARD *et al.*, 1997; BÜNEMANN & HOSEY, 1999).

Eine Desensibilisierung der G-Proteine durch RGS-Proteine („regulators of G-Protein signaling“) wurde ebenfalls beschrieben (BERMAN & GILMAN, 1998). Die RGS-Proteine beschleunigen die Hydrolyse des an der  $G\alpha$ -Untereinheit gebundenen GTP und führen so zu einer Deaktivierung von G-Proteinen.

Ein anderer Mechanismus der GPCR- Regulation auf Rezeptorebene wurde von MCLATCHIE *et al.* (1998) veröffentlicht. Der Calcitoninrezeptor-ähnliche Rezeptor (CRLR), der zur Familie C der GPCRs gehört, kann als Rezeptor für das „Calcitonin-Gen-related peptide“ (CGRP) oder das Adrenomedullin fungieren. Die Affinität des CRLR wird durch RAMPs-Proteine („receptor activity modifying proteins“), die eine einzelne Transmembrandomäne besitzen, reguliert. Die Interaktion des Rezeptors mit einem bestimmten RAMPs-Protein bewirkt die Art der Glycosilierung des Rezeptors und entscheidet, welcher natürliche Ligand an den Rezeptor bindet. Durch Interaktion mit RAMP1 wird der CRLR-Rezeptor vollständig glycosiliert und bindet an der Zelloberfläche CGRP als Ligand. RAMP2 dagegen führt nur zu einer Teilglycosilierung des CRLR-Rezeptors, wodurch Adrenomedullin als natürlicher Ligand gebunden wird.

#### 1.4. Signaltransduktion über heterotrimere G-Proteine

Die heterotrimeren G-Proteine sind die spezifischen Reaktionspartner in der Signalübertragung durch GPCRs. Von den G-Proteinen wird das Signal an nachgeschaltete Effektormoleküle weitergegeben. Die G-Proteine gehören zu der grossen Familie der regulatorischen GTPasen, die GTP binden und hydrolysieren (NEER, 1995; HAMM, 1998). Gemeinsames Merkmal der G-Proteine ist der Aufbau aus drei Untereinheiten, die mit der Zellmembran assoziiert sind. Die grosse  $\alpha$ -Untereinheit von 39 - 46 kDa, trägt die Guaninnukleotid-Bindungsstelle, die  $\beta$ -Untereinheit von 37 kDa und  $\gamma$ -Untereinheit von 8 kDa bilden ein fest verbundenes Dimer. Bisher sind 20  $\alpha$ -, 6  $\beta$ - und 12  $\gamma$ -Genprodukte bekannt (HAMM, 1998). Inaktive G-Proteine bestehen aus der GDP-tragenden  $\alpha$ -Untereinheit, die mit dem  $\beta\gamma$ -Dimer assoziiert sind. Durch die Bindung extrazellulärer Signalmoleküle an einen Rezeptor assoziiert dieser mit dem heterotrimeren  $G(\alpha\beta\gamma)$ -Komplex und induziert eine Konformationsänderung. Diese führt zur Dissoziation von GDP und zur Bindung von GTP an die  $\alpha$ -Untereinheit und damit zur Trennung von  $\alpha$ -Untereinheit und  $\beta\gamma$ -Dimer. Die GTPase-Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheit hydrolysiert das GTP zu GDP und es erfolgt eine Reassoziierung mit der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit zum inaktiven heterotrimeren G-Protein.

Die G-Proteine werden nach der  $G\alpha$ -Untereinheit in vier verschiedene Klassen  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$  eingeteilt.  $G_s$ -Proteine bedienen sich zur Signalweiterleitung in allen Fällen einer Adenylat Cyclase (AC) und können durch das Choleratoxin inaktiviert werden. Die Mitglieder der  $G_i$ -Klasse zeigen einen inhibitorischen Effekt auf Adenylat Cyclasen. Darüber hinaus bildet die Phospholipase  $C\gamma$  ein wichtiges Effektormolekül der  $G_i$ -Proteine. Bis auf

wenige Ausnahmen ist die Aktivität der Mitglieder der  $G_i$ -Klasse durch Pertussistoxin inhibierbar.  $G_q$ -Proteine werden in ihrer Aktivität weder durch Pertussis- noch durch Cholera-toxin beeinflusst. Das nachgeschaltete Effektormolekül ist überwiegend die Phospholipase  $C\beta$ . Für die zur  $G_{12}$ -Subklasse gehörenden  $G\alpha_{12}$ - und  $G\alpha_{13}$ -Proteine ist eine Kopplung an regulatorische Moleküle wie p115 (Guaninnukleotidaustauschfaktor p115 RhoGEF) (KOZASA *et al.*, 1998), RasGAP1 (GTPase-aktivierendes Protein) und Bruton's-Tyrosin-Kinase (JIANG *et al.*, 1998) beschrieben.

Aktiviert G-Proteine geben das Signal an nachgeschaltete Effektormoleküle weiter die entweder enzymatische Aktivität tragen, wie die Adenylat Cyclase, Phospholipasen und cGMP-spezifische Phosphodiesterasen, oder einen Ionenkanal darstellen. Die Aktivierung dieser Enzyme führt zur Bildung der diffusiblen „second messenger“ Signalmoleküle cAMP, cGMP, Diacylglycerol, Inositol-1,4,5-trisphosphat und  $Ca^{2+}$ . Auf die cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen sowie die Ionenkanäle wird im weiteren Verlauf nicht näher eingegangen.

#### 1.4.1. Aktivierung des Adenylat Cyclase/PKA-Signalwegs

Die Adenylat Cyclase (AC) als Effektor katalysiert die Bildung von 3'-5'-cyclischem AMP (cAMP) aus ATP. Das cAMP ist ein weitverbreitetes Signalmolekül, das meistens über eine Aktivierung von Proteinkinasen wirkt. Das durch die Adenylat Cyclasen synthetisierte cAMP wird von Phosphodiesterasen wieder abgebaut. Das gemeinsame Merkmal der verschiedenen bisher bekannten Adenylat Cyclasen (Typ I-VIII) ist die Stimulation ihrer enzymatischen Aktivität durch  $G\alpha_s$ -GTP. Darüber hinaus können die Adenylat Cyclasen durch  $Ca^{2+}$ /Calmodulin, Proteinkinase C sowie die  $G\beta\gamma_{i/0}$ -Untereinheit von G-Proteinen stimuliert werden. Inhibitorisch wirken  $G\alpha_i$ -GTP,  $Ca^{2+}$  und  $G\beta\gamma_i$ -Proteine (SIMONDS, 1999). Das AC-synthetisierte cAMP kontrolliert die Aktivität der Proteinkinase A (PKA). In Abwesenheit von cAMP liegt die PKA als Tetramer vor, das sich aus zwei regulatorischen R-Untereinheiten und zwei katalytischen C-Untereinheiten zusammensetzt. Im Holoenzym  $C_2R_2$  ist die katalytische Aktivität durch ein inhibitorisches Strukturelement der R-Untereinheit blockiert. Die Bindung von cAMP an die R-Untereinheit führt zur Dissoziation des Holoenzym in das Dimer der R-Untereinheit und zwei C Monomere, die katalytisch aktiv werden (DØSKELAND *et al.*, 1993, BRANDON *et al.*, 1997). Diese können u.a. den Transkriptionsfaktor CREB (CRE binding protein) phosphorylieren (GONZALES & MONTMINY, 1989; SASSONE-CORSI, 1995).

#### 1.4.2. Aktivierung der Phosphoinositol/tid-Signalwege

Eine weitere grosse Klasse von Effektormolekülen, die durch G-Proteine aktiviert werden, sind die Phospholipasen des Typs C (PLC) (MAJERUS, 1992). Phospholipasen spalten

enzymatisch Phospholipide und werden, aufgrund ihres spezifischen Angriffspunktes am Phospholipid, in die Typen A1, A2, C und D unterteilt. Eine wichtige regulatorische Funktion besteht in der Spaltung Inositol-haltiger Phospholipide durch die PLC. Diese katalysiert die Freisetzung von Diacylglycerol (DAG) und Inosit-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) aus dem in der Membran lokalisierten Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat ( $PIP_2$ ). DAG,  $IP_3$  sowie das durch  $IP_3$  mobilisierbare  $Ca^{2+}$  sind wichtige intrazelluläre Botenstoffe, so dass die PLC als eines der zentralen Schlüsselenzyme in der GPCR-Signaltransduktion betrachtet werden kann. Von den drei bekannten Subtypen der PLC ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) sind die Phospholipasen des Typs C $\beta$  und C $\gamma$  die wichtigsten. Sie werden von verschiedenen G-Proteinen aktiviert. PLC $\beta$  wird durch  $G\alpha_q$ -Proteine, PLC $\gamma$  durch Rezeptor-Tyrosinkinasen sowie  $G\beta\gamma$ -Proteine (VAN BIESEN *et al.*, 1995A) stimuliert. Die PLC katalysierte Bildung von  $IP_3$  führt zur Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus  $Ca^{2+}$ -Speichern des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Dabei kommt es zur Bindung von  $IP_3$  an die  $IP_3$ -Rezeptoren des ERs, bei denen es sich um Liganden-gesteuerte  $Ca^{2+}$ -Kanäle handelt (BERRIDGE *et al.*, 1993). Während  $IP_3$  nach Abspaltung als diffusibles Signalmolekül im Cytosol wirksam wird, verbleibt das hydrophobe DAG in der Membran. Eine regulatorisch bedeutsame Funktion von DAG ist die Stimulation der Proteinkinase C (PKC). Die PKC bildet eine in 12 Subtypen unterteilte Proteinkinase-Familie ( $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\xi$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$  und  $\mu$ ; DEKKER & PARKER, 1994). Die PKC ist neben DAG durch Kalzium-Ionen stimulierbar und kann eine Vielzahl von Substratmolekülen phosphorylieren. Zu diesen Molekülen zählen z.B. der „Epidermal Growth Factor“-Rezeptor, der Inhibitor I $\kappa$ B des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, das Ras-Protein oder weitere Ionenkanäle.

### 1.4.3. Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase Signalwege

Die Ras-Proteine zählen wie die G-Proteine zu der Familie der regulatorischen GTPasen. Sie verarbeiten Signale, die sie von Rezeptor-Tyrosinkinasen, Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen sowie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren empfangen. Bis zum Ras-Protein erfolgt die Signalleitung vorwiegend membrangebunden. Danach wird das Signal in Form einer Kaskade hintereinander geschalteter Proteinkinasen von der Membran weiter in das Zellinnere geleitet. Das Ras-Protein in seiner aktiven Form kann die Raf-Kinase aktivieren und ist so angebunden an den Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-(MAPK)-Signalweg. Die MAPK-Familie besteht aus drei Subfamilien: die p42/44 MAPK/extrazellulär regulierte Kinase (ERK), die „c-Jun amino-terminal kinases/stress-activated protein kinases“ (JNKs/SAPKs) und die p38. Der p42/44 MAPK/ERK-Weg, im Folgenden nur noch MAPK bezeichnet, soll hier stellvertretend für die anderen, ähnlich strukturierten Signalwege vorgestellt werden. Die MAPK-Proteine stehen am Ende der Signalübertragung. Ihnen ist die MAP/ERK-Kinase (MEK), die auch als MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) bezeichnet wird, vorgeschaltet. MEK wiederum ist Substrat für einen weiteren Typ vorgeschalteter Proteinkinasen, die MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MAPKKK). Zu dieser MAPKKK-



Gruppe gehören unter anderem verschiedene Raf-Kinasen, die vom Ras-Protein oder der PKC aktiviert werden. Die zentrale Funktion der MAPK-Wege besteht in der Phosphorylierung und Aktivierung von genregulatorischen Proteinen oder von Enzymen (BLUMER & JOHNSON, 1994). Beispielsweise wird die Kinase „90-kDa ribosomal protein S6 kinase“ (p90rsk) von ERK aktiviert und kann den Transkriptionsfaktor „CRE binding protein“ (CREB) phosphorylieren. Das CREB-Protein übt eine stimulierende Wirkung auf die Transkription von Genen aus, die cis-regulatorische, cAMP sensitive DNA-Elemente („cAMP responsive elements“, CREs) tragen (SASSONE-CORSI, 1995; SHAYWITZ & GREENBERG, 1999).

## 1.5. Orphan GPCRs

Die Suche nach G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch Sequenz-Vergleiche hat zur Entdeckung einer Vielzahl von möglichen GPCRs geführt, deren natürliche (endogene) Liganden unbekannt sind und die daher als „orphan“ G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (oGPCRs) bezeichnet werden (CIVELLI *et al.*, 2001). Die Homologie der Aminosäuresequenz beträgt oft nicht mehr als 30 – 40 % zu bekannten GPCRs. Es sind zur Zeit ca. 300 offene Leseraster in öffentlich zugänglichen Datenbanken identifiziert worden, die für einen vermutlichen GPCR kodieren. 191 der 300 Gene kodieren für bekannte Rezeptoren und 108 Gene für Orphan-GPCRs. Darin sind die Geschmacks- und Geruchsrezeptoren (etwa 1200) nicht enthalten (HOWARD, *et al.*, 2001). Die oGPCRs repräsentieren eine wichtige Familie von Zielproteinen für die pharmazeutische Industrie, da mehr als 50 % der vermarkteten Medikamente als Agonisten oder Antagonisten von bekannten GPCRs dienen (DREWS, 1996). Somit können die oGPCRs und ihre noch zu beschreibenden Liganden in Zukunft als Leitsubstanzen für neue Therapeutika angesehen werden.

Die sogenannte „Orphan Rezeptor Strategie“ wurde zur Identifizierung der natürlichen Liganden von oGPCRs entwickelt. Bei diesem Verfahren wird der Orphan Rezeptor in Zellen transfiziert mit denen anschliessend Gewebehomogenate auf „second messenger“-Antworten untersucht werden. Dabei dient die durch Rezeptor-Aktivierung hervorgerufene „second messenger“-Antwort im Vergleich mit nicht-transfizierten Zellen als Detektionssystem zur Identifizierung des möglichen Liganden gegenüber inaktiven Substanzen. Nach Reindarstellung und Strukturanalyse wird anschliessend die stimulatorische Wirkung des natürlichen Liganden durch chemische Synthese verifiziert. Die Orphan Rezeptor Strategie beinhaltet mindestens zwei unbekannte Grössen: die chemische Beschaffenheit des Liganden sowie der beteiligte Signaltransduktionsweg (CIVELLI *et al.*, 2001). Mit dieser Strategie wurden trotzdem einige unbekannte neue biogene Peptide entdeckt wie beispielsweise Orphanin FQ (REINSCHIED *et al.*, 1995), Orexin (SAKURAI *et al.*, 1998) oder Ghrelin (KOJIMA *et al.*, 1999). Auch bereits bekannten Peptiden wie „melanin concentrating hormone“ (MCH) (BÄCHNER *et al.*, 1999; CHAMBERS *et al.*, 1999; SAITO *et al.*, 1999), Urotensin II (AMES *et al.*, 1999), Motilin (FEIGHNER *et al.*, 1999) oder Neuromedin U (SZEKERES *et al.*, 2000) konnte so

der zugehörige oGPCR zugeordnet werden. Das „screenen“ von Orphan Rezeptoren mit synthetischen oder bereits bekannten Substanzen wird auch als „Reverse Pharmakologie“ bezeichnet, bei der eine Gewebeextraktion, Fraktionierung und Strukturaufklärung nicht erforderlich ist (CIVELLI *et al.*, 2001). In den letzten 13 Jahren konnten über 25 Liganden (Tab. 1) für oGPCRs identifiziert werden.

**Tabelle 1: Bisher identifizierte Liganden für oGPCRs (mod. nach HOWARD *et al.*, 2001)**

Identifizierte Liganden und deren Rezeptoren	Datum der Entdeckung	Isolierung	Rezeptor-Familie	Funktion
5-HT1A (G-21)	1988	Homologie	Adrenozeptor (35 %)*	Angst, Hypertension
Adenosin A1, A2A (RDC7, RDC8)	1990 - 1991	Homologie, cAMP-Test	Adrenozeptor (24 %)	Regulation der Thrombozytenfunktion, Angst
Nociceptin/Orphanin FQ (ORL1)	1995	Homologie, Peptid-isolierung, cAMP-Test	Opioid (60 %)	Schmerzregulation
Anaphylatoxin C3a	1996	Homologie, cAMP Test	C5a Rezeptor (~ 37 %)	Entzündung
Growth Hormone secretagogue (Ghrelin Rezeptor)	1996 - 1999	Peptidisolierung Ca <sup>2+</sup> - Test	Neurotensin (~ 30 %)	Wachstum
Prolactin-releasing Peptide (hGR3/GRP10)	1998	Peptidisolierung, Arachidonsäure-Ausschüttung	NPY (35 %)	Prolactin-Ausschüttung
Calcitonin gene-related peptid-Peptide, Adrenomedullin, RAMPs	1996 – 1998	Homologie, cAMP-Test	VIP/PACAP (29 %)	Schmerz
Orexin/Hypocretin (HPRAJ70), Orexin 1 und 2 Rezeptoren	1998	Peptidisolierung, Ca <sup>2+</sup> -Ausschüttung, subtraktives Klonen	Adrenozeptor (30 %)	Energiehomöostase
Apelin (APJ)	1998	Homologie, Peptidisolierung, Mikrophysiometrie	Angiotensin (35 %)	HIV-Co-Rezeptor
Thyrotropin-releasing Hormon (trh2)	1999	Homologie	TRH1 (54 %)	Nociception (?)
Cysteinyl leukotrienes: CysLT1 (HMTMF81, HG55)	1999	Datenbanken, Ca <sup>2+</sup> - Test	PAF, P2 (32 %)	Asthma
CysLT2 (HG57)	2000		CysLT1 (38 %)	
Motilin (GPR38)	1999	Homologie, Liganden-screening	GHS (52 %)	Verdauungstraktmotilität
Melanin-concentrating Hormone (GPR24, SLC-1 = MCHR1, MCHR2)	1999	Homologie, Peptidisolierung, Ligandenscreening, Ca <sup>2+</sup> - Test	Somatostatin (34 %)	Fettleibigkeit, Energie-regulation
Urotensin II (GPR14, SENR)	1999	Homologie, Peptidisolierung, Ligandenscreening, Ca <sup>2+</sup> - Test	Somatostatin, Opioid, Galanin (~ 25 %)	Vasokonstriktion
Sphingosine-1-phosphat: Edg1, edg3, edg5, edg8	1998 - 2000	Homologie, Bindung, Ca <sup>2+</sup> - Test	Edg (~ 35–50 %), CB1 (~ 30 %)	Entzündung, Apoptose

Identifizierte Liganden und deren Rezeptoren	Datum der Entdeckung	Isolierung	Rezeptor-Familie	Funktion
Lysophosphatidylsäure: edg2, edg4, edg7	1999 - 2000	Homologie, Bindung, Ca <sup>2+</sup> - Test	Edg (~ 35–50 %), CB1 (~ 30 %)	Wundheilung
Allatostatin-ähnliches Peptid	1999	Homologie, Peptidisolierung, Elektrophysiologie	Somatostatin, Galanin, Opioid (50–70 %)	?
Histamine H3 (GPCR97)	1999	Homologie, Bindung, cAMP-Test	Adrenozeptor (α2), Muskarinrezept. (M1) (31 %)	CNS, Fettleibigkeit
CCR10, Eskine (GPR2)	2000	Homologie, Ca <sup>2+</sup> - Test	CCR (~ 21 %)	Lymphozyten-Migration
UDP-Glukose, (KIAA0001)	2000	Homologie, Isolierung, Hefefunktions-Screening	Nucleotid-ähnlich, PAF, PAR (28–34 %)	Gewebestress
Sphingosinphosphorylcholin (OGR1)	2000	Homologiescreening, Ca <sup>2+</sup> - Test	P2Y (30 %)	Wundheilung
Neuromedin U (FM-3, FM-4, TGR-1)	2000	Homologie, Ca <sup>2+</sup> - Test	Neurotensin, GHS (~30 %)	Fressverhalten
Neuropeptide FF (HG31, NPGPCR, AF119815, EP884387)	2000	Datenbanken, Screening, Ca <sup>2+</sup> - Test	Orexin 2, Y2 (32 %)	Schmerz
Neuropeptid W (GPR 7, GPR 8)	2002	Datenbanken, Screening, cAMP-Inhibitions-Test, [35S]GTPγS-Bindungs-Test	Opioid/Somatostatin-Rezeptoren (39-50 %)	Fressverhalten, Hormonausschüttung

Abkürzungen: CB1: Cannabinoid Typ 1 Rezeptor; CCR: CC Chemokinrezeptor; GHS: growth hormone secretagogue; HPRAJ70: Hypocretin (Orexin) 1 Rezeptor; NPGPCR: Neuropeptid G-Protein-gekoppelter Rezeptor; NPY: Neuropeptid Y; oGPCR: orphan G-Protein gekoppelter Rezeptor; OGR1: ovarian cancer G-Protein-gekoppelter Rezeptor 1; PAF: Platelet-activating Faktor; PAR: Protease-activated Rezeptor; PRL: Prolactin; RAMPs: Receptor activity modifying proteins; TRH: Thyrotropin-releasing Hormon; VIP/PACAP: vasoactive intestinal peptide and pituitary adenyllyl cyclase activating peptide.

\* Die Prozentzahl in Klammern gibt die Homologie auf Aminosäureebene des oGPCRs mit den aufgeführten Rezeptoren an.

## 1.6. Die Orphan Rezeptoren GPR 7, GPR 8, PNR und p40

### 1.6.1. GPR 7 und GPR 8

GPR 7 und GPR 8 wurden von O'DOWD *et al.* (1995) aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert. Die kodierenden Sequenzen von GPR 7 und 8 haben keine Introns und zeigen untereinander eine 70%ige Homologie. Darüberhinaus besitzen beide signifikante Übereinstimmungen mit der kodierenden Sequenz der Transmembrandomänen der Opioid- und Somatostatin-Rezeptoren. GPR 7 ist auf Chromosom 10q11.2-q21.1 und GPR 8 auf Chromosom 20q13.3 lokalisiert. PCR-, Northern Blot-Analysen sowie *in situ* Hybridisierung belegen die Expression von GPR 7 in Hippocampus, Amygdala, Thalamus, Corpus callosum, Substantia nigra, Cerebellum, frontalem Cortex, Hypophyse sowie den suprachiasmatischen, arcuate und ventromedialen Nuclei des Hypothalamus, Prostata, Hoden, Lunge, Trachea,

Colon, Rectum und der Haut. GPR 8 wird im frontalen Cortex, Hippocampus, Nucleus caudatus, Amygdala, Thalamus, Corpus callosum, Substantia Nigra, Cerebellum, Hypophyse, Nebennierendrüse, Milz, Hoden, Lunge, Colon, Rectum und der Haut exprimiert. Pharmakologische Untersuchungen zeigten, dass an den GPR 7-Rezeptor verschiedene Opioide wie Brenazocine und Levorphanol binden. Die spezifischen selektiven Agonisten der  $\mu$ ,  $\delta$  oder  $\kappa$  Opioid-Rezeptoren zeigen dagegen nur eine sehr geringe Affinität zum GPR 7-Rezeptor.

### 1.6.2. PNR

ZENG *et al.* (1998) identifizierten aus humaner genomischer DNA eine Sequenz mit sieben potentiellen Transmembran-Elementen und signifikanter Homologie zu humanen Neurotransmitter-Rezeptoren. Das zugehörige kodierende Gen wurde aus einer humanen Lambda DASH II Gen-Bibliothek isoliert und als „putative neurotransmitter receptor“ (PNR) bezeichnet. PNR kodiert für ein 38,3 kDa Protein, dessen aus 338 Aminosäuren bestehende Sequenz grosse Homologien zum Serotonin-Rezeptor 5-HT<sub>1D</sub> der Ratte besitzt (35 % identische Aminosäuren, 56 % ähnliche Aminosäuren). Weitere signifikante Ähnlichkeiten mit jeweils ~ 34 % identischen Aminosäuren bestehen zu dem 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptor des japanischen Pufferfischs Fugu (*Takifugu*), dem 5-HT<sub>4L</sub>-Rezeptor der Maus, dem Alpha-2 adrenergen Rezeptor und dem D2 Dopamin-Rezeptor. PNR ist auf Chromosom 6q23 lokalisiert und wird im Skelettmuskel, Amygdala, Hippocampus, Nucleus caudatus, Thalamus und Hypothalamus exprimiert.

### 1.6.3. p40

p40 ist ein 40 kDa grosses integrales Membranprotein und wurde von MAYER *et al.* (1998) mittels Affinitäts-Chromatographie aus Erythrozyten-Plasmamembranen isoliert. Dabei dienten verschieden grosse C-terminale Abschnitte des in der Erythrozytenmembran lokalisierten Peptides Stomatin als Säulenmatrix. Die komplette für 399 Aminosäuren kodierende Gensequenz von p40 wurde aus einer humanen Knochenmark- sowie einer fetalen Gehirn-cDNA-Bibliothek kloniert. p40 zeigt eine hohe Expression in den Neuronen des Gehirns, speziell im Hippocampus, Kleinhirn, Rückenmark ausserdem in Testis, verschiedenen Epithelzellen, Thymocyten, Megakaryozyten und Makrophagen (MAYER *et al.*, 1998; BAUER *et al.*, 2000).

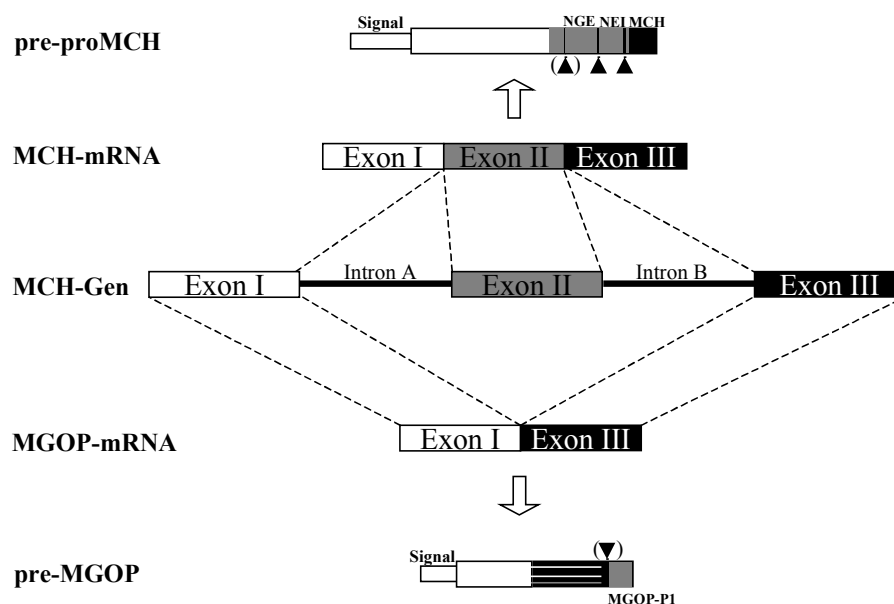
## 1.7. Melanin-concentrating hormone (MCH)

„Melanin concentrating hormone“ (MCH) ist ein zyklisches Peptid und wurde erstmals 1983 von KAWAUCHI *et al.* aus der Lachs-Hypophyse isoliert und sequenziert. Das später aus Ratten-

Hypophyse gereinigte MCH (rMCH) ist mit 19 Aminosäuren um zwei Aminosäuren länger als das Lachs-Homolog (VAUGHAN *et al.*, 1989). rMCH zeigt eine 100%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit humanem MCH (hMCH) (PRESSE *et al.*, 1990). MCH hat sehr unterschiedliche physiologische Wirkungen. Es reguliert zusammen mit „ $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone“ ( $\alpha$ -MSH) die Pigmentierung der Haut von Teleostiern (BAKER, 1991). MCH und  $\alpha$ -MSH fungieren dort als Antagonisten. In Säugetieren wird MCH hauptsächlich in den Perikarien des lateralen Hypothalamus und der Zona incerta exprimiert (QU *et al.*, 1996; SONE *et al.*, 2000) und besitzt eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Fressverhaltens, im Energiestoffwechsel und in der Stressantwort. MCH gehört zusammen mit Neuropeptid Y (NPY), Orexin A und B, Galanin und „Agouti-related peptide“ (AgRP) zu der Gruppe der putativ Appetit-stimulierenden Neuropeptide, während  $\alpha$ -MSH, „corticotropin releasing hormone (CRH), Cholecystinin (CCK), „cocain and amphetamine regulated transcript“ (CART), Neurotensin, „glucagon-like peptide“ (GLP 1) und Bombesin zu der Gruppe der Appetit-hemmenden Neuropeptide zählen (TRITOS & MARATOS-FLIER, 1999). Eine intracerebroventriculare (i.c.v.) Injektion von MCH in Ratten führt zu einer signifikanten, dosisabhängigen Erhöhung der Nahrungsaufnahme sowie zu einer Erniedrigung des Glucocorticoid-Spiegels im Plasma über einen ACTH-(adrenocorticotropes Hormon)-vermittelten Mechanismus. MCH und  $\alpha$ -MSH zeigen dabei einen gegensätzlichen Einfluss auf das Fressverhalten und den stressbedingten Glucocorticoid-Plasmaspiegel. MCH stellt einen funktionellen Melanocortin-Antagonisten im Hypothalamus dar (QU *et al.*, 1996; LUDWIG, *et al.*, 1998; CHAMBERS *et al.*, 1999; SUPPLY *et al.*, 2001). Im Hypothalamus fettleibiger Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>-Knockout-Mäuse (= ob/ob-Mäuse, Leptin-Knockout) wurde eine 3-fache Erhöhung der MCH-Expression festgestellt (QU *et al.*, 1996). Diese Überexpression von MCH scheint die Ursache für die Fettleibigkeit und Insulin-Resistenz transgener Mäuse zu sein (LUDWIG *et al.*, 2001). In Hungerversuchen mit Leptin-Knockout-Mäusen und normalen Mäusen wurde für beide Tiergruppen eine erhöhte MCH-Expressionsrate festgestellt. Leptin fungiert als Negativregulator der MCH-Rezeptor-Expression im Gehirn von Mäusen (KOKKOTOU *et al.*, 2001). SLC 1/MCHR1-Knockout-Mäuse (Mch1r<sup>-/-</sup>) zeigen ein verändertes Fressverhalten und haben, im Vergleich zu normalen Mäusen, aufgrund einer erhöhten Stoffwechselrate sowie hyperaktivem Verhalten ein reduziertes Körpergewicht (SHIMADA *et al.*, 1998; MARSH *et al.*, 2002). SHIMADA *et al.*, (1998) stellte des weiteren bei Mch1r<sup>-/-</sup>-Mäusen eine Verringerung der Nahrungsaufnahme (Hypophagie) fest, wogegen MARSH *et al.* (2002) eine erhöhte Nahrungsaufnahme (Hyperphagie) berichtete. MCH und die Komponenten des MCH-Signaltransduktionsweges sind daher als potentielle Adipositas-Therapeutika von grossem Interesse.

### 1.7.1. Rezeptor-Spezifität von MCH

Durch alternatives Spleißen von primären mRNA-Transkripten können, ausgehend von einem einzigen Gen, eine Vielzahl von Transkripten und damit Proteinen in eukariotischen Zellen generiert werden (SHARP, 1994). Alternatives Spleißen des aus dem MCH-Gen resultierenden primären RNA-Transkripts führt im Gehirn der Ratte zur Synthese von zwei mRNAs (Abb. 2, MCH-mRNA, MGOP-mRNA). Die MCH-mRNA kodiert für ein Vorläufer-Peptid (pre-proMCH), aus dem durch posttranslationale Modifikation neben MCH auch die bioaktiven Peptide Neuropeptid GE (NGE) und Neuropeptid EI (NEI) resultieren (NAHON *et al.*, 1989; TOUMANIANTZ *et al.*, 2000). Eine i.c.v Injektion von NEI oder  $\alpha$ -MSH in Ratten führt zu einem verstärkten Fellpflege- und Nachwuchspflege-Verhalten sowie erhöhter Laufaktivität. Dies durch NEI und  $\alpha$ -MSH hervorgerufene Verhalten wird durch MCH-Gabe wieder aufgehoben (SANCHEZ *et al.*, 1997).



**Abbildung 2:** Struktur der MCH- und MGOP-mRNA und der daraus abgeleiteten Proteine. (nach TOUMANIANTZ *et al.*, 2000). Schematische Darstellung des MCH-Gens und differenzielles Spleißing des primären MCH-mRNA-Transkriptes. Gezeigt ist das pre-proMCH mit den Peptiden von NGE, NEI und MCH sowie das pre-MGOP mit dem MGOP-Peptid 1. Nachgewiesene posttranslationellen Modifikations-Stellen sind mit ▲, postulierte sind mit (▴) angegeben.

Die zweite mRNA (MGOP-mRNA) kodiert für ein putatives 125-Aminosäuren langes Protein, welches als „MCH-gene-overprinted-polypeptide“ (MGOP) bezeichnet wird (TOUMANIANTZ *et al.*, 1996). Es besteht lediglich aus dem Exon I und III des MCH-Gens. Expressions-Studien von MGOP und MCH im Gehirn der Ratte zeigten eine starke MGOP-

Immunreaktivität in den periventriculären Nuclei des Hypothalamus sowie verstreut im Cortex, Caudatum, Putamen, Amygdala und dem lateralen, septalen Nucleus. Eine Übereinstimmung der Expressionen von MCH und MGOP wurde lediglich in der Zona incerta sowie dem lateralen Hypothalamus detektiert. Die physiologische Funktion von MGOP ist bisher nicht bekannt, die Verteilung der MGOP-Immunreaktivität in Gehirn lässt auf eine neuroendokrine Rolle von MGOP schliessen (TOUMANIANTZ *et al.*, 2000). Die sich gegenseitig antagonistisch beeinflussenden physiologischen Funktionen von MCH und  $\alpha$ -MSH bzw. NEI, die Sequenz-Homologien zwischen Somatostatin- und MCH-Rezeptor und die Generierung verschiedener Proteine aus dem MCH-Gen lassen vermuten, dass  $\alpha$ -MSH, NEI, MGOP sowie Somatostatin als natürliche Liganden an den MCH-Rezeptor binden. Somatostatin-14 und seine Analoga (RC-160, Cortistatin-14 und -29), NEI, NGE, MGOP-14 und -27 führen allerdings zu keiner Aktivierung des MCH-Rezeptors. Da eine Stimulation des MCH-Rezeptors durch MCH weder von NEI noch  $\alpha$ -MSH blockiert wird, kann von einer spezifischen Bindung zwischen Rezeptor und Ligand ausgegangen werden. Die gegensätzlichen physiologischen Effekte resultieren wahrscheinlich aus gegenseitiger Beeinflussung der Signaltransduktionswege nach Ligandenbindung (SAITO *et al.*, 2000). Mutationsstudien zur MCH-Rezeptor-Aktivierung konnten belegen, dass Asp<sup>123</sup> in den MCH-Rezeptoren (SLC 1/MCHR1, MCHR2, s.u. 1.8) und Arg<sup>6</sup>, Met<sup>8</sup>, Arg<sup>11</sup> und Tyr<sup>13</sup> im hMCH-Peptid für die richtige Konformation des MCH Peptid/Rezeptor-Komplexes notwendig sind. Dadurch besteht die Möglichkeit, potente und selective Agonisten und Antagonisten für beide Rezeptor-Subtypen zu entwerfen (MCDONALD *et al.*, 2000; BEDNAREK *et al.*, 2001).

## **1.8. Die MCH-spezifischen Rezeptor-Subtypen SLC 1 / MCHR1, MCHR2 und SLT**

### **1.8.1. Der SLC 1- Rezeptor / MCHR1-Subtyp**

Der G-Protein-gekoppelte „somatostatin-like“-Rezeptor (SLC 1, MCHR1) wurde mittels Datenbankrecherche als EST („expressed sequence tag“-)Eintrag gefunden. Die Sequenz wies eine 40 %ige Homologie zu den hydrophoben Transmembrandomänen der fünf bekannten Somatostatin Rezeptoren auf. Dieser aus humaner genomischer DNA klonierte Rezeptor besteht aus 402 Aminosäuren, das auf Chromosom 22, q13.3 lokalisierte Gen weist keine Introns auf (KOLAKOWSKI *et al.* 1996). LAKAYE *et al.* (1998) identifizierten eine kürzere Variante des SLC 1 -Rezeptors aus Rattenhirn sowie die entsprechende humane Form. Diese 353 Aminosäure lange humane/Ratten-Sequenz ist am N-Terminus um 49 Aminosäuren verkürzt und zeigt 91 % Homologie zu der von KOLAKOWSKI *et al.* (1996) publizierten SLC 1-Rezeptor-Sequenz. Diese 353 Aminosäure-Variante besitzt drei konsensus N-Glykosylierungsstellen am Aminoterminal und mehrere Phosphorylierungsstellen an den intrazellulären Schleifen. Das Gen besteht aus zwei Exons, die durch ein Intron getrennt sind.

Northern Blot Analysen und *in situ* Hybridisierungen zeigen eine Expression des SLC 1-Rezeptors im olfaktorischen Nucleus, cerebralem Cortex, Substantia Nigra, basalen Vorderhirn, Thalamus, Mittelhirn, Rombencephalon sowie in den ventromedialen und dorsomedialen Nuclei des Hypothalamus (KOLAKOWSKI *et al.* 1996; CHAMBERS *et al.*, 1999; HERVIEU *et al.*, 2000). Der SLC 1-Rezeptor bindet MCH im sub-nanomolaren Bereich. Stimulation mit MCH führt zur Mobilisierung von intracellulärem  $Ca^{2+}$  sowie einer Reduktion der Forskolin-induzierten Produktion von cAMP. Dieser inhibitorische, durch Pertussistoxin blockierbare, Effekt weist auf die Signaltransduktion des SLC 1-Rezeptors über  $G\alpha_i$ -Proteine hin (CHAMBERS *et al.*, 1999; SAITO *et al.*, 1999). Nach aktueller Nomenklatur ist der SLC 1-Rezeptor als MCHR1 deklariert, er wird im Folgenden weiterhin nach der ursprünglichen Benennung als SLC 1-Rezeptor bezeichnet.

### 1.8.2. Der MCHR2-Subtyp

Die Suche nach GPCRs in humanen genomischen Sequenz-Datenbanken führte 2001 zur Identifikation eines zweiten MCH-Rezeptors (MCHR2). Der MCHR2 besteht aus fünf kodierenden sowie einem nicht-kodierenden Exon und ist auf Chromosom 6q21 lokalisiert (AN *et al.*, 2001). Insgesamt zeigt der MCHR2 eine 36 %ige Aminosäure-Homologie zum SLC 1/MCHR1. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Transmembrandomänen der beiden Rezeptoren zeigt eine 44 %ige Homologie. Der MCHR2 wird, wie SLC 1, spezifisch im Gehirn exprimiert. Im cerebralen Cortex, Hippocampus und Hypothalamus wurden hohe, im caudalen Nucleus, Putamen und Thalamus niedrige Expressionsraten des MCHR2 gefunden. Genauere Untersuchungen mittels *in situ* Hybridisierung in Affen (*Cercopithecus aethiops*) und humanem Gehirngewebe zeigen eine hohe Expressionsrate von SLC 1 im dorsomedialen Hypothalamus während MCHR2 in dieser Gehirnregion keine oder nur geringe Expressionsraten aufweist. Im Gegensatz dazu ist in den vorderen und lateralen Hypothalamusregionen die MCHR2-Expression erhöht und das SLC 1-Signal kaum zu detektieren. Im ventromedialen Nucleus des Hypothalamus werden beide Rezeptorvarianten stark exprimiert (SAILER *et al.*, 2001). Die Stimulation des MCHR2 mit MCH führt wie bei dem SLC 1/MCHR1 zur  $Ca^{2+}$ -Freisetzung. Im Gegensatz zum SLC 1 ist der MCHR2 Pertussistoxin-insensitiv und eine Stimulation mit MCH führt nicht zur Reduktion der Forskolin-stimulierten cAMP-Produktion. Dies deutet auf eine  $G\alpha_q$ -Protein-Kopplung des MCHR2 hin (AN *et al.*, 2001; SAILER *et al.*, 2001). MCHR2 zeigt wie auch der SLC 1 gegenüber  $\alpha$ -MSH keine Aktivierbarkeit (HILL *et al.*, 2001).

