

**Aus dem Institut für Entwicklungsneurobiologie
des Zentrums für Molekulare Neurobiologie
der Universität Hamburg (ZMNH)
– Direktorin Prof. Dr. Chica Schaller –**

**Klonierung und Charakterisierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren
mGpr39, mGpr15 und hVPAC₂**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von Anna Pantlen
aus Hamburg**

Hamburg 2006

INHALTSVERZEICHNIS

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	7
2	Einleitung	8
2.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren	8
2.2	G-Protein gekoppelte Signalwege bei der oxidativen Glutamatoxizität	9
3	Material und Methoden	14
3.1	Material	14
3.1.1	Software	14
3.1.2	Puffer und Lösungen	14
3.1.2.1	50x TAE-Puffer	14
3.1.2.2	Probenpuffer.....	14
3.1.2.3	Bakterienmedium.....	14
3.1.2.4	Größenmarker	15
3.2	Methoden.....	16
3.2.1	Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen	16
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	16
3.2.3	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gel.....	16
3.2.4	Ligation von DNS-Fragmenten.....	16
3.2.5	Transformation.....	17
3.2.6	DNS-Minipräparation.....	17
3.2.7	Sequenzierung	18
3.2.8	Polymerase-Kettenreaktion	18
3.2.9	Verwendete Templates: HT22CR-cDNS und humane Plazenta-Marathon-cDNS	18
3.2.9.1	RNS-Präparation.....	19
3.2.9.2	cDNS-Synthese	20
3.2.10	Klonierung.....	22
3.2.11	Konstruktion des Expressionsvektors pDNR-SPHA	22
3.2.12	Glycerolstock	22
3.3	Klonierung der Rezeptoren	23
3.3.1	mGpr39	23
3.3.2	mGpr15	24
3.3.3	hVPAC ₂	24
3.4	Transfektion	25
3.4.1	Klonierung des Kontruktes pDNR-SPHA-Gpr39-EGFP und Vorbereitung der DNS	25

3.4.2	Elektroporation.....	26
3.5	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	27
3.5.1	Primerdesign	27
3.5.2	Kontrolle der Oligodesoxynukleotide	27
3.5.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	28
3.5.4	Auswertung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion.....	30
3.6	Phylogenetische Analyse.....	31
3.6.1	Stammbäume für Gpr39 und Gpr15.....	31
4	Ergebnisse	33
4.1	mGpr39 und die untranslatierte Region	33
4.1.1	Suchstrategie zur Identifizierung des mGPR39 und der untranslatierten Region	33
4.1.2	Identifizierung des mGpr39	35
4.1.3	Identifizierung der 5´- und 3´-UTR.....	36
4.1.4	Sequenz des mGpr39.....	37
4.1.5	Struktur des mGpr39	39
4.1.6	Chromosomale Lokalisation des mGpr39.....	39
4.2	Identifizierung des mGpr15	40
4.2.1	Sequenz des mGpr15.....	42
4.2.2	Struktur des mGpr15	42
4.2.3	Chromosomale Lokalisation des mGpr15.....	43
4.3	Identifizierung des hVPAC ₂	44
4.4	Phylogenetische Ergebnisse	45
4.4.1	Stammbäume des Gpr39 und Gpr15	45
4.5	Gewebeexpression des Gpr15 und Gpr39 in der Maus.....	47
4.5.1	Primerspezifität	47
4.5.2	Gewebeexpression des Gpr15 und Gpr39 in der Maus.....	47
4.6	Oberflächenlokalisierung des mGpr39.....	52
4.6.1	Plasmid-Konstruktion pDNR-SPHA-Gpr39-EGFP	52
4.6.2	Lokalisation des mGpr39 an der Zellmembran.....	53
5	Diskussion	55
5.1	mGpr39.....	55
5.1.1	Struktur des mGpr39	55
5.1.2	Antisense-Gen	56
5.1.3	Oberflächenlokalisierung des mGpr39	57
5.1.4	Gewebeexpression des mGpr39.....	58
5.1.5	Phylogenetik des Gpr39	58
5.1.6	Signalweg.....	60

5.1.7	Konklusion	61
5.2	mGpr15.....	61
5.2.1	Phylogenetik und Struktur des Gpr15	61
5.2.2	Gewebeexpression des Gpr15	63
5.3	hVPAC ₂ -Rezeptor	64
6	Zusammenfassung.....	66
7	Literaturverzeichnis.....	67
8	Anhang	74
8.1	Konstrukte	74
8.2	Danksagung	77
8.3	Lebenslauf.....	78
8.4	Erklärung.....	79

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BamH	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>
Bgl	<i>Bacillus globigii</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>Complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary Cells</i>
Ct-Wert	<i>Cycle Threshold</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium</i>
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat; umfasst dATP, dCTP, dGTP und dTTP
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
Edg	<i>Endothelial Cell Differentiation Gene</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>Fluorescences Activated Cell Sorting</i>
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
gi	<i>GenBank Identifier</i>
GPCR	<i>G-Protein-Coupled Receptor</i>
HA	Hämagglutinin
LP	<i>Lower Primer</i>

MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
mGpr15	muriner G-Protein gekoppelter Rezeptor 15
mGpr39	muriner G-Protein gekoppelter Rezeptor 39
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
ROS	Reactive Oxygen Species
SP	Signalpeptid
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UP	<i>Upper Primer</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VIP	<i>Vasoactive Intestinal Polypeptide</i>
Xba	<i>Xanthomonas badrii</i>
Xho	<i>Xanthomonas holcicola</i>

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

In einer Arbeitsgruppe des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg (www.zmnh.uni-hamburg.de/methner) wurde an einem Modell der oxidativen Glutamattoxizität der murinen hippocampalen Zelllinie HT22 beobachtet, dass die Aktivierung G-Protein gekoppelter Signalwege vor Zelltod schützen kann (Lewerenz et al., 2003). Versuche mit chronisch glutamatresistenten Zellen zeigten eine unterschiedliche Regulation der mRNA zahlreicher Kandidatenrezeptoren aus der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, deren pharmakologische Stimulierung oder Antagonisierung zu einer zur Regulation gleichsinnigen Veränderung des Zelltodes führte (Sahin et al., Free Radical Research, im Druck). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass gegen oxidativen Stress resistente Zellen bestimmte protektive Rezeptoren hochregulieren, um so das Überleben der Zellen zu fördern. Mittels quantitativer PCR wurde die mRNA-Menge aller derzeit bekannten Waisen-Rezeptoren (Rezeptoren ohne bekannte Liganden) untersucht. Dabei fanden sich VPAC₂, Gpr39 und Gpr15 reproduzierbar hochreguliert. Bei den beiden letztgenannten Proteinen sind die Mausorthologe bisher nicht bekannt und nicht charakterisiert.

Ausgehend von der Hypothese, dass die in den chronisch glutamatresistenten hippocampalen Zellen der Maus hochregulierten Rezeptoren die Zelle vor oxidativem Stress schützen und somit therapeutisches Ziel in der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen oder zerebraler Ischämie werden könnten, war es das Ziel meiner Arbeit, die Rezeptoren in ihrer vollständigen Länge zu klonieren und die murinen Waisen-Rezeptoren Gpr15 und Gpr39 durch Gewebeexpression mithilfe einer quantitativen PCR, phylogenetischer Bäume sowie mGpr39 zusätzlich durch Zelllokalisierung mittels Transfektion zu charakterisieren.

2 Einleitung

2.1 *G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)*

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen eine der größten Familien membranständiger Rezeptoren dar (Bockaert und Pin, 1999). Sie können eine Reihe von extrazellulären Signalen vermitteln. So bewirken extrazelluläre Liganden wie zum Beispiel Kalzium, Licht oder Peptide (Bockaert und Pin, 1999) eine Konformationsänderung des Rezeptors, und dies führt zu einer Regulierung eines membrangebundenen Zielproteins, das ein Enzym (Adenylatzyklase, Phospholipase C und A2, cGMP-Phosphodiesterase) oder ein Ionenkanal sein kann (Metaye et al., 2005). Die Interaktion zwischen Rezeptor und Zielprotein wird durch ein drittes Protein, das GTP-bindende Protein vermittelt (Howard et al., 2001). Diese bestehen aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit. Anhand der α -Untereinheit werden sie in die vier Proteinfamilien G_s , G_i , $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$ eingeteilt (Bartfai et al., 2004). Die Aktivierung oder Hemmung der Zielproteine durch GTP-bindende Proteine kann zu einer Änderung der Konzentration eines intrazellulären Mediators oder der Ionenkonzentration führen und so weitere Modifikationen des zellulären Metabolismus bewirken (Howard et al., 2001). Bedeutende Zielproteine sind beispielsweise die Adenylatzyklase, die durch G_s aktiviert und G_i gehemmt, sowie die Phospholipase C, die durch $G_{q/11}$ stimuliert wird (Bartfai et al., 2004).

G-Protein gekoppelte Rezeptoren besitzen sieben transmembranäre Helices, die durch drei intra- und extrazelluläre Loops verbunden sind (Baldwin, 1993), sowie einen extrazellulären N- und einen intrazellulären C-Terminus und verschiedene konservierte strukturelle Motive (Howard et al., 2001). Dazu gehören u. a. N-Glykosylationen im Bereich der N-terminalen extrazellulären Region und Phosphorylationen im Bereich des intrazellulären C-Terminus (Howard et al., 2001).

GPCRs sind das Ziel vieler verschiedener Liganden. Diese Rezeptoren können grob unterteilt werden in chemosensorische Rezeptoren, die Geruchs- und Geschmacksliganden binden, und Rezeptoren, die durch endogene Liganden (Vassilatis et al., 2003), wie biogene Amine, Neuropeptide und Nukleotide, aktiviert werden (Bockaert und Pin, 1999). Diese GPCRs sind Modulatoren vieler organischer Funktionen und ein wichtiger Angriffspunkt für Medikamente. Etwa 50% der verschreibungspflichtigen Medikamente wirken über GPCRs (Howard et al., 2001).

Von den ca. 800 bislang beschriebenen GPCR-Sequenzen (Fredriksson et al., 2003) sind im menschlichen Genom 367 und in der Maus 392 GPCRs bekannt, die nicht-sensorische Liganden binden (Vassilatis et al., 2003). Von diesen Rezeptoren sind ungefähr 150 sogenannte Waisen-Rezeptoren, das heißt Rezeptoren, deren Liganden bis heute unbekannt sind (Wise et al., 2004).

Anfang der 1990er Jahre erfolgte eine systematische Klassifizierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren anhand funktioneller Merkmale. Die Rezeptoren wurden in sechs Gruppen (A-F) eingeteilt (Kolakowski, 1994). Die Gruppe A repräsentiert die mit Rhodopsin verwandten Rezeptoren und ist die größte. Gruppe B beinhaltet die Glykoproteinrezeptoren; metabotrope Glutamatrezeptoren werden der Gruppe C zugeordnet. Gruppe D und E sind nicht bei Wirbeltieren zu finden, und zur Gruppe F gehören bakterielle Rhodopsine, die zu keiner Bindung von G-Proteinen fähig sind.

2.2 G-Protein gekoppelte Signalwege bei der oxidativen Glutamatoxizität

Die Aminosäure Glutamat ist ein wichtiger exzitatorischer Neurotransmitter im Zentralnervensystem (Fonnum, 1984). Die Freisetzung von Glutamat spielt in der Pathogenese der ischämischen Nervenzellschädigung eine große Rolle (Hossmann, 1994). Eine exzessive Glutamatausschüttung, wie sie bei unterschiedlichen neurologischen

Erkrankungen – etwa bei Schlaganfall oder neurodegenerativen Erkrankungen – stattfinden kann, führt durch massiven Kalziumeinstrom in die Zelle zum Zelltod (Choi et al., 1987). Neben diesem schnell ablaufenden Prozess führt eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration durch oxidativen Stress zu einem langsamer verlaufenden Zelltod. Diese oxidative Zellschädigung durch Glutamat wird auch oxidative Glutamatoxizität genannt. Erhöhtes extrazelluläres Glutamat vermindert hierbei die Menge des intrazellulären Cystins durch eine Blockierung des durch den Gradienten angetriebenen Glutamat/Cystin-Antiporters Xc⁻ (Tan et al., 2001; Lewerenz et al., 2003). Cystin wird in der Zelle für die Synthese von Glutathion gebraucht (Schulz et al., 2000). Glutathion ist ein wichtiges Antioxidans im Gehirn, da es für die Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) notwendig ist (Schulz et al., 2000). Durch die verminderte intrazelluläre Cystinmenge und somit reduzierte Synthese von Glutathion kommt es zur Aktivierung der 12-Lipoxygenase (Li et al., 1997b). Dies führt zur Akkumulation von intrazellulären Peroxiden (Tan et al., 1998) sowie zu einer Aktivierung von cGMP-abhängigen Kalzium-Kanälen (Li et al., 1997a), die durch den Kalziumeinstrom eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und letztendlich den Zelltod bewirkt (Tan et al., 1998).

In meiner Arbeitsgruppe wurde oxidative Glutamatoxizität in der hippocampalen Zelllinie HT22 der Maus als Modell für Zelltod durch oxidativen Stress verwendet. Es wurde hierbei untersucht, welche Mechanismen die Empfindlichkeit gegenüber Glutamatoxizität verändern. Zu diesem Zweck wurden verschiedene pharmakologische Substanzen eingesetzt, die mit G-Proteinen interagieren, und daraufhin beobachtet, welche Effekte diese Substanzen unter den Bedingungen von Glutamatoxizität auf das Zellüberleben, die Morphologie und auf Zelltod bewirkende intrazelluläre Ereignisse hatten (Lewerenz et al., 2003).

Von den verwendeten Substanzen wirkten Choleratoxin und das Phorbol-12-Myristat-13-Acetat am effektivsten. Sie verhindern den Zelltod über unabhängige Wege (Lewerenz et al., 2003): Im Fall von Choleratoxin, das G_s aktiviert, reduziert sich die

Wahrscheinlichkeit des Zelltodes durch einen verminderten Kalziumeinstrom in die Zelle (Lewerenz et al., 2003). Dieser kommt zum einen durch eine durch Cholera-toxin induzierte erhöhte Expression der Untereinheit xCT des Glutamat/Cystin-Antiporters X^{c-} zustande, die wiederum zu einer vermehrten Cystinaufnahme in die Zelle und somit zu einer Erhöhung des intrazellulären Glutathions führt (Lewerenz et al., 2003). Zum anderen bewirkt Cholera-toxin eine Hochregulation des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Lewerenz et al., 2003). Die Protektion der Zelle durch das Phorbol-ester PMA wurde schon in anderen Forschungsarbeiten beschrieben und simuliert eine Aktivierung der Proteinkinase C durch das GTP-bindende Protein G_q (Maher, 2001; Lewerenz et al., 2003).

Weiterhin wurde in der Arbeitsgruppe beobachtet, dass Medium, das durch dicht wachsende Zellen konditioniert wurde, Zellen schützt. Es wurde angenommen, dass die Zellen neuroprotektive Faktoren sezernieren, die wiederum an G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden. Versuche mit chronisch glutamatresistenten hippocampalen Zellen zeigten eine unterschiedliche Regulation der mRNA zahlreicher Kandidatenrezeptoren. Pharmakologische Stimulierung oder Antagonisierung aller regulierten Rezeptoren hatte eine zur Regulation gleichsinnige Veränderung des Zelltodes zur Folge (Sahin et al., Free Radical Research, im Druck). Dies führte zu der Hypothese, dass resistente Zellen protektive Rezeptoren und wahrscheinlich auch deren Liganden in einem autokrinen Mechanismus hochregulieren und so das Überleben der Zellen fördern. Mittels quantitativer PCR wurde die Menge der mRNA aller derzeit bekannten Waisen-Rezeptoren untersucht. Es fanden sich folgende hochregulierte Rezeptoren: Gpr15 und Gpr39 sowie $VPAC_2$, der nicht zu den Waisen-Rezeptoren gehört, aber aufgrund der bekanntermaßen neuroprotektiven Wirkung seines Liganden VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) als Positivkontrolle dienen sollte (Gressens, 1999; Offen et al., 2000; Delgado und Ganea, 2003). Bei Gpr15 sowie Gpr39 handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren, deren Liganden unbekannt waren. Die vollständigen Sequenzen und Gewebeverteilungen beider Rezeptoren in der Maus waren nicht bekannt.

Durch phylogenetische Stammbäume konnten Gpr39 und Gpr15 nach der oben beschriebenen Klassifizierung (siehe Einleitung, Kap. 2.1) je einer Untergruppe der Gruppe A zugeordnet werden (siehe Abbildungen 2.1 und 2.2 nach Joost und Methner, 2002).

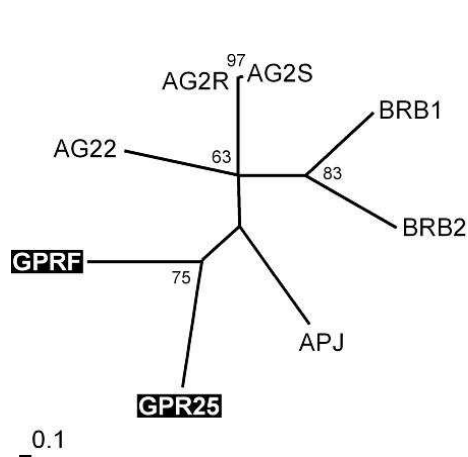


Abbildung 2.1: Gpr15 (GPRF)

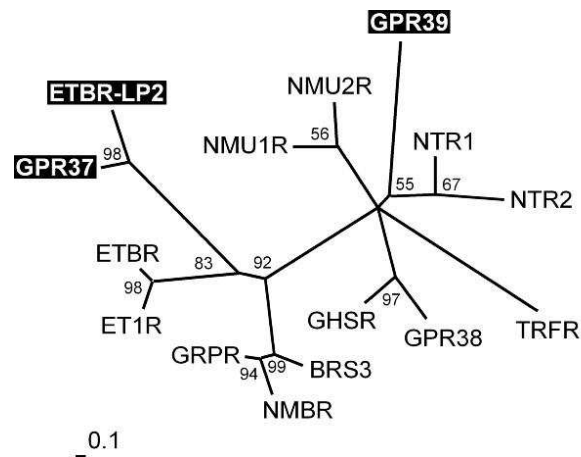


Abbildung 2.2: Gpr39

Zu Abbildung 2.1:

AG2R	Type-1A Angiotensin II Receptor	P30556
AG2S	Type-1B Angiotensin II Receptor	P50052
BRB1	B1 Bradykinin Receptor	P46663
BRB2	B2 Bradykinin Receptor	P30411
APJ	Apelin Receptor	P35414
AG22	Type-2 Angiotensin II Receptor	P50052
GPR25	G Protein-Coupled Receptor 25	P49685
GPRF	G Protein-Coupled Receptor 15	P49685

Zu Abbildung 2.2:

NMU2R	Neuromedin U Receptor 2	NM_020167
NMU1R	Neuromedin U Receptor 1	AF272362
NTR1	Neurotensin Receptor Type 1	P30989
NTR2	Neurotensin Receptor Type 2	O95665
TRFR	Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor	P34981
GHSR	Growth Hormone Secretagogue Receptor Type 1	Q92847
BRS3	Bombesin Receptor Subtype-3	P32247
NMBR	Neuromedin-B Receptor	P28336
GRPR	Gastrin-Releasing Peptide Receptor	P30550
ETBR	Endothelin B Receptor	P24530
ET1R	Endothelin-1 Receptor	P25101
ETBR-LP2	Endothelin B Receptor-Like Protein-2	Y16280
GPR37	G Protein-Coupled Receptor 37	NM_005302
GPR39	G Protein-Coupled Receptor Gpr39	O43194

Ziel dieser Arbeit war es, die in resistenten Zellen hochregulierten Rezeptoren Gpr39, Gpr15 und VPAC₂, mit wahrscheinlich neuroprotektiver Wirkung, zu klonieren und zu sequenzieren. Das Expressionsmuster der Rezeptoren Gpr39 und Gpr15 sollte dann mittels quantitativer PCR in verschiedenen Geweben untersucht und die evolutionäre Beziehung unterschiedlicher Spezies durch phylogenetische Bäume dargestellt werden. Alle Rezeptoren sollten mit einem N-terminalen Epitop markiert und Gpr39 mit dem grün fluoreszierenden Protein EGFP am C-

Terminus fusioniert werden und so die Lokalisation des Rezeptors durch transiente Transfektion und konfokale Mikroskopie überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Software

SeqManII™ (DnaStar)

GrapdPadPrism4™

EditSeq™ (DnaStar)

Oligo Primer Analysis Software (MIB)

Excel (Microsoft)

Photoshop 6.0 (Adobe)

Freehand 10 (Macromedia)

3.1.2 Puffer und Lösungen

3.1.2.1 50x TAE-Puffer

1 M Tris-Base

5,71% (v/v) Acetat

50 mM EDTA (Life Technologies)

3.1.2.2 Probenpuffer (Loading Buffer)

5fach Probenpuffer:

40% Sucrose (20gr.)

