

Funktionelle Untersuchungen
an den
MCH-Rezeptor 1 interagierenden Proteinen
MIZIP* und *Neurochondrin

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation
von

Dipl. Biochem. Felix Francke
geboren am 19.05.1973
in Hamburg

Hannover 2005

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zellbiochemie und Molekulare Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dietmar Richter angefertigt.

Referent:

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Alves

Abteilung Biophysikalische Chemie

Zentrum Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent:

Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller

Abteilung Physiologische Chemie

Zentrum Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 28.06.2005

Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Untersuchungen und Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Weiterhin wurde die Dissertation nicht zuvor als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, April 2005

Felix Francke

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Dietmar Richter danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des UKE-Hamburg und für die Vergabe des Themas.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Alves vom Institut für Biophysikalische Chemie der MH-Hannover möchte ich dafür danken, dass er die Betreuung der Arbeit übernommen hat und sie gegenüber der Universität Hannover vertritt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Dietmar Bächner, für seine hervorragende fachliche Betreuung und intensive praktische Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, für die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes und für eine tolle Zusammenarbeit!

Herrn Prof. Dr. W. Müller danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie danke ich für das nette Arbeitsklima und für eine schöne Zeit. Besonderer Dank gebührt dabei Hans-Hinrich Hönck und Agata Blaszczyk-Wewer für die Tatkräftige Unterstützung bei den Oocyten-Experimenten, Arne Quitsch für die Hippokampusneurone, Vanessa Schröder für fleißige Klonierungen und Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp für die vielen guten Ratschläge und fruchtbaren Ideen.

Vielen Dank auch an meine Lieblingskollegen Wolf Wenthe, Michaela Soltau, Kerstin Berhörster, Chong-Wee Liew und Arne Quitsch. Es hat viel Spaß gemacht mit Euch.

Danke.

Zusammenfassung	9
Abstract	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1. Einleitung	12
1.1 Das Neuropeptid MCH	12
1.2 Molekulare Eigenschaften des MCH-Rezeptor 1	16
1.3 Signaltransduktion des MCHR1	17
1.4 Bedeutung des intrazellulären C-Terminus	20
1.5 MCHR1 interagierende Proteine	21
1.5.1 Periplakin (PPL)	22
1.5.2 MIZIP (<i>MCHR1 interacting zinc-finger protein</i>)	22
1.5.3 Neurochondrin (NCDN).....	24
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Standardchemikalien.....	27
2.2 Bakterienstämme, Hefestämme, Zelllinien	27
2.3 Vektoren.....	27
2.4 Oligonukleotide.....	27
2.5 Peptide	28
2.6 Antikörper	28
2.6.1 Primär-Antikörper	28
2.6.2 Sekundär-Antikörper	29
2.7 Stammlösungen und Puffer.....	29
2.7.1 Proteaseinhibitoren – Stammlösungen.....	29
2.7.2 Antibiotika – 1000x Stammlösungen.....	29
2.7.3 sonstige Lösungen	30
2.8 Molekularbiologische Methoden	30
2.8.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	30
2.8.2 Agarosegelelektrophorese	31
2.8.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.8.4 Restriktionsverdau von DNA	31
2.8.5 Ligation von DNA-Fragmenten.....	32
2.8.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	32
2.8.7 Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	32
2.8.8 Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen	33

2.8.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Zellen	33
2.8.10	Konzentrationsbestimmung von DNA	34
2.8.11	Sequenzierung von DNA.....	34
2.8.12	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen.....	34
2.8.13	Herstellung von cDNA über Reverse Transkription	34
2.9	Hefe-Zwei-Hybrid-System	35
2.9.1	Transformation von Hefezellen	35
2.9.2	Hefe-Zwei-Hybrid-Screen.....	36
2.9.3	β -Galactosidase Filtertest	36
2.9.4	Plasmid-Präparation aus Hefe-Zellen	37
2.10	Zellbiologische Methoden.....	37
2.10.1	Kultivierung von HEK293- und COS7-Zellen	37
2.10.2	Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode	38
2.10.3	Transfektion mit <i>PolyFect</i> [®] -Reagenz	38
2.10.4	Kultivierung und Transfektion von primären Hippokampusneuronen.....	38
2.11	Immuncytochemische Methoden.....	39
2.11.1	Immuncytochemische Analyse von Proteinen in HEK293- und COS7-Zellen.....	39
2.11.2	Immuncytochemische Analyse von Proteinen in primären Hippokampusneuronen.....	39
2.11.3	Immunhistochemische Analyse von Ratten-Gehirnschnitten	40
2.11.4	Mikroskopie	40
2.11.5	ELISA-Assay zur Quantifizierung von membranständigen Rezeptoren	40
2.11.6	Bestimmung von intrazellulärem Ca^{2+} mittels Fluoreszenzmikroskopie	41
2.12	Proteinbiochemische Methoden	42
2.12.1	Proteinbestimmung	42
2.12.2	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.12.3	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	42
2.12.4	Western-Blot Analysen.....	43
2.12.5	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	43
2.12.6	Expression und Aufreinigung von His ₆ -Fusionsproteinen.....	44
2.12.7	<i>GST-Pulldown</i> -Experimente.....	45
2.12.8	Immunpräzipitation aus transfizierten COS7-Zellen	46
2.12.9	Affinitätsaufreinigung von MIZIP-bindenden Proteinen aus HEK293-Zellen	46
2.12.10	Herstellung von Proteinextrakten aus Mausgeweben.....	47
2.12.11	Membranfraktionierung aus Mausgehirnen	47
2.13	Elektrophysiologische Messungen	48
2.13.1	<i>In-vitro</i> Transkription von cRNA	48
2.13.2	Präparation der <i>Xenopus</i> -Oozyten und Injektion der cRNA	49
2.13.3	Elektrophysiologische Messungen von Dosis-Wirkungskurven an <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	50

3.	Ergebnisse	52
3.1	Untersuchungen zur Expression von MIZIP	52
3.1.1	Herstellung und Charakterisierung von spezifischen MIZIP-Antiseren.....	52
3.1.2	Westernblotanalyse der Expression von MIZIP in Mausgeweben.....	54
3.1.3	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von MIZIP in kultivierten Ratten-Hippokampus-Neuronen	56
3.1.4	Überexpression von MIZIP in primären Hippokampusneuronen	57
3.1.5	Kolokalisation von MIZIP und MCHR1 in transfizierten Hippokampusneuronen.....	58
3.1.6	Immunhistochemische Untersuchung der Koexpression von MIZIP und MCHR1 im adulten Rattengehirn.....	60
3.2	Identifizierung von weiteren MIZIP-Interaktionspartnern	62
3.2.1	Suche nach MIZIP-Interaktionspartnern in einer humanen Gehirn-cDNA-Bank mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System	62
3.2.2	Affinitätsaufreinigung von MIZIP-bindenden Proteinen aus HEK293-Zellen	64
3.2.3	Charakterisierung der Interaktion von MIZIP und Tubulin über <i>GST-Pulldown-Experimente</i>	66
3.2.4	Immunocytochemische Untersuchung der MIZIP / Tubulin – Interaktion	69
3.2.5	MIZIP bindet an sich selbst	72
3.2.6	Funktion der MYND-Domäne.....	73
3.3	Untersuchungen zur Interaktion zwischen Neurochondrin und dem MCH-Rezeptor 1	74
3.3.1	Spezifizierung der Bindung von NCDN an MCHR1 im Hefe-System	74
3.3.2	Identifizierung der interagierenden Bereiche von NCDN und MCHR1	75
3.3.3	Verifizieren der Interaktion von NCDN mit MCHR1 im <i>GST-Pulldown-Experiment</i>	77
3.3.4	Verifizieren der MCHR1/NCDN-Interaktion durch Koimmunpräzipitation aus transfizierten Säugierzellen	78
3.3.5	Untersuchungen zur MCHR1 / NCDN – Interaktion <i>in vivo</i>	80
3.4	Funktionelle Untersuchungen von MIZIP und NCDN	82
3.4.1	Untersuchung des Einflusses der MCHR1-interagierenden Proteine auf die Rezeptor-Internalisierung.....	82
3.4.2	Einfluss von NCDN und MIZIP auf die Signaltransduktion von MCHR1 in <i>Xenopus</i> -Oozyten	85
3.4.3	Einfluss von NCDN auf den MCH-vermittelten Anstieg von intrazellulärem Ca ²⁺ in HEK293-Zellen.....	88
4.	Diskussion.....	90
4.1	Analyse der Expression von MIZIP	90
4.2	Identifizierung von MIZIP-Interaktionspartnern.....	93
4.3	Analyse der Interaktion zwischen MCHR1 und Neurochondrin.....	98

4.4	Funktionelle Bedeutung der Interaktionen von MIZIP und NCDN mit dem MCHR1	100
5.	Literaturverzeichnis.....	106
6.	Anhang	115
	Publikationen	118

Zusammenfassung

Das hypothalamische Neuropeptid *Melanin-concentrating hormon* (MCH) ist an der Regulation des Energiehaushalts von Säugern beteiligt. Die Wirkung von MCH wird über die G-Protein gekoppelten Rezeptoren MCHR1 und MCHR2 vermittelt. Wichtige Funktionen von G-Protein gekoppelten Rezeptoren werden über Proteine reguliert, die an den intrazellulären C-Terminus der Rezeptoren binden.

In Voruntersuchungen wurden ein bislang unbekanntes humanes *MCH-Rezeptor 1 interagierendes Zinkfinger Protein* (MIZIP) und das humane Protein Neurochondrin (NCDN), als putative intrazelluläre Bindungspartner des C-Terminus vom MCHR1 identifiziert. In dieser Arbeit wurde die Interaktion des MCHR1 mit diesen beiden Proteinen eingehend untersucht.

Für die Untersuchung von MIZIP wurde ein spezifisches Antiserum hergestellt und erstmals die Expression von endogenem MIZIP-Protein in kultivierten Hippokampusneuronen und im Nager-Gehirn gezeigt. Dabei konnte eine Kolokalisation von MIZIP und MCHR1 in Neuronen mehrerer Gehirnbereiche nachgewiesen werden. Mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System und einer neuen Affinitätsaufreinigungsmethode wurde nach weiteren Proteinen gesucht, die mit MIZIP interagieren. Dabei konnte das Protein Tubulin als potentieller MIZIP-Interaktionspartner identifiziert werden. Mit *GST-Pulldown-Experimenten* konnte die direkte Bindung von MIZIP an α -Tubulin, sowie an β -Tubulin bestätigt werden und die MYND-Zinkfingerdomäne von MIZIP als Bindungsstelle des N-Terminus von Tubulin identifiziert werden.

Für das Protein NCDN wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems und über Koimmunpräzipitationen gezeigt, dass die Bindung an den MCHR1 von dem Bereich proximal zur 7. Transmembrandomäne vermittelt wird. Dieser Bereich grenzt unmittelbar an die sog. Helix 8 an, die eine Schlüsselrolle bei der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion spielt. Durch elektrophysiologische Untersuchungen an *Xenopus* Oocyten und Messungen von intrazellulärem Ca^{2+} in Zellkulturen, wurde eine Hemmung der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion durch NCDN gezeigt. MIZIP beeinflusst dagegen die Signaltransduktion nicht. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Internalisierung des Rezeptors von beiden MCHR1-interagierenden Proteinen nicht beeinflusst wird.

Schlüsselwörter: *Melanin-concentrating hormon*, MIZIP, Neurochondrin

Abstract

The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone (MCH) is known to be involved in the regulation of energy metabolism. MCH acts via the G-protein coupled receptors MCHR1 and MCHR2. Important functions of G-protein coupled receptors are regulated by proteins binding to the intracellular C-terminus of the receptors.

Preliminary studies revealed the putative binding of the *MCH-receptor 1 interacting zinc finger protein* (MIZIP) and the human protein neurochondrin to the C-terminus of MCHR1. In the present study the interaction of MCHR1 with these two proteins was further investigated.

A specific antiserum was generated and used to analyse the expression of endogenous MIZIP protein in cultured rat embryonic hippocampal neurons. In the adult rodent brain, the colocalization of MIZIP and MCHR1 in neurons of distinct areas of the brain was observed.

Using the yeast two hybrid system and a novel affinity purification method, tubulin was identified as a putative binding partner of MIZIP. The direct interaction of MIZIP with α -tubulin and with β -tubulin, was confirmed by GST-pull down assays and it was shown, that the binding occurs via the MYND-zinc finger domain of MIZIP and the N-terminus of tubulin.

Using deletion constructs of the MCHR1, the interaction with neurochondrin was mapped to the proximal region of transmembrane domain 7. This region is involved in the formation of a predicted helix 8 of the receptor, that is suggested to play an important role in G-protein coupled signalling. Electrophysiological studies using *Xenopus* oocytes expressing MCHR1 and neurochondrin and calcium imaging using transfected mammalian cells, revealed an inhibitory effect of neurochondrin on MCH-mediated signalling. In contrast, MIZIP did not interfere with the G-protein coupled signal transduction. Furthermore, there was no impact of MIZIP or neurochondrin on the MCH induced internalization of the MCH-receptor 1.

Keywords: melanin-concentrating hormone, MIZIP, Neurochondrin

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	<i>2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid)</i>
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	kodierende Deoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Dinatriummethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	Fötales Kälberserum
GIRK	<i>G-Protein regulated inwardly rectifying potassium channel</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
MCH	Melanin-konzentrierendes Hormon
kDA	Kilodalton
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PTX	Pertussistoxin
RT	Raumtemperatur
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SST	Somatostatin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumenprozent
VSV-G	vesicular stomatitis virus glycoprotein
w/v	Gewichtsprozent
WB	Westernblot

1. Einleitung

1.1 Das Neuropeptid MCH

Das Melanin-konzentrierende Hormon (MCH) ist ein zyklisches Peptid, das ursprünglich aus der Hypophyse vom Knochenfisch isoliert wurde und dort an der Regulation der Hautfarbe beteiligt ist. Seinem Namen entsprechend bewirkt es die Aggregation des Hautfarbstoffes Melanin, wodurch es zur Aufhellung der Haut kommt. Es wirkt damit dem Melanin verteilenden Effekt von α -MSH (α -Melanocyten stimulierendes Hormon) entgegen (Kawauchi *et al.* 1983; Rance *et al.* 1979). Bei höheren Säugetieren spielt MCH hingegen eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Körpergewichts, indem es das Appetitverhalten, die Nahrungsaufnahme und den Energiehaushalt reguliert.

Das MCH der Säuger besteht aus 19 Aminosäuren und einer intramolekularen Disulfidbrücke, wodurch eine Ringstruktur entsteht (Vaughan *et al.* 1989). Es wird proteolytisch aus dem 116 Aminosäuren langen Vorläuferprotein *ProMCH* prozessiert, aus dem ebenfalls die Neuropeptide *NEI* und *NGE* entstehen (Nahon *et al.* 1989; Parkes *et al.* 1992). MCH ist evolutionär hoch konserviert, die Aminosäuresequenzen von Ratte, Maus und Mensch sind zu 100% identisch (Breton *et al.* 1993; Nahon 1994; Presse *et al.* 1990; Vaughan *et al.* 1989) und zu 70% identisch mit dem Lachs-MCH (Parkes *et al.* 1992) (Abbildung 1).

MCH wird im Säugergehirn ausschließlich in Neuronen des lateralen Hypothalamus und der Zona incerta exprimiert. MCH-Neuronen projizieren aber in sämtliche Bereiche des Gehirns (Bittencourt *et al.* 1992; Skofitsch *et al.* 1985). Der laterale Hypothalamus gilt als wichtiges Steuerungszentrum vieler Funktionen, wie Nahrungsaufnahme, Blutdruck, Thermoregulation, Emotionen, Schlaf-Wach-Rhythmus und Belohnungsprozesse (Bernardis *et al.* 1996). In peripheren Geweben wurde nur eine sehr schwache MCH-Expression, v.a. im peripheren Nervensystem, im Immunsystem und in Geschlechtsorganen festgestellt (Hervieu, G. *et al.* 1996; Viale *et al.* 1997).

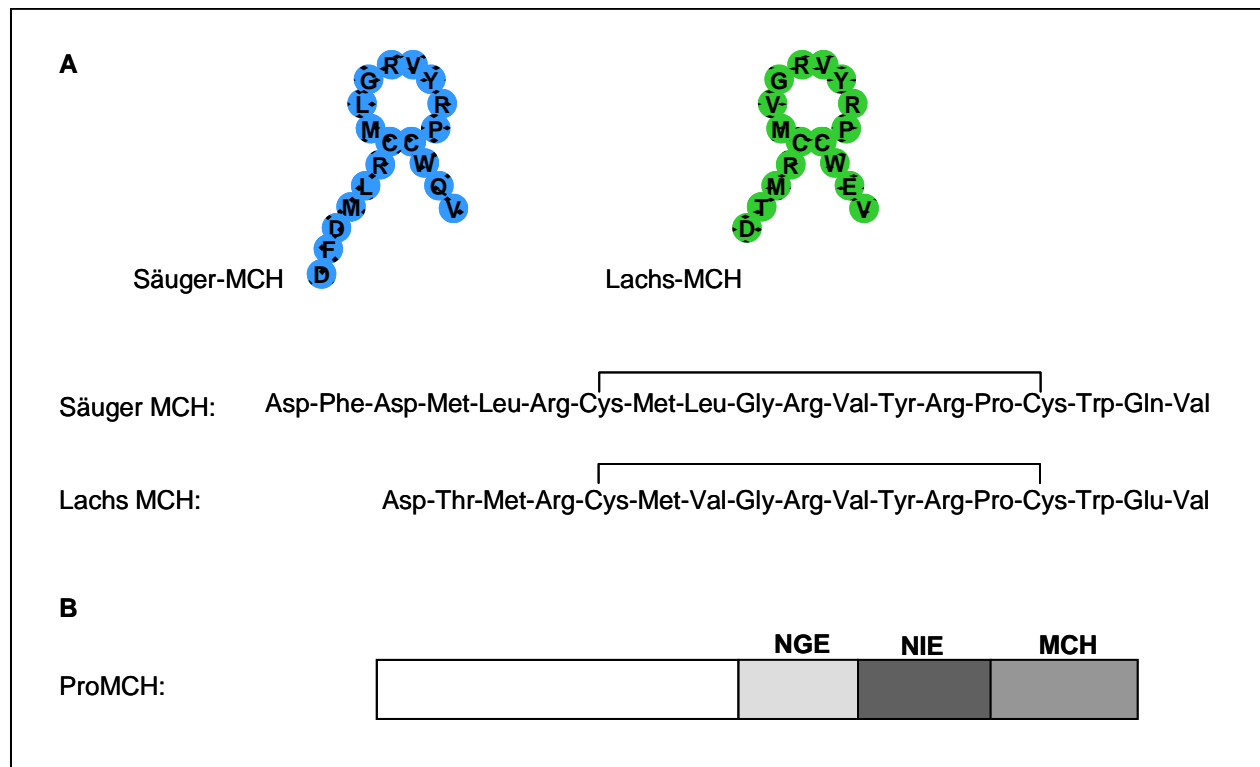


Abbildung 1. A: Struktur und Sequenzvergleich von MCH aus Säugern und Knochenfisch (Lachs). B: Schematische Darstellung des *ProMCH* Proteins (Saito *et al.* 2000).

Als erster Rezeptor für MCH wurde der, bis dahin ligandenlose, G-Protein gekoppelte Rezeptor *Slc-1* (*Somatostatin-Receptor like clone 1*) identifiziert (Bächner *et al.* 1999; Chambers *et al.* 1999; Lembo *et al.* 1999; Saito *et al.* 1999; Shimomura *et al.* 1999), der ursprünglich aufgrund seiner großen strukturellen Ähnlichkeit zu den Somatostatin-Rezeptoren isoliert worden war (Kolakowski *et al.* 1996; Lakaye *et al.* 1998). Das Expressionsmuster von MCHR1 wurde eingehend auf mRNA- und Proteinebene untersucht und entspricht dem von MCH und den Projektionen der MCH-Neurone (Bittencourt *et al.* 1992). So wurde eine starke Expression im Hippokampus, in der Amygdala, im Nucleus Accumbens, im Hypothalamus, im Cortex und in verschiedenen Kernen des Hirnstamms gefunden (Hervieu, G. 2003; Hervieu, G.J. *et al.* 2000; Lembo *et al.* 1999; Saito *et al.* 1999). Auch in einigen peripheren Geweben wurde eine MCHR1-Expression beobachtet (Bradley *et al.* 2000; Kolakowski *et al.* 1996; Saito *et al.* 1999).

Aufgrund der Homologie zum MCHR1 wurde ein weiterer G-Protein gekoppelter Rezeptor mit hoher Affinität zu MCH identifiziert und als MCHR2 bezeichnet (An *et al.* 2001; Hill *et al.* 2001; Rodriguez *et al.* 2001; Sailer *et al.* 2001). Im humanen Gehirn

ist er ebenfalls im Hypothalamus, Cortex, Hippocampus und in der Hypophyse exprimiert (Hill *et al.* 2001; Sailer *et al.* 2001), sowie in der Peripherie im Fettgewebe (Hill *et al.* 2001) und im Testis (Mori *et al.* 2001). Allerdings wird eine wesentliche Funktion des MCHR2 im Energiestoffwechsel als unwahrscheinlich betrachtet, da bisher in Maus und Ratte kein MCHR2 nachgewiesen werden konnte und andere Säuger, wie Kaninchen und Meerschwein, nur funktionslose MCHR2 Pseudogene besitzen. Ein funktioneller MCHR2 konnte bisher nur beim Menschen, Rhesusaffen, Hund und Frettchen nachgewiesen werden (Tan *et al.* 2002).

Viele experimentelle Daten sprechen dafür, dass das MCH/MCHR1-System an der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiestoffwechsels maßgeblich beteiligt ist. So führt die *intracerebroventrikuläre (i.c.v.)* Injektion von MCH zur Erhöhung der Nahrungsaufnahme bei Ratten und Mäusen (Qu *et al.* 1996; Rossi *et al.* 1997). Die mRNAs von MCH und MCHR1 sind bei fastenden Mäusen, sowie den adipösen, Leptin-defizienten (*ob/ob*)-Mäusen, hochreguliert (Kokkotou *et al.* 2001; Qu *et al.* 1996). Nach gezieltem Ausschalten des *preproMCH*-Gens in Mäusen (*Pmch*^{-/-}), kommt es zur Hypophagie und einer erhöhten Stoffwechselrate, wodurch Körpergewicht und Fettgehalt der Tiere gesenkt werden (Shimada *et al.* 1998). Dagegen werden transgene Mäuse, die MCH überexprimieren, hyperphag und infolgedessen auch adipös (Ludwig *et al.* 2001). MCHR1 *Knockout*-Mäuse (*MCHR1*^{-/-}) haben eine reduzierte Fettmasse und zeigen einen schlanken Phänotyp. Gleichzeitig weisen sie eine erhöhte Nahrungsaufnahme auf, die aber durch eine ebenfalls verstärkte Stoffwechselrate und Hyperaktivität ausgeglichen wird (Chen *et al.* 2002; Marsh *et al.* 2002). Mittlerweile sind verschiedenen potente MCHR1-Antagonisten entwickelt worden, die effektiv die MCH-induzierte Nahrungsaufnahme hemmen und im Tierversuch zum Teil antidepressive und angstauflösende Wirkungen haben (Borowsky *et al.* 2002; Takekawa *et al.* 2002).

In die Regulation des Energiehaushalts sind die MCH-Neurone praktisch als Neurone zweiter Ordnung eingegliedert. Aus der Peripherie gelangen hormonelle Signale über den Energiebedarf des Körpers zunächst zum *Nucleus arcuatus* im Hypothalamus, der als primäre Schaltstelle der Energiehomöostase gilt. Bei abnehmenden Energiebedarf wird aus dem Fettgewebe das Sättigungshormon Leptin, und aus dem

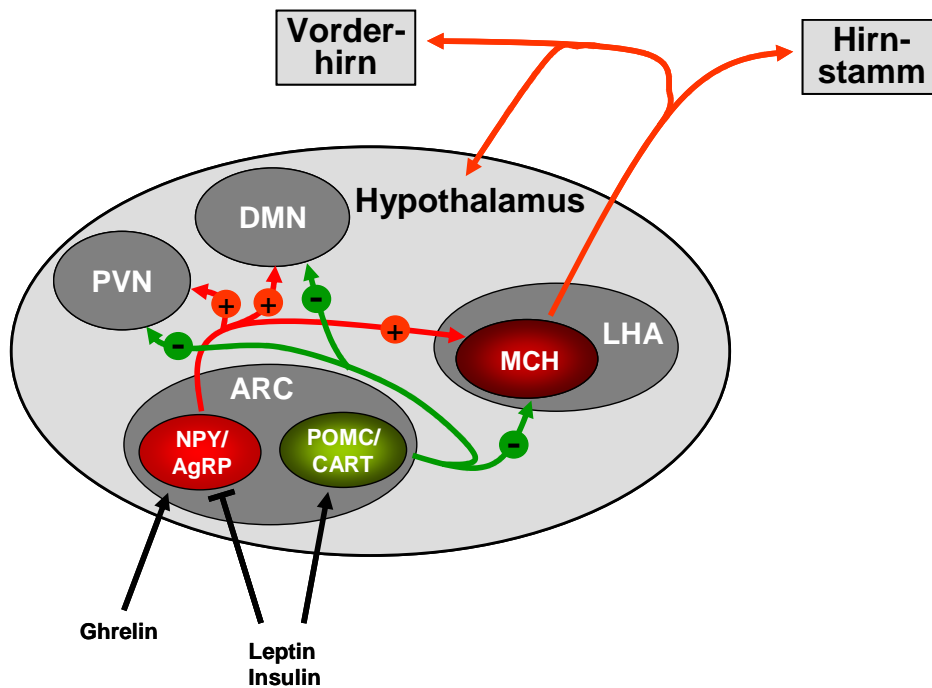


Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung des Kontrollsystems der Nahrungsaufnahme im Hypothalamus (Kawano et al. 2002).

(ARC: *Nucleus arcuatus*, LHA: *lateral hypothalamic area*, PVN: paraventriculärer Nucleus, DMN: dorsomedialer Nucleus; weitere Erklärungen s. Text)

Pankreas Insulin sezerniert. Beide Hormone wirken im *Nucleus arcuatus* auf zwei verschiedene Populationen von Neuronen ein, die gegensätzliche Signale weiterleiten (Baskin et al. 1999). Anabole Signalwege werden dabei von Neuronen gebildet, die die orexigenen Neuropeptide NPY (*neuropeptide Y*) und AgRP (*Aguti related peptide*) exprimieren (Broberger et al. 1998; Hahn et al. 1998), während die katabolen Signale von POMC¹ (*Proopiomelanocortin*) und CART (*cocain- and amphetamine-regulated transkript*) exprimierenden Neuronen erzeugt werden (Elias et al. 1998a; Kristensen et al. 1998). Entsprechend werden NPY/AgRP-Neurone von Leptin und Insulin inhibiert, während POMC/CART-Neurone stimuliert werden. Ghrelin ist ein weiteres orexigenes Hormon, das vom Magen sezerniert wird und die NPY/AgRP-Neurone stimuliert (Nakazato et al. 2001). Die Neurone des *Nucleus arcuatus* projizieren in weitere Kerne des Hypothalamus, u.a. auch in den lateralen Hypothalamus, wo sie die MCH-Neurone innervieren (Elias et al. 1998b). Bei steigendem Nahrungsbedarf werden der Leptin- und der Insulin-Spiegel herunterreguliert. Durch die verringerte Stimulierung der POMC/CART-Neurone und

¹ POMC ist das Vorläuferprotein der Melanocortine. Es kodiert die Peptide α -, β -, γ -MSH, ACTH und β -Endorphin (Hadley et al. 1996). Davon ist α -MSH das wichtigste anorexigene Peptid (Tritos et al. 1999).

die abnehmende Hemmung der NPY/AgRP-Neurone, kommt es zur Aktivierung der MCH-Neurone. Über die vielfältigen Projektionen der MCH-Neurone in das gesamte Gehirn werden schließlich die Signale zur Nahrungsaufnahme vermittelt (Abbildung 2).

1.2 Molekulare Eigenschaften des MCH-Rezeptor 1

Der MCHR1 ist am engsten verwandt mit den Opioid- und Somatostatin-Rezeptoren aus der Rhodopsin-Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese bestehen aus sieben α -helikalen Transmembrandomänen, sowie einer extrazellulären N-terminalen Domäne und einem intrazellulären C-Terminus (Palczewski *et al.* 2000). Die sieben Transmembrandomänen bilden im Rezeptormolekül einen zentralen Kern und werden von je drei intra- bzw. extrazellulären Schleifen verbunden (Bockaert *et al.* 1999). Der MCHR1 besteht aus 353 Aminosäuren und ist in seiner Aminosäuresequenz über die Spezies Maus, Ratte, Mensch, Hund, Affe und Frettchen mit einer Identität > 96% hoch konserviert (Lakaye *et al.* 1998; Saito *et al.* 2000; Tan *et al.* 2002). Das MCHR1-Gen von Ratte und Mensch enthält ein Intron im 5'-Bereich der kodierenden Region (Lakaye *et al.* 1998; Saito *et al.* 2000). Der extrazelluläre N-Terminus des Proteins weist drei N-Glykosylierungsstellen auf, die alle glykosyliert vorliegen. Dabei ist besonders die Glykosylierung von Asp²³ für die korrekte Oberflächenexpression, Ligandenbindung und Signaltransduktion wichtig (Saito *et al.* 2003).

Viele GPCRs der Rhodopsin-Familie enthalten etwa 10 bis 15 Aminosäuren hinter der 7. Transmembrandomäne einen oder mehrere Cysteinreste, die post-translational acyliert werden können (Morello *et al.* 1996) und dadurch in der Membran verankert werden (Moench *et al.* 1994). Dabei entsteht eine vierte intrazelluläre Schleife, die eine amphipathische α -Helix parallel zur Membran ausbildet (Palczewski *et al.* 2000). Diese Struktur wird allgemein als Helix 8 der G-Protein gekoppelten Rezeptoren bezeichnet und ist eine Bindungsstelle der G-Proteine (Ernst *et al.* 2000; Marin *et al.* 2000). Der MCHR1 enthält allerdings keine Cysteinreste in einer entsprechenden Position. Es gibt aber Spekulationen, dass ein Prolin-Rest in dem entsprechenden Bereich (Pro³²⁸) als Helixbrecher wirken könnte und das Ende der Helix 8 des MCHR1 definiert (Murdoch *et al.* 2004). Computer-Modelle sagen für diesen Bereich zudem die Struktur einer amphipathischen α -Helix voraus (Tetsuka *et al.* 2004).

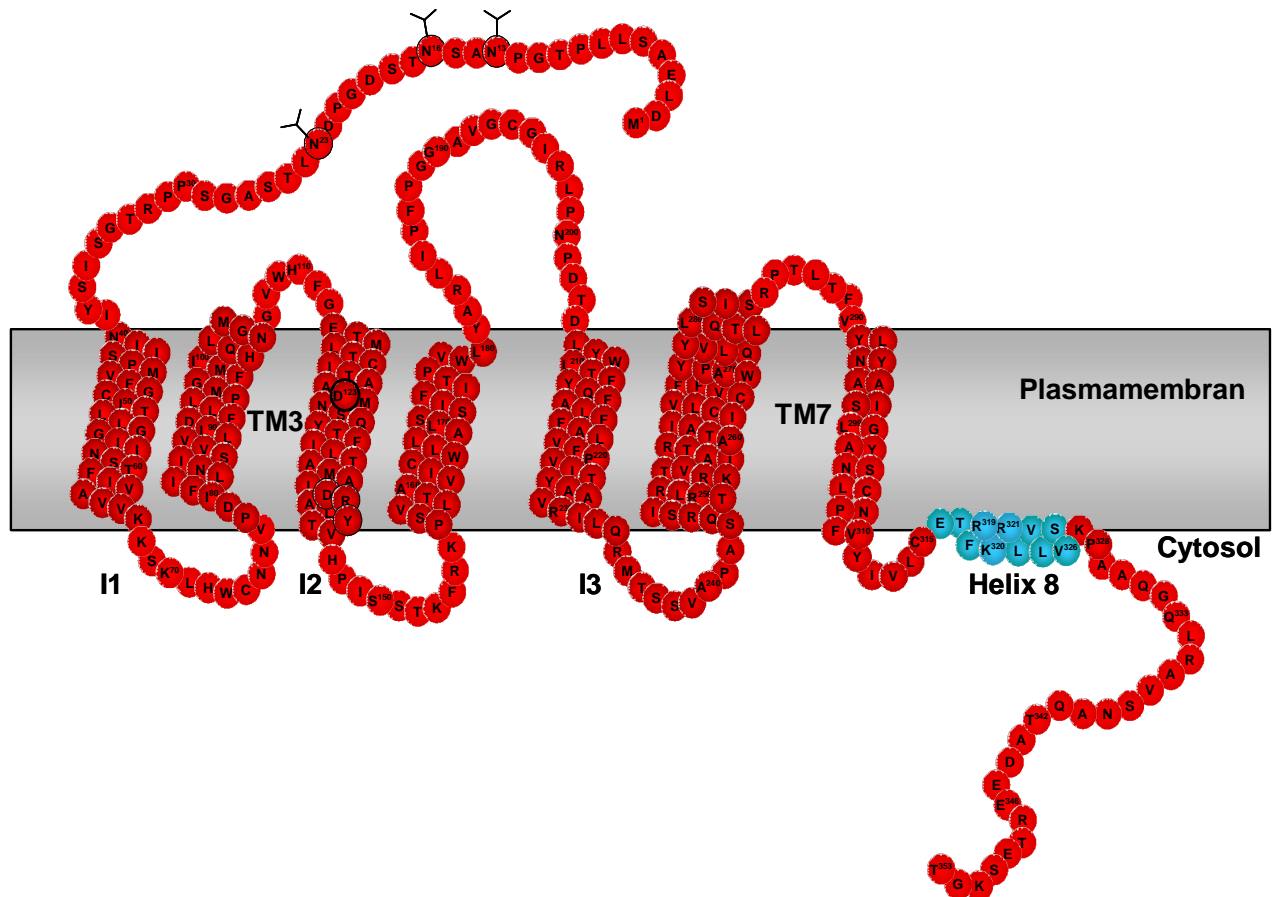


Abbildung 3: Struktur des MCHR1

Es ist schematisch die Struktur des MCHR1 mit seiner Aminosäuresequenz gezeigt. Die sieben Transmembrandomänen (TM) durchspannen die Plasmamembran. Der extrazelluläre N-Terminus ist an den Positionen N¹³, N¹⁶ und N²³ glykosyliert. Die intrazellulären Schleifen werden mit I1, I2 und I3 bezeichnet. Die putative Helix 8 ist blau markiert. In der TM3 ist die, für die Ligandenbindung verantwortliche Aminosäure Asp¹²³, hervorgehoben.

1.3 Signaltransduktion des MCHR1

Die klassische Signaltransduktion von G-Protein gekoppelten Rezeptoren erfolgt über die Aktivierung heterotrimerer G-Proteine. Zunächst führt die Bindung des Liganden zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die die Bindung und Aktivierung der G-Proteine ermöglicht. Dafür bilden die dritte und vierte Transmembrandomäne (TM) eine Vertiefung aus, in der die Bindung des Liganden erfolgt. Bei Peptidrezeptoren stellen die extrazellulären Schleifen und der N-Terminus zusätzliche Bindungsstellen für die größeren Liganden zur Verfügung (Bockaert *et al.* 1999). Ein konservierter Asp-Rest in der TM3 spielt für die Ligandenbindung und

Rezeptoraktivierung eine besondere Rolle. Beim MCHR1 scheint dieses Asp¹²³ eine direkte Interaktion mit dem Arg¹¹ von MCH einzugehen (Macdonald *et al.* 2000).

G-Protein gekoppelte Rezeptoren können an eine oder mehrere Klassen von heterotrimeren G-Proteinen koppeln und so verschiedene Signalwege aktivieren. Die heterotrimeren G-Proteine setzen sich aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammen und werden nach dem, von der α -Untereinheit definierten Signalweg, in die vier Klassen G_s , $G_{i/o}$, G_q und $G_{12/13}$ eingeteilt. Stimulatorische G_s -Proteine aktivieren die Adenylat-Cyclase und erhöhen so den cAMP-Spiegel. Inhibitorische $G_{i/o}$ -Proteine wirken entgegengesetzt und hemmen die Adenylat-Cyclase. Zudem aktivieren $G_{i/o}$ -Proteine über ihre $\beta\gamma$ -Untereinheit die PLC- β , GIRK-Kanäle und die Phosphatidylinositol-3-Kinase. Die Signaltransduktion von $G_{i/o}$ -Proteinen wird von Pertussistoxin (PTX) gehemmt, da die $G_{\alpha_{i/o}}$ -Untereinheit von PTX ADP-ribosyliert wird, wodurch eine Interaktion mit dem Rezeptor verhindert wird. G_q -Proteine aktivieren die Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. Dies führt zur Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ und Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). $G_{12/13}$ -Proteine sind an der Regulation von Na⁺/H⁺-Austauschern beteiligt (Hamm 1998; Neves *et al.* 2002).

Im inaktiven Grundzustand bindet die G_{α} -Untereinheit ein GDP-Molekül und ist fest mit dem β/γ -Komplex assoziiert. Die Bindung des heterotrimeren G-Proteins an einen aktivierten Rezeptor bewirkt den Austausch von GDP gegen GTP. Daraufhin dissoziieren die α -Untereinheit und der β/γ -Komplex und aktivieren jeweils die nachfolgenden Signalwege (Wong 2003). Der aktivierte GPCR übernimmt dabei die Funktion des GEFs (*Guanine-Nucleotide exchange factor*) gegenüber der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins (Pierce *et al.* 2002).

In vitro koppelt der MCHR1 an mehrere G-Proteine und aktiviert verschiedene Signalwege. So wurde in MCHR1-exprimierenden Zellen gezeigt, dass MCH die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion hemmt, die MAP-Kinasen *ERK1/2* aktiviert und die Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ induziert (Chambers *et al.* 1999; Hawes *et al.* 2000; Lembo *et al.* 1999; Macdonald *et al.* 2000; Pissios *et al.* 2003; Saito *et al.* 1999; Shimomura *et al.* 1999). Dabei lassen sich die Inhibierung der cAMP-Produktion und die MAPK-Aktivierung vollständig durch PTX aufheben (Hawes *et al.* 2000). Die Freisetzung von intrazellulärem Calcium wird hingegen von Pertussistoxin

nur verringert, aber nicht vollständig unterdrückt. Das gleiche gilt auch für die MCH induzierte IP_3 -Produktion. Es wird daher davon ausgegangen, dass MCHR1 sowohl über PTX-sensitive $G_{i/o}$ - als auch über PTX-insensitive G_q -Proteine intrazelluläres Calcium mobilisiert (Hawes *et al.* 2000). G_q - und G_i -Proteine aktivieren unterschiedliche Isoformen der Phospholipase C, die jeweils eine Erhöhung der IP_3 -Produktion bewirken (Blank *et al.* 1992; Katz *et al.* 1992). Eine Kopplung von MCHR1 an $G_{i/o}$ -Proteine wurde auch in *Xenopus Oozyten* beobachtet. Wenn der MCHR1 zusammen mit dem G-Protein gekoppelten Kalium-Kanal GIRK in *Xenopus Oozyten* exprimiert wurde, konnte ein MCH-induzierter, PTX-sensitiver Einstrom von K^+ -Ionen gemessen werden (Bächner *et al.* 1999). Zumindest in diesen heterologen Expressionssystemen koppelt also der MCHR1 an $G_{i/o}$ und G_q -Proteine, um die cAMP-Produktion zu inhibieren, MAPK und GIRK zu aktivieren, sowie intrazelluläres Calcium freizusetzen (Abbildung 4).

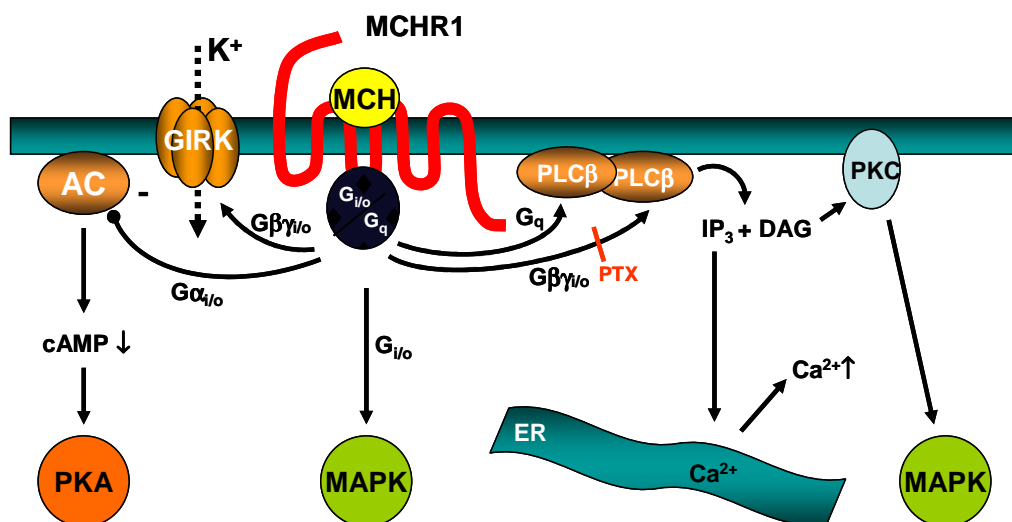


Abbildung 4: Signaltransduktion des MCHR1

Der MCHR1 koppelt über $G_{i/o}$ - und G_q -Proteine. Über $G_{i/o}$ wird die Adenylat-Cyclase (AC) gehemmt, was den cAMP-Spiegel senkt und schließlich die Proteinkinase A (PKA) inhibiert. $G_{i/o}$ aktiviert den GIRK-Kaliumkanal und MAP-Kinase (MAPK) Signalwege. Über Aktivierung der Phospholipase C (PLC) ist $G_{i/o}$ für den PTX-sensitiven Anstieg von Inositoltriphosphat (IP_3) und intrazellulärem Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) verantwortlich. Über G_q und die $PLC\beta$ wird der PTX-insensitive Teil der IP_3 - und Ca^{2+} -Aktivierung vermittelt.

In Zellsystemen, die den MCHR1 endogen exprimieren, konnte bisher allerdings nur eine $G_{i/o}$ -gekoppelte Signaltransduktion beobachtet werden. In humanen Melanom- und Neuroblastom-Zelllinien wurde gezeigt, dass MCH die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion hemmt und ERK1/2 aktiviert. Beide Effekte sind vollständig durch PTX hemmbar. Es wurde jedoch keine Mobilisierung von intrazellulärem Calcium

beobachtet (Saito *et al.* 2001b; Schlumberger *et al.* 2002). Auch in der murinen Adipozyten-Zelllinie 3T3-L1 ist MCHR1 endogen exprimiert und stimuliert PTX-sensitiv ERK1/2 (Bradley *et al.* 2002). In primären Neuronenkulturen aus dem lateralen Hypothalamus wurde über elektrophysiologische Messungen ein inhibitorischer Effekt von MCH auf die synaptische Aktivität von glutamatergen und GABAergen Neuronen gezeigt, der ebenfalls vollständig durch PTX aufgehoben werden konnte (Gao *et al.* 2001).

1.4 Bedeutung des intrazellulären C-Terminus

Dem intrazellulären C-Terminus der G-Protein gekoppelten Rezeptoren kommt eine besondere Bedeutung bei vielen Funktionen der Rezeptoren zu. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die spezifisch an den C-Terminus bestimmter Rezeptoren binden und an der korrekten subzellulären Lokalisation, der Feinregulierung der Signaltransduktion, sowie der Desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren beteiligt sind (Bockaert *et al.* 2004).

