

---

# **Cholesterin und Progesteron – Modulatoren G-Protein-gekoppelter Signaltransduktionswege**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

**Katja Burger**  
geboren in Groß-Umstadt

Mainz 2000

Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2000





# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IX
TABELLENVERZEICHNIS.....	XII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XIII
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
2.1. HORMONE UND HORMONREZEPTOREN .....	3
2.2. G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN .....	3
2.2.1. Merkmale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....	4
2.2.2. Ligandenbindung.....	6
2.2.3. Signaltransduktion .....	7
2.2.4. Desensibilisierung.....	8
2.2.5. Der Oxytocinrezeptor.....	9
Oxytocin.....	9
Signaltransduktion.....	10
2.2.6. Andere G <sub>q</sub> -gekoppelte Rezeptoren.....	11
2.3. STEROIDHORMONE .....	12
2.3.1. Genomische Wirkungen von Progesteron .....	12
2.3.2. Nicht-genomische Wirkungen von Progesteron .....	13
2.4. CHOLESTERIN .....	14
2.4.1. Eigenschaften und Einfluss auf biologische Membranen.....	14
2.4.2. Cholesterinverteilung in der Zelle und der intrazelluläre Cholesterintransport.....	15
2.4.3. Die heterogene Verteilung von Cholesterin in der Plasmamembran.....	17
2.5. REGULATION VON MEMBRANPROTEINEN DURCH CHOLESTERIN .....	19
2.5.1. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor .....	19
2.5.2. Rhodopsin.....	21
2.5.3. Der Oxytocinrezeptor .....	23
2.6. ZIELE DER ARBEIT .....	24
<b>3. MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>27</b>
3.1. CHEMIKALIEN UND GERÄTE .....	27
3.2. HÄUFIG BENUTZTE PUFFER UND ZELLKULTURMEDIEN.....	33
3.2.1. Puffer.....	33
3.2.2. Zellkulturmedien.....	34
3.3. ALLGEMEINE METHODEN .....	35
3.3.1. Absorptionsmessungen im visuellen und UV-Bereich.....	35
3.3.2. Proteinfällung.....	35
3.3.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Proteinbestimmung).....	36
3.3.4. Lipidextraktion .....	37
3.3.5. Bestimmung des Cholesteringehaltes einer Probe (Cholesterinbestimmung).....	37
3.3.6. Dünnschichtchromatographie .....	38
3.3.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
3.3.8. Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	40
3.3.9. Western-Blotting.....	40
3.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	42
3.4.1. Kultivierung von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	42
3.4.2. Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	42
3.4.3. Transformation von <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	42
3.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA .....	43
Minipräparation von Plasmid-DNA.....	43
Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	43
3.4.5. Reinigung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten.....	45

Phenolextraktion .....	45
Ethanol-fällung .....	45
Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation .....	45
3.4.6. Restriktionshydrolyse .....	46
Analytische Restriktionshydrolyse .....	46
Präparative Restriktionshydrolyse .....	46
3.4.7. Phosphorylierung von DNA .....	46
3.4.8. Auffüllreaktion 5'-überhängender Enden mit T4-DNA-Polymerase .....	47
3.4.9. Ligation von DNA-Fragmenten .....	47
3.4.10. Agarosegelelektrophorese von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten .....	47
3.4.11. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	48
3.4.12. Alkalische Denaturierung doppelsträngiger DNA .....	48
3.4.13. Enzymatische DNA-Sequenzierung nach Sanger .....	48
3.4.14. Bestimmung von DNA-Konzentrationen .....	49
3.5. ZELLKULTUR .....	50
3.5.1. Bestimmung von Zelldichten .....	50
3.5.2. Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung) .....	50
3.5.3. Kultivierung von Sf9-Insektenzellen .....	50
Transfektion von Sf9-Zellen .....	51
Reinigung von rekombinanten Baculoviren („Plaque-Assay“) .....	51
Virustiterbestimmung durch Plaque-Assay .....	52
Amplifikation von rekombinanten Baculoviren .....	53
Infektion von Sf9-Zellkulturen zur Expression des Oxytocinrezeptors .....	53
3.5.4. Kultivierung von Säugetierzellen .....	53
3.6. ZELLERNTTE UND MEMBRANPRÄPARATIONEN .....	54
3.6.1. Ernte von Säugetierzellen .....	54
3.6.2. Ernte von Insektenzellen .....	54
3.6.3. Membranpräparation .....	54
3.7. METHODEN ZUR REINIGUNG DES MENSCHLICHEN OXYTOCINREZEPTORS .....	54
3.7.1. Solubilisierung .....	55
Solubilisierung mit CHAPSO als Detergens .....	55
Solubilisierung mit Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid als Detergens .....	55
Solubilisierung mit Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid für Metallchelate-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen .....	55
3.7.2. Metallchelate-Affinitätschromatographie .....	56
Beladung der Chelating Sepharose® Fast Flow (Pharmacia) mit Ni <sup>2+</sup> -Ionen .....	56
Äquilibrierung der Matrix .....	56
Metallchelate-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen .....	57
Metallchelate-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen .....	58
3.7.3. Anti-FLAG® M1-Affinitätschromatographie .....	58
3.7.4. Lektin-Chromatographie mit WGA-Agarose .....	59
3.8. VERÄNDERUNG DER STEROIDZUSAMMENSETZUNG VON ZELLEN, MEMBRANEN ODER SOLUBILISIERTEN PROBEN .....	60
3.8.1. Herstellung von Steroid/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexen .....	60
Cholesterin/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexe (10 mM) .....	61
Steroid/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexe (3 mM) .....	61
[ <sup>3</sup> H]6,6-Azocholestanol/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexe .....	62
3.8.2. Veränderung des Steroidgehaltes lebender Zellen .....	62
Entfernung von Cholesterin aus lebenden Zellen .....	62
Anreicherung lebender Zellen mit Cholesterin durch Cholesterin/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexe .....	62
Anreicherung lebender Zellen mit Steroiden durch Ethanollösungen .....	62
3.8.3. Veränderung des Steroidgehaltes biologischer Membranen .....	63
Entfernung von Cholesterin aus biologischen Membranen .....	63
Anreicherung biologischer Membranen mit Steroiden durch Steroid/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrinkomplexe .....	63
Anreicherung biologischer Membranen mit Steroiden durch Ethanollösungen .....	63
Behandlung von Membranen mit Cholesterinoxidase und Sphingomyelinase .....	63
Behandlung von Membranen mit Filipin .....	64
3.8.4. Veränderung des Steroidgehaltes von Solubilisaten .....	64
3.9. SYNTHESE DES PHOTOREAKTIVEN CHOLESTERINDERIVATS 6,6-AZO-CHOLESTAN-3 $\beta$ -OL .....	64
3.9.1. Synthese von 6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol .....	64
3.9.2. Synthese von 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ - <sup>3</sup> H]-3 $\beta$ -ol .....	66

Oxidation von 6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol zu 6,6-Azo-cholestan-3-on.....	66
Reduktion von 6,6-Azo-cholestan-3-on durch tritiiertes Natriumborhydrid.....	66
3.10. PHOTOAFFINITÄTSMARKIERUNG DES HUMANEN OXYTOCINREZEPTORS MIT [ <sup>3</sup> H]6,6-AZOCHOLESTANOL.....	68
3.10.1. Bestrahlung.....	68
3.10.2. Detektion.....	68
Detektion durch Szintillationszählung.....	68
Detektion durch Phosphorimager.....	69
3.11. ANISOTROPIEMESSUNG BIOLOGISCHER MEMBRANEN MIT 1,6-DIPHENYL-1,3,5-HEXATRIEN (DPH).....	69
3.12. LIGANDENBINDUNGSSTUDIEN.....	70
3.12.1. Hormonbindungsstudien an Sf9-Zellen.....	70
3.12.2. Hormonbindungsstudien an oxytocinrezeptor- bzw. cholecystokinrezeptorhaltigen Zellmembranen.....	70
3.12.3. Sättigungsexperimente.....	71
3.12.4. Hormonbindungsstudien an solubilisiertem Oxytocinrezeptor.....	71
3.13. MESSUNG DES ANSTIEGES DER FREIEN INTRAZELLULÄREN CALCIUMIONENKONZENTRATION FURA-2/AM-BELADENER ZELLEN.....	72
<b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>75</b>
4.1. UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBEREXPRESSION DES HUMANEN OXYTOCINREZEPTORS IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN.....	75
4.1.1. Expression und Charakterisierung des humanen Oxytocinrezeptors in <i>Spodoptera frugiperda</i> 9-Zellen.....	75
Klonierung des Transfervektors zur Expression des humanen Oxytocinrezeptors in Sf9-Zellen.....	77
Herstellung und Klonierung des rekombinanten Baculovirus und Amplifikation der Viruslysate.....	81
Analyse der Expression und Optimierung der Ligandenbindung des humanen Oxytocinrezeptors in Sf9-Zellen.....	81
4.1.2. Expression und Charakterisierung des humanen Oxytocinrezeptors in HEK293-Zellen.....	87
Sättigungsexperiment mit [ <sup>3</sup> H]Oxytocin an HEK-OTRhis-Membranen.....	87
Nachweis des Dekahistidin-tags und des FLAG-Epitops des Oxytocinrezeptors durch Western-Blot.....	88
4.2. VERSUCHE ZUR REINIGUNG DES MENSCHLICHEN OXYTOCINREZEPTORS.....	89
4.2.1. Solubilisierung des menschlichen Oxytocinrezeptors.....	89
Solubilisierungsversuche mit Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid.....	90
Einfluss von Cholesterin/M $\beta$ CD bei der Solubilisierung und Aufbewahrung des Oxytocinrezeptors auf die spezifische Ligandenbindung.....	93
4.2.2. Metallchelate-Affinitätschromatographie.....	95
Elutionsbedingungen.....	97
Einfluss von Ni <sup>2+</sup> bzw. Co <sup>2+</sup> auf die spezifische [ <sup>3</sup> H]OT-Bindung des Oxytocinrezeptors.....	97
Einfluss von Imidazol auf die spezifische [ <sup>3</sup> H]OT-Bindung des Oxytocinrezeptors.....	99
Einfluss des Dekahistidin-tags auf die Bindung des Oxytocinrezeptors an verschiedene Metallchelate-Affinitätsmatrices.....	100
Zusammenfassung der Ergebnisse der Metallchelate-Affinitätschromatographie.....	104
Metallchelate-Affinitätschromatographie an der Ni-NTA-Matrix: Elution des Oxytocinrezeptors durch Imidazol und Wiederherstellung der Ligandenbindung durch anschließendes Umpuffern der Fraktionen an einer NAP10-Säule.....	104
4.2.3. Anti-FLAG <sup>®</sup> M1-Affinitätschromatographie.....	106
4.2.4. Lektin-Chromatographie mit WGA-Agarose.....	109
4.2.5. Zusammenfassung und Diskussion.....	110
4.3. MODULATION DER LIGANDENBINDUNG G-PROTEIN-GEKOPPELTER REZEPTOREN DURCH CHOLESTERIN.....	112
4.3.1. Einfluss von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin, Filipin bzw. Cholesterinoxidase auf die hochaffine Ligandenbindung des Oxytocin- und des Cholecystokinrezeptors.....	113
4.3.2. Struktur-Funktionsanalyse von Cholesterin im Hinblick auf den hochaffinen Zustand des menschlichen Oxytocinrezeptors und des menschlichen Cholecystokin <sub>B</sub> -Rezeptors.....	113
Einbau von verschiedenen Steroiden in Cholesterin-abgereicherte Membranen und Einfluss dieser Steroide auf die Ligandenbindung des Oxytocin- bzw. Cholecystokinrezeptors.....	116
Strukturelle Merkmale des Cholesterins, die für den hochaffinen Zustand des Oxytocinrezeptors wichtig sind.....	120
Strukturelle Merkmale des Cholesterins, die für die Ligandenbindung des Cholecystokinrezeptors wichtig sind.....	122

4.3.3. Anisotropiemessungen an mit verschiedenen Steroiden wiederangereicherten Membranen und an Membranen mit unterschiedlichen Cholesterinkonzentrationen .....	123
4.3.4. Zusammenfassung und Diskussion .....	127
4.4. MODULIERUNG LIGANDEN-INDUZIERTER CALCIUMSIGNALE G- PROTEIN-GEKOPPELTER REZEPTOREN DURCH CHOLESTERIN .....	129
4.5. SYNTHESE VON 6,6-AZOCHOLESTANOL UND TEST AUF DESSEN FÄHIGKEIT, DEN HOCHAFFINEN ZUSTAND DES OXYTOCINREZEPTORS ZU UNTERSTÜTZEN .....	134
4.5.1. Synthese von 6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol .....	134
4.5.2. Synthese von 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ - <sup>3</sup> H]-3 $\beta$ -ol .....	137
4.5.3. Bestimmung der Halbwertszeit von 6,6-Azocholestanol bei $\lambda > 335$ nm .....	138
4.5.4. Test von 6,6-Azocholestanol auf Herstellung der hochaffinen Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors .....	139
Test an Cholesterin-abgereicherten HEK-OTRhis-Membranen .....	139
Test an CHAPSO-Solubilisat von HEK-OTRhis-Membranen .....	140
4.6. VERSUCHE ZUR PHOTOAFFINITÄTSMARKIERUNG DES MENSCHLICHEN OXYTOCINREZEPTORS MIT [ <sup>3</sup> H]6,6-AZOCHOLESTANOL .....	141
4.6.1. Photoaffinitätsmarkierung von HEK-OTRhis-Membranen .....	141
4.6.2. Photoaffinitätsmarkierung von HEK-OTRhis-Membranen und anschließende denaturierende Reinigung des Oxytocinrezeptors über Ni-NTA-Agarose .....	144
Solubilisierung photoaffinitätsmarkierter Membranen .....	144
Denaturierende Reinigung über Ni-NTA-Agarose .....	147
4.6.3. Photoaffinitätsmarkierung von WGA-Eluat .....	149
4.6.4. Photoaffinitätsmarkierung von in <i>E. coli</i> überexprimiertem, gereinigtem und rekonstituiertem Oxytocinrezeptor .....	150
4.6.5. Zusammenfassung und Diskussion .....	151
4.7. DER EINFLUSS VON PROGESTERON AUF G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN .....	153
4.7.1. Verwendete Zelllinien und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren .....	153
4.7.2. Wirkung von Progesteron auf die Liganden-induzierten Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in verschiedenen Zelllinien .....	157
4.7.3. Eigenschaften der Progesteronwirkung .....	159
Geschwindigkeit der Progesteronwirkung .....	159
Reversibilität der Progesteronwirkung .....	160
Einfluss von Cycloheximid auf die Progesteronwirkung .....	161
4.7.4. Wirkung von Progesteron auf die Ligand-Rezeptor-Interaktion .....	162
4.7.5. Einfluss von Progesteron und 5 $\beta$ -Dihydroprogesteron auf die Fluidität von HEK-OTR-Membranen .....	163
4.7.6. Einfluss von Progesteron auf Aluminiumfluorid-induzierte Calciumsignale .....	164
4.7.7. Progesteron-induzierte Calciumsignale .....	167
4.7.8. Struktur-Funktionsanalyse verschiedener Steroide am Oxytocinrezeptor .....	170
4.7.9. Zusammenfassung und Diskussion .....	173
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>177</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>183</b>
<b>SACHVERZEICHNIS .....</b>	<b>193</b>
<b>WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>199</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>199</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisches Modell eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (menschlicher Oxytocinrezeptor).....	5
Abbildung 2: Schematische Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und Ligand-Rezeptor-Interaktionen.	6
Abbildung 3: Die Struktur von Oxytocin .....	9
Abbildung 4: Auswirkungen von Progesteron auf den intrazellulären Cholesterintransport .....	17
Abbildung 5: Modell der Interaktion zwischen Cholesterin und dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor .....	21
Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Stäbchens der Netzhaut.....	23
Abbildung 7: Strukturformel und Form von $\beta$ -Cyclodextrin .....	61
Abbildung 8: Syntheseweg von 6,6-Azocholestan-3 $\beta$ -ol.....	65
Abbildung 9: Syntheseweg des tritiierten 6,6-Azocholestan-3 $\beta$ -ol.....	67
Abbildung 10: Klonierungsschema für den Transfervektor pVLMelFlagOTRHis <sub>10</sub> .....	80
Abbildung 11: Zeitverlauf der Expression des Oxytocinrezeptors in <i>Sf9</i> -Zellen (Ligandenbindungstest und Western-Blot) .....	83
Abbildung 12: Sättigungsexperiment mit [ <sup>3</sup> H]Oxytocin an Membranen von <i>Sf9</i> -Zellen, die mit pVLMelFlagOTRHis <sub>10</sub> /AcMNPV infiziert worden waren .....	86
Abbildung 13: Sättigungsexperiment mit [ <sup>3</sup> H]Oxytocin an HEK-OTRhis-Membranen.....	87
Abbildung 14: Western-Blot mit HEK-OTRhis-Membranen und anti-His <sub>6</sub> (CERN9414) bzw. anti-FLAG M2-Antikörper als Erstantikörper.....	88
Abbildung 15: Strukturformel des Detergens CHAPSO .....	89
Abbildung 16: Strukturformel von Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid.....	90
Abbildung 17: Einfluss von Cholesterin/M $\beta$ CD bei der Solubilisierung und Aufbewahrung des Oxytocinrezeptors auf die spezifische Ligandenbindung .....	93
Abbildung 18: Parameter der Metallchelate-Affinitätschromatographie .....	96
Abbildung 19: Einfluss von Nickel- bzw. Cobaltionen auf die spezifische [ <sup>3</sup> H]Oxytocin-Bindung von CHAPSO-solubiliertem Oxytocinrezeptor.....	98
Abbildung 20: Einfluss von Imidazol auf die spezifische Ligandenbindung von CHAPSO-solubiliertem Oxytocinrezeptor .....	100
Abbildung 21: Vergleich verschiedener Metallchelate-Affinitätsäulen auf die Bindung des mit einem His <sub>10</sub> verknüpften Oxytocinrezeptors, des Oxytocinrezeptors ohne His <sub>10</sub> und auf die Bindung des Gesamtproteins der Probe.....	103
Abbildung 22: Metallchelate-Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose (Elution mit 400 mM Imidazol. Entfernen des Imidazols durch Umpuffern der Fraktionen an einer NAP10-Säule.) .....	105
Abbildung 23: Anti-FLAG <sup>®</sup> M1-Affinitätschromatographie mit Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid als Detergens .....	108
Abbildung 24: Lektin-Chromatographie mit WGA-Agarose.....	110
Abbildung 25: Strukturen von Steroiden für die Struktur-Funktionsanalyse von Cholesterin im Hinblick auf die Ligandenbindung des menschlichen Oxytocinrezeptors und des menschlichen Cholecystokinin <sub>B</sub> -Rezeptors .....	115
Abbildung 26: Densitometrische Bestimmung der Einbauraten von Steroiden in Cholesterin-abgereicherte Membranen am Beispiel des 22-Ketocholesterols.....	117
Abbildung 27: Strukturelle Merkmale von Cholesterin, die für den hochaffinen Zustand des Oxytocinrezeptors wichtig sind .....	122

Abbildung 28: Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors (A) bzw. des Cholecystokininrezeptors (B) in Abhängigkeit der Fluoreszenzanisotropie von DPH in Membranen, deren endogenes Cholesterin gegen unterschiedliche Steroide ausgetauscht wurde.....	125
Abbildung 29: Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors (●) und des Cholecystokininrezeptors (○) in Abhängigkeit von der Anisotropie der Membranen .....	126
Abbildung 30: Computergestütztes Modeling einer möglichen Cholesterinbindungsstelle des menschlichen Oxytocinrezeptors.....	127
Abbildung 31: Einfluss des zellulären Cholesteringehalts auf Liganden-induzierte Veränderungen der cytosolischen $Ca^{2+}$ -Konzentration .....	131
Abbildung 32: Liganden-induzierte Calciumsignale von 1321N1-Astrocytoma, die mit Cholesterin angereichert worden waren.....	132
Abbildung 33: Strukturformel des photoreaktiven Cholesterinderivats 6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol (6,6-Azocholestanol).....	135
Abbildung 34: Reinigung von 6,6-Azocholestanol über eine Kieselgelsäule nach der Synthese .....	136
Abbildung 35: Dünnschichtchromatographie der Reaktionsprodukte der Synthese von 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ - $^3H$ ]-3 $\beta$ -ol (Autoradiogramm) .....	137
Abbildung 36: Strukturformel von 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ - $^3H$ ]-3 $\beta$ -ol.....	138
Abbildung 37: Photolyse von 6,6-Azocholestanol bei $\lambda > 335$ nm.....	138
Abbildung 38: Test von 6,6-Azocholestanol auf die Herstellung der hochaffinen Ligandenbindung des menschlichen Oxytocinrezeptors in HEK-OTRhis-Membranen .....	140
Abbildung 39: Test von 6,6-Azocholestanol auf die Herstellung der hochaffinen Ligandenbindung des solubilisierten menschlichen Oxytocinrezeptors .....	141
Abbildung 40: Photoaffinitätsmarkierung von HEK-OTRhis-Membranen mit [ $^3H$ ]6,6-Azocholestanol mit anschließender Proteinfällung .....	143
Abbildung 41: Vergleich der Solubilisierung des bestrahlten bzw. nichtbestrahlten menschlichen Oxytocinrezeptors mit CHAPSO und Dodecylmaltosid im Western-Blot .....	145
Abbildung 42: Einfluss der Photoaffinitätsmarkierung des menschlichen Oxytocinrezeptors auf die Solubilisierung mit CHAPSO bzw. Dodecylmaltosid .....	146
Abbildung 43: Chromatographie des Oxytocinrezeptors an Ni-NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen nach Markierung von HEK-OTRhis-Membranen mit [ $^3H$ ]6,6-Azocholestanol .....	148
Abbildung 44: Photoaffinitätsmarkierung von WGA-Eluat mit [ $^3H$ ]6,6-Azocholestanol (-/+ 80facher Überschuss an nichttritiertem 6,6-Azocholestanol).....	150
Abbildung 45: Markierung des gereinigten menschlichen Oxytocinrezeptors mit [ $^3H$ ]6,6-Azocholestanol .	151
Abbildung 46: Bradykinin-induzierte Calciumantworten von 1321N1-Zellen.....	155
Abbildung 47: Bestimmung des Subtyps des endogenen in HEK293 bzw. 1321N1-Astrocyten exprimierten muscarinischen Acetylcholinrezeptors .....	157
Abbildung 48: Einfluss steigender Progesteronkonzentrationen auf Liganden-induzierte Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren .....	159
Abbildung 49: Geschwindigkeit der Progesteronwirkung .....	160
Abbildung 50: Reversibilität der Progesteronwirkung.....	161
Abbildung 51: Wirkung von Progesteron und 5 $\beta$ -Dihydroprogesteron auf die [ $^3H$ ]Oxytocin-Bindung von HEK-OTR- bzw. CHO-OTR-Membranen .....	163
Abbildung 52: Bindung von GDP• Aluminiumfluorid im aktiven Zentrum von $G_{i\alpha}$ und Modell des Übergangszustands der GTP-Hydrolyse im aktiven Zentrum von $G_{i\alpha}$ .....	164

---

Abbildung 53: Calciumantwort von 1321N1-Astrocytoma auf verschiedene $\text{AlF}_4^-$ -Konzentrationen .....	165
Abbildung 54: Wirkung von Progesteron auf Aluminiumfluorid-induzierte Calciumsignale von 1321N1-Astrocytoma .....	166
Abbildung 55: Dosis-Wirkungskurve Progesteron-induzierter Calciumantworten von HEK293-Zellen und der Progesteronwirkung auf Acetylcholin-induzierte Calciumsignale .....	167
Abbildung 56: Effekt von EGTA auf die Progesteron-induzierte Calciumantwort von HEK293-Zellen .....	168
Abbildung 57: Zusammenhang zwischen der Calciumantwort von HEK293-Zellen auf verschiedene Steroide und der Fähigkeit dieser Steroide den Acetylcholin-induzierten Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration zu hemmen .....	169
Abbildung 58: Verwendete Steroide für die Struktur-Funktionsanalyse von Progesteron.....	171
Abbildung 59: Struktur-Funktionsanalyse von Steroiden bezüglich der Abschwächung des Oxytocin-induzierten Calciumsignals von HEK-OTR-Zellen.....	172
Abbildung 60: Strukturelle Merkmale von Progesteron, die wichtig sind für die Abschwächung Oxytocin-induzierter Calciumsignale in HEK-OTR-Zellen .....	172
Abbildung 61: Parameter der Beeinflussung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch Cholesterin.....	178
Abbildung 62: Möglicher Zusammenhang zwischen dem Einfluss von Progesteron auf den intrazellulären Cholesterintransport und der Abschwächung Liganden-induzierter Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren .....	181

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Physiologische Wirkung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden [21] .....	11
Tabelle 2: Adaption von <i>Sf</i> 9-Zellen an Cholesterin vor der Baculovirus-Infektion und Optimierung des Zeitpunktes der Cholesterinzugabe nach der Infektion .....	85
Tabelle 3: Solubilisierung des menschlichen Oxytocinrezeptors durch Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid bzw. CHAPSO .....	91
Tabelle 4: Matrices für die Metallchelate-Affinitätschromatographie .....	97
Tabelle 5: Puffer für die Metallchelate-Affinitätschromatographie für einen Versuch, in dem verschiedene Säulenmaterialien verglichen wurden.....	101
Tabelle 6: Puffer für eine Metallchelate-Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose (Waschen der Säule mit 100 mM Imidazol, Elution mit 400 mM Imidazol).....	105
Tabelle 7: Test verschiedener Steroide auf deren Einbau in Cholesterin-abgereicherte Membranen und auf ihre Fähigkeit, die Ligandenbindung des OT-Rezeptors bzw. des CCK-Rezeptors wiederherzustellen.....	118
Tabelle 8: Fluoreszenzanisotropie von DPH in Cholesterin-abgereicherten Membranen, die mit verschiedenen Steroiden wiederangereichert worden waren.....	124
Tabelle 9: Test verschiedener Liganden an HEK293-, 1321N1- und CHO-K1-Zellen .....	154

## Abkürzungsverzeichnis

ABC-Superfamilie	<u>A</u> TP- <u>B</u> inding- <u>C</u> assette-Superfamilie
ACAT	<u>A</u> cy-CoA: <u>C</u> holesterin- <u>A</u> cy <u>t</u> ransferase
AChR	<u>A</u> cetyl <u>ch</u> olin <u>r</u> ezeptor
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> <u>m</u> ultiply embedded <u>n</u> uclear polyhedrosis <u>v</u> irus (Kernpolyedervirus)
amp	Ampicillin-Resistenzgen
APS	<u>A</u> mmoniumperoxydisulfat
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
ATP	<u>A</u> denosin-5'- <u>t</u> riphosphat
AVP	[Arg <sup>8</sup> ]Vasopressin
6,6-Azocholestanol	6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol
$B_{\max}$	Rezeptordichte
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aar
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
CCKR	Cholecystokinin <sub>B</sub> -Rezeptor
CCKS8	<u>s</u> ulfatiertes <u>C</u> holecysto <u>k</u> ininok <u>t</u> apeptid
CHAPSO	(3-[(3-Cholaminopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propansulfonat)
CHO-Zellen	<u>C</u> hinese <u>h</u> amster <u>o</u> vary-Zellen (Zelllinie aus Ovarien von <i>Cricetulus griseus</i> )
cpm	counts per minute (Zählereignisse pro Minute)
Da	<u>D</u> alton
D $\beta$ M	<u>D</u> odecyl- $\beta$ -D- <u>m</u> altosid
DC	<u>D</u> ünnschicht <u>ch</u> romatographie
DHEA	<u>D</u> ehydroepiandrosteron
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>y</u> d
DNA	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure (-acid)
DPH	1,6- <u>D</u> iphenyl-1,3,5- <u>h</u> exatrien
dpm	decays per minute (Zerfälle pro Minute)
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylendi <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
EGTA	<u>E</u> thylenglykol-bis-(2-aminoethyl)- <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
Fura-2/AM	Fura-2/ <u>A</u> cetoxymethylester
GalR2	<u>G</u> alanin <u>r</u> ezeptor 2
GDP	<u>G</u> uanosin-5'- <u>d</u> iphosphat

GPCR	<u>G</u> <u>p</u> rotein- <u>c</u> oupled <u>r</u> eceptor (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
G-Protein	<u>G</u> uanosinnukleotid-bindendes Protein
GRK	<u>G</u> -Protein-gekoppelter <u>R</u> ezeptor- <u>P</u> roteink <u>i</u> nase
GTP	<u>G</u> uanosin-5'- <u>t</u> riphosphat
h	Stunde(n)
[ <sup>3</sup> H]6,6-Azocholestanol	6,6-Azo-cholestan-[3α- <sup>3</sup> H]-3β-ol
HBS	<u>H</u> EPES <u>b</u> uffered <u>s</u> alt <u>s</u> olution (HEPES-gepufferte Salzlösung)
HEK293-Zellen	<u>h</u> uman <u>e</u> mbrionic <u>k</u> idney 293-Zellen (menschliche embryonale Nierenzelllinie)
HEPES	4-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)- <u>p</u> iperazin-1- <u>e</u> thansulfonsäure
HMG-CoA-Reduktase	<u>H</u> ydroxy <u>m</u> ethylglutaryl- <u>C</u> oenzym- <u>A</u> -Reduktase
IDA	<u>i</u> minodi <u>a</u> cetic <u>a</u> cid (Iminodiessigsäure)
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
LDL	<u>l</u> ow <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein (Lipoprotein niedriger Dichte)
MβCD	<u>M</u> ethyl-β- <u>C</u> yclod <u>e</u> xtrin
min	Minute(n)
MOI	<u>m</u> ultiplicity <u>o</u> f <u>i</u> nfection (Multiplizität der Infektion)
M <sub>r</sub>	<u>r</u> elative <u>M</u> olekülmasse
mRNA	<u>m</u> essenger RNA (Boten-RNA)
NTA	<u>n</u> itrilo <u>t</u> riacetic <u>a</u> cid (Nitrilotriessigsäure)
OT	<u>O</u> xy <u>t</u> ocin
OTR	<u>O</u> xy <u>t</u> ocinrezeptor
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>g</u> ele <u>e</u> ktrophorese
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (Phosphatpuffer)
Pfu	<u>p</u> laque <u>f</u> orming <u>u</u> nits (plaquebildende Einheiten)
p. I.	nach Infektion
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Diacylglycerol-aktivierte Proteinkinase
P/S	<u>P</u> enicillin/ <u>S</u> treptomycin
RNA	<u>R</u> ibon <u>k</u> leinsäure (- <u>a</u> cid)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur (20 – 25°C)
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate (Natriumdodecylsulfat)
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9
t	Zeit
TEMED	N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylethylend <u>a</u> min
TM	<u>T</u> ransmembrandomäne

---

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Spannung bzw. <u>units</u> (bei Enzymen)
ÜN	<u>über</u> <u>N</u> acht
upm	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
UV	<u>U</u> ltraviolett
v/v	<u>V</u> olumen pro <u>V</u> olumen
WGA	<u>w</u> heat germ <u>a</u> gglutinin (Weizenkeim-Agglutinin)
w/v	<u>w</u> eight per <u>v</u> olume (Gewicht pro Volumen)
ZNS	<u>Z</u> entral <u>n</u> ervens <u>s</u> ystem



## 1. Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bilden mit etwa 2000 bekannten Mitgliedern die größte Familie plasmamembranständiger Hormonrezeptoren. Über ihre sieben Transmembrandomänen stehen sie in engem Kontakt mit der umgebenden Lipiddoppelschicht. Diese Arbeit zeigt, dass Cholesterin, ein wichtiger Bestandteil der Lipiddoppelschicht, Membranproteine prinzipiell durch zwei Mechanismen beeinflussen kann: Der Oxytocinrezeptor interagiert direkt und spezifisch mit Cholesterin, wobei die hochaffine Ligandenbindung durch kooperative Bindung von mindestens fünf Cholesterinmolekülen induziert wird. Die Ligandenbindung des Cholecystokininrezeptors wird hingegen indirekt durch Cholesterin über dessen Einfluss auf die Membranfluidität moduliert. Die für die Interaktion mit dem Oxytocinrezeptor wichtigen Bereiche des Cholesterinmoleküls konnten identifiziert werden. Die Erkenntnisse wurden zur Synthese eines funktionellen photoreaktiven Cholesterinderivats genutzt, das den gereinigten, jedoch unfunktionellen Oxytocinrezeptor markierte und in Zukunft zur Identifizierung der Cholesterinbindungsstellen verwendet werden soll. Ansätze zur Reinigung des funktionellen Oxytocinrezeptors werden vorgestellt.

Die uteruskontrahierende Wirkung des Oxytocins wird über einen noch unbekanntem Mechanismus durch Progesteron inhibiert. Diese Arbeit demonstriert, dass Progesteron rasch, reversibel und nicht-genomisch Liganden-induzierte Calciumantworten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren verändert. Progesteron wirkt zelltypspezifisch auf einer der Ligand-Rezeptor-Interaktion nachgeschalteten Ebene der Signaltransduktion. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang mit der nachgewiesenen Inhibierung des intrazellulären Cholesterintransports durch Progesteron oder mit raschen Progesteron-induzierten Calciumsignalen, die im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurden.

Diese Arbeit bildet die Grundlage für weitere Untersuchungen zum Einfluss von Cholesterin und Progesteron auf die Ligandenbindung und Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Krankheiten, deren Ursache in einem gestörten Cholesterinmetabolismus oder -transport liegt, wie die Niemann-Pick-C- oder die Tangier-Krankheit, verdeutlichen die Notwendigkeit solcher Forschungsprojekte.



## 2. Einleitung

### 2.1. Hormone und Hormonrezeptoren

Die Evolution vielzelliger Lebewesen ermöglichte eine Spezialisierung und effektive Arbeitsteilung der Zellen eines Organismus. Hierdurch entstand die Notwendigkeit der interzellulären Kommunikation zur Koordination der Zellprozesse. Das älteste Kommunikationssystem beruht auf chemischen Botenstoffen, den Hormonen. Hormone können den verschiedensten Stoffklassen angehören, wie z. B. den Peptiden, Aminosäuren, Steroiden oder Prostaglandinen. Ursprünglich wurden die Hormone aufgrund ihrer primären intrazellulären Wirkungsweise in zwei Hauptklassen eingeteilt. Nach diesem Schema binden hydrophile Hormone, die nicht durch Membranen diffundieren können, an plasmamembranständige Rezeptoren. Konformationsänderungen des Rezeptors vermitteln daraufhin ein Signal in das Zellinnere, wo durch Signalkaskaden vorübergehende Reaktionen der Zelle ausgelöst werden. Die zweite Hormonklasse wird durch lipophile Hormone repräsentiert, die die Plasmamembran leicht durchdringen können und an intrazelluläre Rezeptoren binden. Diese bewirken dann durch Interaktion mit bestimmten DNA-Abschnitten eine Änderung der Genexpression. Lipophile Hormone induzieren somit länger anhaltende Effekte [1].

Nach neueren Erkenntnissen kann diese einfache Einteilung der Hormone nicht mehr aufrechterhalten werden. Im Folgenden werden zunächst G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vorgestellt, die die größte bisher bekannte Familie plasmamembranständiger Rezeptoren darstellen. Danach wird am Beispiel des Progesterons gezeigt, dass Steroidhormone nicht nur über cytosolische Rezeptoren die Genexpression beeinflussen, sondern auch rasche, nicht-genomische Effekte auslösen können (S. 13).

### 2.2. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G protein-coupled receptors, GPCRs) gehören zusammen mit Ionenkanälen und Rezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Proteinkinaseaktivität zu den Hormonrezeptoren der Plasmamembran. Mit annähernd 2000 bekannten Mitgliedern stellen GPCRs die größte Superfamilie membranständiger Rezeptoren dar. Die Bindung eines Agonisten an den extrazellulären Teil des GPCRs induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, die eine Kopplung eines

heterotrimeren Guanosinnukleotid-bindenden Proteins (G-Protein) an den intrazellulären Teil des Rezeptors ermöglicht [2]. Hierdurch werden intrazelluläre Signalkaskaden eingeleitet, die weiter unten besprochen werden.

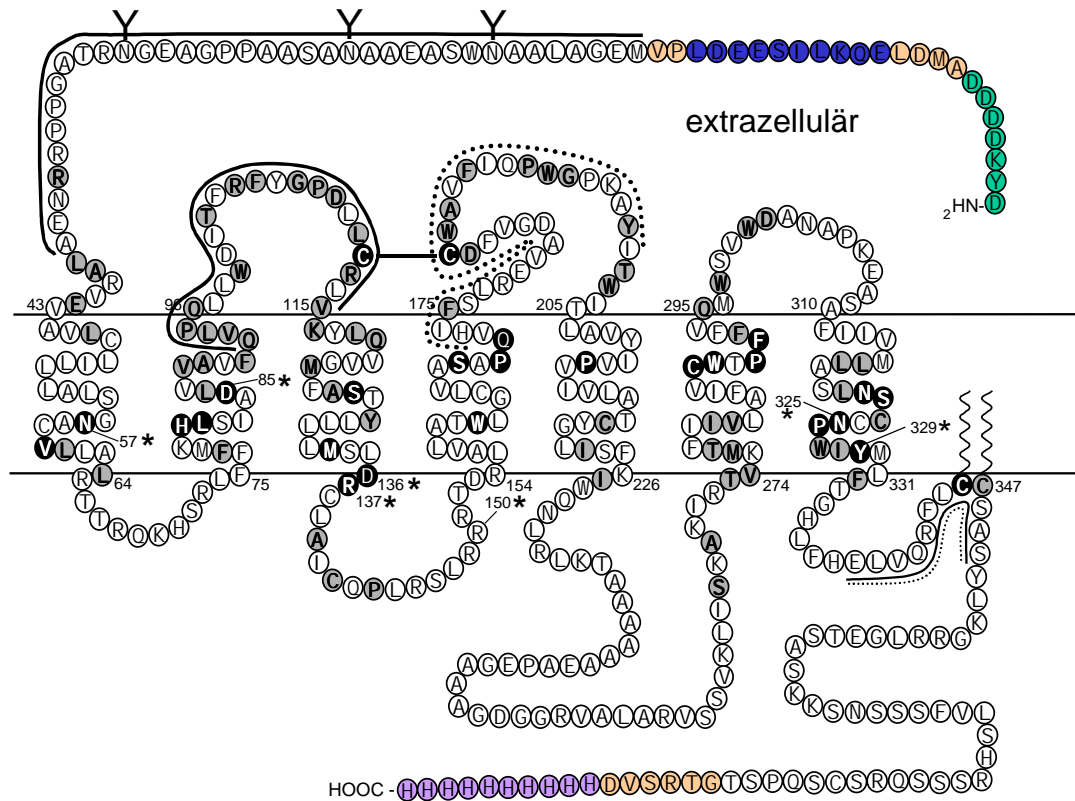
### 2.2.1. Merkmale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

GPCRs bestehen aus einem extrazellulären N-Terminus, sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen (TM), die über jeweils drei extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen verbunden sind, und einem intrazellulären C-Terminus (Abbildung 1). Dieser charakteristische Aufbau gab ihnen auch die Namen „heptahelikale Rezeptoren“ oder „Serpentinrezeptoren“. Zumindest bei Rhodopsin [3], dem Photorezeptor der Sehzellen, und beim  $\beta$ -adrenergen Rezeptor [4] sind die TM1 bis TM7 als geschlossener Kreis gegen den Uhrzeigersinn (bei Blick auf die extrazelluläre Seite der Membran) angeordnet. Die Elektronendichteverteilung zweidimensionaler Rhodopsinkristalle bei einer Auflösung von 9 Å zeigt, dass die TM 4 bis 7 senkrecht zur Membranebene in die Plasmamembran eingelagert sind, wohingegen die TM 1 bis 3 bis zu 30° geneigt sind [5]. Die relative Lage der Transmembrandomänen ist wichtig für die Liganden-induzierte Rezeptoraktivierung (s. S. 7).

Weitere häufige Merkmale vieler GPCRs sind [6]:

- extrazelluläre Konsensussequenzen für die Asparagin-verknüpfte Glycosylierung (Asn-X-Ser/Thr),
- konservierte Cysteinreste in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife, die durch Bildung einer Disulfidbrücke den Rezeptor stabilisieren,
- Cysteinreste am C-Terminus für eine Palmitoylierung, die wahrscheinlich eine zusätzliche Membranverankerung bietet,
- intrazelluläre Konsensussequenzen für Phosphorylierungen (z. B. SXX/R, K/RXS u. a.), die bei der Desensibilisierung und Internalisierung eine Rolle spielen (S. 8).

Abbildung 1 zeigt diese Merkmale am Beispiel des menschlichen Oxytocinrezeptors (OT-Rezeptor), an dem die meisten Experimente der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden.