### 1.8.3. Der SLT-Subtyp

MORI *et al.* (2001) fanden mittels Sequenzvergleich im humanen Genom den GPCR SLT. Er wurde aus einer humanen Hippokampus-cDNA-Bibliothek kloniert und zeigt eine 31,5 %ige



Homologie zum SLC 1-Rezeptor. SLT-exprimierende CHO-Zellen reagieren auf eine Stimulation mit MCH im subnanomolaren Bereich. Expressions-Analysen aus humanen Geweben mittels PCR, zeigen im Gehirn, speziell im cerebralen Cortex, Amygdala, Hippocampus und Corpuss callosum sowie in verschiedenen peripheren Geweben eine SLT-Genexpression.

### **1.9. Gewebe- und Hämofiltrat-Peptidbanken als Quelle biologisch aktiver Substanzen**

Im Körper zirkulierende regulatorische Substanzen werden entweder direkt in die Blutbahn sezerniert oder sie diffundieren vom interstitiellen in den vaskulären Raum. Fast alle regulatorischen Substanzen wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Immun-, Neuro- und Ionenkanalmodulatoren sind im Plasma zu finden. Deshalb stellt Plasma eine Quelle für systemisch zirkulierende regulatorische Substanzen dar. In der IPF PharmaCeuticals GmbH wurde das Konzept zur Isolierung von bioaktiven Substanzen aus Hämofiltrat als eine zu Plasma vergleichbare Quelle im grösserem Maßstab realisiert sowie Extraktions- und Analyseverfahren etabliert (FORSSMANN *et al.*, 1993). Hämofiltrat wird von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gewonnen und enthält Peptidhormone in ähnlichen Konzentrationen wie sie auch in Blutplasma detektierbar sind (SCHEPKY *et al.*, 1994). Auf der Basis einer etablierten „Large-Scale“-Aufreinigung werden routinemässig 10.000 L Hämofiltrat-Chargen aufgearbeitet und daraus Peptidbanken generiert (SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1997). Aus den Hämofiltrat-Peptidbanken wurden verschiedene biologisch aktive Peptide isoliert (vgl. KUHN *et al.*, 1993; HESS *et al.*, 1995; SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1996). Die Herstellung von Peptidbanken aus Gewebekomponenten wie Thymus, Gehirn, Plazenta und Sperma wurde in den letzten Jahren am IPF soweit entwickelt (SEILER *et al.*, 1999), dass auch aus solchen Präparationen gewebespezifische biologisch aktive Substanzen isoliert werden können (LAMMERICH *et al.*, 2002). Bei der Suche nach Liganden für oGPCRs wurden bisher verschiedene Quellen verwendet. Dazu zählen Substanzbibliotheken mit bekannten Peptiden (SZEKERES *et al.*, 2000), oder es wurden in den Extrakten von Gewebekomponenten bekannte aber auch unbekannte Liganden identifiziert (REINSCHIED *et al.*, 1995; SAKURAI *et al.*, 1998; HINUMA *et al.*, 1998; KOJIMA *et al.*, 1999; SAITO *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2001; FUJII *et al.*, 2002; SHIMOMURA *et al.*, 2002).

## 1.10. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung funktionell aktiver Liganden für die Orphan Rezeptoren GPR 7, GPR 8, PNR und p40 und Charakterisierung der durch die Liganden ausgelösten Signaltransduktionsmechanismen. Die Auswahl der Orphan Rezeptoren wurde durch die mögliche biologische Relevanz bestimmt. Es wurden gezielt OR ausgewählt, die überwiegend im Gehirn exprimiert werden und daher neurologische Erkrankungen betreffen könnten. Aufgrund der Expressionsmuster der Rezeptoren GPR 7, GPR 8, PNR und p40 (O'DOWD *et al.* 1995; MAYER *et al.* 1998; ZENG *et al.* 1998; BREZILLON *et al.* 2002) besteht die Möglichkeit, dass Liganden der Rezeptoren im Gehirn über einen autokrinen, parakrinen oder exokrinen Mechanismus wirken. Daher sollten über ein initiales „Screening“ biologische aktive Substanzen in etablierten Gehirn- oder Hämofiltrat-Peptidbanken gefunden werden. Nach Verifizierung der biologischen Aktivität der Substanzen sollten endogene Liganden isoliert und pharmakologisch charakterisiert werden. Für die Etablierung des Bioassays wurde der SLC 1-Rezeptor mit seinem bekannten Liganden „melanin concentrating hormone“ verwendet. Darüber hinaus wurden genauere Untersuchungen zu den MCH-ausgelösten Signaltransduktionsmechanismen durchgeführt.

Aufgrund der Beobachtung, dass vielen GPCRs mehr als einen Liganden haben, wurden auch nach Identifikation eines Liganden durch andere Gruppen, laufende Aufreinigungen fortgesetzt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien, Organismen und Kulturbedingungen

#### 2.1.1. Herstellung und Sterilisation von Lösungen

Thermostabile wässrige Lösungen und Gebrauchsgegenstände (Glaswaren, Polypropylen-Pipettenspitzen) wurden 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck in einem Dampfdruckautoklaven (Bioclav 3.021001, Schütt Labortechnik) sterilisiert.

Lösungen, die nicht mit feuchter Hitze behandelt werden konnten, wurden über Cellulose-Acetat-Phthalat(CAP)-Membranfilter sterilfiltriert (Filtropur, Sarstedt, Ø 0,22 µm oder 0,45 µm). Die Entkeimung von Metall- und Keramikwaren erfolgte über 3 h bei 180 °C trockener Hitze.

Das Ansetzen von Pufferlösungen, Nährmedien und Nähragar erfolgte ausschließlich mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q<sup>UF</sup> plus, Millipore), während für molekularbiologische Zwecke steriles, schwermetallfreies Wasser (ACS-grade) genutzt wurde. Die für die Reagenzienherstellung benötigten Lösungsmittel und Feinchemikalien hatten Analysequalität und wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen BioWhittaker, Costar/Corning, Falcon, Greiner, Life Technologies™, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

#### 2.1.2. Geräte und Apparaturen

Neben laborüblichen Standardgeräten wie Präzisionspipetten, Heizplatten, Magnetrührern u.ä. wurden folgende Geräte verwendet:

<b>Laborgerät (Model)</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	Renner, Darmstadt
Analytik-Waage (AC 120 S)	Satorius, Göttingen
Bildbearbeitung:	
- Kodak EDAS 290-Dokumentations-system mit Software Kodak 1D v.3.5.0	Kodak, Frankfurt
- Gel Doc 2000 System mit Software QuantityOne® 4.0.1	Bio-Rad, California, USA
FLIPR™ (Fluorimetric Imaging Plate Reader)	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Inkubationsschrank (B6030)	Heraeus, Hanau
Kapillarelektrophorese-Sequenzier:	
- ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser	AppliedBiosystems, Weiterstadt
Kulturschüttler (Innova™ 4340)	New Brunswick, C.A., USA

**Laborgerät (Model)**

LumiStar®, Luminometer  
 Proteingelektrophorese:  
 - Mini-Protean II Elektrophoresezellen  
 - XCell Sure Lock Gelkammer  
 Hybridisierungsöfen (HB-1D)  
 Speedvac Univapo (150 H)  
 Spektralphotometer (DU® 640)  
 Sterile Arbeitsbank (8511)  
 Thermocycler:  
 - GeneAmp PCR System 2400 und 9600  
 Ultraschallgerät (Vibra cell)  
 UV-Stratalinker

**Hersteller**

BMG Lab Technologies GmbH, Offenburg  
 BioRad, California, USA  
 Invitrogen™, Groningen, NL  
 Techne, Cambridge  
 Uniequip, Martinsried  
 Beckmann, München  
 Köttermann, Uetze-Hänigsen  
 Perkin Elmer, Weiterstadt  
 Sonic & Materials, Danbury, Connecticut, USA  
 Stratagene, Kirkland, USA

**2.1.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterial**

Sofern nicht ausdrücklich erwähnt, waren für allgemeine Laborarbeiten (Reaktionsgefäße, Handschuhe, Pipettenspitzen, Glaswaren usw.) die Firmen Greiner (Nürnberg), Eppendorf (Hamburg), Nunc (Wiesbaden) und Roth (Karlsruhe) die Bezugsquellen. Labor-Chemikalien wurden in Analysen-Qualität und biochemische Reagenzien in Molekularbiologie-Qualität von den Firmen Applichem (Darmstadt), Bio-Rad (California, USA), Boehringer (Mannheim), Life Technologies™ (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Peribo (Bonn) und Pharmacia (Freiburg) bezogen.

Filterpapier	Schleicher und Schuell, Hannover
Filterkarton Whatman 3 MM	Roth, Karlsruhe
Mehrfachkulturschalen, 24-Well	Corning Costar, NY, USA
Mehrfachkulturschalen, 96-Well, weiß m.D., Klarb.	Corning Costar, NY, USA
Mehrfachkulturschalen, 96-Well, schwarz m.D., Klarb.	Corning Costar, NY, USA
Polyscreen® PVDF Transfer Membran 0,45 µm	NEN® Life Science LTD., Boston, USA
Röntgenfilm, CL-XPosure™	Peribo Science, Illinois, USA
Röntgenfilmentwickler Rodinal B&W	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Röntgenfilmfixierer Tetenal Superfix	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Sterilfilter: Millex-GS	Millipore, Eschborn
Zellkultur-Flaschen, 25 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Newton, NC, USA
Zellkultur-Flaschen, 75 cm <sup>2</sup> Filterdeckel	Sarstedt, Newton, NC, USA
Zellkulturschalen, 100 × 20 mm	Falcon/Becton-Dickenson, NY, USA

**2.1.4. Enzyme und Reagenziensätze**

Für gentechnische Arbeiten wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Enzyme und entsprechenden Puffer von den angegebenen Firmen bezogen. Die spezifische Spaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsendonucleasen der Firmen Pharmacia (Freiburg)

**Tabelle 2:      Verwendete DNA-modifizierende Enzyme**

<b>Enzym</b>	<b>Bezeichnung / Hersteller</b>
Reverse Transcriptase	Superscript™ II RT, Life Technologies™, Eggenstein
RNase-Inhibitor	RNasin, Promega, Heidelberg
DNA-Polymerase	Taq Polymerase, Qiagen, Hilden
Klenow-Enzym	DNA-Polymerase I „large fragment“, Roche, Mannheim
DNA-Ligase	T4 DNA Ligase, Pharmacia, Freiburg

Die Modifikation der DNA (Spaltung, Dephosphorylierung, Ligation) erfolgte dabei stets nach den Instruktionen des Herstellers. Die enzymatische Spaltung mit Restriktionsendonucleasen wurde in den entsprechenden Puffern bei 37 °C in einem Volumen von mindestens 30 µl durchgeführt, um Nebeneffekte durch hohe Konzentrationen an Glycerin, in denen die Enzyme gelagert werden, zu vermeiden.

Zur schnelleren und einheitlichen Durchführung von molekular- und zellbiologischen Routinearbeiten wurden die in Tabelle 3 angegebenen Reagenziensätze („Kits“) verwendet.

**Tabelle 3:      Verwendete kommerziell erhältliche Kits**

<b>Anwendung</b>	<b>Kit / Hersteller</b>
RNA-Isolierung	RNeasy® Mini Kit, Qiagen
Plasmid-Isolierung	NucleoSpin® Plus-Kit, Macherey-Nagel
Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	NucleoSpin Extract Kit, Macherey-Nagel
Reinigung von PCR-Produkten	PCR-Purification Kit, Qiagen
Reinigung von DNA-Fragmenten	NucleoSpin Extract Kit, Macherey-Nagel
DNA-Sequenzierung	ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing
DIG Markierung von DNA	DIG DNA Labeling Kit, Roche
Transfektion eukariotischer Zellen	Effectene™ Transfection Reagent, Qiagen

Für die molekular- und zellbiologischen Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit die in Tabelle 4 aufgeführten Bakterienstämme und Plasmide verwendet.

**Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme und Plasmide**

Bakterienstamm	Genotyp / relevante Eigenschaften	Anbieter / Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL2Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F', <i>proAB, lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15, Tn10(Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup></i> ]	Statagene®, Amsterdam, NL
Plasmide	relevante Eigenschaften	Anbieter / Referenz
pcDNA3.1neo (-) (XhoI/HindIII)	Klonierungs-Vektor mit Neomycin-Gen (Geneticin (G418)-Resistenz) zur Selektion stabil transfizierter Zelllinien	Invitrogen®, Groninngen, NL
pGL2-basic-Vektor	Luciferase-Reportergen-Vektor, kein Promotor oder Enhancer	Promega®, Heidelberg

### 2.1.5. Oligonukleotide

Die zur Überprüfung der cDNA-Sequenzen und für RT-PCR benötigten Oligonukleotide wurden von veröffentlichten Nukleotidsequenzen aus der GenBank (2.1.7) abgeleitet und von MWG-Biotech bezogen. Sie sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5: Übersicht der eingesetzten Oligonukleotide**

Bezeichnung / Richtung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Bemerkungen
GPR 24-5' (forward)	CATTACTCGAGAGGATGGACCTGGAAGCCTCGCTGCT	Oligo für GPR 24/SLC 1
GPR-25-3' (reverse)	ACAGAAAGCAAAGGCACCTGATAAAAGCTTCAGCG	Oligo für GPR 24/SLC 1
GPR24 SeqOli 1 (reverse)	ATGCCCTTCATGATCCAC	Sequenzier-Oligo für GPR 24/SLC 1
GPR24 SeqOli 2 (reverse)	ATGCCCAGGAGAAAGAG	Sequenzier-Oligo für GPR 24/SLC 1
GPR24 SeqOli 3 (forward)	CCCCTGTGTGGCTGTATG	Sequenzier-Oligo für GPR 24/SLC 1
GPR24 SeqOli 4 (forward)	TGGGTTGGCAGGCGTATG	Sequenzier-Oligo für GPR 24/SLC 1
GPR7 Oli 1 (forward)	GACCTCGAGCGGCTCCTCTGCCCTCGTTGAGA	Oligo für GPR 7
GPR7 Oli 2 (reverse)	GACTGAAGCTTTGGCCAGGAGTGGCGCGCAGTTG	Oligo für GPR 7
GPR7 SeqOli-3 (forward)	CCTTCTCCAGCCTCTACT	Sequenzier-Oligo für GPR 7
GPR7 SeqOli-4 (reverse)	CGGTCGGCGCTCATGAC	Sequenzier-Oligo für GPR 7
GPR7 SeqOli-5 (forward)	GGCAATCCTGGCGGTGTG	Sequenzier-Oligo für GPR 7

Bezeichnung / Richtung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Bemerkungen
GPR7 SeqOli-6	CCTTGCGTGGCTGTCC	Sequenzier-Oligo für GPR 7
GPR8 Oli 11 (forward)	GAAGTATCTGCTGAAGTCTCACCA	Oligo für GPR 8
GPR8 Oli 12 (reverse)	TTCAGCACCGCAATATGCTGCGGA	Oligo für GPR 8
GPR8 SeqOli-3 (forward)	GGGCTCTTCACGCTGGTC	Sequenzier-Oligo für GPR 8
GPR8 SeqOli-4 (reverse)	CGATGTTGACGGGCAGTA	Sequenzier-Oligo für GPR 8
GPR8 SeqOli-5 (forward)	CGAGCGGGTCTGGTTCAA	Sequenzier-Oligo für GPR 8
GPR8 SeqOli-6 (reverse)	GAAGCCCAGGACCAAAAGT	Sequenzier-Oligo für GPR 8
PNR Oli 1 (forward)	GCACTCGAGACCATGAGAGCTGTCTTCATCCAAG	Oligo für PNR
PNR Oli 2 (reverse)	GGCGGAAGCTTTCATTCTTGGTACAAATCAACAGT	Oligo für PNR
PNR SeqOli-3 (forward)	TACCTGGACACCCTCTTC	Sequenzier-Oligo für PNR
PNR SeqOli-4 (revers)	GCTCAATGTGGTAATCTGC	Sequenzier-Oligo für PNR
PNR SeqOli-5 (forward)	ACTTCCCTTTGTCTTTGTCT	Sequenzier-Oligo für PNR
PNR SeqOli-6 (revers)	AGTGGCGGTCAATGGAAAT	Sequenzier-Oligo für PNR
P40 Oli 1 (forward)	GGACTCGAGGGCGTCATGGCTCAAAGGGCCTT	Oligo für p40
P40 Oli 2 (revers)	GCGAGAAGCTTCTTTCAGAGTTCAAATGCAGGGAA	Oligo für p40
P40 SeqOli-3 (forward)	GAGAAGCAGGCAGAAGATT	Sequenzier-Oligo für p40
P40 SeqOli-4 (revers)	CCTCTCTGAATACCTTATAG	Sequenzier-Oligo für p40
P40 SeqOli-5 (forward)	GGTCAAGCCCAGTGTAGA	Sequenzier-Oligo für p40
P40 SeqOli-6 (revers)	TATGGCTTTGAGGAATCTTTT	Sequenzier-Oligo für p40
pcDNA 3.1 FW (forward)	ATACGACTCACTATAGGGAG	Sequenzier-Oligo für pcDNA 3.1 Vektor
pcDNA 3.1 REV (revers)	TAGAAGGCACAGTCGAGGCT	Sequenzier-Oligo für pcDNA 3.1 Vektor

## 2.1.6. Größenstandarts

### DNA-Größenmarker

**100 Basenpaarleiter:** 2072 Bp, 1500 Bp, 1400 Bp, 1300 Bp, 1200 Bp, 1100 Bp, 1000 Bp, 900 Bp, 800 Bp, 700 Bp, 600 Bp, 500 Bp, 400 Bp, 300 Bp, 200 Bp, 100 Bp (Life Technologies™, Eggenstein)

**1 Kilobasenpaarleiter:** 12216 Bp, 11198 Bp, 10180 Bp, 9162 Bp, 8144 Bp, 7126 Bp, 6108 Bp, 5090 Bp, 4072 Bp, 3054 Bp, 2036 Bp, 1636 Bp, 1018 Bp, 506 Bp, 396 Bp, 344 Bp, 298 Bp (Life Technologies™, Eggenstein)

### RNA-Größenmarker

**9,5 – 0,24 Kilobasenpaarleiter:** 9.49 Kb, 7.46 Kb, 4.40 Kb, 2.37 Kb, 1.35 Kb, 0.24 Kb (Life Technologies™, Eggenstein)

**6,9-0,3 Kilobasenpaarleiter, Digoxigenin-markiert:** 6948 Bb, 4742 Bb, 2661 Bb, 1821 Bb, 1517 Bb, 1049 Bp, 575 Bp, 438 Bp, 310 Bp (Roche, Mannheim)

### **Protein-Größenmarker**

**Prestained Protein Marker:** 175 kDa, 83 kDa, 62 kDa, 47.5 kDa, 32.5 kDa, 25 kDa, 16.5 kDa, 6.5 kDa (New England Biolabs, Schwalbach)

### **2.1.7. Verwendete Peptidbanken**

Für die Suche von Liganden für die Orphan Rezeptoren GPR 7, GPR 8, PNR und p40 wurden Peptidbanken aus Gesamthirn und Stammhirn vom Schwein, sowie eine humane Hämofiltratbank verwendet.

Die Hämofiltrat-Peptidbank (981116) wurde aus 10.000 l Hämofiltrat hergestellt. Nach Ultrafiltration, bei der Peptide über 50kDa entfernt wurden, wurde mittels pH-Stufenelution über eine Kationenaustausch-Säule das Hämofiltrat in acht pH-Pools getrennt. Im Anschluss erfolgte eine Reversed-Phase-Chromatographie über eine 10 × 40 cm Fineline Source RP C18 der einzelnen pH-Pools. Die daraus erhaltenen Fraktionen beinhalteten pro pH-Pool 63 Fraktionen (SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1997).

Die Peptidbanke aus Stammhirn vom Schwein (990517) wurden aus 29 kg Stammhirn hergestellt. Nach der Extraktion der Peptide aus dem Gewebe wurde durch Bindung an einen Kationenaustauscher und nachfolgender pH-Stufenelution das Homogenat in sechs pH-Pools getrennt. Die resultierenden pH-Pools wurden anschliessend mit Reversed-Phase-Chromatographie über eine 10 × 40 cm Fineline Source RPC 15 weiter unterteilt. Die einzelnen pH-Pools (pH-Pool 0-5) enthielten anschliessend jeweils 46 Fraktionen. Die Peptidbank aus Gesamthirn vom Schwein (990705) wurde aus 29,3 kg Gewebehomogenat hergestellt. Nach Gewebeeextraktion der Peptide, pH-Stufenelution und Reversed-Phase-Chromatographie über eine 10 × 40 cm Fineline Source RP C15 umfasste die Peptidbank sieben pH-Pools (pH-Pool 0-6) mit je 46 Fraktionen (SEILER *et al.*, 1999). Die Peptidbanken wurden von Dr. L. Ständker zur Verfügung gestellt.

### **2.1.8. Genutzte Datenbanken, Software und Statistik**

Die Suche nach öffentlich zugänglicher Sequenzinformationen in Internetdatenbanken erfolgte auf dem NCBI (National Center for Biotechnology Information)-Server und dessen BLAST-Algorithmus („Basic Alignment Search Tool“, ALTSCHUL *et al.*, 1997). Der Vergleich verschiedener sequenzierter DNA-Fragmente untereinander wurde mit der Sequencher V3.1 Software (ABI) durchgeführt. Daten von mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit 3-6 Replika wurden statistisch mit dem Programm GraphPad Prism



(Version 3.0 for Windows; GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA) ausgewertet. Die im Ergebnissteil dargestellten Standardabweichungen (SD) wurden nach folgender Formel berechnet:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_{\text{Mittelwert}})^2}{n - 1}}$$

( $y_i$  = Einzel-Messwerte;  $y_{\text{Mittelwert}}$  = Mittelwert aller Einzel-Messwerte,  $n$  = Anzahl der Replika)

Signifikanzen wurden in GraphPad Prism mit Bonferroni's Multiple Comparison Test berechnet. Dabei wurde  $p < 0,05$  als Grenze definiert. Die Signifikanzen betragen (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  und (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Die planimetrische Auswertung der in Western Blot Analysen erhaltenen spezifischen Protein-Signale (2.7.3) erfolgte mit Hilfe des Programms QuantiScan (Fa. Biosoft, Cambridge, UK).

Diese Dissertation wurde mit Programmen des Microsoft Office-Paketes, GraphPad Prism sowie mit Adobe Photoshop 5.0 erstellt.

## 2.2. Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten

### 2.2.1. Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion oder „polymerase chain reaction“ (PCR) ist eine *in vitro* Standardmethode zur selektiven, exponentiellen Amplifikation von DNA-Abschnitten (SAIKI *et.al.*, 1985). Diese Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes ist die Voraussetzung für weiterführende Schritte wie Klonierung oder Sequenzierung.

Reaktionsansatz für eine Standard-PCR:

- 10 % 10 × PCR-Puffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM KCl,  
1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Tween)
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 200 nM OligonucleotidPrimer (sense und antisense)
- 200 mM dNTP-Mix (je 200mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 7,5 – 200 ng DNA-Matritze (genomische DNA, cDNA oder Plasmid)
- 3,5 U Taq DNA-Polymerase (Expand High Fidelity PCR System,  
Roche, Mannheim)
- 2 % DMSO
- ad 100 % ddH<sub>2</sub>O

Angegeben sind die resultierenden Endkonzentrationen in einem 30 µl bzw. 50 µl Ansatz.

Eine Standard-PCR wurde nach folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

1.	Initiale Denaturierung der Matritze	95 °C	3 min	1 Zyklus
2.	Denaturierung	95 °C	20 s	
	Oligonukleotidanlagerung	44 °C	30 s	
	Elongation	72 °C	2 min	5 Zyklen
3.	Denaturierung	95 °C	20 s	
	Oligonukleotidanlagerung	49 - 65 °C <sup>1</sup>	30 s	
	Elongation	72 °C	2 min	35 Zyklen
4.	End –Elongation	72 °C	7 min	1 Zyklus
5.	Reaktionsende	4 °C	∞	

<sup>1</sup> Die Standard-Annealingtemperatur betrug für GPR 24/SLC 1 49 °C, GPR 7 56°C, GPR 8 65°C, PNR und p40 58°C. Für GPR24/SLC 1 und GPR 8 wurden die PCR-Reaktionen mit den Programmschritte 1, 3, 4 und 5 durchgeführt.

Zur Durchführung der PCR wurde ein GeneAmp PCR System 2400 der Firma Perkin Elmer verwendet. Einzelnen Parameter wie die MgCl<sub>2</sub>-, DMSO-Konzentration, die Zykluszahl und die Annealingtemperatur wurden in initialen PCR-Reaktionen optimiert. Die Länge der Extensionsphase bei 72 °C richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments (ca. 1000 bp/min).

### 2.2.2. Gelelektrophoretische Trennung von DNA

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten zu präparativen oder analytischen Zwecken erfolgte nach ihrem Molekulargewicht in nativen, horizontalen Agarosegelen. Diese wurden in Abhängigkeit vom Trennungsziel in 0,85 – 1,5 %igen (w/v) Agarose/1 × TAE Gelen bei einer Spannung von 10 V/cm in 1 × TAE-Laufpuffer durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurde der Agaroselösung vor dem Gelieren 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden vor der Applikation auf das Gel mit 0,1 Volumen glycerinhaltigem Auftragspuffer versetzt. Dieser erleichterte das Sedimentieren der Proben in die Geltaschen und ließ durch dessen Bromphenolblau-Anteil die Lauffront der Elektrophorese erkennen. Der Auftrag von jeweils 0,5 µg/ml DNA-Größenstandard (1 kbp- bzw. 100 bp-Leiter, Life Technologies™) erlaubte die Abschätzung der relativen Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente. Die fertigen Gele wurden mit den Dokumentationssystemen von Kodak EDAS 290 System mit Software Kodak 1D v.3.5.0 und Gel Doc 2000 System mit Software QuantityOne ® 4.0.1 fotografiert und archiviert.

Ethidiumbromid-Stammlösung     1mg/ml Ethidiumbromid in ddH<sub>2</sub>O

50 × TAE-Puffer (Stammlösung):

2 M Tris  
100 mM EDTA  
1 M Essigsäure

5 × DNA-Auftragspuffer:

40 % Glycerin  
20 mM Tris-HCl (pH 8.0)  
2 mM EDTA  
0,1 % (w/v) Bromphenolblau

### 2.2.3. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolation von gelelektrophoretisch getrennter DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract-Kits der Fa. Macherey-Nagel (VOGELSTEIN & GILLESPIE, 1979). Das die DNA-enthaltende Gelstück wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und eingewogen. Pro 100 mg Agarosegel wurden 300µl Puffer NT1 zugegeben und die Agarose bei 50 °C und 400 rpm für 10 min geschmolzen. Die gesamte Lösung wurde auf eine NucleoSpin Extract-Säule aufgebracht und 1 min bei 8000 × g zentrifugiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit je 500 µl Puffer NT3 bei 12.000 × g und eine Trocknung der Säule durch zweiminütige Zentrifugation. Die Elution der DNA wurde mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O durchgeführt.

### 2.2.4. Ligation

Für die Ligation der zuvor über NucleoSpin Extract-Säulen gereinigten PCR-Produkte in den pcDNA3.1neo (-) (XhoI/HindIII) Vektor wurde ein 3 bis 8-facher molarer Überschuß des DNA-Fragmentes zu 20 ng Vektor gegeben. Nach der Zugabe von 10 × Ligationspuffer und 3 U T4 DNA Ligase (Promega) wurde der 10 µl Ansatz für 12-16 h bei 12-14 °C inkubiert. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde anschließend in kompetente *Escherichia coli* XL2 blue transformiert.

### 2.2.5. Herstellung transformationskompetenter Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter Zellen erfolgte in Anlehnung an die Methode von NISHIMURA *et al.* (1990).

1 ml einer *Escherichia coli* XL blue-Übernachtskultur in LB-Flüssigmedium wurden in 100 ml Medium A inokuliert und bei 37 °C, 200 rpm bis zu einer OD<sub>548 nm</sub> = 0,55 inkubiert. Nach

10 min auf Eis wurden die Zellen 10 min bei  $1500 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  sedimentiert und in 1 ml eiskaltem Medium A resuspendiert. Nach vorsichtiger Zugabe von 5 ml Medium B wurden je 100  $\mu\text{l}$ -Aliquots in vorgekühlte ( $-80^\circ\text{C}$ ), sterile Eppendorfgefäße pipettiert und sofort bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium:

1,0 % Caseinhydrolysat (Sigmar C-0626)

0,5 % Hefe-Extrakt (Sigmar Y-4000)

0,5 % NaCl

Lösen der Feststoffe in ddH<sub>2</sub>O, einstellen des pH 7.4 mit 1 N NaOH und autoklavieren.

Medium A:

LB-Flüssigmedium mit Zusatz von: 10 mM MgSO<sub>4</sub>

0,2 % Glukose

MgSO<sub>4</sub>-Lösung und eine Glukose-Stammlösung wurden über einen Spritzenfilter zum LB-Medium gegeben.

Medium B (Einfriermedium):

LB-Flüssigmedium mit Zusatz von: 36 % Glycerin

12 % Polyethylenglykol (PEG 8000)

12 mM MgSO<sub>4</sub>

Das PEG 8000 wird in Glycerin gelöst und zum magnesiumhaltigen LB-Medium gegeben.

### 2.2.6. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Bakterienzellen (2.1.4) langsam auf Eis aufgetaut, mit 5  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz (2.1.4) versetzt und vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis erfolgte durch einen Hitzeschock von  $42^\circ\text{C}$  für 45 Sekunden das Einbringen der rekombinanten Plasmid-DNA in die Zellen. Der Ansatz wurde sofort im Anschluß für mindestens 5 min auf Eis abgekühlt. Nachfolgend wurden 250  $\mu\text{l}$  vorgewärmtes SOC-Medium hinzugefügt und für mindestens 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  und 300 rpm inkubiert. 150  $\mu\text{l}$  des Transformationsansatzes wurden anschließend auf ampicillinhaltige Selektions-Agarplatten ausgestrichen und bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert, so dass nur erfolgreich mit ampicillinresistenz-vermitteltem Vektor transformierte *E.coli*-Zellen wachsen konnten.

SOC-Medium:

- 2 % Caseinhydrolysat
- 1 % Hefe-Extrakt
- 10 mM NaCl
- 10 mM MgSO<sub>4</sub>
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 20 mM Glucose, steril filtriert

Das Medium wurde vor der Zugabe der Glukose autoklaviert und mit 5 N NaOH auf pH 7.0 eingestellt.

Selektions-Agar-Platten:

- LB-Flüssigmedium mit Zusatz von: 1,5 % Agarose (Sigmar A-5054)
- 100 µg/ml Ampicillin

Der Zusatz von Ampicillin erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlung der Nährmedien auf 50 °C.

### 2.2.7. Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen beruht im Wesentlichen auf der Methode der alkalischen Lyse (BIRNBOIM & DOLY, 1979), die mit Hilfe des NucleoSpin Plus-Kits der Fa. Macherey-Nagel durchgeführt wurde.

Von den gewachsenen Klonen wurde eine 3 ml Übernachtskultur mit ampicillinhaltigem LB-Selektivmedium angesetzt. 1,5 ml der Bakteriensuspension wurde für 30 s bei  $12.000 \times g$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbliebene Pellet mit 250 µl RNase A-haltigem Puffer A1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterienzellwände erfolgte durch Zugabe von 250 µl alkalischem, SDS-haltigen Puffer A2 für 5 min bei RT. Störende chromosomale Bakterien-DNA, bakterielle Proteine und Zellwandreste wurden durch Zugabe von 300 µl Puffer A3 bei anschließender 5-minütiger Inkubation auf Eis gefällt und durch eine 10-minütige Zentrifugation bei  $12.00 \times g$  und 4 °C abgetrennt. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine NucleoSpin-Säule überführt und durch Zentrifugation ( $12.00 \times g$ , 1 min) in die Säule eingebracht. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zur Entfernung von Rückständen zweimal mit 600 µl EtOH-haltigem Puffer A4 gewaschen. Durch nochmaliges zentrifugieren wurde noch verbliebener Puffer beseitigt. Die Elution der DNA erfolgte durch Inkubation der Säule mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O für 2 min bei RT und abschließender Zentrifugation ( $12.000 \times g$ , 1 min).

### 2.2.8. Sequenzierung von DNA

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz von DNA-Fragmenten wurde eine modifizierte Form des enzymatischen Kettenabbruchverfahrens nach SANGER *et al.* (1977) genutzt. Dabei wird

das DNA-Fragment durch Anlagerung eines einzelnen komplementären Primers linear amplifiziert. Bei diesem sogenannten „cycle sequencing“-Verfahren sind geringe Mengen einzel- oder doppelsträngiger DNA für die Analysierung der DNA-Sequenz ausreichend. Die Amplifizierung erfolgt dabei wie bei einer PCR durch die temperaturabhängige Anlagerung des Primers und dessen Verlängerung nach Denaturierung der Zielsequenz. Zusätzlich zu den für die Neusynthese verwendeten Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) werden dem Reaktionsansatz in einem bestimmten Verhältnis Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugefügt. Werden diese ddNTPs während der Extension in einen neu entstehenden Strang eingebaut, kommt es zum Abbruch der Kettenreaktion. Im Verlaufe der Wiederholungen werden spezifische Abbruchprodukte im Reaktionsansatz akkumuliert. Zur Markierung der Abbruchprodukte sind die vier ddNTPs mit Farbstoffen verschiedener Fluoreszenzspektren markiert. Diese ermöglichen die parallele automatisierte Detektion der spezifischen Produkte während der elektrophoretischen Trennung der unterschiedlich großen DNA-Fragmente in der Kapillarelektrophorese.

Die Sequenzierreaktion wurde unter Verwendung des PRISM BigDye Terminator Sequencing Kits (Applied Biosystems) nach Anweisung des Herstellers mit präparierter Plasmid-DNA durchgeführt.

Einfacher Reaktionsansatz für die Sequenzierreaktion:

4 µl	BigDye Terminator Ready Reaction Mix
1 µl	Oligonucleotidprimer (10pmol/µl)
x µl	Matritzen-DNA (DNA in ng = Basenpaaranzahl / 7,5)
ad 20 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die Amplifizierung erfolgte mit folgendem Temperaturprogramm:

1.	Denaturierung	96 °C	10 s	
2.	Oligonukleotidanlagerung	45-60 °C	5 s	
3.	Elongation	60 °C	4 min	25 Zyklen
4.	Reaktionsende	4 °C		

### 2.2.8.1. Aufreinigung von Sequenzierproben durch DNA-Präzipitation

Nach Ablauf des Temperaturprogrammes wurden die Ansätze auf ein Endvolumen von 100 µl mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und in Eppendorfgefäße überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 15 µl 2 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 250 µl 95 %igem Ethanol für

10 min auf Eis. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation bei 15.000 rpm über 15 min sedimentiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das unsichtbare DNA-Pellet wurde mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation 5 min, 15.000 rpm) und danach einige Minuten im Vakuum getrocknet. Zur Sequenzierung im Kapillarelektrophorese-Sequenzier (PRISM 310 Genetic Analyzer, ABI) wurden die Proben mit Formamid-haltigem TSR-Reagenz (ABI) aufgenommen, bei 95 °C für 2 min denaturiert und zur Unterdrückung der Renaturierung schnell auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde über 30 s auf das Kapillargel aufgetragen und bei einer Spannung von 15 kV und einer Temperatur von 50 °C elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung der aufgenommenen Fluoreszenzsignale erfolgte vollautomatisch durch die Sequence Analysis V3.4.1-Software.

### **2.3. Arbeiten mit RNA und Northern Blot Analysen**

RNA ist sehr anfällig für ubiquitär vorkommende RNasen, daher wurden beim Arbeiten mit RNA besondere Vorkehrungen getroffen. Zu diesen zählte die Verwendung von gestopften Pipettenspitzen, das Tragen von Handschuhen sowie die Verwendung von RNase-freien Lösungen. Isolierte RNA wurde in sterilem ddH<sub>2</sub>O in RNase-freien Eppendorfgefäßen bei –80 °C gelagert.

#### **2.3.1. Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen**

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wurde der RNA Isolierungs Kit RNeasy® Mini (Qiagen) verwendet. Die aus einer 24 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche durch Trypsinisierung gewonnenen Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 350 µl RTL-Lysispuffer (inkl. 1 % β-Mercaptoethanol) aufgeschlossen. Bei den verwendeten großen Zellzahlen erfolgte eine weitere Zerkleinerung mit einem QIAshredder (Qiagen).

Das in RNA-Lysispuffer vorliegende Homogenisat wurde zur Abtrennung von größeren Zelltrümmern und Fettpartikeln 3 min bei 12.000 × g zentrifugiert und der Überstand mit 1 Volumenteil 70 %igem Ethanol vermischt. Die Bindung an die RNeasy-Säule erfolgte durch Zentrifugation des Homogenisats bei 8000 × g für 15 s. Durch waschen mit 700 µl RW1-Puffer und 500 µl ethanolhaltigem RPE-Puffer bei 8000 × g für 15 s wurden Reste von Lysispuffer und andere Verunreinigungen entfernt. Nach erneuter Zugabe von 500 µl RPE-Puffer wurde die Säule 2 min bei 8000 × g bis zur Trocknung zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte mit 50 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O und Zentrifugation für 2 min bei 8000 × g und 4 °C. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden 5 µl der RNA-Lösung abgenommen und die restliche Probe bei –80 °C aufbewahrt.

### 2.3.2. Photometrische Messung

Für bestimmte Experimente wie DNA-Sequenzierung und reverse Transkription ist die Bestimmung der Konzentration der Nucleinsäurelösung notwendig. Sie erfolgte durch die Aufnahme eines UV-Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 260 nm in einer Quarzküvette der Schichtdicke 1 cm. Die Nucleinsäurekonzentration  $c$  ergibt sich aus der im Spektralphotometer bestimmten optischen Dichte ( $OD_{260}$ ) durch folgende Beziehung:

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = OD_{260} \times \epsilon \times V$$

$V$  = Verdünnungsfaktor der wässrigen Nucleinsäurelösung

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient

$\epsilon$  für ssRNA = 1,04

$\epsilon$  für dsDNA = 0,05

Anhand der UV-Absorption lässt sich zusätzlich die Reinheit einer Nucleinsäurepräparation bestimmen. Der Quotient aus den gemessenen optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) gibt an, inwieweit die Nucleinsäurelösung durch Proteinreste verunreinigt ist. Reine DNA-Präparationen weisen einen Quotienten von 1,8 auf, bei sauberen RNA-Lösungen beträgt er 2,0.