0,25% Bromphenolblau (0,125 g)

in 50 ml H₂O

3.1.2.3 Bakterienmedium

LB

10 g/l Tryptone

5 g Hefeextrakt (Becton, Dickinson und Co.)

in 200 mM NaCl

pH 7,0

Agarplatten

LB Broth Base (Lennox L Broth Base; Life Technologies)

Bacto™ Agar zur Verfestigung (Becton, Dickinson und Co.)

20 gm per Liter destilliertes Wasser.

15 Minuten bei 121°C autoklaviert

TELT

50 mM Tris pH8

62,5 mM EDTA

2,5 M Lithium Chlorid

0,4% Triton x100

PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCL

7,4 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

20xSSC

3 M NaCl

0,3 M Na₃-Citrat x 2H₂O

3.1.2.4 Größenmarker

1 kb Leiter (Life Technologies)

100 bp Leiter (Life Technologies)

3.2 Methoden

3.2.1 Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Für den Verdau wurden 2 µl DNS (~300 ng/µl), jeweils 0,3 µl Restriktionsenzyme (10 U/µl; Roche), 2,5 µl 10-fach SuRE/Cut Buffer H (500 mM Tris, 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 7,5; Roche) oder B (100 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8.0; Roche) in 19,9 µl H₂O angesetzt und bei eine Stunde lang bei 37°C inkubiert.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1% Agarose-Gels wurden 3 g Seakem LE Agarose (FMC, Rockland, Maine, USA) in 300 ml 1x TAE-Puffer und 1µg/ml Ethidiumbromid-Stammlösung (Boehringer) in der Mikrowelle aufgekocht und in die Gelkammer gegossen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 Volt über 60 Minuten (Bio Rad; Power Pac 200). Pro Bahn wurden 6 µl DNS mit Probenpuffer eingesetzt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet (KAISER RA1), abgelichtet (Cybertech CS1) und ausgedruckt (FUJI Film Thermal Imaging System FTI-500).

3.2.3 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gel

Die DNS-Banden wurden auf einer UV-Kontaktlampe (CHROMA 43) bei 302 nm mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion erfolgte mit dem NucleoSpinTM Extract (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

3.2.4 Ligation von DNS-Fragmenten

Die Ligation der Fragmente mit den Vektoren wurde mit T4-DNS-Ligase (Clontech, Mountain View, USA) und dem mitgelieferten Ligationsspuffer durchgeführt. 10 µl Gesamtansatz bestehend aus 2 µl PCR-Produkt, 1µl Vektor, 10 U/µl T4-DNS-Ligase, 5 µl 2-

fach Ligationspuffer vom Hersteller (Endkonzentration 30 mM Tris-HCl [pH 7,8], 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP und 5% Polyethylenglykol) und 1 µl H₂O wurden bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert.

3.2.5 Transformation

Je 5 µl Ligationsansatz wurden mit 100 µl kompetenten E.coli-Zellen DH5α (3x10⁶ Kolonien/µl transformierte DNS) gemischt und 40 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte bei 42°C über 90 Sekunden (MIXER 5432; Eppendorf). Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen für 10 Minuten auf Eis gekühlt und dann mit 100 µg/ml Ampicillin (Life Technologies) gemischt auf Agaroseplatten ausgestrichen und über Nacht im Inkubator (Heraeus) bei 37°C bebrütet.

3.2.6 DNS-Minipräparation

Am Tag nach der Transformation wurden einige der Bakterienkolonien mit Pipettenspitzen von den Agarplatten gepickt und in je 1,5 ml LB mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht im Rotationsschüttler (HT) bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde je 1 ml des Ansatzes in Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5 ml) gefüllt, 5 Minuten bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert (Biofuge 13; Heraeus Sepatech), die Überstände entfernt und das Pellet in 100 µl TELT und ca.1 mg Lysozym (25.000 U/mg; BIOMOL) resuspendiert. Anschließend wurden die Ansätze 90 Sekunden lang bei 95°C auf dem Heizblock erhitzt, 10 Minuten auf Eis gestellt und erneut 10 Minuten mit 13.000 Umdrehungen zentrifugiert. Das Pellet wurde entfernt und eine Ethanol-fällung durchgeführt. Zunächst wurden 200 µl 100%iges Ethanol hinzugegeben, 5 Minuten bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Dann wurden 200 µl 70%iges Ethanol hinzugegeben, 5 Minuten bei 13.000 zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, danach bei Raumtemperatur gut getrocknet und schließlich in 30 µl Reinstwasser resuspendiert.

3.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg nach der Kettenabbruchmethode mit einem Sequenzierer von Applied Biosystems automatisch durchgeführt. Die Sequenzierung der klonierten Rezeptoren wurde mit Vektorprimern durchgeführt.

3.2.8 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Polymerase-Kettenreaktionen wurden Platinum-Taq-DNA-Polymerase (Life Technologies, Rockville, USA), Easy-A High-Fidelity PCR Cloning Enzyme sowie Pfu-DNA-Polymerase (beide von Stratagene, La Jolla, USA) eingesetzt. Als Template-DNS wurden HT22CR-cDNS und humane Plazenta Marathon-cDNS (Clontech, Mountain View, USA) benutzt. Verwendete selbstkonstruierte Primer wurden mit Hilfe von Oligo Primer Analysis Software (MBI, Cascade, USA) erstellt und von MWG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Alle Reaktionen wurden mit einem TGradientTM PCR Cycler (Biometra) durchgeführt.

3.2.9 Verwendete Templates: HT22CR-cDNS und humane Plazenta-Marathon-cDNS

Die HT22-Zellen wurden von Prof. Wulf Paschen, Max-Planck-Institut für Neurologische Forschung, Köln zur Verfügung gestellt. Diese Zellen sind ein Subklon der murinen hippocampalen Zelllinie HT4. Die Selektion der glutamatresistenten HT22-Zellen wurde in Vorversuchen von Dr. Jan Lewerenz durchgeführt. Hierfür wurden 6×10^5 Zellen in 92 mm Zellkulturschalen (Nunc) ausgesät und nach 24 Stunden Glutamat (10 mM) hinzugegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die überlebenden Zellen wurden 5 Minuten zentrifugiert und in frischem Medium ausgesät. Nachdem sich die Zellzahl erholt hatte, wurde erneut Glutamat (20 mM) hinzugegeben. Ein weiterer Zyklus wurde zu gleichen Konditionen, aber einer geringeren Zelldichte durchgeführt (3×10^5). Im

letzten Zyklus wurden die Zellen über 48 Stunden 20 mM Glutamat ausgesetzt und anschließend in 10 mM Glutamat kultiviert. Diese Zellen wurden chronisch resistente HT22-Zellen (HT22CR) genannt.

3.2.9.1 RNS-Präparation (in Vorversuchen von Dr. Jan Lewerenz durchgeführt)

Zellkultivierung der HT22CR-Zellen für die RNS-Präparation

5×10^5 HT22CR-Zellen wurden in 92 mm Zellkulturschalen ausgesät und in Anwesenheit von 10 mM Glutamat kultiviert. Nach 24 Stunden wurden sie geerntet, indem sie mit PBS gewaschen und anschließend in PBS mit 2 mM EDTA gelöst wurden. Nach der Zentrifugation mit 200 x g über 4 Minuten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in flüssigem Nitrogen schockgefroren und bis zur RNS-Präparation bei -70°C aufbewahrt.

Isolation der Gesamt-RNS

Für die RNS-Präparation wurde TRIzolTM (Life Technologies) eingesetzt. Die zuvor tiefgefrorenen, etwa 200 mg schweren, Zellniederschläge, wurden aufgetaut, in 2 ml TRIzol homogenisiert und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 0,4 ml Chloroform wurden hinzugegeben, die Röhren 15 Sekunden geschüttelt und anschließend erneut bei Raumtemperatur für 3 Minuten inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12 000 x g und 4°C für 15 Minuten. Die wässrige, obere Phase wurde vorsichtig aspiriert und in ein frisches Röhren übertragen. Die Gesamt-RNS wurde mit 1 ml Isopropyl-Alkohol ausgefällt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation bei 12 000 x g und 4°C für 10 Minuten. Der Überstand wurde entfernt und der RNS-Niederschlag mit 75%igem Ethanol durch kurzes Schütteln gewaschen. Anschließend wurde bei 7500 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Niederschlag bei 37°C getrocknet und in 5 - 10 μl RNase freiem H_2O gelöst.

Anreicherung der Poly(A+)-mRNS

Das PolyAtract™ mRNA Isolation System (Promega) wurde eingesetzt, um die Poly(A+)-mRNS anzureichern. Etwa 0,5 mg Gesamt-RNS wurden mit RNase freiem Wasser zu einem Endvolumen von 2,43 ml verdünnt und bei 65°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 10 µl biotinylierte Oligo(dT)-Primer (50 pmol/µl) mit einer Endkonzentration von 0,2 µmol sowie 60 µl 20xSSC hinzugegeben und bei Raumtemperatur abgekühlt. Die biotinbindenden SA-PMPs (Streptavidin-gekoppelte paramagnetische Partikel) wurden drei mal mit 1,5 ml 0,5xSSC gewaschen, mithilfe des Magneten gesammelt und in 0,5 ml 0,5xSSC resuspendiert. Die gewaschenen SA-PMPs wurden mit der Hybridisierungs-Reaktion gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Poly(A+)-mRNS und die SA-PMPs wurden dann durch den Magneten gesammelt und der Überstand vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die Partikel vier mal mit 1,5 ml 0,1xSSC gewaschen und die gebundene RNS in 250 µl H₂O eluiert.

3.2.9.2 cDNS-Synthese (in Vorversuchen von Dr. Jan Lewerenz hergestellt)

Poly(A+)-RNS mit einer Endkonzentration von 0,2 µg/µl wurden in Anwesenheit von 2 µM oligo(dT)-Primer auf 70°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt. Die Erststrang-Reaktion hatte eine Endkonzentration von 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT (DL-Dithiothreitol), 500 µM je dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 0,4 µM oligo(dT)-Primer, 0,04 µg/µl Poly(A+)-mRNS und 10 000 U/ml M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus). Unmittelbar nach Hinzufügen der M-MLV reverse Transkriptase wurden 10 µl dieses Ansatzes in ein frisches Behältnis, das 1 µCi [α -³²P]dATP enthielt, gefüllt. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Erststrang-Reaktion wurde durch Hinzugabe von Na₂EDTA (pH 7,5; Endkonzentration 1,75 mM) gestoppt. Die verbleibenden 40 µl wurden für die Zweitstrang-Synthese verwendet. Der Erststrang-Reaktionsansatz wurde 8fach verdünnt (Endvolumen 320 µl). Die Endkonzentration der Zweitstrang-Reaktion war 25

mM Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM MgCl_2 , je 250 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 0,15 mM NAD, 5 mM DTT, 250 U/ml *E. coli*-DNA-Polymerase I, 30 U/ml *E. coli* DNA-Ligase und 8,5 U/ml *E. coli*-RNAse H. Der Reaktionsansatz wurde leicht geschüttelt und 10 μl wurden in ein zusätzliches Behältnis mit 1 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ gefüllt. Der Reaktionsansatz wurde über 2 Stunden bei 16°C inkubiert und auch diese Reaktion durch Zugabe von Na_2EDTA (pH 7,5; Endkonzentration 1,75 mM) gestoppt.

Nicht eingebaute, radioaktiv markierte Nukleotide wurden durch Größenausschlusschromatografie entfernt (G-50 Sephadex Quick Spin Columns; Roche). Nach Zentrifugation bei 1100 x g über 2 Minuten wurden die Proben auf die Säulen geladen und bei 1100 x g für 4 Minuten eluiert. Die aufgenommene Radioaktivität wurde durch einen Flüssigszintillationszähler LS 6000 IC (Beckmann) gemessen. 5000 cpm (counts per minute) der radioaktiv markierten Erst- und Zweitstrang-Reaktionen wurden mit Probenpuffer zu einer Endkonzentration von 25 mM NaOH, 12,5% Glycerol und 0,15 mg/ml Bromphenolblau gemischt und auf ein 1,4% Seakem™ LE Agarose mit einer 1 kb Leiter (Life Technologies) aufgetragen.

Anschließend wurden die Reaktionsprodukte aus dem Gel aufgereinigt. Hierfür wurden Phenol (pH 7,9; Sigma) mit Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) zu gleichen Teilen gemischt. H_2O wurde zu einem Endvolumen von 300 μl hinzugefügt. Die Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol(25:24:1)-Mischung wurde mit der cDNS gemischt und bei 13 000 x g für 5 Minuten in Phase-Lock-Gel™-Light(PLG)-1,5ml-Eppendorf-Tube zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein frisches PLG-Tube gefüllt, zu gleichen Teilen mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gemischt und erneut zentrifugiert. Die extrahierte cDNS in der oberen Phase wurde durch die Hinzugabe von 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und das doppelte Volumen an Ethanol und anschließend für 15 Minuten bei 16 000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 70%igem Ethanol

gewaschen, erneut bei 16 000 x g für 5 Minuten zentrifugiert, luftgetrocknet und in 53 µl H₂O resuspendiert.

Die cDNS der HT22CR-Zellen wurde für die PCR des Gpr39 und Gpr15 benutzt. Für den VPAC₂-Rezeptor wurde humane Plazenta-Marathon-cDNS (Clontech) eingesetzt.

3.2.10 Klonierung

Die mit der Platinum-Taq-DNA-Polymerase amplifizierten PCR-Produkte wurden zunächst in den pGEM-T-Easy-Vektor (Promega, Madison, USA) kloniert. Dieser Vektor ist dadurch charakterisiert, dass er einen 3'-T-Überhang besitzt. Da die Taq-Polymerase ein 3'-T-Überhang produzierte, konnten die amplifizierten Fragmente ohne weiteren Enzymverdau direkt in den Vektor kloniert werden.

3.2.11 Konstruktion des Expressionsvektors pDNR-SPHA

In einem weiteren Schritt wurden die amplifizierten Rezeptoren in einen Donorvektor mit synthetischem Signalpeptid (SP) sowie einem HA-Tag (MWG) kloniert. Das Fragment SPHA wurde zunächst über EcoRI- und BamHI-Schnittstellen in pDNR1 kloniert (CreatorTM DNA Cloning Kit; Clontech) und in einem zweiten Schritt über SalI/EcoRI (pDNR1) und EcoRI/XhoI (pDNR1-SPHA) *in frame* kloniert (Konstrukt siehe Abbildung 8.1.1 im Anhang).

3.2.12 Glyzerolstock

200 µl 87%iges Glycerin (MERCK) wurden mit 800 µl Bakteriensuspension gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.3 Klonierung der Rezeptoren

3.3.1 mGpr39

Zur Amplifizierung des mGpr39 (1365 Basenpaare) wurde der Vorwärtsprimer 5'-CGAATTCATGGCTTCATCCAGTG-3' mit einer EcoRI- und der Rückwärtsprimer 5'-TTCTAGATTCCTGCTCCTGTAAACT-3' mit einer XbaI-Schnittstelle eingesetzt. Die 25- μ l-Ansätze der PCR-Reaktion hatten folgende Endkonzentrationen 10 U/ μ l Pfu-DNA-Polymerase, 0,25 mM je dNTP, 50 mM Tris-Cl (pH 8,2), 0,1 mM EDTA, 1mM DTT, 1 μ l Template (~300 ng/ μ l cDNS chronisch glutamatresistenter HT22-Zellen) und 0,4 mM je Primer. PCR-Konditionen waren 95°C für 2 Minuten, dann je 40 Zyklen mit folgendem Temperaturschema: Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, eine Anlagerungtemperatur von 52°C für 1 Minute, ein Verlängerungsschritt von 72°C für 90 Sekunden und eine finale Elongation bei 72°C für 10 Minuten. Das PCR-Produkt wurde dann über ein Agarose-Gel aufgetrennt (siehe oben) und aufgereinigt. Anschließend wurde eine Re-PCR für 24 Zyklen mit 2 μ l des PCR-Produktes als Template unter sonst gleichen Konditionen durchgeführt. PCR-Produkt und das Re-PCR-Produkt wurden mit EcoRI und XbaI verdaut und in den pDNR-SPHA kloniert (Konstrukt siehe Abbildung 8.1.2 im Anhang). Um den gesamten Rezeptor zu sequenzieren, wurde ein mittlerer Vorwärtsprimer 5'-CCCGCCACCACGATGAACCTG-3' gebaut.

Für die Amplifikation der 5'-UTR wurde der Vorwärtsprimer 5'-AGGGTGAATTATTCCAGGAAGTT-3' und der Rückwärtsprimer 5'-TGCCCTGAAGTACGTTCTG-3' konstruiert sowie für die 3'-UTR der Vorwärtsprimer 5'-CTCTTTGCCATGGGTATCGAGTA-3' und der Rückwärtsprimer 5'-TTCCCTCCTTTCAAGTAACGC-3'. Für die PCR wurde Platinum-Taq-DNA-Polymerase eingesetzt. Als Template diente cDNS von chronisch glutamatresistenten HT22-Zellen. Temperaturen waren 95°C (2 Minuten), 40 Zyklen bei 95°C (30 Sekunden), 56,7°C (1

Minute) für die 5'-UTR und 57,3°C für die 3'-UTR, 72°C (2 Minuten) und eine finale Elongation für 10 Minuten bei 72°C. Das Master-Mix bestand aus 1 µl Template, 50mM Mg, 0,4mM je Primer, 2,5 U/µl Enzym, 25 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM Tris (pH 8,4) und 50 mM KCl. Beide amplifizierten Sequenzen wurden jeweils in den pGEM-T-Easy-Vektor kloniert.

3.3.2 mGpr15

Die 1080 Basenpaare (bp) lange Sequenz des mGpr15 wurde mit dem Vorwärtsprimer 5'-CGAATTCATGGAACCAGCAACAG-3' und dem Rückwärtsprimer 5'-CCTCGAGTGACACAGATCTCTTC-3' amplifiziert. Als Template diente HT22CR-cDNS. Für die PCR wurde Platinum-Taq-DNA-Polymerase verwendet. Das Master-Mix hatte folgende Endkonzentration: 25 mM je dNTP, 2,5 U/µl Enzym, 0,4 mM je Primer, ~300 ng/µl cDNS, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM Tris (pH 8,4) und 50 mM KCl. PCR-Konditionen waren 95°C für 2 Minuten, dann je 40 Zyklen mit folgendem Temperaturschema: Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, eine Anlagerungstemperatur von 55°C für 1 Minute, ein Verlängerungsschritt von 72°C für 90 Sekunden und eine finale Elongation bei 72°C für 10 Minuten.

Um den kompletten Rezeptor zu Sequenzieren, wurde ein dritter, mittlerer Primer konstruiert (5'- TTGCCCACTCTTCTGTCCAGG-3'). Das PCR-Produkt wurde in den pGEM-T-Easy-Vektor und anschließend über die 5'-EcoRI- und die 3'-XhoI-Schnittstelle in den pDNR-SPHA kloniert.

3.3.3 hVPAC₂

Für die Amplifizierung des hVPAC₂ wurde ein Vorwärtsprimer 5'-CGAATTCATGCGGACGCTGCT-3' mit einer EcoRI-Schnittstelle, der Rückwärtsprimer 5'-AATCTAGATGACCGAGGTCTCCGT-3' mit einer XbaI-Schnittstelle, Easy-A-High-Fidelity-PCR-Cloning-Enzyme und humane Plazenta-Marathon-cDNS (Clontech) eingesetzt.

PCR-Konditionen waren 95°C für 2 Minuten, dann je 40 Zyklen mit folgendem Temperaturschema: Denaturierung bei 95°C für 40 Sekunden, eine Anlagerungstemperatur von 58°C für 1 Minute, ein Verlängerungsschritt von 72°C für 60 Sekunden und eine finale Elongation bei 72°C für 5 Minuten. Die 25- μ l-Ansätze bestanden aus 2,5 μ l 10x Easy-A-Puffer, 25 mM je dNTP, 0,5 μ l Template, 0,5 mM je Primer, 1,25 U/ μ l Easy-A-High-Fidelity-PCR-Cloning-Enzyme. Das amplifizierte 1317 lange PCR-Produkt wurde in den pGEM-T-Easy-Vektor kloniert und sequenziert. Um Informationen über die gesamte Sequenzlänge zu erhalten, wurden zwei weitere Sequenzier-Primer (Vorwärts: 5'-CTGGGTGGGCTGCAAGCTGAG-3'; Rückwärts: 5'-CGATCAGGAGGTAGGCCAGGA-3') konstruiert. Anschließend wurde auch dieser Rezeptor in den pDNR-SPHA-Vektor kloniert.

