

**Der PAC1-Rezeptor:
Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle und
Untersuchungen zum Einfluss auf die α -Sekretase**

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Corinna Buro

geboren in Aschersleben

Mainz 2001

Tag der Prüfung: Januar 2002

Für meine Eltern, Andrea
und Armin.

Jedes Wissen birgt neue Fragen.

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>VI</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VII</i>
<i>1. Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1 Allgemeines	1
1.2. Das Pituitary Adenylate Cyclase Activating-Polypeptide (PACAP)	3
1.3. Die PACAP-Rezeptoren	4
1.4. Physiologische Wirkungen des PACAP/PAC1-Rezeptor – Systems	7
1.5. G-Protein gekoppelte Rezeptoren in der Alzheimer-Thematik	8
1.6. Zielsetzung	10
<i>2. Material und Methoden</i>	<i>11</i>
2.1. Material	11
2.1.1. <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	11
2.1.2. <i>Sonstige Materialien</i>	13
2.1.3. <i>Geräte</i>	13
2.1.4. <i>Standards und Kits</i>	15
2.1.5. <i>Peptide</i>	15
2.1.6. <i>Enzyme</i>	16
2.1.7. <i>Restriktionsenzyme</i>	16
2.1.8. <i>Antikörper</i>	16
2.1.9. <i>Verwendete Organismen</i>	17
2.1.10. <i>Plasmide</i>	17
2.1.11. <i>Medien</i>	18
2.1.12. <i>Puffer und Lösungen</i>	20
2.2. Methoden	25
2.2.1. <i>Allgemeine Biochemische Methoden</i>	25
2.2.1.1. <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	25
2.2.1.2. <i>Detektion von Proteinen</i>	26
2.2.1.3. <i>Bestimmung von Proteinkonzentrationen</i>	28
2.2.1.4. <i>UV-Absorptionsspektroskopie</i>	28
2.2.1.5. <i>Fällung von Proteinen</i>	28
2.2.2. <i>Molekularbiologische Methoden</i>	29
2.2.2.1. <i>Konservierung von E.coli-Stämmen</i>	29
2.2.2.2. <i>Herstellung kompetenter Zellen</i>	29
2.2.2.3. <i>Plasmid-DNA-Isolation</i>	30
2.2.2.4. <i>Reinigung von Plasmid-DNA</i>	32
2.2.2.5. <i>Bestimmung der DNA-Konzentration</i>	32
2.2.2.6. <i>Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	33
2.2.2.7. <i>Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	33
2.2.2.8. <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	34
2.2.2.9. <i>Phosphorylierung von DNA-Fragmenten</i>	34
2.2.2.10. <i>Adapter-Ligation</i>	34
2.2.2.11. <i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	35
2.2.2.12. <i>Transformation</i>	35
2.2.2.13. <i>Sequenzierung von Plasmid-DNA</i>	35
2.2.3. <i>Erstellung der Expressionsplasmide</i>	35
2.2.3.1. <i>Der Expressionsvektor für das Drosophila-Expressionssystem</i>	35
2.2.3.2. <i>Der Expressionsvektor für die Expression in suspensionsadaptierten HEK-Zellen</i>	39
2.2.3.3. <i>Der Expressionsvektor für das Baculovirus-Expressionssystem</i>	40
2.2.3.4. <i>Der Expressionsvektor für die Expression in Bakterien</i>	41

2.2.4. Proteinexpression des PAC1-R in <i>E.coli</i> BL21-Zellen und Präparation von Inclusion bodies	43
2.2.5. Zellkulturmethoden	43
2.2.5.1. Kryokonservierung	43
2.2.5.2. Kultivierung eukaryontischer Zellen	44
2.2.5.3. Transfektionsmethoden	44
2.2.5.4. Präparation von S2- und HEK-Zellmembranen	45
2.2.5.5. Polylysinbeschichtung von Zellkulturschalen	45
2.2.5.6. Behandlung von Zellen für die nachfolgende Fällung des Zellkulturüberstandes	46
2.2.5.7. Kalziummessung	46
2.2.6. Das <i>Drosophila</i> -Expressionssystem	46
2.2.7. Die Expression in suspensionsadaptierten HEK-Zellen	47
2.2.8. Das Baculovirusexpressionssystem	47
2.2.8.1. Allgemeines zur Methode	47
2.2.8.2. Herstellen von Luria-Agar-Platten	48
2.2.8.3. Transposition zum Erhalt viraler DNA	49
2.2.8.4. Kultivierung von Sf9-Insektenzellen	49
2.2.8.5. Monolayerkulturen	49
2.2.8.6. Begaste Suspensionskulturen	50
2.2.8.7. Transposition von Sf9-Zellen zum Erhalt von Viruslysat	50
2.2.8.8. Infektion von Sf9-Zellen zur Amplifikation von rekombinanten Baculoviren	50
2.2.8.9. Präparative Expression des PAC1-Rezeptors in Sf21-Zellen	51
2.2.8.10. Isolierung von rekombinanten Baculoviren aus Expressionskulturüberständen	51
2.2.8.11. Präparation von Sf21-Zellmembranen	51
2.2.7. Proteinchemische Methoden	53
2.2.7.1. Synthese des PACAP27-Ala ₇ -Cys-Bio	53
2.2.7.2. Iodierung des photoreaktiven PACAP27-Liganden	56
2.2.7.3. Synthese von ³ H-Propionyl- PACAP27	58
2.2.7.4. Bindungstests	60
2.2.7.5. Solubilisierung des Rezeptors	60
2.2.7.6. Herstellung einer ID4-Antikörpersäule	61
2.2.7.7. Antikörperaffinitätschromatographie	62
2.2.7.8. Ligandenaffinitätschromatographie	62
2.2.7.9. Photoreaktive Markierung	63
2.2.7.10. Enzymatische Deglykosylierung	63
2.2.7.11. Proteolytischer Verdau des photoreaktiv markierten Rezeptors	63
2.2.7.12. Immunopräzipitation	64
3. Ergebnisse	65
3.1. Charakterisierung verschiedener PACAP27-Liganden	65
3.1.1. Synthese und Charakterisierung des PACAP27-Ala ₇ -Cys-Bio	65
3.1.2. Synthese und Charakterisierung des iodierten, photoreaktiven ¹²⁵ I-[Phe ⁶ (pBz)]PACAP27-Liganden	68
3.1.3. Synthese und Charakterisierung von ³ H-Propionyl-PACAP27	70
3.2. Überexpression des PAC1-Rezeptors in analytischem Massstab	73
3.2.1. Herstellung von Inclusion bodies in <i>E.coli</i>	73
3.2.2. Herstellung der S2PACAPR-Membran	73
3.2.3. Herstellung der HEKPACAPRRho-Membran	73
3.2.4. Herstellung der Sf21PACAPRRho-Membran	74
3.3. Isolierung des PAC1-Rezeptors aus Inclusion bodies	74
3.4. Analyse der eukaryontischen Expressionssysteme	76
3.5. Präparative Erzeugung von Sf21PACAPR-Zellmembranen	84
3.6. Funktionelle Isolierung und Charakterisierung des Ratten-PAC1-Rezeptors	84
3.6.1. Dodecylmaltosid als Detergenz	84
3.6.2. Digitonin als Detergenz	91
3.7. Deglykosylierung des photoreaktiv markierten PAC1-Rezeptors	96
3.8. Proteolytische Spaltung des photoreaktiv markierten Rezeptors	97
3.8.1. Kallikrein	98
3.8.2. Endoproteinase LysC	99

3.9. Beschreibung der verwendeten Strategie und die Zusammenfassung der Ergebnisse.....	99
3.10. Der Einfluß des PAC1-Rezeptors auf die Sekretion des APPsα	105
3.10.1. Charakterisierung des <i>HEK</i> PACAPRRho-Zellsystems	105
3.10.2. Auswirkung der Stimulation des in <i>HEK</i> -Zellen stabil transfizierten PAC1-Rezeptors auf die APPs α -Sekretion	107
3.10.3. Einfluß verschiedener Signaltransduktionswege auf die PAC1-Rezeptor stimulierte APPs α -Sekretion	111
3.10.3.1. Proteinkinase A-Weg	111
3.10.3.2. Proteinkinase C-Weg	112
3.10.3.3. Der Mitogen Aktivierte Protein Kinase-Weg	114
3.10.3.4. Genomische Effekte.....	116
4. DISKUSION	119
4.1. Die Expression des PAC1-Rezeptors	119
4.2. Die Reinigung des PAC1-Rezeptors	123
4.3. Der Proteolytischer Verdau des PAC1-Rezeptors	125
4.4. Die Ligandenstimulation des PAC1-Rezeptors und die APPsα-Sekretion.....	128
5. Zusammenfassung	136
Literaturverzeichnis.....	139

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des Ratten-PAC1.....	6
Abbildung 2: Spleißvarianten des PAC1-Rezeptors im 3. Intrazellularem Loop.	6
Abbildung 3: Ausschnitt aus der Prozessierung des APP	9
Abbildung 4: Klonierungsstrategie zum Erhalt des pMTBPACAPR-Vektors für die Expression in Schneider 2-Zellen.....	37
Abbildung 5: Klonierungsstrategie zum Erhalt des pMTBPACAPRRho-Vektors für die Expression in Schneider 2-Zellen.....	38
Abbildung 6: Klonierungsstrategie zum Erhalt des pcDNA3PACAPRRho-Vektors zur Expression in suspensionsadaptierten <i>HEK</i> -Zellen.	39
Abbildung 7: Klonierungsstrategie zum Erhalt des pFastBacPACAPRRho-Vektors zur Expression in <i>Sf9</i> und <i>Sf21</i> -Insektenzellen.....	40
Abbildung 8: Klonierungsstrategie zum Erhalt des pGexPACAPRRhoHis-Vektors zur Expression in Bakterienzellen.....	42
Abbildung 9: Chromatogramm des PACAP-Ala ₇ -Cys-Acm (geschütztes Peptid).....	54
Abbildung 10: Chromatogramm des PACAP-Ala ₇ -Cys (entschütztes Peptid).	54
Abbildung 11: Chromatogramm des PACAP27-Ala ₇ -Cys-Bio (biotinyliertes Peptid).	55
Abbildung 12: Chromatogramm des vollständig oxidiertem photoreaktiven Liganden.....	57
Abbildung 13: Chromatogramm der Iodierungsreaktion.....	57
Abbildung 14: Chromatogramm der ³ H-Propionyl- PACAP27-Synthese.	59
Abbildung 15: Radioaktiver Verlauf der Auftrennung des Reaktionsgemisches mittels Microbore-HPLC.	59
Abbildung 16: Reaktionsschema für die Biotinylierung des PACAP-Liganden.....	65
Abbildung 17: Kompetitionsanalyse an Schweinegehirnmembranen mit dem biotinylierten PACAP- Liganden PACAP27-Ala ₇ -Cys-Bio.....	67
Abbildung 18: Charakterisierung des ¹²⁵ I-[Phe ⁶ (pBz)]PACAP27-Liganden anhand eines Sättigungstestes an Schweinegehirnmembran.....	69
Abbildung 19: Sättigungskurve des tritiummarkierten PACAP27-Analogen.....	72
Abbildung 20: Qualitative Analyse der PAC1-Rezeptor-Anreicherung aus <i>Inclusion bodies</i>	75
Abbildung 21: Qualitative Analyse des aus <i>Inclusion bodies</i> gereinigten PAC1-Rezeptors.....	76
Abbildung 22: Expressionsanalyse der präparierten Membranen mittels Westernblotanalyse.....	77
Abbildung 23: Nachweis der Funktionalität des 1D4-Antikörpers und des C-terminal an den PAC1- Rezeptor eingefügten Rho-Epitops mittels Westernblotanalyse.	78
Abbildung 24: Vergleich der Westernblotsignale, die sich aus der Detektion von N-terminalem myc- Epitop bzw. C-terminalem Rho-Epitop des PAC1-Rezeptors ergeben.	79
Abbildung 25: Sättigungskurve und Scatchardblot der Schweinegehirnmembran.	80
Abbildung 26: Sättigungskurve und abgeleiteter Scatchard-Plot der <i>Sf21</i> -PACAPR-Membran.	82
Abbildung 27: Sättigungskurve und Scatchardblot der <i>HEKPACAPRRho</i> -Zellmembran.....	82
Abbildung 28: Westerblot-Analyse der Antikörperaffinitätschromatographie.....	86
Abbildung 29: Analyse der Antikörperaffinitätschromatographie mittels Silberfärbung	87
Abbildung 30: Photoreaktive Markierung der <i>Sf21PACAPRRho</i> -Membran.....	88
Abbildung 31: Photoreaktive Markierung des PAC1-Rezeptors.....	89
Abbildung 32: Westernblotdarstellung der Ligandenaffinitätschromatographie.....	90
Abbildung 33: Sättigungskurve und Scatchardplot an mit Digitonin solubilisierten <i>Sf21</i> -PACAPRRho- Membranen	92
Abbildung 34: Westerblot-Analyse der Antikörperaffinitätschromatographie mit Digitonin als Detergenz	93
Abbildung 35: Photoreaktive Markierung des solubilisierten PAC1-Rezeptors.....	95
Abbildung 36: Deglykosylierung des PAC1-Rezeptors.....	97
Abbildung 37: Proteolytische Spaltung des PAC1-Rezeptors mit Kallikrein.	98
Abbildung 38: Proteolytische Spaltung des photoreaktiv markierten PAC1-Rezeptors	99
Abbildung 39: Struktur der zur Auswahl stehenden photoreaktiven PACAP27-Analoga.....	101
Abbildung 40: Darstellung des PAC1-Rezeptors der Ratte.....	104
Abbildung 41: Kalziumantwort der <i>HEKPACAPRRho</i> -Zellen auf die Stimulation mit PACAP38.....	107
Abbildung 42: Einfluß der PAC1-Rezeptor-Stimulation auf die APP _s -Sekretion.....	108
Abbildung 43: Einfluß verschiedener Liganden auf die APP _s -Sekretion.....	109
Abbildung 44: Einfluß der PACAP27-Ligandenkonzentration auf die Stimulation der APP _s -Sekretion.	110

Abbildung 45: Einfluß von PKA-Inhibitoren und –Aktivatoren auf die von PACAP27 induzierte Stimulation der APPsa-Sekretion.	112
Abbildung 46: Einfluß von PKC-Inhibitoren und –Aktivatoren auf die von PACAP27 induzierte Stimulation der APPsa-Sekretion.	114
Abbildung 47: Einfluß eines MAPK-Inhibitors auf die von PACAP27 induzierte Stimulation der APPsa-Sekretion.....	115
Abbildung 48: Einfluß von Cycloheximid auf die von PACAP27 induzierte Stimulation der APPsa-Sekretion.....	117
Abbildung 49: Darstellung der Signaltransduktionswege, die durch die PAC1-Rezeptorstimulation auf die APPsa-Sekretion wirken.....	134
Abbildung 50: Strategie zur Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle im PAC1-Rezeptor.....	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stimulation von second-messenger-Systemen durch die verschiedenen Rezeptortypen und Spleißvarianten. [6].....	5
Tabelle 2: Benutze Antikörper im Westernblot und deren Anwendung	27
Tabelle 3: Pipettierschema für die Antibiotikazugabe zu Luri-Agar-Platten.....	48
Tabelle 4: Gegenüberstellung der aus den Displacementexperimenten bestimmten K_i -Werte von PACAP27 und deren biotinyliertem Analogon.....	67
Tabelle 5: Beschreibung des K_D -Werts des ^{125}I -[Phe ⁶ (pBz)]PACAP27-Liganden.....	70
Tabelle 6: Gegenüberstellung der K_D -Werte der tritiummarkierten PACAP27-Liganden.	72
Tabelle 7: Zusammenfassung der Expressionsanalyse.	81
Tabelle 8: Vergleich von Rezeptordichten und Rezeptoraffinitäten verschiedener Membranen.....	83
Tabelle 9: Quantifizierung der funktionellen PAC1-Rezeptor-Anreicherung mit Digitonin als Detergenz96	
Tabelle 10: Aufstellung der möglichen Rezeptorfragmente nach vollständigem proteolytischen Verdau des photoreaktiv markierten PAC1-Rezeptors mit Kallikrein.....	103
Tabelle 11: Zuordnung der tatsächlich detektierten PAC1-Rezeptorfragmente (vgl. Abbildung 37) nach proteolytischem Verdau mit Kallikrein.	103
Tabelle 12: Die Beeinflussung des jeweiligen Signaltransduktionsweges auf die APPs α -Sekretion nach Stimulation der HEKPACAPRRho-Zellen mit dem PACAP27-Liganden.....	116
Tabelle 13: Zusammenfassung der durch Cycloheximid detektierten Effekte auf die durch PACAP27-vermittelte APPs α -Sekretion.....	118

Abkürzungsverzeichnis

AcNPV	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrois virus
amp	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BiP	immunoglobulin heavy chain binding protein
B_{\max}	Rezeptordichte
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
CHAPSO	(3-[(3-Cholaminopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propansulfonat)
CHO-Zellen	Chinese hamster ovary-Zellen
cpm	counts per minute
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure (-acid)
dpm	decays per minute
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
Fura-2/AM	Fura-2/Acetoxymethylester
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HBS	HEPES buffered salt solution (HEPES-gepufferte Salzlösung)
HEK293-Zellen	human embryonic kidney 293-Zellen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IgG	Immunglobulin G
K_d	Dissoziationskonstante
min	Minute(n)
MOI	multiplicity of infection (Multiplizität der Infektion)

MT	Metallothionein-Promoter
NTA	nitrilotriacetic acid (Nitrilotriessigsäure)
P/S	Penicillin/Streptomycin
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating-Polypeptide
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Diacylglycerol-aktivierte Proteinkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
<i>Sf 9</i>	<i>Spodoptera frugiperda 9</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VIP	Vasoactive Intestinale Polypeptid
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Die große Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) umfasst annähernd 1000 Mitglieder. Das Hauptmerkmal dieser Superfamilie, die aufgrund von Sequenzhomologien, der Ligandenstruktur und der Rezeptorfunktion in 100 Subfamilien unterteilt werden kann, sind sieben hydrophobe, die Zellmembran durchspannende Domänen. Diese Domänen bestehen aus 20-30 Aminosäuren und besitzen eine α -helicale Struktur. Sie sind über Aminosäureketten variabler Länge verbunden. An der Aussenseite der Zellmembran bilden sich drei äußere Schleifen und auf der zytosolischen Seite der Membran drei innere Schleifen aus. Durch die ungerade Anzahl der Transmembrandomänen befindet sich das aminoternale Ende des Rezeptors ausserhalb der Zelle, das carboxyterminale Ende des Rezeptors dagegen im zytoplasmatischen Raum. Ist das C-terminale Rezeptorsegment an einem Cystein palmitoyliert und damit in der Membran verankert, bildet sich eine vierte innere Schleife aus.

Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Mehrzeller können in drei Hauptfamilien eingeteilt werden. Die Familie A umfasst die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren, zu denen die Chemokin-, die Protease-, die Protein-, die Peptid- und die Monoamin-Rezeptoren zählen. Zur Familie B zählen Calcitonin-, PTH- und verwandte Rezeptoren. Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren bilden die Familie C der GPCR. Die Vielzahl der Liganden für GPCR und deren strukturelle Unterschiede führen zu verschiedenen Bindungsmechanismen. Im Falle des Rhodopsin zum Beispiel ist der Ligand kovalent mit dem Rezeptor verbunden. Monoamin-Liganden als weiteres Beispiel wechselwirken mit Transmembranbereichen ihrer Rezeptoren, wogegen gerade in der Familie der Calcitonin- und PTH-Rezeptoren der N-Terminus eine verstärkte Funktion in der Ligandenbindung einnimmt. Eine Änderung der Konformation wird durch photochemische Effekte induziert. Dagegen führt bei Proteaserezeptoren der Angriff einer Protease zur Abspaltung eines Peptidfragmentes aus dem N-Terminus, das dann als Ligand fungieren kann.

Bei der Bindung des Liganden an den Rezeptor wird die Information durch die Membran in die Zelle weitergeleitet, ohne dass der Ligand dafür die Zellmembran passieren muss.

Die durch die Ligandenbindung erfolgte Konformationsänderung des Rezeptors in den aktiven Zustand führt zur Interaktion mit G-Proteinen. G-Proteine bestehen aus einer α - und einer $\beta\gamma$ -Untereinheit. Durch die Interaktion des G-Proteins mit dem aktiven Rezeptor erfolgt

die Anlagerung von GTP an die α -Untereinheit. Die α -Untereinheit mit gebundenem GTP dissoziiert von der $\beta\gamma$ -Untereinheit ab und aktiviert weitere Effektorsysteme. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität des G-Proteins kommt es zur Umwandlung von GTP in GDP und somit zur Inaktivierung der Untereinheit. Neben der aktiven α -Untereinheit wirkt auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit auf Effektorsysteme.

Die Induktion von Effektorsystemen durch G-Proteine, z.B. von Enzymen oder von Ionenkanälen, hat die Bildung oder das Freisetzen von niedermolekularen Substanzen zur Folge. Zu den Effektorsystemen gehören zum Beispiel Phosphodiesterasen, Adenylatzyklen oder Phospholipasen.

Somit wurde nach der Bindung eines extrazellulären Liganden, dem sogenannten first messenger, die Information auf intrazelluläre Substanzen weitergegeben. Die intrazellulären Substanzen generieren ihrerseits wieder Signalmoleküle, die sogenannten second messenger. Alle Signalsysteme haben die Transduktion und die Verstärkung des Eingangssignals zum Ziel. Es ist jedoch auch nötig, die an der Zelloberfläche eingehenden Signale zu filtern und zu selektionieren, um einen Informationsüberschuss im Inneren der Zelle zu vermeiden. Dies wird durch feine Regulationsmechanismen erreicht. Viele Rezeptoren werden z.B. am C-Terminus phosphoryliert, durch Anlagerung von Arrestin blockiert und damit für G-Proteine unzugänglich, oder internalisiert. Bei Mutationen im Rezeptorgen können Aminosäuren des Rezeptorproteins durch andere ersetzt sein oder ganz fehlen. Diese Veränderungen führen möglicherweise zur Fehlregulation in der Signaltransduktionskaskade, was mit der Entstehung von Krankheiten assoziiert sein kann. Zum Beispiel impliziert eine Punktmutation im Rhodopsin und der dadurch bedingte Austausch einer Aminosäure im N-Terminus einen ständig aktiven Rezeptor. Dies führt zum Entstehen der Retinitis pigmentosa, einer degenerativen Netzhauterkrankung [1]. Mit dem detailgenauen Verstehen der Abläufe der Signaltransduktion könnten Methoden entwickelt werden, um selektiv und damit regulatorisch in diese Kaskade einzugreifen.

Die Strukturaufklärung kann einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Signaltransduktion von G-Protein gekoppelten Rezeptoren liefern. Stehen sie doch am Beginn der Signalkaskade. Durch chimäre Rezeptoren, site-directed Mutagenese und folgende Ligandenbindungsstudien können Domänen aufgezeigt werden, die an der Ligandenbindung, an der Transduktion des Signals durch die Membran oder an der Interaktion mit dem G-Protein beteiligt sind. Neben diesen molekularbiologischen Methoden wurden auch proteinchemische Methoden wie die photoreaktive Markierung und Proteolyse von Rezeptoren entwickelt, die jedoch größere Mengen an Rezeptorprotein erfordern. Gerade für GPCR erwies sich das als besonders

schwierig, da zum einen die Rezeptoren dieser Familie in natürlichem Gewebe nur in geringen Mengen exprimiert werden, und zum anderen in den meisten Fällen eine funktionelle Reinigung von Rezeptorprotein erforderlich ist. Für Rhodopsin als einzigem Kandidaten der GPCR ist es durch Überexpression und funktionelle Reinigung gelungen, das Rezeptorprotein zu kristallisieren und durch Röntgenkristallographie seine 3-dimensionale Struktur zu erhalten.

1.2. Das Pituitary Adenylate Cyclase Activating-Polypeptide (PACAP)

Die Beobachtung, dass nicht nur die fünf klassischen Hormone des Hypothalamus für die Wirkung auf die Hypophyse verantwortlich sein können, führte zum „Screenen“ von Gehirngeweben nach neuen Substanzen. Dabei wurde vor ca. zehn Jahren ein Hormon entdeckt, dass die Adenylatzyklase der Hypophysenzellen in hoher Masse stimuliert. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde ihm der Name Pituitary Adenylate Cyclase Activating-Polypeptide (PACAP) gegeben. PACAP gehört zu einer Superfamilie mit neun Peptidhormonen, die eine vergleichbare Struktur, eine ähnliche Funktion und Verteilung im Organismus sowie verwandte Rezeptoren aufweisen. Zu dieser Superfamilie zählen unter anderem folgende Peptidhormone: das Vasoactive Intestinale Polypeptid (VIP), das Secretin und das Glucagon. Da PACAP und Glucagon evolutionär zu den ältesten Peptiden in dieser Gruppe zählen, wird sie PACAP/Glucagon-Superfamilie genannt. Das PACAP wird im Organismus in zwei Formen exprimiert. Das PACAP27-Peptid besitzt 27 Aminosäuren und stellt eine C-terminal verkürzte Form des PACAP38-Peptides dar. Das PACAP besitzt ein 1000fach höheres Vermögen der Adenylatzyklaseaktivierung als Secretin, VIP oder Glucagon.

PACAP27 und PACAP38 entstammen durch alternatives Splicen aus dem selben, hochkonservierten Gen. Aufgrund der hohen Sequenzhomologien des PACAP-Gens zwischen Säugern und niederen Organismen wird eine Konservierung über mehr als 700 Millionen Jahre angenommen. Das menschliche PACAP-Gen ist auf dem Chromosomenabschnitt 18p11 lokalisiert. Das PACAP-Signalpeptid wird im Endoplasmatischen Retikulum gespalten und amidiert. Die weitere Prozessierung zur Herstellung des Hormons erfolgt durch Prohormonkonvertasen, vornehmlich durch PC1 (PC3) und PC2. Die Verteilung der PACAP-Peptide im Zentralen Nervensystem ist im Gegensatz zu anderen Neuropeptiden gleichmäßig und fast alle Organe und Gewebe weisen messbare Mengen der Peptide auf.

1.3. Die PACAP-Rezeptoren

Aufgrund der Klonierung der cDNA des PACAP-Rezeptors im Jahre 1993 und der daraus abgeleiteten Struktur eines Sieben-Transmembran-Proteins wurde der Rezeptor als ein neues Mitglied der G-Protein gekoppelten Rezeptoren identifiziert. Er gehört zur Secretin-/Glucagon-Rezeptorfamilie wie auch der Calcitonin-, der Parathyroid Hormon- und der VIP-Rezeptor. Die größten Sequenzhomologien besitzen die Rezeptoren in den Transmembrandomänen, die Aminosäuresequenzen der N-Termini divergieren dagegen stark. Alle Rezeptoren dieser Familie zeichnen sich durch einen großen N-Terminus aus, der verstärkt an der Ligandenbindung beteiligt ist [2]. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass der N-Terminus allein nicht ausreicht zur Erkennung des Liganden, sondern die extrazellulären Domänen des jeweiligen Rezeptors involviert sind.

Es existieren zwei PACAP-Rezeptortypen, die in Typ I und Typ II eingeteilt und aufgrund ihrer Affinität zum VIP unterschieden werden. Der Typ I-PACAP-Rezeptor (Lokalisation auf dem Chromosomenabschnitt 7p14 [3]) besitzt nur für die PACAP-Liganden eine hohe Affinität, die Affinität zu VIP ist 1000fach geringer. Der Typ I-PACAP-Rezeptor wird nach den neuesten Nomenklaturregeln als PAC1-Rezeptor bezeichnet.

Der Typ II-Rezeptor, früher auch VIP-Rezeptor genannt, besitzt ähnliche Affinitäten für VIP- und PACAP-Liganden und wird seinerseits wiederum in zwei Rezeptortypen unterteilt. Der VPAC1-Rezeptor (früher auch VIP1-Rezeptor) besitzt eine niedrige Affinität zu Secretin, wobei der VPAC2-Rezeptor (früher auch VIP2-Rezeptor genannt) die höchste Affinität zu Helodermin, einem PACAP-ähnlichen Hormon des Frosches, aufweist.

Durch alternatives Splicen des PAC1-Rezeptor-Gens entstehen acht Rezeptorsubtypen. Diese Subtypen divergieren in der Aminosäuresequenz hauptsächlich im N-Terminus und in der dritten intrazellulären Domäne. Eine Übersicht über die Subtypen geben die Abbildungen 1 und 2. Die Rezeptorsubtypen unterscheiden sich in der Stärke der Adenylatzyklaseaktivierung, der Phospholipase-C-Stimulation, der MAPK-Aktivierung und der induzierten Öffnung von Kalziumkanälen, wobei ebenfalls zwischen der Aktivierungspotenz der beiden PACAP-Liganden (PACAP27 und PACAP38) unterschieden werden kann (Tabelle 1) [3].

Spleißvariante	EC ₅₀ (nM) cAMP-Produktion			EC ₅₀ (nM) Inositolphosphatproduktion		
	PACAP 38	PACAP 27	VIP	PACAP 38	PACAP 27	VIP
PAC1-R	0,4	0,1	400	15	> 1 µM	n.d.
PAC1-R-hip	6	1,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PAC1-R-hop	0,4	0,1	400	16	> 1 µM	n.d.
PAC1-R-hip-hop	2,5	0,7	n.d.	50	>> 1 µM	n.d.
VIP-Rezeptor	0,28	0,42	0,57	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 1: Stimulation von second-messenger-Systemen durch die verschiedenen Rezeptortypen und Spleißvarianten. [4]

n.d. nicht bestimmt

Für die verschiedenen Signaltransduktionswege existieren konzentrationsabhängige Mechanismen. In Astrozyten wird zum Beispiel schon bei PACAP-Konzentrationen von 10^{-14} – 10^{-12} M der mitogen-aktivierte Proteinkinaseweg stimuliert, der nicht über die G-Proteine wie bei der Adenylatzyklase- und Phospholipaseaktivierung führt, sondern über die Aktivierung von Ras-Proteinen. Zur Aktivierung der Adenylatzyklase reichen solche niedrigen Ligandenkonzentrationen jedoch noch nicht aus [5].

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Interaktion des PAC1-Rezeptors mit den verschiedenen G-Proteinen von der Anzahl der exprimierten Rezeptoren abhängig ist. Bei niedrigen Expressionsraten erfolgt hauptsächlich die Aktivierung des G_s-Proteins, hohen Rezeptordichten führen dagegen hauptsächlich über G_{q/i}-Proteine zur Stimulation der Inositoltrisphosphat-synthese [6].

PACAP-Rezeptoren sind im Nervensystem und in nichtneuronalem Gewebe weit verbreitet. Die Expression nur eines Rezeptorsubtypes ist dabei eher selten. Meist werden die PACAP-Rezeptorsubtypen gemeinsam, jedoch in Abhängigkeit vom Zelltyp in unterschiedlichen Anteilen exprimiert. Es ist wahrscheinlich, dass durch äußere Einflüsse die Expression des jeweiligen Rezeptorsubtypes verändert werden kann. Der PAC1-Rezeptor wurde verstärkt im Gehirn, im Rückenmark, im Hypophysenvorderlappen, im Nebennierenmark und in Spermatozyten gefunden. Der VPAC1-Rezeptor wird dagegen hauptsächlich in der Lunge, der Leber und im Darm gefunden.

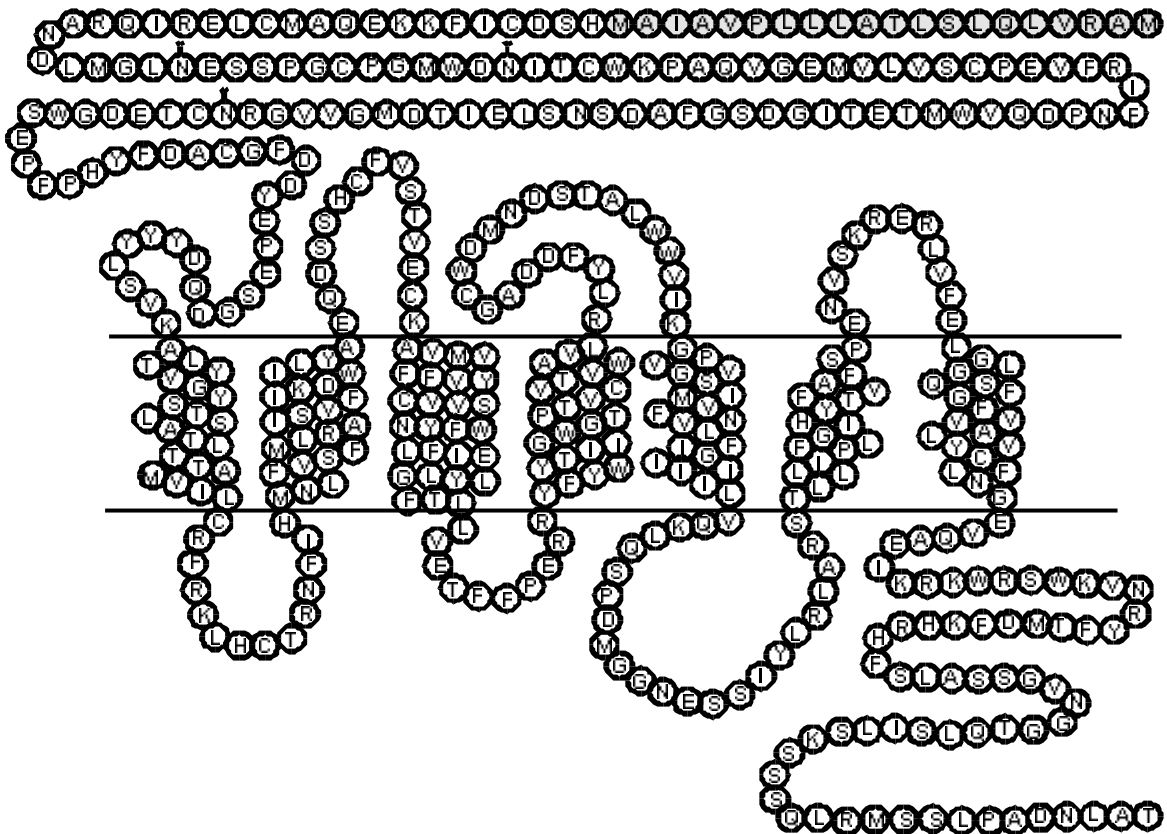


Abbildung 1: Struktur des Ratten-PAC1.

Die Spleißvarianten im 3. intrazellularem Loop sind in der unteren Abbildung 2 dargestellt. Weiterhin existieren folgende Spleißvarianten des N-Terminus des PAC1-R: PAC1-R-s: Dieser Variante fehlen 21 Aminosäuren in der Mitte des N-Terminus (Position 89-109, short-Variante). PAC1-R-vs: Dieser Variante fehlen 57 Aminosäuren in der Mitte des N-Terminus (Position 53-109; very-short-Variante) [7]. PAC1-R-TM4: Dieser Subtyp hat in der 4. Transmembranregion zwei Aminosäuresubstitutionen und zwei Deletionen. Er führt im Gegensatz zu allen anderen Spleißvarianten weder zur Aktivierung der PLC noch der AC. Er stimuliert den Einfluß von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle [8].

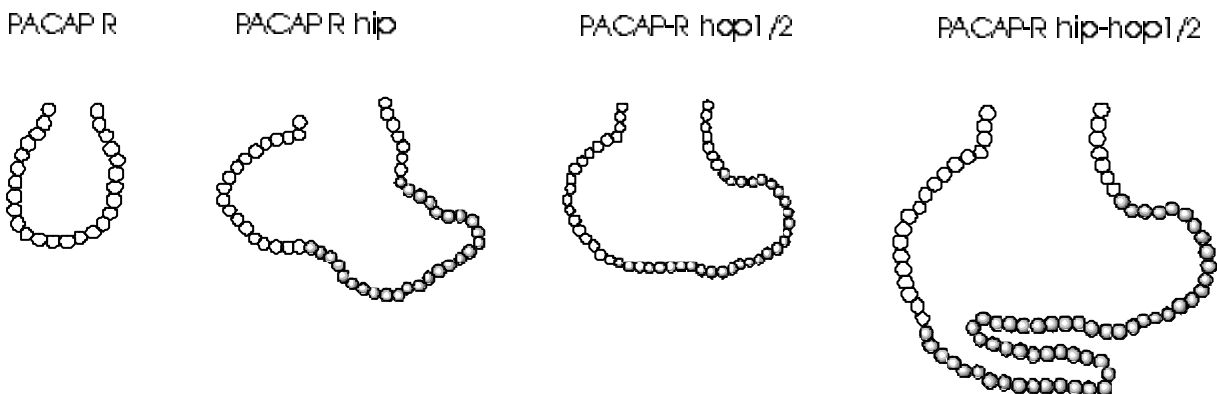


Abbildung 2: Spleißvarianten des PAC1-Rezeptors im 3. Intrazellularem Loop.

1.4. Physiologische Wirkungen des PACAP/PAC1-Rezeptor – Systems

Auf der umfassenden Expression der PACAP-Liganden sowie seiner multiplen Bindungsstellen und der Stimulation verschiedenster Signaltransduktionswege basiert die breite physiologische Wirkung.

Als Hormon wirkt PACAP nicht ausschliesslich auf die Sekretion von Substanzen aus der Hypophyse, sondern vielmehr auf die Genexpression und Transkription von Hypophysenhormonen und Regulatorproteinen, welche dann die Proliferation und die Abstufung von Zellen kontrollieren. PACAP selbst reguliert ebenfalls die Zellteilung und Zelldifferenzierung, wobei besonders der PAC1-Rezeptor involviert ist. Weiterhin inhibiert es den programmierten Zelltod, die Apoptose. So begünstigt PACAP das Überleben von Neuronen *in vitro* und *in vivo* [9]. PACAP und der PAC1-Rezeptor werden schon 14 Tage nach der Befruchtung exprimiert. Diese neurotrophische Eigenschaft spielt bei der postnatalen Entwicklung des Gehirns eine besondere Rolle [10]. So sind bei der Holosproencephalie, einer die Spaltung des Vorderhirns betreffenden Entwicklungsstörung, chromosomale Rearrangements auch innerhalb des PACAP-Gens identifiziert worden [9]. Nachteilig wirken sich oben beschriebene proliferationsfördernde Eigenschaften aus, wenn dadurch die Apoptose verhindert wird. Dann kann es zum Entarten der Zellen kommen und somit zur Entstehung von Karzinomen. Tatsächlich wurde auf sehr vielen Krebszelllinien der PAC1-Rezeptor gefunden ([11],[12]). PACAP wirkt dann als Transkriptionsfaktorinitiator und Genregulator und führt zu einer signifikante Erhöhung der DNA-Synthese verschiedener Zielgene. So wurde in diesem Zusammenhang ein PACAP-Antwortgen PRG1 [13] identifiziert. Durch den Einsatz des PACAP-Antagonisten PACAP6-27, ein um die ersten sechs N-terminalen Aminosäuren verkürzter PACAP27-Ligand, konnte die Rezeptoraktivität unterdrückt und die Zellproliferation eingeschränkt werden [14]. Dieser Befund legt eine Involvierung des Rezeptors bei der Krebsentstehung nahe und bietet somit einen diagnostischen und/oder therapeutischen Ansatz, zum Beispiel das Screenen von Karzinomzellen nach PAC1-Rezeptorexpression oder die Wachstumskontrolle von Tumoren durch antagonistisch wirkende PACAP-Peptide [15].

Neben dem Einfluß von PACAP auf den Zellzyklus und die Zellentwicklung übt das Peptid noch eine Vielzahl weiterer Wirkungen aus, so als Neuromodulator auf die glatte Muskulatur des Gefäßsystems, des Atmungssystems, des Verdauungssystems und des Fortpflanzungssystems.

Erwähnt werden soll hier noch die Funktion des PACAPs als Gedächtnismolekül. So wurde 1995 beschrieben, dass ein dem PACAP homologes Peptid in der Fruchtfliege einen Einfluss auf die Gedächtnisleistung ausübt [16]. Damit wurde erstmals eine Involvierung von Neuropeptiden allgemein und von PACAP insbesondere in das Lern- und Erinnerungsvermögen gezeigt [17]. Diese Befunde werden durch neuere Arbeiten für PACAP als auch für die PACAP-Rezeptoren bestätigt ([18],[19]).

1.5. G-Protein gekoppelte Rezeptoren in der Alzheimer-Thematik

1992 wurde von Nitsch *et al.* erstmals die Entdeckung gemacht, dass Neurotransmitter Einfluss auf den Katabolismus des Amyloid Precursor Protein (APP) ausüben können. So wurde in Zelllinien, die den muskarinischen Acetylcholinrezeptor endogen besitzen oder überexprimieren, ein Anstieg der APP-Prozessierung beobachtet. Neben dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor wurde selbiges für den metabotropen Glutamatrezeptor und einen Serotoninrezeptorsubtyp gefunden.

Das APP wird in Verbindung mit der Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung gebracht. Seit dem Beschreiben der Symptome 1906 durch den Arzt Alois Alzheimer wurde mit dem Erforschen dieser Krankheit begonnen. Typische Merkmale sind das Auftreten von Gedächtnisverlust, eine Verminderung der Lernfähigkeit und Persönlichkeitsverlust. Es wird vermutet, dass die unkontrollierte oder erhöhte Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) in die Entstehung und den Verlauf der Krankheit involviert ist. Ein Indiz dafür ist, dass in Gehirnen von Alzheimerpatienten vermehrte Ablagerungen, sogenannte Plaques, gefunden wurden. Im Umkreis dieser Plaques finden sich vermehrt Entzündungsherde und degeneriertes Gewebe. Ein Hauptbestandteil dieser Plaques ist das A β -Peptid, ein durch die Spaltung des APP hervorgegangenes Molekül. Die erhöhte Prozessierung des APP könnte zur Aggregation von Molekülen und somit zur Bildung von Plaques führen. Das zieht wiederum Entzündungsreaktionen und damit die Zerstörung von Nervenzellen im Gehirn nach sich.

Es wurden daher vermehrt Anstrengungen unternommen, die an der Prozessierung des APP beteiligten Mechanismen aufzuklären. Die an der Spaltung des APPs beteiligten Enzyme werden Sekretasen genannt. Es wurden bisher drei Sekretasespaltstellen für die APP-Prozessierung postuliert, eine α -, eine β - und eine γ -Sekretasespaltstelle. Einen kurzen Überblick über die Spaltungsvorgänge gibt die Abbildung 3. Der β -Sekretaseweg führt zur Entstehung des oben erwähnten hydrophoben A β -Peptides, was bei erhöhter Konzentration zur Bildung der Plaques führen kann. Neben der Plaquebildung wurde auch ein direkter neurotoxischer Einfluss des A β auf Zellen gezeigt. Dagegen führt der beschriebene α -

Sekretaseweg zur Entstehung eines löslichen Fragmentes, des APPs α . Das APPs α besitzt eine vielbeschriebene neuroprotektive Wirkung. Die Spaltung des APP durch die α -Sekretase verhindert die Bildung des A β , da die α -Sekretasespaltstelle innerhalb des A β -Peptides liegt (vergleiche Abbildung 3). Das APP steht damit nicht mehr als Substrat für den β -Sekretaseweg zur Verfügung. Der α -Sekretaseweg und der β -Sekretaseweg konkurrieren um das APP. Es wird auch von einer möglichen reziproken Regulation der APP-Prozessierung gesprochen ([20],[21],[22]).

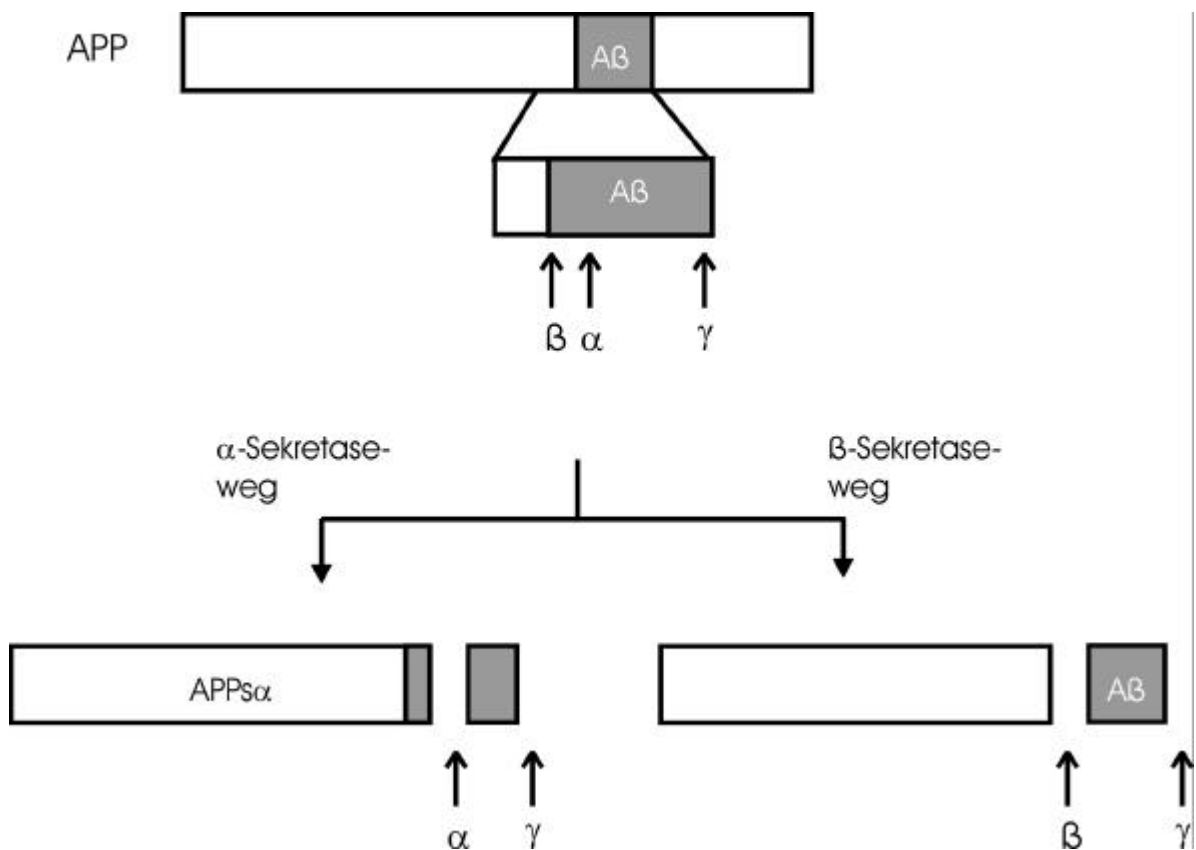


Abbildung 3: Ausschnitt aus der Prozessierung des APP

Angegeben sind die Spaltstellen der α , β - und γ -Sekretasen. Der α -Sekretaseweg zeichnet sich durch die Spaltung des APP durch die α - und γ -Sekretase. Es entsteht das gut lösliche APPs α -Fragment. Im β -Sekretaseweg erfolgt die APP-Spaltung durch die β - und die γ -Sekretase. Es entsteht das schwerer lösliche A β -Peptid. [23]

Die Erhöhung der APP-Prozessierung durch die Stimulation der oben erwähnten Neurotransmitterrezeptoren führt zu einer verstärkten Sekretion des APPs α . Auch für den V $_1$ -

Vasopressinrezeptor und den Bradikininrezeptor ([24],[25]) wurde nach deren Aktivierung eine erhöhte APP α -Menge festgestellt. Eine erhöhte APP α -Sekretion wurde nur für G-Protein gekoppelte Rezeptorsubtypen festgestellt, die die Phosphatidylinositolphosphatase aktivieren. Für die den Adenylatzyklaseweg aktivierenden Rezeptorsubtypen wurde der Effekt der erhöhten APP-Prozessierung bis jetzt nicht beobachtet.

Für VIP, PACAP und deren Rezeptoren wurde bezüglich deren Einfluss auf die APP-Prozessierung in der Literatur nichts beschrieben.

Es existieren aber Untersuchungen, in denen die Konzentrationen von Neuropeptiden, unter anderem auch von VIP, in Gehirnen von Alzheimerpatienten bestimmt wurden. Bei weiblichen Alzheimerpatienten wurde eine signifikante Konzentrationserniedrigung des Neuropeptides VIP [26] festgestellt sowie in Korrelation dazu weniger VIP exprimierende Neuronen im Gehirn gefunden. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass nach der Stimulation von Gliazellen mit VIP ein neurotrophischer Faktor sekretiert wird, der Activity-dependent neurotrophic factor (ADNF) genannt wurde. ADNF wirkt auf Neuronen und konnte als einer der potentesten Zellschutzfaktoren identifiziert werden. So wurde in Gegenwart des ADNF die Toxizität des A β auf neuronale Zellen unterdrückt [27]. Da dieses Peptid schon in femtomolaren Konzentrationen wirkt, wurde mit dieser Entdeckung der Begriff der Femtomolaren Neuroprotektion geprägt [28].