Die Desensibilisierung von GPCRs erfolgt in der Regel über die Phosphorylierung von Thr- und Ser-Resten im C-Terminus oder den intrazellulären Schleifen des Rezeptors durch spezifische GPCR-Kinasen (*GRKs*) oder *second-messenger Kinasen* wie PKA und PKC. Die Phosphorylierung ermöglicht die Bindung eines β -Arrestin-Moleküls an den Rezeptor, das eine sterische Behinderung der Interaktion von Rezeptor und G-Protein bewirkt und so die Signaltransduktion unterdrückt. Das gebundene β -Arrestin vermittelt weiterhin die Internalisierung des Rezeptors durch Clathrin-abhängige Endocytose, indem es direkt mit der schweren Ketten von Clathrin und mit dem Adapterprotein AP-2 interagiert und so den Rezeptor zu *Clathrin-coated pits* in der Zellmembran dirigiert. Die *Clathrin-coated pits* werden dann unter Einwirkung der großen GTPase Dynamin als Vesikel von der Zellmembran abgeschnürt und transportieren den Rezeptor zum Recycling oder zur Degradierung in endosomale bzw. lysosomale Kompartimente (Pierce *et al.* 2002). Es kann aber auch zu anderen Internalisierungs-Prozessen kommen, die ohne Beteiligung von β -Arrestin oder Dynamin, sondern über *Caveolae* oder nicht umhüllte Vesikel, ablaufen (Ferguson 2001; Pierce *et al.* 2002).

Viele G-Protein gekoppelte Rezeptoren besitzen in ihrem äußersten C-Terminus ein Bindemotiv für PDZ-Domänen und binden darüber an entsprechende Proteine mit PDZ-Domänen. So bindet z.B. der *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor* (NHERF) über seine PDZ-Domänen den C-Terminus des β_2 -Adrenergen Rezeptors und des κ -Opioidrezeptors und beschleunigt das Recycling der internalisierten Rezeptoren und reguliert ligandenabhängig den zellulären pH-Wert (Cao *et al.* 1999; Hall *et al.* 1998). Das Protein PSD-95 (*Post-synaptic-density protein* von 95kDa) bindet hingegen über eine PDZ-Domäne den β_1 -Adrenergen Rezeptor und unterdrückt durch die Interaktion dessen Recycling-Prozess (Hu *et al.* 2000). PSD-95 ist zudem, wie das Protein SSTRIP/Shank1, ein Multi-Domänen-Protein in der Postsynaptischen Dichte (PSD) von excitatorischen Synapsen. Beide Proteine wirken als Gerüstproteine, indem sie die Rezeptoren über eine Vielzahl von Protein-Interaktionen mit weiteren Faktoren wie Adhäsionsproteine, Signaltransduktionsmoleküle und Cytoskelett-Komponenten in der PSD in eine funktionell wichtige räumliche Nähe bringen (Kennedy 2000; Sheng *et al.* 2000). G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die an die PDZ-Domäne von SSTRIP binden, sind z.B. der Somatostatinrezeptor 2 und die *Calcium-independent receptors for latrotoxin* C1RL1 und C1RL2 (Kreienkamp *et al.* 2002; Kreienkamp *et al.* 2000; Zitzer *et al.* 1999). Es sind aber auch andere Proteindomänen an der Bindung von GPCRs beteiligt. So binden weitere Strukturproteine der Postsynapse, die *Homer* Proteine, über ihre *enabled/VASP homology*-(EVH)-ähnliche Domäne an eine Konsensus-Sequenz (-PPxxFR-) in den C-Termini der metabotropen Glutamat-Rezeptoren *mGluR1a* und *mGluR5a,b* und vernetzen diese Rezeptoren über weitere Protein-Interaktionen mit den SSTRIP- und PSD-95-Proteinkomplexen, sowie diversen Ionenkanälen (Bockaert *et al.* 2004). Andere Protein-Interaktionen werden von GPCRs über die sogenannte Helix 8 vermittelt. Hier bindet z.B. beim metabotropen Glutamat-Rezeptor 7 der Komplex Ca^{2+} /Calmodulin (O'Connor *et al.* 1999) und beim μ -Opioid-Rezeptor das Protein Periplakin. Letzteres inhibiert dadurch die Aktivierung des G-Proteins (Feng *et al.* 2003).

1.5 MCHR1 interagierende Proteine

Um für den MCHR1 solche Proteine zu identifizieren, die an den C-Terminus des Rezeptors binden, wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet. Dabei wurde

jeweils der gesamte C-Terminus, einschließlich eines Teils der 7. Transmembrandomäne, als Köder eingesetzt und aus einer humanen Gehirn-cDNA-Bibliothek drei potentielle Interaktionspartner für den MCHR1 isoliert. Dabei handelt es sich um die Proteine Periplakin und MIZIP, deren Bindung an den MCHR1 bereits verifiziert und weiter untersucht wurde (Bächner *et al.* 2002; Murdoch *et al.* 2004), sowie um das Protein Neurochondrin (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe), dessen weitere Untersuchung Bestandteil dieser Arbeit ist.

1.5.1 Periplakin (PPL)

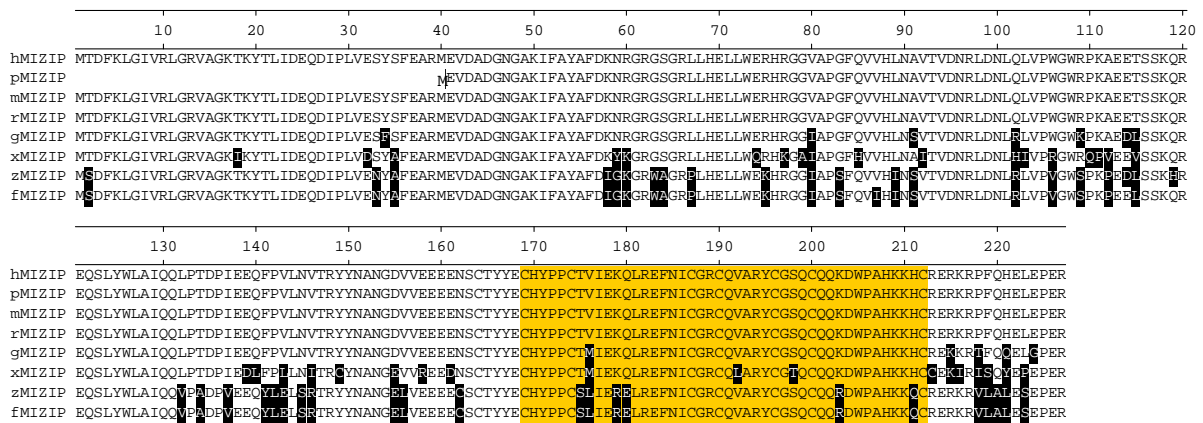
Periplakin (PPL) wurde bereits als Interaktionspartner des μ -Opioid-Rezeptors identifiziert (Feng *et al.* 2003). Es ist ein Vertreter der Plakin-Proteinfamilie und wurde eingehend in Keratinocyten untersucht, wo es als Gerüstprotein an der Bildung des *cornified envelope* beteiligt ist (Ruhrberg *et al.* 1997). Es besteht aus einer N-terminalen globulären Domäne, die an Actin binden kann (DiColandrea *et al.* 2000), einer zentralen *Rod*-Domäne, über die eine Homodimerisierung oder Heterodimerisierung mit anderen Plakinen wie Envoplakin erfolgt (Ruhrberg *et al.* 1997) und einer globulären C-terminalen Domäne, die eine Interaktion mit dem Intermediärfilament vermittelt und an die Proteinkinase B binden kann (van den Heuvel *et al.* 2002). Obwohl PPL bisher fast nur in der Haut untersucht wurde, zeigen auch einige Studien, dass es in weiten Bereichen des Gehirns exprimiert ist, einschließlich der Regionen, die den μ -Opioid-Rezeptor und den MCHR1 exprimieren (Aho *et al.* 1998; Feng *et al.* 2003; Murdoch *et al.* 2004). So wurde eine überlappende Expression der mRNAs von PPL und MCHR1 im Hippokampus und Cerebellum von jugendlichen und adulten Ratten beobachtet, sowie die Kolokalisation beider Proteine in Purkinjezellen des Cerebellums, in Pyramidenzellen im Hippokampus, sowie in Neuronen des piriformen Cortex und der Amygdala gezeigt (Murdoch *et al.* 2004). Über die genaue Funktion der Interaktion von Periplakin mit dem MCHR1 oder dem μ -Opioid-Rezeptor ist noch nichts bekannt.

1.5.2 MIZIP (MCHR1 interacting zinc-finger protein)

MIZIP war bis zu seiner Identifizierung als Interaktionspartner von MCHR1 ein vollkommen unbekanntes Protein (Bächner *et al.* 2002). Die Sequenzanalyse ergab, dass MIZIP ein kleines Protein aus 227 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 27 kDa ist. Es besitzt im C-terminalen Bereich eine *MYND*-Zinkfinger-Domäne, zeigt aber sonst keinerlei Homologie zu anderen bekannten Proteinen. Die *MYND*-

Zinkfinger-Domäne ist eine evolutionär konservierte Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die ursprünglich in den nuklearen Protoonkogenen *Myeloid translocation protein 8* (MTG8/ETO), *Nervy* und *DEAF-1* gefunden wurde, die an der Regulation der Gentranskription beteiligt sind (Feinstein *et al.* 1995; Gross *et al.* 1996; Lutterbach *et al.* 1998). Es sind mittlerweile über 100 *MYND*-Domänen Proteine identifiziert worden, über deren genaue Funktion jedoch kaum etwas bekannt ist.

A



MYND-Zinkfinger-Domäne

B

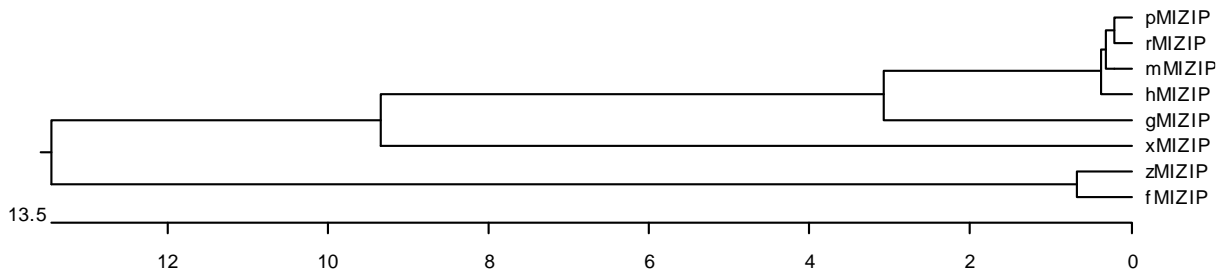


Abbildung 5: Sequenz-Vergleich der MIZIP-Orthologen

A: Die MIZIP-Aminosäuresequenzen von Mensch (h), Schwein (p), Maus (m), Ratte (r), Gans (g), Krallenfrosch (x), Zebra- (z) und Fugufisch (f) wurden mit der Software *Megalign* (Lasergene) verglichen. Aminosäuren, die sich von der humanen Sequenz unterscheiden, sind schwarz hinterlegt.
B: Phylogenetischer Stammbaum der MIZIP-DNA-Sequenzen. Die Skala bezeichnet die evolutionäre Distanz in Jahrmmillionen.

MIZIP-Orthologe wurden bisher bei Mensch, Schwein, Maus, Ratte, Gans, Krallenfrosch, Zebra- und Fugufisch identifiziert. Die Aminosäuresequenzen der Säuger-Orthologe sind untereinander zu 100% identisch und zu 84% bzw. 81% identisch mit den Sequenzen aus Krallenfrosch und Fisch, sowie zu 94% identisch mit der Sequenz der Gans (Abbildung 5). Es konnten bisher keine MIZIP-Orthologe

in Invertebraten entdeckt werden. Die hohe Konservierung von MIZIP lässt auf eine bedeutende physiologische Funktion des Proteins schließen (Bächner *et al.* 2002).

Auch die Genorganisation von MIZIP ist zwischen Mensch und Maus konserviert. Beide Gene bestehen aus 6 Exons und haben identische Spleißstellen. In der Maus wurde allerdings ein zusätzliches Exon 1b identifiziert, das kein Startkodon enthält. Alternatives Einspleißen von Exon 1b würde einen alternativen Leserahmen mit einem Startkodon in Exon 3 erzeugen, so dass ein N-terminal um 39 Aminosäuren verkürztes MIZIP von 22kDa entstehen würde.

Northernblotanalysen und RNA *in situ*-Hybridisierung zeigen für MIZIP eine ubiquitäre Expression sowohl in peripheren Geweben als auch in weiten Bereichen des Gehirns (Bächner *et al.* 2002).

Die Interaktion von MIZIP mit dem C-Terminus von MCHR1 wurde über *GST-Pulldown*-Experimente, *Overlay-Assays*, sowie über Koimmunpräzipitation aus transfizierten Zellen verifiziert und die Kolo-kalisation beider Proteine in diesen Zellen gezeigt (Bächner *et al.* 2002; Murdoch *et al.* 2004). Die Funktion von MIZIP ist bisher vollkommen unbekannt.

1.5.3 Neurochondrin (NCDN)

Neurochondrin ist das humane Ortholog des Proteins Norbin der Ratte und wurde ursprünglich als Faktor isoliert, der nach Behandlung von Rattengehirnschnitten mit Tetraethylammonium (TEA) zur Induzierung von LTP (*long-term potentiation*) hochreguliert wird und daher in Zusammenhang mit Lern- und Gedächtnisvorgängen gesehen wird (Shinozaki *et al.* 1997). NCDN ist ausschließlich in neuronalen Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems, sowie im Knorpel- und Knochengewebe exprimiert (Ishiduka *et al.* 1999; Mochizuki *et al.* 1999). In Neuronen wurde eine somatodendritische Lokalisierung beschrieben. Nach Überexpression in der Neuroblastomzelllinie *Neuro2A* bewirkt NCDN ein verstärktes Neuritenwachstum (Shinozaki *et al.* 1999; Shinozaki *et al.* 1997).

NCDN besteht aus 729 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 79kDa. Die Aminosäuresequenz des humanen NCDN ist zu 98% identisch mit dem Maus- und Ratten-NCDN (Mochizuki *et al.* 1999). Es zeigt keine bekannten funktionellen Domänen oder Homologien zu anderen Proteinen (Shinozaki *et al.* 1997).

Für NCDN wurde eine Protein-Interaktion mit dem cytoplasmatischen Teil von *Semaphorin 4c* (Sema4c) beschrieben, einem Transmembran-Semaphorin, dem eine

Beteiligung an der Axon-Zielsteuerung und Synapsenbildung zugesprochen wird (Ohoka *et al.* 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass Phosphatidsäure, ein Hydrolyseprodukt der Phospholipase D, an Neurochondrin binden kann (Ktistakis *et al.* 2003). Die funktionellen Hintergründe dieser Interaktionen sind jedoch noch vollkommen unklar. NCDN scheint eine essentielle Rolle in der frühen Embryonalentwicklung zu spielen, da das gezielte Ausschalten des NCDN-Gens in der Maus zum frühen embryonalen Tod führt (Mochizuki *et al.* 2003). Eine kürzlich publizierte konditionale *Knock-Out*-Maus, bei der NCDN ausschließlich im Gehirn ausgeschaltet wurde, ist hingegen lebensfähig und zeigt ein stark eingeschränktes Lernvermögen. Dies wird auf eine gesteigerte Aktivität der CamKII (*Ca/Calmodulin dependent protein kinase II*), infolge einer verstärkten Phosphorylierung des Enzyms, zurückgeführt. Es wird daher vermutet, dass NCDN als negativer Regulator der CamKII wirkt und so Einfluss auf LTP, synaptische Plastizität und das Lernverhalten nimmt. Dabei konnte aber kein Einfluss von NCDN auf das Neuritenwachstum oder die neuronale Zelldifferenzierung festgestellt werden. (Dateki *et al.* 2005)

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Der MCH-Rezeptor 1 ist maßgeblich an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt. Die genauen molekularen Vorgänge, die dabei von dem MCHR1 bewirkt werden, sind bei weitem noch nicht verstanden. Aus Studien an anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren weiß man, dass der intrazelluläre C-Terminus eine besondere Bedeutung bei der Regulierung dieser Vorgänge haben kann. Es wurde daher in Vorarbeiten zu dieser Arbeit nach Proteinen gesucht, die spezifisch an den C-Terminus von MCHR1 binden. Dabei konnten die Proteine MIZIP und Neurochondrin als potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Eine weiterführende Charakterisierung der Interaktionen von MIZIP und NCDN mit dem MCHR1 ist Gegenstand dieser Arbeit.

Für die Untersuchungen des bisher unbekanntes Proteins MIZIP sollten zunächst spezifische Antiseren hergestellt werden, um die Expression des nativen Proteins erstmals auch auf Proteinebene analysieren zu können. Mit den Antiseren sollten dann immunocytochemische und immunhistochemische Untersuchungen von kultivierten Neuronen und an Gehirnschnitten von Ratten erfolgen. Zur weiteren Charakterisierung dieses Proteins sollten mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System und über Affinitätschromatographie neue Interaktionspartner von MIZIP identifiziert werden, um so Hinweise auf seine Funktion zu erlangen.

Die, mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierte, potentielle Interaktion von NCDN mit dem MCHR1 war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht weiter untersucht worden. Daher sollte die Bindung von NCDN zunächst unter Einsatz rekombinanter Fusionsproteine mit *GST-Pulldown*- und Koimmunpräzipitations-Experimenten verifiziert werden. Zur Bestimmung der Domänen, die die Interaktion vermitteln, sollten Hefe-Interaktionsstudien mit Deletionsvarianten von NCDN und MCHR1 durchgeführt werden.

Anschließend sollten mögliche Einflüsse von NCDN und MIZIP auf die Signaltransduktion und Internalisierung des MCH-Rezeptors untersucht werden, um Hinweise auf die Bedeutung dieser MCHR1-interagierenden Proteine auf die physiologischen Funktionen des MCH-Rezeptor 1 zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Standardchemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) in p.A. Qualität bezogen.

2.2 Bakterienstämme, Hefestämme, Zelllinien

	Name	Hersteller
Bakterienstämme	<i>E.coli</i> TopF10	Invitrogen, Karlsruhe
	<i>E.coli</i> BL21DE3	Stratagene, Darmstadt
Hefestämme	<i>S.cerevisiae</i> CG1945	Clontech, Heidelberg
	<i>S.cerevisiae</i> AH109	
Zelllinien	HEK293	ATCC, Rockville, USA
	COS7	

2.3 Vektoren

	Name	Hersteller
Klonierungsvektoren	pCR [®] II-TOPO [®]	Invitrogen, Karlsruhe
	pGEM [®] -T Easy	Promega, Mannheim
Prokaryotische Expressionsvektoren	pGex-4T2	Amersham Bioscience
	pGex-6P1	Amersham Bioscience
	pQE30	Qiagen, Hilden
Hefe-Expressionsvektoren	pAS2.1	Clontech, Heidelberg
	pACT2	Clontech, Heidelberg
	pGBKT7	Clontech, Heidelberg
Eukaryotische Expressionsvektoren	pCDNA3.1-T7	(Roth <i>et al.</i> 1997)
	pCDNA3.1-MycHis	Invitrogen, Karlsruhe
	pCDNA6-MycHis	Invitrogen, Karlsruhe
	pEGFP-C1	Clontech, Heidelberg
	pSTAG	H.J.Kreienkamp, Hamburg
<i>Xenopus</i> Expressionsvektoren	pIRES-hrGFP-2a	Clontech, Heidelberg
	pGemHE	(Liman <i>et al.</i> 1992)

2.4 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden im Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (UKE, Hamburg) mit einem DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems) hergestellt. Die Oligonukleotide wurden in H₂O aufgenommen, die Konzentration bestimmt (2.8.10) und Verdünnungen mit 10

pmol/μl bei -20°C gelagert. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang dargestellt.

2.5 Peptide

Peptid	Bezugsquelle	Sequenz
MCH	Bachem, Weil am Rhein	H-Asp-Phe-Asp-Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val-OH
SST14	Bachem, Weil am Rhein	H-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH
GKAP	Genemed Synthesis Inc., San Francisco	H-Ile-Tyr-Ile-Pro-Glu-Ala--Gln-Thr-Arg-Leu-OH
MIZIP	Pineda, Berlin	H-Lys-Arg-Pro-Phe-Gln-His-Glu-Leu-Glu-Pro-Glu-Arg-OH

2.6 Antikörper

2.6.1 Primär-Antikörper

Name	Wirt	Verwendete Verdünnung		Hersteller
		Westernblot	Cytochemie	
Anti-T7	Maus	1:5000	1:5000	Novagen, Darmstadt
Anti-Myc	Maus	1:2000	1:1000	Sigma, Taufkirchen
Anti-EGFP	Maus	1:2000		BabCO, Freiburg
Anti-GM130	Maus	-	1:250	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-His	Maus	1:1000	-	Qiagen, Hilden
Anti-MCHR1	Kaninchen	1:1000	1:1000	BioTrend, Köln
Anti-MCHR1z	Ziege	-	1:200	Santa Cruz Biotech
Anti-NOR-C	Kaninchen	1:1000	1:1000	(Shinozaki <i>et al.</i> 1999)
Anti-NOR-N	Kaninchen	1:1000	1:1000	(Shinozaki <i>et al.</i> 1999)
Anti-MIZIP	Meerschwein	1:500	1:300	Pineda, Berlin
Anti-α/β-Tubulin	Maus	1:1000	1:1000	Abcam, Cambridge
Anti-β-Tubulin	Maus	1:1000	1:1000	Abcam, Cambridge
Anti-SSTRIP	Kaninchen	1:2000	-	(Zitzer <i>et al.</i> 1999)

2.6.2 Sekundär-Antikörper

Name	Wirt	Verwendete Verdünnung		Hersteller
		Westernblot	Cytochemie	
Anti-Maus-Cy TM 3	Ziege	-	1:600	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-Cy TM 3	Ziege	-	1:600	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-Cy TM 2	Ziege	-	1:600	Dianova, Hamburg
Anti-Meerschwein-FITC	Ziege	-	1:300	Dianova, Hamburg
Anti-Meerschwein-Cy TM 3	Esel	-	1:300	Dianova, Hamburg
Anti-Ziege-Cy2	Esel	-	1:200	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-HRP	Schaf	1:2500	-	Amersham Bioscience, Freiburg
Anti-Kaninchen-HRP	Esel	1:20000	-	Amersham Bioscience, Freiburg
Anti-Meerschwein-HRP	Ziege	1:5000	-	Dianova, Hamburg

2.7 Stammlösungen und Puffer

2.7.1 Proteaseinhibitoren – Stammlösungen

Bacitracin (1000x)	100 mg/ml in H ₂ O
Leupeptin (1000x)	10 mg/ml in H ₂ O
Pepstatin A (1000x)	1 mg/ml in Ethanol
PMSF (500x)	0,1 M in Isopropanol

2.7.2 Antibiotika – 1000x Stammlösungen

Ampicillin:	100 mg/ml
Kanamycin:	30 mg/ml
Tetracyclin:	15 mg/ml

2.7.3 sonstige Lösungen

TBS:	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-T:	0,1% Tween-20 in TBS
PBS:	8,8 mM Na ₂ HPO ₄ 0,7 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl
PBS-T:	0,5% Triton X-100 in PBS
IPTG (1000x):	5,6 %
X-Gal (1000x):	8% in DMSO

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

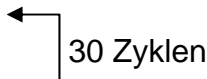
Die PCR wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Klonierung von Vektor-Konstrukten eingesetzt.

Für Standard-PCR-Ansätze wurde die *Taq-DNA-Polymerase* (Promega, Mannheim) verwendet. Ein typischer 50µl-Ansatz enthielt:

10-100 ng	DNA-Templete
50 pmol	je Primer
500 µM	je Desoxyribonukleotid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
1,5 mM	MgCl ₂
5 µl	10x Taq-Polymerase-Puffer (Promega, Mannheim)
5 U	Taq-Polymerase (Promega, Mannheim)

Die Reaktionen wurden in den PCR-Geräten *GeneAmp PCR System 2400 Thermocycler* (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim), *Mastercycler[®] gradient* (Eppendorf, Hamburg) oder *TGradient* (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Dabei wurde folgendes Programm verwendet:

Denaturierung	5 min	90°C	
Denaturierung	30 sec	90°C	
Primer Anlagerung	30 sec	T _m - 5°C *	
Elongation	1 min	72°C	
Elongation	10 min	72°C	
Stopp	∞	4°C	

*T_m: Schmelztemperatur der Primer (ermittelt mit *DNASTAR* Software)

2.8.2 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente aus PCR oder Restriktionsspaltungen wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden 1-2% Agarose (Invitrogen, Karlsruhe) in der gewünschten Menge 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, 0,2 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und im Gelträger bis zum Erstarren abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte dann in horizontalen Gelkammern in TAE-Laufpuffer bei 100V. Die DNA-Proben wurden zuvor mit 5x Agarosegel Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die aufgetrennten Banden wurden mit einer 356nm UV-Leuchtplatte (UVT 2035, Herolab) sichtbar gemacht und dokumentiert. Als Größenstandards wurden der λ -DNA/EcoRI+HindIII-Marker und Gene Ruler™ 100bp DNA-Ladder (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet.

TAE-Puffer:	100 mM Tris/Acetat, pH 8,0 5 mM EDTA
5x Agarosegel Ladepuffer:	40 mM Tris/HCl, pH 8,0 30% (w/v) Glycerol 0,25% (w/v) Bromphenolblau

2.8.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden das *QUIAEX II Agarose Gel Extraktion Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Die entsprechenden DNA-Banden wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend nach dem Protokoll des Herstellers weiterverarbeitet. Die Menge an isolierter DNA wurde anschließend photometrisch bestimmt (s. 2.8.10).

2.8.4 Restriktionsverdau von DNA

Zur Herstellung definierter DNA-Fragmente, wurden 1 bis 20 µg der entsprechenden DNA mit den gewünschten Restriktionsendonukleasen (Invitrogen, Karlsruhe; NEB, Bad Schwalbach; MBI Fermentas, St.Leon-Rot) und der entsprechenden Menge 10fach konzentrierten Reaktionspuffers (entsprechend der Enzym-Herstellerangaben) in 10-50µl Gesamtvolumen inkubiert. Je nach optimaler Enzymaktivität, wurde die Inkubation bei 37°C oder 25°C für 1-2h durchgeführt. Von jedem Enzym wurden etwa 0,5 U pro µg DNA eingesetzt. Die Spaltung der DNA wurde anschließend über Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.8.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmid-DNA wurden insgesamt 100-500ng beider DNAs in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 3:1 im entsprechenden Reaktionspuffer zusammengemischt und mit 1U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St-Leon-Rot) versetzt. Der Ansatz wurde anschließend über Nacht bei 16°C im Wasserbad oder für 1h bei RT, inkubiert .

2.8.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Für bestimmte Ligationen wurde die linearisierte Plasmid-DNA zuvor dephosphoryliert, um eine Religation des Plasmids zu unterdrücken. Dazu wurde 1U der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (Invitrogen, Karlsruhe) in den Restriktionsansatz der Plasmid-DNA gegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 65°C für 15min inaktiviert und die DNA entsprechend 2.8.2 und 2.8.3 aufgereinigt.

2.8.7 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen

Nach diesem Protokoll wurden *E.coli*-Zellen der Stämme Top10F' und BL21 kompetent zur Aufnahme von Plasmid-DNA gemacht:

5 ml LB-Medium mit Tetracyclin wurden mit einer Kolonie der entsprechenden Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurden dann 200 ml LB-Medium versetzt und bis zu einer Optischen Dichte (OD_{600}) von 0,4 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Durch Zentrifugation bei 5.000 rpm und 4°C in der Kühlzentrifuge (Sorvall A6 .14) für 5 min wurden die Zellen pelletiert und in 60 ml TFBI-Lösung (30 mM KOAc; 50 mM $MnCl_2$; 100 mM RbCl; 10 mM $CaCl_2$; 15% (v/v) Glycerol, pH 5,8) resuspendiert. Nach weiterer Zentrifugation (5.000 rpm; 4°C; 5 min) wurde das Pellet in 8 ml TF BII-Lösung (10 mM MOPS; 75 mM $CaCl_2$; 10 mM RbCl; 15% (v/v) Glycerol, pH 7,0) aufgenommen und in Aliquots von 200µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

LB-Medium:	10 g/L Bacto-Pepton 10 g/L NaCl 5 g/L Hefe-Extrakt pH 7,5
LB-Agarplatten:	10 g/L Bacto-Pepton 15 g/L Bacto-Agar 10 g/L NaCl 5 g/L Hefe-Extrakt pH 7,5

2.8.8 Transformation von *E.coli*-Zellen

100 µl kompetenter *E.coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 0,1 – 1,0 µg Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes (2.8.5) zugegeben. Die Zellen wurden weitere 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für eine Minute einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Je nach Bedarf wurden entweder 100 µl der Zellen (nach Retransformation von Plasmid-DNA) auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert oder der gesamte Transformationsansatz (nach Transformation einer Ligation) bei 6.000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die LB-Agarplatten wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert, bis sich gut sichtbare *E.coli*-Kolonien gebildet hatten.

2.8.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen

2.8.9.1 Minipräparation mittels alkalischer Lyse

Für eine Plasmid-Minipräparation wurden 4 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer transformierten *E.coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der Übernachtskultur bei 6.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und das Pellet in 300 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Durch Zugaben von 300 µl Puffer P2 (200 mM NaOH; 1% SDS) wurden die Zellen 5 min lysiert und anschließend mit 300 µl Puffer 3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert. Dabei ausfallende Zellbestandteile wurden bei 14.000 rpm für 15 min bei RT in der Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand abgenommen. Die darin enthaltene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt und 30 min bei 14.000 rpm und 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen und für ca. 10 min bei RT getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 50 µl H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.8.9.2 Midipräparation

Für die Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA (100-400 µg) wurde das *Nucleobond*[®] AX-Kit (Macherey und Nagel, Düren) verwendet.

100 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur wurden 20 min bei 3500 g zentrifugiert und aus dem Zellpellet die Plasmid-DNA entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert.

Die DNA wurde in 100 µl H₂O aufgenommen, die Konzentration photometrisch bestimmt (2.8.10) und auf 1 µg/µl eingestellt. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.8.10 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm im Biophotometer (Fa. Eppendorf) bestimmt. Dabei entspricht eine Extinktion von $E_{260} = 1$ einer DNA-Konzentration von 50 µg/µl. Durch Vergleich der Absorption bei 260 nm und 280 nm wurde zusätzlich die Reinheit der DNA überprüft. Es wurden nur DNA-Lösungen mit $E_{260}/E_{280} = 1,8 - 2,0$ für nachfolgende Anwendungen genutzt.

2.8.11 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden im Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (UKE, Hamburg) durchgeführt. Dazu wurden 0,5 - 1,0 µg DNA und 10 pMol des entsprechenden Primers in 12 ml H₂O gemischt und mit dem *Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Weiterstadt) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Das Verfahren entspricht der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977). Die Analyse der Reaktion erfolgte im *ABI Modell 377-Sequencer* (Applied Biosystems, Weiterstadt).

2.8.12 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus HEK293-Zellen wurde eine 10cm-Schale $\frac{3}{4}$ -konfluent gewachsener HEK293-Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und die Zellen in ein 15ml Falcon-Gefäß überführt. Nach wiederholtem Waschen mit PBS und Zentrifugieren bei 1000g in der Kühlzentrifuge wurde das Zellpellet unter Verwendung des *Invisorb Spin Cell-RNA Mini Kit* (Invitex, Berlin) entsprechend der Herstellerangaben lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Die Qualität der RNA wurde durch Elektrophorese im 1%igen Agarosegel überprüft und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.8.13 Herstellung von cDNA über Reverse Transkription

Für die RT-PCR wurden 7µg Gesamt-RNA (2.8.12) in 20µl DEPC-H₂O mit 1µl RNase-Inhibitor (MBI-Fermentas, St.Leon-Rot) und 2µl Poly(dT)-Primer (1µg/µl) versetzt und 10' bei 72°C inkubiert. Nach Abkühlen auf 4°C wurde ein Mix aus 8µl 5x RT-Puffer (MBI-Fermentas, St.Leon-Rot), 4µl 0,1M DTT und 2µl 10mM dNTP-Mix

zugegeben und 2' bei 42°C inkubiert. Danach wurden 2µl der AMV-Reversen Transkriptase (MBI-Fermentas, St.Leon-Rot) zugegeben, 90' bei 42°C inkubiert und abschließend 10' bei 92°C denaturiert. Zu jeweils einem Kontrollansatz wurde statt Reverser Transkriptase die gleiche Menge H₂O zugegeben. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.9 Hefe-Zwei-Hybrid-System

2.9.1 Transformation von Hefezellen

Zur Transformation von Hefezellen wurde eine Kolonie des gewünschten Hefestamms in 50ml YPDA-Medium suspensiert und bei 30°C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Kultur mit YPDA-Medium bis zu einer OD₆₀₀ = 0.2 verdünnt und erneut bei 30°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ = 0.5 - 0.6 erreicht wurde. Die Zellen wurden dann 5' bei 3000g pelletiert und einmal in 25ml H₂O gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 1ml 100mM Lithiumacetat resuspensiert und wieder bei 3000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500µl 100mM Lithiumacetat resuspensiert. Für jeden Transformationsansatz wurden von dieser Zellsuspension 50µl aliquotiert und die Zellen kurz pelletiert (15" bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge) und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 240µl 50% PEG (Polyethylenglykol) überschichtet, 36µl 1M Lithiumacetat, 50µl denaturierte Lachspermien-DNA (2mg/ml) und 5-10µg Plasmid-DNA zugegeben und mit H₂O auf 360µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden dann 1' gevortext und 30' bei 30°C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30' bei 42°C im Wasserbad und ein kurzes Pelletieren der Zellen bei 7000 rpm für 15" in der Tischzentrifuge. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200-500µl H₂O resuspensiert. Anschließend wurden 100-250µl der Zellsuspension auf geeignete SD-Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert.

Zur Herstellung der Selektionsplatten wurde dem normalen SD-Medium die entsprechende Menge eines Aminosäure-Selektionsmixes (Qbiogene, Heidelberg) zugegeben. Zur Selektion auf pAS- und pGBKT7-Vektoren wurde Tryptophan-Mangelmedium (SD-Trp), zur Selektion auf pACT-Vektoren Leucin-Mangelmedium (SD-Leu) und bei Kotransformationen entsprechendes -Trp/-Leu-Mangelmedium, verwendet. Zur Selektion auf Protein/Protein-Interaktionen wurde zusätzlich auf Histidin und Adenin im Selektionsmedium verzichtet (SD -Trp/-Leu/-His/-Ade).

YPDA-Medium:	20 g/L Difco-Pepton 10 g/L Hefe-Extrakt 2% (w/v) Glucose 0,003% Adenin pH 5,8
für Agarplatten zusätzlich:	20 g/L Bacto-Agar
SD-Medium:	6,7 g/L Difco-Stickstoff-Basis 2% (w/v) Glucose pH 5,8
für Agarplatten zusätzlich:	20 g/L Bacto-Agar

2.9.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

Zellen von *S.cerevisiae* AH109 wurden entsprechend 2.9.1 mit dem gewünschten Köderplasmid pAS2-MIZIP oder pGBKT7-MIZIP transformiert. Eine Kolonie der transformierten Hefen wurde in 500µl SD-Trp Medium resuspendiert, in 50ml SD-Trp Medium überführt und für 24h bei 30°C und 250rpm geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend bei 1000g für 5' zentrifugiert und das Pellet in 45ml 2xYPDA-Medium mit 15µg/ml Kanamycin resuspendiert und in einen 2L Erlenmeyerkolben überführt. Eine Probe der *MatchmakerTM Human Brain Pretransformed Library* (Clontech; 1ml Zellsuspension von *S.cerevisiae* Y187, prätransformiert mit einer humanen GehirncDNA-Bank) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und zu den 45ml Zellsuspension mit dem Köderplasmid gegeben. Der Ansatz wurde anschließend für 24h bei 30°C und 50rpm inkubiert. Die Zellen wurden dann für 10' bei 1000g zentrifugiert und das Pellet in 10ml 0,5xYPDA-Medium (mit 15µg/ml Kanamycin) resuspendiert und auf 50 SD-Trp/-Leu/-His/-Ade – Platten in 200µl Aliquots ausgestrichen. Die Platten wurden 7-14 Tage bei 30°C inkubiert, und gewachsene Hefekolonien anschließend auf frische SD-Trp/-Leu/-His/-Ade – Platten überführt.

2.9.3 β -Galactosidase Filtertest

Mit dem β -Galactosidase Filtertest wurde die Stärke der Protein-Interaktion von positiven Klonen aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen getestet.

Dazu wurden die entsprechenden Hefe-Klone auf SD-Trp/-Leu/-His/-Ade Platten ausgestrichen und für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert, bis Kolonien gewachsen waren. Es wurde dann ein Nitrozellulose-Filter (PROTRAN, Schleicher & Schuell) Luftblasen-frei auf die Hefekolonien gedrückt und mit anhaftenden Hefezellen für 10 Sekunden in ein Bad aus flüssigem Stickstoff getaucht. Auf diese Weise wurden die Zellwände der Hefezellen aufgebrochen. Die Filter wurden kurz an der Luft

getrocknet und danach mit der Kolonienseite nach oben auf ein, mit Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0,27 % (v/v) Mercaptoethanol; 33,4 mg/100 ml X-Gal) getränktes Whatmanpapier (#5) gelegt und bis zur Blaufärbung der ersten Kolonien bei 30°C inkubiert. Die Stärke der Blaufärbung gibt Hinweise auf die Stärke der Protein-Interaktion.

2.9.4 Plasmid-Präparation aus Hefe-Zellen

Zur Analyse der exprimierten Proteine von positiven Klonen aus den Hefe-Zwei-Hybrid-Screens wurden zunächst die entsprechenden Plasmide aus den Hefezellen isoliert. Dazu wurden Kolonien der Hefeklone in 6ml SD-Leu Medium resuspendiert und über Nacht bei 30°C und 250rpm geschüttelt. 2ml der Kultur wurden dann für 10' bei 5000g zentrifugiert und das Zellpellet in 100µl STET-Puffer (8 % Sucrose, 50 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 5 % Triton X-100, pH 8,0) aufgenommen. Zur Lyse wurden die Hefezellen zusammen mit 0,2 g Glaskügelchen (425-600 Mikrons, Sigma) für 5' gevortext, 3' auf 100°C erhitzt und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Die unlöslichen Bestandteile wurden 10' bei 14000rpm und 4°C in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand nach Zugabe von 65 µl 7,5M Ammoniumacetat für 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation von 30' bei 14000rpm und 4°C, wurden 150µl des Überstandes mit 300µl Ethanol versetzt und 30' bei -70°C inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (30'/14000rpm/4°C), das Pellet in 100 µl H₂O aufgenommen und abschließend mit Hilfe des *QIAEX II Agarose Gel Extraction Kits* (Qiagen) entsalzt. Die gereinigte DNA wurde mit 10µl H₂O eluiert und die gesamte Menge in *E.coli* TopF10 Zellen transformiert (2.8.8). Aus den Bakterien konnten dann größere Mengen Plasmid-DNA isoliert (2.8.9.1/2.8.9.2) und zur Analyse über Restriktionsspaltung (2.8.4) und Sequenzierung (2.8.11) eingesetzt werden.

2.10 Zellbiologische Methoden

2.10.1 Kultivierung von HEK293- und COS7-Zellen

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 (ATCC) und die Affennieren-Zelllinie COS7 wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FKS, Biowest), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in Zellkulturschalen bei 37°C in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit Versene-Puffer gewaschen und mit

0,25 % Trypsin (Invitrogen) in Versene-Puffer für 3-5' inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann in frischem DMEM 1:5 bis 1:10 verdünnt und in neue Kulturschalen überführt. Diese Prozedur wurde etwa alle 3-4 Tage wiederholt, wenn die Zellen zu $\frac{3}{4}$ konfluent gewachsen waren.

Kulturmedium für HEK293- und Cos7-Zellen	DMEM (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% (v/v) FCS (Hitze-inaktiviert) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Versene-Puffer:	8,8 mM Na ₂ HPO ₄ 0,7 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1mM EDTA; pH 7,4

2.10.2 Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode

Zur Transfektion größerer Mengen HEK293- oder COS7-Zellen in 10cm Zellkulturschalen, wurde die Calciumphosphat-Methode verwendet. Dazu wurden pro Schale 10µg Plasmid-DNA in 500µl 250mM CaCl₂ zu 500µl 2xHBS getropft. Nach 15' Inkubation bei RT wurde das Präzipitat zu den, etwa zur Hälfte konfluent gewachsenen Zellen, gegeben. Nach 18 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt.

2xHBS:	1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM HEPES 280 mM NaCl 10 mM KCl 12 mM Glucose
--------	---

2.10.3 Transfektion mit *PolyFect*[®]-Reagenz

Zur Transfektion kleinerer Ansätze in 24-Loch-Platten, z.B. für Immuncytochemie oder ELISA-Tests, wurde das *PolyFect*[®] *Transfection Reagent Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Dazu wurden HEK293- oder COS7-Zellen entsprechend der Empfehlungen des Herstellers, in 24-Loch-Platten kultiviert und nach dem Protokoll des Herstellers für transiente Transfektion transfiziert.

2.10.4 Kultivierung und Transfektion von primären Hippokampusneuronen

Die Präparation, Kultivierung und Transfektion der Hippokampusneurone wurde von Arne Quitsch nach dem Protokoll von Goslin und Banker (Goslin *et al.* 1998; Hassel *et al.* 2003) durchgeführt. Dazu wurden die Hippokampusneurone von 18 Tage alten

Ratten präpariert und auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern in Neurobasal A-Medium (Gibco BRL) kultiviert. Bei Bedarf wurden die Zellen 7 Tage nach dem Aussähen mit dem *Effectene*[®] Transfektions-Reagenz (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers transfiziert.

2.11 Immuncytochemische Methoden

2.11.1 Immuncytochemische Analyse von Proteinen in HEK293- und COS7-Zellen

Sterile Deckgläser wurden in 24-Lochplatten für 30-60' mit Poly-D-Lysin (0,1mg/ml in H₂O) inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die HEK293- oder COS7-Zellen wurden in DMEM auf die Deckgläser ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Bei Bedarf wurden die Zellen nach 12-16h auf den Deckgläsern transfiziert (2.10.3). Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen fixiert. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 15' inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und 5' mit 0,2% TritonX-100 in PBS permeabilisiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 2 % FCS in PBS für 60' bei RT blockiert. Anschließend wurde der gewünschte Erst-Antikörper, verdünnt in 2% FCS/PBS (vgl. 2.6) für 60' bei RT oder über Nacht bei 4°C, auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (verdünnt in 2 % FCS/PBS, vgl. 2.6) bei RT für 1 Stunde lichtgeschützt inkubiert. Abschließend wurden die Zellen wiederum dreimal mit PBS sowie einmal mit H₂O gewaschen und auf Objektträgern in Glyceringelatine (Sigma) eingebettet.

2.11.2 Immuncytochemische Analyse von Proteinen in primären Hippokampusneuronen

Die Hippokampusneurone wurden 7 Tage nach der Transfektion zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für 15' mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert. Es wurde erneut mit PBS gewaschen und die Zellen für 5' mit 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach Blockierung mit 2% Pferdeserum (Gibco) in PBS für 1h, wurden die primären Antikörper in PBS mit 2% (v/v) Pferdeserum verdünnt und zu den Zellen gegeben. Nach 2 Stunden Inkubation bei RT wurde dreimal mit PBS gewaschen und die sekundären Antikörper, ebenfalls in PBS mit 2% Pferdeserum

verdünnt, zu den Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde im Dunkeln bei RT. Abschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Glyceringelantine auf einem Objektträger eingebettet.