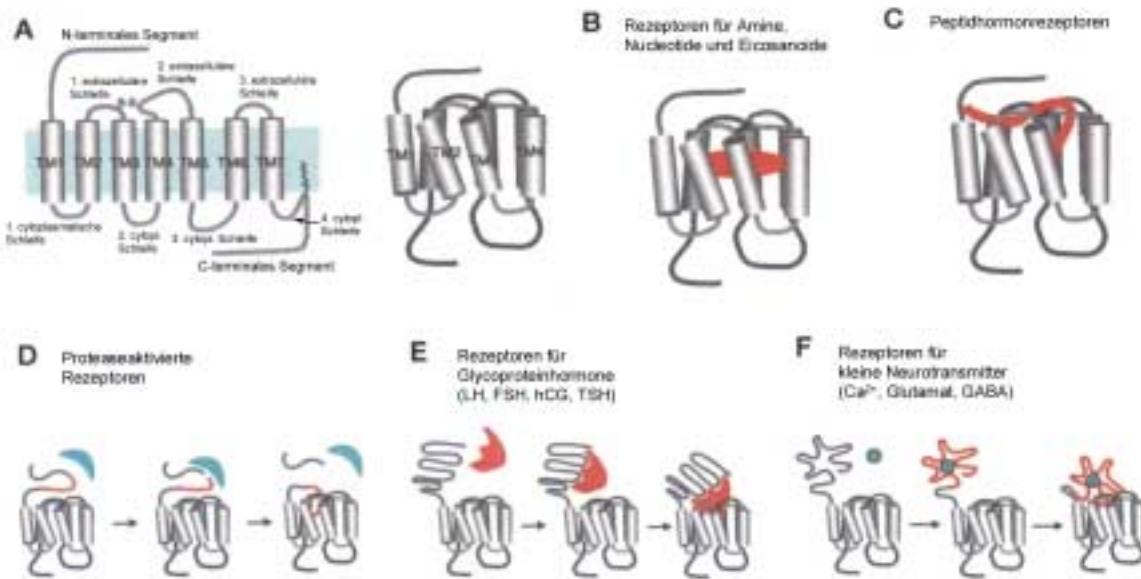
- Y mögliche N-Glycosylierung
- ~~~~~ Palmitoylierung
- Domänen, die mit dem linearen C-terminalen Tripeptid des Oxytocins interagieren
- ..... Domänen, die mit dem cyclischen Teil des Oxytocins interagieren
- ..... Reste, die für die Kopplung von G<sub>q</sub> nötig sind
- \* Reste der polaren Tasche
- ⊗ Reste, die in der Oxytocin-/Vasopressin-Rezeptorsubfamilie konserviert sind
- ⊗ Reste, die in der gesamten Superfamilie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren konserviert sind
- ⊗ Aminosäurerest des FLAG-Epitops
- ⊗ Aminosäurerest des c-Myc-Epitops
- ⊗ Aminosäurerest des Dekahistidintags
- ⊗ irrelevanter Aminosäurerest (durch Klonierung)

**Abbildung 1: Schematisches Modell eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (menschlicher Oxytocinrezeptor)**

Die Aminosäuresequenz des menschlichen OT-Rezeptors ist hier im Einbuchstaben-Code wiedergegeben. Das abgebildete Rezeptorkonstrukt wurde von Dr. G. Gimpl (Universität Mainz) hergestellt und besitzt ein N-terminales FLAG-Epitop, gefolgt von einem c-myc-Epitop und ein C-terminales Dekahistidintag. FLAG-Epitop und Dekahistidintag sollten die Reinigung des Rezeptors im Rahmen dieser Arbeit ermöglichen bzw. dienen, ebenso wie das c-myc-Epitop, dem immunologischen Nachweis des Rezeptors im Western-Blot. Die Struktur von Oxytocin ist in Abbildung 3 dargestellt. Abbildung aus [7], verändert.

### 2.2.2. Ligandenbindung

Die Tatsache, dass mehr als 70 % aller Arzneimittel über GPCRs wirken, spiegelt die Vielfalt der Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wider. Neben dem Photorezeptor Rhodopsin, der durch Photonen aktiviert wird, gibt es Rezeptoren für biogene Amine,  $\text{Ca}^{2+}$ , Nukleotide, Eicosanoide, Peptide, Proteine und Glycoproteine. In folgender Abbildung sind Ligand-Rezeptor-Interaktionen für verschiedene Ligandenklassen gezeigt.



**Abbildung 2: Schematische Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und Ligand-Rezeptor-Interaktionen**

(A) Membrantopologie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR). (B) Biogene Amine, Nucleotide und Eicosanoide binden ausschließlich im Kern der Transmembrandomänen. (C) Peptide mit weniger als 40 Aminosäuren binden zusätzlich an extrazelluläre Schleifen und an das N-terminale Segment. (D) Bei einigen Rezeptoren bindet eine Protease (z. B. Thrombin) an den Rezeptor und spaltet das N-terminale Segment. Das neue N-terminale Segment interagiert als intramolekularer Ligand mit den extrazellulären Schleifen, wohingegen das abgespaltene Peptid im Falle des Thrombinrezeptors die Blutplättchenaggregation stimuliert. (E) Glycoprotein-hormone binden an Rezeptoren mit großen (~ 350 Aminosäuren) N-terminalen Segmenten, die dann mit den extrazellulären Schleifen wechselwirken. (F) Kleine Neurotransmitter binden an sehr große (~ 600 Aminosäuren) N-terminale Segmente, die daraufhin mit membranassoziierten Domänen interagieren können. Abkürzungen: LH = Luteinisierendes Hormon, FSH = Follikel-stimulierendes Hormon, hCG = humanes Choriogonadotropin, TSH = Thyreoidea-stimulierendes Hormon, GABA =  $\gamma$ -Aminobuttersäure (-acid). Abbildung aus [8].

Das aktuellste Modell der Ligand-Rezeptor-Interaktion geht von mindestens drei verschiedenen Rezeptorkonformationen aus [9]: dem nicht mit einem Liganden besetzten Rezeptor (R), dem mit einem Agonisten besetzten und stabilisierten Rezeptor ( $\text{R}^*$ ) und dem durch einen inversen Agonisten stabilisierten Rezeptor ( $\text{R}^0$ ). Inverse Agonisten sind Antagonisten, die gleichzeitig die basale Aktivität des Rezeptors reduzieren. Die basale

Aktivität kommt dadurch zustande, dass der unbesetzte Rezeptor instabil ist und spontan in den aktiven Zustand ( $R^*$ ) übergehen kann. Bindung eines Agonisten führt über mehrere Übergangszustände zu  $R^*$ . Diese Übergangszustände können durch sogenannte partielle Agonisten stabilisiert werden, die den Rezeptor nur zu einem gewissen Grade aktivieren, bzw. durch G-Proteine, welche dann sowohl die Affinität für Agonisten als auch die Kinetik der Konformationsänderungen beeinflussen.

### 2.2.3. Signaltransduktion

Die Rezeptoraktivierung durch einen Agonisten ist zumindest bei Rhodopsin und dem  $\beta$ -adrenergen Rezeptor begleitet von einer kleinen Drehung der TM3 und einer großen Drehung der TM6 (gegen den Uhrzeigersinn bei Blick auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran) [10]. Hierdurch entfernt sich das cytoplasmatische Ende der TM6 von TM3. An der cytoplasmatischen Seite von TM3 befindet sich bei Rezeptoren der Rhodopsin-Familie ein hochkonserviertes DRY-Motiv (im OT-Rezeptor DRC) [11]. Das Arginin dieses Motivs wird im inaktiven Rezeptor durch eine hydrophile Tasche aus polaren Resten von TM1, 2 und 7 festgehalten (Abbildung 1). Rezeptoraktivierung führt zu einer Protonierung des Aspartats, wodurch das Arginin aus der polaren Tasche verdrängt wird. Infolgedessen werden Sequenzen der zweiten und dritten cytoplasmatischen Schleife freigelegt, die dann mit heterotrimeren G-Proteinen interagieren können.

Heterotrimeren G-Proteine sind aus drei Untereinheiten ( $G_\alpha$ ,  $G_\beta$  und  $G_\gamma$ ) aufgebaut. Ein durch einen Agonisten aktivierter Rezeptor interagiert mit der  $\alpha$ -Untereinheit eines inaktiven G-Proteins. Hierdurch kommt es zum Austausch von an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundenem GDP gegen GTP und zur Dissoziation des G-Proteins in die  $\alpha$ - und die  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Sowohl  $G_\alpha \bullet GTP$  als auch  $G_{\beta\gamma}$  können die verschiedensten Effektoren aktivieren oder inaktivieren. Die Hydrolyse des gebundenen GTPs durch die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit inaktiviert diese schließlich und führt zu einer erneuten Assoziation mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit [12].

Bisher sind vier Subfamilien heterotrimerer G-Proteine bekannt, die anhand ihrer  $\alpha$ -Untereinheiten klassifiziert werden und verschiedene Effektorproteine unterschiedlich beeinflussen. Mitglieder der  $G_s$ -Subfamilie stimulieren z. B. die Adenylatzyklase und erhöhen somit den cAMP-Spiegel der Zelle, einige Mitglieder der  $G_i$ -Subfamilie inhibieren hingegen dieses Enzym. Viele  $G_\alpha$ -Proteine wirken auch direkt auf Ionenkanäle, die dann

aktiviert oder inaktiviert werden. Die  $G_{12}$ -Subfamilie wird wahrscheinlich durch Thromboxanrezeptoren aktiviert [13] und reguliert u. a. den  $Na^+/H^+$ -Austausch [14].

Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschließlich mit Rezeptoren, die hauptsächlich an  $G_q$  koppeln. Der Signaltransduktionsweg dieser Rezeptoren wird auf S. 10 am Beispiel des OT-Rezeptors dargestellt. Zunächst sollen jedoch noch die Mechanismen der Signalabschaltung kurz erläutert werden.

#### 2.2.4. Desensibilisierung

Nach länger andauernder Aktivierung der Rezeptoren durch Hormone kommt es zu einer Signalabschaltung, der Desensibilisierung [15]. Innerhalb von Sekunden bzw. Minuten nach seiner Aktivierung wird ein GPCR an Ser/Thr-Resten der cytoplasmatischen Domänen durch cAMP-abhängige Proteinkinasen (PKA), Diacylglycerol-aktivierte Proteinkinasen (PKC) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Proteinkinasen (GRK) phosphoryliert. Diese Proteinkinasen werden selbst im Laufe der Signaltransduktion aktiviert. Phosphorylierung durch PKA oder PKC führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die die Interaktion mit G-Proteinen verhindert, wohingegen nach einer Phosphorylierung durch GRK die Bindung des Proteins Arrestin an den Rezeptor die Kopplung an G-Proteine sterisch unterbindet. Arrestin wiederum bindet Clathrin, das die Endocytose des Rezeptors einleitet. Die Endocytose führt entweder zum lysosomalen Abbau, oder, nach Dephosphorylierung und Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes in Endosomen, zur Rezyklisierung und somit zur Resensitivierung des Systems.

Nach neueren Erkenntnissen dienen Phosphorylierung und Internalisierung von aktivierten GPCRs nicht nur der Signalabschaltung, sondern sind selbst Ausgangspunkt weiterer Signaltransduktionswege [15]. Ein Beispiel ist das „signal switching“ des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors, der im Herzgewebe nach der PKA-katalysierten Phosphorylierung nicht mehr an  $G_s$  sondern an  $G_i$  koppelt. Hier liegt eine Rückkopplungsschleife vor:  $G_s$  aktiviert die Adenylatzyklase, es kommt zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration der Zelle, wodurch die PKA aktiviert wird. Diese phosphoryliert den Rezeptor, der dann an  $G_i$  koppelt, das wiederum die Adenylatzyklase hemmt, aber auch weitere Signaltransduktionswege, wie z. B. den MAP-Kinase-Weg (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Weg), aktiviert. Für die Aktivierung von MAP-Kinasen durch Signalkaskaden, in die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von  $G_i$  involviert sind, ist die Endocytose des Rezeptors essentiell [16,17].

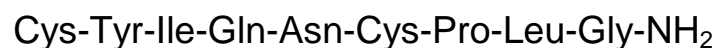
Die einfache Trennung zwischen Aktivierung und Abschaltung von Signalkaskaden kann somit nicht mehr aufrechterhalten werden. Im Gegenteil: Signaltransduktionswege sind vielfach miteinander vernetzt, und die Abschaltung des einen Signals kann zur Aktivierung anderer Signalketten führen.

### 2.2.5. Der Oxytocinrezeptor

Ausgangspunkt für die Untersuchungen der Wechselwirkung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit Cholesterin war der menschliche OT-Rezeptor (Abbildung 1), der für die hochaffine Ligandenbindung Cholesterin essentiell benötigt (S. 23). Daher werden im Folgenden die physiologischen Wirkungen von Oxytocin und die intrazelluläre Signalweiterleitung kurz vorgestellt. Ausführliche Informationen über das OT-Rezeptorsystem findet man in einem Review von G. Gimpl und F. Fahrenholz [7]. Die Signalweiterleitung aller in dieser Arbeit untersuchten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist ähnlich derjenigen des OT-Rezeptors.

#### Oxytocin

Oxytocin (Abbildung 3) ist ein cyclisches Nonapeptidhormon, das als Präprohormon in neurosekretorischen Zellen gebildet wird, deren Zellkörper im *Nucleus supraopticus* und im *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus liegen. Die Axone dieser Zellen enden in der Neurohypophyse. Während des vesikulären, axonalen Transports wird in einer enzymatischen Kaskade aus dem Präprohormon das aktive  $\alpha$ -amidierte Oxytocin und ein Träger-/Schutzprotein (Neurophysin I) freigesetzt. Die Proteine werden in den Axonendigungen gespeichert und nach bestimmten physiologischen Stimuli durch Exocytose in das Blut sezerniert.



#### **Abbildung 3: Die Struktur von Oxytocin**

Das Nonapeptidhormon Oxytocin trägt zwischen den Cysteinresten in Position 1 und 6 eine Disulfidbrücke und liegt C-terminal als Amid vor. Die Struktur wurde gleichzeitig von Tuppy und Michl (1953) und von Du Vigneaud *et al.* (1953) aufgeklärt [18,19].

Oxytocin spielt eine wichtige Rolle auf allen Ebenen der sexuellen Reproduktion. Es fördert zunächst die Fähigkeit, Paarbindungen einzugehen und ist an der Erektion und der Ejakulation beteiligt. Andere Funktionen sind die Kontrolle der Länge des Östruszyklus, der Follikelluteinisierung und der Steroidogenese der Ovarien. Die am längsten bekannten Wirkungen von Oxytocin sind die Stimulation der Uteruskontraktion und der Milchejektion. Zudem sorgt Oxytocin während der Geburt für die Blutgefäßkontraktion in der Nabelschnur. Nach der Geburt fördert Oxytocin schließlich die Beziehung zwischen Eltern und ihrem Nachwuchs.

### Signaltransduktion

Die Signalweiterleitung des aktivierten OT-Rezeptors erfolgt über G-Proteine der Klasse  $G_q$ . Die  $G_\alpha$ -Untereinheit dieser heterotrimeren G-Proteine aktiviert die Phospholipase C $\beta$ , welche daraufhin Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat der Plasmamembran in die sekundären Botenstoffe 1,2-Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-Trisphosphat spaltet. Diacylglycerin verbleibt als hydrophobes Molekül in der Plasmamembran und stimuliert die Proteinkinase C, ist aber auch Ausgangspunkt für die Prostaglandinsynthese. Substrate der Proteinkinase C sind die GPCRs (s. Desensibilisierung, S. 8), die Raf-Kinase, die den MAP-Kinaseweg (Regulation von Wachstums- und Differenzierungsprozessen) aktiviert und weitere Proteine, die so umfassende Prozesse wie die Zellmotilität und den Membrantransport beeinflussen.

Der sekundäre Botenstoff Inositol-1,4,5-Trisphosphat ist wasserlöslich und führt zur Öffnung von Calciumionenkanälen des endoplasmatischen Retikulums und der Plasmamembran. Da die  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration im endoplasmatischen Retikulum und außerhalb der Zelle mit  $10^{-3}$  M 10000-mal so hoch ist wie im Cytosol, kommt es zu einem Anstieg der freien intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Diese Calciumionen aktivieren wiederum die Phospholipase C und kontrollieren gleichzeitig die Inositol-1,4,5-Trisphosphat-vermittelte Calciumfreisetzung. Im Cytosol werden die Calciumionen rasch durch  $Ca^{2+}$ -bindende Proteine wie Calmodulin abgefangen. Ein Effekt von Calcium/Calmodulin-Komplexen in glatten Muskelzellen (z. B. Myoepithelzellen der Brustdrüse oder myometriale Zellen des Uterus) ist die Aktivierung der sogenannten Leicht-Ketten-Kinase des Myosins. Das phosphorylierte Myosin kann dann mit dem Cytoskelettprotein Aktin interagieren, was zur Kontraktion der Muskelzelle führt.

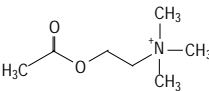
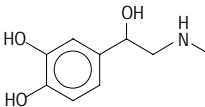
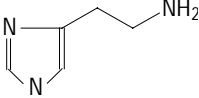
Die Calciumionen werden schließlich durch  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen der Plasmamembran und des endoplasmatischen Retikulums aus dem Cytosol transportiert. Bei sehr hohen cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen werden die Ionen auch in Mitochondrien aufgenommen, aus denen sie später wieder freigesetzt werden.

Die  $\text{G}_{\beta\gamma}$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion. Effektorproteine der  $\text{G}_{\beta\gamma}$ -Untereinheit sind z. B.  $\text{K}^+$ -Kanäle, bestimmte Isoformen der Phospholipase  $\text{C}\beta$  und wahrscheinlich spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle [20].

### 2.2.6. Andere $\text{G}_q$ -gekoppelte Rezeptoren

Die physiologischen Effekte anderer  $\text{G}_q$ -gekoppelter Rezeptoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sollen hier kurz tabellarisch aufgelistet werden:

**Tabelle 1: Physiologische Wirkung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden [21]**

Rezeptor	Ligand	physiologische Wirkung
$\text{M}_3$ muscarinischer Acetylcholinrezeptor	 Acetylcholin	z. B. Kontraktion glatter Muskulatur in verschiedenen Organen (Myometrium, Gallenblase, Harnblase...)
$\alpha$ -adrenerge Rezeptoren	 Adrenalin	z. B. Kontraktion vaskulärer glatter Muskelzellen
Angiotensin II-Rezeptor	Angiotensin-Peptide	Vasokonstriktion und $\text{Na}^+$ - und Wasserreabsorption
$\text{B}_2$ Bradykininrezeptor	Bradykinin-Nonapeptid	z. B. Kontraktion glatter Muskulatur in verschiedenen Organen (Uterus, Trachea...)
Cholecystokininrezeptor Subtyp B	Cholecystokininpeptide	Modulation der Dopaminwirkung im Gehirn, induziert Gallenblasenkontraktion
$\text{H}_1$ Histaminrezeptor	 Histamin	Anstieg der vaskulären Permeabilität bei Inflammation
Thrombinrezeptor	N-Terminus des Rezeptors nach der Rezeptorspaltung bzw. entsprechende Peptide (Abbildung 2)	z. B. Blutplättchenaggregation
$\text{V}_1$ Vasopressinrezeptor	Vasopressin-Peptide	z. B. Kontraktion glatter Muskulatur in verschiedenen Organen (Myometrium, Harnblase...)

## 2.3. Steroidhormone

Die Wirkungsmechanismen der Steroidhormone werden im Folgenden am Beispiel des Progesterons (Abbildung 58) erläutert, dessen Einfluss auf Liganden-induzierte Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in dieser Arbeit untersucht wurde. Als lipophiles Hormon kann Progesteron leicht durch die Plasmamembran diffundieren und an intrazelluläre Rezeptoren binden. Gut charakterisiert sind die genomischen Wirkungen von Progesteron, also seine Wirkungen auf die Transkription bestimmter Gene. Erst in jüngerer Zeit wurde die Bedeutung nicht-genomischer Effekte von Steroidhormonen erkannt. Die Aufklärung der Wirkungsmechanismen ist gegenwärtig das Ziel zahlreicher Forschungsprojekte, deren Zwischenergebnisse auf Tagungen wie dem „First International Meeting – Rapid Responses to Steroid Hormones“ (September 1998 in Mannheim) lebhaft diskutiert werden.

### 2.3.1. Genomische Wirkungen von Progesteron

Progesteron wird im Corpus luteum (Gelbkörper) und ab der 6. Schwangerschaftswoche von der Plazenta gebildet. Seine wichtigsten Aufgaben sind die Vorbereitung des Organismus auf die Schwangerschaft, indem es die Beschaffenheit des Vaginalepithels und des Zervixschleims verändert und somit die Voraussetzungen für die Einnistung (Nidation) der befruchteten Eizelle schafft, sowie der Schwangerschaftserhalt durch Herabsetzen der Ansprechbarkeit des Myometriums auf Oxytocin („Progesteronblock“) [22].

Die genomischen Effekte des Progesterons werden über ein cytosolisches Rezeptordimer vermittelt, das mit den Hitzeschockproteinen Hsp90 und Hsp56 und dem Protein p23 komplexiert ist [23]. Durch Bindung zweier Progesteronmoleküle wird der Rezeptor aktiviert und in den Zellkern transportiert. Dort bindet er an eine DNA-Sequenz, die als Hormone Responsive Element (HRE) bezeichnet wird. Durch direkte oder indirekte Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem Initiationskomplex der Transkription wird die Transkriptionsinitiation stimuliert [6]. Ein Beispiel ist die Expression des Keratinozyten-Wachstumsfaktors, der im Endometrium des Uterus das Wachstum der Spiralarterien stimuliert [24].

Kennzeichnend für eine genomische Progesteronwirkung ist, dass Progesteron in nanomolarer Konzentration wirkt, dass seine Wirkung erst nach einer charakteristischen Zeitspanne (10 Minuten oder länger) nach Kontakt der Zielzelle mit Progesteron eintritt

[25] und dass sie durch einen spezifischen Antagonisten (RU486, „Abtreibungspille“) inhibiert wird [26].

### 2.3.2. Nicht-genomische Wirkungen von Progesteron

Gut untersuchte Beispiele nicht-genomischer Progesteronwirkungen sind die Initiation der Meiose von Amphibienoozyten [27] und die Stimulation der Acrosomenreaktion menschlicher Spermien [28]. Bei menschlichen Spermien induziert Progesteron verschiedene Effekte, die früher eher extrazellulären Liganden, wie z. B. Peptidhormonen zugeordnet wurden: ein rascher Anstieg der freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, Tyrosinphosphorylierung von Proteinen,  $\text{Cl}^-$ -Efflux, Stimulation der Aktivität von Phospholipasen [28], Aktivierung der Proteinkinase C [29] und extrazellulär regulierter Kinasen (ERK = MAP-Kinasen) [30]. Auf der Suche nach Progesteronrezeptoren für nicht-genomische Effekte entdeckten Wehling *et al.* Progesteronbindungsstellen in Membranen des endoplasmatischen Retikulums der Schweineleber [31]. Dieser mögliche Progesteronrezeptor scheint auch von menschlichen Spermien exprimiert zu werden [32]. Andere Arbeitsgruppen favorisieren hingegen plasmamembranständige Progesteronrezeptoren. Desweiteren wird diskutiert, ob die cytosolischen, „klassischen“ Progesteronrezeptoren eventuell auch nicht-genomische Progesteroneffekte ausüben könnten bzw. ob der cytosolische Rezeptor eine N-terminal verkürzte Form des membranständigen Rezeptors darstellen könnte [33].

Die im vorherigen Kapitel erwähnte Reduzierung der Sensitivität des Uterus gegenüber Oxytocin während der Schwangerschaft beruht nach Untersuchungen von Grazzini *et al.* ebenfalls auf einer nicht-genomischen Progesteronwirkung [34]. Grazzini *et al.* postulieren eine direkte, hochaffine Wechselwirkung zwischen Progesteron und dem OT-Rezeptor. Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der Funktionalität des OT-Rezeptors bietet aber auch die Inhibierung des intrazellulären Cholesterintransports durch Progesteron [35]. Ein Interaktionspartner für Progesteron ist in diesem Fall das P-Glycoprotein [36], eine sehr gut charakterisierte ATPase der Plasmamembran, die zur ABC-Superfamilie (ATP-Binding Cassette) gehört [37]. Das P-Glycoprotein transportiert hydrophobe Substanzen, wie z. B. Cholesterin über Membranen. Progesteron stimuliert die ATPase-Aktivität dieses Steroidtransporters, blockiert aber dessen Transportfunktion [38]. Hierdurch wird der intrazelluläre Steroidtransport reversibel inhibiert, so dass Cholesterinvorläufer nicht mehr in das endoplasmatische Retikulum, dem Ort der Cholesterinbiosynthese, gelangen. Folglich hemmt Progesteron die Cholesterinbiosynthese, was letztlich zur

Cholesterinauxotrophie der Zelle führt. Welche Schritte des Cholesterintransports durch Progesteron inhibiert werden, ist in Abbildung 4 dargestellt. Da Cholesterin selbst die Funktion zahlreicher Membranproteine beeinflusst (S. 19 ff.) und insbesondere für die hochaffine Ligandenbindung des OT-Rezeptors essentiell ist, könnte Progesteron indirekt durch die veränderte Cholesterinverteilung die Ansprechbarkeit des Uterus auf Oxytocin reduzieren.

Im Gegensatz zu den genomischen Effekten sind hier oftmals Progesteronkonzentrationen im  $\mu\text{M}$ -Bereich nötig, die jedoch in bestimmten Geweben erreicht werden (S. 175). Charakteristisch für nicht-genomische Progesteronwirkungen ist, dass die maximale Antwort der Zelle innerhalb von Sekunden bis Minuten erfolgt [25] und dass diese nicht durch RU486, dem Antagonisten des „klassischen“ Progesteronrezeptors oder durch Inhibitoren der Proteinbiosynthese blockiert werden kann.

## 2.4. Cholesterin

### 2.4.1. Eigenschaften und Einfluss auf biologische Membranen

Cholesterin ist ein essentielles Lipid vieler eukaryotischer Organismen. Cholesterin ist das Edukt für die Biosynthese von Steroidhormonen, wie z. B. von Gestagenen und Mineralokortikoiden, und ein wichtiger Bestandteil vieler biologischer Membranen. In Zellen von Mammaliern befinden sich etwa 65 – 90 % des „freien“, d. h. nichtveresterten Cholesterins in der Plasmamembran [35], wo Konzentrationen von 200 bis 300  $\mu\text{g}$  Cholesterin/mg Protein vorliegen und das molare Verhältnis von Cholesterin zu Phospholipiden – je nach Zelltyp – bis zu 1:1 betragen kann [39].

Abbildung 25 zeigt die chemische Struktur von Cholesterin. Cholesterin besteht aus einem planaren und relativ starren tetrazyklischen Ringsystem mit einer 3'-Hydroxylgruppe in  $\beta$ -Konfiguration und einer flexiblen Kohlenwasserstoffkette am gegenüberliegenden Ende. Cholesterin lagert sich mit seiner Längsachse senkrecht zur Membranebene in Lipiddoppelschichten ein, so dass die polare  $3\beta\text{-OH}$ -Gruppe in Kontakt mit dem wässrigen Milieu steht, und die Kohlenwasserstoffkette im Zentrum der Lipiddoppelschicht liegt. Durch Interaktion der Kohlenwasserstoffketten zweier Cholesterinmoleküle, die sich in den gegenüberliegenden Hälften der Lipiddoppelschicht befinden, könnte es zur Dimerbildung kommen [40]. Die  $3\beta\text{-OH}$ -Gruppe hingegen interagiert wahrscheinlich mit dem Carbonylsauerstoffatom von Phospholipidkopfgruppen.

Cholesterin beeinflusst viele physikalische Parameter biologischer Membranen. Am bekanntesten ist sein Einfluss auf die Membranfluidität. Cholesterin verhindert durch seine Einlagerung zwischen die Fettsäureketten anderer Lipide deren Kristallisation und somit Phasenübergänge der Lipiddoppelschicht. Darüber hinaus vermindert Cholesterin die Fluidität der Membran, indem es größere Bewegungen der Fettsäureketten verhindert. Das planare Ringsystem von Cholesterin erhöht den Anteil von gestaffelten Konformationen der Kohlenwasserstoffketten von Lipiden, so dass die Dicke der Membran erhöht und die Permeabilität vermindert wird. Durch seine flexiblere Kohlenwasserstoffkette hat Cholesterin hingegen einen geringeren Einfluss auf das Zentrum der Lipiddoppelschicht. Studien an Lipideinzelschichten ergaben, dass Cholesterin einen kondensierenden Effekt hat, also die Oberfläche verringert, die pro gesättigtem bzw. einfach ungesättigtem Phospholipid eingenommen wird. Weitere detaillierte Informationen über Cholesterin findet man in einem Review von P. L. Yeagle mit dem Titel „Cholesterol and the cell membrane“ [39].

#### **2.4.2. Cholesterinverteilung in der Zelle und der intrazelluläre Cholesterintransport**

Zellen haben prinzipiell zwei Cholesterinquellen. Sie können einerseits über plasmamembranständige LDL (low density lipoprotein)-Rezeptoren extrazelluläre Cholesterinester aufnehmen und zum anderen Cholesterin *de novo* aus Acetyl-CoA synthetisieren. Cholesterinester aus LD-Lipoproteinen werden zu den Lysosomen transportiert, in denen durch Hydrolyse Cholesterin freigesetzt wird, das entweder (70 %) durch den Golgi-Apparat hindurch zur Plasmamembran oder (30 %) zum endoplasmatischen Retikulum transportiert wird [35]. Zwischenstufen der Cholesterinbiosynthese (z. B. Lanosterol) werden zunächst zur Plasmamembran [41] und von dort aus zu Mitochondrien, zum Golgi-Apparat, oder – für die letzten Schritte der Cholesterinbiosynthese – wieder zurück zum endoplasmatischen Retikulum transportiert. *De novo* synthetisiertes Cholesterin wird sofort wieder zur Plasmamembran transportiert und gelangt dort zunächst in cholesterinreiche Domänen („Caveolae“ oder „Rafts“, s. S. 18) und danach in cholesterinärmere Mikrodomänen [42,43]. Alternativ hierzu kann *de novo* synthetisiertes Cholesterin durch das Enzym Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) zur Speicherung in cytosolischen Lipidtröpfchen verestert werden [44,45]. In der Plasmamembran befindet sich, wie eingangs erwähnt, der Hauptteil des zellulären Cholesterins, wohingegen am Ort der Cholesterinbiosynthese, dem endoplasmatischen

Retikulum, die Cholesterinkonzentration relativ niedrig ist. Die Beibehaltung der niedrigen Cholesterinkonzentration ist wichtig, da sich im endoplasmatischen Retikulum Proteine befinden, die die Cholesterinhomöostase in der Zelle aufrecht erhalten. Abbildung 4 fasst die Cholesterintransportwege zusammen und zeigt darüber hinaus, dass fast alle Cholesterintransportschritte, jedoch nicht die LDL-Rezeptorvermittelte Aufnahme von Cholesterinestern, durch Progesteron inhibiert werden (s. auch [35]). Progesteron führt zu einer Anhäufung von Cholesterin in Lysosomen und sogenannten Lamellarkörperchen („lamellar bodies“), wie sie auch bei bestimmten Lipidspeicherkrankheiten wie der Niemann-Pick-C-Krankheit beobachtet werden [46]. Progesteron hemmt die Veresterung von Cholesterin eventuell dadurch, dass dem Enzym ACAT im endoplasmatischen Retikulum nicht mehr genügend Cholesterin zur Verfügung steht [47]. Der Progesteron-induzierte Cholesterinmangel im endoplasmatischen Retikulum könnte auch ein Grund dafür sein, dass das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese, die HMG-CoA-Reduktase, aktiviert bzw. vermehrt synthetisiert wird [48]. Die hierdurch gesteigerte Cholesterinbiosynthese läuft allerdings nur bis zur Stufe des Lanosterols ab [49]. Außerdem kommt es durch Progesteron zu einer raschen Reduktion des Cholesteringehalts bestimmter Mikrodomänen der Plasmamembran, den Caveolae [43], die eine wichtige Rolle beim Cholesterintransport und bei Signaltransduktionsprozessen spielen. Sie werden im folgenden Kapitel vorgestellt.



die Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin zwischen den beiden Hälften transportiert [52]. Umstritten ist noch, ob und in welcher Hälfte der Lipiddoppelschicht das Cholesterin angereichert ist [53,54]. Da Cholesterin gut mit Sphingomyelin interagiert, Phosphatidylethanolamin hingegen eine thermodynamisch ungünstige Umgebung für Cholesterin bietet, ist eine Anreicherung in der äußeren Hälfte wahrscheinlich [55]. Diese Anreicherung könnte passiv alleine durch die Verteilung der Phospholipide erfolgen, da Cholesterin durch seinen überwiegend hydrophoben Aufbau sehr leicht zwischen den Hälften der Lipiddoppelschicht hin- und herwechseln kann (sogenannter „flip-flop“) [56]. Die laterale Verteilung von Cholesterin in der Membranebene ist ebenfalls sehr heterogen. In der Membranebene existieren Mikrodomänen von Lipiden und Proteinen, die sich in ihrer Phase, Ladung, in ihrem Glycolipid-, Sphingolipid- oder in ihrem Cholesteringehalt unterscheiden [57]. Für die Interaktion von integralen Membranproteinen, wie den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, und Cholesterin sind glycosphingolipid- und cholesterinreiche Mikrodomänen, sogenannte „Rafts“ (engl. für „Floß“) von besonderer Bedeutung. Rafts wurden erstmals 1988 von Simons und van Meer vorgeschlagen [58] und sind kleine ( $\varnothing \approx 70$  nm), äußerst dynamische Membrandomänen, die wahrscheinlich bei Prozessen wie dem Sortieren apikaler Membranproteine in polarisierten Epithelzellen und bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen (gute Übersichtsartikel: [59-61]).

Eine spezielle Form von Rafts sind Caveolae, kleine Einstülpungen der Plasmamembran, die das Cholesterin-bindende Strukturprotein Caveolin enthalten [62]. Caveolae haben einen Durchmesser von etwa 50 – 100 nm und enthalten ca. 3000 Sphingosinmoleküle. In Caveolae oder Caveolae-ähnlichen Strukturen sind verschiedene Rezeptoren angereichert, wie z. B. der Rezeptor für den aus Blutplättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor (*platelet-derived growth factor*), der  $M_2$  muscarinische Acetylcholinrezeptor und Rezeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor, für Adrenalin, Bradykinin, Endothelin und Cholecystokinin [63]. Darüber hinaus scheinen diese Rezeptoren in den Caveolae funktionell mit Molekülen der Signaltransduktionskaskaden verbunden zu sein, da neben den Rezeptoren z. B. die  $\alpha$ -Untereinheit von G-Proteinen, die Proteinkinase C, die MAP-Kinase, die Adenylatzyklase und die Phosphatidyl-Inositol-Phosphate in Caveolae angereichert sind [64]. Unterstützt werden diese Befunde durch die Beobachtung, dass Caveolin mit einigen Proteinen der Signalkaskaden (z. B. der  $\alpha$ -Untereinheit von G-Proteinen) wechselwirkt und deren Aktivität reguliert [65]. Couet *et al.* identifizierten eine Caveolin-bindende Aminosäuresequenz, die in vielen Caveolae-assoziierten Proteinen zu

finden ist, z. B. in der  $\alpha$ -Untereinheit von G-Proteinen, der Proteinkinase C, der MAP-Kinase und in Rezeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor, den platelet-derived growth factor, für Insulin und in einigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, z. B. dem  $\beta$ -adrenergen Rezeptor, dem Endothelinrezeptor und dem muscarinischen Acetylcholinrezeptor [66]. Caveolin könnte mit diesen Proteinen interagieren und somit die Aktivität verschiedenster Proteine der Signalkaskaden beeinflussen. Der Beweis hierfür muss allerdings noch erbracht werden. Caveolae könnten auch eine Rolle bei der Entstehung von Calciumsignalen spielen. Wie Isshiki *et al.* kürzlich zeigten, findet in Endothelzellen die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern bevorzugt an caveolaereichen Regionen statt [67].

Durch die hohe Cholesterinkonzentration ( $> 300 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) in den Caveolae und die Cholesterin-bindenden Eigenschaften von Caveolin ist es nicht überraschend, dass diese Strukturen wichtig für den intrazellulären Cholesterintransport [43,68] und für den Cholesterinefflux zu extrazellulären Lipoproteinen sind [69]. Alles in allem deuten die Befunde darauf hin, dass die cholesterinabhängige Regulation der Signaltransduktion in Caveolae stattfinden könnte.

## **2.5. Regulation von Membranproteinen durch Cholesterin**

In den letzten zwanzig Jahren wurde verstärkt die Interaktion von Membranlipiden und Proteinen untersucht. Man hatte erkannt, dass Lipide zellulärer Membranen nicht nur für die Kompartimentierung der Zelle wichtig sind und eine Art Lösungsmittel für integrale Membranproteine darstellen, sondern in vielfältiger Weise die Funktion von Proteinen beeinflussen. Gut untersucht ist der Einfluss von Lipiden, insbesondere von Cholesterin, auf den nikotinischen Acetylcholinrezeptor und auf Rhodopsin, da diese beiden Proteine in hoher Dichte in natürlichem Gewebe vorkommen und somit relativ leicht zu reinigen sind. Die funktionelle Abhängigkeit des OT-Rezeptors von Cholesterin wurde Anfang der neunziger Jahre von Uwe Klein in der Arbeitsgruppe von Prof. Fahrenholz entdeckt [70]. In den folgenden Abschnitten werden die unterschiedlichen Aspekte der Regulation von Membranproteinen durch Cholesterin an diesen drei Proteinen dargestellt.

### **2.5.1. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor**

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal, der zum Beispiel in der Membran von Skelettmuskelzellen in der neuromuskulären Endplatte lokalisiert ist. Der Neurotransmitter Acetylcholin öffnet den Kanal, so dass  $\text{Na}^+$ -Ionen in

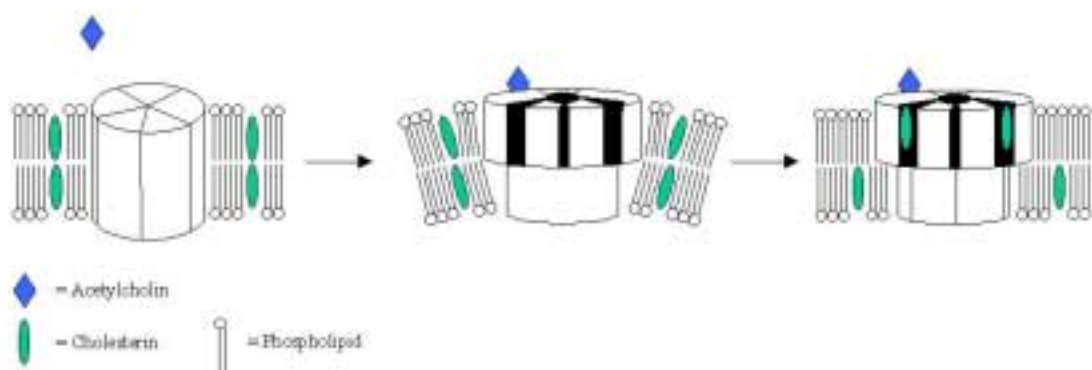
die Zelle und  $K^+$ -Ionen aus der Zelle strömen und die Zelle depolarisiert wird. Der Kanal ist ein multimerer Proteinkomplex aus fünf Untereinheiten, die ringförmig um eine zentrale Pore angeordnet sind. Jede Untereinheit besteht aus jeweils vier Transmembrandomänen (M1 bis M4). Die M2-Domänen der fünf Untereinheiten kleiden die Porenwand aus [71], wohingegen die M4-Domänen in Kontakt mit den umgebenden Lipiden der Membran stehen [72,73].

Rekonstitutionsexperimente ergaben, dass die Ionentranslokation des Acetylcholinrezeptors stark von der Lipidumgebung abhängt [74]. Essentiell für die Ionentranslokation sind neutrale Lipide wie Cholesterin [75]. Da die Anforderungen an die Struktur des Lipids jedoch nicht sehr stringent sind, kann selbst Vitamin D<sub>3</sub> Cholesterin ersetzen [76]. Für eine optimale Ionentranslokation sind neben neutralen Lipiden wie Cholesterin saure Phospholipide wie Phosphatidsäure oder Cardiolipin notwendig [75-79]. Eine Vielzahl experimenteller Befunde, die durch spinmarkierte Steroide [80,81], Infrarotspektroskopie [82], Kalorimetrie [83] oder mit photoaktivierbaren Cholesterinderivaten [84,85] gewonnen wurden, unterstützen die Hypothese einer direkten Wechselwirkung zwischen Cholesterin und dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor. Die Frage war nun, wo die potentiellen Cholesterinbindungsstellen am Rezeptor lokalisiert sein könnten. Allgemein werden die drei folgenden Lipiddomänen unterschieden [57,86]: (1) „bulk lipids“: sie stellen den Großteil der Membranlipide dar und beeinflussen Proteine über die Membranfluidität, (2) „annulare“ Bindungsstellen: sie befinden sich an der Grenze zwischen Rezeptor und den „bulk lipids“ und (3) „nichtannulare Bindungsstellen“: von diesen Lipidbindungsstellen sind die Phospholipide ausgeschlossen. Nach Erkenntnissen von Jones und McNamee bindet Cholesterin an die nichtannularen Stellen (5 – 10 pro Rezeptor), die sich wahrscheinlich zwischen den Untereinheiten und/oder zwischen den Transmembrandomänen der Untereinheiten befinden [87]. Umstritten ist noch, ob es nach Ligandenbindung zu einer Verschiebung der Transmembrandomänen kommt, wodurch bestimmte Cholesterinbindungsstellen leichter, andere hingegen schwerer zugänglich werden [85,88,89].

Neueren Studien von Adonna *et al.* zufolge können die nichtannularen Bindungsstellen weiter eingeteilt werden in Bindungsstellen, die tief im Rezeptor verborgen liegen („interstitial sites“) und in Stellen, die in Kontakt mit der umgebenden Lipiddoppelschicht stehen („periannular sites“) [90]. Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, dass Cholesterin eher an die periannularen Stellen bindet. Adonna *et al.* schlagen zudem einen

hypothetischen Mechanismus vor, durch den Cholesterin die Funktion des Acetylcholinrezeptors unterstützen könnte. Demzufolge führt die Ligandenbindung zu einem Zuwachs des Durchmessers des Rezeptors lediglich in einer Hälfte der Lipiddoppelschicht. Einerseits entsteht durch die Verformung der Lipiddoppelschicht eine Biegespannung, andererseits werden Cholesterinbindungsstellen am Rezeptor zugänglich. Cholesterin könnte nun durch laterale Diffusion an diese „neuen“ Bindungsstellen andocken, die Verformung der Lipiddoppelschicht aufheben und somit den offenen Zustand des Ionenkanals stabilisieren (Abbildung 5).

Darüber hinaus erhöht Cholesterin wahrscheinlich den Anteil an  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen des Acetylcholinrezeptors [74,82]. Inwieweit dies tatsächlich für die Ionentranslokation von Bedeutung ist, muss jedoch noch durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Wichtig ist auf jeden Fall die schützende Wirkung von Cholesterin gegen die thermische Denaturierung des Acetylcholinrezeptors [74]. Dies ist ein Phänomen, das auch bei Rhodopsin (folgendes Kapitel) und später beim OT-Rezeptor beobachtet wurde (s. S. 94).



**Abbildung 5: Modell der Interaktion zwischen Cholesterin und dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor**

Erläuterungen s. Text. Nach [90], verändert.

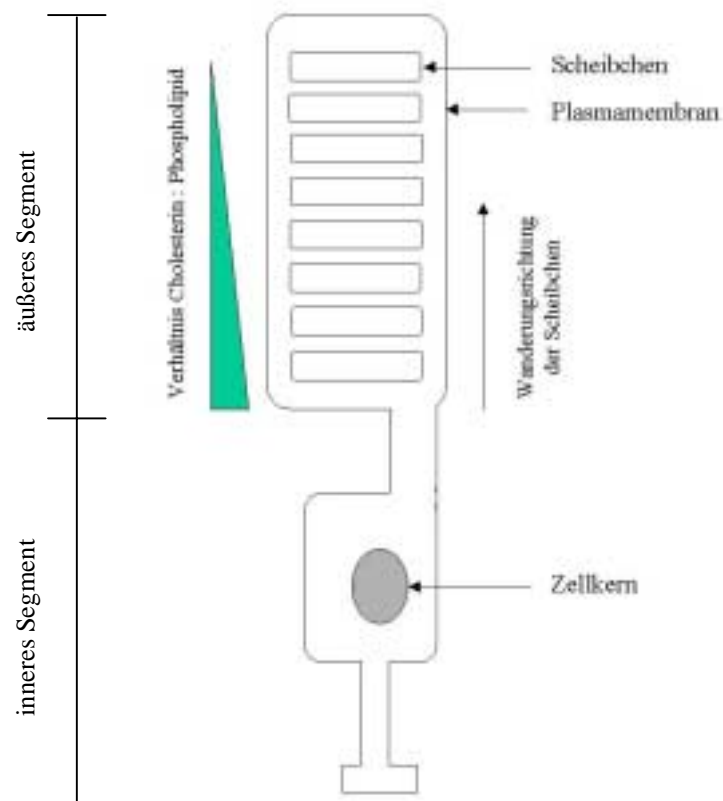
### 2.5.2. Rhodopsin

Der G-Protein-gekoppelte Photorezeptor Rhodopsin aktiviert nach Lichtabsorption eine Signalkaskade, in deren Folge die Sehzelle hyperpolarisiert wird. Licht induziert eine Reihe von Konformationsänderungen des Rhodopsins, wobei die Umwandlung von Metarhodopsin I zu Metarhodopsin II die aktivierte Form des Rezeptors erzeugt [91]. Hohe Cholesterinmengen verschieben das Gleichgewicht zwischen beiden Konformationen in Richtung des Metarhodopsins I [92-94]. Dies bedeutet, dass bei hohen

Cholesterinkonzentrationen Rhodopsin nicht mehr durch Licht aktiviert werden kann [95]. Im Falle des Rhodopsins werden sowohl direkte als auch indirekte Wirkungsmechanismen diskutiert. Ein indirekter Mechanismus könnte die Cholesterin-induzierte Reduktion des freien Volumens für molekulare Bewegungen in der Lipiddoppelschicht sein (s. S. 15), da die Umwandlung von Metarhodopsin I in Metarhodopsin II von einer Volumenexpansion des Moleküls begleitet ist [94,96]. Fluoreszenzenergietransfer-Experimente mit fluoreszierenden Sterolen deuteten hingegen auf eine direkte Interaktion mit Rhodopsin hin [97].

Welche physiologische Bedeutung hat die Unterdrückung der Funktion des Rhodopsins durch Cholesterin? Hierzu muss man wissen, dass das äußere Segment einer Sehzelle (Stäbchen) einen Stapel abgeflachter Membransäckchen (Scheibchen) beinhaltet, in deren Lipiddoppelschicht Rhodopsin eingelagert ist (Abbildung 6). Diese Scheibchen entstehen aus Abschnürungen der Plasmamembran an der Basis des äußeren Segmentes und wandern nach und nach zur Spitze der Zelle, wo sie schließlich durch darüberliegende Zellen phagozytiert werden. Interessanterweise nimmt der Cholesteringehalt dieser Scheibchen während ihrer Bewegung zur Zellspitze hin ab. An der Basis des äußeren Segments entspricht die Cholesterinkonzentration mit 30 % (Mol Cholesterin pro Mol Phospholipid) noch derjenigen der Plasmamembran, wohingegen die ältesten Scheibchen nur noch 5 % Cholesterin besitzen [98]. Ursache für diese Abnahme ist das höhere Verhältnis von Phosphatidylethanolamin zu Phosphatidylcholin (0,92) der Scheibchen im Vergleich zur Plasmamembran (0,16) [99]. Da Phosphatidylethanolamin eine thermodynamisch ungünstige Umgebung für Cholesterin bietet (s. S. 18), findet ein Transfer von Cholesterin aus den Scheibchen zur Plasmamembran statt. Als Konsequenz nimmt die Funktion von Rhodopsin mit dem Alter der Scheibchen zu. In der Plasmamembran schützt Cholesterin das Rhodopsin vor thermischer Denaturierung, so dass es so lange stabilisiert wird, bis es den Ort seiner Funktion erreicht [100].

Die Bedeutung der Cholesterinverteilung wird am Phänotyp des sogenannten „Royal College of Surgeons“ (RCS) Rattenstamms deutlich [101]. Bei diesen Tieren ist die Phospholipidtranslokation gestört, so dass das Verhältnis von Phosphatidylethanolamin zu Phosphatidylcholin der Scheibchen demjenigen der Plasmamembran entspricht [102]. Da als Konsequenz der Cholesteringehalt der Scheibchen genauso hoch wie der der Plasmamembran ist, sind die Tiere trotz eines normalen Rhodopsingehalts blind.



**Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Stäbchens der Netzhaut**  
Erläuterungen s. Text.

### 2.5.3. Der Oxytocinrezeptor

Uwe Klein, ein früherer Doktorand der Arbeitsgruppe von Prof. Fahrenholz, führte Anfang der neunziger Jahre Rekonstitutionsexperimente mit dem OT-Rezeptor aus Meerschweinchenuteri durch [70]. Er konnte zeigen, dass Cholesterin essentiell für die hochaffine Ligandenbindung ist ( $K_d = 1 - 2 \text{ nM}$ ). In weiteren Experimenten änderte U. Klein den Cholesteringehalt von myometrialen Plasmamembranen durch Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD), ein ringförmiges Oligosaccharid, das selektiv Cholesterin aus Membranen entfernt [103] bzw. in Form von Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen zum Einbau von Steroiden in Membranen genutzt werden kann (s. S. 60). Durch Entfernung von Cholesterin ( $> 95 \%$ ) stieg die Dissoziationskonstante des Rezeptors für Oxytocin von  $K_d = 1,5 \text{ nM}$  auf  $K_d = 131 \text{ nM}$  an, ohne dass sich die Anzahl der Bindungsstellen änderte ( $B_{\text{max}} = 1,7 \text{ pmol/mg}$ ) [104]. Dieser Effekt war durch Wiederanreicherung der Membranen mit Cholesterin völlig reversibel. Wurde nur ein Teil des Cholesterins aus den Membranen entfernt, so führte dies zu einem Gleichgewicht zwischen Rezeptoren mit hoher und

Rezeptoren mit niedriger Affinität. Rezeptoren mit mittlerer Affinität wurden nicht beobachtet. Interessant war vor allem, dass eine Inkubation von detergentsolubiliertem Rezeptor mit Cholesterin/M $\beta$ CD-Komplexen ähnliche Effekte hatte. Dies deutete auf eine direkte Interaktion zwischen Cholesterin und dem OT-Rezeptor hin, da im Solubilisat indirekte Cholesterineffekte, wie sie in Membranen beobachtet werden, ausgeschlossen werden können. Erste Experimente mit Cholesterinderivaten zeigten, dass für die hohe Affinität des OT-Rezeptors zu seinem Agonisten insbesondere die 3 $\beta$ -Hydroxylgruppe und der aliphatische Schwanz des Cholesterins von Bedeutung sind [104].

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Cholesterin die Funktion von Membranproteinen sowohl indirekt über Änderungen der biophysikalischen Parameter der Membran als auch durch direkte Interaktion beeinflussen kann. Cholesterin kann, wie im Falle des nikotinischen Acetylcholinrezeptors und des OT-Rezeptors, die Funktion von Membranproteinen unterstützen oder, wie am Beispiel des Rhodopsins gezeigt, zu einer Inhibierung der Signaltransduktion führen. Einige Rezeptoren haben sehr stringente Anforderungen an die Struktur des Cholesterins, wohingegen im Falle des nikotinischen Acetylcholinrezeptors Cholesterin durch Moleküle wie Vitamin D<sub>3</sub> ersetzt werden kann. Cholesterin scheint darüber hinaus die thermische Stabilität von Rezeptoren zu erhöhen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist, Mechanismen der Interaktion zwischen Cholesterin und Membranproteinen am Beispiel G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aufzuklären. Krankheiten, deren Ursache in einem gestörten Cholesterinmetabolismus oder -transport liegt, wie das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom [105], die Niemann-Pick-Krankheit Typ C [106] oder die Tangier-Krankheit [107,108], verdeutlichen die Notwendigkeit, die Auswirkungen von Cholesterin auf zelluläre Prozesse und auf Membranproteine zu erforschen.

## **2.6. Ziele der Arbeit**

Ein Ziel dieser Arbeit war die Markierung der potentiellen Cholesterinbindungsstelle(n) des OT-Rezeptors durch eine kovalente Verknüpfung mit einem radioaktiven photoreaktiven Cholesterinderivat. Dies sollte nach proteolytischem Verdau des markierten Rezeptors eine Identifizierung der Cholesterinbindungsstelle(n) erlauben. Die größte Herausforderung war sicherlich die hierfür notwendige funktionelle Reinigung des OT-Rezeptors. Durch Herstellung eines Fusionsproteins bestehend aus dem menschlichen OT-

Rezeptor mit N-terminalem FLAG-Epitop und einem C-terminalen Dekahistidintag sollte in dieser Arbeit die Reinigung über Anti-FLAG<sup>®</sup> M1-Affinitätschromatographie bzw. Metallchelate-Affinitätschromatographie ermöglicht werden. Darüber hinaus sollte durch Nutzung verschiedener Expressionssysteme eine Überexpression des Rezeptors erreicht werden.

Um die Strategie für die Synthese eines funktionellen photoreaktiven Cholesteriderivats auszuarbeiten, mussten Struktur-Funktionsanalysen durchgeführt werden, in denen verschiedene Steroide auf ihre Wirksamkeit getestet wurden, den menschlichen OT-Rezeptor in den hochaffinen Zustand zu bringen. Somit sollten Positionen am Cholesterinmolekül identifiziert werden, die an einer Wechselwirkung mit dem Rezeptor beteiligt sind. Außerdem sollten die Eigenschaften einer photoreaktiven Gruppe bestimmt werden, die die Funktionalität des Cholesterinderivats nicht beeinträchtigen sollte.

Eine weitere Frage war, inwieweit Liganden-induzierte Calciumsignale verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren von Cholesterin abhängig sind. Zur Beantwortung waren Messungen der Liganden-induzierten Änderung des freien intrazellulären Calciumgehaltes von Zellen geplant, aus denen unterschiedliche Mengen Cholesterin entfernt worden waren. Hinweise darauf, dass nicht alle GPCRs gleichermaßen von Cholesterin abhängig sind, liefert der Cholecystokininrezeptor (CCK-Rezeptor), der funktionell mit Digitonin solubilisierbar ist [109,110]. Dieses Detergens bildet mit Cholesterin unlösliche Komplexe und entfernt somit Cholesterin aus dem Solubilisat [111]. In diesem Zusammenhang war ein weiteres Ziel, die direkten und indirekten Mechanismen näher zu untersuchen, durch die Cholesterin die Ligandenbindungsfunktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren modulieren kann.

Da Progesteron die intrazelluläre Cholesterinverteilung verändert (S. 16), war zudem der Einfluss von Progesteron auf die Signalweiterleitung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren von besonderem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste Experimente zur Aufklärung des noch unbekanntes Wirkungsmechanismus durchgeführt werden.



### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Chemikalien und Geräte

##### Affinitätsmatrices und Gelfiltrationssäulen

Anti-FLAG <sup>®</sup> M1 Affinity Gel	Kodak, CT (USA)
NAP <sup>™</sup> 10-Säule	Pharmacia, Freiburg
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Chelating Sepharose <sup>®</sup> Fast Flow	Pharmacia, Freiburg
TALON <sup>™</sup>	Clontech, CA (USA)
WGA-Agarose	Pharmacia, Freiburg

##### Bindungsstudien und Radioaktivitätszählung

Brandel Cell Harvester	Brandel, Gaithersburg (USA)
Ethylenglykolmonomethylether	Serva, Heidelberg
Flüssigkeitsszintillationszähler Tri-carb 2100 TR	Canberra Packard, Dreieich
GF/C-Glasfaserfilter Whatman	Bender & Hobein, Bruchsal
Hyperfilm-βmax	Amersham Life Sci., Braunschweig
Lipoluma, Lumasolv	LSC, Groningen (Niederlande)
Phosphorimager BAS-1800	Fuji Photo Film, Kanagawa (Japan)
Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe
Szintillationsröhrchen	Canberra Packard, Dreieich

##### Allgemeine Chemikalien und Enzyme

Cholesterinoxidase	Sigma, Deisenhofen
1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien (DPH)	Sigma, Deisenhofen
Filipin	Sigma, Deisenhofen
Fura-2/AM	Fluka, Deisenhofen
Sphingomyelinase	Sigma, Deisenhofen

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

Detergenzien zur Proteinsolubilisierung

CHAPSO	Biomol, Hamburg
Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid	Anatrace, Maumee (USA)

Arbeiten mit DNA

Acrylease <sup>TM</sup>	Stratagene, Heidelberg
Baculogold-DNA	PharMingen (CA/USA)
cDNAs:	
menschlicher Oxytocinrezeptor	Dr. Kimura, Kyoto (Japan)
menschlicher Cholecystokinin <sub>B</sub> -Rezeptor	Dr. Kopin, Boston (USA)
DNA-Längenstandard VII.	Boehringer, Mannheim
Fragmente in bp:	
8000/7100/6000/4800/3500/2700/1900/1850	
/1500/1400/1150/1000/680/490/370	
dNTPs und ddNTPs	Amersham Life Sci., Braunschweig

**Enzyme**

T4-DNA-Ligase	USB (USA)
T4-DNA-Polymerase	NEB, Bad Schwalbach
T4-Polynukleotidkinase	Gibco BRL, Paisley (Schottland)

**Restriktionsendonukleasen [Schnittstelle]**

<i>Bam</i> HI (20 U/ $\mu$ l) [ $\begin{matrix} 5'.G\text{GATC}C..3' \\ 3'.C\text{CTAG}G..5' \end{matrix}$ ]	NEB, Bad Schwalbach
<i>Eco</i> RI (10 U/ $\mu$ l) [ $\begin{matrix} 5'.G\text{AATTC}..3' \\ 3'.C\text{TAAAG}..5' \end{matrix}$ ]	Gibco BRL, Paisley (Schottland)
<i>Sal</i> I (20 U/ $\mu$ l) [ $\begin{matrix} 5'.G\text{TCGA}C..3' \\ 3'.C\text{AGCT}G..5' \end{matrix}$ ]	NEB, Bad Schwalbach

Flachbettgelapparatur für DNA	Eigenbau
Haft-Silan	Pharmacia, Freiburg
Lipofectin	Gibco BRL, Paisley (Schottland)
Macrophor System zur DNA-Sequenzierung	Pharmacia, Freiburg
Primer zur Sequenzierung des Transfervektors pVLMelFlagOTRHis <sub>10</sub>	Dr. H. Reiländer (MPI für Biophysik, Frankfurt am Main)
Quick-seal Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann, München
RNase A	Amersham Life Sci., Braunschweig
Sequense <sup>®</sup> Version 2.0	Amersham Life Sci., Braunschweig
Sequenzierutensilien	

**Oligonukleotide**

Salhistag: 5' TCGACCACCATCACCATCACCATCACCATCACCACTGA 3'

Histag2: 5' TCAGTGGTGATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 3'

Beide Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez (Berlin) bezogen und zur Synthese und Ligation des Dekahistidinadapters *his<sub>10</sub>* eingesetzt:

```
5' TC GAC CAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAC TGA 3'
3'      G GTG GTA GTG GTA GTG GTA GTG GTA GTG GTG ACT 5'
```

Hormone

Peptidhormone	Bachem, Heidelberg
nichtpeptidische Liganden	Sigma, Deisenhofen

Isotopenmarkierte Substanzen

$\alpha$ -[ <sup>35</sup> S]-dATP	Amersham-Buchler, Braunschweig
Natriumbor[ <sup>3</sup> H]hydrid (20 – 40 Ci/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig
[ <i>tyrosyl</i> -2,6- <sup>3</sup> H]Oxytocin (NET-858, 32 Ci/mmol)	NEN Du Pont de Nemours, Bad Homburg
[ <sup>3</sup> H]propionylcholecystokinin-8	Jonas Anders, Universität Mainz

Proteaseinhibitoren

Bacitracin	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Pefabloc	Boehringer, Mannheim
Pepstatin	Bachem, Heidelberg

Protein- und Cholesterinbestimmung, Dünnschichtchromatographie

Bradford Protein-Assay	Bio-Rad, München
BSA	Sigma, Deisenhofen
Cholesterinoxidase-Assay-Kit	Boehringer, Mannheim
HPTLC-Platten (Kieselgel 60)	Merck, Darmstadt
Kieselgel 60	Merck, Darmstadt
2202 Ultrascan Laser Densitometer	LKB, Bromma

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blots

Kaninchen anti-His <sub>6</sub> -Antiserum <i>CERN9414</i>	W. J. DeGrip, Abt. für Biochemie, Zentrum für Augenforschung, Universität Nijmegen eigene Herstellung
anti-c-myc 9E10- Hybridomakulturüberstände	
Maus anti-FLAG M2	Eastman Kodak, New Haven (USA)
anti-Kaninchen Ig, peroxidasegekoppelt	Amersham, Life Sci., Braunschweig
anti-Maus IgG, F <sub>c</sub> -spezifisch, peroxidasegekoppelt	Sigma, Deisenhofen
Semi-Dry-Blotapparatur	Biometra, Göttingen
ECL Western blotting detection system	Amersham Life Sci., Braunschweig
Elektrophorese-Apparatur für große Plattengele (Protean II xi cell)	Bio-Rad, München
Gelschneideapparatur	Bio-Rad, München
Minigel-Elektrophorese	Biometra, Göttingen
Nitrocellulose (Hybond ECL)	Amersham Life Sci., Braunschweig
Protean-II slab cell-Apparatur für Röhrchengele	Bio-Rad, München
Proteinstandards (low range und broad range)	Bio-Rad, München
Whatman-Papier (3MM)	Bender & Hobein, Bruchsal

Sonstige Materialien und Geräte

Bakterieninkubator Infors HT	Infors
Evaporationsapparatur Reacti Therm	Pierce, Rockford (USA)
Fluoreszenzspektrometer Quantamaster	Photon Technology Int., NJ (USA)
Fraktionssammler 2112 Redirac	LKB, Bromma
Glaspotter (Homogenisatoren)	GLW, Würzburg
Hitachi Spektrophotometer U-2000	Colora Messtechnik GmbH, Lorch
Peristaltikpumpe P1	LKB, Bromma
Polytron UltraThorax	Kinematica, Luzern (Schweiz)
Quecksilberdampf Lampe	Leitz, Wetzlar
Rollenmischer CMV-ROM	Fröbel, Lindau
Rotationsverdampfer Rotavapor R-134	Fa. Büchi, Schweiz
UV-Detektor	Knauer, Berlin
UV-Tisch Transilluminator 4000	Stratagene, Heidelberg

Ultraschallgerät Branson Sonifier Cell Disruptor B15 mit Mikrospitze	Heineman, Schwäbisch-Gmünd
<u>Steroide und Methyl-<math>\beta</math>-Cyclodextrin</u>	
Epicholesterol	Steraloids, Wilton (NH/USA)
alle andere Steroide	Sigma, Deisenhofen
Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin	Aldrich, Steinheim
<u>Zellkultur</u>	
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Trypton und Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit (USA)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Osterode
Difco-Agar	Difco Laboratories, Detroit (USA)
DMEM-Flüssigmedium	Sigma, Deisenhofen
DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
FCS	PAA, Linz (Österreich)
G418	Gibco BRL, Paisley (Schottland)
Gentamycin	Gibco BRL, Paisley (Schottland)
Gewebekulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturschalen, 10 und 15 cm Durchmesser	Sarstedt, Nürnbrecht
L-Glutamin, 200 mM	BioConcept, Umkirch
Grace's-Pulvermedium	Gibco BRL, Paisley (Schottland)
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kühlbrutschrank Typ BK 600 für Insektenzellen	Heraeus, Osterode
Laktalbuminhydrolysat (50 x )	Gibco BRL, Paisley (Schottland)
low melting point (LMP)-Agarose	Gibco BRL, Paisley (Schottland)
Mikrotiterplatten (6- und 96-Napf)	Greiner, Nürtingen
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Thoma-Zählkammer (0.1 mm x 0.04 mm <sup>2</sup> )	Brandt, Wertheim
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml/10 mg/ml)	Sigma, Deisenhofen

Sf 1-Medium	BioConcept, Umkirch
Sterilwerkbank Klasse 2	Nunc, Wiesbaden
Umkehr-Phasenkontrastmikroskop	Olympus, Japan
Yeastolate (50 x )	Gibco BRL, Paisley (Schottland)

### Zelllinien

- Bakterienzelllinie *Escherichia coli* **DH5 $\alpha$**  ( $\phi$ 80 $\delta$ lacZ $\Delta$ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ( $r_k^- m_k^+$ ), *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta$ (lacZYA-argFV169), F<sup>-</sup>,  $\lambda^-$ ): Clontech, Heidelberg
- Lepidopterezelllinie *Spodoptera frugiperda* **9** (*Sf 9*) (stammt aus dem Ovar von Larven der Gemüseeule (*Spodoptera frugiperda*)): ATCC, Rockville (USA), Nr. CRL1711
- **CHO-K1** (Chinese hamster ovary-Zellen): ATCC, Rockville (USA), Nr. CCL-61
  - **CHO-OTR** (CHO-K1 stabil transfiziert mit dem menschlichen Oxytocinrezeptor): Dr. G. Gimpl (Institut für Biochemie, Universität Mainz)
- **HEK293** (menschliche embryonale Nierenzelllinie): ATCC, Rockville (USA), Nr. CRL1573
  - **HEK-OTRhis** (HEK293 stabil transfiziert mit einem menschlichen Oxytocinrezeptor-Konstrukt (N-terminales FLAG-Epitop, gefolgt von einem c-myc-Epitop und ein C-terminales Dekahistidin-tag, s. Abbildung 1): Dr. G. Gimpl
  - **HEK-OTRmyc** (HEK293 stabil transfiziert mit einem Oxytocinrezeptor-Konstrukt (N-terminales c-myc-Epitop)): Dr. G. Gimpl
  - **HEK-OTR** (HEK293 stabil transfiziert mit einem Oxytocinrezeptor-Konstrukt (N-terminales c-myc-Epitop und C-terminales FLAG-Epitop)): Dr. G. Gimpl [112]
  - **HEK-V<sub>1</sub>R** (HEK293 stabil transfiziert mit dem menschlichen Vasopressinrezeptor Typ V<sub>1a</sub>): Dr. M. Thibonnier, Ohio (USA)
  - **HEK-CCKR** (HEK293 stabil transfiziert mit dem menschlichen Cholecystokininrezeptor Typ B (N-terminales c-myc-Epitop): Dr. G. Gimpl [112]
- **1321N1** (menschliche Astrocytoma-Zelllinie): Dr. M. Toews, Nebraska (USA)

- Hybridomazelllinie **anti *c-myc* CT14-G4.3 Hybridoma** (zur Herstellung von anti-*c-myc*-Antikörpern): ATCC, Rockville (USA), Nr. CRL1727.

### Zentrifugen

Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann, München
Mikroliterkühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Vakuumzentrifuge Speed-Vac	Savant Instruments, NY (USA)
Tischzentrifuge	Sorvall
Ultrazentrifuge L7-65 (Rotoren Ti60 und VTi65.1)	Beckmann, München

## **3.2. Häufig benutzte Puffer und Zellkulturmedien**

Zur Zubereitung aller Puffer, Bakterienmedien und von TNM-FH-Komplettmedium wurde gereinigtes Wasser aus einer Millipore Milli Q-Wasserreinigungsanlage verwendet.

### **3.2.1. Puffer**

Anisotropiepuffer: 10 mM Tris/HCl (pH = 7,0); 20 mM NaCl

Auftragspuffer: 0,4 % (w/v) Bromphenolblau, 0,4 % (w/v) Xylencyanol, 50 % (w/v) Glycerin

Bindungspuffer (für OT-Rezeptor): 20 mM HEPES/NaOH (pH = 7,4); 5 mM MgCl<sub>2</sub>

Bindungspuffer (für CCK-Rezeptor): 10 mM HEPES/NaOH (pH = 7,4); 120 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 % (v/v) Glycerin; 1 mM EGTA

Calciumpuffer: 10 mM HEPES (pH = 7,4); 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM Glucose

CHAPSO-Solubilisierungspuffer: 0,8 % (w/v) CHAPSO; 20 mM HEPES/NaOH (pH = 7,4); 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 300 mM NaCl; 10 % (w/v) Glycerin; 0,1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD (S. 60)

Filtrationspuffer (für OT-Rezeptor): 10 mM Tris/HCl (pH = 7,4); 5 mM MgCl<sub>2</sub>

Filtrationspuffer (für CCK-Rezeptor): 10 mM HEPES/NaOH (pH = 7,4)

HBS: 10 mM HEPES (pH = 7,4); 140 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>

Hypotonischer Lysispuffer: 10 mM HEPES/NaOH (pH = 7,4); 5 mM EDTA; 10  $\mu$ g/ml Leupeptin; 0,1 mg/ml Pefabloc; 0,1 mg/ml Bacitracin; 5  $\mu$ g/ml Pepstatin A

PBS: 137 mM NaCl; 27 mM KCl; 7,1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7,4 mit 2 N NaOH eingestellt)

Probenpuffer (SDS-Gelelektrophorese): 4 % SDS; 20 % Glycerin; 130 mM Tris/HCl (pH = 6,7 bei RT); 0,01 % Bromphenolblau; 200 mM DTT

50 x TAE-Puffer: 242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA; pH = 8,0 in 1 Liter Wasser

TBE-Puffer: 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH = 8,3.

TBS-Puffer: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 3 g Tris; in 1 Liter Wasser; pH = 7,4 mit HCl.

TBS-T: TBS-Puffer mit 0,1 % TWEEN20

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH = 8,0); 1 mM EDTA

Towbin-Transferpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20 % (v/v) Methanol; 0,05 % (w/v) SDS; pH = 8,3 stellt sich selbst ein.

### **3.2.2. Zellkulturmedien**

DMEM-Komplettmedium: DMEM-Flüssigmedium wurde durch Zusatz von 5 ml 200 mM L-Glutamin, 5 ml P/S und 50 ml FCS (bei HEK293-Zellen) bzw. 25 ml FCS (1321N1-Zellen) pro 500 ml Medium supplementiert. Alle Medien wurden nach der Supplementierung im Dunkeln bei 4 °C gelagert und innerhalb von 14 Tagen verbraucht.

DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM-Komplettmedium: (für CHO-K1-Zellen) DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM-Flüssigmedium wurde durch Zusatz von 5 ml 200 mM L-Glutamin, 5 ml P/S und 50 ml FCS pro 500 ml Medium supplementiert.

LB-Medium: 10 g Bactotryptone, 5 g Bacto Yeast Extract, 10 g NaCl in 1 l Wasser, pH = 7,0 eingestellt und autoklaviert

LB Amp-Medium: Wie LB-Medium. Dem nach dem Autoklavieren abgekühlten Medium wurden 200 mg/l Ampicillin zugesetzt.

LB Amp-Agar: Wie LB-Medium, jedoch zusätzlich 15 g/l Difco-Agar. Nach dem Autoklavieren wurde dem im Wasserbad auf 60 °C temperierten LB Amp-Agar 200 mg/l Ampicillin zugesetzt.

Sf 1-Komplettmedium: Sf 1-Flüssigmedium wurde durch Zusatz von 11,6 ml 200 mM L-Glutamin, 1 ml Gentamycinlösung (25 mg/ml in Wasser; 0,2 µm sterilfiltriert) und 25 ml FCS pro 500 ml Medium supplementiert.

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 eingestellt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Mediums wurden 5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> und 5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> (0,2 µm sterilfiltriert) pro Liter zugesetzt.

SOC-Medium: Wie SOB-Medium, zusätzlich wurden nach dem Abkühlen des Mediums 20 ml 1 M Glucose (0,2 µm sterilfiltriert) pro Liter zugesetzt.

TNM-FH-Medium: Grace's Pulvermedium wurde in der entsprechenden Menge Wasser gelöst. Nach Zusatz von 3,5 g NaHCO<sub>3</sub> 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) und 20 ml FCS pro 400 ml Medium supplementiert.

### **3.3. Allgemeine Methoden**

#### **3.3.1. Absorptionsmessungen im visuellen und UV-Bereich**

Absorptionsmessungen wurden in einem Hitachi-Spektralphotometer U2000 durchgeführt. Die zu messende Lösung wurde luftblasenfrei in eine Küvette überführt, der Messwert wurde nach 15 s Wartezeit abgelesen. Während der Messung wurde gegen Puffer abgeglichen. Für Messungen bei Wellenlängen < 300 nm wurden Quarzküvetten, für Messungen bei Wellenlängen > 300 nm Acrylhalbmikroküvetten verwendet.

#### **3.3.2. Proteinfällung**

Die quantitative und qualitative Analyse proteinhaltiger Lösungen durch Proteinbestimmung bzw. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfordert oft eine Konzentrierung der Probe bei zu starker Verdünnung oder das Abtrennen störender Substanzen wie z. B. Puffer, Salze, Detergenzien und Lipide.

Die quantitative Fällung von Proteinen erfolgte nach einer Methode von Wessel und Flügel [113]. Hierfür wurden 10 µl bis 50 µl der wässrigen Proteinprobe in einem

Reaktionsgefäß vorgelegt. Nacheinander wurden 400 µl Methanol, 100 µl Chloroform und 300 µl Wasser dazugegeben, wobei die Probe zwischen den einzelnen Schritten gut durchmischt und kurz (10 s) abzentrifugiert wurde. Die Probe wurde anschließend für 10 min in einer Mikroliterzentrifuge bei 20.000 x g zentrifugiert. Die Proteine präzipitierten an der Phasengrenze. Die obere Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen. Zur unteren Phase wurden 400 µl Methanol gegeben, die Probe wurde gut durchmischt und zur Pelletierung der Proteine 15 min wie oben zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet bei 30 °C getrocknet und anschließend entweder zur Proteilmengenbestimmung in Ameisensäure (folgendes Kapitel) oder zur Elektrophorese in Probenpuffer aufgenommen.

### **3.3.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Proteinbestimmung)**

Zur quantitativen Bestimmung des Proteingehalts einer Probe wurde die Methode von Bradford verwendet, die auf der nichtkovalenten Bindung des Farbstoffes Coomassie Blue (Natriumanazolen) an Proteine beruht [114]. Die Komplexierung von Coomassie Blue an das Protein überführt den Farbstoff vom kationischen (rot) in den anionischen Zustand (blau), wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von  $\lambda = 465$  nm nach  $\lambda = 595$  nm verschiebt. Durch Vergleich mit den Absorptionwerten einer BSA-Eichkurve bei  $\lambda = 595$  nm kann die Proteinkonzentration einer Probe berechnet werden. Substanzen wie Detergenzien oder basische Puffersubstanzen stören das Protonierungsgleichgewicht durch direkte Bindung an den Farbstoff oder durch pH-Änderung und müssen daher zuvor durch Proteinfällung (vorheriges Kapitel) entfernt werden.

Eichkurve: 50 µl einer wässrigen Lösung mit 0 bis 10 µg BSA wurden 10 min lang mit 50 µl Ameisensäure (100 %) bei RT inkubiert. Anschließend wurden 900 µl 1:5 verdünntes Roti<sup>®</sup>-Quant (Färbelösung der Firma Roth, enthält Coomassie Brilliant Blue-G250) dazugegeben. Die Ansätze wurden gut durchmischt und 30 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde in einem Photometer bei  $\lambda = 595$  nm gemessen.

Proben: Gefälltes Protein (S. 35) in 50 µl Ameisensäure (100 %) wurde mit 50 µl Wasser gemischt. Die Proteinmenge sollte hierbei im Bereich der Eichkurve liegen, so dass bei Bedarf eine Verdünnungsreihe angesetzt wurde. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie bei den Ansätzen der Eichkurve.

### 3.3.4. Lipidextraktion

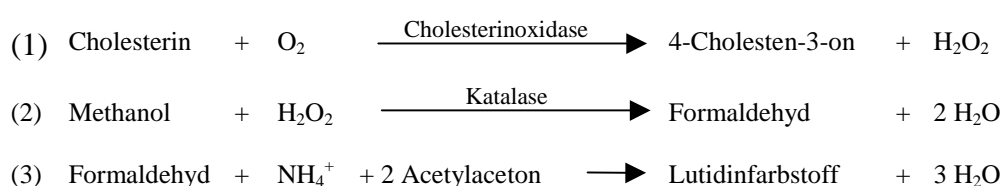
Zur Extraktion von Gesamtlipiden aus Proben wurde die Methode von Bligh und Dyer (1959) [115] in leicht modifizierter Form verwendet. Die Probe wird hierbei in einem Einphasen-System aus Chloroform : Methanol : H<sub>2</sub>O (1 : 2 : 0,8 (v/v)) homogenisiert. Die Wassermenge beinhaltet dabei den Wassergehalt der Probe. Weiterer Zusatz von Chloroform und H<sub>2</sub>O führt zu einem Zweiphasensystem der Zusammensetzung Chloroform : Methanol : H<sub>2</sub>O (2 : 2 : 1,8 (v/v)). Lipide gehen in die untere Chloroform-Phase, die restliche Probe geht in die obere Methanol-Wasser-Phase über.

#### Durchführung:

300 µl wässrige Probe (bis zu 1 mg Protein) wurden mit 375 µl Chloroform und 750 µl Methanol gut gemischt, 15 min bei 40 °C inkubiert und nochmals gut gemischt. Anschließend wurde der Ansatz bei RT für 10 min bei 20.000 x g in einer Mikroliterzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 375 µl Chloroform und 375 µl H<sub>2</sub>O vermischt. Der Ansatz wurde bei RT für 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und verworfen, das Chloroform der unteren lipidhaltigen Phase wurde durch N<sub>2</sub> evaporiert (Reacti Therm-Apparatur). Bis zur weiteren Analyse wurden die Lipide bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.3.5. Bestimmung des Cholesteringehaltes einer Probe (Cholesterinbestimmung)

Der Cholesteringehalt einer Probe wurde mit Hilfe eines Enzymtests der Firma Boehringer-Mannheim bestimmt. Bei diesem Test wird Cholesterin durch eine Cholesterinoxidase zu 4-Cholesten-3-on umgesetzt (s. folgende Reaktionsgleichung (1)). Das hierbei entstehende Wasserstoffperoxid oxidiert Methanol in Gegenwart einer Katalase zu Formaldehyd (2). Formaldehyd schließlich bildet mit Acetylaceton in Gegenwart von NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen den gelben Lutidinfarbstoff 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin (3), dessen Menge der Cholesterinmenge der Probe äquivalent ist und der aufgrund seiner Absorption bei λ = 405 nm bestimmt werden kann.



Durchführung:

Die aus einer Probe extrahierten Lipide (S. 37) wurden in Isopropanol aufgenommen, wobei die geschätzte Cholesterinkonzentration zwischen 1,5 – 40 µg pro 80 µl Isopropanol liegen sollte. 80 µl der Probe in Isopropanol wurden mit 1 ml der auf RT gebrachten Reaktionslösung des Enzymtests gemischt. Hiervon wurden 500 µl abgenommen und in einem zweiten Reaktionsgefäß mit 4 µl der Cholesterinoxidase-Lösung gemischt. Der Ansatz ohne Enzym-Lösung diente bei der photometrischen Analyse als Referenz. Beide Ansätze wurden bei 37 °C im Wasserbad eine Stunde lang inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wurde die Extinktion des enzymhaltigen Ansatzes bei  $\lambda = 405$  nm gegen die Referenz bestimmt.

Die Cholesterinkonzentration in der Isopropanollösung berechnet sich wie folgt:

$$c = \frac{V \cdot M}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E \text{ [}\mu\text{g}/\mu\text{l]}, \text{ wobei}$$

- V = Testvolumen [ml]
- v = Probevolumen [ml]
- M = molare Masse von Cholesterin [g/mol]
- d = Schichtdicke [cm]
- $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient des Lutidinfarbstoffes bei  $\lambda = 405$  nm  
= 7,4 [l · mmol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>]

**3.3.6. Dünnschichtchromatographie**

Lipidextrakte in Chloroform bzw. Produkte der Synthese von 6,6-Azocholestanol im jeweiligen Lösungsmittel (S. 64) wurden auf Kieselgel G-Platten (HPTLC-Platten, Merck) aufgetragen. Die Laufmittel sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben. Nach dem Lauf wurden die Platten getrocknet und durch eine der folgenden Methoden entwickelt:

- Anfärben der Substanzen durch Ioddämpfe
- Besprühen der Platten mit Schwefelsäure:Methanol (1:1) und Veraschen auf einer Heizplatte (120 °C, 30 min). Quantifizierung erfolgte hier durch Intensitätsbestimmung der Lipidflecken mit einem Laserdensitometer.
- [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol: Autoradiographie durch 15-minütige Exposition eines Hyperfilm-MP (Amersham)

### 3.3.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung eines Proteingemischs nach dem Molekulargewicht der einzelnen Proteine. Hierfür wird die Tertiärstruktur der Proteine durch SDS und Mercaptoethanol bzw. Dithiothreitol (DTT) zerstört. Ein SDS-Molekül heftet sich an etwa zwei Aminosäurereste, löst nichtkovalente Wechselwirkungen im Protein und versieht dieses mit negativen Ladungen, deren Anzahl dem Molekulargewicht des Proteins proportional ist. Mercaptoethanol bzw. Dithiothreitol reduzieren Disulfidbrücken. Die stark negativ geladenen Proteine werden anschließend in einem elektrischen Feld durch ein SDS-Polyacrylamidgel getrennt, das hierbei als Molekularsieb wirkt.

In dieser Arbeit wurden diskontinuierliche Gele nach Laemmli verwendet [116]. Die Proteine durchlaufen zunächst ein Sammelgel, dessen große Poren zu einer Konzentrierung der Probe zu engen Banden führen und anschließend ein Trenngel, in dem die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Größe des Trenngels betrug bei Plattengelen  $6 \times 8 \text{ cm}^2$  (Minigel) bzw.  $12 \times 16 \text{ cm}^2$  (großes Gel) bei einer Dicke von 1 mm. Die Laufstrecke durch das Sammelgel betrug 1 cm (Minigel) bzw. 3 cm (großes Gel). Röhrengelle, in denen Proteine nach der Photoaffinitätsmarkierung aufgetrennt wurden (S. 68), hatten einen Durchmesser von 5 mm, das Trenngel war 9 cm, das Sammelgel 1 cm lang.

Die Gele hatten folgende Zusammensetzung (w/v):

Substanz	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	10 %	3,75 %
N,N'-Methylenbis(acrylamid)	0,27 %	0,1 %
Tris	375 mM (pH = 8,9)	126 mM (pH = 6,8)
APS	0,05 %	0,075 %
TEMED	0,05 % (v/v)	0,08 % (v/v)

Vor der Auftragung auf das Gel wurde die Probe (Membranen oder Proteinpellet nach Proteinfällung, S. 35) in Probenpuffer aufgenommen und eine Stunde bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  geschüttelt.

Probenpuffer:

4	%	SDS
20	%	Glycerin
130	mM	Tris/HCl (pH = 6,7 bei RT)
0,01	%	Bromphenolblau
200	mM	DTT

Laufpuffer:

0,2	%	SDS
28,9	g/l	Glycin
6	g/l	Tris (pH = 8,9 bei RT)

Der Gellauf erfolgte bei Minigelen bei 10 mA solange die Probe sich im Sammelgel befand. Nach Übergang der Probe in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Große Plattengele liefen über Nacht bei einer Stromstärke von 7 mA. Am nächsten Tag wurde die Stromstärke auf 60 mA erhöht. Röhrchengele liefen über Nacht bei einer konstanten Spannung von 20 V, die am nächsten Tag auf 100 V erhöht wurde.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden entweder durch Silberfärbung sichtbar gemacht (folgender Abschnitt), oder das Gel wurde zur  $\beta$ -Szintillationszählung (S. 68) aufbereitet. Zum Nachweis eines bestimmten Proteins wurde das SDS-Polyacrylamidgel für einen Western-Blot (S. 40) verwendet.

### 3.3.8. Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Diese empfindliche Methode zum Anfärben von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen hat eine Nachweisgrenze von 10 ng Protein pro Proteinbande. Zur Silberfärbung nach Wray *et al.* [117] wurden die Proteinbanden durch Schwenken des Gels in Methanol:Wasser (1:1) für mindestens zwei Stunden fixiert. Anschließend wurde das Gel für 15 min in ammoniakalischer Silbernitratlösung (0,8 g Silbernitrat, 1,4 ml 25 %ige  $\text{NH}_3$ -Lösung, 21 ml 0.36 % (w/v) NaOH in 100 ml Wasser) geschwenkt. Nach der Färbung wurde das Gel gewässert (4 x 5 min), und die Proteinbanden wurden durch Schwenken in Entwicklerlösung (50 mg Zitronensäure-Monohydrat, 0,5 ml Formaldehyd in 1 l Wasser) sichtbar gemacht. Waren die Banden gut sichtbar, wurde die Entwicklung durch Waschen in Methanol:Wasser (1:1) gestoppt.

### 3.3.9. Western-Blotting

Für den immunologischen Nachweis durch einen Western-Blot wurden die Proteine in einem SDS-Polyacrylamid-Plattengel nach ihrem Molekulargewicht getrennt (S. 39). Eine Nitrocellulose-Membran und sechs Lagen 3MM Whatman-Filterpapier wurden auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und kurz in Towbin-Transferpuffer (S. 34) inkubiert.

Der Blotsandwich wurde luftblasenfrei aus drei Lagen Whatman-Filterpapier, dann der Nitrocellulose-Membran auf der Anodenseite des Gels, dann dem Gel und zum Abschluß aus drei weiteren Lagen Whatman-Papier aufgebaut. Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte für 90 min (Minigele) bzw. 3 Stunden (große Gele) bei RT und konstant 200 mA. Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulose-Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 45 min in Blockierungslösung (5 % Milchpulver in TBS (S. 34), Prozentangabe bezieht sich auf Proteinmenge des Milchpulvers) geschwenkt und anschließend mit TBS-T (TBS, 0,1 % TWEEN20) gewaschen (3 x 10 min). Je nachdem, welches Epitop bzw. „tag“ im Western-Blot nachgewiesen werden sollte, wurde eine der drei folgenden Methoden angewendet:

- **c-myc-Epitop:**

Erstantikörper: Blot mit Hybridomaüberstand 9E10 eine Stunde bei RT inkubieren

Zweitantikörper: anti-Maus IgG (Sigma), F<sub>c</sub>-spezifisch, peroxidasegekoppelt, 1:2000 in 5 % Milchpulver/TBS; 30 min bei RT

- **FLAG-Epitop:**

Erstantikörper: anti-FLAG M2 1:300 in 5 % Milchpulver/TBS-T; eine Stunde bei RT

Zweitantikörper: anti-Maus IgG (Sigma), F<sub>c</sub>-spezifisch, peroxidasegekoppelt, 1:4000 in 5 % Milchpulver/TBS-T; 30 min bei RT

- **His<sub>10</sub>-tag:**

Erstantikörper: anti-His<sub>6</sub>-Antiserum 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS, ÜN bei 4 °C inkubieren

Zweitantikörper: anti-Kaninchen Ig (Amersham), peroxidasegekoppelt, 1:1000 in 5 % Milchpulver/TBS, zwei Stunden bei RT inkubieren

Nach der Inkubation mit dem Erst- bzw. Zweitantikörper wurde die Membran jeweils in TBS-T geschwenkt (zweimal kurz, zweimal 5 min und zweimal 10 min) und danach noch mit TBS gewaschen bis das TWEEN20 entfernt war. Die Blotmembran wurde mit dem ECL-Western-Blotting-Kit von Amersham-Buchler nach den Angaben des Herstellers entwickelt.

## 3.4. Molekularbiologische Methoden

### 3.4.1. Kultivierung von *E. coli* DH5 $\alpha$

Zur Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  verwendete hitzestabile Lösungen wurden bei 120 °C, 2 bar für 20 min autoklaviert, hitzeempfindliche Lösungen durch einen 0,2  $\mu$ m-Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert. Glasgeräte wurden für 2 Stunden bei 180 °C, Zentrifugenbecher mit 80 % Ethanol sterilisiert.

Zur Plasmid-Mini-Schnellpräparation wurden 5 ml LB Amp-Medium mit einer sauber getrennten Einzelkolonie des gewünschten Klons angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Zur Plasmid-Maxi-Präparation wurden 3 ml LB-Amp-Medium mit einem Klon plasmidtransformierter *E.coli* DH5 $\alpha$  angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in 400 ml LB-Amp-Medium überführt und für weitere 18 Stunden bei 37 °C geschüttelt.

### 3.4.2. Herstellung kompetenter Zellen von *E.coli* DH5 $\alpha$

In einem 12 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 3 ml LB-Medium mit Bakterien angeimpft und für 18 Stunden bei 37 °C im Bakterieninkubator geschwenkt. Die 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. Dann wurden die Bakterien bei 3500 x g und 4 °C für 10 min in der Kühlzentrifuge sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 ml eiskaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und für 15 min in Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien erneut unter gleichen Bedingungen sedimentiert, in 20 ml eiskaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub>/10 % (w/v) Glycerin resuspendiert und für 2 Stunden in Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden in 200  $\mu$ l-Portionen bei –70 °C gelagert.

### 3.4.3. Transformation von *E.coli* DH5 $\alpha$

Zur Transformation von *E.coli* DH5 $\alpha$  wurde eine 200  $\mu$ l-Portion kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid-DNA oder 100 ng DNA aus einem Ligationsansatz vermengt. Die Bakteriensuspension wurde 20 min auf Eis inkubiert, dann für 90 s auf 42 °C erwärmt und anschließend für 3 min auf Eis abgekühlt. Nach Zusatz von 2 ml SOC-Medium wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 3500 x g und 4 °C für 5 min in der Tischzentrifuge sedimentiert. Die

transformierten Bakterien wurden auf LB-Amp-Agar ausgestrichen und bis zur Sichtbarkeit von Kolonien bei 37 °C inkubiert.

#### **3.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA**

##### Minipräparation von Plasmid-DNA

2 ml einer plasmidtragenden Bakterien-Übernachtskultur wurden 10 min bei RT und 3500 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und Mediumreste mit einer Pasteurpipette entfernt. Nach Zugabe von 300 µl P1 (50 mM Tris/HCl (pH = 8,0); 10 mM EDTA und 100 µg/ml RNase A) wurde das Zellpellet klumpenfrei homogenisiert. Anschließend wurden 300 µl P2 (200 mM NaOH; 1 % SDS) zugesetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und bei RT 5 min inkubiert. Anschließend wurden 300 µl P3 (3,0 M KAc, pH = 5,5) dazugegeben, der Ansatz wurde wieder vorsichtig gemischt und bei RT 15 min in einer Mikroliterzentrifuge bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben und nochmals wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben, und die DNA wurde mit 55 % (v/v) Isopropanol bei RT eine Stunde lang gefällt. Der Ansatz wurde bei RT 30 min lang in der Mikroliterzentrifuge bei 20.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, nach dem Trocknen in H<sub>2</sub>O suspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

##### Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von DNA-Mengen von 1 – 2 mg wurde eine Plasmid-Maxipräparation durchgeführt. Die Bakterien einer 400 ml LB-Amp-Kultur wurden bei 3500 x g und 4 °C für 10 min in der Kühlzentrifuge sedimentiert.

##### *Alkalische Lyse der Zellen*

Das Zellpellet wurde in 6 ml P1 (50 mM Tris/HCl (pH = 8,0), 10 mM EDTA) resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Dann wurden 6 ml P2 (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) zugesetzt und die Mischung wurde zur Lyse der Bakterien sehr vorsichtig für 5 min bei RT geschwenkt. Anschließend wurde 6 ml eiskalter P3 (3 M KAc, pH 4,8) zugesetzt, und die Probe wurde für 5 min in Eis inkubiert. Die lysierten Bakterien wurden bei 21000 x g und 4 °C für 40 min in der Kühlzentrifuge sedimentiert.

### *Isopropanolfällung der dsDNA*

Die im Überstand der Zentrifugation enthaltene DNA wurde durch Zusatz von 10,8 ml Isopropanol für 10 min bei RT präzipitiert und durch 20-minütige Zentrifugation wie oben sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml 70 % (v/v) Ethanol resuspendiert und die obige Zentrifugation wurde für 5 min wiederholt.

### *NH<sub>4</sub>Ac-Fällung der RNA*

Das Pellet wurde in 6 ml Wasser gelöst und die als Verunreinigung enthaltene RNA wurde durch Zusatz von 5 ml 10 M NH<sub>4</sub>Ac und 20-minütige Inkubation auf Eis präzipitiert. Die RNA wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 17000 x g und 4 °C in der Kühlzentrifuge sedimentiert.

### *Isopropanolfällung der Plasmid-DNA*

Die Plasmid-DNA im Überstand wurde durch Zusatz von 6,6 ml Isopropanol und Inkubation für 30 min auf Eis präzipitiert und durch Zentrifugation bei 17000 x g für 20 min bei 4 °C in der Kühlzentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen.

### *RNase-Behandlung*

Das DNA-Pellet wurde in 0,5 ml Wasser gelöst. Reste kontaminierender RNA wurden durch Zusatz von 4 µl DNase-freier RNase (10 mg/ml in Wasser) und Inkubation für 30 min bei 37 °C entfernt.

### *PEG-Fällung der Plasmid-DNA*

Die Plasmid-DNA wurde durch Zusatz von 0,5 ml 13 % (w/v) PEG 8000, 1,6 M NaCl und Inkubation für 20 min auf Eis gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 4000 x g in der Mikroliterzentrifuge bei RT für 10 min sedimentiert.

### *Reinigung der DNA*

Die DNA wurde durch Phenolextraktion (S. 45) und Ethanol-fällung (S. 45) gereinigt. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurden photometrisch bestimmt (S. 49).

### **3.4.5. Reinigung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten**

#### 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 kräftig durchmischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation in der Mikroliterzentrifuge bei 20.000 x g für 5 min bei RT. Die obere Phase wurde mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 vermengt und kräftig durchmischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Wiederholung der obigen Zentrifugation. Phenolreste in der oberen Phase wurden durch Extraktion mit Chloroform (3 x 1 ml) entfernt. Zuletzt wurden Reste des Chloroforms durch Abdampfen bei 60 °C (eine Stunde) entfernt.

#### Ethanol-fällung

Zur Konzentrierung von verdünnten DNA-Lösungen 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 (100 %) zugesetzt. Die DNA wurde über Nacht bei –20 °C präzipitiert und durch Zentrifugation bei 20.000 x g in der Mikroliterzentrifuge für 5 min bei 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Ethanolreste wurden für 30 min bei 37 °C abgedampft und die DNA in einem angepassten Volumen an Wasser gelöst. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurden wie auf S. 49 beschrieben bestimmt.

#### Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation

Zur Gewinnung hochgereinigter DNA für die Transfektion von Zellen wurde eine Zentrifugation von Plasmid-DNA im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten durchgeführt. In einem 14 ml Beckman-Quick seal-Ultrazentrifugenröhrchen wurden 9,8 g CsCl in 8 ml TE-Puffer gelöst und 1 ml 10 mg/ml Ethidiumbromid in Wasser zugesetzt. Nach dem Zusatz von 1 ml Plasmidlösung wurde der Ansatz mit TE-Puffer aufgefüllt und das Röhrchen zugeschmolzen. Die Zentrifugation erfolgte im VTi65.1-Rotor in der Ultrazentrifuge bei 44.000 upm für 20 h bei 20 °C. Der Lauf wurde ohne Rotorbremse beendet. Zur Isolierung der DNA wurde das Röhrchen im UV-Licht betrachtet, um die DNA-Banden zu identifizieren. Die unterste Bande der supercoiled-DNA wurde durch einen Klebestreifen markiert. Nach Absaugen der DNA mit einer Spritze wurde das

Ethidiumbromid mit wassergesättigtem n-Butanol vollständig extrahiert (5 x 3 ml), Butanolreste wurden anschließend durch Extraktion mit wassergesättigtem Diethylether (5 x 3 ml) entfernt. Etherreste schließlich wurden für 30 min bei 60 °C abgedampft. Die DNA in 3 ml Lösung wurde durch Zusatz von 1 ml Wasser und 8 ml Ethanol für 60 min bei 4 °C gefällt und durch Zentrifugation für 30 min in der Kühlzentrifuge im JA20-Rotor bei 6000 x g bei 4 °C isoliert. Die DNA wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, durch Zentrifugation in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst. Reinheit und Konzentration der DNA wurden photometrisch bestimmt, und die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### **3.4.6. Restriktionshydrolyse**

Die Restriktionsansätze mit den verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden bei 37 °C inkubiert, der Reaktionspuffer wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. Um Stern-Aktivität (star activity) zu vermeiden, wurde das Reaktionsvolumen so gewählt, dass die Glycerinkonzentration stets unter 5 % (v/v) lag.

#### Analytische Restriktionshydrolyse

Die analytischen Restriktionsansätze wurden in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Hierzu wurde die Plasmidlösung mit maximal 1 µg DNA und Reaktionspuffer vermischt und gegebenenfalls mit Wasser auf ein Volumen von 9 µl aufgefüllt. Zuletzt wurde 1 µl Restriktionsenzymlösung (10 oder 20 Units) zugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, und die Reaktion wurde durch Zusatz von Auftragspuffer (S. 33) gestoppt.

#### Präparative Restriktionshydrolyse

Zur präparativen Restriktionshydrolyse wurde der Restriktionsansatz analog zur analytischen Restriktionshydrolyse angesetzt und die Mengen und Volumina in gleichen Verhältnissen vergrößert. Die zur vollständigen Hydrolyse notwendige Inkubationszeit wurde empirisch ermittelt.

### **3.4.7. Phosphorylierung von DNA**

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 (Gibco BRL), 1 µl 10 mM dATP, 2 µl Wasser und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (Gibco

BRL, 6 U/ $\mu$ l) versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Enzym für 20 min bei 70 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert.

#### **3.4.8. Auffüllreaktion 5'-überhängender Enden mit T4-DNA-Polymerase**

Zur Erzeugung von stumpfen Enden an DNA-Fragmenten wurde eine Auffüllreaktion mit T4-DNA-Polymerase durchgeführt. 24  $\mu$ l DNA-Lösung in Wasser wurden mit 2  $\mu$ l 15 x Annealing-Puffer (0,2 M Tris/HCl (pH = 7,5); 0,5 M NaCl; 0,1 M MgCl<sub>2</sub>), 3  $\mu$ l 10 x Synthese-Puffer (0,1 M Tris/HCl (pH = 7,5); 10 mM ATP; 20 mM DTT; je 5 mM dNTP) und 1  $\mu$ l T4-DNA-Polymerase (NEB, 3 U/ $\mu$ l) versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde die DNA durch Phenolextraktion (S. 45) und Ethanolfällung (S. 45) gereinigt.

#### **3.4.9. Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur Ligation eines DNA-Inserts mit linearisierter Vektor-DNA wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Es wurde ein 5facher molarer Überschuss des Inserts gegenüber der Plasmid-DNA eingesetzt. 1  $\mu$ l Insert-DNA in Wasser, 11  $\mu$ l linearisierte Vektor-DNA in H<sub>2</sub>O, 1,5  $\mu$ l 10 x Ligase-Puffer und 1,5  $\mu$ l T4-DNA-Ligase (1 U/ $\mu$ l) wurden vermengt, und der Ligationsansatz wurde für 20 h bei 14 °C inkubiert. Zur Kontrolle auf Selbstligation der Vektor-DNA wurde ein Ansatz ohne Insert-DNA pipettiert und wie der Ligationsansatz behandelt. 5  $\mu$ l Ligationsansatz oder Kontrollansatz wurden anschließend zur Transformation (S. 42) von *E.coli* DH5 $\alpha$  eingesetzt und durch Plasmid-Minipräparation (S. 43) und analytische Restriktionshydrolyse (S. 46) charakterisiert.

#### **3.4.10. Agarosegelelektrophorese von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente nach analytischen und präparativen Restriktionsansätzen wurden in 1 %igen Agarosegelen getrennt. 1 g Agarose wurde in 100 ml TAE-Puffer suspendiert und im Mikrowellenofen geschmolzen. Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurden 5  $\mu$ l Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml in Wasser) zugesetzt und die Agaroselösung wurde in eine vertikale Gelkammer der Dimension 8 x 9,5 cm<sup>2</sup> gegossen. Die Taschen wurden durch Einstecken eines Kammes geformt, für präparative Trennungen nach Restriktionsansätzen wurden die Taschen des Geles durch Überkleben von Zähnen des Kammes vergrößert. Die DNA-Proben wurden im gleichen Volumen an Auftragspuffer (S. 33) aufgenommen. In die Anodenkammer wurden 5  $\mu$ l Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml in Wasser) zugesetzt. Die Elektrophorese wurde in TAE bei konstant 60 mA durchgeführt, bis die untere Farbstoffbande etwa 1 cm vom unteren Rand des Gels entfernt war. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden im UV-Durchlicht bei 312 nm visualisiert.

### 3.4.11. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das entsprechende Agarosestück wurde mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit TE-Puffer-gesättigtem Phenol vollständig überschichtet. Die Probe wurde in flüssigem N<sub>2</sub> gefroren und anschließend in der Mikroliterzentrifuge bei 19000 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, die untere Phase wurde mit 200 µl TE-Puffer-gesättigtem Phenol vermennt. Die Probe wurde erneut eingefroren und wie oben zentrifugiert. Die wässrigen Phasen wurden vereint, mit 0,5 ml TE-gesättigtem Phenol vermennt und 1 min wie oben zentrifugiert. Die DNA wurde durch Phenolextraktion (S. 45) und Ethanol-fällung (S. 45) aus der wässrigen Phase gereint.

### 3.4.12. Alkalische Denaturierung doppelsträngiger DNA

Zur alkalischen Denaturierung wurden 2 µg DNA in 18 µl H<sub>2</sub>O mit 2 µl 2 M NaOH, 2 mM EDTA versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA nach Zusatz von 6 µl 10 M NH<sub>4</sub>Ac und 80 µl Ethanol ÜN bei -20 °C präzipitiert. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 18000 x g und RT in der Mikroliterzentrifuge wurde das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und durch Zentrifugation in der Vakuumzentrifuge bei RT getrocknet.