Für das PACAP als relativ neues Peptidhormon liegen Untersuchungsergebnisse dieser Art nicht vor. Die vielfältigen beobachteten neuroprotektiven Eigenschaften des PACAPs (Förderung der Zellproliferation, Entzündungshemmung [29], antiapoptotische Wirkung), die erhöhte Expression des PAC1-Rezeptors im Gehirn (besonders im Hippocampus, einer für die Gedächtnisleistung wichtigen Gehirnregion), die hohe Sequenzhomologie des PAC1-Rezeptors zum VIP-Rezeptor und seine Eigenschaft als G-Protein gekoppelter Rezeptor machen das PACAP/PAC1-Rezeptor-System zu einem wichtigen Kandidaten, seine Funktion bei neurodegenerativen Erkrankungen ergründen.

1.6. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Eingrenzung der Ligandenbindungstelle des PAC-1-Rezeptors. Dabei sollte die direkte Methode der photoreaktiven Markierung mit anschließender proteolytischen Spaltung des Rezeptors zur Anwendung kommen. Weiterhin sollte geprüft werden, ob der PAC1-Rezeptor einen Einfluss auf die Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins ausübt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Nonident P-40	Sigma, Deisenhofen
Acetonitril (gradient grade)	Roth, Karlsruhe; Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Aktivierete CH Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
APS	Bio-Rad, München
Bacto Agar	AppliChem, Darmstadt
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Biotin-HPDP	Pierce, Rockford (USA)
Bluo-Gal	Invitrogen, Karlsruhe
BSA und BSA fat acid free	Sigma, Deisenhofen
Cellfectin-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Chaps	Biomol, Hamburg
Chapso	Biomol, Hamburg
Chelerythrin Chlorid	Sigma, Deisenhofen
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
dbcAMP	Sigma, Deisenhofen
Digitonin	ICN, Frankfurt
DMEM-Flüssigmedium	Sigma, Deisenhofen
DMEM-Medium	PAA, Cölbe
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTPs	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
Dodecylmaltosid	Anatrace, Maumee (USA)
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Ethylenglykolmonomethylether	Serva, Heidelberg

FCS	PAA, Linz (Österreich)
Fura-2/AM	Fluka, Deisenhofen
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Grace´s-Pulvermedium	Invitrogen, Karlsruhe
H ³ -Propionylester	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
I-Block	Tropix, Bedford (USA)
Iodogen	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Laktalbuminhydrolysat (50 x)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin, 200 mM	BioConcept, Umkirch
Luria Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
NaI	Sigma, Deisenhofen
Ni-NTA-Agarose	Quiagen, Hilden
Octylglucosid	Sigma, Deisenhofen
PEI	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml/10 mg/ml)	Sigma, Deisenhofen
PKA Inhibitor H-98	ICN, Frankfurt
PMA	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Proteaseinhibitoren-Mix	Roche, Mannheim
Protein A/G-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
SF900 Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
SfF900-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Streptavidinagarose	Quiagen, Hilden
TCA	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Bio-Rad, München
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt
Trypsin-Inhibitor	Sigma, Deisenhofen

U0126-Inhibitor	Promega, Heidelberg
Yeastolate (50 x)	Invitrogen, Karlsruhe

Allgemeine Laborchemikalien waren von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen).

2.1.2. Sonstige Materialien

4-12% Bis-Tris-Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylhalbmikroküvetten	Sarstedt, Nürnberg
Gewebekulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturschalen, 10 und 15 cm Durchmesser	Sarstedt, Nürnberg
GF/C-Glasfaserfilter Whatman	Bender & Hobein, Bruchsal
Hyperfilm-βmax	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Lipoluma, Lumasolv	LSC, Groningen (Niederlande)
Mikrotiterplatten (6- und 96-Napf)	Greiner, Nürtingen
Nitrocellulose (Hybond ECL)	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter Vacu Cap 90 (Vakuumfilter)	Gelman Sciences, Ann Arbor (USA)
Szintillationsröhrchen	Canberra Packard, Dreieich
Whatman-Papier (3MM)	Bender & Hobein, Bruchsal

2.1.3. Geräte

Gradientengelapparatur	Bio-Rad, München
Spannungsquelle Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia, Freiburg
Durchflußphotometer 2238 Uvicord SII	LKB, Bromma

Elektrophorese-Apparatur für	
- große Plattengele	Bio-Rad, München
- Minigele	Biometra, Göttingen
Iodcounter	Canberra Packard, Dreieich
Microbore-HPLC-Anlage Model 130A	Applied Biosystems, Weiterstadt
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann, München
Ultrazentrifuge L7-65 (Rotoren Ti60 und VTi65.1)	Beckmann, München
Semi-Dry-Blotapparatur	Biometra, Göttingen
Brandelapparatur	Brandel, Gaithersburg (USA)
Thoma-Zählkammer (0.1 mm x 0.04 mm ²)	Brandt, Wertheim
Flüssigkeitsszintillationszähler Tri-carb 2100 TR	Canberra Packard, Dreieich
Spektrophotometer Hitachi U-2000	Colora Messtechnik GmbH, Lorch
Mikroliterkühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Rotationsverdampfer Rotavapor R-134	Fa. Büchi, Schweiz
Phosphorimager BAS-1800	Fuji Photo Film, Kanagawa (Japan)
Glaspotter (Homogenisatoren)	GLW, Würzburg
Ultraschallgerät Branson Sonifier Cell Disruptor B15 mit Mikrospritze	Heineman, Schwäbisch-Gmünd
Zellkulturbrutschrank	Heraeus, Hanau
Kühlbrutschrank Typ BK 600 für Insektenzellen	Heraeus, Hanau
Spektralphotometer U2000	Hitachi, Japan
Bakterieninkubator Multitron	Infors, Einsbach
Polytron UltraThorax	Kinematica, Luzern (Schweiz)
Quecksilberdampfampe	Leitz, Wetzlar
Fraktionssammler 2112 Redirac	LKB, Bromma
Peristaltikpumpe P1	LKB, Bromma
HPLC-Säule C18-RP 5 µm Vydac	MZ Analysentechnik, Mainz
HPLC-Vorsäule C18-RP 10 µm Vydac	MZ Analysentechnik, Mainz
Sterilwerkbank Klasse 2	Nunc, Wiesbaden
Umkehr-Phasenkontrastmikroskop	Olympus, Japan

DNA-Amplifikationsgerät	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Fluoreszenzspektrometer Quantamaster	Photon Technology Int., NJ (USA)
Bio-Imaging Analyzer BAS-1800 (fuji)	Raytest, Straubenhardt
Vakuummzentrifuge Speed-Vac	Savant Instruments, NY (USA)
HPLC-Anlage Lichrosorb 5000	Varian, Darmstadt

2.1.4. Standards und Kits

BAC-to-BAC Baculovirus Expressions System	Invitrogen, Karlsruhe
Drosophila Expressions System	Invitrogen, Karlsruhe
Micro-BCA Protein Assay Kit	Pierce, KMF-Laborchemie GmbH, St. Augustin
Bradford Protein-Assay Kit	Bio-Rad, München
DNA-Längenstandard 1 kb	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
ECL Western blotting detection system	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
Geltrocknungskit	Invitrogen, Karlsruhe
NucleoSpin-Kit	Machery-Nagel, Düren
Western-Star Protein Detektion Kit	Tropix, Bedford (USA)
SDS-PAGE Standards, Low Range	Bio-Rad, München

2.1.5. Peptide

PACAP27	Bachem, Heidelberg
PACAP38	Bachem, Heidelberg
VIP	Bachem, Heidelberg
¹²⁵ I-PACAP-27	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Elutionspeptid 9-mer	Abteilung Chemie, Universität Gdansk (Polen)
Photoreaktiver Ligand - [Phe ⁶ (pBz)]PACAP27	Jasionowski,M.; Kasprzykowski,F.; Lankiewicz,L.; Abteilung Chemie, Universität Gdansk (Polen)
PACAP27-Ala ₇ -Cys	Abteilung Chemie, Universität Gdansk (Polen)

2.1.6. Enzyme

Kallikrein	Sigma, Deisenhofen
Endopeptidase LysC	Roche, Mannheim
pNGaseF	Roche, Mannheim
RNase A	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
T4-DNA-Ligase	NEB, Bad Schwalbach
T4-Polynukleotidkinase	NEB, Bad Schwalbach

2.1.7. Restriktionsenzyme

Name	Schnittstelle	Bezug
EcoR I	G/AATTC	Fermentas, St. Leon-Rot
Not I	GC/GGCCGC	Fermentas, St. Leon-Rot
EcoR V	GAT/ATC	NEB, Bad Schwalbach
Bgl II	A/GATCT	Fermentas, St. Leon-Rot
Kpn I	GGTAC/C	Fermentas, St. Leon-Rot
Age I	A/CCGGT	NEB, Bad Schwalbach
Pme I	GTTT/AAAC	NEB, Bad Schwalbach

2.1.8. Antikörper

anti-c-myc 9E10-Hybridomakulturüberstände (Maus)	G. Gimpl, Institut für Biochemie, Mainz
Anti-Rho 1D4-Antikörper (Maus)	H. Gobind Khorana, Institut für Technologie, Cambridge, USA
anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt	Sigma, Deisenhofen
anti-APP Maus-Antikörper	Senetek, St. Louis (USA)
anti-Maus IgG, Alkalische Phosphatase- gekoppelt	Tropix, Bedford (USA)
AntiPAC1-Rezeptor Maus-Antikörper	A. Zvirbliene, Institut für Biotechnologie, Vilnius, Litauen [30]

2.1.9. Verwendete Organismen

E.coli-Stämme

Bakterienstamm *Escherichia coli DH5a*; Clontech, Heidelberg

Bakterienstamm *Escherichia coli BL21*; Invitrogen, Karlsruhe

Eukaryontische Zelllinien

HEK293 (menschliche embryonale Nierenzelllinie): ATCC, Rockville (USA), Nr. CRL1573

Insektenzelllinien

Schneider's Drosophila Line 2 (S2) (stammt aus dem Epithel von Embryonen der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*)): Invitrogen, Karlsruhe

Spodoptera frugiperda 9 (Sf 9) (stammt aus dem Ovar von Larven der Gemüseeule (*Spodoptera frugiperda*)): ATCC, Rockville (USA), Nr. CRL1711

Spodoptera frugiperda 21 (Sf21): Invitrogen, Karlsruhe

2.1.10. Plasmide

pFastBac	Invitrogen, Karlsruhe
pGexHis	H. Kiefer, Institut für Zoophysiologie, Stuttgart-Hohenheim
pMTB	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.11. Medien

LB-Medium:

10 g Bactotryptone,
5 g Bacto Yeast Extract,
10 g NaCl

Die 1 l Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,5 gebracht und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde nach Bedarf Antibiotika zugesetzt.

LB Agar:

10 g Bactotryptone,
5 g Bacto Yeast Extract,
10 g NaCl,
15 g Difco Agar

wurden in 1 l Wasser gelöst, mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt und autoklaviert. Dann erfolgte Zusatz von
200 mg Ampicillin
zum abgekühltem Medium.

SOB-Medium:

20 g Bactotryptone
5 g Bacto Yeast Extract
0.5 g NaCl
18.7 g KCl

in 1 l Wasser, pH 7,0 autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Mediums wurden
5 ml 1 M MgSO₄
5 ml 1 M MgCl₂
pro Liter zugesetzt.

SOC-Medium:

Wie SOB-Medium, zusätzlich wurden nach dem Abkühlen des Mediums
20 ml 1 M Glukose (0.2 µm sterilfiltriert)
pro Liter zugesetzt.

DMEM-Komplettmedium:

DMEM-Flüssigmedium wurde durch Zusatz von
5 ml 200 mM L-Glutamin
5 ml P/S
50 ml FCS
pro 500 ml Medium supplementiert.

DES-Komplettmedium:

DES-Flüssigmedium wurde durch Zusatz von
5 ml 200 mM L-Glutamin
5 ml P/S
50 ml FCS
pro 500 ml Medium supplementiert.

TMNFH-Medium:

Grace's Pulvermedium wurde in der entsprechenden Menge Wasser gelöst. Nach Zusatz von
3.5 g NaHCO₃
pro 10 Liter wurde der pH-Wert mit konzentrierter NaOH auf 6.0-6.2 eingestellt. Das
Medium wurde mit 0.2 µm-Vakuumsterilfiltern (Gelman Sciences) sterilfiltriert und durch
Zusatz von
8 ml 50 x Laktalbuminhydrolysat
8 ml 50 x Yeastolate
0.8 ml Gentamycinlösung (25 mg/ml)
20 ml FCS
pro 400 ml Medium supplementiert.

SF900:

Der Ansatz erfolgte nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) und die Komplementierung zu
5 % FCS.

2.1.12. Puffer und Lösungen

BBS-Puffer:

50 mM BES

280 mM NaCl

1,5 mM Na₂HPO₄

Der pH-Wert wurde auf 6,95 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

MEM:

2 mM Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 mg/ml Streptomycin

10 % SerumPlus (JHR Bioscience, USA)

SDS-Polyacrylamidgel:

Sammelgel

4 % (w/v) Acrylamid

125 mM Tris-HCl, pH 6,8

0,1 % (w/v) SDS

0,05 % (v/v) APS

0,1 % (v/v) TEMED

Trenngel

10 % bzw. 7,5 % (w/v) Acrylamid

375 mM Tris-HCl

0,1 % (w/v) SDS

0,05 % (v/v) APS

0,05 % (v/v) TEMED

STET-Puffer:

8 % (w/v) Saccharose

5 % (w/v) Triton X-100

50 mM EDTA

50 mM Tris/HCl pH 8,0

LysozymbLösung:

20 mg Lysozym wurden in 1 ml Wasser gelöst, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Bindungspuffer:**Iodierter Ligand**

0,005 % Chaps

0,05 % Digitonin

0,5 % BSA

1 mM EGTA

20 mM Hepes pH 7,4

Tritierter Ligand

50 mM Tris/HCl pH 7,4

5 mM MgCl_2

0,5 % BSA

5 % Digitonin-Lösung:

Die entsprechende Menge Digitonin (ICN) wurde eingewogen, Wasser zugegeben und für 30 min bei 100°C inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 2 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend über einen $0,2\ \mu\text{m}$ Filter (Sartorius, Göttingen) abfiltriert. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Lysispuffer für Sf9/Sf21-Insektenzellen:

10 mM Hepes pH 7,4

5 mM EDTA

1 x Proteaseinhibitormix

Deglykosilierungspuffer:

25 mM EDTA

1 % Octylglucosid

1 % Mercaptoethanol

Kopplungspuffer:

0,1 M NaHCO₃ , pH 8

0,5 M NaCl

DNA-Auftragspuffer:

0,4 % (w/v) Bromphenolblau

0,4 % (w/v) Xylencyanol

50 % (v/v) Glyzerin

Agaroselösung:

1 g Agarose

100 ml TAE-Puffer

wurden in der Mikrowelle bis zur Lösung der Agarose gekocht. Dann erfolgte zur abgekühlten Lösung Zugabe von 10 µl Ethidiumbromidlösung.

Ethidiumbromidlösung:

10 mg/ml in Wasser.

2x-SDS-Probenpuffer:

62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8

5 % (w/v) SDS

15 % (v/v) Glyzerin

0,4 % (v/v) β-Mercaptoethanol

0,001 % (w/v) Bromphenolblau)

Laufpuffer:

25 mM Tris

192 mM Glyzin

0,1 % (w/v) SDS

Ammoniakalischer Silbernitratlösung:

0,8 mg Silbernitrat
1,5 ml 25 %-ige NH₃-Lösung
21 ml 0,36 % (w/v) NaOH
in 100 ml Wasser.

Entwicklerlösung für Silberfärbung:

50 mg Zitronensäure
0,5 ml Formaldehyd
in 1 l Wasser.

Transferpuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,3
380 mM Glycin
0,1 % SDS
20 % Methanol

Filtrierpuffer:**Iodierter Ligand:**

20 mM Hepes pH 7,4
150 mM NaCl

Tritierter Ligand:

50 mM Tris/HCl pH 7,4
5 mM MgCl₂

HPLC-Puffer A:

99,9 % H₂O
0,1 % TFA

HPLC-Puffer B:

90 % Acetonitril
0,1 % TFA
9,9 % Wasser

I-Block-Puffer:

0,2 % (w/v) I-Block

0,1 % (v/v) Tween-20

Der Ansatz erfolgt in PBS.

Waschlösung A:

1x TBS

0,05 % (v/v) Tween-20

PBS-Puffer:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

7,1 mM NaH₂PO₄

1,5 mM KH₂PO₄ pH 7,3

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl

1 mM EDTA pH 8,0

50 x TAE-Puffer:

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 in 1 Liter Wasser.

TBS-Puffer:

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris, in 1 Liter Wasser, auf pH 7,4 mit HCl einstellen.

TBE-Puffer:

89 mM Tris/HCl pH 8,0

89 mM Borsäure

2 mM EDTA

Towbin-Transferpuffer:

25 mM Tris/HCl pH 8,3

192 mM Glyzin

20 % (v/v) MeOH

0,05 % (w/v) SDS

Lys-C-Verdaupuffer:

25 mM Tris-HCl pH 8,5

1 mM EDTA

Kallikrein-Verdaupuffer:

100 mM Na₂HPO₄ pH 8,5

25 mM EDTA

1 mg/ml Trypsin-Inhibitor

0,2 % Nonident P-40

2.2. Methoden

2.2.1. Allgemeine Biochemische Methoden

2.2.1.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können aufgrund ihrer elektrochemischen Eigenschaften aufgetrennt werden. Die Trennung erfolgte in vertikalen SDS-Polyacrylamid-Gelen in einer Elektrophoreseapparatur der Firma Bio-Rad für Gele der Abmessung 12 x 16 cm oder in einer Apparatur der Firma Biometra für Gele der Abmessung 10 x 8 cm (Minigele). Zum Auftragen wurden die flüssigen Proben im gleichen Volumen 2x-SDS-Probenpuffer aufgenommen, Proteinpellets wurden in 15 µl 1xSDS-Probenpuffer für Minigele bzw. 80 µl 1xSDS-Probenpuffer für große Gele gelöst. Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden durch Commassi- oder Silberfärbung visualisiert oder das Gel wurde für einen Western-Blot eingesetzt oder es wurde getrocknet für anschließende radioaktive analytische Auswertung (2.2.1.2.). Minigele wurden mittels einem Gel Trocknungs-Kit (Invitrogen) getrocknet, große Gele durch Anlegen eines Vakuums und gleichzeitiger Erwärmung auf 80°C für zwei Stunden in einer Gel Trocknungsapparatur.

Die Aufbereitung der Proben für 4-12 % Bis-Tris-Gradientengele (Invitrogen) erfolgte analog wie oben beschrieben. Die Auftrennung erfolgte in der Elektrophoreseapparatur für Gradientengele von Bio-Rad.

10%ige Polyacrylamidgele wurden zur Auftrennung von Membranproteinen verwendet. 7,5%ige Polyacrylamidgele wurden zum Auftrennen von Proteinen aus Zellkulturüberständen verwendet. Die fertigen Gradientengele wurden zur Auftrennung der Rezeptorfragmente nach dem proteolytischen Verdau eingesetzt.

2.2.1.2. Detektion von Proteinen

Commassifärbung

Die Commassilösung (1 % in Methanol) wurde 1:10 mit Entfärbelösung (Eisessig:Methanol:Wasser = 1:3:6) verdünnt und das Polyacrylamidgel darin eine Stunde angefärbt. Die Entfärbung des Gels erfolgte bis zum Sichtbarwerden der Banden mit Entfärberlösung.

Silberfärbung

Bei der Silberfärbung wurde das Polyacrylamidgel zuerst für mindestens zwei Stunden oder über Nacht in Methanol:Wasser = 1:1 schwenkend inkubiert und die Proteinbanden somit fixiert. Dann wurde das Gel für 15 min in ammoniakalischer Silbernitratlösung geschwenkt, anschließend gewässert (2 x 5 min) und die Proteinbanden durch Schwenken in Entwicklerlösung (0,5 g Zitronensäure und 0,5 ml Formaldehyd in 1 l Wasser) visualisiert.

Detektion radioaktiv markierte Proteine

Polyacrylamidgele wurden entweder in einer Gelrocknungsapparatur unter angelegtem Vakuum oder mit Hilfe des Gelrocknungskits (Invitrogen) getrocknet. Das getrocknete Gel bzw. die trockene PVDF-Membran vom Proteintransfer durch Westernblot wurden auf einen BAS-TR2025-Film (Imaging Plate von Fuji Photo Film) aufgelegt und für einige Stunden (^{125}I) bis einige Tage (^{35}S) inkubiert. Die Radioaktivität wurde danach über einen Phosphorimager (BAS-1800, Fuji Photo Film) detektiert.

Immunologisch durch Western-Blotting

Die mittels SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (2.2.1.1.) aufgetrennten Proteine wurden immunologisch durch Western-Blot nachgewiesen. Dafür wurde eine Millipore Immobilon PVDF-Membran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und für einige Minuten mit sechs gleichgroß zugeschnittenem 3 mm Whatman-Filterpapier in Transferpuffer inkubiert. Es wurde beginnend auf der Anodenseite der Blotapparatur drei Lagen des eingeweichten Whatman-Filterpapiers, die eingeweichte PVDF-Membran, das Trenngel und zum Abschluß drei weiteren Lagen eingeweichtes Whatman-Papier luftblasenfrei angeordnet. Die Blotapparatur wurde geschlossen und leicht beschwert. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte für 3 h bei großen Gelen und für 1,5 Stunden für Minigele bei Raumtemperatur mit 200 mA.

Nach erfolgtem Transfer wurde zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen die Membran für eine Stunde in Blockinglösung schwenkend inkubiert. Der erste Antikörper wurde in Blockinglösung zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Die anschließende Waschung erfolgte mit der entsprechenden 1. Waschlösung für 3x5 min, 2x10 min und 1x20 min. Ebenfalls in der 1. Waschlösung wurde die Membran für eine weitere Stunde mit dem zweiten Antikörper inkubiert und abschließend wie oben mit der 2. Waschlösung gewaschen. Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die in der Westernblotanalyse eingesetzten Antikörper und deren Anwendung.

Epitop	Blocking-lösung	1. Anti-körper	Verdünnung	1. Waschlösung	2. Anti-körper	Verdünnung	2. Waschlösung	Detektion
Myc	5 % Milchpulver, 0,1 % Tween20	Hybridoma-überstand	-	Waschlösung A	Anti-Maus-POD	1:1300 in 1. Waschlösung	TBS	Phosphoreszenz
Rho	5 % Milchpulver, 0,1 % Tween20	Maus-Anti-Rho (1D4)	1:2000 in Blockinglösung	Waschlösung A	Anti-Maus-POD, Anti-Maus-AP	1:1300 in 1. Waschlösung	TBS	Phosphoreszenz
APP	I-Block	Mouse-Anti-APP	1:2000 in I-Block	I-Block	³⁵ S-Anti-Maus	1:400 in I-Block	I-Block	Radio-graphisch

Tabelle 2: Benutze Antikörper im Westernblot und deren Anwendung

2.2.1.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Bradford-Test

Die Proteinkonzentration von Lösungen wurde mit dem Bradford-Protein-Assay-Kit (Bio-Rad, München) bestimmt. Die zu messende Proteinlösung (50 µl) wurde mit 50 µl 100%iger Ameisensäure gemischt und für 10 min inkubiert. Dann wurden 900 µl 1:5 verdünnte Farbstofflösung dazupipettiert, gemischt und 20 min weiterinkubiert. Über die bei 595 nm gemessene Absorption konnte dann die Proteinkonzentration ermittelt werden. Als Proteinstandard diente eine Konzentrationsreihe von BSA in Wasser.

BCA-Test

Für detergentshaltige und schwächer konzentrierte Proteinlösungen wurde der Micro-BCA-Test der Firma Pierce verwendet. Dafür wurde 1 ml der zu bestimmenden Proteinlösung mit 1 ml Farbreagens (Anfertigung nach Herstellerangaben) gemischt und für eine Stunde bei 60°C inkubiert. Nach 20minütiger Abkühlungsphase wurde der entstandene Farbkomplex photometrisch bei 495 nm vermessen. Als Standardlösung diente eine BSA-in-Wasser-Verdünnungsreihe.

2.2.1.4. UV-Absorptionsspektroskopie

Reine Peptidkonzentrationen wurden spektralphotometrisch unter Zuhilfenahme des Lambert-Beerschen Gesetzes ($-dI = k * I(x) * dx$) ermittelt.

2.2.1.5. Fällung von Proteinen

Methanol/Chloroform-Fällung

Diese Methode diente zur Fällung geringer hydrophober Proteinmengen. 100 µl der Proteinlösung wurden mit 400 µl Methanol, 200 µl Chloroform und 300 µl Wasser versetzt, gut durchmischt und dann für 20 min mit 9000 g bei 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde verworfen. Zur unteren Phase wurden 300 µl Methanol pipettiert. Alles wurde nochmal gut durchmischt und wie oben zentrifugiert. Das erhaltene Proteinpellet wurde an der Luft getrocknet und im gewünschten Puffer gelöst.

TCA-Fällung

Diese Methode wurde zur Fällung von Zellkulturüberständen angewandt. Die Kulturüberstände wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß geerntet und mit 800 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und auf Eis gestellt. Jeweils 1,5 ml Kulturüberstand wurden in ein 2-ml-Reaktionsgefäß gegeben, mit 170 µl 100%iger eiskalter Trichloressigsäure (6,1 M) versetzt und fünf mal invertiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 4 min mit 10000 g bei 4°C in der Tischzentrifuge. Der Überstand wurde abgesaugt und die Prozedur bis zur gesamten Fällung des Überstandes wiederholt. Die erhaltenen Proteinpellets wurden mit 750 µl Aceton (-20°C) versetzt, fünf mal invertiert und wie oben zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt und die Pellets dann an der Luft für 5 – 10 min getrocknet. Die Pellets wurden jeweils in 80 µl 1x-SDS-Auftragspuffer gelöst, 10 min bei 100°C gekocht und auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Konservierung von *E.coli*-Stämmen

Mit 100 µl der entsprechenden 2-ml-Übernachtskultur wurden 5 ml LB-Medium, das das entsprechende Antibiotikum enthielt, angeimpft. Nach sieben Stunden Inkubation bei 37°C im Inkubationsschüttler wurde die Probe auf eine 20%ige (v/v) Glycerinkonzentration eingestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2.2. Herstellung kompetenter Zellen

In einem 12 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 3 ml LB-Medium mit Bakterien angeimpft und für 18 Stunden bei 140 upm und 37 °C im Bakterieninkubator geschwenkt. Diese Übernachtskultur wurde in 200 ml SOB-Medium überführt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,6-0,7 bei einer Wellenlänge von 600 nm bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 3500 g und 4°C für 10 min in der Kühlzentrifuge sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und für 15 min in Eis inkubiert. Dann wurden die Bakterien erneut wie oben sedimentiert, in 20 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂/10 % (w/v) Glycerin resuspendiert und für

mindestens 2 Stunden auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die kompetenten Bakterien in 200 µl-Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.2.3. Plasmid-DNA-Isolation

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des gewünschten Klons angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert.

Zur Präparation von größeren DNA-Mengen wurden 5 ml LB-Medium mit einer Dauerkultur des gewünschten Klones angeimpft und 4-5 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Kultur wurde in 400 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) überführt und über Nacht bei 37 °C und 140 upm inkubiert.

Lysozymmethode

Das aus einer 2 ml Übernachtskultur durch Zentrifugation gewonnene Bakterienpellet wurde in 350 µl STET-Puffer vollständig suspendiert und nach Zugabe von 25 µl Lysozymlösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 50 s in ein sprudelnd kochendes Wasserbad gestellt und danach für 15 min mit 10000 g bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das schleimige Pellet wurde entfernt und zur verbleibenden Lösung 38 µl 3M Kaliumacetatlösung pH 4,8 sowie 400 µl Isopropanol zugegeben. Nach guter Durchmischung wurde wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Auf die anschließende Zentrifugation für 5 min mit 10000 g bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge folgte das Trocknen des Pellets unter der Sterilbank, abschließendes Lösen des DNA-Pellets in 50 µl Wasser und Aufbewahrung bei -20°C. Zur Restriktionshydrolyse wurden 2 µl der Plasmid-DNA-Lösung eingesetzt.

Puffermethode

Zum Erhalten von Plasmid-DNA für Transfektionen wurde der Aufschluß der Bakterien durch alkalische Lyse angewandt.

2 ml einer Übernachtskultur wurden für 1 min bei RT mit 3500 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl P1-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) suspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 300 µl P2-Puffer (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS), vorsichtiges Schütteln der Probe und Inkubation für 5 min bei RT. Anschließend wurde die Lösung mit 300 µl P3-Puffer (10 M NH₄Ac) versetzt, gevortext und für 15 min bei 16000 g in

der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und aus ihm mit dem 0,6fachen Volumen an Isopropanol die Plasmid-DNA gefällt. Es erfolgte Zentrifugation für 10 min mit 16000g bei RT. Das DNA-Pellet wurde mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt (2.2.2.5.).

Säulenmethode

Diese Methode wurde zum Aufreinigen von Plasmid-DNA genutzt, die anschließend sequenziert werden sollte. Es kam der NucleoSpin-Kit der Firma Machery-Nagel zum Einsatz.

Maxipräparation

Zur Gewinnung von größeren DNA-Mengen wurde eine Plasmid-Maxipräparation durchgeführt. Die Bakterien einer 400 ml LB-Kultur (siehe oben) wurden mit 3500g bei 4°C für 10 min in der Kühlzentrifuge sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 9 ml 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 9 ml 0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS zugesetzt, die Mischung zur Lyse der Bakterien vorsichtig geschwenkt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 9 ml eiskaltes 3 M KAc, pH 4,8 zugesetzt und die Probe für 5 min in Eis inkubiert. Die lysierten Bakterien wurden mit 21000g bei 4°C für 40 min sedimentiert und die im Überstand der Zentrifugation enthaltene Plasmid-DNA durch Zusatz von 16,2 ml Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur präzipitiert und 20 min wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 70 % (v/v) Ethanol resuspendiert und die obige Zentrifugation wurde für 5 min wiederholt. Das resultierende Pellet wurde in 6 ml Wasser gelöst und die enthaltene RNA durch Zusatz von 5 ml 10 M NH₄Ac und 20 min Inkubation auf Eis präzipitiert. Nach dem Absetzen der RNA durch Zentrifugation (17000g, 4°C, 10 min) wurde die DNA im Überstand durch Zusatz von 6,6 ml Isopropanol und Inkubation für 30 min in Eis präzipitiert. Nach der anschließenden Sedimentation der Plasmid-DNA durch Zentrifugation mit 17000 g bei 4°C für 20 min in der Kühlzentrifuge wurde das DNA-Pellet in 0,5 ml Wasser gelöst und Reste kontaminierender RNA durch Zusatz von 4 µl DNase freier RNase (10 mg/ml in Wasser) und Inkubation für 30 min bei 37 °C entfernt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zusatz von 0,5 ml 13 % (w/v) PEG 8000, 1,6 M NaCl und Inkubation für 20 min in Eis gefällt. Anschließend erfolgte Zentrifugation mit 4000 g für 10 min bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge und

abschließende Phenolextraktion (2.2.2.4.) und Ethanol-fällung (2.2.2.4.) zur Reinigung der DNA. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bestimmt (2.2.2.5.).

2.2.2.4. Reinigung von Plasmid-DNA

Phenolextraktion

Zur Entfernung von Proteinverunreinigungen der DNA wurde die Phenolextraktion durchgeführt. Die Probe wurde mit dem gleichen Volumen an TE-Puffer-gesättigtem Phenol versetzt und gevortext. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge mit 7200 g für 5 min bei Raumtemperatur. Der abgenommene Überstand wurde mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 vermischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Wiederholung der obigen Zentrifugation und Phenolreste wurden durch Extraktion mit wassergesättigtem Diethylether (3 x 1 ml) entfernt. Zuletzt wurden Reste des Ethers durch Abdampfen bei 37°C für eine Stunde entfernt und die DNA bei -20°C gelagert.

Ethanol-fällung

Zur Konzentrierung von verdünnten DNA-Lösungen, z.B. nach der Phenolextraktion, wurde die DNA durch Ethanol präzipitiert. Zu 0,5 ml der verdünnten DNA-Lösung wurden 50 µl 3 M NaAc, pH 5,4 und 1 ml Ethanol zugesetzt. Die DNA wurde über Nacht bei -20°C oder eine Stunde bei -80°C präzipitiert und durch Zentrifugation mit 20000g bei 4°C für 20 min in der Tischzentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und die Zentrifugation für 5 min wiederholt. Nach der Trocknung des Pellets wurde die DNA in Wasser gelöst. Die Konzentration und Reinheit wurde bestimmt (2.2.2.5.) und die DNA bei -20 °C gelagert.

2.2.2.5. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit präparierter DNA wurde durch Messung der Extinktionen bei 260 und 280 nm im UV/VIS-Spektrometer bestimmt. Der Quotient E_{260}/E_{280} stellt ein Maß für die Reinheit der DNA in Bezug auf Proteinverunreinigungen dar und sollte für proteinfreie Lösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

2.2.2.6. Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die analytischen Restriktionsansätze wurden in einem Volumen von 15 μ l durchgeführt. Hierzu wurde die Plasmidlösung mit 1 μ g DNA und enzymespezifischem Reaktionspuffer vermischt, gegebenenfalls mit Wasser auf ein Volumen von 14 μ l aufgefüllt und zuletzt 1 μ l Restriktionsenzymlösung zugegeben. Der Ansatz wurde ca. 1 h bei der für das Enzym vorgeschriebenen Reaktionstemperatur inkubiert und nach Zugabe von 5 μ l Auftragspuffer auf ein 1%iges ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetragen.

Zur präparativen Restriktionshydrolyse wurde der Restriktionsansatz analog angesetzt und die Mengen und Volumina in gleichen Verhältnissen vergrößert. Die zur vollständigen Hydrolyse notwendige Inkubationszeit wurde empirisch ermittelt. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer mit 1%igen Agarosegelen bei konstant 60 mA durchgeführt. Nach erfolgter Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die DNA-Banden nur partiell angefärbt und visualisiert. Dazu wurde ein Gellängsschnitt 20 min in Ethidiumbromidlösung inkubiert und die DNA im UV-Durchlicht bei 300 nm visualisiert. Die Laufhöhe der gewünschten DNA-Bande wurde durch das Anlegen des gefärbten Gelequivalentes ermittelt und das mittels Skalpell ausgeschnittene ethidiumbromidfreie Gelstückchen weiterverwendet (2.2.2.7.).

2.2.2.7. Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das ausgeschnittene Agarosestück (2.2.2.6.) wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit TE-Puffer-gesättigtem Phenol vollständig überschichtet. Die Probe wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend mit 19000g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde aufbewahrt und die untere Phase mit 200 μ l TE-Puffer-gesättigtem Phenol versetzt. Die Probe wurde erneut schockgefroren und wie oben zentrifugiert. Die wäßrigen Phasen wurden vereinigt, mit 0,5 ml TE-gesättigtem Phenol vermischt und 1 min wie oben zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde abgenommen und die DNA durch Phenolextraktion und Ethanolfällung (2.2.2.4.) gereinigt.

Alternativ konnte zur Isolation von DNA aus Agarosegelen der NucleoSpin-Kit der Firma Machery-Nagel verwendet werden.

2.2.2.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um einen PCR-Ansatz von 50 μl zu erhalten, wurden die Komponenten wie folgt in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

Zu 41 μl Wasser kamen 5 μl 10x Polymerasepuffer, 2 μl Template-DNA (5 - 50 ng DNA), 0,3 μl *forward*- und 0,3 μl *reverse*-Primer (je 1 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$), 0,4 μl dNTP-Mix (10 mM) und zum Schluß 1 μl Polymerase (1U).

In einem Thermocycler (Biometra) wurden folgende PCR-Zyklen durchlaufen:

95°C für 3 min

95°C für 1 min
55-60 °C für 1 min
72°C für 2 min } 30 Cyclen

72°C für 15 min

2 μl der Probe dienten zur Analyse der Reaktion mittels Auftrennung über ein Agarosegel, der Rest wurde über ein Agarosegel oder mittels Säulenpräparation gereinigt und weiterverarbeitet.

2.2.2.9. Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Ligation mußten Oligonukleotide am 5'-Ende phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung wurde mit dem Enzym T4-Polynukleotid-Kinase durchgeführt. 12 μl DNA-Lösung (150 pmol/ μl in Wasser) wurden mit 4 μl 5 x Reaction Forward buffer (Invitrogen), 1 μl 10 mM dATP, 2 μl Wasser und 1 μl T4 Polynukleotid-Kinase (Invitrogen, 6 U/ μl) versetzt. Die Reaktion wurde für 1 h bei 37 °C durchgeführt und das Enzym anschließend für 20 min bei 70°C im Wasserbad hitzeinaktiviert.

2.2.2.10. Adapter-Ligation

Die Adapterligation diente zur Einführung von Epitopen in Vektoren. Dafür wurden 400 ng Vektor-DNA mit dem 20fachen Überschuss der Adapter-Oligos (von denen nur ein Oligo phosphoryliert wurde (2.2.2.9.)) versetzt, mit 2,5 μl Ligase-Puffer versetzt, mit Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 23 μl eingestellt und mit 2 μl (2 U) T4-Ligase versetzt. Der Ansatz würde über Nacht bei 15°C inkubiert und dann zur Transformation eingesetzt.

2.2.2.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation eines DNA-Inserts mit linearisierter Vektor-DNA wurde die T4-DNA-Ligase eingesetzt. Es wurde ein 10-fach molarer Überschuß des Inserts gegenüber der Plasmid-DNA eingesetzt. Die Insert-DNA, die linearisierte Vektor-DNA und 2 µl 10x Ligase-Puffer wurden vermischt und das Volumen der Lösung mit Wasser auf ein finales Volumen von 19 µl eingestellt. Zuletzt wurde 1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben, gemischt und der Ligationsansatz über Nacht bei 14°C inkubiert. Zur Kontrolle auf Selbstligation der Vektor-DNA wurde ein Ansatz ohne Insert-DNA pipettiert und wie der Ligationsansatz behandelt. 10 µl Ligations- oder Kontrollansatz wurden anschließend zur Transformation (2.2.2.12.) von kompetenten *E.colis* eingesetzt und durch Plasmid-DNA-Isolation (2.2.2.3.) und analytische Restriktionshydrolyse (2.2.2.6.) charakterisiert.

2.2.2.12. Transformation

Zur Transformation von *E.coli* wurde eine 200 µl-Portion kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 5 ng Plasmid-DNA oder 50 ng DNA aus einem Ligationsansatz versetzt. Die Bakteriensuspension wurde 30 min auf Eis inkubiert, dann für 90 s auf 42 °C erwärmt und sofort für 2 min in Eis gestellt. Nach Zusatz von 2 ml SOC-Medium wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 3500g und 4°C für 5 min in der Tischzentrifuge sedimentiert. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.13. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Minipräp-DNA des entsprechenden Klones wurde mit Hilfe eines Kits (Machery Nagel) isoliert und von der Firma Genterprise, Mainz sequenziert.

2.2.3. Erstellung der Expressionsplasmide

2.2.3.1. Der Expressionsvektor für das Drosophila-Expressionssystem

Die cDNA des PAC1-Rezeptors wurde aus dem pSGPACAPR-Vektor [2] mittels PCR amplifiziert. Es handelte sich um die cDNA des PCA1-Rezeptors der Ratte. Der verwendete forward-Primer enthielt eine BglII-Restriktionserkennungsstelle, der verwendete reverse-Primer eine AgeI-Restriktionserkennungsstelle. Das erhaltene Amplifikat wurde in den

pMTB-Vektor über die BglII- und AgeI-Schnittstellen eingefügt. Die cDNA des PAC1-Rezeptors besaß dann N-terminal eine BiP-Signalsequenz (immunoglobulin heavy chain binding protein) und stand unter dem Einfluss eines induzierbaren Metallothionein-Promoters (MT). Die BiP-Signalsequenz soll für eine effizientere Sekretion des rekombinanten Proteins ins Medium sorgen. Im Fall eines Membranproteins wird ein guter Transport an die Zelloberfläche erwartet. Der MT-Promoter ist durch Kupferionen induzierbar. Die Induktion der Proteinsynthese erfolgt im allgemeinen bei hohen Zelldichten kurz vor der Ernte der Zellen. Eine unnötige Belastung des Zellapparates in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen wurde somit vermieden.

Zum immunologischen Nachweis enthielt die PAC1-Rezeptor-cDNA N-terminal ein myc-Epitop (EQKLISEEDL).

Eine Übersicht über die verwendete Klonierungsstrategie zum Erhalt des pMTBPACAPR-Expressionsvektors für S2-Insektenzellen ist in Abbildung 4 dargestellt.

Zum Erhalt von Transformanten wurde der Ligationsansatz im *E.coli* Stamm DH5 α transformiert (2.2.2.12.) und ein korrekter Klon durch Restriktionsanalyse von Mini-Präparations-DNA gesucht. Die cDNA des Klons wurde durchsequenziert, um eventuell entstandene fehlerhafte Nukleotidsequenzen bei der PCR auszuschließen. Vom richtigen pMTBPACAPR-Klon wurde eine Dauerkultur angelegt (2.2.2.1.) und über eine DNA-Präparation (2.2.2.3.) genügend Plasmid-DNA für die Transfektion gewonnen.

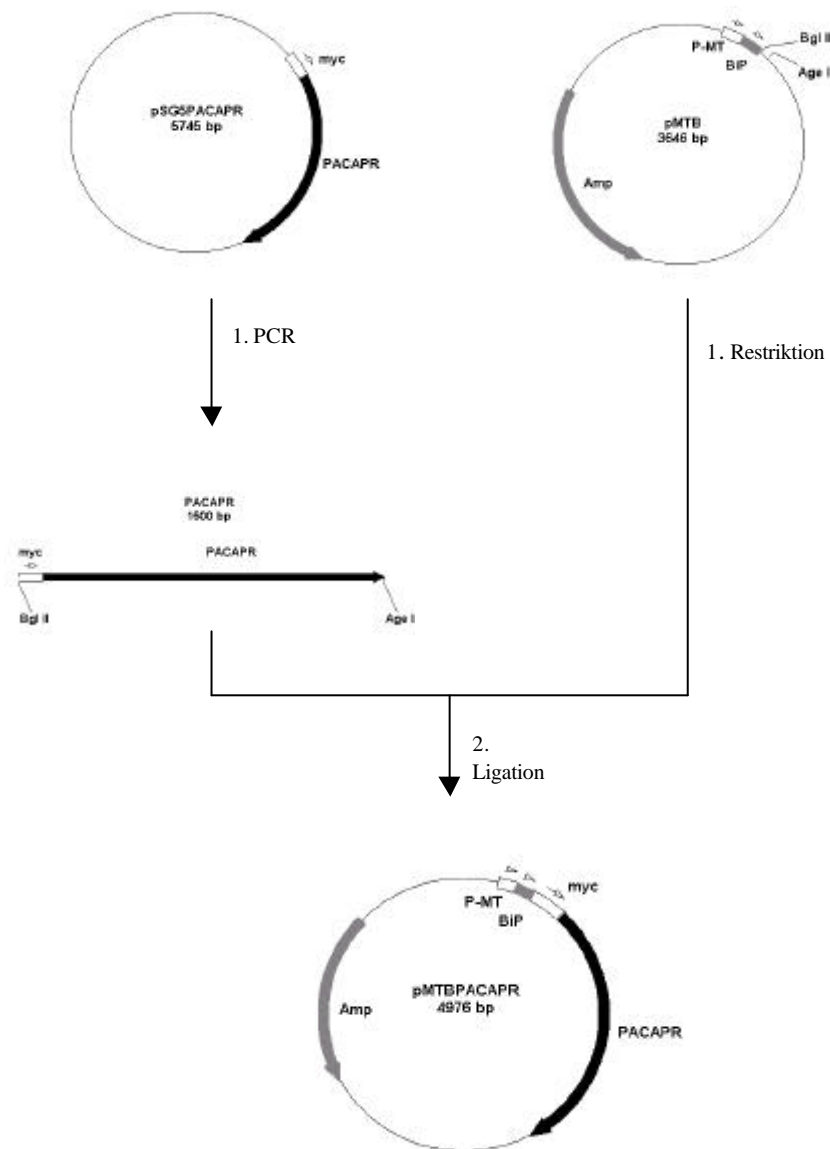


Abbildung 4: Klonierungsstrategie zum Erhalt des pMTBPACAPR-Vektors für die Expression in Schneider 2-Zellen.

Weiterhin wurde ein zusätzliches Tag an die cDNA des PAC1-Rezeptors angefügt, um erstens eine zusätzliche Möglichkeit der Rezeptoranreicherung über Antikörperaffinitätschromatographie und zweitens ein weiteres Mittel des immunologischen Rezeptornachweises zu haben. Bei dem zusätzlich C-terminal eingefügtem Tag handelt es sich um die letzten 15 C-terminalen Aminosäuren des Rhodopsins (Rho). Mit diesem Rho-

Epitop wurden gute Erfolge bei der Reinigung des Glutamaterezeptors [28] erzielt. Weiterhin existieren sehr gute Antikörper gegen dieses Rho-Epitop [31].

Das Rho-Epitop wurde mit der Methode der Adapterligation (2.2.2.10.) eingefügt. Dafür wurden die mit geeigneten Schnittstellen versehenen Oligos zusammen mit dem linearisierten Vektor pMTBPACAPR (siehe oben) inkubiert und ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E.colis* transformiert und ein richtiger Klon durch Restriktionsanalyse von Mini-Präparations-DNA gefunden. Das Rhodopsin-Epitop wurde durchsequenziert. Eine Übersicht über die Klonierungsstrategien zum Erhalt des Expressionsvektors pMTBPACAPRRho ist in Abbildung 5 dargestellt.

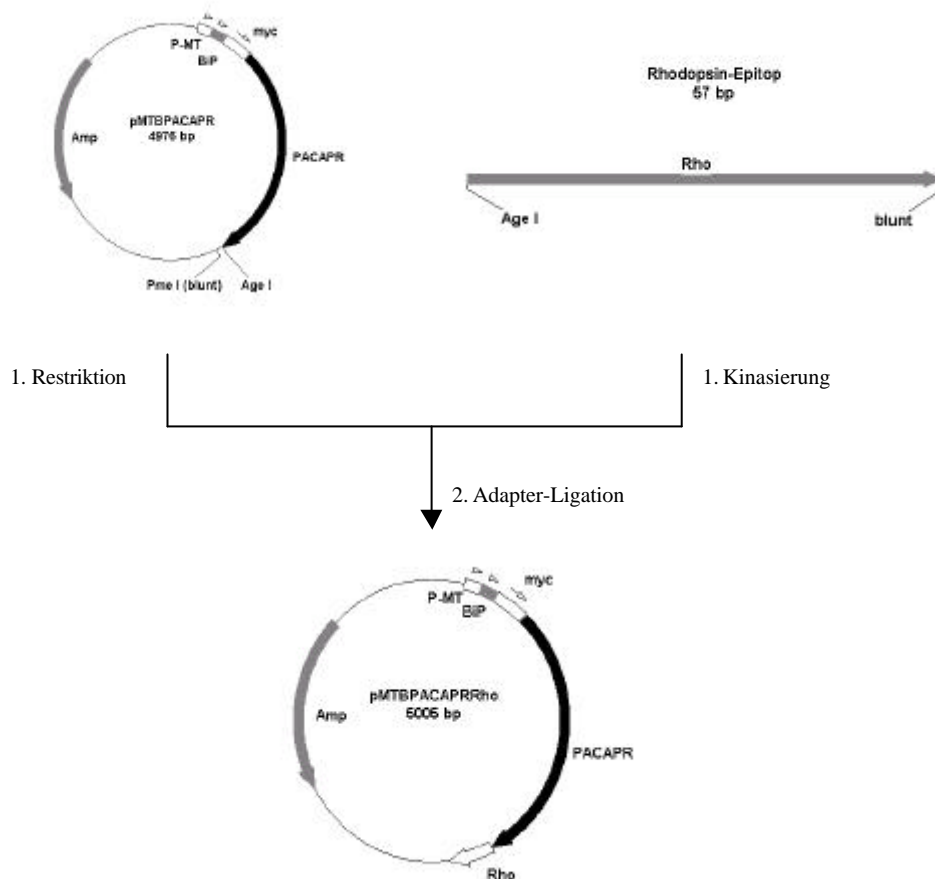


Abbildung 5: Klonierungsstrategie zum Erhalt des pMTBPACAPRRho-Vektors für die Expression in Schneider 2-Zellen.