3.4 Transfektion

3.4.1 Klonierung des Kontruktes pDNR-SPHA-Gpr39-EGFP und Vorbereitung der DNS

Es wurde ein Konstrukt gebaut, bei dem der Rezeptor mGpr39 mit SPHA-Tag in einen pDNR-Donorvektor mit EGFP-Fusionsprotein kloniert wurde (pDNR1-EGFP-N3; Konstrukte siehe Abbildung 8.1.3 und 8.1.4 im Anhang) Hierfür wurde der zuvor in den pDNR-SPHA-Vektor klonierte mGpr39 mit BamHI und PspOmi verdaut. Der Vektor pDNR1-EGFP-N3 (nach CreatorTM DNA Cloning Kit; Clontech) wurde mit PspOmi und Bgl II verdaut, über Gelelektrophorese aufgetrennt und die Banden aufgereinigt und ligiert. Nach Transformation und Ausstrich wurden mehrere Kolonien gepickt (siehe Material und Methoden, Kap. 3.2.5). Nach der folgenden Minipräparation wurde ein Testverdau mit EcoRI und BamHI durchgeführt, erneut ein Gel angesetzt und ein Klon ausgewählt. Da für eine Transfektion salzfreie DNS benutzt werden sollte, wurde Maxi-DNS hergestellt (Kit NucleoBond PC 500;

Macherey-Nagel). Photometrisch (Shimadzu) wurde ein DNS-Gehalt von 0,424 µg/µl bestimmt und vier Eppendorf-Tubes mit je 20 µl auf Eis gestellt.

3.4.2 Elektroporation

Als Zellsystem wurden CHO-Zellen genutzt. Pro Konstrukt wurde eine konfluent bewachsene 250-ml-Gewebekulturflasche eingesetzt. Die Elektroporations-Küvetten (Invitrogen), der Elektroporations-Schlitten und sterilfiltriertes PBS wurden auf Eis kaltgestellt. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach Hinzugabe von 0,5 ml Trypsin/EDTA (GIBCO) drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden durch leichtes Klopfen gelöst, nach Hinzugabe von 10 ml Vollmedium durch Hoch- und Herunterziehen mit der Pipette vereinzelt, um dann in einem 10-ml-Falcon-Röhrchen 6 Minuten bei 1100 upm zentrifugiert (Heraeus Sepatech Varifuge FR) zu werden. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in ein 10-ml-Falcon-Röhrchen gegeben und erneut 6 Minuten bei 1100 upm zentrifugiert. PBS wurde abgesaugt und die Zellen mit 2 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Je 0,5 ml der Suspension wurde zu der DNS (ca. 10 µg) in jedes der vier Eppendorf-Tubes pipettiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde die Suspension in 0,4-cm-Elektroporations-Küvetten (Invitrogen) pipettiert und im Abstand von jeweils 1 Minute bei 960 µF und 320 Volt sowie 270 Volt das pDNR-SPHA-Gpr39-EGFP-Konstrukt sowie der pDNR1-EGFP-N3-Vektor als Kontrolle bei 270 Volt elektroporiert (Biorad Gene Pulser™, Modell-Nr. 1652077, Biorad Capacitance Expander, Modell-Nr. 1652087). Der Ansatz wurde anschließend sofort in 10 ml Vollmedium, bestehend aus DMEM Ham's F-12 mit L-Glutamin (PAA Laboratories), 10% Fetal Calf Serum (Promo Cell), 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10mg/ml, PAA Laboratories), überführt. Nach 48 Stunden wurde Medium mit elektroporierten Zellen auf Polylysin beschichtete Objektträger aufgebracht und unter dem Konfokalmikroskop (Confocal Laser Scanning Microscopy TCSSP2, Leica) betrachtet.

3.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

3.5.1 Primerdesign

Oligodesoxynukleotide (PCR-Primer, Tabelle 1) für die zu untersuchenden Gene wurden mit einem DNS-Analyse-Programm (Oligo Primer Analysis Software; MBI) ermittelt und synthetisiert (MWG). Da 5'-Enden von Boten-RNS (mRNS) in mit Hilfe von Oligodesoxythymidin synthetisierter komplementärer DNS (cDNS) unterrepräsentiert sind, sollten die Primer aus methodischen Gründen bevorzugt im 3'-Bereich des Gens liegen. Die Entfernungen der generierten PCR-Produkte vom vermuteten Poly-Adenosin-Schwanz beträgt für Gpr15 335 bp, für Gpr39 60 bp. Die Primer sollten eine Schmelztemperatur – ermittelt nach der Nearest-Neighbour-Methode (Breslauer et al., 1986) – um 50 °C haben. Zur Gewährleistung einer bestmöglichen Amplifikationseffizienz wurden bevorzugt Oligodesoxynukleotide mit kurzen PCR-Produkten um 100 bp Länge ausgesucht.

Tabelle 1: Eingesetzte Primer der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion.

	Primer	Schmelztemperatur
Gpr15	UP 5`-TCATTACCAGCAGTCGGGAAA-3` LP 5`-CGCCACCGCAATAATAACGAT-3`	52.2 °C
Gpr39	UP 5`-CCTCCAGGAGAACTAACAA-3` LP 5`-TGTGGTGA CT CAGGACTCAA-3`	54.1 °C

3.5.2 Kontrolle der Oligodesoxynukleotide

Initial wurden die synthetisierten Primer getestet, um gelelektrophoretisch zu zeigen, dass in einer konventionellen PCR bei der verwendeten Schmelztemperatur nur ein definiertes PCR-Produkt der richtigen Länge erzeugt wird, da diese Kontrolle bei der Real-Time-PCR nur eingeschränkt möglich ist. Als Template-DNS wurden die jeweils in dieser Arbeit in den pDNR-Vektor klonierten murinen Rezeptoren Gpr15 und Gpr39 eingesetzt. Die

Zusammensetzung der PCR-Reaktion für die quantitative PCR des Gpr39 hatte folgende Endkonzentration: 1,5-3 mM Mg, 10-fach Puffer, 0,14-0,2 mM von jedem Oligodesoxynukleotid, 0,2 mM von jedem Desoxynukleotid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,025 Units/ μ l Platinum-Taq-DNA-Polymerase, 106 ng/ μ l Template für Gpr39 sowie 52 ng/ μ l Template für Gpr15 in 25 μ l Gesamtvolumen. Die einzelnen Zyklen hatten folgendes Temperaturschema: Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden, eine Anlagerungstemperatur von 53-60°C für 70 Sekunden und einen Verlängerungsschritt von 72°C für 30 Sekunden. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde auf ein 4%iges Agarose-Gel (Nu Sieve Agarose, FMC Bioproducts, Rockland, USA, 4% w/v in TAE) mit 10 μ g/ml Ethidiumbromid-Stammlösung (Boehringer) aufgetragen.

3.5.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Zusammensetzung der PCR-Reaktion für die quantitative PCR hatte folgende Endkonzentration: 3 mM MgCl₂, 0,3 mM von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM von jedem Desoxynukleotid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,025 Units/ μ l Sure-Start-Taq-DNS-Polymerase und PCR-Puffer sowie SYBR Green (Brilliant SYBR Green QPCR Core Reagent Kit, Eurogentec, Seraing, Belgien) wie vom Hersteller empfohlen, und 0,5 ng/ μ l cDNS in 20 μ l Gesamtvolumen. Die PCR wurde am ABI-PRISM®-7900-HT-Sequence-Detection-System (SDS; Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Die PCR hatte folgendes Temperaturschema:

Tabelle 2.1: Temperaturschema der quantitativen PCR.

PCR-Schema	Zeit (Minuten)	
95°C	10:00	
95°C	0:15	40-45 Zyklen
60°C	1:00	
60°C	0:10	
95°C	0:20	
60°C	0:20	

Für den Gpr39 wurde ein Versuch mit je drei Proben und 45 Zyklen durchgeführt. Für Gpr15 wurden zwei Versuche mit je drei Proben und 40 Zyklen durchgeführt. Im Anschluss wurde noch je eine Schmelzkurve ermittelt, durch die die Spezifität der Reaktion überprüft werden kann (Ririe et al., 1997). Denn bei jeder PCR kommt es zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals durch Interkalieren des Fluoreszenzfarbstoffes parallel zum Anstieg der Konzentration an dsDNS. Da auch Primer-Dimere oder Nebenprodukte, die sich während der Reaktion bilden, einen Fluoreszenzanstieg verursachen, ist dieser zunächst nicht von dem des spezifischen Produkts zu unterscheiden. Zur Erstellung einer Schmelzkurve wird nach dem letzten Zyklus das PCR-Produkt durch schrittweise Temperaturerhöhung denaturiert, bis es seinem Schmelzpunkt entsprechend nur noch als Einzelstrang vorliegt. Kleinere Fragmente wie z.B. Primer-Dimere weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt auf als die spezifischen PCR-Produkte. Durch die bei der Denaturierung entstehende Fluoreszenzabnahme kann der Schmelzpunkt ermittelt und so die Längen der in den Reaktionsgemischen vorhandenen PCR-Produkte anhand der unterschiedlichen Schmelztemperaturen vermutet werden. Eine elektrophoretische Längenanalyse der PCR-Produkte erfolgte nur beim ersten Austesten der Oligodesoxynukleotide.

Als Substrat wurde eine Sammlung von komplementärer DNS (cDNS) aus verschiedenen Geweben der Maus verwendet (Mouse Multiple Tissue cDNA Panel I, MTC, Clontech, Palo Alto, California, USA). Untersuchte Gewebe stammten aus Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Muskel, Niere, Hoden sowie 7, 11, 15 und 17 Tage alten Embryonen. Die einzelnen cDNS-Proben wurden vom Hersteller auf vier Haushaltsgene (β -Actin, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Phospholipase A2 und ribosomales Protein S29) normalisiert.

3.5.4 Auswertung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion

Als Template wurde das zuvor hergestellte Konstrukt mit Gpr15 und Gpr39 jeweils im Donorvektor pDNR verwendet (siehe Material und Methoden, Kap. 3.3.1 und 3.3.2). Um die Anzahl der Teilchen in den Proben der Verdünnungsreihe zu bestimmen, wurde die Konzentration des Konstrukt photometrisch mit dem UV-160A-Spektrophotometer (Shimadzu) ermittelt. Hierbei wurde die Absorption bei 260 nm durch 0,025 dividiert, wobei $0,025 \text{ (}\mu\text{g/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ als spezifischer Absorptionskoeffizient doppelsträngiger DNS (dsDNS) galt. Anschließend wurde die molare Masse und über die Formel $M = m/n$ (M = molare Masse, m = Masse, n = Stoffmenge) die Stoffmenge in Mol und somit die Teilchenzahl (1 Mol entsprechen $6,0220 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ Teilchen) bestimmt. Für Gpr15-pDNR hieß das $m = 0,208 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $M = 3727,21 \text{ g/mol dsDNS}$ und eine errechnete Teilchenanzahl von $3,360625276 \times 10^{13}$. Für Gpr39-pDNR wurde eine Konzentration von $0,424 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und ein molare Masse von $3895,40 \text{ g/mol dsDNS}$ berechnet. Es wurden Verdünnungsreihen für Gpr15-pDNR und Gpr39-pDNR angesetzt mit folgenden Konzentrationen für Gpr15: $1,08846 \times 10^{-4} \text{ mmol dsDNS Template/ml}$, $4,3 \times 10^{-8} \text{ mmol/ml}$, $2,1 \times 10^{-8} \text{ mmol/ml}$, $1 \times 10^{-8} \text{ mmol/ml}$, $5 \times 10^{-9} \text{ mmol/ml}$, $2 \times 10^{-9} \text{ mmol/ml}$, $1 \times 10^{-9} \text{ mmol/ml}$ und $9,070527631 \times 10^{-10}$. Für Gpr39-pDNR wurden die Konzentrationen $5,04 \times 10^{-7} \text{ nmol/ml}$, $2,017 \times 10^{-10}$, $1,02 \times 10^{-10} \text{ nmol/ml}$, $5,04 \times 10^{-11}$, $2,52 \times 10^{-11} \text{ nmol/ml}$, $1,26 \times 10^{-11} \text{ nmol/ml}$, $6,30 \times 10^{-12} \text{ nmol/ml}$ und $4,20 \times 10^{-12} \text{ nmol/ml}$ angesetzt. Auf diesen Verdünnungsreihen wurden jeweils drei Real-Time-PCRs wie

oben beschrieben mit Gpr15- oder Gpr39-Oligodesoxynukleotiden durchgeführt. Die resultierenden Ct-Werte wurden gegen den Logarithmus der Anfangskonzentrationen aufgetragen. Es wurde eine Korrelationsgerade erstellt (Applied Biosystems, SDS 2.1, Foster City, USA). Für jede Probe wurde anhand dieser Gerade die Ursprungsmenge an DNS abgelesen. Es wurde der Mittelwert und der Standardfehler berechnet. In Analogie zur relativen Quantifizierung wurden die ermittelten Mengen auf die Template-Ursprungsmenge in der cDNS-Probe aus Hirngewebe bezogen (GrampadPrism4Tm, San Diego, USA). Die Signifikanz der Unterschiede der Template-Mengen der untersuchten Gewebe im Vergleich zu Hirngewebe wurde mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests ermittelt.

3.6 Phylogenetische Analyse

3.6.1 Stammbäume für Gpr39 und Gpr15

Für die Erstellung der Stammbäume wurde zunächst ein multiples Alignment mit CLUSTALX erstellt. Hierfür wurden die Peptidsequenzen des mGpr39 und mGpr15 bei Ensembl in Datenbanken verschiedener Spezies als Aminosäuresequenz (BLASTP) gesucht. Gefundene Proteine mit der höchsten Homologie (e^{-20}) wurden als unbenannte Rezeptoren definiert. Für mGpr15 wurden so neun Proteinsequenzen gefunden. Dazu gehörte die der Ratte (*Rattus norvegicus*, Ensembl-Gen: ENSRNOG00000001655), des japanischen Kugelfischs (*Fugu rubripes*, Ensembl-Peptid: SINFRUP00000165603), des Zebrafischs (*Danio rerio*, Ensembl-Peptid: ENSDARP00000001946), des Fadenwurms (*Caenorhabditis elegans*, Ensembl-Peptid: C25G6.5), des Moskitos (*Anopheles gambiae*, Ensembl-Peptid: ENSANGP00000009053), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*, Ensembl-Peptid: CG10001) sowie die über NCBI gefundenen Proteinsequenzen von Swiss-Prot des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*, Accession No. O97663; gi:10720002), des Menschen (*Homo sapiens*, Accession No. P49685; gi:1346170) und der grünen Meerkatze (*Cercopithecus*

aethiops, Accession No. O18982; gi:3023888). Für mGpr39 wurden folgende Sequenzen verwendet: *Rattus norvegicus* (Ensembl-Peptid: ENSRNOP00000004585), *Fugu rubripes* (Ensembl-Peptid: SINFRUP00000135301), *Drosophila melanogaster* (Ensembl-Peptid: CG8795-PB), *Anopheles gambiae* (Ensembl-Peptid: ENSANGP00000020410), *Caenorhabditis elegans* (Ensembl-Peptid: K10B4.4) und *Danio rerio* (Ensembl-Peptid: ENSDARP00000000661). Gerooted wurden die Sequenzen gegen den entfernt verwandten humanen Beta2-Adrenozeptor (Accession No. NM_000024.3; gi:4501969), ebenfalls ein G-Protein gekoppelter Rezeptor. Die Neighbour-Joining-Bäume wurden mit Hilfe des Programms MEGA generiert.

4 Ergebnisse

4.1 *mGpr39* und die untranslatierte Region

4.1.1 Suchstrategie zur Identifizierung des mGPR39 und der untranslatierten Region

Da die Sequenz des Gpr39 in der Maus noch nicht bekannt war, wurde das Ortholog mit der Sequenz des humanen Gpr39 (NM_001508; gi:4504096) mit einer Länge von 1362 Basenpaaren über Ensembl (BLAST 2.0) in der genomischen Datenbank der Maus gesucht. Zwei Sequenzteile wurden auf Chromosom 1 gefunden. Zum einen die ersten 857 Basen (465046-465902), zum anderen die Basen 858 bis 1362 (660002-660531).

Um die gefundene Sequenz über ESTs zu sichern, wurde der humane Gpr39 gegen Maus-ESTs geblastet (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi). Dreizehn Maus-ESTs wurden gefunden. Die Konsensussequenz der Maus-ESTs (973 Basenpaare) wurde genomisch geblastet und die Sequenz des mGpr39 ab Basenpaar 849 bis zum Stopp-Codon (1368) sowie die 3'-UTR mit einer Länge von 338 Basenpaaren gesichert (siehe Abbildung 4.1 und 4.2).

Da der erste Teil der Sequenz des Gpr39 noch nicht über ESTs bestätigt war, wurden die ersten 800 Basenpaare der humanen Gpr39-Sequenz auch gegen Rind-ESTs geblastet. Sechs ESTs wurden gefunden. Die Konsensussequenz der Rind-ESTs (1093 Basenpaare) wurde mit der genomischen DNS (BLASTN) der Maus verglichen und die 183 Basenpaare lange 5'-UTR sowie die Sequenz des Gpr39 bis zu den Basenpaaren 857 genomisch gesichert (siehe Abbildung 4.1 und 4.2).

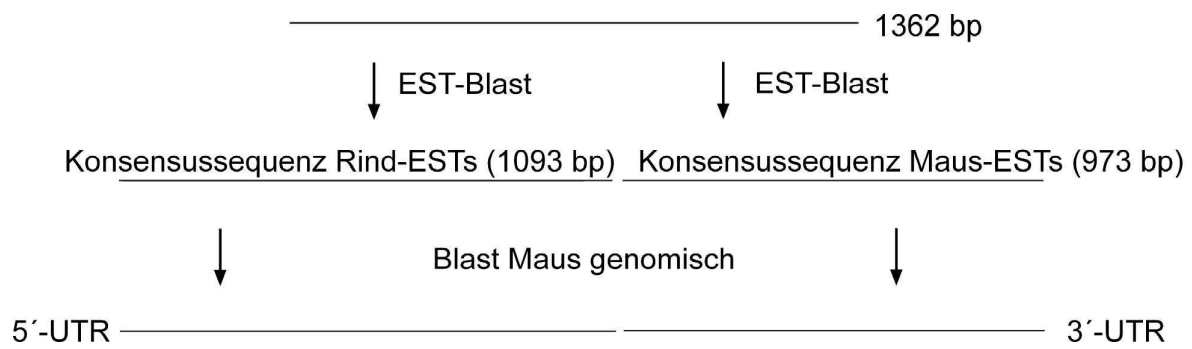


Abbildung 4.1: Suchstrategie der 5'- und 3'-UTR des mGpr39.

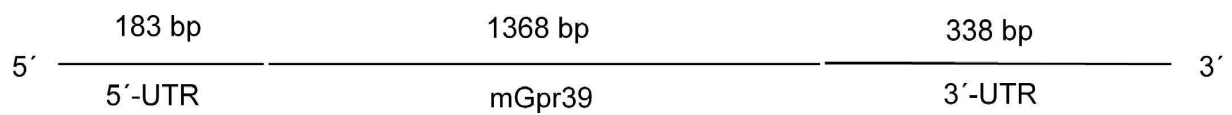


Abbildung 4.2: mGpr39 mit 5'- und 3'-UTR.

4.1.2 Identifizierung des mGpr39

Für die Amplifizierung des offenen Leserasters des mGpr39 wurden zunächst Primer mit EcoRI- und XbaI-Schnittstellen auf der Grundlage der hypothetischen Sequenz konstruiert. Das auf der cDNS chronisch glutamatresistenter HT22-Zellen amplifizierte PCR-Produkt wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen (siehe Abbildung 4.3). Erwartet wurde ein Amplifikat von 1368 Basenpaaren. Über die EcoRI- und XbaI-Schnittstellen wurde die Sequenz in den pDNR-Vektor kloniert (siehe Material und Methoden, Kap. 3.3.1) und anschließend sequenziert.