### 3.4.13. Enzymatische DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger *et al.* beruht auf der enzymatischen Kopierung des zu sequenzierenden DNA-Einzelstrangs mit DNA-Polymerase [118]. Hierfür wird die DNA zunächst mit einem geeigneten Primer hybridisiert. Die Polymerasereaktion findet dann in vier getrennten Ansätzen statt, die alle als Substrat die vier in der DNA vorkommenden 2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate (dNTPs) enthalten. Zum späteren autoradiographischen Nachweis der DNA ist eines davon radioaktiv markiert. Jeder Reaktionsansatz enthält zusätzlich ein jeweils unterschiedliches 2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat (ddNTP), das nach Einbau in die DNA durch die fehlende 3'-OH-Gruppe zum Abbruch der Synthese führt. Auf diese Weise erhält man in jedem Ansatz ein Gemisch unterschiedlich lange aufsynthetisierter DNA-Moleküle, die jeweils mit dem verwendeten ddNTP enden. Nach Hitzedenaturierung werden die DNA-Fragmente ihrer Größe nach gelelektrophoretisch aufgetrennt. Aus der Autoradiographie lässt sich dann die DNA-Sequenz ablesen.

Durchführung:

Zur Sequenzierung wurde alkalisch denaturierte DNA (S. 48) aus Maxipräparationen (S. 43) verwendet. 2 µg DNA wurden direkt vor der Hybridisierung mit dem Primer in 7 µl H<sub>2</sub>O auf Eis aufgenommen, um eine Renaturierung zu vermeiden. Die Primer zur Sequenzierung des Transfervektors pVLMelFlagOTRHis<sub>10</sub> wurden von Dr. H. Reiländer (MPI für Biophysik) zur Verfügung gestellt und befanden sich etwa 40 bp downstream der Klonierungsstellen. Die Hybridisierungs- und die Sequenzierungsreaktion wurden mit Hilfe des Sequenzierkits Sequenase<sup>®</sup> nach Herstellerangaben durchgeführt. Als radioaktives Nukleotid wurde α-[<sup>35</sup>S]-dATP verwendet.

Nach der Reaktion wurde die DNA bei 85 °C für 5 min hitzedenaturiert und in einem denaturierenden, 5 %igen Polyacrylamid/Harnstoff-Gel (4,75 % (w/v) Acrylamid; 0,25 % (w/v) N,N'-β-Methylenbis(acrylamid); 7 M Harnstoff in TBE) elektrophoretisch aufgetrennt (T = 55 °C, U = 2500 V, Elektrophoresepuffer = TBE). Die Herstellung des Sequenziergels erfolgte nach Angaben des Herstellers der Elektrophoreseapparatur (Pharmacia, Freiburg). Die Thermostatplatte wurde mit Acrylease<sup>™</sup> beschichtet, die Gelplatte mit Bindesilanlösung (5 ml Ethanol (100 %); 1,25 ml Essigsäure (10 %); 19 µl Haft-Silan).

Nach der Beendigung des Laufes wurde das Gel durch 30-minütige Inkubation in 10 % (v/v) Essigsäure auf der Gelplatte fixiert, anschließend gründlich mit Wasser gespült und im Heißluftofen bei 50 °C für 2 Stunden getrocknet. Zur Visualisierung der Banden wurde ein Hyperfilm-βmax-Röntgenfilm auf das Gel gelegt und für 36 h bei RT exponiert. Die Entwicklung des Filmes erfolgte nach Herstellerangaben.

**3.4.14. Bestimmung von DNA-Konzentrationen**

Die Konzentration und Reinheit präparierter DNA wurde durch Messung der Extinktionen bei  $\lambda = 260$  und  $\lambda = 280$  nm im Spektrophotometer 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  $E_{260}$ -Einheit entspricht 50 µg/ml DNA.

### 3.5. Zellkultur

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden in einer sterilen Werkbank der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt, nachdem die verwendeten Geräte vor dem Einbringen mit 70 % (v/v) Ethanol desinfiziert worden waren. Glasgeräte wurden bei 180 °C im Trockenschrank über Nacht hitzesterilisiert. Hitzestabile Lösungen wurden bei 120 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert, hitzeempfindliche Lösungen wurden durch einen 0,2 µm-Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert.

#### 3.5.1. Bestimmung von Zelldichten

Zur Bestimmung von Zelldichten wurden die Zellen im Medium suspendiert und zum Auszählen der Zellen in eine Thoma-Zählkammer überführt. Die Grundfläche des Zählrasters der verwendeten Kammer bestand aus einem großen Quadrat, das 16 mittlere Quadrate enthielt, welche wiederum in je 16 kleinere Quadrate unterteilt waren. Die Zellsuspension wurde durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Zählraster eingesaugt. Die Zellen innerhalb fünf mittlerer Quadrate wurden unter dem Umkehr-Phasenkontrastmikroskop gezählt. Aus dem Ergebnis wurde das arithmetische Mittel für die Zellzahl innerhalb eines mittleren Quadrats gebildet und mit dem Faktor  $2,5 \cdot 10^5$  multipliziert, um die Zelldichte in Zellen/ml zu erhalten. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

#### 3.5.2. Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden Zellen eines konfluenten Zellrasens suspendiert und in der Tischzentrifuge 10 min bei 200 x g und Raumtemperatur sedimentiert. Das Zellsediment wurde im entsprechenden frischen Medium (10 % DMSO) bei einer Dichte von  $0,5 \times 10^8$  Zellen/ml suspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml-Portionen in Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80 °C vorgefroren. Anschließend wurden die Dauerkulturen in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 3.5.3. Kultivierung von Sf9-Insektenzellen

Die Kultivierung der Sf9-Zellen erfolgte in einem unbegasteten Brutschrank bei 27 °C. Die Zellen wurden als Monolayer in sterilen Gewebekulturflaschen gezüchtet. Für die Passage wurden die Zellen konfluenten Flaschen vom Boden abgeklopft, 1:5 in frischem Kulturmedium verdünnt und auf Gewebekulturflaschen verteilt. Nach drei bis vier Tagen war der Schalenboden mit einem konfluenten Zellrasen bewachsen. Bei Zellpassagen

wurden pro 25 cm<sup>2</sup>-Flasche 5 ml, pro 75 cm<sup>2</sup>-Flasche 15 ml und pro 175 cm<sup>2</sup>-Flasche 50 ml Zellkulturmedium verwendet.

### Transfektion von Sf 9-Zellen

Zur Transfektion von Sf 9-Zellen wurden Zellen einer konfluent bewachsenen 25 cm<sup>2</sup>-Gewebe Kulturschale in TNM-FH-Komplettmedium verwendet. Der Transfektionsmix wurde durch Mischen von 50 µl Lösung A (0,4 µg Transfektor-DNA, 0,15 µg BaculoGold-DNA in TNM-FH-Komplettmedium ohne FCS) und 50 µl Lösung B (10 µl Lipofectin und 40 µl TNM-FH-Komplettmedium ohne FCS) hergestellt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde der Transfektionsmix mit TNM-FH-Komplettmedium ohne FCS auf 1 ml verdünnt. Vor der Transfektion wurde der Zellrasen zunächst zweimal mit FCS-freiem TNM-FH-Medium gewaschen, da FCS das Lipofectin inaktiviert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit dem Transfektionsmix überschichtet (Kontrollansatz: Medium ohne DNA) und für 4 Stunden bei 27 °C inkubiert. Nach dem Zusatz von 3 ml TNM-FH-Komplettmedium wurden die Zellen 7 Tage lang bei 27 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand geerntet und die im Medium enthaltenen Viren durch Plaque-Assay gereinigt (folgender Abschnitt) und amplifiziert (S. 53).

### Reinigung von rekombinanten Baculoviren („Plaque-Assay“)

Die Reinigung rekombinanter Baculoviren aus Transfektionsüberständen erfolgte durch einen sogenannten „Plaque-Assay“ in Zellkulturschalen (Durchmesser = 60 mm) [119]. In jede Schale wurden  $2 \times 10^6$  Sf 9-Zellen in 3 ml TNM-FH-Komplettmedium eingesät und zur Zelladhäsion eine Stunde bei 27 °C inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurde der Zellrasen mit 1 ml einer seriellen Verdünnungsreihe des Transfektionsüberstandes in TNM-FH-Komplettmedium mit Verdünnungsstufen zwischen  $1 \times 10^{-1}$  und  $1 \times 10^{-8}$  überschichtet. Als Kontrolle wurde zu einer Schale die gleiche Menge TNM-FH-Komplettmedium ohne Viren gegeben. Zur Infektion der Sf 9-Zellen wurden die Ansätze für 1 h in einer feuchten Atmosphäre bei 27 °C geschaukelt. Nach Entfernen des Transfektionsüberstandes wurden die Zellen mit je 4 ml Agarose/TNM-FH-Medium (1,5 % (w/v) LMP (low melting point)-Agarose in TNM-FH-Komplettmedium) überschichtet und bis zum Erstarren der Agarose bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde die Agarose mit jeweils 2 ml TNM-FH-Komplettmedium überschichtet. Die Platten wurden in einer feuchten Atmosphäre bei 27 °C inkubiert, bis Plaques unter dem Lichtmikroskop erkennbar waren, was etwa nach 5 Tagen der Fall war. Plaques sind Löcher im Zellrasen,

die von infizierten und anschließend lysierten Zellen stammen. Im Idealfall entsteht ein Plaque durch Infektion einer einzelnen Zelle mit einem einzelnen rekombinanten Baculovirus, so dass ein Klon von Viren isoliert werden kann. Die Agarose sollte hierbei die freie Diffusion und somit die Durchmischung von Viren einzelner Plaques verhindern. Die Isolierung der Plaques erfolgte durch Ausstechen mit einer Pasteurpipette und Überführen des Agarosestückchens in 1 ml TNM-FH-Komplettmedium. Die Viren wurden über Nacht bei 4 °C aus dem Agarosestückchen eluiert. Der Überstand wurde zur Amplifikation der Baculoviren eingesetzt.

Positive Plaques wurden durch Expression des OT-Rezeptors in *Sf* 9-Zellen und einem Radioligandbindungstest mit [<sup>3</sup>H]Oxytocin an ganzen Zellen identifiziert (S. 70). Hierfür wurden die cholesterinauxotrophen *Sf* 9-Zellen 48 Stunden nach der Infektion mit Cholesterin durch Zugabe von 0,1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD angereichert (S. 62). 24 Stunden nach der Cholesterinanreicherung, d. h. 72 Stunden p. I. (nach Infektion), wurde dann der Bindungstest durchgeführt. Zur Gewinnung klonaler Viren wurden die rekombinanten Plaques ein zweites Mal mit dem Plaque-Assay gereinigt und in Monolayerkulturen von *Sf* 9-Zellen amplifiziert. Die amplifizierten Überstände aus Plaques, die auch im zweiten Durchgang des Plaque-Assays positiv waren, wurden als erste Viruspassage (P1-Stock) des jeweiligen Virus bezeichnet und im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

### Virustiterbestimmung durch Plaque-Assay

Der Plaque-Assay wurde wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben durchgeführt. Für die Virustiterbestimmung wurden Verdünnungsstufen der Viruslysatspräparationen von  $1 \times 10^{-3}$  bis  $1 \times 10^{-9}$  verwendet. Aus der Anzahl der Plaques pro Verdünnungsstufe lässt sich der Virustiter (pfu/ml; pfu = plaquebildende Einheiten) wie folgt berechnen:

$$\text{Virustiter [pfu/ml]} = \text{Anzahl der Plaques pro Verdünnungsstufe.}$$

Hieraus kann dann die Menge des Lysats ( $V_{\text{Lysat}}$ ) berechnet werden, die für eine gewünschte Multiplizität der Infektion (MOI) benötigt wird. Die MOI gibt an, wieviele Virionen pro Zelle zur Infektion eingesetzt werden.

$$V_{\text{Lysat}} [\text{ml}] = \text{MOI [pfu/Zelle]} \times N \times (\text{Virustiter [pfu/ml]})^{-1},$$

wobei  $N$  = Anzahl der zu infizierenden Zellen [Zellen].

### Amplifikation von rekombinanten Baculoviren

Rekombinante Baculoviren wurden in *Sf* 9-Monolayerkulturen (25 cm<sup>2</sup>-Schalen) amplifiziert, die zu 70 % konfluent waren. Zunächst wurde das Kulturmedium von den Zellen abgezogen. Der Zellrasen wurde zur Amplifikation viraler Plaques mit 0,5 ml Virenüberstand des Plaque-Assays bzw. zur Amplifikation gereinigter Baculoviren mit einer MOI von 0,1 (ebenfalls in 0,5 ml) für eine Stunde bei RT leicht schwenkend inkubiert. Anschließend wurden 4,5 ml Medium dazugegeben. Nach fünftägiger Inkubation bei 27 °C wurden die Zellen bei 400 x g und RT in der Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand (Viruslysate) wurde bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

### Infektion von *Sf* 9-Zellkulturen zur Expression des Oxytocinrezeptors

Zur Infektion von *Sf* 9-Zellen zur Expression des OT-Rezeptors wurden konfluent bewachsene Gewebekulturschalen verwendet. Die Zellen für die Expression des Fremdproteins waren zuvor an *Sf* 1-Medium (10 % FCS) adaptiert worden. Das Zellkulturmedium wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen wurde mit rekombinantem Viruslysate mit einer MOI von 5 in 1/5 des Kulturvolumens überschichtet. Zur Infektion wurden die Kulturen 1 h unter leichtem Schwenken bei 27 °C inkubiert, dann wurde das Viruslysate abgezogen und die Kulturen mit frischem Medium auf die entsprechenden Kulturvolumina eingestellt (S. 50).

#### **3.5.4. Kultivierung von Säugetierzellen**

Die Kultivierung aller Säugetierzellen erfolgte bei 37 °C in einem CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschrank in einer Atmosphäre von 95 % Luft, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 100 %. Die Zellen wurden in DMEM-Komplettmedium (HEK293 und 1321N1) bzw. DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM-Komplettmedium (CHO-K1) in Gewebekulturschalen mit Durchmessern von 10 oder 15 cm für drei bis vier Tage kultiviert. In 10 cm-Schalen wurden 10 ml Medium verwendet, in 15 cm-Schalen 25 ml. Zur Passage wurde das überstehende Medium vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, und die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % (w/v) Trypsin, 0,6 mM EDTA in PBS) überschichtet (1 ml pro 10 cm-Schale, 2,5 ml pro 15 ml-Schale) und 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit der Pipette im dreifachen Volumen an PBS suspendiert, bei 200 x g für 10 min bei RT in der Tischzentrifuge sedimentiert, im entsprechenden Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:6 bis 1:10 (HEK293 und 1321N1) bzw. 1:20 (CHO-K1) auf neue Gewebekulturschalen verteilt.

## **3.6. Zellernte und Membranpräparationen**

### **3.6.1. Ernte von Säugetierzellen**

Die Zellen konfluent bewachsener Gewebekulturschalen wurden mit eiskaltem PBS/10 mM EDTA überschichtet (2 ml pro 10 cm-Schale und 5 ml pro 15 cm-Schale). Die Gewebekulturschalen wurden zum Ablösen der Zellen für fünf Minuten bei RT geschaukelt. Die Zellen wurden mit einer Pipette suspendiert und durch Zentrifugation für 10 min in der Tischzentrifuge bei 400 x g und RT sedimentiert.

### **3.6.2. Ernte von Insektenzellen**

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Zellen 48 Stunden nach der Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus durch Sedimentation bei 400 x g und RT in der Tischzentrifuge isoliert. Die weitere Präparation der Zellen war für Säugetierzellen und für Insektenzellen gleich und ist im nächsten Abschnitt beschrieben.

### **3.6.3. Membranpräparation**

Um Reste des Mediums wegzuwaschen, wurden die Zellen erneut in PBS/10 mM EDTA resuspendiert und unter gleichen Bedingungen sedimentiert. Das gewaschene Zellpellet wurde durch 10 Schübe mit einem eingeschliffenen Glaspotter bei einer Zelldichte von  $0,5 \times 10^8$  Zellen/ml im zwanzigsten Teil des Kulturvolumens an eiskaltem hypotonischem Lysispuffer (S. 33) resuspendiert. Die Suspension wurde für 15 min bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Die lysierten Zellen wurden durch 2 x 30 s Polytron UltraThorax bei maximaler Leistung unter Eiskühlung homogenisiert. Anschließend wurden die Membranen durch Zentrifugation bei 40000 x g für 30 min bei 4 °C isoliert. Das Membranpellet wurde mit Bindungspuffer gewaschen und anschließend in diesem Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## **3.7. Methoden zur Reinigung des menschlichen Oxytocinrezeptors**

Alle Puffer, die zur Reinigung des OT-Rezeptors verwendet wurden, enthielten einen Proteaseinhibitorcocktail aus 10 µg/ml Leupeptin, 0,1 mg/ml Pefabloc, 0,1 mg/ml Bacitracin und 5 µg/ml Pepstatin A. Ebenfalls zur Vermeidung von Proteolyse wurden alle Schritte bei 4 °C durchgeführt.

### 3.7.1. Solubilisierung

#### Solubilisierung mit CHAPSO als Detergens

Membranen wurden in einer Mikroliterzentrifuge abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 20.000 x g) und auf Eis in CHAPSO-Solubilisierungspuffer bei einer Konzentration von 5 mg Protein pro ml resuspendiert. Der CHAPSO-Solubilisierungspuffer hatte im Allgemeinen folgende Zusammensetzung (modifiziert nach [120]):

0,8	% (w/v)	CHAPSO
20	mM	HEPES (pH = 7,4)
10	mM	MgCl <sub>2</sub>
300	mM	NaCl
10	% (w/v)	Glycerin
0,1	mM	Cholesterin/M $\beta$ CD

Abweichungen von diesem Puffer sind bei den einzelnen Versuchen aufgeführt. Prozentangaben bei CHAPSO und Glycerin beziehen sich immer auf „Gewicht pro Volumen (w/v)“.

Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 60 min bei 100.000 x g und 4 °C ultrazentrifugiert. Der Überstand (= Solubilisat) wurde abgenommen und sofort weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

#### Solubilisierung mit Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid als Detergens

Die Solubilisierung mit Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (D $\beta$ M) wurde durchgeführt wie diejenige mit CHAPSO. Die Zusammensetzung des D $\beta$ M-Solubilisierungspuffers ist bei dem jeweiligen Versuch beschrieben. Prozentangaben bei D $\beta$ M beziehen sich immer auf „Gewicht pro Volumen (w/v)“.

#### Solubilisierung mit Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid für Metallchelataffinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Membranen wurden in einer Mikroliterzentrifuge abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 20.000 x g) und in folgendem Solubilisierungspuffer bei einer Konzentration von 5 mg Protein pro ml resuspendiert:

1,0	% (w/v)	D $\beta$ M
100	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH = 8,0)
10	mM	Tris/HCl (pH = 8,0)
300	mM	NaCl
1	mM	Imidazol

Die Suspension wurde 30 min bei RT inkubiert und anschließend 60 min bei 100.000 x g und 18 °C ultrazentrifugiert. Der Überstand (= Solubilisat) wurde abgenommen und sofort weiterverwendet.

### 3.7.2. Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie nutzt die Affinität von Proteinen mit einem Polyhistidin-tag zu immobilisierten Metallionen wie z. B. Nickelionen. Die in dieser Arbeit verwendeten Metallchelate-Affinitätsmatrices sind auf S. 95 aufgelistet. Dort wird auch die Methode der Metallchelate-Affinitätschromatographie ausführlich erläutert.

#### Beladung der Chelating Sepharose® Fast Flow (Pharmacia) mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen

Diese Matrix aus Iminodiessigsäure wird unbeladen, also ohne Metallionen, geliefert und kann mit Ionen der Wahl selbst beladen werden.

5 ml Matrix wurden in eine C10/10-Säule (Pharmacia) gepackt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C und einer Flussrate von 0,4 ml/min durchgeführt. Die Matrix wurde wie folgt gespült:

- 1.) 10 ml H<sub>2</sub>O
- 2.) 10 ml 0,5 M NaCl
- 3.) 20 ml 250 mM NiCl<sub>2</sub>
- 4.) 10 ml 0,5 M NaCl
- 5.) 30 ml 20 mM HEPES (pH = 7,4) mit 0,02 % NaN<sub>3</sub>  
(Aufbewahrungspuffer)

#### Äquilibrierung der Matrix

250 µl suspendiertes Säulenmaterial (= 125 µl Matrix) wurden bei 100 x g in der Mikroliterzentrifuge 5 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst dreimal mit 1

ml H<sub>2</sub>O und danach fünfmal mit 250 µl Äquilibriumspuffer gewaschen. Die Zusammensetzung des Äquilibriumspuffers und aller anderen Puffer variierte je nach Versuch und ist im Ergebnisteil bei dem jeweiligen Versuch angegeben.

### Metallchelate-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen

Die Matrix wurde mit verdünntem Solubilisat (S. 55) ÜN bei 4 °C auf einem Rollenmischer (30 upm) inkubiert. Die Pufferzusammensetzung des verdünnten Solubilisates war gleich der des Äquilibriumspuffers. Die Menge an verdünntem Solubilisat entsprach hierbei 320 µl unverdünntem Solubilisat, so dass 125 µl Matrix mit etwa 800 µg Proteinen inkubiert wurden. Parallel wurde immer auch verdünntes Solubilisat ohne Matrix inkubiert, um die Bestimmung der eingesetzten Menge an OT-Rezeptor zu ermöglichen.

Nach der Inkubation ÜN wurde die aufgewirbelte Matrix in eine Säule gefüllt, und der Durchlauf wurde gesammelt. Als Säule eignet sich bei solch geringen Matrixmengen hervorragend eine 1 ml Spitze für Eppendorf-Pipetten. Diese wurde mit ein wenig Glaswolle abgedichtet, so dass noch Flüssigkeit abfließen aber nichts von der Matrix verloren gehen konnte. Unten an der Spitze wurde ein 2 cm langer Schlauch befestigt. Durch eine Schlauchklemme konnte somit der Durchfluss durch die Matrix reguliert werden. Nach oben blieb die „Säule“ geöffnet, d. h. der Durchfluss durch die Matrix erfolgte unter hydrostatischem Druck.

Das Säulenmaterial wurde sechsmal mit je 250 µl Waschpuffer gespült (Waschfraktion). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte entweder durch Verdrängung der Histidinreste durch Imidazol, durch Protonierung der Histidinreste durch Verwendung eines sauren Puffers oder durch Komplexbildung der Metallionen durch EDTA. Hierfür wurde der Waschpuffer auf der Matrix durch 250 µl Elutionspuffer ersetzt. Weitere 250 µl Elutionspuffer wurden für 30 min mit der Matrix inkubiert. Zuletzt wurde die Matrix noch mit viermal 250 µl Elutionspuffer gespült. Alle Eluatfraktionen wurden, falls nicht anders angegeben, vereinigt.

Vor dem Ligandenbindungstest (S. 70) wurden alle Säulenfraktionen auf die gleiche Pufferzusammensetzung gebracht. Für Proteinbestimmungen (S. 36), Silbergele (S. 40) bzw. Western-Blots (S. 40) wurden Proteinfällungen (S. 35) durchgeführt.

### Metallchelate-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Die Ni-NTA-Matrix wurde mit folgendem Puffer äquilibriert:

0,1	% (w/v)	D $\beta$ M
100	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH = 8,0)
10	mM	Tris/HCl (pH = 8,0)
300	mM	NaCl
1	mM	Imidazol
6	M	Guanidin-HCl <u>oder:</u>
8	M	Harnstoff

Solubilisat (S. 55) wurde 1:10 auf die Zusammensetzung des jeweiligen Äquilibrierungspuffers verdünnt und anschließend 60 min bei RT mit der Matrix inkubiert (12 ml verdünntes Solubilisat pro 125  $\mu$ l Matrix, Rollenmischer, 30 upm).

Nach dieser Inkubation wurde die Matrix in der Sorvall-Tischzentrifuge bei 100 x g bei RT 10 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde als „Durchlauf“ bezeichnet. Die Matrix wurde in 500  $\mu$ l Waschpuffer aufgenommen (= Äquilibrierungspuffer bei pH = 6,5) und 10 min lang bei RT inkubiert. Der Überstand der sich daran anschließenden Zentrifugation (Mikroliterzentrifuge, 100 x g, RT, 5 min) wurde als „Waschfraktion“ bezeichnet. Dieser Vorgang wurde dreimal mit je 250  $\mu$ l Waschpuffer wiederholt, wobei alle Waschfraktionen vereinigt wurden. Gebundene Proteine wurden in gleicher Weise mit Elutionspuffer 1 (= Äquilibrierungspuffer bei pH = 4,5) und Elutionspuffer 2 (100 mM EDTA, 20 mM HEPES (pH = 7,4), 0,1% D $\beta$ M) wiederholt. Die entsprechenden Überstände wurden mit „Eluat 1“ bzw. „Eluat 2“ bezeichnet.

### **3.7.3. Anti-FLAG<sup>®</sup> M1-Affinitätschromatographie**

Bei der Anti-FLAG<sup>®</sup> M1-Affinitätschromatographie binden Proteine mit einem N-terminalen FLAG-Epitop (Abbildung 1) an den anti-FLAG M1-Antikörper, der an eine Agarose-Matrix gekoppelt wurde.

#### Durchführung:

Suspendiertes Säulenmaterial wurde bei 100 x g in der Mikroliterzentrifuge 2 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst zweimal mit dem 2,5fachen Matrixvolumen an TBS und danach dreimal mit dem 2,5fachen Matrixvolumen an Säulenpuffer gewaschen. Der Säulenpuffer hatte folgende Zusammensetzung:

maximal 0,1	%	Detergens	
20	mM	HEPES (pH = 7,4)	
2	mM	CaCl <sub>2</sub>	} für Bindung des FLAG-Fusionsproteins an Matrix nötig
150	mM	NaCl	
10	%	Glycerin	
0,1	mM	Cholesterin/M $\beta$ CD	

Die Matrix wurde mit verdünntem Solubilisat ÜN bei 4 °C auf einem Rollenmischer (30 upm) inkubiert. Die Pufferzusammensetzung des Solubilisates war gleich der des Säulenpuffers. Die Menge an verdünntem Solubilisat, die pro ml Matrix verwendet wurde, entsprach hierbei maximal 3,2 ml unverdünntem Solubilisat. Dies entspricht rechnerisch einer Rezeptormenge von maximal etwa 120 pmol pro ml Matrix, so dass stets ein fünfzig- bis hundertfacher Überschuss an Bindungsstellen auf der Matrix (6 – 12 nmol/ml) vorhanden war. Parallel wurde immer auch verdünntes Solubilisat ohne Matrix inkubiert, um die Bestimmung der eingesetzten Menge an OT-Rezeptor zu ermöglichen.

Die Matrix wurde zusammen mit dem Solubilisat in eine Säule (s. S. 57) gefüllt, und der Durchlauf wurde gesammelt. Das Säulenmaterial wurde mit dem 10fachen Matrixvolumen an Säulenpuffer gespült (Waschfraktion). Gebundene Proteine können entweder durch Konkurrenz mit dem FLAG-Peptid eluiert werden oder durch den Zusatz von EDTA, das Calcium-Ionen komplexiert, die für die Bindung zwischen Antikörper und FLAG-Peptid nötig sind oder durch Erniedrigung des pH-Wertes auf 3,5. Zur Elution wurde die Matrix mit dem dreifachen Volumen an Elutionspuffer (Zusammensetzung s. Ergebnisteil) für 30 min inkubiert. Dieser Puffer wurde abgelassen, und die Matrix wurde wieder mit dem dreifachen Volumen an Elutionspuffer diesmal für 10 min inkubiert. Dieser Elutionsschritt wurde noch siebenmal wiederholt, wobei alle Eluatfraktionen vereinigt wurden.

Vor dem Ligandenbindungstest (S. 70) wurden alle Säulenfraktionen auf die gleiche Pufferzusammensetzung gebracht. Für Proteinbestimmungen (S. 36), Silbergele (S. 40) bzw. Western-Blots (S. 40) wurden Proteinfällungen (S. 35) durchgeführt.

#### 3.7.4. Lektin-Chromatographie mit WGA-Agarose

Die Lektin-Chromatographie nutzt die Affinität von Lektinen zu Kohlenhydratenseitenketten von Proteinen. Die verwendete Weizenkeim-Agglutinin-Agarose (WGA-Agarose = wheat germ agglutinin-Agarose) bindet N-Acetyl- $\beta$ -D-

Glucosamin, das sich in der Kernstruktur der Kohlenhydratseitenketten des OT-Rezeptors befindet.

#### Durchführung:

1 ml Matrix in 1 M NaCl (0,02 % Natriumazid) wurde unter hydrostatischem Druck in eine Glassäule (C10/10 von Pharmacia, Innendurchmesser = 10 mm, mit Adapter) gefüllt und mit 10 ml entgastem Säulenpuffer äquilibriert (Flussrate = 0,2 ml/min):

0,1	%	CHAPSO
20	mM	HEPES (pH = 7,4)
10	mM	MgCl <sub>2</sub>
300	mM	NaCl
10	%	Glycerin
0,1	mM	Cholesterin/M $\beta$ CD

3,2 ml CHAPSO-Solubilisat (s. S. 55) wurden 1:8 auf die Zusammensetzung des Säulenpuffers verdünnt. 1,6 ml des verdünnten Solubilisats wurden als Referenz ÜN bei 4 °C inkubiert. Das restliche Solubilisat wurde ÜN bei einer Flussrate von 0,2 ml pro Minute über die Matrix rezykliert.

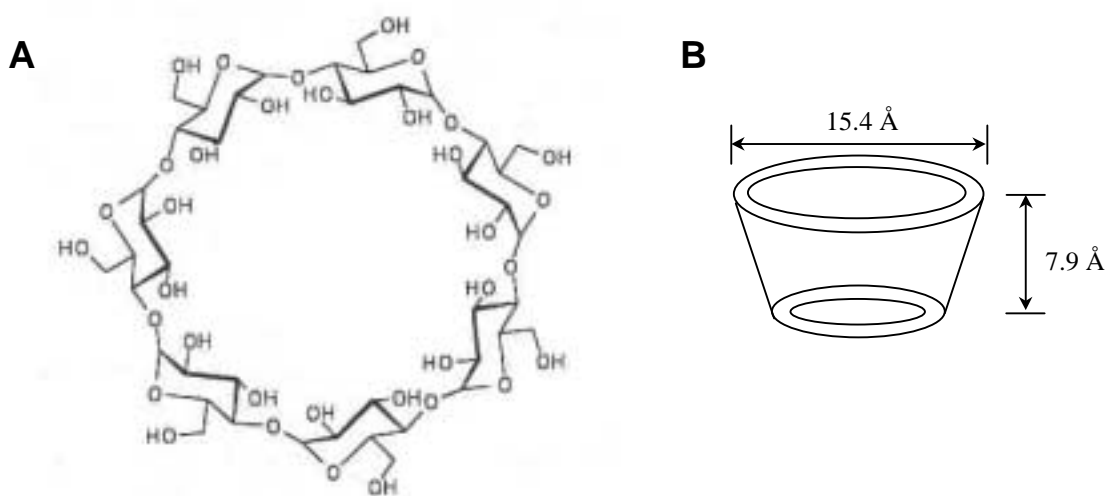
Am nächsten Tag wurde der Durchlauf (24 ml) gesammelt, und die Säule wurde mit 3 ml Säulenpuffer gewaschen. Danach folgte die Elution der gebundenen Proteine mit 0,6 M N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosamin in Säulenpuffer. Hierbei wurden Fraktionen mit einem Volumen von 500  $\mu$ l gesammelt und auf spezifische [<sup>3</sup>H]Oxytocin-Bindung ([<sup>3</sup>H]OT-Bindung) getestet. Das Elutionsprofil der Proteine wurde bei  $\lambda = 280$  nm aufgenommen. Die rezeptorhaltigen Fraktionen wurden anschließend für die Photoaffinitätsmarkierung mit tritiiertem 6,6-Azocholestan-3 $\beta$ -ol verwendet (s. S. 68).

### **3.8. Veränderung der Steroidzusammensetzung von Zellen, Membranen oder solubilisierten Proben**

#### **3.8.1. Herstellung von Steroid/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexen**

Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide aus  $\alpha$ -1,4-verknüpften Glucosebausteinen und bestehen aus 6, 7 oder 8 Glucoseuntereinheiten ( $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Cyclodextrine) (Abbildung 7). In den hydrophoben Hohlraum eines Cyclodextrins können hydrophobe Gastmoleküle, wie z. B. Steroide, eingelagert werden. In dieser Arbeit wurde M $\beta$ CD

verwendet, bei dem die freien Hydroxylgruppen teilweise durch Methylgruppen substituiert sind. Durch die Modifizierung liegt ein Gemisch aus verschiedenen substituierten Molekülen vor, die nicht mehr so leicht kristallisieren und somit besser wasserlöslich sind als die ursprünglichen Cyclodextrine. M $\beta$ CD hatte sich in Versuchsreihen, in denen U. Klein verschiedene Cyclodextrine getestet hatte, als optimal für die Herstellung wasserlöslicher Cholesterin/Cyclodextrinkomplexe erwiesen. M $\beta$ CD bildete den stabilsten Komplex mit Cholesterin, bei dem außerdem das Verhältnis Cholesterin:Cyclodextrin am größten war [120].



**Abbildung 7: Strukturformel und Form von  $\beta$ -Cyclodextrin**

$\beta$ -Cyclodextrin ist ein zyklisches Molekül aus sieben Glucoseuntereinheiten (A). Der hydrophobe Hohlraum im Inneren des torusförmigen Moleküls (B) kann hydrophobe Gastmoleküle wie z. B. Cholesterin aufnehmen.

### Cholesterin/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexe (10 mM)

10 g M $\beta$ CD wurden in 50 ml H<sub>2</sub>O gelöst und auf 60 °C erwärmt. 300 mg Cholesterin wurden bei 60 °C in 6 ml Isopropanol gelöst und tropfenweise unter Rühren zur M $\beta$ CD-Lösung gegeben. Nach fünfstündigem Rühren bei 60 °C wurde die klare Lösung mit H<sub>2</sub>O auf 78 ml aufgefüllt, durch einen 0,2  $\mu$ m-Filter sterilfiltriert und bei -20 °C aufbewahrt. Die fertige Lösung hatte eine Cholesterinkonzentration von 10 mM und eine M $\beta$ CD-Konzentration von 100 mM [120].

### Steroid/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexe (3 mM)

M $\beta$ CD in H<sub>2</sub>O (40 mg/ml) wurde mit final 3 mM des entsprechenden Steroids vermischt. Die Suspension wurde mit N<sub>2</sub> überschichtet und 24 Stunden lang bei 30 °C unter

Lichtausschluss auf einem Schüttler inkubiert. Die fertige Lösung wurde durch einen 0,2 µm-Filter filtriert und bei -20 °C aufbewahrt.

#### [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol/Methyl-β-Cyclodextrin-Komplexe

Die Herstellung der [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol/MβCD-Komplexe erfolgte wie im vorherigen Absatz beschrieben. Die Konzentration an [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol betrug jedoch, je nach Versuchsansatz, 0,3 bzw. 3 mM.

### **3.8.2. Veränderung des Steroidgehaltes lebender Zellen**

#### Entfernung von Cholesterin aus lebenden Zellen

Adhärente Säugetierzellen einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale wurden mit 10 ml FCS-freiem Medium gewaschen und mit 10 ml FCS-freiem Medium (mit 10 mM MβCD) überschichtet. Die Zellen wurden je nach Versuch bis zu 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium (10 % FCS) gewaschen. Wurden die Zellen zur Messung der freien intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration verwendet, wurden sie mit 5 ml Medium (10 % FCS, 1,5 µM Fura-2/AM als Calciumindikator) überschichtet und wie auf S. 72 beschrieben weiterbehandelt.

#### Anreicherung lebender Zellen mit Cholesterin durch Cholesterin/Methyl-β-Cyclodextrin-Komplexe

Zellen wurden durch Inkubation mit Cholesterin/MβCD-Komplexen (S. 60) mit Cholesterin angereichert. Die Inkubationsdauer und -temperatur sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

#### Anreicherung lebender Zellen mit Steroiden durch Ethanollösungen

Diese Methode wurde verwendet, um den Einfluss von Steroiden auf Liganden-induzierte Calciumsignale von Zellen zu untersuchen (s. S. 157). Zu 2·10<sup>6</sup> Zellen/ml Calciumpuffer (S. 33) wurden 8 µl einer ethanolschen Steroidlösung gegeben. Die Zellen wurden zunächst für 10 min bei 37 °C und anschließend für 10 min bei 25 °C inkubiert. Danach wurden sofort die Calciummessungen durchgeführt (S. 72).

### 3.8.3. Veränderung des Steroidgehaltes biologischer Membranen

#### Entfernung von Cholesterin aus biologischen Membranen

850  $\mu$ l Membranen in Bindungspuffer (Proteingehalt = 4,2 mg) wurden mit 150  $\mu$ l einer 200 mM M $\beta$ CD-Lösung (finale Konzentration = 30 mM) 30 min bei 30 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert. Danach wurden die Membranen zweimal mit Bindungspuffer gewaschen und in 1 ml Bindungspuffer (S. 33) resuspendiert. Hierdurch wurden fast 85 % des Cholesterins aus den Membranen entfernt. Diese Membranen wurden als „Cholesterin-abgereichert“ bezeichnet. Durch Variation der Inkubationszeit und/oder der Temperatur konnten unterschiedliche Cholesterinmengen aus den Membranen entfernt werden.

#### Anreicherung biologischer Membranen mit Steroiden durch Steroid/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrinkomplexe

Cholesterin-abgereicherte oder unbehandelte Membranen (1,3 mg/310  $\mu$ l in Bindungspuffer) wurden mit 124  $\mu$ l Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen (3 mM Stammlösung) 30 min bei 30 °C auf einem Thermomixer inkubiert. Danach wurden die Membranen einmal mit Bindungspuffer gewaschen, um Steroide zu entfernen, die nicht in die Membran eingebaut hatten. Anschließend wurden die Membranen wieder in 325  $\mu$ l Bindungspuffer aufgenommen oder solubilisiert.

#### Anreicherung biologischer Membranen mit Steroiden durch Ethanollösungen

Ethanollösungen des entsprechenden Steroids wurden mit Membransuspensionen (1,7 mg Protein/ml Puffer) gemischt und bei 30 °C für 10 min auf einem Thermoschüttler inkubiert. Die finale Ethanolkonzentration betrug 1 % (v/v).

#### Behandlung von Membranen mit Cholesterinoxidase und Sphingomyelinase

Das Enzym Cholesterinoxidase (*Brevibacterium* sp.) oxidiert Cholesterin zu 4-Cholesten-3-on. Die gleichzeitige Verwendung von Sphingomyelinase erleichtert hierbei den Zugang der Cholesterinoxidase zu Cholesterin, da Cholesterin zusammen mit Sphingomyelin in bestimmten Mikrodomänen der Membran lokalisiert ist [121].

7,5 mg Membranen wurden mit 1 ml Enzympuffer bei 30 °C inkubiert (Dauer: 0 – 120 min). Der Puffer hatte folgende Zusammensetzung: 20 mM HEPES (pH = 7,0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Mannitol, 1,5 % (v/v) Cholesterinoxidase (50 U/ml in 3 mM MES-Puffer (pH = 6,2), 3 M NaCl) und 1 % (v/v) Sphingomyelinase (0,04 U/ $\mu$ l in NaP<sub>i</sub> (pH = 7,4), 50

% Glycerin). Kontrolle: Puffer ohne Enzyme. Die Reaktion wurde durch Abkühlen der Ansätze auf 0 °C abgestoppt. Die Membranen wurden pelletiert, mit Bindungspuffer gewaschen und für den Ligandenbindungstest (S. 70) in Bindungspuffer resuspendiert.

### Behandlung von Membranen mit Filipin

Filipin ist ein Cholesterin-bindender, fluoreszierender Farbstoff. Filipin verändert nicht den Cholesteringehalt der Membranen, kompetiert jedoch mit dem OT-Rezeptor um die Bindung an die 3'-OH-Gruppe des Cholesterins.

Membranen (5 mg/ml) in Bindungspuffer wurden mit einer methanolischen Filipinlösung 10 min lang bei 30 °C inkubiert. Die finale Konzentration an Filipin betrug 44 µM, die Endkonzentration an Methanol war geringer als 2 % (v/v). Die Membranen wurden pelletiert, mit Bindungspuffer gewaschen und für den Ligandenbindungstest (S. 70) in Bindungspuffer resuspendiert.

### **3.8.4. Veränderung des Steroidgehaltes von Solubilisaten**

Der Steroidgehalt von Solubilisaten wurde durch Inkubation mit Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen verändert. Die Inkubationsdauer und -temperatur sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

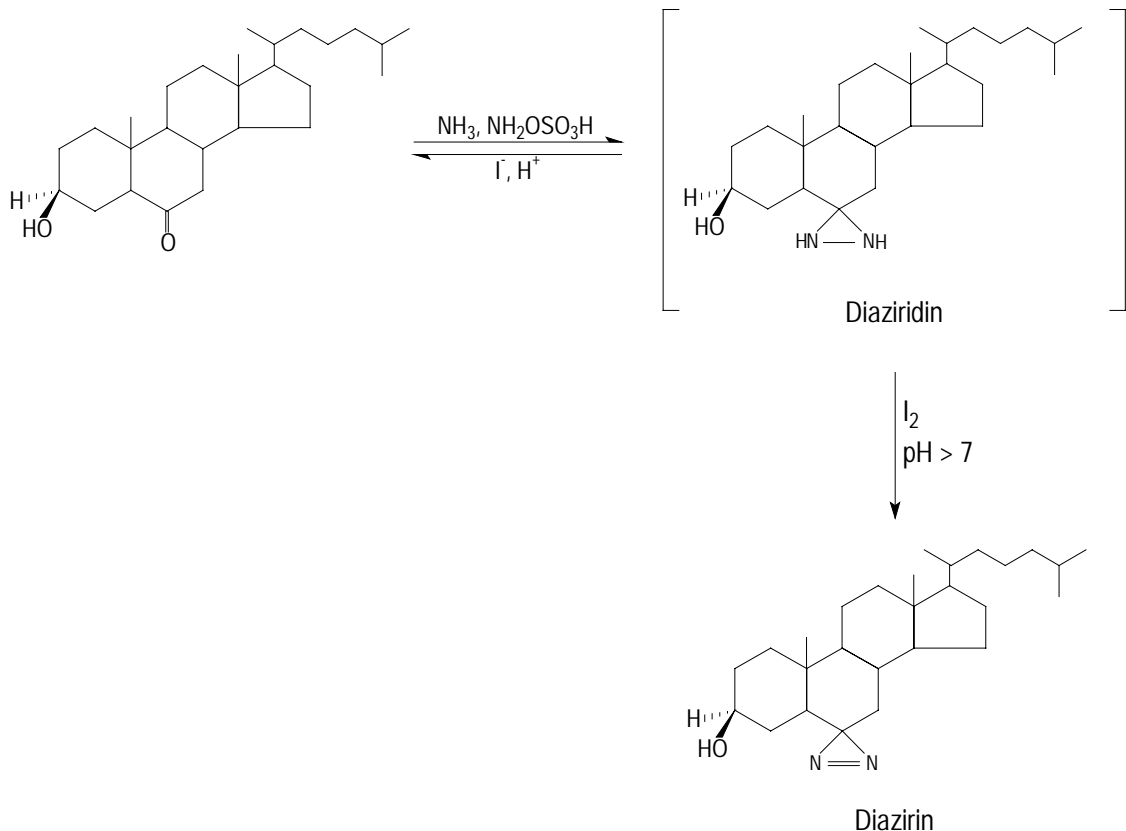
## **3.9. Synthese des photoreaktiven Cholesterinderivats 6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol**

6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol (Abbildung 33) wurde nach einer modifizierten Vorschrift von W. Kramer und G. Kurz (Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg, Deutschland) für die Synthese von 7,7-Azo-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -cholansäure hergestellt [122].

### **3.9.1. Synthese von 6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol**

Durch eine Lösung von 1 g (2,5 mmol) 6-Ketocholestan-3 $\beta$ -ol in 30 ml trockenem Methanol wurde bei 0 °C 2 Stunden lang trockener, gasförmiger Ammoniak geleitet. Danach wurde eine Lösung von 1 g Hydroxylamin-O-sulfonsäure in 10 ml trockenem Methanol langsam unter Rühren dazugetropft. Der Ansatz wurde anschließend lichtgeschützt bei Raumtemperatur 8 Stunden lang gerührt und schließlich filtriert. Nach Zugabe von 1 ml Triethylamin wurde die Lösung bis zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde wieder in 20 ml trockenem Methanol aufgenommen. Nach erneuter Zugabe von 1 ml Triethylamin wurde eine Lösung von 1 g Iod in 10 ml Methanol langsam

bis zur bleibenden Gelbfärbung des Ansatzes dazugetropft. Das überschüssige Iod wurde durch Natriumdithionit reduziert. Um wasserunlösliche Bestandteile zu fällen, wurde der Ansatz unter Rühren zu 300 ml H<sub>2</sub>O gegeben, und das entstehende Präzipitat (373 mg) wurde abfiltriert. Der Reaktionsweg ist in folgender Abbildung dargestellt:



**Abbildung 8: Syntheseweg von 6,6-Azocholestan-3β-ol**

6-Ketocholestanol wurde mit Ammoniak und Hydroxylamin-O-sulfonsäure zum Diaziridin umgesetzt. Das Diaziridin wurde anschließend durch Iod zum 6,6-Azocholestan-3β-ol, einem Diazirin, oxidiert.