2.2.3.2. Der Expressionsvektor für die Expression in suspensionsadaptierten *HEK*-Zellen

Aus dem erhaltenen pMTBPACAPRRho-Vektor (2.2.3.1.) wurde die cDNA des PAC1-Rezeptors mit N-terminalem myc- und C-terminalem Rho-Tag in den für die Expression in *HEK*-Zellen geeigneten pcDNA3-Vektor kloniert. N-terminal wurde die EcoRI-Schnittstelle verwendet, C-terminal die PmeI-Schnittstelle bzw. die EcoRV-Schnittstelle (blunt). Eine Übersicht über die angewandte Klonierungsstrategien zum Erhalt des Expressionsvektors pcDNA3PACAPRRho für die Expression in suspensionsadaptierten *HEK*293-Zellen ist in Abbildung 6 dargestellt.

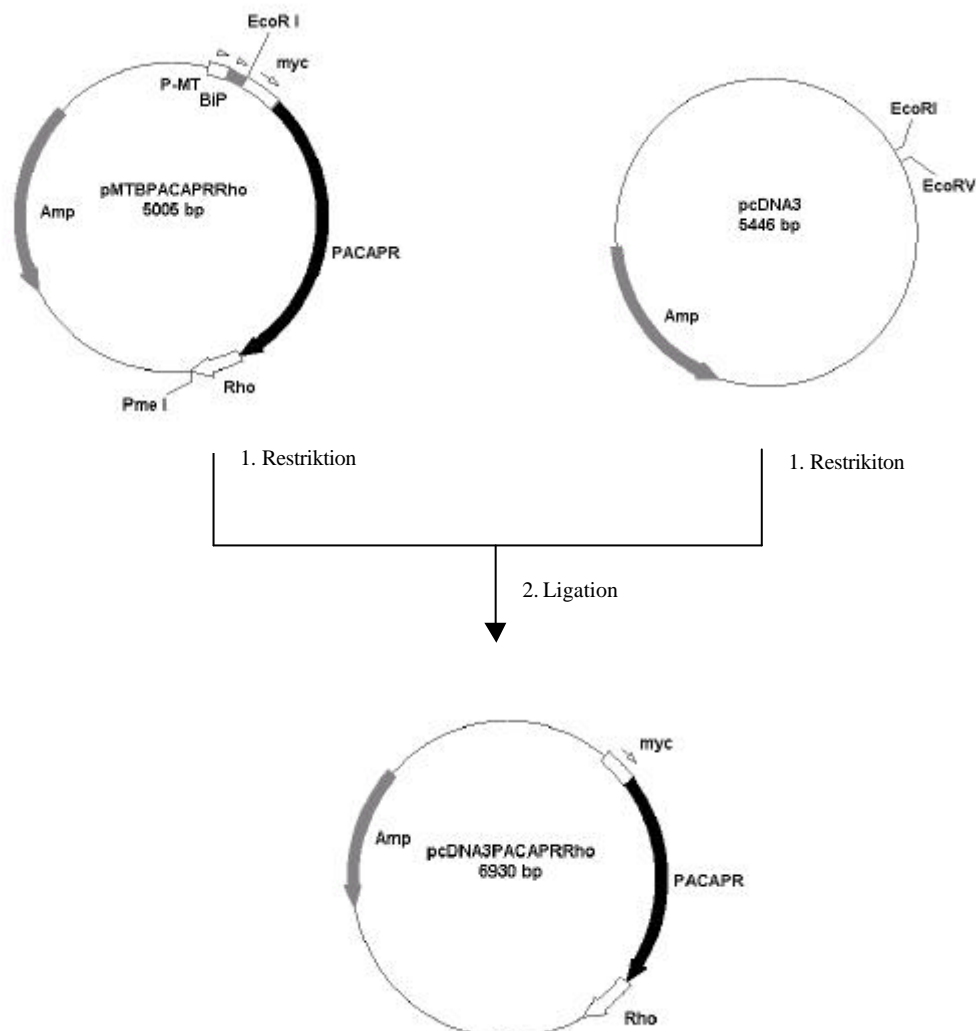


Abbildung 6: Klonierungsstrategie zum Erhalt des pcDNA3PACAPRRho-Vektors zur Expression in suspensionsadaptierten *HEK*-Zellen.

Der Ligationsansatz wurde transformiert und ein richtiger Klon durch Restriktionsanalyse identifiziert. Es wurde eine Dauerkultur angelegt und über eine Plasmid-Maxipräparation größere Mengen Plasmid-DNA zur Transfektion der suspensionsadaptierten *HEK*-Zellen erhalten.

2.2.3.3. Der Expressionsvektor für das Baculovirus-Expressionssystem

Aus dem erhaltenen pcDNA3PACAPRRho-Vektor (2.2.3.2.) wurde die cDNA des PAC1-Rezeptors mit N-terminalem myc- und C-terminalem Rho-Tag in den pFastBac-Vektor kloniert. Eine Übersicht über die angewandte Klonierungsstrategien zum Erhalt des pFastBacPACAPRRho-Vektors ist in der Abbildung 7 dargestellt.

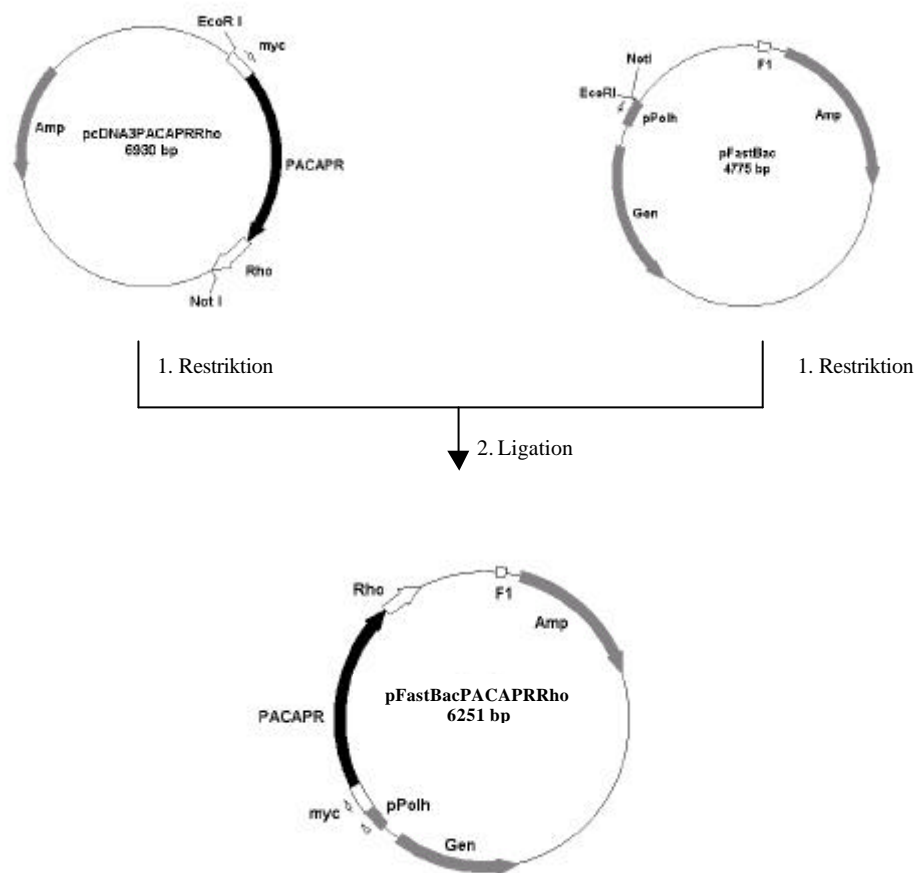


Abbildung 7: Klonierungsstrategie zum Erhalt des pFastBacPACAPRRho-Vektors zur Expression in *Sf9* und *Sf21*-Insektenzellen.

Der Ligationsansatz wurde transformiert und Minipräparations-DNA isoliert.

Der generierte Vektor war dann zur Transposition in AcNPV-Bacmid-DNA (2.2.8.2.) geeignet, die in speziellen kompetenten E.coli-Zellen (Invitrogen) enthalten war.

2.2.3.4. Der Expressionsvektor für die Expression in Bakterien

Für die Expression des PAC1-Rezeptors in Bakterien wurde die cDNA des Rezeptors in den pGexHis-Vektor transferiert. Der generierte pMTBPACAPRRho-Vektor (2.2.3.1.) wurde als Template für die Amplifikation der cDNA des PAC1-Rezeptors gewählt. Die Primer wurden so konstruiert, dass die Ligation des Amplifikates über die EcoRI- und die KpnI-Schnittstelle in den pGexHis-Vektor zu einer cDNA des PAC1-Rezeptors führte, die im Leserahmen mit dem GST-Tag und dem His-Tag standen. Eine Übersicht über die Klonierungsstrategie zum Erhalt des pGexPACAPRRhoHis-Vektors gibt die Abbildung 8. Der Ligationsansatz wurde in *DH5a*-Zellen transformiert und ein richtiger Klon isoliert. Die Plasmid-DNA des pGexPACAPRRhoHis-Vektors wurde isoliert und für die Expression des Rezeptorproteins in *BL21*-Zellen transformiert.

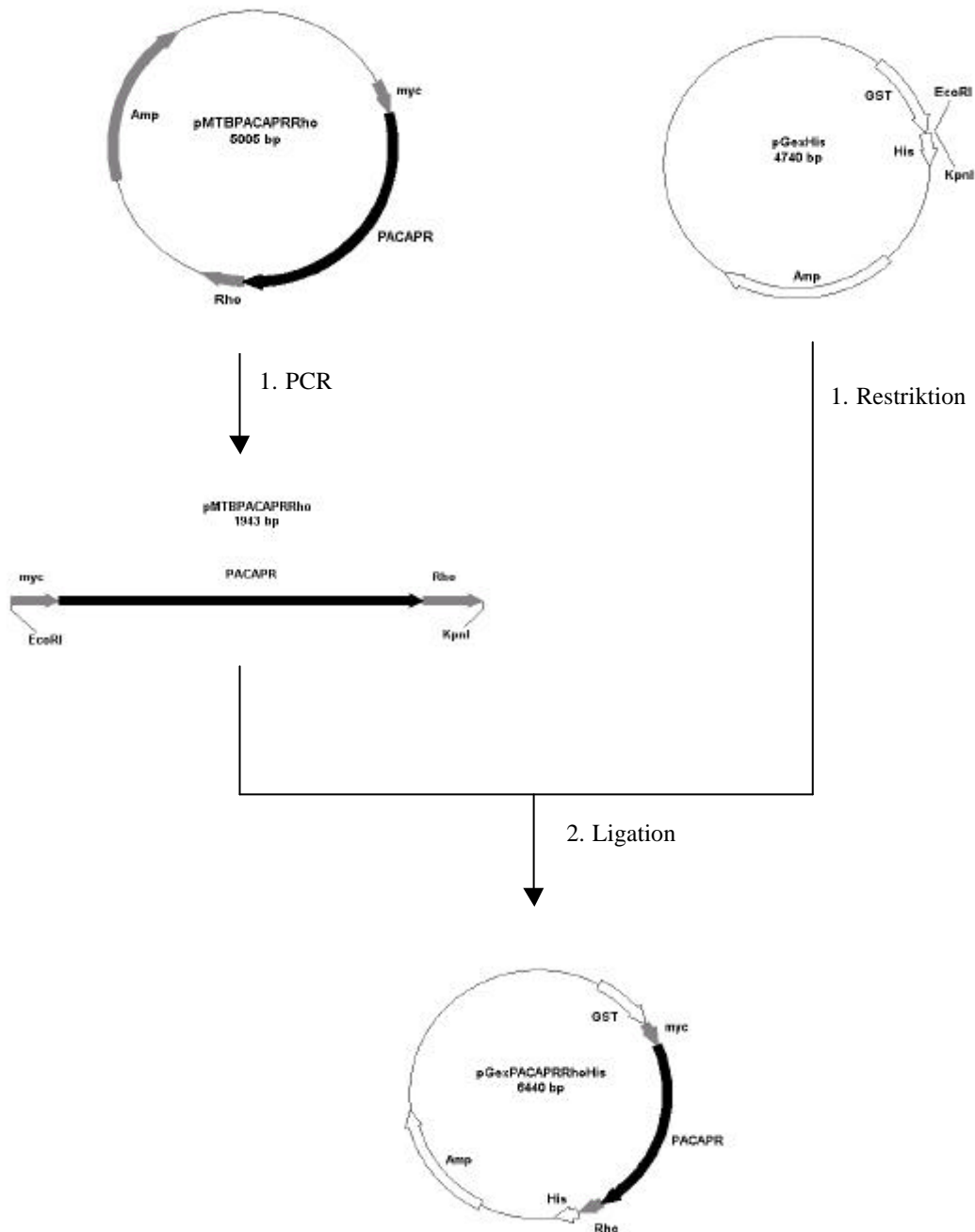


Abbildung 8: Klonierungsstrategie zum Erhalt des pGexPACAPRRhoHis-Vektors zur Expression in Bakterienzellen.

Für die PCR kamen folgende Primer zum Einsatz: 5'- CCG AAT TCA TGG ATC TCG AAC AAA AAC TCA TT - 3' (forward) und 5'- AAA CGG TAC CGG CAG GCG CCA CTT GGC TGG T - 3' (reverse).

2.2.4. Proteinexpression des PAC1-R in *E.coli* BL21-Zellen und Präparation von Inclusion bodies

Der *E.coli*-Stamm *BL21* wurde mit der Plasmid-DNA des pGexPACAPRRho-Plasmides (2.2.3.4.) transformiert und eine Dauerkultur (2.2.2.1.) angelegt. Von dieser Dauerkultur wurde eine Übernachtskultur angesetzt. Mit 1 ml dieser Übernachtskultur wurden 100 ml Ampicillin-LB-Medium angeimpft. Es erfolgte Inkubation bei 37°C im Bakterienschüttler. Bei einer $OD_{600} = 0,4-0,6$ wurde zur Induktion der Proteinexpression IPTG bis zu einer Konzentration von 100 μ M steril zugegeben und für 3 Stunden weiterinkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 1 min mit 3000 g bei 4°C geerntet und in 3 ml 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 25 % Sucrose resuspendiert. Die Probe wurde auf 1 mM EDTA eingestellt, mit 0,25 mg Lysozym pro ml Probe versetzt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Abschließend wurde 1 mM DTT und 20 μ g/ml PMSF zugegeben und alles bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen wurde auf 15 mM $MgCl_2$ und 5 μ g/ml DNase eingestellt und die Probe für eine Minute mit Ultraschall behandelt. Danach erfolgte Ultrazentrifugation für 30 min mit 250000 g bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 3 ml PBS/ 1 mM DTT suspendiert und nochmals in der Ultrazentrifuge wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich in 1 ml PBS/1 mM DTT suspendiert und die Fraktion als *InclusionBody*-Präparation bezeichnet, obwohl Bakterienmembran enthalten war.

2.2.5. Zellkulturmethoden

2.2.5.1. Kryokonservierung

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden Zellen eines konfluenten Zellrasens suspendiert und in der Tischzentrifuge für 5 min bei 2000 g mit Raumtemperatur sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml frischem Medium suspendiert und mit dem gleichen Volumen frisch zubereitetem Gefriermedium (Zellkulturmedium und 20 % (v/v) DMSO) verdünnt. Die Zellsuspension wurde in 1 ml-Portionen in Kryoröhrchen überführt, einige Stunden bei -20°C und über Nacht bei -70 °C vorgefroren. Anschließend wurden die Dauerkulturen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.5.2. Kultivierung eukaryontischer Zellen

HEK-Zellen (auch suspensionsadaptierte [32]) wurden auf Zellkulturschalen in DMEM-Medium bei 37°C im Zellkulturbrutschrank (5 % CO₂) kultiviert. Zum Passagieren dieser Zellen wurde das alte Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen und die Zellen für eine min mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, was zum Ablösen der Zellen führte. Die Zellsuspension wurde nach der Einwirkzeit zügig mit 9 ml PBS verdünnt und für 5 min mit 800 g bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen und die Zellen in geeigneten Verdünnungen auf neue Zellkulturschalen verteilt. Weiterhin war es möglich, die suspensionsadaptierten *HEK*-Zellen in einem Spinnerflaschensystem (Integra) zu kultivieren. Dafür wurden die Zellen von konfluent bewachsenen 10-cm-Schalen steril in die Spinnerflaschen überführt und auf einer Rührereinheit bis zur gewünschten Zelldichte bei 37°C weiterinkubiert. Der Luftraum über der Suspensionskultur wurde dabei mit steriler Brutschrankluft (5 % CO₂) begast. Es wurde darauf geachtet, dass das eingetragene Kulturvolumen nicht mehr als 1/5 des möglichen Füllvolumens überschritt.

S2-Zellen wurden in Zellkulturflaschen in DES-Medium bei 27°C kultiviert. Zum Passagieren dieser Zellen wurden sie mit einem Pipettenstrahl vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde für 5 min mit 800 g bei RT zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in geeigneten Verdünnungen auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.5.3. Transfektionsmethoden

Transfektion von *HEK*-Zellen

Für die stabile Transfektion von *HEK*-Zellen wurde die Kalziumphosphat-Transfektionsmethode angewendet. Von einer zu 50 % konfluenten 10-cm-Schale wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und mit der vorbereiteten Transfektionsmischung (10 µg DNA, 750 µl Wasser, 250 µl CaCl₂, 1 ml BBS wurden kräftig gemischt, für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit 8 ml MEM versetzt.) für 4,5 Stunden bei 3 % CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionsmischung abgesaugt und 2 ml Glycerinlösung zugegeben. Nach 3 min Inkubationszeit bei

Raumtemperatur wurde die Glycerinlösung wieder abgesaugt und die Zellen drei mal mit je 5 ml PBS gewaschen. Abschließend wurde frisches Medium zugegeben und die Zellen bei 5 % CO₂ im Inkubator weiter inkubiert.

Transfektion von S2-Zellen

Die Transfektion von S2-Insektenzellen wurde nach Angaben des mitgelieferten Protokolls (Drosophila Expressions-Kit, Invitrogen) mit 10 µg Plasmid-DNA durchgeführt.

2.2.5.4. Präparation von S2- und HEK-Zellmembranen

Die Zellen wurden mit der Pipette vom Schalen- oder Flaschenboden abgelöst, für 10 min mit 800 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis mit vorgekühlten Lösungen. Das Zellpellet wurde in 5 ml Puffer 1 (5 mM HEPES pH 7,4 /1 mM EDTA) suspendiert und 10 min bei 0°C inkubiert. Die Suspension wurde in einen Potter überführt und für 1 min bearbeitet. Das Suspensionsvolumen wurde mit Puffer 1 auf 20 ml erhöht und für 20 min mit 19000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml Puffer 2 (15 mM HEPES, pH 7,4) suspendiert. Es erfolgte die Behandlung im Potter, das Auffüllen des Suspensionsvolumens mit Puffer 2 auf 20 ml und Zentrifugation wie oben. Letzterer Schritt mit Puffer B wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet mit 5 ml Puffer 2 mittels Potter sehr gut homogenisiert. Die Zellmembransuspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5.5. Polylysinbeschichtung von Zellkulturschalen

Eine 10-cm-Zellkulturschale wurde mit 5 ml Poly-L-Lysin-Lösung (1 mg/ml steril) beschickt und für 30 min inkubiert. Die Poly-L-Lysinlösung wurde abgenommen und für weitere Beschichtungen verwendet. Die Zellkulturschale wurde drei mal mit 5 ml sterilem Wasser gewaschen und konnte dann einige Tage aufbewahrt werden. Wurden auf der beschichteten Platte sofort Zellen ausgesät, wurde nur zwei mal mit Wasser gewaschen und abschließend mit 5 ml PBS.

2.2.5.6. Behandlung von Zellen für die nachfolgende Fällung des Zellkulturüberstandes

Der alte Kulturüberstand einer 10-cm-Schale wurde abgesaugt und die Zellen zur Waschung vorsichtig mit 4,5 ml Medium ohne Zusätze überschichtet. Das Medium wurde abgesaugt und der Waschschrift nochmals wiederholt. Anschließend wurden die Zellen mit 4,5 ml Medium, das 5 % Glutamin und 5 µg/ml BSA (fettsäurefrei) enthielt, überschichtet und der jeweilige Stimulator oder Inhibitor zugesetzt. Die Zellen wurden für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert und der Überstand geerntet.

2.2.5.7. Kalziummessung

Die konfluent gewachsenen Zellen einer 10-cm-Schale wurden mit 5 ml Medium bedeckt. Es wurden 7,5 µl Fura-2/AM (1 mM in DMSO) dazugegeben und die Zellen für 30 min im Brutschrank weiterinkubiert. Anschließend wurde der Zellüberstand verworfen und 5 ml 37°C warmes PBS/0,5 M EDTA auf die Zellen gegeben. Die Lösung wurde kurz einwirken gelassen, die Zellen dann mit der Pipette abgelöst und in ein 15 ml Reagenzröhrchen überführt. Die Schale wurde mit 5 ml EDTA/PBS nachgewaschen, alles vereinigt und für 10 min mit 800 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 10 ml warmen HBS-Puffer überschichtet und nochmals für 5 min mit 800 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 5,5 ml HBS-Puffer suspendiert. Für die Messung des Kalziumeinstroms wurden jeweils 500 µl der Zellsuspension mit 2,5 ml HBS-Puffer in einer Küvette gemischt und das Extinktionsverhältnis gemessen. Dann wurde zu der Zellsuspension 10 µl der jeweiligen Ligandenlösung (300fach Stammkonzentration) zugegeben und der zeitliche Verlauf der Änderung des Extinktionsverhältnisses dokumentiert.

2.2.6. Das Drosophila-Expressionssystem

Das Drosophila-Expressionssystem beruht auf der Expression von Proteinen in Schneider2-Zellen (S2-Zellen). Die Schneider2-Zellen (S2-Zellen) wurden von der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* erhalten und besitzen den Vorteil, in loser Adherentkultur oder für größere Maßstäbe auch in Suspensionskultur zu wachsen. Mit Hilfe dieses Expressionssystems wurde der Glucagon-Rezeptor durch Tota *et al.* in hohem Maße überexprimiert [33]. Der Drosophila Expressionskit der Firma Invitrogen war Ausgangspunkt für die Expression des PAC1 in S2-Zellen. Die Transfektion der S2-Zellen mit der Mini-

Präparations-DNA erfolgte nach den Vorschriften des mitgelieferten Protokolls. Eine stabile Selektion erfolgte durch Zugabe des Selektionsantibiotikas Hygromycin (200 µg/ml).

24 Stunden vor der Ernte der S2-Zellen und der nachfolgenden Membranpräparation für die Expressionsanalyse wurde zur Induktion der PAC1-Expression sterile 100 mM Kupfersulfatlösung (Endkonzentration 0,5 bis 1,5 mM in 0,2er Schritten) zugegeben.

2.2.7. Die Expression in suspensionsadaptierten HEK-Zellen

Weiterhin wurde der PAC1-Rezeptor in suspensionsadaptierten Humanen Embryonalen Nieren-Zellen (HEK-Zellen) transformiert. Suspensionsadaptierte HEK-Zellen besitzen gegenüber nur adherent wachsenden HEK-Zellen den Vorteil, auf Zellkulturschalen sowie auch als Suspensionskultur (2.2.5.2.) kultivierbar zu sein.

Die Transfektion mit Mini-Präparations-DNA erfolgte wie unter 2.2.5.3. beschrieben. Eine Selektion nur der Zellen mit aufgenommener Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe des Antibiotikas G418 in das Zellkulturmedium. Die Zellmembran wurde präpariert (2.2.5.4.) und für die Expressionsanalyse eingesetzt.

2.2.8. Das Baculovirusexpressionssystem

2.2.8.1. Allgemeines zur Methode

Die wohl besten Ergebnisse bei der Überexpression von G-Protein gekoppelten Rezeptoren wurden bisher mit dem Baculovirus-Expressionssystem erhalten. Der Baculovirus ist nicht pathogen für Pflanzen und Tiere. Er führt jedoch bei der Aufnahme durch Insekten zur Zellylyse derselben, wobei der austretende Virus wieder auf der Pflanzenoberfläche verteilt wird. Pflanzen haben somit ein System entwickelt, sich wirksam vor Insektenfraß zu schützen.

Mittels Restriktionstechnik wurde die cDNA des PAC1-Rezeptors in den pFastBac-Vektor inkloniert und über eine F1-Integrationsstelle in die in *E.colis* enthaltene Virus-DNA eingefügt. Die Virus-DNA enthielt alle für die Virusinfektiösität und Virusamplifikation wichtigen Gene. Die cDNA des Rezeptors wurde so integriert, dass sie unter Einfluß eines der stärksten in der Natur bekannten Promotoren, des viralen Promoters Polyhedrin, stand. Bei erfolgreicher Integration wurde ein Galaktosidasegen zerstört. Dieser Umstand wurde zur Selektion richtiger Klone benutzt, da diese auf X-Gal-Agaroseplatten keine blaue Farbreaktion mehr ergaben. Die durch Mini-Präparation erhaltene Bacmid-DNA wurde zur Transposition von Insektenzellen eingesetzt. Die Zelllinien des Nachtfalters *Spodoptera*

frugiperda (*Sf*) kamen zur Anwendung des Baculovirus-Expressionssystems. *Sf9*-Zellen sind für die Amplifikation des Virus besser geeignet, *Sf21*-Zellen dagegen für die Expression des Proteins.

Sf9-Zellen werden in TMNFH-Medium kultiviert und besitzen gegenüber *Sf21*-Zellen einen langsameren Stoffwechsel. Sie wurden mit der erhaltenen Bacmid-DNA transfiziert und zur Gewinnung von viralen Überständen wurde der Zellkulturüberstand geerntet. Es wurde nach Protokoll (Invitrogen) weitergearbeitet und somit ein Viruslysate mit einer Anzahl von ca. 10^8 Viren enthalten. Um eine erfolgreiche Expression zu erhalten, muss eine bestimmte Anzahl von Viren pro Zelle vorhanden sein. Dieses Verhältnis beschreibt die Multiplizität der Infektion (MOI).

Für eine optimale Infektion wurden die *Sf21*-Zellen mit einer MOI von 5-10 infiziert. Die Ernte der infizierten *Sf21*-Zellen erfolgte nach 3 Tagen (72 h) mit anschließender Membranpräparation. Der Zellüberstand enthielt Virus und wurde gesammelt.

Wurde die Infektion der Zellen mit frisch präparierten Virusüberständen vorgenommen, mußte vor der Infektion der Zellen, also vor der Zugabe der Viruslysate, das äquivalente Volumen an Zellkulturüberstand entfernt werden. Um diesen Schritt zu vermeiden, wurden die Spinnerflaschen meist nur bis zu 2/3 mit dem Insektenzellmedium befüllt. Bei Infektion der Zellen mit aus Expressionsüberständen präpariertem Virus war das Virusvolumen meist so gering, dass es nur zugesetzt werden mußte. Es wurde mit einer MOI von 5-10 infiziert. Drei Tage (72 h) nach der Infektion wurden die Zellen geerntet. Dafür wurde mit einer Filtrationseinheit der Kulturüberstand steril geerntet und der Virus aus ihm zurückgewonnen (2.2.8.10.). Die eingengten Zellen wurden abzentrifugiert, gewaschen und wie beschrieben die Membran präpariert.

2.2.8.2. Herstellen von Luria-Agar-Platten

3,7 g Luria-Agar wurde mit 100 ml Wasser versetzt und für 10 min autoklaviert. Anschließend wurden in die ca. 50°C warme Lösung Zusätze nach folgender Tabelle 3 eingebracht:

Zusatz	Endkonzentration µg/ml	Stammkonzentration mg/ml	Pipettiervolumen µl
Kanamycin	50	10	500
Gentamicin	7	25	28
Tetracyclin	10	10	100
IPTG	40	200	20
Bluo-Gal	300	20	1500

Tabelle 3: Pipettierschema für die Antibiotikazugabe zu Luri-Agar-Platten

Die Lösung wurde durchmischt, sofort auf 5–6 Bakterienplatten verteilt und bei 4°C gelagert.

2.2.8.3. Transposition zum Erhalt viraler DNA

Die präparierte pFastBacPACAPRRho-Plasmid-DNA (2.2.3.3.) wurde mittels Transposition in die Bacmid-DNA eingebracht. Dafür wurden 1 ng der Plasmid-DNA mit 100 µl der kompetenten *DH10Bac*-Zellen (Invitrogen) vermischt, 30 min auf Eis inkubiert und für 45 s auf 42°C gebracht. Anschließend wurden die Zellen nochmals für 2 min auf Eis gestellt, dann mit 900 µl SOC-Medium versetzt und für 4 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von der Transformationslösung wurde dann mit SOC-Medium eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen bis zu einer Verdünnung von 10^{-3} hergestellt. Jeweils 200 µl der Verdünnung wurden auf den Luri-Agar-Platten (2.2.8.2.) ausplattiert und für 36 Stunden im Brutschrank inkubiert. Es wurden nur weiße, von den anderen Kolonien gut getrennte Kolonien gepickt und auf frische Luria-Agar-Platten ausplattiert. Blaue Kolonien enthalten keine eingebaute Plasmid-DNA. Das LB-Medium für Übernachtskulturen wurden mit den Antibiotika Kanamycin (50 µg/ml), Gentamycin (7 µg/ml) und Tetracyclin (10 µg/ml) versetzt. Es wurde eine Dauerkultur (2.2.2.1.) angelegt und Minipräparations-DNA nach der Puffermethode (2.2.2.3.) hergestellt, wobei sie aufgrund ihrer Größe nicht gevortext werden sollte. Die DNA konnte aufgrund ihrer Größe (Virus-DNA!) nicht über Restriktionsanalyse analysiert werden. Darum war das Weiterverarbeiten nur optisch eindeutig weißer Klone sehr wichtig.

2.2.8.4. Kultivierung von *Sf9*-Insektenzellen

Die Kultivierung der *Sf9*-Zellen erfolgte bei 27°C in TMNFH-Medium in einem unbegasteten Brutschrank in Zellkulturflaschen oder in einem wasserdampfgesättigtem Brutschrank in Zellkulturschalen .

2.2.8.5. Monolayerkulturen

Die Kultivierung von Insektenzellen in Medienvolumina von 5-60 ml erfolgte als Monolayer in sterilen Gewebekulturflaschen oder Zellkulturschalen, in die frisches Zellkulturmedium vorgelegt und mit einer Zellsuspension im Verhältnis 5:1 angeimpft wurde. Die Zellkultur wurde bis zur Konfluität inkubiert. Für die Passage wurden die Zellen vom Flaschenboden abgeklopft bzw. mit einem Mediumstrahl aus der Pipette abgelöst und zum Animpfen von frischem Medium in einem Verhältnis von 1:5 eingesetzt. Bei Zellpassagen wurden pro 25

cm²-Flasche 5 ml, pro 75 cm² Flasche 15 ml und pro 150 cm²-Flasche 40 ml Zellkulturmedium verwendet. Für 10 cm Zellkulturschalen wurden 10 ml und für 15 cm Zellkulturschalen 20 ml Zellkulturmedium eingesetzt.

2.2.8.6. Begaste Suspensionskulturen

Präparative Suspensionskulturen von *Sf21*-Zellen wurden in einem selbst entwickelten Superspinnersystem mit Begasungseinrichtung und Anstechgarnitur durchgeführt.

2.2.8.7. Transposition von *Sf9*-Zellen zum Erhalt von Viruslysat

Zur Infektion von *Sf9*-Zellen mit der erhaltenen Bacmid-DNA wurde die Zellen auf einer 6-Loch-Platte kultiviert. Zellen, die zu 50 % konfluent gewachsen waren, wurden infiziert. Das alte Medium wurde abgesaugt und die *Sf9*-Zellen zwei mal mit 2 ml TMNFH-Medium ohne Antibiotika-Zusätze gewaschen. Der Transfektionsmix (5 µl Bacmid-DNA (2.2.8.3.) in 200 µl Medium ohne Antibiotika wurden zu 6 µl CellFectin in 100 µl Medium ohne Antibiotika getropft, vorsichtig geschwenkt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließendes Eintropfen der Lösung in 800 µl Medium ohne Antibiotika und umschwenken) wurde auf die Zellen gegeben und die Zellen für 5 Stunden im Brutschrank weiter inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Transfektionsmix abgesaugt und 2 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben. Nach sieben Tagen sollten die Zellen erste Anzeichen einer Infektion, also einer beginnenden Zelllyse, aufzeigen. Der Zellüberstand enthielt erste Virenpartikel, die zur Virusamplifikation eingesetzt wurden.

2.2.8.8. Infektion von *Sf9*-Zellen zur Amplifikation von rekombinanten Baculoviren

Rekombinante Baculoviren wurden in *Sf9*-Monolayerkulturen amplifiziert. Konfluent mit *Sf9*-Zellen in TMNFH-Komplettmedium bewachsene Gewebekulturschalen wurden zur Virusamplifikation mit 1 ml Virenüberstand (2.2.8.7.) infiziert. Nach acht Tagen Inkubation wurden die Zellen mit 1500 g bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge sedimentiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die Zellen nach 3 Tagen deutliche Infektionsmerkmale trugen. Der Überstand kann bei 4°C im Dunkeln bis zu 6 Monaten gelagert werden.

2.2.8.9. Präparative Expression des PAC1-Rezeptors in Sf21-Zellen

Zur präparativen Expression des Rezeptors in Sf21-Zellen wurde ein Eigenbau-Superspinnersystem (H. Reiländer, MPI für Biophysik, Frankfurt) modifiziert. 2000 ml-Spinnerflaschen waren mit einer Begasungseinrichtung versehen, die ein steriles und gasblasenfreies Einbringen von Sauerstoff in das Kulturmedium erlaubte. Als Begasungsmembran wurde AccurelTM-Polyethylenmembran (Akzo Nobel, Wuppertal) verwendet. Zusätzlich zur Begasungseinrichtung wurde das System mit einer Crossflow-Filtrationseinheit versehen, welche den sterilen Anschluß einer Zellfiltrationseinheit erlaubte, der Zugang zur Flasche wurde dabei mit einer autoklavierbaren Silikonsepten verschlossen. Die Durchmischung der Zellsuspension erfolgte über einen Magnetrührer, der in 3 cm Höhe vom Flaschenboden beweglich an der Halterung der Begasungsmembran befestigt war.

Die Viruszugabe erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Viruszugabe (ml)} = \text{MOI (pfu / ml)} * \text{Zellzahl} / \text{Titer (pfu / ml)}$$

Es wurde mit einer MOI von 5-10 infiziert. Der Titer des jeweiligen Virusstockes wurde nach den Angaben des Kits (Invitrogen) abgeschätzt.

Bei einer Zelldichte von 1×10^6 -Zellen/ml bei einem Gesamtvolumen von 1300 - 1500 ml wurden die Flaschen infiziert. Dazu wurde das Viruslysate unter sterilen Bedingungen in die Flasche eingebracht. Die Flasche wurde dann lichtgeschützt im Wasserbad mit 27°C für 3 Tage weiterinkubiert (Expressionsmaximum nach 72 h).

2.2.8.10. Isolierung von rekombinanten Baculoviren aus Expressionskulturüberständen

Die Rückgewinnung des Baculovirus aus den Expressionkulturüberständen erfolgte mittels Ultrazentrifugation. Hierzu wurde das sterile Filtrat einer präparativen Expressionskultur (2.2.8.9.) in sterile Beckman Type 19 -Zentrifugenbecher überführt und für 1 h bei 4 °C mit 50000g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das erhaltene Viruspellet wurde im hundertsten Teil des zur Virusisolierung eingesetzten Kulturvolumens resuspendiert. Die Baculovirus suspension wurde bei 4 °C im Dunkeln bis zu sechs Monaten gelagert.

2.2.8.11. Präparation von Sf21-Zellmembranen

Die eingegangene Zellsuspension wurde aus der Spinnerflasche in sterile Zentrifugenbecher überführt und für 10 min mit 1500 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Rückgewinnung des Virus benutzt (2.2.8.10.). Das Zellpellet wurde mit 100 ml kaltem PBS gewaschen und nochmals wie oben zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 50 ml

Lysispuffer suspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension für zwei mal 30 s mit dem Polytronmixer behandelt und für 20 min mit 10000 g bei 4°C im JA20-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wieder in 50 ml Lysispuffer suspendiert. Die Polytron-Mixer-Behandlung und Zentrifugation wurden solange wiederholt, bis in der unter dem Mikroskop betrachteten Suspension keine intakten Zellen mehr vorhanden waren. Die Suspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.7. Proteinchemische Methoden

2.2.7.1. Synthese des PACAP27-Ala₇-Cys-Bio

Entschützung des PACAP27-Ala₇-Cys-Bio

Das Peptid PACAP27-Ala₇-Cys-Bio (Abbildung 9) wurde in 1 ml TFA gelöst und Silbertrifluoracetat in ebenfalls 1 ml TFA zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde zwei Stunden bei 20°C gerührt. Danach wurde der Ansatz mittels Rotationsverdampfer eingengt und das zurückbleibende gelbliche Öl mit 5 ml Diethylether versetzt, was sofort zum Ausfallen eines amorphen Niederschlages führte. Von diesem Niederschlag wurde der Ether vorsichtig abgenommen. Das zurückgebliebene Salz wurde in 500 µl 50%iger Essigsäure gelöst, mit Ethandiol versetzt und für wiederum zwei Stunden bei 20°C gerührt. Das entstandene Präzipitat wurde über eine Fritte abgesaugt und das Filtrat auf eine vorbereitete C18- Säule gegeben. Es wurde mit 20 ml 0.1%iger TFA gewaschen und mit 10 ml Puffer B eluiert. Nach der Gefriertrocknung des Eluates verblieb das entschützte Peptid PACAP27-Ala₇-Cys in Form eines weißen Rückstandes. Die Konzentration der wäßrigen Lösung wurde wie in (2.2.1.4.) beschrieben bestimmt. Weiterhin wurde die Vollständigkeit der Entschützung mittels HPLC überprüft werden (Abbildung 10).

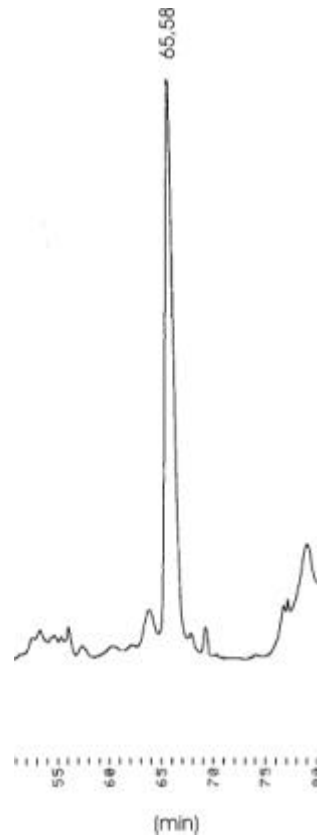


Abbildung 9: Chromatogramm des PACAP-Ala₇-Cys-Acm (geschütztes Peptid).

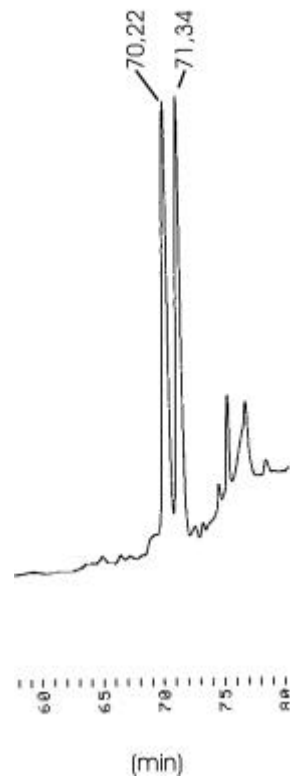


Abbildung 10: Chromatogramm des PACAP-Ala₇-Cys (entschütztes Peptid).

Biotinylierung des entschützten Peptides

Zum gelösten, entschützten Peptid PACAP27-Ala₇-Cys wurde tropfenweise N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamid (Biotin-HPDP) in DMF in 10fachem Überschuß gegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C gerührt. Nach Feststellung der Vollständigkeit der Reaktion mittels HPLC wurde die Reaktionsmischung über HPLC gereinigt. Die gesammelten Fraktionen wurden in der Speedvak einrotiert, in Wasser gelöst und mittels HPLC auf Reinheit überprüft (Abbildung 11). Die Konzentration der Lösung wurde bestimmt (2.2.1.3.) und die Aliquots bei -20°C gelagert.

- Elutionsprogramm HPLC:
- 0-5 min 0 % Puffer B
 - 5-15 min 35 % Puffer B
 - 15 - 45 min 50 % Puffer B
 - 45 - 60 min 100 % Puffer B
 - 60 - 80 min 0 % Puffer B

Die Interpretation der Peaks erfolgt im Ergebnissteil dieser Arbeit (3.1.1.).

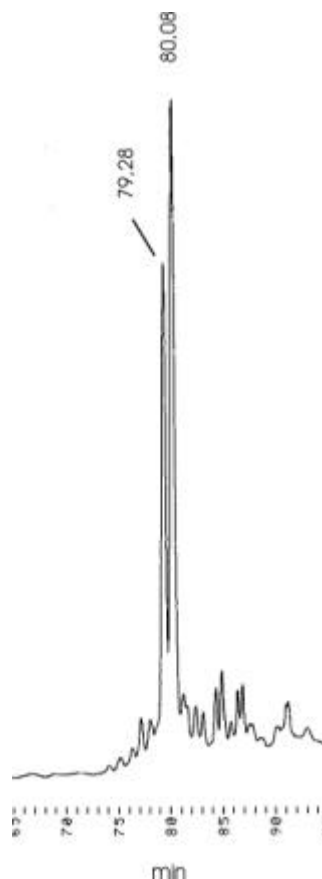


Abbildung 11: Chromatogramm des PACAP27-Ala₇-Cys-Bio (biotinyliertes Peptid).

2.2.7.2. Iodierung des photoreaktiven PACAP27-Liganden

Als Ausgangspeptid für die Iodierung stand das PACAP-Analogon [Phe⁶(pBz)]PACAP27 zur Verfügung. Es besitzt in Position 6 eine Benzophenongruppe. Über die Iodierung mittels Iodogen-Methode [34] wurde an Position 10 oder 15 des Liganden das radioaktive Iod-Isotop ¹²⁵I eingeführt. Es besitzt eine Halbwertszeit von 60 Tagen.

Für die Iodierung wurde ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Iodogen beschichtet. Dafür wurden 1,4 mg Iodogen in 7 ml Chloroform gelöst, 30 µl der Lösung in das Kunststoffgefäß überführt und die Lösung mit sanftem Stickstoffstrahl eingedampft. Die Lagerung konnte dann einige Monate bei -20°C erfolgen. In das Reaktionsgefäß wurden 1 nmol [Phe⁶(pBz)]PACAP27 in einem Volumen von 10 µl gegeben und 30 min bei Raumtemperatur sanft geschüttelt. Anschließend wurden die 10 µl [Phe⁶(pBz)]PACAP27 in ein neues, mit Iodogen beschichtetes Reaktionsgefäß überführt, die Lösung mit 10 µl Dreifach-Iodierungspuffer verdünnt und auf Eis gestellt. Es erfolgte dann die Zugabe von 0,5 nmol Na¹²⁵I in einem Volumen von 10 µl. Alles wurde für 5 min auf Eis inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 5 µl TCA gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde mit Puffer A auf 100 µl verdünnt und über HPLC getrennt. Die Fraktionen mit dem iodierten [Phe⁶(pBz)]PACAP27 wurden vereinigt, mittels Zugabe von HEPES neutralisiert und auf 0,2 % Dodecylmaltosid und 90 mM NaCl eingestellt. Nach Aliquotierung erfolgte die Lagerung bei -20°C.

Es wurde folgendes Elutionsprogramm benutzt:

- 0-10 min 10-30 % Puffer B
- 10-60 min 30-45 % Puffer B
- 60 - 75 min 45-100 % Puffer B
- 75 - 105 min 0 % Puffer B

Die folgenden HPLC-Chromatogramme geben einen Überblick über den Reaktionsverlauf der Iodierung. Die Interpretation der Peaks erfolgt im Ergebnisteil dieser Arbeit (3.1.2.).

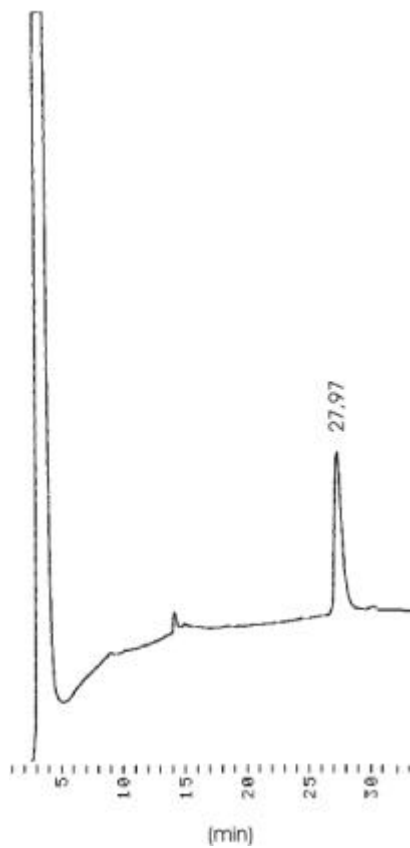


Abbildung 12: Chromatogramm des vollständig oxidiertem photoreaktiven Liganden.

Die erfolgte Oxidation des Eduktes durch Iodogen führte zur Verschiebung der Retentionszeit um 1 min nach hinten auf 27,97 min.

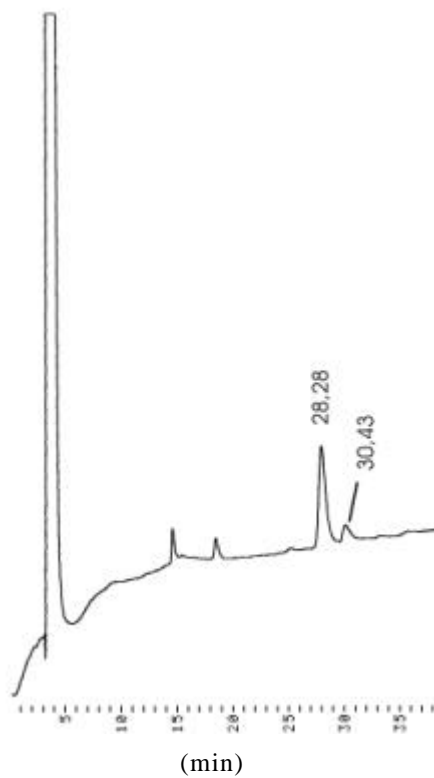


Abbildung 13: Chromatogramm der Iodierungsreaktion.

Vollständig oxidiertes Edukt: 2828

Iodiertes Produkt: 30,43

2.2.7.3. Synthese von ^3H -Propionyl- PACAP27

200 μCi des N-Propionylsuccinimids (5 nmol) in 200 μl Toluol wurden in einem Reaktionsgefäß mit 20 μl DMF versetzt und kurz gemischt. Die Lösung wurde in einem sanften Stickstoffstrom bis auf ein Volumen von 20 μl eingedampft. Es wurde eine Mischung von 9 μl PACAP27 (3 nmol) und 1 μl Morpholin (1:10 verdünnt mit DMF) zugegeben und der Reaktionsansatz für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 μl TFA zugegeben. Es wurde mit 20 μl Puffer A verdünnt und auf die Microbore-HPLC aufgetragen (Abbildung 14, Elutionsprogramm: 0-60 min von 20 % auf 40 % Puffer B, 60-70 min von 40 % auf 100 % B). Die Fraktionen (200 $\mu\text{l}/\text{min}$) wurden gesammelt und ein Aliquot (10 μl) von ihnen im β -Counter auf Radioaktivität untersucht (Abbildung 15). Es entstanden vorwiegend zwei radioaktiv markierte Reaktionsprodukte. Die Verlaufsform der chromatographischen Auftrennung (Abbildung 15) ist dabei mit dem Chromatogramm der kalten Markierung (Abbildung 14) identisch.

Es wurden beide Reaktionspeaks getrennt gesammelt und charakterisiert.