Abbildung 4.3: Verifikation der hypothetischen Sequenz des mGpr39. Die PCR mit mGpr39-Oligodesoxynukleotiden (Lane 1) ergibt in der gelelektrophoretischen Auftrennung eine distinkte Bande, die der hypothetischen entspricht. In Lane 2-4 wurde versucht, den mGpr15- (Lane 2), mhm74- (Lane 3) sowie den hVPAC₂-Rezeptor (Lane 4) zu amplifizieren, ohne jedoch weder für den mGpr15- noch VPAC₂-Rezeptor spezifische Banden zu erhalten. Agarose-Gel 1% (Seakem, FMC Bioproducts, Rockland, USA) mit Ethidiumbromid. DNS-Größenleiter (1 kb Leiter; Life Technologies).

4.1.3 Identifizierung der 5'- und 3'-UTR

Um die 5'- und die 3'-UTR des mGpr39 zu amplifizieren wurden zwei neue Primerpaare konstruiert. Die Primer der 5'- und 3'-UTR wurden so auf der hypothetischen Sequenz erstellt, dass nach Amplifizierung der 5'-UTR ein 1145 Basenpaare langes PCR-Produkt und der 3'-UTR ein 1199 Basenpaare langes DNS-Fragment zu erwarten war (siehe Abbildung 4.4). Wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, wurden DNS-Fragmente in dieser Größenordnung gelelektrophoretisch dargestellt, die nach Sequenzierung mit der hypothetischen Sequenz übereinstimmten.

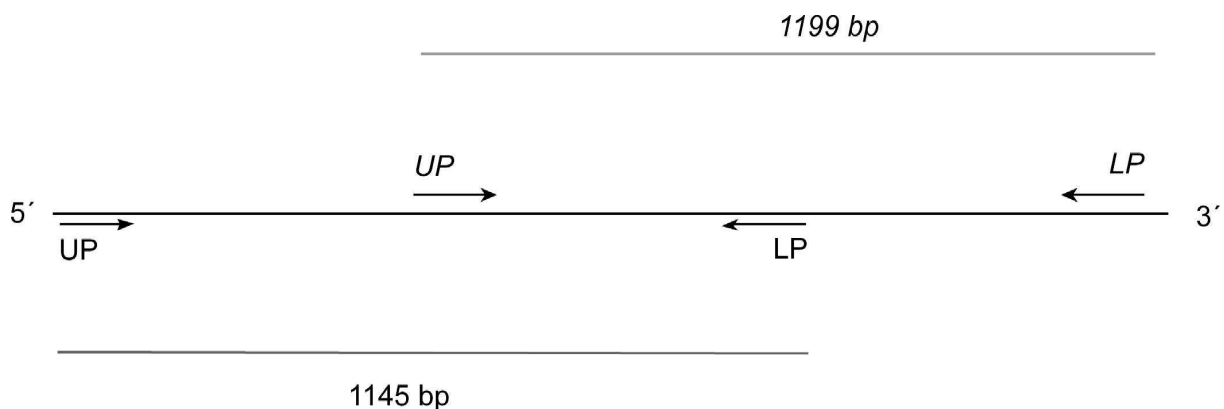


Abbildung 4.4: Primerdesign zur Amplifizierung der 5'- und 3'-UTR des mGpr39. Upper und Lower Primer (UP und LP) sowie die zu erwartenden Amplifikationsprodukte mit einer Länge von 1145 bp und 1199 bp sind eingezeichnet.

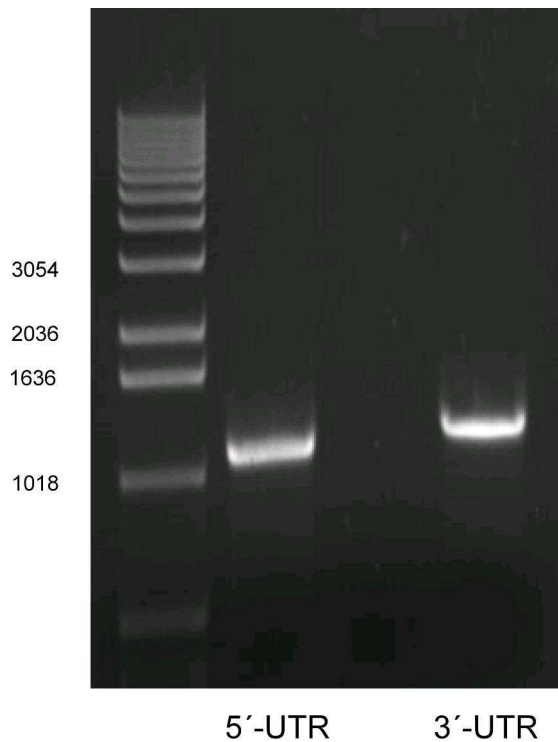


Abbildung 4.5: Bestätigung der vorhergesagten Amplifikationsprodukte der 5'- und 3'-UTR des mGpr39. Die PCR-Produkte entsprechen etwa den erwarteten Größen von 1145 bp für die 5'-UTR (Lane 1) und 1199 bp für die 3'-UTR (Lane 3) des mGpr39. Agarose-Gel 1% (Seakem, FMC Bioproducts, Rockland, USA) mit Ethidiumbromid. DNS-Größenleiter (1 kb Leiter; Life Technologies).

4.1.4 Sequenz des mGpr39

In dieser Arbeit wurde der mGpr39 mit einer Volllänge von 1368 Basenpaaren kloniert, der ein 465 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 51584.32 Dalton kodiert. Analysen des Gens (<http://www.expasy.org>) zeigen mögliche Glykosylations- und Myristoylationsstellen, Proteinkinase-C- und Caseinkinase-II-Phosphorylationsstellen sowie eine cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase-Phosphorylationsstellen (siehe Abbildungen 4.6).

```

TAGGGTGAAT TATCCAGGAAGT TACAATGAGAGAGCCGAAAAACTAAGTCACTCCTGGCCAGC -119
CAACCACAGT GACAGAAAAAGT TGGCGCCACGCTGGT GAGTTGCGGGGCTCTTTGGGAGGCC -56
GAAGAAAAGG CAGTGGAGACAT TTTGGGACCTGGTGGTCTGGGTCTCTCTCCATGGCTTCA 9
           M A S

TCCAGTGGCT CCAACCATCTGCTCCCGTGTATCGATCAGCCATGTTCTGAATTTGAGG 73
S S G S N H I C S R V I D H S H V P E F E

TGGCCACTTGGATCAAATCACCCCTCATCTTGGGTACCTGATCATCTTTGGTAGGCATCTT 137
V A T W I K I T L I L V Y L I I F V V G I L

GGGCAACAGCGTCACCATCAGGGTTACGCAGGTATTGCAGAAGAAGGGCTATTGCAGAAGGAG 201
  G N S V T I R V T Q V L Q K K G Y L Q K E
  ● ▲

GTGACAGATCACATGGTCAAGTTGGCTTGTTCAGATATCTTGGTCTTTTGGATTGGCATGCCA 265
V T D H M V S L A C S D I L V F L I G M P

TGGAGTTCTACAGCATATTTGGAACCCCTGACCCACCCAGCTATGCTCTGCTGTAAGCT 329
M E F Y S I I W N P L T T P S Y A L S C K L
▲

CCACACGTTCTCTTTGAGACGTGCAGCTACGCCACACTGCTGCACGTGCTGACCCCTCAGCTT 393
H T F L F E T C S Y A T L L H V L T L S F

GAGCGCTACATTGCCATTTGTATCCCTTCAAGTATAAAGCAGTGTCTGGACCTCGCCAGGTGA 457
E R Y I A I C H P F K Y K A V S G P R Q V

AACTGCTGATTGGCTTTGTATGGGTACCTCCGCCCTGGTGGCACTGCCTTTGCTCTTTGCCAT 521
K L L I G F V W V T S A L V A L P L L F A M

GGGTATCGAGTACCCTCTGGTAAACGTACCCACTCACAGGGACTCAACTGCAACCTCTCTCGC 585
G I E Y P L V N V P T H K G L N C N L S R
  ▲ ● ■

ACCCGCCACCAGATGAACCTGGAACCTCAATATGTCCATCTGCACGAACCTCTCCAACCGTT 649
T R H H D E P G N S N M S I C T N L S N R
  ■ ▲

GGGAGTCTTCCAGTCCAGCATCTTTGGGGCTTTGCTGTTTACCTGGTGGTCTGGCGTCTGT 713
W E V F Q S S I F G A F A V Y L V V L A S V

GGCTTTATGTTGGAAATATGATGAAAGTGCATGAAGAGCAAGCAGGGCACTTTGCAGGG 777
A F M C W N M M K V L M K S K Q G T L A G
  ●

ACCGGGCCACAGCTCCAGCTGAGGAAGT CAGAGAGTGAGGAGAGCCGGACAGCAAGAAGACAGA 841
T G P Q L Q L R K S E S E E S R T A R R Q
  ★ ▲

CCATCATATTCCTGAGACTGATTGGGTGACGTTGGCGGTGTGGATGCCAATCAGATCCG 905
T I I F L R L I V V T L A V C W M P N Q I R
  ★

ACGGATCATGGCTGCAGCAAAACCCAAACATGACTGGACCAGAACGTACTTCAGGGCATACTG 969
R I M A A A K P K H D W T R T Y F R A Y M

ATCCTCTGCCCTTCTCTGATACCTTCTTCTACCTCAGCTCTGTGGTCAACCCCTCTCCTTACA 1033
I L L P F S D T F F Y L S S V V N V L L Y

ACGTGCTCTCAGCAGTCCCGAAGGTGTCTGGCAGGTGCTCTGCTGCCCGCTGACTCTGCA 1097
N V S S Q Q F R K V F W Q V L C C R L T L Q
  ■

GCATGCCAACCAAGAGAAACGCCAGCGTCCCGCTTTCATCCACCAAGGACAGCACCAGCTCA 1161
H A N Q E K R Q R A R F I S T K D S T S S
  ▲ ★ ▲

GCCCGCAGCCCCTCATCTTCTAGCCTCCCGGCGCAGTAACTTCTCCTCAGGAGAACTAACA 1225
A R S P L I F L A S R R S N S S S R R T N
  ▲ ■ ▲ ▲ ▲

AGGTTTTCTTAAGCACTTTT CAGACTGAGGCCAAGCCTGGAGAGGCTAAGCCCCAGCCCTTGAG 1289
K V F L S T F Q T E A K P G E A K P Q P L S

TCCTGAGTCAACCAGACTGGCTCAGAGACCAAACCAGCTGGGTCCACCCCAGAAAATAGTTTA 1353
P E S P Q T G S E T K P A G S T P E N S L
  ★ ★ ★

CAGGAGCAGGAAGTATGAATGGCAAGTTCAGAAGCCTTGAGCCGAAACTGGCTCTCCCCTCCC 1417
Q E Q E V stopp

CAAAAGCAAAGTTACCTTCAACGACGAGCAGTCTCTGAATAGACTGTGACTCTACTGGGACAG 1481
AATGGAAAGCTCAAGGCTTTGGGAAAGGCAGATGCGTATCTCAATGACTTCTAAGGGCTGGTTCT 1545
TCCAGGCTAGCCTTGGCGGTGTTAACCAGATTGGGATGGGAGGGTCTGGACTTTCTGCTCCAT 1609
GCTTTTTTCTCAACTACACAGAAATCAGAATGAATGGTTT CAGAGCTTACAAAAGTATTT 1673
GTGCACGGCAATCTTGGCTTACTTGAAGGAGGGGAA 1737

```

Abbildung 4.6: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des mGpr39. Die Nummerierung der Nukleotide beginnt mit dem Initiations-Codon für Methionin. Mögliche N-Glykosylationsstellen (Quadrate), Myristoylationsstellen (Kreise), Phosphorylationsstellen für Proteinkinase C (Dreiecke), Caseinkinase II (Sterne) und einer cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase (Kreuz) sind eingezeichnet.

4.1.5 Struktur des mGpr39

Sequenzanalysen des mGpr39 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) zeigen einen 7-Transmembranrezeptor (siehe Abbildungen 4.7).

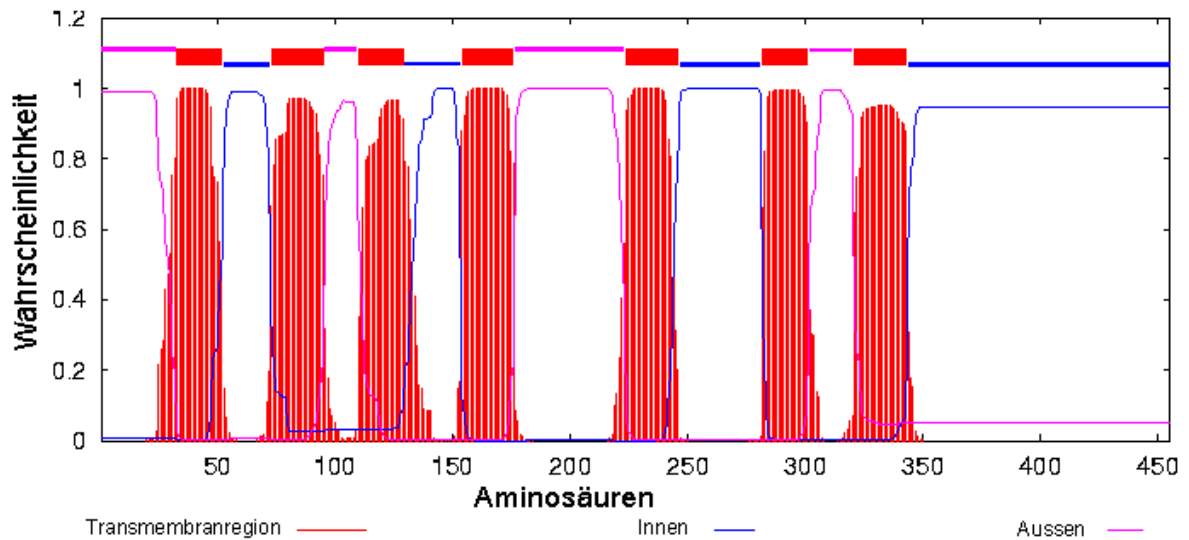


Abbildung 4.7: 7-Transmembranstruktur des mGpr39.

4.1.6 Chromosomale Lokalisation des mGpr39

Der Rezeptor besteht aus zwei Exons, die durch ein Intron, das ca. 20 kB lang ist, getrennt werden. Die chromosomale Organisation des mGpr39 ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

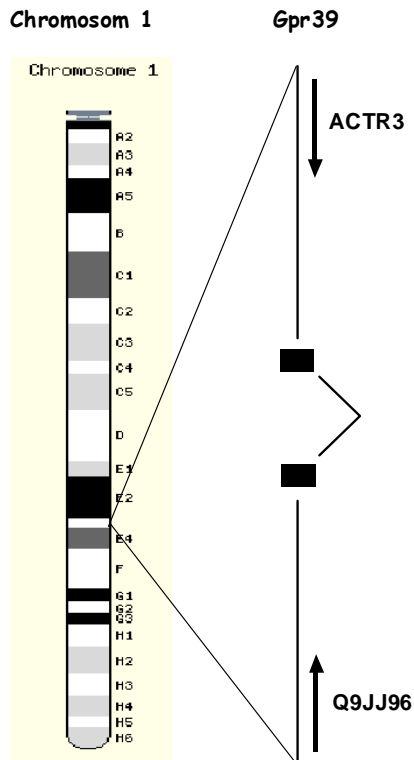


Abbildung 4.8: Chromosomale Struktur des mGpr39. Q9JJ96 ist die Bezeichnung für ein Swissprot-Protein, Actr3 ein Marker-Symbol.

4.2 Identifizierung des mGpr15

Da die Maussequenz des Gpr15 ebenfalls nicht bekannt war, wurde die humane Sequenz (Accession No. NM_005290; gi:4885298) über Ensembl geblastet. Dabei fand sich ein vermeintliches Gen ENSMUST00000023425 auf Chromosom 16. Diese 1080 Basenpaare (bp) lange Sequenz wurde mit Hilfe eines Primerpaares aus cDNS amplifiziert (siehe Abbildung 4.9) und in den pGEM-T-Easy-Vektor ligiert. Zur Kontrolle wurde nun ein Verdau mit EcoRI und XhoI durchgeführt. Es wurde eine 1080 bp lange DNS-Sequenz erwartet, die nach dem Verdau über ein 1%iges Agarose-Gel aufgetrennt wurde (siehe Abbildung 4.10). In der erhaltenen Sequenz waren im Vergleich zur genomischen Sequenz fünf Basenaustausche zu verzeichnen, die in einem der Fälle einen Aminosäureaustausch bedeuteten. Mutationen, die keinen Aminosäureaustausch nach sich zogen, waren auf Position 292 **GCG** statt **ACG**,

Position 432 **GCG** statt **ACG**, 498 **ACC** statt **GCC** und Position 838 **TTC** statt **TCT**. Die Mutation auf Position 64 **ATC** statt **TTC** bedeutete einen Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Phenylalanin.

Gpr15 1080 bp

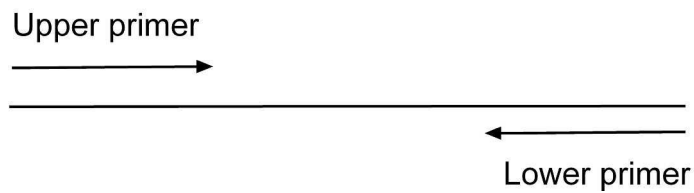


Abbildung 4.9: Klonierungsstrategie des mGpr15.

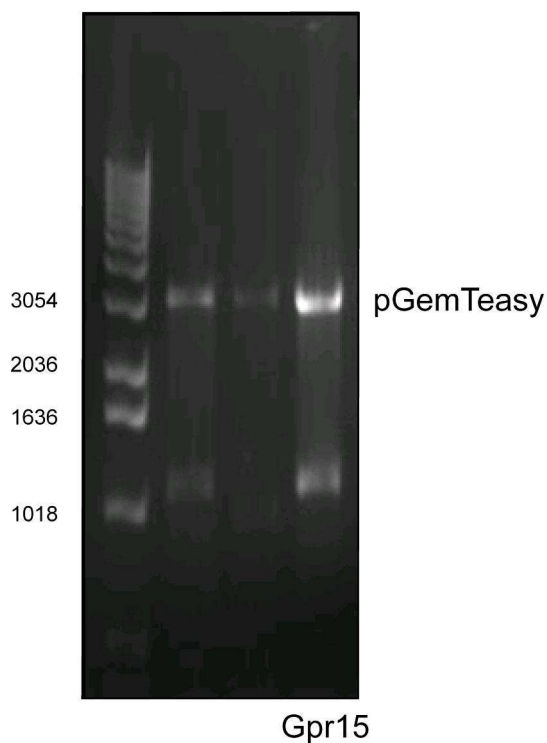


Abbildung 4.10: Testverdau des mGpr15-pGEM-T-Easy (Lane 3). Der Verdau (EcoRI/XhoI) zeigt eine Bande in Höhe der erwarteten Größe des mGpr15 (1080 bp). Agarose-Gel 1% (Seakem, FMC Bioproducts, Rockland, USA) mit Ethidiumbromid. DNS-Größenleiter (1 kb Leiter; Life Technologies).

4.2.1 Sequenz des mGpr15

Der mGpr15 besteht aus 1080 Basenpaaren, die ein 360 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 40541.22 Daltons kodieren (siehe Abbildung 4.11).