Die Aufreinigung von 6,6-Azo-cholestan-3β-ol erfolgte über eine Kieselgel 60-Säule (Länge = 32 cm, Ø = 4,5 cm) mit folgendem Laufmittel: Petrolether (30-50) : Diethylether : Essigsäure = 80 : 20 : 1. Die Reaktionsprodukte der vorangegangenen Synthese (373 mg) wurden in 10 ml Chloroform gelöst und auf die Säule aufgetragen. Diese wurde anschließend an das Laufmittelreservoir angeschlossen. Nach einem Durchlauf von 510 ml wurden Fraktionen à 8,2 ml gesammelt. Im Schnitt wurde jede dritte Fraktion dünnschichtchromatographisch untersucht (S. 38). Fraktionen mit gleichem R<sub>f</sub>-Wert wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 35 °C und 200 – 300 Torr eingengt

(Entfernung von Petrol- und Diethylether). Die Essigsäure wurde bei Raumtemperatur in der Vakuumzentrifuge evaporiert. Je 1 mg Probe wurde in Diethylether gelöst und mit einem Spektrophotometer auf das charakteristische Spektrum des Diazirins untersucht.

### 3.9.2. **Synthese von 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-3 $\beta$ -ol**

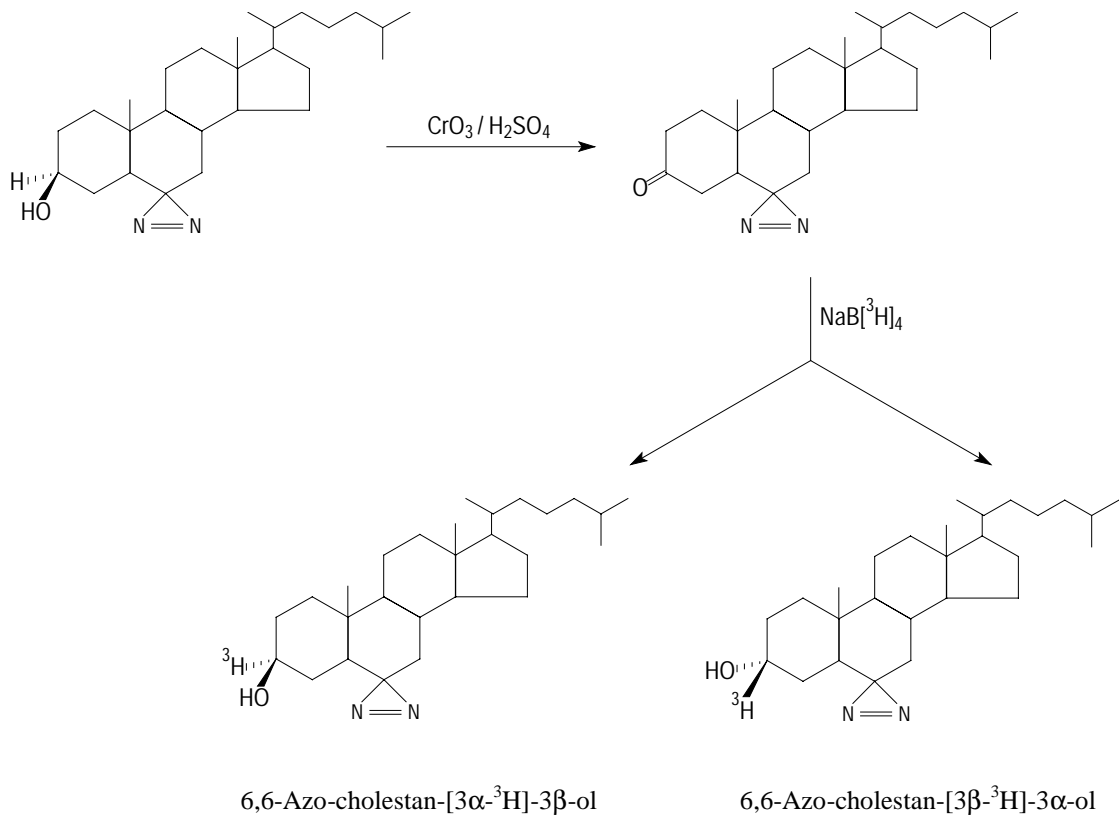
Für die Synthese des tritiierten 6,6-Azocholestan-3 $\beta$ -ol wurde zunächst nichttritiiertes 6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol zu 6,6-Azo-cholestan-3-on oxidiert. Anschließend wurde die Ketogruppe von 6,6-Azo-cholestan-3-on durch tritiiertes Natriumborhydrid wieder reduziert. Die entstehenden Isomere (3-Hydroxylgruppe in  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Konfiguration) wurden dünnschichtchromatographisch getrennt.

#### Oxidation von 6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol zu 6,6-Azo-cholestan-3-on

Diese Reaktion wurde von Christoph Thiele (Universität Heidelberg) durchgeführt. 60 mg 6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol wurden in 10 ml Aceton gelöst. Eine Lösung von 100 mg CrO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (9:1, v/v) wurde tropfenweise dazugegeben bis zur Persistenz der orangenen Farbe. Nach Zugabe von 1 ml Isopropanol wurde der Ansatz 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 20 ml H<sub>2</sub>O in den Ansatz gegeben, und die organischen Reaktionsprodukte wurden durch Zugabe von 15 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden evaporiert und die darin enthaltenen Produkte durch eine Kieselgel 60-Säule (Länge = 30 cm, Ø = 1 cm) mit Hexan:Ethylacetat = 3:1 (v/v) als Laufmittel aufgetrennt.

#### Reduktion von 6,6-Azo-cholestan-3-on durch tritiiertes Natriumborhydrid

Alle Schritte wurden bei gedämpftem Licht durchgeführt. 2,4 mg (5,8  $\mu$ mol) 6,6-Azo-cholestan-3-on wurden in 1 ml Tetrahydrofuran gelöst und zu 25 mCi Natriumbor[<sup>3</sup>H]hydrid (ca. 1  $\mu$ mol bzw. 38  $\mu$ g) in 1 ml 0,1 N NaOH gegeben. Nach 7 Stunden Rühren bei RT wurden zur Zersetzung des überschüssigen Natriumborhydrids 300  $\mu$ l 1 N HCl dazugegeben. 15 min später wurde 1 ml Ethylacetat zugegeben, um die hydrophoben Bestandteile des Ansatzes zu extrahieren. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen wurden vereinigt und im Stickstoffstrom auf 300  $\mu$ l eingengt. Der Reaktionsweg ist in folgender Abbildung dargestellt:



**Abbildung 9: Syntheseweg des tritiierten 6,6-Azocholestan-3 $\beta$ -ol**

6,6-Azocholestan-3 $\beta$ -ol wurde zunächst mit  $\text{CrO}_3$  zu 6,6-Azocholestan-3-on oxidiert und anschließend mit tritiiertem Natriumborhydrid wieder reduziert. Die beiden entstehenden Isomere (6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ - $^3\text{H}$ ]-3 $\beta$ -ol und 6,6-Azo-cholestan-[3 $\beta$ - $^3\text{H}$ ]-3 $\alpha$ -ol) wurden dünnstschichtchromatographisch getrennt (s. nächster Abschnitt).

Aufreinigung von 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ - $^3\text{H}$ ]-3 $\beta$ -ol

Die Produkte wurden auf eine analytische Kieselgelplatte aufgetragen (10 x 20 cm<sup>2</sup>, 0,25 mm Schichtdicke) und durch Hexan:Ethylacetat = 2:1 (v/v) als Laufmittel aufgetrennt. Als Referenz diente eine zweite Kieselgelplatte, auf die 20  $\mu\text{g}$  nichttritiiertes 6,6-Azocholestanol aufgetragen und in gleicher Weise aufgetrennt wurde. Diese zweite Platte wurde mit Iod gefärbt, so dass die Position von 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ - $^3\text{H}$ ]-3 $\beta$ -ol auf der ersten Platte ermittelt werden konnte. Zur Sicherheit wurden die radioaktiven Reaktionsprodukte der ersten Platte autoradiographisch durch 15-minütige Exposition eines Hyperfilm-MP (Amersham) analysiert. Die radioaktive Bande, deren Position mit der iodgefärbten Bande der ersten Platte übereinstimmte, wurde ausgekratzt und mit 4 x 1ml Ethanol eluiert. Das in Ethanol gelöste 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ - $^3\text{H}$ ]-3 $\beta$ -ol wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.10. Photoaffinitätsmarkierung des humanen Oxytocinrezeptors mit [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol**

Zur Markierung wurden folgende Ausgangsmaterialien verwendet: HEK-OTRhis-Membranen (S. 54 und S. 87), Solubilisat dieser Membranen (S. 55), Eluat der WGA-Chromatographie (S. 59) und gereinigter humaner OT-Rezeptor, welcher mir von Dr. H. Kiefer (Universität Hohenheim) zur Verfügung gestellt worden war (S. 150). Die Vorbehandlung der einzelnen Proben und die Inkubation mit dem [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol variierten von Versuch zu Versuch und sind daher im Ergebnisteil ausführlich beschrieben.

#### **3.10.1. Bestrahlung**

Zur Bestrahlung wurde die Probe in eine Quarzküvette gefüllt und 5 Minuten lang mit einer Quecksilberdampfampe (200 W, 15 cm Abstand) belichtet, wobei die Wellenlänge durch einen Langpassfilter auf  $\lambda > 335$  nm festgelegt wurde, um eine Schädigung des OT-Rezeptors zu vermeiden. Die Probe wurde durch einen Kühlmantel mittels eines Wasserbades je nach Versuchsbedingung auf 4 °C, 30 °C bzw. 37 °C temperiert. Bei der Bestrahlung entsteht aus dem 6,6-Azocholestanol unter Abspaltung von N<sub>2</sub> ein reaktives Carben, das mit unterschiedlichen Aminosäureresten kovalente Bindungen knüpfen kann.

#### **3.10.2. Detektion**

Membranen wurden nach der Bestrahlung abzentrifugiert und mit Bindungspuffer (S. 33) gewaschen. Die Membranproteine wurden gefällt, um [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol zu entfernen, das zwar in die Membran eingebaut, aber nicht oder mit Lipiden reagiert hatte. Eine Proteinfällung wurde auch bei Solubilisaten durchgeführt. Die Proteine wurden in Probenpuffer für die SDS-Gelelektrophorese (S. 34) aufgenommen und 60 min bei 30 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert.

#### Detektion durch Szintillationszählung

Nach der Inkubation wurde die Probe (maximal 1 mg Protein) durch ein Röhrchengel aufgetrennt (S. 39). Das Gel wurde anschließend ÜN bei RT in einer Lösung aus 30 % Methanol, 10 % Essigsäure und 60 % H<sub>2</sub>O fixiert. Das Gel mit dem Größenstandard wurde mit Coomassie Brilliant Blue R (0,1 % in der Fixierlösung) gefärbt, die Probengele wurden durch einen Gelschneider in 1,1 mm große Scheibchen zerschnitten, die einzeln in Szintillationsröhrchen gegeben wurden. Nach Zugabe von 4 ml Szintillationscocktail (Lipoluma:Lumasolv:Wasser = 10:1:0,2) wurden die Gelstückchen 2 Stunden bei 55 °C inkubiert, auf RT abgekühlt und geschüttelt. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt.

Anschließend wurde die Radioaktivität der einzelnen Gelstückchen in einem Flüssigszintillationszähler bestimmt und gegen die relative Molekülmasse ( $M_r$ ) aufgetragen.

#### Detektion durch Phosphorimager

Die Proben wurden durch ein SDS-PAGE-Minigel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (s. Western-Blot, S. 40). Der getrocknete Blot wurde 5 Tage lang auf einen BAS-TR2025-Film (Imaging Plate von Fuji Photo Film) gelegt. Die Radioaktivität wurde danach über einen Phosphorimager (BAS-1800, Fuji Photo Film) detektiert.

### **3.11. Anisotropiemessung biologischer Membranen mit 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien (DPH)**

Der hydrophobe Fluoreszenzfarbstoff DPH lagert sich zwischen die Kohlenwasserstoffketten der Membranlipide, wo seine Beweglichkeit direkt mit der Viskosität der Membran verknüpft ist. Die Membranen werden bei der Messung mit polarisiertem Licht bestrahlt, und die Anisotropie  $r$  wird wie folgt bestimmt:

$$r = (I_{VV} - I_{VHG}) / (I_{VV} + 2I_{VHG}),$$

wobei  $I_{VV}$  und  $I_{VH}$  die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei vertikalem Polarisator und vertikalem bzw. horizontalem Analysator sind.  $G (= I_{HV}/I_{HH})$  ist ein gerätespezifischer Korrekturfaktor für die ungleiche Transmission unterschiedlich polarisierten Lichts.

#### Durchführung:

Membranen (90  $\mu$ g Protein) wurden in 1 ml Anisotropiepuffer (10 mM Tris/HCl (pH = 7,0); 20 mM NaCl) aufgenommen und mit final 2  $\mu$ M DPH (1 mM Stammlösung in Dimethylformamid) 60 min lang bei 30 °C unter Lichtausschluss auf einem Thermomixer inkubiert. Die Polarisationsmessungen wurden bei 30 °C in einem Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 362 nm ( $\pm$  6 nm), die Emission wurde bei 430 nm ( $\pm$  6 nm) gemessen. Zur Unterdrückung von Streulichteffekten wurde ein Kantenfilter (GG 395) vor den Analysator gesetzt.

## 3.12. Ligandenbindungsstudien

### 3.12.1. Hormonbindungsstudien an Sf 9-Zellen

Hormonbindungsstudien an Sf 9-Zellen wurden durchgeführt, um positive Plaques im Plaque-Assay zu identifizieren (S. 51). Zellen einer 60 mm-Kulturschale wurden abgelöst und in der Tischzentrifuge bei 400 x g und RT 5 min lang sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 400 µl eiskaltem HBS (5 mM MgCl<sub>2</sub>) (S. 33) resuspendiert. Je 90 µl Zellsuspension wurden mit 10 µl einer 100 nM [*tyrosyl*-2,6-<sup>3</sup>H]Oxytocin-Lösung in Bindungspuffer 20 min lang bei 30 °C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion auf Eis wurden die Zellen sedimentiert und mit 1 ml eiskaltem HBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 µl 0,5 % Triton X-100/10 mM EDTA suspendiert und mit 10 ml Szintillationscocktail (Rotiszint eco plus) in ein Szintillationsröhrchen gegeben. Nach guter Durchmischung der Probe wurde die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Die Bestimmung der Menge des spezifisch an die Rezeptoren gebundenen radioaktiven Liganden wird im nächsten Kapitel erläutert.

### 3.12.2. Hormonbindungsstudien an oxytocinrezeptor- bzw. cholecystokinrezeptorhaltigen Zellmembranen

Rezeptorhaltige Membranen wurden 30 min bei 30 °C in Bindungspuffer (S. 33) mit tritiiertem Hormon (10 nM [*tyrosyl*-2,6-<sup>3</sup>H]Oxytocin bzw. 20 nM [<sup>3</sup>H]propionylcholecystokin-8) inkubiert. Die Membranmenge wurde so gewählt, dass im Gleichgewichtszustand höchstens 10 % des eingesetzten Hormons durch Rezeptoren gebunden wurde. Falls nicht anders angegeben, wurde im Falle des OT-Rezeptors 0,1 mM Cholesterin/MβCD im Bindungstest verwendet. Die Bindungsreaktion wurde durch Zugabe von 2 ml eiskaltem Filtrationspuffer (S. 33) gestoppt. Die Trennung von freiem und gebundenem Hormon erfolgte durch rasche Filtration über GF/C-Glasfaserfilter, die vorher eine halbe Stunde in eiskaltem Filtrationspuffer eingelegt worden waren. Die Filter wurden zweimal mit Filtrationspuffer gespült, in Szintillationsröhrchen gegeben und mit 3 ml Ethylenglycolmonomethylether transparent gemacht. Nach 10 min wurden 7 ml Szintillationscocktail (Rotiszint eco plus) dazugegeben. Nach guter Durchmischung der Probe wurde die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

Die Menge des spezifisch an die Rezeptoren gebundenen radioaktiven Liganden wurde aus der Differenz der Gesamtbindung (rezeptorgebundene und unspezifisch gebundene Liganden) und der unspezifischen Bindung ermittelt. Unspezifische Bindungsstellen

befinden sich sowohl am Glasfaserfilter als auch an den Zellmembranen. Sie sind niederaffin und im Vergleich zu den Rezeptorbindungsstellen in wesentlich größerer Zahl vorhanden. Die unspezifische Bindung wurde durch einen 500fachen molaren Überschuss an nichttritiertem Oxytocin bzw. einen 2000fachen Überschuss an nichttritiertem Pentagastrin in einem Parallelexperiment bestimmt. Bei den verwendeten Mengen an nichttritiertem Ligand werden die Rezeptoren weitgehend mit unmarkiertem Hormon beladen. Bei den unspezifischen Bindungsstellen ist aufgrund ihrer großen Anzahl nicht mit einer Kompetition der markierten durch nichttritierten Liganden zu rechnen.

### 3.12.3. Sättigungsexperimente

Durch Sättigungsexperimente wurden Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) und Rezeptordichten ( $B_{max}$ ) ermittelt. Hierbei wird die spezifische Bindung eines radioaktiven Liganden an den Rezeptor bei konstanter Rezeptorkonzentration als Funktion der Ligandenkonzentration bestimmt. Aus dem Massenwirkungsgesetz folgt nach Umformung:

$$B = B_{max} \cdot F / (K_d + F)$$

und in der linearisierten Form die Scatchard-Gleichung

$$B / F = B / K_d + B_{max} / K_d ,$$

wobei B der Konzentration des gebundenen Liganden und F der des ungebundenen Liganden entspricht. Bei der Auftragung von B gegen B/F kann aus der Steigung der Geraden die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) und aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse die Anzahl der Bindungsstellen ( $B_{max}$ ) ermittelt werden. Moderne Auswertungsverfahren (hier: Programmpaket Radlig 4.0, Biosoft, Cambridge, UK) verzichten auf die Transformation der Bindungsdaten zu linearen Abhängigkeiten und bestimmen über eine iterative Kurvenanpassung direkt aus den Messdaten die Bindungsparameter  $K_d$  und  $B_{max}$ . Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SigmaPlot (Jandel Scientific).

### 3.12.4. Hormonbindungsstudien an solubilisiertem Oxytocinrezeptor

Diese Bindungsstudien wurden genauso durchgeführt wie die Bindungsstudien an Membranen. Falls nicht anders angegeben, enthielten die Ansätze 1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD-Komplexe. Die GF/C-Glasfaserfilter wurden vor der Filtration eine Stunde lang in 0,3 % Polyethylenimin eingelegt, das den negativ geladenen OT-Rezeptor über elektrostatische Wechselwirkung an die Filter bindet.

### 3.13. Messung des Anstieges der freien intrazellulären Calciumionenkonzentration Fura-2/AM-beladener Zellen

Die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern in Säugetierzellen wurde nach einer modifizierten Methode von Iredale und Dickenson (1995) mit dem fluoreszierenden Calciumindikator Fura-2/AM bestimmt [123]. Fura-2/AM ist ein Derivat des nichtfluoreszierenden Calcium-Chelators EGTA. In Abwesenheit von Calcium besitzt Fura-2/AM ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 380$  nm, wohingegen nach der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  das Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 340$  nm liegt. Beide Formen haben ihr Emissionsmaximum bei  $\lambda = 510$  nm. Dadurch, dass bei Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  die Fluoreszenz bei  $\lambda = 340$  nm stark zunimmt und die bei  $\lambda = 380$  nm stark abnimmt, kann man eine sogenannte „Fluoreszenz-Ratio“ bilden (340 nm/380 nm). Hierdurch wird die Messung unabhängiger von der absoluten Farbstoffmenge, die z. B. durch Bleichen des Farbstoffes oder durch einen Farbstoffverlust der Zellen im Laufe der Messung abnehmen kann. Fura-2/AM ist durch seine fünf Acetoxymethylester-Gruppen ein lipophiles Molekül, das leicht durch die Plasmamembran diffundiert. Innerhalb der Zelle werden die Acetoxymethylester durch Esterasen abgespaltet, so dass Fura-2 im Cytoplasma bleibt.

#### Durchführung:

Alle Arbeiten wurden im abgedunkelten Raum ohne direkte Lichteinstrahlung durchgeführt. Von konfluenten Säugerzellkulturen wurde das Medium abgenommen, und der Zellrasen wurde mit 5 ml 1,5  $\mu\text{M}$  Fura-2/AM in DMEM-Komplettmedium überschichtet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurde das Medium abgezogen und durch 10 ml frisches DMEM-Komplettmedium ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 20 min bei 37 °C zur Hydrolyse des intrazellulären Fura-2/AM im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, so dass die Zellen mit 37 °C warmem PBS/0,5 mM EDTA von der Kulturschale gelöst werden konnten. Die Zellen wurden in einer Tischzentrifuge bei 200 x g abzentrifugiert, das Zellpellet wurde mit Calciumpuffer (S. 33) gewaschen und schließlich in diesem Puffer bei einer Zelldichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml suspendiert. Als Kontrolle für den Streulichteffekt wurde eine Kontrollprobe ohne Zusatz von Fura-2/AM mitgeführt. Die Messung erfolgte in einem computergesteuerten Fluoreszenzspektrometer, welches mit einem thermostatisierbaren und mit einer Magnetrührereinrichtung versehenen Küvettenhalter ausgerüstet war. Die Emissionswellenlänge wurde auf 510 nm eingestellt, zur Exzitation wurde durch ein motorgetriebenes Gitter zwischen 340 und 380 nm gewechselt. In einer 3 ml-Küvette

wurden 2,5 ml auf 37 °C vorgewärmter Calciumpuffer mit 0,5 ml Zellsuspension luftblasenfrei vermengt, und die Messung wurde gestartet. Nach 60 s wurde der entsprechende Agonist in 10 µl Volumen zugesetzt, und das Signal wurde bis zum Abklingen verfolgt.

Die freie intrazelluläre Calciumionenkonzentration wurde nach Grynkiewicz *et al.* (1985) berechnet [124]:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \frac{(K_D * F_0)}{F_S} * \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)}$$

$K_D$ :	Dissoziationskonstante (224 nM bei 37 °C)
$R$ :	Ratio der Fluoreszenz von 340 nm/380 nm
$R_{\max}$ :	R bei $\text{Ca}^{2+}$ -Sättigung des Indikators
$R_{\min}$ :	R bei $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexierung durch EGTA
$F_0$ :	380 nm-Fluoreszenz bei $R_{\min}$
$F_S$ :	380 nm-Fluoreszenz bei $R_{\max}$

Für die Kalibrierung der Signale mussten die Werte  $R_{\min}$ ,  $R_{\max}$ ,  $F_S$  und  $F_0$  bestimmt werden. Zur Messung von  $R_{\max}$  und  $F_S$  wurden die Zellen durch Zusatz von 0,1 % (w/v) Triton X-100 permeabilisiert, so dass die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Pufferkonzentration von 1,5 mM entsprach. Zur Bestimmung von  $R_{\min}$  und  $F_0$  wurden zur Komplexierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen 25 mM EGTA und 30 µl 0,5 N NaOH zugesetzt. Die Auswertung der Signale erfolgte mit dem Computerprogramm *Felix* des Geräteherstellers, die Daten wurden gegen die Autofluoreszenz von nicht mit dem Calciumindikator Fura-2/AM beladenen Zellen korrigiert. Der Wert R wurde als Differenz des Signalmaximums zur Basislinie von der gegen die Autofluoreszenz korrigierten Kurve abgelesen und in die obige Gleichung eingesetzt.



## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Untersuchungen zur Überexpression des humanen Oxytocinrezeptors in verschiedenen Zelllinien

Die Identifizierung der hypothetischen Cholesterinbindungsstelle(n) des humanen OT-Rezeptors durch ein radioaktiv markiertes photoreaktives Cholesterinderivat setzt eine Anreicherung, wenn nicht gar eine Reinigung des Rezeptors voraus. Dies ist notwendig, da bei den in natürlichen Geweben vorkommenden Rezeptordichten der markierte OT-Rezeptor durch eine Fülle an ebenfalls mit Cholesterin interagierenden Proteinen verdeckt wird (s. S. 141). In natürlichem Gewebe, wie z. B. dem Myometrium des Meerschweinchens am Ende der Trächtigkeit, wird der OT-Rezeptor mit einer maximalen Dichte von über 2 pmol/mg Membranprotein exprimiert [120], wohingegen in heterologen Expressionssystemen mit Hilfe starker Promotoren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bereits in Rezeptordichten von 100 pmol/mg und mehr exprimiert wurden [125,126]. Schon alleine durch die Überexpression liegt ein besseres Ausgangsmaterial für die Reinigung eines Proteins vor. Bei der Verwendung etablierter Zelllinien wird man zudem von der meist begrenzten Verfügbarkeit natürlichen Gewebes unabhängig, umgeht die Isolierung des erwünschten Gewebes und hat außerdem den großen Vorteil, das zu reinigende Protein molekularbiologisch mit Fusionspeptiden versehen zu können, die die Identifizierung und Isolierung des Proteins erleichtern sollten.

#### 4.1.1. Expression und Charakterisierung des humanen Oxytocinrezeptors in *Spodoptera frugiperda* 9-Zellen

*Sf* 9-Zellen stammen aus dem Ovar der Larven des Falters *Spodoptera frugiperda* und können mit sogenannten *Baculoviren* infiziert werden. Baculoviren bestehen aus doppelsträngiger, zirkulärer DNA von 80 – 200 kbp Länge, welche mit Proteinen zu einem Nukleoprotein („Core“) kondensiert ist, das von einem stäbchenförmigen Kapsid umhüllt wird. Kapsid und Nukleoprotein werden zusammen als Nukleokapsid bezeichnet. Das Nukleokapsid ist von einer Membran umhüllt, die entweder von der Plasmamembran der Wirtszelle stammt und während der Knospung des Virus um das Nukleokapsid gelegt wurde, oder von der inneren Kernmembran der Wirtszelle, falls das Virus im Zellkern verbleibt. Die Knospung dient der Virenfreisetzung und der darauffolgenden Infektion weiterer Zellen des Insekts, wohingegen Viren, die in der Zelle bleiben, von einer Matrix umhüllt werden, die aus dem Protein Polyhedrin besteht. Dieses Protein schützt die Viren

vor schädlichen Umwelteinflüssen nach dem Tod ihres Wirts und kann bis zu 25 % des Trockengewichts des Insektenkadavers ausmachen. Werden die Polyhedrineinschlusskörper von einem weiteren Insekt, z. B. einer Schmetterlingsraupe mit der Nahrung aufgenommen, so wird das Polyhedrin verdaut, die Virionen werden im Darm freigesetzt und infizieren die Insektenlarve. Da das Polyhedrin zur Vermehrung des Virus in der Zellkultur nicht benötigt wird, kann das Polyhedrin durch Fremdgene – wie z. B. die cDNA des OT-Rezeptors in dieser Arbeit – ersetzt werden. Zwischen 27 und 48 Stunden nach der Infektion codieren etwa 20 % der gesamten mRNA der Wirtszelle für Polyhedrin, das bis zu 50 % des Gesamtproteins einer Zelle ausmachen kann. Die Expression von Genen der Wirtszelle wird vollständig abgeschaltet. Somit sollte der Ersatz des Polyhedrins durch ein Fremdgen beste Voraussetzungen für die Überexpression des Fremdproteins schaffen.

In dieser Arbeit wurde das Baculovirus *AcMNPV* des Eulenfalters *Autographa californica* (*Autographa californica* multiply eembedded nuclear polyhedrosis virus = multipler Kernpolyedervirus) verwendet. Bei Kernpolyederviren sind jeweils mehrere Viren im Zellkern von einer Polyhedrinmatrix umhüllt. Der Term „multiply“ bedeutet, dass mehrere Nukleokapside zusammen von einer einzelnen Membran umhüllt werden und als solche in die Polyhedrinmatrix eingebettet („embedded“) werden. Das *AcMNPV*-Genom umfasst 134 kbp und kann wahrscheinlich dadurch, dass das Nukleokapsid in seiner Größe zunehmen kann, Fremd-DNA von bis zu 100 kbp aufnehmen.

Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist, dass die verwendeten *Sf* 9-Insektenzellen leicht in Suspensionskulturen vermehrt werden können und dort Zelldichten von bis zu  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml erreichen. Insektenzellen führen darüber hinaus ähnliche posttranslationale Modifikationen durch, wie sie auch in Säugerzellen beobachtet werden, wie z. B. Glycosylierungen. Nähere Informationen zum Baculovirus-Expressionssystem findet man im Handbuch „Baculovirus Expression Vectors“ von O’Reilly *et al.* [127].

In *Sf* 9-Zellen wurden bereits mehrere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erfolgreich überexprimiert, wie die muscarinischen  $M_1$  und  $M_2$  Acetylcholinrezeptoren [128], der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor [129] und der menschliche Endothelin<sub>B</sub>-Rezeptor [126]. Diese Rezeptoren erreichten Rezeptordichten von 20 – 100 pmol/mg, wohingegen der humane OT-Rezeptor bisher nur in einer Dichte von 1 pmol/mg exprimiert werden konnte [130]. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, die Expression des OT-Rezeptors in den *Sf* 9-Zellen weiter zu optimieren. Im Hinblick auf diese Arbeit ist ein weiterer Vorteil von

Insektenzellen deren Cholesterinauxotrophie. Da Insektenzellen nicht in der Lage sind, Cholesterin zu synthetisieren, stammt das Cholesterin ihrer Membranen aus dem Serum des Zellkulturmediums. Somit kann der OT-Rezeptor in cholesterinfreien oder -armen Zellen untersucht werden, ohne dass zunächst das endogene Cholesterin entfernt werden muss. Alternativ können diese Zellen auch mit anderen Steroiden angereichert werden, ohne dass störende Einflüsse von restlichem endogenem Cholesterin zu befürchten wären. Ein Nachteil des Insektenzellsystems ist, dass die Zellen nicht stabil transfiziert, sondern 4 bis 5 Tage nach der Infektion durch das Virus lysiert werden. Vor der Lyse gehen die Funktionen der Wirtszelle nach und nach verloren, so dass posttranslationale Modifikationen in sehr späten Stadien der Infektion nicht mehr korrekt durchgeführt werden. Durch die Zellyse werden zudem Proteasen freigesetzt, die das Fremdprotein abbauen können. Der optimale Zeitpunkt der Zellernte ist für jedes Fremdprotein neu zu bestimmen und ist ein Kompromiss zwischen maximaler Expression des funktionellen Proteins (also z. B. des hochaffinen OT-Rezeptors) und einsetzender Proteolyse, die z. B. zum Abbau der Fusionspeptide an den Enden des Rezeptorproteins führt. Weitere Probleme betreffen die Glycosylierungsmuster der in Insektenzellen exprimierten Fremdproteine, die von denen in Säugerzellen abweichen können [131] und die Tatsache, dass Insektenzellen keine Kohlenhydratseitenketten vom Mannose-reichen Typ, die Mannose-6-phosphat enthalten, synthetisieren können [132]. Der OT-Rezeptor mit seinen drei Asn-Glycosylierungsstellen wird in *Sf* 9-Zellen nur schwach glycosyliert [130]. Im Falle des OT-Rezeptors ist die Glycosylierung jedoch für die Ligandenbindung nicht nötig [133].

#### Klonierung des Transfervektors zur Expression des humanen Oxytocinrezeptors in *Sf* 9-Zellen

Zur Expression des humanen OT-Rezeptors in *Spodoptera frugiperda* 9-Zellen (*Sf* 9-Zellen) wurde der Transfervektor pVLMelFlagOTRHis<sub>10</sub> konstruiert (Abbildung 10). Dieser Vektor enthält die cDNA des OT-Rezeptors, der N-terminal von der Signalsequenz Präpromellitin und einem FLAG-Epitop und C-terminal von einem Dekahistidin-tag (His<sub>10</sub>) flankiert wird. Dieses Konstrukt steht unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors. Die insektenzellspezifische Signalsequenz Präpromellitin sollte den OT-Rezeptor zum endoplasmatischen Retikulum leiten, so dass der Rezeptor in die Plasmamembran eingebaut werden würde. Zudem wird nach Abspaltung der Signalsequenz im

endoplasmatischen Retikulum durch Signalpeptidasen das Aspartat des FLAG-Epitops zur ersten N-terminalen Aminosäure des Rezeptorkonstruktes. Dies ist für die Erkennung des FLAG-Epitops durch den anti-FLAG M1-Antikörper bei der Affinitätschromatographie notwendig [134]. Das FLAG-Epitop und das Dekahistidin-tag ermöglichten zum einen den immunologischen Nachweis des Rezeptors im Western-Blot und sollten zum anderen zur Reinigung des Rezeptors verwendet werden.

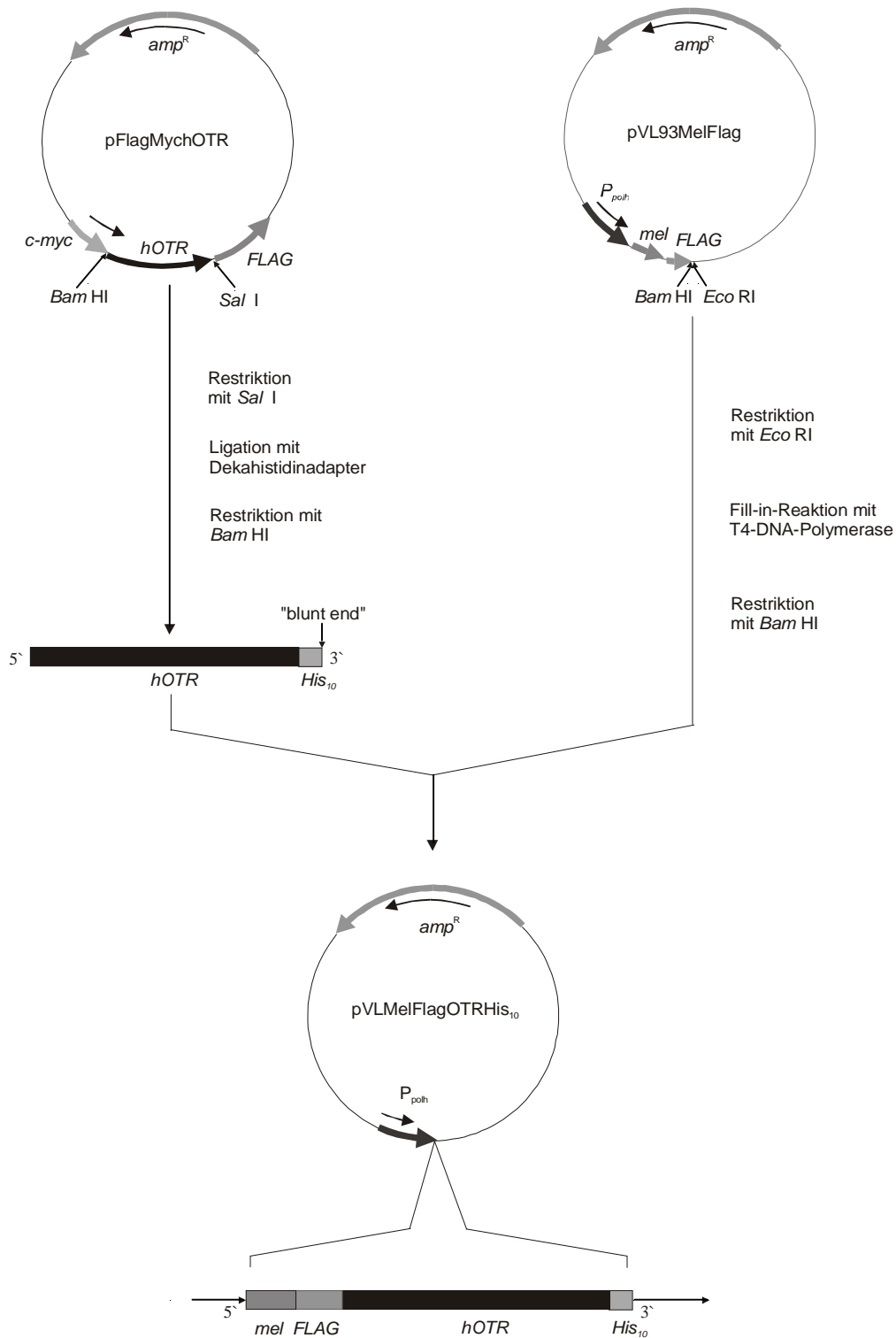
Zur Klonierung des Transfervektors pVLMelFlagOTRHis<sub>10</sub> wurde das Plasmid pVL93MelFlag (Abbildung 10) verwendet. Dieses Plasmid wurde von Dr. H. Reiländer (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt und enthält die DNA für die Signalsequenz Präpromellitin und das FLAG-Epitop unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors des Baculovirus *AcMNPV* stromaufwärts einer multiplen Klonierungsstelle. pVL93MelFlag geht ursprünglich auf das Plasmid pVL1392 [135] zurück. Dieses Plasmid enthält die komplette Sequenz von pUC8 zur Amplifikation in *E. coli*, ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion transformierter *E. coli*, das Polyhedrinstrukturgen des Baculovirus *AcMNPV* mit seinem viralen Promotor, sowie eine Polylinkerregion zur Insertion von Fremdgenen und den Terminator mit der Polyadenylierungssequenz.

Zunächst wurde das Plasmid pVL93MelFlag im reparaturdefizienten *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  vermehrt und anschließend mit der Restriktionsendonuklease *Eco* RI linearisiert. Die 5'-überhängenden Enden der *Eco* RI-Schnittstelle wurden durch die T4-DNA-Polymerase zu stumpfen Enden aufgefüllt. Anschließend wurde das linearisierte Plasmid mit der Restriktionsendonuklease *Bam* HI direkt hinter der codierenden Sequenz für das FLAG-Epitop hydrolysiert und durch präparative Agarose-Gelelektrophorese, Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt.

Zur Gewinnung eines DNA-Fragmentes, welches die cDNA des humanen OT-Rezeptors enthält, wurde der Transfervektor pFlagMychOTR verwendet, der von Dr. G. Gimpl (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt wurde (Abbildung 10). Dieser Vektor enthielt die komplette codierende DNA-Sequenz des humanen OT-Rezeptors mit zusätzlichem N-terminalen c-myc- und C-terminalen FLAG-Epitop. Durch Verdau dieses Vektors mit der Restriktionsendonuklease *Sal* I direkt hinter dem 3'-Ende der für den OT-Rezeptor codierenden Sequenz wurde der Vektor linearisiert. An diese Stelle wurde die codierende Sequenz für das Dekahistidin-tag ligiert. Der Vektor wurde anschließend mit *Bam* HI zwischen den codierenden Sequenzen für das c-myc-Epitop und den OT-Rezeptor

geschnitten, so dass ein 1250 bp großes Fragment erhalten wurde, das für den OT-Rezeptor mit einem C-terminalen His<sub>10</sub>-tag codiert. Dieses Fragment wurde ebenfalls durch präparative Agarose-Gelelektrophorese, Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt.

Das resultierende DNA-Fragment wurde mit dem linearisierten Plasmid pVL93MelFlag/ $\Delta$ Eco RI/ $\Delta$ Bam HI ligiert und zur Amplifikation in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Der resultierende Transfervektor pVLMelFlagOTRHis<sub>10</sub> (Abbildung 10) wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  vermehrt und durch Zentrifugation im Cäsiumchloridgradienten gereinigt. Die Identität des Vektors wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft und bestätigt, wobei die notwendigen Primer zur Sequenzierung der Klonierungsstellen von Dr. H. Reiländer, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt worden waren.



**Abbildung 10: Klonierungsschema für den Transfervektor pVLMelFlagOTRHis<sub>10</sub>**

*mel*: Präpromellitin; *FLAG*: FLAG-Epitop; *c-myc*: c-myc-Epitop; *hOTR*: cDNA des menschlichen OT-Rezeptors; *His<sub>10</sub>*: Dekahistidin-tag; *amp<sup>r</sup>*: Ampicillinresistenz-Gen; *P<sub>polh</sub>*: Polyhedrin-Promotor  
Erläuterungen s. Text.

### Herstellung und Klonierung des rekombinanten Baculovirus und Amplifikation der Viruslysate

Die Expression des OT-Rezeptors erfolgte durch die Infektion von *Sf* 9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren, welche die cDNA des OT-Rezeptors ins Genom integriert hatten. Diese Baculoviren werden durch Kotransfektion des Transfervektors pVLMelFlagOTRHis<sub>10</sub> mit linearisierter Wildtyp-Baculovirus-DNA in *Sf* 9-Zellen erzeugt (S. 51). Das rekombinante Baculovirus wurde als pVLMelFlagOTRHis<sub>10</sub>/AcMNPV bezeichnet und durch Plaque-Assay gereinigt (S. 51). Zur Expression des OT-Rezeptors in *Sf* 9-Zellen wurden Viruslysate der vierten Viruspassage (P4-Stock) eingesetzt. Die rekombinanten Baculoviren der P1-Stocks wurden hierfür in drei Passagen in *Sf* 9-Zellen amplifiziert (S. 53).

### Analyse der Expression und Optimierung der Ligandenbindung des humanen Oxytocinrezeptors in *Sf* 9-Zellen

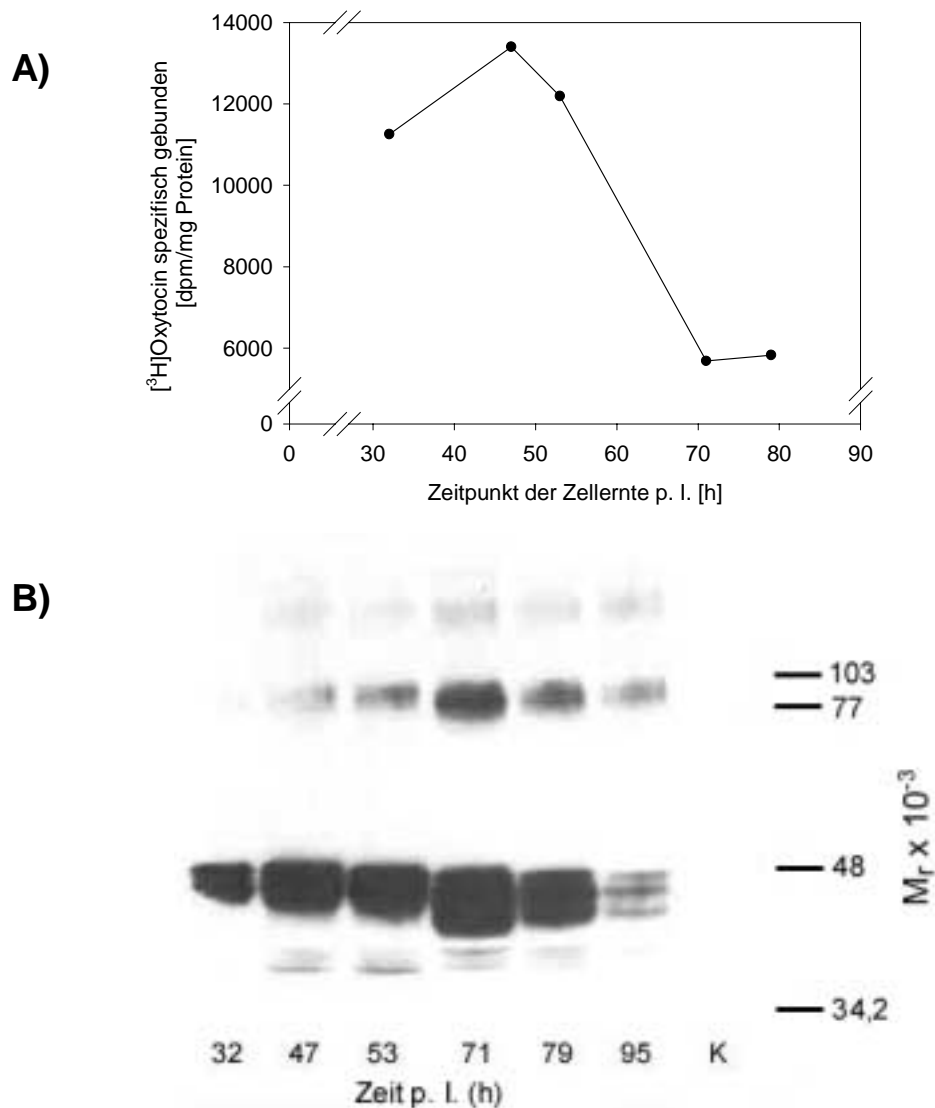
In der Arbeitsgruppe von Prof. Fahrenholz war von Gimpl *et al.* bereits ein OT-Rezeptorkonstrukt mit N-terminalem c-myc-Epitop in *Sf* 9-Zellen exprimiert worden [130]. Hierbei wurde eine Rezeptordichte von  $B_{\max} = 1,0$  pmol/mg erreicht. Da jeder Rezeptor einen anderen charakteristischen Zeitverlauf der Expression bzw. maximalen Ligandenbindung zeigt, untersuchte ich zunächst den zeitlichen Expressionsverlauf des OT-Rezeptors nach Infektion der *Sf* 9-Zellen mit pVLMelFlagOTRHis<sub>10</sub>/AcMNPV (MOI = 5). Gleichzeitig wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion 0,1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD in das Medium gegeben, um die Menge an hochaffinem OT-Rezeptor zu maximieren.

Abbildung 11 (A) zeigt die spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]Oxytocin pro mg Membranprotein in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt der Zellernte nach der Infektion. In diesem Beispiel war 23 Stunden nach der Infektion 0,1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD zu den Zellen gegeben worden. Maximale spezifische Bindung wurde 47 Stunden nach der Infektion gemessen. Der gleiche Versuch wurde mit Zellen durchgeführt, die 32,5 Stunden, 47,5 Stunden bzw. 54,0 Stunden nach Infektion 0,1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD erhalten hatten. Diese späteren Cholesterinzugaben führten allerdings in allen Fällen zu deutlich schlechteren Bindungstestergebnissen (nicht gezeigt). Eine Erklärungsmöglichkeit für diesen Befund liefern neuere Erkenntnisse über einen Zusammenhang zwischen dem

Cholesteringehalt biologischer Membranen und der thermischen Stabilität des OT-Rezeptors. Diese Studien werden auf S. 93 ausführlicher diskutiert.

Ergänzend zu den Ligandenbindungstests wurde ein Western-Blot der Membranen der *Sf* 9-Zellen durchgeführt, die 23 Stunden nach der Infektion Cholesterin erhalten hatten und zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion geerntet worden waren (Abbildung 11 (B)). Etwa 70 Stunden p. I. liegt die größte Menge an OT-Rezeptor in den Zellen vor, das heißt, bis zu diesem Zeitpunkt überwiegt die Expression des Rezeptors den proteolytischen Abbau. Zu späteren Zeitpunkten p. I. überwiegt dann der proteolytische Abbau, da durch die Zellyse Proteasen freigesetzt werden. Man erkennt deutlich, dass der Zeitpunkt der maximalen Menge an OT-Rezeptor (etwa 70 Stunden p. I.) nicht mit dem der maximalen spezifischen OT-Bindung (etwa 47 Stunden p. I.) zusammenfällt. Ein Grund hierfür könnte die mit fortschreitender Infektion verminderte Fähigkeit der Zellen sein, posttranslationale Modifikationen durchzuführen oder den Rezeptor korrekt zu falten [127].

Rechnerisch beträgt die Masse des nichtglycosylierten OT-Rezeptorkonstruktes 45809 Da. Die diffuse Bande zwischen 41,9 und 51,6 kDa besteht daher aus unglycosyliertem oder schwach glycosyliertem (bis zu 5,8 kDa Kohlenhydrate) monomeren OT-Rezeptor bzw. Abbauprodukten. Desweiteren sind auf dem Western-Blot zwei spezifische Banden mit größerer Masse (89,5 – 97 kDa und 132 – 154 kDa) zu sehen, die wahrscheinlich Dimere und Oligomere des OT-Rezeptors darstellen. Banden zwischen 37,6 und 40,8 kDa sind möglicherweise proteolytische Abbauprodukte des Rezeptors.



**Abbildung 11: Zeitverlauf der Expression des Oxytocinrezeptors in *Sf* 9-Zellen (Ligandenbindungstest und Western-Blot)**

Die *Sf* 9-Zellen hatten 23 Stunden nach der Infektion (p. I.) mit dem rekombinanten Baculovirus pVLMelFlagOTRHis<sub>10</sub>/AcMNPV 0,1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD erhalten. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden Zellen geerntet. Die Membranen wurden (**A**) für einen [<sup>3</sup>H]OT-Bindungstest (zusätzlich 0,1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD) und (**B**) für einen Western-Blot verwendet (70  $\mu$ g Protein pro Spur; K = Kontrolle mit Membranen von *Sf* 9-Zellen, die ein OT-Rezeptorkonstrukt exprimierten, das nur ein c-myc-Epitop trug; Erstantikörper: anti-FLAG M2; Zweitantikörper: peroxidasegekoppelter anti-Maus-Antikörper; Nachweissystem: ECL (Amersham)).

Es stellte sich bei diesen Versuchen auch heraus, dass Cholesterin/M $\beta$ CD zumindest bei finalen Konzentrationen von 0,1 mM Cholesterin schädlich für die Zellen ist. Die Zellen wurden „grieselig“ und lösten sich leichter vom Untergrund ab als unbehandelte Zellen. Daher wurde in weiteren Optimierungsversuchen 0,02 mM Cholesterin/M $\beta$ CD eingesetzt. Bei diesen Versuchen wurde zum einen getestet, ob eine frühere Zugabe von Cholesterin/M $\beta$ CD (zwischen 2 und 24 Stunden p. I.) zu den infizierten Zellen eine weitere Erhöhung der Bindung ergeben könnte. Zum anderen wurden Zellen schon drei Tage vor der Baculovirusinfektion mit 0,02 mM Cholesterin/M $\beta$ CD inkubiert, um die Zellen gewissermaßen an Cholesterin zu adaptieren. Durch die Adaption wurde ein größerer zeitlicher Abstand zwischen den Stressfaktoren „Cholesterinbehandlung“ und „Baculovirusinfektion“ erreicht. Außerdem sollte eine Cholesterinanreicherung der Zellen vor der Baculovirusinfektion den OT-Rezeptor gleich zu Beginn der Expression in einem Zustand hoher Affinität zu Oxytocin stabilisieren. Zu der Hälfte der „Cholesterin-adaptierten“ Zellen wurde zwei Stunden nach der Infektion nochmals 0,02 mM Cholesterin/M $\beta$ CD gegeben. Parallel wurden alle Versuche mit 0,02 mM Cholesterinhemisuccinat durchgeführt. Cholesterinhemisuccinat lagert sich gut in Zellmembranen ein und kann danach durch intrazelluläre Esterasen zu Cholesterin und Succinat hydrolysiert werden. Cholesterinhemisuccinat wurde als 5 mM Stammlösung (10 % DMSO) eingesetzt, so dass die Zellen final 0,04 % DMSO erhielten. Die Obergrenze für die Verträglichkeit der *Sf* 9-Zellen liegt bei 0,1 % DMSO (Dr. G. Gimpl, persönliche Mitteilung). Auf diese Weise wurde zudem die Verwendung von M $\beta$ CD vermieden. In allen Fällen wurden die Zellen 47 Stunden nach der Infektion geerntet (Tabelle 2).