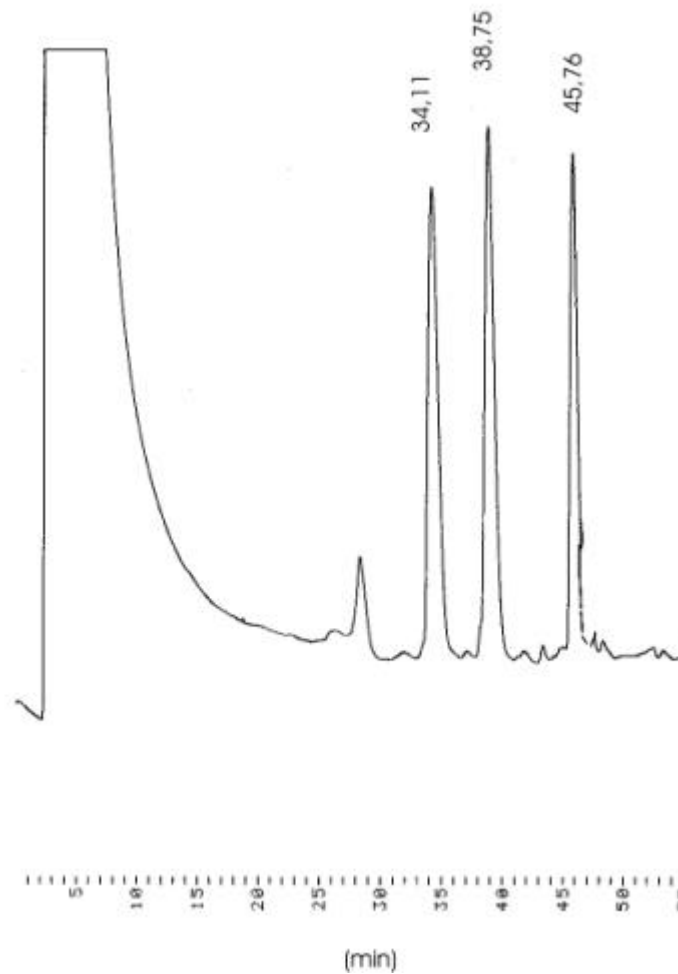


Abbildung 14: Chromatogramm der ^3H -Propionyl- PACAP27-Synthese.

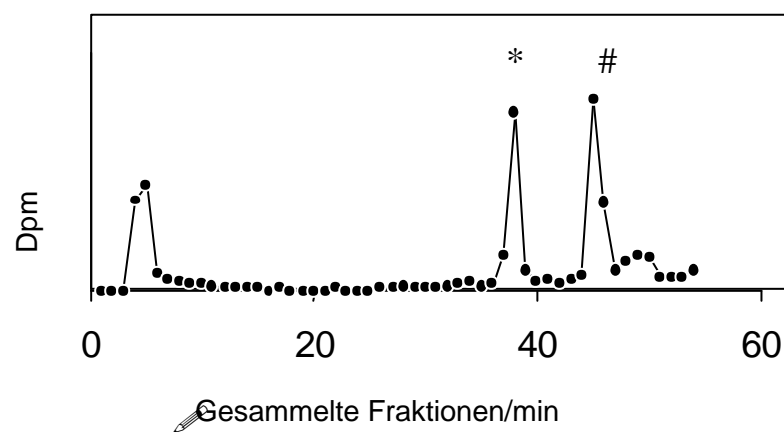


Abbildung 15: Radioaktiver Verlauf der Auftrennung des Reaktionsgemisches mittels Microbore-HPLC.
* entspricht dem Reaktionspeak in Abbildung 14 mit der Retentionszeit von 38,75 min.
entspricht dem Reaktionspeak in der Abbildung 14 mit der Retentionszeit von 45,76 min.
Der Peak des Ausgangsproduktes aus der Abbildung 14 mit einer Retentionszeit von 34,11 min ist hier nicht detektiert worden, da er keine radioaktive Markierung besass.

2.2.7.4. Bindungstests

In einem Reagenzröhrchen wurden 10 µl Wasser sowie 0,5 nmol des heißen Liganden in einem Volumen von 10 µl vorgelegt. Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde das Wasser durch 5 nmol PACAP27 in einem Volumen von 10 µl ersetzt. Zu den Ansätzen wurde die Membran in einem Volumen von 80 µl zugegeben. Alle Pipettierungsschritte erfolgten auf Eis. Die Ansätze wurden dann für 30 min bei 25°C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Filtration über GF/C-Filter, die zuvor für 4 Stunden in 0.3 % PEI-eingelegt wurden. Für die Filtration wurden die Ansätze mit 3 ml eiskaltem Filtrationspuffer versetzt und über eine 12-Loch-Filtrationsapparatur mittels Wasserstrahlvakuum filtriert. Die Filter wurden drei mal mit gleichem Volumen an Filtrationspuffer gewaschen und die verbliebene Radioaktivität auf den Filtern in einem γ -Counter vermessen.

Sättigungstest

Die Durchführung von Bindungstests für Sättigungskurven erfolgte bis auf folgende Ausnahmen analog zu den Bindungstests: Die Konzentration des heißen Liganden und des PACAP27 variierte, die Ansätze wurden für 60 min bei 25°C inkubiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm RADLIG.

Displacementexperimente

Die Durchführung von Displacementexperimenten zur Bestimmung von K_d -Werten erfolgte bis auf folgende Ausnahmen analog zu den Bindungstests:

Die Konzentration des heißen Liganden und des PACAP27 variierte, die Ansätze wurden für 60 min bei 25°C unter Schütteln inkubiert.

2.2.7.5. Solubilisierung des Rezeptors

Solubilisierung mit Digitonin

Die entsprechende Menge Membran wurde mit 5 % Digitoninlösung und PBS-Puffer, der ein Proteaseninhibitormix (Roche) enthielt, auf die gewünschte Proteinkonzentration von 2 mg/ml und 1 % Digitonin eingestellt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 4°C inkubiert.

Solubilisierung mit Dodecylmaltosid

Die entsprechende Menge Membran wurde mit 10 % Dodecylmaltosidlösung und PBS-Puffer, der ein Proteaseninhibitormix (Roche) enthielt, auf die gewünschte Proteinkonzentration von 5 mg/ml und 1 % Dodecylmaltosid eingestellt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 4°C inkubiert.

Für Versuchsreihen wurden die Solubilisierungsansätze für eine Stunde in der Tischzentrifuge mit 10000 g bei 4°C zentrifugiert. Für präparative Ansätze erfolgte die Zentrifugation in der Ultrazentrifuge mit 120000g bei 4°C für 30 min. Die Solubilisate wurden gleich weiterverarbeitet.

2.2.7.6. Herstellung einer 1D4-Antikörpersäule

Gelpräparation:

0,5 g Gel (aktivierte CH-Sepharose 4B) wurde in 100 ml 1 mM HCl suspendiert und in eine Säule mit Fritte überführt. Die Säule wurde an eine Peristaltikpumpe angeschlossen und die Suspension für 15 min mit 100 ml 1 mM HCl gewaschen. Danach erfolgte die Waschung der Suspension mit 5 ml Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8). Es blieb ein Gelvolumen von 1,5 ml zurück.

Antikörperkopplung:

1 ml des 1D4-Antikörpers (2 mg/ml in Kopplungspuffer) wurden mit der Gelsuspension in einer verschließbaren Säule mit Fritte gemixt. Die Kopplung erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Invertieren im Überkopfschüttler. Sodann wurde das Gel durch Waschen mit 7,5 ml Kopplungspuffer von nicht gebundenem 1D4-Antikörper befreit. Noch aktivierte Gruppen der Sepharose wurden durch Inkubation des Gels in 0,1 M Tris-HCl für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Invertieren geblockt. Anschließend erfolgten drei Zyklen alterniernden Waschens mit 7,5 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 4,0, 0,5 M NaCl und danach mit 7,5 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 0,5 M NaCl. Zum Abschluß wurde das Gel letztmalig mit 15 ml PBS gewaschen und in PBS/ 0,1 % NaN₃ bei 4°C gelagert.

2.2.7.7. Antikörperaffinitätschromatographie

Das verwendete Chromatographieverfahren beruhte auf der Bildung eines Antikörper-Epitop-Komplexes. Als Epitop fungierte das in den PAC1-Rezeptor C-terminal eingefügte Rho-Epitop. Dieses Epitop bestand aus den 15 C-terminalen Aminosäuren des Rhodopsins. Es wird natürlicherweise von dem 1D4-Antikörper erkannt. Dieser Antikörper wurde an eine Trägermatrix gebunden. Als Trägermatrix fungierte aktivierte Sepharose.

Zu 1,5 ml Solubilisat wurden 50 µl mit dem entsprechenden Solubilisierungspuffer gewaschene 1D4-Antikörpersepharose (2.2.7.6.) gegeben. Alles wurde für mindestens vier Stunden oder über Nacht bei 4°C unter Invertieren inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 1 min bei 4°C mit 1500 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgenommen. Zur Sepharose wurden 200 µl Solubilisierungspuffer gegeben, kurz gemischt, für 10 s wie oben abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Waschschrift wurde noch einmal mit Solubilisierungspuffer und danach mit Elutionspuffer wiederholt. Der Elutionspuffer enthielt nur noch 50 % der Detergenzkonzentration des Solubilisierungspuffers, ansonsten jedoch gleiche Pufferkonzentrationen. Zur Elution des Rezeptors wurde die Sepharose mit 50 - 100 µl Elutionspuffer versetzt und das Elutionspeptid C9 (Stammkonzentration 20 mM) bis zu einer Endkonzentration von 200 µM zugesetzt. Alles wurde für eine Stunde bei 4°C geschüttelt und danach wie oben kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteine gefällt oder zur Vermeidung von Bindungsverlust sofort in die Ligandenaffinitätschromatographie eingesetzt.

Sequenz des Elutionspeptides C9: H₂N-TETSQVAPA-CONH₂

2.2.7.8. Ligandenaffinitätschromatographie

Für die Ligandenaffinitätschromatographie wurde 100 µl des Eluates (2.2.7.7.) sowie der biotinylierte modifizierte PACAP27-Ligand (2.2.7.1., Endkonzentration 50 µM) eingesetzt. Die Mischung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert, um Bedingungen für die Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes zu erreichen. Anschließend wurden 50 µl Streptavidinagarose (Quiagen) zugesetzt und für eine weitere Stunde bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Streptavidinagarose wurde mit 1500 g für 10 s bei 4°C in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, 3x mit 200 µl Solubilisierungspuffer gewaschen und das Rezeptorprotein mittels Zugabe von 100 µl Elutionspuffer (pH 4,0; 0,5 % Detergens) und Inkubation für 5 min von der Agarosematrix eluiert. Aus dem Eluat wurden mittels der

Chloroform-Methanol-Fällung (2.2.1.5.) die Proteine präzipitiert, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf einem Minigel aufgetrennt.

2.2.7.9. Photoreaktive Markierung

100 – 150 µg der zu markierenden Membran wurde in 200 µl Bindungspuffer ohne BSA mit einer Konzentration des photoreaktiven Liganden I^{25} -[Phe⁶(pBz)]PACAP27 (2.2.7.2.) von 0,5 nM suspendiert und für 60 min bei 25°C unter Schütteln inkubiert (Bindungstestbedingungen). Danach wurde die Lösung durch die Verdünnung mit 1800 µl eiskaltem Bindungspuffer ohne BSA und Stellen auf Eis sehr schnell abgekühlt. Die Probe wurde in eine Quarzküvette überführt. Die Bestrahlung erfolgte unter kontinuierlichem Kühlen der Küvette auf 4°C für 45 min in einer Bestrahlungseinheit der Firma Leitz, Wetzlar. Es wurde eine Quecksilberdampfampe vom Typ HBO 200 (Osram) und ein Glasfilter (Schott, Mainz) zum Absorbieren der Wellenlängen unterhalb von 310 nm verwendet.

Solubilisate und Eluate wurden mit 2x Bindungspuffer verdünnt und unter Bindungstestbedingungen mit dem photoreaktiv markiertem Liganden (0,5 nM) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zur schnellen Abkühlung in die eisgekühlte Küvette überführt. Die Bestrahlung erfolgte wie oben. Für die SDS_Polyacrylamidgelelektrophorese wurde ein Aliquot der Probe mit gleichem Volumen an 2xSDS-Probenpuffer versetzt oder die Proteine des Ansatzes mittels Methanol/Chloroform-Fällung (2.2.1.5.) präzipitiert.

2.2.7.10. Enzymatische Deglykosilierung

Die photoreaktiv markierte Membran (2.2.7.9.) wurde abzentrifugiert und in 100 µl Deglykosilierungspuffer resuspendiert. Es erfolgte Zugabe von 2,5 µl PNGaseF (10U). Die Deglykosolierung erfolgte für 4 Stunden bei 37°C. Anschließend wurde die Membran über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und radiographisch detektiert.

2.2.7.11. Proteolytischer Verdau des photoreaktiv markierten Rezeptors

Zu dem photoreaktiv markiertem Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie (2.2.7.7.) wurden 2 µl Kallikrein (10 U) zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 25°C inkubiert.

Alternativ wurde in einem weiteren Reaktionsansatz die Proteine des Eluates der Antikörperaffinitätschromatographie nach der photoreaktiven Markierung gefällt (2.2.1.5.), das Proteinpellet durch einstündige Inkubation in 1 % SDS gelöst und mit Kallikrein-Puffer

(2.1.12.) auf 0,1 % SDS verdünnt. Nach der Zugabe von 2 µl Kallikrein (10 U) wurde über Nacht bei 25°C verdaut.

2.2.7.12. Immunopräzipitation

Das Probenvolumen wurde mit PBS auf 500 µl eingestellt und mit 100 µl Protein A-Sepharose für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Die Protein A-Sepharose wurde abzentrifugiert, der Überstand mit der Antikörperlösung und 100 µl Protein A/G-Sepharose versetzt und über Nacht bei 4°C unter Invertieren inkubiert. Anschließend wurde die Protein A/G-Sepharose abzentrifugiert, mit 2 x 500 µl PBS und abschließend mit 500 µl Wasser gewaschen. Zur Elution wurden 100 µl Zitronensäure pH 3,0 zugesetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Ein Aliquot des Eluats wurde mit Auftragspuffer gemischt und aufgetragen.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung verschiedener PACAP27-Liganden

3.1.1. Synthese und Charakterisierung des PACAP27-Ala₇-Cys-Bio

Ein Ziel dieser Arbeit war die Anreicherung des PAC1-Rezeptors in seiner funktionellen Form, um ihn photoreaktiv markieren zu können. Ein sich anschließender proteolytischer Verdau des photoreaktiv markierten PAC1-Rezeptors sollte zur Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle führen.

Ein Schritt zum Erhalt des angereicherten funktionellen Rezeptors bietet die Methode der Affinitätschromatographie mit einem biotinylierten PACAP-Liganden. Für die Biotinylierung stand das PACAP-Analogon PACAP27-Ala₇-Cys-Acm zur Verfügung. Die Brücke von sieben Alaninresten zwischen dem eigentlichen PACAP-Liganden und der reaktiven Gruppe des Cysteins fungierte als Spacer und ließ das biotinylierte Molekül beweglicher erscheinen. Die Thiolgruppe des Cysteinsrestes wurde im Ausgangspeptid durch die Acetoaminomethylschutzgruppe (Acm) vor einer Oxidation bewahrt. Die Schutzgruppe wurde vor der Biotinylierungsreaktion entfernt. Als Biotinylierungsreagenz diente N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamid (Biotin-HPDP; Pierce). Biotin-HPDP besitzt die leicht abspaltbare Pyridin-2-thiolgruppe und reagiert in seiner freien Thiolform selektiv mit Thiolgruppen. Ein kurzes Reaktionsschema ist in Abbildung 16 dargestellt.

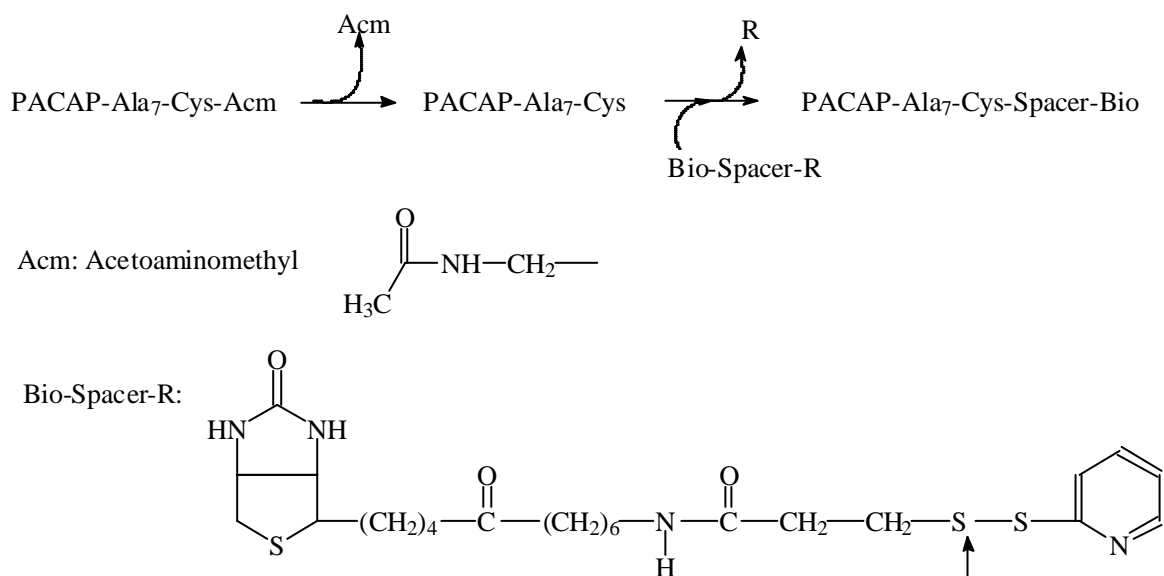


Abbildung 16: Reaktionsschema für die Biotinylierung des PACAP-Liganden.
Der Pfeil markiert die Abgangsgruppe R.

Die Acm-Schutzgruppe wurde wie unter 2.2.7.1. beschrieben abgespalten. Das Reaktionsgemisch wurde chromatographisch über RP-HPLC aufgetrennt. Es wurde das Auftreten von zwei Produktpeaks beobachtet (vgl. Abbildung 10), die auch nach der Biotinylierung (vgl. Abbildung 11) erhalten blieben. Dieses Phänomen könnte mit der Oxidation der Aminosäure Methionin des PACAP27 erklärt werden. Es ist wahrscheinlich, dass diese Oxidationsreaktion besonders im sauren Milieu bei Zugang von Luftsauerstoff eintritt, zum Beispiel beim der Elution des Peptides mit TFA-haltigem Puffer (0,1 %). Massenspektrometrische Analysen bestätigten diese Vermutung, da sich die molekulare Masse beider Produktpeaks um 15,8 g/mol unterschieden. Das oxidierte Produkt besaß dabei die kürzere Retentionszeit.

Beide biotinylierte Liganden (oxidierte und nicht oxidierte Form) wurden anfangs getrennt isoliert. Es wurden Displacementexperimente durchgeführt. Als Testmembran kam eine von Dr. J. Cao isolierte Membran aus dem Schweinegehirn zur Verwendung. Als spezifisch verdrängbarer Ligand diente ^{125}I -PACAP27 (Perkin Elmer). Da kein signifikanter Unterschied in den Affinitäten beider biotinylierter Liganden festgestellt werden konnte, wurden die Peptide nach der quantitativen Präparation nicht getrennt isoliert, sondern es wurde eine Mischung beider biotinylierter Liganden verwendet.

Der aus dem IC_{50} -Wert der Displacementexperimente (Abbildung 17) und aus dem K_D -Wert des PACAP27 (0,5 nM) abgeleitete K_i -Wert des biotinylierten Liganden PACAP27-Ala₇-Cys-Bio betrug 32 nM. Da unter identischen Testbedingungen für den unmodifizierten PACAP27-Liganden ein K_i -Wert von 15,5 nM erreicht werden konnte, lag die Affinität des biotinylierten Liganden nur um das Zweifache niedriger (vergleiche Tabelle 4). Die Abweichung der Daten von den Literaturwerten wurde auf das Testsystem zurückgeführt.

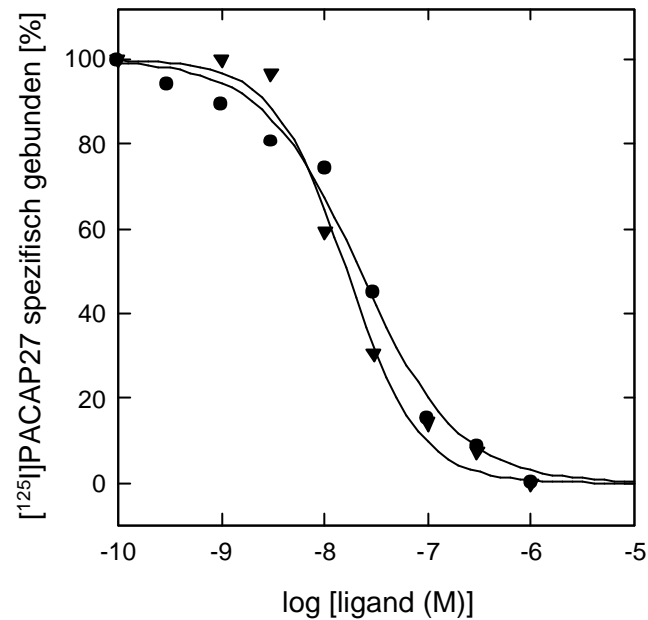


Abbildung 17: Kompetitionsanalyse an Schweinegehirnmembranen mit dem biotinylierten PACAP-Liganden PACAP27-Ala₇-Cys-Bio.

Die aus den IC_{50} -Werten berechneten Affinitätskonstanten der Liganden ist in Tabelle 4 dargestellt. Symbole: ▼ PACAP27; • PACAP27-Ala₇-Cys-Bio

Ligand	K_i -Wert (nM)	
	Arbeit	Literatur [35]
PACAP27-Ala ₇ -Cys-Bio	32,0	2,4
PACAP27	15,50	0,45

Tabelle 4: Gegenüberstellung der aus den Displacementexperimenten bestimmten K_i -Werte von PACAP27 und deren biotinyliertem Analogon.

Die Werte wurden mit Literaturdaten verglichen.

3.1.2. Synthese und Charakterisierung des iodierten, photoreaktiven ^{125}I - $[\text{Phe}^6(\text{pBz})]\text{PACAP27}$ -Liganden

Zur photoreaktiven Markierung des funktionell angereicherten PAC1-Rezeptors mußte ein Ligand zur Verfügung stehen, der eine hohe Affinität zum PAC1-Rezeptor, eine photoreaktive Gruppe zur Ausbildung kovalenter Bindungen und eine zum Nachweis dienende radioaktive Gruppe in einem Molekül vereint. Dafür wurde der photoreaktive $[\text{Phe}^6(\text{pBz})]\text{PACAP27}$ -Ligand mit dem radioaktivem ^{125}I -Isotop (aus NaI) markiert. Es kam die Iodogenmethode (Iodogen: 1,3,4,6-Tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglucoluril) zum Einsatz [34]. Sie stellt eine relativ sanfte Oxidationsmethode dar, bei der nur Tyrosinreste angegriffen werden. Dabei wurde das aus NaI stammende Iod zuerst durch das aus dem Iodogen entstehende Chlor oxidiert. Die *in situ* entstandene Interhalogenverbindung ICl ist das eigentliche Iodierungsmittel. Es greift am Phenylring von Tyrosin an. Dabei können mono- oder disubstituierte Reaktionsprodukte entstehen. Aus der Anzahl der drei Tyrosinreste im PACAP27-Ligand ergab sich somit die Schwierigkeit, einen monoiodierten Liganden mit einem eingebauten Iodmolekül an definierter Stelle zu erhalten. (Der resultierende Ligand besaß an Position 6 eine photoreaktive Gruppe und an Position 10 oder 13 den radioaktiven Label.)

Zum Justieren der Markierungsbedingungen wurde zuerst kaltes NaI verwendet. Und obwohl die Iodogenmethode ein für den Liganden schonendes Verfahren darstellt, kam es zur Oxidation des PACAP27-Analogon. Der Retentionspeak des $[\text{Phe}^6(\text{pBz})]\text{PACAP27}$ -Liganden verschob sich bei der Inkubation mit Iodogen zu kürzeren Retentionszeiten. Das Phänomen der Oxidation wurde schon bei der Biotinylierung des PACAP27-Ala₇-Cys beschrieben. Um hauptsächlich ein monoiodiertes Reaktionsprodukt zu erhalten, wurden Reaktionszeit und Reaktionstemperatur variiert. Es wurde beobachtet, dass nichtoxidiertes, monoiodiertes Ligand I- $[\text{Phe}^6(\text{pBz})]\text{PACAP27}$ und oxidiertes Ligand ox- $[\text{Phe}^6(\text{pBz})]\text{PACAP27}$ bei dem verwendeten RP-HPLC-Elutionsschema ähnliche Retentionszeiten besaßen. Eine saubere Trennung von iodiertem und nichtiodiertem Liganden wäre unter diesen Bedingungen nicht möglich gewesen. Um dennoch eine gute chromatographische Trennung von iodiertem und nicht-iodiertem Liganden zu erreichen, wurde deshalb nur vollständig oxidiertes Ligand zur Iodierung eingesetzt (vgl. Abbildung 13) Die unterschiedlichen Retentionszeiten von oxidiertem Ligand ox- $[\text{Phe}^6(\text{pBz})]\text{PACAP27}$ (28,28 min) und iodiertem oxidiertem Ligand ox-I- $[\text{Phe}^6(\text{pBz})]\text{PACAP27}$ (30,43 min) reichten für eine saubere Abtrennung mittels RP-HPLC aus (vgl. Abbildung 14). Nach optimaler Einstellung der Reaktionsbedingungen wurde

die Iodierung mit heißem Na^{125}I durchgeführt. Die Chromatographiespektren von kalter und heißer Iodierung waren identisch. Die Iodierung erfolgte mit einer Ausbeute von 5 % gemessen am Einsatz des Na^{125}I .

Für den ^{125}I -[Phe⁶(pBz)]PACAP27-Liganden wurde am Tag der Iodierung eine spezifische Aktivität von 2000 Ci/mol kalkuliert.

Die Charakterisierung des iodierten Liganden erfolgte mit Hilfe eines Sättigungstestes an Schweinegehirnmembranen (Abbildung 18). Es wurde eine hohe unspezifische Bindung beobachtet (75 % bei 1,5 nM Ligandkonzentration), dennoch konnte für den ^{125}I -[Phe⁶(pBz)]PACAP27-Liganden ein K_D -Wert von $0,4 \pm 0,1$ nM bestimmt werden. Damit handelte es sich um einen hochaffinen photoreaktiven Liganden (vergleiche Tabelle 5), der für die photoreaktive Markierung des funktionell gereinigten PAC1-Rezeptors zur Verfügung stand.

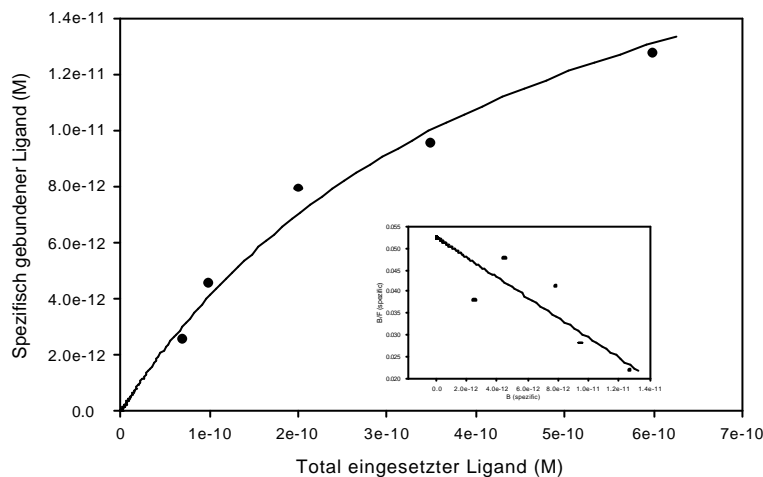


Abbildung 18: Charakterisierung des ^{125}I -[Phe⁶(pBz)]PACAP27-Liganden anhand eines Sättigungstestes an Schweinegehirnmembran.

Ligand	K _D -Wert (nM)	
	bestimmt	Literatur [36]
¹²⁵ I-[Phe ⁶ (pBz)]PACAP27	0,40 ± 0,10	1,01 ± 0,12
¹²⁵ I-PACAP27	0,50 ± 0,08	0,50 ± 0,03

Tabelle 5: Beschreibung des K_D-Werts des ¹²⁵I-[Phe⁶(pBz)]PACAP27-Liganden.

3.1.3. Synthese und Charakterisierung von ³H-Propionyl-PACAP27

Für die Bestimmung von Bindungskonstanten oder Rezeptordichten von PAC-Rezeptoren wurden bisher immer iodidierte Liganden verwendet. Für andere Rezeptoren ist jedoch der Einsatz von tritiummarkierten Liganden zur Bestimmung von Bindungsdaten Standard. In vielen Fällen wird über einen aktivierten Ester eine tritiummarkierte Gruppe an Aminoreste der Liganden eingeführt. Durch die Variation des pH-Wertes kann die Protonierung und somit die Reaktivität verschiedener Aminogruppen beeinflusst werden. α -Aminogruppen sind ab einem pH-Wert von 8, ϵ -Aminogruppen dagegen ab einem pH-Wert von 10 deprotoniert und damit reaktiv [37].

Ein Vorteil eines ³H-Propionyl-PACAP27-Liganden ist die Halbwertszeit von Tritium, die 11 Jahre beträgt, im Gegensatz zu der des ¹²⁵I-Isotop, die nur eine Zeitspanne von 60 Tagen umfasst. Weiterhin wäre der ³H-Propionyl-PACAP27-Ligand in Sättigungstests in höheren Konzentrationen einsetzbar. Damit könnte gerade in Sättigungsstudien mit überexprimierten Membranen die Membrankonzentration erhöht werden, was zu geringeren Schwankungen der Ergebnisse führen würde.

Im Falle des PACAP27-Liganden existieren drei Lysinreste mit jeweils einer primären ϵ -Aminogruppe, der N-Terminus mit einer primären α -Aminogruppe und einer sekundären Aminogruppe im Histidinrest ($pK_R = 6,0$), der ersten N-terminalen Aminosäure des PACAP27-Liganden. Daraus ergaben sich, wie auch schon bei der Iodierung des photoreaktiven Liganden, die Schwierigkeiten, einen einfach markierten PACAP27-Liganden zu synthetisieren.

Die Markierungsreaktion wurde zuerst mit kaltem N-Propionylsuccinimid (freundliche Überlassung von Dr. S. Lammich) durchgeführt. Durch die Variation des pH-Wertes und der Reaktionszeit wurden optimale Versuchsbedingungen für den Erhalt eines einfach markierten Produktes eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde über Microbore-HPLC aufgetrennt. Die zwei Hauptreaktionspeaks (38,75 min, 45,76 min; vgl. Abbildung 15) wurden getrennt gesammelt und massenspektrometrisch analysiert. Beide Reaktionspeaks besaßen gleiche Molekulargewichte und konnten als monogelabeltes Produkt identifiziert werden. Die unterschiedlichen Retentionszeiten basierten auf der Markierung verschiedener Reste.

Für die heiße Synthese des ^3H -Propionyl-PACAP27 wurde der Aktivester N- ^3H -Propionylsuccinimid (Amersham) verwendet. Die spezifische Aktivität der tritiummarkierten Liganden wurde mit $2,2 \cdot 10^5$ dpm/pmol bestimmt. Die Ausbeuten betragen 3,5 % für den ersten Reaktionspeak (38,75 min) und 4,5 % für den zweiten Reaktionspeak (45,76 min) gemessen am eingesetzten N- ^3H -Propionylsuccinimid.

Für die ^3H -Propionyl-PACAP27-Liganden wurde anhand eines Sättigungstestes die Affinität zum PAC1-Rezeptor bestimmt (Abbildung 19). In diesem Sättigungstest wurde die Schweinegehirnmembran eingesetzt und aus den Daten die K_D -Werte der synthetisierten Liganden bestimmt. Beide Liganden zeigen hohe Affinität zum PAC1-Rezeptor (vergleiche Tabelle 6) und wären in Bindungsstudien einsetzbar. Bei den verwendeten Reaktionsbedingungen (pH = 6,5) wurden wahrscheinlich vornehmlich der Imidazolring und die α -Aminogruppe des Histidin markiert [38]. Da der Imidazolring für die Ligand-Rezeptor-Erkennung im PAC1-Rezeptor eine größere Rolle spielt als die freie α -Aminogruppe (im Gegensatz zu anderen Rezeptoren der Familie), könnte es sich bei dem Liganden mit dem größeren K_D -Wert (^3H -Propionyl-PACAP27-45,76 min) um den am Imidazolrest gelabelten Liganden handeln [39].

Zwar lagen die für die Rezeptorerkennung wichtigen Lysinreste [40] durch die gewählten Versuchsbedingungen in einer chemisch reaktionsträgeren Form (protonierte Lysinreste) vor, die Markierung einer ϵ -Aminogruppe konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Allerdings resultiert aus der Einführung einer photoreaktiven Gruppe an die Lysinreste des PACAP27-Liganden keine starken Auswirkungen auf die Affinität der resultierenden Liganden, wie von Cao *et al.* gezeigt [36]. So wäre es möglich, die tritiummarkierte Propionylgruppe an einen Lysinrest zu koppeln und dadurch eventuell einen weniger hydrophoben Liganden zu erhalten. Weniger hydrophobe Peptide sind für die Anwendung in Bindungstests besser geeignet.

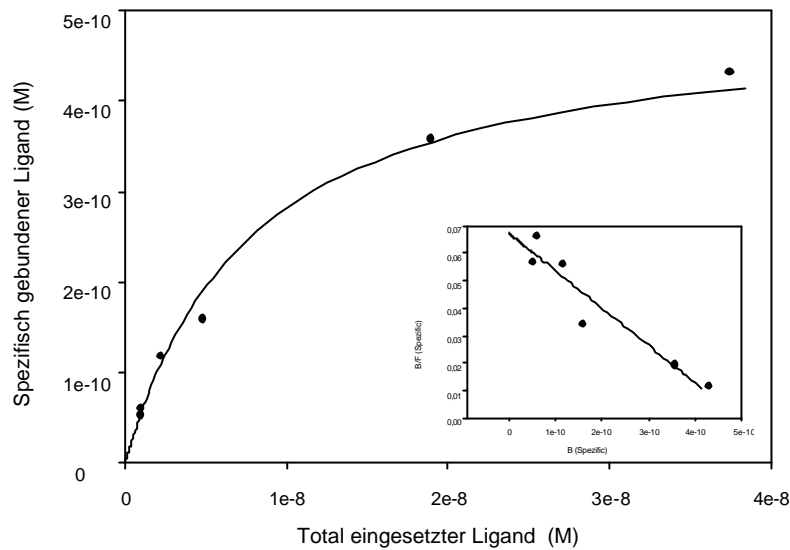


Abbildung 19: Sättigungskurve des tritiummarkierten PACAP27-Analogon.

Stellvertretend ist hier die Sättigungskurve des ^3H -Propionyl-PACAP27 (Retentionszeit 38,75 min, vgl. Abbildung 15) abgebildet.

Ligand	K_D (nM)
^3H -Propionyl-PACAP27-38,75 min	$3,70 \pm 0,52$
^3H -Propionyl-PACAP27-45,76 min	$7,30 \pm 1,10$
^{125}I -PACAP27	$0,50 \pm 0,08$

Tabelle 6: Gegenüberstellung der K_D -Werte der tritiummarkierten PACAP27-Liganden.

3.2. Überexpression des PAC1-Rezeptors in analytischem Massstab

Ausgangsvektor für die Klonierungsversuche war das Plasmid pSGPACAPR. Er enthält die cDNA des PAC1-Rezeptors aus der Ratte. Alle verwendeten Zelllinien (*S2*, *Sf9*, *Sf21*, *HEK*) wurden auf Zellkulturschalen (Sarstedt) kultiviert. Für präparative Zwecke wurden die *Sf21*-Zellen in Suspensionskultur gehalten.

3.2.1. Herstellung von *Inclusion bodies* in *E.coli*

Durch PCR mit geeigneten Linker-Primern wurde die PAC1-Rezeptor-cDNA amplifiziert und in den von Dr. H. Kiefer überlassenen pGexHis-Vektor inkloniert. Der generierte pGEXPACAPRRhoHis-Vektor (2.2.3.4) enthielt N-terminal ein myc-Epitop sowie C-terminal ein Rho-Epitop und ein für die Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie benötigtes His₆-Epitop.

Die Expression des Rezeptorproteins erfolgte in *E.coli BL21*-Zellen, die mit der pGEXPACAPRRhoHis-Plasmid-DNA transformiert wurden. Die Induktion der Rezeptorexpression erfolgte mit Isopropyl- β -thiogalactopyranosid (IPTG). Die präparierten *Inclusion bodies* wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2. Herstellung der *S2*PACAPR-Membran

Für die Expression des PAC1-Rezeptors in *S2*-Zellen wurde wie im Material- und Methodenteil beschrieben der pMTBPACAPR-Vektor (2.2.3.1.) hergestellt. Dieser Vektor enthielt am N-Terminus ein myc-Epitop. Mit der pMTBPACAPR-Plasmid-DNA wurden *S2*-Zellen transfiziert. Die Selektion der Zellen erfolgte mit dem Antibiotika Hygromycin B. Die PAC1-Rezeptor-Expression wurde mit Kupfersulfatlösung induziert. Die präparierten *S2*PACAPR-Membran wurde bei -80°C gelagert.

3.2.3. Herstellung der *HEK*PACAPRRho-Membran

Für die Expression des PAC1-Rezeptors in suspensionsadaptierten *HEK*-Zellen wurde der pcDNA3PACAPRRho-Vektor (2.2.3.2.) konzipiert. Er enthielt N-terminal ein myc-Epitop und C-terminal ein Rho-Epitop. Die *HEK*-Zellen wurden mittels der Kalziumphosphatmethode transfiziert und mit Hygromycin selektioniert. Die präparierten *HEK*PACAPRRho-Membran wurde bei -80°C gelagert.

3.2.4. Herstellung der *Sf21*PACAPRRho-Membran

Für die Expression des PAC1-Rezeptors mit dem Baculovirussystem wurde der pFastBacPACAPRRho-Vektor (2.2.3.3.) kloniert. Er enthielt ein N-terminales myc-Epitop und ein C-terminales Rho-Epitop. Mittels einer Transposition wurde der Vektor in Bacmid-DNA eingebracht. Die Bacmid-DNA diente zur Infektion von *Sf9*-Zellen. Mit dem von den *Sf9*-Zellen produziertem Virus wurden anschließend *Sf21*-Zellen infiziert, um das PAC1-Rezeptorprotein zu exprimieren. Die präparierte *Sf21*PACAPRRho-Membran wurde bei -80°C gelagert.

3.3. Isolierung des PAC1-Rezeptors aus *Inclusion bodies*

Aufgrund von fehlenden Faltungs- und Glykosilierungsmechanismen liegen in Bakterienzellen exprimierte Proteine nicht in der für ihre Funktion wichtigen Tertiär- und Quartiärstruktur vor. Die Isolation von Proteinen aus den Bakterien erfolgt unfunktionell unter denaturierenden Bedingungen. Die Wahl des Detergenz für die Anreicherung von Rezeptorproteinen aus *Inclusion bodies* spielt deshalb keine bedeutende Rolle.

Die mit 2 % SDS solubilisierten *Inclusion bodies* wurden mit einer Nickel-Matrix (Qiagen) inkubiert. Das PAC1-Rezeptorprotein bildete über das C-terminal angefügten His₆-Tag einen Komplex mit den Nickelionen der Matrix und wurde so spezifisch aus dem Solubilisat gebunden. Die Elution des gebundenen Rezeptorproteins erfolgte durch 0,1 M EDTA. EDTA verdrängt das gebundene Rezeptorprotein von der Matrix durch Komplexbildung der Nickelionen.

Die qualitative Analyse der Anreicherung des PAC1-Rezeptorproteins aus *Inclusion bodies* erfolgte durch Commassifärbung der mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine. Das Eluat der Nickel-Chelat-Chromatographie enthielt hauptsächlich ein Protein mit einem Molekulargewicht von 80 kDa (Abbildung 20). Dies entsprach dem Molekulargewicht des Fusionsproteins aus dem PAC1-Rezeptor (50 kDa) und dem Gluthation-S-Transferase-Protein (GST, 30 kDa). Das GST kann wie das His₆-Epitop zur Anreicherung von Fusionsproteinen aus *Inclusion bodies* verwendet werden. Durch eine vorhandene Proteaseschnittstelle kann es im Bedarfsfall vom rekombinanten Protein abgespalten werden.

Die ebenfalls im Eluat der Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie schwächer sichtbare Proteinbande geringeren Molekulargewichts konnte durch stringenteren Waschbedingungen

entfernt werden. Es handelte sich wahrscheinlich um ein unspezifisch an die Nickel-Matrix gebundenes Protein.

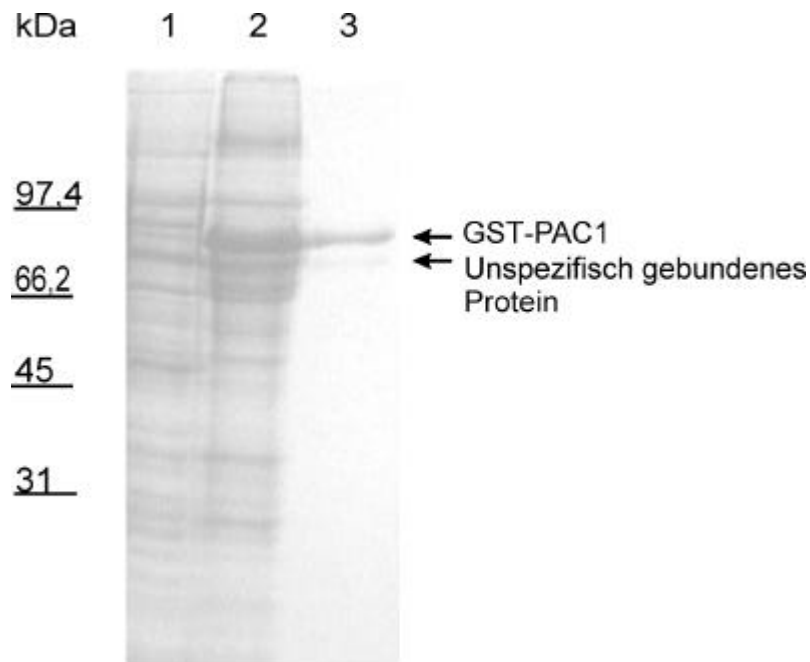


Abbildung 20. Qualitative Analyse der PAC1-Rezeptor-Anreicherung aus *Inclusion bodies*.

50 μ l der *Inclusion bodies*-Präparation wurden solubilisiert, mit einer Nickel-Matrix inkubiert und die gebundenen Proteine eluiert. Es handelt sich um ein mit Commassi gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (10 %). Spur 1: *E.coli*-Suspension; Spur 2: *Inclusion bodies*-Präparation; Spur 3: Eluat der Nickel-Chelat-Chromatographie

Auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel wurden gleiche Proteinmengen der *Inclusion bodies*-Präparation und des Nickel-Matrix-Eluates aufgetragen, aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Neben der Reinheit des Eluates – es treten im Vergleich zum Commassi-gefärbten Gel keine weiteren Proteinbanden auf – wurde auch der hohe Anteil des Rezeptorproteins in der *Inclusion bodies*-Präparation sichtbar (Abbildung 21). Der Hauptproteinanteil der *Inclusion bodies*-Präparation bestand aus dem exprimierten GST-PAC1-Rezeptor-Fusionsprotein mit dem erwähnten Molekulargewicht von 80 kDa.

Der PAC1-Rezeptor konnte in *E.colis* in *Inclusion bodies* exprimiert und über ein N-terminal angefügtes His₆-Tag mittels Nickel-Chelatchromatographie gereinigt werden. Aus 50 μ l der *Inclusion bodies*-Präparation (585 μ g) wurden 13,5 μ g reines Fusionsprotein isoliert. Um die

Funktionalität des aus *Inclusion bodies* isolierten PAC1-Rezeptors zu erreichen, müssen die für den Rezeptor optimalen Rückfaltungsbedingungen gefunden werden. Dies umfasst einen langwierigen und zeitaufwendigen Prozess und soll durch eine Kooperation mit der Firma m-phasys aus Tübingen gelöst werden.

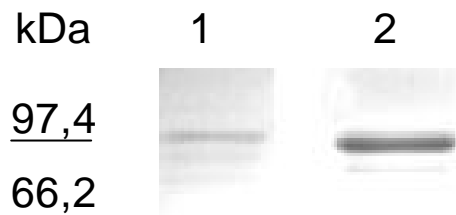


Abbildung 21: Qualitative Analyse des aus *Inclusion bodies* gereinigten PAC1-Rezeptors.

Über ein SDS-Polyacrylamidgel (10 %) wurden gleiche Proteinmengen der *Inclusion bodies*-Präparation (Spur 1) und des Eluates der Nickel-Chelat-Chromatographie (Spur 2) aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung detektiert.

3.4. Analyse der eukaryontischen Expressionssysteme

Die präparierten *S2*PACAPR-, *HEKPACAPRRho*- und *Sf21*PACAPRRho-Membranen wurden auf die Expression des PAC1-Rezeptors hin untersucht.

Zuerst wurden Westernblotanalysen durchgeführt. Dafür standen Antikörper gegen das N-terminale myc-Epitop und das C-terminale Rho-Epitop des PAC1-Rezeptors zur Verfügung, wobei die Funktionalität des Rho-Epitops noch geprüft werden mußte. Die Westernblotanalysen gaben Aufschluß über die Größe und über die gesamte Menge an exprimiertem Rezeptorprotein.

Die Membran des *S2*-Insektenzellsystems wies bei einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa eine Proteinbande auf (Abbildung 22, Spur 1).

Die Membran des *Sf21*-Insektenzellsystems wies ebenfalls eine Proteinbande bei 55 kDa auf, die jedoch zu einem kleineren Molekulargewicht heterogen verbreitert war. Weiterhin war eine Proteinbande bei einem Molekulargewicht von 120 kDa sichtbar (Abbildung 22, Spur 3). Die Verbreiterung der 55kDa-Bande sowie das Auftreten einer weiteren Bande mit dem

doppelten Molekulargewicht wiesen auf eine hohe Heterogenität und Hydrophobizität des exprimierten Rezeptorproteins hin.

Das in der Membran der suspensionsadaptierten *HEK*-Zellen detektierte Protein wurde in Form einer scharfen Proteinbande detektiert. Im Vergleich zu den Proteinbanden aus den Insektenzellsystemen lag deren Molekulargewicht mit ca. 60 kDa um ca. 5 kDa höher (Abbildung 22, Spur 2). Unterschiedliche Glykosilierungsmuster in Insekten- bzw. Säugerzellen können für das höhere Molekulargewicht verantwortlich sein.

Aufgrund des detektierten Molekulargewichtes von 55-60 kDa und der in weiteren Westernblots gezeigten Spezifität handelte es sich bei den detektierten Proteinbanden um den Ratten-PAC1-Rezeptor.

Die detektierten Rezeptorbanden wurden anhand ihres Westernblotsignals verglichen. Aus Abbildung 22 ist ersichtlich, dass die höchste Expressionrate an gesamten Rezeptorprotein mit dem Baculovirus Expressionssystem erzielt werden konnte.

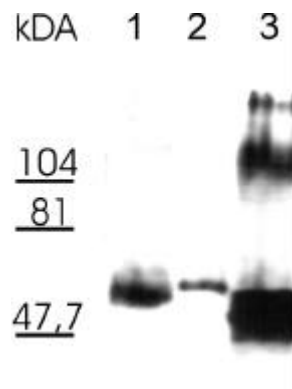


Abbildung 22: Expressionsanalyse der präparierten Membranen mittels Westernblotanalyse.

Es wurden gleiche Proteinmengen über SDS-Polyacrylamidminigele (10 %) aufgetrennt und die Proteine auf eine Trägermembran transferiert. Zur Detektion wurde ein Maus-Antikörper verwendet, der spezifisch gegen das myc-Epitop gerichtet war. Als Zweitantikörper diente ein gegen Maus gerichteter peroxidasegekoppelter Antikörper. Die Detektion erfolgte durch Umsetzung von Substrat durch die Peroxidase und das Belichten eines Films durch das entstandene Phosphoreszenzlicht. Spur 1: S2PACAPR-Membran; Spur 2: *HEK*PACAPRRho-Membran; *Sf21*PACAPRRho-Membran. Die Spezifität der Signale konnte auf weiteren Westernblots gezeigt werden.