### 2.3.3. Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Denaturierte RNA-Moleküle lassen sich in einem Natrium-Phosphat-gepuffertem Agarosegel nach ihrem Molekulargewicht auftrennen. Die Agarose-Polymere bilden ein dreidimensionales Netzwerk, in dem kleinere Moleküle im elektrischen Feld schneller wandern als größere. Für die Trennung der RNA wurden 1,2 %ige (w/v) Agarose/10 mM Natrium-Phosphat Gele mit einer Lauflänge von 13 cm hergestellt und die Elektrophorese bei einer angelegten Spannung von 50 V in 10 mM Natrium-Phosphatpuffer für 5 h durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben (5  $\mu$ g RNA, lyophilisiert) wurden in 16  $\mu$ l glyoxalhaltigem Probenpuffer resuspendiert, 1 h bei 50 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Zum leichteren Einsinken der Proben in die Geltaschen wurden diese mit 0,2 Volumen glycerinhaltigem RNA-Auftragspuffer versetzt.



Natrium-Phosphatpuffer (100 mM Stammlösung):

40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Für die Herstellung der Lösungen wurde ausschließlich DEPC-ddH<sub>2</sub>O verwendet. Einstellen des pH 7.0 mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Probenpuffer:

1 M Glyoxal (deionisiert, pH >5)

10 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7.0)

50 % DMSO

RNA-Auftragspuffer:

50 % Glycerin

10 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7.0)

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

RNA-Marker Färbelösung:

0,5 µg/ml EtBr in ddH<sub>2</sub>O

### 2.3.4. Kapillarblot

Die Überführung der elektrophoretisch aufgetrennten RNA auf eine Nylonmembran (Pall, Biotyne® PLUS) erfolgte durch Kapillartransfer. Hierbei wurden Agarosegel und Nylonmembran so zwischen Filterkartons (Whatmann, 3 MM, Roth) auf einer Brücke angeordnet, dass die Ränder des unteren Filterkartons in ein mit Transferpuffer gefülltes Reservoir eintauchten. Zur Aufrechterhaltung des Kapillarsoges diente ein 2 cm hoher Stapel aus Zellstoff, der mit einem 1 kg Gewicht beschwert wurde. Der Transfer erfolgte über 16 h. Im Anschluß wurde die Membran einmal für 5 min in 6 × SSC gewaschen und bei RT getrocknet. Zur Immobilisierung der RNA wurde die Membran für 2 h bei 80 °C erhitzt und mit UV-Licht von 1200 J (UV-Stratalinker, Stratagen) bestrahlt.

20 × SSC (Transferpuffer):

3 M NaCl

0,3 M Trinatriumcitrat-Dihydrat

Lösen der Feststoffe in ddH<sub>2</sub>O, einstellen des pH 7.0 mit HCl.

### 2.3.5. Northern Hybridisierung mit DIG-markierten cDNA-Sonden

Der Nachweis spezifischer RNA-Moleküle erfolgte durch Hybridisierung der Membran mit einer entsprechenden digoxigenin markierten cDNA-Sonde. Für die Herstellung der benötigten cDNA-Sonden wurden in einer PCR-Reaktion DNA-Fragmente nach der „random-primed“-Methode (FEINBERG & VOGELSTEIN, 1983) unter Verwendung des DIG DNA Labelling Kits (Roche) mit DIG-11-UTP nicht radioaktiv markiert.

Das für die Denaturierung der RNA benötigte Glyoxal und andere Pufferreste wurden durch waschen der Blots mit 20 mM Tris (Waschpuffer 1) für 1 h bei 65 °C in einem Rotationsofen (Techne) entfernt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde nachfolgend mit 35 ml Hybridisierungslösung für 2 h bei 68 °C prähybridisiert. Nach Austausch der Hybridisierungslösung gegen 15 ml frische Lösung erfolgte, unter Zugabe der DIG-markierten DNA-Sonde, die Hybridisierungsreaktion über einen Zeitraum von 10 – 18 h bei 68 °C. In deren Verlauf kommt es zur Bindung von RNA-Molekülen mit komplementärer DNA.

Waschpuffer 1 (Deglyoxalisierungslösung):

20 mM Tris (pH 8.0)

Blocklösung (Stammlösung):

10 % (w/v) Blockreagenz (Roche)

0,1 M Maleinsäure (pH 7.5)

0,15 M NaCl

Hybridisierungslösung:

0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.2 mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> einst.)

1 mM EDTA

20 % SDS

0,5 % Blocklösung

50 µg/ml Herings-Sperma-DNA (Roche)

Zugabe der Herings-Sperma-DNA erfolgte nach deren Denaturierung (10 min, 99 °C, Abkühlung auf Eis).

Zur Entfernung überschüssiger Rückstände der Hybridisierung wurde der Blot mehrfach gewaschen (dreimal 20 min Waschpuffer 2, zweimal 5 min Waschpuffer 3). Vor der Zugabe des digoxigenin-spezifischen Antikörpers („anti-digoxigenin alkaline phosphatase conjugate“, anti-DIG-AP, 1:20.000) wurden abermals überschüssige Bindungsstellen abgesättigt, indem

der Blot mit Blockpuffer 1 h bei RT inkubiert wurde. Nach Entfernung der Block-Lösung durch viermaliges waschen mit Waschpuffer 2 wurde die Membran 5 min in Substratpuffer equilibriert. Die Detektion hybridisierter RNA/DNA-DIG-Sonden auf der Membran erfolgte durch die Zugabe eines Chemilumineszenz-Substrates (CDP-*Star*, Roche) in den Substratpuffer. Dieses wird durch die alkalische Phosphatase des gebundenen Antikörpers umgesetzt. Die dabei entstehende Lumineszenz wurde durch einen Röntgenfilm detektiert.

Phosphatpuffer:

1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.2 mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$  einst.)

Waschpuffer 2:

20 mM Phosphatpuffer (pH 7.2)  
1 mM EDTA  
1 % (w/v) SDS

Waschpuffer 3:

0,1 M Maleinsäure (pH 8.0 mit 1 N NaOH einst.)  
3 M NaCl  
0,3 % (w/v) Tween ® 20 (Zugabe nach autoklavieren)

Blockpuffer:

0,1 M Maleinsäure (pH 8.0 mit 1 N NaOH einst.)  
3 M NaCl  
0,5 % Blocklösung  
0,3 % (w/v) Tween 20 (Zugabe nach autoklavieren)

Substratpuffer

0,1 M Tris  
0,1 M NaCl

## 2.4. Kultivierung eukaryotischer Zellen

### 2.4.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Für die Arbeiten mit humanen Zellkulturen wurden die von LINDL *et al.* (2000) zusammengefassten allgemeinen Empfehlungen eingehalten. Die für die Stimulationsexperimente genutzten Arbeitskulturen (Tab. 6) wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Dauerkulturen wurden bei Bedarf vorsichtig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 20 ml Kulturmedium überführt.

Zum Passagieren 70-90 % konfluenten Kulturen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 3 ml 1 × Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Die Ablösereaktion wurde nach 2-4 min durch Zugabe von 4 Volumen FCS-haltigem Kulturmedium gestoppt, die Zellen für 5 min bei 120 × g sedimentiert und je nach Zelldichte 1:3 bis 1:9 in 20 ml frischem Medium resuspendiert.

Nicht mehr benötigte Arbeitskulturen wurden wieder in flüssigen Stickstoff eingeforen. Die nach der Trypsinisierung erhaltenen Zellen wurden zentrifugiert, bei einer Dicht von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml in Einfriermedium aufgenommen und in geeigneten Einfriergefäßen (Cryovial ®, Roth) überführt. Nach 48 h Lagerung bei -80 °C konnten die Zellen dann in flüssigen Stickstoff (-196 °C) eingebracht werden.

Einfriermedium:

MEM alpha Medium  
20 % FCS  
2 mM L-Glutamin  
1 mM Natrium Pyruvat  
500 µg/ml Geneticin (G418)  
500 µg/ml Zeocin  
10 % DMSO\*

\* Der 10 %ige Zusatz vom DMSO verhindert die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen.

**Tabelle 6: Verwendete Zelllinien**

Zellstamm	Gewebe / Morphologie / relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
CHO-K1	„chinese hamster ovar“-Zelllinie; Adhärent als einschichtiger Zellrasen („monolayer“) wachsend.	DSMZ, Nr: ACC 110
CHO-G $\alpha$ <sub>16</sub>	„chinese hamster ovar“-Zellen die ein stabil transfiziertes G $\alpha$ <sub>16</sub> -Protein und ein Hygromycin-Resistenzgen enthalten; Adhärente als einschichtiger Zellrasen („monolayer“) wachsend.	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
CHO-CRE	„chinese hamster ovar“-Zellen die ein stabil transfiziertes Luciferase-Gen, reguliert von drei CRE-Transkriptionselementen, und ein Zeocin-Resistenzgen enthalten; Adhärente als einschichtiger Zellrasen („monolayer“)	Die Zellen wurden von F.W. Kluxen (Merck, Darmstadt) zur Verfügung gestellt.
CHO-SRE	„chinese hamster ovar“-Zellen die ein stabil transfiziertes Luciferase-Gen, reguliert von drei SRE-Transkriptionselementen, und ein Zeocin-Resistenzgen enthalten; Adhärente als einschichtiger Zellrasen („monolayer“)	Die Zellen wurden von F.W. Kluxen (Merck, Darmstadt) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 7: Verwendete Agentien zur Kultivierung von eukariotischen Zellen**

Medien, sonstiges Zellkulturmaterial	Anbieter, Bestellnummer
Minimum Essential alpha Medium mit Ribonucleotides and Desoxyribonucleotides	Life Technologies™, Kat. Nr. 41061-029
Fetales Kälber Serum (FCS)	BioWhittaker, Kat. Nr. 14-701F, Lot. Nr. 7SB0001
PBS Dulbecco`s	Life Technologies™, Kat. Nr. 144190-094
Trypsin/EDTA-Lösung (10 ×)	Life Technologies™, Kat. Nr. 35400-027
Penicillin/Streptomycin 10.000 µg/ml (100 ×)	Life Technologies™, Kat. Nr. 15140-114
Geneticin (G 418) 50 mg/ml	Life Technologies™, Kat. Nr. 10131-027
Zeocin 100 mg/ml	Invitrogen, Kat. Nr. R250-05
L-Glutamin 200 mM (100 ×)	Life Technologies™, Kat. Nr. 25030-024
Sodium Pyruvate MEM 100mM	Life Technologies™, Kat. Nr. 11360-039

**Tabelle 8:      Verwendete Kulturbedingungen**

Zellstamm	Kulturmedium
CHO-K1	MEM alpha, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Sodium Pyruvat, 10 % FCS,
CHO-G $\alpha$ <sub>16</sub>	MEM alpha, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 500 µg/ml Hygromicin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Sodium Pyruvat, 10 % FCS
CHO-CRE	MEM alpha, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 500 µg/ml Zeocin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Sodium Pyruvat, 10 % FCS
CHO-CRE transfiziert mit Orphan Rezeptor cDNA	MEM alpha, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 500 µg/ml Zeocin, 500 µg/ml Geneticin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Sodium Pyruvat, 10 % FCS

### 2.4.2. Transfektion von Zellen

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen wurde das Effectene-Transfektions-Reagent® der Firma Qiagen verwendet. In diesem System wird die zu transfizierende Plasmid-DNA in einem Puffersystem („buffer EC“) unter Verwendung eines kondensierenden Agens („enhancer“) in eine kompakte Form gebracht. Durch die Zugabe von Lipiden (Effectene) erfolgt die Verpackung des DNA-Enhancer-Komplexes in Micellen. Die eigentliche Transfektion erfolgt durch die Fusion der Lipide mit der Zellmembran, wodurch die DNA in das Innere der Zellen gelangen kann.

Zur Etablierung stabil transfizierter Zellen wurde zunächst eine Optimierung der Transfektionsparameter mit CHO-Zellen durchgeführt. Für die Bestimmung der Effizienz der Transfektionen unter verschiedenen Bedingungen wurde das Reporter-Plasmid pGL2-control (2.1.4, Tab.4) verwendet. Durch die hohe und permanente Expression des Reportergens Luciferase entsprach die Transfektionseffizienz direkt proportional der im Luminometer gemessenen Licht-Ausbeute. Für die Einbringung klonierter DNA-Fragmente in CHO-CRE-Zellen (2.4.1, Tab. 6) wurde der Vektor pcDNA3.1(-)neo verwendet. Dieses Plasmid kodiert für das Resistenzgen Neomycin, und führte durch die Zugabe von Geneticin (G 418) zur Selektion von pcDNA3.1 positiven Zellen. Als Kontrolle dienten CHO-Zellen, die dem Transfektions Prozeß ohne Zugabe von Plasmid-DNA unterzogen wurden. 16-24 h vor der Transfektion wurden die Zellen in 15 ml entsprechendem Kulturmedium in 100 × 20 mm Kulturschalen ausplattiert. Vor Beginn der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 5 ml Medium in die Zellkulturschalen vorgelegt.

**Tabelle 9: Verwendetes Transfektions-Protokoll**

Absolute Zellzahl/Kulturschale	$2 \times 10^5$ CHO-CRE Zellen	$2 \times 10^5$ CHO-CRE Zellen
<b>Herstellung der Transfektionsansätze</b>		
buffer EC	96 $\mu$ l	96 $\mu$ l
Plasmid-DNA (0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	4 $\mu$ l	—
Enhancer	3,2 $\mu$ l	3,2 $\mu$ l
<b>Vortexen, Inkubation für 2 min bei RT, anschließend Zugabe von:</b>		
Effectene	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
<b>Vortexen, Inkubation für 10 min bei RT, danach Zugabe von 5 ml Kulturmedium.</b>		

Die Transfektionsansätze wurden anschließend auf die entsprechenden Zellen gegeben und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. 48 h nach der Transfektion wurde mit der Selektion positiver Klone durch die Zugabe von Selektionsmedium (Kulturmedium mit 500  $\mu$ g/ml Geneticin) begonnen. Zur Entfernung abgestorbener Zellen wurde das Medium regelmäßig erneuert, die verbliebenen G418-resistenten Zellklone nach 8-10 Tagen trypsinisiert und zur Vereinzelung ca. 200 Zellen in neue Kulturschalen überführt. Nach ca. 14 Tagen Selektion waren die Kontrollzellen gänzlich abgestorben und gewachsene Einzelklone konnten bei einer Zellzahl von ca. 500-5000 Zellen mit einer Pipettenspitze in 96-Well-Zellkulturplatten überführt werden. Je nach Dichte der einzelnen Klone wurden diese sukzessiv in 24-Well-Zellkulturplatten und schließlich in 24 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt, und dann in flüssigem Stickstoff eingelagert. Vor der Verwendung doppelt stabil transfizierter Einzelklone für Stimulationsexperimente wurden Expressionsanalysen mittels Luciferase Test (2.5.1) und Northern Blots (2.3.5) durchgeführt, um falsch positive Klone (die nur eine geringe oder gar keine Expression der eingebrachten cDNA-Sequenzen aufweisen) auszuschließen.

### 2.4.3. Stimulation von Zellen

Für die *in vitro* Untersuchungen der Signaltransduktionswege des SLC1-Rezeptors in Reporter- und FLIPR-Experimenten (2.5.1, 2.5.2) sowie auf proteinchemischer Ebene (Western Blot Analysen, 2.7.3) wurden die doppelt stabil transfizierten Einzelklone mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert. Dazu wurden seit mindestens 10 Tagen in Kultur befindliche Zellen in entsprechende Zellkultur-Schalen ausgesät. Nach 14-stündiger Inkubation wurde das Kulturmedium der nun 70-90 % konfluenten Zellen durch stimulatorhaltiges, auf RT äquilibriertes MEM alpha Medium (ohne Phenolrot) ersetzt. Bei Inhibitorexperimenten erfolgte die Zugabe der stimulierenden Substanzen erst nach einer

Vorinkubation der Zellen mit den inhibitorischen Substanzen. Die verwendeten Inhibitoren und Stimulatoren wurden zur Vernachlässigung eines möglichen Lösungsmiteleinflusses in einer Verdünnung von 1:100 der Stammlösung, für in DMSO gelöste Substanzen 1:1000, eingesetzt. Jede Stimulation wurde in mindestens drei Wells parallel durchgeführt, wobei die Inkubation mit zusatzfreiem MEM alpha Medium als Kontrolle diente.

Die für die Stimulation von Zelllinien genutzten Substanzen sowie die Inhibitoren sind in Tabelle 10 angegeben. Alle Substanzen wurden in Wasser (ACS-grade, Sigmar) oder DMSO (Sigma) gelöst, aliquotiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur genauen Identifikation der in verschiedenen Aktivitätseinheiten angebotenen Substanzen wurden die jeweiligen Bestellnummern mitaufgeführt.

**Tabelle 10: Verwendete Substanzen**

<b>Stimulanzien</b>	<b>Anbieter</b>	<b>Konzentration der Stammlösung / Lösungsmittel</b>	<b>Best.Nr.</b>
MCH	Bachem	1 mM / DMSO	6. H-1482
Forskolin	RBI	10 mM / DMSO	F-105
PMA	Sigma	1 mM / DMSO	P 8139
<b>Inhibitoren</b>	<b>Anbieter</b>	<b>Konzentration der Stammlösung / Lösungsmittel</b>	<b>Best.Nr.</b>
Rp-8-CPT-cAMPS	Biolog	100 mM / H <sub>2</sub> O	C 011-25
SQ 22,536	Sigma	1 mM / DMSO	S-153
MDL-12,330	Sigma	1 mM / DMSO	M-182
Rottlerin	Biomol	25 mM / DMSO	EI-270
Chelerytrine	Biomol	1 mM / DMSO	EI-225
Bisindolylmaleimide I	Calbiochem	10 mM / DMSO	203290
KN-62	Biomol	1 mM / DMSO	EI-230
PD 98059	Alexis® Biochemics	100 mM / DMSO	385-023
SB203580	Alexis® Biochemics	5 mM / DMSO	270-179
U 73122	Calbiochem®	10 mM / DMSO	662035
Ly294002	Sigma	10 mM / DMSO	L9908
Wortmannin	Sigma	10 mM / DMSO	W1628
Pertussintoxin	Calbiochem	100 ng/ml / H <sub>2</sub> O	516560



## 2.5. Biotests

### 2.5.1. Luciferase-Reporter-Gen-Test

Zur Bestimmung von Luciferase-Reporter-Gen-Aktivität wurde stabilisierte Luciferin-Lösung (SteadyGlo®, Promega) verwendet. Hierbei findet die Umsetzung des Substrates Luciferin durch das Enzym Luciferase nicht in einer schnellen Reaktion mit geringer Halbwertszeit statt („flash reaction“,  $t_{1/2}$  ca. 10 min) sondern wird unter besonderen Pufferbedingungen verlangsamt, so dass die Halbwertszeit der Reaktion bei RT ca. 2 h beträgt.

Die Reporter-Gen-Experimente wurden mit doppelt stabil transfizierten Zellen, die das CRE-Luciferase-Reporter-Gen enthielten, durchgeführt (CHO-CRE-SLC 1, CHO-CRE-PNR, CHO-CRE-P40, CHO-CRE-GPR 7, CHO-CRE-GPR 8). Dazu wurden die Zellen in einer Dichte von  $4 \times 10^4$  Zellen pro Well auf einer 96-Well-Kulturschale mit klarem Boden und weißen Seitenwänden ausgesät. Nach Inkubation  $\bar{u}N$  (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurde für die Stimulation das Kulturmedium in den einzelnen Wells abgenommen und durch jeweils 25  $\mu$ l der entsprechenden gelösten Stimulanz bzw. Peptidbank-Fraktionen ersetzt. Für Inhibitionsexperimente wurden die Inhibitoren in einem Volumen von 25  $\mu$ l auf die Zellen gegeben und für mindestens 20 min bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> vorinkubiert. Der anschließende Stimulus erfolgte durch die Zugabe von 5  $\mu$ l Medium, das die 6-fache Konzentration der stimulierenden Substanz enthielt. Nach einer Inkubationszeit von maximal 4 h wurden 25  $\mu$ l auf RT äquilibrierte SteadyGlo®-Lösung zugegeben und die Kulturplatte bei RT für 15 min mit 250 rpm geschüttelt. Hierbei erfolgt die Lyse der Zellwände und die Freisetzung der zuvor gebildeten Luciferase. Die Erfassung des emittierten Lichts erfolgte in einem automatischen 96-Well-Lumineszenzmeßgerät (LumiStar®). Die Auswertung der Platten wurde mit Hilfe einer LumiStar-Exel-Maske (BMG) und anschließender statistischer Auswertung durchgeführt (2.1.8).

### 2.5.2. Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Messungen (FLIPR™)

Zur Messungen von intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Änderungen wurde der FLIPR™ („Fluorometric Imaging Plate Reader“) verwendet. Das System basiert auf der Beladung von Zellen mit einem fluoreszenten Acetoxy-Methyl-Ester (Fluo-4-AM, Molecular Probes®, Leiden, NL). Die Diffusion der Farbstoffes in die Zellen wird durch die Zugabe des permeabilität erhöhenden Detergenz Pluronic F-127 (Molecular Probes) erhöht. Der Ester wird durch intrazelluläre Esterasen gespalten, so dass sich Fluo-4 in der Zelle anreichert. Durch die Bindung von freiem intrazellulären Ca<sup>2+</sup> erhöht das Derivat seine Fluoreszenz-Intensität um den Faktor 100.

Für die Experimente wurden CHO-CRE-SLC 1 Zellen in schwarzen 96-Well-Kulturschalen mit je  $2 \times 10^4$  Zellen pro Well in Kulturmedium ausplattiert und  $\text{üN}$  bei  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  kultiviert. Vor Beladung der Zellen mit Fluo-4-AM wurden die Zellen einmal mit Waschpuffer gewaschen und dann mit Beladungspuffer für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$ / $5\% \text{CO}_2$  inkubiert. Die Wells wurden nachfolgend dreimal mit  $1 \times \text{HBSS/HEPES}$  gewaschen und in einem Volumen von  $100 \mu\text{l}$   $1 \times \text{HBSS/HEPES}$  für weitere 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Bei der anschließenden Datenaufnahme der relative Fluoreszenz-Änderung im FLIPR-System wurden die Zellen, zur Ermittlung der Basislinie, für 30 s mit einem Argon-Laser bei 488 nm angeregt. Anschließend erfolgte die Zugabe von  $50 \mu\text{l}$  der in  $1 \times \text{HBSS/HEPES}$  gelösten, 3-fach konzentrierten Testsubstanzen. Bei Versuchen mit Vorinkubation von Inhibitoren wurde nach Beladung der Zellen mit Fluo-4-AM, dem Waschschritt und der Zugabe von  $100 \mu\text{l}$   $1 \times \text{HBSS/HEPES}$   $50 \mu\text{l}$  3-fach konzentrierte Inhibitoren gelöst in  $1 \times \text{HBSS/HEPES}$  zugegeben und 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von  $50 \mu\text{l}$  der in  $1 \times \text{HBSS/HEPES}$  gelösten, 4-fach konzentrierten Stimulanzen. Die Emission wurde bei 516 nm für 180 s aufgenommen.

Waschpuffer:

1  $\times$  HBSS (Life Technologies™)  
20 mM HEPES (Life Technologies™)

Beladungspuffer:

Waschpuffer mit Zusatz von: 2  $\mu\text{M}$  Fluo-4  
2,5 mM Pluronic F-127

## 2.6. Chromatographische Methoden

### 2.6.1. Umkehrphasen/Reversed-Phase-HPLC

Die gefriergetrockneten Peptidbankfraktionen wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und die unlöslichen Bestandteile durch Filtration abgetrennt. Die Trennung des Peptidgemisches erfolgte durch einen linearen Anstieg von Solvent B im Elutionsmittel. Gradient, Fliessgeschwindigkeit und Detektionswellenlänge sind bei den jeweiligen Chromatogrammen angegeben. Alle weiter verwendeten Fraktionen der einzelnen Chromatographieschritte wurden 1:5 mit Solvent A verdünnt und auf die stationäre Phase aufgetragen.

Für die Trennung verwendete Säulen und Chromatographieranlagen sind in Tabelle 11 angegeben.

**Tabelle 11: RP-Chromatographiesäulen und –anlagen, die für die Isolierung von CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden Substanzen verwendet wurden**

Säulenmaterial	Chromatographieranlage
Fineline Source RPC 15, 10 × 40 cm, Å n.b., µm n.b. (Pharmacia, Freiburg)	BioCad 250, PerSeptive Biosystems (Freiburg)
Delta Pak, RP C4, 47 × 300 mm, 100 Å, 15-20 µm (Milford, Massachusetts)	BioCad 60, PerSeptive Biosystems (Freiburg)
Vydac, RP C18, 47 × 300 mm, 300 Å, 15-20 µm (Hesperia)	BioCad 60, PerSeptive Biosystems (Freiburg)
Vydac, RP C18, 20 × 250 mm, 300 Å, 10 µm (Hesperia)	Kontron 420 (Henningen)
Vydac, RP C18, 10 × 250 mm, 300 Å, 5 µm (Hesperia)	Shimadzu (SCL 10A, SPD 10A, LC 10AT, DGU 14A) (Duisburg)
YMC C18, 4,6 × 250 mm, 120 Å, 5 µm (Schermbek)	Shimadzu (SCL 10A, SPD 10A, LC 10AT, DGU 14A) (Duisburg)

Die Säulen wurden nach ihrer Verwendung mit 100 % Puffer B regeneriert und in 20 % Methanol gelagert.

Zur Herstellung der organischen Lösungen wurden die verwendeten Fließmittel mit bidestilliertem Wasser aus der Reinstwasseranlage angesetzt. Die verwendeten Eluenten wurden im Heliumstrom 10 min entgast. Die für die RP-Chromatographie verwendeten Fließmittel sind in Tabelle 12 angegeben. Die Fraktionierung des Eluats erfolgte im Abstand von einer Minute mit einem Fraktionssammler der Fa. BioRad (München).

**Tabelle 12: Fließmittel, die für die Reinigung von CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden Substanzen verwendet wurden**

Eluent A	Eluent B
10 mM HCl	80 % ACN / 10 mM HCl
20 % Methanol / 10mM HCl	100 % Methanol
0,1 % TFA	80 % ACN / 0,1 % TFA

## 2.6.2. Kationen- und Anionenaustausch-HPLC

Für die Kationen- (CEC) und Anionenaustauschchromatographie (AEC) wurden folgende Säulen verwendet.

**Tabelle 13: Chromatographiesäulen und –anlagen, die für die Isolierung von CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden Substanzen verwendet wurden**

	Säulenmaterial	Chromatographieranlage
CEC	Fraktogel TSK SP650 (M), Å n.b. ,40 - 90 µm (Merck, Darmstadt)	Kontron 420 (Henningen)
AEC	Macro-Prep 50 Q SAX, 10 × 50 mm, 1000 Å, 50 µm (BioRad, München)	BioCat Sprint, PerSeptive Biosystems (Freiburg)

Als Fließmittel dienten folgende Elutionspuffer, die vor der Verwendung 10 min im Heliumstrom entgast wurden (Tab. 14).

**Tabelle 14: Elutionspuffer, die für die Isolierung von CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden Substanzen verwendet wurden**

	Puffer A	Puffer B
CEC	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 M NaCl / 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2.4)
AEC	20 mM Tris-HCl (pH 8.6)	20 mM Tris-HCl / 1 M NaCl (pH 8.6)

### 2.6.2.1. Entsalzung von Fraktionen der Kationen- und Anionenaustausch-Chromatographie

Die Entsalzung der Proben erfolgte nach dem Prinzip der RP-Chromatographie. Die aus der Kationen- und Anionenaustauschchromatographie erhaltenen Fraktionen wurden über eine Pharmacia Source RP C15 Säule (Freiburg) (4 × 250 mm, Å n.b., 15 µm; Fließmittel: A: 0,1 % TFA, B: 80 % ACN / 0,1 % TFA) entsalzt. Dazu wurden jeweils 2 ml der einzelnen Fraktionen auf die Säule aufgetragen. Die Peptide binden an das Reverse-Phase-Material. Durch Spülen des RP-Materials mit Eluent A wurde das gelöste Salz, welches nicht an das RP-Material bindet, abgetrennt. Die Peptide wurden anschliessend mit Fließmittel B eluiert. Die

entsalzten Proben wurden lyophilisiert und für die Anwendung im Luciferase-Reportergen-Test in 100 µl MEM alpha Medium resuspendiert.

## 2.7. Proteinchemische Methoden

### 2.7.1. Probenvorbereitung

Experimente zum Nachweis von intrazellulären Proteinen wie Transkriptionsfaktoren (z.B. pCREB oder pMAPK) erfolgte über SDS-PAGE (RITTENHOUSE & MARCUS, 1984) und anschließender Western Blot Analyse. Dazu wurden CHO-CRE-SLC 1-Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Kavität in 24-Well-Zellkulturschalen ausgesät und entsprechend dem jeweiligen Experiment stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde der Überstand entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von 100 µl  $2 \times$  Probenpuffer aufgeschlossen. Das zähflüssige Lysat wurde zur Zerstörung hochmolekularer DNA mehrfach bei 10-12 W über 2 s mit Ultraschall (Vibra cell-Sonofizierer) behandelt. Zur Denaturierung der Proteine folgte eine Erhitzung der Proben bei 70 °C für 10 min mit nachfolgender kurzer Abkühlung auf Eis. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

$2 \times$  Probenpuffer:

- 1 ml 0,5 M Tris/HCl (pH 6.8)
- 1 ml 0,5 M Imidazol/HCl (pH 6.8)
- 4 ml 10 % SDS
- 1 ml Glycerin
- 0,2 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol
- 0,8 ml 0,1 % Bromphenolblau

### 2.7.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen im Bereich von 1-100 kDA wurden denaturierende SDS-Polyacrylamidgele eingesetzt. Als Gelapparatur diente die Mini-Protean II-Kammer (BIO-RAD). Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten (Abstand 75 mm) gefüllt und zur Auspolymerisation für 1 h bei RT mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel über das Trenngel geschichtet und ein Probenkamm eingesteckt.

## 12,5 % Polyacrylamid-Trenngel:

17,2 ml ddH<sub>2</sub>O  
10 ml 1,5 M Tris/HCl  
12,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1; 40 %)  
0,3 ml 10 % SDS-Lösung

Zugabe von Polymerisations-Startern: 0,04 ml 10 % APS  
0,004 ml TEMED

## 5 % Polyacrylamid –Sammelgel:

2,9 ml ddH<sub>2</sub>O  
0,0125 ml 10 % SDS  
0,188 ml Acrylamid Bisacrylamid (37,5:1; 40 %)  
0,875 ml 0,5 M Tris/HCl (pH 6.8)  
0,875 ml 0,5 M Imidazol/HCl (pH 6.8)

Zugabe von Polymerisations-Startern 0,04 ml 10 % APS  
0,004 ml TEMED

Nach dem Einbringen des Polyacrylamidgels in die Mini-Protean II-Kammer wurde diese mit Elektrodenpuffer gefüllt und der Probenkamm entfernt. Maximal 10 µl der denaturierten Proben wurden in die mit Elektrodenpuffer gespülten Geltaschen überführt und für 20 min bei einer Spannung von 80 V und anschließend 40 min bei 160 V gelelektrophoretisch getrennt. Abschließend entfernte man das Gel von den Glasplatten und äquilibrierte es bis zu Durchführung des Western Blots in 1 × Roti®-Blot K (Kathodenpuffer).

## Elektrodenpuffer:

6 g Tris-Base  
28,8 g Glycerin  
10 ml 10 % SDS  
ad 1 l ddH<sub>2</sub>O

Für einen Teil der Untersuchungen wurden Bis-Tris gepufferte Polyacrylamid-Gradientengele der Firma Invitrogen™ (NP0323) verwendet. In diesem System wurden die Gele in eine XCell Sure Lock Gelkammer (Invitrogen) eingebracht und das innenliegende Pufferreservoir mit ca. 200 ml Laufpuffer unter Zugabe von 500 µl Antioxidans (NP0005) gefüllt. Die zu untersuchenden Proben (10 µl) wurden in die mit Laufpuffer gespülten Geltaschen

pipettiert und 35 min bei einer Spannung von 200 V getrennt. Nach Entfernung des Rahmens wurden die Gele in Transferpuffer (Invitrogen) gelagert.

Laufpuffer (für Bis-Tris Gele):

50 ml 20 × NuPAGE Running Buffer (Invitrogen, NP0002)  
950 ml ddH<sub>2</sub>O

In beiden Systemen diente der „prestained protein marker“ (NEB) als Größenmarker (2.1.6).

### 2.7.3. Immuno-Blot Analyse (Western Blot)

Die Überführung der mittels PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte durch elektrophoretischen Transfer. Dazu wurden Polyacrylamidgel und PVDF-Membran so zwischen Filterkartons (Whatmann) angeordnet, dass die Membran näher zur Anode und das Gel näher zur Kathode lag.

Im „semi-dry“ Blot-Verfahren erfolgte der Transfer in einer Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell-Aparatur (BIO-RAD). Hierzu wurde die in Methanol gespült und in 1 × Roti®-Blot A (Anodenpuffer) äquilibriert Membran auf einen mit Anodenpuffer getränkten Filterkarton gelegt. Das darauf liegende Gel wurde mit einem in Kathodenpuffer getränkten Filterkarton bedeckt. Der Transfer erfolgte über 60 min bei 1-1,5 mA/cm<sup>2</sup>.

Anoden-Puffer (1 × Roti®-Blot A):

100 ml 10 × Roti®-Blot A  
200 ml Methanol  
700 ml ddH<sub>2</sub>O

Kathoden-Puffer (1 × Roti®-Blot K):

100 ml 10 × Roti®-Blot K  
200 ml Methanol  
700 ml ddH<sub>2</sub>O

Im „Wet Blot“-Verfahren mit dem XCell II Blot Module der Fa. Invitrogen wurde PVDF-Membran und Polyacrylamidgel zwischen je 2 transferpuffergetränkten Schwammtüchern und Filterkartons als Blot-Sandwich in die Blotkammer eingebracht und diese mit 800 ml Transferpuffer vollständig gefüllt. Der Transfer erfolgte bei konstant 30 V für 60 min, was einer Stromdichte von ca. 2 mA/cm<sup>2</sup> entsprach.

## Transferpuffer (für Bis-Tris Gele):

50 ml 20 × NuPAGE Transfer Buffer (NP006-1)  
1 ml NuPAGE Antioxidans  
200 ml Methanol  
749 ml ddH<sub>2</sub>O

Zur Entfernung methanolischer Rückstände wurde die Membran anschließend für 3 x 5 min in TBS-Tween gewaschen. Vor der Zugabe des primären Antikörpers wurden überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran abgesättigt, indem die Membran mindestens 1 h mit 1 × Roti®-Block-Lösung (Roth) inkubiert wurde. Anschließend wurde der gleichfalls in Roti-Block verdünnte Primär-Antikörper (Tab. 15) hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C und 20-50 rpm gebunden. Nach Entfernung der Antikörperlösung durch dreimaliges Waschen mit TBS-Tween wurde der 1:50.000 in 1 × Roti®-Block verdünnte sekundäre Antikörper (Tab. 15) aufgebracht und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem fünfmaligem Waschen erfolgte die Visualisierung der Sekundäantikörper-Bindung über ein Chemilumineszenz-Signal. Dazu wurde der Blot für 1 min mit 1,5 ml frisch angesetztem Detektionsreagenz (SuperSignal® West Dura, Pierce, Rockford) inkubiert, danach luftblasenfrei in eine dünne Polyethylenfolie eingewickelt und auf einem Röntgenfilm (CL-X Posure, Pierce) exponiert. Je nach Signalintensität lag die Expositionszeit zwischen 10 s und 12 h.

## 10 × TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung):

24,2 g Tris  
80,0 g NaCl

Der pH-Wert der Lösung wurde mit ca. 20 ml 25 % HCl auf 7,6 eingestellt, anschließend wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt.

## 1 × TBS-Tween:

100 ml 10 × TBS  
0,5 ml Tween-20  
900 ml ddH<sub>2</sub>O

## 1 × Roti®-Block:

2 ml 10× Roti®-Block  
18 ml ddH<sub>2</sub>O



**Tabelle 15: Antikörper**

<b>Primär-Antikörper</b>		
Phospho-p42/44 MAP Kinase (Thr 202/Tyr 204)	1:1000	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Phospho-CREB (Ser133)	1:1000	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
42/44 MAP Kinase	1:1000	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
C/EBP $\beta$ (C-19)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
<b>Sekundär-Antikörper</b>		
Anti-Rabbit IgG, HRP-gekoppelt	1:50.000	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Anti-Mouse IgG, HRP-gekoppelt	1:50.000	New England Biolabs, Beverly, MA, USA

Zur genauen Beurteilung eines positiven Signals ist es erforderlich, dass alle zu vergleichenden Spuren eines Gels oder Blots ähnliche Mengen Protein aufweisen. Deshalb wurden die Blots und Gele abschließend mit Proteinfärbereagenzien behandelt. Bereits geblottete Gele wurden mindestens 30 min in Coomassie-Lösung geschüttelt und anschließend bis zum gewünschten Kontrast über Nacht mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Mit ddH<sub>2</sub>O gespülte PVDF-Membranen wurden über 2 h bei RT in India-Ink-Lösung geschüttelt, überschüssige Tinte wurde anschließend mit 1  $\times$  TBS-Tween entfernt.

#### Coomassie-Lösung:

- 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R-250
- 0,05 % Coomassie Brilliant Blue G-250
- 42,5 % Ethanol
- 5 % Methanol
- 10 % Essigsäure

#### India-Ink-Lösung:

- 50 ml TBS-Tween
- 0,15 ml Fount India Ink (Pelikan)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Etablierung des Luciferase-Reportergen-Tests

In der vorliegenden Arbeit sollten für die vier Orphan-Rezeptoren p40, GPR 7, GPR 8 und PNR (MAYER *et al.*, 1997; O'DOWD *et al.*, 1995; ZENG *et al.*, 1998) spezifische Liganden aus Gewebehomogenaten isoliert werden. Voraussetzung dafür war ein biologisches Testsystem, das die Detektion von Liganden-induzierter cAMP-Erhöpfung ermöglichte. Für die Untersuchung der Peptidbanken sollte eine elegantere Methode als beispielsweise ein cAMP-ELISA etabliert werden. Die erwartete Anzahl der zu untersuchenden Proben in den Peptidbanken (2.1.7) machten es erforderlich die Durchführung des Tests so zu optimieren, dass mit einem hohen Probendurchsatz gearbeitet werden konnte (CASTANÓN, 1994; CHEN *et al.*, 1995; SILVERMAN *et al.*, 1998; GONZÁLEZ & NEGULESCU, 1998).

Die Signalweiterleitung nach Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Orphan Rezeptors (GPCR) kann über verschiedene G-Proteine erfolgen. Eine Kopplung an stimulatorische G-Proteine ( $G_s$ ) führt zu einer Erhöhung von cAMP in den Zellen. Es wurden CHO-Zellen verwendet, die ein stabil transfiziertes Luciferase-Reportergen enthielten, welches von drei CRE-Elementen („cAMP-response element“) reguliert wird (2.4.1). In diesen Zellen führte eine Rezeptor-Aktivierung über  $G\alpha_s$  zur Stimulation der Adenylat-Cyclase (AC). Die Adenylat-Cyclasen katalysieren die Bildung von 3'-5'-cyclischem AMP (cAMP), das in den Zellen die Proteinkinase A (PKA) aktiviert und so die Trennung der regulatorischen und katalytischen Untereinheit bewirkt. Deren Aufspaltung ermöglicht die Verlagerung der katalytischen Untereinheiten aus dem Cytoplasma in den Zellkern und führt dort unter anderem zur Phosphorylierung von „cAMP-response element binding protein“ (CREB). Die Anlagerung von pCREB zusammen mit weiteren Helferproteinen an das Transkriptionselement CRE (TAYLOR *et al.*, 1990; SHAYWITZ & GREENBERG *et al.*, 1999) bewirkt die Aktivierung der Gentranskription und somit die Bildung des Enzyms Luciferase in den Zellen. Dieses oxidiert nach Lyse der Zellen zugegebenes Luciferin. Dabei wird Licht der Wellenlänge 562 nm frei, das in einem Luminometer detektiert werden kann.