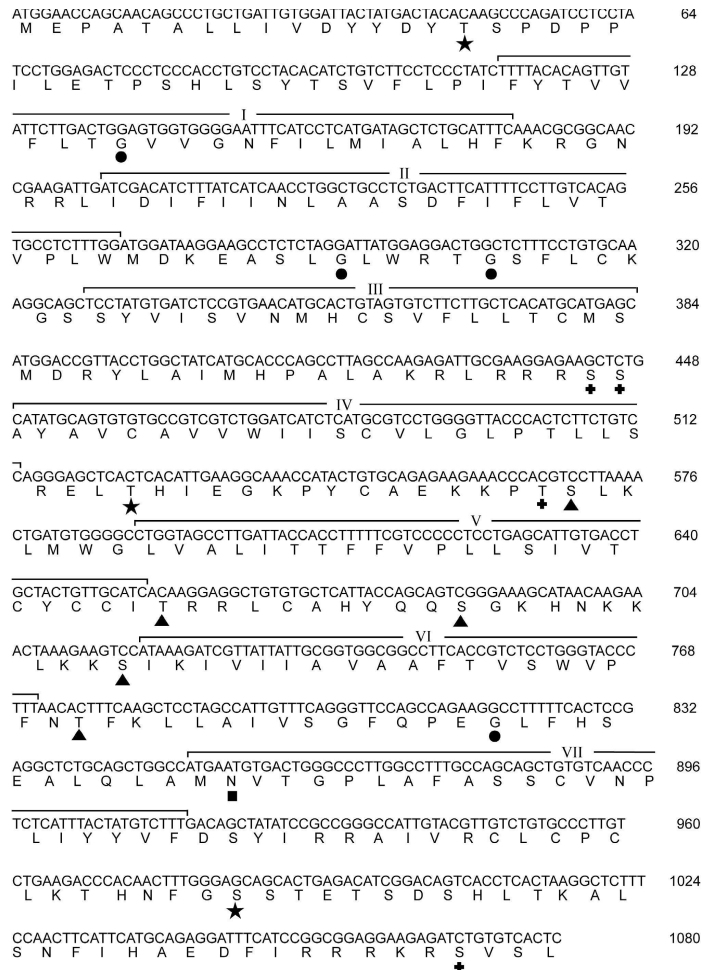


Abbildung 4.11: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des mGpr15. Mögliche N-Glykosylationsstellen (Quadrate), Myristoylationsstellen (Kreise), Phosphorylationsstellen der Proteinkinase C (Dreiecke), Caseinkinase II (Sterne) sowie der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase (Kreuze) sind eingezeichnet.

4.2.2 Struktur des mGpr15

Analysen der DNS-Sequenz (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) zeigen eine 7-Transmembranstruktur des mGpr15 (siehe Abbildung 4.12).

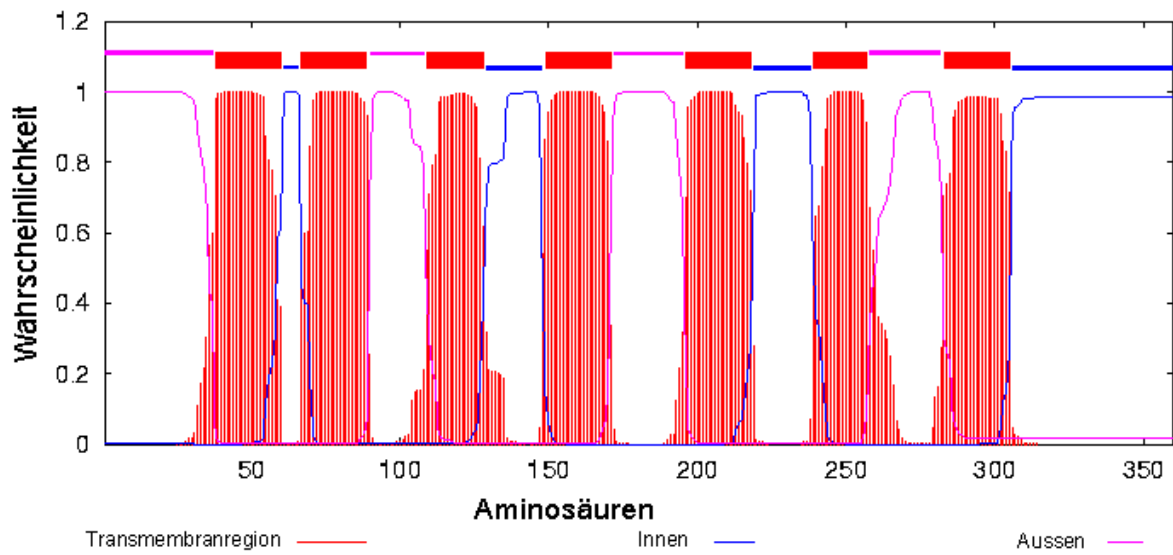


Abbildung 4.12: 7-Transmembranstruktur des mGpr15.

4.2.3 Chromosomale Lokalisation des mGpr15

Der mGpr15 ist auf Chromosom 16 lokalisiert und besteht aus einem Exon (siehe Abbildung 4.13).

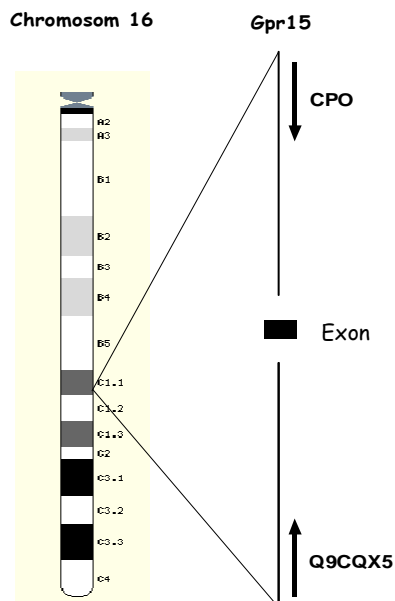
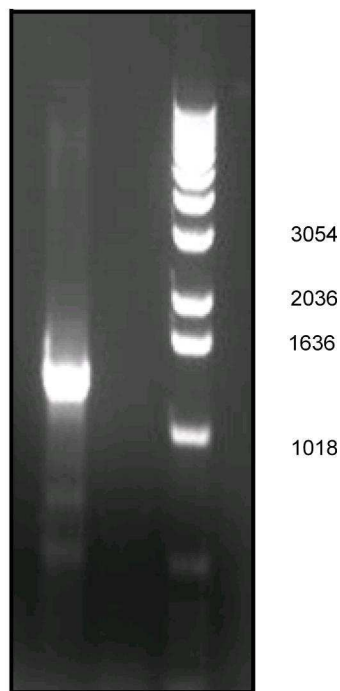


Abbildung 4.13: Chromosomale Struktur des mGpr15. Bekannte Ensembl-Gene sind CpoX, ein Marker-Symbol des Ensembl-Gens ENSMUSG00000022742, und Q9CQX5, ein Swissprot-Protein.

4.3 Identifizierung des hVPAC₂

In dieser Arbeit wurde der humane VPAC₂-Rezeptor mit einer Volllänge von 1317 Basenpaaren kloniert. Das aus 438 Aminosäuren bestehende Protein wird auf Chromosom 7 q36.3 kodiert und besteht aus 13 Exons. Die Größe der Introns variiert von 68 bp (Intron 11) bis 45 kb (Intron 4).



VPAC₂

Abbildung 4.14: Verifikation der hypothetischen Sequenz des hVPAC₂-Rezeptors. Die PCR mit VPAC₂-Oligodesoxynukleotiden ergibt in der gelelektrophoretischen Analyse eine Bande in Höhe der erwarteten 1317 bp (Lane 1). Agarose-Gel 1% (Seakem, FMC Bioproducts, Rockland, USA) mit Ethidiumbromid. DNS-Größenleiter (1 kb Leiter; Life Technologies).

Die PCR-Primer wurden auf der Sequenz des humanen VIP2 (Homo Sapiens Vasoactive Intestinal Polypeptide Receptor 2; Accession L40764; gi:712836) gebaut und der Rezeptor, wie in Material und Methoden (siehe Kap. 3.3.3) beschrieben, amplifiziert (siehe Abbildung 4.14). Dabei fanden sich im Vergleich zum hVIP2 (Homo Sapiens Vasoactive Intestinal

Polypeptide Receptor 2; Accession L40764; gi:712836) sechs Mutationen, die in drei Fällen auch einen Aminosäureaustausch bedeuteten. Diese befanden sich auf Position 115 GCA (Alanin) statt ACA (Threonin), Position 1235 CGC (Arginin) statt CAC (Histidin) und auf Position 1271 und 1272 GGC (Glycin) statt GCG (Alanin). Keinen Aminosäureaustausch bewirkten die Mutationen auf Position 288, 825 und 1278.

4.4 Phylogenetische Ergebnisse

4.4.1 Stammbäume des Gpr39 und Gpr15

Neighbor Joining ist eine distanzbasierte Methode, um phylogenetische Stammbäume zu erstellen. In den Abbildungen 4.15 und 4.16 wurden die Sequenzen gegen den entfernt verwandten humanen Beta2-Adrenozeptor gerootet. Wie anhand der Abbildungen zu sehen, zeigen die erhaltenen Bäume eine enge verwandtschaftliche Nähe zwischen Mensch, Ratte und Maus, sowohl für den Gpr39 als auch für den Gpr15. Die Sequenzen beider Rezeptoren wurden in den verschiedensten – auch weit voneinander entfernten – Spezies identifiziert. Dies lässt auf eine evolutionäre Konservierung schließen und legt somit eine wichtige funktionelle Bedeutung beider Rezeptoren nahe.

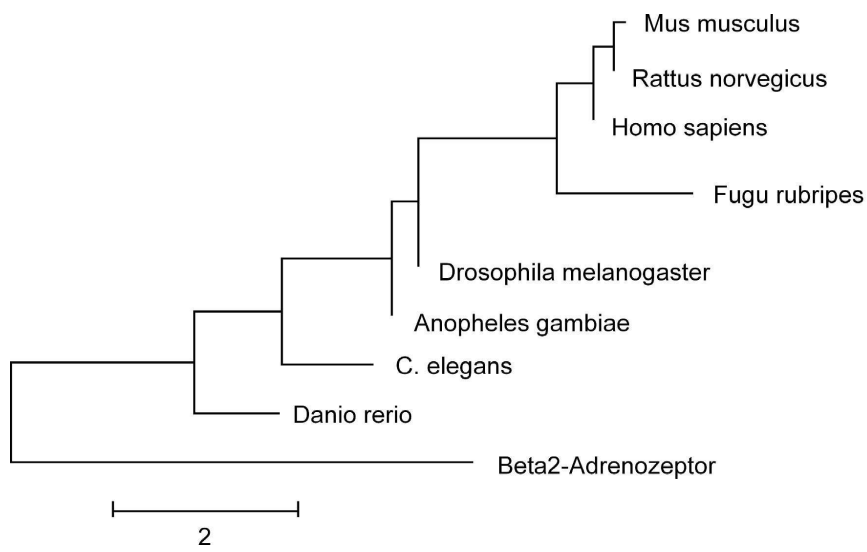


Abbildung 4.15: Gpr39: höchste Homologie $> e^{-20}$ jeder Spezies.

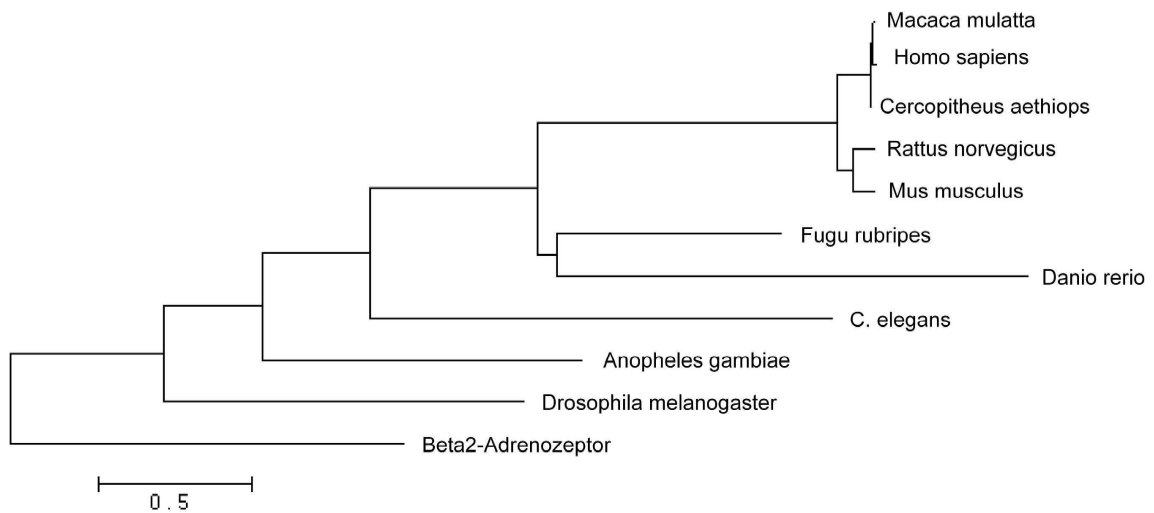


Abbildung 4.16: Gpr15: höchste Homologie $> e^{-20}$ jeder Spezies.

4.5 Gewebeexpression des *Gpr15* und *Gpr39* in der Maus

4.5.1 Primerspezifität

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR zur Kontrolle der synthetisierten Primer über ein 4%iges Agarose-Gel (NuSieve, FMC Bioproducts, Rockland, USA) zeigt jeweils eine spezifische Bande ohne weitere Nebenprodukte in Höhe der erwarteten 73 Basenpaare für *Gpr15* und 99 Basenpaare für *Gpr39* (siehe Abbildung 4.17).

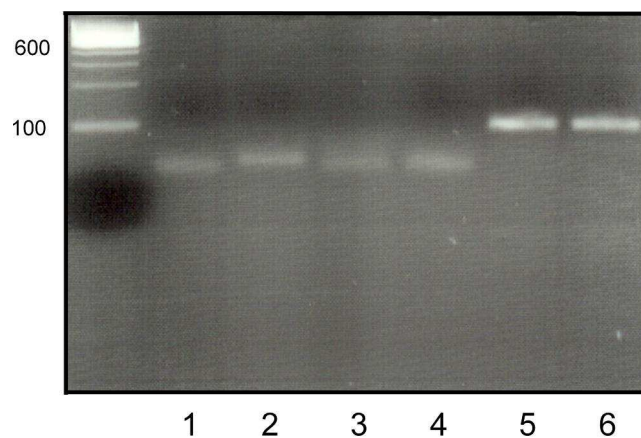


Abbildung 4.17: Die PCR mit *Gpr15*- (Lane 1-4) und *Gpr39*-Oligodesoxynukleotiden (Lane 5-6) ergibt in der hoch auflösenden gelelektrophoretischen Analyse bei der richtigen Anlagerungstemperatur nur eine distinkte Bande der richtigen Größe. Lane 1: Leerprobe; Lane 2: *Gpr15* 53°C für 35 Zyklen; Lane 3: *Gpr15* 53°C für 40 Zyklen; Lane 4: *Gpr15* 60°C für 40 Zyklen; Lane 5: *Gpr39* 55°C für 35 Zyklen; Lane 6: *Gpr39* 60°C für 35 Zyklen. Agarose-Gel 4% (Nu-Sieve, FMC Bioproducts, Rockland, USA) mit Ethidiumbromid. DNS-Größenleiter (100 bp Leiter; Life Technologies).

4.5.2 Gewebeexpression des *Gpr15* und *Gpr39* in der Maus

Für die relative Quantifizierung wurde eine Standardkurve mittels einer Verdünnungsreihe bekannter DNS-Konzentrationen hergestellt. Trägt man den Logarithmus der eingesetzten DNS-Menge gegen den in der PCR erhaltenen Ct-Wert auf, erhält man eine Standardkurve anhand deren Steigung die Amplifikationseffizienz der PCR ermittelt wird ($E=10^{-1/\text{Steigung}}$).

Für jede einzelne Reaktion der untersuchten Gewebe wird nun über den erhaltenen Ct-Wert und die bekannte Amplifikationseffizienz die DNS-Menge ermittelt (siehe Abbildungen 4.18, 4.19 und 4.20). Da bei einigen Geweben im ersten Versuch für mGpr15 nur auf einer der jeweils drei Proben ein Signal erschien, wurde ein zweiter Versuch mit mGpr15 unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurden für jeden Versuch alle Gewebe auf den jeweiligen Mittelwert des Gehirngewebes geeicht, das heisst die einzelnen Gewebe durch den Mittelwert der Transkriptmenge des Gehirngewebes dividiert. Durch diesen Schritt fällt die Einheit der Standardkurve weg. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt (GraphPadPrism4[™], San Diego, USA) (siehe Abbildungen 4.21 und 4.22). Der U-Test von Mann-Whitney, ein non-parametrischer Test zum Vergleich zweier Teilstichproben, wurde als statistischer Test angewandt. Es zeigte sich eine starke Hochregulation des mGpr39 im Gehirngewebe (siehe Abbildung 4.21). Der statistische U-Test von Mann-Whitney, angewandt auf die Gewebe von Gehirn und Hoden (ebenfalls leicht hochreguliert), ergab einen p-Wert von 0,05. Da in diesem Experiment nur drei Stichproben erhoben wurde und innerhalb der Stichproben des Hirngewebes ein Ausreißer zu finden war, wurde ein Mediantest durchgeführt, bei dem $p < 0.05$ betrug. Die Ergebnisse für mGpr15 zeigen eine starke Expression in Gehirn- und Hodengewebe (siehe Abbildung 4.22). Der exemplarisch gewählte p-Wert zwischen Gehirn- und Milzgewebe des mGpr15 ergab bei einseitiger Testung einen p-Wert von 0,0011. Dieser Wert liegt deutlich unter dem Signifikanzniveau $p < 0.05$, was die Expression von mGpr15 im Gehirngewebe bestätigt.

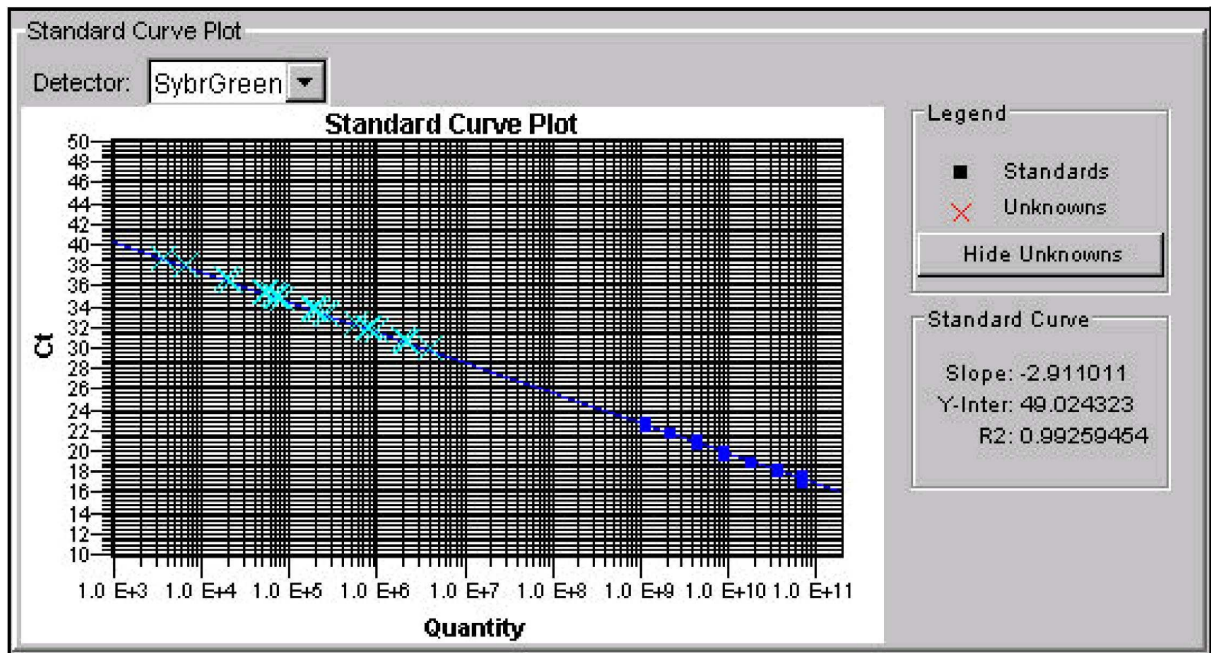


Abbildung 4.18: Verdünnungsreihe und Korrelationsgerade des mGpr15 sowie Darstellung der Ct-Werte der unbekanntem Ausgangsmengen (erster Versuch). Der Korrelationskoeffizient R2 ist in diesem Versuch 0,99.