Weiterhin wurden die spezifische Erkennung zwischen dem Rho-Epitop und dem 1D4-Antikörper getestet. Das Rho-Epitop umfasst die letzten C-terminalen Aminosäuren des Rhodopsins und wurde an das C-terminale Ende des PAC1-Rezeptors angefügt. Der verwendete 1D4-Antikörper besitzt die beste Affinität zum Rho-Epitop.

Für den Test wurde in der Westernblotanalyse der 1D4-Antikörper als 1. Antikörper eingesetzt. Das spezifisch detektierte Signal der *Sf21PACAPRRho*-Membran zeigte eine starke und diffuse Bande um 55 kDa, eine Aggregationsbande bei 120 kDa und eine weitere, schwächere Bande bei noch höherem Molekulargewicht (Abbildung 23).

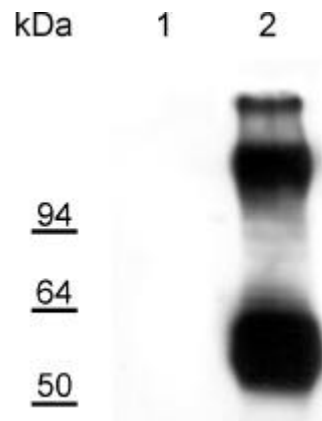


Abbildung 23: Nachweis der Funktionalität des 1D4-Antikörpers und des C-terminal an den PAC1-Rezeptor eingefügten Rho-Epitops mittels Westernblotanalyse.

Gleiche Membranmengen wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel (10 %) aufgetrennt und die Proteine auf eine Trägermembran transferiert. Als erster Antikörper diente der 1D4-Antikörper, als zweiter Antikörper ein Peroxidase gekoppelter Antikörper. Spur 1: *Sf21*-Membran; Spur 2: *Sf21PACAPRRho*-Membran

Das durch das Rho-Epitop detektierte Westernblotsignal ist mit dem durch das myc-Epitop detektierte Signal identisch. Ein Vergleich der Westernblotsignale in Abbildung 24 macht das nochmals deutlich. Damit konnte die Funktionalität des Rho-Epitops und des 1D4-Antikörpers gezeigt werden. Folglich stand das durch Adapterligation an die cDNA des PAC1-Rezeptors angefügte Rho-Epitop zur Anreicherung des PAC1-Rezeptors über Antikörperaffinitätschromatographie zur Verfügung.

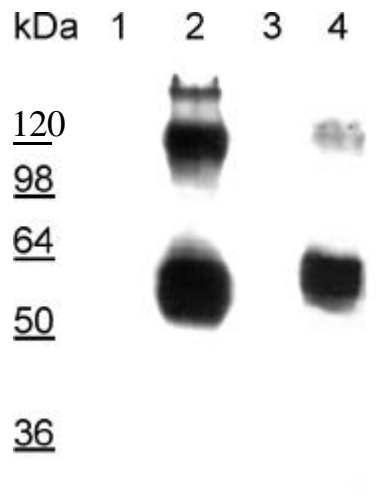


Abbildung 24: Vergleich der Westernblotsignale, die sich aus der Detektion von N-terminalem myc-Epitop bzw. C-terminalem Rho-Epitop des PAC1-Rezeptors ergeben.

Es wurden jeweils gleiche Mengen *Sf21PACAPRRho*-Membranen (Spuren 2 und 4) bzw. *Sf21*-Membranen (Spuren 1 und 3) über ein SDS-Polyacrylamidgel (10 %) aufgetrennt und auf eine Trägermembran transferiert. Als Erstantikörper dienten der 1D4-Antikörper (Spur 1, 2) bzw. der anti-myc-Antikörper (Spur 3, 4). Als Zweitantikörper kam wiederum der Peroxidase gekoppelte Anti-Maus-Antikörper zum Einsatz. Die Entwicklungs- und Belichtungsprozeduren beider Proben waren identisch.

Nach der Westernblotanalyse wurden die *S2PACAPR*-, *HEKPACAPRRho*- und *Sf21PACAPRRho*-Membranen mittels Bindungstests auf bindungsfähigen Rezeptor hin untersucht. Die Bindungstests dienten der Feststellung, ob ein funktioneller PAC1-Rezeptor exprimiert wurde, der seinen PACAP27-Liganden spezifisch binden kann. Als Ligand kam hier der ^{125}I -PACAP27-Ligand (Perkin Elmer) zum Einsatz. Er wurde zuerst durch Sättigungstests an Schweinegehirnmembran charakterisiert. Die Membranen wurden von Dr. J. Cao präpariert und dienten als Positivkontrolle für die durchgeführten Bindungs- und Sättigungstests und zur groben Abschätzung der Rezeptordichte der in dieser Arbeit präparierten PAC1-Rezeptor-Membranen. Mit dem ^{125}I -PACAP27-Ligand konnte in der Schweinegehirnmembran eine Rezeptordichte von $1,90 \pm 0,25$ pmol/mg bestimmt werden (Abbildung 25). Dies entspricht den in der Literatur referrierten Daten. Die Affinität des Liganden zum PAC1-Rezeptor konnte mit $0,50 \pm 0,03$ nM bestimmt werden. Auch dies korreliert mit den in der Literatur angegebenen Daten (vergleiche Tabelle 8, Zeilen 3 und 4).

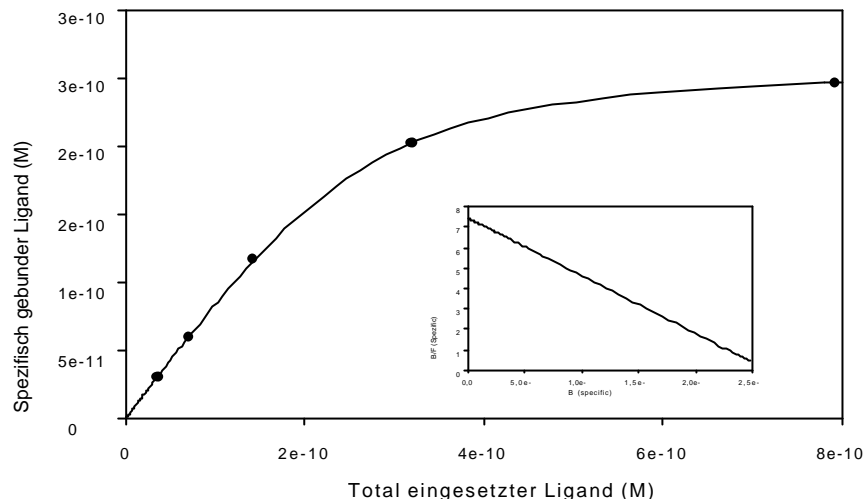


Abbildung 25: Sättigungskurve und Scatchardplot der Schweinegehirnmembran.

Durch Bindungstests allgemein ist eine grobe Abschätzung der Menge an funktionell exprimiertem Rezeptor möglich. Die Bindungstests ergaben bei allen drei präparierten Zellmembranen ein positives Ergebnis, das heißt die Bindung des PACAP27-Liganden war spezifisch.

Die grobe Abschätzung der Rezeptordichte anhand der Bindungstests in den präparierten Zellmembranen ergab für die *S2PACAPR*-Membran eine mit der Rezeptordichte in der Schweinegehirnmembran vergleichbare Rezeptordichte. Die Rezeptordichte konnte nicht gesteigert werden, wenn die Proteinexpression länger oder mit höheren Kupfersulfatkonzentrationen induziert wurde (vgl. *Drosophila*-Expressionssystem, 2.2.6.).

Für die *HEKPACAPRRho*-Membran ergab sich laut Abschätzung aus den Bindungstests eine höhere Rezeptordichte als in der Schweinegehirnmembran.

In der *Sf21PACAPRRho*-Membran wurde ein hoher Anteil an funktionellem PAC1-Rezeptor detektiert. Laut Bindungstests liegt die Rezeptordichte über den Rezeptordichten von *S2PACAPR*- und *HEKPACAPRRho*-Membranen. Dieses Ergebnis wurde erzielt, wenn die Infektionszeit der *Sf21*-Zellen mit dem Baculovirus 72 Stunden betrug. Kürzere oder längere Infektionszeiten führten laut Bindungstests zu niedrigeren Expressionsraten. Dies ist ein Indiz dafür, dass der PAC1-Rezeptor nach 72 Stunden Infektionszeit sein Expressionsmaximum erreicht hatte und dann aufgrund eintretender Zellyse der infizierten Insektenzellen proteolytisch abgebaut wurde.

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Westernblotanalytik und der Bindungstests zusammengefaßt.

Zellmembran	PAC1-Rezeptorgröße (kDa)	Expression Gesamtes Rezeptorprotein Φ	Expression funktioneller PAC1-Rezeptor $>$
S2PACAPR	55	mittel	niedrig
HEKPACAPRRho	60	niedrig	mittel
Sf21PACAPRRho	50-55 (heterogen) 120 (Aggregat)	sehr hoch	hoch

Tabelle 7: Zusammenfassung der Expressionsanalyse.

Die Menge an gesamt exprimiertem Rezeptorprotein (Abschätzung aus der Westernblotanalyse: Φ , vgl. Abbildung 22) wurde der Menge des funktionell exprimierten Rezeptorproteins (Abschätzung aus Bindungstests: $>$. Als Referenz diente die Schweinehirnmembran.) gegenübergestellt.

Die Sf21PACAPRRho-Membran wurde anhand von Sättigungstests näher charakterisiert.

Sättigungstests allgemein geben Aufschluß über die genaue Rezeptordichte an Membranen sowie über die Affinität des Liganden zu seinem Rezeptor. Für die Sf21PACAPRRho-Membran wurde eine PAC1-Rezeptordichte von 40 +/- 12 pmol/mg festgestellt. Für den iodierten PACAP27-Liganden wurde ein K_D -Wert von 0,75 +/- 0,18 nM ermittelt (Abbildung 26).

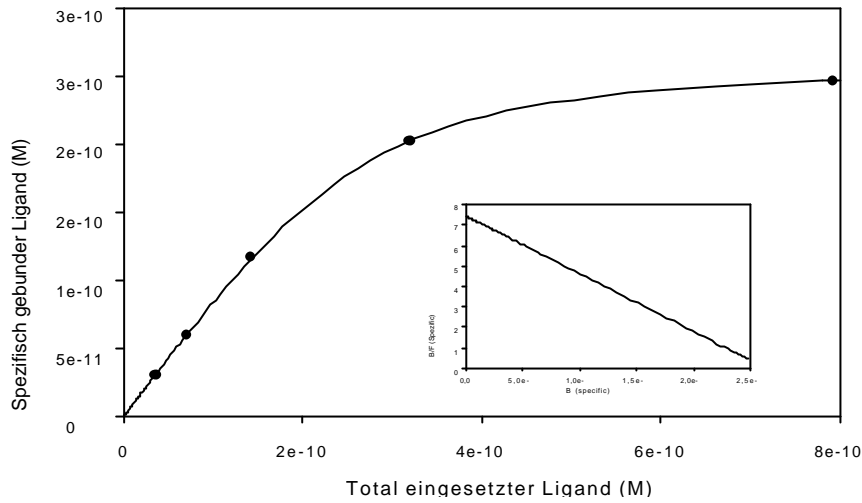


Abbildung 26: Sättigungskurve und abgeleiteter Scatchard-Plot der *Sf21*-PACAPR-Membran.

Da das *HEKPACAPRRho*-Zellsystem für physiologische Versuche eingesetzt wurde (3.10.), wurde die *HEKPACAPRRho*-Membran ebenfalls durch Sättigungstests charakterisiert. Der Sättigungstests ergab eine Rezeptordichte von $8,6 \pm 1,4$ pmol/mg und einen K_D -Wert von $1,1 \pm 0,2$ nM (Abbildung 27).

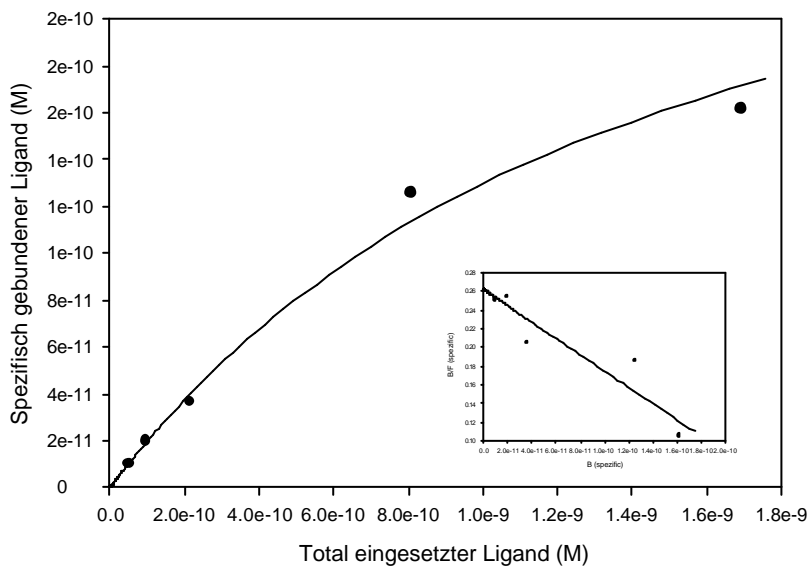


Abbildung 27: Sättigungskurve und Scatchardplot der *HEKPACAPRRho*-Zellmembran.

Die Tabelle 8 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die ermittelten Rezeptordichten der präparierten Membranen und Rezeptoraffinitäten.

Zellmembran		Rezeptordichte (pmol/mg)	Affinität (nM)
<i>HEK</i> PACAPRRho		8,60 ± 1,40	1,10 ± 0,20
<i>Sf21</i> PACAPRRho		40,0 ± 12,0	0,75 ± 0,18
Schweine- gehirn- membran	vorliegende Arbeit	1,90 ± 0,25	0,50 ± 0,09
	Literatur [41]	2,50 ± 0,09	0,50 ± 0,03

Tabelle 8: Vergleich von Rezeptordichten und Rezeptoraffinitäten verschiedener Membranen.

Die Rezeptordichten und Affinitäten wurden aus Sättigungsexperimenten mit dem ^{125}I -PACAP27-Liganden bestimmt.

Die Schwankungen der Rezeptordichte in der Membran des Schweinegehirns wurden auf das verwendete Testsystem zurückgeführt. Allerdings konnte eine Degradation des Rezeptors während der Lagerung der Membran nicht ausgeschlossen werden.

Aufgrund der Bestimmung und des Vergleichs der Rezeptordichten in den präparierten Membranen verschiedener Zelllinien wurde zur Gewinnung von PAC1-Rezeptormembranen in präparativem Massstab mit dem Baculovirusexpressionssystem weitergearbeitet. Trotz der beobachteten Heterogenität und der zu erwartenden Hydrophobizität des in *Sf21*-Zellen exprimierten Rezeptorproteins wurde mit diesem System die höchste Menge an funktionellem PAC1-Rezeptorprotein exprimiert. Der funktionell exprimierte Rezeptor erkannte seinen Liganden im nanomolaren Bereich.

3.5. Präparative Erzeugung von *Sf21*PACAPR-Zellmembranen

Für die Erzeugung größerer Mengen an *Sf21*-Zellmembranen bewährte sich die Kultivierung von *Sf21*-Zellen in einem begasten Spinnerflaschensystem. Die Insektenzellen wurden dabei in Suspensionskultur gehalten und mit Sauerstoff begast. Der Vorteil dieser Kultivierungsart war das Erreichen sehr hoher Zelldichten unter optimalen Wachstumsbedingungen. Somit war eine hohe Zellvitalität gesichert, woraus bestmögliche Infektions- und Expressionsbedingungen resultierten. Umfangreiche Arbeiten wurden darüber von Dr. J. Anders im Rahmen seiner Promotion angefertigt. Insgesamt wurden ca. 4 g *Sf21*PACAPRRho-Membranen präpariert.

Die *Sf21*PACAPRRho-Membran wurde mittels Westernblot und Sättigungstest charakterisiert. Es wurden mit der analytischen Präparation übereinstimmende Ergebnisse gefunden (vergleiche Kapitel 3.4.), das heißt, es konnte eine *Sf21*PACAPRRho-Membran präpariert werden, die einen hochfunktionellen PAC1-Rezeptor und eine PAC1-Rezeptordichte von 40 pmol/mg aufwies und somit für die Anreicherung des PAC1-Rezeptors geeignet war.

3.6. Funktionelle Isolierung und Charakterisierung des Ratten-PAC1-Rezeptors

3.6.1. Dodecylmaltosid als Detergenz

Anlehnend an vorliegende Protokolle für die Reinigung des Rhodopsins über Antikörperaffinitätschromatographie (bereitgestellt von G. Khorana) wurde die Solubilisierung des PAC1-Rezeptors mit Dodecylmaltosid begonnen. Mit Dodecylmaltosid als Detergenz gelang es verschiedenen Gruppen, das Rhodopsin zu solubilisieren und über Antikörperaffinitätschromatographie zu reinigen ([32],[42]).

Der PAC1-Rezeptor wurde mit 1 % Dodecylmaltosid aus den *Sf21*PACAPRRho-Membranen solubilisiert. Das Solubilisat wurde mittels Westernblot-Methode analysiert. Dort konnte eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von 55 kDa detektiert werden, die dem PAC1-Rezeptor zugeordnet wurde (Abbildung 28, Spur 2).

Die Bestimmung der spezifischen Bindung im Solubilisat erfolgte anhand von Bindungstests mit dem ^{125}I -[Phe⁶(pBz)]PACAP27-Liganden (3.1.2.). Als Vergleichsmembran zur Abschätzung der Rezeptordichte diente die *Sf21*PACAPRRho-Membran. Es konnte eine

spezifische Bindung im Dodecylmaltosidsolubilisat detektiert werden, die nach Abschätzung eine Rezeptordichte ähnlich der der *Sf21*/PACAPRRho-Membran implizierte.

Der mit Dodecylmaltosid solubilierte PAC1-Rezeptor sollte mittels Antikörperaffinitätschromatographie angereichert werden. Das verwendete Chromatographieverfahren beruht auf der Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes. Als Antigen fungierte das in den PAC1-Rezeptor C-terminal eingefügte Rho-Epitop. Es wird natürlicherweise vom 1D4-Antikörper erkannt [31]. Die spezifische Erkennung von Epitop und Antikörper wurde durch Westernblotanalyse überprüft (vergleiche Abbildung 23). Die Effizienz der Komplexbildung zwischen dem 1D4-Antikörper und dem Rho-Epitop wird durch die Wahl des Detergenzes beeinflusst, wie von Molday *et al.* berichtet wurde [43]. Für Dodecylmaltosid waren keine nachteiligen Effekte auf die Komplexbildung bekannt. Die verwendete Antikörpermatrix wurde durch die Kopplung des 1D4-Antikörpers an Sepharose hergestellt (2.2.7.6.).

Das Solubilisat wurde mit der 1D4-Antikörpermatrix für vier Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Säulenmaterial abzentrifugiert und ein Aliquot des Überstandes mittels Westernblotmethode analysiert. Es konnte kein spezifisches Signal detektiert werden. Die Kapazität der Säule reichte also aus, um sämtliche mit dem Rho-Epitop markierten Proteine aus dem Solubilisat zu binden.

Die Elution des Rezeptors von der Matrix erfolgte mit Solubilisierungspuffer (siehe Material- und Methodenteil) und dem Elutionspeptid. Das Elutionspeptid ist ein synthetisch hergestelltes Peptid aus neun Aminosäuren (9-mer), die den letzten neun Aminosäuren des Rho-Epitops entsprechen. Das Elutionspeptid wurde in hoher Konzentration (200 μ M) eingesetzt und verdrängte somit in einer Konkurrenzreaktion spezifisch gebundene Proteine von der Antikörpermatrix. Diese Proteine wurden folglich im Elutionspuffer angereichert.

Dieser Anreicherungsschritt erfolgte analytisch im Batchverfahren. Als kleinstes Elutionsvolumen wurden 100 μ l Elutionspuffer gewählt, um eine ausreichende Benetzung der Antikörpermatrix zu erreichen. Die Antikörpermatrix wurde für 3 h mit dem Elutionspuffer bei 4°C inkubiert.

Das Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie wurde mittels Westernblotmethode analysiert. Es konnte eine spezifische Rezeptorbande mit einem Molekulargewicht von 55 kDa identifiziert werden (Abbildung 28, Spur 4). Der PAC1-Rezeptor konnte also mittels Antikörperaffinitätschromatographie aus dem Dodecylmaltosidsolubilisat isoliert werden.

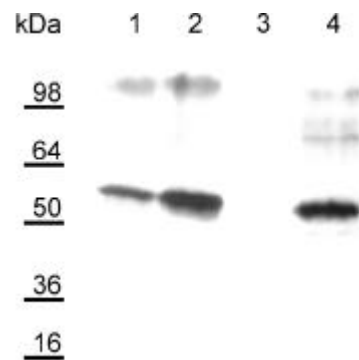


Abbildung 28: Westerblot-Analyse der Antikörperaffinitätschromatographie

Die Proteine aus dem Solubilisat, dem Überstand und dem Eluat wurden mittels Chloroform/Methanol-Methode gefällt und über ein SDS-Polyacrylamidgel (10 %) aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran erfolgte die Detektion der Proteine durch Immunostaining des Rho-Epitops über einen Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Antikörper. Spur 1: Sf21PACAPRRho-Membran Spur 2: Dodecylmaltosid-Solubilisat Spur 3: Überstand der Antikörperaffinitätschromatographie Spur 4: Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie

Die Funktionalität des PAC1-Rezeptors im Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie wurde mittels Bindungstest mit dem ^{125}I -[Phe⁶(pBz)]PACAP27-Liganden überprüft. Als Vergleichsmembran fungierte die Sf21PACAPRRho-Membran. Es konnte spezifische Bindung festgestellt werden. Eine grobe Abschätzung wies auf eine ähnliche Rezeptordichte wie im Solubilisat hin.

Die Reinheit des Eluates der Antikörperaffinitätschromatographie wurde mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Anfärbung der Proteinbanden mittels Silberfärbung überprüft. Es wurden viele Proteinbanden von verunreinigenden Proteinen sichtbar (Abbildung 29, Spur 3). Eine Proteinbande wurde bestimmt, die im Bereich von 55 kDa liegt und im Solubilisat nicht zu finden war (Abbildung 29, Pfeil). Dabei könnte es sich um den angereicherten PAC1-Rezeptor handeln.

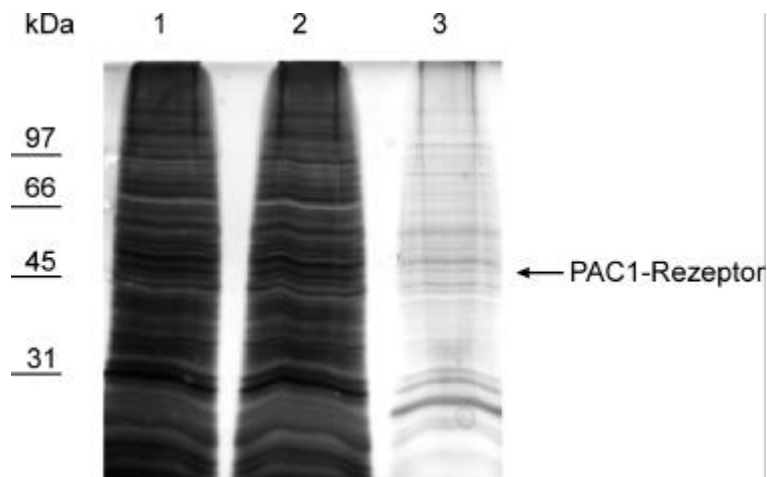


Abbildung 29: Analyse der Antikörperaffinitätschromatographie mittels Silberfärbung

Die Proteine aus dem Solubilisat, dem Überstand und dem Eluat wurden mittels Chloroform/Methanol-Methode gefällt und über ein SDS-Polyacrylamidgel (10 %) aufgetrennt. Das Gel wurde einer Silberfärbung unterzogen. Spur 1: Dodecylamltosid-Solubilisat, Spur 2: Überstand der Antikörperaffinitätschromatographie, Spur 3: Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie. Ein Vergleich der Spuren im Original-Silbergel führte zur Herausstellung der PAC1-Rezeptorbande.

Durch Photoaffinitätsmarkierung mit dem photoreaktiven ^{125}I -[Phe⁶(pBz)]PACAP27-Liganden wurde der PAC1-Rezeptor weiter charakterisiert. Die Photoaffinitätsmarkierung liefert wie auch Bindungstests Hinweise auf die Funktionalität des Rezeptors, da ein Komplex zwischen funktionellem Rezeptor und Ligand gebildet werden muß.

Der Rezeptor wurde in der Ausgangsmembran, der *Sf21*PACAPRRho-Membran photoreaktiv markiert. Nach Auftrennung der Membranproteine über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde eine radioaktive Bande im Bereich von 58 kDa detektiert, die dem PAC1-Rezeptor zugeordnet werden konnte (Abbildung 30, Spur 1). Das ermittelte Molekulargewicht setzte sich hier aus den Molekulargewichten des PAC1-Rezeptors und des photoreaktiven Liganden zusammen. Wurde die Photoaffinitätsmarkierung mit 1000fachem Überschuß an kaltem PACAP27-Liganden durchgeführt, wurde keine Rezeptorbande identifiziert (Abbildung 30, Spur 2). Die Spezifität der Photoaffinitätsmarkierung konnte somit gezeigt werden.

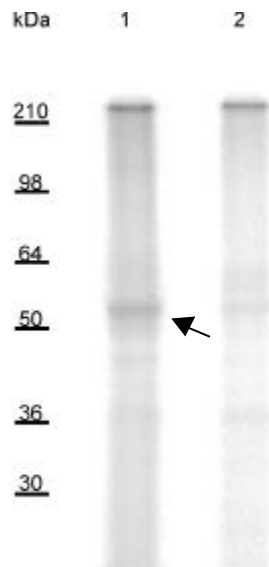


Abbildung 30: Photoreaktive Markierung der Sf21PACAPRRho-Membran

Die Sf21PACAPRRho-Membran wurde mit dem radioaktiven photoreaktiven Liganden inkubiert, mit UV-Licht bestrahlt und über ein SDS-Polyacrylamidgel (10%) aufgetrennt. In einem identischen Ansatz erfolgte die Inkubation zusätzlich mit einem 1000fachen Überschuß an kaltem Liganden. Spur 1: 0,5 nM ^{125}I -[Phe⁶(pBz)]PACAP27 (Der Pfeil markiert die spezifische Bande.), Spur 2: 0,5 nM ^{125}I -[Phe⁶(pBz)]PACAP27; 0,5 μM PACAP27

Anschließend erfolgte die Photoaffinitätsmarkierung des mit Dodecylmaltosid solubilisierten PAC1-Rezeptors aus dem Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie. Diese Markierungsreaktion verlief in geringer Ausbeute. Es konnte jedoch eine radioaktiv markierte Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 58 kDA bestimmt werden (Abbildung 31, Spur 2).

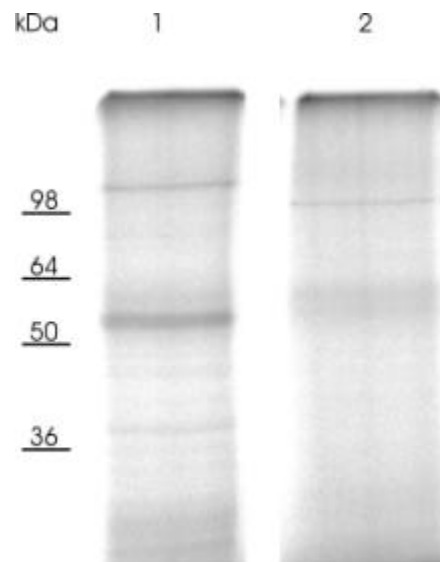


Abbildung 31: Photoreaktive Markierung des PAC1-Rezeptors

Der PAC1-Rezeptors wurde aus den *Sf21PACAPRRho*-Membranen mit Dodecylmaltosid solubilisiert und über Antikörperaffinitätschromatographie angereichert. Das Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie wurde für die photoreaktive Markierung eingesetzt. Es erfolgte eine Fällung der Proteine über die Chloroform/Methanol-Methode und anschließende Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel (10 %) und radiographische Detektion. Spur 1: *Sf21PACAPRRho*-Membran, Spur 2: Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie.

Da sich im Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie eine hohe Anzahl von verunreinigenden Proteinen befanden (vergleiche Abbildung 29), wurde ein weiterer Reinigungsschritt durch Ligandenaffinitätschromatographie angeschlossen. Ein Vorteil der Ligandenaffinitätschromatographie ist, dass durch die Bildung eines Liganden-Rezeptor-Komplexes nur funktioneller Rezeptor isoliert wird. So sollte eine weitere Anreicherung und eine bessere photoreaktive Markierung des PAC1-Rezeptors erreicht werden.

Dafür wurde das Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie mit dem biotinylierten PACAP27-Analogen PACAP27-Ala₇-Cys-Bio (3.1.1.) inkubiert. Dabei sollte sich der Rezeptor-Ligand-Komplex bilden. Der Ansatz wurde anschließend mit Streptavidinagarose inkubiert. Dabei wurde der Rezeptor-Ligand-Komplex über das Biotin des Liganden an die Streptavidin-Matrix gekoppelt und nur funktioneller PAC1-Rezeptor aus der Lösung isoliert. Eine pH-Wert-Änderung in den sauren Bereich war in der Lage, den Komplex aus PAC1-Rezeptor und Ligand aufzubrechen. Dadurch war die Elution des Rezeptors von der Streptavidinmatrix möglich. Der biotinylierte Ligand verblieb dabei an der Streptavidinmatrix.

Die Westernblotanalytik des Eluates der Ligandenaffinitätschromatographie ergab eine relativ schwache, aber spezifische Proteinbande bei einem Molekulargewicht von 55 kDa (Abbildung 32, Spur 3).

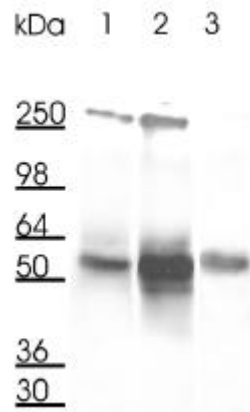


Abbildung 32: Westernblotdarstellung der Ligandenaffinitätschromatographie

Das Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie (Spur 1) wurde mit PACAP27-Ala₇-Cys-Bio und Sreptavidin-Agarose unter Bindungstestbedingungen inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert und der Überstand (Spur 2) abgenommen. Die Agarose-Matrix wurde mit Elutionspuffer pH 4 inkubiert, abzentrifugiert und das Eluat abgenommen. Der pH-Wert des Eluates (Spur 3) wurde sofort wieder auf pH 7,4 eingestellt. Die Proteine der verschiedenen Ansätze wurden mittels Chloroform-Methanol-Fällung präzipitiert und über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran erfolgte die Detektion der Proteine durch Immunostaining des Rho-Epitops über einen Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Antikörper.

Um die Reinheit des Eluates zu bestimmen, wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Auf dem gefärbten SDS-Polyacrylamidgel konnten keine Proteinbanden in der Spur des Eluates detektiert werden (nicht gezeigt). Die isolierte Rezeptormenge war somit zu gering für einen Nachweis mittels Silberfärbung. Es wurde jedoch auch kein weiteres Protein über die Methode der Ligandenaffinitätschromatographie in höheren Ausbeuten als das PAC1-Rezeptorprotein isoliert, was für die Spezifität der Methode spricht.

Der Reinigungsschritt der Ligandenaffinitätschromatographie gelang trotz des zur Verfügung stehenden hochaffinen biotinylierten PACAP-Liganden nur mit geringer Ausbeute, wie ein visueller Vergleich der Spur des Überstandes (Abbildung 32, Spur 2) mit der Spur des Eluates (Abbildung 32, Spur 3) zeigte. Folglich handelt es sich bei dem durch Antikörperaffinitätschromatographie angereicherten Rezeptor hauptsächlich um seine unfunktionelle Form.

Da die Westernblotanalyse keinen Aufschluß über die Funktionalität des nach der Ligandenaffinitätschromatographie eluierten PAC1-Rezeptors gab, wurde das Eluat der Ligandenaffinitätschromatographie einer Photoaffinitätsmarkierung unterzogen. Dabei konnte keine radioaktive Bande im SDS-Polyacrylamidgel identifiziert werden. Demnach war es nicht möglich, den PAC1-Rezeptor im Eluat der Ligandenaffinitätschromatographie photoreaktiv zu markieren. Entweder war die Menge des isolierten PAC1-Rezeptors zu gering für die photoreaktive Markierung, oder der PAC1-Rezeptor wurde aufgrund der sauren Elutionsbedingungen und der hohen Empfindlichkeit irreversibel denaturiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Dodecylmaltosid als Detergenz der PAC1-Rezeptor aus *Sf21PACAPRRho*-Membranen solubilisiert werden konnte. Es erfolgte eine Anreicherung des Rezeptors über das angefügte Rho-Epitop mittels Antikörperaffinitätschromatographie. Im Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie wurde funktioneller Rezeptor durch Bindungstests bzw. durch photoreaktive Markierung nachgewiesen. Mit geringer Ausbeute war auch eine Anreicherung des Rezeptors durch die Ligandenaffinitätschromatographie möglich, wobei jedoch nur nichtfunktioneller Rezeptor eluiert und durch Westernblotanalyse detektiert werden konnte.

3.6.2. Digitonin als Detergenz

Das radioaktive Rezeptorsignal nach der photoreaktiven Markierung mit Dodecylmaltosid als Detergenz war aus den oben diskutierten Gründen sehr schwach. Um die Hormonbindungsstelle des Rezeptors zu identifizieren, sollte sich der photoreaktiven Markierung ein proteolytischer Verdau des Rezeptors anschließen. Eine Auffächerung der schwachen radioaktiven Rezeptorbande in Rezeptorfragmente (vgl. Abbildung 31) würde die Detektion der Signale sehr erschweren. Der PAC1-Rezeptor wurde deshalb zusätzlich zum Dodecylmaltosid aus den *Sf21PACAPRRho*-Membranen mit 1% Digitonin solubilisiert. Aus der Literatur waren Beispiele für die erfolgreiche Solubilisierung des PAC1-Rezeptors mit Digitonin bekannt [44].

Die Solubilisierung erfolgte mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml für eine Stunde bei 4°C. Die Proteinausbeute der Solubilisierung betrug 25 %. Das Solubilisat wurde mittels Westernblot-Methode analysiert. Dabei wurde eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von 55 kDa detektiert, die dem PAC1-Rezeptor zugeordnet werden konnte (Abbildung 34, Spur 2).

Ein visueller Vergleich der detektierten Westernblotsignale von Membran und Solubilisat ergab, dass mit Dodecylmaltosid mehr PAC1-Rezeptorprotein aus den *Sf21PACAPRRho*-Membranen solubilisiert werden konnte als mit Digitonin. Nach dem Auftragen identischer Proteinmengen wurde im Dodecylmaltosidolubilisat eine stärkere Rezeptorbande als in der *Sf21PACAPRRho*-Membran detektiert, d.h. mit Dodecylmaltosid konnte eine höhere Anreicherung des PAC1-Rezeptors im Solubilisat erreicht werden (Abbildung 28, Spuren 1 und 2). Die Solubilisierung mit Digitonin als Detergenz ergab im Solubilisat keine stärkere PAC1-Rezeptorbande als in der Membran (Abbildung 34, Spuren 1 und 2).

Das Digitoninsolubilisat wurde anhand eines Bindungstests mit dem iodierten Ligand ^{125}I -[Phe⁶(pBz)]PACAP27 auf funktionellen Rezeptor hin untersucht. Im direktem Vergleich mit dem Dodecylmaltosidsolubilisat wurde eine mengenmäßig höhere spezifische Bindung nach der Solubilisierung mit Digitonin detektiert.

Das Digitoninsolubilisat wurde deshalb durch Sättigungstests mit einem ^{125}I -PACAP27-Liganden (Perkin Elmer) näher charakterisiert (Abbildung 33). Der ^{125}I -PACAP27-Ligand war durch seine spezifischere Bindung besser geeignet als der vorher eingesetzte ^{125}I -[Phe⁶(pBz)]PACAP27-Ligand.

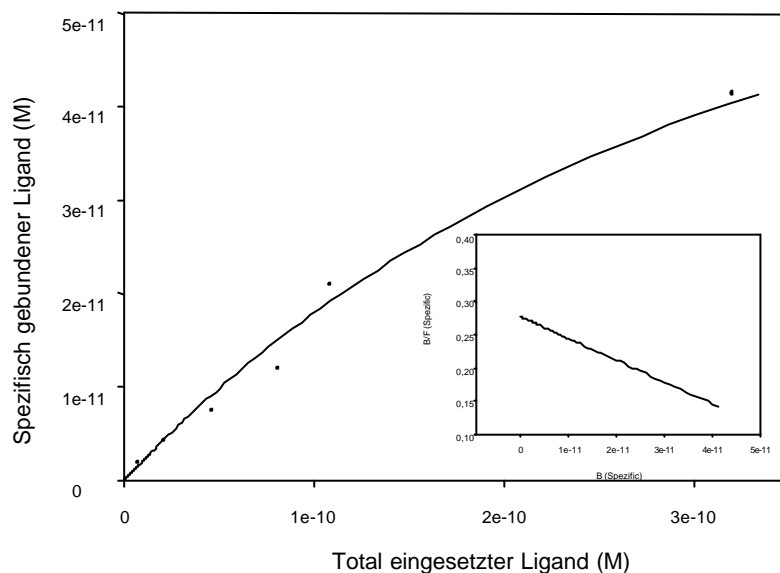


Abbildung 33: Sättigungskurve und Scatchardplot an mit Digitonin solubilisierten Sf21-PACAPRRho-Membranen

Im Digitoninsolubilisat konnte eine Rezeptordichte von 18 pmol/mg festgestellt werden. Die Affinität des Liganden zum Rezeptor betrug 0,3 nM.

Es konnte beobachtet werden, dass durch die Aufbewahrung bei 4°C der solubilierte PAC1-Rezeptor die Fähigkeit verlor, seinen Liganden zu binden. So konnte nach 4 Tagen im Kühlschrank nur noch eine Rezeptordichte von 8 pmol/mg detektiert werden.

Nach dem Einfrieren des Solubilisates bei -20°C und -80°C konnte überhaupt keine Bindung des Liganden an den Rezeptor mehr festgestellt werden. Die Rezeptoraggregation an Gefäßwände könnte neben der hohen Empfindlichkeit des Rezeptors eine Ursache für den

Bindungsverlust sein. Eine Solubilisierung des PAC1-Rezeptors in größerem Massstab war somit nicht möglich, da die Funktionalität des Rezeptorproteins verloren ging.

Der mit Digitonin solubilierte PAC1-Rezeptor wurde für einem ersten Anreicherungsschritt in der Antikörperaffinitätschromatographie eingesetzt.

Die Elution des über das Rho-Epitop an die Antikörpermatrix gebundenen Proteins erfolgte mit einer Detergenzkonzentration von 0,5 % Digitonin und dem 9-mer Elutionspeptid.

Ein Aliquot des Durchlaufes der Antikörperaffinitätschromatographie (oder Überstand, da im Batchverfahren gearbeitet wurde) und des Eluates wurden über Westernblotanalyse charakterisiert. Im Durchlauf konnte wiederum kein spezifisches Signal detektiert werden (Abbildung 34, Spur 3). Das spricht dafür, dass Digitonin keine nachteiligen Effekte auf die spezifische Erkennung des Rho-Epitops und des 1D4-Antikörpers besaß. Im Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie konnte eine spezifische Proteinbande im Bereich von 55 kDa detektiert werden (Abbildung 34, Spur 4). Folglich konnte der PAC1-Rezeptor aus den *Sf21*PACAPRRho-Membranen mit Digitonin solubiliert, über die 1D4-Antikörperaffinitätschromatographie aus dem Solubilisat entfernt und im Elutionspuffer angereichert werden (Abbildung 34).

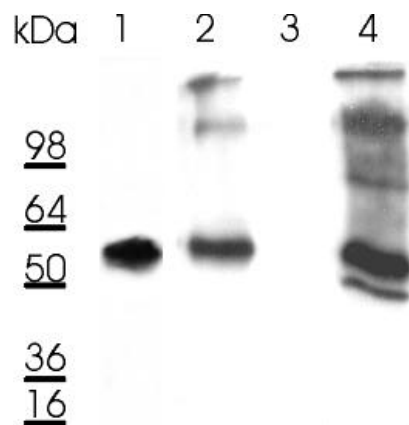


Abbildung 34: Westerblot-Analyse der Antikörperaffinitätschromatographie mit Digitonin als Detergenz

Die Proteine aus dem Solubilisat, dem Überstand und dem Eluat wurden mittels Chloroform/Methanol-Methode gefällt und über ein SDS-Polyacrylamidgel (10 %) aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran erfolgte die Detektion der Proteine durch Immunostaining des Rho-Epitops über einen Alkalische-Phosphatasegekoppelten Zweitantikörper. Spur 1: *Sf21*PACAPRRho-Membran Spur 2: Digitonin-Solubilisat Spur 3: Überstand der Antikörperaffinitätschromatographie (Durchlauf) Spur 4: Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie

Anschließend wurde in einem Bindungstestansatz der photoreaktive Ligand ^{125}I -[Phe⁶(pBz)]PACAP27 mit dem angereicherten Rezeptor aus der Antikörperaffinitätschromatographie inkubiert. Als Vergleichsansatz diente hier die

*Sf21*PACAPRRho-Membran. Es konnte spezifische Bindung im Eluat detektiert werden. Nach Abschätzung der spezifischen Bindung lagen die Rezeptordichten im Eluat höher als in der *Sf21*PACAPRRho-Membran. Bei einem direkten Vergleich der Eluate der Antikörperaffinitätschromatographie war mit Dodecylmaltosid als Detergenz die spezifische Bindung niedriger als mit Digitonin als Detergenz. Der Anteil der unspezifischen Bindung war jedoch, wie schon bei der Charakterisierung des photoreaktiven Liganden mit der Schweinehirnmembran beschrieben wurde, sehr hoch (3.1.2.).

Eine weitere Charakterisierung des PAC1-Rezeptors erfolgte durch Photoaffinitätsmarkierung des Rezeptors im Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie.

Für die Photoreaktivitätsmarkierung des PAC1-Rezeptors nach der Antikörperaffinitätschromatographie wurde das Eluat unter Bindungstestbedingungen mit dem iodierten photoreaktiven PACAP27-Liganden inkubiert und mit Licht (Quecksilberdampflampe, Wellenlängen < 320 nm wurden durch Filter entfernt) bestrahlt. Aus diesem Ansatz wurden die Proteine gefällt und über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde eine radioaktive Bande im Molekulargewichtsbereich von 58 kDa detektiert (Abbildung 35, Spur 2). Der PAC1-Rezeptor konnte somit photoreaktiv markiert werden. Die Photoaffinitätsmarkierung war ein weiterer Beweis dafür, dass der PAC1-Rezeptor nach der Anreicherung über Antikörperaffinitätschromatographie weiterhin seine Funktionalität besaß. Die Effizienz der Photoaffinitätsmarkierung war mit Digitonin als Detergenz höher als mit Dodecylmaltosid. Obwohl mit Dodecylmaltosid das Rezeptorprotein in höherer Menge solubilisiert werden konnte (laut Westernblotanalyse), unterstützte Digitonin stärker die Funktionalität des PAC1-Rezeptors. Die höhere Ausbeute der photoreaktiven Markierung mit Digitonin als Detergenz war auch für den nachfolgenden proteolytischen Verdau besser geeignet. Da erstens Verluste von radioaktiven Proteinen bei der Durchführung des proteolytischen Verdau auftreten (Pipettieren, Fällung von Proteinen) und zweitens das radioaktive Rezeptorsignal in mehrere Rezeptorfragmente aufgefächert werden kann und dadurch die Detektion radioaktiver Fragmente erschwert ist (z.B. unvollständig erfolgter Verdau).

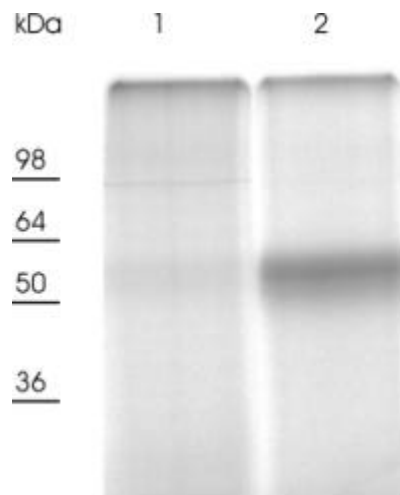


Abbildung 35: Photoreaktive Markierung des solubilisierten PAC1-Rezeptors.

Vergleich der Photoreaktiven Markierung des PAC1-Rezeptors nach Solubilisierung mit Dodecylmaltosid (Spur 1) bzw. Digitonin (Spur 2) und Reinigung über Antikörperaffinitätschromatographie. Die Auftrennung erfolgte über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (10 %). Es erfolgte eine radiographische Detektion der Signale.

Das Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie wurde ebenfalls in der Ligandenaffinitätschromatographie eingesetzt. Nach der sauren Elution (pH 4) von an die Streptavidinmatrix gebundenen Proteinen wurde das Eluat in einer photoreaktiven Markierungsreaktion eingesetzt. Wie im Fall des Dodecylmaltosids konnte jedoch kein radioaktives Signal detektiert werden, d.h. der PAC1-Rezeptor lag nach der Elution in einer unfunktionellen Form vor. Der Rezeptor wurde wahrscheinlich bei der Elution von der Matrix irreversibel denaturiert. Trotz schneller pH-Wert Änderung nach der sauren Elution und Digitonin als Detergenz konnte der PAC1-Rezeptor auch hier nach der Ligandenaffinitätschromatographie nicht in seiner funktionellen Form erhalten werden.

Die analytische Anreicherung des PAC1-Rezeptors aus dem Solubilisat der *Sf21*PACAPRRho-Membranen über Antikörperaffinitätschromatographie mit Digitonin als Detergenz wird in Tabelle 9 zusammengefasst und quantifiziert.

Probe	Protein- menge	Rezeptordichte	Rezeptor- menge	Ausbeute	Anreicherung
<i>Sf21</i> -PACAPRRho- Membran	3 mg	40 pmol/mg	120 pmol	100 %	1 fach
Solubilisat	0,75 mg	18 pmol/mg	13,5 pmol	11,25 %	- (1 fach)
Eluat der Antikörperaffinitäts- chromatographie	0,008 µg	202 pmol/mg	810 fmol	0,67 %	5 fach (11 fach)

Tabelle 9: Quantifizierung der funktionellen PAC1-Rezeptor-Anreicherung mit Digitonin als Detergenz

Aufgezeigt ist die analytische Anreicherung aus 1,5 ml Solubilisat. Die *Sf21*PACAPRRho-Membran und das Solubilisat wurden anhand von Sättigungstests mit iodiertem Ligand charakterisiert. Die Abschätzung der Rezeptordichte im Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie erfolgte aufgrund der Signale der photoreaktiven Markierung.

3.7. Deglykosilierung des photoreaktiv markierten PAC1-Rezeptors

Die Deglykosilierung gibt Hinweise auf den Umfang der posttranslationalen Modifikationen im verwendeten Expressionssystem. So kann das Glykosilierungsmuster hilfreich bei der Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle sein. Denn bei der Zuordnung der radioaktiven extrazellulären Rezeptorfragmente nach dem proteolytischen Verdau muss die Größe der Kohlenhydratreste berücksichtigt werden. Der PAC1-Rezeptor besitzt fünf potentielle Glykosilierungsstellen, drei im N-Terminus, eine im zweiten und eine im dritten extrazellulären Loop (vergleiche Abbildung 40).

Der über Antikörperaffinitätschromatographie angereicherte und photoreaktiv markierte PAC1-Rezeptor (58 kDa) wurde in einer Deglykosilierungsreaktion mit dem Enzym PNGaseF eingesetzt. PNGaseF hydrolysiert spezifisch N-glykosidische Bindungen zwischen Zuckermolekülen und dem Peptid. Im SDS-Polyacrylamidgel wurde im Vergleich mit nicht

deglykosiliertem Rezeptor eine um ca. 3 kDa kleinere Rezeptorbande detektiert (55 kDa; Abbildung 36, Spur 2). Diese geringe Molekulargewichtsverschiebung ließ auf einen sehr geringen Glykosilierungsgrad des PAC1-Rezeptors in der *Sf21*PACAPRRho-Membran schließen. Der deglykosilierte PAC1-Rezeptor besaß demnach ein Molekulargewicht von 52 kDa.