Leider führte eine Zugabe von Cholesterin in Form von M $\beta$ CD-Komplexen oder in Form von Cholesterinhemisuccinat vor der Baculovirusinfektion zu keinerlei spezifischer Bindung von [ $^3$ H]Oxytocin an die Zellmembranen, selbst wenn zwei Stunden p. I. zusätzlich 0,02 mM Cholesterinhemisuccinat ins Medium gegeben wurde, was bei nichtadaptierten Zellen zu 54 fmol spezifischer [ $^3$ H]OT-Bindung pro mg Protein geführt hatte. Eventuell interferiert die Adaption der Zellen an Cholesterinhemisuccinat mit der Expression des Rezeptors. Auf die Morphologie der Zellen hatte Cholesterinhemisuccinat keinen signifikanten Einfluss, wohingegen viele der mit Cholesterin/M $\beta$ CD adaptierten Zellen doppelt so groß waren wie die Kontrollzellen.

**Tabelle 2: Adaption von Sf 9-Zellen an Cholesterin vor der Baculovirus-Infektion und Optimierung des Zeitpunktes der Cholesterinzugabe nach der Infektion**

Sf 9-Zellen wurden drei Tage vor der Infektion mit pVLMelFlagOTRHis<sub>10</sub>/AcMNPV mit 0,02 mM Cholesterinhemisuccinat (CH) bzw. Cholesterin/M $\beta$ CD (Chol/M $\beta$ CD) an Cholesterin adaptiert. Zwei Stunden nach der Infektion erhielt die Hälfte der Ansätze zusätzlich 0,02 mM CH bzw. Chol/M $\beta$ CD. In einer zweiten Serie von Experimenten wurde zu Zellen, die nicht an Steroide adaptiert worden waren, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion 0,02 mM bzw. 0,1 mM CH oder Chol/M $\beta$ CD gegeben. Der Ligandenbindungstest an Membranen dieser Zellen ist auf S. 70 beschrieben.

Steroidzugabe (0,02 mM) vor Infektion	Steroidzugabe nach Infektion			[ <sup>3</sup> H]OT spezifisch gebunden [fmol/mg]
	Steroid	Konzentration [mM]	Zeitpunkt p.I. [h]	
CH	CH	0,02	2	0
	–	–	–	0
Chol/M $\beta$ CD	Chol/M $\beta$ CD	0,02	2	0
	–	–	–	0
–	CH	0,02	2	54
		0,02	4,5	0
		0,02	7	0
		0,02	23,5	0
		0,1	23,5	8
–	Chol/M $\beta$ CD	0,02	2	0
		0,02	4,5	28
		0,02	7	17
		0,02	23,5	84
		0,1	23,5	296

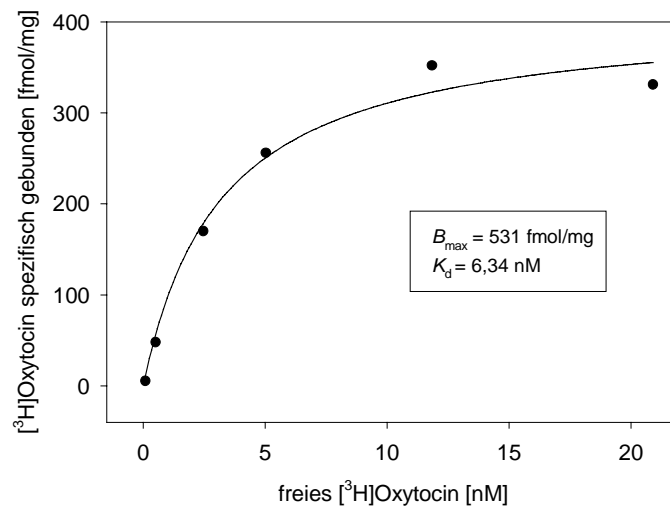
Der beste Zeitpunkt für die Cholesterinhemisuccinatzugabe schien kurz nach der Infektion zu liegen, die Zugabe von Cholesterin/M $\beta$ CD ergab etwa 24 Stunden nach der Infektion die höchste spezifische Bindung. Es ist möglich, dass bei früherer Zugabe von Cholesterin/M $\beta$ CD die Ligandenbindung deswegen niedriger ist, weil die Schädigung der Zellen durch den Cyclodextrinkomplex überwiegt. Generell jedoch ist Cholesterin in Form eines Cyclodextrinkomplexes besser zur Optimierung der spezifischen Bindung geeignet als Cholesterinhemisuccinat. Trotz seiner schädigenden Wirkung auf Sf 9-Zellen ergab die Zugabe von 0,1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD eine mehr als dreifach höhere spezifische Bindung als die Zugabe von lediglich 0,02 mM Cholesterin/M $\beta$ CD.

In einem letzten Optimierungsversuch wurde Zellen 24 Stunden nach der Infektion 0,06 mM, 0,1 mM bzw. 0,3 mM Cholesterin/M $\beta$ CD zugesetzt. Die Zugabe von 0,3 mM Cholesterin/M $\beta$ CD erbrachte eine weitere leichte Erhöhung der Ligandenbindung um 25 % verglichen mit der Zugabe von 0,1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD.

Mit diesen Vorgaben wurde nun folgendes Experiment durchgeführt:

- Infektion von Sf 9-Zellen mit pVLMelFlagOTRHis<sub>10</sub>/AcMNPV
- 24 Stunden p.I. Zugabe von 0,3 mM Cholesterin/M $\beta$ CD

- 48 Stunden p.I. Zellernte und Membranpräparation
- unmittelbar vor dem Bindungstest: zusätzliche Anreicherung der Membranen mit final 1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD bei 464  $\mu$ g Cholesterin pro mg Protein. Dies entspricht in etwa der 4,5fachen Menge an Cholesterin von Säugerzellmembranen. An solubilisiertem Rezeptor wurde ab einer Cholesterinkonzentration von etwa 0,6 mM Cholesterin maximale Bindung von [ $^3$ H]OT gemessen, wobei sich die Bindung bei noch höheren Cholesterinmengen nicht mehr veränderte [120].
- Sättigungsexperiment mit 100  $\mu$ g Membranprotein (Abbildung 12)



**Abbildung 12: Sättigungsexperiment mit [ $^3$ H]Oxytocin an Membranen von *Sf 9*-Zellen, die mit pVLMelFlagOTRHis $_{10}$ /AcMNPV infiziert worden waren**

24 Stunden nach der Infektion wurde dem Zellkulturmedium final 0,3 mM Cholesterin/M $\beta$ CD zugesetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Infektion geerntet. Das Sättigungsexperiment mit 100  $\mu$ g Membranen pro 100  $\mu$ l wurde durchgeführt wie auf S. 71 beschrieben. Hierbei erhielten die Proben zusätzlich final 1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD.

Unter diesen optimierten Bedingungen wurde der OT-Rezeptor hochaffin mit einem  $K_d$ -Wert von 6,34 nM exprimiert. Ein vergleichbarer  $K_d$ -Wert (6,0 nM) wurde bereits von Kimura *et al.* in COS-1-Zellen, die ebenfalls mit dem menschlichen OT-Rezeptor transfiziert worden waren, bestimmt [136]. In myometrialen Zellmembranen von Meerschweinchen am Ende der Trächtigkeit ist die Ligandenaffinität des OT-Rezeptors noch höher und beträgt etwa 1 nM [120]. Leider lag die Rezeptordichte in den *Sf 9*-Zellen unter optimalen Bedingungen bei lediglich 531 fmol/mg Membranprotein und somit deutlich unter derjenigen myometrialer Zellen (> 2 pmol/mg). Daher erschien es sinnvoller, als Ausgangsmaterial für die Reinigung des OT-Rezeptors transfizierte

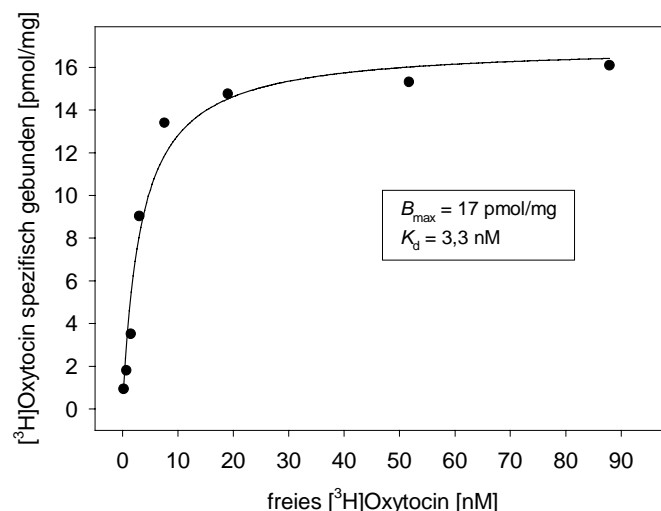
HEK293-Zellen zu verwenden (folgender Abschnitt), die den Rezeptor in hoher Dichte exprimieren, jedoch als Zellrasen gezüchtet werden müssen.

#### 4.1.2. Expression und Charakterisierung des humanen Oxytocinrezeptors in HEK293-Zellen

Die Zelllinie HEK293 stammt aus menschlichem embryonalem Nierengewebe (human embryonic kidney) und wird in vielen Laboratorien verwendet, da sie einfach transfizierbar ist, einen raschen Zellzyklus (ca. 24 Stunden) besitzt und leicht zu kultivieren ist. Zur Gewinnung des OT-Rezeptors für funktionelle Studien wurde von Dr. G. Gimpl eine stabil transfizierte HEK293-Zelllinie als homologes Expressionssystem erzeugt, die den menschlichen OT-Rezeptor mit N-terminalem FLAG-Epitop, gefolgt von einem c-myc-Epitop und C-terminalem Dekahistidin-tag exprimiert. Dieses Rezeptorkonstrukt bestand aus 427 Aminosäuren und hatte ein Molekulargewicht von 47396 (Abbildung 1). Die Klonierung des hierfür verwendeten Transfervektors pfmOTRHis wurde von Dr. G. Gimpl durchgeführt, der rekombinante Einzelzellklon wurde als HEK-OTRhis bezeichnet.

#### Sättigungsexperiment mit [<sup>3</sup>H]Oxytocin an HEK-OTRhis-Membranen

Kurz nach seiner Generierung zeigte der Klon HEK-OTRhis eine überaus hohe Rezeptordichte von  $B_{\max} = 60$  pmol/mg, die allerdings im Laufe der Zellpassagen auf – immerhin – 17 pmol/mg bei einem  $K_d$ -Wert von 3,3 nM zurückging (Abbildung 13).

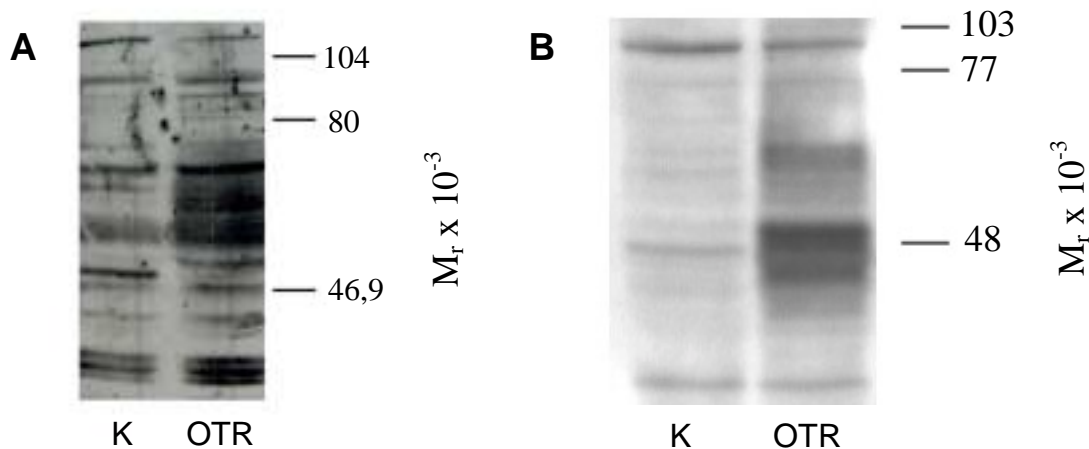


#### **Abbildung 13: Sättigungsexperiment mit [<sup>3</sup>H]Oxytocin an HEK-OTRhis-Membranen**

Das Sättigungsexperiment mit 1  $\mu$ g Membranen des HEK-OTRhis-Zellklons pro 100  $\mu$ l wurde durchgeführt wie auf S. 71 beschrieben. Der Klon war seit seiner Generierung etwa 20-mal passagiert worden.

### Nachweis des Dekahistidin-tags und des FLAG-Epitops des Oxytocinrezeptors durch Western-Blot

Das Dekahistidin-tag bzw. das FLAG-Epitop waren die Voraussetzung für die Reinigung des OT-Rezeptors durch eine Metallchelate-Affinitätschromatographie bzw. über die Anti-FLAG<sup>®</sup> M1 Antikörper-Matrix. Im Western-Blot wurde der OT-Rezeptor spezifisch sowohl durch den anti-His<sub>6</sub>-Antikörper als auch durch den anti-FLAG M2-Antikörper erkannt und besaß somit zumindest einen Teil seines His<sub>10</sub>-tags und das N-terminale FLAG-Epitop (Abbildung 14). Die diffuse Rezeptorbande hat in beiden Blots eine molare Masse von 61 bis 71 kDa. Der in HEK293-Zellen überexprimierte menschliche OT-Rezeptor wird also etwas schwächer glycosyliert (Kohlenhydratanteil von 13 bis 23 kDa) als der OT-Rezeptor in den Meerschweinchenmyometriem (Kohlenhydratanteil = 25 bis 37 kDa) [137]. Im anti-FLAG M2-Blot ist zusätzlich eine diffuse Bande von 46,8 bis 52,9 kDa zu erkennen, die aus nicht oder nur schwach glycosyliertem Rezeptor bzw. Degradationsprodukten des Rezeptors besteht.



**Abbildung 14: Western-Blot mit HEK-OTRhis-Membranen und anti-His<sub>6</sub> (CERN9414) bzw. anti-FLAG M2-Antikörper als Erstantikörper**

(A) Proteine von 300  $\mu$ g HEK-OTRhis-Membranen (OTR) wurden durch ein großes SDS-PAGE-Plattengel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Erstantikörper: anti-His<sub>6</sub>-Antikörper CERN9414. (B) Proteine von 50  $\mu$ g HEK-OTRhis-Membranen wurden durch ein Minigel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Erstantikörper: anti-FLAG M2-Antikörper. Zweitantikörper in beiden Blots: peroxidasegekoppelter anti-Maus-Antikörper. Nachweissystem: ECL (Amersham). Als Kontrolle dienten Membranen nichttransfizierter HEK293-Zellen (K).

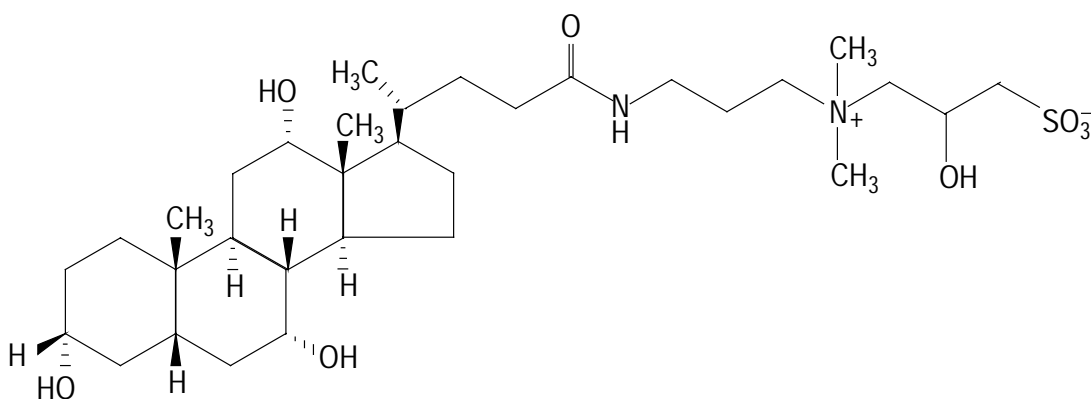
## 4.2. Versuche zur Reinigung des menschlichen Oxytocinrezeptors

Alle Versuche zur Reinigung des OT-Rezeptors wurden, falls nicht anders angegeben, mit Membranen von HEK-OTRhis-Zellen (s. S. 87) durchgeführt, da diese die höchste Rezeptordichte (17 pmol/mg) enthielten und somit das beste Ausgangsmaterial darstellten.

### 4.2.1. Solubilisierung des menschlichen Oxytocinrezeptors

Vor der chromatographischen Anreicherung oder Reinigung integraler Membranproteine müssen diese zunächst durch Detergenzien aus der zellulären Membran gelöst werden. Geeignete Detergenzien solubilisieren den Rezeptor unter Erhalt oder zumindest unter reversiblen Verlust seiner Fähigkeit, Oxytocin zu binden. Im Idealfall findet sogar bereits bei der Solubilisierung eine Anreicherung des OT-Rezeptors statt, d. h. das Detergens löst prozentual mehr OT-Rezeptoren als restliche Proteine aus der Membran. Ein Detergens muss außerdem mit den geplanten chromatographischen Techniken kompatibel sein.

Vor Beginn dieser Arbeit waren bereits verschiedenste Detergenzien wie z. B. Triton X-100, Natriumcholat und Digitonin auf die funktionelle Solubilisierung des OT-Rezeptors getestet worden [138]. Lediglich die beiden Gallensäurederivate CHAPS und CHAPSO ermöglichten die Solubilisierung des Rezeptors aus Myometriemembranen von Meerschweinchen-Uteri unter nennenswertem Erhalt (ca. 7 bzw. 8 %) der spezifischen hochaffinen Bindung. Abbildung 15 zeigt die Strukturformel von CHAPSO, das auch bei dieser Arbeit für die meisten Chromatographieversuche verwendet wurde.

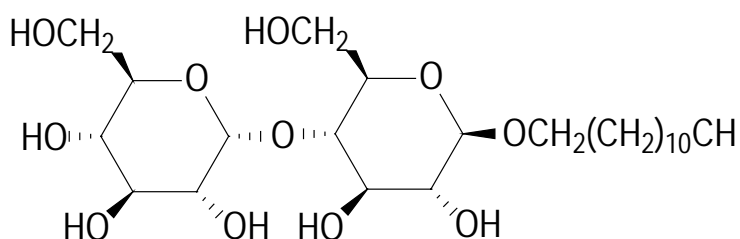


**Abbildung 15: Strukturformel des Detergens CHAPSO**

CHAPSO (3-[(3-Cholaminopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonat) ist ein Sulfobetain-Derivat der Gallensäure mit einem Steroid-Grundkörper und einer zwitterionischen Seitenkette.

Mitte der neunziger Jahre gelang es B. K. Kobilka den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor aus *Sf* 9-Membranen fast bis zur Homogenität zu reinigen [129]. Wie auch in dieser Arbeit geplant, kombinierte Kobilka die Metallchelate-Affinitätschromatographie und die Anti-FLAG<sup>®</sup> M1-Affinitätschromatographie. Da Kobilka das Detergens Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (D $\beta$ M, Abbildung 16) verwendet hatte, wurde dieses zunächst auf die funktionelle Solubilisierung des OT-Rezeptors getestet.

### Solubilisierungsversuche mit Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid



**Abbildung 16: Strukturformel von Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid**

In diesen Versuchen wurden Puffer mit verschiedenen D $\beta$ M-Konzentrationen (0.5 %, 1.0 % und 1.5 %) auf die funktionelle Solubilisierung des OT-Rezeptors getestet und mit einem Solubilisierungspuffer verglichen, der 0.8 % CHAPSO enthielt. Gleichzeitig wurde der Einfluss von NaCl auf den Solubilisierungsprozess untersucht. Die Solubilisierung wurde mit HEK-OTRmyc-Membranen durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die später verwendeten HEK-OTRhis-Membranen noch nicht zur Verfügung standen. HEK-OTRmyc-Zellen exprimieren den menschlichen OT-Rezeptor, der N-terminal ein c-myc-Epitop besitzt, und wurden mir ebenfalls von Dr. G. Gimpl zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse des Ligandenbindungstest sind in folgender Tabelle zusammengefasst, in deren Legende auch die genaue Zusammensetzung des Puffer beschrieben ist.

**Tabelle 3: Solubilisierung des menschlichen Oxytocinrezeptors durch Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid bzw. CHAPSO**

HEK-OTRmyc-Membranen wurden mit verschiedenen D $\beta$ M-Konzentrationen bzw. mit 0,8 % CHAPSO bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen solubilisiert (Puffer: 20 mM HEPES (pH = 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 % (w/v) Glycerin, 0,1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD) (S. 55). Für den Ligandenbindungstest wurden alle Solubilisate auf 130 mM NaCl und 0,3 % Detergens gebracht bei ansonsten gleichbleibender Pufferzusammensetzung. Die [<sup>3</sup>H]OT-Bindung ([<sup>3</sup>H]OT) und die Proteinkonzentrationen der Solubilisate wurden gemessen wie im Methodenteil beschrieben. Die Werte beziehen sich auf unverdünntes Solubilisat.

Detergenskonz. bei Solubilisierung (w/v)	NaCl [mM]	[ <sup>3</sup> H]OT spezifisch gebunden [dpm/ml Solubilisat]	[ <sup>3</sup> H]OT spezifisch gebunden [% der Membranbindung]	Proteinkonz. [mg/ml]	solubiliertes Protein [% des Membranproteins]	Rezeptorkonzentration im Solubilisat [pmol/mg]
0,5 % D $\beta$ M	0	49634	2,6	1,375	27,5	0,47
	300	79166	4,1	2,627	52,5	0,39
	600	73600	3,8	2,774	55,5	0,34
1,0 % D $\beta$ M	0	54694	2,8	1,297	25,9	0,55
	300	70610	3,7	2,700	54	0,34
	600	57500	3,0	2,861	57,2	0,26
1,5 % D $\beta$ M	0	59064	3,1	1,348	27	0,57
	300	63480	3,3	2,742	54,8	0,30
	600	63250	3,3	2,898	58	0,28
0,8 % CHAPSO	300	312892	16,3	2,571	51,4	1,58

Offenbar reichten 0,5 % D $\beta$ M aus, um eine maximale Menge an Proteinen zu solubilisieren, da eine Erhöhung der Detergenskonzentration bei jeweils gleicher NaCl-Konzentration keine wesentliche Erhöhung der Proteinmenge im Solubilisat erbrachte. Verwendung von 300 mM NaCl verdoppelte in etwa die Menge an solubiliertem Protein im Vergleich zu NaCl-freien Ansätzen. Eine weitere Erhöhung auf final 600 mM NaCl brachte hingegen nur noch eine leichte Steigerung der Proteinmenge im Solubilisat auf durchschnittlich 56,9 % der eingesetzten Proteinmenge. Der in der Arbeitsgruppe seit längerem verwendete CHAPSO-Puffer solubilisierter bei diesen Bedingungen ebenfalls etwa die Hälfte (52,3 %) der eingesetzten Proteinmenge. Die Veränderung der Ionenstärke des Solubilisierungspuffers beeinflusste zudem die Bindungsaktivität im Solubilisat, die bei 300 mM NaCl maximal ist. Bei ähnlichen Solubilisierungsversuchen mit CHAPSO wurde ein breites Maximum der spezifischen Bindung im Konzentrationsbereich von 200 – 700 mM NaCl gefunden [138].

Maximale spezifische Bindung bei der Solubilisierung mit D $\beta$ M wurde bei der Kombination von 0,5 % D $\beta$ M mit 300 mM NaCl gefunden (79166 dpm/ml Solubilisat). Bei einer spezifischen Aktivität des eingesetzten [<sup>3</sup>H]OT von 77700 dpm/pmol entspricht dies 1,03 pmol OT-Rezeptor/ml Solubilisat bzw. 4,1 % der Bindungsaktivität der Membran. CHAPSO hingegen solubilisierter etwa 16 % funktionellen Rezeptor aus der

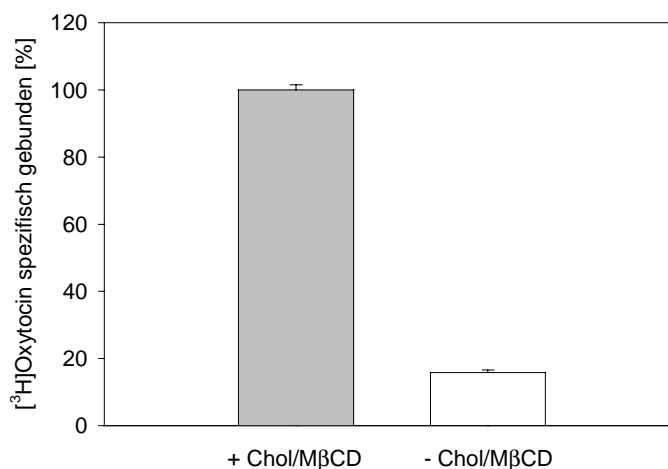
Membran. Die Variation der D $\beta$ M-Konzentration führte zu keinem klaren Ergebnis hinsichtlich der Maximierung der Ligandenbindung. Dies weist ebenfalls darauf hin, dass die maximal mögliche Solubilisierung des funktionellen OT-Rezeptors schon bei 0,5 % D $\beta$ M erreicht wurde.

Die Rezeptordichte im Solubilisat betrug bei Verwendung von CHAPSO 1,58 pmol/mg Protein, also 32 % der Rezeptordichte der Membranen. Bei D $\beta$ M-Solubilisaten betrug die Rezeptordichte bei allen Ansätzen weniger als 12 % der ursprünglichen Rezeptordichte. Die geringe [ $^3$ H]OT-Bindung von D $\beta$ M-Solubilisaten könnte zum einen an der geringen Solubilisierung des Rezeptors liegen oder aber, was angesichts der solubilierten Proteinmengen wahrscheinlicher ist, an einem Verlust der Bindungsaffinität durch die Solubilisierung. Für die funktionelle Solubilisierung ist D $\beta$ M also denkbar ungeeignet. Später wurde mittels Western-Blot untersucht, ob D $\beta$ M eventuell eine große Menge unfunktionellen OT-Rezeptors aus Membranen lösen könnte (S. 144) und somit für Reinigungsschritte unter denaturierenden Bedingungen (S. 147) einsetzbar wäre.

Eine weitere Möglichkeit, D $\beta$ M bei der Reinigung zu verwenden, besteht darin, den OT-Rezeptor durch CHAPSO zu solubilisieren, CHAPSO für die Reinigungsschritte durch D $\beta$ M zu ersetzen und vor dem Ligandenbindungstest die D $\beta$ M-Konzentration gegebenenfalls wieder zu reduzieren. Leider verminderten schon geringe Mengen (0,3 %) D $\beta$ M irreversibel die hochaffine Ligandenbindung des mit CHAPSO solubilierten OT-Rezeptors (nicht gezeigt). D $\beta$ M konnte zwar im vorherigen Versuch im Vergleich zu CHAPSO immerhin etwa halb soviel funktionellen OT-Rezeptor solubilisieren, also wahrscheinlich zusammen mit gebundenen Cholesterinmolekülen aus der Membran lösen. Es könnte jedoch Cholesterin- aber auch CHAPSO-Moleküle vollständig vom *bereits solubilierten* Rezeptor verdrängen und diesen damit in den niederaffinen Zustand bringen. Ein Hinweis auf eine Verdrängung und Präzipitierung von Cholesterin ist die Tatsache, dass alle Ansätze, die D $\beta$ M enthielten, „milchig“ wurden. D $\beta$ M ist also für die native Reinigung des OT-Rezeptors eher ungeeignet, da selbst nach einer funktionellen Solubilisierung mit D $\beta$ M spätestens der an die Säulenmatrix gebundene Rezeptor durch den ständigen Austausch der Detergenmoleküle höchstwahrscheinlich Cholesterin verlieren würde.

### Einfluss von Cholesterin/M $\beta$ CD bei der Solubilisierung und Aufbewahrung des Oxytocinrezeptors auf die spezifische Ligandenbindung

Es ist bislang unbekannt, ob Cholesterin/M $\beta$ CD mit bestimmten chromatographischen Techniken, wie z. B. Metallchelate-Affinitätschromatographien, interferiert. Daher wurde im folgenden Versuch analysiert, ob der zu erwartende Verlust der Ligandenbindung bei einer Solubilisierung des OT-Rezeptors ohne Zusatz von Cholesterin/M $\beta$ CD reversibel ist. Solubilisierung ohne Cholesterin/M $\beta$ CD und Inkubation des Solubilisats ÜN bei 4 °C führte zu einem Verlust von rund 85 % der spezifischen Ligandenbindung des OT-Rezeptors, der auch durch Zugabe hoher Cholesterinmengen im Bindungstest nicht wieder aufgehoben werden konnte (Abbildung 17). Ähnliche Beobachtungen wurden an HEK-OTR-Membranen gemacht, deren Cholesterin nahezu vollständig durch Inkubation mit M $\beta$ CD entfernt worden war. Auch hier erreichte die spezifische Ligandenbindung nach Zugabe hoher Cholesterinmengen nicht mehr den Wert von Kontrollmembranen [112].



**Abbildung 17: Einfluss von Cholesterin/M $\beta$ CD bei der Solubilisierung und Aufbewahrung des Oxytocinrezeptors auf die spezifische Ligandenbindung**

HEK-OTRhis-Membranen wurden mit (+) bzw. ohne (-) Zusatz von final 0,1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD mit CHAPSO solubilisiert (S. 55). Um die typische Behandlung von Solubilisat bei der Aufbewahrung und bei der Verwendung bei Reinigungsversuchen zu simulieren, wurden beide Ansätze zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und 10 Tage bei -80 °C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden sie 1:10 unter Beibehaltung der Pufferzusammensetzung auf 0,08 % CHAPSO verdünnt und ÜN bei 4 °C aufbewahrt. Der Ligandenbindungstest wurde bei final 1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD durchgeführt (S. 71).

In jüngerer Zeit untersuchte Dr. G. Gimpl (Universität Mainz) die Eigenschaften von OT-Rezeptoren in cholesterinarmen bzw. -reichen Mikrodomänen der Plasmamembran. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass Cholesterin nicht nur für die hohe Affinität des OT-Rezeptors zu Oxytocin wichtig ist, sondern auch die thermische Stabilität des Rezeptors stark erhöht. In cholesterinarmen Membranen sank bei 37 °C die Ligandenbindung bereits nach 50 min auf die Hälfte ab, wohingegen in cholesterinreichen Membranen die Halbwertszeit etwa 155 min betrug. Behandlung der cholesterinarmen Membranen mit Cholesterin/M $\beta$ CD konnte die Stabilität der Ligandenbindung sogar soweit über diejenige von cholesterinreichen Mikrodomänen erhöhen, dass im Verlauf von drei Stunden keinerlei Bindungsverlust feststellbar war. Dies bedeutet aber auch, dass die cholesterinarmen Domänen der Plasmamembranen von Säugerzellen noch genug Cholesterin besitzen, um einen Übergang in einen irreversiblen niederaffinen Zustand des OT-Rezeptors zu verhindern. Drastischere Ergebnisse wurden an solubilisiertem OT-Rezeptor beobachtet: Solubilisierung ohne Cholesterin führte bei 37 °C bereits nach 10 min zu einem 50 %igen irreversiblen Verlust der Bindung [139]. Solubilisierter Rezeptor kann jedoch ohne Bindungsverlust ÜN bei 4 °C aufbewahrt werden, wenn der Solubilisierungspuffer 0,1 mM Cholesterin/M $\beta$ CD enthält (eigene Beobachtung, nicht dargestellt). Diese Stabilität bei 4 °C war eine Voraussetzung für die Reinigung des funktionellen Rezeptors.

Diese Befunde erklären auch die Ergebnisse zur Studie des Einflusses des Zeitpunktes der Cholesterinzugabe zu cholesterinauxotrophen *Sf* 9-Insektenzellen auf die Ligandenbindung des in diesen Zellen exprimierten OT-Rezeptors (Seite 81). Erhielten die Zellen später als 23 h nach der Baculovirusinfektion Cholesterin/M $\beta$ CD, so war kaum noch spezifische hochaffine Ligandenbindung nachweisbar. Eine späte Cholesterinzugabe hat zur Folge, dass der OT-Rezeptor zunächst in cholesterinarme Plasmamembranen gelangt. Kultivierung von *Sf* 9-Zellen in Medium mit 10 % FCS führt zwar zu einer Einlagerung von Cholesterin in die Plasmamembranen, der Cholesteringehalt beträgt dennoch höchstens 10 % desjenigen in Säugerzellen. Somit liegt der OT-Rezeptor in diesen Membranen in thermolabiler Konformation vor, so dass es bald nach der Expression wahrscheinlich zu einem irreversiblen Übergang in einen niederaffinen Zustand kommt.

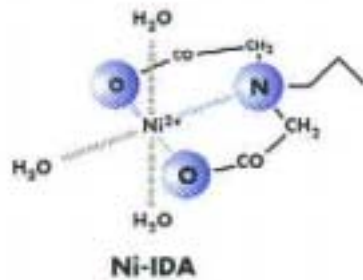
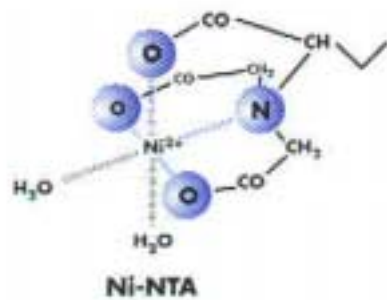
#### 4.2.2. Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt bei Metallchelate-Affinitätschromatographien durch die unterschiedliche Affinität von Aminosäuren zu chelatgebundenen Metallionen. Da Histidin die stärkste Affinität zu Metallionen besitzt (Abbildung 18 (A)), wurde der C-Terminus des menschlichen OT-Rezeptors mit einem Peptid aus 10 Histidin-Resten versehen (Abbildung 1). Neben den Aminosäuren beeinflusst auch die Wahl des an die Matrix gebundenen Metallions die Bindungsstärke zwischen Protein und Matrix (Abbildung 18 (B)). Die Ionen sind bei den Metallchelate-Affinitätsmatrices, wie der Name schon sagt, über chelatierende Substanzen an ein Trägermaterial (i. Allg. Agarose) gebunden. Als Chelatbildner finden hierbei z. B. Iminodiessigsäure (iminodiacetic acid, IDA) oder Nitrioltriessigsäure (nitrioltriacetic acid, NTA) Verwendung (Abbildung 18 (C)). Bei der NTA-Matrix wird ein Metallion über vier Stellen an die Matrix gebunden, so dass noch zwei Koordinationsstellen für die Interaktion mit Histidin-Resten frei sind. Die IDA-Matrix hingegen bindet Metallionen schwächer über lediglich drei Koordinationsstellen und verliert somit leichter Ionen als die NTA-Matrix. Bei der IDA-Matrix haben die Metallionen jedoch verglichen mit der NTA-Matrix eine Koordinationsstelle mehr für die Proteinbindung frei. Die Abbildung 18 (D) zeigt exemplarisch die Interaktion zwischen benachbarten Histidin-Resten eines Histidin-tags mit einer Ni-NTA-Matrix.

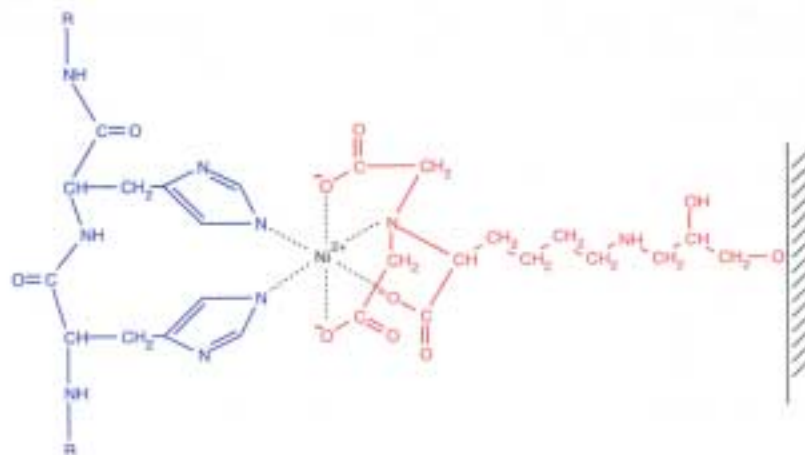
**A)** His > Trp > Cys > Tyr

**B)**  $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$

**C)**



**D)**



#### Abbildung 18: Parameter der Metallchelate-Affinitätschromatographie

(A) Vergleich der Bindungsstärken verschiedener Aminosäurereste an chelatgebundene Metallionen. (B) Vergleich der Bindungsstärken verschiedener zweiwertiger Metallionen. (C) Vergleich einer Ni-NTA (nitrilotriacetic acid)- mit einer Ni-IDA (iminodiacetic acid)-Matrix. (D) Interaktion zwischen benachbarten Histidin-Resten eines Histidin-tags (blau) mit einer Ni-NTA-Matrix (rot).

Tabelle 4 fasst die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Matrices und deren Eigenschaften zusammen:

**Tabelle 4: Matrices für die Metallchelate-Affinitätschromatographie**

Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Säulenmaterialien für die Metallchelate-Affinitätschromatographie. Die Firma Clontech machte für die TALON™-Matrix keine Angaben bezüglich des verwendeten Trägermaterials oder der Ionen. Farbe (rosa) und Eigenschaften lassen aber auf Nitrilotriessigsäure als Trägermaterial und auf Cobaltionen schließen.

Name	Hersteller	Trägermaterial	Ion	Eigenschaften
Ni-NTA Agarose	Qiagen	Nitrilotriessigsäure an Agarose gekoppelt	Ni <sup>2+</sup>	Kapazität: 5 – 10 mg Protein mit His-tag pro ml; Ni <sup>2+</sup> -Ionen werden über 4 Koordinationsstellen an Matrix gebunden.
TALON™	Clontech	wahrsch. Nitrilotriessigsäure	wahrsch. Co <sup>2+</sup>	niedrigere Affinität zu Histidin-Resten als Nickel-Matrices; sollte weniger unspezifische Proteine binden.
Chelating Sepharose® Fast Flow	Pharmacia	Iminodiessigsäure an Agarose gekoppelt	unbeladen	kann mit Ionen der Wahl beladen werden; bindet Ionen etwas schwächer als NTA, aber dafür Proteine fester über drei freie Koordinationsstellen.

### Elutionsbedingungen

Prinzipiell gibt es bei der Metallchelate-Affinitätschromatographie drei Methoden zur Elution gebundener Proteine:

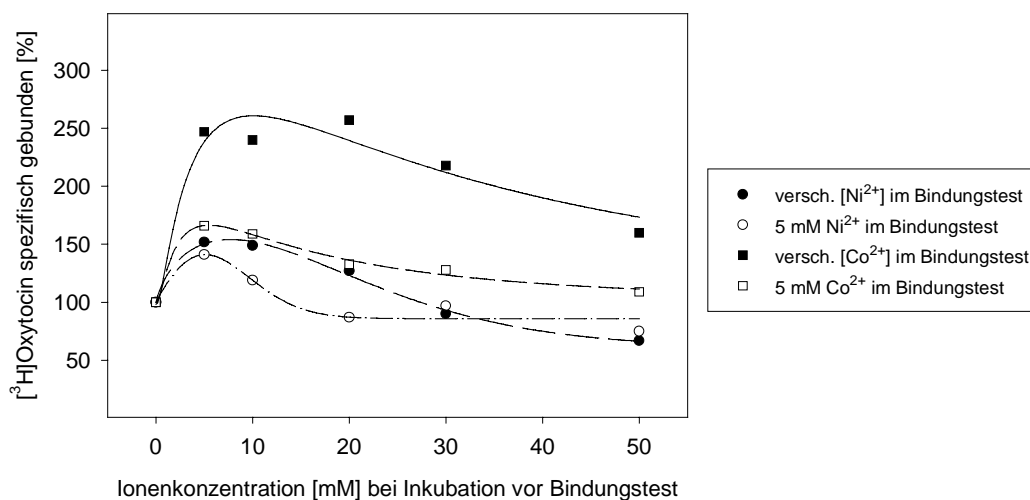
- Erniedrigung des pH-Wertes. Hierdurch werden die Histidin-Reste protoniert und können nicht länger an die Metallionen binden.
- Kompetitive Elution mit Imidazol, das aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit Histidin ebenfalls an die Matrix binden und so Histidin verdrängen kann.
- Zusatz von Chelatbildnern wie EDTA, die die Metallionen binden und auf diese Weise von der Säule waschen. Da hierbei alle gebundenen Proteine eluiert werden, ist eine Differenzierung zwischen verschiedenen Proteinen nicht mehr möglich.

### Einfluss von Ni<sup>2+</sup> bzw. Co<sup>2+</sup> auf die spezifische [<sup>3</sup>H]OT-Bindung des Oxytocinrezeptors

Die spezifische Ligandenbindung des OT-Rezeptors wird maßgeblich durch zweiwertige Kationen beeinflusst. Untersuchungen wurden bisher an Membranen aus Brustdrüsengewebe der Ratte durchgeführt [140]. Dort erhöhten Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Ni<sup>2+</sup>-Ionen die Bindungskapazität ( $B_{max}$ ), wohingegen die Affinität ( $K_d$ ) gleich blieb, Co<sup>2+</sup>-Ionen hingegen hatten keinen Einfluss auf den  $B_{max}$ -Wert, erhöhten aber die Affinität des OT-

Rezeptors. Bei Verwendung von  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  konnte nur unspezifische Bindung detektiert werden. Unklar war bislang, wie sich *solubilisierter* OT-Rezeptor in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen verhält. Da für die Metallchelate-Affinitätschromatographie Nickel- (Ni-NTA) bzw. Cobalt-beladene (TALON™) Säulen verwendet werden sollten, wurde der Einfluss dieser Ionen auf die Ligandenbindung von CHAPSO-Solubilisat untersucht.

CHAPSO-Solubilisat wurde 1:2 unter Beibehaltung der Pufferbedingungen aber unter steigender  $\text{NiCl}_2$ - bzw.  $\text{CoCl}_2$ -Konzentrationen (0 bis 50 mM) ÜN bei 4 °C inkubiert. (Zum Vergleich: die Chelating Sepharose® Fast Flow-Säule, die man selbst mit Ionen beladen muss, hat eine Kapazität von etwa 25  $\mu\text{mol Zn}^{2+}$ -Ionen pro ml.) Eine Hälfte eines jeden Ansatzes wurde unter Beibehaltung der Konzentrationsreihe auf spezifische [ $^3\text{H}$ ]OT-Bindung getestet, die andere Hälfte wurde auf 5 mM  $\text{NiCl}_2$  bzw.  $\text{CoCl}_2$  gebracht (Test auf Reversibilität). Das Ergebnis des daran anschließenden Ligandenbindungstests (S. 71) ist in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19: Einfluss von Nickel- bzw. Cobaltionen auf die spezifische [ $^3\text{H}$ ]Oxytocin-Bindung von CHAPSO-solubiliertem Oxytocinrezeptor**

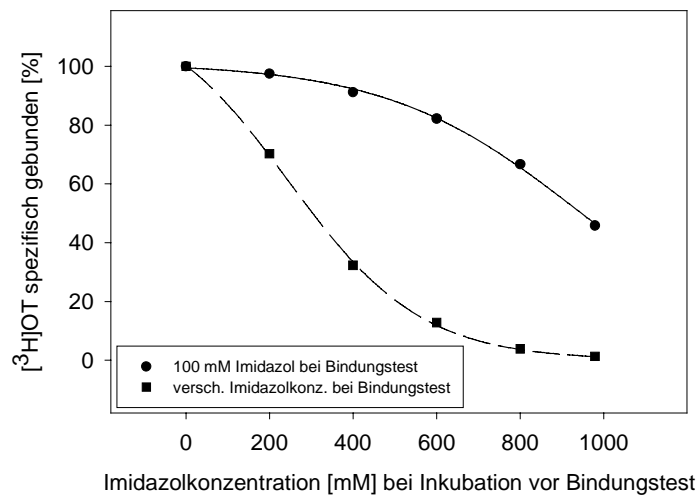
CHAPSO-Solubilisat wurde zunächst mit unterschiedlichen  $\text{NiCl}_2$ - bzw.  $\text{CoCl}_2$ -Konzentrationen inkubiert. Vor dem Ligandenbindungstest wurde eine Hälfte eines jeden Ansatzes auf 5 mM des entsprechenden Ions eingestellt, die zweite Hälfte hingegen behielt ihre unterschiedlichen Ionenkonzentrationen bei.

Cobaltionen erhöhen bis 50 mM die spezifische [<sup>3</sup>H]OT-Bindung stark. Dieser Effekt bleibt auch bei einer Nivellierung der Ionenkonzentration im Bindungstest auf 5 mM in abgeschwächter Form erhalten. Auch Nickelionen erhöhen in Konzentrationen bis 30 mM die Bindung auf maximal 150 % bei etwa 10 mM. Ab 30 mM sinkt jedoch die Bindung stetig aber mäßig bis auf 67 % bei 50 mM ab. Auch dieser Effekt ist nicht völlig reversibel. Alles in allem wirken sich Nickel- bzw. Cobaltionen zumindest in freier Form jedoch eher positiv auf die Ligandenbindung des solubilisierten OT-Rezeptors aus.

#### Einfluss von Imidazol auf die spezifische [<sup>3</sup>H]OT-Bindung des Oxytocinrezeptors

Eine Möglichkeit, den OT-Rezeptor von Metallchelate-Affinitätssäulen zu eluieren, ist die kompetitive Elution durch Imidazol bei Konzentrationen von 200 – 400 mM. Vor den ersten chromatographischen Versuchen wurde getestet, ob Imidazol einen Einfluss auf die spezifische Ligandenbindung des OT-Rezeptors hat und falls ja, ob dieser Einfluss reversibel ist.

Die genaue Versuchsdurchführung und das Ergebnis sind in Abbildung 20 dargestellt. Imidazol führte offenbar rasch zu einem Rückgang der spezifischen Bindung, so dass bei 400 mM Imidazol nur noch 32 % der spezifischen [<sup>3</sup>H]OT-Bindung detektiert werden konnten. Andererseits war der Einfluss von Imidazol selbst bei hohen Konzentrationen fast vollständig reversibel. So sank zwar die Bindung bei Verwendung von 600 mM Imidazol auf 13 % ab, stieg aber nach dem Verdünnen wieder auf 82 % des Kontrollwertes an. Der Einfluss von 200 mM Imidazol war sogar zu 98 % reversibel. Imidazol war somit zur funktionellen Elution des OT-Rezeptors bei der Metallchelate-Affinitätschromatographie geeignet.



**Abbildung 20: Einfluss von Imidazol auf die spezifische Ligandenbindung von CHAPSO-solubilisiertem Oxytocinrezeptor**

CHAPSO-Solubilisat von HEK-OTRhis-Membranen wurde zunächst 1:4 unter Beibehaltung der Pufferbedingungen (bis auf CHAPSO = 0,2 %) verdünnt und mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen bei 4 °C für 2,5 Stunden inkubiert. Dies entspricht in etwa der Elutionsdauer einer Metallchelate-Affinitätsäule. Für den Ligandenbindungstest wurde jeder Ansatz geteilt und 1:5 verdünnt. Eine Hälfte eines jeden Ansatzes wurde auf 100 mM Imidazol eingestellt (Test auf Reversibilität), die zweite Hälfte hingegen behielt ihre unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen bei. Die Pufferzusammensetzung im Ligandenbindungstest war wie folgt: 0,1 % CHAPSO, 20 mM HEPES (pH = 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM NaCl, 1 % Glycerin und 1 mM Cholesterin/MβCD.

### Einfluss des Dekahistidin-tags auf die Bindung des Oxytocinrezeptors an verschiedene Metallchelate-Affinitätsmatrices

Für diesen Versuch wurden CHAPSO-Solubilisate von HEK-OTRhis-Membranen und von HEK-OTRmyc-Membranen verwendet. Letztere stammten von HEK293-Zellen, die stabil ein OT-Rezeptorkonstrukt exprimieren, das weder ein FLAG-Epitop noch ein Histidin-tag, sondern lediglich ein N-terminales c-myc-Epitop besitzt. Durch Vergleich dieser beiden Rezeptor-Konstrukte war es möglich, die „unspezifische“ Bindung des OT-Rezeptors an die verschiedenen Säulenmaterialien zu ermitteln. Da die HEK-OTRhis-Membranen eine höhere Rezeptordichte aufwiesen als die HEK-OTRmyc-Membranen (17 pmol/mg gegenüber 5 pmol/mg), wurden sie mit Membranen nichttransfizierter HEK293-Zellen entsprechend „verdünnt“. Darüber hinaus ermittelte ich die Proteinmengen, die unspezifisch an die einzelnen Matrices banden.

Der Versuch wurde durchgeführt wie auf S. 56 ff. erläutert. Die getesteten Säulen (Ni-NTA-Agarose, TALON™ und Nickel-beladene Chelating Sepharose® Fast Flow) sind in auf S. 97 beschrieben. Alle Puffer für diesen Versuch sind in Tabelle 5 aufgelistet. Das

Imidazol (1 mM) im Äquilibriumspuffer sollte von Anfang an die unspezifische Bindung von Proteinen möglichst gering halten.

**Tabelle 5: Puffer für die Metallchelate-Affinitätschromatographie für einen Versuch, in dem verschiedene Säulenmaterialien verglichen wurden**

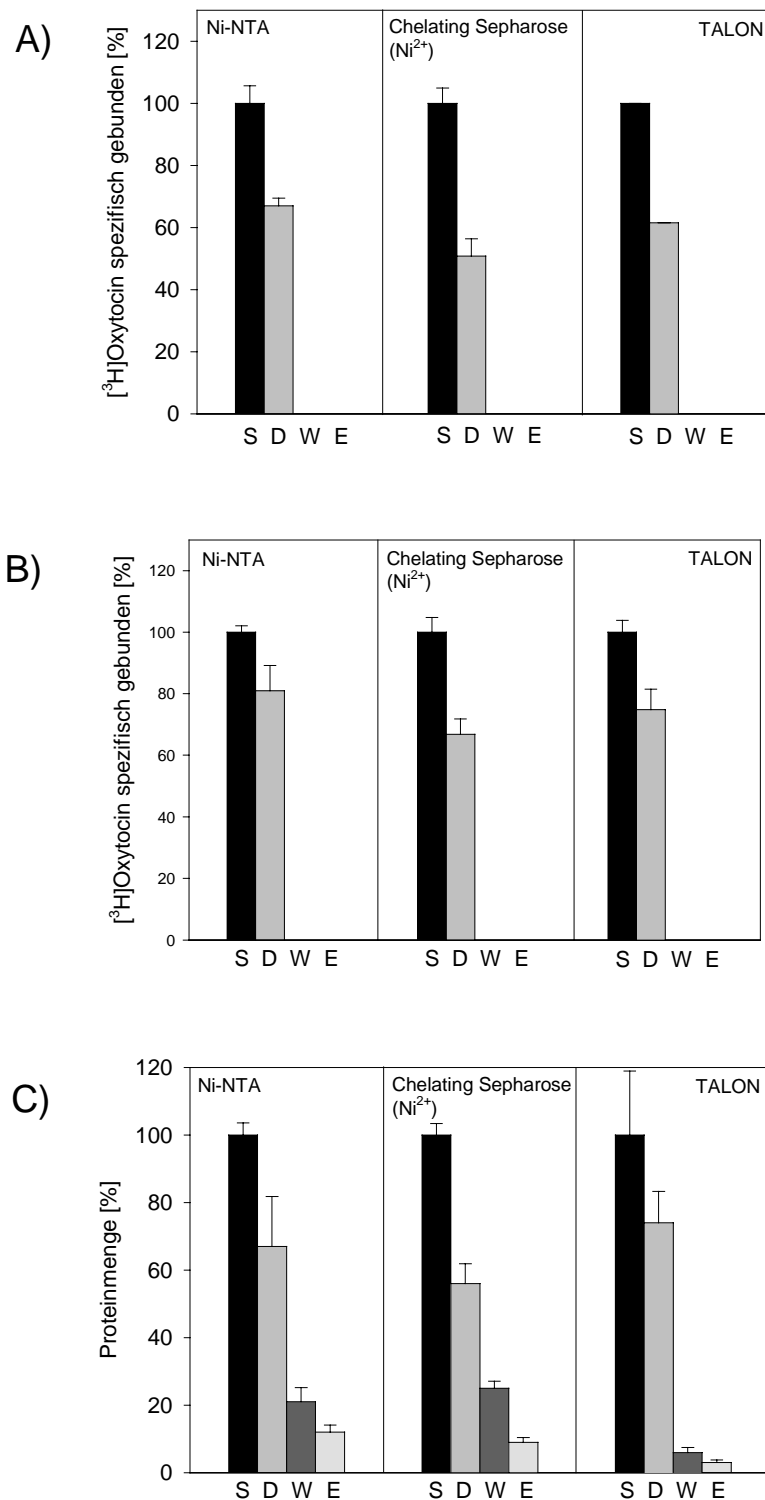
Zusammensetzung der Puffer für einen Versuch, in dem die in dieser Arbeit verwendeten Säulenmaterialien (Ni-NTA-Agarose, TALON™ und Nickel-beladene Chelating Sepharose® Fast Flow) hinsichtlich der Bindung des OT-Rezeptors und der unspezifischen Bindung kontaminierender Proteine verglichen wurden.

	Solubilisierung	Äquilibriumierung	Waschpuffer	Elution
CHAPSO (%)	0,8	0,2	0,2	0,2
HEPES (mM) (pH = 7,4)	20	20	20	20
NaCl (mM)	300	300	300	300
Glycerin (%)	10	10	10	10
MgCl <sub>2</sub> (mM)	10	10	10	10
Cholesterin/MβCD (mM)	0,1	0,1	0,1	0,1
Imidazol (mM)	-	1	10	200

Alle Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 21 dargestellt. Bei Verwendung der Chelating Sepharose® Fast Flow findet man im Vergleich zu den anderen Säulenmaterialien die geringste Menge an OT-Rezeptor im Durchlauf ( $50,8 \pm 5,55$  %). Dies war zu erwarten, da diese Säule drei freie Koordinationsstellen für die Bindung von Histidinresten am Nickel-Ion besitzt. Bei der Ni-NTA-Säule und der TALON™-Säule (jeweils zwei freie Koordinationsstellen) hingegen befanden sich etwas mehr Rezeptoren im Durchlauf (67 % bzw. 61,5 %). Leider band der OT-Rezeptor ohne das Histidin-tag nur geringfügig schlechter an die Säulen, d. h. im Durchschnitt waren nur etwa 1,3-mal mehr aktive Rezeptoren im Durchlauf. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass die Inkubation des Rezeptors mit den Säulenmaterialien zu einem Verlust der spezifischen [<sup>3</sup>H]OT-Bindung führte und dass eigentlich nahezu alle OTRmyc im Durchlauf vorhanden waren. Dennoch deutete der geringe Unterschied zwischen beiden Rezeptorkonstrukten auf zu erwartende Schwierigkeiten bei der Trennung des OT-Rezeptors (mit Dekahistidin-tag) von den restlichen Proteinen der Probe hin.

Diese Befürchtung wurde durch die Proteinbestimmung der Säulenfraktionen noch verstärkt. Abbildung 21 (C) zeigt nur das Ergebnis der Proteinbestimmung für die Versuchsreihe mit dem OTRmyc, da die Proteinmengen in den einzelnen Fraktionen wie erwartet unabhängig von dem eingesetzten Rezeptorkonstrukt waren. Die verschiedenen Säulen banden einen nicht unerheblichen Anteil des Gesamtproteins. Bei der Ni-NTA befanden sich nur 67 % der Proteine im Durchlauf. Bei der Chelating Sepharose® fast flow

banden durch die drei freien Koordinationsstellen am  $\text{Ni}^{2+}$ -Ion mehr Proteine an die Matrix, so dass nur 56 % der Proteine sich im Durchlauf befanden. An die TALON™-Matrix banden am wenigsten Proteine (74 % im Durchlauf), da diese Matrix (wahrscheinlich) mit  $\text{Co}^{2+}$  beladen ist, das Proteine schwächer bindet als  $\text{Ni}^{2+}$  (Abbildung 18). Diese Matrix schien für die Metallchelate-Affinitätschromatographie am geeignetsten zu sein, da sie die geringste Menge an Proteinen „unspezifisch“ band und auch die geringste Menge an Protein im Eluat (3 %) aufwies. Bei dieser Säule bestand auch die Hoffnung, durch Optimierung der Versuchsbedingungen zumindest eine gute Anreicherung des OT-Rezeptors zu erhalten, die für eine Markierung des Rezeptors durch ein photoreaktives Cholesterinderivat ausreichen könnte. Alles in allem waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Säulenmaterialien jedoch eher gering, so dass ich beschloss, keine Matrix von vornherein auszuschließen.



**Abbildung 21: Vergleich verschiedener Metallchelate-Affinitätsäulen auf die Bindung des mit einem His<sub>10</sub> verknüpften Oxytocinrezeptors, des Oxytocinrezeptors ohne His<sub>10</sub> und auf die Bindung des Gesamtproteins der Probe**

CHAPSO-Solubilisat von HEK-OTRhis- bzw. HEK-OTRmyc-Membranen wurde 1:4 unter Beibehaltung der Pufferzusammensetzung und Zusatz von 1 mM Imidazol auf 0,2 % CHAPSO verdünnt und mit den angegebenen Matrices ÜN inkubiert. Die Durchläufe wurden gesammelt, und die Matrices wurden mit 10 mM Imidazol gewaschen und mit 200 mM Imidazol eluiert. Die [<sup>3</sup>H]OT-Bindung und der Proteingehalt folgender Fraktionen wurde gemessen: S = verdünntes Solubilisat, D = Durchlauf der Säule, W = Waschfraktion, E = Eluat. (A) Ligandenbindung des OT-Rezeptors mit His<sub>10</sub>, (B) Ligandenbindung des OTRmyc (ohne His<sub>10</sub>) und (C) Proteingehalt der Fraktionen von (B).

Im Rahmen dieser Arbeit kann nicht auf sämtliche durchgeführten Versuche zur Metallchelate-Affinitätschromatographie des OT-Rezeptors eingegangen werden. Ich möchte daher kurz die wesentlichen Probleme bei den einzelnen Säulen skizzieren und das Ergebnis einer Chromatographie darstellen, die die höchste Anreicherung des OT-Rezeptors ergeben hatte.

### Zusammenfassung der Ergebnisse der Metallchelate-Affinitätschromatographie

#### **TALON™-Matrix**

- Potenzial: an diese Matrix binden (im Vergleich zu den anderen Metallchelate-Affinitätsmatrices) *relativ* wenige kontaminierende Proteine.
- Problem: die Menge des an die Matrix bindenden OT-Rezeptors ist ebenfalls gering und konnte auch durch Erhöhung des pH-Wertes auf pH = 8,0 nicht erhöht werden.