2.11.3 Immunhistochemische Analyse von Ratten-Gehirnschnitten

Für die immunhistochemischen Analysen wurden 50µm dicke *free-floating*-Kryoschnitte von Gehirnen 12 Tage alter Wistar-Ratten (zur Verfügung gestellt von Dr. Matthias Schreff, (Hassel *et al.* 2003)) und 10µm starke, auf Objektträgern fixierte Kryoschnitte von adulten Rattengehirnen (zur Verfügung gestellt von Dr. Dietmar Bächner) verwendet. Die Schnitte wurden 5' in 4% Paraformaldehyd (in PBS) und anschließend 10' in eiskaltem Methanol nachfixiert und zweimal in PBS-T gewaschen. Zum Blockieren wurde 1h mit 10%igem Pferdeserum in PBS-T inkubiert. Die gewünschten Primär-Antikörper wurden in 5%igem Pferdeserum in PBS-T verdünnt (vgl. 2.6) und über Nacht auf den Schnitten bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 5x für je 5' mit PBS-T gewaschen und mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpern (in 5% Pferdeserum in PBS-T) für 1-2 Stunden bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte wiederum 5x mit PBS-T und einmal mit H₂O gewaschen und in Glyceringelantine eingebettet.

2.11.4 Mikroskopie

Die Analyse der Immunfluoreszenz-markierten Zellen und Gehirnschnitte wurde mit dem Aristoplan-Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Stuttgart) und einer CCD C4742-95-12NRB Digital Kamera (Hamamatsu, Hamamatsu-City, Japan) sowie der Openlab 2.2.5 Software (Improvision, Heidelberg) durchgeführt. Rot-Fluoreszenz wurde dabei über einen N2.1-Filter (Leica; Anregung 515-560 nm, Emission 580 nm) und Grün-Fluoreszenz über einen L5-Filter (Leica; Anregung 480 nm, Emission 505 nm) detektiert. Die Aufnahmen wurden anschließend mit dem Programm *Adobe® Photoshop 6.0* (Adobe Systems Incorporated) weiter bearbeitet.

2.11.5 ELISA-Assay zur Quantifizierung von membranständigen Rezeptoren

Zur Quantifizierung von membranlokalisierten Rezeptoren wurden HEK293-Zellen auf 10cm-Schalen mit den gewünschten Konstrukten transfiziert (vgl. 2.10.2). Die zu messenden Rezeptoren verfügten über ein N-terminal fusioniertes T7-Epitop. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen auf 24-Lochplatten umgesetzt, die

zuvor für 24h mit Poly-D-Lysin (0,1mg/ml in PBS) beschichtet wurden. Dabei wurden jeweils 2×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach 1-2 Tagen wurde das Medium abgenommen, 2x mit PBS gewaschen und für 2h Serum-freies DMEM-Medium mit einem monoklonalen Anti-T7 Antikörper (Verdünnung 1/2500) bei 4°C auf die Zellen gegeben. Für Internalisierungsstudien wurde anschließend Serum-freies DMEM-Medium mit der gewünschten Konzentration an MCH oder SST14 auf die Zellen gegeben und für 30' bei 37°C inkubiert. Direkt im Anschluss wurden die Zellen dann mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 15' fixiert und 3x mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus Antikörper (1/2500 in PBS) für 1h bei RT und wiederum drei Waschrunde mit PBS. Sämtliche Flüssigkeit wurde von den Zellen abgesaugt und pro Vertiefung 250µl einer gebrauchsfertigen ABTS-Lösung (Sigma, Taufkirchen) zugegeben und für 30' bei RT inkubiert. Die Lösung enthält ein Substrat der Peroxidase, das bei der Umsetzung ein Produkt mit grünlicher Färbung ergibt. Die Intensität der Färbung wurde dann in einem ELISA-Reader (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, West Lafayette, USA) bei 405nm gemessen. Dazu wurden von jedem Ansatz zweimal 100µl der Lösung auf eine 96-Lochplatte übertragen.

2.11.6 Bestimmung von intrazellulärem Ca^{2+} mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur Bestimmung des intrazellulären Ca^{2+} wurden HEK293-Zellen auf Deckgläsern kultiviert (2.11.1) und nach Bedarf transfiziert (2.10.3). Nach 24h wurden die Zellen für 15-20' bei 37°C mit 1,5µM Fura-2-AM (Sigma) in DMEM im Dunklen inkubiert. Zur Messung der Fluoreszenzsignale wurden die Zellen über ein Inversmikroskop (Nikon Diaphot) mit 40x Öl-Immersionobjektiv mit einer Xenon-Lampe (Optosource, Cairn Research, Faversham, Kent, UK) und einem Monochromator (Optoscan, Cairn Research) mit den Wellenlängen von 340 und 380nm angeregt. Die resultierende Fluoreszenz-Emission wurde bei 510nm mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (Cool Snap-HQ, Roper Scientific/Photometrics, Tucson, AZ) unter Verwendung der *MetaFluor Imaging Software* (Version 4.6.8, Universal Imaging Corp., Downing, PA) aufgezeichnet und ausgewertet. Dazu wurden Serienbilder in Zwei-Sekunden-Intervallen mit einer Anregungsdauer von 100ms pro Bild aufgenommen. Während der Messungen wurden die Zellen mit Puffer (130nM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl_2 , 20mM HEPES, 10mM D-glucose, 0.01mM EGTA, pH 7.4) umspült. Alle Messungen wurden im Labor von *Prof. Graeme Milligan, Institut of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Scotland* durchgeführt (Liu *et al.* 2002; Murdoch *et al.* 2004).

2.12 Proteinbiochemische Methoden

2.12.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Dazu wurden 5µl der zu bestimmenden Proteinlösungen sowie jeweils 5µl verschiedener Proben einer Verdünnungsreihe von BSA (Rinderserumalbumin) in Wasser (0-1mg/ml) in einer Mikrotiterplatte mit jeweils 200µl Bradford-Reagenz (Sigma, Taufkirchen) gemischt und 20' bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen photometrisch durch Messung der Extinktion in einem ELISA-Reader bei 620 nm (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, West Lafayette, USA) und Erstellen einer Eichgeraden ermittelt. Dabei wurden jeweils Doppelwerte für jeden Ansatz bestimmt.

2.12.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach der Laemmli-Methode (Laemmli 1970) und wurde mit dem *Mini-PROTEAN III Systems* (BioRad, München) durchgeführt. Je nach Bedarf wurden 10, 12 oder 15%ige Trenngele nach der Polymerisierung mit einem Sammelgel überschichtet. Die Proben wurden nach 5 minütigem Aufkochen in Laemmli-Puffer auf das Gel geladen und bei konstanter Spannung (100-180V) im Laufpuffer aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurden vorgefärbte Protein-Molekulargewichtsstandards (*Full Range Rainbow Marker*, Amersham Bioscience, Freiburg und *Broad Range Prestained*, New England Biolabs, Bad Schwalbach) verwendet.

5x Laemmli-Probenpuffer:	300 mM Tris/HCl, pH 6,8
	7,5% (w/v) SDS
	100 mM DTT
	50% (w/v) Glycerol Bromphenolblau
Laufpuffer:	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0,1% (w/v) SDS

2.12.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Gele wurden nach der SDS-PAGE (2.12.2) für 20' in Coomassie-Lösung geschwenkt. Anschließend wurden die Gele mit Entfärberlösung mehrere Stunden entfärbt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit der CS1 Geldokumentationsanlage von Cybertech.

Coomassie Färbelösung:	20% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,1% (w/v) Coomassie R-250
Coomassie Entfärbelösung:	20% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure

2.12.4 Western-Blot Analysen

Zum Nachweis von Proteinen im Western-Blot wurden die Proben zunächst durch SDS-PAGE (2.12.2) aufgetrennt. Die Gele wurden dann für einige Minuten in Blotpuffer geschwenkt und mit einer Mini-Trans-Blot Apparatur (BioRad, München) nach Anweisungen des Herstellers auf eine Nitrozellulosemembranen (PROTRAN, Schleicher & Schüll) transferiert. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1 Stunde bei 4°C (100 V/ 250 mA). Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen 10' in TBS-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 0,1 % Tween-20, pH 7,5) gewaschen und 1 Stunde mit Blockierlösung inkubiert. Daraufhin wurden die gewünschten Erst-Antikörper in Blockierlösung entsprechend 2.6 verdünnt und entweder über Nacht bei 4°C, oder für 1h bei RT, auf die blockierte Membran gegeben. Nach dreimaligem Waschen für je 15' mit TBS-T, folgte eine einstündige Inkubation mit einem entsprechenden HRP-gekoppelten Zweit-Antikörper (2.6). Die Membran wurde erneut gewaschen und die Immunodetektion mit Hilfe des ECL-Reagenz (*Enhanced Chemiluminescence*, Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Chemilumineszenzsignal wurde auf einem Röntgenfilm (*Cronex 5 Medical X-Ray Film*, Agfa) festgehalten.

Blotpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol
Blockierlösung:	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T

2.12.5 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden die gewünschten DNA-Sequenzen in den Vektor pGEX4T2 oder pGEX6P1 kloniert und die Vektoren in *E.coli* BL21 Zellen transformiert (2.8.8). Einzelne Kolonien transformierter Bakterien wurden in 6ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin (LB-Amp) suspensiert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde dann in 200ml LB-Amp verdünnt und erneut bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,6 erreicht wurde.

Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1mM IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid) induziert und die Bakteriensuspension für weitere 2h bei 37°C inkubiert. (Bei der Expression von GST-MIZIP Fusionsproteinen - GST-MIZIP, GST-V5, GST-MYND - wurde stattdessen etwa 3h bei 30°C inkubiert!) Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (15 Min., 5.000 rpm, 4°C; Sorvall A6.14) pelletiert und einmal mit 10ml STE-Puffer gewaschen. Bei GST-MIZIP Fusionsproteinen wurde statt STE-Puffer immer TBS-Puffer verwendet, da sich die Anwesenheit von EDTA negativ auf die Proteinausbeute auswirkte. Die Zellpellets wurden anschließend bei -20°C eingefroren. Zur Zelllyse wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 10 ml STE (TBS) mit Protease-Inhibitoren (10 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Pepstatin A, 100 μ g/ml Bacitracin, 100 μ M PMSF) resuspendiert. Anschließend wurden 100 μ l Lysozym (10 mg/ml) zugegeben und 20' bei 4°C langsam geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Proben auf Eis mit einem Ultraschallstab (SONIFIER[®] B-12, Branson Sonic Power) auf Stufe 4 für 5x 5" beschallt. Anschließend wurden 1,5ml 10% N-Lauroylsarcosin in STE (TBS) zugegeben, 10' bei 4°C geschüttelt und danach je 2ml 10% Triton X-100 in STE (TBS) zugegeben und wiederum 10' geschüttelt. Anschließend wurde das gesamte Volumen mit STE (TBS) mit Proteaseinhibitoren verdoppelt und für 30' bei 4°C und 14000rpm (Sorvall A8.24) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml *Glutathion-Sepharose™ 4 Fast Flow* (Amersham Bioscience, Freiburg), äquilibriert in STE (TBS), versetzt und für 4h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die Sepharosematrix wurde für 2' bei 4°C und 1000g sedimentiert und dann 4 mal mit je 10ml STE (TBS) gewaschen. Die, an der Sepharose gekoppelten GST-Fusionsproteine, wurden in 1ml STE (TBS) mit Proteaseinhibitoren bei 4°C gelagert, über SDS-PAGE (2.12.2) mit Coomassie-Färbung (2.12.3) analysiert und für weitere Versuche eingesetzt.

	10 mM Tris/HCl, pH 8
STE	150 mM NaCl
	1mM EDTA

2.12.6 Expression und Aufreinigung von His₆-Fusionsproteinen

Für die Expression von His₆-Fusionsproteinen wurden die gewünschten DNA-Sequenzen in den Vektor pQE30 oder pQE40 kloniert. Die Vektoren wurden wie unter 2.12.5 beschrieben in Bakterien transformiert und exprimiert. Die Induktion der Expression erfolgte für 4h bei 37°C, bzw. für 4h bei 30°C bei His-MIZIP Fusionsproteinen. Das Zellpellet wurde mit TBS gewaschen und bei -20°C

eingefroren. Zur Aufreinigung wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und in 20ml Lysispuffer resuspendiert. Es wurden dann 200 µl Lysozym (10 mg/ml) zugegeben und 60' bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5x 5" mit dem Ultraschallstab (SONIFIER® B-12, Branson Sonic Power) auf Stufe 4 aufgeschlossen. Für die Aufreinigung von His-MIZIP wurden zuvor 3ml 10% N-Lauroylsarcosin in TBS und 5mM DTT zugegeben. Nach der Ultraschallbehandlung erfolgte in diesem Fall noch eine Zugabe von 2ml 10% Triton X-100 in TBS und eine Inkubation von 15' auf Eis.

Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 30' bei 4°C und 14000rpm (Sorvall A8.24) sedimentiert und der Überstand mit 2ml Ni-NTA Agarose (Qiagen, Hilden) versetzt, die zuvor in Lysispuffer equilibriert worden war. Die Proben wurden für 1 Stunde bei 4°C leicht geschüttelt und anschließend für 2' bei 1000g und 4°C sedimentiert und 5x mit je 10ml Waschpuffer gewaschen. Zur Elution wurde die Agarose-Matrix mit 2 ml Elutionspuffer für 30' bei 4°C inkubiert, der Überstand mit dem Protein abgenommen und über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Lysispuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , pH8 300mM NaCl 10mM Imidazol
Waschpuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , pH8 300mM NaCl 20mM Imidazol
Elutionspuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , pH8 300mM NaCl 250mM Imidazol

2.12.7 GST-Pulldown-Experimente

Zum Nachweis von direkten Protein/Protein-Interaktionen wurden *GST-Pulldown*-Experimente durchgeführt. Dazu wurden etwa 10µg aufgereinigtes und an GSH-Sepharose gekoppeltes GST-Fusionsprotein in 1ml TBS-T mit Proteaseinhibitoren (10 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A, 100 µg/ml Bacitracin, 100 µM PMSF) suspensiert und mit etwa 10µg eines gelösten His₆-Fusionsprotein versetzt. Der Ansatz wurde für 2h bei 4°C leicht geschüttelt. Anschließend wurde die GSH-Sepharose durch Zentrifugation für 2' bei 4°C und 1000g sedimentiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde 6x mit je 1ml TBS-T gewaschen und schließlich in Laemmli-Puffer aufgenommen und 10' bei 94°C inkubiert. Teile des Überstandes wurden mit der entsprechenden Menge 5x Laemmli-Puffer versetzt und

ebenfalls denaturiert. Die Proben wurden anschließend über SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

2.12.8 Immunpräzipitation aus transfizierten COS7-Zellen

Je eine 10cm-Schale transient transfizierter COS7-Zellen wurde 2 Tage nach der Transfektion einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren (10 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A, 100 µg/ml Bacitracin, 100 µM PMSF) auf der Zellkulturschale für 20' bei 4°C lysiert. Anschließend wurden die Lysate mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die DNA und unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation (3' / 10000g / 4°C) präzipitiert und entfernt. Von dem Ly sat wurden 80µl für die spätere Analyse entnommen und mit 20µl 5x Laemmli-Puffer aufgekocht. Der restliche Überstand wurde mit 30µl T7-Agarose (Novagen, Darmstadt) versetzt und 2h bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurde die Agarose pelletiert (3' / 500g / 4°C) und viermal mit 1ml RIPA-Puffer gewaschen, ehe die Pellets in je 40µl 2x Laemmli-Puffer aufgekocht wurden. Die Lysate und Präzipitate wurden dann mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

	50 mM Tris/HCl, pH 7,5
	150 mM NaCl
RIPA-Puffer	1% (v/v) NP-40
	0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat
	0,1% (w/v) SDS

2.12.9 Affinitätsaufreinigung von MIZIP-bindenden Proteinen aus HEK293-Zellen

Jeweils sechs 10cm-Schalen HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden pSTAG-MIZIP bzw. pSTAG-PIST transfiziert (2.10.2) und nach 48h lysiert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1ml RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren pro Schale für 20' bei 4°C inku biert. Die Lysate wurden mit einem Zellschaber von den Platten gelöst und identisch transfizierte Ansätze vereinigt. Die DNA und unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation (3' / 10000g / 4°C) präzipitiert und entfernt.

3mg eines synthetischen Peptids aus den 10 letzten Aminosäuren des Proteins GKAP/SAPAP (GeneBank Acc.No. U67987, vgl. 2.5) wurden in 1ml NHS-Kopplungspuffer (0,1M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 7,5) gelöst und nach Angaben des

Herstellers kovalent an 1ml *NHS-activated SepharoseTM 4 Fast Flow* (Amersham Biosciences) gekoppelt.

Zu den HEK-Zellysaten wurden jeweils 80µl dieser GKAP-Sepharose zugegeben und die Ansätze für 2h bei 4°C leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Sepharose durch Zentrifugation (3' / 500g / 4°C) sedimentiert und 5x mit je 4ml RIPA-Puffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden dann durch 10 minütiges Kochen der Sepharose-Pellets in jeweils 120µl Laemmli-Puffer eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Proteingel wurde anschließend mit Coomassie gefärbt und ausgesuchte Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die Analyse der ausgeschnittenden Proteinbanden erfolgte im Servicelabor des *Institut für klinische Zellbiochemie und molekulare Neurobiologie am UKE-Hamburg*. Die Gelstücke wurden dazu intensiv gewässert und im Gel mit Trypsin verdaut (Shevchenko *et al.* 1996). Die entstandenen Peptide wurden aus den Gelstücken extrahiert und über *ZipTip_{µ-C18}* Säulen (Millipore) gereinigt und aufkonzentriert. Anschließend wurden sie mit einem *ESI-QToF2* Massenspektrometer (MicroMass, Manchester, UK) analysiert. Die resultierenden Daten wurden mit dem Programm *Mascot MS/MS Ion Search* (zugänglich unter www.MatrixScience.com) ausgewertet und die Proteine identifiziert.

2.12.10 Herstellung von Proteinextrakten aus Mausgeweben

Adulten NMRI-Mäusen wurden Teile verschiedener Organe entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Von dem gefrorenen Gewebe wurden je 300-500mg in 6-10ml (50mg/ml) RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgetaut. Die Gewebe wurden zunächst mit einem Ultra-Turrax und anschließend mit einem Glaspotter auf Eis homogenisiert. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis und eine anschließende Zentrifugation für 30' bei 4°C und 14000rpm (Sorval I A8.24). Die Überstände wurden abgenommen und der Proteingehalt bestimmt. Für Westernblotanalysen wurden die Extrakte in einer Konzentration von 3µg/µl Protein in Laemmli-Puffer aufgekocht und von jedem Extrakt 90µg Protein auf ein 12%iges PAA-Gel aufgetragen.

2.12.11 Membranfraktionierung aus Mausgehirnen

Frische Gehirne von adulten NMRI-Mäusen wurden in Sucrose-Puffer mit Proteaseinhibitoren (10g Frischgewicht / 40ml Puffer) in einem Glaspotter homogenisiert. Die Lösung wurde für 10' bei 4°C und 1400g zentrifugiert, das Pellet

noch einmal im gleichen Puffer gewaschen und die Überstände vereinigt und auf 10% Frischgewicht/Volumen verdünnt. Von diesem Rohextrakt wurde ein Aliquot abgenommen und in Laemmli-Puffer für die Westernblotanalyse aufgekocht.

Der restliche Rohextrakt wurde für 10' bei 4°C und 14000g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 24ml Sucrose-Puffer pro 10g Frischgewicht resuspendiert und stellt die sog. P2-Membranfraktion dar. Sie enthält Synaptosomen und Mitochondrien. Von der P2-Fraktion wurde ebenfalls ein Aliquot für die Westernblotanalyse abgenommen. Mit dem verbleibenden Material wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit einem Stufengradienten von 0,85, 1,0 und 1,2 M Sucrose in 1mM NaHCO₃ für 2h bei 82500g durchgeführt. An der Grenze zwischen 1,0 und 1,2M Sucrose wurde die Synaptosomen-Fraktion erhalten. Das Material wurde mit 60ml pro 10g Startmaterial Sucrose-Puffer verdünnt und mit der gleichen Menge an Triton X-100 (1% in 0,32M Sucrose, 12mM Tris-HCl, pH 8.1) versetzt und für 15' bei 4°C leicht geschüttelt. Der Extrakt wurde dann für 20' bei 32000g zentrifugiert, das Pellet in 2,5ml pro 10g Startmaterial Sucrose-Puffer resuspendiert und zur Präparation der PSD-Fraktion einer erneuten Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen. Dazu wurden je 2ml des Extrakts auf ein Dichtekissen aus 4ml 2M, 3ml 1,5M und 3ml 1M Sucrose in 1mM NaHCO₃ appliziert und für 2h bei 200000g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die PSD-Fraktion wurde an der Grenze zwischen 1,5 und 2M Sucrose erhalten. (Carlin *et al.* 1980)

Alle Fraktionen wurden in Laemmli-Puffer aufgekocht und im Westernblot analysiert.

Sucrose-Puffer:	0,32M Sucrose
	1mM NaHCO ₃
	1mM MgCl ₂
	0,5mM CaCl ₂

2.13 Elektrophysiologische Messungen

2.13.1 *In-vitro* Transkription von cRNA

Zur Herstellung der cRNA wurden die vollständigen Leserahmen aller benötigten Proteine in den Vektor pGEMHE kloniert. Die Plasmid-DNA dieser Konstrukte wurde unmittelbar hinter der Expressionskassette mit dem Enzym NheI linearisiert (vgl. 2.8.4) und anschließend über Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Dazu wurden den 10µl-Restriktionsansätzen 90µl DEPC-H₂O und 100µl Phenol zugegeben, gründlich gemischt und durch Zentrifugation (1', 14000rpm,

Tischzentrifuge) die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde anschließend zweimal mit je 100µl Chloroform extrahiert, nach Zugabe von 10µl 3M Na-Acetat mit 300µl Ethanol gefällt (2-3h/-70°C, anschl. 30'/1400 0rpm/4°C), einmal mit 300µl 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20µl DEPC-H₂O aufgenommen. Der DNA-Gehalt wurde anschließend photometrisch bestimmt (2.8.10).

Für die *in-vitro* Transkription wurden 300ng der linearisierten Plasmid-DNA zu einem Reaktionsansatz aus

30µl	linearisierte Plasmid-DNA in DEPC-H ₂ O
5µl	10x Transkriptionspuffer (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)
1µl	RNase-Inhibitor (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)
10µl	5mM ATP/UTP/CTP; 0,5mM GTP (in DEPC-H ₂ O)
2µl	10mM GpppG <i>cap structure</i> (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)
2µl	T7-RNA-Polymerase (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)

zugegeben und für 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zur Kontrolle 1µl der Reaktion abgenommen und in 9µl RNA-Probenpuffer für eine spätere Gelelektrophorese auf Eis aufbewahrt. Zum Rest der Reaktion wurde 1µl RQ-DNase zugegeben und für 15' bei 37°C die DNA degradiert. Die RNA wurde dann über Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt und gefällt (s.o.). Das RNA-Pellet wurde auf Eis getrocknet und schließlich in 30µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Mit einem RNase-freien Agarosegel wurde die Qualität der RNA überprüft und mit Hilfe des *WinCam 2.0 Gel* Dokumentationssystems (Cybertech) die Konzentration densitometrisch bestimmt.

2.13.2 Präparation der *Xenopus*-Oozyten und Injektion der cRNA

Die Präparation der Oozyten vom Krallenfrosche *Xenopus laevis* und die Injektion der RNA wurden von Hans-Hinrich Hönk und Agatha Blaszczyk-Wewer durchgeführt. Dazu wurde einem Tier ein Teil des Ovars operativ entfernt und in Barth-Medium überführt. Die einzelnen Oozyten wurden dann mechanisch aus dem Ovar gelöst und vollständig defollikuliert. Die gewünschten RNAs wurden in einer Konzentration von je 40ng/µl gemischt und etwa 10nl pro Oozyte injiziert. Die Oozyten wurden dann 3-5 Tage bei 19°C in Barth-Medium inkubiert und täglich wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

	88 mM	NaCl
	1 mM	KCl
	2,4 mM	NaHCO ₃
	10 mM	HEPES, pH 7,6
Barth-Medium:	0,82 mM	MgSO ₄
	0,33 mM	Ca(NO ₃)
	0,41 mM	CaCl ₂
	50 µg/ml	Tetracyclin
	100 µg/ml	Gentamycin

2.13.3 Elektrophysiologische Messungen von Dosis-Wirkungskurven an *Xenopus*-Oozyten

Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten nach der "Gesamtzellen-Zwei-Elektroden" Messtechnik. Das Prinzip des Verfahrens besteht darin, bei Aufhebung des Diffusionsgradienten von K⁺-Ionen, aber gleichzeitiger Aufrechterhaltung des Membranpotentials, die elektrische Leitfähigkeit der Zellmembran für K⁺-Ionen zu messen. Die K⁺-Leitfähigkeit der Membran wird von dem exprimierten K⁺-Kanal *GIRK* und seiner Aktivierung durch den koexprimierten GPCR *MCHR1* beeinflusst.

Eine Oozyte wurde dazu in die Messapparatur appliziert, mit ND96-Medium umspült und zwei, mit 3M KCl gefüllte Glas-Elektroden in die Zelle eingestochen. Die eine Elektrode ist die Potential-Elektrode und bestimmt das Membranpotential im Vergleich zu einer extrazellulären Referenz-Elektrode im Außenmedium. Das Membranpotential wurde dann mit dem vorgegebenen Haltepotential (Klemmspannung) verglichen. Dieses wurde in den Versuchen auf etwa -60mV geklemmt. Durch die zweite Elektrode, die Strom-Elektrode, wurde in die Zelle ein entsprechender, kompensatorischer Strom appliziert, um die Klemmspannung konstant zu halten. Die Stärke dieses kompensatorischen Stroms ist damit proportional zur Leitfähigkeit der Zellmembran.

Für die Messung des MCH-induzierten K⁺-Stroms durch den aktivierten GIRK-Kanal wurde von ND96-Medium zu HK-Medium (High Kalium) gewechselt. Die hohe K⁺-Konzentration in diesem Medium bewirkte die Aufhebung des Diffusionsgradienten der K⁺-Ionen über die Zellmembran. Durch Zugabe des Rezeptor-Agonisten MCH (Bachem, Weil am Rhein) wurde über die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion des Rezeptors der GIRK-Kanal aktiviert, wodurch die Leitfähigkeit der Membran für K⁺-Ionen in Abhängigkeit der MCH-Konzentration erhöht wurde. K⁺-Ionen konnten nun ausschließlich entlang des elektrischen Gradienten über die Membran fließen

und erzeugten damit einen direkt proportionalen Anstieg des kompensatorischen Stroms, der an einem Schreiber über die Zeit aufgezeichnet wurde.

ND96-Medium:	96 mM	NaCl
	2 mM	KCl
	5 mM	HEPES, pH 7,4
	1 mM	MgCl ₂
	1,8 mM	CaCl ₂
HK-Medium:	2 mM	NaCl
	96 mM	KCl
	5 mM	HEPES, pH 7,4
	1 mM	MgCl ₂
	1 mM	CaCl ₂

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Expression von MIZIP

MIZIP wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems als potentieller Interaktionspartner des MCH-R1 C-Terminus identifiziert.

3.1.1 Herstellung und Charakterisierung von spezifischen MIZIP-Antiseren

Für Untersuchungen an dem nativen MIZIP-Protein sind spezifische Antikörper unverzichtbar. Zur Herstellung eines gegen MIZIP gerichteten Antiserums, wurde zunächst ein Peptid aus den letzten zwölf Aminosäuren von MIZIP mit der Sequenz *KRPFQHELEPER* synthetisiert. Diese Sequenz ist in den Spezies Maus, Ratte, Schwein und Mensch identisch. Das Peptid wurde als Antigen für die Immunisierung eines Kaninchens und zweier Meerschweinchen eingesetzt. Die Seren wurden anschließend mittels Affinitätschromatographie über eine Sepharosesäule mit kovalent gekoppeltem MIZIP-Peptid aufgereinigt. Die entsprechenden Arbeiten wurden von der Firma *Pineda Antikörper-Service, Berlin*, durchgeführt.

Die affinitätsgereinigten Seren wurden im Westernblot und immunocytochemisch getestet. Für die Westernblotanalyse (Abbildung 6A) wurde die vollständige humane MIZIP-cDNA in den Vektor pQE30 kloniert und als His-MIZIP Fusionsprotein in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. Weiterhin wurden HEK293-Zellen mit dem Plasmid pCDNA6-MIZIP-MycHis transfiziert, das die vollständige Maus-MIZIP cDNA enthält und MIZIP als Fusionsprotein mit einem C-terminalen MycHis-Epitop exprimiert (Bächner *et al.* 2002). Gesamt-Proteinextrakte dieser Zellen und von untransfizierten Kontrollzellen sowie das aufgereinigte His-MIZIP Fusionsprotein wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit dem affinitätsgereinigten Seren inkubiert. Dabei zeigte ein Meerschwein-Serum das beste Ergebnis und ist daher im folgenden dargestellt. Das gereinigte Meerschwein-Serum konnte eine deutliche Bande für das His-MIZIP Fusionsprotein mit dem erwarteten Molekulargewicht von 28kDa klar erkennen. In dem Zelllysat der transfizierten HEK293-Zellen wurde ebenfalls eine Bande mit der richtigen Größe des exprimierten MIZIP-MycHis Fusionsproteins von 30kDa detektiert. In beiden Proben trat weiterhin jeweils noch ein schwache Bande bei etwas mehr als 50kDa auf. Im Lysat der untransfizierten Kontrollzellen wurde dagegen keine Immunreaktivität von dem affinitätsgereinigten Serum erkannt (Abbildung 6A, oben).

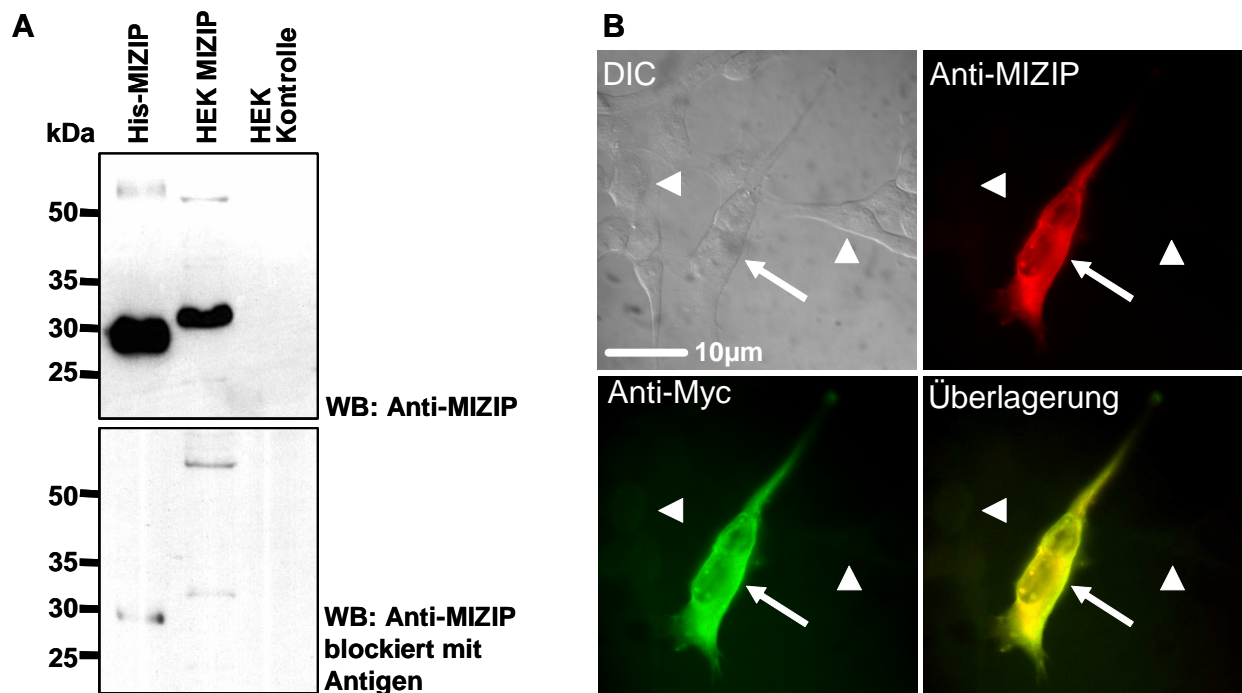


Abbildung 6: Charakterisierung des MIZIP-Antiserums (Anti-MIZIP) aus Meerschwein.

A: Aus Bakterien aufgereinigtes, rekombinantes His-MIZIP Protein und Lysate von transient transfizierten (HEK MIZIP) und untransfizierten (HEK Kontrolle) HEK293-Zellen, wurden im Westernblot mit dem Anti-MIZIP Antiserum behandelt. Das Serum erkennt Banden für das aufgereinigte His-MIZIP und das transfizierte MIZIP-MycHis Protein mit den erwarteten Molekulargewichten von 28 bzw. 30kDa (oberes Bild). Ein identischer Blot wurde mit Anti-MIZIP Antiserum behandelt, das zuvor für 30min mit einem zehnfachen Überschuss an MIZIP-Peptid inkubiert wurde (unteres Bild). **B:** Mit MIZIP-MycHis transfizierte HEK293-Zellen wurden nach 24 Stunden auf Deckgläsern fixiert und mit dem Anti-MIZIP sowie einem monoklonalen Anti-Myc Antikörper aus Maus inkubiert. Nach Behandlung mit Anti-Meerschwein-Cy3 (rot) und Anti-Maus-Cy2 (grün) Zweitantikörpern wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Das DIC-Bild zeigt transfizierte (Pfeil) und untransfizierte (Pfeilspitze) Zellen. Die Überlagerung zeigt die Fluoreszenzsignale beider Antikörper. (DIC: digital interference contrast)

Die Spezifität des Serums wurde weiter untersucht, indem es vor dem Einsatz im Westernblot mit einem zehnfachen Überschuss des MIZIP-Peptids inkubiert wurde. Dabei wurden die spezifischen Erkennungsstellen für das MIZIP-Epitop von dem Peptid abgesättigt und blockiert. Anschließend wurde das blockierte Serum auf einem identischen Westernblot getestet (Abbildung 6A, unten). Dabei verschwanden die beiden starken Banden bei 28 und 30kDa fast vollständig. Das affinitätsgereinigte Anti-MIZIP Serum erkennt also sehr spezifisch das C-terminale Peptid-Epitop von MIZIP, unabhängig davon, ob MIZIP als N- oder C-terminales Fusionsprotein vorliegt. Für die immunocytochemische Analyse der HEK293-Zellen wurde das transfizierte MIZIP-MycHis Fusionsprotein sowohl mit dem Anti-MIZIP Antiserum als auch über einen monoklonalen Antikörper gegen das C-terminal fusionierte Myc-Epitop markiert. Die beiden Antikörper wurden dann mit unterschiedlichen Fluoreszenz-

markierten Zweitantikörpern nachgewiesen und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Beide Antikörper zeigten dabei ein exakt identisches Färbemuster, wie an der Gelbfärbung in der Überlagerung von Abbildung 6B zu erkennen ist. Das Anti-MIZIP Serum erkennt demnach das MIZIP-MycHis Fusionsprotein in gleicher Weise wie der monoklonale Anti-Myc Antikörper. Das Fusionsprotein wurde dabei im Cytoplasma der transfizierten Zellen nachgewiesen. In untransfizierten Zellen zeigte das Serum hingegen keine Immunreaktivität.

3.1.2 Westernblotanalyse der Expression von MIZIP in Mausgeweben

Bisher konnte die Untersuchung der Expression von MIZIP nur auf dem Level der mRNA erfolgen (Bächner *et al.* 2002). Mit dem Anti-MIZIP Antiserum sollte nun auch erstmals endogen exprimiertes MIZIP-Protein nachgewiesen werden. Dazu wurden aus diversen Mausgeweben Proteinextrakte hergestellt und im Westernblot analysiert. Das affinitätsgereinigte Anti-MIZIP Antiserum erkannte in den untersuchten Extrakten von Leber, Lunge, Herz, Testis und Skelettmuskel jeweils ein Signal bei dem erwarteten Molekulargewicht von 27 kDa, sowie in Leber und Herz zusätzlich eine Bande bei etwa 30 kDa. Außerdem traten noch einige weitere Banden zwischen 35 und 50 kDa auf (Abbildung 7A, oben). Um diese Banden auf ihre Spezifität zu überprüfen wurde ein identischer Blot mit Anti-MIZIP Serum inkubiert, das zuvor mit einem Überschuss an Antigen blockiert wurde (vgl. 3.1.1). Dieses Serum konnte nur noch die größeren Banden zwischen 35 und 50kDa, bei denen es sich daher offensichtlich um unspezifische Immunreaktivitäten handelt, erkennen. Die, zum Teil sehr starken Banden bei 27kDa und 30kDa verschwanden hingegen fast vollständig (Abbildung 7A, Mitte). Sie entsprechen daher dem endogen exprimierten MIZIP-Protein. Die 30kDa-Bande in Leber und Herz könnte von einer gewebespezifischen, postrational modifizierten oder alternativ gespleißten MIZIP-Variante stammen. Sie ist im Herz-Extrakt am stärksten ausgeprägt und hat dort auch den größeren Anteil am endogenen MIZIP, während in der Leber die 27kDa-Bande sehr viel stärker ist. Vergleicht man die Westernblotsignale mit der Coomassie-Färbung der Proteinextrakte wird deutlich, dass in der Leber und im Skelettmuskel die MIZIP-Expression am stärksten und im Testis am geringsten ist. Da MIZIP als Interaktionspartner des Transmembranrezeptors MCHR1 identifiziert wurde, kommt der Expression von MIZIP im Gehirn eine besondere Bedeutung zu. Daher wurde für eine Westernblotanalyse eine Membranfraktionierung aus Mäusegehirn-Extrakten durchgeführt. Das Anti-MIZIP Serum konnte im kernlosen

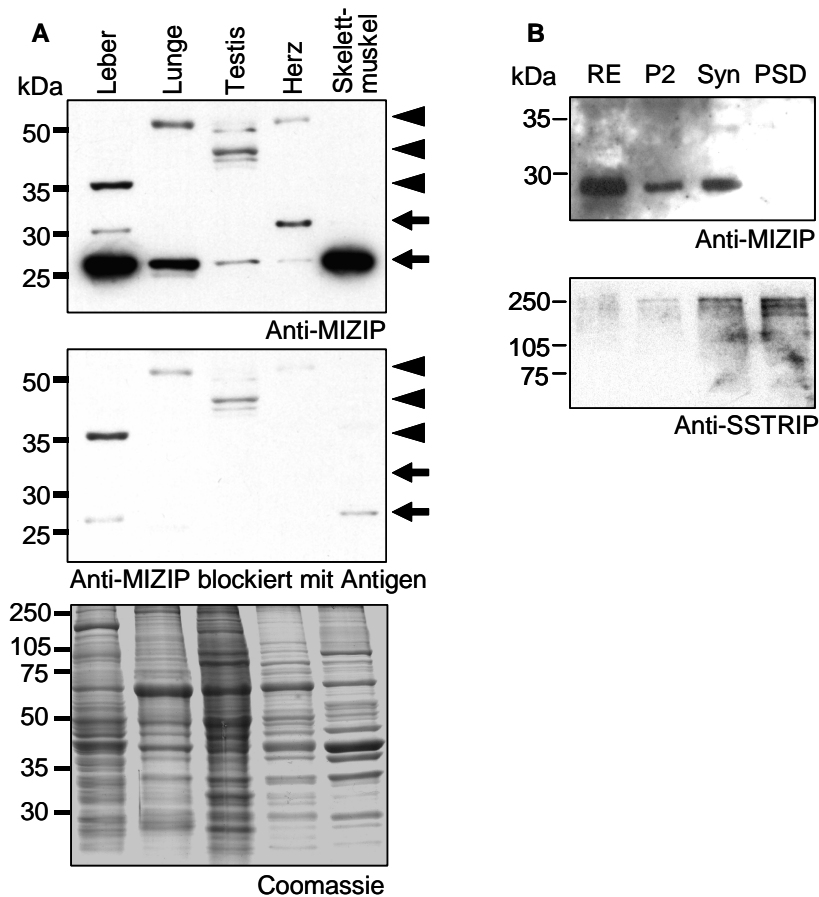


Abbildung 7: Nachweis von endogen exprimiertem MIZIP in Proteinextrakten aus Mausegeweben.

A: Proteinextrakte der angegebenen Gewebe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (unterstes Bild) oder auf Nitrozellulosemembran geblottet. Identische Blots wurden entweder mit unbehandeltem Anti-MIZIP Antiserum (oberstes Bild) oder mit Anti-MIZIP Serum, das zuvor mit einem Überschuss an Antigen blockiert wurde (mittleres Bild), inkubiert. Spezifische Banden wurden nur von dem unbehandelten Serum erkannt (Pfeile), während unspezifische auch mit dem blockierten Serum markiert wurden. **B:** Verschiedene Membranfraktionen aus Extrakten von adultem Mäusegehirn wurden über SDS-PAGE aufgetrennt im Westernblot mit dem Anti-MIZIP Serum (oberes Bild) analysiert. Derselbe Blot wurde anschließend, nach Entfernen der Antikörper, mit einem Anti-SSTRIP Antikörper erneut analysiert (unteres Bild). (RE: Rohextrakt; P2: Gesamt-Membranfraktion; Syn: Synaptosomen-Fraktion; PSD: PSD-Fraktion)

Rohextrakt, in der Gesamtmembran-Fraktion (P2) und in der Synaptosomen-Fraktion jeweils eine Bande bei 27kDa detektieren. In der Präparation der Postsynaptischen Dichte (PSD) wurde jedoch kein MIZIP erkannt. Die Qualität der Präparation wurde mit einem Antikörper gegen das postsynaptische Gerüstprotein SSTRIP/Shank1 überprüft, das in der PSD angereichert ist (Zitzer *et al.* 1999). Dementsprechend zeigte das Anti-SSTRIP Serum eine Bande bei der erwarteten Größe von 250kDa, die in der PSD-Fraktion am stärksten ausgeprägt ist (Abbildung 7B). MIZIP wird also auch im Mäusegehirn exprimiert und ist trotz seiner cytoplasmatischen Lokalisation mit den Membranen assoziiert. Es scheint jedoch nicht in der Postsynaptischen Dichte präsent zu sein.