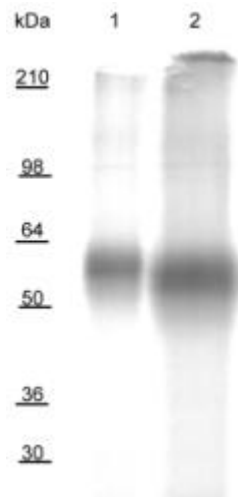


Abbildung 36: Deglykosilierung des PAC1-Rezeptors.

Die Deglykosilierung erfolgte mit PNGaseF nach Anreicherung über Antikörperaffinitätschromatographie und Photoaffinitätsmarkierung. Das Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie wurde mit dem radioaktiven photoreaktiven Liganden inkubiert, mit UV-Licht bestrahlt und die Proteine mit der Chloroform/Methanol-Methode gefällt. Die Proteinpellets wurden gelöst, mit Verdauerpuffer versetzt und ein Ansatz mit dem Enzym versetzt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine über ein SDS-Polyacrylamidgel (10 %), die Detektion radiographisch. Spur 1: Ansatz ohne PNGaseF, Spur 2: Ansatz mit PNGaseF

3.8. Proteolytische Spaltung des photoreaktiv markierten Rezeptors

Der PAC1-Rezeptor wurde nach dem Anreicherungsschritt durch Antikörperaffinitätschromatographie photoreaktiv markiert und einem proteolytischen Verdau durch Kallikrein bzw. Endoproteinase LysC unterzogen. Die Zuordnung der auftretenden radioaktiven Banden zu den theoretisch entstehenden Rezeptorfragmenten sollte zu einer Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle im PAC1-Rezeptor führen.

Wie schon bei der Deglykosilierung des Rezeptors erwähnt wurde, musste auch hier die potentielle Möglichkeit der Glykosilierung von extrazellulären Rezeptordomänen und damit ein höheres Molekulargewicht der Rezeptorfragmente beachtet werden.

3.8.1. Kallikrein

Der radioaktiv photoreaktiv markierte PAC1-Rezeptor wurde in einem proteolytischen Ansatz mit Kallikrein verdaut. Bei dem verwendeten Enzym handelte es sich um Gewebeskallikrein aus dem Pancreas des Schweines (Enzymnomenklatur 3.4.21.35). Es hydrolysiert hauptsächlich Peptidbindungen zwischen Met-Lys und Arg-Ser [45].

Im PAC1-Rezeptor der Ratte existieren zwei Arg-Ser Spaltstellen an Position 352 und an Position 451. Eine Met-Lys-Spaltstelle existiert nicht. Demnach müßte bei einem vollständigen Verdau des Rezeptors durch Kallikrein drei Fragmente mit 352 Aminosäuren (40,5 kDa), 63 Aminosäuren (6,6 kDa) und 52 Aminosäuren (5,7 kDa) Länge entstehen. Im Falle der Ausbildung von kovalenten Bindungen durch den photoreaktiven Liganden während der Photoaffinitätsmarkierung wären die entstandenen proteolytischen Fragmente um 3 kDa größer. Für glykosilierte Fragmente müßte zusätzlich eine Erhöhung des Molekulargewichtes um bis zu 3 kDa beachtet werden (vergleiche Kapitel 3.7.).

Die Größen der tatsächlich beobachteten radioaktiven Banden betragen 48 kDa und 36 kDa (Abbildung 37, Spur 2). Die Zuordnung der Banden erfolgt in Kapitel 3.9.

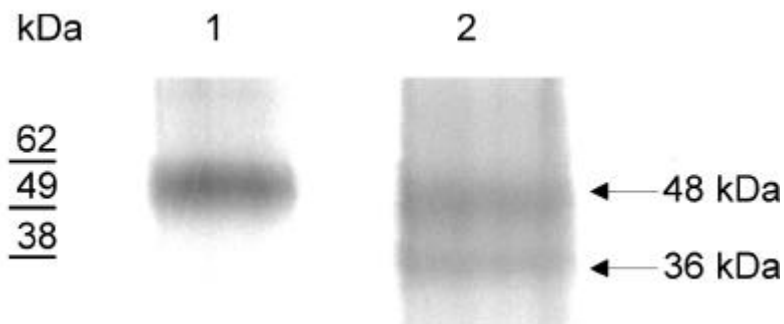


Abbildung 37: Proteolytische Spaltung des PAC1-Rezeptors mit Kallikrein.

Die Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (4-12%, Invitrogen) aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde das Gel getrocknet und radiographisch analysiert. Spur 1: ohne Kallikrein, Spur 2: mit Kallikrein.

3.8.2. Endoproteinase LysC

Der proteolytische Verdau mit der Endoproteinase LysC sollte weiter Aufschluß über die Ligandenbindungsstelle im PAC1-Rezeptor geben. Dieses Enzym schneidet Proteine nach jedem Lysinrest. Im N-Terminus des PAC1-Rezeptors sind vier Lysinreste lokalisiert (Positionen 27, 28, 64 und 153). Es müßten folglich nach einem Endoproteinase LysC-Verdau drei aus dem N-Terminus (bis Position 154) stammende Fragmente entstehen. Es konnte jedoch keine Verschiebung der PAC1-Rezeptorbande detektiert und somit kein proteolytischer Verdau des Rezeptors beobachtet werden (Abbildung 38).

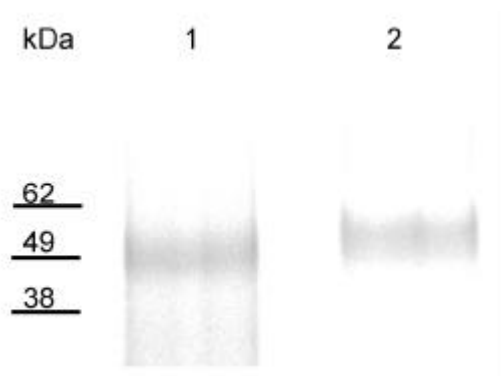


Abbildung 38: Proteolytische Spaltung des photoreaktiv markierten PAC1-Rezeptors

Die Proteolyse des photoreaktiv markierten PAC1-Rezeptors aus dem Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie erfolgte mit der Endoproteinase LysC (4-12 % Gradientengel, radiographische Detektion). Spur 1: Probe ohne LysC-Behandlung Spur 2: Probe mit LysC-Behandlung.

3.9. Beschreibung der verwendeten Strategie und die Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die Ligandenbindungsstelle des PAC1-Rezeptors erstmals durch den proteolytischen Verdau des photoreaktiv markierten Rezeptorproteins stark eingegrenzt. Der proteolytische Verdau radioaktiv markierter Rezeptoren stellt eine direkte Strategie zur Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle dar. Andere indirekte Methoden sind die Konstruktion chimärer Rezeptoren sowie die Mutagenese oder Deletion von vermutlich an der Ligandenerkennung beteiligter Rezeptordomänen.

Für den proteolytischen Verdau von Proteinen stand eine Vielzahl von kommerziell zu erwerbenden Enzymen zur Verfügung. Der Großteil der käuflichen Proteasen war jedoch

aufgrund der hohen Spaltsequenz des PAC1-Rezeptors für den proteolytischen Verdau ungeeignet. Die Fragmente des verdauten Rezeptors mußten für eine eindeutige Zuordnung der Spaltfragmente ein variables Molekulargewicht aufweisen. Weiterhin musste darauf geachtet werden, den photoreaktiv markierten Liganden nicht zu verdauen bzw. die radioaktiv markierte Aminosäure und die photoreaktive Gruppe in einem Fragment zu erhalten. Die Synthese von Liganden mit der photoreaktiven und der radioaktiven Gruppe an einem Aminosäurerest würde das Spektrum der verwendbaren Proteasen erweitern. Sie gestaltet sich jedoch als sehr schwierig aufgrund der sterischen Hinderung der einzuführenden Reste sowie der möglichen resultierenden niedrigeren Affinität des modifizierten Liganden. Da der PACAP-Ligand 27 Aminosäuren besitzt, war die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins von spezifischen Proteaseschnittstellen sehr hoch. Als Lösung bietet sich die Verkürzung und Mutagenese von Liganden an, um potentielle Erkennungssequenzen für proteolytische Enzyme zu entfernen und damit den Einsatz dieser Liganden in der proteolytische Analysen zu ermöglichen ([46],[47]). Im Falle der PACAP-Liganden war die sinnvolle Verkürzung der Peptide jedoch nicht geeignet, da verkürzte PACAP-Liganden eine signifikant schlechtere Affinität zum PAC1-Rezeptor besitzen und deshalb als Liganden für die photoreaktive Markierung zum Zweck des proteolytischen Verdaus nicht geeignet waren [48].

Für die photoreaktive Markierung des PAC1-Rezeptors standen fünf photoreaktive Liganden zur Auswahl (Abbildung 39) [49]. Keiner dieser Liganden besaß eine spezifische Erkennungssequenz für das Gewebskallikrein aus dem Schwein. Trotz der zu erwartenden geringen Effizienz der photoreaktiven Markierung [36] wurde der $[\text{Phe}^6(\text{pBz})\text{PACAP}27\text{-Ligand}]$ ausgewählt. Denn einzigst für diesen Liganden bestand die Option, nach dem Verdau mit der Endoproteinase LysC die photoreaktive und die radioaktive Gruppe in einem Fragment zu erhalten (Aminosäurefragment 1-15, vergleiche Abbildung 39). Über die Iodogenmethode wurde der $[\text{Phe}^6(\text{pBz})\text{PACAP}27\text{-Ligand}]$ hochaffin radioaktiv markiert (an Position 10 oder 13, $K_D = 0,4 \text{ nM}$). Die dabei beobachtete Oxidation der Aminosäure Methionin im PACAP-Liganden hatte keinen Einfluß auf die Rezeptorerkennung. Gleiches wurde für den hier synthetisierten biotinylierten PACAP-Liganden gefunden, der trotz gezeigter Methioninoxidation ebenfalls hochaffin war. Im Gegensatz dazu wurde für andere Peptidhormone ein Verlust der biologischen Aktivität nach einer Methioninoxidation beobachtet [50].

Photoreaktive Liganden

PACAP27

His-Ser-Asp-Gly-Ile-**Phe**-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-**Lys**-Gln-Met-Ala-Val-**Lys-Lys-Tyr**-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH₂[Phe⁶(pBz)]PACAP27His-Ser-Asp-Gly-Ile-**Phe(pBz)**-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH₂[Lys¹⁵(ε-pBz₂)]PACAP27His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-**Lys(ε-Bz₂)**-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH₂[Lys²⁰(ε-pBz₂)]PACAP27His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-**Lys(ε-Bz₂)**-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH₂[Lys²¹(ε-pBz₂)]PACAP27His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-**Lys(ε-Bz₂)**-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH₂[Phe²²(pBz₂)]PACAP27His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-**Phe(pBz)**-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH₂**Abbildung 39: Struktur der zur Auswahl stehenden photoreaktiven PACAP27-Analoga**

Die fett geschriebenen Aminosäuren wurden jeweils modifiziert. Phe(pBz): p-Benzoyl-L-phenylalanin

Für die photoreaktive Markierung wurde der über Antikörperaffinitätschromatographie funktionell gereinigte PAC1-Rezeptor verwendet. Die Spaltfragmente des proteolytischen Verdau wurden nach Auftrennung der Proteine über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese radiographisch detektiert. Ein erster Verdau des Rezeptors erfolgte mit Kallikrein. Das verwendete Gewebeskallikrein besaß zwei spezifische Erkennungssequenzen an den Positionen 352 und 415 des PAC1-Rezeptors (vgl. Abbildung 40).

Durch die proteolytische Spaltung des photoreaktiv markierten PAC1-Rezeptors mit Kallikrein entstanden zwei Spaltfragmente, die Molekulargewichte von 48 kDa und 36 kDa aufwiesen. Das 48 kDa-Fragment konnte eindeutig der spezifischen Kallikrein-Spaltstelle an Position 352 zugeordnet werden. Die Position 352 befand sich im dritten intrazellulären Loop des PAC1-Rezeptors. Zu dem theoretisch kalkulierten Molekulargewichtes dieses Rezeptorfragmentes (40,4 kDa) müssen noch das Molekulargewicht der Glykosylierung (3 kDa) und des photoreaktiven Liganden (3 kDa) hinzugezogen werden (Tabelle 10). Die errechnete Fragmentgröße von 46,4 kDa stimmte mit der zugeordneten Fragmentgröße von 48 kDa gut überein (Tabelle 11). Dieses Ergebnis schließt die Beteiligung des dritten extrazellulären Loops an der Ligandenbindung aus. Da kein radioaktives Fragment größeren Molekulargewichtes auftrat, wurde die spezifische Erkennungssequenz an der Position 415 im

C-Terminus des PAC1-Rezeptors ebenfalls erkannt und das Protein somit vollständig durch Kallikrein verdaut.

Das Auftreten des 36 kDa-Fragmentes nach längerer Kallikreineinwirkung (über Nacht) wurde einer weiteren Spaltung des N-terminalen radioaktiven 48 kDa-Fragmentes zugeordnet. Das 48 kDa-Fragment wies keine spezifische Spaltstelle für das Gewebeskallikrein aus dem Schwein auf. Für die zusätzliche Spaltung kommen jedoch zwei Phenylalaninpaare an den Positionen 232 und 258 des PAC1-Rezeptors als zusätzliche Erkennungssequenz in Betracht, wie sie für das menschliche Gewebeskallikrein beschrieben wurde. Das menschliche Gewebeskallikrein besitzt die gleiche Substratspezifität wie das Gewebeskallikrein aus dem Schwein, es hydrolysiert Peptidbindungen zwischen Arginin-Serin und Methionin-Lysin. Zusätzlich wurde eine Spaltung von Peptiden nach einem Paar von Phenylalanin gefunden ([51], [52]). Diese Spezifität wäre für das Kallikrein aus dem Schwein ebenso denkbar. Es könnte somit eine zusätzliche Fragmentierung des PAC1-Rezeptors an den Positionen 232 und 258 stattfinden. Da sich die Position 232 in der Umgebung von hydrophoben Aminosäuren aus der dritten Transmembrandomäne befand, kann ein Nichterkennen durch das Enzym wahrscheinlich sein.

Die Fragmentierung des Rezeptors an Position 258 im zweiten intrazellulären Loop ergibt mit eingerechneter Glykosylierung und eingerechnetem photoreaktiven Liganden eine Größe von 36,5 kDa, was sehr gut mit dem detektierten Fragment von 36 kDa übereinstimmt. Da in diesem Fragment (N-Terminus, erste extrazelluläre Domäne) die gesamten detektierten Glykosylierung vorhanden ist, wird für den zweiten extrazellulären Loop eine Einbeziehung in die Ligandenbindung ebenso ausgeschlossen wie eine Glykosylierung des PAC1-Rezeptors an der Position 299.

Eine Zusammenfassung der durch Kallikreinverdau möglichen Rezeptorfragmente gibt die Tabelle 10. Darin wurden alle hier diskutierten möglichen Spaltstellen berücksichtigt. Eine Zusammenfassung über die tatsächlich ermittelten radioaktiven Fragmente des PAC1-Rezeptors mit Kallikrein gibt die Tabelle 11. In der Abbildung 40 sind die Spaltstellen des Kallikreins im PAC1-Rezeptor markiert.

Rezeptor-fragment (AS)	Anzahl der Aminosäuren	Theoretische Fragment-größe (kDa)	Erwartete Fragmentgröße (kDa)	
			Mit Ligand	mit Ligand und Glykosilierung
1-232 (Met?Phe-Phe)	232	26,1	29,1	32,1
233-259 (Cys?Phe-Phe)	27	3,4	6,4	n.m.
260-352 (Pro?Arg)	93	10,9	13,9	16,9
353-415 (Ser?Arg)	63	7,2	10,2	13,2
416-467 (Ser?Thr)	52	5,7	8,7	n.m.

Tabelle 10: Aufstellung der möglichen Rezeptorfragmente nach vollständigem proteolytischen Verdau des photoreaktiv markierten PAC1-Rezeptors mit Kallikrein.

Arg: Spaltung zwischen Arginin und Serin

Phe-Phe: Spaltung nach einem Paar von Phenylalanin

N.m.: Glykosilierung nicht möglich

Rezeptor-fragment (AS)	Theoretische Fragment-größe (kDa)	Erwartete Fragmentgröße mit Ligand und Glykosilierung (kDa)	Detektierte Fragmentgröße (kDa)
1-352 (Met?Arg)	40,4	46,4	48
1-259 (Met?Phe)	29,5	35,5	36

Tabelle 11: Zuordnung der tatsächlich detektierten PAC1-Rezeptorfragmente (vgl. Abbildung 37) nach proteolytischem Verdau mit Kallikrein.

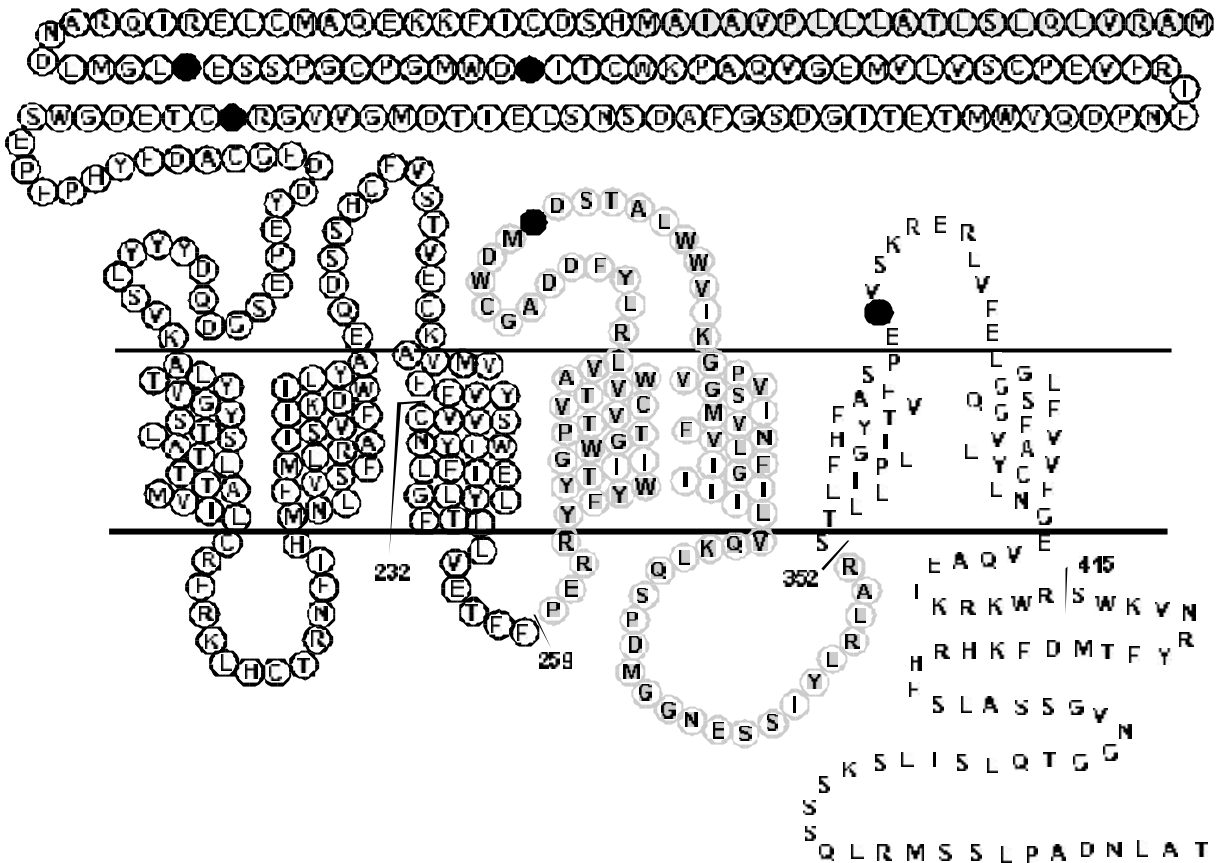


Abbildung 40: Darstellung des PAC1-Rezeptors der Ratte.

Potentielle Glykosylierungsstellen sind dunkel hervorgehoben. Die ersten 20 grau unterlegten Aminosäuren markieren das Signalpeptid. Die Positionen 352 und 415 bezeichnen spezifische Erkennungssequenzen des Gewebsskallikreins aus dem Schwein. Die Positionen 232 und 259 die vermuteten und aus dem menschlichem Gewebsskallikrein abgeleiteten Erkennungssequenzen. Nach dem proteolytischen Verdau könnten die radioaktiv markierten Rezeptorfragmente durch Spaltung an Position 352 (schwarz und grau umrandete Aminosäuren) und durch Spaltung an Position 259 (schwarz umrandete Aminosäuren) entstanden sein.

Der proteolytische Verdau mit der Endoproteinase Lys-C sollte zu einer weiteren Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle im N-Terminus führen. Die Endoproteinase schneidet nach jedem Lysinrest. Für den N-Terminus wurden drei Fragmente variabler Größe erwartet. Es konnten jedoch keine Spaltfragmente detektiert werden (15 potentielle Spaltstellen im gesamten PAC1-Rezeptor). Es wird angenommen, dass trotz der nach Vorschrift gewählten optimalen Reaktionsbedingungen Komponenten für die Reaktivität des Enzyms fehlten. Desweiteren könnte das Rezeptorprotein trotz Behandlung mit 1 % SDS in einer unvollständig denaturierten Form vorliegen und damit für die Endoproteinase LysC unzugänglich sein. Andererseits kann die Endkonzentration von 0,1 % SDS im Reaktionspuffer eventuell Inaktivierung des Enzyms führen.

Die Aufwendige Generierung des Ausgangsmaterials, die geringe Langzeitstabilität des Rezeptorsolubilisates und die durch die Halbwertszeit begrenzte Verwendbarkeit der

radioaktiven PACAP-Liganden erlaubten es im Rahmen dieser Arbeit nicht, die Arbeiten zur Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle des PAC1-Rezeptors weiter zu vertiefen.

3.10. Der Einfluß des PAC1-Rezeptors auf die Sekretion des APPs α

Neben der Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des PAC1-Rezeptors auf die APPs α -Sekretion geprüft werden. Für einige G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) wurde nämlich ein Einfluss auf die Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) gezeigt. Das membranständige APP kann durch α -Sekretasen in eine gut lösliche Form, das APPs α , prozessiert werden. Dem APPs α wurden zellschützende Funktionen nachgewiesen. Neben der Prozessierung durch α -Sekretasen kann das APP durch β - und γ -Sekretasen in A β umgewandelt werden (vgl. Abbildung 3). Dem hydrophoben A β wird eine besondere Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit zugesprochen. Denn mit A β angereicherte Plaques werden in größerer Anzahl in Gehirnen von Patienten mit der Alzheimer'schen Erkrankung gefunden. Für einige GPCR ist eine Stimulation des α -Sekretaseweges und die daraus folgende erhöhte Sekretion des APPs α beobachtet wurden. Durch die α -Sekretaseaktivierung kann der amyloidogene Stoffwechselweg zurückgedrängt werden und daraus eine verminderte Produktion des A β resultieren. Der hier behandelte PAC1-Rezeptor gehört zu den GPCR, die unter anderem im Gehirn verstärkt exprimiert werden. Der PAC1-Rezeptor übt eine Vielzahl von Einflüssen auf physiologische Systeme aus und wurde hier erstmals im Hinblick auf die APP-Prozessierung untersucht.

3.10.1. Charakterisierung des HEKPACAPRRho-Zellsystems

Für die physiologischen Untersuchungen wurde die generierte HEKPACAPRRho-Zelllinie gewählt. Der PAC1-Rezeptor wurde in dieser Zelllinie ca. vierfach überexprimiert (Rezeptordichte: 8,6 pmol/mg) gegenüber der Expressionsdichte im Schweinegehirn. Aufgrund des vorliegenden Säugerzellsystems wird der PAC1-Rezeptor vollständig prozessiert (aktiver Rezeptor). Der PAC1-Rezeptor wird in HEK-Zellen nicht endogen exprimiert, was der Interpretation der Untersuchungsergebnisse entgegenkommt. So wurden nur Signale detektiert, die aufgrund der Stimulation des transfizierten PAC1-Rezeptors auftraten.

Neben der Bestimmung der Rezeptordichte (8,6 pmol/mg, Abschnitt 3.4.) wurde die *HEKPACAPRRho*-Zelllinie anhand ihrer Kalziumantwort auf PACAP-Ligandenstimulation charakterisiert. Dafür wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzmarker FURA beladen. Dieser Marker (FURA) wandert durch die Zellmembran und ist dann im Zytosol lokalisiert. FURA besitzt eine hohe Affinität zu Kalziumionen und bildet zusammen mit ihnen einen Komplex. Durch die Komplexbildung verändert sich das Emissionsspektrum von FURA. Aus dem Vergleich der Emissionsspektren zwischen freiem und mit Kalziumionen komplexiertem FURA kann auf die momentane Konzentration von Kalziumionen im Zytosol der Zelle geschlossen werden.

Für die Versuche wurden die *HEKPACAPRRho*-Zellen mit dem Fluoreszenzmarker FURA beladen und mit verschiedenen PACAP27-Ligandenkonzentrationen stimuliert. Die resultierende Kalziumantwort wurde detektiert. Das bedeutet, dass nach Stimulation des PAC1-Rezeptors ein Kalziumeinstrom aus intrazellulären Kalziumspeichern oder dem Extrazellulärraum stattfand.

Zwischen der eingesetzten Ligandenkonzentration und der detektierten Signalstärke wurde jedoch keine Korrelation gefunden (Daten nicht gezeigt). Die Streuung der Werte war so groß, dass keine Sättigungskurve konzipiert werden konnte.

Die Versuchsreihe wurde mit dem PACAP38-Liganden wiederholt. Die Stimulation des PAC1-Rezeptors mit dem PACAP38-Liganden führte ebenfalls zu einer Kalziumantwort. Im Unterschied zum PACAP27-Liganden wurde eine Korrelation zwischen der eingesetzten PACAP38-Ligandenkonzentration und der detektierten Signalstärke ermittelt. Ab einer 10 nM Ligandenkonzentration wurde eine Sättigung des Signals erreicht. Die Sättigungskurve ist in Abbildung 41 dargestellt.

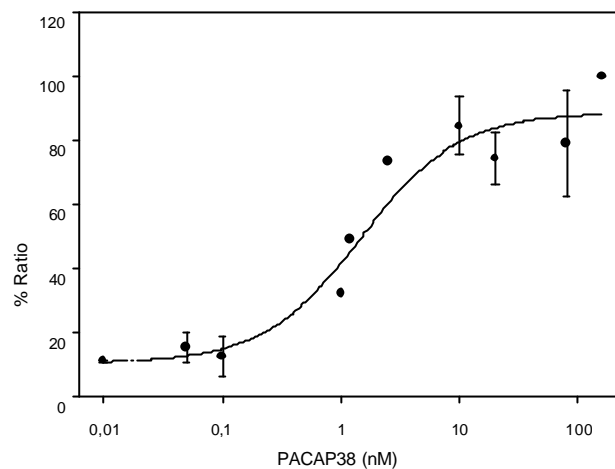


Abbildung 41: Kalziumantwort der *HEKPACAPRRho*-Zellen auf die Stimulation mit PACAP38.

Anhand der in die Messpunkte gelegten Funktion wurde die halbmaximale Konzentration auf $1,13 \text{ nM} \pm 0,04 \text{ nM}$ bestimmt (Sigma Plot).

Die Ursache für die ungleich ausfallenden Kalziumantworten wurde auf die unterschiedlich starke Stimulation des Kalziumsignaltransduktionsweges durch die verschiedenen PACAP-Liganden zurückgeführt.

3.10.2. Auswirkung der Stimulation des in *HEK*-Zellen stabil transfizierten PAC1-Rezeptors auf die APP α -Sekretion

Für den Einfluß des PAC1-Rezeptors auf die APP-Prozessierung wurde die APP α -Sekretion in den Zellkulturüberstand der *HEKPACAPRRho*-Zellen untersucht. Das APP α entsteht aus dem APP durch Einwirkung von α -Sekretasen.

Nach Stimulation der *HEKPACAPRRho*-Zellen mit dem PACAP27-Liganden (300 nM Endkonzentration) wurde im Gegensatz zu ebenfalls mit dem PACAP27-Liganden stimulierten *HEK*-Zellen und zu nicht stimulierten *HEKPACAPRRho*-Zellen ein fünffacher Anstieg der APP α -Sekretion ins Medium beobachtet (Abbildung 42). Es handelte sich damit um einen signifikanten Anstieg der APP α -Sekretion.

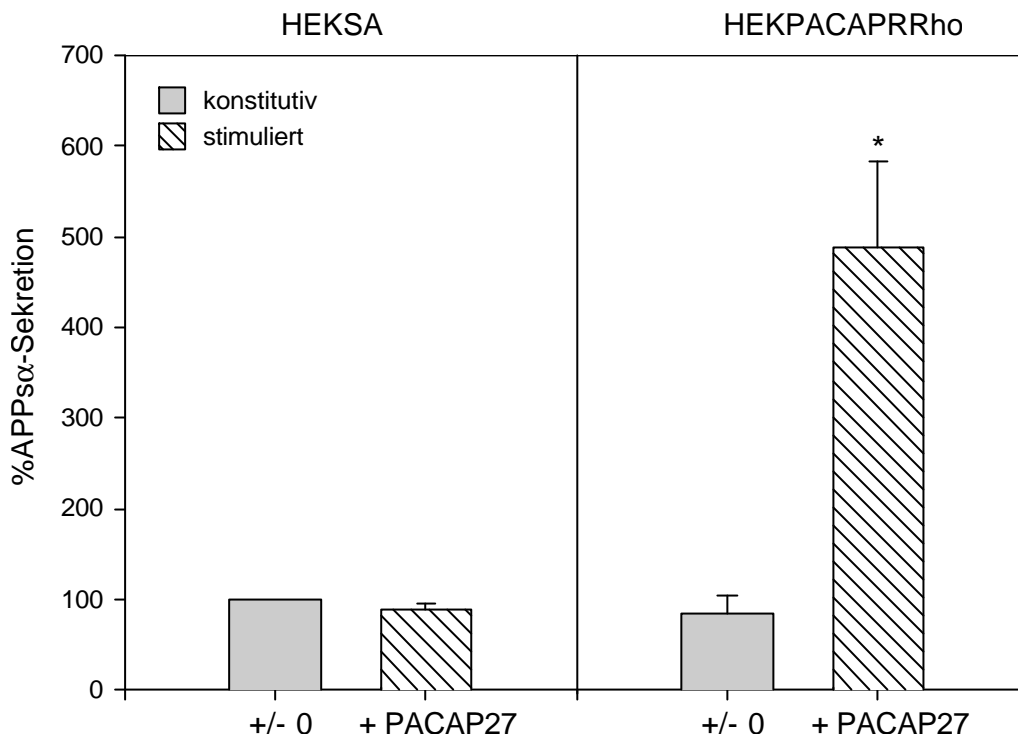


Abbildung 42: Einfluß der PAC1-Rezeptor-Stimulation auf die APP α -Sekretion.

Es wurde jeweils eine gleiche Anzahl von Zellen auf mit Polylysin beschichteten 10-cm-Zellkulturschalen ausgesät. Zu den Zellen wurde der PACAP27-Ligand bis zu einer Endkonzentration von 300 nM zugegeben und nach vier Stunden der Zellkulturüberstand gefällt (vgl. Material- und Methodenteil). Die Detektion erfolgte über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Westernblotanalyse. Die Quantifizierung der detektierten Banden erfolgte mit dem Phosphorimagersystem (Aida, Raytest). *HEKSA*: suspensionsadaptierte *HEK*-Zellen; *HEKPACAPRRho*: Mischklon; * $p < 0,001$ (Student t-Test, Sigma Blot)

Weiterhin wurde der Einfluß des PACAP38-Liganden auf die APP α -Sekretion der *HEKPACAPRRho*-Zellen untersucht. Der PACAP38-Ligand ist ebenfalls ein natürlicher Ligand des PAC1-Rezeptors. Er besteht aus 38 Aminosäuren und seine ersten 27 N-terminalen Aminosäuren sind mit der Sequenz des PACAP27-Liganden identisch. Mit dem PACAP38-Liganden (300 nM) wurde ein 2,5facher Anstieg der APP α -Konzentration gegenüber dem basalem APP α -Wert festgestellt. Damit besass der PACAP38-Ligand bei gleicher Ligandkonzentration (300 nM) ein um 50 % geringeres Stimulationspotential als der PACAP27-Ligand (Abbildung 43).

Einen Hinweis auf die Spezifität ergab die Inkubation der *HEKPACAPRRho*-Zellen mit dem Vasoactiven Intestinale Polypeptid (VIP). Der VIP-Ligand ist ein natürlicher Agonist der VIP-Rezeptoren (VPAC1 und VPAC2), die zur gleichen Familie wie der PAC1-Rezeptor gehören und eine hohe Sequenzhomologie zum PAC1-Rezeptor besitzen. Während die PACAP-Liganden ebenfalls eine hohe Affinität zu den VIP-Rezeptoren erkennen lassen, besitzt VIP eine 1000fach schlechtere Affinität zum PAC1-Rezeptor als die PACAP-Liganden. Die Behandlung der Zellen mit dem VIP-Agonisten (300 nM) ergab keinen

Anstieg der basalen APP α -Sekretion (Abbildung 43). Durch diesen Versuch konnte ausgeschlossen werden, dass die Aktivierung von eventuell in HEK-Zellen endogen vorkommenden VIP-Rezeptoren zur Stimulation der APP α -Sekretion führten.

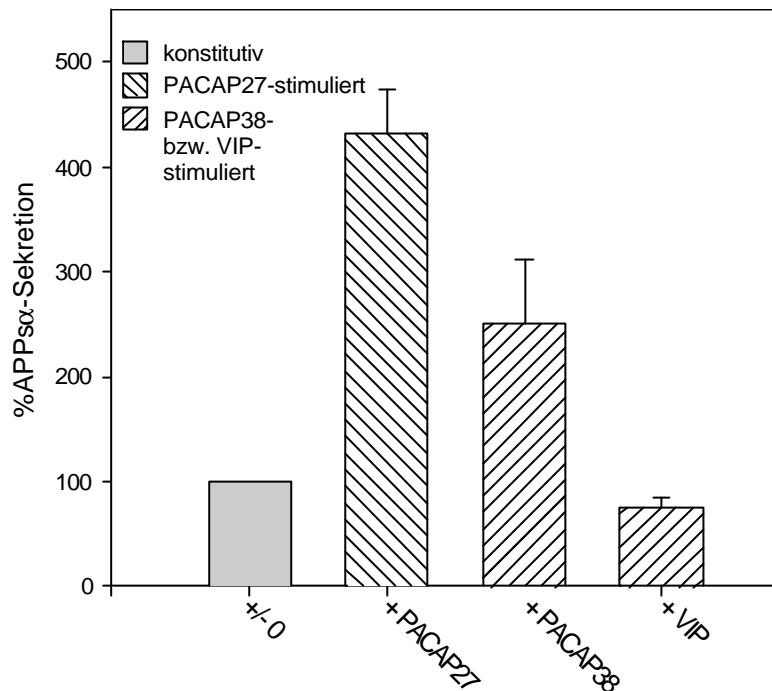


Abbildung 43: Einfluß verschiedener Liganden auf die APP α -Sekretion.
Die Endkonzentration aller eingesetzter Liganden betrug 300 nM.

Der durch die PACAP-Liganden erzielte Anstieg der APP α -Sekretion ins Medium der HEKPACAPRRho-Zellen war spezifisch für die Stimulation des PAC1-Rezeptors. Da der PACAP27-Ligand ein höheres Stimulationspotential als der PACAP38-Ligand besass, wurden alle weiteren Versuche mit dem PACAP27-Liganden durchgeführt.

Für die Stimulation der APP α -Sekretion durch den PACAP27-Liganden wurde der Einfluss der Ligandenkonzentration untersucht. Dafür wurden die Zellen mit verschiedenen PACAP27-Konzentrationen behandelt. Die geringste eingesetzte Konzentration betrug 1 nM PACAP27. Die höchste eingesetzte Konzentration betrug 3000 nM. Es wurde eine Abhängigkeit der APP α -Sekretion von der PACAP27-Ligandenkonzentration gefunden (Abbildung 44). Während bei einer Ligandenkonzentration von 10 nM kein Effekt auf die konstitutive APP α -Sekretion gefunden wurde, betrug bei einer 30 nM PACAP27-Ligandenkonzentration die APP α -Menge schon das Dreifache gegenüber dem basalen Wert. Bei einer 3000 nM PACAP27-Ligandenkonzentration wurde sogar ein 7,5facher Anstieg der

APPs α -Sekretion beobachtet. Die Stimulation des PAC1-Rezeptors mit einer 1 nM PACAP27-Ligandenkonzentration führte zu einer Inhibierung der konstitutiven APPs α -Sekretion um 50 % (Abbildung 44).

In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die durch PACAP27 ausgelösten stimulatorischen Effekte auf die APPs α -Sekretion gelegt. Diese Effekte wurden in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Der Effekt der α -Sekretase-Inhibierung bei einer 1 nM PACAP27-Konzentration wurde nicht weiter verfolgt, da es sich um einen nicht signifikanten Wert handelte ($p = 0,075$). Im allgemeinen sind inhibitorische Effekte schwieriger zu quantifizieren und bedürfen weiterer genauerer Untersuchungen. Sollte sich der inhibitorische Effekt jedoch bestätigen, wäre der PAC1-Rezeptor sowohl ein Aktivator als auch ein Inhibitor der APPs α -Sekretion in den verwendeten *HEKPACAPRRho*-Zellen.

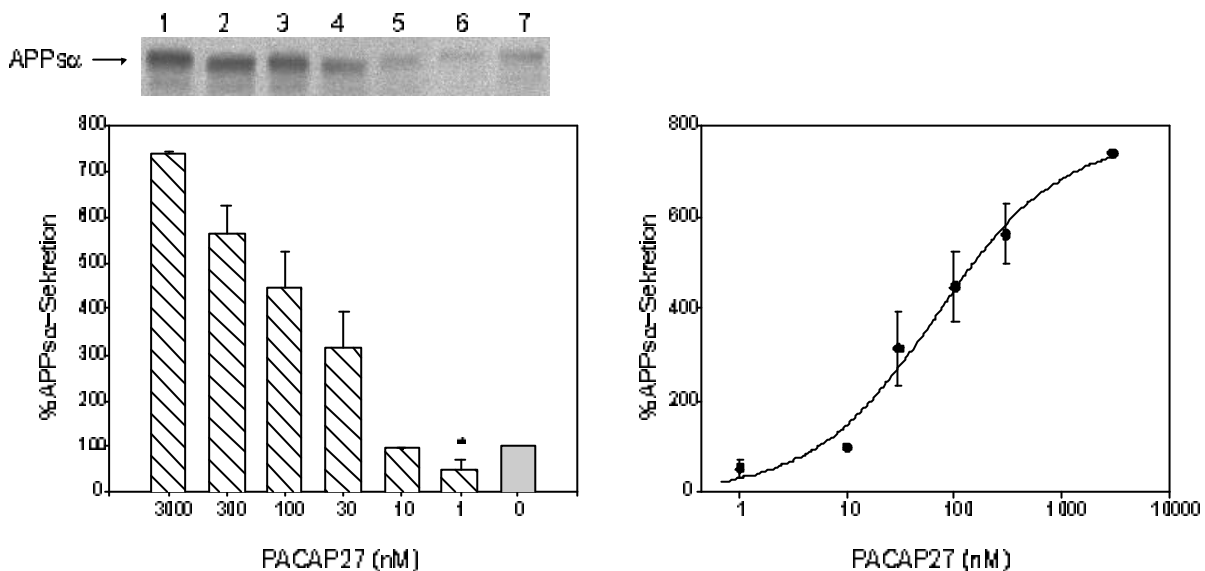


Abbildung 44: Einfluß der PACAP27-Ligandenkonzentration auf die Stimulation der APPs α -Sekretion.

Die linke Abbildung zeigt die Abhängigkeit in Form eines Balkendiagramms (Doppelbestimmung, zwei unabhängige Experimente). Darüber ist ein typisches Westernblotsignal (7,5%iges SDS_Polyacrylamidgel) abgebildet (1-6 PACAP27-Konzentrationen: 3000 nM, 300 nM, 100 nM, 30 nM, 10 nM, 1 nM; 7: basales APPs α). In der rechten Abbildung wurde die Konzentrationsabhängigkeit in Form einer Funktion dargestellt (Kurvenanpassung mit SigmaPlot 5.0, Sigmoidaler Fit). Mittels dieser Funktion wurde eine halbmaximale Konzentration von $58,3 \text{ nM} \pm 1,9 \text{ nM}$ bestimmt. * $p = 0,075$ (Student t-Test, SigmaPlot)

3.10.3. Einfluß verschiedener Signaltransduktionswege auf die PAC1-Rezeptor stimulierte APPs α -Sekretion

Für den PAC1-Rezeptor wurde ein Einfluß auf die Signaltransduktionswege der Proteinkinase A (PKA), der Proteinkinase C (PKC) und Mitogen Aktivierten Proteinkinase (MAPK) beschrieben. Eine Inhibierung dieser Signaltransduktionswege ermittelte deren Einfluß auf die von PACAP27 induzierte APPs α -Sekretion.

Je nach Passage und Zustand der Zellen wurden geringfügige Unterschiede in der APPs α -Sekretion beobachtet. Deshalb wurde die alleinige Stimulation der *HEKPACAPRRho*-Zellen mit dem PACAP27-Liganden für alle folgenden Versuche wiederholt.

3.10.3.1. Proteinkinase A-Weg

Es wurde der Einfluß des PKA-Signaltransduktionsweges auf den PAC1-Rezeptor vermittelten Anstieg der APPs α -Sekretion untersucht (Abbildung 45).

Die *HEKPACAPRRho*-Zellen wurden mit dem PKA-Inhibitor H89 inkubiert. H89 ist ein potenter und selektiver Inhibitor der PKA, indem er das von der PKA benötigte ATP kompetitiv verdrängt [53]. Der PKA-Inhibitor H89 ergab keine Veränderung des basalen APPs α -Wertes. Die PKA besaß also keinen Einfluss auf die konstitutive α -Sekretaseaktivität. Durch die Behandlung der Zellen mit dem PKA-Inhibitor H89 wurde jedoch die PACAP27-stimulierte APPs α -Sekretion um 43 % inhibiert (Abbildung 45, Tabelle 12). Die PKA ist somit an der durch den PAC1-Rezeptor vermittelten α -Sekretaseaktivierung beteiligt.

Weiterhin wurden die Zellen mit dem PKA-Stimulator Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) behandelt. dbcAMP fungiert wie das cAMP, ist jedoch stabiler gegen den Angriff von Phosphodiesterasen und damit ein langfristigerer Stimulator der Proteinkinase A. Wie der PKA-Inhibitor H89 besaß auch der PKA-Stimulator dbcAMP keinen Einfluss auf die basale APPs α -Sekretion der *HEKPACAPRRho*-Zellen. Der PKA-Stimulator dbcAMP besaß ebenfalls keinen Effekt auf den durch PACAP27 ermittelten APPs α -Anstieg (Abbildung 45).

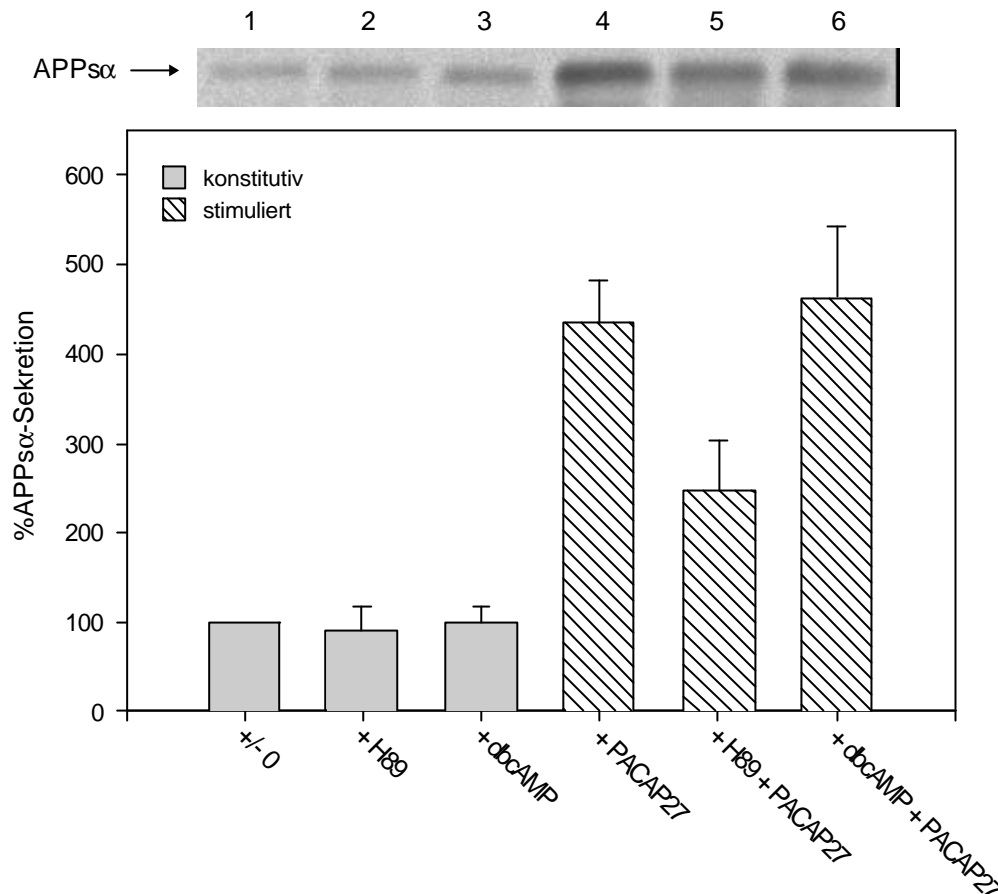


Abbildung 45: Einfluß von PKA-Inhibitoren und –Aktivatoren auf die von PACAP27 induzierte Stimulation der APPs α -Sekretion.

Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit in Form eines Balkendiagramms. Die Zellen wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben behandelt und die Überstände gefällt. Die Zellen für die Inhibitorversuche wurden 30 min mit dem Inhibitor vorinkubiert. Die Endkonzentration betrug für den PACAP27-Liganden 300 nM, für den Inhibitor H89 20 μ M und für den Aktivator dbcAMP 1 mM. Über dem Balkendiagramm (Doppelbestimmung, drei unabhängige experimente) ist ein typisches Westernblotsignal (7,5%iges Westernblotsignal) abgebildet mit folgenden Spuren: 1: basales APPs α , 2: PKA-Inhibitor H89, 3: PKA-Stimulator dbcAMP, 4: PACAP27-Ligand, 5: PKA-Inhibitor H89 und PACAP27-Ligand, 6: PKA-Aktivator dbcAMP und PACAP27-Ligand.

3.10.3.2. Proteinkinase C-Weg

Die *HEKPACAPRRho*-Zellen wurden in Ab- oder Anwesenheit des PACAP27-Liganden mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrin und dem PKC-Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-Acetat PMA untersucht (Abbildung 46).

Chelerythrin ist ein spezifischer Inhibitor der PKC ($IC_{50} = 660$ nM). In höheren Konzentrationen inhibiert Chelerythrin weitere Enzyme der Signaltransduktionskaskade (z.B. PKA, Tyrosin-Protein-Kinasen; $IC_{50} = 100$ μ M). Er wurde deshalb in einer Konzentration von

300 nM eingesetzt. Es wurde festgestellt, dass der PKC-Inhibitor Chelerythrin keinen Einfluß auf die konstitutive α -Sekretaseaktivität besitzt, da sich die basale APPs α -Menge im Zellkulturüberstand während der Chelerythrininkubation nicht signifikant änderte (Abbildung 46). Durch die Behandlung der Zellen mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrin wurde jedoch die PACAP27-stimulierte APPs α -Sekretion um 34 % inhibiert (Abbildung 46, Tabelle 12). Eine Involvierung der Proteinkinase C in die PAC1-Rezeptor vermittelte Stimulation der APPs α -Sekretion wurde damit gezeigt.