##### 3.1.1. Optimierung der Transfektionseffizienz

Für ein stabiles und reproduzierbares Testsystem war die Selektion von doppelt stabilen Zelllinien erforderlich, die den zu untersuchenden Rezeptor exprimierten und das Luciferase-Reportergen trugen. Es wurden deshalb für die Etablierung des Luciferase-Reportergen-Testsystems zunächst mit einem pGL2-control Vektor (2.1.4) Optimierungsversuche zur Transfektionseffizienz durchgeführt. Bei diesem Vektor ist die kodierende Sequenz der Luciferase 3' an den Promotor des Cytomegalusvirus (CMV) gekoppelt, um maximale

Transkription des CRE-Promotor-Konstrukts zu gewährleisten. Zur Transfektion von CHO-Zellen (2.4.1) wurden DNA- und Transfektionsagentien in verschiedenen Mengenverhältnissen eingesetzt. Nach Bestimmung der optimalen Transfektionsbedingungen im 24-Well-Format mit dem pGL2-control-Vektor wurden die Zellen in 10 × 22 mm Schalen entsprechend transfiziert (2.4.2), in 96-Well-Mikrotiterplatten mit definierter Zellzahl ausplattiert und die Aktivität der Luciferase bestimmt. Das so erhaltene Protokoll erlaubte die gleichzeitige Transfektion von ca. 4-8 Millionen Zellen und gewährleistete, dass die Transfektionseffizienz bei allen Zellen einer Transfektion vergleichbar war.

Vor der Herstellung der doppelt stabilen Zelllinien, welche die zu untersuchenden Orphan Rezeptoren exprimierten, wurde das Testsystem auf seine Funktionalität geprüft. Dazu wurde der SLC 1-Rezeptor, mit seinem mittlerweile bekannten Liganden MCH verwendet. Die Bindung von MCH an den SLC 1-Rezeptor führte zu einem detektierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom sowie der Aktivierung von p42/44 MAP Kinase (SAITO *et al.*, 1999; CHAMBERS *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung von 42/44 MAP Kinase kann über den Transkriptionsfaktor Elk-1 das „Serum-response-element“ (SRE) sowie über CREB das „cAMP-response-element“ (CRE) aktivieren (BLUMER & JOHNSON, 1994; GONZALES *et al.*, 1998; SILVERMANN *et al.*, 1998). Die Bildung von  $\text{Ca}^{2+}$  kann auch über  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin Kinasen zur Phosphorylierung von CREB führen (SHENG *et al.*, 1991; AHN *et al.*, 2000). Daher ist es möglich eine  $G_s$ - und  $G_q$ -Protein-Aktivierung durch CREB-vermittelte Luciferase-Reportergen-Expression zu detektieren (CHEN *et al.*, 1995). Es wurden CHO-SRE- und CHO-CRE-Zellen (2.4.1) mit cDNA (2.2), die für den MCH-Rezeptor codierte, unter Verwendung von Effectene-Transfektions-Reagent® (Qiagen) transient transfiziert, mit MCH stimuliert und auf die Induktion der SRE- bzw. CRE-Promotor-Konstrukte untersucht. Es zeigte sich, dass die transient transfizierten CHO-CRE-Zellen auf die Stimulation mit MCH mit einer Erhöhung des emittierten Lichtes reagierten (nicht dargestellt).

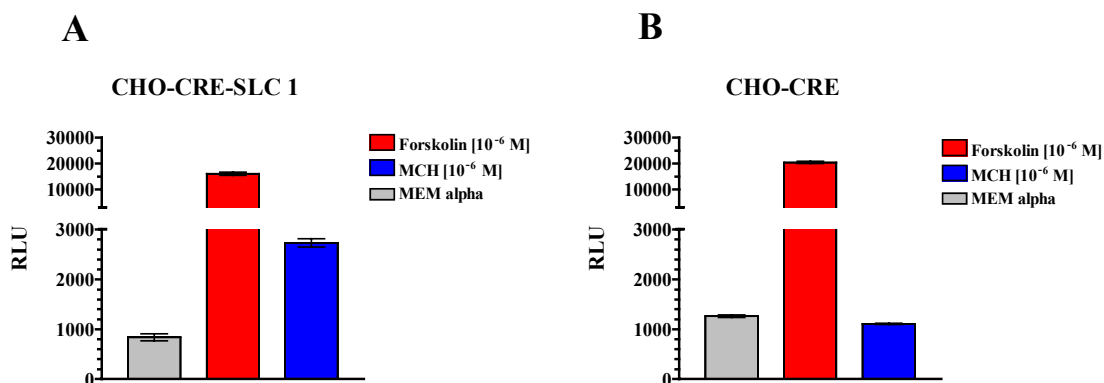
Da für den MCH-Rezeptor zu diesem Zeitpunkt nichts über eine Beteiligung von CREB in der Signaltransduktion bekannt war, wurden mit den CHO-CRE-Zellen und der cDNA des MCH-Rezeptors stabile Zelllinien selektiert (2.4.2) um Untersuchungen zur Signaltransduktion durchführen zu können (3.3).

Die cDNAs von GPR 7, GPR 8, PNR und p40 (2.2) wurde ebenfalls stabil in CHO-CRE-Zellen transfiziert. Anschließend wurden von jeder der neuen Zelllinien Einzel- und Mischklone hergestellt (2.4.2) um mit diesen ein „Screening“ nach Liganden durchzuführen.

### 3.1.2. Prüfung der Funktionalität der MCH-Rezeptor tragenden CHO-CRE-Zellen im Luciferase-Reportergen-Test

Die CHO-CRE-Zellen wurden mit cDNA (2.2), die für den MCH-Rezeptor codiert, stabil transfiziert (2.4.2). Die selektionierten CHO-CRE-SLC 1 Einzelklone wurden nachfolgend im Luciferase-Reportergen-Test (2.5.1) hinsichtlich der Induzierbarkeit des CRE-Promotor-Konstrukts durch Aktivierung des Rezeptors mit MCH untersucht.

Die stabile genomische Insertion von Fremd-DNA kann beliebig oft und an verschiedenen Stellen des Genoms erfolgen. Dabei kann, beispielsweise durch Rekombinationsereignisse, das CRE-Promotor-Konstrukt unvollständig oder in heterochromatische Regionen inseriert und dadurch nicht mehr abgelesen werden. Die Stimulation mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylat-Cyclase, führte in CHO-CRE-Zellen zur Induktion des CRE-Promotor-Konstrukts und damit zu einer detektierbaren Lumineszenz (Abb. 3A). Die Stimulation mit Forskolin diente zur Kontrolle, ob es nach Einbringung von Rezeptor-cDNA in das Genom der CHO-CRE-Zellen zu einer Veränderung der Forskolin-stimulierten Induktion des CRE-Promotor-Konstrukts kam. Die selektierten Einzelklone wurden deshalb in 96-Well-Mikrotiterplatten ausplattiert und mit MCH in der Konzentration  $10^{-6}$  M sowie Forskolin ( $10^{-6}$  M) und MEM alpha Medium über 4 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung des emittierten Lichts im Luminometer. Abbildung 3 zeigt CHO-CRE-SLC 1 Einzelklon 5-17 sowie die CHO-CRE-Zellen nach der Gabe von MCH und Forskolin. Die Zellen reagierten auf das Forskolin mit einem hohen Lichtsignal. Die Induzierbarkeit des CRE-Promotor-Konstrukts wurde durch die Einbringung der Rezeptor-DNA in CHO-CRE-Zellen nicht wesentlich beeinträchtigt.

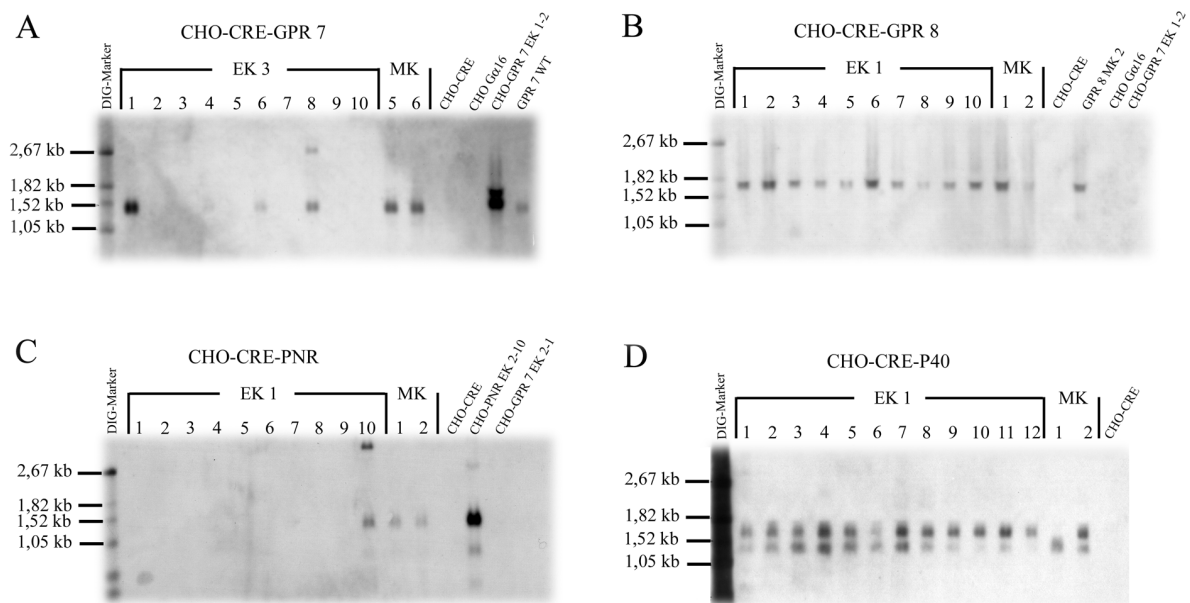


**Abbildung 3:** Induzierbarkeit des CRE-Promotor-Konstrukts durch Forskolin und MCH in CHO-CRE-SLC 1 Einzelklon 5-17 und CHO-CRE-Kontroll-Zellen im Luciferase-Reportergen-Test. Beide Zelllinien wurden mit MCH [ $10^{-6}$  M] oder Forskolin [ $10^{-6}$  M] für 4 h inkubiert.

Ziel war es einen Einzelklon mit möglichst hoher Lichtemission bei MCH-Stimulation, bei gleichzeitig geringen (MEM alpha) Basalwerten zu erhalten. Das emittierte Licht in den doppelt stabil transfizierten CHO-CRE-SLC 1 EK 5-17 Zellen war nach Inkubation mit MCH im Verhältnis zum MEM alpha Basalwert um den Faktor 3,25 erhöht.

### 3.1.3. Expressionsanalyse von GRP 7, GPR 8, PNR und p40 mittels Northern Blot

Da für eine Analyse der hergestellten CHO-CRE-GPR 7, -GPR 8, -PNR und -p40 Zelllinien im Luciferase-Reporter-Gen-Test keine Positivkontrollen (Liganden) zur Verfügung standen, wurden sie mit Hilfe der Northern Blot Technik auf Expression der Rezeptor-RNA untersucht. Zur Bestimmung des Expressionsmusters der CHO-CRE-GPR 7, -GPR 8, -PNR und -p40 Einzel- und Mischklone wurde die RNA extrahiert (2.3.1) und je 5 µg im Northern Blot eingesetzt. Als Hybridisierungssonden dienten spezifische GPR 7-, GPR 8-, PNR- und p40-cDNA-Fragmente, die mit DIG-11-UTP markiert wurden (2.3.5).



**Abbildung 4:** Expressions-Analyse der Zelllinien im Northern Blot. **A:** CHO-CRE-GPR 7 Einzelklone 3 1-10; **B:** CHO-CRE-GPR 8 Einzelklone 1 1-10; **C:** CHO-CRE-PNR Einzelklone 1 1-10; **D:** CHO-CRE-p40 Einzelklone 1 1-12. Aufgetragen wurde je 5 µg RNA.

Die Analyse der GPR 7-Rezeptor exprimierenden Zellen (Abb. 4A) zeigte, dass etwa 1400 bp grosse Fragmente erhalten wurden. Am 5' und 3' Ende des codierenden Bereiches von 986 bp befanden sich untranslatierte Sequenzabschnitte aus denen das ~ 1400 bp grosse Fragment

resultierte. Der Einzelklon 1 (EK 1) wies die höchste, und EK 4 die niedrigste Expressionsrate auf. Die Höhe der Expression von EK 8 liegt zwischen EK 1 und 4, es wurde aber ein weiteres Transkript bei 2,67 kb detektiert. Bei EK 2, 3, 5, 7 und 9 konnten keine GPR 7 spezifischen Transkripte nachgewiesen werden. Abbildung 4B zeigt die untersuchten CHO-CRE-GPR 8 Zelllinien. Bei allen 10 Einzelklonen konnte ein spezifisches Signal von ~ 1700 bp detektiert werden, wobei der codierende Bereich bei 1001 bp lag. Im Falle der CHO-CRE-PNR Einzelklone (Abb. 4C) ließ sich lediglich bei EK 10 ein spezifisches RNA-Transkript von ~ 1400 bp, bei einem codierenden Bereich von 1014 bp, detektieren. Bei der Expressions-Analyse der p40-Zelllinien (Abb. 4D) wurden bei allen Einzelklonen sowie in MK 2 jeweils zwei Transkripte der Grösse ~ 1700 und ~ 1400 bp detektiert. Mischklon 1 wies als einziger nur das kleinere Transkript auf. Der codierende Bereich von p40 umfasst ca. 1200 bp. Es wurden die Einzelklone 1-4 und 1-10 sowie der Mischklon 1, der nur die kleinere Bande aufwies, für das Peptidbank-Screening eingesetzt. EK 1-4 zeigte bei beiden Transkripten eine hohe Expressionsrate, während bei EK 1-10 eine stark exprimierte grössere und eine schwächere kleinere Bande zu sehen waren. Die zum Screening verwendeten Zelllinien sind zur Übersicht in Tabelle 16 gezeigt.

**Tabelle 16: Selektionierte Zelllinien**

Orphan Rezeptor	stabile Transfektion	selektionierte Klone	im Screening eingesetzte Einzelklone
GPR 24/SLC 1	CHO-CRE Zelllinie transfiziert mit cDNA des MCH-Rezeptors (SLC 1)	Einzelklon 5 1-17 Mischklon 5, 6	CHO-CRE-SLC 1 EK 5-17
GPR 7	CHO-CRE Zelllinie transfiziert mit cDNA des GPR 7-Rezeptors	Einzelklon 3 1-10 Mischklon 5, 6	CHO-CRE-GPR 7 EK 3-5 *
GPR 8	CHO-CRE Zelllinie transfiziert mit cDNA des GPR 8-Rezeptors	Einzelklon 1 1-10 Mischklone 1, 2	CHO-CRE-GPR 8 EK 1-9
PNR	CHO-CRE Zelllinie transfiziert mit cDNA des PNR-Rezeptors	Einzelklon 1 1-10 Mischklone 1, 2	CHO-CRE-PNR EK 1-8 *
p40	CHO-CRE Zelllinie transfiziert mit cDNA des p40-Rezeptors	Einzelklone 1 1-12 Mischklone 1, 2	CHO-CRE-p40 EK 1-4, EK 1-10, MK 1,

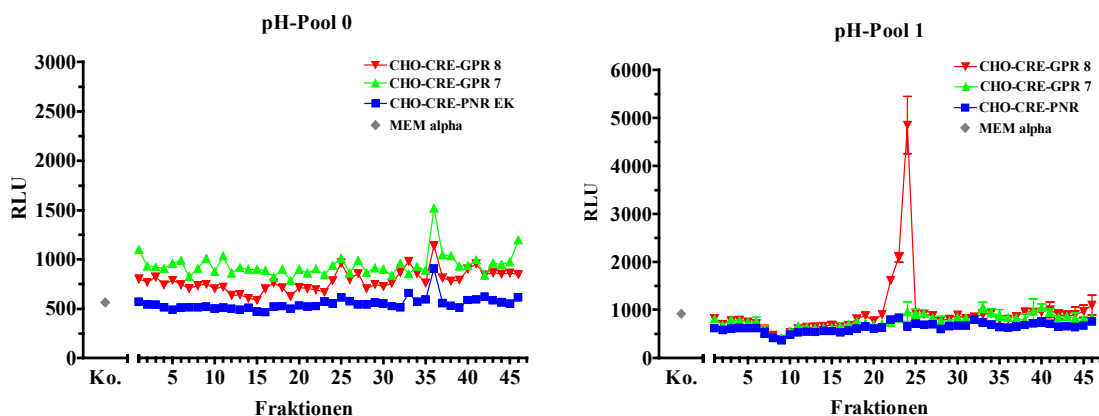
\* Bei GPR 7 und PNR wurden im Screening nicht die Einzelklone mit den höchsten Expressionsraten verwendet.

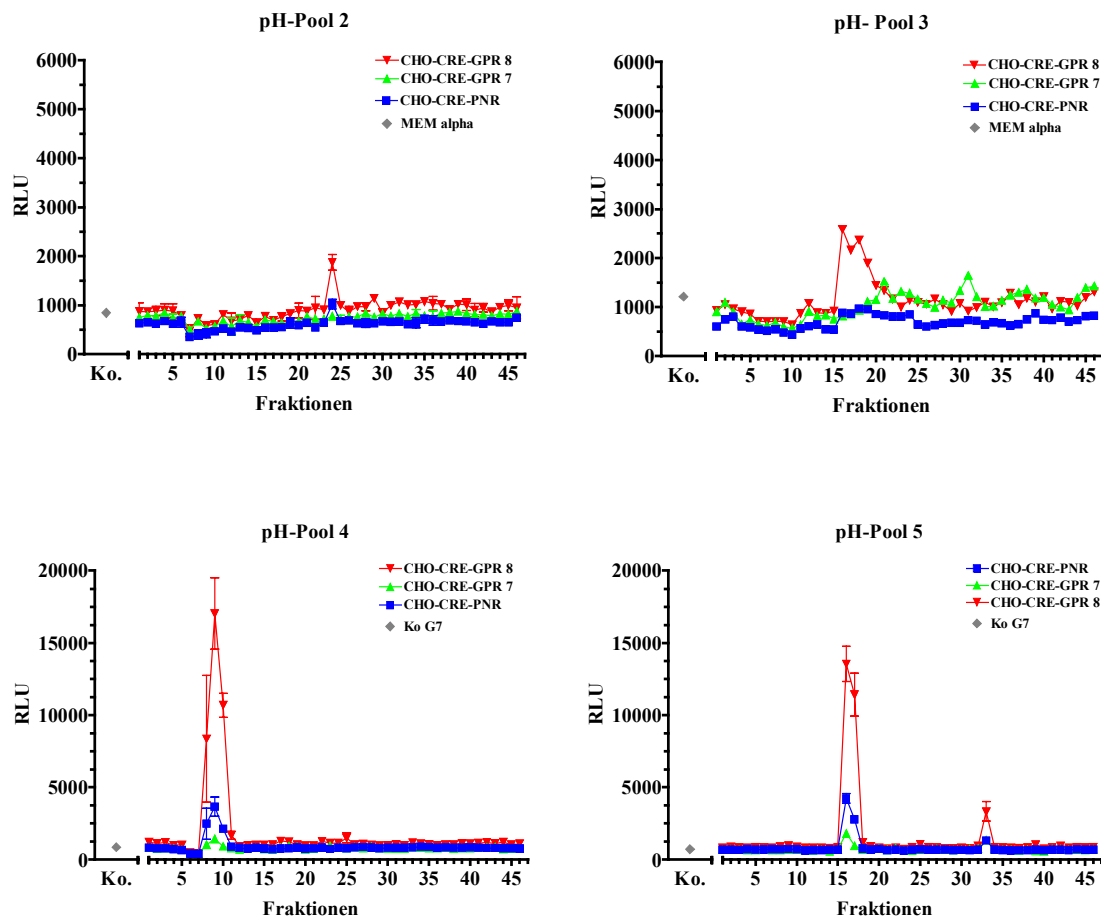
### 3.2. Detektion von Orphan Rezeptoren aktivierenden Liganden

Für das initiale Screening der klonierten Orphan Rezeptoren nach spezifisch aktivierenden Liganden wurden Peptidbanken aus Gesamthirn und Stammhirn vom Schwein, sowie eine humane Hämofiltratbank verwendet (2.1.7). Es wurden dabei immer verschiedene Orphan Rezeptor tragende Zelllinien parallel auf CRE-Promotor-Konstrukt-Induktion in den verwendeten Peptidbanken untersucht. Kam es dabei zu einer Erhöhung der emittierten Lichtmenge in nur einer Zelllinie, konnte von einem Rezeptor-spezifischen Signal ausgegangen werden. Zusätzlich wurden die CHO-CRE-SLC 1 EK 5-17 Zellen untersucht, da hier mit MCH eine Kontrolle für die Funktionalität des transfizierten Rezeptors zur Verfügung stand. Darüberhinaus wurden die einzelnen verwendeten Zelllinien mit Forskolin stimuliert, um die Responsivität des CRE-Promotor-Konstrukts zu kontrollieren.

#### 3.2.1. Screening der Stammhirn-Peptidbank vom Schwein

Das initiale Screening der Stammhirn-Peptidbank im Luciferase-Reporter-Gen-Test wurde mit einer Menge der Fraktionen die 22 g Ausgangsgewebe entsprechen (Gewebeäquivalent) durchgeführt. Für die Zelllinien CHO-CRE-SLC 1 EK 5-17 und CHO-CRE-p40 EK 1-4, EK 1-10 und MK 1 konnten keine spezifischen Substanzen, die zu einer Aktivierung der untersuchten Rezeptoren führten, detektiert werden. Das Ergebnis des initialen Screenings mit den ausgewählten Zelllinien von GPR 7, GPR 8 und PNR (Tab. 16) ist in Abbildung 5 gezeigt.





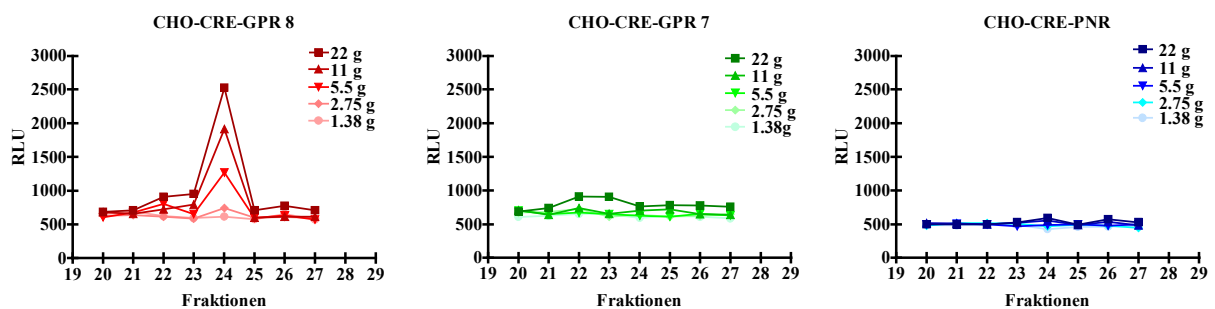
**Abbildung 5:** Initiales Screening der Stammhirn-Peptidbank vom Schwein. Eine Probe, die 22 g Stammhirngewebe entspricht, der jeweils 46 Fraktionen der einzelnen pH-Pools 0 bis 5 wurden im Luciferase-Reporter-Gen-Test auf Induzierbarkeit des CRE-Promotor-Konstrukts untersucht. In pH-Pool 1, Fraktionen 22-24, pH-Pool 2, Fraktion 24 und pH-Pool 3, Fraktionen 16-20 sind Substanzen enthalten, die in CHO-CRE-GPR 8 Zellen die Transkription des CRE-Promotor-Konstrukts induzieren.

Im pH-Pool 1, Fraktionen 22-24, pH-Pool 2, Fraktion 24 und pH-Pool 3, Fraktionen 16-20 wurden Substanzen detektiert, die zu einer Induktion des CRE-Promotor-Konstrukts in CHO-CRE-GPR 8 Zellen führten. Die in Fraktionen des pH-Pools 0, 4 und 5 detektierten aktiven Substanzen waren unspezifische Signale, da sie auch in den CHO-CRE-PNR und -GPR 7 Zellen zu einer Induktion des CRE-Promotor-Konstrukts führten. Fraktion 24 aus pH-Pool 2 wurde trotz des zusätzlichen Signals in den CHO-CRE-PNR Zellen für eine weitere chromatographische Reinigung verwendet, da in CHO-CRE-GPR 7 Zellen keine Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts feststellbar war.



### 3.2.1.1. Konzentrationsabhängigkeit der CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden Fraktionen

Um festzustellen, ob die CRE-Promotor-Konstrukt-Induktion der Peptidbank Fraktionen durch wirkstoffvermittelte Effekte zustande kommt, wurde ihre Konzentrationsabhängigkeit untersucht. Abbildung 6 zeigt die CRE-Promotor-Konstrukt -Induktion der Fraktionen 22-24 aus pH-Pool 1 (Abb. 5 und 7A) auf CHO-CRE-GPR 8, -GPR 7 und -PNR Zellen sowie die benachbarten inaktiven Fraktionen.

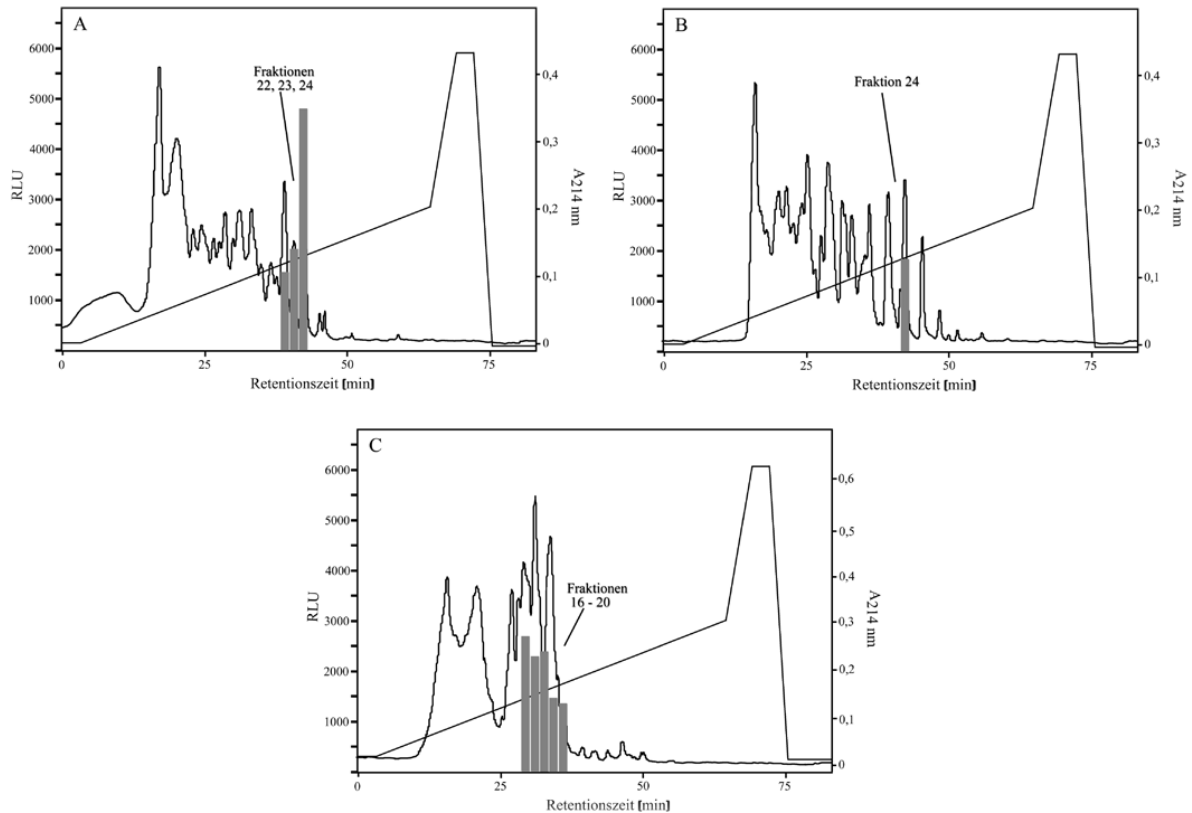


**Abbildung 6:** Konzentrationsabhängigkeit der CRE-Promotor-Konstrukt-Induktion von pH-Pool 1 Fraktionen 20-27, die CRE-Promotor-Konstrukt induzierende Substanzen enthielten, im Luciferase-Reporter-Gen-Test. Die Fraktionen wurden in Mengen getestet, die 22, 11, 5,5, 2,75 und 1,375 g Gewebe entsprachen.

Die getesteten Fraktionen induzierten in CHO-CRE-GPR 8 EK 1-9 Zellen das CRE-Promotor-Konstrukt konzentrationsabhängig.

### 3.2.1.2. Verfahren zur Trennung von CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden Substanzen aus der Stammhirn-Peptidbank

Zur Reinigung der aktiven Substanzen aus der Stammhirn-Peptidbank war es notwendig, inaktive Bestandteile abzutrennen. Für eine erste Einschätzung der chemischen Eigenschaften der aktivierenden Substanzen, wurde das Elutionsverhalten der Substanzen in der Peptidbank untersucht. Die Elution von der RP-Säule, dargestellt in Abbildung 7, erfolgte in den pH-Pools 1 und 2 bei einer mittleren Konzentration an hydrophobem Fließmittel Puffer B (24,5 %), während in pH-Pool 3 die Elution etwas früher erfolgte (17-21 % Puffer B). Dies lässt auf einen relativ hydrophilen Charakter der Substanzen schließen.



**Abbildung 7:** Reverse-Phase-Chromatographien der pH-Pools 1, 2 und 3 der Stammhirn-Peptidbank vom Schwein. In den Chromatogrammen sind die Elutionsprofile der pH-Pools bei einer Absorptionswellenlänge von 214 nm und die zur Elution verwendeten Gradienten gezeigt. Die grauen Balken zeigen die Induktion des CRE-Promotor-Konstrukts durch Peptidbank Fraktionen im Luciferase-Reportergen-Test auf CHO-CRE-GPR 8 Zellen. Es wurde ein Teil der HPLC-Fractionen entsprechend 22 g Gewebe Stammhirn eingesetzt.

- A:** pH-Pool 1 der Stammhirn-Peptidbank. Aktive Fraktionen 22-24.  
**B:** pH-Pool 2 der Stammhirn-Peptidbank. Aktive Fraktion 24.  
**C:** pH-Pool 3 der Stammhirn-Peptidbank. Aktive Fraktionen 16-20.

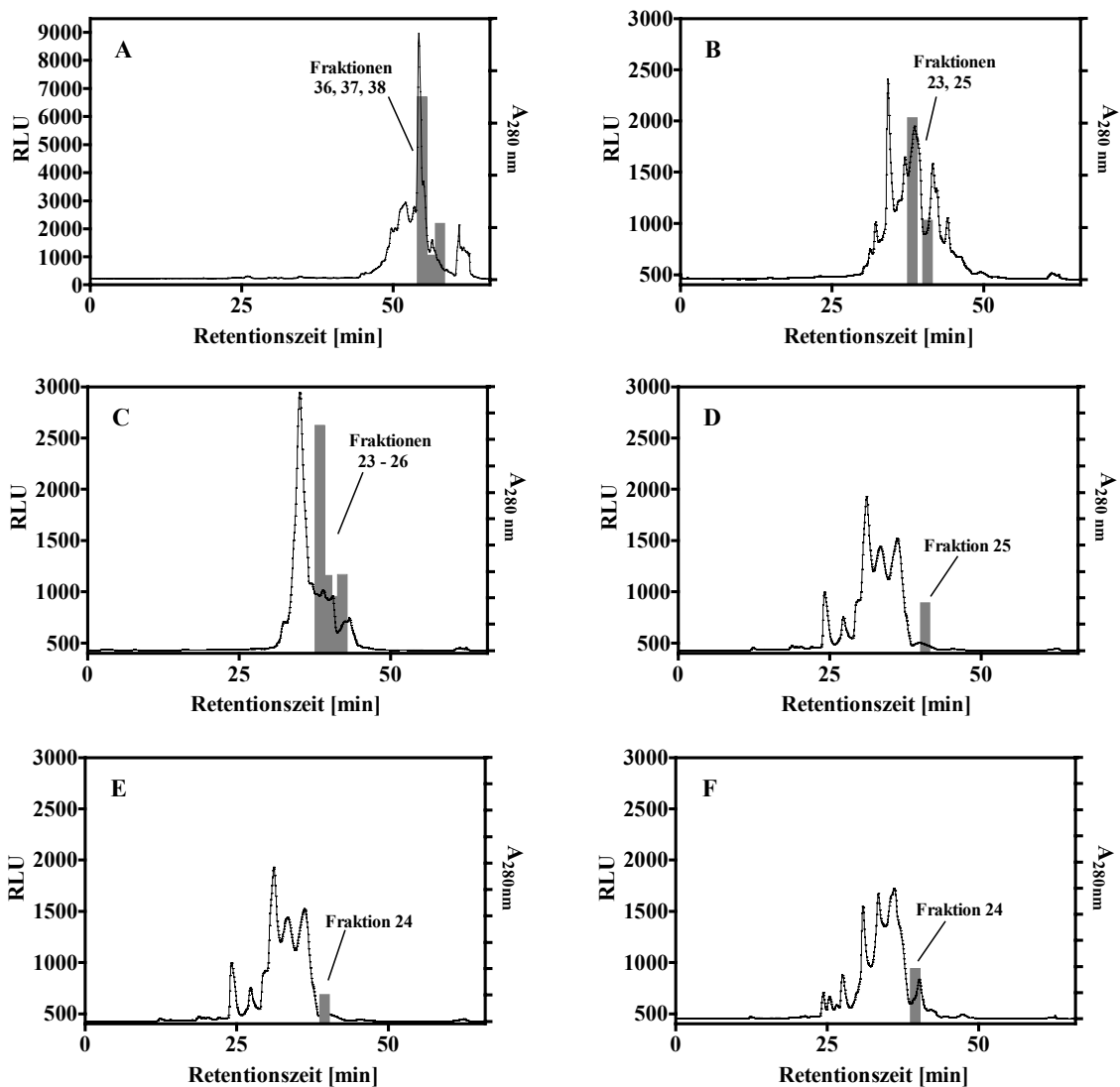
Säule: Fineline Source RPC 15, 10 × 40 cm, Å n.b., µm n.b., 13,5 bar. Fließmittel: A: 10 mM HCl, B: 80 % ACN / 10 mM HCl. Flussrate: 130 ml/min. Gradient: 0-45 % B in 65 min. Detektionswellenlänge: 214 nm.

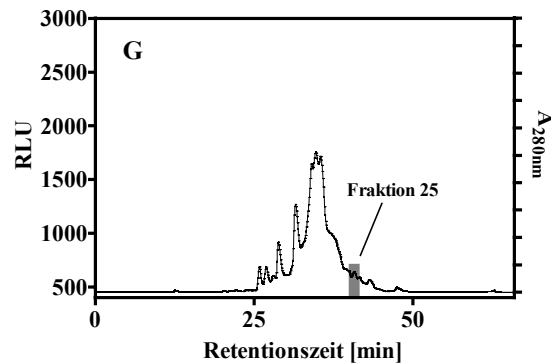
Im folgenden ist das Trennverfahren dargestellt, das für die Reinigung der CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden Substanzen benutzt wurde.

Die Isolierung der CRE-Promotor-Konstrukt induzierenden Substanzen erfolgte als erstes über eine Reverse-Phase-Chromatographie. Den resultierenden Fraktionen der einzelnen Chromatographien wurden Aliquots entnommen, lyophilisiert und im Luciferase-Reportergen-Test eingesetzt.

Als Ausgangsmaterial dienen die Fraktionen 22-24 aus pH-Pool 1, Fraktion 24 aus pH-Pool 2 und die Fraktionen 16-20 aus pH-Pool 3 (Abb. 7A-C).

Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils in 500 ml Puffer A gelöst, über eine 0,45 µm Filtermembran filtriert und einzeln auf eine RP-Säule aufgetragen. Die Fraktionen 16-18 aus pH-Pool 3 wurden aufgrund ihres jeweils hohen Peptidgehaltes geteilt und in zwei Schritten rechromatographiert. Gebundene Peptide wurden durch einen linearen Anstieg von Acetonitril (ACN) im Elutionsmittel (10 mM HCl / 80 % ACN in 10 mM HCl) eluiert und fraktioniert gesammelt.





**Abbildung 8:** Reinigung von CRE-Promotor-Konstrukt induzierenden Substanzen aus der Stammhirn-Peptidbank. Die grauen Balken zeigen die Fraktionen in denen Substanzen enthalten sind, die das CRE-Promotor-Konstrukt im Luciferase-Reporter-Gen-Test in CHO-CRE-GPR 8 Zellen aktivierten.

**A:** RP-Chromatographie von pH-Pool 1 Fraktion 23. Im Luciferase-Reporter-Gen-Test wurde ein Teil der HPLC-Fraktionen entsprechend 110 g Gewebe Stammhirn eingesetzt. Die Fraktionen 36-38 enthielten Substanzen, die die Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts induzierten.

Säule: RP C4 Delta Pak,  $47 \times 300$  mm,  $100 \text{ \AA}$ ,  $15\text{-}20 \text{ \mu m}$ . Fließmittel: A: 10 mM HCl, B: 80 % ACN / 10 mM HCl. Flussrate: 40 ml/min. Gradient: 5-45 % B in 50 min. Detektionswellenlänge: 280 nm.

**B:** RP-Chromatographie von pH-Pool 1 Fraktion 24. Im Luciferase-Reporter-Gen-Test wurde ein Teil der HPLC-Fraktionen entsprechend 66 g Gewebe Stammhirn eingesetzt. Die Fraktionen 23 und 25 enthielten Substanzen, die die Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts induzierten.

**C:** RP-Chromatographie von pH-Pool 2 Fraktion 24. Im Luciferase-Reporter-Gen-Test wurde ein Teil der HPLC-Fraktionen entsprechend 66 g Gewebe Stammhirn eingesetzt. Die Fraktionen 23-26 enthielten Substanzen, die die Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts induzierten.

**D:** RP-Chromatographie von pH-Pool 3 Fraktion 16(1). Im Luciferase-Reporter-Gen-Test wurde ein Teil der HPLC-Fraktionen entsprechend 88 g Gewebe Stammhirn eingesetzt. Die Fraktion 25 enthielt Substanzen, die die Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts induzierte.

**E/F:** RP-Chromatographie von pH-Pool 3 Fraktion 16(2) (E) und 17(1) (F). Im Luciferase-Reporter-Gen-Test wurde ein Teil der HPLC-Fraktionen entsprechend 88 g Gewebe Stammhirn eingesetzt. Die Fraktion 24 (E, F) enthielt Substanzen, die die Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts induzierte.