3.1.3 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von MIZIP in kultivierten Ratten-Hippokampus-Neuronen

Nach *in situ* - Hybridisierungsanalysen von Mausgehirnen ist MIZIP stark im Hippokampus exprimiert (Bächner *et al.* 2002). Daher wurden kultivierte, embryonale Ratten-Hippokampus-Neuronen verwendet, um die subzelluläre Lokalisation von MIZIP in Neuronen zu untersuchen. Dafür wurden Hippokampusneurone von 18 Tage alten Rattenembryonen 14 Tage *in vitro* kultiviert, anschließend fixiert und zur Analyse mit dem Anti-MIZIP Antiserum inkubiert (Abbildung 8). Das Serum erkennt eine Immunreaktivität im Soma und in den Dendriten der Zellen. Der Vergleich der Immunfluoreszenz mit einer Phasenkontrastaufnahme derselben Zellen zeigt,

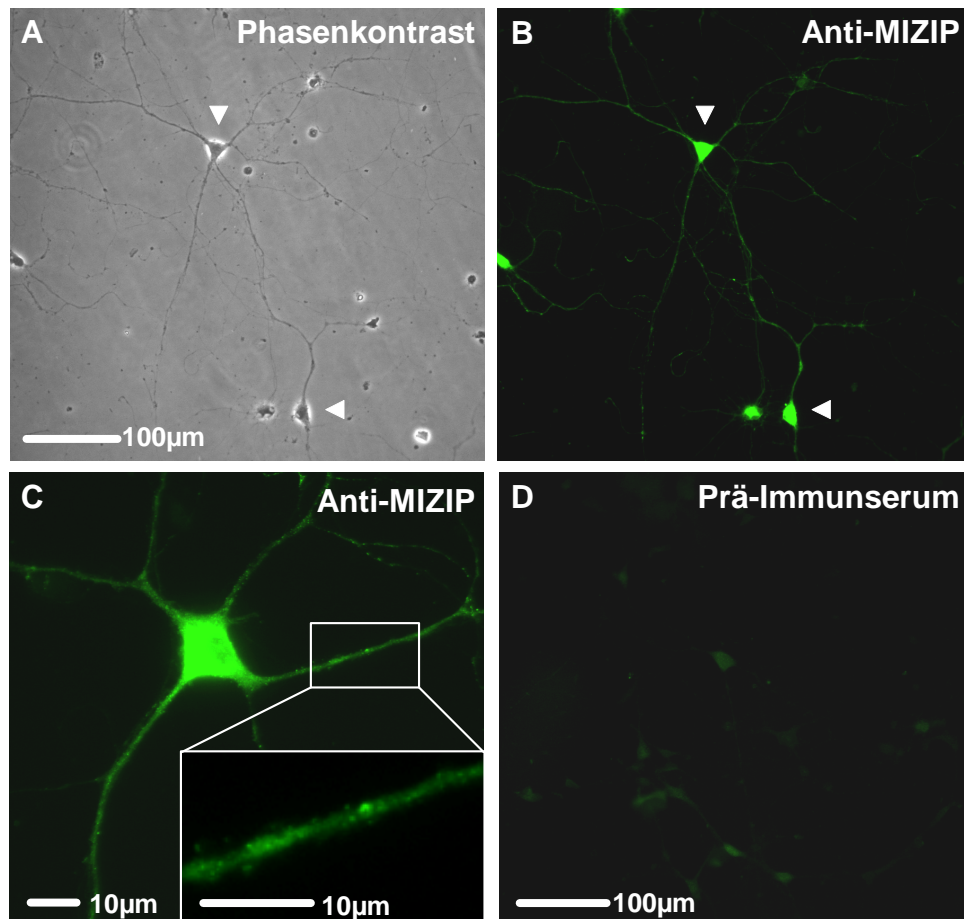


Abbildung 8: Immuncytochemischer Nachweis von endogen exprimiertem MIZIP in primären Hippokampusneuronen.

Die Hippokampusneurone wurden 14 Tage auf Deckgläsern kultiviert, fixiert und anschließend immuncytochemisch mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Endogenes MIZIP wurde mit dem Anti-MIZIP Antiserum und einem Anti-Meerschwein-Cy2 gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen (B+C). Zur Kontrolle wurden gleiche Zellen auch mit dem Prä-Immunsereum inkubiert (D). In A ist derselbe Bildausschnitt wie in B im Phasenkontrast gezeigt. C zeigt vergrößert eine weitere Zelle mit einem wiederum vergrößerten Dendritenabschnitt.

dass alle untersuchten Zellen MIZIP exprimieren (Abbildung 8, A+B). Die Vergrößerungen einer Zelle und eines Dendritenabschnitts lassen weiterhin erkennen, dass MIZIP homogen über das gesamte Cytoplasma verteilt ist, in den Dendriten aber ein punktförmiges Färbemuster aufweist (Abbildung 8, C). Zur Kontrolle der Spezifität dieser Signale wurden gleiche Zellen mit dem Prä-Immunsereum inkubiert, das bei der Herstellung des Anti-MIZIP Serums dem entsprechenden Tier vor der ersten Immunisierung entnommen wurde. Dieses Prä-Immunsereum zeigt nur eine schwache Hintergrundfärbung der Zellkörper (Abbildung 8, D). Das Anti-MIZIP Serum detektiert also spezifisch das endogen exprimierte MIZIP-Protein in den Hippokampusneuronen.

3.1.4 Überexpression von MIZIP in primären Hippokampusneuronen

Da MIZIP in den primären Hippokampusneuronen endogen exprimiert wird, stellt sich die Frage nach der Funktion des Proteins in diesen Zellen. Einen möglichen Einfluss auf die Differenzierung der Neurone durch MIZIP kann man über die Analyse der Morphologie der Zellen bei Überexpression von MIZIP untersuchen. Dazu wurde die vollständige MIZIP-cDNA in die Vektoren pCDNA6 und pEGFP-C1 kloniert, so dass Fusionsproteine aus MIZIP und einem C-terminalen MycHis-Epitop (MIZIP-MycHis) bzw. einem N-terminalen EGFP-Protein entstehen. Mit diesen Vektoren wurden die Hippokampusneurone nach sieben Tagen in Kultur transfiziert und nach weiteren sieben Tagen immunocytochemisch analysiert. Das MIZIP-MycHis Fusionsprotein wurde mit dem Anti-MIZIP Antiserum nachgewiesen, das EGFP-MIZIP Fusionsprotein über die Autofluoreszenz von EGFP. Abbildung 9 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen von je einem transfizierten Neuron und die entsprechenden Bereiche im digitalen Interferenz-Kontrast (DIC) bzw. im Phasenkontrast. Anhand dieser Aufnahmen ist ersichtlich, dass die transfizierten Zellen sich morphologisch nicht von untransfizierten unterscheiden. Einen Einfluss der beiden MIZIP-Fusionsproteine auf die Differenzierung der Neuronen scheint es daher nicht zu geben.

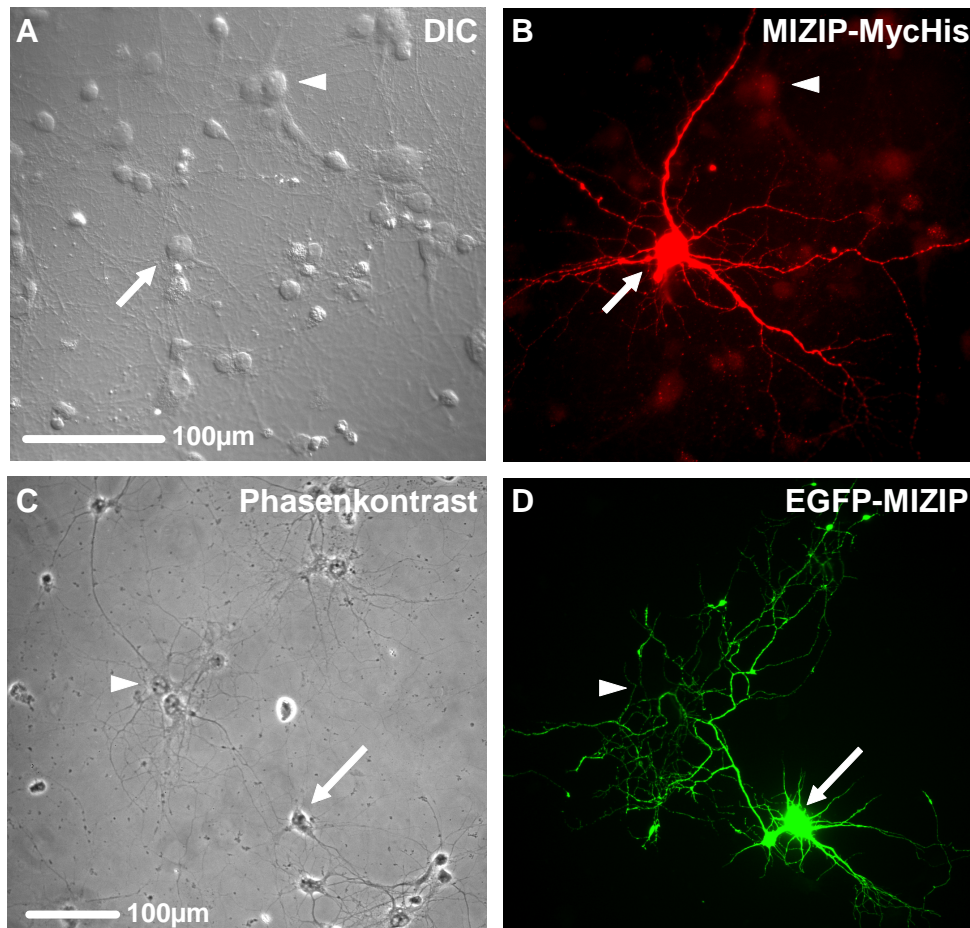


Abbildung 9: Überexpression von MIZIP-Fusionsproteinen in primären Hippokampusneuronen
 Es wurden MIZIP-MychHis (A+B) und EGFP-MIZIP (C+D) Fusionsproteine in 7 Tage alten Hippokampusneuronen überexprimiert. 7 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und immunocytochemisch im Fluoreszenzmikroskop analysiert. MIZIP-MychHis wurde mit dem affinitätsgereinigten Anti-MIZIP Antiserum und einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper (B; rot), EGFP-MIZIP über die Autofluoreszenz von EGFP (D; grün) nachgewiesen. Die Morphologie transfizierter (Pfeile) und untransfizierter (Pfeilspitzen) Zellen wurde in den DIC- oder Phasenkontrastaufnahmen verglichen. (DIC: digital interference contrast)

3.1.5 Kolokalisation von MIZIP und MCHR1 in transfizierten Hippokampusneuronen

Auch für den MCHR1 ist eine starke Expression in der gesamten Hippokampus-Formation des Rattengehirns beschrieben worden (Hervieu, G.J. *et al.* 2000; Lembo *et al.* 1999). Daher sollte sich die Interaktion von MIZIP mit dem MCHR1 auch in einer Kolokalisation beider Proteine in den Hippokampusneuronen widerspiegeln. Allerdings konnte mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern keine spezifische Immunreaktivität für den endogen exprimierten MCHR1 in den kultivierten Zellen detektiert werden. Dies mag an einer zu geringen Expression des Rezeptors in diesen Zellen liegen. Um die Kolokalisation dennoch zu untersuchen, wurden MIZIP

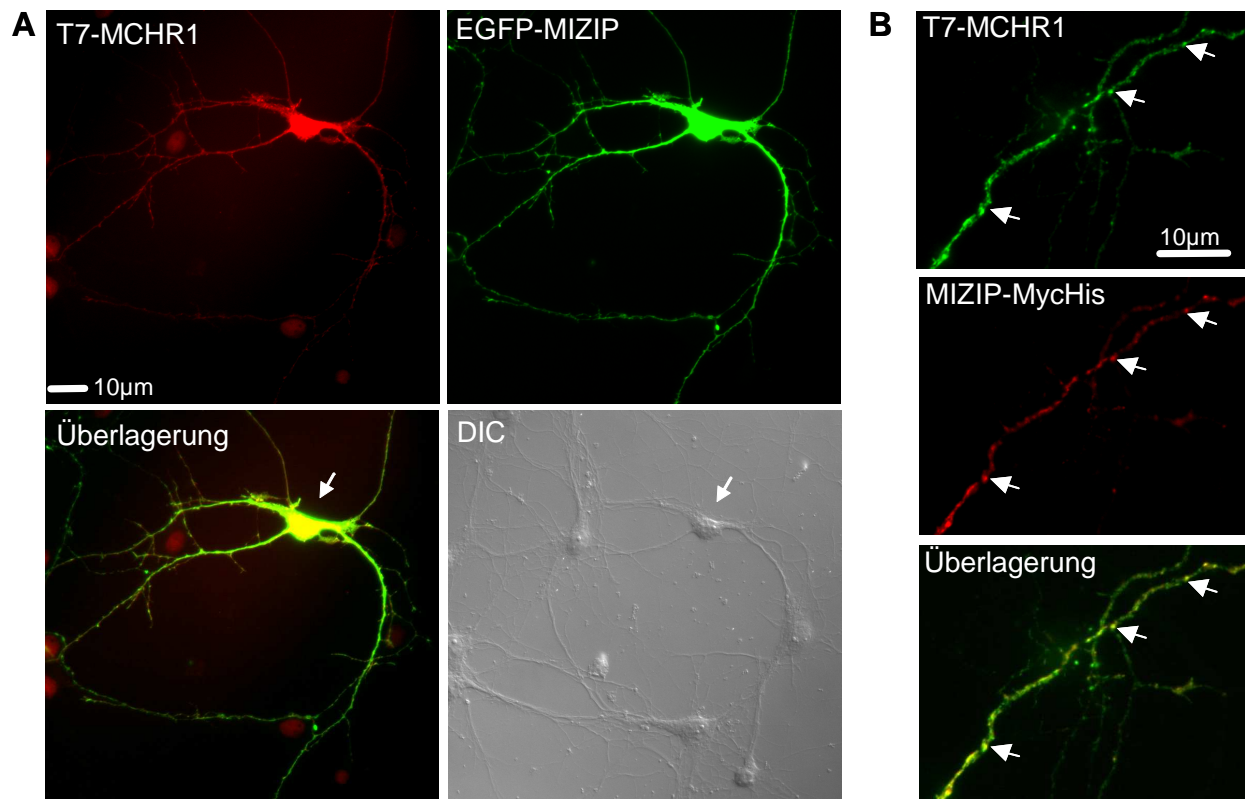


Abbildung 10: Überexpression von MIZIP und MCHR1 in primären Hippokampusneuronen.

A: 7 Tage alte Hippokampusneurone wurden mit T7-MCHR1 und EGFP-MIZIP kotransfiziert und nach weiteren 7 Tagen in Kultur fixiert und immunocytochemisch analysiert. Über das N-terminal fusionierte T7-Epitop wurde der MCHR1 mit einem monoklonalen Anti-T7 Antikörper und einem Cy3-gekoppelten Anti-Maus Antikörper nachgewiesen (rot). EGFP-MIZIP ist über die Autofluoreszenz von EGFP detektiert worden (grün). Die Überlagerung zeigt die Fluoreszenzsignale beider Proteine. **B:** Hippokampusneurone wurden wie in A mit T7-MCHR1 und MIZIP-MycHis kotransfiziert und analysiert. T7-MCHR1 wurde mit dem Anti-T7 Antikörper und einem Cy2-gekoppelten Anti-Maus Antikörper (grün), MIZIP-MycHis mit dem Anti-MIZIP Serum und einem Anti-Meerschwein-Cy3 Antikörper (rot), nachgewiesen.

und MCHR1 in den Hippokampusneuronen überexprimiert. Dazu wurde der vollständige Leserahmen des Ratten-MCHR1 in den Vektor pCDNA3.1-T7 kloniert, so dass die Sequenz des T7-Epitops N-terminal an den MCH-Rezeptor fusioniert ist. Dieses Konstrukt wurde dann zusammen mit MIZIP-MycHis oder EGFP-MIZIP in sieben Tage alte Hippokampusneurone transfiziert und nach weiteren sieben Tagen immunocytochemisch im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Aufnahmen in Abbildung 10A zeigen die Kolokalisation von T7-MCHR1 und EGFP-MIZIP im Zellsoma und den Dendriten durch die gelbe Farbe in der Überlagerung. Zellen, die mit T7-MCHR1 und MIZIP-MycHis kotransfiziert wurden, zeigen eine identische Färbung und Kolokalisation der Proteine. In Abbildung 10B sind Vergrößerungen eines Dendritenabschnitts dieser Zellen gezeigt. Beide Proteine überlappen dort in einem punktförmigen Verteilungsmuster, wie es schon für das endogen exprimierte MIZIP beobachtet wurde (3.1.3).

Die Kolokalisation von MIZIP und MCHR1 in den transfizierten Hippokampusneuronen ist ein wichtiges Indiz für die Interaktion dieser Proteine auch *in vivo*.

3.1.6 Immunhistochemische Untersuchung der Koexpression von MIZIP und MCHR1 im adulten Rattengehirn

Das Expressionsmuster von MCHR1 im Rattengehirn ist bereits auf Proteinebene untersucht worden (Hervieu, G.J. *et al.* 2000; Lembo *et al.* 1999). Mit dem hergestellten Anti-MIZIP Antikörper konnte nun überprüft werden, ob MIZIP mit dem MCHR1 im Rattengehirn *in vivo* koexprimiert wird. Dazu wurden von Gehirnen adulter Ratten Sagittal-Schnitte hergestellt und mit dem affinitätsgereinigten Anti-MIZIP Antiserum sowie dem Anti-MCHR1 Antiserum über Doppel-Immunfluoreszenz analysiert. MIZIP wurde über Rot- und MCHR1 über Grünfluoreszenz identifiziert. Durch Überlagerung beider Fluoreszenzsignale konnten Zellen mit Koexpression anhand der Gelbfärbung erkannt werden. Die entsprechenden Gehirnregionen wurden mit Hilfe des "Rat Brain Atlas" (Paxinos *et al.* 1998) identifiziert. Dabei wurde in mehreren Regionen des Rattengehirns eine Kolokalisation der beiden Proteine in Neuronen beobachtet. Vor allem in der Großhirnrinde, dem Hippokampus, im Hypothalamus und in verschiedenen Kernen des Mesencephalons und Stammhirns wurden deutliche Signale lokalisiert (Abbildung 11). So wurde in Pyramidenzellen der Großhirnrinde (a-c) und des Hippokampus (d-e) eine Kolokalisation von MIZIP und MCHR1 im Zellsoma (Pfeile) und in den Dendriten (Pfeilspitzen) erkannt. In den großen Neuronen des Trigeminuskerns im Mesencephalons (g-i) kolokalisieren beide Proteine ebenfalls im Zellsoma (Pfeil). In Zellen des Brückenkerns (Pons; k-i) ist der MCHR1 deutlich in der Zellmembran lokalisiert (Pfeile), während MIZIP im Cytoplasma verteilt ist. Dagegen sind beide Proteine in Zellen des Olivenkerns (n-p) und des Hypothalamus (q-s) an der Membran kolokalisiert (Pfeil).

Mit diesen immunhistochemischen Untersuchungen konnte also gezeigt werden, dass MIZIP und MCHR1 im Gehirn in mehreren Regionen in denselben Neuronen koexprimiert sind und innerhalb dieser Neurone auch kolokalisieren.

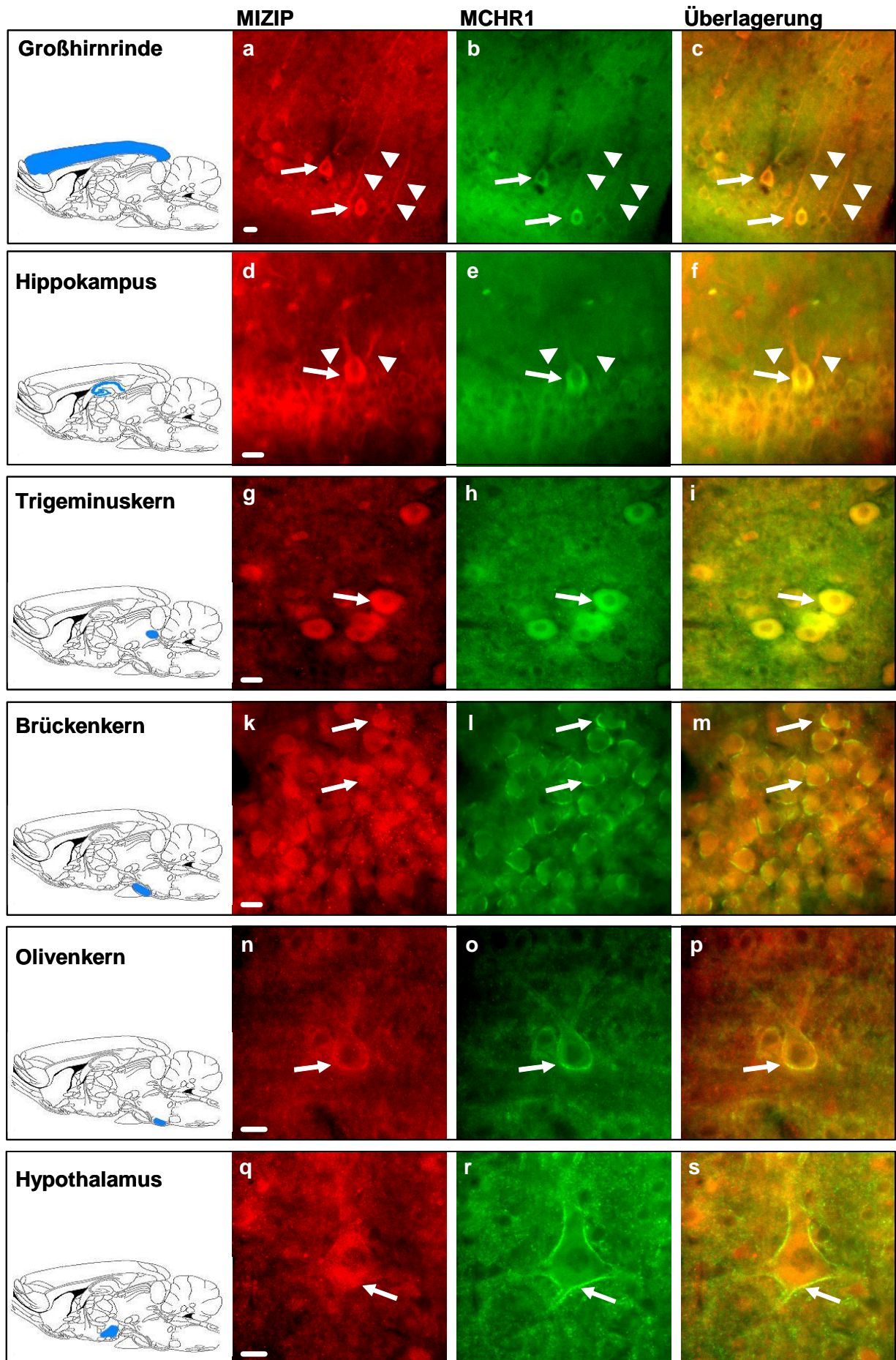


Abbildung 11 (vorherige Seite): Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung von Rattengehirn-Schnitten.

MIZIP wurde mit dem affinitätsgereinigten Anti-MIZIP Serum und Anti-Meerschwein-Cy3 Antikörper, MCHR1 über Anti-MCHR1 und Anti-Kaninchen-Cy2 Antikörper nachgewiesen. Die abgebildeten Regionen sind in den Übersichtsbildern der rechten Spalte blau markiert (nach (Paxinos *et al.* 1998). Weiteres s.Text. (Größenbalken: 10µm)

3.2 Identifizierung von weiteren MIZIP-Interaktionspartnern

Für MIZIP ist zwar die Interaktion mit dem MCH-Rezeptor gezeigt worden und die Kolo-kalisation von MIZIP mit dem Rezeptor im Rattengehirn (3.1.6) lässt eine physiologische Bedeutung dieser Interaktion erwarten, jedoch ist über die genaue Funktion von MIZIP bisher nichts bekannt. Über die Identifizierung von weiteren Proteinen, die mit MIZIP interagieren, sollten weitere Anhaltspunkte über die molekularen und physiologischen Funktionen von MIZIP erhalten werden.

3.2.1 Suche nach MIZIP-Interaktionspartnern in einer humanen GehirncDNA-Bank mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ermöglicht das *Screening* von cDNA-Banken nach DNA-Sequenzen, deren Genprodukte Protein-Protein-Interaktionen mit einem bestimmten Protein eingehen. Um nach solchen Interaktionspartnern von MIZIP zu suchen, wurde das gesamte MIZIP-Protein als Köder eingesetzt und als Fusionsprotein der GAL4-DNA-Bindedomäne in dem haploiden Hefestamm *S.cerevisiae* AH109 exprimiert. Eine humane GehirncDNA-Bank wurde als Fusionsprotein der GAL4-Aktivierungsdomäne in dem haploiden Stamm Y187 exprimiert. Durch Paarung beider Stämme gelangen der Köder und die cDNA-Bank-Fusionsproteine in die selben Zellen. Kommt es dort zur Interaktion beider Proteine, werden DNA-Bindedomäne und Aktivierungsdomäne in eine räumliche Nähe gebracht und könne dadurch verschiedene Reportergene aktivieren. Abbildung 12 fasst schematisch das beschriebene Hefesystem zusammen.

Bei dem durchgeführten *Screen* wurden insgesamt 3.3 Millionen Klone durchmustert. Davon vermochten über 300 Klone auf dem Selektionsmedium zu wachsen. 150 Klone wurden willkürlich ausgewählt und einem β -Galactosidase-Test unterzogen. Dabei zeigten alle 150 Klone ein positives Ergebnis. Da es nicht zu erwarten ist, dass alle diese Klone einen echten spezifischen MIZIP-Interaktionspartner exprimieren, wurde versucht falsch-positive Klone über Retransformationsversuche zu eliminieren.

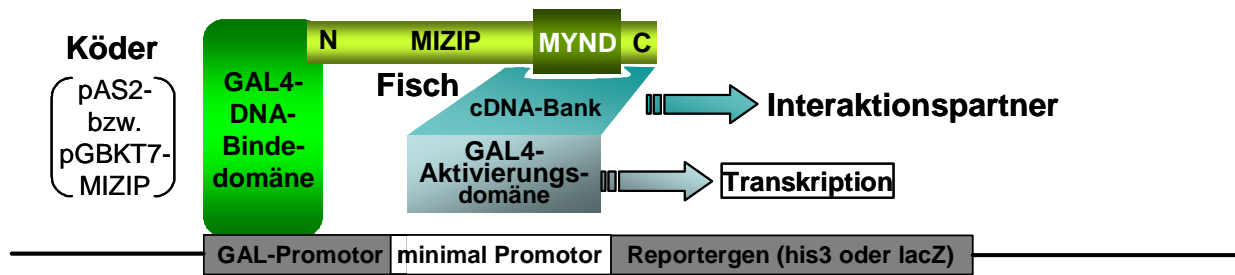


Abbildung 12: Schematische Darstellung des angewandten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Der vollständige MIZIP-Leserahmen wurde in den pAS2.1- bzw. pGBKT7-Vektor kloniert und als Fusionsprotein der GAL4-DNA-Bindedomäne exprimiert (Köder). Die cDNA-Bank ist in den pACT2-Vektor kloniert, so dass die cDNA-Produkte als Fusionsproteine der GAL4-Aktivierungsdomäne exprimiert werden (Fisch). Kommt es zur Interaktion eines cDNA-Produkts mit MIZIP, wird die GAL4-Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe zur GAL4-DNA-Bindedomäne gebracht und beide können als funktionelle Einheit die Expression von Reportergenen unter der Kontrolle von GAL4-sensitiven Promotorsequenzen (GAL-Promotor) in den Hefezellen aktivieren.

Dazu wurden 18 Hefeklone ausgewählt und aus ihnen der pACT2-Vektor isoliert und erneut mit pAS2-MIZIP in Hefezellen kotransformiert. Von diesen 18 Klonen vermochten anschließend nur noch 6 Klone auf dem Selektionsmedium zu wachsen. Die Sequenzierung der cDNA dieser Klone bestätigte dann den Verdacht auf falsch-positive Ergebnisse, da die meisten analysierten Sequenzen keine sinnvollen Leseraster enthielten. Nur Klon Nr. 12 konnte als *β-Tubulin 5* (TUBB5, ACC: NM_006087) identifiziert werden. Der Klon enthält die gesamte kodierende TUBB5-Sequenz aus 1334 Basenpaaren, zuzüglich 83 bp der 5'-UTR und einem Teil der 3'-UTR, der aber beim Sequenzieren nicht vollständig bestimmt werden konnte. Allerdings stimmt das Leseraster der Tubulinsequenz von Klon 12 nicht mit dem Raster der Aktivierungsdomäne des pACT-Vectors überein.

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse wurde der Versuch mit einem anderen Köderplasmid wiederholt. Der Vektor pGBKT7 ermöglicht eine stringenter Selektion als pAS2.1. Wiederum wurde die vollständige MIZIP-Sequenz in das Köderplasmid kloniert und der Versuch wie beschrieben durchgeführt. Es wurden 5.8 Millionen Klone durchmustert und erneut sehr viele Klone erhalten, die auf dem Selektionsmedium zu wachsen vermochten (mehr als 1000). Von diesen wurden wiederum 58 Klone im β -Galactosidase-Assay getestet; mit einem positiven Ergebnisse für alle Klone. Von 10 retransformierten Klonen überlebten immer noch 7 Klone auf Selektionsmedium, die anschließend sequenziert wurden. Auch hier zeigten die meisten Sequenzen keine identifizierbaren Leseraster. Es konnte aber erneut der gleiche *β-Tubulin 5* – Klon (Klon 30-1) einmal identifiziert werden.

Die Spezifität der Interaktion von MIZIP mit diesem Klon wurde mit einem weiteren Retransformationsexperiment kontrolliert. Dazu wurde der Tubulin-Klon (pACT-

TUBB) zusammen mit pGBKT7-MIZIP bzw. zusammen mit dem leeren Vektor pGBKT7 in Hefezellen transformiert. Ebenso wurde pGBKT7-MIZIP zusammen mit dem leeren pACT2-Vektor transformiert. Die Hefezellen konnten aber nur bei Kotransformation von pGBKT7-MIZIP und pACT2-TUBB auf Selektionsmedium wachsen (Tabelle 1). Die Interaktion ist also für den Tubulin-Klon und MIZIP spezifisch.

Köder	Fisch	Wachstum der Hefen
pGBKT7-MIZIP	pACT2-TUBB5	+++
pGBKT7-MIZIP	pACT2	-
pGBKT7	pACT2-TUBB5	-

Tabelle 1: Kotransformation in den Hefestamm AH109.

Interaktion der Proteine MIZIP und β -Tubulin (TUBB5) führt zum Wachstum der Hefezellen auf Selektionsmedium (SD-Trp/Leu/His/Ade).

3.2.2 Affinitätsaufreinigung von MIZIP-bindenden Proteinen aus HEK293-Zellen

Da der Versuch, mit dem Hefe-Zwei-Hybridsystem neue Interaktionspartner für MIZIP zu identifizieren, zunächst keine viel versprechenden Ergebnisse lieferte, wurde stattdessen ein affinitätschromatographischer Ansatz gewählt:

Bei dieser neu entwickelten Affinitätsaufreinigungsmethode (Brendel *et al.* 2004), wird die sehr spezifische und starke Interaktion zwischen der PDZ-Domäne des neuronalen Proteins SSTRIP/Shank und dem C-Terminus des Proteins GKAP ausgenutzt (Naisbitt *et al.* 1999; Tu *et al.* 1999).

Dafür wurde die vollständige MIZIP-cDNA in den Vektor pSTAG kloniert. Dieser Vektor enthält die Sequenz der PDZ-Domäne von SSTRIP/Shank, so dass ein Fusionsprotein aus MIZIP und der C-terminal fusionierten PDZ-Domäne entsteht. Dieses Konstrukt wurde in HEK293-Zellen überexprimiert und aus den Zellen ein Gesamt-Proteinextrakt hergestellt. Der Extrakt wurde mit einem synthetischen Peptid aus den letzten 10 C-terminalen Aminosäuren von GKAP, das kovalent an NHS-Sepharose gekoppelt wurde, inkubiert. Dieses Peptid enthält das Bindemotiv für die SSTRIP/Shank-PDZ-Domäne und kann somit über die PDZ-Interaktion an das MIZIP-PDZ Fusionsprotein binden. Dieses wird dabei an der Sepharose immobilisiert und der gesamte Komplex kann leicht durch Sedimentation der Sepharose isoliert

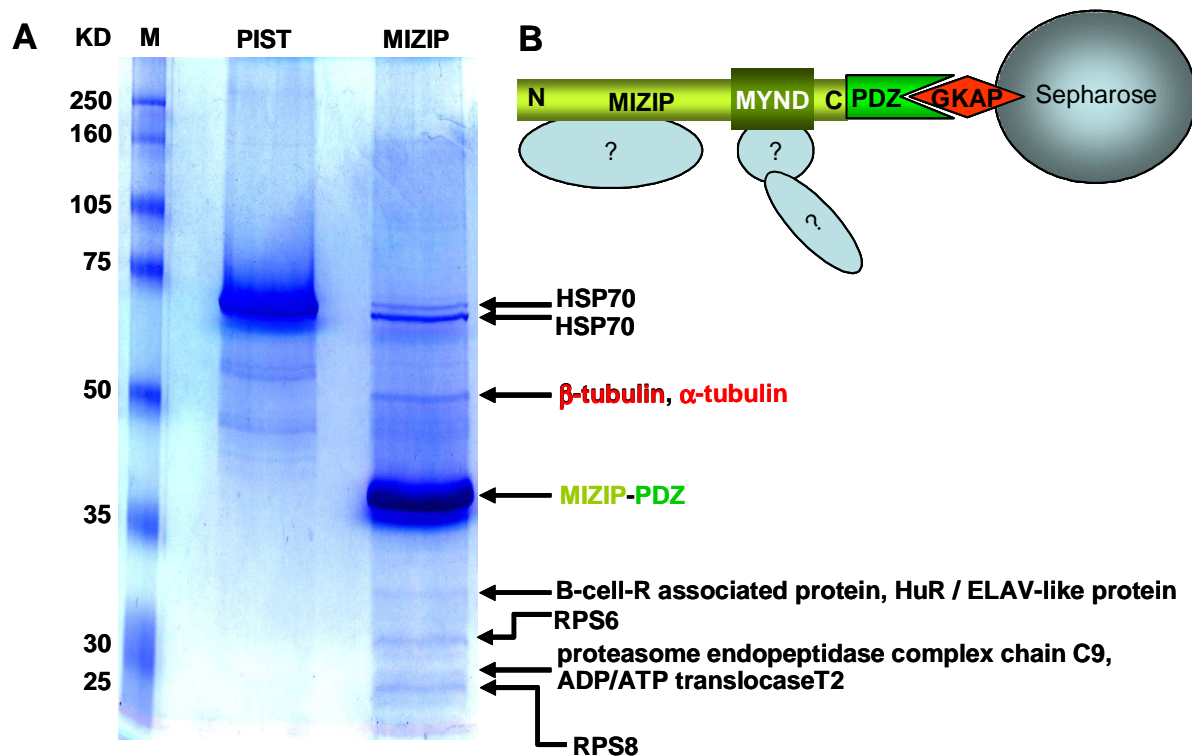


Abbildung 13: Affinitätsaufreinigung von MIZIP-bindenden Proteinen aus HEK293-Zellen

A: Die PIST-PDZ und MIZIP-PDZ Fusionsproteine wurden einschließlich gebundener HEK-Zell-Proteine aufgereinigt und im Coomassie-Gel aufgetrennt. Die Fusionsproteine sind an den starken Banden zu erkennen (PIST-PDZ: 70kD, MIZIP-PDZ: 41kD). Weitere Banden, die spezifisch in der "MIZIP-Spur" erscheinen (durch Pfeile markiert) wurden massenspektrometrisch analysiert. Die identifizierten Proteine sind angegeben. **B:** Schematische Darstellung des aufgereinigten MIZIP-PDZ-Komplexes: Das vollständige MIZIP-Molekül ist C-terminal an die SSTRIP-PDZ-Domäne fusioniert. Diese bindet an das GKAP-Peptid, das kovalent an NHS-Sepharose gekoppelt ist. Zellproteine, die an das Fusionsprotein binden, können so aufgereinigt werden.

und aufgereinigt werden. Dabei wurde so verfahren, dass auch HEK-Zellproteine an dem Komplex gebunden bleiben, die mit dem MIZIP-Anteil des Fusionsproteins interagieren (vgl. Abbildung 13B). Die Proteine des aufgereinigten Komplexes wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Um die Banden von Proteinen identifizieren zu können, die spezifisch an den MIZIP-Anteil binden, wurde parallel ein identisches Kontroll-Experiment durchgeführt, bei dem das unverwandte Protein PIST (Neudauer *et al.* 2001) als PDZ-Fusionsprotein eingesetzt wurde. Abbildung 13A zeigt das Coomassie-gefärbte Proteingel der aufgereinigten Proteinkomplexe. In der Spur des aufgetrennten MIZIP-Proteinkomplexes sind mehrere deutliche Banden zu erkennen, die im PIST-Komplex nicht auftreten. Die Banden bei 70, 50, 35, 33, 30 und 25 kD wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die Proteine extrahiert. Die Identität der Proteine wurde dann massenspektrometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 und Tabelle 2 aufgelistet. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass die Bande bei 50kD als α -

und β -Tubulin identifiziert wurden. β -Tubulin wurde bereits zweimal mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System als potentieller MIZIP-Interaktionspartner identifiziert (s. 3.2.1).

Bande [KD]	Protein	Masse [D]	Peptidsequenz	Protein ID
72	HSP70	1680,42	WPFQVINDGDKPK	NP_005337
70	HSP70	2774,27	QTQIFTTYSDNQPGLIQQVYEGER	NP_005337
50	α -Tubulin	1824,08	VGINYQPPTVVPGGDLAK	NP_005991
	β -Tubulin	1658,89	ALTVPELTQQVFDAK	AAH20946
40	MIZIP-PDZ	3421,95	AQTPIEEFTPTPAFPALQYL- ESVDEGGVAWR	AAF35887
32	B-Cell associated protein	1176,69	FNASQLITQR	AAF17231
	HuR/ELAV-like protein	1187,69	VLVDQTTGLSR	AAH03376
30	Ribosomales Protein S6	1283,73	DIPGLTDTTVPR	AAH27620
27	Proteasome Endopeptidase Komplex Chain9	1225,75	LLDEVFFSEK	SNHUC9
	ADP/ATP Translokase T2	1218,79	DFLAGGVAAAISK	A29132
25	Ribosomales Protein S8	1313,79	LTPEEEEEILNK	S25022

Tabelle 2: Ergebnisse der Massenspektrometrischen Analyse von MIZIP-bindenden Proteinen aus HEK293-Zellen

Es sind die identifizierten Proteine entsprechend der Größe der analysierten Bande aufgelistet. Für jedes Protein ist exemplarisch eine identifizierte Peptidmasse und die korrespondierende Peptidsequenz angegeben. Die angegebenen Protein-Identifikationsnummern beziehen sich auf die *NCBI Protein* Datenbank.

3.2.3 Charakterisierung der Interaktion von MIZIP und Tubulin über *GST-Pulldown-Experimente*

Tubulin ist mit zwei unterschiedlichen *Screening-Methoden* als ein MIZIP-bindendes Protein identifiziert worden. Dies macht eine wirkliche Interaktion beider Proteine wahrscheinlich. Daher wurde die Interaktion mit Hilfe aufgereinigter rekombinanter Proteine verifiziert. Die vollständige α -Tubulin-cDNA wurde dafür aus cDNA von HEK293-Zellen, die von β -Tubulin aus dem Hefe-Vektor von Klon 30-1, über PCR amplifiziert und in den Vektor pGex4T2 kloniert. Mit diesen Vektoren konnten in *E.coli*-Zellen GST-Tubulin Fusionsproteine (GST-TUBA, GST-TUBB) exprimiert werden. Die aufgereinigten Fusionsproteine wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und mit nativ aufgereinigtem His-MIZIP Fusionsprotein inkubiert. Über Westernblotanalyse wurde dann ermittelt, ob His-MIZIP von den GST-Fusionsproteinen präzipitiert werden konnte. Zur Negativkontrolle wurde reines GST

mit His-MIZIP inkubiert. His-MIZIP lässt sich sowohl mit GST-TUBA, als auch mit GST-TUBB präzipitieren. Mit GST allein kann jedoch kein His-MIZIP präzipitiert werden. MIZIP bindet also direkt und spezifisch an α - und β -Tubulin (Abbildung 14).

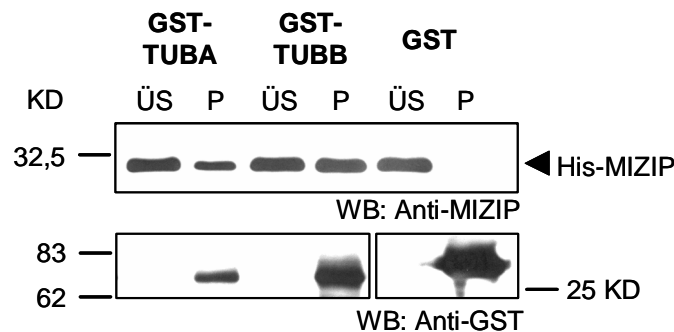


Abbildung 14: Interaktion von MIZIP und Tubulin im GST-Pulldown-Experiment

GST-Fusionsproteine von α -Tubulin (GST-TUBA) und β -Tubulin (GST-TUBB) sowie GST allein wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit aufgereinigtem His-MIZIP inkubiert. Die Proben wurden präzipitiert und im Westernblot analysiert. Die immobilisierten GST-Proteine sind im unteren Blot mit einem Anti-GST Antikörper nachgewiesen worden. Sie erscheinen dementsprechend ausschließlich im Präzipitat (P). Im oberen Blot ist das lösliche His-MIZIP Fusionsprotein über das Anti-MIZIP Serum nachgewiesen worden. Es erscheint in allen Ansätzen im Überstand (ÜS), bei GST-TUBA und GST-TUBB zusätzlich auch im Präzipitat. D.h. es wurde selektiv mit den GST-Tubulin Fusionsproteinen kopräzipitiert.

α - und β -Tubulin haben den gleichen grundlegenden Aufbau aus drei funktionellen Domänen: Der N-Terminus umfasst die GTP-bindende Domäne, in der Molekülmitte ist im β -Tubulin die Bindungsstelle für Taxol lokalisiert und an den C-Terminus binden die Mikrotubuli assoziierte Proteine (MAPs) und Motorproteine (Nogales *et al.* 1998). Um einzugrenzen, ob MIZIP an den N- oder C-terminalen Bereich von Tubulin bindet, wurden zunächst zwei weitere GST-Fusionsproteine hergestellt, die jeweils nur die N-terminale (GD) oder die C-terminale (CT) Hälfte von β -Tubulin enthalten (vgl. Abbildung 15B). Dazu wurden mittels PCR aus dem Hefeklon 30-1 die entsprechenden Fragmente amplifiziert und in den Vektor pGex4T2 (GD) bzw. pGex6P1 (CT) kloniert. Die GST-Fusionsproteine wurden in Bakterien exprimiert, aufgereinigt und an GSH-Sepharose gebunden. Anschließend wurde wiederum im GST-Pulldown-Experiment getestet, ob sie His-MIZIP Fusionsprotein binden können. Als Positivkontrolle wurde das GST- β -Tubulin Fusionsprotein eingesetzt und als Negativkontrolle ein Fusionsprotein aus GST und dem C-Terminus des humanen Somatostatinrezeptor 5 (zur Verfügung gestellt von Wolf Wente).

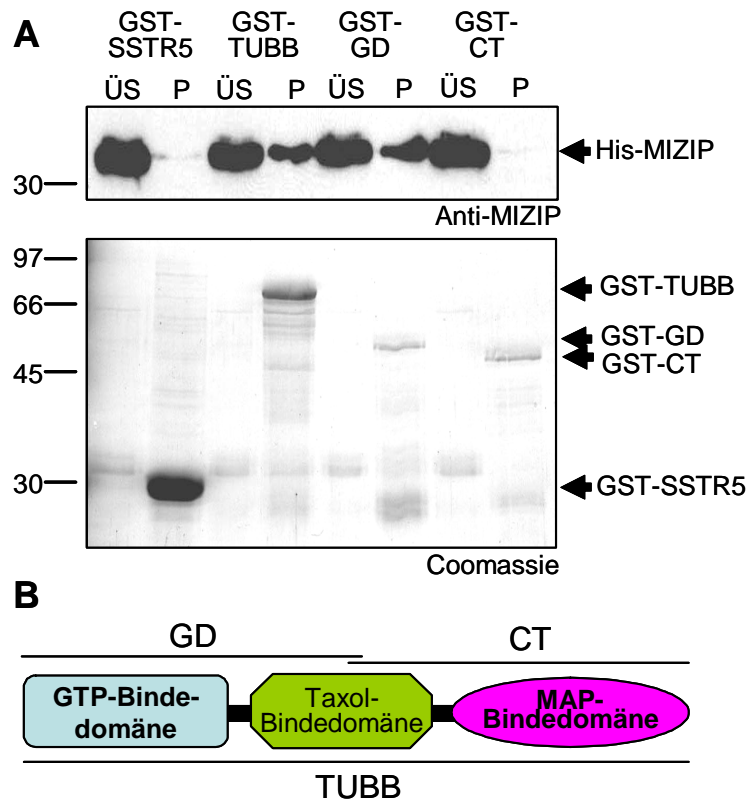


Abbildung 15: GST-Pulldown-Experiment mit β -Tubulin-Fragmenten

A: GST-Fusionsproteine von Somatostatinrezeptor 5 (GST-SSTR5), volle Länge β -Tubulin (GST-TUBB), der N-terminalen Hälfte von β -Tubulin (GST-GD) und der C-terminalen Hälfte von β -Tubulin (GST-CT) wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit His-MIZIP inkubiert. Nach Sedimentation der Sepharose wurden Proben der Überstände (ÜS) und Präzipitate (P) über SDS-PAGE aufgetrennt. Im Coomassie-Gel (unten) wurden die präzipitierten GST-Fusionsproteine nachgewiesen. Die entsprechenden Banden sind durch Pfeile markiert. Im Westernblot (oben) wurde das His-MIZIP Fusionsprotein mit dem Anti-MIZIP Serum nachgewiesen. Es ist in allen Überständen, aber nur im Präzipitat von GST-TUBB und GST-GD detektierbar. **B:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von β -Tubulin. Die Bereiche der Tubulinfragmente GD, CT und TUBB sind durch schwarze Linien dargestellt.