Weiterhin wurden die *HEKPACPRRho*-Zellen mit dem PKC-Stimulator PMA behandelt. PMA ist ein Phorbolster. Phorbolster sind starke Stimulatoren der α -Sekretasen und somit der APPs α -Sekretion. Dies konnte ebenfalls am verwendeten Zellsystem nach Zugabe von PMA festgestellt werden. Der durch PMA erzeugte Anstieg der APPs α -Sekretion betrug das Siebenfache der basalen Sekretion (Abbildung 46).

Die Behandlung der Zellen mit PMA führte allerdings zu einer Inhibierung der PACAP27-induzierten APPs α -Sekretion um 33 % (Abbildung 46, Tabelle 12).

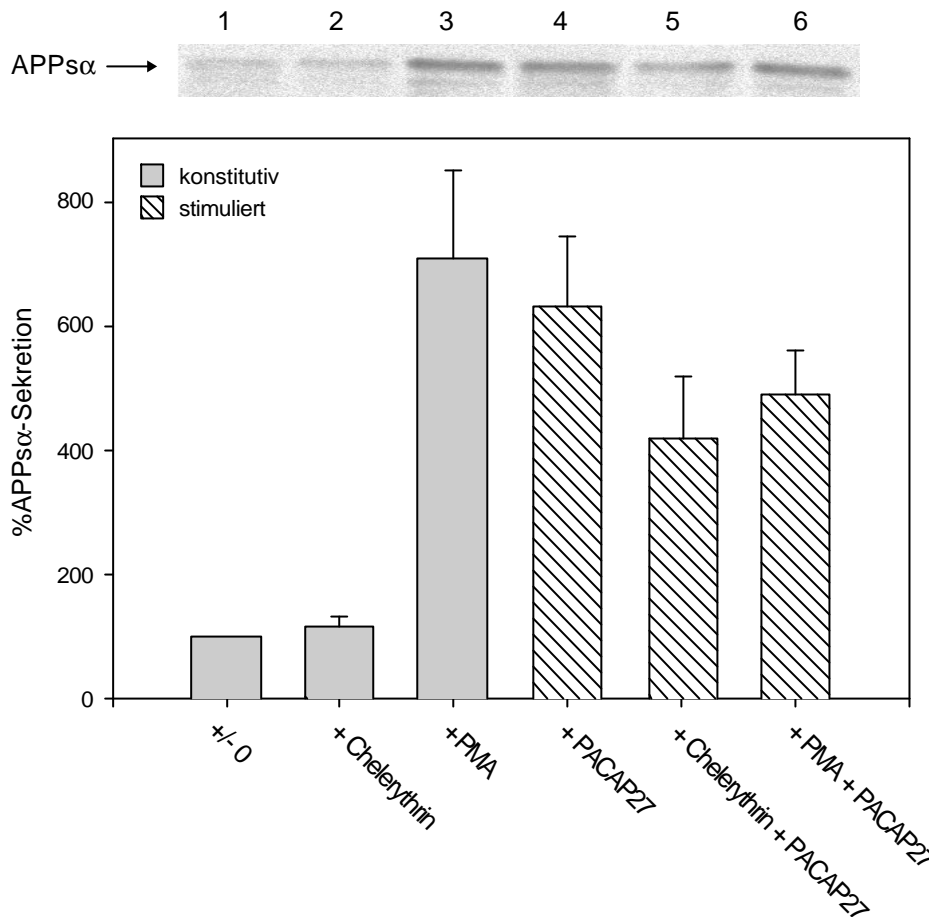


Abbildung 46: Einfluß von PKC-Inhibitoren und –Aktivatoren auf die von PACAP27 induzierte Stimulation der APPs α -Sekretion.

Die Zellen für die Inhibitorversuche wurden 30 min mit dem Inhibitor vorinkubiert. Die Endkonzentration betrug für den PACAP27-Liganden 300 nM, für den Inhibitor Chelerythrin 5 μ M und für den Aktivator PMA 10 μ M. Über dem Balkendiagramm (Doppelbestimmung, zwei unabhängige Experimente) ist ein typisches Westernblotsignal (7,5%iges Polyacrylamidgel) abgebildet (1: basales APPs α , 2: 5 μ M Chelerythrin, 3: 10 μ M PMA, 4: 300 nM PACAP27, 5: 300 nM PACAP27 und 5 μ M Chelerythrin, 6: 300 nM PACAP27 und 10 μ M PMA).

3.10.3.3. Der Mitogen Aktivierte Protein Kinase-Weg

Der MAPK-Weg ist ein weiterer für den PAC1-Rezeptor beschriebener Signaltransduktionsweg [54]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des MAPK-Inhibitors U0126 auf die APPs α -Sekretion untersucht. U0126 inhibiert selektiv die MAP-Kinasen MEK-1 und MEK-2, indem es die Substrate (ATP und das Kinasesystem ERK) für diese Kinasen blockiert (vgl. Abbildung 49) [55]. Eine weitergehende Phosphorylierung von Effektorsystemen wird somit unterbunden.

Die *HEKPACAPRRho*-Zellen wurden mit dem MAPK-Inhibitor U0126 inkubiert. Der basale APPs α -Wert verringerte sich unter Einwirkung des MAPK-Inhibitors um 21 %. Der MAPK-Inhibitor U0126 hat demnach einen inhibitorischen Einfluß auf die basale Sekretion des APPs α (Abbildung 47). Es handelte sich dabei jedoch nicht um einen signifikanten Effekt ($p = 0,21$). Die Behandlung der *HEKPACAPRRho*-Zellen mit dem MAPK-Inhibitor U0126 führte zu einer 52%igen Inhibierung der PACAP27-vermittelten APPs α -Sekretion. Somit ist die durch den PACAP27-Liganden stimulierte APPs α -Sekretion stark MAPK-abhängig.

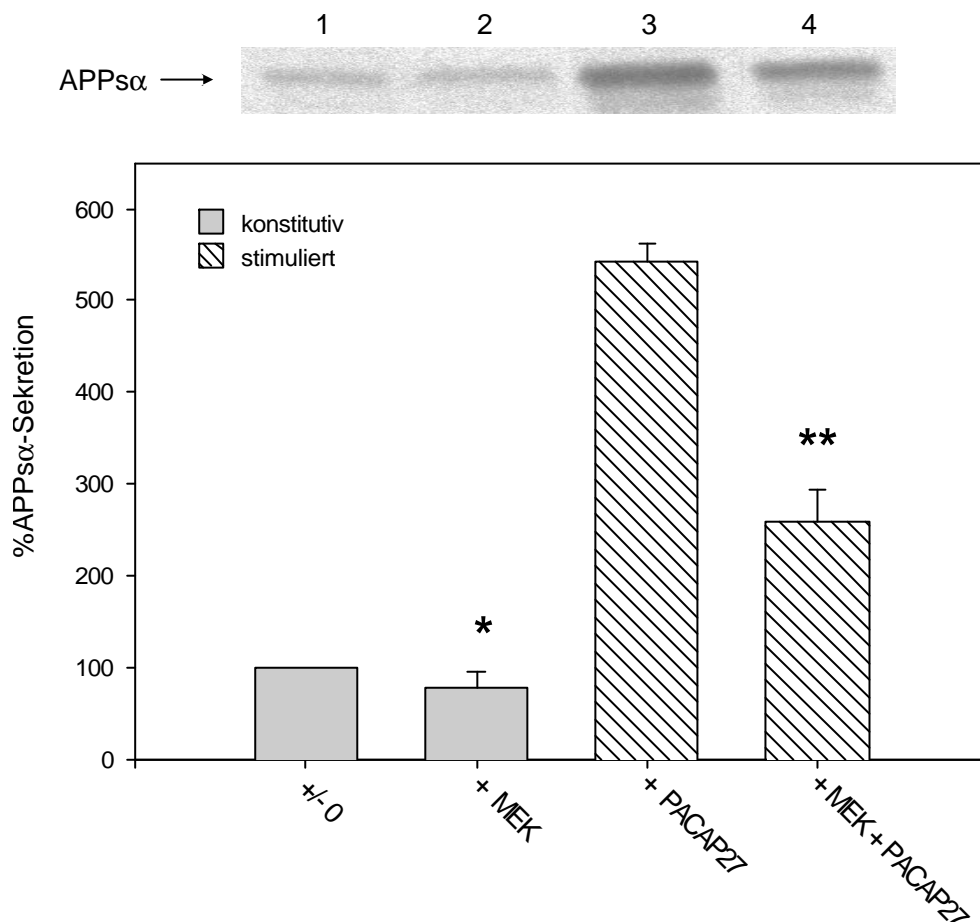


Abbildung 47: Einfluß eines MAPK-Inhibitors auf die von PACAP27 induzierte Stimulation der APPs α -Sekretion.

Die Zellen wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben behandelt und die Überstände nach 4 Stunden gefällt. Die Zellen für die Inhibitorversuche wurden 30 min mit dem Inhibitor vorinkubiert. Die Endkonzentration betrug für den PACAP27-Liganden 300 nM und für den MAPK-Inhibitor U0126 50 μ M. Über dem Balkendiagramm ist ein typisches Westernblotsignal abgebildet (1: basales APPs α , 2: MAPK-Inhibitor U0126, 3: PACAP27-Ligand, 4: PACAP27-Ligand und MAPK-Inhibitor U0126). * $p = 0,21$; ** $p < 0,005$ (Student t-Test, SigmaPlot)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle drei für den PAC1-Rezeptor bekannten Signaltransduktionswege (PKA, PKC, MAPK) eine Rolle bei der durch den PACAP27-Liganden vermittelten Stimulation der APP-Prozessierung spielen. Die folgende Tabelle 12 fasst die Ergebnisse der Versuche zusammen.

Inhibitor/Aktivator	APPs α (%)			
	konstitutiv		PACAP27/PAC1-Rezeptor-stimuliert	
		Anteil der Inhibierung		Anteil der Inhibierung
-	100%	-	100%	-
+PKA-Inhibitor (H89)	89% \pm 16%	-	57% \pm 13%	43% \pm 13%
+PKA-Aktivator (dbcAMP)	100% \pm 13%	-	107% \pm 18%	-
+ PKC-Inhibitor (Chelerythrin)	113% \pm 11%	-	66% \pm 16%	34% \pm 16%
+ PKC-Aktivator (PMA)	710% \pm 20%	-	77% \pm 12%	33% \pm 12%
+MAPK-Inhibitor (U0126)	79% \pm 19%	21% \pm 19%	48% \pm 7%	52% \pm 7%

Tabelle 12: Die Beeinflussung des jeweiligen Signaltransduktionsweges auf die APPs α -Sekretion nach Stimulation der HEKPACAPRRho-Zellen mit dem PACAP27-Liganden

3.10.3.4. Genomische Effekte

Die Inhibierung der Proteinbiosynthese sollte zeigen, ob die mit dem PACAP27-Liganden beobachteten Effekte auf die APPs α -Sekretion genomischer Natur waren. Für diesen Zweck wurden die HEKPACAPRRho-Zellen mit Cycloheximid behandelt. Cycloheximid ist ein Inhibitor der Proteinbiosynthese auf der Ebene der RNA-Translation an zytosolischen Ribosomen [56]. Die Proteinsynthese der Organellen inhibiert es dagegen nicht.

Cycloheximid allein wirkt inhibitorisch auf die konstitutive APPs α -Sekretion. Die Menge des APPs α im Medium der mit Cycloheximid behandelten Zellen war um 30 % gegenüber dem APPs α -Basalwert verringert (Abbildung 48, Tabelle 13). Cycloheximid besaß also einen Einfluss auf die konstitutive APPs α -Sekretion. Der durch PACAP27 beobachtete Anstieg der APPs α -Sekretion wurde in Anwesenheit von Cycloheximid um 60 % reduziert (Abbildung 48, Tabelle 13).

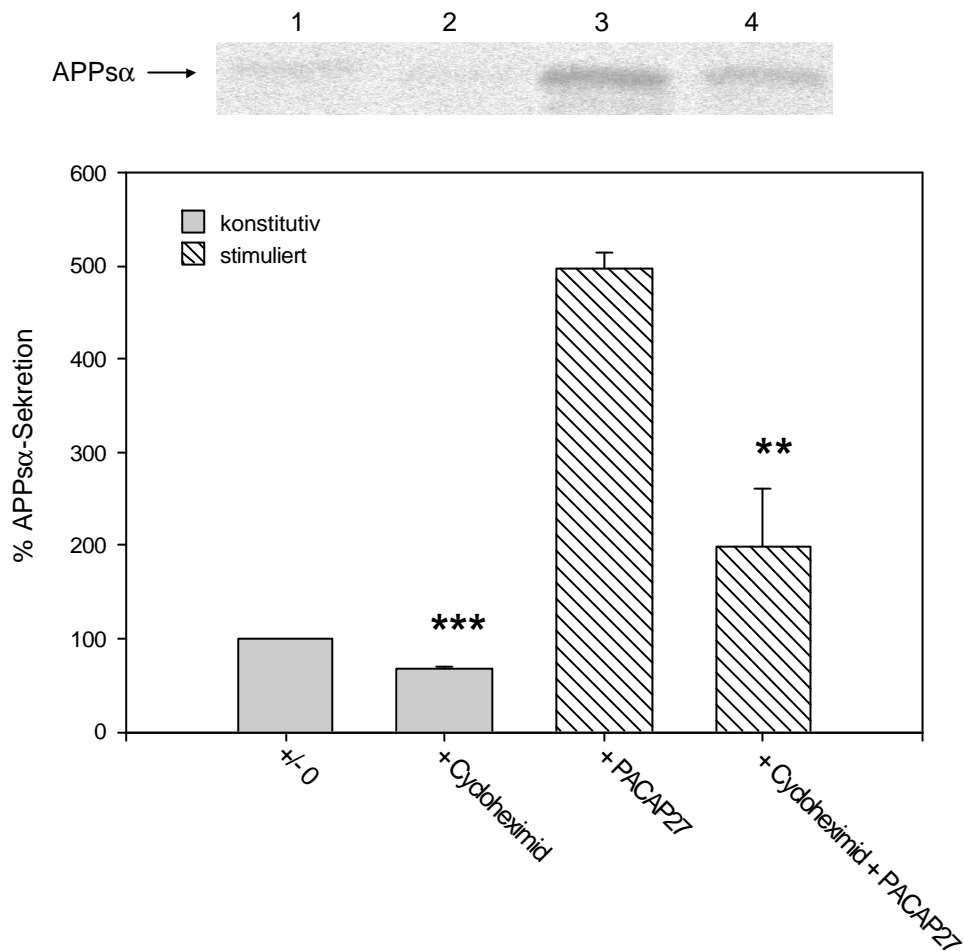


Abbildung 48: Einfluß von Cycloheximid auf die von PACAP27 induzierte Stimulation der APPs α -Sekretion.

Die Zellen für die Inhibitorversuche wurden 30 min mit dem Inhibitor vorinkubiert. Die Endkonzentration betrug für den PACAP27-Liganden 300 nM und für den Inhibitor Cycloheximid 1 μ M. Über dem Balkendiagramm ist ein typisches Westernblotsignal dargestellt (1: basales APPs α , 2: 1 μ M Cycloheximid, 3: 300 nM PACAP27, 4: 300 nM PACAP27 und 1 μ M Cycloheximid). ** $p < 0,05$; *** $p < 0,005$ (Student t-Test, SigmaPlot)

Die Ergebnisse des Einflusses von Cycloheximid auf die von PACAP27 induzierte APPs α -Sekretion wurde nochmals in folgender Tabelle 13 zusammengefasst.

Inhibitor	APPs α (%)			
	konstitutiv		PACAP27/PAC1-Rezeptor-stimuliert	
		Anteil der Inhibierung		Anteil der Inhibierung
-	100%	-	100%	-
Cycloheximid	67% \pm 2%	33% \pm 2%	40% \pm 12%	60% \pm 12%

Tabelle 13: Zusammenfassung der durch Cycloheximid detektierten Effekte auf die durch PACAP27-vermittelte APPs α -Sekretion.

Ob die durch Cycloheximid beobachtete starke Inhibierung der durch PACAP27 vermittelten APPs α -Sekretion wirklich genomisch bedingt oder auf die durch Cycloheximid verursachte verminderte Bereitstellung von Enzymen oder Proteinen zurückzuführen ist, konnte anhand des durchgeführten Experimentes nicht sicher beantwortet werden. Hierfür wären Untersuchungen nötig, die die Expression der α -Sekretasen und des APP-Holoproteins über den gesamten Versuchszeitraum von vier Stunden verfolgen.

4. DISSKUSION

4.1. Die Expression des PAC1-Rezeptors

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Ratten-PAC1-Rezeptor in drei eukaryontische Expressionssysteme transformiert; in das Drosophila-Expressionssystem, in suspensionsadaptierte *HEK*-Zellen und in das Baculovirus-Expressionssystem. In allen drei Systemen konnte bindungsfähiger Rezeptor nachgewiesen werden.

Der PAC1-Rezeptor konnte mit dem Drosophila-Expressionssystem nicht überexprimiert werden (ähnliche Rezeptordichte wie in der Schweinegehirnmembran, ca. 2 pmol/mg). Im Gegensatz dazu wurde der Glucagon-Rezeptor, der ebenfalls der VIP/Secretin-Familie angehört, in hohem Maße in Drosophila Schneider 2-Zellen (250 pmol/mg) überexprimiert [33].

In suspensionsadaptierten *HEK*-Zellen konnte der PAC1-Rezeptor vierfach überexprimiert werden (8,6 pmol/mg). Für den verwendeten pcDNA3-Vektor liegt die erreichte Rezeptordichte im üblichen Rahmen. Für eine Isolation des Rezeptors wurde diese Rezeptordichte in der *HEK*PACAPRRho-Zellmembran jedoch als zu gering angesehen. Um höhere Expressionsraten zu erreichen, wurde bei Reeves *et al.* mit suspensionsadaptierten *HEK*-Zellen und einem anderen Expressionsvektor (pACH) gearbeitet. Dadurch konnte das Rhodopsin in großen Mengen überexprimiert und aus den Zellmembranen isoliert werden [32].

Die höchste Expression des PAC1-Rezeptors wurde mit dem Baculovirussystem in *Sf21*-Zellen erzielt. Eine detektierte Rezeptordichte von 40 pmol/mg entspricht der zwanzigfachen Rezeptordichte der Schweinegehirnmembran. Die von Ohtaki *et al.* erzielte Expressionsdichte des menschlichen PAC1-Rezeptors in *Sf9*-Zellmembranen von 82,6 pmol/mg konnte nicht erreicht werden. Trotz der Verwendung von *Sf21*-Zellen, für die die Fähigkeit der verstärkten Proteinexpression beschrieben wurde. *Sf9*-Zellen dagegen werden meist nur zur Virusamplifikation eingesetzt. Die Gründe für die relativ geringe Expressionsrate des PAC1-Rezeptors können, wie folgend dargelegt, vielfältig sein.

Die Homologieidentität zwischen dem von Ohtaki verwendeten menschlichem PAC1-Rezeptor und dem der Ratte betragen 94 %, ein Sequenzeinfluß auf die Expressionsausbeute wird dementsprechend ausgeschlossen. Nicht nachvollziehbar war jedoch der von Ohtaki beschriebene Einsatz von nur 0,037 µg Membran pro 100 µl Bindungstestansatz. Aus eigenen Erfahrungen blieb aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des für die Durchführung der Bindungstests eingesetzten iodierten PACAP27-Liganden eine große Menge des Liganden an

den Filtern der Filtrationseinheit haften. Desweiteren war die Verdünnung der Membran so groß, dass einzelne Membranpartikel aus der Suspension zu weiteren fehlerhaften Werten führten. Membranmengen unter 1 µg pro 100 µl Bindungstestansatz lieferten bei hier durchgeführten Versuchen keine sinnvollen Ergebnisse.

Bei eigenen Bindungsstudien mit iodierten Liganden fiel auf, dass es aufgrund der niedrigen Arbeitskonzentration schwer war, die Bedingungen der Cheng-Prussoff-Gleichung zu erfüllen. Dies führte ebenfalls zu unkorrekten Ergebnissen. Deshalb wurde die Synthese eines tritiierten Liganden in Angriff genommen, der in höheren Konzentrationen einsetzbar ist (synthesebedingt) und somit gerade bei Membranen mit stark exprimierten Rezeptorproteinen die erforderlichen Bedingungen erfüllen kann. In der Schweinegehirnmembran konnte mit dem tritiierten Liganden eine PAC1-Rezeptordichte von 2 pmol/mg detektiert werden. Für die Durchführung dieses Sättigungstestes mussten viele Versuche zur Findung des optimalen Bindungspuffers durchgeführt werden. Leider wurde festgestellt, dass diese Bedingungen nicht für die *Sf21*PACAPRRho-Membranen geeignet waren. Es scheint jedoch, dass der in dieser Arbeit synthetisierte Ligand mit dem Einsatz des optimalen Bindungspuffers für die Anwendung in Bindungstestsstudien geeignet wäre.

Für die Durchführung von Bindungsstudien war, wie schon für den tritiierten Liganden erwähnt, die Zusammensetzung des Bindungspuffers von Bedeutung. Die Verwendung von Digitonin im Bindungspuffer führte bei Othaki zur Verdopplung der Rezeptordichte in der *Sf9*-Zellmembran. Er führt dies auf eine Stabilisierung des PAC1-Rezeptors und damit auf einen Aktivitätsgewinn zurück. In dieser Arbeit war Digitonin standardmäßig im Bindungspuffer enthalten, da dieses Detergenz in der Lage ist, GPCR zu stabilisieren [57]. Der Verzicht von Digitonin im Bindungspuffer führte bei Bindungstests mit der *Sf21*PACAPRRho-Membran jedoch nicht zu einer signifikanten Verschlechterung der Rezeptordichte. Ursache dafür kann die stabilisierende Wirkung der noch vorhandenen Zellmembran sein. Am Rezeptorsolubilisat wurden diese Versuche nicht wiederholt.

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Expressionsraten von GPCR in Insektenzellen kann in der Struktur der verwendeten cDNA liegen. Eine Veränderung des DNA-Konstruktes in der Nähe des Initiationscodons oder in der 5'-untranslatierten Region kann zu einer verbesserten Expression führen [28]. In dieser Arbeit wurden jedoch in das Vektorkonstrukt keine Veränderungen in der Promoterregion durchgeführt bzw. kein regulatorisch wirkender untranslatierter Bereich eingeführt.

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass ein gut funktionierendes Expressionssystem nicht von einem Rezeptorprotein auf ein anderes übertragbar sind. Ein optimales Expressionssystem

muß für jeden Rezeptor neu entwickelt und bestmöglich gestaltet werden. Die Voraussetzung für die Detektion hoher Expressionsraten ist ein gut funktionierendes Bindungstestsystem.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der PAC1-Rezeptor in *Sf21*-Zellen nur leicht glykosiliert wurde. Das Molekulargewicht des exprimierten PAC1-Rezeptors aus den *S2*-, *Sf21*-Insektenzellen und den *HEK*-Zellen unterschied sich um 5 kDa. Für die Insektenzellmembranen (*Sf21* und *S2*) konnte ein Molekulargewicht des PAC1-Rezeptors von 55 kDa detektiert werden. Auffällig war jedoch die hohe Heterogenität im *Sf21*-Zellsystem. In der *HEK*-Zellmembran wurde der PAC1-Rezeptor mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse lieferte Ohataki, der in *CHO*-Zellen einen um 4 kDa höher glykosilierten PAC1-Rezeptor als in *Sf9*-Zellen detektierte [44]. Im allgemeinen sind Rezeptoren in Säugerzellsystemen höher glykosiliert als in Insektenzellsystemen.

Für den homogen aus *Sf9*-Zellen gereinigten PAC1-Rezeptor ermittelte Ohtaki nach einem PNGaseF-Verdau eine Molekulargewichtsverschiebung des PAC1-Rezeptors um 5 kDa zu einem Molekulargewicht von 43 kDa. Eine Molekulargewichtsverschiebung um 3 kDa auf 52 kDa wurde für den hier photoreaktiv markierten und deglykosilierten PAC1-Rezeptor nach einem PNGaseF-Verdau gefunden. Der Unterschied der Molekulargewichte von 10 kDa wird auf die Verwendung verschiedener Konstrukte zurückgeführt.

Weiterhin wurde festgestellt, dass der PAC1-Rezeptor in *Sf21*-Zellen nur an einer der drei potentiellen Glykosilierungsstellen im N-Terminus glykosiliert wurde (vgl. folgende Diskussion). Die potentiellen Glykosilierungsstellen in der zweiten und dritten extrazellulären Schleife wurden nicht glykosiliert.

Der von Cao in *COS*-Zellen exprimierte und photoreaktiv markierte PAC1-Rezeptor wies ein Molekulargewicht von 58 kDa auf. Nach der Deglykosilierung verminderte sich das Molekulargewicht auf 54 kDa [36]. Dies stimmt mit dem in dieser Arbeit gefundenem deglykosiliertem Molekulargewicht des PAC1-Rezeptors von 52 kDa (Verwendung gleicher cDNA) gut überein.

Die Glykosilierung als posttranslationale Modifikation kann neben dem effizientem Transport und dem Einbau von Rezeptoren in die Membran auch einen Einfluß auf die Rezeptor-Ligand-Erkennung haben. Für den in *Sf9*-Zellen exprimierten LH-Rezeptor wurde mit dem Verlust von Glykosilierungsstellen auch ein Verlust an Bindungsfähigkeit beobachtet [58]. Der Aktivitätsverlust wurde auf die unvollständige Bildung einer Hormonbindungsdomäne zurückgeführt. Dagegen wurde für den in *COS*-Zellen exprimierten VIP-Rezeptor beschrieben, dass fehlende Glykosilierungsstellen zwar zu einem verringerten Transport an

die Zelloberfläche führten, der aus dem Zytosol solubilisierte Rezeptor jedoch voll bindungsfähig war [59]. Ein Einfluss des Expressionssystems auf die Funktionalität des PAC1-Rezeptors konnte hier gezeigt werden. So war die Expressionsrate des gesamten PAC1-Rezeptorproteins in *Sf21*-Zellen viel höher als in den *HEKPACAPRRho*-Zellen, in der Membran der *Sf21PACAPRRho*-Zellen wurde aber nur eine fünffach höhere Expressionsrate des bindungsfähigen Rezeptors detektiert. Demnach wurde in den *Sf21*-Zellen ein Großteil des Rezeptors nicht von seinem Liganden erkannt. Ob dafür die diskutierte geringe Glykosylierung des Rezeptors oder andere Gründe in Frage kommen, muss noch geklärt werden.

Wichtig für den Transport von Rezeptoren an die Zelloberfläche ist die Signalsequenz. Für den PAC1-Rezeptor umfasst sie die ersten zwanzig Aminosäuren des N-Terminus. Das Fehlen der Signalsequenz im reifen PAC1-Rezeptor wurde in *Sf9*-Zellen und in *COS*-Zellen beobachtet [44],[60]. Auch für weitere Rezeptoren der VIP/Glucagon/Secretin-Familie wurde diese Abspaltung beschrieben [61]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Abspaltung der Signalsequenz in *Sf21*-Zellen nicht bestätigt werden, da das PAC1-Rezeptorprotein über das dem Signalpeptid vorgelagerte *myc*-Epitop mittels Westernblotanalytik nachweisbar war.

Ein generelles Fehlen der Signalsequenz für den PAC1-Rezeptor wurde mit fehlenden Glykosylierungsmustern und einer verminderten Transportrate des PAC1-Rezeptors an die Zelloberfläche von *COS7*-Zellen beschrieben [62]. Ferner wurde für den in *Sf9*-Zellen exprimierten PAC1-Rezeptor ein niedrigerer affiner Zustand sowie der Verlust der Kopplung an G-Proteine im Gegensatz zu in *CHO*-Zellen exprimierten PAC1-Rezeptor beobachtet [44]. Khorana favorisierte deshalb die Expression von Rezeptoren zum Zweck der Funktionalitätsstudien in Säugerzellsystemen (z.B. suspensionsadaptierte *HEK*-Zellen), da nur dort die posttranslationale Prozessierung vollständig abläuft [32].

Neueste Studien weisen darauf hin, dass die Oligomerisierung von GPCR eine weitere Rolle für deren Funktionalität spielen kann [63]. Neben der pharmakologischen Wirkung wurde der Oligomerisierung auch ein Chaperon-ähnlicher Effekt zugesprochen. So kann das Auftreten einer weiteren Proteinbande im Westernblot der *Sf9PACAPRRho*-Zellmembran mit einem Molekulargewicht von ca. 120 kDA auf ein PAC1-Rezeptordimer hinweisen. Neben für die Aktivierung des jeweiligen Rezeptors benötigten Rezeptoroligomeren [64] kann es sich jedoch auch um einen bei der Membranpräparationen entstandenen Artefakt handeln. Jedoch impliziert die in den *Sf21*-Zellen hohe heterogene Expression des PAC1-Rezeptors mit geringem Glykosylierungsgrad eine hohe Hydrophobizität, und somit ist eine artifizielle Dimerbildung wahrscheinlicher.

4.2. Die Reinigung des PAC1-Rezeptors

Für die Anreicherung des PAC1-Rezeptor aus der präparierten *Sf21*PACAPRRho-Membran wurde der Rezeptor zuerst solubilisiert und anschließend einer Antikörperaffinitätschromatographie sowie einer Ligandenaffinitätschromatographie unterzogen.

Für die Solubilisationsausbeute und die Funktionalität des solubilisierten PAC1-Rezeptors spielte das verwendete Detergenz eine tragende Rolle. Obwohl beide verwendeten Detergenzien (Dodecylmaltosid und Digitonin) nicht-ionische Detergenzien und somit ähnliche Eigenschaften (schonende Detergenzien) haben, wurde festgestellt, dass mit Dodecylmaltosid mehr Rezeptorprotein aus der *Sf21*PACAPRRho-Membran solubilisiert werden konnte. So war Dodecylmaltosid als Detergenz in der Lage, das Rezeptorprotein im Solubilisat anzureichern. Trotz der erhöhten Ausbeute an gesamten Rezeptorprotein im Dodecylmaltosid-solubilisat wurde im Digitonin-solubilisat eine höhere Dichte an funktionellem Rezeptor detektiert. Durch Digitonin konnte die Struktur des solubilisierten Rezeptors also nachhaltiger stabilisiert werden als mit Dodecylmaltosid.

Es wurde dennoch ein Verlust der Rezeptordichte im Digitonin-solubilisat (18 pmol/mg) im Vergleich zur *Sf21*PACAPRRho-Membran (40 pmol/mg) beobachtet. Dieser Effekt kann mit einer hohen Rezeptorempfindlichkeit sowie einer geringen Rezeptorstabilität und dem daraus resultierenden Verlust an Ligandenbindung erklärt werden. Ohtaki dagegen konnte durch die Solubilisierung mit Digitonin eine zweifache Anreicherung des funktionellen PAC1-Rezeptors aus den *Sf9*-Insektenzellmembranen erzielen.

Die Stabilität des hier funktionell solubilisierten PAC1-Rezeptors war so gering, dass eine präparative Solubilisierung und die Aufbewahrung des funktionellen Rezeptorsolubisates in seiner funktionellen Form nicht möglich waren.

Die Anreicherung des PAC1-Rezeptors erfolgte über Antikörperaffinitätschromatographie. Darum ist das Verhalten des Epitops (C-terminales Rho-Epitop, entsprach den letzten 15 C-terminalen Aminosäuren des Rhodopsins) gegen seinem Antikörper (monoklonaler 1D4-Antikörper) in dem jeweilig verwendeten Puffersystem von Bedeutung. Es wurde beschrieben, dass die Funktionalität des Rho-Epitops und des 1D4-Antikörpers durch die Wahl des Detergenzes beeinflussbar ist [43]. Nach einem persönlichen Protokoll von Prof. J. Khorana besitzt Dodecylmaltosid einen positiven Einfluß auf die Wechselwirkung zwischen dem Rho-Epitop und dem 1D4-Antikörper. Wie hier gezeigt wurde, verliefen neben der

Antikörperaffinitätschromatographie mit Dodecylmaltosid auch die mit Digitonin quantitativ. Alle Rho-markierten Proteine wurden in beiden Puffersystemen aus dem Solubilisat entfernt. Demnach war für die spezifische Erkennung zwischen dem Rho-Epitop und dem 1D4-Antikörper, auf der die Antikörperaffinitätschromatographie beruht, auch Digitonin als Detergenz geeignet.

Die Antikörperaffinitätschromatographie des PAC1-Rezeptors aus dem Digitoninsolubilisat (18 pmol/mg) ergab mit einer Rezeptordichte von 202 pmol/mg eine 11fache Anreicherung. Unter Berücksichtigung der Rezeptordichte in der *Sf21PACAPRRho*-Membran (40 pmol/mg) ergab sich eine 4fache Konzentrierung. Die geringen Anreicherungsfaktoren wurden auf einen hohen Verlust der Rezeptorfunktionalität während der Solubilisierungsprozedur und die geringe Langzeitstabilität des PAC1-Rezeptors zurückgeführt. Die geringe Langzeitstabilität und Denaturierungserscheinungen wurden auch dafür verantwortlich gemacht, dass nach der Ligandenaffinitätschromatographie kein funktioneller PAC1-Rezeptor detektiert werden konnte. Denkbar wäre noch das Auftreten eines niederaffinen Rezeptors nach diesem Reinigungsschritt, der durch die photoreaktive Markierung nicht nachweisbar war. Diese Befunden unterstreichen wiederum die große Empfindlichkeit des PAC1-Rezeptors.

Neben der Denaturierung wurde auch die Degradation des PAC1-Rezeptors für den geringen Anreicherungsfaktor an funktionellem Protein verantwortlich gemacht. Die PAC1-Rezeptor-Degradation in den *Sf21PACAPRRho*-Membranen wurde mittels Westernblot festgestellt. Obwohl die Lagerung der Membranen bei -80°C in einem Aufbewahrungspuffer mit Proteaseinhibitoren erfolgte. Die bei der Degradation N-terminal verkürzten Rezeptorfragmente können an die Antikörpermatrix binden. Sie zeigen jedoch in Bindungstests und während der photoreaktiven Markierung keine funktionelle Aktivität mehr. Die Degradation von überexprimierten Membranproteinen kann bis zum vollständigen Verlust der Funktionalität führen. Bei Membranen aus natürlichem gewonnenen Material erfolgt dies nicht in diesem Umfang. So ist die Rezeptordichte des PAC1-Rezeptors in der präparierten Schweinegehirnmembran über Jahre relativ konstant.

Wie oben kurz erwähnt wurde, konnte nach der Ligandenaffinitätschromatographie kein funktioneller PAC1-Rezeptor detektiert werden, obwohl ein hochaffiner biotinylierter PACAP-Ligand (3.1.1.) zur Verfügung stand. Mittels Westernblotanalyse konnte jedoch gezeigt werden, dass der PAC1-Rezeptor über den biotinylierten Liganden an die Streptavidinmatrix gebunden wurde. Der geringe Anteil des gebundenen PAC1-Rezeptors sprach für eine niedrige Konzentration an funktionellem PAC1-Rezeptor im Eluat der Antikörperaffinitätschromatographie. Durch die Elution in saurem Milieu wurde die Struktur

des Rezeptorproteins soweit verändert, dass durch Detektionsmethoden mit hochaffinen Liganden kein Nachweis eines funktionellen Rezeptors mehr möglich war. Eine Denaturierung des PAC1-Rezeptors während der Elution ist wahrscheinlich. Anderen Gruppen dagegen gelang die funktionelle Elution des Rezeptors von der Biotinmatrix [35].

Durch den auftretenden Funktionalitätsverlust während der Solubilisierung und die geringe Stabilität des PAC1-Rezeptors erfolgte die Anreicherung des PAC1-Rezeptors nur im analytischen Maßstab. Es musste festgestellt werden, dass sich eine funktionelle Reinigung des PAC1-Rezeptors in größerem Massstab als äußerst problematisch erweist.

Die allgemein auftretenden Schwierigkeiten der Überexpression und funktionellen Reinigung von Rezeptorproteinen aus eukaryontischen Systemen legte die Idee nahe, prokaryontische Systeme wie *E.coli* für die Überexpression von Rezeptoren oder Rezeptorfragmenten zu nutzen ([65],[66]). Der Vorteil dieser Methode beruht auf der relativ schnellen Bereitstellung von sauberem Rezeptormaterial. So konnte der PAC1-Rezeptor in dieser Arbeit aus *Inclusion bodies* solubilisiert und über Nickelchelchromatographie gereinigt werden. Durch fehlende Prozessierungsmechanismen in Bakterien und die folgende denaturierende Reinigungsprozedur lag das Rezeptorprotein in einer unfunktioneller Form vor. Für die Erlangung seiner Funktionalität muss es richtig gefaltet werden. Die Findung der optimalen Rückfaltungsbedingungen ist sehr zeitaufwendig und konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bearbeitet werden. Zur Zeit wird von Dr. H. Kiefer (m-phasys, Tübingen) an den Rückfaltungsbedingungen für den PAC1-Rezeptor gearbeitet.

Allgemein werden verstärkt Anstrengungen unternommen, die GPCR in Bakterien zu exprimieren und unter optimalen Rückfaltungsbedingungen funktionelle Rezeptorproteine zu erhalten ([67],[68]).

4.3. Der Proteolytischer Verdau des PAC1-Rezeptors

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine grobe Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle im PAC1-Rezeptor erstmals durch die Methode der direkten photoreaktiven Markierung und der proteolytischen Fragmentierung des Rezeptors vorgenommen. Es wurde gefunden, dass der N-Terminus und eventuell der erste extrazelluläre Loop des PAC1-Rezeptors an der Ligandenbindung beteiligt sind. Für den zweiten und dritten extrazellulären Loop konnte eine Beteiligung an der Bindung des Liganden ausgeschlossen werden.

Die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen alle bisher in der Literatur beschriebenen Fakten, die durch andere Methoden für die Ligandenbindung des PAC1-Rezeptors gefunden wurde. So wurde aus dem Ligandenbindungsverhalten einer VPAC2/PAC1-Rezeptorchimäre eine alleinige Beteiligung des N-Terminus des PAC1-Rezeptors an der Ligandenerkennung abgeleitet [69]. Die Bedeutung des N-Terminus für die Ligandenbindung wurde durch die Expression eines verkürzten PAC1-Rezeptors in COS-Zellen unterstrichen. Der verkürzte PAC1-Rezeptor bestand aus seinem N-Terminus und der ersten Transmembrandomäne und war in der Lage, den PACAP27-Liganden zu binden [2]. Da der verkürzte PAC1-Rezeptor seinen Liganden nur mit einer 20fach geringeren Affinität binden konnte als der vollständige Rezeptor, kann eine Beteiligung des ersten extrazellulären Loops an der Ligandenerkennung jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ein Vergleich von Bindungsstudien an Rezeptorchimären zeigte weiterhin, dass die erste extrazelluläre Membrandomäne des PAC1-Rezeptors nicht in dem Maße an der Ligandenerkennung beteiligt ist wie bei anderen Rezeptoren der VIP-Secretin-Glucagon-Rezeptorfamilie [70]. So konnte von Grauschopf *et al.* der N-Terminus des PTH-Rezeptors in *E.colis* überexprimiert, aus *Inclusion bodies* gereinigt und funktionell gefaltet werden. Es wurde gezeigt, dass der verkürzte PTH-Rezeptor seinen PTH-Liganden mit einer um den Faktor 1000 schlechteren Affinität gebunden hat. Als Ursache für die schlechtere Affinität wurde hauptsächlich das Fehlen von für die Ligandbindung wichtigen weiteren Rezeptordomänen diskutiert [28]. Diese Ergebnis wird durch vorige Untersuchungen am PTH-Rezeptor unterstützt, wonach der dritte extrazelluläre Loop an der Ligandenbindung beteiligt ist [71]. Für die mit dem PAC1-Rezeptor strukturell stark verwandten VPAC1 und VPAC2-Rezeptoren wurde anhand von chimären Rezeptoren ebenfalls die Einbindung weiterer Rezeptordomänen in die Ligandenbindung gezeigt ([72],[69]). Besonders von Lutz wurde darauf hingewiesen, dass für die VIP-PACAP-Rezeptoren hauptsächlich der N-Terminus und der erste extrazelluläre Loop, für weitere Rezeptoren der Familie komplexere Erkennungsmechanismen nötig sind [73].

Eine weitere Methode bei der Identifikation der Ligandenbindungsstelle stellte das Einführen von Epitopen in konkrete Bereiche des N-Terminus eines Rezeptors dar. Eine eindeutige Zuordnung der radioaktiven Spaltfragmente nach proteolytischem Verdau wäre durch Immunopräzipitationen möglich. So konnte für den Secretinrezeptor durch das Einfügen eines Hämagglutinin-Tags in den N-Terminus, durch photoreaktive Markierung des Rezeptors sowie nachfolgendem proteolytischen Verdau mit anschließender Immunopräzipitation die Ligandenbindungsstelle auf ca. 20 Aminosäuren im N-Terminus eingegrenzt werden [74]. Diese Strategie zur weiteren Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle wäre für den PAC1-

Rezeptor ebenfalls denkbar. So ist für den PAC1-Rezeptor bekannt, dass die Einführung eines Hämagglutinin-Tags in den N-Terminus die Expression des Rezeptors nicht stört [75]. Zwar existieren für den PAC1-Rezeptor Antikörper gegen den N-Terminus, die für eine Immunopräzipitation geeignet wären und das Einfügen von Tags erübrigen würde [30]. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Immunopräzipitation des photoreaktiv markierten Rezeptors mit diesen Antikörpern führte jedoch zu solch schwachen Ausbeuten (Daten nicht gezeigt), dass von einer weiteren Anwendung der Immunopräzipitation abgesehen wurde.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse über die Ligandenbindungsstelle im PAC1-Rezeptor beruhen auf der Verwendung eines radioaktiven Liganden mit der photoreaktiven Gruppe an Position 6. Bei der Durchführung der photoreaktiven Markierung wäre es aber denkbar, dass die Markierung eines Rezeptors mit Liganden, deren photoreaktive Gruppen an verschiedenen Positionen sitzen, nach der Proteolyse verschiedene radioaktive Spaltfragmente ergibt. Für die Ligandenbindung existiert die Vorstellung, dass sich der Ligand der Länge nach an den N-Terminus und die extrazellulären Rezeptordomänen anschmiegt. Er fügt sich sozusagen in eine Bindungstasche ein [76]. Dabei wechselwirkt der N-terminale Teil des Liganden mit anderen Rezeptorbereichen als der C-terminale Teil. Für die photoreaktiven PACAP27-Liganden wurden unterschiedlich starke Wechselwirkungen einzelner Aminosäurereste mit der Bindungstasche des PAC1-Rezeptors demonstriert [36]. Der $[\text{Phe}^{22}(\text{pBz}_2)]\text{PACAP27}$ -Ligand besitzt eine schlechtere Affinität als der hier verwendete $[\text{Phe}^6(\text{pBz})]\text{PACAP27}$ -Ligand, im scheinbaren Gegensatz dazu aber eine bessere Photoaffinitätsausbeute. Der $[\text{Phe}^{22}(\text{pBz}_2)]\text{PACAP27}$ -Ligand könnte demnach höhere Wechselwirkungen mit den in der Ligandenbindungstasche positionierten Aminosäuren eingehen. Dem Phenylalaninrestes an Position 22 des Liganden kann somit eine höhere Bedeutung bei der Ligandenbindung zugesprochen werden als dem Phenylalaninrest an Position 6. Durch Ligandenbindungsstudien an Rezeptorchimären konnte auch für die Position 16 des PACAP-Liganden eine Interaktion mit dem N-Terminus des PAC1-Rezeptors gezeigt werden [77]. Für die engere Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle im PAC1-Rezeptor wäre es also denkbar, weitere photoreaktive Markierungen des PAC1-Rezeptors mit anderen photoreaktiven Liganden durchzuführen. Eine anschließende proteolytische Spaltung könnte eventuell Aufschluss über die Positionierung des Liganden im N-Terminus des Rezeptors geben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals partiell gereinigter PAC1-Rezeptor photoreaktiv markiert und durch proteinchemische Methoden die Ligandenbindungsstelle eingegrenzt. Die Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle auf den N-Terminus und eventuell auf den ersten

extrazellulären Loop des PAC1-Rezeptors unterstützt den Befund der enormen Wichtigkeit dieser Domänen für die Ligandenerkennung in dieser Rezeptorfamilie.

4.4. Die Ligandenstimulation des PAC1-Rezeptors und die APP α -Sekretion

In dieser Arbeit konnte erstmals ein Einfluss des PAC1-Rezeptors auf die APP-Prozessierung beschrieben werden. Dieser Einfluss wurde durch die Sekretion des APP α in den Zellkulturüberstand von *HEKPACAPRRho*-Zellen verfolgt. Das gut lösliche APP α -Fragment entsteht durch die Einwirkung von α -Sekretasen auf APP. Drei Enzyme gelten im Moment als α -Sekretase-Kandidaten: das TNF- α -Converting-Enzym (TACE oder ADAM17 [74], ADAM9 [78] und ADAM10 ([79],[80]). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass nach Stimulation des PAC1-Rezeptors mit dem PACAP27- sowie dem PACAP38-Liganden die Sekretion des APP α ins Zellkulturmedium von *HEKPACAPRRho*-Zellen zunahm.

Die Aktivierung des PAC1-Rezeptors führt zur Stimulation verschiedenster Signaltransduktionswege. In der Literatur gut beschrieben sind die Aktivierung der Proteinkinase A über die Adenylatzyklase [4], der Proteinkinase C über die Phospholipase C ([4],[81]) und der MAP-Kinasen [54]. Die Stimulation dieser Signaltransduktionswege durch den PAC1-Rezeptor und der daraus resultierende Einfluss auf die APP-Prozessierung wurde untersucht.

Die Proteinkinase A (PKA) wird durch das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert. Das cAMP entsteht durch eine Zyklisierungsreaktion aus ATP, die von der Adenylatzyklase katalysiert wird. Als Proteinkinase A-Stimulator wurde in dieser Arbeit dbcAMP verwendet. Es interagiert wie cAMP mit der Proteinkinase A. Im Gegensatz zu cAMP ist dbcAMP jedoch stabiler gegen den Angriff von Phosphodiesterasen und damit ein längerer Stimulator der Proteinkinase A. Neben einem Proteinkinase A-Aktivator kam auch der Proteinkinase A-Inhibitor H89 zum Einsatz. H89 ist ein potenter und selektiver Inhibitor der Proteinkinase A, indem er das von der Proteinkinase A benötigte ATP kompetitiv verdrängt [53]. Für das *HEKPACAPRRho*-Zellsystem konnte gezeigt werden, dass die Proteinkinase A keinen Einfluss auf die konstitutive Aktivität der α -Sekretasen besass.

Der Einfluss von Proteinkinase A-Stimulatoren auf die konstitutive Aktivität der α -Sekretasen wurde in der Literatur kontrovers diskutiert. So existieren Arbeiten, die ebenfalls wie in der vorliegenden Arbeit nach Stimulation der Proteinkinase A keine Änderung der APP α -

Konzentration im Zellkulturüberstand beobachtet haben [82]. Andere wiederum beschreiben eine Abnahme [83] oder Zunahme [84] der konstitutiven APP α -Produktion nach Stimulation der Proteinkinase A.

Der Proteinkinase A-Aktivator dbcAMP besass keinen Einfluss auf die durch PACAP27-vermittelte APP α -Sekretion. Für den metabotropen Glutamatrezeptor wurde ein gegenteiliger Effekt beobachtet [85]. Wie der PAC1-Rezeptor aktiviert der metabotische Glutamatrezeptor die Proteinkinase A- und Proteinkinase C-Kaskade. Der durch die Ligandenstimulation des metabotropen Glutamatrezeptors beobachtete Anstieg der APP α -Sekretion in Astrozyten wurde in Anwesenheit von dbcAMP oder Forskolin, einem weiteren Proteinkinase A-Aktivator, vollständig unterdrückt. Es können demzufolge für den PAC1-Rezeptor und den metabotropen Glutamatrezeptor verschiedene Regulationmechanismen für die Stimulation der α -Sekretasen, auch in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie, in Betracht kommen.

Anders verhielt es sich mit dem Proteinkinase A-Inhibitor H89. Hier wurde eine 43%ige Inhibierung des stimulatorischen PACAP27-Effektes auf die APP α -Sekretion beobachtet. Es konnte somit eine Beteiligung der Proteinkinase A an der durch den PAC1-Rezeptor vermittelten regulatorischen APP-Prozessierung festgestellt werden.