**G:** RP-Chromatographie von pH-Pool 3 Fraktion 17(2). Im Luciferase-Reporter-Gen-Test wurde ein Teil der HPLC-Fraktionen entsprechend 88 g Gewebe Stammhirn eingesetzt. Die Fraktion 25 enthielt Substanzen, die die Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts induzierte.

**B-G:** Säule: RP C4 Delta Pak,  $47 \times 300$  mm,  $100 \text{ \AA}$ ,  $15\text{-}20 \text{ \mu m}$ . Fließmittel: A: 10 mM HCl, B: 80 % ACN / 10 mM HCl. Flussrate: 40 ml/min. Gradient: 18-60 % B in 50 min. Detektionswellenlänge: 280 nm.

Es konnte in den Fraktionen von sieben der zwölf Chromatographien (Abb. 8A-G) aktivierende Substanzen im Luciferase-Reportergen-Test detektiert werden. In der Tabelle 17 sind die Fraktionen, welche die CRE-Promotor-Konstrukt induzierenden Substanzen enthielten, aufgelistet.

**Tabelle 17: Auflistung der Fraktionen die CRE-Promotor-Konstrukt induzierende Substanzen enthalten**

Ausgangsfractionen der Stammhirn-Peptidbank die CRE-Promotor-Konstrukt induzierende Substanzen enthielten		Subfraktionen in denen CRE-Promotor-Konstrukt induz. Substanzen detektiert wurden	Peptidgehalt der erhaltenen Subfraktionen
Pool 1	Fraktion 23	36 – 38	36 (36,4 mg), 37 (12,7 mg), 38 (5,9 mg)
	Fraktion 24	23, 25	23 (69 mg), 25 (43,5 mg)
Pool 2	Fraktion 24	23 - 26	23 (50 mg), 24 (41 mg), 25 (19 mg), 26 (23,8)
Pool 3	Fraktion 16(1)	25	25 (6,3 mg)
	Fraktion 16(2)	24	24 (6,3 mg)
	Fraktion 17(1)	24	24 (30 mg)
	Fraktion 17(2)	25	25 (16 mg)

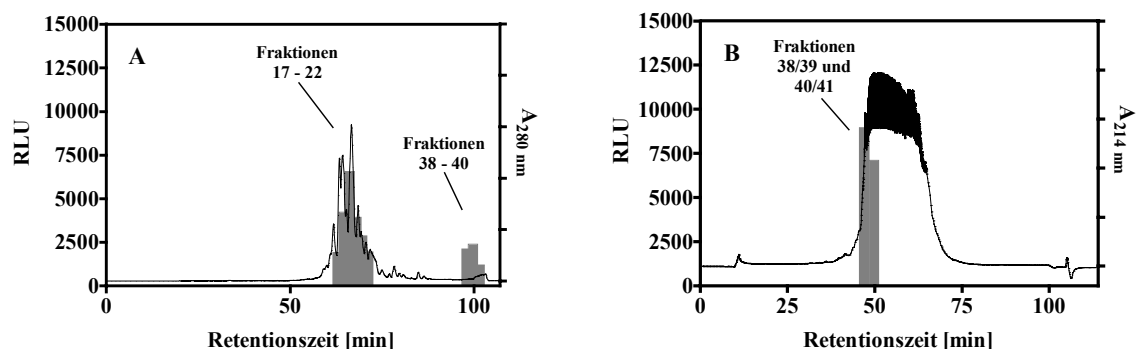
Der Peptidgehalt der Fraktionen wurde ermittelt, und zunächst mit der Hälfte der Fraktion 38 der Chromatographie von pH-Pool 1 Fraktion 23 (Abb. 8A) eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt (Fraktogel TSK SP650 (M), Fließmittel: A: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; B: 2 M NaCl/50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2.4). Aufgrund des salzhaltigen Elutionsmittels war eine Entsalzung der erhaltenen Fraktionen vor der Untersuchung im Luciferase-Reportergen-Test notwendig (2.6.2.1). In den erhaltenen Fraktionen konnten keine CRE-Promotor-Konstrukt induzierenden Substanzen detektiert werden.

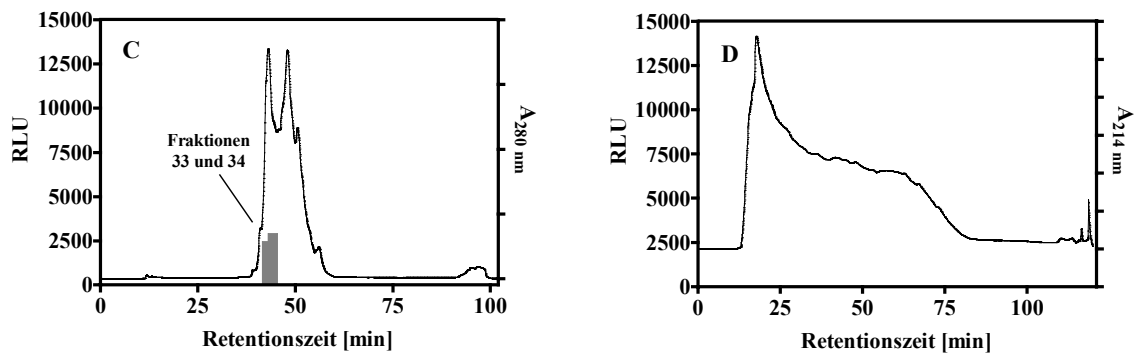
Es wurde daher anschliessend mit den vereinigten aktiven Fraktionen (Tab. 17) eine RP-Chromatographie durchgeführt. Dabei wurde sowohl die stationäre Phase als auch die mobile Phase gewechselt. Statt des im vorherigen Chromatographieschritt genutzten C4-Materials wurde C18-Material und statt ACN Methanol benutzt. Mit dem Wechsel der Chromatographie-Bedingungen konnten die CRE-Promotor-Konstrukt-aktivierenden Substanzen wiedergefunden werden. Es zeigte sich eine Trennung der aktiven Substanzen in zwei Peaks (Abb. 9A). Die Fraktionen 17-22 sowie 38 und 39 enthielten CRE-Promotor-Konstrukt induzierende Substanzen.

Mit der aktiven Fraktion 18 (Abb. 9A) wurde zunächst ein semiquantitatives Vorexperiment durchgeführt. Mit 1/10 der Fraktion wurde eine Anionenaustauschchromatographie mit starkem

Anionenaustausch-Material (Strong Anion Exchanger 10 × 50 mm, Macro-Prep 50 Q) durchgeführt. Aufgrund des verwendeten Elutionsmittels (A: 20 mM Tris-HCl, pH 8.6; B: 20 mM Tris-HCl / 1 M NaCl, pH 8.6) enthielten die entstandenen Fraktionen Salz, das vor deren Untersuchung im Test entfernt wurde (2.6.2.1). Es zeigte sich, dass die CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden Substanzen in der mobilen Phase, in der die Substanzen nicht an das Anionenaustauscher-Material gebunden hatten, detektiert werden konnten. Dieser Chromatographieschritt wurde daher zur Abtrennung der inaktiven anionischen Substanzen mit dem gesamten Material der Fraktionen 18-22 durchgeführt. Dieses nicht an die Säule gebundene Material wurde anschließend erneut chromatographisch getrennt, wobei eine RP-Chromatographie (Vydac RP C18) durchgeführt wurde. Mit Hilfe von ACN als Elutionsmittel und einer RP-Säule mit geringerer Poren- und Partikelgröße konnten die CRE-Promotor-Konstrukt induzierenden Substanzen weiter von inaktiven Peptiden getrennt werden (Abb. 9B).

Die Fraktionen 38-41, in denen biologisch aktive Substanzen nachzuweisen waren, wurden vereinigt und im folgenden Chromatographieschritt durch eine weitere RP-Chromatographie mit einer analytischen Vydac RP C18-Säule separiert. Um eine bessere Trennleistung zu erhalten, wurde ein flacher Gradient gewählt (0,5 % B/min). Die Fraktionen 33 und 34, in denen die CRE-Promotor-Konstrukt induzierenden Substanzen nachzuweisen waren (Abb. 9C), wurden anschließend auf einer analytischen YMC RP C18-Säule chromatographiert. In den daraus erhaltenen Fraktionen war eine CRE-Promotor-Konstrukt aktivierende Substanz nicht mehr eindeutig nachzuweisen.





**Abbildung 9:** Reinigung von CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden Substanzen aus der Stammhirn-Peptidbank. Die grauen Balken zeigen die Fraktionen in denen Substanzen enthalten sind, die das CRE-Promotor-Konstrukt im Luciferase-Reporter-Test auf CHO-CRE-GPR 8 Zellen induzieren.

**A:** RP-Chromatographie der vereinigten aktiven Fraktionen aus den 1. Rechromatographien (Tab. 17). Im Luciferase-Reporter-Test wurde ein Teil der HPLC-Fraktionen entsprechend 40 g Gewebe Stammhirn eingesetzt. Die Fraktionen 17-22 sowie 38 und 39 induzierten das CRE-Promotor-Konstrukt.

Säule: Vydac RP C18, 47 × 300 mm, 300 Å, 15-20 µm. Fließmittel: A: 20 % Methanol / 10 mM HCl, B: 100 % Methanol / 10 mM HCl. Flussrate: 30 ml/min. Gradient: 30-70 % B in 66 min. Detektionswellenlänge 280 nm.

**B:** RP-Chromatographie vom Durchlauf der Anionenaustauschchromatographie. Im Luciferase-Reporter-Test wurde ein Teil der HPLC-Fraktionen entsprechend 60 g Gewebe Stammhirn eingesetzt. Die Fraktionen 38-41 induzierten das CRE-Promotor-Konstrukt.

Säule: Vydac RP C18, 20 × 250 mm, 300 Å, 10 µm. Fließmittel: A: 0,1 % TFA, B: 80 % ACN / 0,1 % TFA. Flussrate: 7,2 ml/min. Gradient: 25-70 % B in 90 min. Detektionswellenlänge: 214 nm.

**C:** RP-Chromatographie der vereinigten Fraktionen 38-41. Im Luciferase-Reporter-Test wurde ein Teil HPLC-Fraktionen entsprechend 60 g Gewebe Stammhirn eingesetzt. Die Fraktion 33 und 34 induzierten das CRE-Promotor-Konstrukt.

Säule: Vydac RP C18, 10 × 250 mm, 300 Å, 5 µm. Fließmittel: A: 0,1 % TFA, B: 80 % ACN / 0,1 % TFA. Flussrate: 1,8 ml/min. Gradient: 30-60 % B in 80 min. Detektionswellenlänge: 280 nm.

**D:** RP-Chromatographie der vereinigten Fraktionen 33 und 34. Im Luciferase-Reporter-Test wurde ein Teil der HPLC-Fraktionen entsprechend 60 g Gewebe Stammhirn eingesetzt. CRE-Promotor-Konstrukt induzierende Substanzen q konnten nicht mehr detektiert werden.

Säule: YMC C18, 4,6 × 250 mm, 120 Å, 5 µm. Fließmittel: A: 0,1 % TFA, B: 80 % ACN / 0,1 % TFA. Flussrate: 0,6 ml/min. Gradient: 5-55 % B in 100 min. Detektionswellenlänge: 214 nm.

### 3.2.2. „Screening“ der Gesamthirn- und Hämofiltrat-Peptidbank

Da die Reindarstellung der in der Stammhirn-Peptidbank vom Schwein enthaltenden CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden Substanzen nicht erfolgreich beendet werden konnte, wurden weitere biologische Quellen genutzt, um Liganden für die GPR 7-, GPR 8- und PNR-Rezeptoren zu identifizieren. Dazu wurden mit den CHO-CRE-GPR 7, -GPR 8 und -PNR Zellen ein initiales Screening der Gesamthirn-Peptidbank vom Schwein sowie mit der humanen Hämofiltrat-Peptidbank durchgeführt. Das Screening der Gesamthirn-Peptidbank im Luciferase-Reporter-Gen-Test wurde mit einer Menge, die 120 g Gewebe entsprachen, das der Hämofiltrat-Peptidbank mit einer Menge, die 250 ml Hämofiltrat entsprachen, durchgeführt. Dabei zeigte keine der beiden Peptidbanken eine biologische Aktivität im Luciferase-Reporter-Gen-Test.

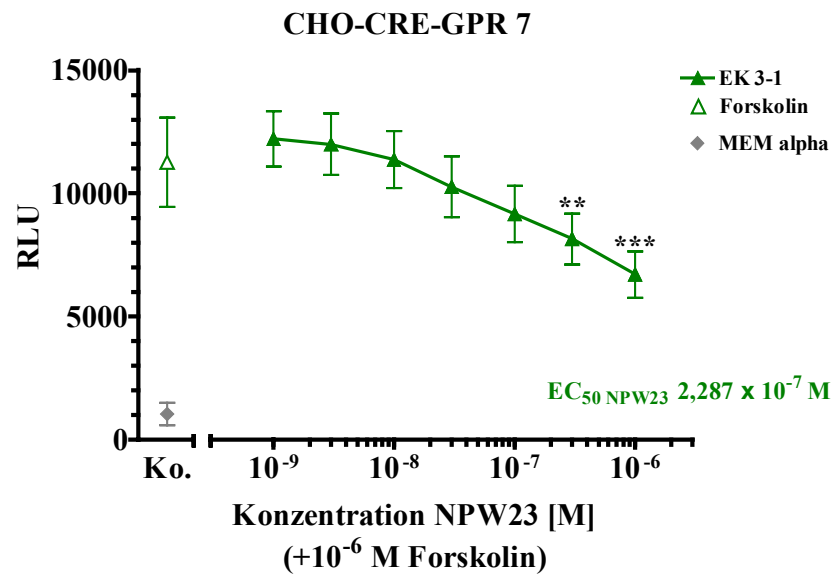
Im Verlauf dieser Arbeit erschien die Publikation von BAUER *et al.* (2000), in der das Membran-Protein p40 in Beziehung gesetzt wird zu den Lantibiotic Synthetase Component C-Proteinen (LanC Familie bakterieller Membran-Proteine). p40 wird darin nicht mehr zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gezählt. Die CHO-CRE-p40 Zellen wurden deshalb nicht mehr im Screening eingesetzt.

### 3.2.3. Inhibition der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion durch NPW

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde Neuropeptid W (NPW) als neuer Ligand für GPR 7 und GPR 8 veröffentlicht (BREZILLON *et al.*, 2002; FUJII *et al.*, 2002; SHIMOMURA *et al.*, 2002). Die Autoren (SHIMOMURA *et al.*, 2002) beschreiben eine hochpotente inhibitorische Wirkung von NPW auf die Forskolin-stimulierte Produktion von cAMP, mit einer  $IC_{50}$  im nanomolaren Bereich.

Zur Überprüfung der während dieser Arbeit selektionierten Klone von GPR 7 wurden diese mit synthetisch hergestelltem NPW23 (WYKHVASPRYHTVGRAAGLLMGL) im Luciferase-Reporter-Gen-Test untersucht. Dazu wurden die exprimierenden Zelllinien CHO-CRE-GPR 7 EK 3-1, -EK 3-6, -MK 5 und -MK 6 mit NPW in steigenden Konzentrationen von  $10^{-9}$  M bis  $10^{-6}$  M stimuliert. Nach 30 min wurde Forskolin in der Endkonzentration von  $10^{-6}$  M zugegeben. Dabei zeigte sich, dass NPW23 die Forskolin-induzierte Produktion von cAMP in EK 3-1 Zellen im Bereich von  $3 \times 10^{-8}$  bis  $10^{-6}$  M inhibierte (Abb. 10).





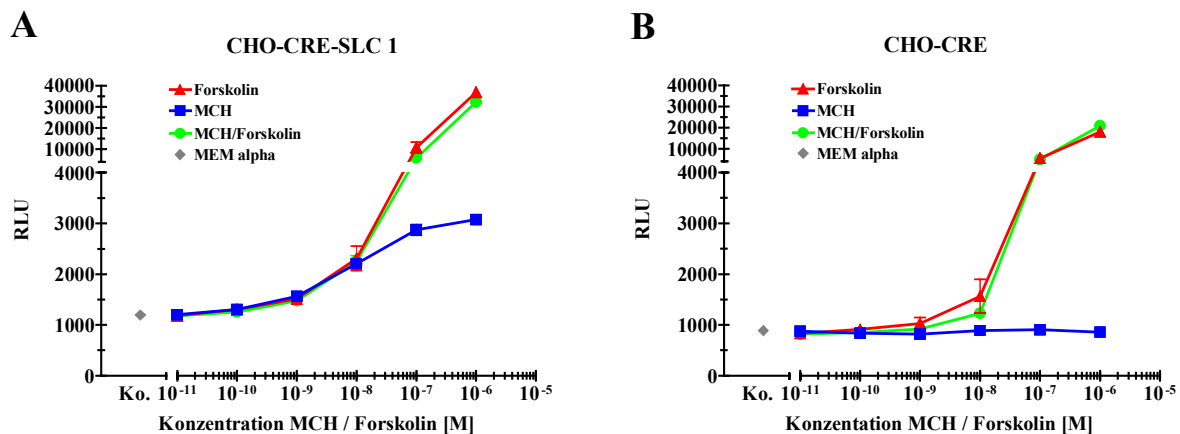
**Abbildung 10:** Inhibition der Forskolin-induzierten CRE-Promotor-Konstrukt-Induktion durch Neuropeptid W23 (NPW 23) in der GPR 7-Rezeptor exprimierenden CHO-CRE-GPR 7 EK 3-1 Zelllinie. CHO-CRE-GPR 7 EK 3-1 wurde mit NPW23 in steigenden Konzentrationen [10<sup>-9</sup> bis 10<sup>-6</sup> M] für 30 min inkubiert. Anschließend wurde Forskolin in der Endkonzentration 10<sup>-6</sup> M zugegeben, weitere 3 ½ h inkubiert und im Lumistar (BMG) das emittierte Licht gemessen. Die Signifikanzen sind jeweils bezogen auf die Einzelstimulation mit 10<sup>-6</sup> M Forskolin. Als Kontrollen (Ko.) wurden MEM alpha Medium sowie die Einzelstimulationen mit Forskolin dargestellt.

### 3.3. Charakterisierung der Signaltransduktionswege des MCH-Rezeptors

Im folgenden wurde die Signaltransduktion des MCH-Rezeptors in CHO-CRE-SLC 1 Zellen untersucht. Die Charakterisierung aktivierender Signaltransduktionswege des MCH-Rezeptors wurde mit Hilfe von Luciferase-Reporter-Gen-Tests (2.5.1), FLIPR- (2.5.2) und Western Blot Analysen (2.6) durchgeführt. Immunologisch wurde sowohl das an Serin 133 phosphorylierte „CRE-binding protein“ (pCREB) als auch die phosphorylierte Form (Thr 202/Tyr 204) der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (pMAPK) nachgewiesen (2.7.3). Eine parallele Inkubation mit verschiedenen Aktivatoren und Inhibitoren (2.4.3) ermöglichte dabei Aufschluss über die an der Signalweiterleitung des MCH-Rezeptors beteiligten G-Proteine zu erhalten.

#### 3.3.1. cAMP als „second messenger“

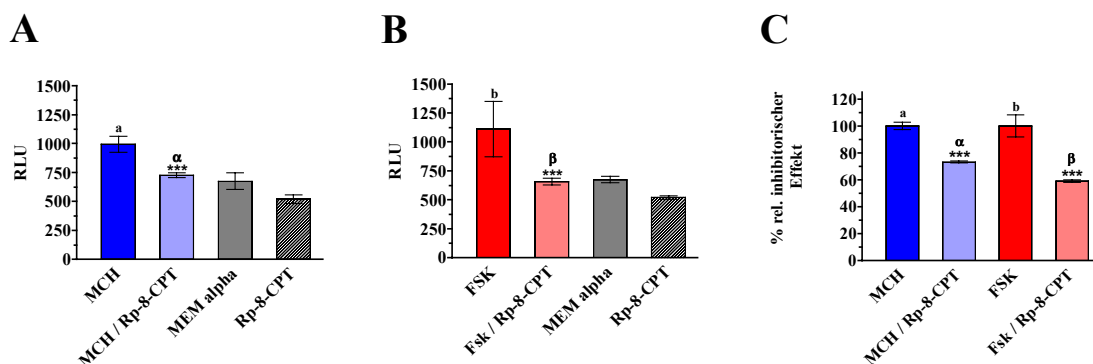
Die enzymatische Aktivität der Adenylat-Cyclase (AC) wird durch die GTP-gebundene Form der  $\alpha$ -Untereinheit der  $G_s$ -Proteine stimuliert. Darüber hinaus kann sie die durch das Diterpen Forskolin aktiviert werden (DE SOUZA *et al.*, 1983). Aus der Aktivierung der AC resultiert eine erhöhte cAMP-Produktion. Zur näheren Analyse der Involvierung von cAMP an der Signalleitung in CHO-CRE-SLC 1 Zellen wurden diese mit Forskolin und MCH stimuliert.



**Abbildung 11:** Konzentrationsabhängigkeit der CRE-Promotor-Konstrukt induzierenden Wirkung von MCH und Forskolin auf CHO-CRE-SLC 1- und CHO-CRE Zellen. Die Zellen wurden mit MCH, Forskolin oder beiden Agenzien in steigenden Konzentrationen [ $10^{-11}$  bis  $10^{-6}$  M] stimuliert. Die Dosis-Wirkungskurve von Forskolin ist in Rot, die von MCH in Blau, die gleichzeitige Gabe von MCH und Forskolin in Grün dargestellt. Als Kontrolle (Ko.) ist der Basalwert von MEM alpha Medium angegeben. Der  $EC_{50}$  Wert bezieht sich auf die Stimulation mit MCH in CHO-CRE-SLC 1 Zellen.

Die Gabe von Forskolin und MCH [ $10^{-11}$  bis  $10^{-6}$  M] führt, wie in Abbildung 11A zu erkennen, in den CHO-CRE-SLC 1 Zellen bei beiden Stimulanzen zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung des CRE-Promotor-Konstruktes. Der Kontrollversuch mit CHO-CRE Zellen (Abb. 11B) zeigt für Forskolin wie erwartet eine Erhöhung des emittierten Lichtes, während mit MCH keine Aktivierung detektiert wurde. Bei einer Kostimulation von MCH und Forskolin konnte in den CHO-CRE-SLC 1- und CHO-CRE-Zellen kein Unterschied zur Einzelstimulation mit Forskolin festgestellt werden (Abb. 11A und 11B, grüne Kurven). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die MCH/SLC 1-Signalkaskade in diesen Zellen über  $G_s$ -Proteine zur Erhöhung von cAMP führt, aus der über Proteinkinasen eine Phosphorylierung von CREB und so die Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts erfolgt.

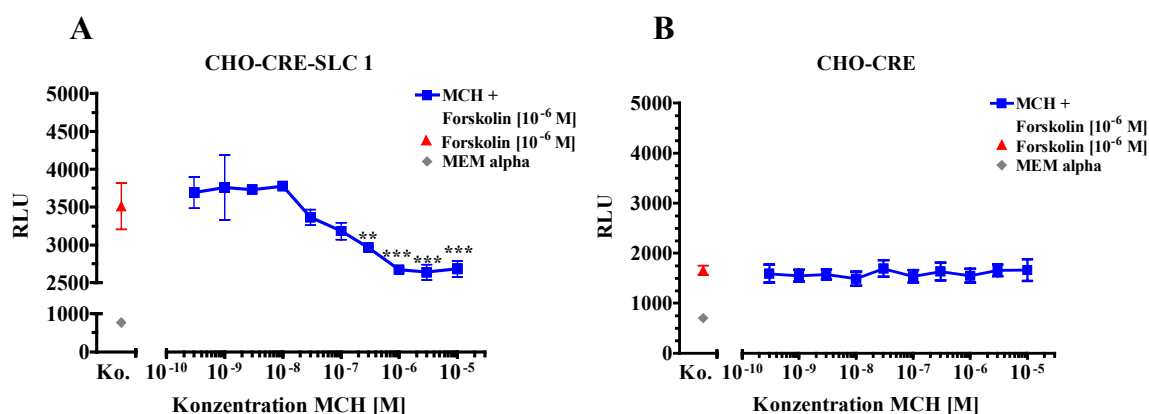
Zur Überprüfung der Beteiligung der PKA, die durch cAMP aktiviert wird, wurde der PKA-spezifische Inhibitor Rp-8-CPT-cAMPS (GJERTSEN *et al.*, 1995; SCHWEDE *et al.*, 2000) eingesetzt (2.4.3). Abbildung 12 zeigt die Einzelstimulationen von CHO-CRE-SLC 1 Zellen mit MCH (Abb. 12A) und Forskolin (Abb. 12B) in den Konzentrationen von jeweils  $3 \times 10^{-7}$  M. Desweiteren sind in Abbildung 12A/B die Inhibition der MCH- und der Forskolin-vermittelten Signaltransduktion durch Rp-8-CPT-cAMPS [ $10^{-4}$  M] gezeigt.



**Abbildung 12:** Inhibition der Proteinkinase A durch Rp-8-CPT-cAMPS. CHO-CRE-SLC 1 Zellen wurden mit Rp-8-CPT-cAMPS [ $10^{-4}$  M] für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von: A: MCH [ $3 \times 10^{-7}$  M] (MCH/Rp-8-CPT) bzw. B: Forskolin [ $3 \times 10^{-7}$  M] (Fsk/Rp-8-CPT). Als Basalwerte sind MEM alpha Medium (MEM alpha) und Rp-8-CPT-cAMPS [ $10^{-4}$  M] in MEM alpha Medium (Rp-8-CPT) dargestellt. C: Darstellung des inhibitorischen Effektes von Rp-8-CPT-cAMPS auf die Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts durch MCH (α) und Forskolin (β) in Prozent. Die Stimulationen von MCH (a) und Forskolin (b) ohne Rp-8-CPT-cAMPS entsprechen 100 %. Die Inhibitionen der MCH stimulierten Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts durch Rp-8-CPT-cAMPS (α) wurden auf die Einzelstimulationen von MCH (a) bezogen, entsprechend bezieht sich die Forskolin/Rp-8-CPT-cAMPS (β) auf die Einzelstimulationen von Forskolin (b).

Durch Inkubation mit Rp-8-CPT-cAMPS liess sich eine Hemmung der MCH- und Forskolin-induzierten CRE-Promotor-Konstrukt-Aktivität feststellen. Abbildung 12C stellt die gemessenen Werte von MCH und MCH/Rp-8-CPT bzw. Forskolin und Forskolin/Rp-8-CPT aus Abbildung 12A/B in Prozent dar. Darin wurden die Einzelstimulationen von MCH (Abb. 12C, a) und Forskolin (Abb. 12C, b) als Absolutwerte (100 %) gesetzt. Die Darstellung in Abbildung 12C zeigt die erhaltenen Werte von MCH/Rp-8-CPT ( $\alpha$ ) und Forskolin/Rp-8-CPT ( $\beta$ ) jeweils bezogen auf die Einzelstimulationen mit MCH (a) bzw. Forskolin (b). Bei Inkubation von MCH mit Rp-8-CPT-cAMPS kommt es zu einer signifikanten Verringerung der Reporter-gen-Aktivität von 27 %. Im Kontrollversuch mit Forskolin/Rp-8-CPT-cAMPS zeigte sich ein signifikanter inhibitorischer Effekt von 41 %. Die Inhibition der MCH vermittelten Signaltransduktion durch Rp-8-CPT-cAMPS lässt darauf schließen, dass die PKA, und damit eine cAMP-vermittelte Signalleitung, an der Transduktion des MCH-Signals in den CHO-CRE-SLC 1 Zellen beteiligt ist.

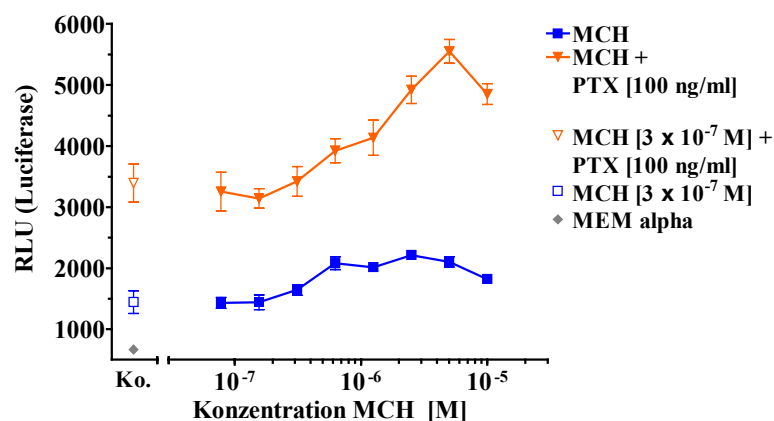
MCH bewirkt durch Aktivierung des SLC 1-Rezeptors und Kopplung an ein inhibitorisches  $G_i$ -Protein eine Inhibition der Forskolin-stimulierten Produktion von cAMP (CHAMBERS *et al.* 1999; SHIMOMURA *et al.* 1999). Bei einer Stimulationszeit im Luciferase-Reporter-gen-Test von 4 h konnte der inhibitorische Effekt von MCH nicht festgestellt werden (Abb. 11, grüne Kurve). Um diesen im Luciferase-Reporter-gen-Test detektieren zu können, wurden die CHO-CRE-SLC 1 Zellen für 15 min zeitgleich mit Forskolin [ $10^{-6}$  M] und MCH in steigenden Konzentrationen [ $3 \times 10^{-10}$  bis  $10^{-5}$  M] inkubiert. Anschließend wurden die Agentien durch MEM alpha ersetzt und für weitere 45 min inkubiert, um die Luciferasebildung in den Zellen zu ermöglichen.



**Abbildung 13:** Inhibition der Forskolin stimulierten Aktivität des Luciferase-Reporter-gen-Tests durch MCH. CHO-CRE-SLC 1 (A) und CHO-CRE Zellen (B) wurden für 15 min mit Forskolin [ $10^{-6}$  M] und steigenden Konzentrationen an MCH [ $3 \times 10^{-10}$  bis  $10^{-5}$  M] stimuliert. Anschließend wurden die Stimulanzen durch MEM alpha Medium ersetzt und weitere 45 min inkubiert. Die blaue Kurve zeigt die Inhibition der Forskolin-induzierten CRE-Promotor-Konstrukt-Induktion durch MCH. Als Kontrolle ist der MEM alpha Basalwert und Forskolin [ $10^{-6}$  M] angegeben. Die Signifikanzen sind jeweils bezogen auf die Stimulation mit  $10^{-6}$  M Forskolin.

In der Abbildung 13A ist bei paralleler Inkubation von Forskolin und MCH im Luciferase-Reporter-Gen-Test eine Verringerung der Forskolin vermittelten CRE-Promotor-Konstrukt-Induktion durch MCH zu erkennen. Die  $G_i$ -gekoppelte Signalweiterleitung des MCH-Rezeptors konnte mit dem Luciferase-Reporter-Gen-Test bestätigt werden.

Zur Überprüfung der Signalweiterleitung des MCH Rezeptors über inhibitorische G-Proteine wurde die Kopplung über  $G_i/G_0$ -Proteine mit Pertussistoxin inhibiert. Stimuliert man CHO-CRE-SLC 1 Zellen, die 20-24 h mit Pertussistoxin vorbehandelt wurden, mit MCH in steigenden Konzentrationen [ $3 \times 10^{-7}$  bis  $10^{-5}$  M], ist eine deutliche Erhöhung des emittierten Lichtes bei der parallelen Gabe von MCH/PTX (Abb. 14, orange Kurve) zu erkennen. Die Blockierung der  $G_i/G_0$ -Signalleitung führt möglicherweise zu einer verstärkten Signaltransduktion des MCH-Rezeptors über  $G_s$ -Proteine.

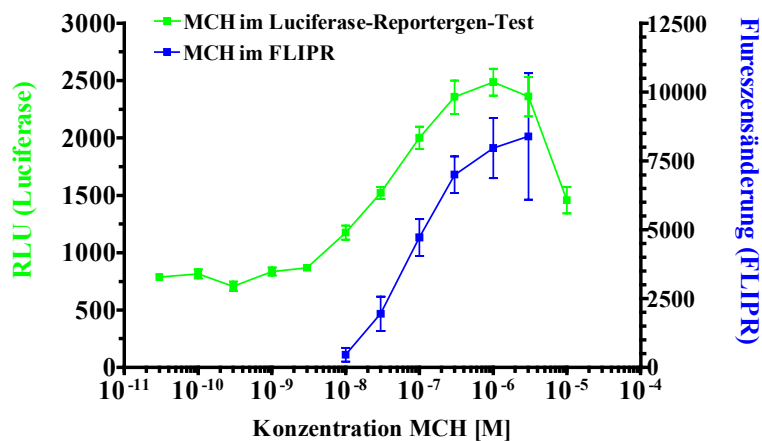


**Abbildung 14:** Inhibition der  $G_i/G_0$ -gekoppelten Signalleitung durch Pertussistoxin im Luciferase-Reporter-Gen-Test. CHO-CRE-SLC 1 Zellen wurden 20-24 h mit 100 ng/ml Pertussistoxin vorinkubiert und anschließend mit MCH in steigenden Konzentrationen stimuliert. Als Kontrollen (Ko.) sind die Stimulationen von MCH [ $3 \times 10^{-7}$  M] mit und ohne Pertussistoxin (PTX 100 ng/ml), sowie MEM alpha Medium angegeben. Die Signifikanzen sind jeweils bezogen auf die Stimulation mit MCH ohne Pertussistoxin-Vorbehandlung.

### 3.3.2. $Ca^{2+}$ -Messung im FLIPR

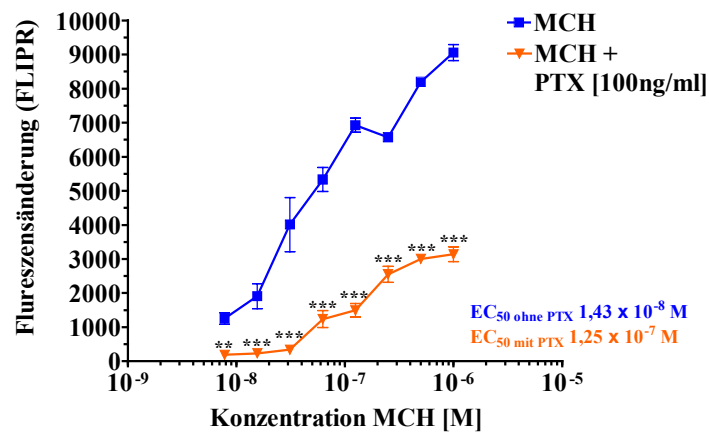
Als weitere Versuchsreihe wurden die MCH-Rezeptor exprimierenden Zellen auf die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  durch Aktivierung mittels MCH untersucht. Veränderungen des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels wurden mit dem „Fluometric Imaging Plate Reader“ (FLIPR, 2.5.2) erfasst. Diese auf Fluoreszenzänderung basierende Messmethode kann Änderungen der freien  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der Zelle durch Freisetzung aus zellulären Speichern oder  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch Ionenkanäle zeitaufgelöst nachweisen. In Abbildung 15 ist vergleichend

die Dosis-Wirkungsbeziehung von MCH auf CHO-CRE-SLC 1 Zellen im FLIPR- und Luciferase-Reporter-Gen-Test dargestellt. Sie zeigt, dass durch die Gabe von MCH eine konzentrationsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung erzeugt wurde.



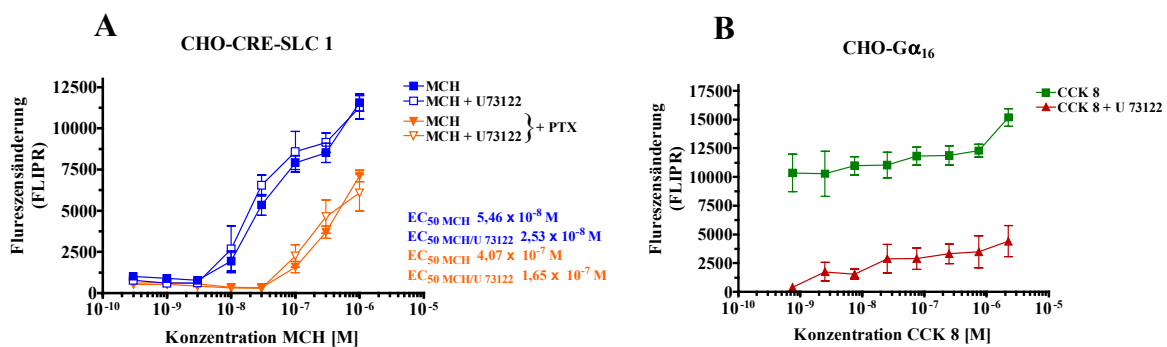
**Abbildung 15:** Konzentrationsabhängigkeit der MCH induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bzw. Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts in CHO-CRE-SLC 1 Zellen. Die grün dargestellte Kurve zeigt die durch Stimulation mit MCH erfolgte Induktion des Luciferase-Reportergens ( $\text{EC}_{50} 2,3 \times 10^{-8} \text{ M}$ ). Die blaue Kurve stellt die durch MCH induzierte, im FLIPR gemessene, Fluoreszenzänderung von Fluo-4 dar ( $\text{EC}_{50} 7,6 \times 10^{-8} \text{ M}$ ). Diese wird durch Veränderung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels, bewirkt durch MCH-Rezeptor Stimulation, hervorgerufen.

Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) wird zusammen mit Diacylglycerol (DAG) durch Phospholipase C aus Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) freigesetzt. Dieser Signalweg kann, ausgehend von  $\text{G}_q$ -Proteinen oder  $\text{G}_{i/\beta\gamma}$ -Proteinen, über die Phospholipase C verlaufen. Sie führen jeweils zur Produktion von  $\text{IP}_3$  und damit zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Unterdrückt man die Kopplung der Signalleitung über  $\text{G}_i/\text{G}_0$ -Proteine durch die Behandlung mit Pertussistoxin, so kommt es in CHO-CRE-SLC 1 Zellen zu einer deutlichen Verringerung des MCH induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals (Abb. 16). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Transduktion des Signals über  $\text{G}_i$ -Proteine verläuft. Allerdings wird keine vollständige Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals erreicht, sondern wie in Abbildung 16 ersichtlich nur eine Teilhemmung.



**Abbildung 16:** Inhibition der  $G_i/G_o$ -gekoppelten Signalweiterleitung durch Pertussistoxin. CHO-CRE-SLC 1-Zellen wurden 20-24 h mit 100 ng/ml Pertussistoxin (PTX) inkubiert und anschließend mit MCH in steigenden Konzentrationen stimuliert. Pertussistoxin führt zu einer Verringerung der MCH-induzierten  $Ca^{2+}$ -Freisetzung. Die Signifikanzen sind jeweils bezogen auf die Stimulation mit MCH ohne Pertussistoxin-Vorbehandlung.

Zur Feststellung ob  $G_q$ -Proteine über die PLC an der  $Ca^{2+}$ -Freisetzung beteiligt sind, wurde der Phospholipase C Inhibitor U 73122 verwendet (BLEASDALE *et al.*, 1990; SMITH *et al.*, 1990). Dazu wurden CHO-CRE-SLC 1-Zellen, die mit und ohne Pertussistoxin vorbehandelt wurden, erst mit  $10^{-6}$  M U 73122 20 min inkubiert und nachfolgend in steigender Konzentration [ $3 \times 10^{-10}$  bis  $10^{-6}$  M] MCH auf die Zellen gegeben.