Im Präzipitat von GST-TUBB und GST-GD konnte dabei jeweils kopräzipitiertes His-MIZIP Protein nachgewiesen werden, nicht aber im Präzipitat von GST-CT oder GST-SSTR5 (Abbildung 15). MIZIP bindet also an der N-terminalen Hälfte von Tubulin, in der auch die GTP-Bindestelle lokalisiert ist. Damit unterscheidet es sich von den bisher bekannten MAPs, die mit dem C-terminalen Bereich von Tubulin interagieren.

Die Verwendung von GST-SSTR5 als weitere Negativkontrolle unterstreicht die Spezifität der Interaktion zwischen MIZIP und Tubulin.

Um auch den Bereich im MIZIP-Molekül näher einzugrenzen, der die Interaktion zu Tubulin vermittelt, wurden zwei MIZIP-Fragmente in den Vektor pGex4T2 kloniert, die nur den vorderen Bereich von MIZIP ohne die MYND-Domäne (GST-V5), bzw. nur die MYND-Domäne und den gesamten C-Terminus umfassen (GST-MYND). Die

entsprechenden GST-Fusionsproteine wurden aufgereinigt und an GSH-Sepharose gekoppelt. Für ein *GST-Pulldown*-Experiment wurden sie mit aufgereinigtem α/β -Tubulin Dimeren aus Schweinegehirn (Fa. Cytoskeleton) inkubiert und anschließend präzipitiert.

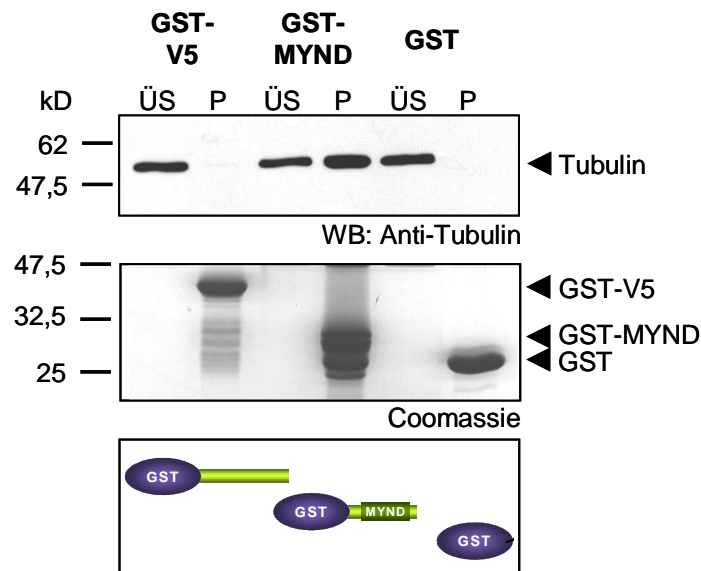


Abbildung 16: GST-Pulldown-Experiment mit MIZIP-Fragmenten.

GST-Fusionsproteine des N-terminalen Bereichs von MIZIP (V5) und des C-terminalen Bereichs (MYND) sowie GST allein wurden an GSH-Sepharose gekoppelt und mit aufgereinigten α/β -Tubulin-Dimeren inkubiert. Die Präzipitation der GST-Fusionsproteine wurde im Coomassiegefärbten Gel überprüft (mittleres Bild). Tubulin wurde mit einem Anti- α/β -Tubulin Antikörper im Westernblot nachgewiesen (oberes Bild). Es ist im Überstand (ÜS) aller Ansätze, aber nur im Präzipitat (P) von GST-MYND zu detektieren.

Dabei konnte nur mit dem GST-MYND Fusionsprotein Tubulin kopräzipitiert werden, nicht aber mit GST-V5. Tubulin bindet also an den C-terminalen Bereich von MIZIP, der im wesentlichen aus der MYND-Domäne besteht (Abbildung 16). Durch die Verwendung des aufgereinigten Tubulins aus Schweinegehirn, wurde mit diesem Experiment außerdem gezeigt, dass MIZIP auch an das α/β -Dimer bindet, das in der Zelle die funktionelle Untereinheit der Mikrotubuli darstellt.

3.2.4 Immuncytochemische Untersuchung der MIZIP / Tubulin – Interaktion

α - und β -Tubulin sind die monomeren Bausteine der Mikrotubuli, einer Hauptkomponente des Cytoskeletts, mit essentiellen Funktionen für den intrazellulären Transport, die Zellteilung und die Zellmorphologie der Eukaryoten. α - und β -Tubulin bilden ein Heterodimer, aus dem durch Polymerisation die Mikrotubuli entstehen. Da mit *GST-Pulldown*-Experimenten gezeigt wurde, dass MIZIP an

monomeres α - und β -Tubulin sowie an das α/β -Dimer bindet, stellt sich die Frage, ob es auch zu einer Interaktion mit polymerisierten Mikrotubuli kommt.

Es wurden daher COS7-Zellen transient mit MIZIP-MycHis transfiziert und immunocytochemisch auf Kolokalisation von MIZIP und dem endogen exprimierten Tubulin untersucht. Mit einem Anti- β -Tubulin Antikörper wurden die Mikrotubuli der Zellen angefärbt. Sie erstrecken sich vom Centromer aus zur Zellperipherie. MIZIP hingegen ist über die gesamte Zelle verteilt (Abbildung 17A). Die Überlagerung beider Bilder verdeutlicht, dass es keine exakte Kolokalisation von MIZIP und den Mikrotubuli gibt. Nur im Bereich des Centromers, wo auch MIZIP stärker konzentriert vorkommt, ist eine Kolokalisation zu erkennen (Pfeil). Demnach scheint MIZIP nicht an Mikrotubuli zu binden.

Der Vergleich von transfizierten (Pfeil) mit untransfizierten Zellen (Pfeilspitze) zeigt weiterhin, dass die Überexpression von MIZIP keinen Einfluss auf die Formation der Mikrotubuli hat.

Im *GST-Pulldown*-Experiment wurde aber gezeigt, dass MIZIP an das lösliche α/β -Dimer bindet. Daher wurden die Zellen mit der Substanz *Nocodazol* behandelt. Nocodazol bewirkt die Depolimerisation von Mikrotubuli, die dabei in die α/β -Dimere zerfallen. Unter diesen Bedingungen werden rundliche Strukturen im Cytoplasma von dem Anti- β -Tubulin Antikörper angefärbt (Pfeile in Abbildung 17B). Dieselben Strukturen werden jetzt auch von dem Anti-MIZIP Serum erkannt und in der Überlagerung der Bilder ist die exakte Kolokalisation beider Proteine an der Gelbfärbung dieser Strukturen deutlich zu erkennen (Abbildung 17B). Zur Kontrolle der Wirkung von Nocodazol wurden gleiche Zellen mit einem Antikörper gegen das Golgi-Marker Protein GM130 angefärbt. GM130 ist ein Strukturprotein der cis-Golgi-Matrix und ist ausschließlich dort lokalisiert (Nakamura *et al.* 1995). Der Golgiapparat selbst wird durch Mikrotubuli in seiner Struktur erhalten und befindet sich in COS7-Zellen im Bereich des Centrosoms (Abbildung 17C). Infolge der Zerstörung der Mikrotubuli durch Nocodazol, zerfällt der Golgi in sog. *Ministacks*, die sich im Cytosol verteilen (Drecktrah *et al.* 1999). In Abbildung 17D ist dies an dem Auftreten kleiner punktförmiger Strukturen zu erkennen, die der Anti-GM130 Antikörper anfärbt. Diese Punkte überlappen aber nicht mit dem Färbemuster des Anti-MIZIP Serums, wie die Überlagerung der Signale beweist. Die Kolokalisation von MIZIP und Tubulin nach der Behandlung mit Nocodazol, scheint also für diese beiden Proteine spezifisch zu sein. Die immunocytochemischen Untersuchungen unterstützen die These, dass

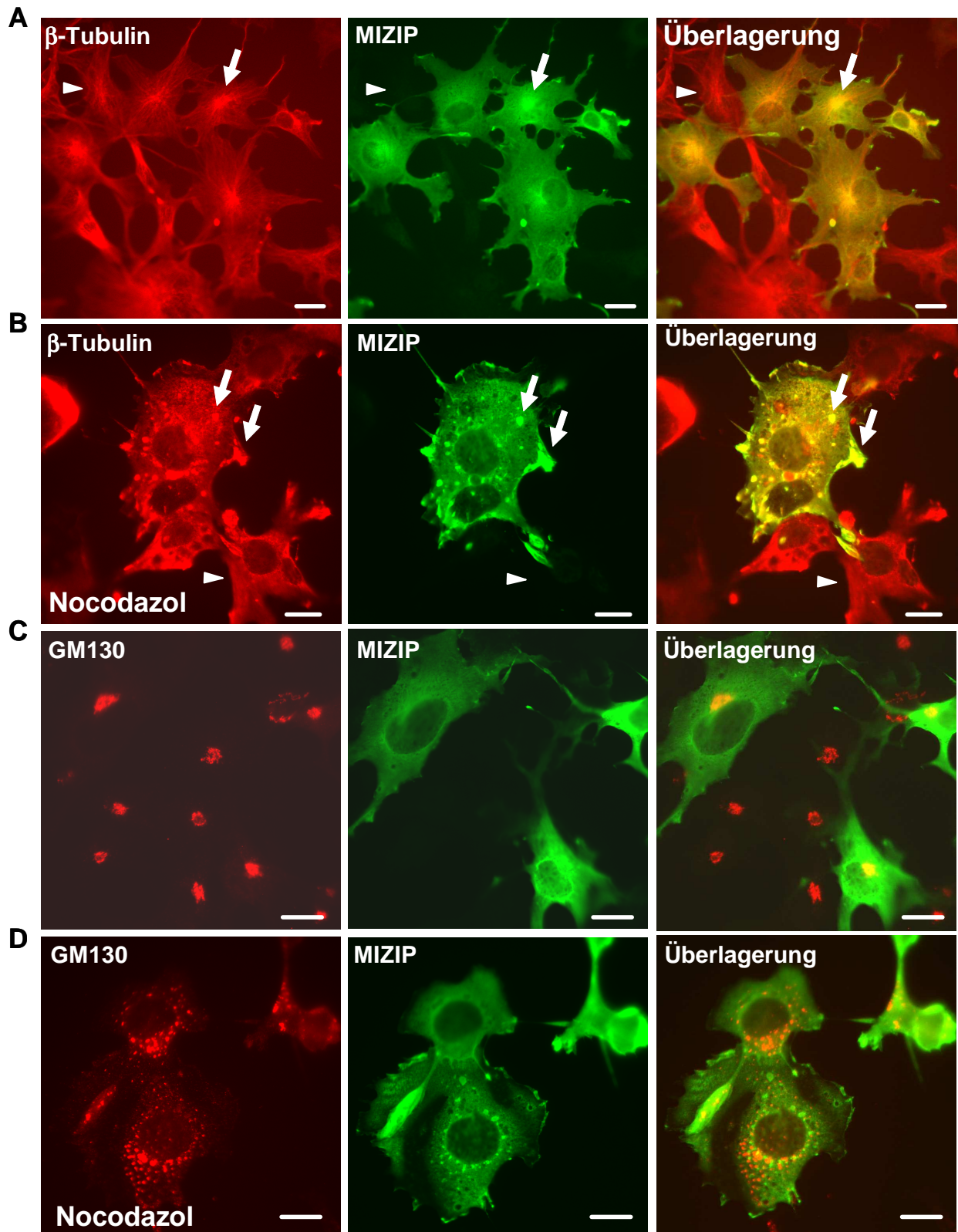


Abbildung 17: Immunocytochemische Untersuchung der Kollokalisierung von MIZIP und Tubulin. COS7-Zellen wurden mit MIZIP-MycHis transient transfiziert. MIZIP wurde mit dem Anti-MIZIP Serum und einem Anti-Meerschwein-FITC (grün) konjugierten Antikörper nachgewiesen. Endogen exprimiertes β -Tubulin wurde mit einem Anti- β -Tubulin und entsprechendem Anti-Maus-Cy3 (rot) Antikörpern angefärbt (A+B). GM130 wurde mit dem Anti-GM130 und Anti-Maus-Cy3 Antikörpern markiert (C+D). Die Zellen in B+D wurden vor der Fixierung für 4h mit 10 μ g/ml Nocodazol behandelt. (Größenbalken: 10 μ m)

MIZIP zwar das lösliche α/β -Tubulin Dimer binden kann, aber keine Interaktion zu polymerisierten Mikrotubuli zeigt.

3.2.5 MIZIP bindet an sich selbst

Mit einem *GST-Pulldown*-Experiment wurde getestet, ob MIZIP mit sich selbst interagieren kann. Dazu wurden die GST-Fusionsproteine GST-MIZIP, GST-V5 und GST-MYND (vgl. 3.2.3 und Abbildung 18C) an GSH-Sepharose gekoppelt und mit His-MIZIP Fusionsprotein inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein GST-SSTR5 Fusionsprotein verwendet. Die Überstände und Präzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt oder im Westernblot analysiert. Mit einem Anti-His Antikörper wurde in den Präzipitaten aller GST-MIZIP Fusionsproteine Banden von His-MIZIP detektiert (Abbildung 18A). Die His-MIZIP-Bande im Präzipitat von GST-MYND ist dabei stärker ausgeprägt als die anderen Signale des Anti-His Antikörpers, da mehr GST-MYND Fusionsprotein als GST-MIZIP oder GST-V5 zum Präzipitieren von His-MIZIP eingesetzt wurde (vgl. Coomassie-Gel in Abbildung 18B).

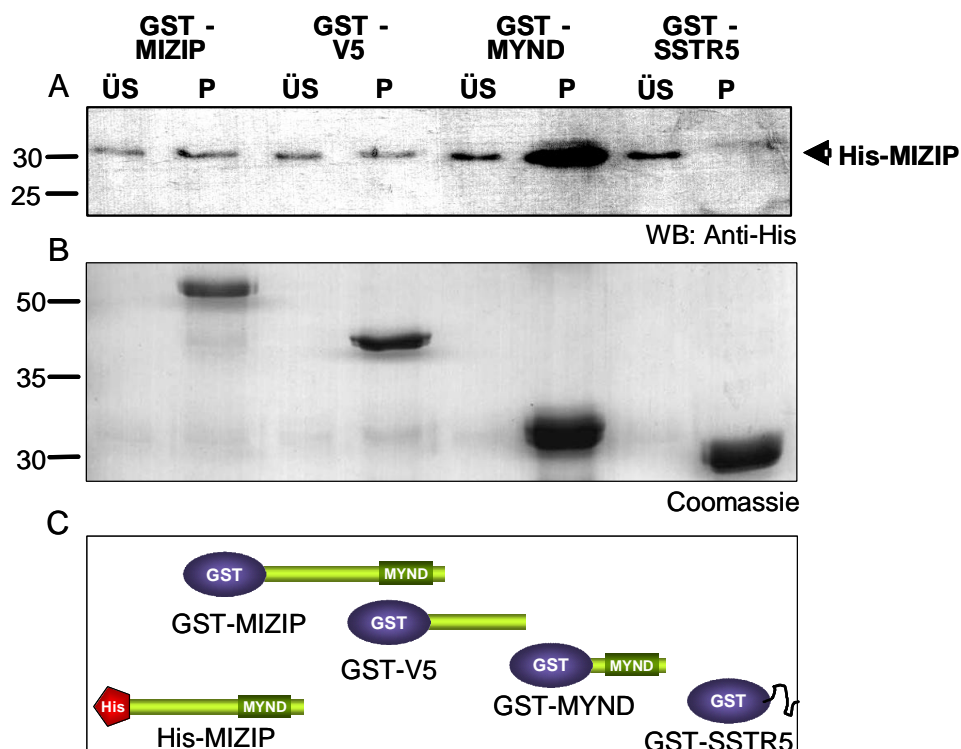


Abbildung 18: GST-Pulldown-Experiment zum Nachweis der Bindung von MIZIP an sich selbst. GST-Fusionsproteine von MIZIP, V5, MYND und SSTR5 wurden an GSH-Sepharose gebunden und zum Präzipitieren von His-MIZIP verwendet. **A:** Im Westernblot wurden die Überstände (ÜS) und Präzipitate (P) der Ansätze mit dem Anti-His Antikörper analysiert. Der Antikörper erkennt Banden des His-MIZIP Fusionsproteins bei etwa 30kDa. **B:** Identische Proben wie in A wurden im Coomassie-Gel analysiert. Es sind die eingesetzten GST-Fusionsproteine zu erkennen: GST-MIZIP (53kDa), GST-V5 (44kDa), GST-MYND (34kDa), GST-SSTR5 (30kDa). **D:** Schematische Darstellung der eingesetzten Fusionsproteine. GST-MIZIP und His-MIZIP enthalten jeweils den vollständigen MIZIP-Leserahmen. GST-V5 enthält die Aminosäuren 1-157 und GST-MYND die Aminosäuren 156-227 von MIZIP.

Vom GST-SSTR5 Fusionsprotein wurde eine vergleichbar große Menge eingesetzt. Trotzdem lässt sich im Präzipitat kein His-MIZIP Protein nachweisen. MIZIP ist also in der Lage an sich selbst zu binden. Dabei muss es sowohl in der N-terminalen Hälfte (V5) wie auch im C-terminalen Bereich (MYND) jeweils eine Bindungsstelle geben, da das vollständige His-MIZIP sowohl an GST-V5 als auch an GST-MYND binden kann.

3.2.6 Funktion der MYND-Domäne

Als einzige konservierte Struktur enthält MIZIP eine MYND-Domäne. Dieser speziellen Zinkfinger-Domäne wird die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen zugeschrieben. Bei den untersuchten Interaktionen zwischen MIZIP und Tubulin bzw. MIZIP und sich selbst könnte die MYND-Domäne eine wichtige Rolle spielen, da die Bindung jeweils von dem C-terminalen Bereich des MIZIP-Moleküls vermittelt wird, wo die MYND-Domäne lokalisiert ist (vgl. 3.2.3 und 3.2.5.). Die Zinkfinger der MYND-Domäne enthalten je ein Zn^{2+} -Ion, das von konservierten Cystein- und Histidin-Resten koordiniert wird.

Um weitere Hinweise über den Einfluss der MYND-Domäne auf die Protein-Interaktionen von MIZIP zu erhalten, wurden *GST-Pulldown*-Experimente in Gegenwart von EDTA durchgeführt. EDTA komplexiert Zn^{2+} -Ionen und entzieht sie so dem Protein. Die MYND-Domäne verliert dabei ihre intakte Zinkfinger-Struktur und wird funktionell ausgeschaltet.

Für das Experiment wurden GST-Fusionsproteine von MIZIP und Tubulin (GST-MIZIP bzw. GST-TUBB) an GSH-Sepharose immobilisiert und mit His-MIZIP Fusionsprotein inkubiert. Zu jeweils zwei parallelen Ansätzen wurde je einmal 20mM EDTA bzw. 20 μ M $ZnCl_2$ zugegeben. Durch die erhöhte Zink-Konzentration sollte die Struktur der MYND-Domäne zusätzlich stabilisiert werden. In einem Kontrollexperiment wurde in gleicher Weise mit den Proteinen GST-SSTR5 und His-PDZK1 (zur Verfügung gestellt von Wolf Wenthe) verfahren. Für PDZK1 ist gezeigt worden, dass es spezifisch über eine PDZ-Domäne an den C-Terminus von SSTR5 bindet (Wenthe 2004). Diese PDZ-Interaktion ist unabhängig von jeglichen Metallionen und sollte daher von EDTA nicht zu beeinflussen sein. In Abbildung 19 ist das Ergebnis des Experiments gezeigt. In den Ansätzen mit erhöhter Zink-Konzentration sind Banden von His-MIZIP in den Präzipitaten der GST-Fusionsproteinen GST-TUBB und GST-MIZIP eindeutig nachweisbar. In Gegenwart von EDTA kann jedoch

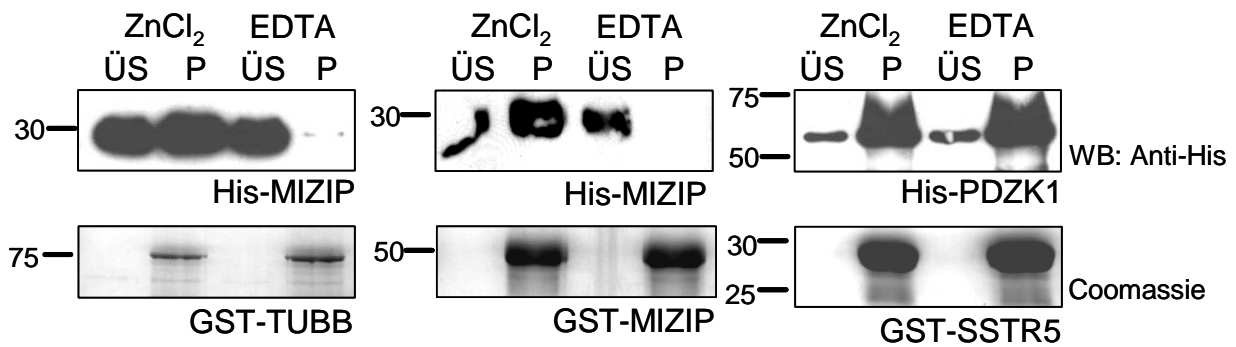


Abbildung 19: GST-Pulldown-Experiment mit MIZIP unter Einfluss von EDTA

Die GST-Fusionsproteine GST-TUBB, GST-MIZIP und GST-SSTR5 wurden an GSH-Sepharose gekoppelt und in Anwesenheit von $ZnCl_2$ oder EDTA mit His-MIZIP bzw. His-PDZK1 inkubiert und anschließend präzipitiert. Proben der Überstände (ÜS) und Präzipitate (P) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Die GST-Fusionsproteine wurden im Coomassie-Gel (untere Reihe), die His-Fusionsproteine im Westernblot über einen Anti-His Antikörper nachgewiesen (obere Reihe).

mit beiden GST-Fusionsproteinen kein His-MIZIP präzipitiert werden. Im Kontrollexperiment wurden hingegen unter beiden Bedingungen gleiche Mengen His-PDZK1 mit dem GST-SSTR5 Fusionsprotein präzipitiert. Die Gegenwart von EDTA beeinflusst also die Interaktion dieser beiden Proteine nicht. MIZIP verliert demnach in Anwesenheit von EDTA die Fähigkeit an Tubulin oder sich selbst zu binden. Für diese Bindung ist also eine intakte Zinkfingerstruktur der MYND-Domäne notwendig. Dies unterstützt stark die Annahme, dass die Protein-Interaktionen von MIZIP über die MYND-Domäne vermittelt werden.

3.3 Untersuchungen zur Interaktion zwischen Neurochondrin und dem MCH-Rezeptor 1

Das Protein Neurochondrin (NCDN) wurde in Vorarbeiten mit einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen als potentieller Interaktionspartner des MCH-Rezeptor 1 identifiziert. In diesem Teil der Arbeit wurde diese Interaktion verifiziert und funktionell analysiert.

3.3.1 Spezifizierung der Bindung von NCDN an MCHR1 im Hefe-System

Die im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen entdeckte Interaktion zwischen NCDN und MCHR1 wurde zunächst auf ihre Spezifität überprüft. Dazu wurden die identifizierten NCDN-Klone L14, L21 und L22 mit Konstrukten der C-Termini der eng verwandten GPCRs MCHR1, MCHR2 und Somatostatinrezeptor 5 (SSTR5) in Hefezellen auf ihre Fähigkeit zur Interaktion getestet. Eine Interaktion konnte aber ausschließlich zwischen NCDN und MCHR1 beobachtet werden. Ebenfalls konnte keine Interaktion von MCHR1 mit dem leeren pACT2-Vektor oder von einem der NCDN-Klone mit dem

leeren pAS2-Vektor detektiert werden. Die Bindung von NCDN an den MCHR1 im Hefe-System ist demnach für beide Proteine spezifisch.

pAS2	pACT2	Wachstum der Hefen
rMCHR1 ₍₂₉₉₋₃₅₃₎	L14, L21, L22	+++
rMCHR1 ₍₂₉₉₋₃₅₃₎ pAS2	pACT2	-
hMCHR2 ₍₃₀₀₋₃₄₀₎	L14, L21, L22	-
rSSTR5 ₍₂₉₅₋₃₆₃₎	L22	-
	L22	-

Tabelle 3: Spezifität der Interaktion von NCDN mit MCHR1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System.

Die C-Termini (die Aminosäuren sind in Klammern angegeben) des Ratten-MCHR1 (rMCHR1), des humanen MCHR2 (hMCHR2) und des Ratten-SSTR5 (rSSTR5) wurden in den Hefe-Vektor pAS2 kloniert und mit den isolierten NCDN-Klonen im pACT2-Vektor (L14, L21, L22) in Hefezellen kotransformiert. Zellen, in denen es zur Interaktion der Expressionsprodukte der Vektoren kam, konnten auf Selektionsmedium wachsen.

3.3.2 Identifizierung der Interagierenden Bereiche von NCDN und MCHR1

Um die Bereiche innerhalb der Proteine NCDN und MCHR1 einzugrenzen, die die Interaktion vermitteln, wurde wiederum das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet. Die isolierten NCDN-Klone L14, L21 und L22 enthalten 278-297 Aminosäuren aus dem C-terminalen Bereich des Proteins (vgl. Abbildung 20). Von diesem Bereich wurden daher mittels PCR verschieden große N- und C-terminale Deletionsvarianten hergestellt und in den Hefevektor pACT2 kloniert. Dabei wurde sowohl die humane als auch die Ratten-Sequenz von NCDN verwendet. Beide Sequenzen unterscheiden sich in diesem Bereich in drei einzelnen Aminosäuren. Für den MCHR1 wurden drei verschiedene Konstrukte eingesetzt. Neben dem Köderplasmid aus dem *Hefe-Zwei-Hybrid-Screen*, das den gesamten C-Terminus und einen Teil der 7. Transmembrandomäne enthält (AS 299-353), wurde noch ein N-terminal (AS 319-353) und ein C-terminal (299-326) verkürztes Konstrukt über PCR hergestellt und in den Vektor pAS2.1 kloniert. Alle diese Konstrukte wurden in verschiedenen Kombinationen in den Hefestamm *AH109* kotransformiert und auf ihre Fähigkeit zur Interaktion getestet. Dabei konnte mit keiner der NCDN-Deletionsvarianten eine Interaktion beobachtet werden. Nur die drei Klone L14, L21 und L22 aus der cDNA-Bank konnten an MCHR1 binden. Um auszuschließen, dass dies auf Artefakten der cDNA-Bank oder der Herstellung der Deletionsvarianten beruht, wurde das Konstrukt F3-R1 genau wie die anderen Deletionsvarianten hergestellt. Es enthält die

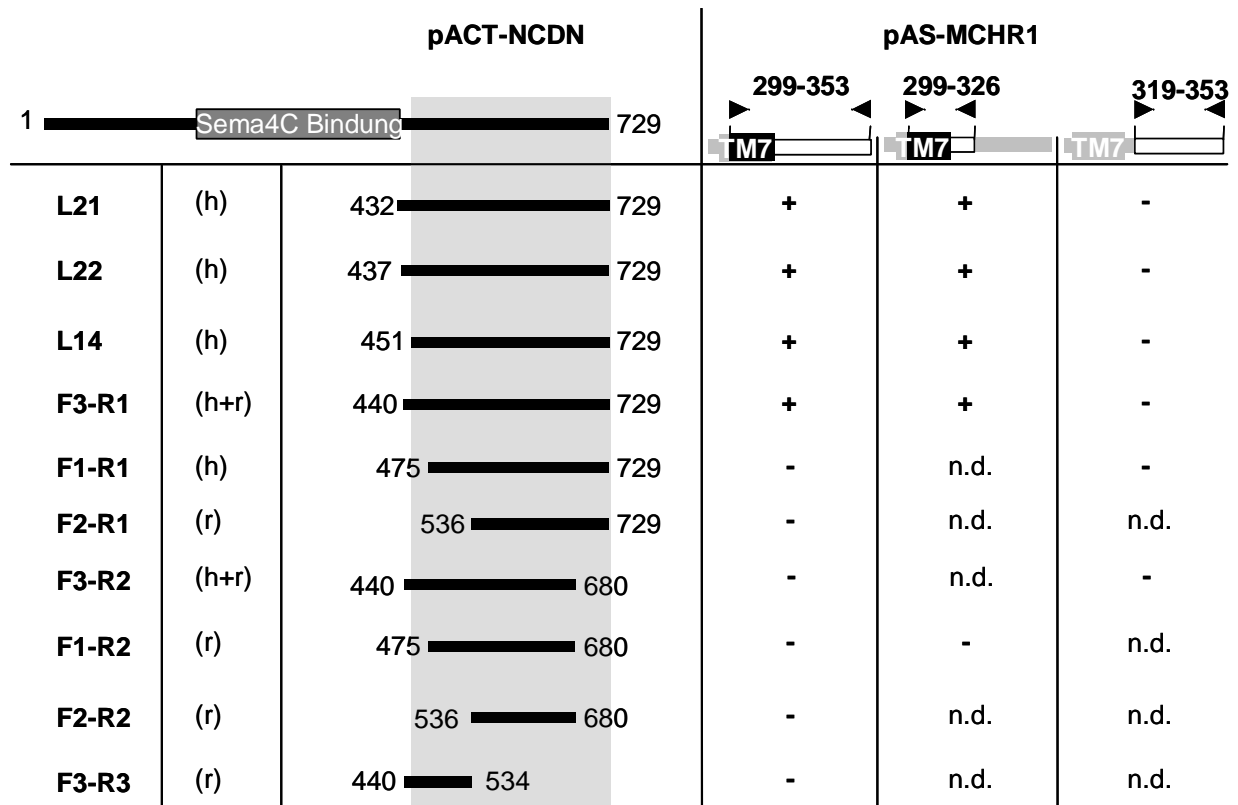


Abbildung 20: Eingrenzen der interagierenden Bereiche von NCDN und MCHR1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System.

Verschiedene NCDN-Deletionsvarianten (Fx-Rx) und die identifizierten cDNA-Bank-Klone von NCDN (L21, L22, L14) wurden mit unterschiedlichen MCHR1-Konstrukten (pAS-MCHR1 299-353/299-326/319-353) auf ihre Fähigkeit zur Interaktion getestet. Interagierende Konstrukte (+) ermöglichten es transformierten Hefen auf Selektionsmedium zu wachsen. Die von den Konstrukten kodierten Aminosäuresequenzbereiche sind durch Nummern angegeben. Die NCDN-Deletionsvarianten wurden aus der Ratten- (r) und/oder humanen (h) NCDN-Sequenz hergestellt. Die Lage und Länge der NCDN-Konstrukte ist durch schwarze Balken im Vergleich zum gesamten NCDN-Molekül (AS 1-729) dargestellt. Dort ist auch die Bindungsstelle von Semaphorin4C eingezeichnet (Ohoka *et al.* 2001). Der Bereich, der für die Interaktion zum MCHR1 notwendig ist, ist grau hinterlegt. (-, keine Interaktion; n.d., nicht getestet)

Aminosäuren 440-729 und ist damit am N-Terminus länger als L14 aber kürzer als L21 und L22. Es wurde dabei sowohl mit der humanen als auch der Ratten-Sequenz eine Interaktion festgestellt. Die gesamte NCDN-Sequenz von Klon L14 ist demnach für die Interaktion mit dem MCHR1 notwendig und ausreichend. Sie umfasst den gesamten C-terminalen Bereich aus den Aminosäuren 451-729. N- oder C-terminales Verkürzen dieses Bereichs führt zur Aufhebung der Interaktion im Hefesystem. Die Bindung von NCDN erfolgt im MCHR1-Molekül im Bereich der 7. Transmembrandomäne und der direkt angrenzenden Aminosäuren. So wurde mit allen vier NCDN-Konstrukten (L14, L21, L22, F3-R1) eine Interaktion mit dem gesamten C-Terminus von MCHR1 (AS 299-353) und der C-terminalen Deletionsvariante (AS 299-326) beobachtet, nicht jedoch mit dem absoluten C-Terminus (AS 319-353).

3.3.3 Verifizieren der Interaktion von NCDN mit MCHR1 im *GST-Pulldown*-Experiment

Die Interaktion zwischen Neurochondrin und dem C-Terminus von MCHR1 wurde über ein *GST-Pulldown*-Experiment verifiziert. Dazu wurde der gesamte NCDN-Anteil des Hefeklons L22 (AS 437-729) als *EcoRI/XhoI*-Fragment in den Vektor pGex4T2 kloniert, so dass ein GST-NCDN Fusionsprotein von 57,5 kDa exprimiert und aufgereinigt werden konnte. Die DNA-Sequenz des MCHR1-C-Terminus wurde in den Vektor pQE40 kloniert, so dass ein 6xHis-DHFR-MCHR1 Fusionsprotein von 30kDa exprimiert und aufgereinigt werden konnte. Aufgereinigtes GST-NCDN und GST wurden an GSH-Sepharose gekoppelt, mit His-DHFR-MCHR1 Fusionsprotein inkubiert und präzipitiert. Die Präzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt oder im Westernblot analysiert. Abbildung 21 zeigt, dass nur mit GST-NCDN das His-DHFR-MCHR1 Fusionsprotein präzipitiert werden konnte, nicht aber mit GST allein. Der C-Terminus des MCHR1 bindet also auch im *GST-Pulldown*-Experiment direkt und spezifisch an Neurochondrin.

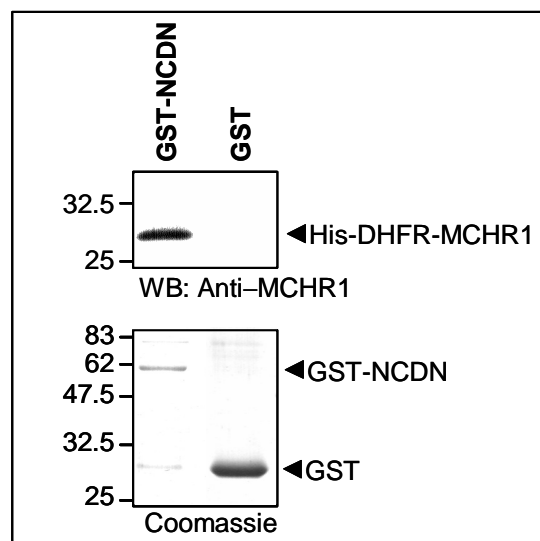


Abbildung 21: *GST-Pulldown*-Experiment mit NCDN und MCHR1

GST und GST-NCDN Fusionsprotein wurden an GSH-Sepharose immobilisiert, mit His-DHFR-MCHR1 Fusionsprotein inkubiert und anschließend präzipitiert. Die Präzipitate wurden im Westernblot (oben) und im Coomassie-Gel (unten) analysiert. Im Westernblot (WB) wurde das His-DHFR-MCHR1 Fusionsprotein mit einem Anti-MCHR1 Antikörper ausschließlich im Präzipitat von GST-NCDN detektiert. Im Coomassie-Gel wurden die eingesetzten Mengen GST-NCDN und GST kontrolliert.

3.3.4 Verifizieren der MCHR1/NCDN-Interaktion durch Koimmunpräzipitation aus transfizierten Säugerzellen

Mit den bisherigen Versuchen wurde die Interaktion von MCHR1 und NCDN nur für bestimmte Fragmente der beiden Proteine gezeigt. Um diesbezüglich das Verhalten der beiden vollständigen Proteine zu untersuchen, wurden diese in COS7-Zellen zur Expression gebracht. Dazu wurde der komplette Leserahmen von NCDN in den Vektor pCDNA6-Myc kloniert, so dass das Protein mit einem C-terminal fusionierten cMyc-Epitop exprimiert wird. Dieses Konstrukt wurde dann, zusammen mit dem vollständigen MCH-Rezeptor mit N-terminal fusionierten T7-Epitop (T7-MCHR1, vgl. 3.1.5), in COS7-Zellen koexprimiert. Zusätzlich wurde eine weitere Rezeptorvariante mit deletiertem C-Terminus kloniert. Das resultierende Protein T7-MCHR1- Δ C315 enthält die Aminosäuren 1-315 des MCH-Rezeptor 1 und endet damit unmittelbar hinter der 7. Transmembrandomäne (vgl. Abbildung 22B). Es verfügt ebenfalls über ein N-terminal fusioniertes T7-Epitop. Mit diesem Konstrukt sollte überprüft werden, ob durch weitere Deletion des C-Terminus die Bindung von NCDN beeinflusst wird. Daher wurde auch dieses Konstrukt sowie zur Kontrolle der leere Vektor pCDNA3-T7 jeweils mit NCDN-Myc in COS7-Zellen kotransfiziert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Rohextrakte zur Koimmunpräzipitation eingesetzt. Mit einem kovalent an Sepharose gekoppelten Anti-T7 Antikörper wurden dabei die MCHR1-Konstrukte über das N-terminal fusionierte T7-Epitop präzipitiert. Die Rohextrakte und Präzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot analysiert (Abbildung 22A). Mit einem spezifischen NCDN-Antiserum konnte in allen Rohextrakten eine Bande für Neurochondrin mit der erwarteten Größe von 82kDa nachgewiesen werden. Kopräzipitiertes NCDN wurde in den Präzipitaten von T7-MCHR1 und T7-MCHR1- Δ C315 detektiert, nicht jedoch im Kontrollansatz mit dem Leervektor pCDNA3-T7.

Die Präzipitation der MCHR1-Konstrukte wurde im Westernblot mit einem Anti-T7 Antikörper kontrolliert und zeigte sich als Schmier mehrerer Banden. Mit transfizierten HEK293-Zellen wurde bereits gezeigt, dass der MCHR1 im Westernblot spezifische Banden bei 60 und 120kDa (Hervieu, G.J. *et al.* 2000) bzw. mehrere Banden zwischen 35 und 65kDa gibt (Saito *et al.* 2003), obwohl das rechnerische Molekulargewicht nur knapp 40kDa beträgt. Im Präzipitat von T7-MCHR1 wurde ebenfalls eine Bande bei etwa 60kDa detektiert und zusätzlich noch mehrere höhermolekulare Banden. Dies kann mit der Glykosylierung des Rezeptors und der

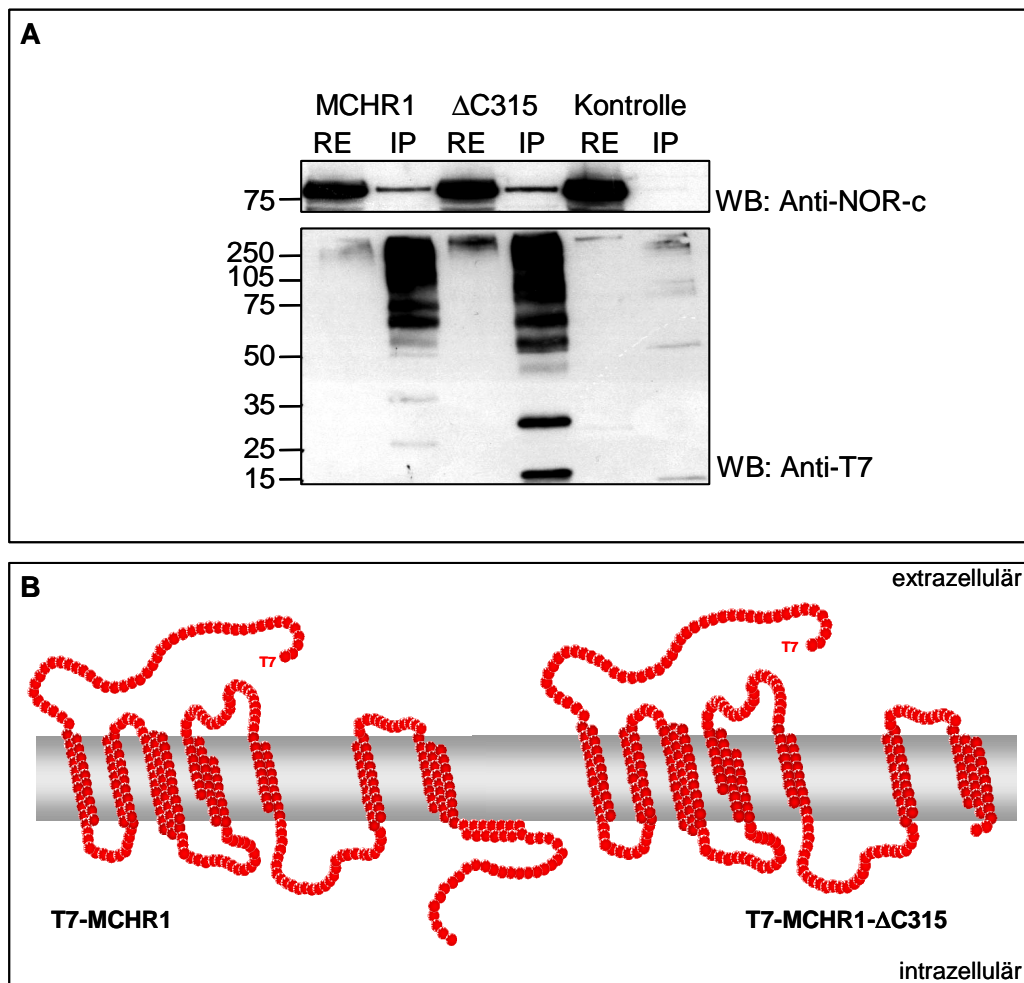


Abbildung 22: Koimmunpräzipitation von MCHR1 und NCDN aus transfizierten COS7-Zellen.

A: COS7-Zellen wurden mit NCDN und T7-MCHR1, T7-MCHR1- Δ C315 oder dem Leervektor pCDNA3-T7 (Kontrolle) transfiziert und nach 2 Tagen lysiert. Aus den Rohextrakten wurden die MCHR1-Varianten mittels T7-Agarose immunpräzipitiert. Proben der Rohextrakte (RE) und Immunpräzipitate (IP) wurden im Westernblot mit Anti-T7 Antikörper (unten) und Anti-NOR-c Antiserum (oben) analysiert. **B:** Schematische Darstellung der eingesetzten MCHR1-Varianten.

Bildung von Rezeptoraggregaten erklärt werden (Hervieu, G.J. *et al.* 2000; Saito *et al.* 2003). Auch im Präzipitat von T7-MCHR1- Δ C315 konnten diese Banden, entsprechend der Deletion bei etwas geringerer Größe, detektiert werden. Zusätzlich traten allerdings noch zwei deutliche Banden bei 30 und 15 kDa auf. Eventuell kommt es in Folge der Deletion des C-Terminus zu einem verstärkten proteolytischen Abbau dieses Konstrukts.