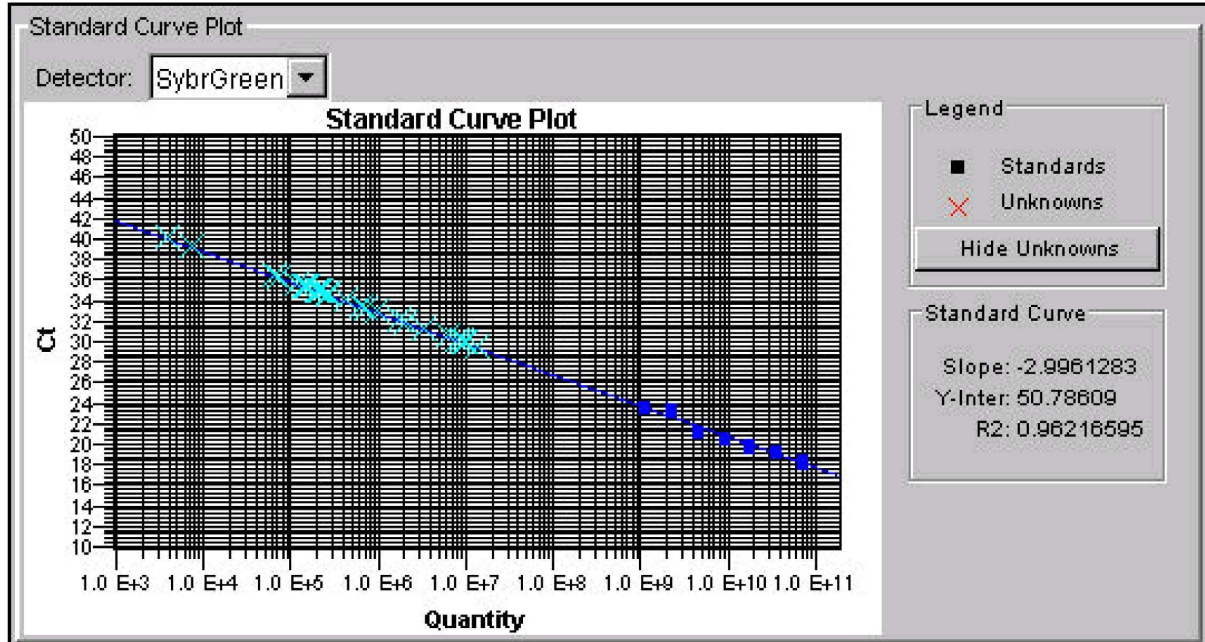


Abbildung 4.19: Verdünnungsreihe und Korrelationsgerade des mGpr15 sowie Darstellung der Ct-Werte der unbekanntem Ausgangsmengen (zweiter Versuch). Der Korrelationskoeffizient R2 ist in diesem Versuch 0,96.

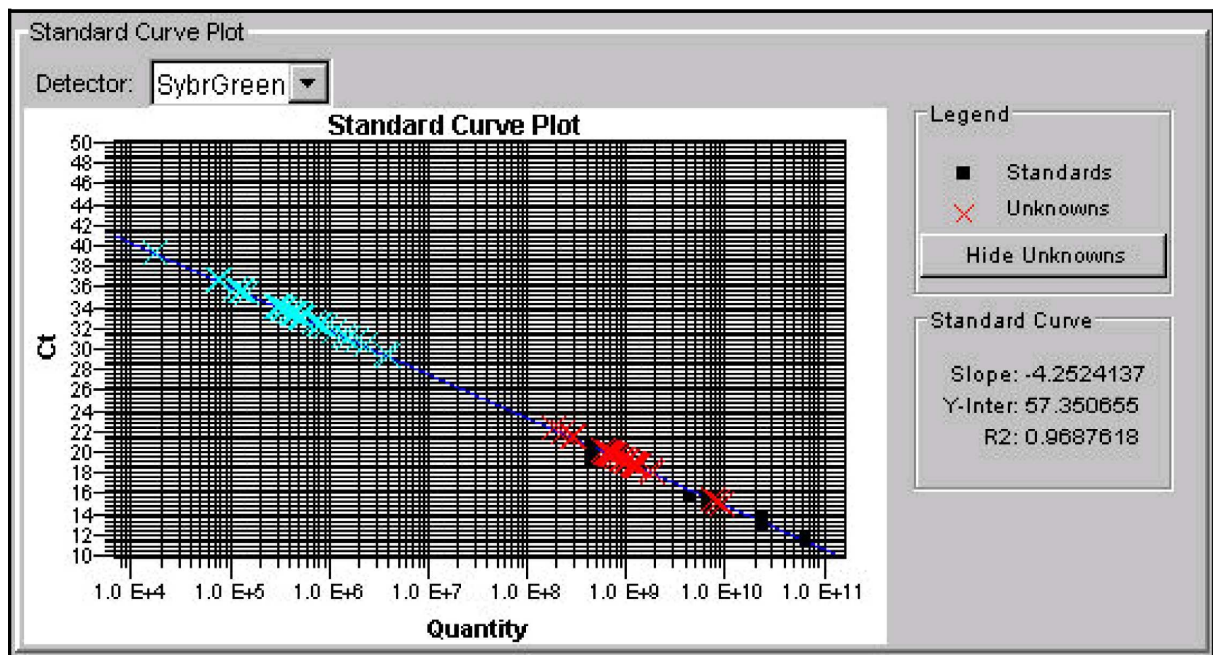


Abbildung 4.20: Verdünnungsreihe und Korrelationsgerade des Gpr39 sowie Darstellung der Ct-Werte der unbekanntem Ausgangsmengen. Der Korrelationskoeffizient R2 ist in diesem Versuch 0,97.

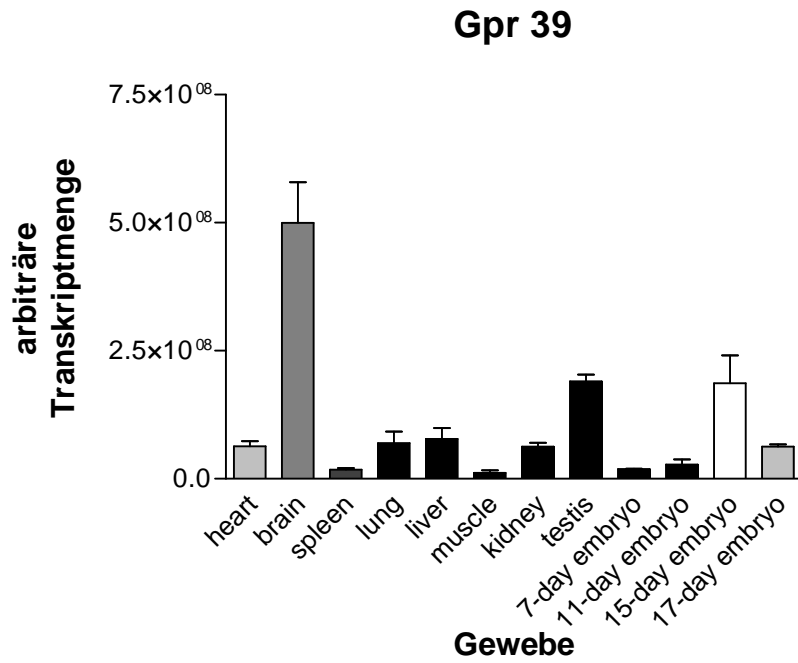


Abbildung 4.21: Expressionsunterschiede des Gpr39 in Geweben der Maus.

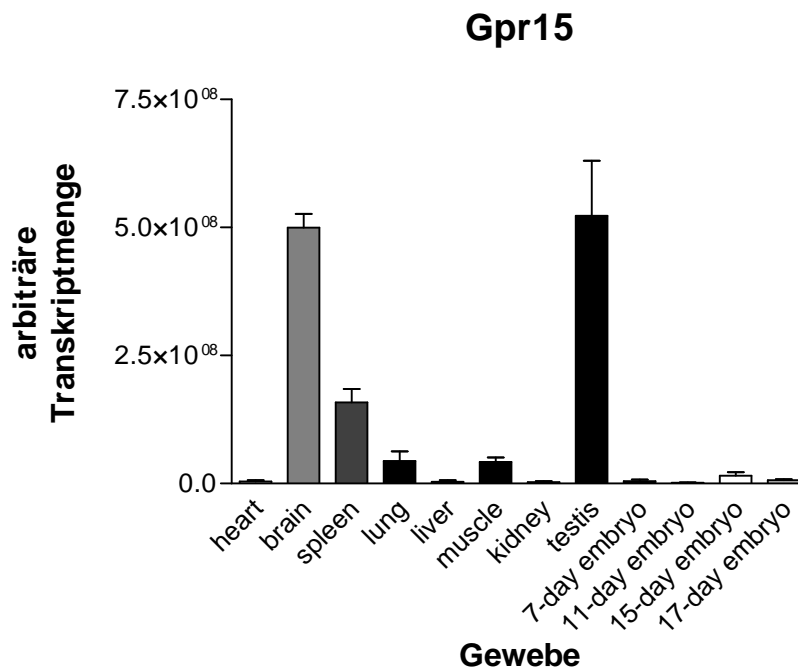


Abbildung 4.22: Expressionsunterschiede des Gpr15 in Geweben der Maus.

4.6 Oberflächenlokalisierung des mGpr39

Die Fusion von Proteinen mit Fluorophoren wie EGFP ist eine geeignete Methode, um die Verteilung dieser Proteine innerhalb der lebenden Zelle zu beobachten. EGFP ist ein Reportergen und ein Marker, der grün fluoresziert, wenn er blauem oder ultraviolettem Licht ausgesetzt wird. Transfizierte Zellen können so fluoreszenzmikroskopisch identifiziert werden.

Für die durchgeführte Elektroporation wurde ein Donorvektor (pDNR) eingesetzt, der neben EGFP auch ein synthetisches Signalpeptid (SP) sowie ein HA-tag besaß. Das HA-tag stammt von einem Epitop des Influenza-Hämagglutinin-Proteins. Wird ein Protein N- oder C-terminal mit einem HA-tag markiert, kann es mittels spezifischer Antikörper durch beispielsweise Immunblotten oder Immunfärbungen nachgewiesen werden. Signalpeptide bestimmen, neben anderen Signalbereichen, den Zielort eines Proteins in der Zelle. Handelt es sich um N-terminales Signalpeptid, wird das Protein an die Zellmembran dirigiert und das Peptid nach der Insertion des Proteins in die Membran abgespalten.

4.6.1 Plasmid-Konstruktion pDNR-SPHA-Gpr39-EGFP

Das zu transfizierende Konstrukt pDNR-SPHA-Gpr39-EGFP (siehe Material und Methoden, Kap. 3.4.1) wurde nach einem Testverdau mit EcoRI und BamHI durch ein Agarose-Gel aufgetragen, und wie erwartet fiel ein DNS-Fragment in der Größenordnung von 1400 Basenpaaren aus (siehe Abbildung 4.23).

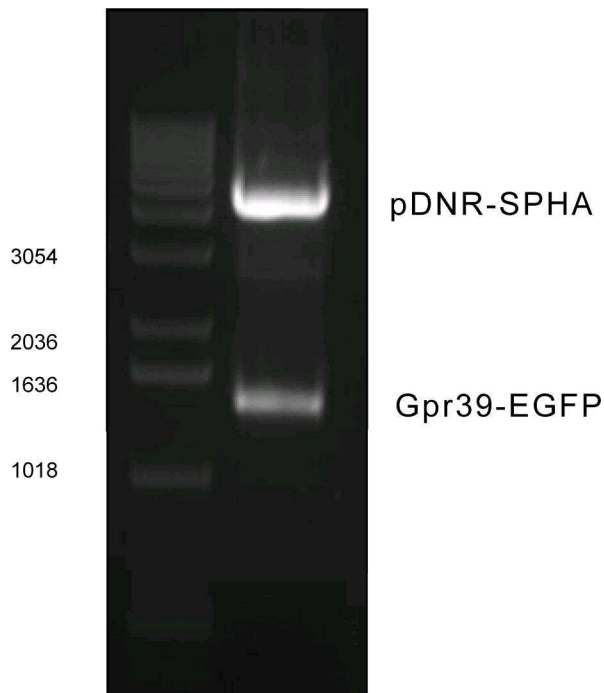
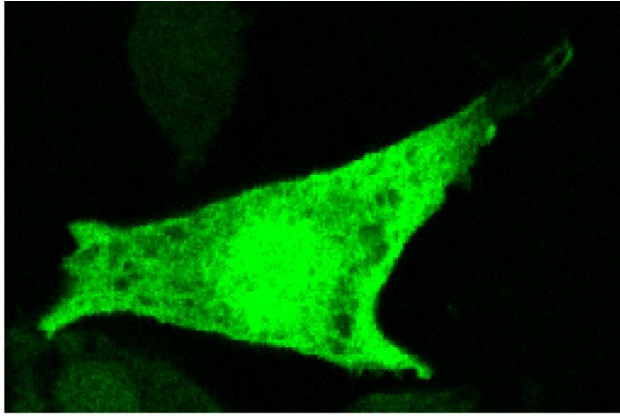


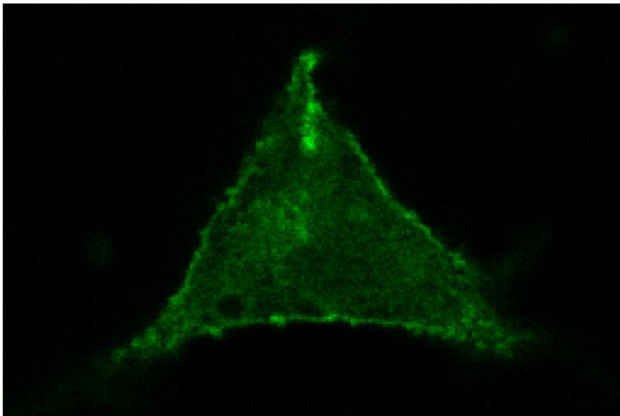
Abbildung 4.23: Testverdau des Maxis pDNR-SPHA-Gpr39-EGFP (EcoRI/ BamHI). Der Verdau zeigt eine distinkte Bande in Höhe der erwarteten Größe (Lane 1). Agarose-Gel 1% (Seakem, FMC Bioproducts, Rockland, USA) mit Ethidiumbromid. DNS-Größenleiter (1kb Leiter; Life Technologies).

4.6.2 Lokalisation des mGpr39 an der Zellmembran

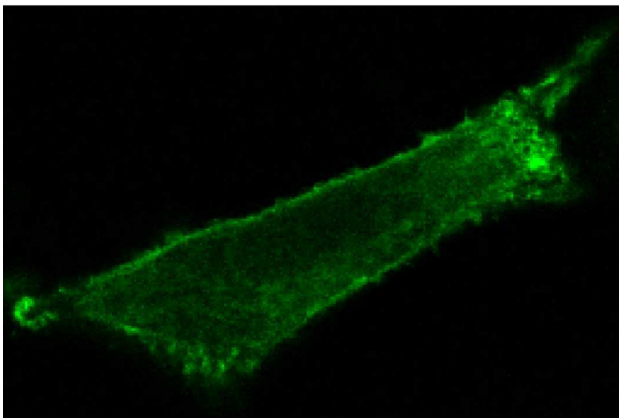
Die Expression des mGpr39, gekoppelt an einen EGFP-Donorvektor, konnte 48 Stunden nach der Transfektion an der Zellmembran bestätigt werden. Ein Signal in der Zellmembran setzte sich deutlich gegenüber der Kontrolltransfektion mit pDNR1-EGFP-N3 (siehe Material und Methoden, Kap. 3.4.1) ab, bei der ein diffuses Signal über die gesamte Zelle zu erkennen war (siehe Abbildung 4.24).



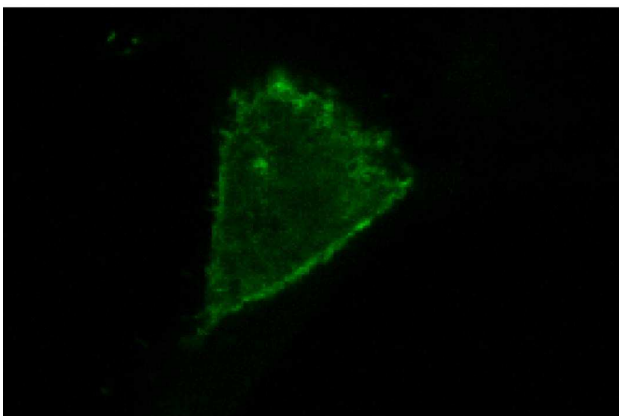
EGFP



Gpr39-EGFP



Gpr39-EGFP



Gpr39-EGFP

Abbildung 4.24: Transient mit pDNR-SPHA-Gpr39-EGFP transfizierte CHO-Zellen nach 48 Stunden. 1440-fache Vergrößerung.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die bislang unbekanntes murinen Rezeptoren Gpr15 und Gpr39 zu klonieren, ihre phylogenetische Verwandtschaft zu klären sowie ihre Gewebeexpression und Zelllokalisierung genauer zu beschreiben.

5.1 *mGpr39*

5.1.1 Struktur des mGpr39

Analysen des Gens (<http://www.expasy.org>) zeigen einen 7-Transmembranrezeptor mit Glykosylations- und Myristoylationsstellen, Proteinkinase-C- und Caseinkinase-II-Phosphorylationsstellen sowie einer cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase-Phosphorylationsstelle (siehe Abbildungen 4.6 und 4.7). Phosphoryliert werden Serin-, Threonin-, und Tyrosinreste durch Proteinkinasen. Häufig sind sie im Bereich des intrazellulären C-Terminus zu finden (Howard et al., 2001) und können unter anderem eine Desensibilisierung des Rezeptors bewirken (Hausdorff et al., 1990). Über eine G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase wird der aktivierte Rezeptor phosphoryliert. Dies wiederum führt zu einer Bindung von Arrestin (Krupnick und Benovic, 1998). Dieser Komplex zwischen phosphoryliertem Rezeptor und Arrestin verhindert eine weitere Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein und somit eine massive Zellaktivierung (Metaye et al., 2005). Der mGpr39 weist am intrazellulären C-Terminus sechs mögliche Proteinkinase-C- und vier Caseinkinase-II-Phosphorylationsstellen auf. N-Glykosylationen gehören zu einer der häufigsten post-translationalen Modifikationen der GPCRs und finden N-gebunden am terminalen Stickstoff von Asparagin statt. Die N-Glykosylationen spielen eine Rolle in der Zelloberflächenexpression der Rezeptoren (Duvernay et al., 2005). So ist zum Beispiel für den AT1R (Angiotensin-Typ-1-Rezeptor) die Glykosylierung zwingend für eine

Oberflächenexprimierung notwendig (Deslauriers et al., 1999). Zudem spielen sie eine Rolle in der Faltung des AT1R (Lanctot et al., 2005) und möglicher Weise auch bei anderen GPCRs. Die N-Glykosylationen sind bei GPCRs überwiegend in der zweiten extrazellulären Schleife lokalisiert (Lanctot et al., 2005). Auch der murine Gpr39 hat drei seiner fünf möglichen Glykosylationen im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife, also zwischen der vierten und fünften Transmembranregion (siehe Abbildung 4.6).

Myristoylation ist eine Lipidmodifikation am N-Terminus von Proteinen. Myristat, eine gesättigte Fettsäure, wird hierbei spezifisch an an Glycin gebunden (Boutin, 1997) und beeinflusst so die Interaktion zwischen Protein und Zellmembran (Resh, 2004). MGpr39 weist vier mögliche Myristoylationsstellen auf und besitzt so insgesamt also eine Reihe von Modifikationen, die typisch für GPCRs sind.

5.1.2 Antisense-Gen

Der Gpr39 ist ein Waisen-Rezeptor, dessen Maus-Sequenz zuvor nicht kloniert wurde. Um den mGpr39 zu klonieren, wurde zunächst die humane Sequenz geblastet. Zwei Exons wurden auf Chromosom 1 lokalisiert (siehe Abbildung 4.8). Um die ermittelte genomische Sequenz über ESTs zu sichern, wurde die humane Sequenz gegen Maus-ESTs geblastet. 13 Maus-ESTs wurden so gefunden. Hierbei fällt auf, dass bei einigen Maus-ESTs des zweiten Exons eine Umwandlung der Sequenz in einen Revers-Komplementstrang notwendig ist. Einige EST-Sequenzen beginnen dann mit einem Poly(T)-Schwanz, der 89 Basenpaare vor Beginn der klonierten mGpr39-Sequenz liegt (siehe Abbildung 5.1). Zu erklären wäre dies durch ein beschriebenes Gen, MGC29643, das als RNS-Antisense-Transkript des humanen Gpr39 bekannt ist (Hu et al., 2004). Das MGC29643-Gen besteht aus vier Exons und kodiert ein 165 Aminosäuren langes Protein, dessen Funktion nicht bekannt ist (Hu et al., 2004). Die Transkripte stammen von demselben Genlokus, werden allerdings in gegensätzlicher Richtung transkribiert (Hu et al., 2004). Die Transkripte überlappen sich mit 1261

Basenpaaren in der Exonregion extern des 3'-Endes (Hu et al., 2004). Ein bei den Maus-ESTs beobachteter Poly(T)-Schwanz könnte dementsprechend von einem Antisense-Transkript stammen.

gpr39 1368 bp

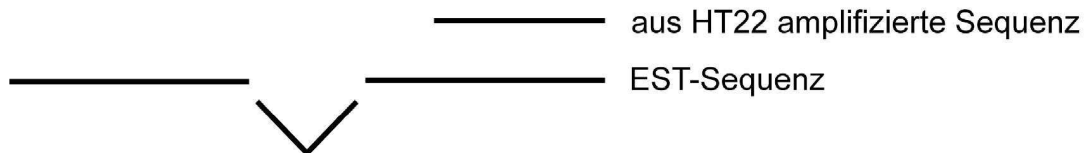


Abbildung 5.1: EST-Sequenz des mGpr39.