#### **Ni-NTA-Agarose**

- Potenzial: an diese Matrix binden ebenfalls relativ wenige Proteine unspezifisch. Diese können durch geringe Imidazolkonzentrationen zumindest teilweise eluiert werden.
- Problem: bei keiner der drei Elutionsmethoden (Imidazol, pH-Erniedrigung, EDTA) konnte funktioneller OT-Rezeptor im Eluat nachgewiesen werden.

#### **Chelating Sepharose® Fast Flow**

- Potenzial: Diese Matrix bindet den OT-Rezeptor besser als die anderen beiden Matrices. Die Bindung ist spezifisch, da die unbeladene (d. h. ohne Ni<sup>2+</sup>) Matrix kaum OT-Rezeptor bindet.
- Problem: Diese Matrix bindet hohe Mengen kontaminierender Proteine, deren Elutionsprofil dem des OT-Rezeptors entspricht.

### Metallchelate-Affinitätschromatographie an der Ni-NTA-Matrix: Elution des Oxytocinrezeptors durch Imidazol und Wiederherstellung der Ligandenbindung durch anschließendes Umpuffern der Fraktionen an einer NAP10-Säule

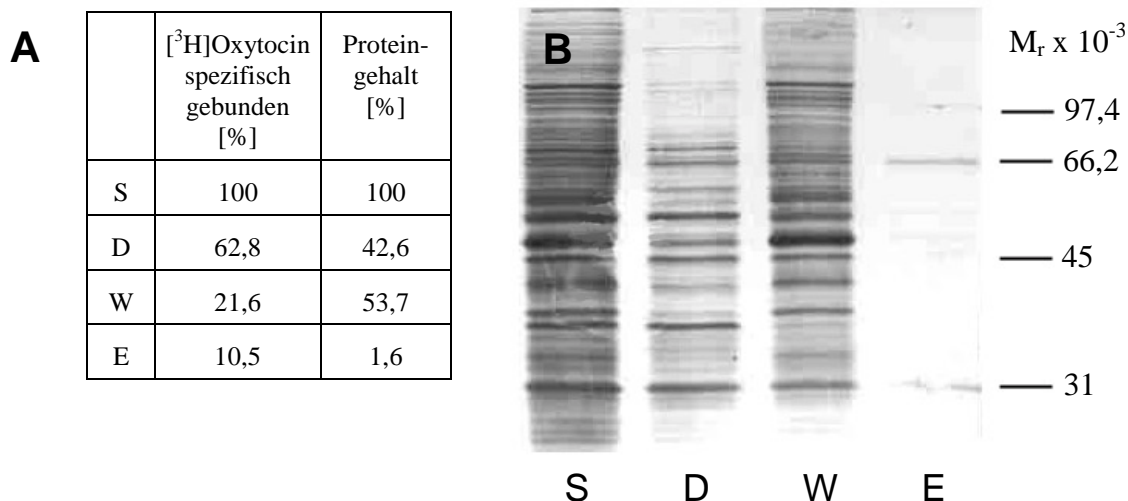
Vorversuche mit dieser Säule hatten gezeigt, dass 100 mM Imidazol selbst bei einem sauren pH-Wert von 6,0 den OT-Rezeptor nicht von der Ni-NTA-Säule eluieren konnten. 100 mM Imidazol sollten sich somit gut zum Waschen dieser Säule eignen. Zudem bestand die Möglichkeit, dass durch ein Waschen mit hohen Imidazolkonzentrationen ein Großteil der Koordinationsstellen der Nickelionen durch Imidazol besetzt werden würden, so dass gewissermaßen alle Imidazolmoleküle bei der Elution (400 mM Imidazol) zum Lösen des

OT-Rezeptors von der Matrix zur Verfügung stehen würden. Folgende Puffer wurden verwendet:

**Tabelle 6: Puffer für eine Metallchelate-Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose (Waschen der Säule mit 100 mM Imidazol, Elution mit 400 mM Imidazol)**

	Solubilisierung	Äquilibrierung	Waschpuffer	Elution
CHAPSO (%)	0,8	0,8	0,8	0,8
HEPES (mM) (pH = 7,4)	20	20	20	20
NaCl (mM)	300	300	300	300
Glycerin (%)	10	10	10	10
MgCl <sub>2</sub> (mM)	10	10	10	10
Cholesterin/M $\beta$ CD (mM)	0,1	0,1	0,1	0,1
Imidazol (mM)	-	-	100	400

Nach der Elution wurden alle Ansätze auf die gleiche Pufferzusammensetzung gebracht und an einer NAP<sup>TM</sup>10-Gelfiltrationssäule (Pharmacia) nach Herstellerangaben umgepuffert, um die CHAPSO-Konzentration auf 0,2 % zu reduzieren und das Imidazol zu entfernen (Pufferzusammensetzung s. Legende zu folgender Abbildung). Abbildung 22 zeigt das Ergebnis des Ligandenbindungstests, der Proteinbestimmung und des Silberjells.



**Abbildung 22: Metallchelate-Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose (Elution mit 400 mM Imidazol. Entfernen des Imidazols durch Umpuffern der Fraktionen an einer NAP10-Säule.)**

Die Ni-NTA-Agarose wurde mit 100 mM Imidazol bei pH = 7,4 gewaschen. Eluiert wurde mit 400 mM Imidazol (pH = 7,4). Anschließend wurden alle Fraktionen auf die gleiche Pufferzusammensetzung gebracht und an einer NAP10-Säule umgepuffert, um das Imidazol zu entfernen und die CHAPSO-Konzentration zu reduzieren (Puffer: 0,2 % CHAPSO, 20 mM HEPES (pH = 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin; Cholesterin/M $\beta$ CD wurde erst beim Ligandenbindungstest wieder verwendet (1 mM), da das Cholesterin bei diesem Schritt leicht ausfällt). Fraktionen: S = Solubilisat, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, E = Eluat. (A) Ergebnisse des Ligandenbindungstests (S. 71) und der Proteinbestimmung (S. 36), (B) Silberjell (S. 40): pro Spur wurde ein Probenvolumen gefällt (S. 35) und aufgetragen, das 2  $\mu$ l unverdünntem Solubilisat entsprach.

Zum ersten Mal konnten bei einer Metallchelate-Affinitätschromatographie fast 100 % des OT-Rezeptors im Ligandenbindungstest detektiert werden. Immerhin 10,5 % des funktionellen OT-Rezeptors befanden sich im Eluat zusammen mit 1,6 % Gesamtprotein. Dies entspricht einer 6,6fachen Anreicherung des funktionellen OT-Rezeptors, die allerdings mit ähnlichen Ausbeuten schon bei klassischen Chromatographien, wie z. B. Lektinaffinitätschromatographien erzielt wird [120].

#### 4.2.3. Anti-FLAG® M1-Affinitätschromatographie

Diese Chromatographie nutzt die hohe Affinität zwischen dem monoklonalen Antikörper IgG<sub>2β</sub> M1 und dem freien N-Terminus des FLAG-Peptids, das an den N-Terminus des OT-Rezeptors ligiert worden war (Abbildung 1). Bei dem *Anti-FLAG® M1 Affinity Gel* von Kodak ist der Antikörper kovalent über eine Hydrazid-Bindung mit einer Agarose-Matrix verknüpft. Die maximale Bindungskapazität beträgt 6 – 12 nmol FLAG-Fusionsprotein pro ml Matrix.

Auch bei dieser Matrix gibt es wieder drei Elutionsmöglichkeiten:

- Saure Elution mit Glycin (0,1 M Glycin, pH =3,5).
- Zusatz von EDTA, das Calcium-Ionen komplexiert, die für die Bindung zwischen Antikörper und FLAG-Peptid nötig sind.
- Kompetitive Elution mit dem FLAG-Peptid.

Für die ersten Versuche wurde die Elution durch EDTA gewählt, da sie schonender für den Rezeptor ist als eine starke Erniedrigung des pH-Wertes. Wird CHAPSO-solubilisierter OT-Rezeptor 30 min lang einem sauren Milieu von pH = 4 ausgesetzt, anschließend durch HEPES/NaOH neutralisiert und rekonstituiert, so führt dies zu einem Verlust von etwa 30 % der Ligandenbindungsaktivität [120]. Die Elution durch EDTA ist zudem preiswerter als die Elution durch das FLAG-Peptid.

Zunächst wurde versucht, CHAPSO-solubilisierter OT-Rezeptor funktionell über diese Säule anzureichern. Der Elutionspuffer entsprach in seiner Zusammensetzung dem Säulenpuffer (S. 58), lediglich das CaCl<sub>2</sub> war durch 2 mM EDTA ersetzt worden. Um den Effekt des EDTAs auf die Bindungsaffinität des OT-Rezeptors aufzuheben, wurden final drei Äquivalente Mg<sup>2+</sup> über die eingesetzte EDTA-Konzentration zugegeben [120] (obwohl wahrscheinlich ein Großteil des EDTAs bereits mit den Ca<sup>2+</sup>-Ionen komplexiert gewesen sein dürfte), so dass die finale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration im Bindungstest 13 mM statt

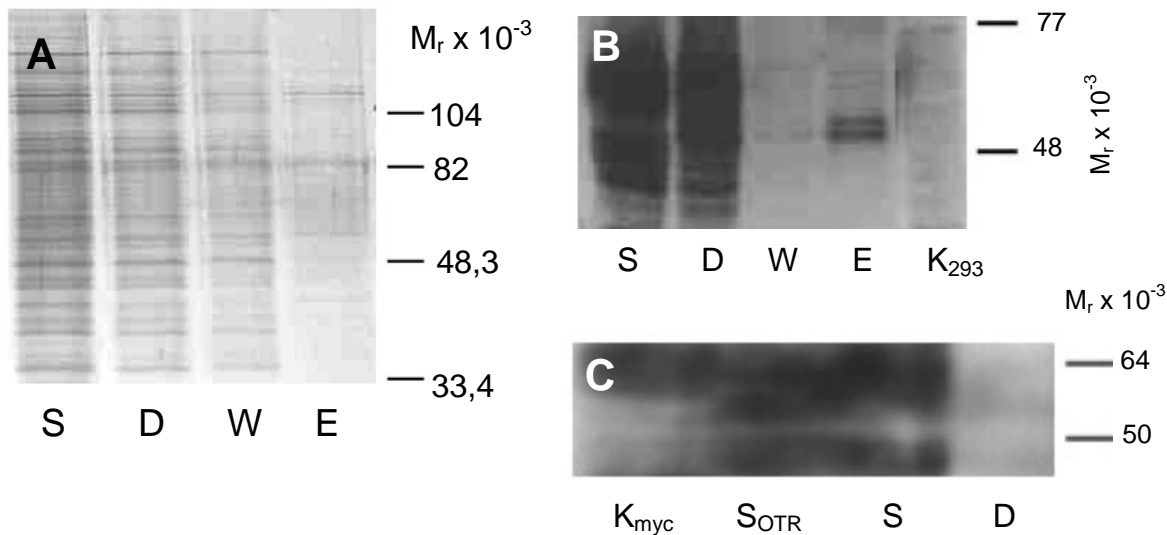
normalerweise 10 mM betrug. Im Bindungstest wurde außerdem Solubilisat getestet, das kein EDTA erhalten hatte (aber ansonsten gleich behandelt worden war) und dessen  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration 10 mM betrug.

Der Effekt des EDTA wurde durch den  $\text{MgCl}_2$ -Zusatz tatsächlich fast vollständig aufgehoben – die spezifische [ $^3\text{H}$ ]OT-Bindung des Kontrollsolubilisates lag lediglich um rund 12 % höher als die des mit EDTA versetzten Solubilisates. Immerhin 4,1 % der Rezeptoren konnten funktionell eluiert werden. Leider banden weniger als 10 % des OT-Rezeptors an die Säule. Ein Grund könnte ein möglicher proteolytischer Abbau des FLAG-Epitops sein, obwohl alle Schritte bei 4 °C und unter Verwendung von Proteaseinhibitoren (Pepstatin, Pefabloc und Leupeptin) durchgeführt worden waren. Weitere Möglichkeiten sind eine Faltung des Proteins, die das FLAG-Epitop unzugänglich für den anti-FLAG-Antikörper macht, oder ein Interferieren der Chromatographie mit CHAPSO.

Im nächsten Versuch sollte daher D $\beta$ M als Detergens verwendet werden. Kobilka hatte bereits die Reinigung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors an der Anti-FLAG<sup>®</sup> M1-Affinitätsmatrix mit diesem Detergens beschrieben [129]. D $\beta$ M solubilisiert bestenfalls etwa ¼ so viele funktionelle OT-Rezeptormoleküle wie CHAPSO (S. 91), kann jedoch den OT-Rezeptor besser als CHAPSO aus Membranen lösen, wenn dieser zuvor mit einem photoreaktiven Cholesterinderivat kovalent verknüpft worden war (S. 144ff., D $\beta$ M-Konzentration = 1 %). Der folgende Versuch wurde im Hinblick auf eine Photoaffinitätsmarkierung von Membranen mit *anschließender* Solubilisierung und chromatographischer Anreicherung des OT-Rezeptors durchgeführt und ist in der Legende von Abbildung 23 beschrieben.

Das Silbergel zeigt, dass an diese Matrix nur sehr wenige Proteine binden (Abbildung 23 (A)), was jedoch leider auch für den OT-Rezeptor zutrifft (Abbildung 23 (B), anti-c-myc-Blot). Die beiden starken Banden im Eluat stammen übrigens nicht vom OT-Rezeptor, sondern von unspezifisch angereicherten Proteinen, die auch in einem Kontrollversuch mit Solubilisat aus HEK293-Membranen im Eluat vorhanden waren (nicht gezeigt). Der Grund für die mangelnde Bindung des OT-Rezeptors an die Matrix wird bei Betrachtung des anti-FLAG-Blots in der gleichen Abbildung ersichtlich: Im Solubilisat, das ebenfalls über Nacht bei 4 °C inkubiert worden war (S), trug der OT-Rezeptor noch sein FLAG-Epitop (diffuse Bande bei etwa 50 kDa), wie ein Vergleich mit frisch aufgetautem Solubilisat zeigt (S<sub>OTR</sub>). Unklar ist, aus welchem Protein die diffuse Bande bei 64 kDa besteht, die auch in der Kontrolle K<sub>myc</sub> sichtbar ist (K<sub>myc</sub> = Solubilisat aus HEK-OTRmyc-Membranen,

d. h. hier trägt der OT-Rezeptor nur ein c-myc- aber kein FLAG-Epitop). Eine Inkubation des solubilisierten OT-Rezeptors mit der Anti-FLAG<sup>®</sup> M1-Affinitätsmatrix führte zu einem fast vollständigen Abbau des FLAG-Epitops, das im Durchlauf (D) dann kaum noch nachweisbar war. Ein Grund hierfür könnte eine Aufkonzentrierung von unspezifisch an die Säule bindenden Proteasen sein, die trotz Verwendung von Inhibitoren noch aktiv waren und den Rezeptor evtl. von den Enden her abbauten. Ein terminaler Abbau des OT-Rezeptors würde auch die Nachweisbarkeit des c-myc-Epitops erklären, das zwischen dem N-terminalen FLAG-Epitop und dem OT-Rezeptor lokalisiert ist (Abbildung 1).



**Abbildung 23: Anti-FLAG<sup>®</sup> M1-Affinitätschromatographie mit Dodecyl-β-D-maltosid als Detergens**

DβM-Solubilisat (S. 55, 1 % DβM) (S) von HEK-OTRhis-Membranen wurde 1:10 verdünnt (Pufferzusammensetzung: S. 58, 0,1 % DβM ohne Cholesterin/MβCD) und mit Anti-FLAG<sup>®</sup> M1-Affinitätsmatrix inkubiert (S. 58). Cholesterin/MβCD wurde in diesem Versuch weggelassen, da es mit der Chromatographie interferieren könnte und in diesem Versuch die hochaffine Ligandenbindung des OT-Rezeptors keine Rolle spielte. Der Durchlauf (D) wurde gesammelt, die Säule mit Säulenpuffer gewaschen (W) und mit Elutionspuffer (= Säulenpuffer ohne CaCl<sub>2</sub>, jedoch mit 2 mM EDTA) eluiert (E). (A) Silbergel (S. 40): Das gefällte und aufgetragene Probenvolumen entsprach 0,4 µl unverdünntem Solubilisat für S und D, bzw. 4 µl für W und E. (B) Western-Blot mit dem anti-c-myc 9E10-Antikörper bzw. (C) dem anti-FLAG M2-Antikörper als Erstantikörper. Zweitantikörper war bei beiden Blots peroxidasegekoppelter anti-Maus-Antikörper. Nachweissystem: ECL (Amersham) (S. 40). Die gefällte Probenmenge pro Spur entsprach 15 µl (anti-c-myc-Blot) bzw. 20 µl (anti-FLAG-Blot) unverdünntem Solubilisat. (K<sub>293</sub>) = Kontrolle mit HEK293-Solubilisat, (K<sub>myc</sub>) = Kontrolle mit OTRmyc-Solubilisat, (S<sub>OTR</sub>) = OTRhis<sub>10</sub>-Solubilisat (frisch aufgetaut, d. h. nicht ÜN bei 4 °C inkubiert).

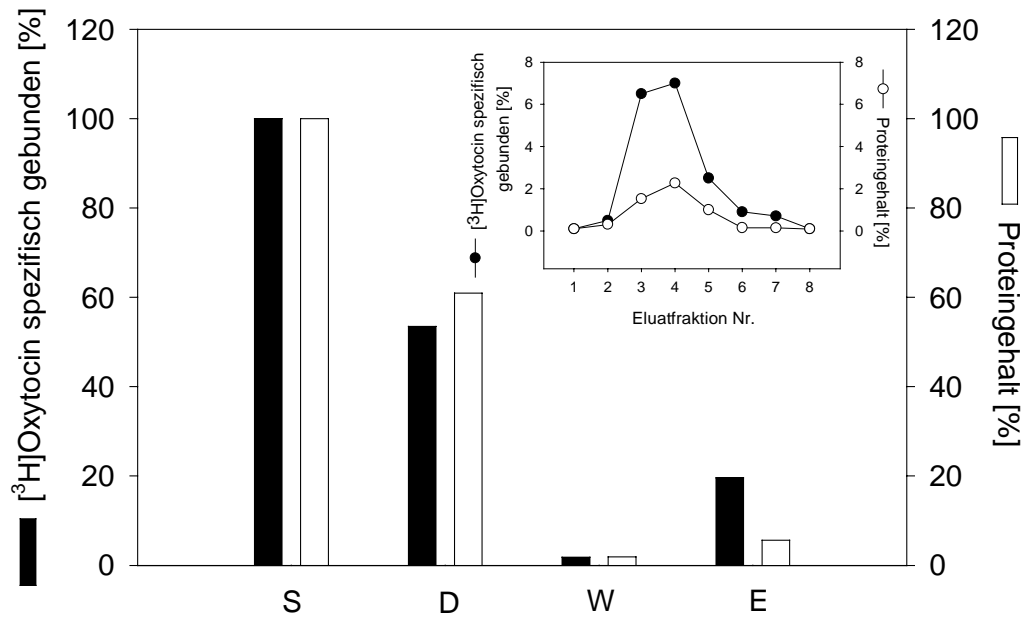
#### 4.2.4. Lektin-Chromatographie mit WGA-Agarose

Lektine sind Proteine, die Zellen agglutinieren und/oder komplexe Kohlenhydrate präzipitieren. Sie werden aus verschiedensten Quellen, wie z. B. Pflanzensamen, Pilzen, Bakterien und auch aus Plasmamembranen von Säugern gewonnen. *In vivo* spielen sie unter anderem eine Rolle bei der Blutgerinnung und der Adhäsion von Eizelle und Spermium. An einer Trägermatrix immobilisiert, eignen sie sich zur chromatographischen Anreicherung von Glycoproteinen, wobei verschiedene Lektine unterschiedliche Spezifitäten bezüglich der Zuckerreste aufweisen.

Der in HEK-OTRhis-Zellen exprimierte OT-Rezeptor ist hochglycosyliert (Abbildung 14) und sollte durch Lektin-Chromatographie anreicherbar sein. Für den nachfolgenden Versuch wurde WGA (Wheat germ agglutinin, Weizenkeim-Agglutinin) aus *Triticum vulgare* verwendet, da dieses Lektin N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosamin (GlcNAc) bindet. GlcNAc ist der Zuckerrest der Kernstruktur der Kohlenhydratseitenketten des OT-Rezeptors, der mit dem Asparaginrest des Glycosylierungssignals verknüpft und somit unabhängig von der Art der weiteren Glycosylierung auf jeden Fall vorhanden ist.

WGA wird von der Firma Pharmacia als „Agarose Wheat Germ Lectin“ angeboten und ist an Sepharose als Trägermatrix gebunden. Die Lektin-Chromatographie wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse des Ligandenbindungstests und der Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen dieser Chromatographie dargestellt.

Etwa 74 % der aufgetragenen Ligandenbindungsaktivität des OT-Rezeptors konnten zurückerhalten werden. 53,5 % des auf die Säule aufgetragenen funktionellen Rezeptors fanden sich im Durchlauf wieder, 1,8 % in der Waschfraktion. 19 % des OT-Rezeptors konnten mit 0,6 M N-Acetyl-D-Glucosamin eluiert werden. Der Hauptteil hiervon (17,6 % der aufgetragenen Ligandenbindungsaktivität) befand sich in den Fraktionen E3 bis E7, in denen sich 5,1 % aller aufgetragenen Proteine befanden. Dies entspricht einer 3,5fachen Anreicherung des funktionellen OT-Rezeptors durch die WGA-Chromatographie.



#### Abbildung 24: Lektin-Chromatographie mit WGA-Agarose

24 ml 1:10 verdünntes CHAPSO-Solubilisat wurden ÜN über 1ml Matrix rezykliert (S. 59). Gebundener OT-Rezeptor wurde mit 0,6 M N-Acetyl-D-Glucosamin eluiert. Die Proben waren wie folgt: S = Solubilisat, D= Durchlauf, W = Waschfraktion, E = Gesamteluat. Die spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]Oxytocin (●) wurde im Ligandenbindungstest ermittelt (S. 71) und bezieht sich auf die Gesamtmenge an aufgetragener Bindungsaktivität (100 %). Der Proteingehalt der Proben (○) wurde mit der Methode von Bradford bestimmt (S. 36) und bezieht sich auf die Gesamtmenge an aufgetragenem Protein (100 %).

#### 4.2.5. Zusammenfassung und Diskussion

Eine Reinigung oder zumindest eine starke Anreicherung des menschlichen OT-Rezeptors war für eine nachweisbare Markierung mit einem photoreaktiven Cholesterinderivat notwendig. Reinigung zur Homogenität erfordert bei einer molaren Masse von rund 47,4 kDa des Proteinteils des verwendeten Rezeptorkonstruktes und bei einer Rezeptordichte von 17 pmol/mg Protein in HEK-OTRhis-Zellen eine 1240fache Anreicherung. Klassische Affinitätschromatographien an immobilisierten Liganden oder Versuche mit biotinylierten Liganden und Avidinmatrices waren bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführt worden, hatten jedoch zu keinem Erfolg geführt [120]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun ein Fusionspeptid aus OT-Rezeptor mit N-terminalem FLAG-Epitop und C-terminalem Dekahistidin-tag konstruiert, um den Rezeptor über eine Affinitätsmatrix mit immobilisiertem anti-FLAG M1-Antikörper und über Metallchelat-Affinitätschromatographie zu reinigen. Darüber hinaus wurde das Detergens DβM auf die Erhaltung der hochaffinen Ligandenbindung des OT-Rezeptors getestet.

Das Hauptproblem bei den Metallchelate-Affinitätschromatographien war die recht hohe Menge unspezifisch bindender Proteine. Dies machte sich auch dadurch bemerkbar, dass der OT-Rezeptor mit seinem Dekahistidin-tag nur geringfügig besser an die Matrices binden konnte als ein Konstrukt ohne Dekahistidin-tag. Verwendung von Imidazol im Äquilibrierungspuffer sollte die Menge an unspezifisch bindenden Proteinen vermindern, hatte jedoch zur Folge, dass die Bindung des OT-Rezeptors an die Matrix ebenfalls stark reduziert wurde. Die hohen Rezeptormengen im Durchlauf könnten auch durch eine ungünstige Faltung des Dekahistidin-tags zustande gekommen sein, die eine Bindung an die Matrix verhindern könnte. Daher wurden später noch Versuche zur Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, die auf S. 147 beschrieben sind. Ein weiteres Problem bei der Metallchelate-Affinitätschromatographie war, dass bei vielen Versuchen kein funktioneller Rezeptor im Eluat detektiert werden konnte. In Western-Blots zeigte sich, dass der Rezeptor oftmals nicht oder nur unfunktionell eluiert worden war (nicht dargestellt). Das beste Ergebnis wurde mit der Ni-NTA-Matrix erzielt. Nach Optimierung der Versuchsbedingungen konnten bei 6,6facher Anreicherung 10,5 % des aufgetragenen Rezeptors im Eluat nachgewiesen werden.

Wenig aussichtsreich war die Verwendung der Anti-FLAG<sup>®</sup> M1-Affinitätsmatrix, da hierbei nur 10 % des Rezeptors an die Säule gebunden hatten. Als Grund hierfür konnte der proteolytische Abbau des FLAG-Epitops bei Inkubation mit der Matrix entdeckt werden, der auch durch Verwendung einer Mischung von Proteaseinhibitoren nicht verhindert werden konnte.

Die größte Menge OT-Rezeptor im Eluat (17,6 %) wurde schließlich durch eine Lektinchromatographie an WGA-Agarose erhalten, bei der eine 3,5fache Anreicherung erzielt werden konnte. Dieser Anreicherungsfaktor stimmt mit Ergebnissen von Lektinchromatographien von U. Klein gut überein [120]. Eluat der Lektinchromatographie wurde später zur Photoaffinitätsmarkierung verwendet (S. 149).

Mit den hier vorgestellten Experimenten sind die Möglichkeiten chromatographischer Techniken selbstverständlich noch nicht erschöpft. So kann z. B. ein Fusionsprotein aus dem OT-Rezeptor und der Glutathion-S-transferase konstruiert werden, das die Reinigung an Glutathion-Agarose ermöglichen könnte [141]. Das größte Potenzial zur Optimierung der Reinigungsschritte liegt sicherlich in der weiteren Suche nach geeigneteren Detergenzien. Die Solubilisierungsversuche dieser Arbeit hatten gezeigt, dass D $\beta$ M die hochaffine Ligandenbindung des OT-Rezeptors nicht aufrecht erhalten konnte. Somit

bleibt das Gallensäurederivat CHAPSO das bisher einzige Detergens, das den Rezeptor über längere Zeit bei 4 °C stabilisiert unter der Voraussetzung, dass Cholesterin/M $\beta$ CD-Komplexe im Puffer vorhanden sind. Wünschenswert wäre jedoch ein Detergens, das die hochaffine Ligandenbindung des OT-Rezeptors *unabhängig* von Cholesterin/M $\beta$ CD erhält, da dieser Komplex wahrscheinlich bei chromatographischen Reinigungsverfahren stört. Darüber hinaus sollte dieses Detergens den Rezeptor mit hoher Ausbeute solubilisieren und mit einem möglichst breiten Spektrum chromatographischer Techniken kompatibel sein. Ab S. 113 werden Experimente vorgestellt, durch die Bereiche und Gruppen von Cholesterin ermittelt wurden, die für die hochaffine Ligandenbindung des OT-Rezeptors essentiell sind. Ausgehend von diesen Befunden sollte es möglich sein, ein Detergens zu synthetisieren, welches in der Lage ist, wie Cholesterin den Rezeptor zu stabilisieren und dabei gleichzeitig in Lösung zu halten.

#### **4.3. Modulation der Ligandenbindung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch Cholesterin**

Cholesterin kann Membranproteine prinzipiell durch zwei verschiedene Mechanismen beeinflussen. Im Falle des OT-Rezeptors wird eine direkte Interaktion postuliert, die diesen Rezeptor in den hochaffinen Zustand bringt (S. 24). Cholesterin verändert aber auch biophysikalische Parameter von Membranen, wie z. B. die Fluidität und beeinflusst somit indirekt Membranproteine (S. 15). In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde der OT-Rezeptor diesbezüglich mit dem menschlichen Cholecystokinin<sub>B</sub>-Rezeptor (CCK-Rezeptor, Tabelle 1) verglichen. Der CCK-Rezeptor, der ebenfalls zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, ist funktionell unter Erhaltung seiner hochaffinen Ligandenbindung mit Digitonin solubilisierbar [109,110]. Das Detergens Digitonin bildet mit Cholesterin unlösliche 1:1-Komplexe und führt zu einer vollständigen Entfernung des Cholesterins aus dem Solubilisat [111]. Da der CCK-Rezeptor darüber hinaus funktionell in den cholesterinarmen Plasmamembranen baculovirusinfizierter Insektenzellen exprimiert werden kann [142], war anzunehmen, dass dieser Rezeptor, wenn überhaupt, in einer völlig anderen Weise durch Cholesterin beeinflusst werden würde als der OT-Rezeptor. Das Ziel der folgenden Versuche war daher, die Mechanismen der Cholesterinwirkung auf den OT-Rezeptor bzw. den CCK-Rezeptor näher zu untersuchen und die Steroidspezifität beider Rezeptoren in Struktur-Funktionsanalysen zu ermitteln. Die Versuche dieses Kapitels wurden 1997 in *Biochemistry* veröffentlicht [112].

#### **4.3.1. Einfluss von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin, Filipin bzw. Cholesterinoxidase auf die hochaffine Ligandenbindung des Oxytocin- und des Cholecystokininrezeptors**

Um die Mechanismen der Cholesterinwirkung auf den OT-Rezeptor bzw. den CCK-Rezeptor genauer zu untersuchen, behandelte Dr. G. Gimpl (Universität Mainz) Membranen von HEK-OTR- bzw. HEK-CCKR-Zellen (S. 32) mit Reagenzien, die auf unterschiedliche Weise den Cholesteringehalt oder die -verteilung der Membranen verändern. Entfernung von Cholesterin aus den Membranen mittels M $\beta$ CD verminderte die Ligandenbindung beider Rezeptoren und führte wie erwartet (S. 15) zu einer Erhöhung der Membranfluidität, die durch Messung der Fluoreszenzanisotropie von Diphenylhexatrien bestimmt werden kann (S. 69). Wurden die Membranen hingegen mit dem Cholesterinbindenden Fluorochrom Filipin oder mit Cholesterinoxidase (Oxidation von Cholesterin zu 4-Cholesten-3-on) behandelt (S. 63), so wurde nur die Ligandenbindung des CCK-Rezeptors vermindert. Die Cholesterinoxidasebehandlung führte zu keiner Veränderung der Membranfluidität (bei Filipin-behandelten Membranen konnte die Anisotropie aufgrund der Fluoreszenz von Filipin nicht gemessen werden).

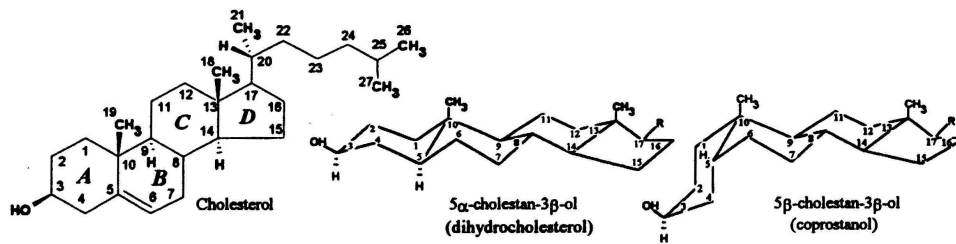
Diese Ergebnisse bekräftigten die Hypothese einer direkten, nicht durch die Membranfluidität vermittelten Wechselwirkung des OT-Rezeptors mit Cholesterin und waren ein weiterer Hinweis darauf, dass der CCK-Rezeptor eher indirekt beeinflusst werden könnte. Hingegen waren die Ergebnisse noch kein Beweis dafür, dass der CCK-Rezeptor über die Membranfluidität beeinflusst wird, da Cholesterin gleichzeitig andere Parameter von Membranen, wie z. B. die Dicke der Lipiddoppelschicht, verändert (s. S. 15).

#### **4.3.2. Struktur-Funktionsanalyse von Cholesterin im Hinblick auf den hochaffinen Zustand des menschlichen Oxytocinrezeptors und des menschlichen Cholecystokinin<sub>B</sub>-Rezeptors**

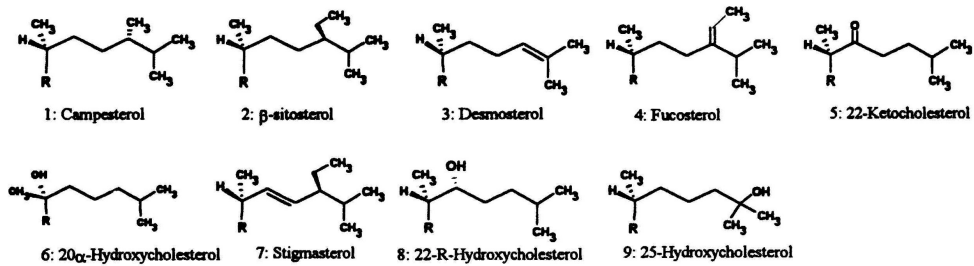
U. Klein hatte durch Substitution des endogenen Cholesterins in Membranen myometrialer Zellen des Meerschweinchens durch 5-Cholesten-3-on, Pregnenolon, Stigmasterol und 5-Cholesten die Hydroxylgruppe und die aliphatische Kohlenwasserstoffseitenkette als notwendige Strukturmerkmale des Cholesterins in Bezug auf die hochaffine Ligandenbindung des OT-Rezeptors erkannt [104]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Untersuchungen auf 23 weitere Steroide ausgedehnt. Auch für diese Versuche wurde der CCK-Rezeptor als Vergleich herangezogen. Neben den Strukturmerkmalen des Cholesterins interessierte mich die Veränderung der Fluidität der Membranen durch die

verschieden Steroide. Hierdurch wollte ich herausfinden, ob die Veränderung in der Ligandenbindung der beiden Rezeptoren eher mit der Anisotropie der Membranen korrelieren oder stärker von bestimmten Strukturmerkmalen der Steroide abhängig sein würde.

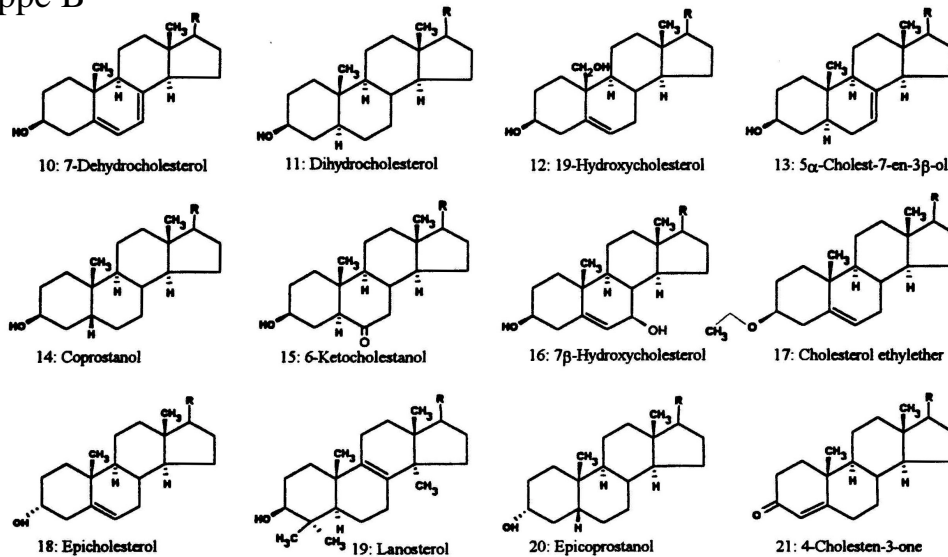
Die Versuche wurden wie folgt durchgeführt: Membranen von HEK-OTR- und HEK-CCKR-Zellen wurden mit M $\beta$ CD behandelt, um das endogene Cholesterin bis auf etwa 15 % zu entfernen und anschließend mit verschiedenen Steroiden mittels Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen wiederangereichert (S. 63). Die angereicherten Membranen (je 1,3 mg Protein) wurden in 325  $\mu$ l Bindungspuffer aufgenommen. 50  $\mu$ l (200  $\mu$ g) wurden für den Ligandenbindungstest verwendet, 22,5  $\mu$ l (90  $\mu$ g) für die Anisotropiemessungen und aus 250  $\mu$ l (1 mg) wurden die Lipide extrahiert und über Dünnschichtchromatographie auf die Einbauraten der Steroide untersucht (Abbildung 26). Die Steroide (Abbildung 25) wurden bezüglich ihrer Veränderungen gegenüber Cholesterin in drei Gruppen eingeteilt: (A) Steroide mit Veränderungen in der aliphatischen Seitenkette, (B) Steroide mit Veränderungen im tetrazyklischen Ringsystem und (C) Steroide mit Veränderungen sowohl in der Seitenkette als auch im Ringsystem.



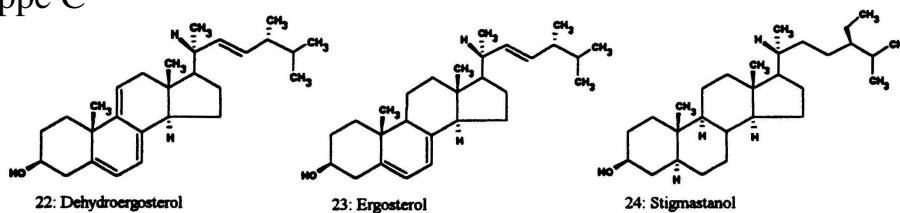
## Gruppe A



## Gruppe B



## Gruppe C

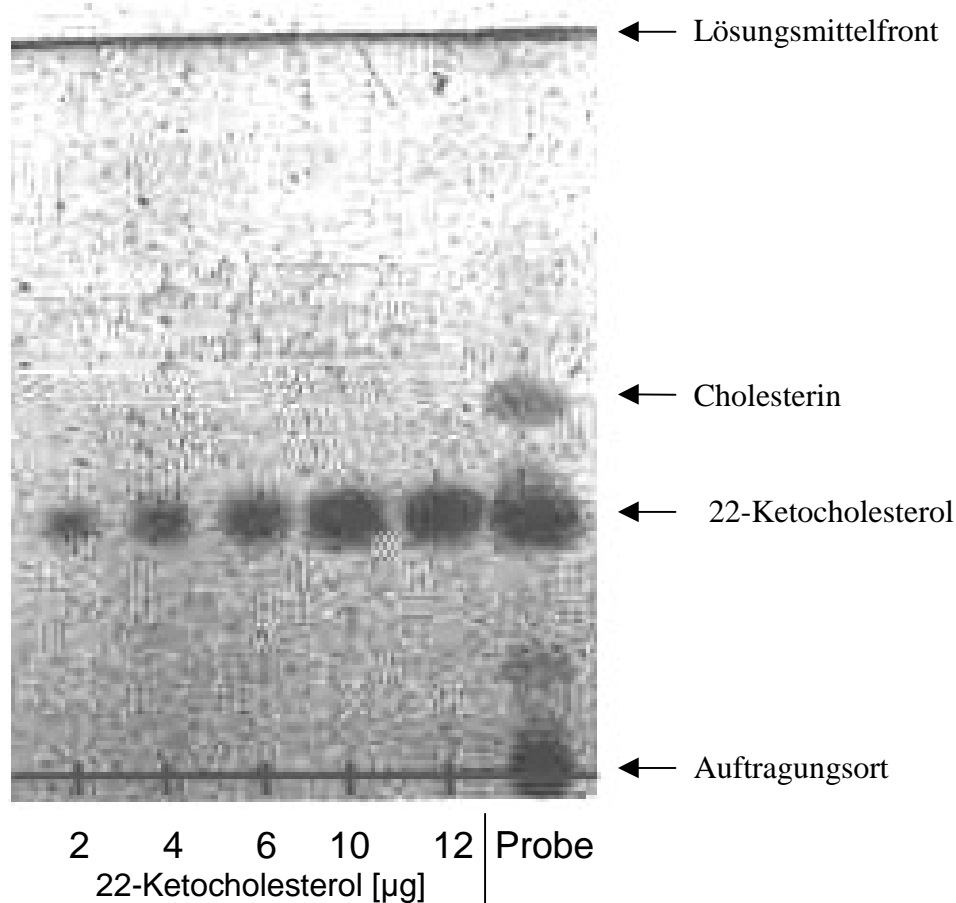


**Abbildung 25:** Strukturen von Steroiden für die Struktur-Funktionsanalyse von Cholesterin im Hinblick auf die Ligandenbindung des menschlichen Oxytocinrezeptors und des menschlichen Cholecystokinin<sub>B</sub>-Rezeptors

Die Steroide wurden bezüglich ihrer Veränderungen gegenüber Cholesterin in drei Gruppen eingeteilt: **(A)** Steroide mit Veränderungen in der aliphatischen Seitenkette; R = Androstenol (C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>OH). **(B)** Steroide mit Veränderungen im tetrazyklischen Ringsystem; R = C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>. **(C)** Steroide mit Veränderungen sowohl in der Seitenkette als auch im Ringsystem. Innerhalb dieser Gruppen sind die Steroide ihrer Fähigkeit nach geordnet, den hochaffinen Zustand des OT-Rezeptors in Cholesterin-abgereicherten Membranen wiederherzustellen (absteigende Reihenfolge).

### Einbauraten verschiedener Steroide in Cholesterin-abgereicherte Membranen und Einfluss dieser Steroide auf die Ligandenbindung des Oxytocin- bzw. Cholecystokininrezeptors

Die Abbildung 26 zeigt am Beispiel des 22-Ketocholesterols die Messung der Einbaurate der einzelnen Steroide in Cholesterin-abgereicherte Membranen. Lipidextrakte dieser Membranen wurden zunächst dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Bei Steroiden, die bei dem verwendeten Laufmittel den gleichen  $R_f$ -Wert wie Cholesterin hatten, wurde zusätzlich bei jeder Konzentration Lipidextrakt aus abgereicherten Membranen aufgetragen, um das nach der M $\beta$ CD-Behandlung in den Membranen verbleibende Cholesterin zu berücksichtigen. Nach dem Entwickeln der Platten wurden die Intensitäten der Flecken densitometrisch bestimmt. Anhand einer Konzentrationsreihe konnte die Menge an eingebautem 22-Ketocholesterol bestimmt werden, wobei eine Menge von 11  $\mu\text{g}$  pro 300  $\mu\text{g}$  Membranen einer 100 %igen Wiederanreicherung entsprach. In diesem Beispiel bauten mehr als 12  $\mu\text{g}$  Steroid ein, somit lag die Wiederanreicherung bei mehr als 110 %.



**Abbildung 26: Densitometrische Bestimmung der Einbaurrate von Steroiden in Cholesterin-abgereicherte Membranen am Beispiel des 22-Ketocholesterols**

Auf eine DC-Platte wurden eine 22-Ketocholesterol-Konzentrationsreihe (2 – 12  $\mu\text{g}$ ) und die Probe aufgetragen (S. 38). Die Probe bestand aus Lipidextrakt (S. 37) aus 300  $\mu\text{g}$  Cholesterin-abgereicherten Membranen, die mit 22-Ketocholesterol/M $\beta$ CD wiederangereichert worden waren. Nach dem Entwickeln wurden die Intensitäten der Steroidflecken densitometrisch bestimmt. Der 22-Ketocholesterol-Gehalt der Probe wurde anhand einer Eichgeraden bestimmt. Einer Wiederanreicherung von 100 % entsprach eine Steroidmenge von 11  $\mu\text{g}$  pro 300  $\mu\text{g}$  Membranen. Dünnschichtchromatographie: Laufmittel: Petrolether : Diethylether : Essigsäure = 80 : 20 : 2 (v/v), Nachweis: Besprühen mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  : Methanol = 1 : 1 (v/v) und anschließendes Veraschen bei 120 °C.

Tabelle 7 zeigt die Inkorporationsraten der Steroide in die Zellmembranen und die Fähigkeit der Steroide, die Ligandenbindung des OT-Rezeptors bzw. des CCK-Rezeptors wiederherzustellen.

**Tabelle 7: Test verschiedener Steroide auf deren Einbau in Cholesterin-abgereicherte Membranen und auf ihre Fähigkeit, die Ligandenbindung des OT-Rezeptors bzw. des CCK-Rezeptors wiederherzustellen**

Cholesterin-abgereicherte Membranen von HEK-OTR- bzw. HEK-CCKR-Zellen wurden mit den angegebenen Steroiden mittels Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen angereichert (S. 63). Die Einbauraten der Steroide in die Membranen und die Ligandenbindung des OT-Rezeptors bzw. des CCK-Rezeptors (S. 70) wurden gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von Dreifachbestimmungen angegeben. <sup>a</sup>100 % Einbaurate entsprach 37,4  $\mu$ g Steroid/mg Protein. Diese Menge wurde in unbehandelten Membranen gemessen. <sup>b</sup>Anstelle von Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen wurden die Membranen mit Bindungspuffer inkubiert. <sup>c</sup>Anstelle von Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen wurden die Membranen mit M $\beta$ CD in Bindungspuffer inkubiert. <sup>d</sup>100 % [<sup>3</sup>H]Oxytocin-Bindung entsprach 6205 dpm (20  $\mu$ g Membranen). <sup>e</sup>100 % [<sup>3</sup>H]propionyl-CCK8-Bindung entsprach 11691 dpm (10  $\mu$ g Membranen).

Steroid-Nr.	Name des Steroids im M $\beta$ CD-Komplex	Einbaurate (% unbehandelter Membranen) <sup>a</sup>	[ <sup>3</sup> H]Oxytocin-Bindung (% der Kontrolle) <sup>d</sup>	[ <sup>3</sup> H]propionyl CCK8-Bindung (% der Kontrolle) <sup>e</sup>
Kontrolle	Cholesterin	$\geq 100$	100.0 $\pm$ 2.8	100.0 $\pm$ 2.6
Puffer <sup>b</sup>	-	-	12.0 $\pm$ 1.0	43.3 $\pm$ 1.4
M $\beta$ CD <sup>c</sup>	-	-	5.1 $\pm$ 0.5	39.4 $\pm$ 2.1
A 1	Campesterol <sup>e</sup>	>100	97.0 $\pm$ 3.8	61.3 $\pm$ 2.7
A 2	$\beta$ -Sitosterol	>100	91.7 $\pm$ 1.9	66.9 $\pm$ 3.2
A 3	Desmosterol	>100	91.3 $\pm$ 4.1	107.2 $\pm$ 3.5
A 4	Fucosterol	>100	77.0 $\pm$ 2.2	70.2 $\pm$ 3.2
A 5	22-Ketocholesterol	>100	76.1 $\pm$ 1.6	72.1 $\pm$ 2.6
A 6	20 $\alpha$ -Hydroxycholesterol	97 $\pm$ 12	74.2 $\pm$ 1.8	86.0 $\pm$ 3.3
A 7	Stigmasterol	86 $\pm$ 10	56.6 $\pm$ 3.2	61.7 $\pm$ 2.4
A 8	22-R-Hydroxycholesterol	86 $\pm$ 11	15.9 $\pm$ 1.6	47.1 $\pm$ 2.0
A 9	25-Hydroxycholesterol	61 $\pm$ 11	13.2 $\pm$ 1.5	54.4 $\pm$ 1.8
B 10	7-Dehydrocholesterol	>100	91.5 $\pm$ 3.1	87.8 $\pm$ 3.4
B 11	Dihydrocholesterol	>100	86.1 $\pm$ 4.3	105.3 $\pm$ 2.6
B 12	19-Hydroxycholesterol	77 $\pm$ 9	70.3 $\pm$ 3.4	58.4 $\pm$ 3.3
B 13	5 $\alpha$ -Cholest-7-en-3 $\beta$ -ol	76 $\pm$ 13	66.5 $\pm$ 2.9	82.4 $\pm$ 3.6
B 14	Coprostanol	70 $\pm$ 10	57.2 $\pm$ 2.9	68.9 $\pm$ 3.1
B 15	6-Ketocholestanol	>100	22.9 $\pm$ 2.0	85.6 $\pm$ 3.5
B 16	7 $\beta$ -Hydroxycholesterol	62 $\pm$ 9	11.6 $\pm$ 1.2	61.0 $\pm$ 2.7
B 17	Cholesterylethylether	45 $\pm$ 10	11.4 $\pm$ 1.3	66.7 $\pm$ 3.4
B 18	Epicholesterol	>100	10.1 $\pm$ 1.4	62.8 $\pm$ 2.1
B 19	Lanosterol	95 $\pm$ 14	7.4 $\pm$ 1.0	71.4 $\pm$ 2.6
B 20	Epicoprostanol	84 $\pm$ 12	6.1 $\pm$ 0.7	67.9 $\pm$ 4.1
B 21	4-Cholesten-3-on	>100	6.0 $\pm$ 0.9	87.5 $\pm$ 3.1
C 22	Dehydroergosterol	>100	85.2 $\pm$ 4.6	66.7 $\pm$ 3.8
C 23	Ergosterol	>100	67.8 $\pm$ 2.7	69.4 $\pm$ 2.5
C 24	Stigmastanol	92 $\pm$ 13	52.7 $\pm$ 3.2	97.3 $\pm$ 2.7

Für diese Versuche wurden drei Kontrollansätze verwendet:

- (1) **Membranen, die mit Cholesterin wiederangereichert wurden.** Die Ligandenbindung dieser Membranen wurde als 100 % definiert und entsprach der Ligandenbindung unbehandelter Membranen, zumindest wenn aus den Membranen vor der Wiederanreicherung nicht mehr als 85 % des endogenen Cholesterins entfernt worden war. War hingegen der Cholesteringehalt vor der Wiederanreicherung auf weniger als 15 % reduziert worden, konnte im Falle des OT-Rezeptors selbst bei 100 %iger Wiederanreicherung mit Cholesterin die Ligandenbindung nicht mehr vollständig wiederhergestellt werden.
- (2) **Abgereicherte Membranen, die mit Bindungspuffer statt mit Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen inkubiert wurden.**
- (3) **Abgereicherte Membranen, die mit M $\beta$ CD statt mit mit Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen inkubiert wurden.** Während der Inkubation abgereicherter Membranen mit Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen nimmt der Steroidgehalt in den Komplexen immer weiter ab, da das Steroid nach und nach in die Membran eingebaut wird. Daher kann das „leere“ M $\beta$ CD nun als Akzeptor für das restliche endogene Cholesterin der Membranen dienen. Werden Membranen mit unwirksamen Steroiden angereichert, führt dies zu einem weiteren Absinken der Ligandenbindung im Vergleich zu Ansatz (2).

Tatsächlich führte eine Wiederanreicherung von abgereicherten HEK-OTR-Membranen mit Epicholesterol, Lanosterol, Epicoprostanol bzw. 4-Cholesten-3-on zu einer Absenkung der [ $^3$ H]OT-Bindung unter den Wert für die „Pufferkontrolle“.

Die meisten Steroide bauten sehr gut in die Membranen ein (Inkorporationsrate > 90 % im Vergleich zu Cholesterin (100 %)). Wahrscheinlich aufgrund ihrer höheren Polarität bauten Hydroxysterole teilweise schlechter in die Membranen ein. Bei Steroiden mit schlechteren Inkorporationsraten (z. B. Coprostanol ( $70 \pm 10$  %)) könnten die Ergebnisse des Ligandenbindungstests eventuell unter ihrem „wahren“ Wert liegen, der bei 100 %igem Einbau erreicht werden würde.

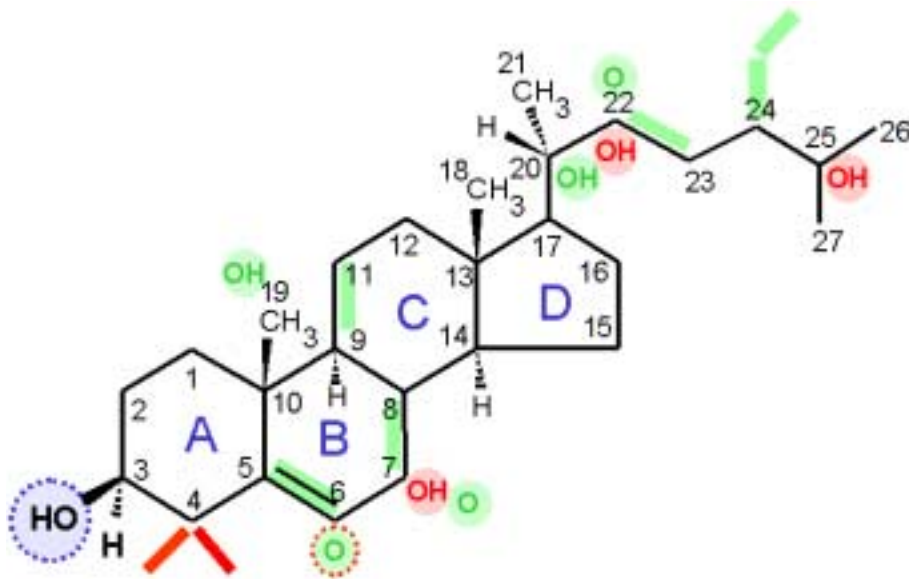
### Strukturelle Merkmale des Cholesterins, die für den hochaffinen Zustand des Oxytocinrezeptors wichtig sind

Wie Tabelle 7 zeigt, waren im Falle des OT-Rezeptors die Steroide größtenteils entweder gute Cholesterinsubstituenten (50 – 100 % der Ligandenbindung von Membranen, die mit Cholesterin wiederangereichert worden waren) oder sie waren komplett inaktiv (16 % oder sogar weniger Ligandenbindung als Pufferkontrolle). Diese Einteilung ist auch in Abbildung 27 dargestellt, in der Modifikationen, die zu inaktiven Steroiden führten, rot und solche, die zu aktiven Steroiden führten, grün gekennzeichnet sind. Gute Cholesterinsubstituenten waren Steroide mit hydrophoben Modifikationen in der aliphatischen Seitenkette, also Steroide mit einer Alkylgruppe (Campesterol, A1;  $\beta$ -Sitosterol, A2) oder einer Doppelbindung (Desmosterol, A3). Fucosterol (A4) und Stigmasterol (A7), die sowohl eine Alkylgruppe als auch eine Doppelbindung tragen, waren etwas weniger gute Substituenten. Die Effektivität von Steroiden mit Hydroxylgruppen hing von der Position der Gruppe am Steroid ab. Hydroxysterole mit einer OH-Gruppe an C-19 oder C-20 waren hochfunktionell, wohingegen die Einführung einer OH-Gruppe an C-7, C-22 oder C-25 zu völlig inaktiven Cholesterinderivaten führte. Befand sich an C-22 eine hydrophobere Keto- statt einer Hydroxylgruppe, so wurde die Ligandenbindung des OT-Rezeptors zu 76 % wiederhergestellt. Diese Befunde könnten durch das Modell der sogenannten „tail-to-tail“-Dimere des Cholesterins erklärt werden, wonach ein Cholesterinmonomer, das sich in der einen Hälfte der Lipiddoppelschicht befindet, mit seiner aliphatischen Kette mit derjenigen eines zweiten Cholesterinmoleküls in der anderen Hälfte der Doppelschicht über hydrophobe Wechselwirkungen in Kontakt steht [40]. Falls diese Dimere für die hochaffine Ligandenbindung des OT-Rezeptors nötig wären, könnte die Unwirksamkeit von Sterolen mit einer Hydroxylgruppe vor allem am Ende der Seitenkette durch eine Störung der hydrophoben Dimerbildung erklärt werden. Tatsächlich nahm die Wirksamkeit von Sterolen ab, je näher sich die Hydroxylgruppe am Ende der aliphatischen Kette befand ( $20\alpha$ -Hydroxycholesterol > 22-R-Hydroxycholesterol > 25-Hydroxycholesterol). Membranen mit  $20\alpha$ -Hydroxycholesterol wiesen zudem eine deutlich niedrigere Fluidität auf als solche mit 22-R-Hydroxycholesterol bzw. 25-Hydroxycholesterol, was ebenfalls darauf hindeutet, dass  $20\alpha$ -Hydroxycholesterol tatsächlich leichter Dimere bilden könnte als die beiden anderen Hydroxysterole.

Aus Veränderungen am Ringsystem läßt sich folgendes Bild ableiten: Die  $\Delta^5$ -Doppelbindung ist offenbar nicht notwendig, da Dihydrocholesterol (B11) ein sehr aktives Steroid darstellt. Die inaktiven Steroide 4-Cholesten-3-on (B21), Cholesterylethylether (B17) und Epicholesterol (B18) zeigen, dass die C3-Hydroxylfunktion in  $\beta$ -Konfiguration für die hochaffine Ligandenbindung des OT-Rezeptors absolut notwendig ist. Wichtig ist auch die Region zwischen C3 und C7, wie die inaktiven Steroide 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol (B16), Lanosterol (B19) und Epicoprostanol (B20) und das zu 23 % aktive Steroid 6-Ketocholestanol (B15) demonstrieren.

Sehr interessant ist, dass Coprostanol (B14) bei einer Einbaurate von nur 70 % zu immerhin 57 % aktiv war, obwohl es im Gegensatz zu Cholestanol ein nichtplanares Ringsystem besitzt (Abbildung 25), das die Interaktion des Steroids mit Phospholipiden stört [143,144]. Somit ist eine indirekte Wirkung von Cholesterin auf den OT-Rezeptor über Cholesterin-Phospholipid-Wechselwirkungen, die die Membranstruktur beeinflussen, eher unwahrscheinlich.

Ebenfalls sehr aktiv war das in Hefen natürlich vorkommende Dehydroergosterol (C22), das noch stärker modifiziert ist als das weniger aktive Ergosterol (C23). Durch seine drei Doppelbindungen im Ringsystem könnte eine Konformation des Steroids stabilisiert werden, die besonders gut mit dem OT-Rezeptor interagieren kann, also z. B. gut in eine mögliche Cholesterinbindungstasche am Rezeptor passen könnte. Dehydroergosterol ist ein fluoreszierendes Cholesterinderivat und könnte in weiteren Studien zur Untersuchung von Rezeptor-Cholesterin-Interaktionen verwendet werden. Veröffentlichungen von Mukherjee *et al.*, in denen die Verwendung von Dehydroergosterol zur Untersuchung der Cholesterinverteilung in lebenden Zellen beschrieben wird, bestätigen, dass Dehydrocholesterol ähnliche Eigenschaften wie Cholesterin hat und somit für die genannten Versuche geeignet sein sollte [145].