Die Rezeptoren konnten unter diesen Bedingungen allerdings praktisch nicht in den Rohextrakten detektiert werden. Für eine erfolgreiche Koimmunpräzipitation durften nur sehr moderate Detergenzien zur Zellyse eingesetzt werden. Daher wurden die Rezeptoren wahrscheinlich nur zu einem geringen Teil aus den Membranen solubilisiert und lagen in den Rohextrakten in sehr geringer Konzentration vor. Erst

durch die Immunpräzipitation wurden sie aufkonzentriert und konnten mit dem Antikörper nachgewiesen werden.

NCDN bindet also sowohl an den vollständigen MCHR1 als auch an den verkürzten MCHR1- Δ C315. Unter Einbeziehung der Ergebnisse aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-System (3.3.2) bzw. dem *GST-Pulldown*-Experimenten (3.3.3) bedeutet dies, dass die Bindungsstelle für NCDN im MCHR1-Molekül innerhalb der Aminosäuresequenz ²⁹⁹LG YANSCLNPFVYIVLC³¹⁵ liegen muss und sich daher direkt an der 7. Transmembrandomäne befindet. (Die unterstrichenen Aminosäuren gelten als Bestandteil der TM7.)

3.3.5 Untersuchungen zur MCHR1 / NCDN – Interaktion *in vivo*.

Die Interaktion von MCHR1 und Neurochondrin wurde bisher nur *in vitro* untersucht. Da beide Proteine im Gehirn exprimiert werden, wurde mittels Koimmunpräzipitation versucht, die Interaktion in Proteinextrakten von Mäusegehirnen nachzuweisen. Dabei war es jedoch nicht möglich, mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern eindeutige Banden für den MCHR1 in den Extrakten zu detektieren. In den Proben einer Membranfraktionierung von Mäusegehirnen konnte aber im Rohextrakt, in der P2-Gesamtmembran-Fraktion und in der Synaptosomen-Fraktion Signale des endogenen NCDNs mit dem Anti-NCDN Antikörper erkannt werden (Abbildung 23A). In der Präparation der Postsynaptischen Dichte (PSD) ist NCDN jedoch nur ganz schwach nachzuweisen. Zur Kontrolle wurde wiederum das Protein SSTRIP (Abbildung 23B) analysiert. SSTRIP ist als synaptisches Gerüstprotein in der PSD-Fraktion angereichert (vgl. 3.1.2).

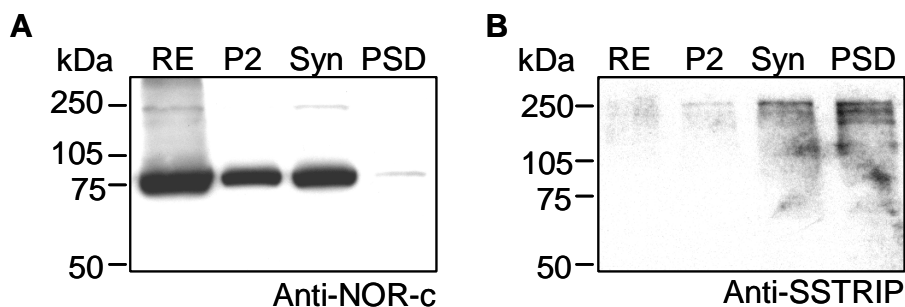


Abbildung 23: Westernblotanalyse von Membranfraktionen aus Mäusegehirn.

Proben einer Membranfraktionierung von adultem Mäusegehirnen wurden in zwei identischen Westernblots mit verschiedenen Antikörpern analysiert A: Neurochondrin. B: SSTRIP. (RE: Rohextrakt; P2: Gesamt-Membranfraktion; Syn: Synaptosomen-Fraktion; PSD: PSD-Fraktion)

Neurochondrin ist also ebenfalls wie MIZIP (vgl. 3.1.2) mit Membranen in den Zellen des Mäusegehirns assoziiert, was seine Interaktion mit Transmembranproteinen wie Semaphorin 4C und MCHR1 widerspiegelt.

Um weitere Belege für eine Interaktion von NCDN und MCHR1 *in vivo* zu erhalten, wurde die Lokalisation von beiden Proteinen immunhistochemisch im Rattengehirn untersucht. Dazu wurden Gehirnschnitte von adulten und zwölf Tage alten Ratten mit spezifischen Antikörpern gegen NCDN und MCHR1 inkubiert und über fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper angefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop wurden die Schnitte anschließend analysiert. Dabei wurde eine Expression beider Proteine in

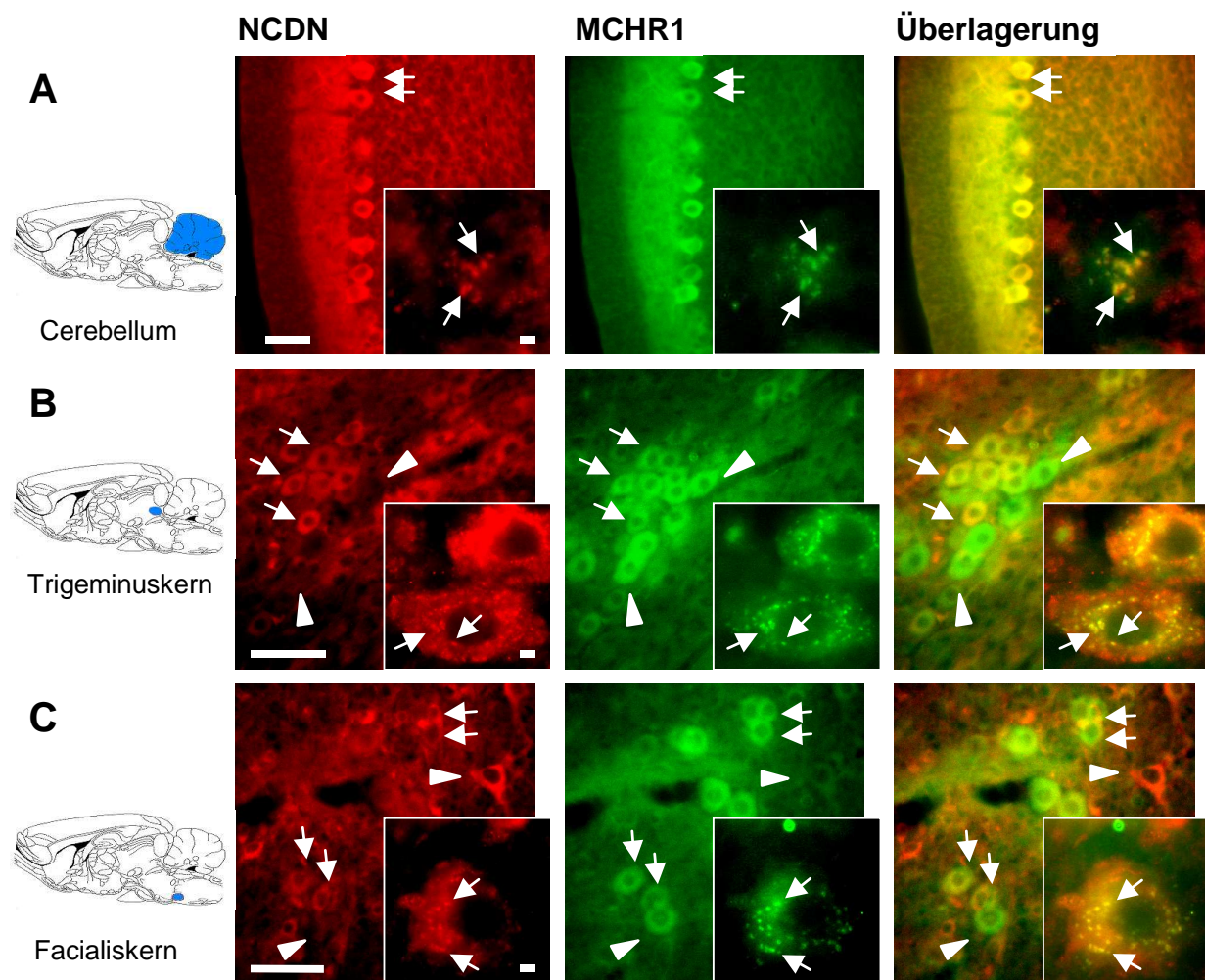


Abbildung 24: Immunhistochemische Untersuchung der Kolo-kalisation von MCHR1 und NCDN im Rattengehirn.

Es sind Bilder von 50µm-Cryoschnitten von Gehirnen zwölf Tage alter Ratten (große Bilder) und 10µm-Cryoschnitte von Gehirnen adulter Ratten (kleine Bilder) der angegebenen Regionen gezeigt. NCDN wurde über das Anti-NOR-c Antiserum und einen Anti-Kaninchen-Cy3 (rot) gekoppelten Antikörper nachgewiesen. MCHR1 wurde mit einem spezifischen Antikörper aus Ziege und entsprechendem Cy2-gekoppelten Zweitantikörper (grün) markiert. Die Gelbe Farbe in den Überlagerungen markiert Bereiche der Kolo-kalisation beider Proteine. (Größenbalken: große Bilder 100µm; kleine Bilder 10µm. Zur Bedeutung der Pfeile, siehe Text)

mehreren Bereichen des Gehirns beobachtet. So zeigen die großen Bilder in Abbildung 24A die Schichten der Kleinhirnrinde (v.li.: Molekularschicht, Purkinjzellschicht, Körnerzellschicht) der jugendlichen Ratten. In den großen Purkinjzellen (Pfeile) und den Körnerzellen kommt es zur Koexpression von NCDN und MCHR1. Die kleinen Bilder zeigen Vergrößerungen von Purkinjzellen des adulten Cerebellums. Dort kolokalisieren beide Proteine in punktförmigen Mustern. Auch in bestimmten Neuronen des Hirnstammes, wie im Trigemuskern des Mesencephalons (Abbildung 24B) und im Facialiskern der Pons (Abbildung 24C) kommt es zur Koexpression von NCDN und MCHR1 (Pfeile). Allerdings sind dort auch Neurone zu finden, die jeweils nur eins der beiden Proteine exprimieren (Pfeilspitzen). In den Vergrößerungen entsprechender Zellen des adulten Rattengehirns ist wiederum eine Kolokalisation beider Proteine in einem punktförmigen Muster zu erkennen.

In früheren Studien wurde bereits jeweils für NCDN und MCHR1 eine Expression in diesen Gehirnarealen beschrieben (Hervieu, G.J. *et al.* 2000; Istvanffy *et al.* 2004; Saito *et al.* 1999; Shinozaki *et al.* 1999). Mit dieser Untersuchung ist jetzt aber auch gezeigt, dass beide Proteine dort in denselben Neuronen koexprimiert sind. Damit ist eine Grundvoraussetzung für eine funktionellen Interaktion beider Proteine *in vivo* erfüllt.

3.4 Funktionelle Untersuchungen von MIZIP und NCDN

3.4.1 Untersuchung des Einflusses der MCHR1-interagierenden Proteine auf die Rezeptor-Internalisierung

Um einen möglichen Einfluss von NCDN oder MIZIP auf die Liganden-induzierte Internalisierung des MCH-Rezeptors zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen analysiert, die mit T7-MCHR1 und dem Leervektor pCDNA6 bzw. NCDN oder MIZIP kotransfiziert wurden.

Für eine immunocytochemische Analyse wurden die Zellen zunächst in Serum-freien Medium gehalten und dann für 30 Minuten mit 0 μ M oder 1 μ M MCH inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sofort fixiert und mittels Immunfluoreszenz unter dem Mikroskop analysiert (Abbildung 25). Der MCH-Rezeptor ist in unstimulierten Zellen hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert (a, c und i), während NCDN und MIZIP diffus im gesamten Cytoplasma verteilt sind (d und j). Zum Teil kommt es aber auch im Cytoplasma, wahrscheinlich im Bereich des Golgis, zu einer

Aggregation des MCH-Rezeptors und dort dann auch zur Kolokalisation mit NCDN bzw. MIZIP (Pfeile in a, e und k). Die Stimulierung der Zellen mit MCH führt zur Internalisierung des MCH-Rezeptors in intrazelluläre Vesikel (Pfeile in b, h und n). Dies geschieht unabhängig davon, ob MCHR1 allein oder mit NCDN bzw. MIZIP

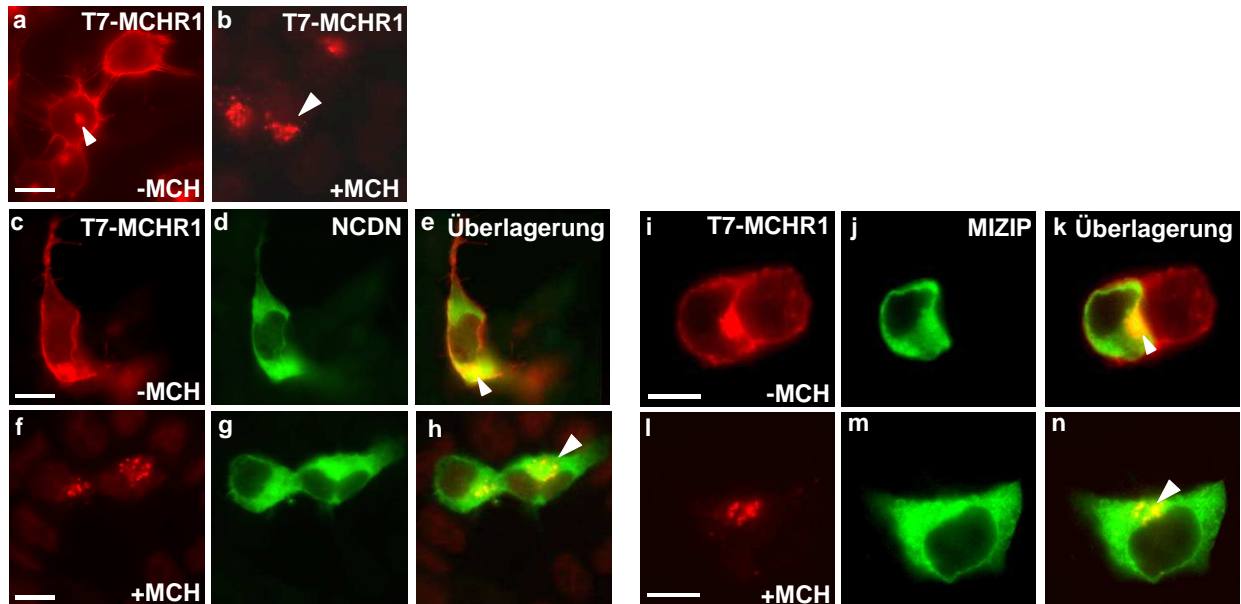


Abbildung 25: Immuncytochemische Analyse der Internalisierung von MCHR1 in HEK293-Zellen

In HEK293-Zellen wurde T7-MCHR1 allein (a,b) oder zusammen mit NCDN (c-h) bzw. MIZIP (i-n) überexprimiert. Zur Internalisierung wurden alle Zellen zunächst in Serum-freien Medium inkubiert und anschließend für 30' mit 0 μ M (a, c-e, i-k) oder 1 μ M (b, f-h, l-n) MCH stimuliert und sofort fixiert. T7-MCHR1 wurde mit Anti-T7 und Anti-Maus-Cy3 (rot), NCDN über Anti-NOR-c und Anti-Kaninchen-Cy2 (grün) und MIZIP mit Anti-MIZIP und Anti-Meerschwein-FITC (grün) Antikörpern nachgewiesen. Kolokalisation von T7-MCHR1 und NCDN bzw. MIZIP ist in den Überlagerungen an der gelben Farbe zu erkennen. (Größenbalken: 10 μ m)

koexprimiert wird. Ebenso ist keine Veränderung der Lokalisation von NCDN oder MIZIP zu beobachten, wenn der MCH-Rezeptor internalisiert. Immuncytochemisch ist also kein Einfluß von NCDN und MIZIP auf die Internalisierung festzustellen. Um Effekte auf die Effizienz der Internalisierung zu untersuchen, wurde die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der MCH-induzierten Internalisierung durch Quantifizierung der Menge an membranständigem Rezeptor bestimmt. Dazu wurde ein quantitativer ELISA etabliert, bei dem der MCHR1 über das N-terminal fusionierte T7-Epitop nachgewiesen wird. Die transfizierten HEK293-Zellen wurden zunächst in Serum-freien Medium gehalten und mit einem Anti-T7 Antikörper inkubiert, um membranständige T7-MCHR1-Moleküle zu markieren. Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit wurden die Zellen anschließend für 30' mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 10⁻¹² und 10⁻⁶ M MCH stimuliert. Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurden die Zellen für 5', 10' oder 30' mit 10⁻⁶M

MCH inkubiert. Nach der Fixierung wurden die nicht permeabilisierten Zellen mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Da dieser nicht in die Zellen eindringen kann, erkennt er nur Anti-T7-markierte Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche, die nicht internalisiert worden sind. Über eine Peroxidase abhängige

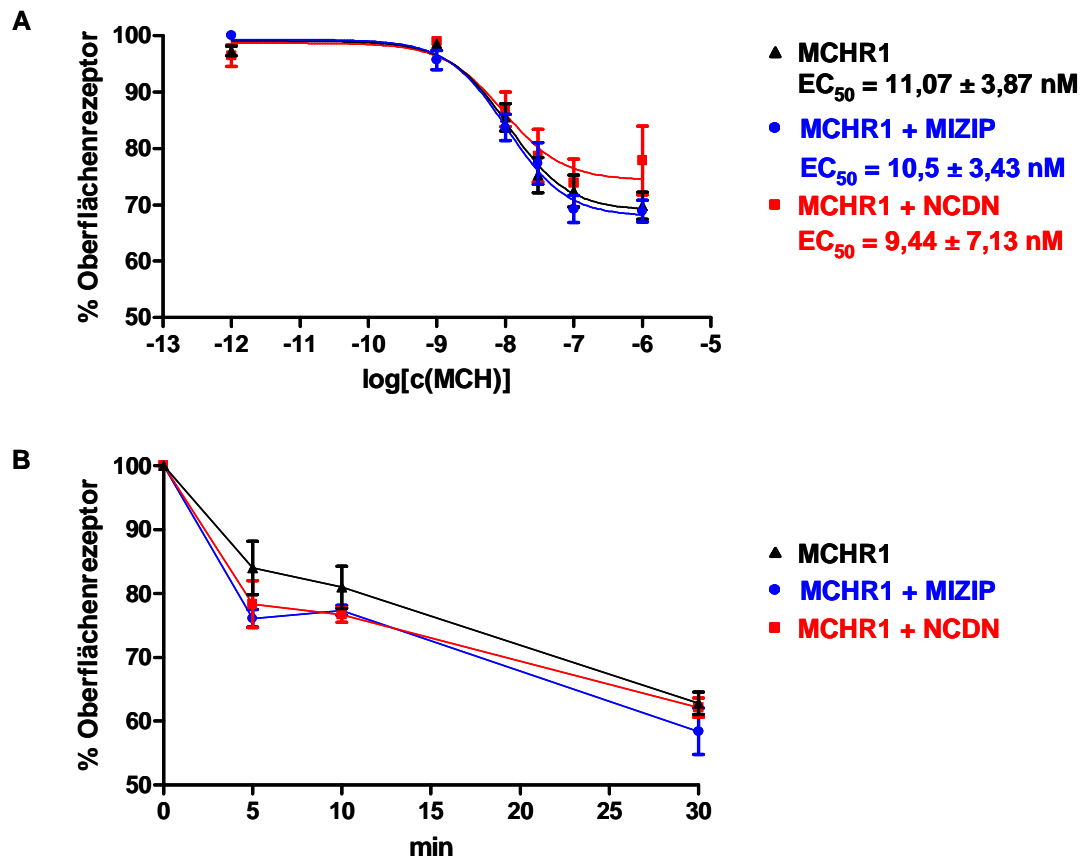


Abbildung 26: Quantitative Analyse der MCH-induzierten Internalisierung von T7-MCHR1

A: Konzentrations-Abhängigkeit der Internalisierung. Es sind die Daten von drei unabhängigen Experimenten jeweils mit Doppelbestimmung gezeigt. Die Messwerte wurden mit Hilfe der *GraphPad Prism* Software analysiert. Für jedes Experiment wurden die Messwerte auf den höchsten Wert normiert (100%) und als prozentualer Anteil der höchsten Oberflächenrezeptor-Menge ausgedrückt. Aus den normierten und gemittelten Werten aller Experimente wurde mittels nichtlinearer Regression eine Dosiswirkungskurve berechnet und die EC_{50} -Werte bestimmt. **B:** Zeitabhängigkeit der Internalisierung. Es sind die Daten von zwei unabhängigen Experimenten jeweils mit Dreifachbestimmung gezeigt. Die Messwerte wurden mit Hilfe der *GraphPad Prism* Software analysiert. Für jedes Experiment wurden die Messwerte auf den höchsten Wert normiert (100%) und als prozentualer Anteil der höchsten Oberflächenrezeptor-Menge ausgedrückt. Die Mittelwerte der normierten Daten sind mit Fehlerbalken dargestellt.

Farbreaktion konnte dann die Menge der an der Zelloberfläche verbliebenen MCH-Rezeptoren photometrisch bestimmt werden. Für die Konzentrationsabhängigkeit wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt und die entsprechenden EC_{50} -Werte berechnet (Abbildung 26A). Die Kurvenverläufe bei Koexpression von MCHR1 mit NCDN oder MIZIP zeigen dabei keine signifikanten Unterschiede zum Kurvenverlauf bei Expression des MCHR1 allein. Die Stimulation mit MCH führt bei allen Ansätzen

zu einer dosisabhängigen Abnahme des Oberflächenrezeptors mit einem EC_{50} -Wert von etwa 10nM MCH auf etwa 70% des Anfangwertes.

Auch bei der Zeitabhängigkeit der Internalisierung sind keine signifikanten Einflüsse von MIZIP und NCDN zu erkennen. Bereits nach 5' MCH-Stimulation ist die Menge an Oberflächenrezeptor auf etwa 80% des Anfangwertes verringert und sinkt nach 30' MCH-Inkubation weiter auf etwa 60%.

3.4.2 Einfluss von NCDN und MIZIP auf die Signaltransduktion von MCHR1 in *Xenopus*-Oozyten

Um einen möglichen Einfluss der Proteine NCDN und MIZIP auf die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion des MCH-Rezeptor 1 zu untersuchen, wurden elektrophysiologische Messungen an *Xenopus*-Oozyten durchgeführt. Die Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* eignen sich gut für solche Experimente, da sie kaum endogene Rezeptoren exprimieren und aufgrund ihrer Größe recht einfach zu handhaben sind. Für den MCHR1 wurde bereits gezeigt, dass er in den Oozyten funktionell exprimiert werden kann und dort an einen koexprimierten *G-Protein-gekoppelten einwärtsgerichteten Kaliumkanal* (GIRK1) koppelt und einen agonistenabhängigen Kaliumeinstrom bewirken kann (Bächner *et al.* 1999). Die Kopplung erfolgt über endogen exprimierte, Pertussistoxin sensitive G-Proteine ($G_{i/o}$). Nach Aktivierung des Rezeptors durch den Liganden MCH dissoziiert die $G\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins von der α -Untereinheit und bindet direkt an den GIRK-Kanal. Dieser wird dadurch aktiviert und erhöht die Permeabilität der Plasmamembran für K^+ -Ionen (Abbildung 27A). Bei den angewandten Versuchsbedingungen bewirkt dies einen Kaliumeinstrom in die Zelle, der gemessen werden kann und proportional zur Aktivität des $G_{i/o}$ -Proteins ist. Mit diesem System wird also die $G_{i/o}$ -gekoppelte Signaltransduktion des MCHR1 gemessen.

Zur Expression des Rezeptors und der interagierenden Proteine in den Oozyten wurden die vollständigen Leserahmen von MCHR1, NCDN und MIZIP in den *Xenopus*-Expressionsvektor pGEMHE kloniert. Dieser Vektor enthält die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des *Xenopus*- β -Globin-Gens und ermöglicht so eine effiziente Expression der rekombinanten Proteine in den Oocyten (Liman *et al.* 1992). Von diesen Vektoren wurde *in vitro* cRNA transkribiert und in die Oocyten injiziert. Dabei wurde in verschiedenen Ansätzen jeweils cRNA von GIRK1 und MCHR1, von GIRK1, MCHR1 und MIZIP oder von GIRK, MCHR1 und NCDN in gleichen Teilen koinjiziert. Außerdem wurde eine MCHR1-Variante mit deletiertem C-Terminus

(MCHR1- Δ V326) zusammen mit GIRK injiziert. Während einer Inkubation von 3-5 Tagen wurden die Proteine in den Oozyten exprimiert. Um die Einflüsse der Proteine MIZIP und NCDN auf die Signaltransduktion des MCHR1 bestimmen zu können,

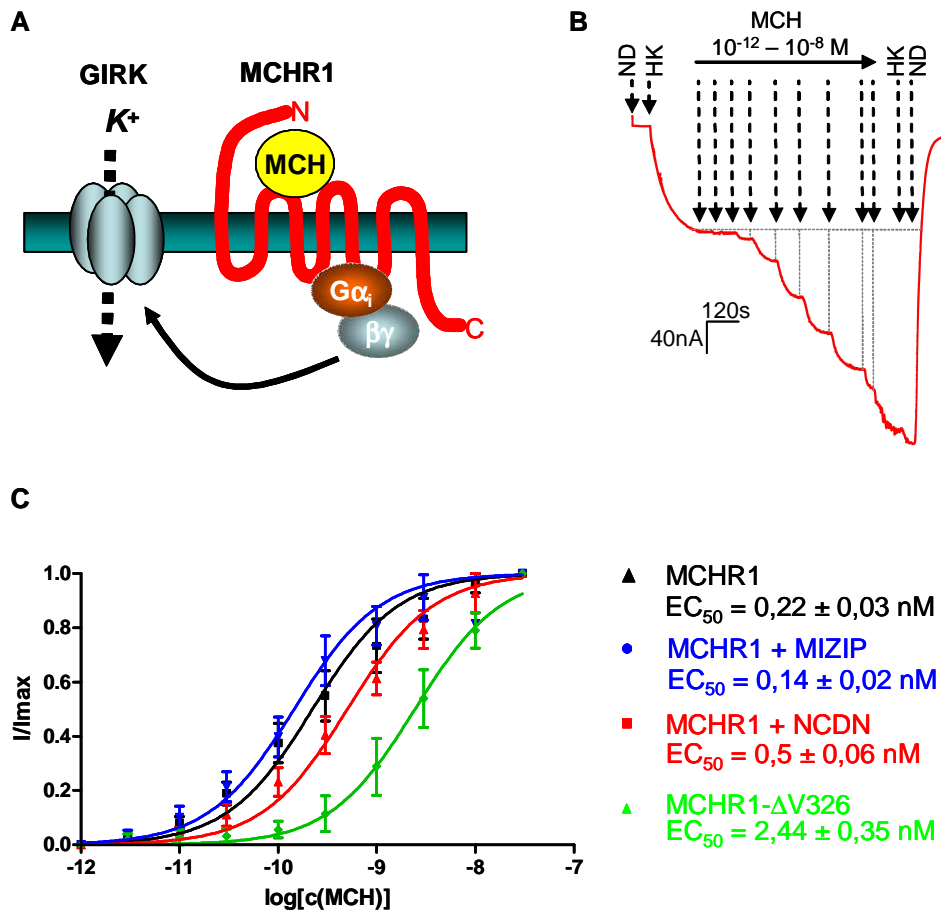


Abbildung 27: Elektrophysiologische Messungen der $G_{i/o}$ -gekoppelten Signaltransduktion von MCHR1 in *Xenopus*-Oozyten.

A: MCHR1 koppelt über die $\beta\gamma$ -Untereinheit von $G_{i/o}$ an GIRK. Aktivierung des Rezeptors durch MCH führt zur Öffnung des GIRK-Kanals und bewirkt einen Einwärtsstrom von K^+ -Ionen in die Zelle. **B:** Messung des Einwärtsstroms bei Applikation von steigenden MCH-Konzentrationen zwischen 10^{-12} und 10^{-8} M an einer exemplarischen Oozyte, die MCHR1 und NCDN exprimierte. Die gestrichelten Pfeile geben die Zeitpunkte an, zu denen ein bestimmtes Medium (ND96 oder HK) bzw. eine bestimmte MCH-Konzentration (in HK-Medium) zugegeben wurde. Die rote Linie gibt den gemessenen Stromverlauf über die Zeit wieder. Die Messwerte zu den einzelnen MCH-Konzentrationen wurden aus der Differenz zwischen dem, nach MCH-Zugabe erreichten Plateau und dem, durch HK-Medium bewirktem Grundstrom ermittelt (graue Linien). **C:** Die Messwerte der Oozyten wurden mit der *GraphPadPrism*-Software ausgewertet. Dazu wurden zunächst die Messwerte auf den maximal gemessenen Strom jeder Oozyte normiert (I/I_{max}) und für jeden Ansatz aus den normierten Daten aller gemessenen Oozyten Mittelwerte berechnet. Diese wurden gegen den Logarithmus der MCH-Konzentration aufgetragen und mit der Software Dosis-Wirkungskurven berechnet. Anhand dieser Funktionen wurde für jeden Ansatz der EC_{50} bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche mit je 2-4 Oozyten pro Ansatz ausgewertet.

wurden an den Oozyten Dosis-Wirkungs-Kurven durch Applikation steigender MCH-Konzentrationen (10^{-12} - 3×10^{-8} M) gemessen.

Dazu wurden die Oozyten in der Messapparatur zunächst mit dem normalen Nährmedium (ND) umspült. Zu Beginn der Messungen wurde dann zu einem

Medium mit hoher K^+ -Konzentration (HK) gewechselt, wobei ein unspezifischer Grundstrom in die Zelle gemessen wurde. Dieser Grundstrom erreichte nach einigen Sekunden ein konstantes Plateau. Bei Applikation von MCH ins Medium konnte dann ein spezifischer, MCH-vermittelter K^+ -Einstrom gemessen werden, der nach einer gewissen Zeit wiederum ein konstantes Plateau erreichte. Jeweils beim Erreichen dieses Plateauwertes wurde eine höhere Konzentration von MCH appliziert und dabei ein steigender K^+ -Strom gemessen (Abbildung 27B). Gemäß der Vorzeichenkonvention ist ein Strom von Kationen vom Außenmilieu in die Zelle ein Einwärtsstrom und wird nach unten gerichtet dargestellt (Numberger *et al.* 1996).

Zur Auswertung wurden die normierten Messwerte gegen den Logarithmus der MCH-Konzentration aufgetragen und mit dem Computerprogramm *GraphPadPrism* (GraphPad Software, Inc.) über nichtlineare Regression sigmoidale Dosis-Wirkungskurven berechnet und die EC_{50} -Werte bestimmt (Abbildung 27C). Die Kurven von Oocyten, die nur den MCHR1 (schwarz) oder MCHR1 und MIZIP (blau) exprimierten, unterscheiden sich nur sehr gering in ihrem Verlauf. Die EC_{50} -Werte (MCHR1 allein: $EC_{50}=0,22\text{nM}$; MCHR1+MIZIP: $EC_{50}=0,14\text{nM}$) dieser Kurven stimmen gut mit Literaturangaben zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von MCH auf die Inhibierung der cAMP-Produktion in MCHR1-transfizierten Säugerzellen ($EC_{50}=0,1\text{nM}$ MCH) überein (Hawes *et al.* 2000). MIZIP scheint also keinen bedeutsamen Einfluss auf die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion zu nehmen. Bei Oocyten, die den MCHR1 und NCDN koexprimierten (rot) verschiebt sich die Dosis-Wirkungskurve jedoch deutlich nach rechts und der EC_{50} -Wert erhöht sich auf $0,50\text{nM}$. Die Bindung von NCDN an den MCHR1 führt demnach zu einer Hemmung der G-Protein abhängigen Aktivierung von GIRK.

Weiterhin wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit Oocyten erstellt, die eine MCH-Rezeptorvariante mit deletiertem C-Terminus (MCHR1- $\Delta V326$) exprimierten. Dieser Deletionsmutante fehlen die letzten 27 Aminosäuren. Die Dosis-Wirkungs-Kurve ist erheblich nach rechts verschoben und der entsprechende EC_{50} -Wert ist mit $2,44\text{nM}$ etwa 11mal größer als für den MCHR1 Wildtyp. Die Deletion des C-Terminus von MCHR1 führt also zu einer starken Behinderung der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion.

3.4.3 Einfluss von NCDN auf den MCH-vermittelten Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} in HEK293-Zellen

Stimulierung des MCHR1 führt auch zur G-Protein vermittelten Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} (Lembo *et al.* 1999). Daher wurde überprüft, ob NCDN auch auf die Mobilisierung von Ca^{2+} einen hemmenden Einfluß ausüben kann. Es wurden dazu transfizierte HEK293-Zellen verwendet, die MCHR1 allein oder zusammen mit NCDN exprimierten. Dazu wurde ein MCHR-Konstrukt mit einem N-terminal fusioniertem VSV-G-Epitop in den Vektor pCDNA3.1 kloniert (Murdoch *et al.* 2004). Weiterhin wurde der gesamte NCDN-Leserahmen in den Vektor pIRES-EGFP kloniert, so dass in transfizierten Zellen eine bicistronische mRNA gebildet wird, von der sowohl NCDN als auch EGFP als eigenständige Proteine exprimiert werden. Die Messungen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Graeme Milligan, Institut of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Scotland, unter Verwendung der Mikrospektrofluorimetrie. Die transfizierten Zellen wurden dazu mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladen und anschließend die Fluoreszenzsignale von einzelnen Zellen, nach

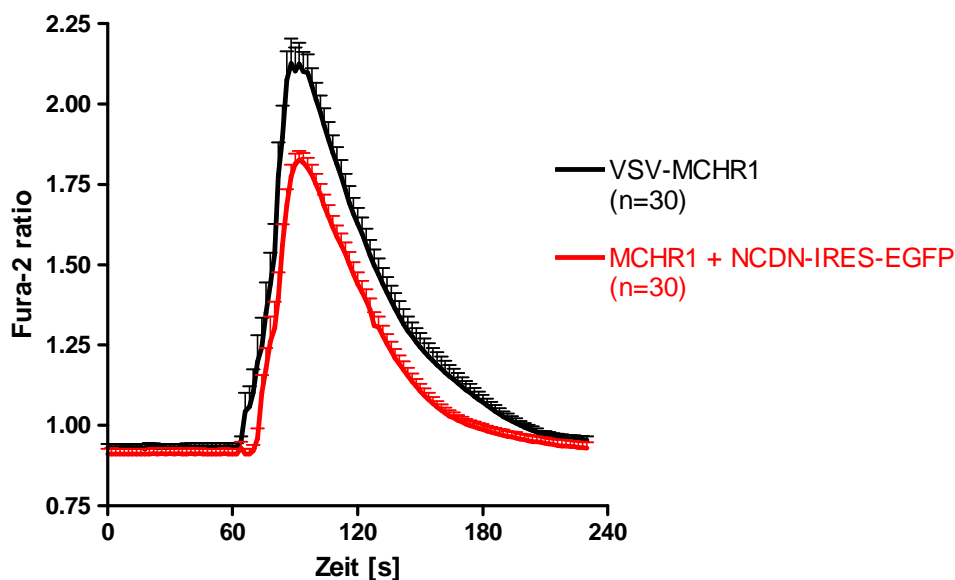


Abbildung 28: Messung des MCH-induzierten Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in transfizierten HEK293-Zellen

Die Zellen wurden mit VSV-G-MCHR1 allein oder zugleich mit VSV-G-MCHR1 und NCDN-IRES-EGFP transfiziert. Nach Beladen der Zellen mit Fura-2 wurde von je 30 einzelnen Zellen alle 2" die Fluoreszenz-Emission nach Anregung mit 340 und 380nm bei 510nm gemessen. Jeweils nach 60" wurde 0,1 μM MCH appliziert. Für jeden Messwert wurde der Quotient der Fluoreszenz-Emissionen F_{340}/F_{380} (= "Fura-2 ratio") gebildet und zu Mittelwerten zusammengefasst. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Auswahl von NCDN exprimierenden Zellen erfolgte über die Autofluoreszenz von koexprimiertem EGFP.

Applikation von 0,1µM MCH über die Zeit aufgenommen. Die Mittelwerte von Messungen an jeweils 30 einzelnen Zellen wurden dabei verglichen (Abbildung 28). Demnach kommt es bei Koexpression von NCDN mit dem MCHR1 zu einem deutlich verringerten und leicht zeitlich verzögerten Anstieg an intrazellulärem Ca²⁺ im Vergleich zu Zellen, die nur den MCH-Rezeptor exprimierten. Die Stimulation von untransfizierten Zellen hatte hingegen keinen Effekt (Daten nicht gezeigt). NCDN zeigt also auch hier einen hemmenden Einfluß auf die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion des MCH-Rezeptors.

4. Diskussion

Das Melanin-konzentrierende Hormon (MCH) spielt im Hypothalamus von Säugern eine wichtige Rolle bei der Regulation des Energiehaushalts (Qu *et al.* 1996). Der MCH-Rezeptor 1 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der die Effekte von MCH im Zentralen Nervensystem übermittelt. Mittlerweile ist deutlich geworden, dass wichtige Funktionen von G-Protein gekoppelten Rezeptoren wie Desensibilisierung, Internalisierung, subzelluläre Lokalisierung und Signaltransduktion über Proteine reguliert werden, die an den intrazellulären C-Terminus der Rezeptoren binden. In Vorarbeiten wurde daher nach Proteinen gesucht, die mit dem C-Terminus von MCHR1 interagieren, um daraus weitere Erkenntnisse über die Funktion von MCHR1 bei der Vermittlung der MCH-Effekte zu erhalten. Dabei wurden die beiden Proteine MIZIP und Neurochondrin als potentielle Interaktionspartner identifiziert.

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von MCHR1 mit diesen Proteinen weiter untersucht.

4.1 Analyse der Expression von MIZIP

MIZIP ist ein neues Protein, das erst über seine Interaktion zum MCHR1 identifiziert wurde (Bächner *et al.* 2002). Um die Expression und subzelluläre Lokalisation des MIZIP-Proteins *in vivo* untersuchen zu können, wurden spezifische Antiseren gegen das Protein hergestellt. Dabei erwies sich das affinitätsgereinigte Serum von einem Meerschweinchen als besonders spezifisch. Es erkannte im Westernblot spezifische Banden von aufgereinigtem, rekombinanten His-MIZIP Protein oder von MIZIP-MycHis Protein in Extrakten transfizierter HEK293-Zellen, mit den erwarteten Molekulargewichten von 27kDa bzw. 30kDa. Dies zeigt, dass diese MIZIP-Fusionsproteine nicht posttranslational modifiziert werden, wenn sie in Bakterien oder Säugierzellen exprimiert werden. Außerdem kann das Antiserum, das gegen die 12 C-terminalen Aminosäuren von MIZIP gerichtet ist, das Epitop nicht nur in seiner nativen Form (His-MIZIP) erkennen, sondern auch, wenn C-terminal ein weiteres Peptid-Epitop fusioniert ist (MIZIP-MycHis). Dies wurde auch durch die Doppel-Immunfluoreszenz-Analyse von MIZIP-MycHis in transfizierten HEK293-Zellen bestätigt. Dabei konnte sowohl das Myc- als auch das MIZIP-Peptid epitop mit entsprechenden Antikörpern parallel nachgewiesen werden. Von beiden Antikörpern wurden dabei exakt dieselben Strukturen angefärbt. Der hier generierte Anti-MIZIP

Antikörper zeichnet sich also durch eine hohe Spezifität aus. Daher konnte damit erstmals endogen exprimiertes MIZIP-Protein *in vivo* nachgewiesen werden. In Proteinextrakten von verschiedenen Mausgeweben wurde im Westernblot ein spezifisches Signal bei etwa 27kDa identifiziert, das in allen untersuchten Geweben auftrat sowie ein weiteres Signal bei ca. 30 kDa, das ausschließlich in Herz und Leber beobachtet wurde. Eine starke MIZIP-Expression wurde in der Leber, im Skelettmuskel und im Gehirn, sowie weniger stark in Lunge, Testis und Herz beobachtet. Dies korreliert mit der mRNA-Expression, die mittels *Northernblot*-Analyse in allen untersuchten Geweben nachgewiesen wurde. Die mRNA-Expression war dort allerdings im Testis am stärksten (Bächner *et al.* 2002). Die Größe der Bande bei etwa 27kDa entspricht dem rechnerischen Molekulargewicht von MIZIP, so dass davon auszugehen ist, dass der Hauptteil des ubiquitär exprimierten MIZIP-Proteins nicht postranslational modifiziert wird. Die 30 kDa Banden könnten hingegen einer gewebespezifisch modifizierten MIZIP-Variante entsprechen. Eine Sequenzanalyse hat ergeben, dass MIZIP über mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen verfügt (Bächner *et al.* 2002), so dass es sich um eine stark phosphorylierte MIZIP-Form handeln könnte. In der *Northernblot*-Analyse wurde für humanes MIZIP eine einzige 1,5kb mRNA gefunden, in Mausgeweben jedoch noch zwei zusätzliche mRNAs von 3,5 und 4kb Länge. Allerdings konnte hier kein gewebespezifisches Spleißen beobachtet werden. Die verschiedenen mRNAs traten in allen untersuchten Geweben gleichermaßen auf (Bächner *et al.* 2002). Es ist daher nicht zu erwarten, dass die 30kDa Bande ein spezifisches Produkt dieser mRNAs ist. Die verschieden großen mRNAs müssen zudem nicht zwangsläufig unterschiedliche MIZIP-Varianten kodieren, da die Unterschiede auch im nicht-kodierenden Bereich der mRNAs liegen können. Außerdem zeigte die Analyse der Genstruktur von Maus-MIZIP, dass alternatives Spleißen eher zu der Expression eines N-terminal verkürzten MIZIPs von 22kDa führen sollte, indem ein alternatives Exon 1b verwendet wird (Bächner *et al.* 2002). Eine entsprechende Bande wurde mit dem Anti-MIZIP Serum in den untersuchten Geweben jedoch nicht beobachtet. Die Daten der Westernblotanalyse mit dem Anti-MIZIP Serum geben daher keine Hinweise auf mögliche Produkte der zusätzlichen mRNAs oder auf alternatives Spleißen in den Mausgeweben. Weitere Experimente könnten klären, ob die alternative Spleißform während der Embryonalentwicklung oder exklusiv in anderen Geweben auftritt, die hier nicht untersucht wurden.

Die Präparation von Membranfraktionen aus dem Mäusegehirn hat gezeigt, dass MIZIP mit Membranen der P2- und Synaptosomen-Fraktion assoziiert ist, obwohl es keine hydrophoben Domänen enthält und in transfizierten Zellen im Cytoplasma lokalisiert ist. Dies könnte die Interaktion mit dem MCHR1 oder anderen, noch nicht identifizierten Membran-assoziierten Proteinen widerspiegeln. MIZIP konnte jedoch nicht in der Präparation der Postsynaptischen Dichte detektiert werden. Eine Funktion im Zusammenhang mit exzitatorischen Synapsen ist daher für MIZIP unwahrscheinlich. Weiterhin zeigte die Überexpression von MIZIP in Hippokampusneuronen keine strukturellen oder morphologischen Veränderungen dieser Zellen, so dass es auch keine Hinweise auf einen Effekt von MIZIP auf die Differenzierung dieser Zellen gibt. MIZIP ist aber in den Hippokampusneuronen endogen exprimiert und zwar sowohl im Zellsoma als auch in den Dendriten. Dort wurde ein punktförmiges Verteilungsmuster beobachtet. Das gleiche Verteilungsmuster zeigten auch Neurone, die MIZIP und MCHR1 überexprimierten. Dabei kolokalisierten beide Proteine in punktförmigen Strukturen in den Dendriten, so dass eine Interaktion beider Proteine dort vermutet werden kann. Es könnte sich dabei um Transportvesikel oder inhibitorische Synapsen handeln. Die Identifizierung dieser Strukturen könnte aufschlussreiche Informationen über die Bedeutung der Interaktion liefern.