**Abbildung 17:** Inhibition der  $G_i/G_o$ -gekoppelten und der Phospholipase C vermittelten Signalleitung. A: CHO-CRE-SLC 1-Zellen wurden 20-24 h mit 100 ng/ml Pertussistoxin inkubiert. Anschließend erfolgte für 20 min eine Inkubation mit dem Phospholipase C Inhibitor U 73122 [ $10^{-6}$  M]. Danach wurde mit MCH in steigenden Konzentrationen [ $3 \times 10^{-10}$  bis  $10^{-6}$  M] stimuliert und direkt im FLIPR gemessen. B: CHO- $G\alpha_{16}$  Zellen wurden mit CCK 8 [ $7,5 \times 10^{-10}$  bis  $2,25 \times 10^{-6}$  M] stimuliert. Bei Vorinkubation mit U 73122 [ $3 \times 10^{-6}$  M] zeigte sich mit der Verringerung des  $Ca^{2+}$ -Signals (rote Kurve) bei Stimulation mit CCK 8 deutlich der inhibitorische Effekt.

Abbildung 17A zeigt die Inkubation von MCH und U 73122 im FLIPR ohne (blaue Kurven) und mit Vorbehandlung mit Pertussistoxin (orange Kurven). An den Kurven der MCH- und MCH/U 73122-Stimulationen ohne Pertussistoxin-Vorbehandlung ist erkennbar, dass das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal durch U 73122 nicht verringert werden konnte. Bei der Versuchsanordnung mit Pertussistoxin wurde lediglich der inhibitorische Effekt durch das Pertussistoxin detektiert. Eine Beteiligung der PLC konnte demnach nicht nachgewiesen werden. CHO- $\text{G}\alpha_{16}$ -Zellen (2.4.1), die den  $\text{CCK}_A$ -Rezeptor als endogenen Rezeptor beinhalten (CORDELIER *et al.*, 1997), wurden mit CCK8 in den Konzentrationen  $7,5 \times 10^{-10}$  bis  $2,25 \times 10^{-6}$  M stimuliert. Es konnte ein konzentrationsabhängiges  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal detektiert werden, dass sich bei Vorinkubation mit  $3 \times 10^{-6}$  M U 73122 hemmen liess. In Abbildung 17B ist dieser inhibitorische Effekt dargestellt und belegte die Funktionalität des PLC-Inhibitors U 73122.

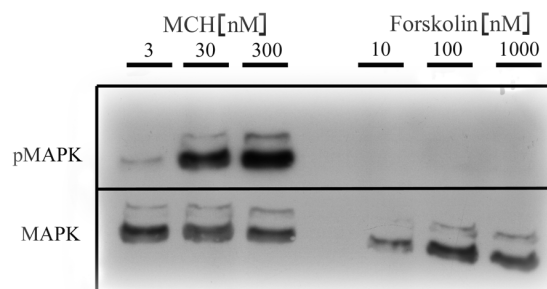


### 3.3.3. Untersuchung der MAP Kinase Kaskade

#### 3.3.3.1. Induktion von p42/44 MAP Kinase durch MCH

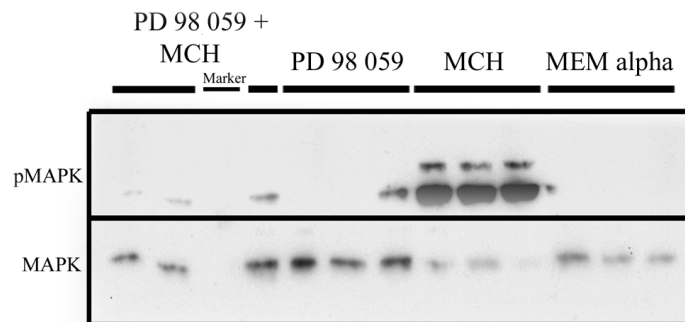
Die Stimulation des SLC 1-Rezeptors mit MCH führt zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK 42/44 = MAPK; HAWES *et al.*, 2000), die auch als extrazelluläre regulierte Kinase (ERK) bezeichnet wird. Die Übertragung der Signale vom aktivierten Rezeptor zur MAPK Kaskade ist über  $G_i$ -,  $G_o$ - und  $G_q$ -Proteine möglich.

Die Aktivierung des MCH-Rezeptors in CHO-CRE-SLC 1 Zellen durch Stimulation mit MCH führte erwartungsgemäss zur Phosphorylierung von MAPK (Abb. 18). Die niedrigste MCH-Konzentration, bei der eine erhöhte pMAPK-Bildung nachgewiesen werden konnte, lag bei 3 nM. Eine Aktivierung der Adenylat Cyclase durch Forskolin führte zu keiner Phosphorylierung von MAPK. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele im Western Blot, wurden die Antikörper der nicht-phosphorylierten inaktiven Form der MAPK verwendet.



**Abbildung 18:** Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Phospho-p42/44 MAP Kinase (pMAPK) und MAP Kinase. CHO-CRE-SLC 1-Zellen wurden für 60 min mit MCH und Forskolin in den oben gezeigten Konzentrationen behandelt. Als Kontrolle für eine gleichmässige Beladung der Geltaschen wurden MAPK-Antikörper für die nicht-phosphorylierte Form verwendet (MAPK).

Die Kaskade der MAP Kinase verläuft über eine Reihe hintereinandergeschalteter Proteinkinasen, welche die Signale von der inneren Zellmembran weiter in das Zellinnere leiten. Diese verläuft vom Rezeptor Ras-abhängig oder -unabhängig zur Raf- und weiter zur MEK1-Proteinkinase und führt zur Phosphorylierung von MAPK. Durch die Behandlung mit PD 98059, einem spezifischen Inhibitor der MEK1 (ALESSI *et al.*, 1995), kann diese Phosphorylierung der MAPK blockiert werden.

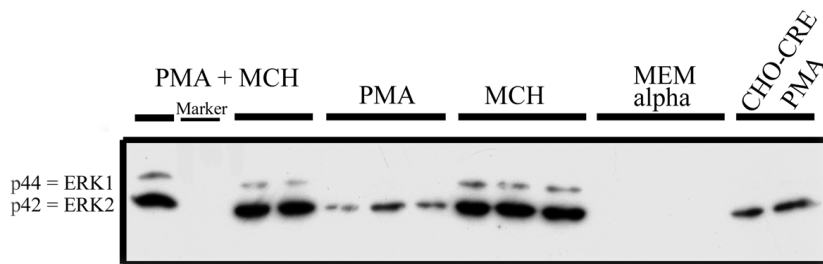


**Abbildung 19:** Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern gegen Phospho-p42/44 MAP Kinase (pMAPK) und MAP Kinase (MAPK). CHO-CRE-SLC 1-Zellen wurden für 30 min mit  $5 \times 10^{-5}$  M PD 98059, einem Inhibitor der MEK1, inkubiert und anschließend für weitere 60 min mit  $3 \times 10^{-7}$  M MCH stimuliert

Inkubiert man CHO-CRE-SLC 1 Zellen vor einer Stimulation mit MCH [ $3 \times 10^{-7}$  M] mit PD 98059 [ $5 \times 10^{-5}$  M], so zeigte sich an den schwachen Signalen eine sehr verringerte pMAPK-Bildung (Abb. 19). Die Verhinderung der MAPK Phosphorylierung durch die Behandlung mit PD 98059 belegte die Signalweiterleitung in den CHO-CRE-SLC 1 Zellen über die MEK1.

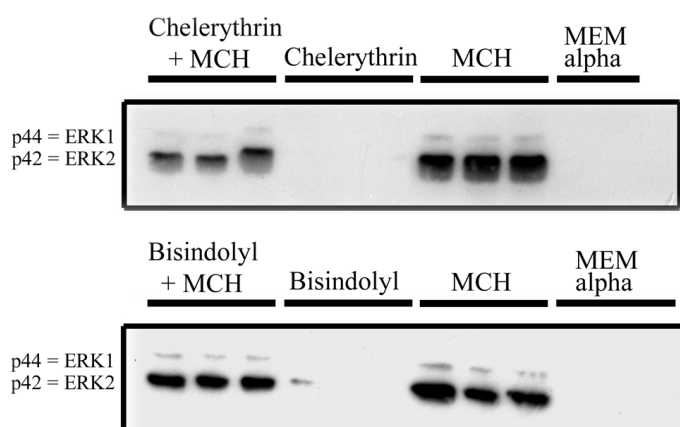
### 3.3.3.2. Phospholipase C-regulierte Aktivierung der MAPK-Kaskade

Der Ras/MAPK Signalweg kann von verschiedenen G-Protein Subtypen moduliert werden. Die Signalleitung kann sowohl über  $G_i/G_0$ - als auch  $G_q$ -Proteine erfolgen. Dabei können die  $G_{\alpha}$ - als auch die  $\beta\gamma$ -Heterodimere die MAPK-Kaskade regulieren. Bei einer Beteiligung von  $G_{\alpha_q}$  und  $G\beta\gamma_i$  an der Signalleitung erfolgt die Aktivierung der Ras/MAPK-Kaskade, über PLC und DAG, durch die Proteinkinase C (SMRCKA *et al.*, 1991; STERNWEIS & SMRCKA, 1992; CRESPO *et al.*, 1994). Darüber hinaus kann auch die  $\alpha$ -Untereinheit der  $G_0$ -Proteine eine PKC-abhängige MAPK-Aktivierung induzieren (VAN BIESEN *et al.*, 1995B). Die Applikation des PKC-aktivierenden Agens Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) in der Konzentration  $3 \times 10^{-7}$  M induzierte lediglich ein p42 MAPK-Signal in den CHO-CRE-SLC 1 bzw. den CHO-CRE-Zellen (Abb. 20). Bei Kostimulation mit MCH [ $3 \times 10^{-7}$  M] liess sich keine deutliche Erhöhung des pMAPK-Signals detektieren.



**Abbildung 20:** Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern gegen Phospho-p42/44 MAP Kinase. CHO-CRE-SLC 1-Zellen wurden für 30 min mit PMA [ $3 \times 10^{-7}$  M] inkubiert und anschließend für weitere 60 min mit MCH [ $3 \times 10^{-7}$  M] stimuliert. Als weitere Kontrolle wurden CHO-CRE-Zellen mit PMA stimuliert. p44: p44 MAPK, p42: p42 MAPK, ERK: extrazellulär aktivierte Proteinkinase.

Im Falle einer Beteiligung der PKC müsste sich die Phosphorylierung von MAPK durch die PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimide I bzw. Chelerythrin (HERBERT *et al.*, 1990; TOULLEC *et al.*, 1991) sowie den PLC-Inhibitor U 73122 (2.4.3) (STAMM *et al.*, 1998) inhibieren lassen. Durch die Inhibition der PLC mit U 73122 ergab sich keine Veränderung der durch MCH-Stimulation erhöhten pMAPK-Signale. Mit Chelerythrin konnte bei paralleler Inkubation mit MCH eine Verringerung der pMAPK-Bildung detektiert werden. Dagegen zeigte sich mit Bisindolylmaleimide I keine deutliche Verringerung des MAPK-Signals (Abb. 21). Im Luciferase-Reportergen-Test wurden inhibitorischen Effekte durch gleichzeitige Inkubation von Chelerythrin mit MCH bzw. U 73122 mit MCH nicht nachgewiesen (nicht gezeigt). Diese Befunde zeigen, dass die PKC an der Phosphorylierung der MAPK in CHO-CRE-SLC 1 Zellen beteiligt ist.

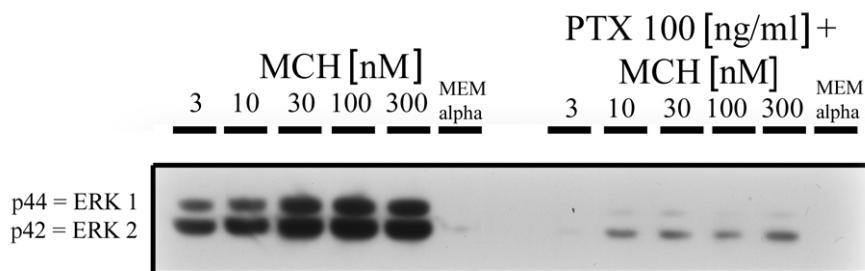


**Abbildung 21:** Western Blot mit spezifischen Antikörpern für Phospho-p42/44 MAP Kinase. CHO-CRE-SLC 1-Zellen wurden für 30 min mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrin bzw. Bisindolylmaleimide [ $10^{-6}$  M], inkubiert und anschließend für weitere 60 min mit  $3 \times 10^{-7}$  M MCH stimuliert. p44: p44 MAPK, p42: p42 MAPK, ERK: extrazellulär aktivierte Proteinkinase.

Die Inhibition der Proteinkinasen  $C\delta$  und  $C\gamma$  durch Rottlerin (GSCHWENDT *et al.*, 1994) in CHO-CRE-SLC 1-Zellen führte zu keiner Verringerung der p42/44 MAPK Signale (nicht gezeigt). Eine Beteiligung dieser PKC-Subtypen an der p42/44 MAPK-Kaskade konnte mit dem verwendeten Inhibitor nicht nachgewiesen werden.

### 3.3.3.3. $G\beta\gamma$ -Protein-regulierte Aktivierung der MAPK-Kaskade

Da eine Beteiligung der PKC an der Signalweiterleitung zur MAPK nur bedingt nachgewiesen werden konnte, wurde die Involvierung von  $G_i$ -Proteinen mit Hilfe von Pertussistoxin untersucht. Eine Kopplung des MAPK-Weges über  $G_i$ -Rezeptoren kann über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit direkt an das Ras-Protein vermittelt werden (CRESPO *et al.*, 1994; VAN BIESEN *et al.*, 1995A; HAWES *et al.*, 1995; LUTRELL *et al.*, 1996). In CHO-CRE-SLC 1 Zellen, die mit Pertussistoxin vorbehandelt wurden, zeigte sich dabei eine deutliche Verringerung der MCH-induzierten Bildung von pMAPK (Abb. 22). Die Signalweiterleitung des durch MCH aktivierten SLC 1-Rezeptors zur Ras/MAPK-Kaskade scheint über die  $G\beta\gamma$ -Untereinheit vermittelt zu sein.



**Abbildung 22:** Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Phospho-p42/44 MAP Kinase. CHO-CRE-SLC 1 Zellen wurden 20-24 h mit 100 ng/ml Pertussistoxin inkubiert und anschließend für 1 h mit MCH in den oben gezeigten Konzentrationen stimuliert. p44: p44 MAPK, p42: p42 MAPK, ERK: extrazellulär aktivierte Proteinkinase.

#### 3.3.3.3.1. Involvierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase an der $\beta\gamma$ -regulierten MAPK Aktivierung

Die  $G_i$ -Protein-vermittelten MAPK-Aktivierung durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit kann auch über die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) reguliert werden (RODRIGUEZ-VICINIA *et al.* 1994; HAWES *et al.* 1996; TANG & DOWNES, 1997). Das MCH-induzierte pMAPK-Signal im Western Blot sowie die CRE-Promotor-Konstrukt-Induktion im Luciferase-Reportergen-Test konnten mit den spezifischen PI3-K-Inhibitoren Ly 294002 (VLAHOS *et al.*, 1994) und Wortmannin (POWIS *et al.*, 1994) nicht inhibiert werden. Eine Beteiligung der PI-3-Kinase an

der  $G_{\beta\gamma}$ -Protein gekoppelten MAPK-Aktivierung konnte in CHO-CRE-SLC 1 Zellen nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

### 3.3.4. cAMP/PKA-induzierte Aktivierung von MAPK

Eine Aktivierung oder Inaktivierung der MAP Kinase-Kaskade durch oGPCRs kann über den cAMP/Proteinkinase A Signalweg reguliert werden (HOUSLAY & KOLCH, 2000; STORK & SCHMITT; 2002). Wie aus Abbildung 23 ersichtlich, wurde bei gleichzeitiger Stimulation von MCH und Forskolin eine Verstärkung der Bildung von pMAPK detektiert. Diese stimulatorische Wirkung zeigte sich noch deutlicher bei planimetrischer Auswertung der pMAPK-Banden. Die erhöhte Bildung von pMAPK ist in Abbildung 24 deutlich festzustellen.

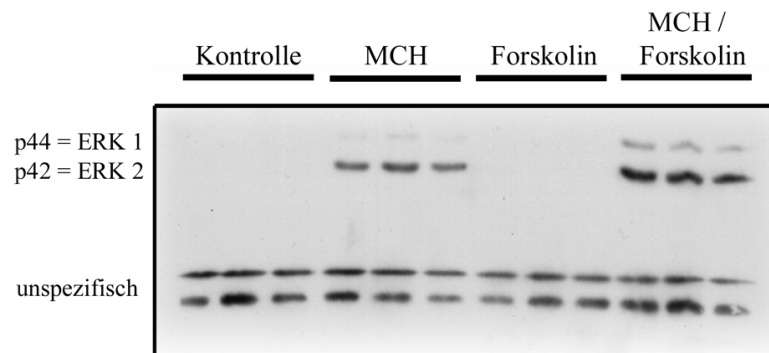


Abbildung 23:

Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Phospho-p42/44 MAP Kinase. CHO-CRE-SLC 1-Zellen wurden mit  $5 \times 10^{-7}$  M MCH und  $5 \times 10^{-7}$  M Forskolin als Einzelstimulationen und MCH/Forskolin als Kostimulation (Endkonzentration jeweils  $5 \times 10^{-7}$  M) für 60 min inkubiert. p44: p44 MAPK, p42: p42 MAPK, ERK: extrazellulär aktivierte Proteinkinase.

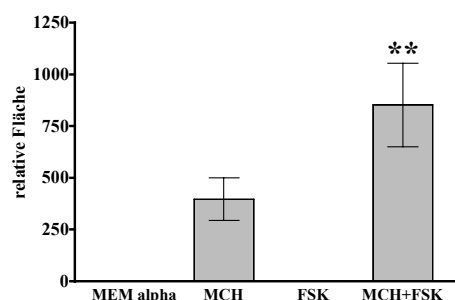
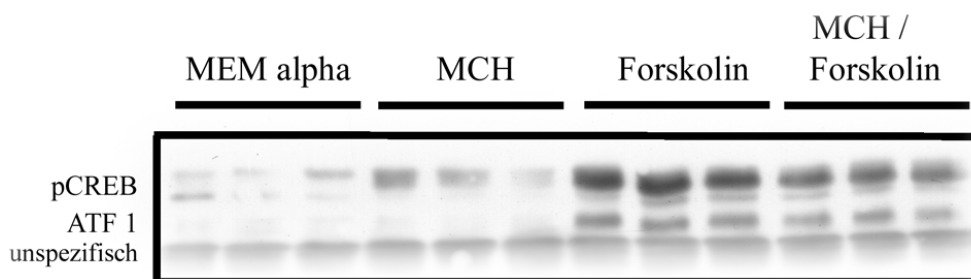


Abbildung 24: Planimetrische Auswertung der pMAPK-Signalstärke. Die Kostimulation von MCH mit Forskolin (MCH + Fsk) führt zu einer Verstärkung der pMAPK-Signalstärke im Vergleich zur MCH-Einzelstimulation. Die Signifikanz ist bezogen auf die Stimulation mit MCH. Fsk: Forskolin.

Möglicherweise führte in CHO-CRE-SLC 1 Zellen die Forskolin-induzierte Stimulation der PKA indirekt zu einer Verstärkung der MAPK-Signalkaskade, die sich bei MCH/Forskolin Kostimulation in einem in einem erhöhten pMAPK-Signal widerspiegelte.

### 3.3.5. Untersuchung der pCREB-induzierten Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts

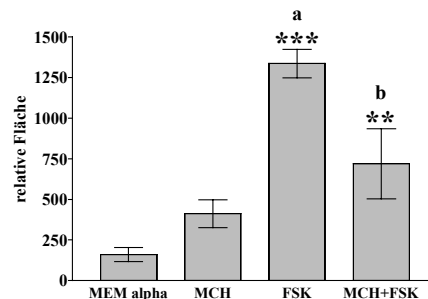
PKA oder MAPK abhängige Promotor-Aktivitäten werden in vielen Fällen durch den Transkriptionsfaktor CREB vermittelt. In Abbildung 25 ist der immunologische Nachweis der Phosphorylierung von CREB (2.7.3) in CHO-CRE-SLC 1 Zellen durch Stimulation mit MCH [ $5 \times 10^{-7}$  M] und Forskolin [ $5 \times 10^{-7}$  M] sowie die Kostimulation von beiden Agentien dargestellt.



**Abbildung 25:** Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen phosphoryliertes „cAMP-response-element binding protein“ (pCREB). CHO-CRE-SLC 1 Zellen wurden für 60 min mit MCH [ $5 \times 10^{-7}$  M], Forskolin [ $5 \times 10^{-7}$  M] oder beiden Stimulatoren inkubiert. ATF 1: Activating Transcription Factor 1.

In der Kontrolle mit MEM alpha Medium wurden schwache pCREB-Signale detektiert. Das durch MCH-Stimulation hervorgerufene pCREB-Signal war im Vergleich zur Kontrolle stärker. Bei Stimulation mit Forskolin erschienen erwartungsgemäss deutliche pCREB-Banden. Weiterhin ist erkennbar, dass eine Kostimulation von MCH mit Forskolin im Vergleich zur Forskolin-Einzelstimulation zu einem schwächeren pCREB-Signal führte. Für eine bessere Vergleichbarkeit stimulatorischer und inhibitorischer Effekte wurden die pCREB-Signale aus Abbildung 25 planimetrisch ausgewertet (2.1.8). Dabei wurden die einzelnen pCREB-Signale der Agentien aus Abbildung 25 jeweils als eine Fläche berechnet und der Mittelwert  $\pm$  SD in Abbildung 26 als Balkendiagramm dargestellt. Das stärkere pCREB-Signal bei Stimulation mit MCH im Vergleich zur MEM alpha-Kontrolle ist in der graphischen Darstellung deutlich zu erkennen. Die Ergebnisse implizieren eine Beteiligung von pCREB an der Induktion des CRE-Promotor-Konstrukts. Die Hemmung des pCREB-

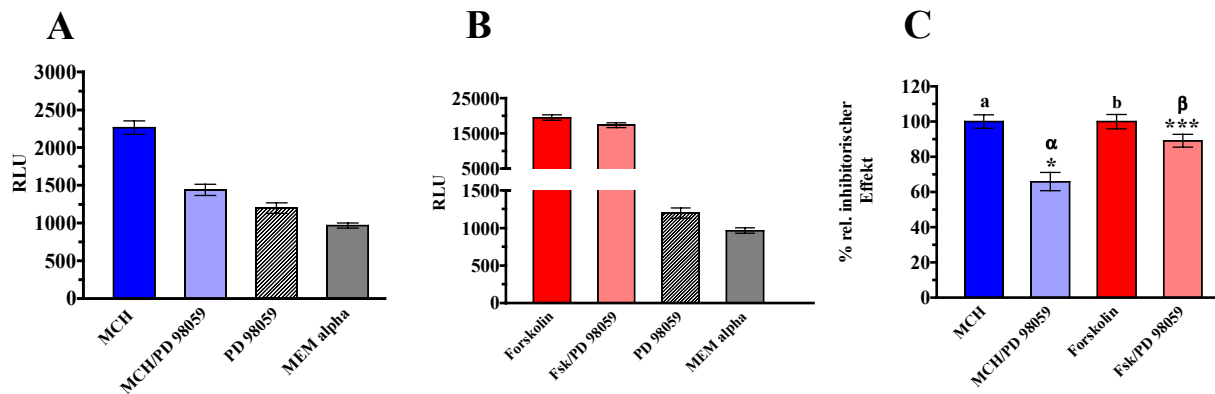
Signales bei MCH/Forskolin-Kostimulation im Vergleich zur Forskolin-Einzelstimulation bestätigte die Untersuchungen zur Inhibition der Forskolin-stimulierten cAMP-Produktion im Luciferase-Reporter-Test (Abb. 13).



**Abbildung 26:** Planimetrische Auswertung der pCREB-Signalstärke. Graphische Darstellung der pCREB-Signale aus Abbildung 25 berechnet mit der Software QuantiScan (2.1.8). Gezeigt sind die Einzelstimulationen von Forskolin (Fsk) [ $5 \times 10^{-7}$  M] und MCH [ $5 \times 10^{-7}$  M], beide Agentien kostimuliert (MCH + FSK) sowie die MEM alpha Medium-Kontrolle. Die Signifikanzen sind mit a bezogen auf die Kontrolle mit MEM alpha Medium und b bezogen auf die Stimulation mit Forskolin angegeben.

### 3.3.5.1. Beteiligung von MAPK an der Phosphorylierung von CREB

Die Aktivierung von CREB durch die Phosphorylierung am Serin-133 kann auch über die MAPK erfolgen (SHAYWITZ & GREENBERG, 1999). Untersucht man den inhibitorischen Effekt von PD 98059 im Luciferase-Reporter-Test, so liess sich feststellen, dass es zur Inhibition der MCH-vermittelten CRE-Promotor-Konstrukt-Induktion kam. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse dargestellt. CHO-CRE-SLC 1 Zellen wurden 30 min mit PD 98059 [ $10^{-5}$  M] inkubiert und danach MCH (Abb. 27A) bzw. Forskolin (Abb. 27B), in einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  M, zugegeben. Abbildung 27C zeigt den inhibitorischen Effekt von PD 98059 auf die MCH- bzw. Forskolin-Stimulation in Prozent. Die Einzelstimulationen von MCH und Forskolin wurden als 100 % definiert. Die Inkubation mit PD 98059 und anschliessende Stimulation mit MCH (Abb. 27C/α) führte zu einer 35 %igen Hemmung der MCH-induzierten Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts bezogen auf die Einzelstimulation mit MCH (Abb. 27C/a). Bei Forskolin kam es zu einer 10 %igen Inhibition des emittierten Lichts (Abb. 27C/β) bezogen auf die Einzelstimulation mit Forskolin (Abb. 27C/b). Möglicherweise ist die MEK1 auch bei der Signaltransduktion von Forskolin in den CHO-CRE-SLC 1 Zellen beteiligt. Die Verringerung der MCH-induzierten Aktivität des CRE-Promotor-Konstrukts durch die Inhibition der MEK1 mit PD 98059 deuten auf die Beteiligung der MAPK an der Phosphorylierung von CREB hin.



**Abbildung 27:** Inhibition der MEK durch PD 98059 im Luciferase-Reporter-Gen-Test. CHO-CRE-SLC 1 Zellen wurden mit PD 98059 [ $10^{-5}$  M] für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von MCH (A) bzw. Forskolin (B) in der Endkonzentration von jeweils  $10^{-6}$  M. C: Die Stimulationen von MCH (a) und Forskolin (b) sind als 100 % gesetzt. Die parallele Inkubation von MCH/PD 98059 bezieht sich auf die Einzelstimulation mit MCH, entsprechend bezieht sich Fsk/PD 98059 auf Forskolin. Die Signifikanzen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) sind jeweils bezogen auf die Einzelstimulationen (a, b). Fsk: Forskolin.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde die Phosphorylierung von CREB immunologisch untersucht. CHO-CRE-SLC 1 Zellen wurden vor der Stimulation mit MCH [ $3 \times 10^{-7}$  M] mit  $5 \times 10^{-5}$  M PD 98059 vorinkubiert. Dabei liess sich in der Immunoblot Analyse mit pCREB-Antikörpern eine Verringerung der pCREB-Signalstärke nicht detektieren (nicht gezeigt). Der direkte Nachweis der Beteiligung von MAPK an der Phosphorylierung von CREB war nicht möglich.

Es wurde daher im weiteren untersucht, ob andere Substrate oder Transkriptionsfaktoren an der Aktivierung von CREB bzw. der CRE-Elemente im Promotor des Luciferase-Reportergens beteiligt sind.

### 3.3.5.2. Involvierung $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Kinase an der Aktivierung von CREB

Die signalvermittelnde Funktion von  $Ca^{2+}$  wird in vielen Signalketten in Form des  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Komplexes ausgeübt, der an spezifische Effektorproteine bindet. Zu diesen gehören die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaM-K). Ein Substrat der CaM-Kinasen ist unter anderem auch CREB (BRAUN und SCHULMAN, 1995). Die Inhibition der CaM-KII durch den spezifischen Inhibitor KN-62 (2.3.4) führte im Luciferase-Reporter-Gen-Test zu keiner Verringerung der MCH-induzierten Reporter-Gen-Aktivität. Eine Beteiligung der CaM-KII an der Transkriptionskontrolle des CRE-Promotor-Konstrukts konnte also nicht nachgewiesen werden.

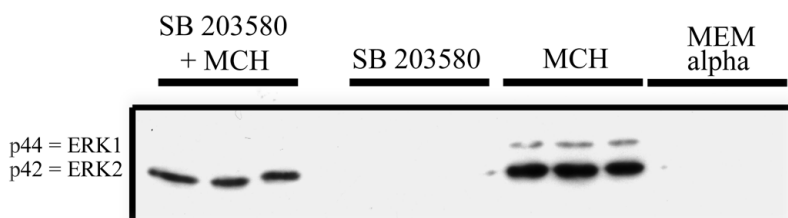


### 3.3.5.3. Beteiligung von C/EBP an der Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts

Die palindromische Konsensussequenz des Transkriptionselements CRE dient in Promotoren als typische Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor CREB. Darüberhinaus kann aber auch das „CCAAT-enhancer binding protein“ (C/EBP) an das CRE-Element binden (ROESLER, 2000). Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern für C/EBP  $\beta$  (2.7.3) führten in CHO-CRE-SCL 1 Zellen bei Stimulation mit MCH in steigenden Konzentrationen [ $3 \times 10^{-9}$  bis  $3 \times 10^{-7}$  M] zu keinen C/EBP-spezifischen Signalen (nicht gezeigt). C/EBP  $\beta$  konnte als Transkriptionsfaktor für das CRE-Promotor-Konstrukt nicht nachgewiesen werden.

### 3.3.6. Interaktion zwischen pMAPK und p38 Kaskaden

Zwischen den verschiedenen MAP Kinase-Signaltransduktionswegen MAPK, p38 sowie JNK bestehen zahlreiche Verbindungen, durch die gegenseitige positive oder negative Regulationen erfolgen (SINGH *et al.*, 1999). SB 203580 ist ein spezifischer Inhibitor der p38 (BÖRSCH-HAUBOLD *et al.*, 1998). Hemmt man die p38 mit SB 203580, so kam es nach Stimulation mit MCH zur Inhibition der Phosphorylierung von MAPK (Abb. 28). Dieser inhibitorische Effekt führte zu einer Verringerung des p42-Signals, während das p44-Signal gar nicht mehr detektierbar war.



**Abbildung 28:** Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern für Phospho-p42/44 MAP Kinase. CHO-CRE-SLC 1-Zellen wurden für 30 min mit  $10^{-6}$  M SB 203580 inkubiert und anschließend für weitere 60 min mit  $3 \times 10^{-7}$  M MCH stimuliert. SB 203580 ist ein spezifischer Inhibitor der p38. p44: p44 MAPK, p42: p42 MAPK, ERK: extrazellulär aktivierte Proteinkinase.

In CHO-CRE-SLC 1-Zellen scheint zwischen der Signaltransduktion der MAPK- und der p38-Kaskade eine Wechselbeziehung zu bestehen.

## 4. Diskussion

### 4.1. Spezifität des „Screening“-Systems

Mit der in dieser Arbeit verwendeten „Orphan Rezeptor Strategie“ zur Identifizierung von Liganden für G-Protein-gekoppelte Orphan Rezeptoren (oGPCR) (WILSON *et al.*, 1998; CIVELLI *et al.*, 2001) sollten spezifische endogene Liganden für die Orphan Rezeptoren GPR 7, GPR 8, PNR und p40 isoliert werden. Mit dieser Strategie konnten unbekannte Peptide wie beispielsweise Orphanin FQ (REINSCHIED *et al.*, 1995), Orexin (SAKURAI *et al.*, 1998) oder Ghrelin (KOJIMA *et al.*, 1999) aber auch bereits bekannte Peptide wie Melanin concentrating hormone (MCH) (BÄCHNER *et al.*, 1999; CHAMBERS *et al.*, 1999; SAITO *et al.*, 1999), Urotensin II (AMES *et al.*, 1999), Motilin (FEIGHNER *et al.*, 1999) oder Neuromedin U (SZEKERES *et al.*, 2000) den zugehörige oGPCR zugeordnet werden. Voraussetzungen für die Durchführung des Ansatzes sind ein stabiles Testsystem zur Detektion der Rezeptoraktivierung (WILSON *et al.*, 1998) sowie qualitativ hochwertige Gewebeextrakte oder Substanzbanken (HOWARD *et al.*, 2001). In dem Testsystem zur Identifizierung biologisch aktiver Substanzen wurden CHO-Zellen verwendet, die neben den transfizierten GPR 7-, GPR 8-, PNR- und p40-Rezeptoren zusätzlich ein Luciferase-Reportergen, mit vorgeschaltetem CRE-Promotor-Konstrukt, enthielten. Ziel dieses Tests war stimulatorisch wirkende Liganden luminometrisch zu detektieren. Die Bindung eines Liganden hat eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Folge, die über die PKA zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB führt. pCREB aktiviert durch Bindung an das CRE-Promotor-Konstrukt die Transkription des Luciferase-Reportergens. Aus der vermehrten Bildung des Enzyms Luciferase in den Zellen resultierte nach Gabe des Substrates Luciferin eine Erhöhung des emittierten Lichts (CHEN *et al.*, 1995; SILVERMAN *et al.*, 1998; HSU *et al.*, 2000). Die Applikation von Peptid/Substanzbankfraktionen, die potentieller Liganden enthalten, kann eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration induzieren, wodurch Liganden detektiert werden. Es wurde somit ein Lumineszenz-Test-System etabliert, welches die Möglichkeit bot auf direktem Wege G<sub>s</sub>-gekoppelte oGPCRs auf Rezeptor-Aktivierung zu untersuchen. Dies bot eine Alternative zu der Methode von OFFERMANN und SIMON (1995), die Signalleitung von G<sub>α<sub>s</sub></sub>-gekoppelten Rezeptoren über eine Kofunktion mit G<sub>α<sub>16</sub></sub> an die Phospholipase C zu leiten. Beispielsweise binden die GPCRs Dopamine D<sub>3</sub>, Angiotensin AT<sub>2</sub>, Somatostatin SST<sub>1</sub>, Melatonin MT<sub>1c</sub>, muskarinischer Acetylcholin M<sub>1</sub>- und Tachykinin NK<sub>2</sub>-Rezeptoren, α<sub>1A</sub>-, α<sub>1B</sub>- und α<sub>1C</sub>-Adrenorezeptoren sowie die Chemokin-Rezeptoren CCR1 und CCR2 mit ihren jeweiligen bekannten Liganden nicht oder nur sehr schwach an G<sub>α<sub>16</sub></sub> (MILLIGAN *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 1998; MARCHESE *et al.*, 1999; MODY *et al.*, 2000). Die Kopplung über G<sub>α<sub>16</sub></sub> führt nicht in jedem Fall zur Detektion von Liganden

für G<sub>s</sub>-gekoppelte Orphan Rezeptoren und ist daher keine universelle Methode für ein stimulatorisches Liganden-Screening (KOSTENIS, 2001).

Durch Northern Blot-Analysen zur Überprüfung der Expression der Rezeptor-Gene der selektierten CHO-CRE-Zellen zeigte sich, dass nicht alle Einzelklone die entsprechenden Gene transkribierten. In diesen Einzelklonen wurde das resistenzvermittelnde Gen korrekt inseriert und transkribiert, da eine Selektion und Isolierung dieser Einzelklone sonst nicht möglich gewesen wäre. Es ist jedoch möglich, dass durch Rekombinationsereignisse die Rezeptor-Gene unvollständig oder in heterochromatischen Regionen des Genoms inseriert worden sind und nicht, oder nur unvollständig, abgelesen wurden. Bei stabilen Transfektionen kann Fremd-DNA theoretisch beliebig oft und an jedem Ort des Genoms inseriert werden, was zu unterschiedlich starker Expression führen kann. Die Einbringung Orphan Rezeptor tragender Plasmide in die CHO-CRE-Zellen kann daher auch das bereits im Genom inserierte Luciferase-Reporter-gen-Konstrukt beeinflussen. Dies erklärt möglicherweise die unterschiedliche Responsivität der CHO-CRE-Orphan Rezeptor-Einzelklone im Luciferase-Reporter-gen-Test auf die Stimulation mit Forskolin.

Die Untersuchung der generierten Einzelklone mittels Northern Blot gibt lediglich Auskunft über das Vorkommen von mRNA-Transkripten der eingebrachten Fremd-DNA in den Zellen. Eine Untersuchung auf Proteinebene sowie eine für die Funktionalität notwendige plasmamembranständige Anordnung der Rezeptoren hätte proteinchemische Untersuchungen mit entsprechenden Antikörpern oder markierte Liganden erfordert.

Erschwert wird die Suche nach Liganden für oGPCRs durch die Expression endogener Rezeptoren in den CHO-CRE-Zellen. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu falsch positiven Ergebnissen, die durch den Vergleich zwischen verschiedenen Orphan Rezeptor-tragenden CHO-CRE-Zellen validiert werden konnten. Es wurden immer verschiedene Orphan Rezeptor tragende Zelllinien parallel auf CRE-Promotor-Konstrukt-Induktion in den verwendeten Peptidbanken untersucht. Kam es dabei zu einer Erhöhung der emittierten Lichtmenge in mehr als einer Zelllinie, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um ein Signal handelte, welches durch einen endogen exprimierten Rezeptor ausgelöst wurde. Eine weitere Schwierigkeit in der Suchen nach Liganden besteht in der Detektion von spezifischen biologisch aktiven Substanzen, die nur in geringen Konzentrationen in der zu untersuchenden Peptidbank vorliegen und deren Signale von unspezifischen Signalen überdeckt werden. In solch einem Fall kann versucht werden, die spezifischen aktivierenden Substanzen chromatographisch von den unspezifischen zu trennen.

Um für die Suche nach Orphan Rezeptor aktivierenden Liganden möglichst optimale Voraussetzungen zu gewährleisten, ist die Auswahl der zu untersuchenden Peptidbanken ein wichtiges Kriterium. Durch die Kenntnis der gewebespezifischen Expression der zu

untersuchenden Orphan Rezeptoren kann eine entsprechende Peptidbank ausgewählt werden. PNR zeigt eine spezifische mRNA-Expression in verschiedenen Regionen des Gehirns und im Skelettmuskel (Zeng *et al.*, 1998), während p40 vor allem im Gehirn, aber auch im Rückenmark, Testis, Epithelzellen, Thymocyten, Megakaryozyten und Makrophagen exprimiert wird (Mayer *et al.*, 1998; BAUER *et al.*, 2000). Analysen von GPR 7 und GPR 8 dokumentieren eine Expression in verschiedenen Regionen des Gehirns sowie in einzelnen Organen des urogenital, respiratorischen, gastrointestinal Systems (O'DOWD *et al.*, 1995; BREZILLON *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Expressionsmuster lag es nahe, aus Gehirngewebe etablierte Peptidbanken zu verwenden. Um die Möglichkeit der Aktivierung der Rezeptoren über endokrine Mechanismen zu berücksichtigen, wurde eine Hämofiltrat-Peptidbank im Screening eingesetzt, in der Peptidhormone in ähnlichen Konzentrationen wie im Blutplasma enthalten sind (SCHEPKY *et al.*, 1994).