5.1.3 Oberflächenlokalisierung des mGpr39

Meine Ergebnisse zeigen eine Expressierung des mGpr39 48 Stunden nach transienter Transfektion an der Zellmembran. In der Literatur ist die Expression des humanen Gpr39 an der Zellmembran beschrieben (Holst et al., 2004). Um die konstitutive Internalisation zu überprüfen, wurde der humane Gpr39 am extrazellulären N-Terminus mit einem FLAG-Tag gekennzeichnet und stabil in HEK293-Zellen transfiziert. Anschließend wurde das FLAG-Tag mit M2-Antikörpern (die das FLAG-Tag erkennen) markiert. In diesen Versuchen zeigte sich der Gpr39 fast ausschließlich an der Zellmembran (Holst et al., 2004). Um die mikroskopisch dargestellten Ergebnisse zu bestätigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Western-Blot mit HA-Antikörpern angefertigt, der in Höhe von 51,5 kD eine Bande zeigt. Insgesamt ist dieser Blot jedoch nicht eindeutig zu interpretieren, so dass für weitere Untersuchungen ein Immunofärbetechnik zu empfehlen wäre. Es ist in der Literatur bekannt, dass GPCRs häufig Spleißvarianten und Modifikationen besitzen (Minneman, 2001). Auch dies könnte ein erschwertes Western-Blotten erklären. Zusammenfassend kann in diesem Experiment also die Oberflächenexpressierung des mGpr39 bestätigt werden.

5.1.4 Gewebeexpression des mGpr39

In der durchgeführten quantitativen Polymerase-Kettenreaktion wurde SYBR Green eingesetzt, ein Farbstoff, der in dsDNS interkaliert. Diese Methode ist etabliert und mehrfach beschrieben worden. Für die Bewertung der Ergebnisse müssen jedoch einige beeinflussende Faktoren berücksichtigt werden. Zum einen bindet SYBR Green unspezifisch an Doppelstrang-DNS, so dass auch Primer-Dimere und Nebenprodukte einen Fluoreszenzanstieg bewirken können. Um die Spezifität der PCR zu ermitteln wurde eine Schmelzkurve erstellt. Da kleinere PCR-Fragmente einen niedrigeren Schmelzpunkt haben, kann so nach dem letzten PCR-Zyklus die Länge der in der Reaktion amplifizierten Produkte überprüft werden. In allen drei Versuchen dieser Arbeit waren keine unspezifischen PCR-Produkte zu ermitteln.

Desweiteren ist für eine möglichst verlässliche Quantifizierung eine zuverlässige Standardverdünnung notwendig. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine photometrische Messung. Da in meinen Versuchen die Standardreihen nicht im Bereich der gemessenen Werte lagen, können kleine Schwankungen im Bereich der Standardreihe eher Auswirkungen auf die Steigung der Korrelationsgeraden und somit die ermittelten Ergebnissen haben. Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden gleiche Verdünnungsreihen erstellt und alle Messwerte dreifach bestimmt. Die Ergebnisse der quantitativen PCR zeigen eine Hochregulation des mGpr39 im Gehirngewebe der Maus, die statistisch mit $p < 0.05$ relevant ist. In der Literatur weist eine Northern-Blot-Analyse darauf hin, dass die periphere Expression des humanen Gpr39 auf Magen und Dünndarm beschränkt ist und er vermehrt im zentralen Nervensystem zu finden ist (McKee et al., 1997).

5.1.5 Phylogenetik des Gpr39

In den erstellten Bäumen zeigt sich eine verwandtschaftliche Nähe zwischen dem humanen Gpr39 und dem Gpr39 in der Maus sowie eine evolutionäre Konservierung über

verschiedenste Spezies. In der Literatur sind die Ähnlichkeiten der Sequenzen des Gpr39 in verschiedenen Spezies bislang nicht untersucht worden.

In einer Studie unserer Arbeitsgruppe (Joost und Methner, 2002) wurde der Gpr39 innerhalb der GPCRs der Gruppe A, den Rhodopsin verwandten Rezeptoren, zugeordnet (Abbildung 2.2). Mittels Datenbanksuche (Swissprot NCBI, Swiss-Prot, EMBL und GPCRDB) wurde in dieser Arbeit eine Liste mit 81 Waisen-Rezeptoren sowie 196 humanen GPCRs mit bekannten Liganden erstellt. Von diesen Sequenzen wurden die Sequenzen der 241 Rezeptoren, die den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren der Familie A angehörten, mittels PHYLIP 3.6 verglichen und ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Anhand dieses Baumes wurden 19 Untergruppen der Familie A eingeteilt. Gpr39 gehört hierbei in eine Untergruppe, die Peptide bindet. Zu diesen Peptidliganden zählen Neuromedin, Neurotensin, Motilin, Endothelin, Bombesin und die Releasing-Hormone für Growth Hormon (GH) und Thyreotropin. Gpr39 könnte diesem Stammbaum zufolge also kleine Peptide binden, so wie die ihm verwandten Neurotensin-Rezeptoren NTR1 und -2.

Initial wurde der humane Gpr39 über den GHSR (Growth Hormone Secretagogue Receptor) identifiziert (McKee et al., 1997). Bereits bei McKee et al. wurde der Gpr39 über Nukleotid-Sequenzanalysen dem NTR1 und GHSR zugeordnet. Zwei Jahre später wurde Ghrelin, ein GHSR bindendes Peptid identifiziert (Kojima et al., 1999). In einem Paper von 2004 wurde der Gpr39 schließlich in einem phylogenetischen Stammbaum dargestellt und verwandschaftliche Beziehungen zwischen dem Ghrelin-Rezeptor, dem humanen Gpr39, Neurotensin-Rezeptor-1 und -2, sowie Neuromedin-U-Rezeptor-1 und -2 aufgezeigt (Holst et al., 2004). Auch in den phylogenetischen Bäumen, die unsere Arbeitsgruppe erstellt hat, zeigt sich diese verwandschaftliche Nähe zwischen Gpr39, GHSR und Neurotensin (siehe Abbildung 2.2).

Der in dieser Arbeit erstellte Baum des Gpr39 (siehe Abbildung 4.15) offenbart also eine große verwandschaftliche Nähe zwischen Mensch und Maus, was ein Hinweis darauf sein kann, dass die für die Maus erzielten Ergebnisse eine Relevanz für den Menschen haben

sowie eine hohe evolutionäre Konservierung. Weitere phylogenetische Analysen legen zudem nahe, dass der Gpr39 ebenso wie die verwandten Rezeptoren durch kleine Peptide aktiviert wird (Zhang et al., 2005).

5.1.6 Signalweg

Heterotrimere GTP bindende Proteine – auch G-Proteine genannt – bestehen aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit. Sie werden anhand der α -Untereinheit in die vier Proteinfamilien G_s , G_i , $G_{q/11}$, $G_{12/13}$ eingeteilt, die über inhibierende oder aktivierende Signalwege wirken (Howard et al., 2001). Um die Funktion eines Rezeptors zu verstehen, ist es von Interesse, den Signalweg, über den ein Rezeptor aktiviert wird und wirkt, zu kennen. Unsere Arbeitsgruppe hat die chronisch glutamatresistenten HT22-Zellen, in denen auch der Gpr39 hochreguliert war, verschiedenen Toxinen, wie CTX (Choleratoxin), PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) und PTX (Pertussistoxin), ausgesetzt, die die Glutamatsensitivität herabgesetzt haben und protektive Wirkung durch Hemmung des $G_{i/o}$ gekoppelten oder durch Aktivierung des G_s - und G_q -Signalwegs gezeigt haben (Habilitation Axel Methner). Holst et al. haben sich in einem Paper, das die konstitutive Aktivität behandelt, bereits mit dem Signalweg des humanen Gpr39 beschäftigt (Holst et al., 2004). Um den Weg der transkriptionellen Regulation des humanen Gpr39 zu untersuchen, wurden Experimente mit HEK293-Zellen durchgeführt, die zuvor mit Gpr39 transient transfiziert worden waren. In diesen Experimenten zeigt der Gpr39 seine höchste Aktivität, wenn er über den Serum-Response-Element-Weg aktiviert wird (Holst et al., 2004). Pertussistoxin hingegen, das den Signalweg über G_i inhibiert, erzielt keinerlei Änderung in der Signalvermittlung (Holst et al., 2004). Bei der Verwendung eines Rho-Kinase-Inhibitors wird die SRE- Aktivität um mehr als 60% gesenkt (Holst et al., 2004). Da $G_{\alpha_{12/13}}$ häufig funktionell an die Rho-Kinase gekoppelt ist, können diese Versuche als Hinweis auf dieses G-Protein-System angesehen werden.

Zusammenfassend gibt es demnach in der Literatur überzeugende Hinweise, dass der Gpr39 über den G_{12/13}-, G_s- oder G_q-Signalweg aktiviert wird.

5.1.7 Konklusion

Die hier durchgeführten Versuche zeigen, dass der mGpr39 in der Zellmembran lokalisiert ist und hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird. Folgeversuche unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass eine transiente Überexpression des mGpr39 im Zellversuch vor Glutamattoxizität schützt. Dies stützt die Hypothese, dass der hochregulierte Rezeptor protektive Signalvermittlungswege aktiviert. Diese Aktivierung kann entweder konstitutiv oder durch Ligandenbindung stattfinden. Ziel weiterer Experimente können nun zum einen Erkenntnisse über den Signalweg sowie zum anderen die Identifizierung des Liganden sein, um möglicherweise in Zukunft pharmakologische Angriffspunkte bei der Behandlung neurodegenerativer oder zerebraler Ischämie zu erhalten.

5.2 mGpr15

In dieser Arbeit wurde der 1080 Basenpaare lange mGpr15 kloniert, der auf Chromosom 16 lokalisiert ist und ohne Intron ein 360 Basenpaare langes Protein mit einem Molekulargewicht von 40541.22 Daltons kodiert.

5.2.1 Phylogenetik und Struktur des Gpr15

Der Gpr15 ist ein Waisen-Rezeptor, also ein Rezeptor, dessen Ligand nicht bekannt ist. In den in meiner Arbeit erstellten Bäumen, welche die verwandtschaftliche Nähe des Gpr15 zwischen den verschiedenen Spezies darstellen, ist der Gpr15 in der Maus am engsten mit dem Rezeptor der Ratte verwandt (siehe Abbildung 4.16). Der nächste abzweigende Ast führt zu Mensch und Affe. Innerhalb der GPCRs gehört der Gpr15 strukturell zur Rezeptorgruppe

A, d.h. zu den rhodopsinverwandten Rezeptoren (Joost und Methner, 2002), und wird der Untergruppe zugeordnet, die Angiotensin, Bradykinin und Apelin bindet (Abbildung 2.1). In seiner Funktion ähnelt der Gpr15 jedoch den Chemokin-Rezeptoren, die genau wie Gpr15 Co-Rezeptoren für HIV sind (Deng et al., 1997). Von Farzan et al. wird diskutiert, ob der Gpr15 der Familie der Chemokin-Rezeptoren angehört. Ihm fehlt allerdings Cystein in der N-terminalen Region und ebenso an der dritten extrazellulären Schleife, wo Cystein bei den Chemokin-Rezeptoren Disulfid gebunden ist (Farzan et al., 1997). Jedoch weist der Gpr15 an seinem NH₂-Terminus drei Tyrosin-Aminosäuren auf, die als Motiv auch bei den HIV-Co-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 zu finden sind (Farzan et al., 1997). Veränderungen dieser Tyrosine zeigen für CCR5 eine niedrige Effizienz beim Eindringen des HI-Virus in die Zelle (Farzan, unveröffentlichte Beobachtungen) und könnten somit auch für Gpr15 eine Bedeutung für das Eindringen des HI-Virus in die Zelle haben. Desweiteren zeigt der Gpr15 mögliche Phosphorylations-, N-Glykosylations- und Myristoylationsstellen (siehe Abbildung 4.11 und zur Erläuterung Kap. 5.1.1).

Für eine mögliche Identifizierung des Liganden ist es von Bedeutung, dass der Rezeptor den gleichen Verwandtschaftsgrad zum Apelin-Rezeptor wie zu den Angiotensin- und Bradykinin-Rezeptoren aufweist. Es könnte also sein, dass er ebenfalls kleine Peptide bindet. Da der APJ-Rezeptor genau wie der Gpr15 ein Co-Rezeptor für das HI-Virus ist (Choe et al., 1998), wäre dies ein Hinweis auf eine strukturelle Ähnlichkeit der Liganden (Joost und Methner, 2002). Ebenso wäre es möglich, dass der Gpr15 ähnliche Liganden bindet, wie die ihm funktionell nahestehenden Chemokin-Rezeptoren.

5.2.2 Gewebeexpression des Gpr15

In der quantitativen PCR dieser Arbeit ist der mGpr15 in der Maus am häufigsten im Gehirngewebe zu finden. In der Literatur ist die Expression des Gpr15 im Gehirn bisher nicht beschrieben worden.

Gpr15, der 1996 als G-Protein gekoppelter Rezeptor über Sequenzähnlichkeiten eines opioidverwandten Rezeptors identifiziert wurde (Heiber et al., 1996), ist ein Jahr später unter dem Namen BOB als Co-Rezeptor für SIV, HIV-1 und -2 isoliert worden (Deng et al., 1997). Human- und Simian-Immundeficiency-Viren (HIV und SIV) infizieren die Zielzellen durch Interaktion mit CD4-Rezeptoren und weiteren Co-Rezeptoren. Letztere sind hauptsächlich Chemokin-Rezeptoren. CCR5 und CXCR4 sind die ersten Chemokin-Rezeptoren, deren Funktion als Co-Rezeptoren für HIV und SIV bekannt wurde (Davis et al., 1997). Gpr15 ist ebenfalls ein wichtiger Co-Rezeptor für SIV (Kuhmann et al., 2001), einer der drei wichtigsten Co-Rezeptoren für HIV-2 und ebenfalls ein Co-Rezeptor für HIV-1, wobei jedoch nur wenige HIV-1 Varianten überhaupt andere Co-Rezeptoren als CCR5 nutzen (Blaak et al., 2005). Die Expression des humanen Gpr15 ist bisher in Zellen und Organen des Abwehrsystems wie CD4-T-Lymphozyten, Makrophagen (Farzan et al., 1997), peripheren Blut-Leukozyten, Milz und Thymus beschrieben sowie in Leber, Prostata, Hoden, Dünndarm- und Kolonmukosa (Deng et al., 1997; Clayton et al., 2001).

Dass die Expression des humanen Gpr15 im Gehirn in der Literatur bisher nicht beschrieben worden ist, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist die Aussagekraft zumindest eines der zwei bislang veröffentlichten humanen Blots kritisch zu beurteilen. In der Arbeit von Deng (Deng et al., 1997) ist auf dem Northern-Blot bei allen acht untersuchten humanen Gewebearten keine Bande zu sehen. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Blot nicht aussagekräftig ist, besteht. Desweiteren könnten die unterschiedlich groß ausgeprägten Gehirnteile beim Menschen und bei der Maus – etwa das proportional größere Großhirn des Menschen - zu einer geringeren Konzentration des Gpr15 im getesteten Gesamtgehirngewebe

führen. Schließlich wäre die Diskrepanz auch durch eine grundsätzlich unterschiedliche Expression bei verschiedenen Spezies zu erklären.

Im Dünndarm ist der Gpr15 an der basalen Seite des Epithels lokalisiert (Clayton et al., 2001). Eine Aktivierung des Rezeptors durch gp120, ein HIV-Oberflächenprotein, wird als Ursache der HIV-Enteropathie in Betracht gezogen (Clayton et al., 2001). In den Versuchen von Clayton et al. wurden zudem die durch gp120 induzierten Zelleffekte durch Perussistoxin und U73122 inhibiert (Clayton et al., 2001). Sollte die Signalvermittlung des gp120 also durch Gpr15 stattfinden, sind dies Hinweise für einen G_i - und G_q -Protein gekoppelten Signalweg des Gpr15/BOB.

Zusammenfassend ist also in dieser Arbeit mittels quantitativer PCR eine erhöhte Expression des in den Vorversuchen hochregulierten mGpr15 im Gehirngewebe nachgewiesen worden. In der Literatur ist von dem bislang wenig erforschten Rezeptor die Expression vor allem in lymphoidem Gewebe bekannt sowie seine Eigenschaft als Co-Rezeptor für HIV und SIV. Weitere Versuche, um eine mögliche neuroprotektive Funktion zu untersuchen, und eine anschließende Ligandenidentifizierung stehen aus.

5.3 *hVPAC₂-Rezeptor*

VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) ist ein aus 28 Aminosäuren bestehender Neurotransmitter, der im peripheren sowie zentralen Nervensystem zu finden ist. Zu den mit VIP strukturell verwandten Peptiden gehört u.a. PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide). Beide Transmitter binden die Rezeptoren VPAC₁- und -₂ (Vasoactive Intestinal Polypeptide/Pituitary Adenylate Cyclase-Aktivating Polypeptide) und gehören in die Rezeptorfamilie B, deren Mitglieder von großen Peptiden wie Sekretin aktiviert werden (Nicole et al., 2000). VPAC-Rezeptoren besitzen einige gemeinsame molekulare Eigenschaften mit anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren für Peptide, so etwa eine lange

N-terminale extrazelluläre Domäne, eine N-terminale hydrophobische Region, sechs stark konservierte Cystein-Residuen, multiple N-Glykosylationsstellen sowie 83 stark konservierte Aminosäureresiduen, die in allen Rezeptoren der Familie vorhanden sind (Laburthe und Couvineau, 2002). Zelluläre Effekte von VIP sind im kardiovaskulären System, in Lunge, Immunsystem, endokrinen Drüsen und Gehirn beschrieben (Said, 1986). Es ist zudem bekannt, dass VIP im ZNS u.a. neuroprotektive Effekte induziert (Gressens, 1999; Offen et al., 2000; Delgado und Ganea, 2003). VPAC-Rezeptoren sind überwiegend an ein $G_{\alpha s}$ -Protein gekoppelt (Harmar et al., 1998), können aber ebenfalls an G_q - und G_i -Proteine gekoppelt sein (Olah et al., 1994; Langer et al., 2001). Im Gehirn kommt der VPAC₁-Rezeptor vor allem im cerebralen Cortex und Hippocampus vor und in der Peripherie in Leber und Darm (Usdin et al., 1994). Der VPAC₂-Rezeptor wird insbesondere in Cortex, Hippocampus, cerebellarem Cortex, Hypothalamus und Hirnstamm exprimiert (Usdin et al., 1994; Sheward et al., 1995; Joo et al., 2004) sowie im Nucleus Suprachiasmaticus, wo er eine Rolle bei der circadianen Uhr spielt (Harmar et al., 2002). Im peripheren Gewebe wird der VPAC₂-Rezeptor hauptsächlich in glatter Muskulatur, der basalen Mukosa des Kolon, Lunge, Niere und Retina exprimiert (Harmar et al., 2004).