Eine grundlegende Voraussetzung für eine physiologisch relevante Interaktion von MIZIP und MCHR1 ist die Koexpression beider Proteine in Neuronen *in vivo*. Über Doppel-Immunfluoreszenz konnte mit dem Anti-MIZIP Antikörper gezeigt werden, dass MIZIP und der MCHR1 in einer Anzahl von Zellen im Rattengehirn koexprimiert werden und dort kolokalisieren. Die Koexpression wurde in Neuronen in Bereichen des Großhirns, im Hippokampus und Hypothalamus sowie in mehreren Kernen des Stammhirns beobachtet. Dies sind alle Regionen, in denen bereits zuvor eine starke Expression des MCHR1 gezeigt wurde und die mit seinen physiologischen Funktionen in Zusammenhang gebracht werden (Hervieu, G.J. *et al.* 2000; Saito *et al.* 2001a). Der Hypothalamus gilt als der zentrale Ort für die Regulation der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts (Anand *et al.* 1951). Die meisten MCH-exprimierenden Neuronen befinden sich im lateralen Hypothalamus. Die kortikale Expression von MCHR1 wird im Zusammenhang mit einer generellen kortikalen Erregung und beschleunigten Verarbeitung der Sensomotorik unter Einfluss von MCH diskutiert, wodurch die Wahrscheinlichkeit gesteigert würde, an Nahrung zu

gelangen (Bittencourt *et al.* 1992; Hervieu, G.J. *et al.* 2000; Nahon 1994; Saper *et al.* 2002). Über die Expression von MCHR1 im Hippokampus könnte MCH an der Erstellung eines olfaktorischen Gedächtnisses beteiligt sein (Saito *et al.* 2000). Der Trigemuskern, Olivenkern und Brückenkern im Hirnstamm haben Anteil an der Koordination von sensomotorischen Vorgängen (Hervieu, G.J. *et al.* 2000; Saito *et al.* 2000). Ob MIZIP an einer Modulation dieser Funktionen beteiligt ist, ist derzeit noch ungeklärt. Die Herstellung und Analyse einer funktionalen MIZIP-*Knock-Out* Maus, die derzeit in der Arbeitsgruppe entwickelt wird, könnte hier entscheidende Hinweise geben.

4.2 Identifizierung von MIZIP-Interaktionspartnern

Über die genaue zelluläre Funktion von MIZIP ist bisher nichts bekannt. Um Hinweise auf seine Bedeutung zu erhalten, wurde in dieser Arbeit nach neuen Interaktionspartnern gesucht. Dazu wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet und das gesamte MIZIP-Protein als Köder eingesetzt. Bei zwei unabhängigen Versuchen wurde jeweils ein Klon aus einer humanen Gehirn-cDNA-Bank isoliert, der für das Protein β -Tubulin als potentiellen Interaktionspartner kodierte. Neben diesen Tubulin-Klonen wurde aber bei beiden Versuchen eine sehr große Zahl an falsch-positiven Klonen erhalten, obwohl die Selektionsbedingungen sehr stringent gewählt waren. Testversuche mit den Köderplasmiden und der cDNA-Bank allein hatten auch keine Hinweise auf ein verstärktes Hintergrundwachstum oder auf Autoaktivierung der Reportergene ergeben. Die meisten der, zur weiteren Untersuchung willkürlich ausgewählten Klone, zeigten auch in Retransformationsversuchen unter überprüften Bedingungen ein positives Ergebnis, was die Möglichkeit von technischen Fehlern im Verfahren ausschließt. Trotzdem ergab die Sequenzanalyse dieser Klone, dass sie für keine bekannten Proteine kodierten, sondern genomische Sequenzen ohne erkennbare Leserahmen enthielten. Dies deutet darauf hin, dass MIZIP für den Einsatz als Köderprotein im Hefe-Zwei-Hybrid-System nicht geeignet ist. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System kann es vorkommen, dass mit der Fusion der DNA-Bindedomäne an das Köderplasmid ein Produkt mit unvorhersehbaren Eigenschaften entsteht, die das System stören und zu falsch positiven Ergebnissen führen (Van Criekinge *et al.* 1999).

Um dennoch weitere putative MIZIP-Interaktionspartner zu identifizieren, wurde eine neu entwickelte Affinitätsaufreinigung von MIZIP-Proteinkomplexen aus HEK293-Zellen angewendet. Dabei wurde in den Zellen ein rekombinantes MIZIP-Protein exprimiert, dem eine PDZ-Bindedomäne an den C-Terminus fusioniert wurde. Über diese PDZ-Domäne konnte das Fusionsprotein und assoziierte HEK-Zellproteine isoliert werden. Mit dieser Methode wurden bereits Proteinkomplexe, die an das Protein Staufen binden, erfolgreich aus HEK293-Zellen aufgereinigt und identifiziert (Brendel *et al.* 2004). Ein Vorteil bei diesem System ist, dass die Expression des humanen Köderproteins auch in einer humanen Zelllinie erfolgt, wodurch korrekte posttranslationale Modifizierungen ermöglicht werden. Weiterhin werden die potentiellen Zielproteine in den verwendeten Zellen endogen exprimiert und binden daher in ihrer natürlichen Umgebung an das Köderprotein.

Mit dieser Methode wurde eine Reihe von möglichen Interaktionspartnern für MIZIP identifiziert, darunter wiederum das Protein Tubulin. Auch hier muss für jede einzelne Interaktion mit weiteren Methoden überprüft werden, ob die identifizierten Proteine direkt an MIZIP binden und ob diese Bindung für MIZIP spezifisch ist.

Für die weiteren Untersuchungen wurde zunächst nur das Protein Tubulin gewählt, da es zuvor ebenfalls mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System als potentieller MIZIP-Interaktionspartner identifiziert wurde und eine wirkliche Interaktion zwischen MIZIP und Tubulin daher als sehr wahrscheinlich anzusehen ist. Im Hefe-System wurde zweimal der gleiche, für β -Tubulin 5 kodierende Klon isoliert. Bei der Affinitätsaufreinigung wurden hingegen Peptide identifiziert, die für β -Tubulin oder α -Tubulin spezifisch waren. Über *GST-Pulldown*-Experimente mit aufgereinigten rekombinanten Proteinen konnte eine direkte und spezifische Bindung von MIZIP an α -Tubulin und β -Tubulin nachgewiesen werden. Weitere *Pulldown*-Experimente mit β -Tubulin-Fragmenten zeigten, dass die Interaktion von dem N-terminalen Bereich von Tubulin vermittelt wird. Dieser Bereich (As 1-246) umfasst die gesamte GTP-Bindedomäne und einen Teil der Taxol-Bindedomäne (vgl. Abbildung 15). Die Aminosäuresequenzen der α - und β -Tubulin-Isoformen sind in diesem Bereich relativ stark konserviert und beide Monomere bilden fast identische Strukturen aus (McKean *et al.* 2001). Daher ist es plausibel, dass MIZIP an α - und β -Tubulin binden kann. Je ein α - und β -Tubulin-Molekül bilden ein Heterodimer als Grundbaustein der Mikrotubuli. Die Bildung des Heterodimers ist ein komplizierter Vorgang, der nur

unter Vermittlung einer ganzen Reihe von spezifischen Kofaktoren ablaufen kann (Tian *et al.* 1997). Im α/β -Heterodimer befindet sich die N-terminale Nukleotid-Bindedomäne des α -Tubulins direkt an der Verbindung zwischen beiden Monomeren und ist dadurch so abgeschirmt, dass das GTP der α -Untereinheit nicht hydrolysiert und ausgetauscht werden kann (Nogales 2000). Trotzdem kann MIZIP auch an das Heterodimer binden, wie ein *Pulldown*-Experiment mit GST-MIZIP Fusionsproteinen und nativen, aus Schweinegehirn aufgereinigten α/β -Tubulin-Dimeren zeigte (Abbildung 16). Die Bindungsstellen für MIZIP sind also auch im Tubulin-Heterodimer für die Interaktion zugänglich. Bei der Polymerisation der Tubulin-Dimere zu Mikrotubuli lagern sich die Untereinheiten so aneinander an, dass die N-terminalen Nukleotid-Bindedomänen und die mittlere Taxol-Bindedomäne im Inneren der Mikrotubuli lokalisiert sind (Nogales 2000). Es ist daher zu erwarten, dass in Mikrotubuli die Bindungsstellen für MIZIP nicht mehr zugänglich sind und es zu keiner Interaktion von MIZIP mit Mikrotubuli kommt. Entsprechende Hinweise lieferte auch die immunocytochemische Untersuchung von transfizierten COS7-Zellen (3.2.4). In unbehandelten Zellen konnte keine exakte Kollokalisierung von MIZIP mit den Mikrotubuli beobachtet werden. Nach Behandlung der Zellen mit Nocodazol, wodurch der Zerfall der Mikrotubuli in α/β -Tubulin-Dimere bewirkt wird, zeigte sich aber eine Kollokalisierung von Tubulin und MIZIP in rundlichen Strukturen. Man kann annehmen, dass durch die Depolymerisation der Mikrotubuli die Bindungsstellen der α/β -Dimere für MIZIP wieder zugänglich werden und es infolgedessen zur Interaktion beider Proteine kommt. Biochemisch lässt sich die Interaktion eines Proteins mit Mikrotubuli nachweisen, indem aufgereinigte, *in vitro* polymerisierte Mikrotubuli in Gegenwart des zu testenden Proteins mittels Ultrazentrifugation sedimentiert werden und anschließend überprüft wird, ob das Testprotein dabei kosedimentiert wurde (van Rossum *et al.* 1999). Ein solches Experiment konnte mit MIZIP aber nicht erfolgreich durchgeführt werden, da MIZIP unter den entsprechenden Bedingungen auch in Abwesenheit von Mikrotubuli sedimentiert wird (Daten nicht gezeigt). Es konnte daher nicht abschließend geklärt werden, ob MIZIP wirklich nur an depolymerisiertes Tubulin binden kann, oder ob es doch mit Mikrotubuli interagiert. MIZIP unterscheidet sich aber wesentlich von den klassischen Mikrotubuli assoziierten Proteinen (MAPs) wie MAP2, MAP4 oder Tau. Diese verfügen über eine C-terminale, konservierte Mikrotubuli-Bindedomäne, die an den C-Terminus von

Tubulin bindet. Da dieser auf der Außenseite der Mikrotubuli frei zugänglich ist, können diese Proteine an Mikrotubuli binden (Nogales 2000).

Die Bedeutung der Interaktion von MIZIP und Tubulin ist noch vollkommen ungeklärt. Hinsichtlich der Interaktion von MIZIP mit dem MCHR1, lassen aber Einflüsse von Tubulin-Dimeren auf die Signaltransduktion und Internalisierung von anderen Transmembran-Rezeptoren bzw. Einflüsse von solchen Rezeptoren auf die Dynamik der Mikrotubuli, eine physiologische Relevanz der MIZIP/Tubulin-Interaktion vermuten. So binden z.B. Tubulin-Dimere an die heterotrimeren G-Proteine G_s , G_{i1} und G_q und können das, von der β -Tubulin-Untereinheit gebundene GTP auf die α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine übertragen. Durch diese Transaktivierung kann die Regulierung der Adenylatcyclase und PLC β 1 unabhängig von einem GPCR bewirkt werden oder die Signaltransduktion von aktivierten Rezeptoren über Tubulin moduliert werden (Popova *et al.* 1997; Popova *et al.* 2000; Roychowdhury *et al.* 1994; Wang *et al.* 1990; Yan *et al.* 2001). Weiterhin scheinen Tubulin-Dimere über ihre Interaktion mit $G\beta\gamma$ und Dynamin für die Zielsteuerung der m3-Muskarinischen Rezeptoren in *Clathrin-coated pits* verantwortlich zu sein, die in Abhängigkeit von Clathrin und Dynamin, aber unabhängig von β -Arrestin, internalisieren (Popova *et al.* 2004). Andererseits wurde für den C-Terminus des metabotropen Glutamat-Rezeptor 1 α eine direkte Interaktion mit Tubulin-Dimeren gezeigt, die eine Agonisten-abhängige Translokation der Tubulin-Dimere zur Plasmamembran bewirkt (Ciruela *et al.* 2001; Ciruela *et al.* 1999). Auch für die C-Termini der NR1 und NR2B Untereinheiten des NMDA-Rezeptors wurde eine direkte Interaktion mit Tubulin-Dimeren gezeigt, die einen hemmenden Einfluss auf die Polymerisationsrate der Mikrotubuli ausübt (van Rossum *et al.* 1999). Die Bindung von Tubulin an Transmembran-Rezeptoren könnte der Regulation der Menge an Mikrotubuli-Untereinheiten in der Zelle dienen, die für die Bildung von Mikrotubuli zur Verfügung stehen. Über Vermittlung der Rezeptoren könnte das Mikrotubuli-Cytoskellet dann in Reaktion auf extrazelluläre Signale modifiziert werden.

Bei verschiedenen Experimenten wurden wiederholt bei SDS-PAGE- oder Westernblot-Analysen spezifische MIZIP-Signale detektiert, die dem doppelten Molekulargewicht oder einem Vielfachen davon entsprachen. Auch die Beobachtung, dass MIZIP durch Ultrazentrifugation sedimentiert werden kann, könnte mit einer Selbstaggregation von MIZIP erklärt werden. Mit einem *GST-Pulldown*-Experiment

konnte gezeigt werden, dass His-MIZIP Fusionsprotein sich von einem GST-MIZIP Fusionsprotein präzipitieren lässt. Dies deutet auf eine direkte Interaktion zwischen zwei MIZIP-Molekülen hin. Weiterhin konnte das His-MIZIP Fusionsprotein auch an GST-Fusionsproteine binden, die entweder nur die N-terminale oder nur die C-terminale Hälfte von MIZIP enthielten. Es muss also sowohl im N-terminalen wie auch im C-terminalen Bereich eine Bindungsstelle für diese Interaktion geben. Dabei ist es denkbar, dass der N-Terminus an den C-Terminus bindet und es so zu einer Kettenbildung von mehreren MIZIP-Molekülen kommen könnte. Weitere Untersuchungen mit verkürzten MIZIP-Varianten müssen aber noch zeigen, welche Bereiche von MIZIP genau miteinander interagieren.

Sowohl das His-MIZIP Fusionsprotein als auch das α/β -Tubulin-Heterodimer binden direkt an das GST-MIZIP Fusionsprotein, das nur die C-terminale Hälfte von MIZIP enthält. Dieser Bereich von MIZIP besteht fast ausschließlich aus der MYND-Zinkfinger-Domäne, die als Protein-Protein-Interaktionsdomäne gilt (Gross *et al.* 1996). Man kann daher vermuten, dass die MYND-Domäne an der Bindung von Tubulin und MIZIP beteiligt ist. Diese These wird von den Ergebnissen der *Pulldown*-Experimente unter Einfluss von EDTA unterstützt (3.2.6). Als Zinkfinger-Domäne enthält die MYND-Domäne acht hoch konservierte Cystein- und Histidin-Reste, die zwei Zink-Ionen koordinieren (Abbildung 29). EDTA komplexiert die Zink-Ionen und entzieht sie dem MIZIP-Protein, wodurch die Struktur der MYND-Domäne zerstört werden sollte. Die MIZIP-Interaktionen mit Tubulin und mit sich selbst wurden beide durch EDTA aufgehoben. Es ist also eine intakte Struktur der Zinkfinger-Domäne für diese Interaktionen notwendig. Die Analyse von Punktmutationen an den Positionen der konservierten Aminosäuren der MYND-Domäne könnte weiteren Aufschluss geben, ob beide Zinkfinger für die Interaktionen benötigt werden und welchen Einfluss die konservierten Reste haben, die offensichtlich nicht an der Koordination der Zink-Ionen beteiligt sind.

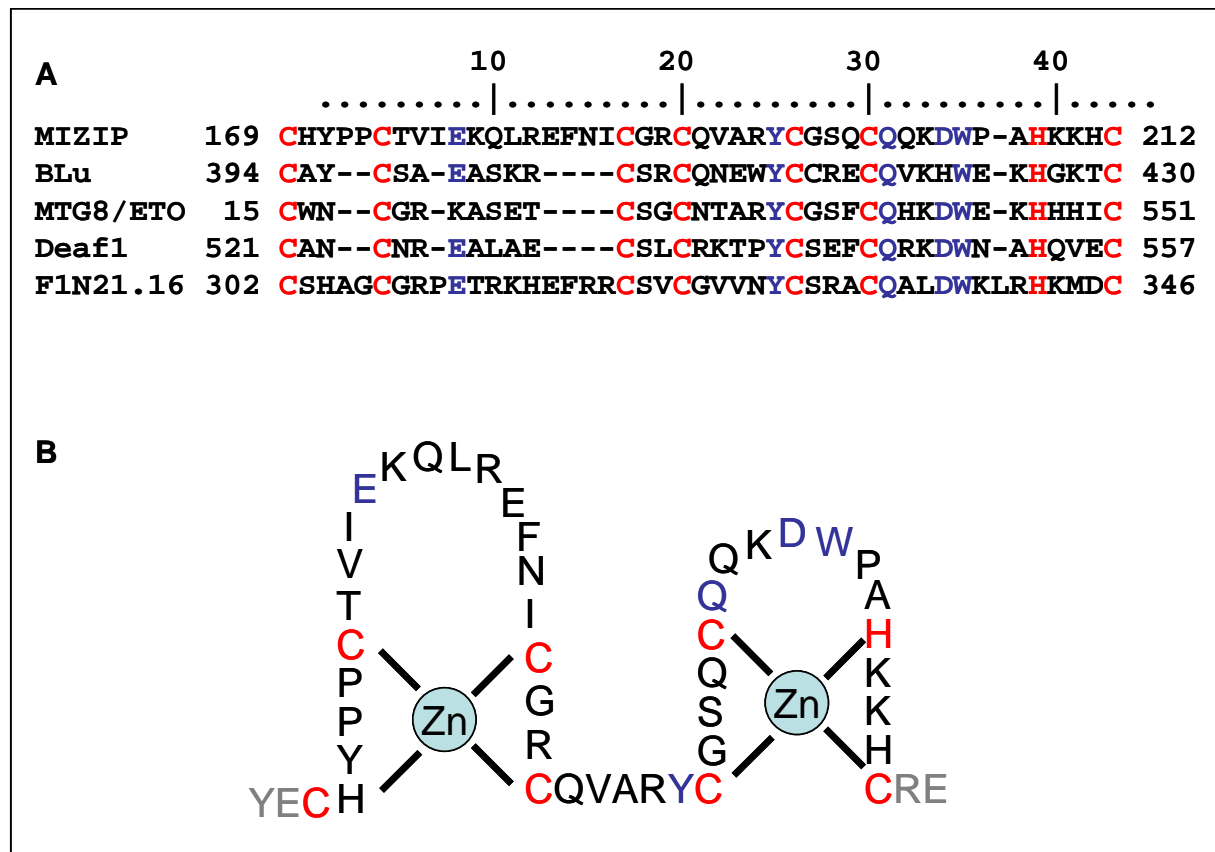


Abbildung 29: Sequenz und Struktur der MYND-Domäne.

A: Aminosäuresequenzvergleich der MYND-Domänen verschiedener Proteine (Bächner *et al.* 2002). Hochkonservierte Aminosäuren sind farbig markiert. Die rot gefärbten Aminosäuren wurden für das Protein MTG8/ETO als Koordinationsstellen der Zink-Ionen vorhergesagt und durch Mutationsexperimente untermauert (Lutterbach *et al.* 1998). **B:** In Anlehnung an Lutterbach *et al.* 1998 vermutete Struktur der MIZIP-MYND-Domäne.

4.3 Analyse der Interaktion zwischen MCHR1 und Neurochondrin

Neurochondrin wurde wie MIZIP, mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System als potentieller Interaktionspartner des C-Terminus vom MCHR1 identifiziert. In dieser Arbeit wurde diese Interaktion zunächst verifiziert. Unter Verwendung aufgereinigter rekombinanter Proteine wurde mit einem *GST-Pulldown*-Experiment gezeigt, dass beide Proteine direkt aneinander binden. Über eine Koimmunpräzipitation aus transfizierten COS7-Zellen konnte weiterhin bestätigt werden, dass die Interaktion auch zwischen den kompletten Proteinen in einem Säuger-Zellsystem stattfindet. Im Hefe-System wurde gezeigt, dass die Interaktion spezifisch für MCHR1 ist, da keine Interaktion von NCDN mit den nah verwandten Rezeptoren MCHR2 und Somatostatinrezeptor 5 beobachtet werden konnte und, dass sowohl der MCHR1 der Ratte als auch sein humanes Ortholog an NCDN binden. Die dabei verwendeten

Sequenzen sind in Abbildung 30 dargestellt. Der humane und der Ratten-MCHR1 unterscheiden sich in diesem Bereich nur in einer einzigen Aminosäure.

		TM7	10	20	30	40	50	
r MCHR1	299	LG	ANSCLNPFVY	IVL	CETFRK	- -	RLVLSVKPAAQQQLRTVSNAQT	ADEERTESKGT . 353
hMCHR1	348	LG	ANSCLNPFVY	IVL	CETFRK	- -	RLVLSVKPAAQQQLRAVSNAQT	ADEERTESKGT . 402
hMCHR2	294	LSYASSS	INPFLY	ILL	SGNFQK	- -	RLPQIQRRATEKEI	NNMGNTLKSHF . 340
rSSTR5	248	LSYANSCANPLLY	GFL	SDNFRQSF	FRKVLCLRR	GYG	MEDADAIEPRPDKSGRPQATLP .	304

Abbildung 30: Aminosäuresequenzvergleich der C-Termini von MCHR1, MCHR2 und SSTR5

Es wurden die Sequenzen verglichen, die im Hefe-Zwei-Hybrid-System jeweils als Köder eingesetzt wurden. Der ursprüngliche *Hefe-Screen* wurde mit der Rattensequenz von MCHR1 (rMCHR1) durchgeführt. Alle zu dieser Sequenz identischen Aminosäuren sind fett gedruckt. Die Positionen der Aminosäuren sind durch Zahlen angegeben. Die grau hinterlegten Bereiche werden der 7. Transmembrandomäne (TM7) des jeweiligen Rezeptors zugeordnet. NCDN kann nur an rMCHR1 und hMCHR1 binden.

Durch die immunhistochemische Analyse der Expression von MCHR1 und NCDN im Rattengehirn, konnte eine Kolokalisation beider Proteine in Neuronen mehrerer Gehirnnareale gezeigt werden. Dies ist ein Beleg für die Interaktion dieser Proteine *in vivo*. Der biochemische Nachweis der Interaktion von NCDN und MCHR1 im Gehirn konnte allerdings nicht erbracht werden, da es nicht möglich war, den endogenen MCHR1 über Westernblot-Techniken nachzuweisen. In keiner bisher veröffentlichten Untersuchung wurde ein endogen im Gehirn exprimierter MCHR1 im Westernblot gezeigt. Wie es schon bei dem Nachweis des überexprimierten MCHR1 in COS7-Zellen beobachtet worden war, scheint die Solubilisierung des Rezeptors aus den Zellmembranen sehr schwierig zu sein. Dies ist ein allgemeines Problem bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren, da sie aufgrund der sieben Transmembrandomänen sehr hydrophob sind und zudem meistens relativ schwach exprimiert werden. Außerdem kommt es häufig zur Bildung von Rezeptor-Dimeren oder Oligomeren mit hohem Molekulargewicht, so dass der Nachweis im Westernblot weiter erschwert wird (Salim *et al.* 2002).

Die beobachtete Kolokalisation von MCHR1 mit NCDN im Rattengehirn gibt aber gute Hinweise auf eine funktionelle Interaktion beider Proteine *in vivo*. Die Kolokalisation wurde in Purkinjezellen und in der Körnerzellschicht im Cerebellum, sowie in Kernen der Trigemini- und Facialisnerven im Hirnstamm und Mesencephalon beobachtet. In genau diesen Bereichen wurde zuvor bereits die Expression von NCDN in jugendlichen und adulten Ratten und Mäusen gezeigt (Istvanffy *et al.* 2004; Shinozaki *et al.* 1999). Ebenfalls wurde dort eine Expression von MCHR1 beobachtet und mit einem Einfluss auf die Koordination von

sensomotorischen Vorgängen in Zusammenhang gebracht (Hervieu, G.J. *et al.* 2000; Saito *et al.* 2001a).

Um die Bereiche im NCDN-Molekül und im MCHR1-C-Terminus einzugrenzen, die die Interaktion vermitteln, wurden Versuche mit Deletionsvarianten von NCDN und MCHR1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die 278 C-terminalen Aminosäuren von NCDN für die Interaktion notwendig sind. N- und C-terminales Verkürzen dieser Sequenz führte zur Zerstörung der Interaktion im Hefe-System. Daher scheint die intakte Tertiärstruktur des C-Terminus von NCDN für die Bindung an den MCHR1 von Bedeutung zu sein. Auf der Seite des MCHR1 konnte die Bindungsstelle für NCDN hingegen auf eine kurze Sequenz aus 17 Aminosäuren bestimmt werden. Mit dem Hefe-System wurde gezeigt, dass die Aminosäuren 299-326 ausreichen, um NCDN zu binden. Dieser Bereich konnte durch ein Koimmunpräzipitations-Experiment C-terminal weiter eingeschränkt werden, da NCDN auch mit der C-terminalen Deletionsvariante T7-MCHR1- Δ C315 präzipitiert werden konnte. Aus beiden Ergebnissen ergibt sich damit zusammen, dass die Aminosäuresequenz ²⁹⁹LG YANSCLNPFVYIVLC³¹⁵ die Bindung von NCDN vermittelt. Die unterstrichenen Aminosäuren in dieser Sequenz werden der 7. Transmembrandomäne zugerechnet (Tetsuka *et al.* 2004). NCDN bindet also an einen Teil der TM7 und/oder an die angrenzenden vier Aminosäuren, die direkt vor der Helix 8 des MCHR1 liegen. Interessanterweise erfolgt die Interaktion von NCDN mit dem Transmembran-Protein Semaphorin 4C ebenfalls an dem Membran-angrenzenden Bereich dieses Proteins. Die Bindungsstelle für Semaphorin im NCDN-Molekül liegt jedoch im mittleren Bereich und überlappt nicht mit der Bindedomäne des MCHR1 (Ohoka *et al.* 2001).

4.4 Funktionelle Bedeutung der Interaktionen von MIZIP und NCDN mit dem MCHR1

Zur Analyse der funktionellen Bedeutung der Interaktion von MIZIP und Neurochondrin mit dem C-Terminus von MCHR1 wurde die MCH-induzierte Internalisierung und Signaltransduktion des Rezeptors in Gegenwart von NCDN und MIZIP untersucht. Dabei konnten keine Einflüsse der beiden Proteine auf die Dosis- oder Zeitabhängigkeit der Internalisierung beobachtet, oder eine veränderte Lokalisation der beteiligten Proteine detektiert werden. Die Internalisierung des

MCHR1 verläuft völlig unabhängig von MIZIP oder NCDN. Hingegen wurde für Neurochondrin ein hemmender Einfluss auf die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion festgestellt. Die Koexpression von NCDN mit MCHR1 in *Xenopus*-Oocyten führte zu einer Hemmung der Gi-gekoppelten Aktivierung des GIRK-Kanals. Der EC_{50} -Wert der Dosis-Wirkungskurve für die MCH-vermittelte GIRK-Aktivierung ist in Gegenwart von NCDN mehr als doppelt so hoch, als für den MCHR1 allein. Weiterhin wurde gezeigt, dass NCDN in HEK293-Zellen die Höhe der MCH-induzierten Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} verringert. MIZIP zeigte dagegen keinen hemmenden Effekt auf die GIRK-Aktivierung in *Xenopus*-Oocyten. Der EC_{50} -Wert der entsprechenden Dosis-Wirkungs-Kurve ist sogar, im Vergleich zum MCHR1 allein, leicht verringert. Es ist aber fraglich, ob MIZIP wirklich einen stimulatorischen Effekt auf die Signaltransduktion des MCHR1 ausübt. Zumindest wurde in transfizierten HEK293-Zellen weder ein stimulierender noch ein hemmender Einfluss von MIZIP auf die MCH-induzierte Bindung von [35 S]GTP γ S an kotransfiziertes G_{α_01} -Protein festgestellt (Murdoch *et al.* 2004). MIZIP beeinflusst demnach die direkte Aktivierung des G-Proteins nicht. In derselben Studie wurde aber gezeigt, dass das MCHR1-interagierende Protein Periplakin die Aktivierung des G-Proteins stark hemmt und außerdem wie NCDN, die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} verringert. Weiterhin konnte hier ebenfalls kein Einfluss von MIZIP und von Periplakin auf die Internalisierung des MCHR1 festgestellt werden.

Alle drei MCHR1-interagierenden Proteine binden den Rezeptor in einem Bereich angrenzend an die TM7. Für NCDN wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass es an die Aminosäuren 299-315 bindet. MIZIP und Periplakin binden beide an die hier direkt angrenzende Sequenz der Helix 8 (Murdoch *et al.* 2004). Innerhalb dieser Bindestellen liegen mehrere konservierte Aminosäuren, die von besonderer Bedeutung für die Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion sind. So liegt innerhalb der NCDN-Bindungssequenz das so genannte *NPxxY-Motiv* (307 Asn-Pro-Phe-Val-Tyr 311 ; x steht für eine beliebige, i.a. hydrophobe Aminosäure), das eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Konformation sowohl des inaktiven als auch des aktivierten MCH-Rezeptors spielt. Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt der Bereich des *NPxxY-Motivs* eine Konformationsänderung durch, wodurch es zu einer Annäherung der Helix 8 an den Bereich des konservierten *DRY-Motivs* in der TM3 kommt, was schließlich die Bindung des G-Proteins ermöglicht

(Vitale *et al.* 2003). In der Mitte der Helix 8 liegen drei basische Aminosäuren (³¹⁹Arg-Lys-Arg³²¹), die wichtig für die Signaltransduktion sind und als Bindungsstelle für die heterotrimeren G-Proteine gelten. Der Austausch dieser Aminosäuren bewirkt eine deutliche Inhibierung der Mobilisierung von intrazellulärem Ca²⁺ (Tetsuka *et al.* 2004). Es ist daher leicht vorstellbar, dass der inhibierende Effekt von NCDN und Periplakin auf die Signaltransduktion, aus der Konkurrenz mit den heterotrimeren G-Proteinen um die Bindungsstellen in der Helix 8 resultiert, oder auf einer sterischen Behinderung der Konformationsänderung des gesamten Bereichs beruht. Letzteres ist nahe liegend, da NCDN und PPL große Proteine sind. Die geringe Größe von MIZIP hingegen könnte die Bindung an die Helix 8 ermöglichen, ohne dass die Funktion der G-Proteine beeinträchtigt wird. Dafür spricht auch, dass sich die exakten Bindungsstellen von MIZIP und Periplakin in der Helix 8 voneinander unterscheiden müssen, da Deletion der N- oder C-terminalen Hälfte der Helix 8 zwar die Bindung von PPL verhindert, die von MIZIP jedoch nicht beeinflusst (Murdoch *et al.* 2004). Das heißt, auch wenn PPL mit den heterotrimeren G-Proteinen um die Bindungsstellen in der Helix 8 konkurriert (Murdoch *et al.* 2004), könnten trotz Bindung von MIZIP, die Bindungsstellen der G-Proteine frei zugänglich bleiben. Weitere Analysen von Punktmutationen innerhalb der Helix 8 und Kopräzipitationsversuche von allen beteiligten Faktoren, könnten hier weitere Aufschlüsse geben.

Die Tatsache, dass zwei der MCHR1-interagierenden Proteine die Signaltransduktion beeinflussen, aber keines der Proteine in Zusammenhang mit der Rezeptor-Internalisierung steht, weist darauf hin, dass Signaltransduktion und Internalisierung zwei voneinander unabhängige Merkmale des MCH-Rezeptors sind. Bemerkenswert dabei ist, dass drei potentielle Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von MCHR1, von denen zwei innerhalb der Sequenz von Helix 8 liegen, für die Internalisierung des Rezeptors von Bedeutung sind. Die Aminosäuren Thr³¹⁷ und Ser³²⁵ innerhalb der Helix 8 sind potentielle Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase C (PKC). Die Behandlung von MCHR1-exprimierenden Zellen mit einem selektiven PKC-Inhibitor führt zu einer deutlichen Hemmung der Internalisierung des Rezeptors. Der gleiche Effekt wurde auch durch Mutation aller drei Phosphorylierungsstellen im C-Terminus des Rezeptors, einschließlich der Aminosäure Thr³⁴², erzielt. Letztere ist eine potentielle Phosphorylierungsstelle der Casein Kinase 2 (Saito *et al.* 2004). Weiterhin zeigte dieselbe Studie, dass die

Internalisierung abhängig von β -Arrestin-2 und Dynamin ist. Auch wurde eine MCH-induzierte Translokation von β -Arrestin-2 von der Plasmamembran in intrazelluläre Vesikel gezeigt (Evans *et al.* 2001). Das heißt, zur Internalisierung des MCHR1 werden die Aminosäuren Thr³¹⁷ und Ser³²⁵ innerhalb der Helix 8 durch die PKC phosphoryliert. β -Arrestin-2 muss diese Phosphorylierung erkennen und daher ebenfalls in diesem Bereich an den MCHR1 binden, um den Rezeptor dem Endocytoseprozess zuzuführen. Beides wird aber offensichtlich durch die Bindung der MCHR1-interagierenden Proteine nicht beeinträchtigt. PKC und β -Arrestin müssen also auch in Anwesenheit von MIZIP, NCDN oder PPL ungehindert mit der Helix 8 interagieren können, da keine Beeinträchtigung der Internalisierung bei Koexpression dieser Proteine beobachtet werden konnte. Dies zeigt weiterhin, dass die Inhibierung der Signaltransduktion durch Neurochondrin und Periplakin ein hoch spezifischer Prozess sein muss.

Bei der Untersuchung der Signaltransduktion in *Xenopus*-Oocyten wurde auch die Deletionsvariante $\Delta V326$ des MCHR1 eingesetzt, der die letzten 27 Aminosäuren fehlen. Diese Mutante zeigte eine starke Hemmung der MCH-induzierten GIRK-Aktivierung. Der gleiche Effekt wurde auch in transfizierten HEK293-Zellen bei der MCH-induzierten Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} beobachtet, wo verschiedene Deletionsvarianten getestet wurden (Tetsuka *et al.* 2004). Die Studie zeigte ebenfalls, dass Deletion der letzten 32 oder 28 Aminosäuren eine deutliche Hemmung der Ca^{2+} -Mobilisierung bewirkt, während das Entfernen des gesamten C-Terminus, einschließlich Helix 8, die Signaltransduktion vollständig verhindert. Lediglich Deletionsvarianten, denen nur die letzten 20 bzw. die letzten 11 Aminosäuren fehlten, zeigten eine mit dem Wildtyp vergleichbare Aktivierung von intrazellulärem Ca^{2+} . Der Bereich der Aminosäuren 326-333 im C-Terminus von MCHR1 ist also ebenfalls für die Signaltransduktion von Bedeutung. Die Helix 8 spielt aber offensichtlich dabei die entscheidende Schlüsselrolle.

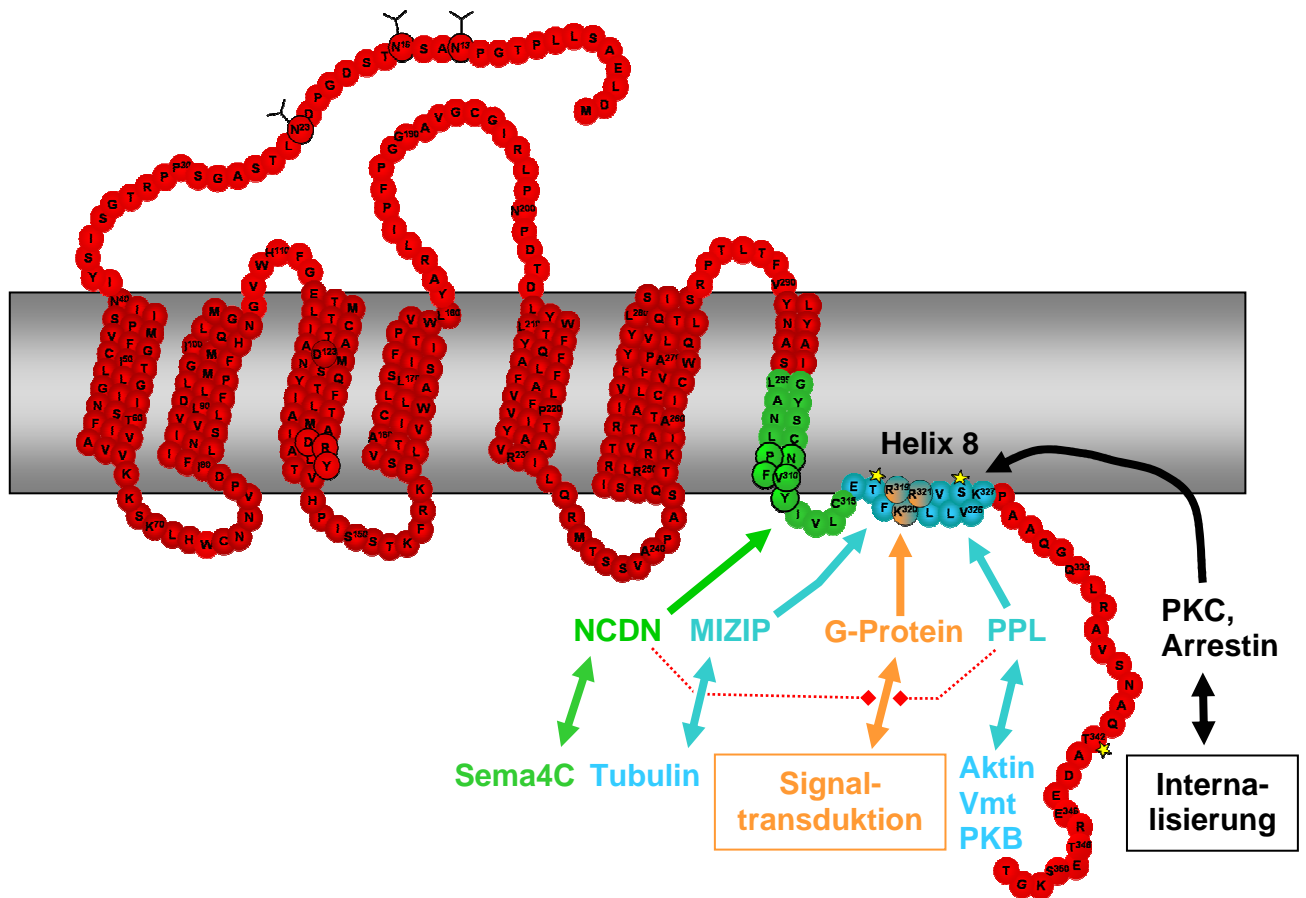


Abbildung 31: Protein-Interaktionen am C-Terminus von MCHR1

Es ist schematisch der gesamte MCHR1 mit seiner Aminosäuresequenz und Membrantopologie gezeigt. Im N-Terminus sind die glykosylierten Asn-Reste markiert. In der TM3 und TM7 sind die konservierten DRY- und NpXXY-Motive hervorgehoben. Im C-Terminus sind die Bindestellen der MCHR1-interagierenden Proteine farbig gekennzeichnet: NCDN bindet an den grün markierten Bereich der TM7. MIZIP und Periplakin (PPL) binden an die blau markierte Helix 8. Dort binden außerdem die heterotrimeren G-Proteine unter Beteiligung der basischen Aminosäuren R¹⁹-K²⁰-R²¹ (braun). NCDN und PPL hemmen die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion von MCHR1 (gestrichelte rote Linien). Im Zuge der Internalisierung kommt es an den mit gelben Sternen markierten Thr- und Ser-Resten zu Phosphorylierung. Dazu muss die PKC an die Helix 8 binden und anschließend ebenfalls β -Arrestin-2, um den Rezeptor der Endocytose zuzuführen. Dieser Vorgang wird von der Bindung der übrigen Proteine nicht beeinflusst. Die MCHR1-interagierenden Proteine zeigen noch weitere Protein-Interaktionen: NCDN bindet an Semaphorin 4C (Sema4C), MIZIP an Tubulin und Periplakin an Actin, Proteinkinase B (PKB) und Vimentin (Vmt).

Abbildung 31 fasst alle Protein-Interaktionen am C-Terminus vom MCH-Rezeptor 1 zusammen. Dabei ergibt sich ein Bild von vielschichtigen Protein-Komplexen, die über die MCHR1-interagierende Proteine vermittelt werden könnten. Bisher ist sehr wenig über die weiteren Interaktionen dieser Proteine bekannt und ob sie gleichzeitig an den MCHR1 binden oder dabei mit noch weiteren Faktoren interagieren. Auffallend ist jedoch, dass die bisher identifizierten Interaktionspartner der MCHR1-bindenden Proteine Bestandteile des Cytoskeletts sind oder in die Signaltransduktion

involviert sind. So bindet Periplakin an Actin-Filamente und an das Intermediärfilament-Protein Vimentin sowie an die Proteinkinase B (DiColandrea *et al.* 2000; van den Heuvel *et al.* 2002). MIZIP bindet, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, an Tubulin, während Neurochondrin mit Semaphorin 4C interagiert, dem Signalfunktionen zugeschrieben werden (Ohoka *et al.* 2001). Vieles spricht also dafür, dass auch der MCHR1 Bestandteil eines komplizierten Signalkomplexes sein könnte, in dem verschiedene Signalmoleküle und Gerüstproteine miteinander verbunden sind und sich gegenseitig beeinflussen. Die Aufklärung dieser Wechselwirkungen könnte das Verständnis der Signalkaskade des Melaninkonzentrierenden Hormons wesentlich verbessern und neue Möglichkeiten aufzeigen, diese zu beeinflussen. Die gezielte Manipulation der Signalverarbeitung von MCH stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, in die Kontrolle der Nahrungsaufnahme einzugreifen. Die übermäßige Energiezufuhr bei gleichzeitig verringerter körperlicher Aktivität aufgrund eines veränderten Lebensstils, hat in den letzten Jahrzehnten zu einem dramatischen Anstieg der weltweiten Adipositas-Prävalenz geführt. Adipositas (Fettsucht) ist eine schwerwiegende Krankheit mit Folgeerscheinungen wie TypII Diabetes, coronarer Herzkrankheit, Schlaganfall und verschiedenen Krebsformen (Solomon *et al.* 1997). Allein in den USA sind 30% der Bevölkerung adipös und weitere 35% übergewichtig. Dort kommt es derzeit zu 300.000 Todesfällen pro Jahr, die auf Übergewicht zurückzuführen sind und die jährlich durch Adipositas entstandenen Kosten belaufen sich auf etwa 60 Milliarden US-Dollar (Segal *et al.* 2001). Daher gibt es große Anstrengungen, neue Wege für eine medikamentöse Therapie der Adipositas zu entwickeln. Die Identifizierung von potenten MCHR1-Antagonisten hat bereits im Tierversuch gezeigt, dass der MCHR1 als Ziel einer solchen Therapie ein großes Potential trägt (Borowsky *et al.* 2002; Takekawa *et al.* 2002). Die genaue Kenntnis aller Faktoren, die an den Funktionen des MCHR1 beteiligt sind, kann bei der Entwicklung und Optimierung besonders spezifischer und zielgerichteter Wirkstoffe helfen und ist daher von großer Bedeutung.

5. Literaturverzeichnis

Aho, S., W. H. McLean, K. Li und J. Uitto (1998). "cDNA cloning, mRNA expression, and chromosomal mapping of human and mouse periplakin genes." Genomics **48**(2): 242-7.