#### **4.2. Reinigung CRE-Promotor-Konstrukt induzierender Substanzen für GPR 8**

Das Screening von Peptidbanken, synthetischen Banken oder „phage libraries“ ist eine Methode Rezeptorliganden zu identifizieren. Einige Publikationen legen nahe, dass die Isolierung von Liganden aus Gewebehomogenaten möglich ist (REINSCHEID *et al.*, 1995; CHAMBERS *et al.*, 1999; XU *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für GPR 8 in der Stammhirn-Peptidbank vom Schwein CRE-Promotor-Konstrukt-induzierende Substanzen in den pH-Pools 1, 2 und 3 detektiert werden. Es wurde mit einer fünf Chromatographieschritte umfassenden Reinigungsstrategie versucht, aus 29 kg Stammhirn vom Schwein die biologisch aktiven Substanzen soweit von inaktiven zu trennen, um eine Reindarstellung und nachfolgende Identifizierung zu ermöglichen. Nach der fünften Reinigungsstufe konnten keine CRE-Promotor-Konstrukt-induzierenden Substanzen mehr detektiert werden, so dass eine Identifizierung der stimulatorisch wirkenden Substanzen für GPR 8 nicht möglich war. Es ist nicht auszuschließen, dass die Menge des eingesetzten Stammhirnmaterials zu gering war und dadurch die Konzentration der stimulatorisch wirkenden Substanzen in der Peptidbank für eine Reindarstellung nicht ausgereicht hat. Das daraufhin durchgeführte primäre Screening der Peptidbanken aus Gesamthirn vom Schwein und Hämofiltrat führte nicht zur Detektion CRE-Promotor-Konstrukt-induzierender Substanzen. In der Präparation der Gehirne vom Schwein für die Stammhirn-Peptidbank wurde das Diencephalon, die Medulla oblongata und der Hypothalamus, der Hauptexpressionsort von GPR 7 und 8, als Ausgangsmaterial verwendet (mündl. Mitteilung PD Dr. E. Maronde). Möglicherweise sind aufgrund des Verdünnungseffektes des Gesamthirngewebes die CRE-Promotor-Konstrukt aktivierenden

Substanzen in der Gesamthirn-Peptidbank zu gering konzentriert und konnten daher nicht mehr detektiert werden.

#### 4.2.1. Identifizierung von NPW als Ligand für GPR 7 und GPR 8

In den Publikationen von FUJII *et al.* (2002), SHIMOMURA *et al.* (2002), und BREZILLON *et al.* (2002), die im Verlauf dieser Arbeit veröffentlicht wurden, ist ein natürlicher Ligand für GPR 7 und GPR 8 identifiziert worden. Die als Neuropeptid B23 (NPB23) (FUJII *et al.*, 2002), hL7, hL7C, hL8 und hL8C (BREZILLON *et al.*, 2002), Neuropeptid W23 (NPW23) sowie Neuropeptid W30 (NPW30) (SHIMOMURA *et al.*, 2002) publizierten Sequenzen besitzen untereinander grosse Homologien. hL8 und NPW23, hL8C und NPW30 sind zu 100 % identisch, während das hL7 und hL7C mit NPB23 übereinstimmen. In Tabelle 18 sind die Aminosäuresequenzen der isolierten Liganden dargestellt.

**Tabelle 18:** Sequenzvergleich der publizierten Liganden für GPR 7 und GPR 8

NPB23	WYKPAAGHSSYSVGRAAGLLSGL	FUJII <i>et al.</i> (2002)
hL7	WYKPAAGHSSYSVGRAAGLLSGL	BREZILLON <i>et al.</i> (2002)
hL7C	WYKPAAGHSSYSVGRAAGLLSGLRRSPYA	
hL8	WYLVASPRYHTVGRAAGLLMGL	
hL8C	WYKLVASPRYHTVGRAAGLLMGLRRSPYLW	
NPW23	WYKLVASPRYHTVGRAAGLLMGL	SHIMOMURA <i>et al.</i> (2002)
NPW30	WYKLVASPRYHTVGRAAGLLMGLRRSPYLW	

BREZILLON *et al.* (2002) identifizierten durch Sequenzvergleich des L8-Peptides in humanen Genom- und EST-Datenbanken ein humanes, für die Liganden kodierendes Gen und dessen Homolog in der Maus. Die vier biologisch aktiven Peptide gehen möglicherweise durch unterschiedliche Prozessierung aus dem 125 Aminosäuren grossen humanen Vorläuferpeptid hervor. Sie zeigen alle einen inhibitorischen Effekt auf die Forskolin-stimulierte Produktion von cAMP, was auf eine Signalweiterleitung nach Ligandenkopplung über ein inhibitorisches G<sub>i</sub>-Protein hinweist (FUJII *et al.*, 2002; SHIMOMURA *et al.*, 2002; BREZILLON *et al.*, 2002). In der Publikation SHIMOMURA *et al.* (2002) wurde eine Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Produktion durch NPW23 (= hL8) in GPR 7-exprimierenden CHO-Zellen mit einer EC<sub>50</sub> von 0,178 ± 0,007 nM nachgewiesen, während Brezillon *et al.* (2002) für hL8 einen höheren EC<sub>50</sub>-Wert von 0,42 ± 0,09 nM publiziert. Nach SHIMOMURA *et al.* (2002) aktivieren NPW23 und NPW30 die Rezeptoren GPR 7 und GPR 8 in ähnlichen Konzentrationen.

Dagegen hat BREZILLON *et al.* (2002) für die Bindung und Aktivierung von GPR 7 und 8 mit hL7, hL7C, hL8 und hL8C grössere Unterschiede in den jeweiligen Konzentrationen feststellen können. Eine i.c.V. Applikation von NPW23 in Ratten führte zu erhöhter Nahrungsaufnahme und stimulierte die Ausschüttung von Prolactin (SHIMOMURA *et al.*, 2002).

Da in der vorliegenden Arbeit ein stimulatorischer Biotest für das Screening von Peptidbanken durchgeführt wurde, war eine Identifizierung des natürlichen Liganden mit dem verwendeten Testansatz nicht möglich. Eine Vorhersage, welcher der möglichen Signaltransduktionswege letztendlich nach Rezeptoraktivierung aktiviert wird, ist oftmals nicht möglich. Die Struktur der Rezeptoren lässt nicht immer Voraussagen zu, welches G-Protein und welcher Signaltransduktionsweg durch den Rezeptor aktiviert wird (FITZGERALD *et al.*, 1999). Mit dem exprimierenden Einzelklon 3-1 von GPR 7 wurde nach Vorstimulation mit Forskolin die inhibitorische Wirkung von synthetisch hergestelltem NPW23 (SHIMOMURA *et al.*, 2002) (= hL8; BREZILLON *et al.*, 2002) untersucht. NPW23 zeigte einen signifikanten inhibitorischen Effekt in CHO-CRE-GPR 7 EK 3-1-Zellen auf die Forskolin-stimulierte Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts im Luciferase-Reporter-Gen-Test ( $EC_{50\text{ NPW23}} = 229\text{ nM}$ ) (Abb. 10). Diese Untersuchungen zeigen, dass NPW23 als natürlicher Ligand für GPR 7 mit dem Luciferase-Reporter-Gen-Test hätte detektiert werden können, vorausgesetzt es wäre ein inhibitorisches Screening durchgeführt worden. Dies hätte eine Vorstimulation des CRE-Promotor-Konstrukts mit Forskolin vor der Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen erfordert. Um den von SHIMOMURA *et al.* (2002) und BREZILLON *et al.* (2002) publizierten inhibitorischen Effekt von NPW23/hL8 auf die Forskolin-induzierte Produktion von cAMP im nanomolaren Bereich nachweisen zu können, wäre eine Optimierung des inhibitorischen Screeningsystems mit dem Luciferase-Reporter-Gen-Test notwendig gewesen. Die inhibitorische Wirkung von NPW23 konnte mit unserem System erst im mikromolaren Bereich gezeigt werden (Abb. 10).

#### **4.2.2. Klassifizierung von p40 und PNR in nicht GPCR Membranprotein-Familien**

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Zugehörigkeit von p40 und PNR zu anderen Membranprotein-Familien publiziert (BAUER *et al.*, 2000; BOROWSKY *et al.*, 2001). Strukturelle Untersuchungen zeigten, dass p40 sieben hydrophobe Domänen mit  $\alpha$ -helicalen Transmembranstrukturen besitzt, die aber keine signifikanten Ähnlichkeiten mit oGPCRs aufweisen (Bauer *et al.*, 2000). p40 wurde als ein peripheres Membranprotein klassifiziert, dessen sieben hydrophobe Domänen grosse Homologie zu den prokaryotischen peptid-modifizierenden Enzymen LanC (Lantibiotic Synthetase Component C-Proteinen) und LanM (Bauer *et al.*, 2000) besitzen. Die Ähnlichkeit mit der LanC-Familie lässt vermuten, dass p40

möglicherweise ein Rolle bei der Modifikation von humanen Peptiden spielt (Bauer *et al.*, 2000). Die Zuordnung von p40 in eine nicht GPCR Membranproteinfamilie wäre ein Erklärung, warum in den initialen Screenings der Peptidbanken keine p40-spezifischen CRE-Promotor-Konstrukt-aktivierenden Substanzen detektiert werden konnten.

In der Publikation von BOROWSKY *et al.* (2001) wurde PNR zu der Familie der Trace Amin-Rezeptoren (Spuren-Amin-Rezeptoren), wie beispielsweise rTAR1 (rat trace amin receptor 1; BUNZOW *et al.*, 2001), zugeordnet. Trace Amine fungieren in Wirbellosen als Neurotransmitter. In den Geweben von Säugetieren sind sie nur in geringen Konzentrationen (<100 ng/g Gewebe) vorhanden. Sie entstehen wahrscheinlich als Nebenprodukte bei der Synthese aminer Neurotransmitter, wie Katecholaminen oder Serotonin, mit denen sie strukturell verwandt sind (NGUYEN & JUORIO, 1998). Zusätzlich zu der geringen Konzentration im Gewebe besitzen die Trace Amine als Liganden der TA-Rezeptoren eine sehr geringe Halbwertszeit (NGUYEN & JUORIO, 1998). Die Identifizierung eines Liganden für PNR aus Peptidbanken erscheint nach dem Stand der Literatur schwierig, da im Gesamtgewebeextrakt die Konzentration des Liganden sehr niedrig bzw. zum Zeitpunkt der Gewebepreparation nicht mehr vollständig vorhanden und somit schwer detektierbar ist.

### **4.3. Charakterisierung der Signaltransduktionswege des MCH-Rezeptors**

Untersuchungen von HAWES *et al.* (2000) beschreiben die Signaltransduktion des „melanin-concentrating hormone“ (MCH) Rezeptors über eine Kopplung an verschiedene G-Proteine. Die Autoren stellten *in vitro* einen Anstieg des Phosphoinositol-Metabolismus sowie einen Anstieg des freien intracellularen  $Ca^{2+}$ -Spiegels durch die Stimulation von CHO-Zellen, die den SLC 1-Rezeptor exprimierten, mit MCH fest. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse zum Teil bestätigt. Darüberhinaus konnte erstmalig eine Beteiligung des „CRE binding protein“ (CREB) an der Signalweiterleitung des SLC 1-Rezeptors nach MCH-Bindung nachgewiesen werden.

#### **4.3.1. Involvierung stimulatorischer und inhibitorischer G-Proteine an der Signalweiterleitung des SLC 1-Rezeptors**

Die enzymatische Aktivität der Adenylat-Cyclase (AC) wird durch die GTP-gebundene Form der  $\alpha$ -Untereinheit stimulatorischer G-Proteine ( $G_s$ ) aktiviert. Darüber hinaus kann sie durch das Diterpen Forskolin stimuliert werden (DE SOUZA *et al.*, 1983). Aus der Aktivierung der AC resultiert eine erhöhte cAMP-Produktion. Die ausgehend von dem „second messenger“ cAMP eingeleiteten biologischen Prozesse werden von der PKA über Phosphorylierung von CREB an das „cAMP-response element“ (CRE) weitergeleitet (TAYLOR *et al.*, 1990). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass sowohl MCH als auch Forskolin zu

einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Luciferase-Reportergen-Aktivität durch Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts führen (Abb. 11). Mit dem pharmakologischen PKA-Inhibitor Rp-8-CPT-cAMPS (Abb. 12) konnte bei Stimulation mit Forskolin die Induktion des CRE-Promotor-Konstrukts zu 41 % inhibiert werden. Weiterhin zeigte sich, dass Rp-8-CPT-cAMPS auch die MCH-vermittelte Induktion um 27 % reduzierte. Rp-8-CPT-cAMPS zeigte in MEM alpha Medium eine Verringerung der basalen CRE-Promotor-Konstrukt-Aktivität (Abb. 12A/B), die durch eine Hemmung der PKA-Grundaktivität in den Zellen durch das Rp-8-cAMPS-Isomer verursacht wird (GJERTSEN *et al.*, 1995). Diese Befunde implizieren entgegen der bereits von CHAMBERS *et al.* (1999), SAITO *et al.* (1999) und HAWES *et al.* (2000) publizierten Ergebnissen, dass in der Signalweiterleitung in CHO-CRE-SLC 1-Zellen nach Rezeptoraktivierung durch MCH auch G<sub>s</sub>-Proteine involviert sind.

CHAMBERS *et al.* (1999), SAITO *et al.* (1999) und HAWES *et al.* (2000) beschreiben eine Inhibition der Forskolin-stimulierten cAMP-Produktion durch MCH, verursacht durch die Kopplung des SLC 1-Rezeptors an Pertussistoxin sensitive G<sub>i</sub>/G<sub>0</sub>-Proteine. Dieser inhibitorische Effekt von MCH liess sich mit dem Luciferase-Reportergen-Test bestätigen (Abb. 13A). Allerdings war es dazu erforderlich, die Inkubationszeit von MCH und Forskolin im Luciferase-Reportergen-Tests zu verkürzen. Inkubationszeiten von 4 h führten, aufgrund der dauerhaften Stimulation von Forskolin, zu einer Überlagerung des inhibitorischen Effekts von MCH (Abb. 11A). Dieser inhibitorische Effekt wurde auch immunologisch mit pCREB-Antikörpern nachgewiesen. Bei Kostimulation von MCH/Forskolin kommt es im Vergleich zur Forskolin-Einzelstimulation (Abb. 25 und 26) zu einer signifikanten Hemmung (Abb. 26, b) des pCREB-Signals. Dies zeigt, dass auch auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren die inhibierende Wirkung von MCH auf die Forskolin-stimulierte cAMP-Produktion, und die damit einhergehende verringerte CREB-Phosphorylierung, detektierbar war. Es kann vermutet werden, dass es zu einer simultanen Kopplung an zwei G-Proteine (G<sub>s</sub> und G<sub>i</sub>) mit gegensätzlichen Effekten kommt. Diese Vermutung wurde durch die Blockierung der G<sub>i</sub>/G<sub>0</sub>-Signalleitung mit Pertussistoxin bestätigt. Dabei lassen die deutlich höheren emittierten Lichtmengen (Abb. 14) darauf schliessen, dass es durch den Ausfall der G<sub>i</sub>/G<sub>0</sub>-gekoppelten Signalleitung zu einer verstärkten Signaltransduktion des MCH-Rezeptors über G<sub>s</sub>-Proteine kam (vgl. COMMUNI *et al.*, 2001).

Es ist anzunehmen, dass es auch bei der durch Forskolin-Stimulation bedingten Aktivierung des AC/PKA-Signaltransduktionsweges zu einem desensitivierend wirkenden Rückkopplungsmechanismus kommt. Dieser könnte dann zu einer Deaktivierung der G<sub>s</sub>-Proteine führen. Bei Kostimulation von MCH und Forskolin ständen die G<sub>s</sub>-Proteine nicht zur Verfügung und würde die G<sub>i</sub>-Protein-Kopplungs-bedingte Hemmung der Forskolin-induzierten CRE-Promotor-Konstrukt Aktivität erklären.



### 4.3.2. Phosphoinositol/tid-Metabolismus-unabhängige Signaltransduktion des MCH-Rezeptors in CHO-CRE-SLC 1-Zellen

Ausgehend von der MCH-induzierten Aktivierung des SLC 1-Rezeptors kann die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  (Abb. 15) sowie die Phosphorylierung von MAPK (Abb. 18) über verschiedene Signalwege erfolgen. Bei einer Kopplung an  $G_q$ - und  $G_i$ -Proteine mit nachfolgender Aktivierung der jeweiligen Phospholipase C (PLC)  $\beta$  bzw.  $\gamma$  wird  $\text{IP}_3$  und DAG aus Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) freigesetzt.  $\text{IP}_3$  kann durch die Bindung an zugeordnete Rezeptoren die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  induzieren, während DAG die PKC stimuliert und damit die MAPK-Kaskade Ras-unabhängig aktiviert (HAWES *et al.*, 1996). Desweiteren kann über  $G\alpha_0$  eine PKC-abhängige MAPK-Aktivierung erfolgen (VAN BIESEN *et al.*, 1995B).

In den Untersuchungen zur Signaltransduktion des MCH-Rezeptors SLC 1 konnte  $\text{Ca}^{2+}$  als signalvermittelnder „second messenger“ verifiziert werden (Abb. 15; CHAMBERS *et al.*, 1999; SAITO *et al.*, 1999; HAWES *et al.*, 2000). Die niedrigste Konzentration, bei der im FLIPR bei Stimulation des SLC 1-Rezeptors mit MCH ein signifikantes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal detektiert werden konnte, lag bei  $3 \times 10^{-8}$  M. Im Luciferase-Reporter-Test lag die Konzentration, bei der eine signifikante Erhöhung der Luciferase-Aktivität gemessen wurde, bei  $10^{-8}$  M. Der Luciferase-Reporter-Test ist demnach um den Faktor drei empfindlicher als der FLIPR. Somit scheint in diesem Zellsystem der Luciferase-Reporter-Test gegenüber dem FLIPR das geeignetere Testsystem für ein oGPCR-Ligandenscreening darzustellen (vgl. KOSTENIS, 2001). Die signifikante Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signales im FLIPR durch Pertussistoxin (Abb. 16) bestätigte die bereits festgestellte Involvement der  $G_i/G_0$ -Proteine an der MCH-induzierten Signalweiterleitung. Eine Verringerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals durch Inhibition der PLC mit U 73122 konnte in CHO-CRE-SLC 1 Zellen nicht gezeigt werden (Abb. 17A). Eine Beteiligung von  $G_q$ - und  $G\beta\gamma_i$ -Proteinen über PLC $\beta$  bzw.  $\gamma$  und  $\text{IP}_3$  an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung war ebenfalls nicht festzustellen. Möglicherweise erfolgt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch MCH-Stimulation über eine  $G_0$ -Protein Kopplung deren Mechanismen bisher nicht geklärt sind (vgl. HAWES *et al.*, 2000).

Die Aktivierung der MAPK-Kaskade durch Stimulation des SLC 1-Rezeptors mit MCH (HAWES *et al.*, 2000) konnte bestätigt werden (Abb. 18). Die Involvement der MEK1 an der MAPK-Kaskade wurde mit dem MEK1-Inhibitor PD 98059 nachgewiesen (Abb. 19). Eine Beteiligung der PLC an der Signalübertragung zur MAPK-Kaskade konnte dagegen nicht eindeutig belegt werden. Eine Aktivierung des MAPK-Weges über Stimulation der PKC mit PMA führte zu einem p42 (ERK 2)-Signal (Abb. 20) (vgl. HAWES *et al.*, 2000). Bei Kostimulation von PMA und MCH war keine wesentliche Verstärkung des MAPK-Signals erkennbar (Abb. 20). Mit den PKC-Inhibitoren Chelerythrin und Bisindolylmaleimide I

(Abb. 21) kam es zu geringfügiger Hemmung der PKC und damit des pMAPK-Signals. Die von HAWES *et al.* (2000) publizierte Involvierung von  $G_q$ -Proteinen, welche die Signale des aktivierten SLC 1-Rezeptors an die MAPK-Kaskade leiten, konnte in der vorliegenden Arbeit mit den verwendeten CHO-CRE-SLC 1-Zellen nicht nachgewiesen werden.

Die fast vollständige Inhibition des pMAPK-Signals durch Pertussistoxin (Abb. 22) belegte die Vermittlung der Signalleitung des MCH-Rezeptors zur MAPK-Kaskade über  $G_i/G_o$ -Protein-Kopplung. Eine mögliche Beteiligung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) an der Regulation der  $G\beta\gamma_i$ -Protein-vermittelten MAPK-Aktivierung (RODRIGUEZ-VICINIA *et al.* 1994; HAWES *et al.* 1996; TANG & DOWNES, 1997) konnte nicht festgestellt werden. Mit LY 294002 und Wortmannin als spezifische Inhibitoren der PI3-K konnte keine Inhibition der MAPK-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Da nach den vorliegenden Ergebnissen von einer Beteiligung der PLC sowie PI3-Kinase nicht ausgegangen werden kann, verläuft die Signalweiterleitung des MCH-Rezeptors in CHO-CRE-SLC 1-Zellen wahrscheinlich einerseits direkt von der  $G\beta\gamma_i$ -Untereinheit über das Ras-Protein sowie andererseits von der  $G\alpha_o$ -Untereinheit über PKC zur Raf-Kinase und MAPK (Abb. 29) (CRESPO *et al.*, 1990; HAWES *et al.*, 1995; LUTRELL *et al.*, 1996; HAWES *et al.*, 2000).

#### 4.3.3. Forskolin aktiviert die MAP Kinase 42/44-Kaskade

G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktivieren die MAPK-Kaskade nicht nur über  $G\beta\gamma_i$ -, Ras-abhängige bzw.  $G_q$ -medierte, PKC-abhängige Signalweiterleitung, sondern können auch durch den cAMP/Proteinkinase A Signalweg vermittelt sein. Eine  $G_s$ -Rezeptor-gekoppelte Regulation kann zellspezifisch aktivierend oder inaktivierend auf die MAPK-Kaskade wirken (WEISSINGER *et al.*, 1997). In CHO-CRE-SLC 1-Zellen kommt es bei Kostimulation von MCH und Forskolin zu einer erhöhten Phosphorylierung der MAPK, die sich in einem verstärkten pMAPK-Signal widerspiegelt (Abb. 23 und 24). Die PKA kann die MAPK-Kaskade über zwei verschiedene Mechanismen aktivieren. In Untersuchungen mit dem „ $\beta_2$ -Adrenergic Receptor“ ( $\beta_2$ -AR) führte eine  $G_s$ -vermittelte Aktivierung der PKA zur Phosphorylierung des  $\beta_2$ -AR, wodurch der Rezeptor von  $G_s$ -Protein-Kopplung auf eine Pertussistoxin-sensitive  $G_i$ -Protein-Kopplung wechselt und über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit die Ras/MAPK aktiviert (DAAKA *et al.*, 1997; MAUDSLEY *et al.*, 2000). In Zellen, die eine zelltypspezifische Isoform von Raf, das sogenannte B-Raf, exprimieren, führte die Stimulation von  $\beta_2$ -AR zu einer Aktivierung von MAPK die den Pertussistoxin-insensitiven Signalweg über  $G_s$ , PKA und Rap-1 beinhaltet (SCHMITT & STORK, 2000; STORK & SCHMITT, 2002). In CHO-CRE-SLC 1-Zellen konnte durch die Gabe von Pertussistoxin die MCH-induzierte MAPK-Phosphorylierung nicht vollständig gehemmt werden (Abb. 22). Da in der Kontrolle mit MEM alpha Medium keine pMAPK-Signale detektierbar waren, ist es

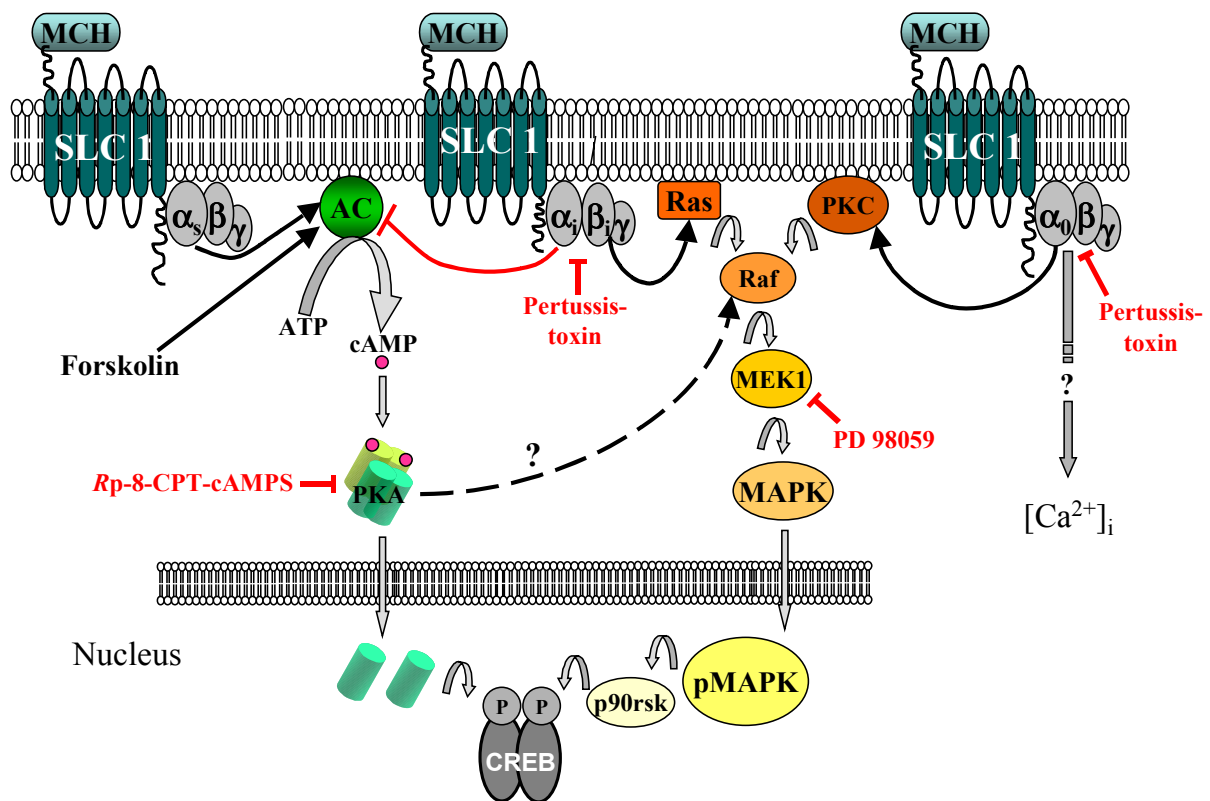
möglich, dass das verbleibende pMAPK-Signal durch den Pertussistoxin-insensitiven cAMP/PKA-Signalweg mediiert wurde.

#### 4.3.4. Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts durch CREB

Sowohl PKA als auch MAPK vermittelte Signaltransduktion kann zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB führen. Das „CRE binding protein“ (CREB) ist ein Transkriptionsfaktor, der spezifisch an CRE-Elemente bindet. Die Aktivierung von CREB erfolgt durch die Phosphorylierung von Serin-133 durch die katalytische Untereinheit der PKA. Serin-133 stellt aber auch ein Ziel für die Proteinkinase p90<sup>rsk</sup> dar, welches als Substrat der ERK fungiert (SATO *et al.*, 1997; SHAYWITZ & GREENBERG, 1999; HOUSLAY & KOLCH, 2000). Das in der Kontrolle mit MEM alpha Medium detektierte pCREB-Signal (Abb. 25) kann auf die in Zellen vorhandene Basalaktivität der PKA zurückgeführt werden (DØSKELAND *et al.*, 1993; MOTZKUS *et al.*, 2000). Bei Stimulation mit Forskolin liess sich ein signifikantes pCREB-Signal (Abb. 26, a), bezogen auf die Kontrolle mit MEM alpha Medium, detektieren. Das durch Stimulation mit MCH detektierbare pCREB-Signal (Abb. 25 und 26) war beim Vergleich mit MEM alpha Medium nicht signifikant. Eine Beteiligung der pMAPK an der Phosphorylierung von CREB konnte durch die signifikante Verringerung der MCH-induzierten CRE-Promotor-Konstrukt-Aktivität durch den MEK1-Inhibitor PD 98059 (Abb. 27C,  $\alpha$ ) nachgewiesen werden (vgl. GREWAL *et al.*, 2000). Der Effekt der Verringerung der CRE-Promotor-Konstrukt-Induktion durch die Hemmung der MEK1 mit PD 98059 konnte immunologisch mit pCREB-Antikörpern nicht bestätigt werden. Eine beschriebene signalvermittelnde Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaM-K) (BRAUN und SCHULMAN, 1995) und „CCAAT-enhancer binding protein“-beta (C/EBP $\beta$ ) (ROESLER, W.J., 2000) an der Transkriptionskontrolle des CRE-Promotor-Konstrukts wurde ebenfalls nicht nachgewiesen. Tendenziell kann aber von einer Beteiligung von pCREB (oder anderen Transkriptionsfaktoren) an der Induktion des CRE-Promotor-Konstrukts ausgegangen werden. Die detektierbare Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts durch MCH wird möglicherweise noch durch andere, mit CRE-Elementen interagierenden, Faktoren verstärkt. Zu der CREB-Familie zählen die zwei Transkriptionsfaktoren CREM und ATF-1. Beide besitzen eine einzelne Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase A. Andere Arbeiten zeigen, dass auch diese Varianten für die Aktivierung der Transkription durch pCREB verantwortlich sein können (BENBROCK & JONES, 1994; SHAYWITZ & GREENBERG, 1999). Weitere immunologische Untersuchungen wären notwendig um zu zeigen inwieweit diese, oder andere Transkriptionsfaktoren für die CRE-Promotor-Konstrukt-Aktivierung und damit die detektierbare Luciferase-Aktivität, relevant sind.

#### 4.3.5. Vernetzung zwischen p42/44 MAP Kinase- und p38 MAP Kinase-Kaskade

Neben der mitogenen Kinasekaskade (MAPK 42/44) bestehen zwei weitere MAPK-Signaleinheiten (JNK, p38) die durch Faktoren, wie z.B. Hitzestress oder UV-Strahlung, aktiviert werden (SHI & GAESTEL, 2002). Bekanntermassen bestehen zwischen den verschiedenen Signaltransduktionswegen zahlreiche Vernetzungen, die auf allen Ebenen erfolgen können (SINGH *et al.*, 1999). Zwischen der durch MCH aktivierbaren MAPK-Kaskade und dem p38-Signaltransduktionsweg besteht in CHO-CRE-SLC 1-Zellen offensichtlich eine Verbindung. Die Phosphorylierung der MAPK kann durch spezifische Inhibition der p38 mit SB 203580 gehemmt werden (Abb. 28). Es scheint eine regulierende Wirkung der p38 zu bestehen. Um die Vernetzung der beiden Signaltransduktionskaskaden aufzuklären, müssten genauere Untersuchungen zeigen inwieweit eine gegenseitige Regulierung besteht und auf welchen Ebenen diese erfolgt.



**Abbildung 29:** Darstellung der Signaltransduktion nach Ligandenbindung am SLC 1-Rezeptor. Abkürzungen: SLC 1: Somatostatin-like receptor 1 (MCHR1); MCH: melanin concentrating hormone; PKA : Proteinkinase A;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ : Untereinheiten der G-Proteine, s: stimulatorisch, i: inhibitorisch; AC: Adenylat Cyclase; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; pMAPK: phosphorylierte MAP Kinase; MEK1: MAP/ERK-Kinase; Ras: rat sarcoma-protein (= p21<sup>ras</sup>); p90rsk: 90-kDa ribosomal protein S6 kinase; CREB: CRE-Bindeprotein; Rp-8-CPT-cAMPS: Rp-8-(4-Chlorophenylthio)-Adenosin-3',5'-cyclic Monophosphorothionat (Inhibitor der PKA); PD 98059: [2'-Amino-3'-methoxyflavone] (Inhibitor der MEK1).

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war die Isolierung funktionell aktiver Liganden für die Orphan Rezeptoren GPR 7, GPR 8, PNR und p40 sowie die Charakterisierung der Signaltransduktionsmechanismen. Mit Hilfe des SLC 1-Rezeptors und seinem Liganden MCH wurde in einer CHO-Zelllinie, die ein CRE-Element-reguliertes Luciferase-Reportergen trägt (CHO-CRE), ein Luciferase-Reportergen-Test etabliert. Mit diesem Testsystem wurde ein „Screening“ mit einer Stammhirn- und Gesamthirn-Peptidbank vom Schwein sowie einer humanen Hämofiltratbank durchgeführt. Dabei wurden für den Orphan Rezeptor GPR 8 in der Stammhirn-Peptidbank CRE-Promotor-Konstrukt aktivierende Substanzen detektiert. Ein Grossteil der inaktiven Substanzen konnte über fünf aufeinanderfolgende Chromatographieschritte von den Aktiven abgetrennt werden. Die Menge des eingesetzten Stammhirnmaterials war möglicherweise zu gering, so dass die Konzentration der stimulatorisch wirkenden Substanzen in der Peptidbank letztendlich für dessen Identifizierung nicht ausgereicht hat.

Darüber hinaus wurden Untersuchungen zu den MCH-medierten Signaltransduktionsmechanismen des SLC 1-Rezeptors durchgeführt. In MCH-Stimulationsexperimenten wurde mit einer Reihe von Methoden unter Verwendung pharmakologischer Inhibitoren die Aktivierung verschiedener „second messengers“ und Proteinkinase-Kaskaden untersucht, um die an der Signalweiterleitung beteiligten G-Proteine identifizieren zu können. Für die detektierte Kalzium-Freisetzung war eine Beteiligung von  $G_q$ - bzw.  $G\beta\gamma$ -Proteinen über PLC und  $IP_3$  nicht festzustellen. Die Kalzium-Freisetzung sowie eine festgestellte PKC-induzierte Phosphorylierung der p42/44 MAPK verlaufen möglicherweise über eine Aktivierung  $G_0$ -Proteinen, deren Mechanismen und Funktion in diesem Zusammenhang bisher ungeklärt sind. Eine  $G_s$ -vermittelte Signalweiterleitung über PKA führte zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB sowie zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts. Parallel zu diesem stimulatorischen Signaltransduktionsweg kommt es über die Kopplung des SLC 1-Rezeptors an  $G\alpha_i$ -Proteine zu inhibitorischen Effekten. Die  $G\alpha_i$ -Protein medierte Signaltransduktion des MCH-Signals führte zu einer nachweislichen Verringerung einer Forskolin-induzierten Aktivierung des CRE-Promotor-Konstrukts sowie der Phosphorylierung von CREB. Die Kopplung des SLC 1-Rezeptors an  $G_i$ -Proteine führte weiterhin über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit zur Aktivierung der p42/44 MAPK-Kaskade. Mit einem inhibierenden Agens konnte die Beteiligung der MAPK an der Aktivierung des CRE-Promotor-Konstruktes festgestellt werden. Diese Analysen zeigten, dass die Phosphorylierung von CREB durch positiv und negativ wirkende Signaltransduktionswege reguliert wird. Die Kopplung des SLC 1-Rezeptors nach Stimulation mit MCH erfolgt in dem untersuchten Zellsystem demnach über  $G_s$ - und  $G_i/G_0$ -Proteine.

## 6. Literatur

- AHN, S., RICCIO, A. & GINTY, D.D. (2000): Spatial considerations for stimulus-dependent transkription in neurons. *Annu Rev Physiol* **62**: 803-823.
- ALESSI, D.R., CUENDA, A., COHEN, P., DUDLEY, D.T. & SALTIEL, A.R. (1995): PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **270**: 27489-27494.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3398-3402.
- AMES, R.S., SARAU, H.M., CHAMBERS, J.K., WILLETTE, R.N., AIYAR, N.V., ROMANIC, A.M., LOUDEN, C.S., FOLEY, J.J., SAUERMECH, C.F., COATNEY, R.W., AO, Z., DISA, J., HOLMES, S.D., STADEL, J.M., MARTIN, J.D., LIU, W.-S., GLOVER, G.I., WILSON, S., McNULTY, D.E., ELLIS, C.E., ELSHOURBAGY, N.A., SHABON, U., TRILL, J.J., HAY, D.W.P., OHLSTEIN, E.H., BERGSMAN, D.J. & DOUGLAS, S.A. (1999): Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* **401**: 282-286.
- AN, S., CUTLER, G., ZHAO, J.J., HUANG, S.-G., TIAN, H., LI, W., LIANG, L., RICH, M., BAKLEH, A., DU, J., CHEN, J.-L. & DAI, K. (2001): Identification and characterisation of a melanin-concentrating hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci* **98**(13): 7576-7581.
- ATTWOOD, T.K. & FINDLAY, J.B.C. (1994): Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Engineering* **7**(2): 195-203.
- BÄCHNER, D., KREIENKAMP, H.-J., WEISE, C., BUCK, F. & RICHTER, D. (1999): Identification of melanin concentrating hormone (MCH) as the natural ligand for the orphan somatostatin-like receptor 1 (SLC 1). *Fed Europ Biochem Soc* **457**: 522-524.
- BAKER, B.I. (1991): Melanin-concentrating hormone: a general vertebrate neuropeptide. *Int Rev Cytol* **126**: 1-47.
- BAUER, H., MAYER, H., MARCHLER-BAUER, A., SALZER, U. & PROHASKA, R. (2000): Characterization of p40/GPR69A as a peripheral membrane protein related to the Lantibiotic synthetase component C. *Biochem Biophys Res Com* **275**: 69-74.
- BEDNAREK, M.A., FEIGNER, S.D., HRENIUK, D.L., PALYHA, O.C., MORIN, N.R., SADOWSKI, S.J., MACNEIL, D.J., HOWARD, A.D. & VAN DER PLOEG, L.H.Y. (2001): Short segment of human melanin-concentrating hormone that is sufficient for full activation of human melanin-concentrating hormone receptor 1 and 2. *Biochemistry* **40**: 9379-9386.