Die nur teilweise erzielte Inhibierung der α -Sekretaseaktivität durch den PKA-Inhibitor weist auf noch weitere Signaltransduktionswege hin, deren Aktivierung über den PACAP27-Liganden durch den PAC1-Rezeptor zur Steigerung der APP α -Sekretion führen. Der Einfluss der Proteinkinase C auf die APP-Prozessierung wurde als weiterer Signaltransduktionsweg untersucht.

Die Aktivierung der PKC erfolgt über die Stimulation der Phospholipase C. Die Phospholipase C führt zur Spaltung von Phosphatidyl-inosit-4,5-bisphosphat. Als Spaltprodukte entstehen Diacylglycerol und Inositoltrisphosphat. Inositoltrisphosphat induziert den Einstrom von Kalziumionen aus intrazellulären Kalziumspeichern oder dem Extrazellulärraum. Die Kalziumionen und das Diacylglycerol aktivieren die Proteinkinase C. Die Aktivierung der PKC führt nicht zur direkten Phosphorylierung des APP, sondern verändert die Sekretaseaktivitäten und den APP-Transport in der Zelle [86]. Weiterhin wurde eine Translokation der PKC vom Zytosol zur Membran beobachtet [87].

Für den spezifischen PKC-Inhibitor Chelerythrin wurde kein Einfluss auf die konstitutive Aktivität der α -Sekretasen beobachtet. Chelerythrin führte jedoch zu einer 35%igen

Inhibierung der PAC1-vermittelten APPs α -Sekretion ins Medium. Das zeigte, dass die durch den PAC1-Rezeptor ermittelte Stimulation der APPs α -Sekretion auch PKC-abhängig war.

Eine von Kalziumionen und Diacylglycerol unabhängige Stimulation der PKC erfolgt über Phorbolster. Phorbolster stimulieren die PKC durch direkte Interaktion. Der direkte stimulatorische Effekt des Phorbolsters PMA auf die APP-Prozessierung und die damit verbundene erhöhte APPs α -Sekretion wurde in der Literatur für verschiedenste Zellsysteme einheitlich beschrieben [23]. In der vorliegenden Arbeit führte PMA ebenfalls zu einem starken Anstieg der APPs α -Konzentration (siebenfach gegenüber der basalen APPs α -Sekretion) und besass demnach auch im *HEKPACAPRRho*-Zellsystem einen stark aktivierenden Effekt auf die konstitutive Aktivität der α -Sekretasen.

Mit PMA wurde eine Inhibierung des durch PACAP27-induzierten Effektes auf die APPs α -Sekretion um 33 % beobachtet. Weiterhin wurde durch den PACAP27-Liganden auch eine Reduzierung des PMA-Effektes ermittelt. Es scheint somit ein wechselseitiger regulatorischer Zusammenhang zwischen PMA und der PAC1-Rezeptor-Aktivierung in bezug auf die α -Sekretasestimulation zu existieren.

Die hier beobachtete Inhibierung des durch PMA vermittelten stimulatorischen Effektes der α -Sekretaseaktivität wurde auch für den β -adrenergen Rezeptor beschrieben. Sein Einfluss auf die konstitutive APPs α -Sekretion ist bisher noch nicht untersucht worden. Seine Aktivierung führte jedoch über die Stimulation der Adenylatzyklase zur Inhibierung der durch PMA vermittelten Anhebung der APPs α -Sekretion [83]. Gleichzeitig und im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte Transkription der APP-DNA beobachtet [85]. Der Anstieg der APPmRNA und die beobachtete Inhibierung des PMA-Effektes konnten für den β -adrenergen Rezeptor nicht erklärt werden. Da jedoch der Einfluss von cAMP auf die Aktivität der Proteinkinase C beschrieben wurde [88], kann von einem wechselseitigen Mechanismus ausgegangen werden. Auch für den PAC1-Rezeptor kann solch ein wechselseitiger Einfluss in Betracht gezogen werden. Allerdings sollte hier berücksichtigt werden, dass eine Involvement der Proteinkinase A in die durch PACAP27-vermittelte α -Sekretaseaktivierung beobachtet wurde.

Auch die Entschlüsselung des genomischen Einflusses des PAC1-Rezeptors auf die APP-Prozessierung ist erforderlich. In dieser Arbeit konnte zwar eine starke Inhibierung der PACAP27-vermittelten APPs α -Sekretion durch Cycloheximid festgestellt werden (um 60 %). Diese Beobachtung muss jedoch auf der Protein- und der mRNA-Ebene für das Holo-APP und für die α -Sekretasen überprüft werden.

Anhand der beschriebenen Versuche konnte gezeigt werden, dass die PAC1-vermittelte Aktivierung der APPs α -Sekretion in den *HEKPACAPRRho*-Zellen sowohl PKA- als auch PKC-abhängig war. Die durch PMA erfolgte Stimulation der APPs α -Sekretion war teilweise durch die Stimulation des PAC1-Rezeptors inhibierbar. Dieser Effekt beruhte bei anderen Rezeptoren auf der Aktivierung der Adenylatzyklase, für den PAC1-Rezeptor muss der dafür verantwortliche Mechanismus noch weiter untersucht werden.

Über den genauen Wirkmechanismus, der zur Aktivierung der APP-Prozessierung führt, ist noch nichts bekannt. Eine Beteiligung von Proteinkinasen gilt jedoch als sicher, wie auch hier gezeigt werden konnte. Proteinkinasen sind durch die Phosphorylierung von Proteinen an der katabolischen Prozessierung des APP beteiligt. Neben dem Einfluss der PKA und der PKC wurde auch eine Beteiligung der mitogen aktivierten Proteinkinase Kinase (MEK) und der extrazellulär Signal-regulierten Proteinkinase (ERK; auch MAP-Kinasen genannt) auf die APP-Prozessierung beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die durch Phorbol ester stimulierte Aktivierung der APPs α -Sekretion durch die Inhibierung der MAP-Kinasen vollständig unterdrückbar ist [89]. Die MAPK-Signaltransduktionskaskade kann durch den MAPK-Inhibitor U0126 unterbrochen.

Der MAPK-Inhibitor U0126 führte in der vorliegenden Arbeit zur Inhibierung der konstitutiven α -Sekretase-Aktivität um 21 % (nicht signifikant). Mit dem MAPK-Inhibitor U0126 wurde eine Inhibierung der PACAP27-induzierten APPs α -Sekretion um 52 % (signifikanter Wert) beobachtet. Den MAP-Kinasen kann also eine 50%ige Beteiligung am durch PACAP27 beobachteten Effekt zugesprochen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Aktivierung der PKA und der PKC zur Regulation der MAP-Kinasen führt [90]. Demnach muss es aber für den PAC1-Rezeptor noch weitere, von der Stimulation der MAP-Kinasen durch die PKA und PKC unabhängige Stimulationsmechanismen geben. Weitere Experimente müssen zur Klärung dieser Frage durchgeführt werden.

Interessant im Zusammenhang mit den MAP-Kinasen ist die für den PAC1-Rezeptor gezeigte konzentrationsabhängige Aktivierung der MAP-Kinasen in Astrozyten unabhängig von der PKA und der PKC [54]. Dort wurde gezeigt, dass die Aktivierung der MAP-Kinasen durch den PAC1-Rezeptor bei viel geringeren Ligandenkonzentrationen eintrat als die Stimulation der Adenylatzyklase. In bezug auf die α -Sekretaseaktivierung durch den PAC1-Rezeptor wirft das die Frage auf, ob der in Astrozyten beobachtete Effekt auch für das

HEKPACAPRRho-Zellsystem gilt. In diesem Fall könnte der Einfluss der durch den PAC1-Rezeptor stimulierten MAP-Kinase auf die α -Sekretaseaktivierung unabhängig von der PKA und PKC-Aktivierung betrachtet werden. So könnte zum Beispiel die Inkubation der *HEKPACAPRRho*-Zellen gleichzeitig mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrin und dem PKA-Inhibitor H89 die Frage klären, ob die durch PACAP27 gefundene Stimulation der APP-Prozessierung allein von der PKA und der PKC abhängig ist, oder es einen von diesen Kinasen unabhängigen Stimulationsweg der MAP-Kinasen gibt, zum Beispiel durch Tyrosinkinase stimulierbare Ras-Proteine.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der PAC1-Rezeptor über den PKA, den PKC und den MAPK-Weg die APPs α -Sekretion stimuliert. Inwieweit die Aktivierung einer der genannten Kinasen zur Aktivierung den nächsten führt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Neben dem PKA, PKC und MEK/ERK-Kinasesystemen existieren für den PAC1-Rezeptor wahrscheinlich noch weitere Regulationsmechanismen für die α -Sekretaseaktivierung. Einen Hinweis dafür liefern die beobachteten und bekannten halbmaximalen Ligandenkonzentrationen für die Stimulation des jeweiligen Signaltransduktionsweges. Wie hier gezeigt wurde, führt der PACAP38-Ligand bei geringeren Konzentrationen (10 nM) zu einem effizienteren Anstieg der Kalziumionenkonzentration in der Zelle als der PACAP27-Ligand. Damit korrelieren auch die aus der Literatur bekannten Daten für die Inositoltrisphosphatproduktion. Der PACAP38-Ligand ($EC_{50} = 15$ nM) besitzt ein größeres Vermögen der Phospholipase C-Stimulation und damit der Inositoltrisphosphatproduktion als der PACAP27-Ligand ($EC_{50} = 1$ μ M). Die Fähigkeit zur Stimulation der Adenylatzyklase sind für beide PACAP-Liganden ähnlich groß (PACAP38 0,4 nM, PACAP27 0,1 nM). Der Einfluss der PACAP-Liganden auf die APPs α -Sekretion ist, wie gezeigt wurde, unterschiedlich. So wurde für den PACAP27-Liganden das doppelte Stimulationspotential der α -Sekretaseaktivierung gefunden wie für den PACAP38-Liganden (Ligandenkonzentrationen je 300 nM). Aus der Konzentrationsabhängigkeit der APPs α -Sekretion konnte für den PACAP27-Liganden eine halbmaximale Enzymstimulation von 200 nM abgeleitet werden. Eine alleinige Beteiligung der PKA und der PKC an der Aktivierung der α -Sekretasen ist somit nicht wahrscheinlich, da ansonsten eine Korrelation zwischen den EC_{50} -Werten zu erwarten gewesen wäre.

Der PAC1-Rezeptor ist ein weiterer GPCR, für den ein Einfluss auf die α -Sekretaseaktivität gefunden wurde. Für Vasopressin und Bradykinin wurde nach deren Rezeptorstimulation

ebenfalls ein Anstieg der APPs α -Sekretion beobachtet. Für den Bradykinin-Rezeptor wurde ein PKC-abhängiger, für den Vasopressin-Rezeptor ein PKC-unabhängiger Mechanismus der APP-Prozessierung beschrieben. Diskutiert wurde im letzteren Fall ein Phospholipase A₂ oder ein Tyrosin-Kinase abhängiger Mechanismus. Für den Serotoninrezeptor wurde durch Stimulation der Phospholipase A₂ ein Anstieg der APPs α -Konzentration im Medium gemessen, eine Aktivierung der PKC erwies sich als nicht nötig [91]. Zwei unabhängige Stimulationsmechanismen (PKC und MAPK) im Hinblick auf die Aktivierung der APPs α -Sekretion wurden für den muskarinischen Acetylcholinezeptor beschrieben [92].

In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung des Einflusses des PAC1-Rezeptors auf die APPs α -Sekretion die *HEKPACAPRRho*-Zelllinie verwendet. Bei diesem Zellsystem handelt es sich nicht um endogen exprimierten PAC1-Rezeptor. Inwieweit es einen Zusammenhang zwischen der vierfachen Überexpression des PAC1-Rezeptors (8,6 pmol/mg) und dem beobachteten fünffachen Effekt auf die APPs α -Sekretion durch den PACAP27-Liganden gibt, muss weiter untersucht werden. Erste Untersuchungen an Zelllinien (Astrozyten, H4), die den PAC1-Rezeptor endogen exprimieren, zeigten, dass die APPs α -Sekretion nach PAC1-Rezeptor Stimulation viel geringer ausfiel (Experimente nicht gezeigt). Dennoch ist die *HEKPACAPRRho*-Zelllinie ein guter Ansatz, die für den PAC1-Rezeptor in Frage kommenden Wirkmechanismen zu entschlüsseln und zu verstehen.

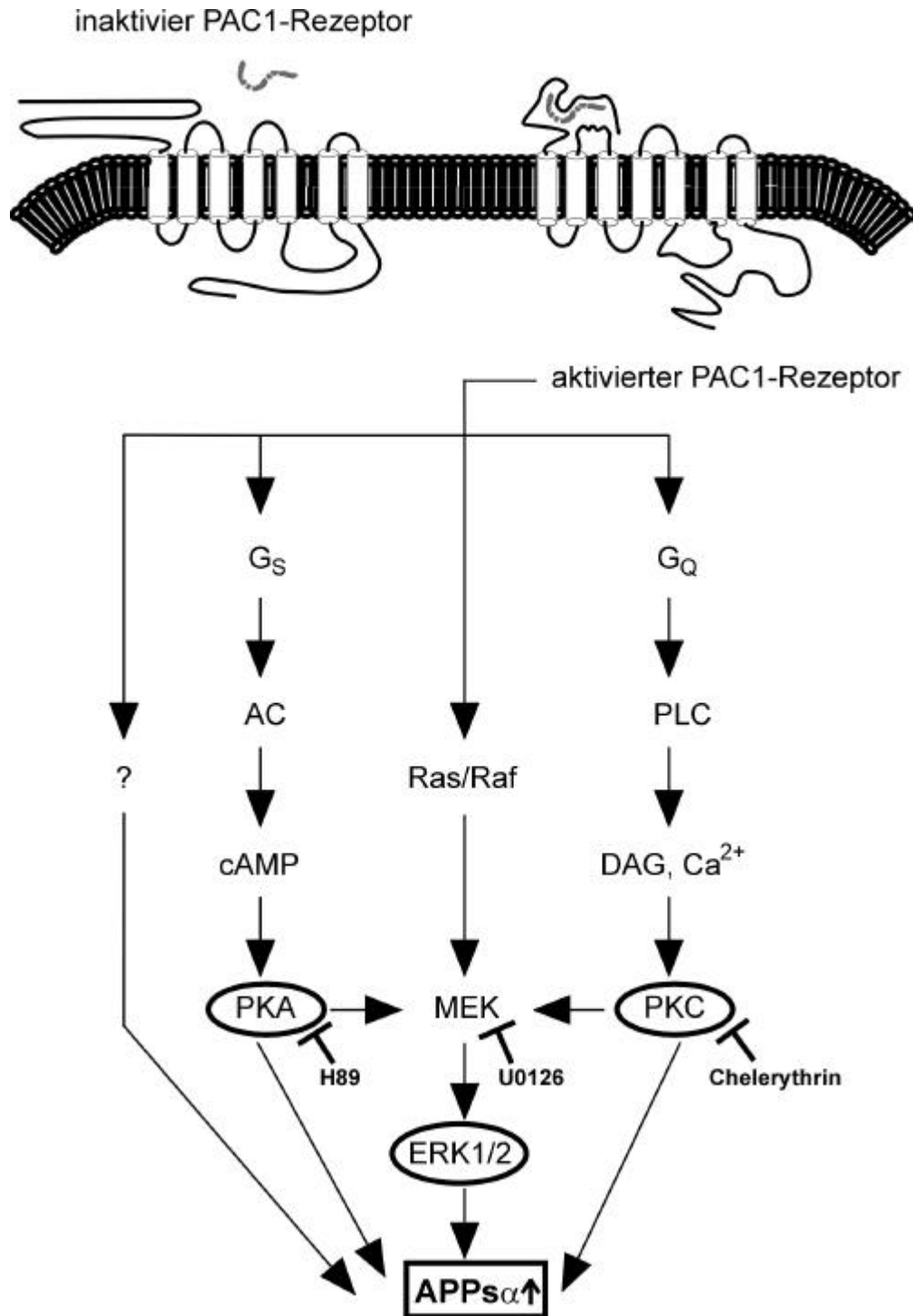


Abbildung 49: Darstellung der Signaltransduktionswege, die durch die PAC1-Rezeptorstimulation auf die APPs α -Sekretion wirken.

Der PAC1-Rezeptor wird durch seine Liganden (PACAP27 oder PACAP38) stimuliert. Wie im ersten Teil der Arbeit festgestellt wurde, sind der N-Terminus und wahrscheinlich der erste extrazelluläre Loop an der Ligandenerkennung beteiligt. Die Bindung der Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch eine Stimulation von G-Proteinen möglich wird. Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, führt die Stimulation des PAC1-Rezeptors mit seinen Liganden zu einer erhöhten APPs α -Sekretion. Eine Inhibierung der Proteinkinase A (durch H89), der Proteinkinase C (durch Chelerythrin) und der MAP-Kinasen (durch U0126) konnte den PACAP27-induzierten Effekt auf die APPs α -Sekretion bis zu einem gewissen Prozentsatz unterdrücken. In weiterführenden Experimenten muss geklärt werden, ob die PKA und die PKC über die MAP-Kinasen auf die APPs α -Sekretion wirken oder über diskrete Stimulationsmechanismen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass für den PAC1-Rezeptor weitere Signaltransduktionswege existieren, die auf die APPs α -Sekretion wirken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren alle auf der Stimulation der „normalen“ Spleißvariante des PAC1-Rezeptors. Diese Spleißvariante stimuliert die Adenylatzyklase stärker als die Phospholipase C. Dies ist jedoch nicht bei allen Spleißvarianten des PAC1-Rezeptors der Fall. Ein Einfluss der anderen Spleißvarianten des PAC1-Rezeptors auf die APP-Prozessierung könnte ebenfalls Aufschluss über den Aktivierungsmechanismus geben. So ist aus der Literatur bekannt, dass die Anhebung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration zur Erhöhung der APPs α -Sekretion führt. Dies geschieht über einen Tyrosinkinase-abhängigen Mechanismus [93]. Der Kalziumeinfluss wurde bei Petryniak durch die Stimulation des muskarinischen Acetylcholinrezeptors erreicht. Für den PAC1-Rezeptor ist eine Spleißvariante bekannt, die nur zur Öffnung von Kalziumkanälen führt. Mit dieser Spleißvariante des PAC1-Rezeptors wären also die Kalzium-abhängigen Mechanismen der APP-Prozessierung analysierbar. Weiterhin wurde für den PAC1-Rezeptor eine konstitutiv aktive Mutante gefunden [94]. Auch deren Einfluss auf die kontinuierliche Stimulation der APP-Prozessierung könnte untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen der Stimulation des PAC1-Rezeptors und dem Anstieg der APPs α -Produktion gezeigt. Die PKA, die PKC und die MAP-Kinasen sind in diesen stimulatorischen Effekt involviert. Trotz der noch nicht geklärten Stimulationsmechanismen wurde damit die neurotrophische Wirkungsweise des PAC1-Rezeptors unterstrichen. Die verstärkte Expression des PAC1-Rezeptors im Hippocampus, die durch den PAC1-Rezeptor beobachtete Inhibierung der proapoptischen Caspase-3 und die hier gefundene, durch den PAC1-Rezeptor vermittelte Stimulation der APPs α -Sekretion erlauben es, den PAC1-Rezeptor nun auch in Zusammenhang mit der neurodegenerativen Erkrankungen Alzheimer zu diskutieren.

5. Zusammenfassung

Die Anreicherung von Rezeptoren für funktionelle Studien setzt Ausgangsmaterial mit einem hohen Anteil an dem zu reinigenden Rezeptor voraus. In natürlichem Gewebe ist dies meist nicht gegeben. Die Überexpression in Zellsystemen ist daher das Mittel der Wahl. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der PAC1-Rezeptor in *Sf21*-Zellen überexprimiert und in seiner funktionellen Form angereichert. Es schlossen sich die photoreaktive Markierung und ein proteolytischer Verdau des PAC1-Rezeptors an. Die Zuordnung der radioaktiven Banden führte zu einer groben Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle im PAC1-Rezeptor. Eine Zusammenfassung der Strategie dieser Arbeit bietet die Abbildung 50.

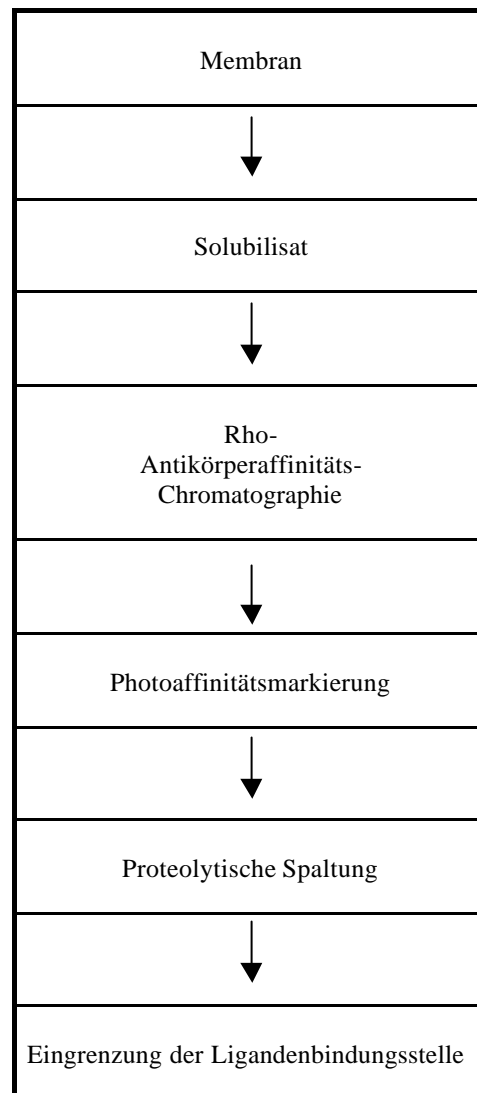


Abbildung 50: Strategie zur Eingrenzung der Ligandenbindungsstelle im PAC1-Rezeptor.

Funktionell wurde der PAC1-Rezeptor aus *Sf21*-Insektenzellen angereichert. Zur Überexpression wurde das Baculovirussystem genutzt. Die Expression konnte um das

20fache gegenüber natürlichem Gewebe gesteigert werden (40 pmol/mg). Das Drosophila-Expressionssystem und die Expression in suspensionsadaptierten *HEK*-Zellen erwiesen sich als weniger effizient für die Überexpression des PAC1-Rezeptors.

Der PAC1-Rezeptor wurde mit Digitonin aus den *Sf21*-Zellmembranen solubilisiert und mittels eines Rhodopsin-Epitops über Antikörperaffinitätschromatographie funktionell angereichert. Die hohe Empfindlichkeit und Instabilität des PAC1-Rezeptorproteins im Solubilisat und der damit einhergehende Funktionalitätsverlust wurden als der Hauptgrund für die geringen Anreicherungsausbeuten angesehen.

Der funktionell angereicherte Rezeptor wurde photoreaktiv markiert. Der dafür verwendete iodidierte Ligand ^{125}I -[Phe⁶(pBz)]PACAP27 besaß an Position 6 eine photoreaktive Gruppe. Anschließend an die photoreaktive Markierung erfolgte der proteolytische Verdau mit Kallikrein. Die detektierten, radioaktiven Banden wurden Rezeptorfragmenten zugeordnet. Aufgrund der Zuordnung konnte die Ligandenbindungsstelle im PAC1-Rezeptor auf den N-Terminus und den ersten extrazellulären Loop beschränkt werden. Dieses Ergebnis bestätigt Resultate, die für andere Mitglieder dieser Rezeptorfamilie vorliegen [95]. Außerdem wurde für den in *Sf21*-Zellen exprimierten PAC1-Rezeptor eine Glykosylierung im zweiten und dritten extrazellulärem Loop sowie eine Beteiligung dieser Loops an der Ligandenerkennung ausgeschlossen.

Alternativ wurde der PAC1-Rezeptor unfunktionell in *E.colis* überexprimiert und in hohem Maße über ein C-terminales His₆-Tag aus *Inclusion bodies* angereichert. Sollten die Bedingungen für eine funktionelle Rückfaltung des Rezeptors gefunden werden (Bearbeitung außerhalb des Instituts), wäre die Expression in *E.colis* eine schnelle, elegante und kostengünstige Methode zur Bereitstellung größerer Mengen an Rezeptorprotein, die für funktionelle und strukturelle Untersuchungen eingesetzt werden könnten.

Zudem wurde in dieser Arbeit erstmals ein Einfluss des PAC1-Rezeptors auf die APP-Prozessierung festgestellt. Anhand einer generierten *HEK*PACAPRRho-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des PAC1-Rezeptors durch seine Liganden (PACAP27 und PACAP38) zu einem signifikanten Anstieg der APPs α -Sekretion führte. Eine 300 nM Konzentration des PACAP27-Liganden führte innerhalb von vier Stunden zu einem fünffachen Anstieg der APPs α -Menge im Zellkulturüberstand. Ferner wurde für die Stimulation der APPs α -Sekretion durch den PACAP27-Liganden eine Konzentrationsabhängigkeit aufgezeigt.

Weiterhin wurden Signaltransduktionswege ermittelt, die durch die Stimulation des PAC1-Rezeptors an der erhöhten Sekretion des APPs α beteiligt sind. So wurde festgestellt, dass der

Proteinkinase A-Inhibitor Chelerythrin und der Proteinkinase C-Inhibitor H89 keinen Einfluss, der MAPK-Inhibitor U0126 keinen signifikanten Einfluss auf die konstitutive APPs α -Sekretion besaßen. Der PACAP27-vermittelte Anstieg der APPs α -Sekretion wurde jedoch durch alle drei verwendeten Inhibitoren unterdrückt. So führte Chelerythrin zu einer 43%igen, H89 zu einer 34%igen und U0126 zu einer 52%igen Reduktion der durch den PACAP27-Liganden vermittelten APPs α -Sekretion. Damit sind die Proteinkinase A, die Proteinkinase C und die MAP-Kinasen an der durch PACAP27-vermittelten Stimulation der APPs α -Sekretion beteiligt. Obwohl weitere Untersuchungen über genauere Mechanismen und Wechselwirkungen noch ausstehen, konnte hier gezeigt werden, dass der PAC1-Rezeptor einen positiv regulatorischen Einfluss auf die APPs α -Sekretion besaß. Der PAC1-Rezeptor ist wahrscheinlich aufgrund der festgestellten erhöhten APPs α -Sekretion ein Stimulator der α -Sekretasen und erstmals in direkten Zusammenhang mit der Alzheimerschen Erkrankung diskutierbar.

Literaturverzeichnis

- 1 Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., and Black, R. A. (1998): An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**, 1281-1284.
- 2 Cao, Y. J., Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (1995): The amino-terminal fragment of the adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptor functions as a high affinity PACAP binding domain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **212**, 673-680.
- 3 Pantaloni, C., Brabet, P., Bilanges, B., Dumuis, A., Houssami, S., Spengler, D., Bockaert, J., and Journot, L. (1996): Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J.Biol.Chem.* **271**, 22146-22151.
- 4 Rawlings, S. R. (1994): PACAP, PACAP receptors, and intracellular signalling. *Mol.Cell Endocrinol.* **101**, C5-C9.
- 5 Braas, K. M., Brandenburg, C. A., and May, V. (1994): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulation of AtT- 20/D16v corticotrope cell proopiomelanocortin expression and secretion. *Endocrinology* **134**, 186-195.
- 6 Van Rampelbergh, J., Poloczek, P., Francoys, I., Delporte, C., Winand, J., Robberecht, P., and Waelbroeck, M. (1997): The pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP I) and VIP (PACAP II VIP1) receptors stimulate inositol phosphate synthesis in transfected CHO cells through interaction with different G proteins. *Biochim.Biophys.Acta* **1357**, 249-255.
- 7 Dautzenberg, F. M., Mevenkamp, G., Wille, S., and Hauger, R. L. (1999): N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. *J.Neuroendocrinol.* **11**, 941-949.
- 8 Chatterjee, T. K., Sharma, R. V., and Fisher, R. A. (1996): Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase- activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. *J.Biol.Chem.* **271**, 32226-32232.
- 9 Takei, N., Torres, E., Yuhara, A., Jongasma, H., Otto, C., Korhonen, L., Abiru, Y., Skoglosa, Y., Schutz, G., Hatanaka, H., Sofroniew, M. V., and Lindholm, D. (2000): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes the survival of basal forebrain cholinergic neurons in vitro and in vivo: comparison with effects of nerve growth factor. *Eur.J.Neurosci.* **12**, 2273-2280.
- 10 Vaudry, D., Gonzalez, B. J., Basille, M., Fournier, A., and Vaudry, H. (1999): Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 9415-9420.
- 11 Vertongen, P., Ciccarelli, E., Woussen-Colle, M. C., De Neef, P., Robberecht, P., and Cauvin, A. (1994): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors of types I and II and glucagon-like peptide-I receptors are expressed in the rat medullary carcinoma of the thyroid cell line 6/23. *Endocrinology* **135**, 1537-1542.
- 12 Olianias, M. C., Ennas, M. G., Lampis, G., and Onali, P. (1996): Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in Y-79 human retinoblastoma cells.

- J.Neurochem.* **67** , 1293-1300.
- 13 Schafer, H., Trauzold, A., Siegel, E. G., Folsch, U. R., and Schmidt, W. E. (1996): PRG1: a novel early-response gene transcriptionally induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a pancreatic carcinoma cell line.
Cancer Res. **56** , 2641-2648.
 - 14 Robberecht, P., Woussen-Colle, M. C., De Neef, P., Gourlet, P., Buscail, L., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., and Christophe, J. (1991): The two forms of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP (1-27) and PACAP (1-38)) interact with distinct receptors on rat pancreatic AR 4-2J cell membranes.
FEBS Lett. **286** , 133-136.
 - 15 Robberecht, P., Woussen-Colle, M. C., Vertongen, P., De Neef, P., Hou, X., Salmon, I., and Brotchi, J. (1994): Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptors in human glial cell tumors.
Peptides **15** , 661-665.
 - 16 Feany, M. B. and Quinn, W. G. (1995): A neuropeptide gene defined by the Drosophila memory mutant amnesiac.
Science **268** , 869-873.
 - 17 Kandel, E. and Abel, T. (1995): Neuropeptides, adenylyl cyclase, and memory storage.
Science **268** , 825-826.
 - 18 Sacchetti, B., Lorenzini, C. A., Baldi, E., Bucherelli, C., Roberto, M., Tassoni, G., and Brunelli, M. (2001): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide hormone (PACAP) at very low dosages improves memory in the rat.
Neurobiol.Learn.Mem. **76** , 1-6.
 - 19 Sauvage, M., Brabet, P., Holsboer, F., Bockaert, J., and Steckler, T. (2000): Mild deficits in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor type 1 (PAC1) performing on memory tasks.
Brain Res.Mol.Brain Res. **84** , 79-89.
 - 20 Nitsch, R. M., Slack, B. E., Wurtman, R. J., and Growdon, J. H. (1992): Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors.
Science **258** , 304-307.
 - 21 Nitsch, R. M., Wurtman, R. J., and Growdon, J. H. (1996): Regulation of APP processing. Potential for the therapeutical reduction of brain amyloid burden.
Ann.N.Y.Acad.Sci. **777** , 175-182.
 - 22 Nitsch, R. M., Wurtman, R. J., and Growdon, J. H. (1995): Regulation of proteolytic processing of the amyloid beta-protein precursor by first messengers. A novel potential approach for the treatment of Alzheimer's disease.
Arzneimittelforschung. **45** , 435-438.
 - 23 Mills, J. and Reiner, P. B. (1999): Regulation of amyloid precursor protein cleavage.
J.Neurochem. **72** , 443-460.
 - 24 Jolly-Tornetta, C., Gao, Z. Y., Lee, V. M., and Wolf, B. A. (1998): Regulation of amyloid precursor protein secretion by glutamate receptors in human Ntera 2 neurons.
J.Biol.Chem. **273** , 14015-14021.
 - 25 Lee, R. K., Wurtman, R. J., Cox, A. J., and Nitsch, R. M. (1995): Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **92** , 8083-8087.
 - 26 Shearstone, J. R. and Baneyx, F. (1999): Biochemical characterization of the small heat shock protein IbpB from Escherichia coli.

- J.Biol.Chem.* **274**, 9937-9945.
- 27 Brenneman, D. E. and Gozes, I. (1996): A femtomolar-acting neuroprotective peptide. *J.Clin.Invest* **97**, 2299-2307.
- 28 Butkerait, P., Zheng, Y., Hallak, H., Graham, T. E., Miller, H. A., Burris, K. D., Molinoff, P. B., and Manning, D. R. (1995): Expression of the human 5-hydroxytryptamine1A receptor in Sf9 cells. Reconstitution of a coupled phenotype by co-expression of mammalian G protein subunits. *J.Biol.Chem.* **270**, 18691-18699.
- 29 Kim, W. K., Kan, Y., Ganea, D., Hart, R. P., Gozes, I., and Jonakait, G. M. (2000): Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor-alpha production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *J.Neurosci.* **20**, 3622-3630.
- 30 Zvirbliene, A., Zvirblis, G., Cao, Y. J., and Fahrenholz, F. (1999): Production and characterization of monoclonal antibodies to pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide type I receptor. *Hybridoma* **18**, 335-342.
- 31 MacKenzie, D., Arendt, A., Hargrave, P., McDowell, J. H., and Molday, R. S. (1984): Localization of binding sites for carboxyl terminal specific anti-rhodopsin monoclonal antibodies using synthetic peptides. *Biochemistry* **23**, 6544-6549.
- 32 Reeves, P. J., Thurmond, R. L., and Khorana, H. G. (1996): Structure and function in rhodopsin: high level expression of a synthetic bovine opsin gene and its mutants in stable mammalian cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 11487-11492.
- 33 Tota, M. R., Xu, L., Sirotina, A., Strader, C. D., and Graziano, M. P. (1995): Interaction of [fluorescein-Trp25]glucagon with the human glucagon receptor expressed in Drosophila Schneider 2 cells. *J.Biol.Chem.* **270**, 26466-26472.
- 34 Salacinski, P. R., McLean, C., Sykes, J. E., Clement-Jones, V. V., and Lowry, P. J. (1981): Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha,6 alpha-diphenyl glycoluril (Iodogen). *Anal.Biochem.* **117**, 136-146.
- 35 Schafer, H. and Schmidt, W. E. (1993): Characterization and purification of the solubilized pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide-1 receptor from porcine brain using a biotinylated ligand. *Eur.J.Biochem.* **217**, 823-830.
- 36 Cao, Y. J., Kojro, E., Gimpl, G., Jasionowski, M., Kasprzykowski, F., Lankiewicz, L., and Fahrenholz, F. (1997): Photoaffinity labeling analysis of the interaction of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) with the PACAP type I receptor. *Eur.J.Biochem.* **244**, 400-406.
- 37 Gaudriault, G. and Vincent, J. P. (1992): Selective labeling of alpha- or epsilon-amino groups in peptides by the Bolton-Hunter reagent. *Peptides* **13**, 1187-1192.
- 38 Tang, Y. S., Davis, A. M., and Kitcher, P. (1982): N-succinimidyl propionate: Charakterisation and Optimum Conditions for use as a Tritium Labelling for Proteins. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **10**, 277-284.
- 39 Robberecht, P., Gourlet, P., De Neef, P., Woussen-Colle, M. C., Vandermeers-Piret, M. C., Vandermeers, A., and Christophe, J. (1992): Receptor occupancy and adenylyl cyclase activation in AR 4-2J rat pancreatic acinar cell membranes by analogs of pituitary adenylyl cyclase-activating peptides amino-terminally shortened or modified at position 1, 2, 3, 20, or 21. *Mol.Pharmacol.* **42**, 347-355.

- 40 Bitar, K. G., Somogyvari-Vigh, A., and Coy, D. H. (1994): Cyclic lactam analogues of ovine pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): discovery of potent type II receptor antagonists.
Peptides **15** , 461-466.
- 41 Cao, Y. J., Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (1994): Molecular structure analysis of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor from pig brain.
Biochim.Biophys.Acta **1222** , 432-440.
- 42 Mollaaghababa, R., Davidson, F. F., Kaiser, C., and Khorana, H. G. (1996): Structure and function in rhodopsin: expression of functional mammalian opsin in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **93** , 11482-11486.
- 43 Molday, R. S. and MacKenzie, D. (1983): Monoclonal antibodies to rhodopsin: characterization, cross-reactivity, and application as structural probes.
Biochemistry **22** , 653-660.
- 44 Ohtaki, T., Ogi, K., Masuda, Y., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Kitada, C., Sawada, H., Onda, H., and Fujino, M. (1998): Expression, purification, and reconstitution of receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. large-scale purification of a functionally active G protein-coupled receptor produced in Sf9 insect cells.
J.Biol.Chem. **273** , 15464-15473.
- 45 Mashiko, H., Miyamoto, K., and Takahashi, H. (1999): Cleavage of porcine high molecular weight kininogen by the action of porcine pancreatic kallikrein.
Immunopharmacology **45** , 103-105.
- 46 Shimizu, M., Potts, J. T., Jr., and Gardella, T. J. (2000): Minimization of parathyroid hormone. Novel amino-terminal parathyroid hormone fragments with enhanced potency in activating the type-1 parathyroid hormone receptor.
J.Biol.Chem. **275** , 21836-21843.
- 47 Powers, S. P., Fourmy, D., Gaisano, H., and Miller, L. J. (1988): Intrinsic photoaffinity labeling probes for cholecystokinin (CCK)- gastrin family receptors. D-Tyr-Gly-[Nle28,31,pNO2-Phe33]CCK-26-33).
J.Biol.Chem. **263** , 5295-5300.
- 48 Vandermeers, A., Vandenborre, S., Hou, X., De Neef, P., Robberecht, P., Vandermeers-Piret, M. C., and Christophe, J. (1992): Antagonistic properties are shifted back to agonistic properties by further N-terminal shortening of pituitary adenylate-cyclase-activating peptides in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes.
Eur.J.Biochem. **208** , 815-819.
- 49 Cao, Y. J., Kojro, E., Jasionowski, M., Lankiewicz, L., Grzonka, Z., and Fahrenholz, F. (1998): Identification of binding domains of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) for its type I receptor by photoaffinity labeling.
Ann.N.Y.Acad.Sci. **865** , 82-91.
- 50 Lambert, D. T., Stachelek, C., Varga, J. M., and Lerner, A. B. (1982): Iodination of beta-melanotropin. Time course analysis of reaction mixtures by high pressure liquid chromatography and characterization of biologically active mono- and diiodo-beta-melanotropin.
J.Biol.Chem. **257** , 8211-8215.
- 51 Pimenta, D. C., Chao, J., Chao, L., Juliano, M. A., and Juliano, L. (1999): Specificity of human tissue kallikrein towards substrates containing Phe-Phe pair of amino acids.
Biochem.J. **339 (Pt 2)** , 473-479.
- 52 Pimenta, D. C., Juliano, M. A., and Juliano, L. (1997): Hydrolysis of somatostatin by human tissue kallikrein after the amino acid pair phe-Phe.
Biochem.J. **327 (Pt 1)** , 27-30.

- 53 Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T., and Hidaka, H. (1990): Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5- isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells.
J.Biol.Chem. **265** , 5267-5272.
- 54 Moroo, I., Tatsuno, I., Uchida, D., Tanaka, T., Saito, J., Saito, Y., and Hirai, A. (1998): Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cultured rat astrocytes.
Brain Res. **795** , 191-196.
- 55 Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A., and Trzaskos, J. M. (1998): Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase.
J.Biol.Chem. **273** , 18623-18632.
- 56 Obrig, T. G., Culp, W. J., McKeehan, W. L., and Hardesty, B. (1971): The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes.
J.Biol.Chem. **246** , 174-181.
- 57 Hulme, E. C., Birdsall, N. J., and Buckley, N. J. (1990): Muscarinic receptor subtypes.
Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. **30** , 633-673.
- 58 Zhang, Q., Shi, T. J., Ji, R. R., Zhang, Y. Z., Sundler, F., Hannibal, J., Fahrenkrug, J., Hokfelt, T., and Zhang, Y. (1995): Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in dorsal root ganglia following axotomy: time course and coexistence.
Brain Res. **705** , 149-158.
- 59 Couvineau, A., Fabre, C., Gaudin, P., Maoret, J. J., and Laburthe, M. (1996): Mutagenesis of N-glycosylation sites in the human vasoactive intestinal peptide 1 receptor. Evidence that asparagine 58 or 69 is crucial for correct delivery of the receptor to plasma membrane.
Biochemistry **35** , 1745-1752.
- 60 Hashimoto, H., Yamamoto, K., Hagigara, N., Ogawa, N., Nishino, A., Aino, H., Nogi, H., Imanishi, K., Matsuda, T., and Baba, A. (1996): cDNA cloning of a mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor.
Biochim.Biophys.Acta **1281** , 129-133.
- 61 Pisegna, J. R. and Wank, S. A. (1993): Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **90** , 6345-6349.
- 62 Hashimoto, H., Shintani, N., Nishino, A., Okabe, M., Ikawa, M., Matsuyama, S., Itoh, K., Yamamoto, K., Tomimoto, S., Fujita, T., Hagihara, N., Mori, W., Koyama, Y., Matsuda, T., Nagata, S., and Baba, A. (2000): Mice with markedly reduced PACAP (PAC(1)) receptor expression by targeted deletion of the signal peptide.
J.Neurochem. **75** , 1810-1817.
- 63 Milligan, G. (2001): Oligomerisation of G-protein-coupled receptors.
J.Cell Sci. **114** , 1265-1271.
- 64 Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M. (2001): Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells.
Life Sci. **68** , 2243-2250.
- 65 Baneyx, F. (1999): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*.
Curr.Opin.Biotechnol. **10** , 411-421.

- 66 Lillie, H., Schwarz, E., and Rudolph, R. (1998): Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr.Opin.Biotechnol.* **9**, 497-501.
- 67 Kiefer, H., Vogel, R., and Maier, K. (2000): Bacterial expression of G-protein-coupled receptors: prediction of expression levels from sequence. *Receptors.Channels* **7**, 109-119.
- 68 Kiefer, H., Krieger, J., Olszewski, J. D., von Heijne, G., Prestwich, G. D., and Breer, H. (1996): Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli*: purification, reconstitution, and ligand binding. *Biochemistry* **35**, 16077-16084.
- 69 Lutz, E. M., MacKenzie, C. J., Johnson, M., West, K., Morrow, J. A., Harmar, A. J., and Mitchell, R. (1999): Domains determining agonist selectivity in chimaeric VIP2 (VPAC2)/PACAP (PAC1) receptors. *Br.J.Pharmacol.* **128**, 934-940.
- 70 Laburthe, M., Couvineau, A., Gaudin, P., Maoret, J. J., Rouyer-Fessard, C., and Nicole, P. (1996): Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure- function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **805**, 94-109.
- 71 Lee, C., Gardella, T. J., Abou-Samra, A. B., Nussbaum, S. R., Segre, G. V., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M., and Juppner, H. (1994): Role of the extracellular regions of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor in hormone binding. *Endocrinology* **135**, 1488-1495.
- 72 Hashimoto, H., Ogawa, N., Hagihara, N., Yamamoto, K., Imanishi, K., Nogi, H., Nishino, A., Fujita, T., Matsuda, T., Nagata, S., and Baba, A. (1997): Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase- activating polypeptide receptor chimeras reveal domains that determine specificity of vasoactive intestinal polypeptide binding and activation. *Mol.Pharmacol.* **52**, 128-135.
- 73 Lutz, E. M., MacKenzie, C. J., Morrow, J., Mitchell, R., Bennie, J., Carroll, S., Clark, E., and Harmar, A. J. (1996): Chimaeric VIP2/PACAP receptors reveal that agonist pharmacology but not signal transduction is determined by extracellular domain 1. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **805**, 574-578.
- 74 Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., and Cerretti, D. P. (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733.
- 75 Shintani, N., Hashimoto, H., Kunugi, A., Koyama, Y., Yamamoto, K., Tomimoto, S., Mori, W., Matsuda, T., and Baba, A. (2000): Desensitization, surface expression, and glycosylation of a functional, epitope-tagged type I PACAP (PAC(1)) receptor. *Biochim.Biophys.Acta* **1509**, 195-202.
- 76 Lins, L., Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Nicole, P., Maoret, J. J., Benhamed, M., Brasseur, R., Thomas, A., and Laburthe, M. (2001): The human VPAC1 receptor: three-dimensional model and mutagenesis of the N-terminal domain. *J.Biol.Chem.* **276**, 10153-10160.
- 77 Gourlet, P., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., De Neef, P., Waelbroeck, M., and Robberecht, P. (1996): Effect of introduction of an arginine16 in VIP, PACAP and secretin on ligand affinity for the receptors. *Biochim.Biophys.Acta* **1314**, 267-273.

- 78 Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sebara-Fujisawa, A., Ohno, S., and Mekada, E. (1998): A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* **17**, 7260-7272.
- 79 Nunan, J. and Small, D. H. (2000): Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* **483**, 6-10.
- 80 Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999): Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 3922-3927.
- 81 Van Rampelbergh, J., Poloczek, P., Francoys, I., Delporte, C., Winand, J., Robberecht, P., and Waelbroeck, M. (1997): The pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP I) and VIP (PACAP II VIP1) receptors stimulate inositol phosphate synthesis in transfected CHO cells through interaction with different G proteins. *Biochim.Biophys.Acta* **1357**, 249-255.
- 82 Marambaud, P., Wilk, S., and Checler, F. (1996): Protein kinase A phosphorylation of the proteasome: a contribution to the alpha-secretase pathway in human cells. *J.Neurochem.* **67**, 2616-2619.
- 83 Efthimiopoulos, S., Vassilacopoulou, D., Ripellino, J. A., Tezapsidis, N., and Robakis, N. K. (1996): Cholinergic agonists stimulate secretion of soluble full-length amyloid precursor protein in neuroendocrine cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 8046-8050.
- 84 Xu, H., Sweeney, D., Greengard, P., and Gandy, S. (1996): Metabolism of Alzheimer beta-amyloid precursor protein: regulation by protein kinase A in intact cells and in a cell-free system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 4081-4084.
- 85 Lee, R. K. and Wurtman, R. J. (1997): Metabotropic glutamate receptors increase amyloid precursor protein processing in astrocytes: inhibition by cyclic AMP. *J.Neurochem.* **68**, 1830-1835.
- 86 Marquez-Sterling, N. R., Lo, A. C., Sisodia, S. S., and Koo, E. H. (1997): Trafficking of cell-surface beta-amyloid precursor protein: evidence that a sorting intermediate participates in synaptic vesicle recycling. *J.Neurosci.* **17**, 140-151.
- 87 McLaughlin, M. and Breen, K. C. (1999): Protein kinase C activation potentiates the rapid secretion of the amyloid precursor protein from rat cortical synaptosomes. *J.Neurochem.* **72**, 273-281.
- 88 Karl, P. I. and Divald, A. (1996): Protein kinase C in cultured human placental trophoblasts: identification of isoforms and role in cAMP signalling. *Biochem.J.* **320 (Pt 3)**, 831-836.
- 89 Mills, J., Laurent, Charest D., Lam, F., Beyreuther, K., Ida, N., Pelech, S. L., and Reiner, P. B. (1997): Regulation of amyloid precursor protein catabolism involves the mitogen- activated protein kinase signal transduction pathway. *J.Neurosci.* **17**, 9415-9422.
- 90 Roberson, E. D., English, J. D., Adams, J. P., Selcher, J. C., Kondratick, C., and Sweatt, J. D. (1999): The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J.Neurosci.* **19**, 4337-4348.

- 91 Nitsch, R. M., Deng, M., Growdon, J. H., and Wurtman, R. J. (1996): Serotonin 5-HT_{2a} and 5-HT_{2c} receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion. *J.Biol.Chem.* **271** , 4188-4194.
- 92 Haring, R., Fisher, A., Marciano, D., Pittel, Z., Kloog, Y., Zuckerman, A., Eshhar, N., and Heldman, E. (1998): Mitogen-activated protein kinase-dependent and protein kinase C- dependent pathways link the m1 muscarinic receptor to beta-amyloid precursor protein secretion. *J.Neurochem.* **71** , 2094-2103.
- 93 Petryniak, M. A., Wurtman, R. J., and Slack, B. E. (1996): Elevated intracellular calcium concentration increases secretory processing of the amyloid precursor protein by a tyrosine phosphorylation-dependent mechanism. *Biochem.J.* **320 (Pt 3)** , 957-963.
- 94 Cao, Y. J., Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (2000): A mutation in the second intracellular loop of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor confers constitutive receptor activation. *FEBS Lett.* **469** , 142-146.
- 95 Gether, U. (2000): Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein- coupled receptors. *Endocr.Rev.* **21** , 90-113.

o

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, die hier vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel selbstständig angefertigt zu haben.

Bingen, im Oktober 2001

Corinna Buro