An, S., G. Cutler, J. J. Zhao, S. G. Huang, H. Tian, W. Li, L. Liang, M. Rich, A. Bakleh, J. Du, J. L. Chen und K. Dai (2001). "Identification and characterization of a melanin-concentrating hormone receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7576-81.

Anand, B. K. und J. R. Brobeck (1951). "Hypothalamic control of food intake in rats and cats." Yale J Biol Med **24**(2): 123-40.

Bächner, D., H. Kreienkamp, C. Weise, F. Buck und D. Richter (1999). "Identification of melanin concentrating hormone (MCH) as the natural ligand for the orphan somatostatin-like receptor 1 (SLC-1)." FEBS Lett **457**(3): 522-4.

Bächner, D., H. J. Kreienkamp und D. Richter (2002). "MIZIP, a highly conserved, vertebrate specific melanin-concentrating hormone receptor 1 interacting zinc-finger protein." Febs Letters **526**(1-3): 124-8.

Baskin, D. G., D. Figlewicz Lattemann, R. J. Seeley, S. C. Woods, D. Porte, Jr. und M. W. Schwartz (1999). "Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight." Brain Res **848**(1-2): 114-23.

Bernardis, L. L. und L. L. Bellinger (1996). "The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior." Neurosci Biobehav Rev **20**(2): 189-287.

Bittencourt, J. C., F. Presse, C. Arias, C. Peto, J. Vaughan, J. L. Nahon, W. Vale und P. E. Sawchenko (1992). "The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization." J Comp Neurol **319**(2): 218-45.

Blank, J. L., K. A. Brattain und J. H. Exton (1992). "Activation of cytosolic phosphoinositide phospholipase C by G-protein beta gamma subunits." J Biol Chem **267**(32): 23069-75.

Bockaert, J., L. Fagni, A. Dumuis und P. Marin (2004). "GPCR interacting proteins (GIP)." Pharmacol Ther **103**(3): 203-21.

Bockaert, J. und J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." Embo J **18**(7): 1723-9.

Borowsky, B., M. M. Durkin, K. Ogozalek, M. R. Marzabadi, J. DeLeon, B. Lagu, R. Heurich, H. Lichtblau, Z. Shaposhnik, I. Daniewska, T. P. Blackburn, T. A. Branchek, C. Gerald, P. J. Vaysse und C. Forray (2002). "Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist." Nat Med **8**(8): 825-30.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.

Bradley, R. L., E. G. Kokkotou, E. Maratos-Flier und B. Cheatham (2000). "Melanin-concentrating hormone regulates leptin synthesis and secretion in rat adipocytes." Diabetes **49**(7): 1073-7.

Bradley, R. L., J. P. Mansfield, E. Maratos-Flier und B. Cheatham (2002). "Melanin-concentrating hormone activates signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes." Am J Physiol Endocrinol Metab **283**(3): E584-92.

Brendel, C., M. Rehbein, H. J. Kreienkamp, F. Buck, D. Richter und S. Kindler (2004). "Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes." Biochem J **384**(Pt 2): 239-46.

- Breton, C., M. Schorpp und J. L. Nahon (1993). "Isolation and characterization of the human melanin-concentrating hormone gene and a variant gene." Brain Res Mol Brain Res **18**(4): 297-310.
- Broberger, C., J. Johansen, C. Johansson, M. Schalling und T. Hokfelt (1998). "The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 15043-8.
- Cao, T. T., H. W. Deacon, D. Reczek, A. Bretscher und M. von Zastrow (1999). "A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor." Nature **401**(6750): 286-90.
- Carlin, R. K., D. J. Grab, R. S. Cohen und P. Siekevitz (1980). "Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities." J Cell Biol **86**(3): 831-45.
- Chambers, J., R. S. Ames, D. Bergsma, A. Muir, L. R. Fitzgerald, G. Hervieu, G. M. Dytko, J. J. Foley, J. Martin, W. S. Liu, J. Park, C. Ellis, S. Ganguly, S. Konchar, J. Cluderay, R. Leslie, S. Wilson und H. M. Sarau (1999). "Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1." Nature **400**(6741): 261-5.
- Chen, Y., C. Hu, C. K. Hsu, Q. Zhang, C. Bi, M. Asnicar, H. M. Hsiung, N. Fox, L. J. Sliker, D. D. Yang, M. L. Heiman und Y. Shi (2002). "Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity." Endocrinology **143**(7): 2469-77.
- Ciruela, F. und R. A. McIlhinney (2001). "Metabotropic glutamate receptor type 1alpha and tubulin assemble into dynamic interacting complexes." J Neurochem **76**(3): 750-7.
- Ciruela, F., M. J. Robbins, A. C. Willis und R. A. McIlhinney (1999). "Interactions of the C terminus of metabotropic glutamate receptor type 1alpha with rat brain proteins: evidence for a direct interaction with tubulin." J Neurochem **72**(1): 346-54.
- Dateki, M., T. Horii, Y. Kasuya, R. Mochizuki, Y. Nagao, J. Ishida, F. Sugiyama, K. Tanimoto, K. I. Yagami, H. Imai und A. Fukamizu (2005). "Neurochondrin negatively regulates CaMKII phosphorylation and nervous system specific gene disruption results in epileptic seizure." J Biol Chem.
- DiColandrea, T., T. Karashima, A. Maatta und F. M. Watt (2000). "Subcellular distribution of envoplakin and periplakin: insights into their role as precursors of the epidermal cornified envelope." J Cell Biol **151**(3): 573-86.
- Drecktrah, D. und W. J. Brown (1999). "Phospholipase A2 Antagonists Inhibit Nocodazole-induced Golgi Ministack Formation: Evidence of an ER Intermediate and Constitutive Cycling." Mol. Biol. Cell **10**(12): 4021-4032.
- Elias, C. F., C. Lee, J. Kelly, C. Aschkenasi, R. S. Ahima, P. R. Couceyro, M. J. Kuhar, C. B. Saper und J. K. Elmquist (1998a). "Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord." Neuron **21**(6): 1375-85.
- Elias, C. F., C. B. Saper, E. Maratos-Flier, N. A. Tritos, C. Lee, J. Kelly, J. B. Tatro, G. E. Hoffman, M. M. Ollmann, G. S. Barsh, T. Sakurai, M. Yanagisawa und J. K. Elmquist (1998b). "Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area." J Comp Neurol **402**(4): 442-59.
- Ernst, O. P., C. K. Meyer, E. P. Marin, P. Henklein, W. Y. Fu, T. P. Sakmar und K. P. Hofmann (2000). "Mutation of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin affects binding of transducin and peptides derived from the carboxyl-terminal sequences of transducin alpha and gamma subunits." J Biol Chem **275**(3): 1937-43.
- Evans, N. A., D. A. Groarke, J. Warrack, C. J. Greenwood, K. Dodgson, G. Milligan und S. Wilson (2001). "Visualizing differences in ligand-induced beta-arrestin-GFP interactions and trafficking between three recently characterized G protein-coupled receptors." J Neurochem **77**(2): 476-85.

- Feinstein, P. G., K. Kornfeld, D. S. Hogness und R. S. Mann (1995). "Identification of homeotic target genes in *Drosophila melanogaster* including *nervy*, a proto-oncogene homologue." Genetics **140**(2): 573-86.
- Feng, G. J., E. Kellett, C. A. Scorer, J. Wilde, J. H. White und G. Milligan (2003). "Selective interactions between helix VIII of the human mu-opioid receptors and the C terminus of periplakin disrupt G protein activation." J Biol Chem **278**(35): 33400-7.
- Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." Pharmacol Rev **53**(1): 1-24.
- Gao, X. B. und A. N. van den Pol (2001). "Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus." J Physiol **533**(Pt 1): 237-52.
- Goslin, K. und G. Banker (1998). Culturing Nerve Cells. MIT Press, Cambridge, MA.
- Gross, C. T. und W. McGinnis (1996). "DEAF-1, a novel protein that binds an essential region in a Deformed response element." Embo J **15**(8): 1961-70.
- Hadley, M. E., V. J. Hruby, J. Jiang, S. D. Sharma, J. L. Fink, C. Haskell-Luevano, D. L. Bentley, F. al-Obeidi und T. K. Sawyer (1996). "Melanocortin receptors: identification and characterization by melanotropic peptide agonists and antagonists." Pigment Cell Res **9**(5): 213-34.
- Hahn, T. M., J. F. Breininger, D. G. Baskin und M. W. Schwartz (1998). "Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons." Nat Neurosci **1**(4): 271-2.
- Hall, R. A., R. T. Premont, C. W. Chow, J. T. Blitzer, J. A. Pitcher, A. Claing, R. H. Stoffel, L. S. Barak, S. Shenolikar, E. J. Weinman, S. Grinstein und R. J. Lefkowitz (1998). "The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange." Nature **392**(6676): 626-30.
- Hamm, H. E. (1998). "The many faces of G protein signaling." J Biol Chem **273**(2): 669-72.
- Hassel, B., M. Schreff, E. M. Stube, U. Blaich und S. Schumacher (2003). "CALEB/NGC interacts with the Golgi-associated protein PIST." J Biol Chem **278**(41): 40136-43.
- Hawes, B. E., E. Kil, B. Green, K. O'Neill, S. Fried und M. P. Graziano (2000). "The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways." Endocrinology **141**(12): 4524-32.
- Hervieu, G. (2003). "Melanin-concentrating hormone functions in the nervous system: food intake and stress." Expert Opin Ther Targets **7**(4): 495-511.
- Hervieu, G., D. Segretain und J. L. Nahon (1996). "Developmental and stage-dependent expression of melanin-concentrating hormone in mammalian germ cells." Biol Reprod **54**(6): 1161-72.
- Hervieu, G. J., J. E. Cluderay, D. Harrison, J. Meakin, P. Maycox, S. Nasir und R. A. Leslie (2000). "The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, *slc-1*, in the central nervous system of the rat." Eur J Neurosci **12**(4): 1194-216.
- Hill, J., M. Duckworth, P. Murdock, G. Rennie, C. Sabido-David, R. S. Ames, P. Szekeres, S. Wilson, D. J. Bergsma, I. S. Gloger, D. S. Levy, J. K. Chambers und A. I. Muir (2001). "Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor." J Biol Chem **276**(23): 20125-9.
- Hu, L. A., Y. Tang, W. E. Miller, M. Cong, A. G. Lau, R. J. Lefkowitz und R. A. Hall (2000). "beta 1-adrenergic receptor association with PSD-95. Inhibition of receptor internalization and facilitation of beta 1-adrenergic receptor interaction with N-methyl-D-aspartate receptors." J Biol Chem **275**(49): 38659-66.
- Ishiduka, Y., R. Mochizuki, K. Yanai, M. Takatsuka, T. Nonomura, S. Niida, H. Horiguchi, N. Maeda und A. Fukamizu (1999). "Induction of hydroxyapatite resorptive activity in bone marrow cell

populations resistant to bafilomycin A1 by a factor with restricted expression to bone and brain, neurochondrin." Biochim Biophys Acta **1450**(1): 92-8.

Istvanffy, R., D. M. Vogt Weisenhorn, T. Floss und W. Wurst (2004). "Expression of neurochondrin in the developing and adult mouse brain." Dev Genes Evol **214**(4): 206-9.

Katz, A., D. Wu und M. I. Simon (1992). "Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C." Nature **360**(6405): 686-9.

Kawano, H., S. Honma, A. Honma, M. Horie, Y. Kawano und S. Hayashi (2002). "Melanin-concentrating hormone neuron system: the Wide Web that controls the feeding." Anat Sci Int **77**(3): 149-60.

Kawauchi, H., I. Kawazoe, M. Tsubokawa, M. Kishida und B. I. Baker (1983). "Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries." Nature **305**(5932): 321-3.

Kennedy, M. B. (2000). "Signal-processing machines at the postsynaptic density." Science **290**(5492): 750-4.

Kokkotou, E. G., N. A. Tritos, J. W. Mastaitis, L. Sliker und E. Maratos-Flier (2001). "Melanin-concentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain." Endocrinology **142**(2): 680-6.

Kolakowski, L. F., B. P. Jung, T. Nguyen, M. P. Johnson, K. R. Lynch, R. Cheng, H. H. Heng, S. R. George und B. F. O'Dowd (1996). "Characterization of a human gene related to genes encoding somatostatin receptors." FEBS Lett **398**(2-3): 253-8.

Kreienkamp, H. J., M. Soltau, D. Richter und T. Bockers (2002). "Interaction of G-protein-coupled receptors with synaptic scaffolding proteins." Biochem Soc Trans **30**(4): 464-8.

Kreienkamp, H. J., H. Zitzer und D. Richter (2000). "Identification of proteins interacting with the rat somatostatin receptor subtype 2." J Physiol Paris **94**(3-4): 193-8.

Kristensen, P., M. E. Judge, L. Thim, U. Ribbel, K. N. Christjansen, B. S. Wulff, J. T. Clausen, P. B. Jensen, O. D. Madsen, N. Vrang, P. J. Larsen und S. Hastrup (1998). "Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin." Nature **393**(6680): 72-6.

Ktistakis, N. T., C. Delon, M. Manifava, E. Wood, I. Ganley und J. M. Sugars (2003). "Phospholipase D1 and potential targets of its hydrolysis product, phosphatidic acid." Biochem Soc Trans **31**(Pt 1): 94-7.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.

Lakaye, B., A. Minet, W. Zorzi und T. Grisar (1998). "Cloning of the rat brain cDNA encoding for the SLC-1 G protein-coupled receptor reveals the presence of an intron in the gene." Biochim Biophys Acta **1401**(2): 216-20.

Lembo, P. M., E. Grazzini, J. Cao, D. A. Hubatsch, M. Pelletier, C. Hoffert, S. St-Onge, C. Pou, J. Labrecque, T. Groblewski, D. O'Donnell, K. Payza, S. Ahmad und P. Walker (1999). "The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor." Nat Cell Biol **1**(5): 267-71.

Liman, E. R., J. Tytgat und P. Hess (1992). "Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs." Neuron **9**(5): 861-71.

Liu, S., J. J. Carrillo, J. D. Padiani und G. Milligan (2002). "Effective information transfer from the alpha 1b-adrenoceptor to Galpha 11 requires both beta/gamma interactions and an aromatic group four amino acids from the C terminus of the G protein." J Biol Chem **277**(28): 25707-14.

- Ludwig, D. S., N. A. Tritos, J. W. Mastaitis, R. Kulkarni, E. Kokkotou, J. Elmquist, B. Lowell, J. S. Flier und E. Maratos-Flier (2001). "Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance." J Clin Invest **107**(3): 379-86.
- Lutterbach, B., J. J. Westendorf, B. Linggi, A. Patten, M. Moniwa, J. R. Davie, K. D. Huynh, V. J. Bardwell, R. M. Lavinsky, M. G. Rosenfeld, C. Glass, E. Seto und S. W. Hiebert (1998). "ETO, a Target of t(8;21) in Acute Leukemia, Interacts with the N-CoR and mSin3 Corepressors." Mol. Cell. Biol. **18**(12): 7176-7184.
- Macdonald, D., N. Murgolo, R. Zhang, J. P. Durkin, X. Yao, C. D. Strader und M. P. Graziano (2000). "Molecular characterization of the melanin-concentrating hormone/receptor complex: identification of critical residues involved in binding and activation." Mol Pharmacol **58**(1): 217-25.
- Marin, E. P., A. G. Krishna, T. A. Zvyaga, J. Isele, F. Siebert und T. P. Sakmar (2000). "The amino terminus of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin modulates rhodopsin-transducin interaction." J Biol Chem **275**(3): 1930-6.
- Marsh, D. J., D. T. Weingarh, D. E. Novi, H. Y. Chen, M. E. Trumbauer, A. S. Chen, X. M. Guan, M. M. Jiang, Y. Feng, R. E. Camacho, Z. Shen, E. G. Frazier, H. Yu, J. M. Metzger, S. J. Kuca, L. P. Shearman, S. Gopal-Truter, D. J. MacNeil, A. M. Strack, D. E. MacIntyre, L. H. Van der Ploeg und S. Qian (2002). "Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 3240-5.
- McKean, P. G., S. Vaughan und K. Gull (2001). "The extended tubulin superfamily." J Cell Sci **114**(15): 2723-2733.
- Mochizuki, R., M. Dateki, K. Yanai, Y. Ishizuka, N. Amizuka, H. Kawashima, Y. Koga, H. Ozawa und A. Fukamizu (2003). "Targeted disruption of the neurochondrin/norbin gene results in embryonic lethality." Biochem Biophys Res Commun **310**(4): 1219-26.
- Mochizuki, R., Y. Ishizuka, K. Yanai, Y. Koga, A. Fukamizu und K. Murakami (1999). "Molecular cloning and expression of human neurochondrin-1 and -2." Biochim Biophys Acta **1446**(3): 397-402.
- Moench, S. J., J. Moreland, D. H. Stewart und T. G. Dewey (1994). "Fluorescence studies of the location and membrane accessibility of the palmitoylation sites of rhodopsin." Biochemistry **33**(19): 5791-6.
- Morello, J. P. und M. Bouvier (1996). "Palmitoylation: a post-translational modification that regulates signalling from G-protein coupled receptors." Biochem Cell Biol **74**(4): 449-57.
- Mori, M., M. Harada, Y. Terao, T. Sugo, T. Watanabe, Y. Shimomura, M. Abe, Y. Shintani, H. Onda, O. Nishimura und M. Fujino (2001). "Cloning of a novel G protein-coupled receptor, SLT, a subtype of the melanin-concentrating hormone receptor." Biochem Biophys Res Commun **283**(5): 1013-8.
- Murdoch, H., G. J. Feng, D. Bachner, L. Ormiston, J. H. White, D. Richter und G. Milligan (2004). "Periplakin interferes with G protein activation by the melanin-concentrating hormone receptor-1 by binding to the proximal segment of the receptor C-terminal tail." J Biol Chem.
- Nahon, J. L. (1994). "The melanin-concentrating hormone: from the peptide to the gene." Crit Rev Neurobiol **8**(4): 221-62.
- Nahon, J. L., F. Presse, J. C. Bittencourt, P. E. Sawchenko und W. Vale (1989). "The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus." Endocrinology **125**(4): 2056-65.
- Naisbitt, S., E. Kim, J. C. Tu, B. Xiao, C. Sala, J. Valtschanoff, R. J. Weinberg, P. F. Worley und M. Sheng (1999). "Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin." Neuron **23**(3): 569-82.
- Nakamura, N., C. Rabouille, R. Watson, T. Nilsson, N. Hui, P. Slusarewicz, T. E. Kreis und G. Warren (1995). "Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130." J Cell Biol **131**(6 Pt 2): 1715-26.

- Nakazato, M., N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa und S. Matsukura (2001). "A role for ghrelin in the central regulation of feeding." Nature **409**(6817): 194-8.
- Neudauer, C. L., G. Joberty und I. G. Macara (2001). "PIST: a novel PDZ/coiled-coil domain binding partner for the rho-family GTPase TC10." Biochem Biophys Res Commun **280**(2): 541-7.
- Neves, S. R., P. T. Ram und R. Iyengar (2002). "G protein pathways." Science **296**(5573): 1636-9.
- Nogales, E. (2000). "Structural insights into microtubule function." Annu Rev Biochem **69**: 277-302.
- Nogales, E., S. G. Wolf und K. H. Downing (1998). "Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography." Nature **391**(6663): 199-203.
- Numberger, M. und A. Draguhn (1996). Patch-Clamp-Technik. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg; Berlin; Oxford.
- O'Connor, V., O. El Far, E. Bofill-Cardona, C. Nanoff, M. Freissmuth, A. Karschin, J. M. Airas, H. Betz und S. Boehm (1999). "Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling." Science **286**(5442): 1180-4.
- Ohoka, Y., M. Hirotsani, H. Sugimoto, S. Fujioka Sh, T. Furuyama und S. Inagaki (2001). "Associates with a Neurite-Outgrowth-Related Protein, SFAP75." Biochem Biophys Res Commun **280**(1): 237-243.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto und M. Miyano (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**(5480): 739-45.
- Parkes, D. und W. Vale (1992). "Secretion of melanin-concentrating hormone and neuropeptide-EI from cultured rat hypothalamic cells." Endocrinology **131**(4): 1826-31.
- Paxinos, G. und C. Watson (1998). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, Orlando.
- Pierce, K. L., R. T. Premont und R. J. Lefkowitz (2002). "Seven-transmembrane receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 639-50.
- Pissios, P., D. J. Trombly, I. Tzameli und E. Maratos-Flier (2003). "Melanin-concentrating hormone receptor 1 activates extracellular signal-regulated kinase and synergizes with G(s)-coupled pathways." Endocrinology **144**(8): 3514-23.
- Popova, J. S., J. C. Garrison, S. G. Rhee und M. M. Rasenick (1997). "Tubulin, Gq, and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interact to regulate phospholipase Cbeta1 signaling." J Biol Chem **272**(10): 6760-5.
- Popova, J. S. und M. M. Rasenick (2000). "Muscarinic receptor activation promotes the membrane association of tubulin for the regulation of Gq-mediated phospholipase Cbeta(1) signaling." J Neurosci **20**(8): 2774-82.
- Popova, J. S. und M. M. Rasenick (2004). "Clathrin-mediated endocytosis of m3 muscarinic receptors. Roles for Gbetagamma and tubulin." J Biol Chem **279**(29): 30410-8.
- Presse, F., J. L. Nahon, W. H. Fischer und W. Vale (1990). "Structure of the human melanin concentrating hormone mRNA." Mol Endocrinol **4**(4): 632-7.
- Qu, D., D. S. Ludwig, S. Gammeltoft, M. Piper, M. A. Pelleymounter, M. J. Cullen, W. F. Mathes, R. Przypek, R. Kanarek und E. Maratos-Flier (1996). "A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour." Nature **380**(6571): 243-7.
- Rance, T. und B. I. Baker (1979). "The teleost melanin-concentrating hormone -- a pituitary hormone of hypothalamic origin." Gen Comp Endocrinol **37**(1): 64-73.

- Rodriguez, M., P. Beauverger, I. Naime, H. Rique, C. Ouvry, S. Souchaud, S. Dromaint, N. Nagel, T. Suply, V. Audinot, J. A. Boutin und J. P. Galizzi (2001). "Cloning and molecular characterization of the novel human melanin-concentrating hormone receptor MCH2." Mol Pharmacol **60**(4): 632-9.
- Rossi, M., S. J. Choi, D. O'Shea, T. Miyoshi, M. A. Ghatei und S. R. Bloom (1997). "Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight." Endocrinology **138**(1): 351-5.
- Roth, A., H. J. Kreienkamp, R. B. Nehring, D. Roosterman, W. Meyerhof und D. Richter (1997). "Endocytosis of the rat somatostatin receptors: subtype discrimination, ligand specificity, and delineation of carboxy-terminal positive and negative sequence motifs." DNA Cell Biol **16**(1): 111-9.
- Roychowdhury, S. und M. M. Rasenick (1994). "Tubulin-G protein association stabilizes GTP binding and activates GTPase: cytoskeletal participation in neuronal signal transduction." Biochemistry **33**(32): 9800-5.
- Ruhrberg, C., M. A. Hajibagheri, D. A. Parry und F. M. Watt (1997). "Periplakin, a novel component of cornified envelopes and desmosomes that belongs to the plakin family and forms complexes with envoplakin." J Cell Biol **139**(7): 1835-49.
- Sailer, A. W., H. Sano, Z. Zeng, T. P. McDonald, J. Pan, S. S. Pong, S. D. Feighner, C. P. Tan, T. Fukami, H. Iwaasa, D. L. Hreniuk, N. R. Morin, S. J. Sadowski, M. Ito, M. Ito, A. Bansal, B. Ky, D. J. Figueroa, Q. Jiang, C. P. Austin, D. J. MacNeil, A. Ishihara, M. Ihara, A. Kanatani, L. H. Van der Ploeg, A. D. Howard und Q. Liu (2001). "Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7564-9.
- Saito, Y., M. Cheng, F. M. Leslie und O. Civelli (2001a). "Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain." J Comp Neurol **435**(1): 26-40.
- Saito, Y., H. Nothacker und O. Civelli (2000). "Melanin-concentrating Hormone Receptor: An Orphan Receptor Fits the Key." Trends Endocrinol Metab **11**(8): 299-303.
- Saito, Y., H. P. Nothacker, Z. Wang, S. H. Lin, F. Leslie und O. Civelli (1999). "Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor." Nature **400**(6741): 265-9.
- Saito, Y., M. Tetsuka, Y. Li, H. Kurose und K. Maruyama (2004). "Properties of rat melanin-concentrating hormone receptor 1 internalization." Peptides **25**(10): 1597-604.
- Saito, Y., M. Tetsuka, L. Yue, Y. Kawamura und K. Maruyama (2003). "Functional role of N-linked glycosylation on the rat melanin-concentrating hormone receptor 1." FEBS Lett **533**(1-3): 29-34.
- Saito, Y., Z. Wang, K. Hagino-Yamagishi, O. Civelli, S. Kawashima und K. Maruyama (2001b). "Endogenous melanin-concentrating hormone receptor SLC-1 in human melanoma SK-MEL-37 cells." Biochem Biophys Res Commun **289**(1): 44-50.
- Salim, K., T. Fenton, J. Bacha, H. Urien-Rodriguez, T. Bonnert, H. A. Skynner, E. Watts, J. Kerby, A. Heald, M. Beer, G. McAllister und P. C. Guest (2002). "Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation." J Biol Chem **277**(18): 15482-5.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Saper, C. B., T. C. Chou und J. K. Elmquist (2002). "The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating." Neuron **36**(2): 199-211.
- Schlumberger, S. E., V. Jaggin, H. Tanner und A. N. Eberle (2002). "Endogenous receptor for melanin-concentrating hormone in human neuroblastoma Kelly cells." Biochem Biophys Res Commun **298**(1): 54-9.
- Segal, D. G. und J. C. Sanchez (2001). "Childhood Obesity in the Year 2001." The Endocrinologist **11**(4): 296-306.

- Sheng, M. und E. Kim (2000). "The Shank family of scaffold proteins." *J Cell Sci* **113 (Pt 11)**: 1851-6.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm und M. Mann (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem* **68(5)**: 850-8.
- Shimada, M., N. A. Tritos, B. B. Lowell, J. S. Flier und E. Maratos-Flier (1998). "Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean." *Nature* **396(6712)**: 670-4.
- Shimomura, Y., M. Mori, T. Sugo, Y. Ishibashi, M. Abe, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura, Y. Sumino und M. Fujino (1999). "Isolation and identification of melanin-concentrating hormone as the endogenous ligand of the SLC-1 receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **261(3)**: 622-6.
- Shinozaki, K., H. Kume, H. Kuzume, K. Obata und K. Maruyama (1999). "Norbin, a neurite-outgrowth-related protein, is a cytosolic protein localized in the somatodendritic region of neurons and distributed prominently in dendritic outgrowth in Purkinje cells." *Brain Res Mol Brain Res* **71(2)**: 364-8.
- Shinozaki, K., K. Maruyama, H. Kume, H. Kuzume und K. Obata (1997). "A novel brain gene, norbin, induced by treatment of tetraethylammonium in rat hippocampal slice and accompanied with neurite-outgrowth in neuro 2a cells." *Biochem Biophys Res Commun* **240(3)**: 766-71.
- Skofitsch, G., D. M. Jacobowitz und N. Zamir (1985). "Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain." *Brain Res Bull* **15(6)**: 635-49.
- Solomon, C. G. und J. E. Manson (1997). "Obesity and mortality: a review of the epidemiologic data." *Am J Clin Nutr* **66(4 Suppl)**: 1044S-1050S.
- Takekawa, S., A. Asami, Y. Ishihara, J. Terauchi, K. Kato, Y. Shimomura, M. Mori, H. Murakoshi, K. Kato, N. Suzuki, O. Nishimura und M. Fujino (2002). "T-226296: a novel, orally active and selective melanin-concentrating hormone receptor antagonist." *Eur J Pharmacol* **438(3)**: 129-35.
- Tan, C. P., H. Sano, H. Iwaasa, J. Pan, A. W. Sailer, D. L. Hreniuk, S. D. Feighner, O. C. Palyha, S. S. Pong, D. J. Figueroa, C. P. Austin, M. M. Jiang, H. Yu, J. Ito, M. Ito, X. M. Guan, D. J. MacNeil, A. Kanatani, L. H. Van_der_Ploeg und A. D. Howard (2002). "Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression." *Genomics* **79(6)**: 785-92.
- Tetsuka, M., Y. Saito, K. Imai, H. Doi und K. Maruyama (2004). "The basic residues in the membrane-proximal C-terminal tail of the rat melanin-concentrating hormone receptor 1 are required for receptor function." *Endocrinology* **145(8)**: 3712-23.
- Tian, G., S. A. Lewis, B. Feierbach, T. Stearns, H. Rommelaere, C. Ampe und N. J. Cowan (1997). "Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors." *J Cell Biol* **138(4)**: 821-32.
- Tritos, N. A. und E. Maratos-Flier (1999). "Two important systems in energy homeostasis: melanocortins and melanin-concentrating hormone." *Neuropeptides* **33(5)**: 339-49.
- Tu, J. C., B. Xiao, S. Naisbitt, J. P. Yuan, R. S. Petralia, P. Brakeman, A. Doan, V. K. Aakalu, A. A. Lanahan, M. Sheng und P. F. Worley (1999). "Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins." *Neuron* **23(3)**: 583-92.
- Van Crielinge, W. und R. Beyaert (1999). "Yeast Two-Hybrid: State of the Art." *Biol Proced Online* **2**: 1-38.
- van den Heuvel, A. P., A. M. de Vries-Smits, P. C. van Weeren, P. F. Dijkers, K. M. de Bruyn, J. A. Riedl und B. M. Burgering (2002). "Binding of protein kinase B to the plakins family member periplakin." *J Cell Sci* **115(Pt 20)**: 3957-66.
- van Rossum, D., J. Kuhse und H. Betz (1999). "Dynamic interaction between soluble tubulin and C-terminal domains of N-methyl-D-aspartate receptor subunits." *J Neurochem* **72(3)**: 962-73.
- Vaughan, J. M., W. H. Fischer, C. Hoeger, J. Rivier und W. Vale (1989). "Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus." *Endocrinology* **125(3)**: 1660-5.

-
- Viale, A., Y. Zhixing, C. Breton, F. Pedeutour, A. Coquerel, D. Jordan und J. L. Nahon (1997). "The melanin-concentrating hormone gene in human: flanking region analysis, fine chromosome mapping, and tissue-specific expression." Brain Res Mol Brain Res **46**(1-2): 243-55.
- Vitale, R. M., L. Zaccaro, B. Di Blasio, R. Fattorusso, C. Isernia, P. Amodeo, C. Pedone und M. Saviano (2003). "Conformational features of human melanin-concentrating hormone: an NMR and computational analysis." Chembiochem **4**(1): 73-81.
- Wang, N., K. Yan und M. M. Rasenick (1990). "Tubulin binds specifically to the signal-transducing proteins, Gs alpha and Gi alpha 1." J Biol Chem **265**(3): 1239-42.
- Wente, W. (2004). "Funktionelle Untersuchungen von Somatostatinrezeptor-5 interagierenden Proteinen in der Maus (*Mus musculus*)." Dissertation, Universität Hamburg. ISBN: 3-89825-896-3
- Wong, S. K. (2003). "G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs." Neurosignals **12**(1): 1-12.
- Yan, K., J. S. Popova, A. Moss, B. Shah und M. M. Rasenick (2001). "Tubulin stimulates adenylyl cyclase activity in C6 glioma cells by bypassing the beta-adrenergic receptor: a potential mechanism of G protein activation." J Neurochem **76**(1): 182-90.
- Zitzer, H., H. H. Honck, D. Bachner, D. Richter und H. J. Kreienkamp (1999). "Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain." J Biol Chem **274**(46): 32997-3001.

6. Anhang

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten DNA-Konstrukte

Es sind alle Konstrukte unter Angabe des Basisvektors, den bei der Klonierung verwendeten Primern und der, in der *Cloning Site* der Vektoren genutzten Schnittstellen angegeben. Die *GeneBank Accession Nummer* (ACC.-Nr.) der jeweiligen klonierten Sequenzen sind angegeben.

Konstrukt	Vektor	Primer	Cloning site	ACC.-NR.
T7-MCHR1	pCDNA3-T7	Slc1-1 Slc1-2	HindIII / XbaI	AF008650
T7-MCHR1- Δ C315	pCDNA3-T7	pCDNA3 Fw Bam MCHR1- Δ 315 Rev Xba	HindIII / XbaI	AF008650
VSV-MCHR1	pCDNA3.1	{Murdoch, 2004 #3}		AF008650
pAS-MCHR1 ₂₉₉₋₃₅₃	pAS2.1	Slc-1 f1 (Nco) Slc-1 rs (BamHI)	NcoI / BamHI	AF008650
pAS-MCHR1 ₂₉₉₋₃₂₆	pAS2.1	Slc-1 f1 (Nco) Slc-1 r2s	NcoI / BamHI	AF008650
pAS-MCHR1 ₃₁₉₋₃₅₃	pAS2.1	Slc-1 F2 (Nco) Slc-1 rs (BamHI)	NcoI / BamHI	AF008650
pGEM-MCHR1	pGEMHE	pCDNA3 Fw Bam Slc1-2	BamHI / XbaI	AF008650
pGEM-MCHR1- Δ V326	pGEMHE	pCDNA3 Fw Bam pCDNA3 Rev Xba Stop	BamHI / XbaI	AF008650
His-DHFR-MCHR1	pQE40	SLC-1 f1n (kpnI) SLC pQE R1 (hind)	KpnI / HindIII	AF008650
GST-MIZIP	pGex4T2	L9-FAgex(BamHI) L9-RSgex(XhoI)	BamHI / XhoI	AJ298882
GST-V5	pGex4T2	L9-FAgex(BamHI) L9RmGex(XhoI)	BamHI / XhoI	AJ298882
GST-MYND	pGex4T2	L9-FMgex(BamHI) L9-RSgex(XhoI)	BamHI / XhoI	AJ298882
His-MIZIP	pQE30	L9-FAgex(BamHI) MIZIPrev Sall	BamHI / Sall	AJ298882
MIZIP-MycHis	pCDNA6	L9-FAgex(BamHI) L9-RSgex(XhoI)	BamHI / XhoI	NM_026021
EGFP-MIZIP	pEGFP-C1	UFA pEGFP (Eco) UR pAS (Bam)	EcoRI / BamHI	AJ298882
pAS2-MIZIP	pAS2.1	UFA pAS (Nco) UR pAS (Bam)	NcoI / BamHI	AJ298882
pGBKT7-MIZIP	pGBKT7	UFA pAS (Nco) UR pAS (Bam)	NcoI / BamHI	AJ298882
MIZIP-PDZ	pSTAG	UFA pEGFP (Eco) UR Bam Shank	EcoRI / BamHI	NM_026021
pGEM-MIZIP	pGEMHE	UFA pGEMHE (BamHI) UR pGEMHE (XbaI)	BamHI / XbaI	NM_026021
NCDN-MycHis	pCDNA6	NOR FA6 (Eco) NOR RS2 (Xba)	EcoRI / XbaI	NM_053543
GST-NCDN	pGex4T2	NC-GEX F-Bam-n NC-GEX Rxho	BamHI / XhoI	NM_001014841

NCDN-F3-R1	pACT2	Nor-F3 (1782) Nor-R1 (2664)	NcoI / BamHI	NM_001014841 NM_053543
NCDN-F1-R1	pACT2	Nor-F1 (1891) Nor-R1 (2664)	NcoI / BamHI	NM_001014841
NCDN-F2-R1	pACT2	Nor-F2 (2076) Nor-R1 (2664)	NcoI / BamHI	NM_053543
NCDN-F3-R2	pACT2	Nor-F3 (1782) Nor-R2 (2506)	NcoI / BamHI	NM_001014841 NM_053543
NCDN-F1-R2	pACT2	Nor-F1 (1891) Nor-R2 (2506)	NcoI / BamHI	NM_053543
NCDN-F2-R2	pACT2	Nor-F2 (2076) Nor-R2 (2506)	NcoI / BamHI	NM_053543
NCDN-F3-R3	pACT2	Nor-F3 (1782) Nor-R3 (2052)	NcoI / BamHI	NM_053543
pGEM-NCDN	pGEMHE	pCDNA6-NorFw-KpnI pCDNA6-NorRev-Hind	KpnI / HindIII	NM_053543
GST-TUBB	pGex4T2	TubFw1 TubRev1	EcoRI / XhoI	NM_006087
GST-TUBA	pGex4T2	TUBA3 Fw Bam TUBA3 Rev Xho	BamHI / XhoI	NM_006009
GST- GD	pGex4T2	TubFw1 TubRev2	EcoRI / XhoI	NM_006087
GST- CT	pGex6P1	TubFw2 TubRev1	EcoRI / XhoI	NM_006087
GST-SSTR5	pGex4T2	H5pGEXF h5pGEXR	EcoRI / XhoI	L04535
pAS-MCHR2 ₃₀₀₋₃₄₀	pAS2.1	MCHR2 F-pAS1 MCHR2 R-pAS1	NcoI / BamHI	AF399937
His-PDZK1	pQE30	PDZpGEXF PDZrev	BamHI / HindIII	NM_002614

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Primer

Es sind alle, für die Klonierungen verwendeten Primer mit ihrer Nukleotidsequenz und der darin enthaltenen Schnittstelle angegeben. Letztere ist in der jeweiligen Sequenz fett gedruckt.

Primer	Schnittstelle	Sequenz
Slc1-1	HindIII	GCG AAG CTT ATG GAT CTG CAA ACC TCG
Slc1-2	XbaI	GCG TCT AGA TCA GGT GCC TTT GCT TTC
pCDNA3 Fw Bam	BamHI	ATT AAG GAT CCA GCA AAT GGG TAA GCT TAT GG
pCDNA3 Rev Xba Stop	XbaI	ACT CTA GAA TCA CAC TGA CAA CAC CAA GCG T
MCHR1-Δ315 Rev Xba	XbaI	GCG TCT AGA TTC AAC AGA GCA CTA TGT ACA CAA AG
SLC-1 f1n (kpnI)	KpnI	CGG GTA CCA GCT TGG GCT ATG CTA ACA G
SLC pQE R1 (hind)	HindIII	CTA AGC TTT CAG GTG CCT TTG CTT TCT
Slc-1 f1 (Nco)	NcoI	CGC CAT GGA GCT TGG GCT ATG CTA ACA G
Slc-1 F2 (Nco)	NcoI	AGC CAT GGC GAA AAC GCT TGG TGT TGT
Slc-1 rs (BamHI)	BamHI	GCG GAT CCT CAG GTG CCT TTG CTT TC T
Slc-1 r2s	BamHI	TGG GAT CCA GGC TAC ACT GAC AAC ACC

UFA pGEMHE (BamHI)	BamHI	CGG GAT CCC GGC CAT GAC CGA CTT CA
UR pGEMHE (XbaI)	XbaI	GTC TAG ATC CCC TGC CCG TCA TCG CTC
UFA pEGFP (Eco)	EcoRI	CGA ATT CCC GGC CAT GAC CCG ACT TCA
UR Bam Shank	BamHI	CGT GGA TCC CGC TCT GGC TCA AGC TC
UR pAS (Bam)	BamHI	CCG GAT CCC GTC ATC GCT CTG GCT CAA
L9-FAgex(BamHI)	BamHI	CAG GAT CCG CCA TGA CCG ACT TCA AAT TG
L9-RSgex(XhoI)	XhoI	CCC TCG AGC GTC ATC GCT CTG GCT AAG C
L9RmGex(XhoI)	XhoI	TCC TCG AGC ACT ACA TCC CCG TTG GCA TTA
UFA pAS (Nco)	NcoI	AGC CAT GGC CAT GAC CGA CTT CAA ATT GGG
pCDNA6-NorFw-KpnI	KpnI	CGA CGG TAC CCG TTC GAC TTC ATC AAT G
pCDNA6-NorRev-Hind	HindIII	CGT AAG CTT TCT AAG GCT CTG ACA GGC AC
NC-GEX F-Bam	BamHI	GTG GAT CCT CAT CAA TGT CGT GTT GTG ACC T
NC-GEX Rxho	XhoI	GGC TCG AGC TCC TTC CAG CAC TGT GTC T
NOR FA6 (Eco)	EcoRI	TGA ATT CAT CGC TGC CCT GTC GTT CGA CTT C
NOR RS2 (Xba)	XbaI	CTC TAG AGG GCT CTG ACA GGC ACT GCT CC
Nor-F1 (1891)	NcoI	TGC CAT GGG TCC CCG GGA GAT TTT GAT
Nor-F2 (2076)	NcoI	AAC CAT GGA GCG CGA CGC CTG CTT CAC ATC
Nor-F3 (1782)	NcoI	TGC CAT GGC GCA GCA GGT GGC TAA CTT GG
Nor-R1 (2664)	BamHI	GAG GAT CCT CAG GGC TCT TGA CAG GCA CTG
Nor-R2 (2506)	BamHI	TCG GAT CCT TGA CAG AGT TGG GGC TTA CA
Nor-R3 (2052)	BamHI	CTG GAT CCG CCC GGG AGC GGT GAC CA
MCHR2 F-pAS1	NcoI	GCC ATG GGC AGC ATT AAC CCT TTT CTC TAC
MCHR2 R-pAS1	BamHI	AGG ATC CTG GTG ATC CAT GTA CTT TCC TAA
PDZpGEXF	BamHI	GGA TCC CAA GAA GGG CAA AAC TAT GGC
PDZrev	HindIII	AAG CTT ATC AGC CAG GGA GGA AAC AAT AG

Publikationen

Wissenschaftliche Artikel

F. Francke, D. Richter, D. Bächner (2004) Immunohistochemical distribution of MIZIP and its co-localization with the Melanin-concentrating hormone receptor 1 in the adult rodent brain. Brain Res Mol Brain Res.,
Manuskript angenommen (08. Juni 2005)

F. Francke, D. Richter, D. Bächner (2004) Neurochondrin interferes with Gi protein coupled signal transduction but not with internalization of Melanin-concentrating hormone receptor 1. Mol Endocrinol.,
Manuskript eingereicht

Posterpräsentationen

F. Francke, D. Bächner, H.J. Kreienkamp, D. Richter: MIZIP, a newly identified Melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCH-R1) interacting zinc-finger protein. 22nd Blankenese Conference, Hamburg, 17.-21. Mai 2002

Bächner, D., Francke F., Kreienkamp, H.-J., und Richter, D.: MIZIP, a highly conserved, vertebrate specific melanin-concentrating hormone receptor 1 interacting zinc-finger protein. 6th Joint Meeting Signal Transduction - Receptors, Mediators and Genes, Weimar, 7. – 9. 11. 2002 (Posterpreis)

Bächner, D., Francke F., Richter, D.: Interaction of the neurite outgrowth related factor Neurochondrin with the Melanin-concentrating hormone receptor 1. 23th Blankenese Conference, "Learning at from the synapse", Hamburg, 08. - 12. Mai 2003

F. Francke, D. Bächner:
Functional characterization of MIZIP, a highly conserved, vertebrate specific melanin-concentrating hormone receptor 1 interacting zinc-finger protein.
ELSO 2003, Dresden, 20.-24. September 2003

Bächner, D., Francke F.: Interaction of the neurite outgrowth related factor Neurochondrin with the Melanin-concentrating hormone receptor 1. ELSO 2003, Dresden, 20. – 24. 09.2003

F. Francke, D. Bächner:
Functional characterization of MIZIP, a highly conserved, vertebrate specific melanin-concentrating hormone receptor 1 interacting zinc-finger protein.
STS 2003, Weimar, 06.-08. November 2003

F. Francke, V. Schröder, D. Richter, D. Bächner: Functional characterization of MIZIP: subcellular localization and identification of interacting proteins.
25th Blankenese Conference, Hamburg, 16. - 20. Mai 2004