- BENBROOK, D.M. & JONES, N.C. (1994): Different binding specificities and transactivation of variant CRE's by CREB complexes. *Nucleic Acid Res* **22**: 1463-1469.
- BERMAN, D.M. & GILMAN, A.G. (1998): Mammalian RGS proteins: Barbarians in the gate. *J Biol Chem* **273**(3): 1269-1272.
- BERRIDGE, M. (1993): Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **341**: 197-205.
- BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J.(1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1522.
- BLEASDALE, J.E., THAKUR, N.R., GREMBAN, R.S., BUNDY G.L., FITZPATRICK, F.A., SMITH, R.J. & BUNTING, S. (1990): Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* **255**: 756-768.
- BLUMER, K.J. & JOHNSON, G.L. (1994): Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biochem Sci* **19**: 236-240.
- BOROWSKY, B., ADHAM, N., JONES, K.A., RADDATZ, R., ARTYMYSHYN, R., OGOZALEK, K.L., DURKIN, M.M., LAKHLANI, P.P., BONINI, J.A., PATHIRANA, S., BOYLE, N., PU, X., KOURANOVA, E., LICHTBLAU, H., OCHOA, F.Y., BRANCHEK, T.A. & GERALD, C. (2001): Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc Nacl Acad Sci USA* **98**(16):8966-8971.
- BÖRSCH-HAUBOLD, A.G., PASQUET, S. & WATSON, S. (1998): Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059. *J Biol Chem* **273**(44): 28766-28772.
- BRANDON, E.P., IDZERDA, R.L. & MCKNIGHT, G.S. (1997): PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making the connection. *Current Opinion Neurobiol* **7**: 397-403.
- BRAUN, A.P. & SCHULMAN, H. (1995): The multifunctional calcium/calmodulin dependent protein kinase: From form to function. *Annu Rev Physiol* **57**: 417-445.
- BREZILLON, S., LANNOY, V., FRANSSSEN, J.-D., LE POUL, E., DUPRIEZ, V., LUCHETTI, J., DETHEUX, M. & PARMENTIER, M. (2002): Identification of natural ligands for the orphan G protein-coupled receptors GPR 7 and GPR 8. *J Biol Chem* **278**(2): 776-783.
- BÜNEMANN, M. & HOSEY, M.M (1999): G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol* **517**(1): 5-23.
- BUNZOW, J.R., SONDEERS, M.S., ARTTAMANGKUL, S., HARRISON, L.M., ZHANG, G., QUILGLEY, D.I., DARLAND, T., SUCHLAND, K.L., PASUMAMULA, S., KENNEDY, J.L., OLSON, S.B., MAGENIS, R.E., AMARA, S.G. & GRANDY, D.K. (2001): Amphetamine, 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamine, and metabolites of the

- catecholamine neurotransmitters are agonists of rat trace amine receptor. *Molecular Pharmacology* **60**(6): 1181-1188.
- CASTANÓN, M.J. & SPEVAK, W. (1994): Functional coupling of human adenosine receptors to a ligand-dependent reporter gene system. *Biochem Biophys Res Comm* **198**(2): 626-631.
- CHAMBERS, J., AMES, R.S., BERGSMA, D., MUIR, A., FITZGERALD, L.R., HERVIEU, G., DYTOKO, G.M., FOLEY, J.J., MARTIN, J., LIU, W.-S., PARK, J., ELLIS, C., GANGULY, S., KONCHAR, S., CLUDERAY, J., LESLIE, R., WILSON, S. & SARAU, H.M. (1999): Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein coupled receptor SCL-1. *Nature* **400**: 261-265.
- CHEN, W., SHIELDS, T.S., STORK, J.S. & CONE, R.D. (1995): A colorimetric assay for measuring activation of G<sub>s</sub>- and G<sub>q</sub>-coupled signalling pathways. *Analytical Biochemistry* **226**: 349-354.
- CHURCH, G.M. & GILBERT, W. (1984): Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**(7): 1991-1995.
- CIVELLI, O., NOTHACKER, H.-P., SAITO, Y., WANG, Z., LIN, S.H.S. & REINSCHIED, R.K. (2001): Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* **24**(4): 230-237.
- CLAPHAM, D.E. & NEER, E.J. (1993): New roles for G-protein  $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365**: 403-406.
- COMMUNI, D., GONZALEZ, N.S., DETZEUX, M., BRÉZILLON, S., LANNOY, V., PARMENTIER, M. & BOEYNAEMS, J.-M. (2001): Identification of a novel human ADP receptor coupled to G<sub>i</sub>. *J Biol Chem* **276**(44): 41479-41485.
- CORDELIER, P., ESTÈVE, J.-P., BOUSQUET, C., DELESQUE, N., O'CARROL, A.-M., SCHALLY, A.V., VAYSSE, N., SUSINI, C. & BUSCAIL, L. (1997): Characterisation of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 9343-9348.
- CRESPO, P., XU, N.Z., DIMONDS, W.F. & GUTKIND, J.S. (1994): Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediates by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature* **369**: 418-420.
- DAAKA, Y., LUTTRELL, L.M. & LEFKOWITZ, R.J. (1997): Switching of the coupling of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**: 88-91.
- DEKKER, L.V. & PARKER, P.J. (1999): Protein kinase C- a question of specificity. *TiPS* **19**: 73-77.



- DE SOUZA, N.J., DOHADWALLA, A.N. & REDEN, J. (1983): Forskolin: a labdane diterpenoid with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory, and adenylate cyclase activating properties. *Med Res Rev* **3**: 201-219.
- DE WEERD, W.F. & LEEB-LUNDBERG, L.M. (1997): Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled G $\alpha$  subunit G $\alpha_q$  and G $\alpha_i$  in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem* **272**: 17858-17866.
- DOHLMANN, H.G., THORNER, J., CARON, M.G. & LEFKOWITZ, R.J. (1991): Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* **60**: 653-688.
- DØSKELAND, S.O., MARONDE, E. & GJERTSEN, B.T. (1993): The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase – functionally different or redundant? *Biochimica et Biophysica Acta* **1178**: 249-258.
- DREWS, J. (1996): Genomic sciences and the medicine of tomorrow. *Nature Biotechnol* **14**:1516-1518.
- ENGLER-BLUM, G., MEIER, M., FRANK, J. & MULLER, G.A. (1993): Reduction of background problems in nonradioactive northern and southern blot analyses enables higher sensitivity than <sup>32</sup>P-based hybridizations. *Anal Biochem* **1**;210(2): 235-244.
- FEIGHNER, A.D., TAN, C., MCKEE, K.K., PALYHA, O.C., HRENIUK, D.L., PONG, S.S., AUSTIN, C.P., FIGUEROA, D., MACNEIL, D., CASCIERE, M.A., NARGUND, R., BAKSHI, R., ABRAMOVITZ, M., STOCCO, R., KARGMAN, S., O'NEILL, G., VAN DER PLOEG, L.H.T., EVANS, J., PATCHETT, A.A., SMITH, R.G. & HOWARD, A.D. (1999): Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system. *Science* **284**: 2184-2188.
- FITZGERALD, L.R., MANNAN, I.J., DYTOKO, M.G., WU, H.-L. & NAMVI, P. (1999): Measurement of responses from Gi-, Gs, or Gq-coupled receptors by a multiple response element/cAMP response element-directed reporter assay. *Analytical Biochemistry* **275**: 54-61.
- FLOWER, D.R. (1999): Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochimica et Biophysica Acta* **1422**: 207-234.
- FORSSMANN, W.-G., SCHULZ-KNAPPE, P., MEYER, M., ADERMANN, K., FORSSMANN, K. & AOKI, A. (1993): Characterisation of natural posttranslationally processed peptides from human blood: A new tool in the systematic investigation of native peptides. in: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Japan Symposium on Peptide Chemistry (Yanaiharu, N.Ed.) pp553-557, Escom, Leiden.
- FUJII, R., YOSHIDA, H., FUKUSUMI, S., HABATA, Y., HOSOYA, M., KAWAMATA, Y., YANO, T., HINUMA, S., KITADA, C., ASAMI, T., MORI, M., FUJISAWA, Y. & FUJINO, M. (2002):

- Identification of neuropeptide modified with bromine as an endogenous ligand for GPR 7. *J Biol Chem* **277**(37): 34010-34016.
- GARRINGTON, T.P. & JOHNSON, G.L. (1999): Organisation and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 211-218.
- GETHER, U. (2000): Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine Reviews* **21**(1): 90-113.
- GJERTSEN, B.T., MELLGREN, G., OTTEN, A., MARONDE, E., GENIESER, H.-G., JASTORFF, B., VINTERMYR, O.K., MCKNIGHT, G.S. & DOESKELAND, S.O. (1995): Novel Rp-cAMPS analogs as tools for inhibition of cAMP kinase in cell culture. *J Biol Chem* **270**: 20599-20607.
- GONZALEZ, G.A., & MONTMINY, M.R. (1989): Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59**: 675-680.
- GONZÁLEZ, J.E. & NEGULESCU, P.A. (1998): Intracellular detection assays for high-throughput screening. *Current Opinion Chemical Biology* **9**: 624-631.
- GREWAL, S.S., FASS, D.M. YAO, H., ELLIG, C.L., GOODMAN, R.H. & STORK, P.J.S. (2000): Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem* **275**(44): 34433-34441.
- GSCHWENDT, M., MÜLLER, H.-J., KIELBASSA, K., ZANG, R., KITTSTEIN, W., RINCKE, G. & MARKS, F. (1994): Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **199**(1):93-98.
- HAMM, H.E. (1998): The many faces of G protein signalling. *J Biol Chem* **273**(2): 669-672.
- HAUSDORFF, W.P., CARON, M.G. & LEFKOWITZ, R.J. (1990): Turning off the signal: desensitisation of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *FASEB* **4**: 2881-2889.
- HAWES, B.E., KIL, E., GREEN, B., O'NEILL, K., FRIED, S., & GRAZIANO, M.P. (2000): The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signalling pathways. *Endocrinology* **141**(12): 4524-4532.
- HAWES, B.E., LUTTRELL, L.M., VAN BIESEN, T. & LEFKOWITZ, R.S.J. (1996): Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G $\beta\gamma$ -mediated mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *J Biol Chem* **271**(21): 12133-12136.
- HAWES, B.E., VAN BIESEN, T., KOCH, W., LUTRELL, L.M. & LEFKOWITZ, R.J. (1995): Distinct pathways of G $_i$ - and G $_o$ -mediated mitogen-activated protein kinases activation. *J Biol Chem* **270**(29): 17148-17153.

- HERBERT, J.M., AUGEREAU, J.M., GLEYE, J. & MAFFRAND, J.P. (1990): Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Comm* **172**(3): 993-999.
- HERVIEU, G.J., CLUDERAY, J.E., HARRISON, D., MEAKIN, J., MAYCOX, P., NASIR, S. & LESLIE, R.A. (2000): The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gen, slc-1, in the central nervous system of the rat. *European J Neurosci* **12**: 1194-1216.
- HESS, R., KUHN, M., SCHULZ-KNAPPE, P., RAIDA, M., FUCHS, M., KLODT, J., ADERMANN, K., KAEVER, V., CETIN, Y. & FORSSMANN, W.-G. (1995): GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS* **374**: 34-38.
- HILL, J., DUCKWORTH, M., MURDOCK, P., RENNIE, G., SABIDO-DAVID, C., AMES, R.S., SZEKERES, P., WILSON, S., BERGSMA, D.J., GLOGER, I.S., LEVY, D.S., CHAMBERS, J.K. & MUIR, A.I. (2001): Molecular cloning and functional characterization of MCH<sub>2</sub>, a novel human MCH receptor. *J Biol Chem* **276**(23): 20112-20119.
- HINUMA, S., HABATA, Y., FUJII, R., KAWAMATA, Y., HOSOYA, M., FUKUSUMI, S., KITADA, C., MASUO, Y., ASANO, T., MATSUMOTO, H., SEKIGUCHI, M., KUROKAWA, T., NISHIMURA, O., ONDA, H. & FUJINO, M. (1998): A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* **393**: 272-275.
- HOUSLAY, M.D. & KOLCH, W. (2000): Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signalling. *Mol Pharmacol* **58**(4): 659-668.
- HOWARD, A.D., MCALLISTER, G., FEIGNER, S.D., LIU, Q., NARGUND, R.P., VAN DER PLOEG, L.H.T. & PATCHETT, A.A. (2001): Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol Sci* **22**(3): 132-139.
- HSU, S.Y., KUDO, M., CHEN, T., NAKABAYASHI, K., BHALLA, A., VAN DER SPEK, P., VAN DUIN, M. & HSUEH, A.J.W. (2000): The three subfamilies of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors (LGR): Identification of LGR6 und LGR7 and the signaling mechanism for LGR7. *Mol Endocrinol* **14**(8): 1257-1271.
- IBELGAUFTS, H. (1992): Gentechnologie von A bis Z. 1. korrigierter Nachdr., Studienausg., VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- INGLESE, J., FREEDMANN, N.J., KOCH, W.J. & LEFKOWITZ, R.J. (1993): Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* **268**(32): 23735-23738.

- JIANG, Y., MA, W., WAN, Y., KOZASA, T., HATTORE, S. & HUANG, X.-Y. (1998): The G protein  $G\alpha_{12}$  stimulates Bruton's tyrosin kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain. *Nature* **395**: 808-813.
- KARIN, M. & HUNTER, T. (1995): Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* **5**: 747-757.
- KAWAUCHI, H., KAWAZOE, I., TSUBOKAWA, M., KISHIDA, M. & BAKER, B.I. (1983): characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature* **305**(5932): 321-323.
- KOJIMA, M., HOSODA, H., DATE, Y., NAKAZATO, M., MATSUO, H. & KANGAWA, K. (1999): Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**: 656-660.
- KOKKOTOU, E.G., TRITOS, N.A., MASTAITIS, J.W., SLIEKER, L. & MARATOS-FLIER, E. (2001): Melanin-concentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain. *Endocrinol* **142**(2): 680-686.
- KOLAKOWSKI, L.F. JR., JUNG, B.P., NGUYEN, T., JOHNSON, M.P., LYNCH, K.R., CHENG, R., HENG, H.H., GEORG, S.R. & O'DOWD, B.F. (1996): Characterisation of a human gene related to genes encoding somatostatin receptors. *FEBS Lett* **398**: 253-258.
- KOSTENIS, E. (2001): Is  $G\alpha_{16}$  the optimal tool for fishing ligands of orphan G-protein-coupled receptors? *Trends Pharmacol Sci* **22**(11): 560-564.
- KOZASA, T., JIANG, X., HART, M.J., STERWEIS, P.M., SINGER, W.D., GILMAN, A.G., BOLLAG, G. & STERNWEIS, P.C. (1998): p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for  $G\alpha_{12}$  and  $G\alpha_{13}$ . *Science* **280**: 2109-2111.
- KRAUSS, G. (1997): Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- KUHN, M., RAIDA, M., ADERMANN, K., SCHULZ-KNAPPE, P., GERZER, R., HEIM, J.M. & FORSSMANN, W.-G. (1993): The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10,3 kDA). *FEBS* **318**: 205-209.
- LAKAYE, B., MINET, A., ZORZI, W. & GRISAR, T. (1998): Cloning of the rat brain cDNA encoding for the SLC-1 protein-coupled receptor reveals the presence of an intron in the gene. *Biochim Biophys Acta* **1401**(2): 216-220.
- LAMMERICH, H.P., BUSMANN, A., KUTZLEB, C., WENDLAND, M., SEILER, P., EICKELMANN, P., MEYER, M., FORSSMANN, W.-G. & MARONDE, E. (2002): Identification and functional characterisation of hemorphins VV-H7 and LVV-H-7 as low affinity agonist for the orphan bombesin receptor subtype 3. *British J Pharmacol* **in Press**.

- LEE, C.H., KANG, J.S., KOH, H.C., HA, J.H. & MIN, C.K. (1998): Differential coupling of G $\alpha_q$  family of G-protein to muscarin M1 receptor and neurokinin-2 receptor. *Arch Pharm Res* **21**(4):423-428.
- LEFKOWITZ, R.J. (1993): G-Protein-coupled receptor kinases. *Cell* **74**: 409-412.
- LIEBMANN, C. (2001): Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathways: paradigms of multiplicity. *Cell Signal* **13**(11):777-785.
- LINDL, T. (2000): Zell und Gewebekultur. 4. Überarbeitete Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- LIPPE, C. & ARDIZZONE, C. (1990): Actions of Vasopressin and isoprenaline on the ionic transport across the isolated frog skin in the presence and the absence of adenylyl cyclase inhibitors MDL 12330A and SQ225336. *Comp Biochem Physiol* **99C**(1/2): 209-211.
- LUDWIG, D.S., MOUNTJOY, L.G., TATRO, J.B., GILLETTE, J.A., FREDERICH, R.C., FLIER, J.S. & MARATOS-FLIER, E. (1998): Melanin-concentrating hormone: a functional melanocortin antagonist in the hypothalamus. *Am J Physiol* **274**(Endocrinol Metab 37): E627-E633.
- LUDWIG, D.S., TRITOS, N.A., MASTAITIS, J.W., KUKKARNI, R., KOKKOTOU, E., ELMQUIST, J., LOWELL, B., FLIER, J.S. & MARATOS-FLIER, E. (2001): Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **107**(3): 379-386.
- LUTTRELL, L.M., HAWES, L.M., VAN BIESEN, T., LUTTRELL, D.K., JANSING, T.J. & LEFKOWITZ, R.J. (1996): Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and G $\beta\gamma$  subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **271**: 19443-19450.
- MACDONALD, D., MURGOLO, N., ZHANG, R., DURKIN, J.P., YAO, X., STRADER, C.D. & GRAZIANO, M.P. (2000): Molecular characterisation of the melanin-concentrating hormone/receptor complex: Identification of critical residues involved in binding and activation. *Molecular Pharmacol* **58**: 217-225.
- MAJERUS, P.W. (1992): Inositol Phosphate Biochemistry. *Annu Rev Biochem* **61**: 225-250.
- MARCHESE, A., GEORGE, S.R., KOLAKOWSKI, L.F. JR., LYNCH, K.R. & O'DOWD, B. (1999): Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **20**(9): 370-375.
- MARSH, D., WEINGARTH, D.T., NOVI, D.E., CHEN, H.Y., TRUMBAUER, M.E., CHEN, A.S., GUAN, X.-M., JIANG, M.M., FENG, Y., CAMACHO, R.E., SHEN, Z., FRAZIER, E.G., YU, H., METZGER, J.M., KUCA, S.J., SHEARNAM, L.P., GOPAL-TRUTER, S., MACNEIL, D.J., STRACK, A.M., MACINTYRE, E., VAN DER PLOEG, L.H.T. & QIAN, S. (2002): Melanin-

- concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci* **99**(9): 3240-3245.
- MAUDSLEY, S., PIERCE, K.L., ZAMAH, A.M., MILLER, W.E., AHN, S., DAAKA, Y., LEFKOWITZ, R.J. & LUTTRELL, L.M. (1999): the  $\beta_2$ -adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase-activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **275**(13): 9572-9580.
- MAYER, H., SALZER, U., BREUSS, J., ZIEGLER, S., MARCHLER-BAUER, A. & PROHASKA, R. (1998): Isolation, molecular characterization, and tissue-specific expression of a novel putative G protein-coupled receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* **1395**: 301-308
- MÉNARD, L., FERGUSON, S.S.G., ZHANG, J., LIN, F.-T., LEFKOWITZ, R.-J., CARON, M.G. & BARRAK, L. (1997): Synergistic regulation of  $\beta_2$ -adrenergic receptor sequestration: Intracellular complement of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase and  $\beta$ -arrestin determine kinetics of internalisation. *Molecular Pharmacol* **51**: 800-808.
- MCLATCHIE, L.M., FRASER, N.J., MAIN, M.J., WISE, A., BROWN, J., THOMPSON, N., SOLARI, R., LEE, M.G. & FOORD, S.M. (1998): RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* **393**: 333-339.
- MILLIGAN, G., MARSHALL, F. & REES, S (1996):  $G_{16}$  as a universal G protein adapter: implications for agonist screening strategies. *Trends Pharmacol Sci* **17**(7): 235-237.
- MONTMINY, M.R., GONZALEZ, G.A. & YAMAMOTO, K.K. (1990): Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* **13**: 184-188.
- MORI, M., HARADA, M., TERAOKA, Y., SUGO, T., WATANABE, T., SHIMOMURA, Y., ABE, M., SHINTANI, Y., ONDA, H., NISHIMURA, O. & FUJINO, M. (2001): Cloning of a novel G protein-coupled receptor. SLT, a subtype of the melanin-concentrating hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **283**(5): 1013-1018.
- MODY, S.M., HO, M.K.C., JOSHI, S.A. & WONG, Y.H. (2000): Incorporation of  $G\alpha_z$ -specific sequence at the carboxyl terminus increases the promiscuity of  $G\alpha_{16}$  toward  $G_i$ -coupled receptors. *Mol Pharmacol* **57**: 13-23.
- MOTZKUS, D., MARONDE, E., GRUNENBERG, U., LEE, C.C., FORSSMANN, W.-G. & ALBRECHT, U. (2000): The human *PER1* gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathway. *FEBS* **486**: 315-319.
- NAHON, J.L., PRESSE, F., BITTENCOURT, J.C., SAWCHENKO, P.E. & VALE, W. (1989): The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptide coexpressed in the dorsolateral hypothalamus. *Endocrinology* **125**(4): 2056-2065.
- NEER, E.J. (1995): Heterotrimeric G Proteins. *Cell* **80**: 249-257.

- NGUYEN, T.V. & JUORIO, A.V. (1998): Binding sites for brain trace amines. *Cellular Molecular Neurobiology* **9**(3): 297-311.
- NISHIMURA, A., MORITA, M., NISHIMURA, Y. & SUGINO, Y. (1990): A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. *Nucleic Acids Res* **18**: 6169.
- O'DOWD, B.F., HNATOWICH, M., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J. & BOUVIER, M. (1989): Palmitoylation of the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **264**(13): 7564-7569.
- O'DOWD, B.F., SCHERDELER, M.A., NGUYEN, T., CHENG, R., RASMUSSEN, J.S., MARCHESE, A., ZASTAWNY, R., HENG, H.H., TSUI, L.C., SHI, X. ASA, S., PUY, L. & GEORGE, S.R. (1995): The cloning and chromosomal mapping of two novel human opioid-somatostatin-like receptor genes. GPR 7 and GPR 8, expressed in discrete areas of the brain. *Genomics* **28**: 84-91.
- OFFERMANN, S. & SIMON, M.I. (1995):  $G\alpha^{15}$  and  $G\alpha^{16}$  couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem* **270**: 15175-15180.
- POWIS, G., BONJOUKLIAN, R., BERGGREN, M.M., GALLEGOS, A., ABRAHAM, R., ASHENDEL, C., ZALKOW, L., MATTER, W.F., DODGE, J., GRINDEY, G. & VLAHOS, C.J. (1994): Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* **54**: 2419-2423.
- PALCZEWSKI, K., KUMASAKA, T., HORI, T., BEHNKE, C.A., MOTOSHIMA, H., FOX, B.A., LE TRONG, I., TELLER, D.C., OKADA, T., STENKAMP, R.E., YAMAMOTO, M. & MIYANO, M. (2000): Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**: 739-745.
- PREMONT, R.T., INGLESE, J. & LEFKOWITZ, R.J. (1995): Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB* **9**: 175-182.
- PRESSE, F., NAHON, J.L., FISCHER, W.H. & VALE, W. (1990): Structure of the human melanin concentrating hormone mRNA. *Mol Endocrinol* **4**(4): 632-637.
- PROBST, W.C., SNYDER, L.A., SCHUSTER, D.I., BROSIUS, J. & SEALFON, S.C. (1992): Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA and Cell Biology* **11**(1): 1-20.
- QU, D., LUDWIG, D.S., GAMMELTOFT, S., PIPER, M., PELLEYMOUNTER, M.A., CULLEN, M.J., MATHES, W.F., PRZYPEK, J., KANAREK, R. & MARATOS-FLIER, E. (1996): A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* **380**: 243-247.
- REINSCHIED, R.K., NOTHACKER, H.-P., BOURSON, A., ARDATI, A., HENNINGSEN, R.A., BUNZOW, J.R., GRANDY, D.K., LANGEN, H., MONSMA JR., F.J. & CIVELLI, O. (1995):

- Orphanin FQ: A neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* **270**: 792-794.
- RITTENHOUSE, J. & MARCUS, F. (1984): Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage of aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers. *Anal Biochem* **138**: 442-448.
- RODRIGUEZ-VICINIA, P., WARNE, P.H., DHAND, R., VANHAESEBROECK, B., GOUT, I., FRY, M.J., WATERFIELD, M.D. & DOWNWARD, J. (1994): Phosphatidylinositol-3-OH Kinase as a direct target of ras. *Nature* **370**:527-532.
- ROESLER, W.J. (2000): What is a cAMP response unit?. *Mol Cell Endocrinol* **162**: 1-7.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIC, L.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. & ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globulin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- SAILER, A.W., SANO, H., ZENG, Z., McDONALD, T.P., PAN, J., PONG, S.-S., FEIGNER, S.D., TAN, C.P., FUKAMI, T., IWAASA, H., HRENIUK, D.L., MORIN, N.R., SADOWSKI, S.J., ITO, MAK., ITO, MAS., BANSAL, A., KY, B., FIGUEROA, D.J., JIANG, Q., AUSTIN, C.A., MACNEIL, D.J., ISHIHARA, A., IHARA, M., KANATANI, A., VAN DER PLOEG, L.H.T., HOWARD, A.D. & LIU, Q. (2001): Identification and characterisation of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R. *Proc Natl Acad Sci* **98**(13): 7564-7569.
- SAITO, Y., NOTHACKER, H.-P. & CIVELLI, O. (2000): Melanin-concentrating hormone receptor: An orphan receptor fits the key. *TEM* **11**(8): 299-303.
- SAITO, Y., NOTHACKER, H.-P., WANG, Z., LIN, S.H.S., LESLIE, F. & CIVELLI, O. (1999): Molecular characterisation of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature* **400**: 265-269.
- SAKURAI, T., AMEMIYA, A., ISHII, M., MATSUZAKI, I., CHEMELLI, R.M., TANAKA, H., WILLIAMS, S.C., RICHARDSON, J.A., KOULOWSKI, G.P., WILSON, S., ARCH, J.R.S., BUCKINGHAM, R.E., HAYNES, A.C., CARR, S.A., ANNAN, R.S., McNULTY, D.E., LIU, W.-S., TERRETT, J.A., ELSHOURBAGY, N.A., BERGSMAN, D.J. & YANAGISAWA, M. (1998): Orexin and Orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**: 573-585.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANCHEZ, M., BAKER, B.I. & CELIS, M. (1997): Melanin-concentrating hormone (MCH) antagonizes the effects of alpha-MSH and neuropeptide E-I on grooming and locomotor activities in the rat. *Pepitdes* **18**(3): 393-396.



- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* **74**: 5463-5467.
- SASSONE-CORSI, P. (1995): Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 355-377.
- SATO, N., KAMINO, K., TATEISHI, K., SATOH, T., NISHIWAKI, Y., YOSHIIWA, A., MIKI, T. & OGIHARA, T. (1997): Elevated amyloid  $\beta$  protein (1-40) level induces CREB phosphorylation at serine-133 via p42/44 MAP kinase (ERK1/2)-dependent pathway in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem biophys Res Commun* **232**: 637-642.
- SCHEPKY, A.G., BENSCH, K.W., SCHULZ-KNAPPE, P. & FORSSMANN, W.-G. (1994): Human hemofiltrat as a source of circulating bioactive peptides: determination of amino acids, peptides and proteins. *Biomedical Chromatography* **8**: 90-94.
- SCHMITT, J.M. & STORK, P.J.S. (2000):  $\beta_2$ -adrenergic receptor activates extracellular signal-regulated kinases (ERKs) via the small G protein Rap1 and the serine/threonine kinase B-Raf. *J Biol Chem* **275**(33): 25342-25350.
- SCHULZ-KNAPPE, P., MÄGERT, H.J., DEWALD, B., MEYER, M., CETIN, Y., KUBBIES, M., TOMECZKOWSKI, J., KIRCHHOFF, K., RAIDA, M., ADERMANN, K., KIST, A., REINECKE, :, SILARD, R., PARDIGOL, A., UGUCCIONI, M., BAGGIOLONI, M. & FORSSMANN, W.-G. (1996): HCC-1, a novel chemokine from human plasma. *J Exp Med* **183**: 295-299.
- SCHULZ-KNAPPE, P., RAIDA, M., STÄNDKER, L., RICHTER, R., HESS, R., JÜRGENS, M. & FORSSMANN, W.-G. (1997): Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. *J. Chromatogr. A* **776**: 125-132.
- SCHWEDE, F., MARONDE, E., GENIESEN, H.-G. & JASTOFF, B. (2000): Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs. *Pharmacology & Therapeutics*. **87**: 199-226.
- SEILER, P., STÄNDKER, L., MARK, S., HAHN, W., FORSSMANN, W.-G., & MEYER, M. (1999): Application of a peptide bank from porcine brain in isolation of regulatory peptides. *J. Chromatogr. A* **852**: 273-283.
- SHARP, P.A. (1994): Split genes and RNA splicing. *Cell* **77**: 805-815.
- SHAYWITZ, A.J. & GREENBERG, M.E. (1999): CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 821-861.
- SHENG, M., THOMPSON, M.A. & GREENBERG, M.E. (1991): CREB: a  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* **252**: 1427-1430.

- SHI, Y. & GAESTEL, M. (2002): In the garden of forking paths: How p38 MAPKs signal for downstream assistance. *J Biol Chem* **383**: 1519-1536.
- SHIMADA, M., TRITOS, N.A., LOWELL, B.B., FLIER, J.S. & MARATOS-FLIER, E. (1998): Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* **396**: 670-674.
- SHIMOMURA, Y., HARADA, M., GOTO, M., SUGO, T., MATSUMOTO, Y., ABE, M., WATANABE, T., ASAMI, T., KITADA, C., MORI, M., ONDA, H. & FUJINO, M. (2002): Identification of Neuropeptide W as the endogenous ligand for orphan G-protein coupled receptor GPR 7 and GPR 8. *J. Biol. Chem.* **277**(39): 35826-35832.
- SHIMOMURA, Y., MORI, M., SUGO, T., ISHIBASHI, Y., ABE, M., KUROKAWA, T., ONDA, H., NISHIMURA, O., SUMINO, Y. & FUJINO, M. (1999): Isolation and identification of melanin-concentrating hormone as the endogenous ligand for the SLC 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **261**: 622-626.
- SILVERMAN, L., CAMPBELL, R. & BROACH, J.R. (1998): New assay technologies for high-throughput screening. *Current Opinion Chemical Biology* **2**: 397-403.
- SIMON, M.I., STRATHMANN, M.P. & GAUTAM, N. (1991): Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**: 802-808.
- SIMONDS, W.F. (1999): G protein regulation of adenylat cyclase. *TiPS* **20**: 66-73.
- SINGH, R.P., DAHWAN, P., GOLDEN, C., KAPOOR, G.S. & MEHTA, K.D. (1999): One-way cross-talk between p38<sup>MAPK</sup> und p42/44<sup>MAPK</sup>. *J Biol Chem* **274**(28): 19593-19600.
- SMITH, R.J., SAM, L.M., JUSTEN, J.M., BUNDY, G.L., BALS, G.A. & BLEASDALE, J.E. (1990): Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther.* **253**: 688-697.
- SMRCKA, A.V., HEPLER, J.H., BROWN, K.O. & STERNWEIS, P.C. (1991): Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified G<sub>q</sub>. *Science* **251**: 804-807.
- SONE, M., TAKAHASHI, K., MURAKAMI, O., TOTSUNE, K., ARIHARA, Z., SATOH, F., SASANO, H. ITO, H. & MOURI, T. (2000): Binding sites for melanin-concentrating hormone in the human brain. *Peptides* **21**: 245-250.
- STAMM, J.C., MICHIELS, F., VAN DER KAMMEN, R.A., MOOLENAAR, W.H. & COLLARD, J.G. (1998): Invasion of T-lymphoma cells: cooperation between Rho family GTPases and lysophospholipid receptor signaling. *EMBK* **17**(4): 4066-4074.

- STERNWEIS, P.C. & SMRCKA, A.V. (1992): Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem Sci* **17**: 502-506.
- STILES, G.L., BENOVIC, J.L., CARON, M.G. & LEFKOWITZ, R.J. (1984): Mammalian  $\beta$ -adrenergic receptors. *J Biol Chem* **259**(13): 8655-8663.
- STORK, P.J.S. & SCHMITT, J.M. (2002): Crosstalk between cAMP and MAP kinase signalling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* **12**(6): 258-266.
- STRADER, C.D., FONG, T.M., TOTA, M.R. & UNDERWOOD, D. (1994): Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* **63**: 101-132.
- STRYER, L. (1996): Biochemie. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- SUPLY, T., ZUANA, O.D., AUDINOT, V., RODRIGUEZ, M., BEAZVERGER, P., DUHAULT, J., CANET, E., GALIZZI, J.-P., NAHON, J.-L., SEVENS, N. & BOUTIN, J.A. (2001): SLC-1 receptor mediates effect of melanin-concentrating hormone on feeding behavior in rat: A structure-activity study. *J Pharmacol Exp Therap* **299**(1): 137-146.
- SZEKERES, P.G., MUIR, A.I., SPINAGE, L.D., MILLER, J.E., BUTLER, S.I., SMITH, A., RENNIE, G.I., MURDOCK, P.R., FITZGERALD, L.R., WU, H.-L., MCMILLIAN, L.J., GUERRERA, S., VAWTER, L., ELSHOURBAGY, N.A., MOONEY, J.L., BERGSMAN, D.J., WILSON, S. & CHAMBERS, J.K. (2000): Neuromedin U is a potent agonist at the orphan G protein-coupled receptor FM3. *J Biol Chem* **275**(27): 20247-20250.
- TANG, X. & DOWNES, C.P. (1997): Purification and characterisation of G $\beta\gamma$ -responsive phosphoinositide 3-Kinases from pig platelet cytosol. *J Biol Chem* **272**(22): 14193-14199.
- TAYLOR, S.S., BUECHLER, J.A. & YONEMOTO, W. (1990): cAMP-dependent protein kinases: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* **59**: 971-1005.
- TOULLEC, D., PIANETTI, P., COSTE, H., BELLEVERGUE, P., GRAND-PERRET, T., AJAKANE, M., BAUDET, V., BOISSIN, P., BOURSIER, E., LORIOLE, F., DUHAMEL, L., CHARON, D. & KIRILOVSKY, J. (1991): The Bisindolylmaleinide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* **266**: 15771-15781.
- TOUMANIANTZ, G., BITTENCOURT, J.C. & NAHON, J.-L. (1996): The rat melanin-concentrating hormone gene encodes an additional putative protein in a different reading frame. *Endocrinology* **137**(10): 4518-4521.
- TOUMANIANTZ, G., FERREIRA, P.C., ALLAEYS, I., BITTENCOURT, J.C. & NAHON, J.-L. (2000): Differential neuronal expression and projections of melanin-concentrating hormone (MCH) and MCH-gene-overprinted-polypeptide (MGOP) in the rat brain. *Eur J Neurosci* **12**: 4367-4380.

- TRITOS, N.A. & MARATOS-FLIER, E.(1999): Two important systems in energy homeostasis: melanocortins and melanin-concentrating hormone. *Neuropeptides* **33**: 339-349.
- VAN BIESEN, T., HAWES, B.E., LUTTRELL, D.K., KRUEGER, K.M., TOUGARA, K., PORFIRI, D., SAKAUE, M., LITRELL, L.M. & LEFKOWITZ, R.J. (1995A): Receptor-tyrosine-kinase- and G $\beta\gamma$ -mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* **376**: 781-784.
- VAN BIESEN, T., HAWES, B.E., RAYMOND, J.R., LUTTRELL, L.M., KOCH, W.J. & LEFKOWITZ, R.J. (1995B): G<sub>0</sub>-protein  $\alpha$ -subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* **271**(3):1266-1269.
- VAUGHAN, J.M., FISCHER, W.H., HOEGER, C. , RIVIER, J. & VALE, W. (1989): Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology* **125**(3): 1660-1665.
- VLAHOS, C.J., MATTER, W.F., HUI, K.Y. & BROWN, R.F. (1994): A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* **269**(7):5241-5248.
- VOGELSTEIN, B. & GILLESPIE, D. (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci. USA* **76**: 615-619.
- WEISSINGER, E.M., EISSNER, G., GRAMMER, C., FACKLER, S., HAEFNER, B., YOON, L.S., LU K.S., BAZAROV, A., SEDIVY, J.M., MISCHAK, H. & KOLCH, W. (1997): Inhibition of the Raf-1 kinase by cyclic AMP agonists causes apoptosis of v-abl-transformed cells. *Mol Cell Biol* **17**(6): 3229-3241.
- WILSON, S., BERGSMAN, D.J., CHAMBERS, J.K., MUIR, A.I., FANTOM, K.G.M., ELLIS, C., MURDOCK, P.R., HERRITY, N.C. & STADEL, J.M. (1998): Orphan G-Protein-coupled receptors: The next generation of drug targets? *British J of Pharmacol* **125**: 1387-1392.
- XU, Y., ZHU, K., HONG, G., WU, W., BAUDHUIN, L.M., XIAO, Y. & DAMRON, D.S. (2000): Sphingosylphosphorylcholine is a ligand for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1. *Nature Cell Biol* **2**: 261-267.
- ZENG, Z., FAN, P., RAND, E., KYAW, H., SU, K., MADIKE, V., CARTER, K.C. und LI, Y. (1998): Cloning of a putative human neurotransmitter receptor expressed in skeletal muscle and brain. *Biochem Biophys Res Commun* **242**(3): 575-578.
- ZHANG, F.L., LUO, L., GUSTAFSON, E., LACHOWICZ, J., SMITH, M., QIAO, X., LIU, Y.-H., CHEN, G., PRAMANIK, B., LAZ, T.M., PALMER, K., BAYNE, M. & MONSMA, F. (2001): ADP is the cognate ligand for the orphan G-protein coupled receptor SP1999. *J Biol Chem* **276**: 8608-8615.

---

ZHANG, J., FERGUSON, S.S.G., BARAK, L.S., MÉNARD, L. & CARON, M.G. (1996): Dynamin and  $\beta$ -arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* **271**(31): 18302-18305.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Erik Maronde für die kompetente, freundschaftliche Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Koreferates.

Ich danke dem wissenschaftlichen Leiter von IPF PharmaCeuticals GmbH (bis 31.03.2000: Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung GmbH), Herrn Prof. Dr. Dr. Wolf-Georg Forssmann, ganz herzlich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe der „Orphan Rezeptoren“ und für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich für die Übernahme des Referates danken.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Dirk Motzkus für die zahlreichen Diskussionen, Ideen und Hilfestellungen, die den Verlauf meiner Arbeit oft maßgeblich beeinflusst haben.

Ich möchte mich besonders bei der Orphan Rezeptor Gruppe um Herrn Dr. Christian Kutzleb, Frau Dr. Annette Busmann, Edith Rambow, Kathleen Listemann und Violetta Diazek für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Außerdem danke ich allen Kollegen der Abteilung Molekularbiologie, besonders Melanie Klingenberg, Rainer Schreeb und PD Dr. Hans-Jürgen Mägert sowie Dr. Axel Schulz aus der Abteilung Peptidsynthese für die Bereitstellung des synthetischen NPW23.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern der präparativen Abteilung für die wertvollen praktischen Hilfestellungen bei der Laborarbeit, besonders Herrn Dr. Rudolf Richter und Frau Susann Busch.

Bei Frau Dr. Cornelia Liepke, Frau Dr. Susann Baxmann und Herrn Dr. Michael Walden möchte ich mich für die kreativen Gespräche bedanken, sowie für die geduldige Beantwortung zahlreicher „kurzer Fragen“.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Bewilligung der Doktorandenstipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs „Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine“.

Bei den Kollegiaten und Beteuern des Graduiertenkollegs möchte ich mich für die interessanten und abwechslungsreichen Seminarveranstaltungen und Tagung auf Gut Sunder bedanken.

Der grösste Dank gilt meinem Mann, meinen Geschwistern und meinen Freunden, die mir während der Erstellung dieser Arbeit in vielfältigerweise zur Seite gestanden haben.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Maike Sniehotta (geb. Schlüter)

Geburtsdatum / -ort: 18.07.1968 in Völklingen/Saarland

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet; 1 Kind

### **Ausbildung**

1978 – 1987 Integrierte Gesamtschule Langenhagen,  
Schulabschluss Abitur.

1987 – 1988 Berufsbildende Schule 2 der Landeshauptstadt Hannover,  
Berufsgrundschuljahr Chemie, Physik, Biologie.

1988 – 1990 Ausbildung zur Biologielaborantin,  
Tierärztliche Hochschule Hannover.

1990 – 1997 Studium der Biologie an der Universität Hannover  
(1995 – 1997 Bearbeitung der Diplomarbeit).

1999 - 2003 Doktorarbeit bei der IPF PharmaCeuticals GmbH Hannover (bis  
31.03.2000: Niedersächsisches Institut für Peptidforschung GmbH)  
als Stipendiat des Graduiertenkollegs „Charakterisierung von  
regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine“.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Zu Hilfeleistung herangezogenen Institute und Personen habe ich vollständig angegeben. Ich versichere ferner, dass ich die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, im Februar 2003

Maika Sniehotta