Zusammenfassend ist in der Literatur die Expression des VPAC₂-Rezeptors im Hippocampus sowie eine neuroprotektive Wirkung von VIP bekannt. Der in den Vorversuchen in chronisch glutamatresistenten HT22-Zellen hochregulierte Rezeptor wurde in dieser Arbeit kloniert, u.a. mit dem weiteren Ziel, den VPAC₂-Rezeptor und den bekannten neuroprotektiven Transmitter VIP als Positivkontrolle für nachfolgende Versuche zu nutzen.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die in den chronisch glutamatresistenten HT22-Zellen hochregulierten G-Protein gekoppelten Rezeptoren zu klonieren und die zwei Waisen-Rezeptoren Gpr39 und Gpr15, also Rezeptoren, deren Liganden unbekannt sind, genauer zu charakterisieren. Da die Sequenzen des Gpr39 und Gpr15 in der Maus nicht bekannt waren, wurden die vermutlichen Gene über die DNS-Sequenz der bekannten humanen Rezeptoren in der genomischen Datenbank der Maus (Ensembl BLAST 2.0) identifiziert und auf den ermittelten Sequenzen Primer zur Amplifizierung der Rezeptoren konstruiert. Die Primer für den VPAC₂-Rezeptor wurden auf der humanen cDNS-Sequenz erstellt (Accession L40764; gi:712836). Alle drei Sequenzen wurden in einen Donorvektor kloniert. Zur Oberflächenlokalisierung in der Zelle wurde Gpr39 an EGFP gekoppelt und transient in CHO-Zellen transfiziert. In den erstellten phylogenetischen Stammbäumen für Gpr15 und Gpr39 weisen beide Rezeptoren eine hohen Verwandtschaftsgrad zwischen Maus und Mensch auf sowie eine evolutionäre Konservierung. Um die Expression in den verschiedenen Geweben der Maus zu untersuchen, wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Sowohl mGpr39 als auch mGpr15 werden demnach unter anderem erhöht im Gehirngewebe exprimiert. Sollte sich in weiteren Versuchen die Beobachtung bestätigen, dass die in den Vorversuchen hochregulierten und in dieser Arbeit klonierten Rezeptoren vor oxidativem Stress schützen, könnten sie möglicherweise ein wichtiger therapeutischer Angriffspunkt bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen und zerebralen Ischämien werden.

7 Literaturverzeichnis

- Baldwin JM (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J* 12 (4): 1693-1703.
- Bartfai T, Benovic JL, Bockaert J, Bond RA, Bouvier M, Christopoulos A, Civelli O, Devi LA, George SR, et al. (2004). G-protein-coupled receptors: the devil is in the detail. *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 577-626.
- Blaak H, Boers PHM, Gruters A, Schuitemaker H, van der Ende ME und Osterhaus ADME (2005). CCR5, GPR15, and CXCR6 are major coreceptors of human immunodeficiency virus type 2 variants isolated from individuals with and without plasma viremia. *J Virol* 79 (3): 1686-1700.
- Bockaert J und Pin JP (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors an evolutionary success. *EMBO J* 18 (7): 1723-1729.
- Boutin JA (1997). Myristoylation. *Cellular Signalling* 9 (1): 15-35.
- Choe H, Farzan M, Konkel M, Martin K, Sun Y, Marcon L, Cayabyab M, Berman M, Dorf ME, et al. (1998). The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72 (7): 6113-6118.
- Choi DW, Maulucci-Gedde M und Kriegstein AR (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7 (2): 357-368.
- Clayton F, Kotler DP, Kuwada SK, Morgan T, Stepan C, Kuang J, Le J und Fantini J (2001). Gp120-induced Bob/GPR15 activation: A possible cause of human immunodeficiency virus enteropathy. *Am J Pathol* 159 (5): 1933-1939.
- Davis CB, Dikic I, Unutmaz D, Hill CM, Arthos J, Siani MA, Thompson DA, Schlessinger J und Littman DR (1997). Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J Exp Med* 186 (10): 1793-1798.

- Delgado M und Ganea D (2003). Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *FASEB J*: 02-0799fje.
- Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN und Littmann DR (1997). Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 388: 296-300.
- Deslauriers B, Ponce C, Lombard C, Larguier R und Marie J (1999). N-glycosylation requirements for the AT1a Angiotensin II receptor delivery to the plasma membrane. *Biochem J* 339 (0264-6021): 397-405.
- Duvernay MT, Filipeanu CM und Wu G (2005). The regulatory mechanisms of export trafficking of G protein-coupled receptors. *Cellular Signalling* 17 (12): 1457-1465.
- Farzan M, Choe H, Martin K, Marcon L, Hofmann W, Karlsson G, Sun Y, Barrett P, Marchand N, et al. (1997). Two orphan seven-transmembrane segment receptors which are expressed in CD4-positive cells support simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med* 186 (3): 405-411.
- Fonnum F (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42 (1): 1-11.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin L und Schioth HB (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63 (6): 1256-1272.
- Gressens P (1999). VIP neuroprotection against excitotoxic lesions of the developing mouse brain. *Ann NY Acad Sci* 897 (1): 109-124.
- Harmar A, Marston H, Shen S, Spratt C, West K, Sheward W, Morrison C, Dorin J, Piggins H, et al. (2002). The VPAC2 receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell Press* 109 (4): 497-508.

- Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, et al. (1998). International union of pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev* 50 (2): 265-270.
- Harmar AJ, Sheward WJ, Morrison CF, Waser B, Gugger M und Reubi JC (2004). Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinology* 145 (3): 1203-1210.
- Hausdorff WP, Caron MG und Lefkowitz RJ (1990). Turning off the signal: Desensitization of [beta]-adrenergic receptor function. *FASEB J* 4 (11): 2881-2889.
- Heiber M, Marchese A, Nguyen T, Heng HHQ, George SR und O'Dowd BF (1996). A novel human gene encoding a G-protein-coupled receptor (Gpr15) is located on chromosome 3. *Genomics* 32 (3): 462-465.
- Holst B, Holliday ND, Bach A, Elling CE, Cox HM und Schwartz TW (2004). Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem* 279 (51): 53806-53817.
- Hossmann KA (1994). Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol* 4 (1): 23-36.
- Howard AD, McAllister G, Feighner SD, Liu Q, Nargund RP, Van der Ploeg LHT und Patchett AA (2001). Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol Sci* 22 (3): 132-140.
- Hu X, Hipolito S, Lynn R, Abraham V, Ramos S und Wong-Staal F (2004). Relative gene-silencing efficiencies of small interfering RNAs targeting sense and antisense transcripts from the same genetic locus. *Nucleic Acids Res* 32 (15): 4609-4617.
- Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH und Cha C (2004). Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

- receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol* 476 (4): 388-413.
- Joost P und Methner A (2002). Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. *Genome Biol* 3 (11): research0063.1 - research0063.16.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H und Kangawa K (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402 (6762): 656-660.
- Kolakowski LFJ (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept Channels* 2: 1-7.
- Krupnick JG und Benovic JL (1998). The role of receptor kinases and arrestins in g protein coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38 (1): 289-319.
- Kuhmann SE, Madani N, Diop OM, Platt EJ, Morvan J, Müller-Trutwin MC, Barré-Sinoussi F und Kabat D (2001). Frequent substitution polymorphisms in african green monkey CCR5 cluster at critical sites for infections by simian immunodeficiency virus SIVagm, implying ancient virus-host coevolution. *J Virol* 75 (18): 8449-8460.
- Laburthe M und Couvineau A (2002). Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regul Pept* 108: 165-173.
- Lanctot P, Leclerc P, Clément M und Auger-Messier M (2005). Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor. *Biochem J* 390 (1470-8728): 367-376.
- Langer I, Perret J, Vertongen P, Waelbroeck M und Robberecht P (2001). Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates [Ca²⁺]_i and cyclic AMP in CHO cells expressing Ga16. *Cell Calcium* 30 (4): 229-234.

- Lewerenz J, Letz J und Methner A (2003). Activation of stimulatory heterotrimeric G proteins increases glutathione and protects neuronal cells against oxidative stress. *J Neurochem* 87 (2): 522-31.
- Li Y, Maher P und Schubert D (1997a). Requirement for cGMP in nerve cell death caused by glutathione depletion. *J Cell Biol* 139 (5): 1317-24.
- Li Y, Maher P und Schubert D (1997b). A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron* 19 (2): 453-63.
- Maher P (2001). How protein kinase C activation protects nerve cells from oxidative stress-induced cell death. *J Neurosci* 21 (9): 2929-2938.
- McKee KK, Tan CP, Palyha OC, Liu J, Feighner SD, Hreniuk DL, Smith RG, Howard AD und Van der Ploeg LHT (1997). Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics* Volume 46 (Issue 3): Pages 426-434.
- Metaye T, Gibelin H, Perdrisot R und Kraimps J-L (2005). Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 17 (8): 917-928.
- Minneman KP (2001). Splice variants of GPCRs. *Mol Interv* 1 (2): 108-116.
- Nicole P, Lins L, Rouyer-Fessard C, Drouot C, Fulcrand P, Thomas A, Couvineau A, Martinez J, Brassuer R, et al. (2000). Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 275 (31): 24003-24012.
- Offen D, Sherki Y, Melamed E, Fridkin M, Brennemann DE und Gozes I (2000). Vasoactive intestinal peptide prevents neurotoxicity in neuronal cultures: relevance to neuroprotection in Parkinson's disease. *Brain Res* 854: 257-262.

- Olah Z, Lehel C, Anderson WB, Brenneman DE und van Agoston D (1994). Subnanomolar concentration of VIP induces the nuclear translocation of protein kinase C in neonatal rat cortical astrocytes. *J Neurosci Res* 39 (4): 355-363.
- Resh MD (2004). Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem* 37: 217-232.
- Ririe KM, Rasmussen RP und Wittwer CT (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245 (2): 154-160.
- Said SI (1986). Vasoactive intestinal peptide. *J Endocrinol Investig* 9: 191-200.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J und Dichgans J (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267 (16): 4904-11.
- Sheward WJ, Lutz EM und Harmar AJ (1995). The distribution of vasoactive intestinal peptide₂ receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization. *Neuroscience* 67 (2): 409-418.
- Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P und Schubert D (1998). The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 141 (6): 1423-32.
- Tan S, Somia N, Maher P und Schubert D (2001). Regulation of antioxidant metabolism by translation initiation factor 2alpha. *J Cell Biol* 152 (5): 997-1006.
- Usdin TB, Bonner TI und Mezey E (1994). Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 135 (6): 2662-2680.
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, et al. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *PNAS* 100 (8): 4903-4908.
- Wise A, Jupe SC und Rees S (2004). The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44 (1): 43-66.

Zhang JV, Ren P-G, Avsian-Kretchmer O, Luo C-W, Rauch R, Klein C und Hsueh AJW (2005). Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310 (5750): 996-999.

8 Anhang

8.1 Konstrukte

Folgende Konstrukte wurden u.a. in dieser Arbeit verwendet und konstruiert:

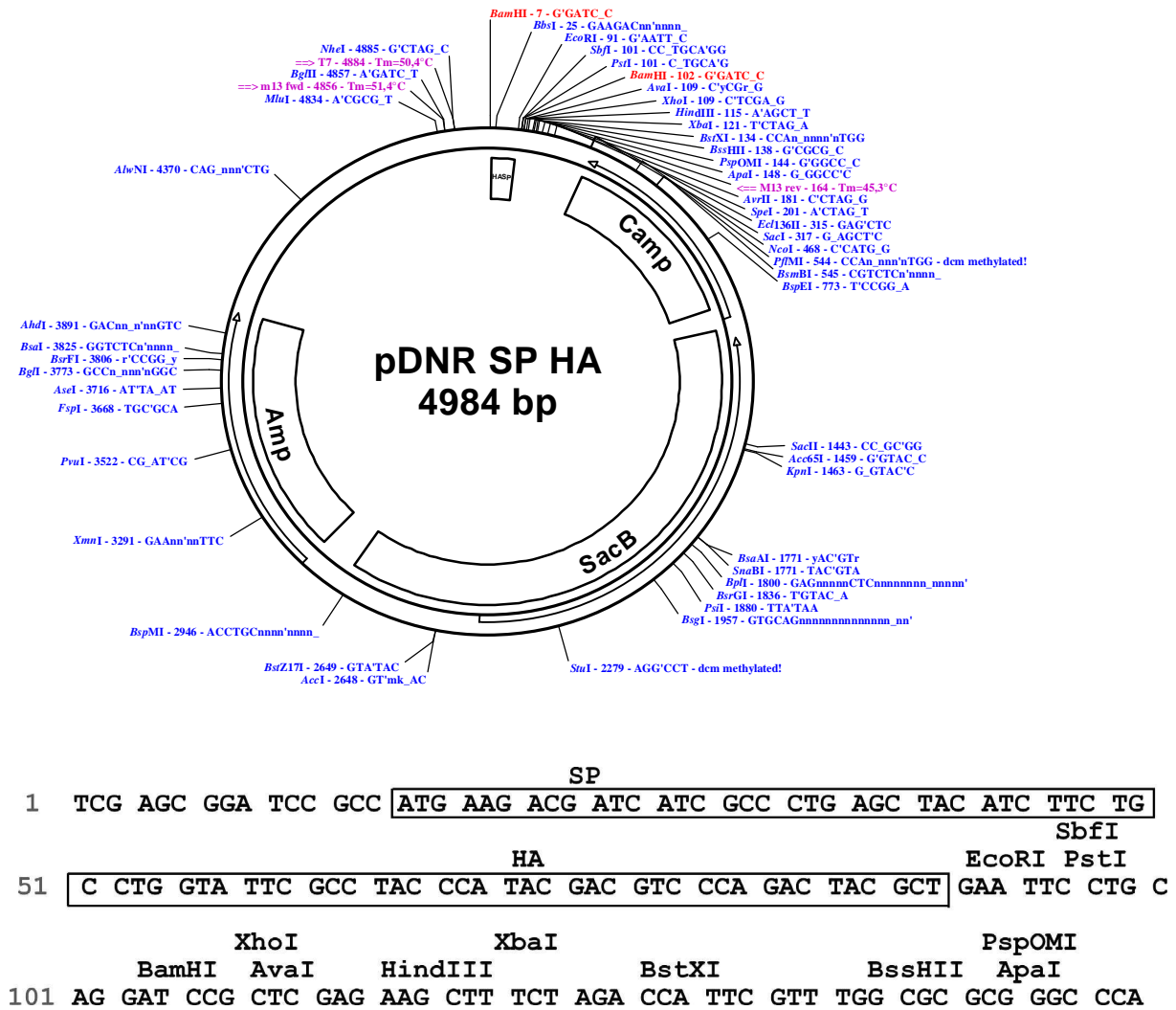


Abbildung 8.1.1: Donorvektor pDNR-SPHA mit Detaildarstellung der SPHA-Sequenz (siehe Material und Methoden, Kap. 3.2.11; Amp: Ampicillinresistenz; Camp: Campicillinresistenz; SacB: Bacillus subtilis Levansucrase-Gen).

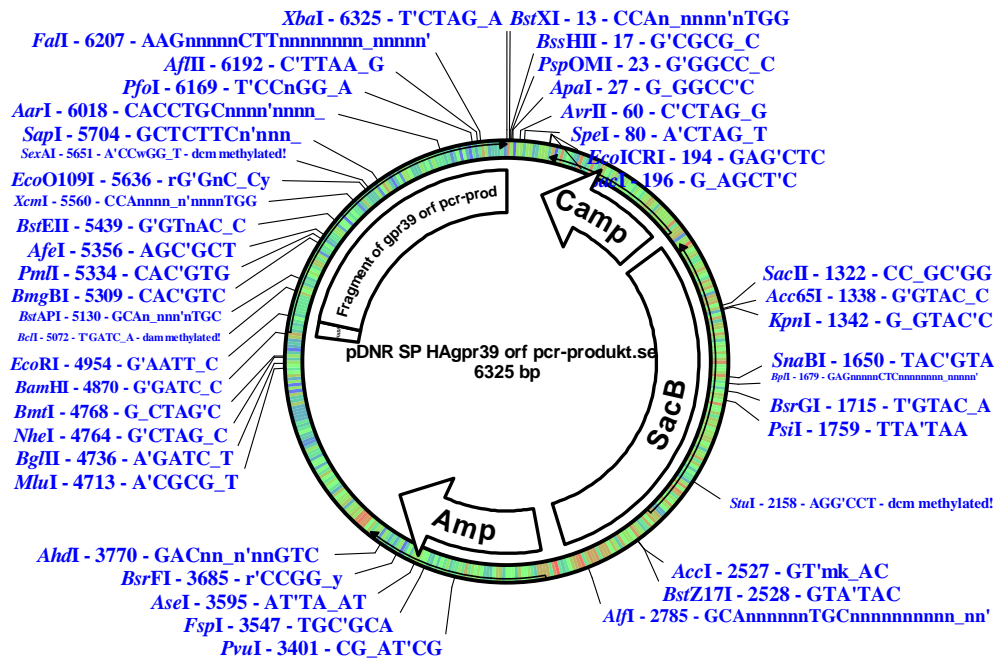


Abbildung 8.1.2: pDNR-SPHA-Gpr39 (siehe Material und Methoden, Kap. 3.3.1).

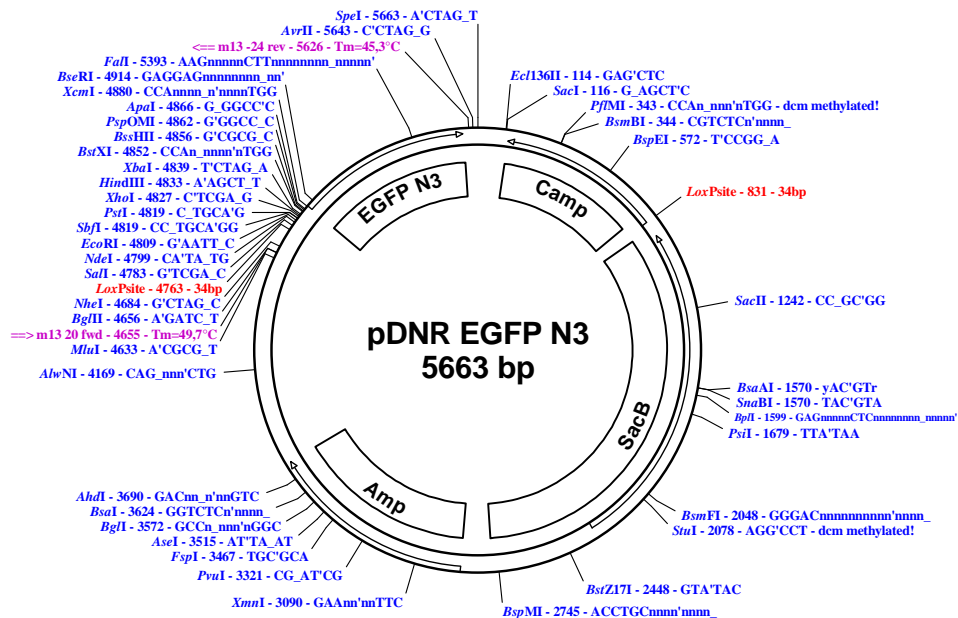


Abbildung 8.1.3: pDNR1-EGFP-N3 (siehe Material und Methoden, Kap. 3.4.1).

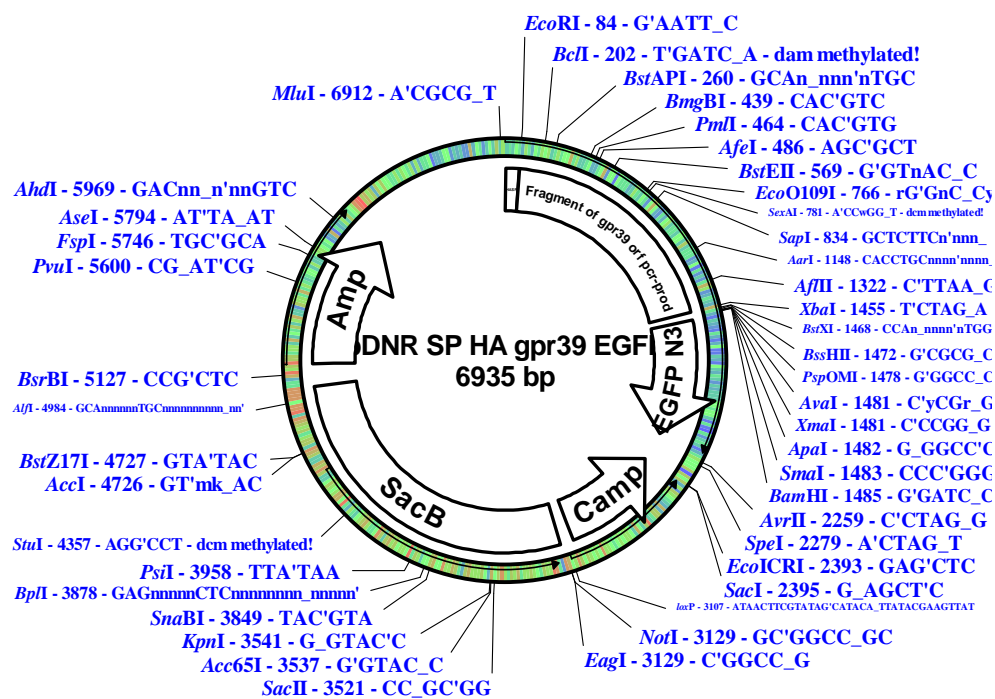


Abbildung 8.1.4: pDNR-SPHA-Gpr39-EGFP (siehe Material und Methoden, Kap. 3.4.1).

8.4 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Berlin, den 22.03.2006

Anna Pantlen