**Abbildung 27: Strukturelle Merkmale von Cholesterin, die für den hochaffinen Zustand des Oxytocinrezeptors wichtig sind**

HEK-OTR-Membranen, aus denen das endogene Cholesterin zu 85 % mit M $\beta$ CD entfernt worden war (S. 63), wurden mit verschiedenen Steroiden mittels Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen wiederangereichert. Anschließend wurde die [ $^3$ H]OT-Bindung gemessen (S. 70). Steroide haben „verbotene“ Modifikationen (rot), wenn sie die Ligandenbindung des OT-Rezeptors zu weniger als 16 % im Vergleich zu Cholesterin wiederherstellten, und „erlaubte“ Modifikationen (grün) wenn sie die Ligandenbindung zu mehr als 50 % wiederherstellten. Blau gekennzeichnet ist die 3 $\beta$ -OH-Gruppe, die für den hochaffinen Zustand des OT-Rezeptors absolut notwendig ist, grün mit rotem Rand ist die C6-Ketogruppe von 6-Ketocholestanol dargestellt. Dieses Steroid zeigte 23 % Wirksamkeit und war Edukt für die Synthese des photoreaktiven Cholesterinderivats 6,6-Azocholestanol (S. 64).

### Strukturelle Merkmale des Cholesterins, die für die Ligandenbindung des Cholecystokininrezeptors wichtig sind

Für den CCK-Rezeptor ergab sich ein völlig anderes Bild als für den OT-Rezeptor. Zunächst einmal gab es hier kein Steroid, das komplett inaktiv gewesen wäre. Der schlechteste Cholesterinsubstituent für den CCK-Rezeptor war 22(R)-Hydroxycholesterol (A8), das, verglichen mit Cholesterin, 47 % der Ligandenbindung wieder herstellte. Ähnlich „niedrige“ Aktivitäten zeigten zwei weitere Hydroxysterole, nämlich 25-Hydroxycholesterol (A9) und 19-Hydroxycholesterol (B12). Bis auf Desmosterol (A3) und Dihydrocholesterol (B11) waren alle getesteten Steroide weniger wirksam als Cholesterin. Ganz im Gegensatz zum OT-Rezeptor scheint für den CCK-Rezeptor die 3-OH-Gruppe unwichtig zu sein, wie man an der hohen Effektivität von 4-Cholesten-3-on (B21, 87,5 %) und von Cholesterylethylether (B17) erkennen kann. Ebenso wie es Steroide gibt, die die Ligandenbindung des CCK-Rezeptors wirksam unterstützten, jedoch nicht die des OT-

Rezeptors, gibt es auch Cholesterinsubstituenten, die die Ligandenbindung des OT-Rezeptors aufrechterhalten, weniger aber die des CCK-Rezeptors. Ein Beispiel hierfür ist Campesterol (A1), das die Ligandenbindung Cholesterin-abgereicherter HEK-OTR-Membranen zu 97 %, diejenige von HEK-CCKR-Membranen aber nur zu 61 % wiederherstellte.

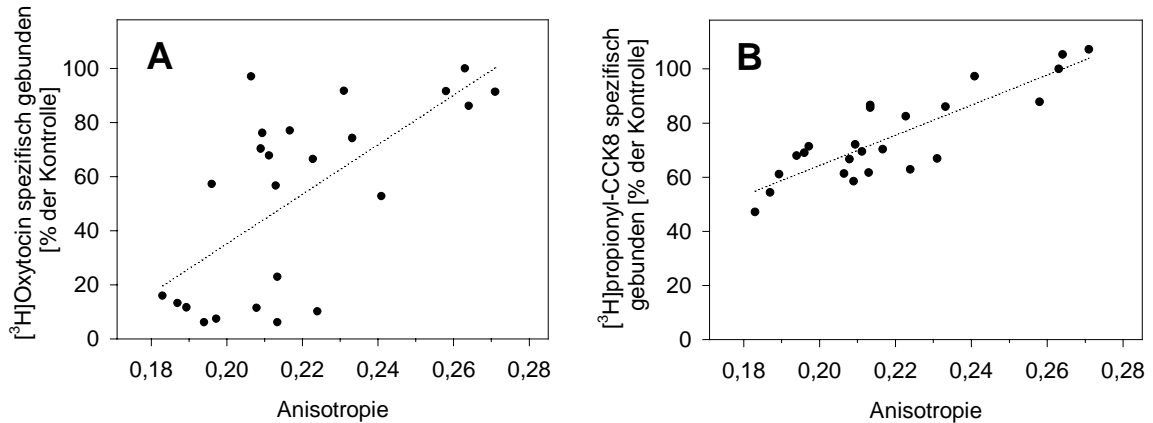
#### **4.3.3. Anisotropiemessungen an mit verschiedenen Steroiden wiederangereicherten Membranen und an Membranen mit unterschiedlichen Cholesterinkonzentrationen**

Um zu überprüfen, ob der CCK-Rezeptor im Gegensatz zum OT-Rezeptor indirekt über die Membranfluidität durch Cholesterin beeinflusst wird, wurden an den mit Steroiden wiederangereicherten Membranen des vorherigen Kapitels Anisotropiemessungen durchgeführt. Auftragung der Ligandenbindung der beiden Rezeptoren (Tabelle 7) gegen die Anisotropie (Tabelle 8) ergab für den CCK-Rezeptor eine weitaus höhere Korrelation ( $r^2 = 0,7338$ ) als für den OT-Rezeptor ( $r^2 = 0,4420$ ) (Abbildung 28). Steroide, die für den CCK-Rezeptor die besten Cholesterinsubstituenten darstellten (z. B. Desmosterol), ergaben die höchsten Anisotropiewerte, und bei Membranen mit den schlechtesten Substituenten (z. B. 25-Hydroxycholesterol) wurden die niedrigsten Anisotropiewerte gemessen. Das für den OT-Rezeptor hochfunktionelle Campesterol konnte die Fluidität der Membranen kaum vermindern und stellte die Ligandenbindung des CCK-Rezeptors wie erwähnt nur zu 61% wieder her. Im Gegensatz dazu ergaben Cholesterinderivate, die im Falle des OT-Rezeptors völlig inaktiv waren (z. B. Epicholesterol, 4-Cholesten-3-on und Cholesterylethylether) mittlere Anisotropiewerte. Da die verschiedenen Steroide nicht nur die Fluidität der Membran, sondern auch in unterschiedlicher Weise deren Dicke, Biegung und Dipolpotential beeinflussen, ist es bei der hohen Korrelation zwischen Ligandenbindung und Anisotropie im Falle des CCK-Rezeptors wahrscheinlich, dass dieser tatsächlich durch die Fluidität der Membran am stärksten beeinflusst wird.

**Tabelle 8: Fluoreszenzanisotropie von DPH in Cholesterin-abgereicherten Membranen, die mit verschiedenen Steroiden wiederangereichert worden waren**

HEK-OTR- bzw. HEK-CCKR-Membranen wurden mit M $\beta$ CD behandelt, um das endogene Cholesterin (bis auf ca. 15 %) zu entfernen. Nachdem die abgereicherten Membranen mit Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen wiederangereichert worden waren, wurde ihre Anisotropie bestimmt (S. 69). <sup>a</sup>Die Werte sind Durchschnittswerte  $\pm$  Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente mit Dreifachbestimmungen. Kontrollen: <sup>b</sup>unbehandelte Membranen; <sup>c</sup>M $\beta$ CD: Membranen, die anstelle von Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen mit M $\beta$ CD inkubiert worden waren; <sup>d</sup>Kontrolle: Membranen, die mit Cholesterin/M $\beta$ CD wiederangereichert worden waren. <sup>e</sup>Anisotropiewert nicht bestimmt, da die intrinsische Fluoreszenz von Dehydroergosterol mit den Fluoreszenzsignalen von DPH interferiert.

Steroid-Nr.	Name des Steroids im M $\beta$ CD-Komplex	Anisotropie <sup>a</sup>
unbehandelt <sup>b</sup>	-	0.232 $\pm$ 0.010
M $\beta$ CD <sup>c</sup>	-	0.174 $\pm$ 0.008
Kontrolle <sup>d</sup>	Cholesterin	0.263 $\pm$ 0.011
A 1	Campesterol	0.206 $\pm$ 0.012
A 2	$\beta$ -Sitosterol	0.231 $\pm$ 0.009
A 3	Desmosterol	0.271 $\pm$ 0.008
A 4	Fucosterol	0.217 $\pm$ 0.012
A 5	22-Ketocholesterol	0.209 $\pm$ 0.007
A 6	20 $\alpha$ -Hydroxycholesterol	0.233 $\pm$ 0.008
A 7	Stigmasterol	0.213 $\pm$ 0.011
A 8	22-R-Hydroxycholesterol	0.183 $\pm$ 0.009
A 9	25-Hydroxycholesterol	0.187 $\pm$ 0.006
B 10	7-Dehydrocholesterol	0.258 $\pm$ 0.015
B 11	Dihydrocholesterol	0.264 $\pm$ 0.008
B 12	19-Hydroxycholesterol	0.209 $\pm$ 0.009
B 13	5 $\alpha$ -Cholest-7-en-3 $\beta$ -ol	0.223 $\pm$ 0.010
B 14	Coprostanol	0.196 $\pm$ 0.007
B 15	6-Ketocholestanol	0.213 $\pm$ 0.011
B 16	7 $\beta$ -Hydroxycholesterol	0.189 $\pm$ 0.006
B 17	Cholesterylethylether	0.208 $\pm$ 0.009
B 18	Epicholesterol	0.224 $\pm$ 0.012
B 19	Lanosterol	0.197 $\pm$ 0.007
B 20	Epicoprostanol	0.194 $\pm$ 0.009
B 21	4-Cholesten-3-on	0.213 $\pm$ 0.011
C 22	Dehydroergosterol	n. d. <sup>e</sup>
C 23	Ergosterol	0.211 $\pm$ 0.009
C 24	Stigmastanol	0.241 $\pm$ 0.014



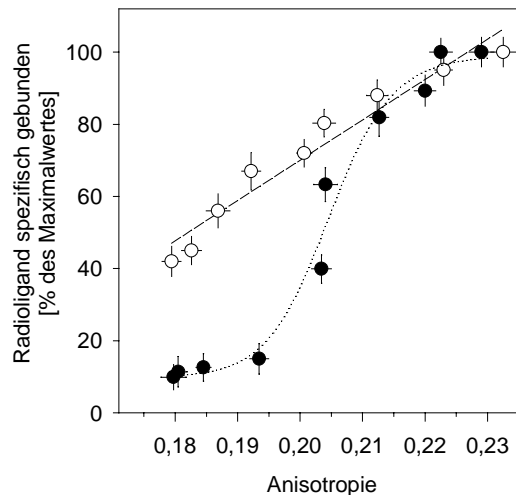
**Abbildung 28: Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors (A) bzw. des Cholecystokinrezeptors (B) in Abhängigkeit der Fluoreszenzanisotropie von DPH in Membranen, deren endogenes Cholesterin gegen unterschiedliche Steroide ausgetauscht wurde**

Membranen von HEK-OTR- bzw. HEK-CCKR-Zellen wurden mit M $\beta$ CD behandelt, um das endogene Cholesterin zu entfernen (S. 63). Danach wurden die Membranen mit unterschiedlichen Steroiden (Tabelle 8) mittels Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen wieder angereichert (Kontrolle: Anreicherung mit Cholesterin) (S. 63). Anschließend wurden die Radioligandenbindung ([<sup>3</sup>H]Oxytocin bzw. [<sup>3</sup>H]propionyl-CCK8) und die Anisotropie der Membranen gemessen (Werte in Tabelle 8). Die Daten wurden mittels linearer Regression (gepunktete Linien) angepasst: (A)  $y = 916,7x - 148,1$ ; Koeffizient  $r^2 = 0,4420$ ; (B)  $y = 557,3x - 47,09$ ; Koeffizient  $r^2 = 0,7338$ .

Um die unterschiedliche Abhängigkeit des OT-Rezeptors bzw. des CCK-Rezeptors von der Anisotropie weiter zu untersuchen, wurden die entsprechenden Membranen unterschiedlich lange (1 – 30 min) mit final 30 mM M $\beta$ CD behandelt (S. 63). Auf diese Weise wurden unterschiedliche Cholesterinmengen aus den Membranen entfernt und unterschiedliche Anisotropiewerte erzielt.

Die Korrelation der Anisotropie der HEK-CCKR- bzw. HEK-OTR-Membranen mit der Ligandenbindung (Abbildung 29) ergab im Falle des CCK-Rezeptors eine lineare Abhängigkeit: die Ligandenbindung stieg mit zunehmender Anisotropie (also abnehmender Membranfluidität) linear an. Im Gegensatz hierzu nahm die Ligandenbindung des OT-Rezeptors zunächst parallel mit der Entfernung von Cholesterin aus der Membran ab. Wurde die Cholesterinmenge hingegen unterhalb eines bestimmten Schwellenwertes (57 % des ursprünglichen Cholesteringehaltes un behandelter Membranen) abgesenkt, kam es zu einem scharfen Abfall der Ligandenbindung des OT-Rezeptors. Der sigmoidale Verlauf dieser Kurve deutet auf eine kooperative Bindung mehrerer Cholesterinmoleküle an den OT-Rezeptor hin. Durch Korrelation der Cholesterinmengen der HEK-OTR-Membranen mit der Ligandenbindung konnte ein Hill-Koeffizient von 5,7 bestimmt werden. Dies bedeutet, dass im Falle einer kooperativen Bindung mindestens fünf bis sechs Cholesterinmoleküle an den menschlichen OT-

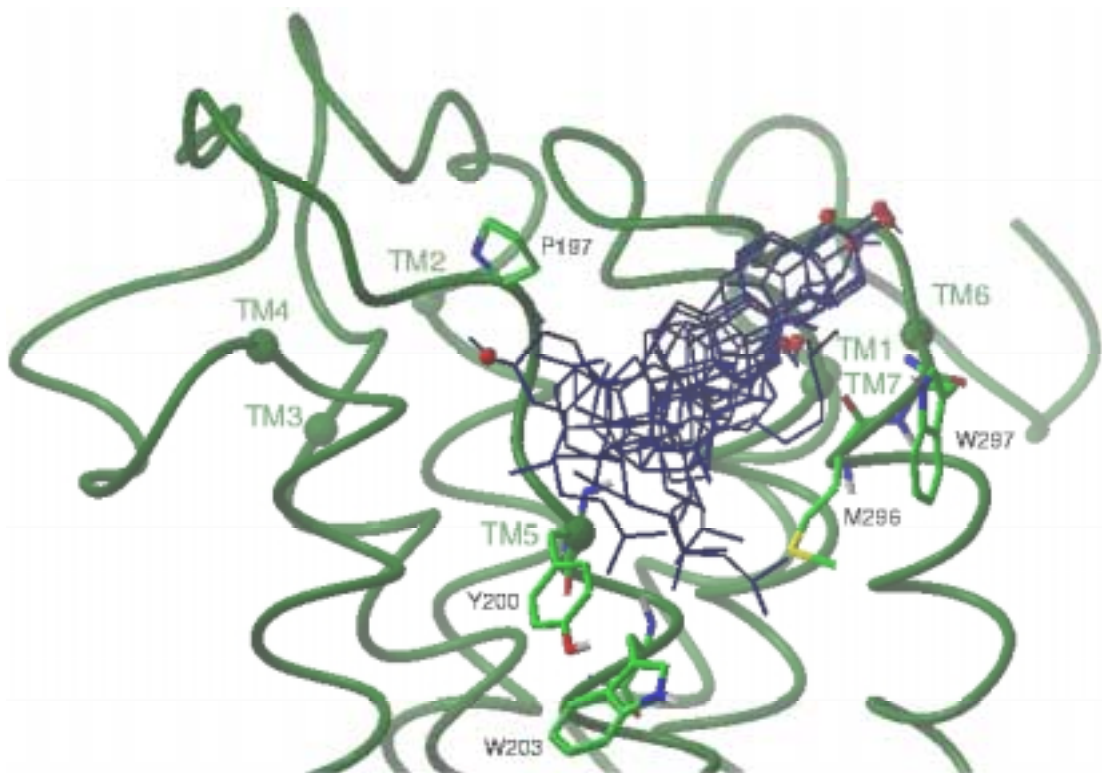
Rezeptor binden würden. Bei einer bestimmten kritischen Cholesterinkonzentration könnte sich aber auch die Verteilung des Cholesterins in der Nähe des OT-Rezeptors abrupt ändern, indem z. B. mögliche Cholesterindimere (S. 14) dissoziieren oder indem eine Umlagerung von Cholesterin zwischen den Hälften der Lipiddoppelschicht stattfindet.



**Abbildung 29: Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors (●) und des Cholecystokininrezeptors (○) in Abhängigkeit von der Anisotropie der Membranen**

HEK-OTR- bzw. HEK-CCKR-Membranen wurden für 1 – 30 min mit final 30 mM M $\beta$ CD behandelt, um unterschiedliche Mengen Cholesterin zu entfernen (S. 63). Nach dem Waschen der Membranen mit Bindungspuffer wurden die Ansätze aufgeteilt, um sowohl die Ligandenbindung (S. 70) als auch die Anisotropie (S. 69) zu messen. Zur Kurvenanpassung wurden folgende Funktionen verwendet: CCK-Rezeptor (gestrichelte Linie):  $y = 1117,6x - 153,5$  (Koeffizient  $r^2 = 0,9477$ ); OT-Rezeptor (gepunktete Linie):  $y = (a - d)/(1 + (x/c)^b) + d$ , wobei  $a = 99,09$ ;  $b = -40,78$ ;  $c = 0,2046$  und  $d = 9,799$ .

Die Ergebnisse der Struktur-Funktionsanalysen wurden verwendet, um durch computergestütztes „Modeling“ mögliche Cholesterinbindungsstellen im OT-Rezeptor zu identifizieren. Diese theoretische Arbeit wurde von Frau Politowska aus der Arbeitsgruppe von Prof. J. Ciarkowski (Universität Danzig, Polen) durchgeführt und in *Experimental Physiology* veröffentlicht [146]. Eine mögliche Cholesterinbindungsstelle liegt demzufolge zwischen den Transmembranhelices 5 und 6 am Übergang zwischen Membran und extrazellulären Domänen (Abbildung 30). Das inaktive Cholesterinderivat 4-Cholesten-3-on konnte in diesem Modell nicht eingepasst werden, was auf eine Spezifität dieser möglichen Cholesterinbindungsstelle hinweist.



**Abbildung 30: Computergestütztes Modeling einer möglichen Cholesterinbindungsstelle des menschlichen Oxytocinrezeptors**

Die Aminosäurereste P197, Y200 und W203 sind in der Transmembranhelix 5 (TM5), die Aminosäurereste M296 und W297 in der Transmembranhelix 6 (TM6) lokalisiert. Aus [146].

#### 4.3.4. Zusammenfassung und Diskussion

Die vorangegangenen Versuche verdeutlichen am Beispiel des OT-Rezeptors und des CCK-Rezeptors die verschiedenen Mechanismen der Cholesterinwirkung auf Membranproteine. Folgende Beobachtungen demonstrieren, dass der CCK-Rezeptor indirekt über die Membranfluidität durch Cholesterin beeinflusst wird: (1) Die Ligandenbindung des CCK-Rezeptors wurde nicht durch Oxidation des Cholesterins zu 4-Cholesten-3-on beeinflusst (keine Änderung der Membranfluidität). (2) Substitution von Cholesterin durch verschiedene Steroide zeigte, dass die Ligandenbindung des CCK-Rezeptors nicht von der Struktur des Steroids, sondern von der resultierenden Membranfluidität abhängt. (3) Die Ligandenbindung des CCK-Rezeptors ist direkt proportional zur Anisotropie der Membran. Beispiele für Rezeptoren, die ebenfalls über die Membranfluidität reguliert werden, sind neben dem menschlichen CCK-Rezeptor der  $\beta$ -adrenerge Rezeptor und der Serotoninrezeptor [147,148].

Im Gegensatz hierzu wurde die Ligandenbindung des OT-Rezeptors schon bei geringsten Änderungen des Cholesteringehaltes der Membran, die noch keinen Einfluss auf die Fluidität hatten (s. Cholesterinoxidase-Experimente), vermindert. Auch Filipin, das an die 3'-OH-Gruppe des Cholesterins bindet und den Cholesteringehalt der Membran nicht verändert, führte zu einer Reduktion der Ligandenbindung des OT-Rezeptors, nicht jedoch des CCK-Rezeptors. Die Interaktion zwischen Cholesterin und dem OT-Rezeptor war darüber hinaus hoch spezifisch, wie die Cholesterinsubstitutionsexperimente zeigten. Hierbei wurde auch deutlich, dass die Ligandenbindung des OT-Rezeptors nur sehr schwach mit der Membrananisotropie korreliert. Die Cholesterinbindung an den OT-Rezeptor erfolgt wahrscheinlich kooperativ über mehrere (mindestens fünf) Cholesterinbindungsstellen. Eine mögliche Bindungsstelle wurde durch computergestütztes Modeling vorgeschlagen.

Ebenso wie der OT-Rezeptor wird Rhodopsin, der Photorezeptor von Sehzellen, vermutlich direkt von Cholesterin beeinflusst. Wie in der Einleitung ausführlich erläutert (S. 23), wird die Signalweiterleitung von Rhodopsin jedoch durch Cholesterin *inhibiert*. Eigene Beobachtungen zeigen, dass der V<sub>2</sub> Vasopressinrezeptor, dessen Ligand mit Oxytocin verwandt ist, ebenso empfindlich auf Cholesterinoxidase/Sphingomyelinase-Behandlung der Plasmamembranen reagiert wie der OT-Rezeptor und wahrscheinlich ebenfalls über direkte Interaktion mit Cholesterin reguliert wird.

Pang *et al.* führten ähnliche Experimente mit dem Galaninrezeptor 2 (GalR2) – ebenfalls ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor – durch, die 1999 in *Biochemistry* veröffentlicht wurden [149]. Ähnlich wie im Falle des OT-Rezeptors wird die Ligandenbindung des GalR2 durch Filipin- bzw. Cholesterinoxidase/Sphingomyelinase-Behandlung, sowie durch das Entfernen von Cholesterin aus den Membranen negativ beeinflusst. Auftragung der Ligandenbindung gegen den Cholesteringehalt von Membranen, die mit verschiedenen M $\beta$ CD-Konzentrationen inkubiert worden waren, ergaben wie im Falle des OT-Rezeptors eine sigmoidale Abhängigkeit mit einem Hill-Koeffizienten von  $H = 3,1$ . Dieser lag somit etwas niedriger als derjenige für den OT-Rezeptor ( $H = 5,7$ ). Pang *et al.* reicherten Cholesterin-abgereicherte Membranen mit folgenden Steroiden wieder an: Cholesterin, 5-Cholesten, 5-Pregnen-3 $\beta$ -ol-20-on (= Pregnenolon), 4-Cholesten-3-on und 5-Cholesten-3-on. Ein interessantes Ergebnis ist, dass 5-Cholesten-3-on nicht aber 4-Cholesten-3-on die Ligandenbindung des GalR2 wiederherstellen kann. Dies bedeutet, dass bei diesem Rezeptor im Gegensatz zum OT-Rezeptor [104] die 3 $\beta$ -Hydroxylfunktion des Cholesterins

durch eine 3-Ketofunktion substituiert werden darf, ohne dass die Ligandenbindung beeinträchtigt wird. Die  $\Delta^5$ -Doppelbindung im Ringsystem darf hingegen nicht durch eine  $\Delta^4$ -Doppelbindung ersetzt werden. Ähnlich wie der OT-Rezeptor benötigt der GalR2 wahrscheinlich die aliphatische Seitenkette des Cholesterins, da Pregnenolon ein inaktives Steroid darstellt.

Die Inkubation von Membranen mit Ethanol in Konzentrationen bis zu 5 % (v/v) hatte keinen Einfluss auf die Ligandenbindung des GalR2, obwohl hierdurch die Fluidität der Membranen erhöht wird, was von Pang *et al.* als weiterer Hinweis gedeutet wurde, dass der GalR2 nicht über die Fluidität der Membranen reguliert wird. Problematisch an der Arbeit von Pang *et al.* sind allerdings vor allem die fehlenden Anisotropiemessungen – die Autoren zitierten durchweg unsere Ergebnisse – und die fehlende Bestimmung der Einbauraten der Steroide, weshalb die Daten nur unter Vorbehalt betrachtet werden sollten.

#### **4.4. Modulierung Liganden-induzierter Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch Cholesterin**

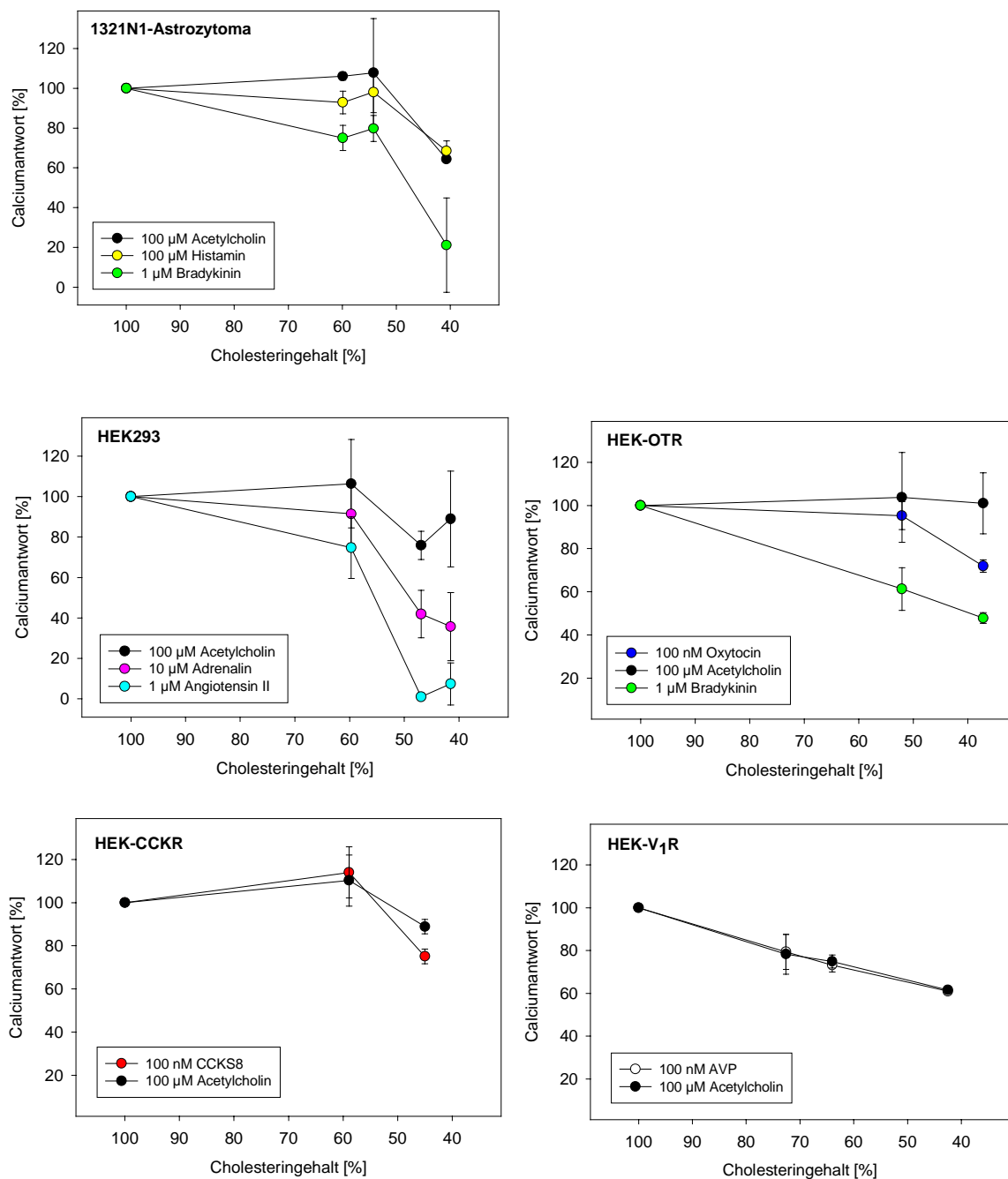
Aufgrund der hohen Cholesterinkonzentrationen in Plasmamembranen von Säugetierzellen von durchschnittlich 200 – 300  $\mu\text{g}$  pro mg Protein kommen wahrscheinlich alle Transmembranproteine mehr oder weniger häufig in Kontakt mit Cholesterin. In dieser Versuchsreihe wurde daher der Einfluss von Cholesterin auf Liganden-induzierte Calciumsignale verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren untersucht. Hierfür wurden menschliche 1321N1-Astrocytomazellen und nichttransfizierte bzw. mit verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren transfizierte HEK293-Zellen verwendet. Wie auf S. 153 ff. gezeigt, exprimieren die Zellen folgende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mit dem Phosphatidyl-Inositolphosphat-Signalweg verbunden sind:

- 1321N1-Astrocytoma: M<sub>3</sub> muscarinischer Acetylcholinrezeptor  
B<sub>2</sub> Bradykininrezeptor  
H<sub>1</sub> Histaminrezeptor
- HEK293: M<sub>3</sub> muscarinischer Acetylcholinrezeptor  
adrenerger Rezeptor (Subtyp unbekannt)  
Angiotensin II-Rezeptor  
B<sub>2</sub> Bradykininrezeptor
- HEK-OTR: wie HEK293, zusätzlich menschlichem Oxytocinrezeptor

- HEK-CCKR: wie HEK293, zusätzlich menschlichem Cholecystokinrezeptor Subtyp B
- HEK-V<sub>1</sub>R: wie HEK293, zusätzlich menschlichem V<sub>1</sub> Vasopressinrezeptor

Durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten mit 10 mM M $\beta$ CD wurden aus den Zellen unterschiedlich hohe Cholesterinmengen entfernt (S. 62). Anschließend wurden die Zellen mit dem fluoreszierenden und calciumsensitiven Farbstoff Fura-2/AM beladen, so dass Liganden-induzierte Änderungen der freien intrazellulären (= cytosolischen) Ca<sup>2+</sup>-Konzentration messbar wurden (S. 72). Diese wurden dann in Abhängigkeit von der zellulären Cholesterinkonzentration ( $\mu$ g pro mg Protein) dargestellt, die für unbehandelte Zellen auf 100 % gesetzt wurde (Abbildung 31).

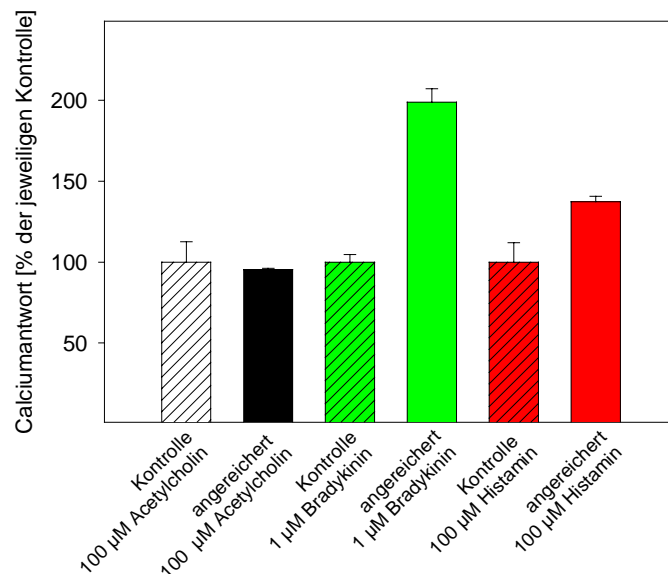
Auf den ersten Blick fällt auf, dass die Liganden-induzierten Calciumsignale aller Zellen und (fast) aller Rezeptoren mit zunehmender Entfernung des endogenen Cholesterins schwächer werden. Darüber hinaus erkennt man, dass die Empfindlichkeit eines Rezeptors in gewissem Maße von der zellulären Umgebung abhängt. So wird die Calciumantwort des M<sub>3</sub> muscarinischen Acetylcholinrezeptors in HEK-OTR-Zellen durch die Entfernung von 60 % des Cholesterins überhaupt nicht beeinflusst, wohingegen sie in HEK-V<sub>1</sub>R-Zellen auf 60 % absinkt. Daher können nur Rezeptoren der gleichen Zelllinie miteinander verglichen werden. Ähnlich wie der Acetylcholinrezeptor verhielten sich der Histamin-, der CCK- und der V<sub>1</sub> Vasopressinrezeptor. Etwas empfindlicher reagierte der OT-Rezeptor. Deutlich sensitiver gegenüber der Cholesterinentfernung waren die Calciumantworten auf Bradykinin und Adrenalin. Am empfindlichsten war der Angiotensinrezeptor, bei dem die Entfernung der Hälfte des endogenen Cholesterins zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung des Calciumsignals führte.



**Abbildung 31: Einfluss des zellulären Cholesteringehalts auf Liganden-induzierte Veränderungen der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**  
Versuchsdurchführung s. Text.

Würde nun umgekehrt eine Erhöhung der Cholesterinmenge über den Gehalt in unbehandelten Zellen hinaus zu stärkeren Calciumsignalen führen? Um diese Frage zu beantworten, inkubierte ich 1321N1-Zellen mit 0,15 mM Cholesterin/M $\beta$ CD bei 37 °C für 30 min, wodurch der Cholesteringehalt auf 137 % gegenüber Kontrollzellen erhöht wurde. Abbildung 32 zeigt die Calciumantworten der Zellen auf Acetylcholin, Bradykinin bzw.

Histamin. Die Calciumantwort des Acetylcholinrezeptors der mit Cholesterin angereicherten Zellen unterschied sich nicht von derjenigen der Kontrollzellen. Im Vergleich zu Kontrollzellen zeigten die Cholesterin-angereicherten Zellen hingegen eine um 37 % erhöhte Calciumantwort auf Histamin. Am empfindlichsten reagierte wieder der Bradykininrezeptor, dessen Calciumantwort in Cholesterin-angereicherten Zellen doppelt so stark war wie in den Kontrollzellen. Der Bradykininrezeptor reagierte also sowohl bei einer Ab- also auch bei einer Anreicherung der 1321N1-Zellen am empfindlichsten. Unempfindlicher gegenüber Änderungen des zellulären Cholesteringehalts war der Histaminrezeptor und am unempfindlichsten der Acetylcholinrezeptor.



**Abbildung 32: Liganden-induzierte Calciumsignale von 1321N1-Astrocytoma, die mit Cholesterin angereichert worden waren**

Adhärente 1321N1-Zellen wurden bei 37 °C für 30 min mit 0,15 mM Cholesterin/M $\beta$ CD inkubiert. Nach dem Waschen des Zellrasens mit Medium wurden die Zellen als Vorbereitung auf die Calciummessung mit Fura-2/AM inkubiert. Die Messung der Liganden-induzierten Calciumantworten erfolgte wie im Methodenteil beschrieben (S. 72). Ein Teil der Zellen wurde zur Bestimmung des Cholesterin- und Proteingehaltes (S. 37 und S. 36) bzw. zur Messung der Fluoreszenzanisotropie (S. 69) verwendet.

Da die untersuchten Rezeptoren an den gleichen Signaltransduktionsweg gekoppelt sind, spiegeln diese Unterschiede tatsächlich unterschiedliche Empfindlichkeiten der Rezeptoren gegenüber Cholesterin wider. Die Experimente sagen jedoch nichts über den Mechanismus der Cholesterinwirkung auf die einzelnen Rezeptoren aus, da sowohl eine Entfernung von endogenem Cholesterin aus den Zellen als auch eine Anreicherung die physikalischen Eigenschaften der Zellmembranen verändert. So führte z. B. die Erhöhung des

Cholesteringehalts der 1321N1-Zellen auf 137 % zu einem massiven Rückgang der Membranfluidität, was sich in einem Anstieg der Anisotropie der Membranen von  $r = 0,1892 \pm 0,0057$  auf  $r = 0,2348 \pm 0,0028$  widerspiegelte. Experimente, wie sie mit dem OT- und dem CCK-Rezeptor durchgeführt wurden, sind für eine Klärung des Wirkungsmechanismus notwendig.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass viele G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (zumindest diejenigen, welche an den Inositoltrisphosphatweg gekoppelt sind) Cholesterin für die maximale Signalweiterleitung benötigen. Dies passt zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die von einer Anreicherung verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in cholesterinreichen Domänen der Plasmamembran berichten. Beispiele sind der CCK-Rezeptor, der  $M_2$  Acetylcholinrezeptor, der Bradykinin- und der  $\beta$ -adrenerge Rezeptor [63]. Jüngere Ergebnisse von Dr. G. Gimpl zeigen, dass sich die Gesamtdichte des menschlichen OT-Rezeptors in cholesterinreichen Domänen nicht von der in cholesterinarmen Domänen unterscheidet. Die Anzahl der hochaffinen Rezeptoren ist jedoch in cholesterinreichen Mikrodomänen doppelt so hoch [139]. Gleichzeitig erhöht Cholesterin die thermische Stabilität des OT-Rezeptors (s. S. 94). In sogenannten Caveolae, also cholesterinreichen Domänen, die das Strukturprotein Caveolin enthalten, könnten die Calciumsignale durch Cholesterin verstärkt und durch Caveolin moduliert werden (S. 18). Wie in der Einleitung erläutert, bindet Caveolin sowohl Cholesterin als auch verschiedene Proteine der Signalkaskaden, wobei noch unklar ist, ob Caveolin Liganden-induzierte Calciumsignale beeinflussen kann.

Was könnte die physiologische Bedeutung dieser Phänomene im Falle des OT-Rezeptors sein? 1987 beschrieben Murphy und Dwarde einen Anstieg der Cholesterinkonzentration in Plasmamembranen des Myometriums der Ratte während der Schwangerschaft [150]. Dies könnte zu einer erhöhten Stabilität des Rezeptors und zu einem Anstieg der hochaffinen Rezeptoren führen. Dies ist wichtig, da die physiologische Konzentration von Oxytocin im Blut sehr gering ist (im pM-Bereich), so dass nur Rezeptoren mit höchster Affinität auf Oxytocin antworten können. Daher tragen Änderungen im Cholesteringehalt und in der –verteilung zusammen mit einer verstärkten Expression des OT-Rezeptors am Ende der Schwangerschaft zu einer starken Antwort auf Oxytocin bei, die während der Wehen wichtig ist.

## 4.5. Synthese von 6,6-Azocholestanol und Test auf dessen Fähigkeit, den hochaffinen Zustand des Oxytocinrezeptors zu unterstützen

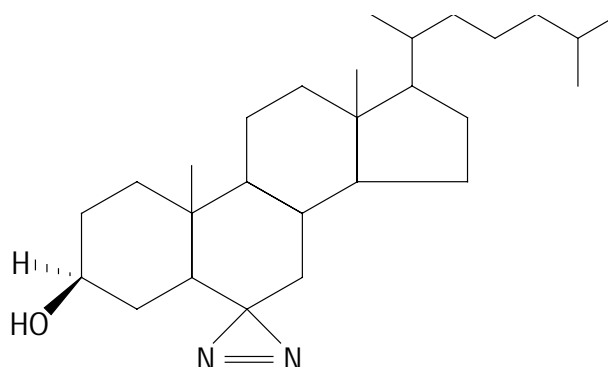
In dieser Versuchsreihe sollte der humane OT-Rezeptor kovalent mit einem radioaktiv markierten, photoreaktiven Cholesterinderivat – [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol – verknüpft werden. Eine spezifische Markierung des Rezeptors mit [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol würde zum einen die Hypothese einer direkten Wechselwirkung zwischen Cholesterin und dem OT-Rezeptor untermauern und zum anderen die Identifizierung der hypothetischen Cholesterinbindungsstelle(n) nach Anreicherung und proteolytischer Fragmentierung des Rezeptors ermöglichen.

### 4.5.1. Synthese von 6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol

Dieses photoreaktive Cholesterinderivat – im Folgenden kurz als 6,6-Azocholestanol bezeichnet – wurde nach den Erkenntnissen zur Struktur-Funktionsanalyse von Cholesterin im Hinblick auf den hochaffinen Zustand des menschlichen OT-Rezeptors synthetisiert (Abbildung 27). Es besitzt folgende Eigenschaften und Vorteile, die eine Markierung des OT-Rezeptors begünstigen sollten:

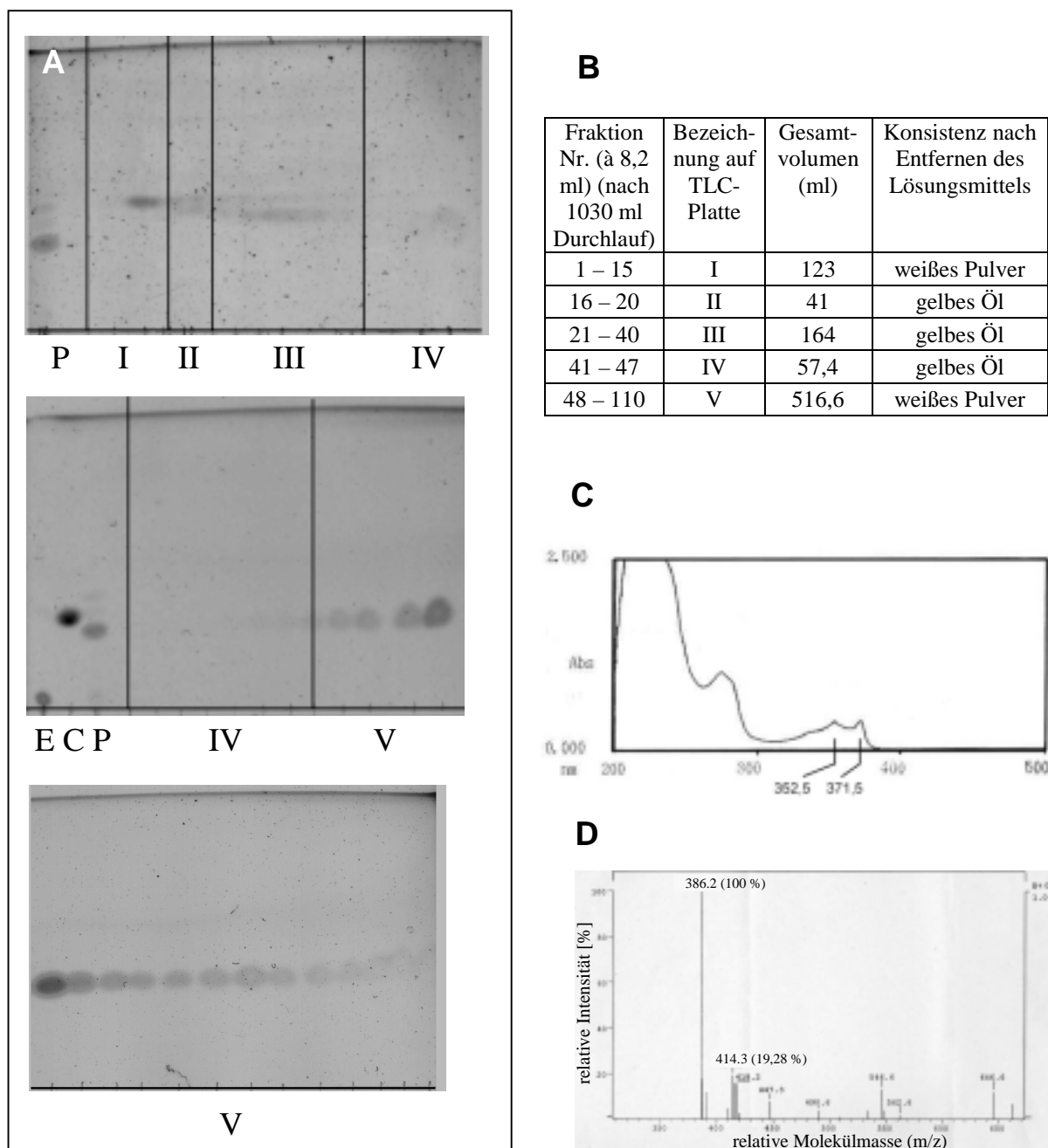
- eine Hydroxylgruppe an Position C3 in  $\beta$ -Konfiguration
- eine hydrophobe aliphatische Seitenkette ohne Modifikationen
- eine sehr kleine photoreaktive Gruppe (Diazogruppe) aus zwei Stickstoffatomen am C6
- eine kurze Halbwertszeit für eine proteinschonende Bestrahlung

Die Struktur-Funktionsanalyse hatte zudem gezeigt, dass die Position C6 des Cholesterins wahrscheinlich an der Wechselwirkung mit dem OT-Rezeptor beteiligt ist, da die Einführung einer Ketogruppe eine Reduktion der hochaffinen Ligandenbindung des OT-Rezeptors auf 23 % zur Folge hatte. Die Substitution dieser Ketogruppe durch eine hydrophobere Diazogruppe versprach somit ein funktionelles Cholesterinderivat mit den oben genannten Eigenschaften. Seine Struktur ist in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33: Strukturformel des photoreaktiven Cholesterinderivats 6,6-Azo-cholestan-3 $\beta$ -ol (6,6-Azocholestanol)**

Der Syntheseweg von 6,6-Azocholestanol ist auf S. 64 und in Abbildung 8 beschrieben. Abbildung 34 (A) zeigt die Dünnschichtchromatographien der Fraktionen bei der Aufreinigung des 6,6-Azocholestanols über eine Kieselgelsäule. Die ersten Produkte eluierten nach 1030 ml Lösungsmitteldurchfluss, also nach etwa zwei Säulenvolumina (510 ml). Die darauffolgenden Fraktionen (à 8,2 ml) wurden, wie in Abbildung 34 (B) dargestellt, zu größeren Fraktionen vereinigt. Die Lösungsmittel wurden durch einen Rotationsverdampfer und daran anschließende Vakuumzentrifugation entfernt. Jeweils 1 mg (pulverförmige Rückstände) bzw. 10  $\mu$ l (bei öligen Rückständen) wurde in 1 ml Diethylether aufgenommen und in einem Spektrophotometer bei Wellenlängen von 200 – 500 nm untersucht. Die vereinigten Fraktionen 48 – 110 ( $R_f$ -Wert = 0,37) zeigten das typische Absorptionsspektrum des Diazirins mit Maxima bei 352,5 und 371,5 nm [151]. Somit eluierte das gesuchte Produkt nach 1415 bis 1932 ml.



### Abbildung 34: Reinigung von 6,6-Azocholestanol über eine Kieselgelsäule nach der Synthese

Die Produkte der Synthese von 6,6-Azocholestanol (P) wurden über eine Kieselgel 60-Säule (32 cm lang,  $\varnothing = 4,5$  cm) mit Petrolether : Diethylether : Essigsäure = 80 : 20 : 2 als Laufmittel aufgetrennt. Fraktionen à 8,2 ml wurden gesammelt und dünnschichtchromatographisch untersucht (A). Folgende Fraktionen wurden auf die DC-Platte aufgetragen: I + II: jede 5. Fraktion, III: jede 3. Fraktion, IV: jede Fraktion, V: erste drei Auftragungspunkte: jede Fraktion, danach jede 5. Fraktion. Zum Vergleich wurden das Edukt der Synthese (6-Ketocholestanol = E) und Cholesterin (C) aufgetragen. Die ersten Produkte erschienen nach 1030 ml. Fraktionen wurden wie in der Tabelle angegeben vereinigt (B), das Laufmittel wurde entfernt und die Rückstände mit einem Photospektrometer bei 200 – 500 nm untersucht. (C) zeigt das Spektrum der vereinigten Fraktionen 48 – 110, die das 6,6-Azocholestanol enthielten. (D) Feld-Desorptions-Massenspektrum (Universität Mainz) von 6,6-Azocholestanol. Der Peak bei 414,3 entspricht der relativen Molekülmasse von 6,6-Azocholestanol, der Peak bei 386,2 entsteht durch Verlust von  $N_2$  bei der Ionisation von 6,6-Azocholestanol.

#### 4.5.2. Synthese von 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-3 $\beta$ -ol

Die Synthese des tritiierten 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-3 $\beta$ -ol ist auf S. 66 und in Abbildung 9 beschrieben. Auf dem Autoradiogramm der Dünnschichtchromatographie der Reaktionsprodukte (Abbildung 35) sind drei Banden sichtbar: 1) am Auftragungsort, 2) bei  $R_f = 0,6$  (6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-3 $\beta$ -ol) und 3) bei  $R_f = 0,74$  (6,6-Azo-cholestan-[3 $\beta$ -<sup>3</sup>H]-3 $\alpha$ -ol). Die Ausbeute an 6,6-Azo-cholestan-[3 $\beta$ -<sup>3</sup>H]-ol lag bei  $3,41 \cdot 10^8$  Bq (9,2 mCi) und somit bei 36,9 % bezogen auf die eingesetzte Radioaktivität. Abbildung 36 zeigt die Strukturformel von 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-3 $\beta$ -ol.



**Abbildung 35: Dünnschichtchromatographie der Reaktionsprodukte der Synthese von 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-3 $\beta$ -ol (Autoradiogramm)**

Die Reaktionsprodukte der Synthese von 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-3 $\beta$ -ol (Synthsevorschrift S. 66) wurden über eine analytische Kieselgelplatte (10 x 20 cm<sup>2</sup>, Schichtdicke = 0,25 mm) mit Hexan:Ethylacetat = 2:1 (v/v) als Laufmittel dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (S. 38). Zur Autoradiographie wurde die DC-Platte 15 min lang auf einen Hyperfilm-MP (Amersham) gelegt. Die Entwicklung des Films erfolgte nach Herstellerangaben.

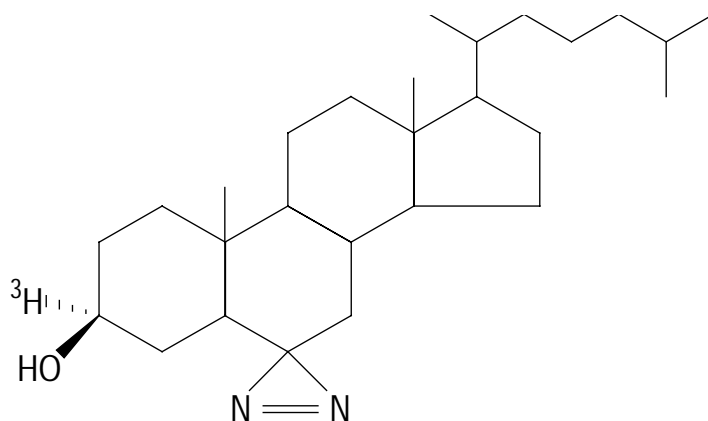


Abbildung 36: Strukturformel von 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-3 $\beta$ -ol

#### 4.5.3. Bestimmung der Halbwertszeit von 6,6-Azocholestanol bei $\lambda > 335$ nm

Um den OT-Rezeptor nicht länger als nötig der Strahlung der Quecksilberdampfampe auszusetzen, wurde zunächst die Halbwertszeit des 6,6-Azocholestanols bei Bestrahlung mit  $\lambda > 335$  nm bestimmt (Abbildung 37). Diese betrug lediglich 77 Sekunden, und nach 5 Minuten war das photoreaktive Cholesterinderivat komplett photolysiert. Somit sollten auch bei der Markierung von Membranen kurze Bestrahlungszeiten von weniger als 10 Minuten ausreichen, um Proteine kovalent mit [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol zu verknüpfen.

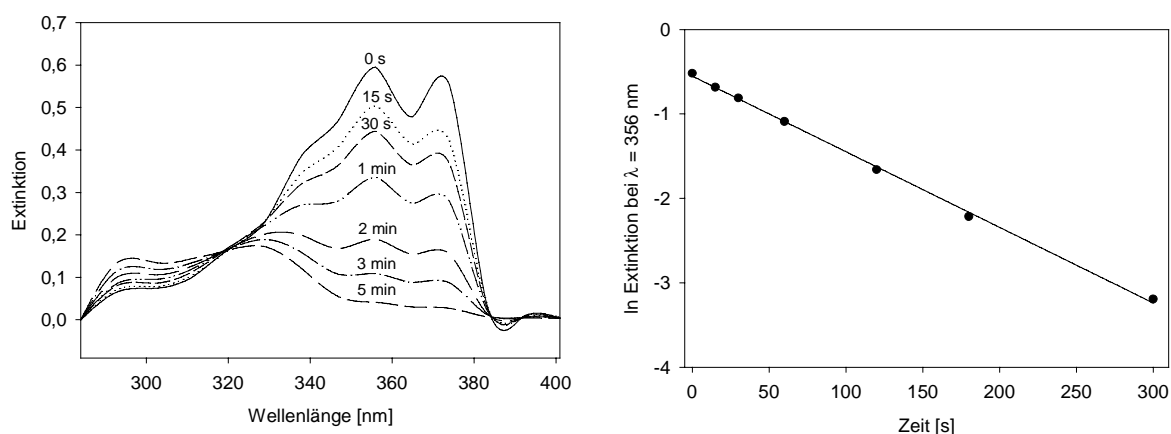


Abbildung 37: Photolyse von 6,6-Azocholestanol bei  $\lambda > 335$  nm

3 mg 6,6-Azocholestanol wurden in 1 ml Methanol gelöst und bei 4 °C und  $\lambda > 335$  nm bestrahlt. Nach verschiedenen Bestrahlungszeiten wurde das Absorptionsspektrum des 6,6-Azocholestanols zwischen 280 und 400 nm aufgenommen (linker Graph). Der natürliche Logarithmus der Extinktion des Peaks bei  $\lambda = 356$  nm wurde gegen die Bestrahlungszeit aufgetragen (rechter Graph). Über die Geradengleichung  $\ln E(t) = \ln E_0 - at$  konnte die Halbwertszeit zu  $t_{1/2} = 77$  s bestimmt werden. Hierbei waren  $E(t)$ : Extinktion zum Zeitpunkt  $t$ ,  $E_0$ : Extinktion bei  $t = 0$  und  $a = 0,009$ .

#### 4.5.4. Test von 6,6-Azocholestanol auf Herstellung der hochaffinen Ligandenbindung des Oxytocinrezeptors

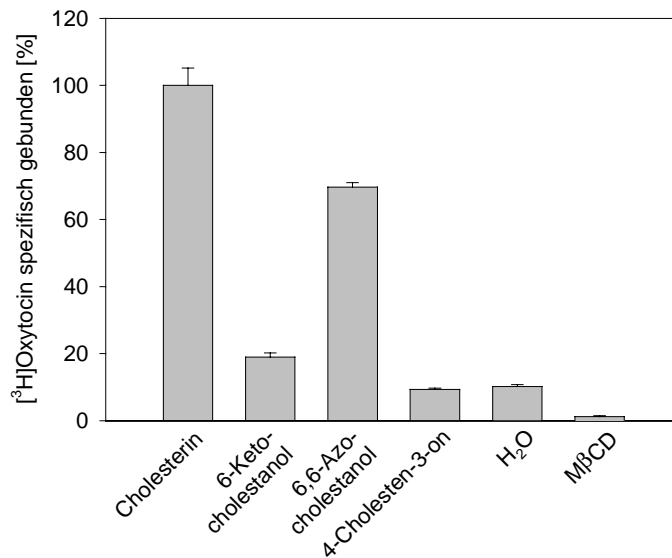
Bevor tritiiertes 6,6-Azo-cholestan-[3 $\alpha$ -<sup>3</sup>H]-3 $\beta$ -ol – im Folgenden kurz als [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol bezeichnet – hergestellt wurde, wurde nichttritiiertes 6,6-Azocholestanol auf seine Wirksamkeit getestet, die hochaffine Ligandenbindung des OT-Rezeptors wiederherzustellen. Dieser Test wurde zum einen an Cholesterin-abgereicherten HEK-OTRhis-Membranen und zum anderen an CHAPSO-Solubilisat unbehandelter HEK-OTRhis-Membranen durchgeführt. Der Test am Solubilisat sollte einen Einfluss von 6,6-Azocholestanol auf den OT-Rezeptor über die physikalischen Eigenschaften der Membran ausschließen.

##### Test an Cholesterin-abgereicherten HEK-OTRhis-Membranen

Cholesterin-abgereicherte HEK-OTRhis-Membranen (S. 63) wurden mit verschiedenen Steroiden mittel Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen wiederangereichert (S. 63) und für den [<sup>3</sup>H]OT-Bindungstest (S. 70) eingesetzt. Folgende Steroide wurden getestet:

- **Cholesterin:** natürlicher Interaktionspartner für OT-Rezeptor (Positivkontrolle)
- **6-Ketocholestanol:** Edukt für Synthese von 6,6-Azocholestanol
- **6,6-Azocholestanol:** photoreaktives Cholesterinderivat
- **4-Cholesten-3-on:** unwirksames Cholesterinderivat (Negativkontrolle)

Als zusätzliche Negativkontrollen dienten abgereicherte Membranen, die mit H<sub>2</sub>O bzw. M $\beta$ CD statt mit M $\beta$ CD/Steroid-Komplexen inkubiert wurden. Inkubation mit M $\beta$ CD statt mit Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen führt zu einer vollständigen Cholesterinabreicherung der Membranen und zu einem weiteren Absinken der spezifischen [<sup>3</sup>H]OT-Bindung. Die spezifische Bindung der Membranen, die mit Cholesterin wiederangereichert worden waren, wurde auf 100 % gesetzt (Positivkontrolle). Alle Steroide wurden vollständig in M $\beta$ CD eingebaut. 6,6-Azocholestanol zeigte 70 % der Wirksamkeit von Cholesterin und war somit deutlich wirksamer als 6-Ketocholestanol (19 %), das Edukt der Synthese von 6,6-Azocholestanol (Abbildung 38). Wie bereits erwähnt, ist die geringe Wirksamkeit von 6-Ketocholestanol ein Hinweis darauf, dass das Kohlenstoffatom C6 an der Wechselwirkung mit dem OT-Rezeptor beteiligt sein könnte. Da die Substitution der Keto-Gruppe durch die hydrophobere Diazogruppe die Wirksamkeit des Derivats stark erhöhte, stand nun ein photoreaktives Cholesterinderivat zur Verfügung, das für eine kovalente Verknüpfung mit dem OT-Rezeptor bestens geeignet sein sollte.



**Abbildung 38: Test von 6,6-Azocholestanol auf die Herstellung der hochaffinen Ligandenbindung des menschlichen Oxytocinrezeptors in HEK-OTRhis-Membranen**

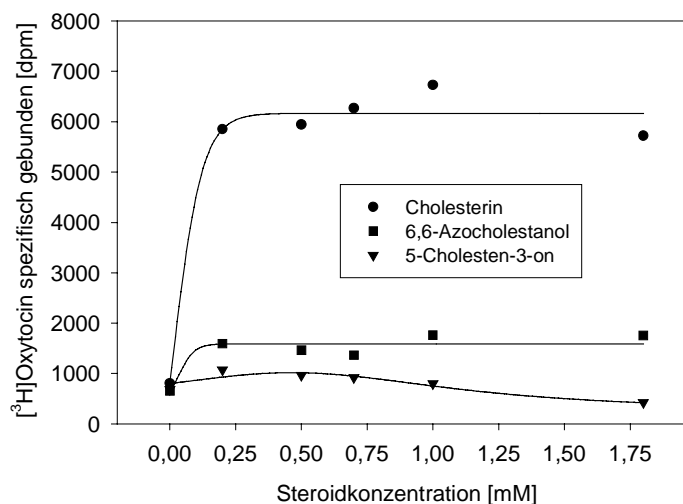
Versuchsdurchführung s. Text.

### Test an CHAPSO-Solubilisat von HEK-OTRhis-Membranen

In diesem Versuch wurde die Wirksamkeit von 6,6-Azocholestanol an solubilisiertem OT-Rezeptor getestet und eine Dosis-Wirkungskurve für Cholesterin und 6,6-Azocholestanol aufgenommen (Abbildung 39). Bei solubilisiertem OT-Rezeptor erreichte 6,6-Azocholestanol zwar nur noch 26 % der Wirksamkeit von Cholesterin (verglichen mit 70 % Wirksamkeit in Membranen, Abbildung 38), lag aber noch deutlich über der Negativkontrolle, bei der 5-Cholesten-3-on verwendet worden war (16 %). Bei der Negativkontrolle stieg die spezifische Bindung mit steigender Steroidkonzentration zunächst leicht an, um am Ende unter den Ausgangswert (0 mM 5-Cholesten-3-on) abzusinken. Es ist möglich, dass CHAPSO zunächst vom OT-Rezeptor abdissoziierte und sich in das Cyclodextrin einlagerte. CHAPSO solubilisiert zwar den OT-Rezeptor funktionell, stört aber dennoch dessen Ligandenbindung (nicht gezeigt). Daher würde die Abdissoziation vom OT-Rezeptor zunächst zu einer verbesserten Ligandenbindung führen, solange keine Präzipitierung des Rezeptors eintritt. Mit steigender 5-Cholesten-3-on-Konzentration wurde dieses unwirksame Steroid wahrscheinlich gegen noch am OT-Rezeptor befindliches Cholesterin ausgetauscht, so dass die Ligandenbindung absank (s. auch S. 119).

Die EC<sub>50</sub>-Werte für Cholesterin und 6,6-Azocholestanol lagen im mikromolaren Bereich, und zwar bei 55 μM für Cholesterin und 15 μM für 6,6-Azocholestanol. Diese im

Vergleich zu Hormon-Rezeptor-Wechselwirkungen niederaffine Bindung wird in der Plasmamembran durch das hohe Verhältnis von Cholesterin zu Proteinen (200 – 300  $\mu\text{g}$  Cholesterin pro mg Protein) und durch die auf eine Ebene beschränkte Diffusion von Cholesterin und dem OT-Rezeptor ausgeglichen.



**Abbildung 39: Test von 6,6-Azocholestanol auf die Herstellung der hochaffinen Ligandenbindung des solubilisierten menschlichen Oxytocinrezeptors**

1:20 verdünntes CHAPSO-Solubilisat wurde mit steigenden Mengen an Cholesterin (Positivkontrolle), 5-Cholesten-3-on (Negativkontrolle) bzw. 6,6-Azocholestanol in Form von Steroid/M $\beta$ CD-Komplexen drei Stunden auf Eis inkubiert (Puffer: 0,2 % CHAPSO, 20 mM HEPES (pH = 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 10 % Glycerin, 0,005 mM Cholesterin/M $\beta$ CD, 0 – 1,8 mM Steroid/M $\beta$ CD). Die spezifische [<sup>3</sup>H]OT-Bindung wurde wie auf S. 71 beschrieben gemessen.

## 4.6. Versuche zur Photoaffinitätsmarkierung des menschlichen Oxytocinrezeptors mit [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol

### 4.6.1. Photoaffinitätsmarkierung von HEK-OTRhis-Membranen

1 mg Cholesterin-abgereicherte HEK-OTRhis- bzw. HEK293-Membranen (Kontrolle) wurden mit 2,1  $\mu\text{g}$  [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol (100  $\mu\text{Ci}$ , 0,3 mM-Stammlösung in M $\beta$ CD) inkubiert. [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol, das nicht in die Membran eingebaut hatte, wurde durch Abzentrifugieren der Membranen und Waschen des Pellets mit Bindungspuffer entfernt. Anschließend wurden die Membranen bei 4 °C für 5 min bestrahlt. Bei der Bestrahlung wird [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol wahrscheinlich nicht nur mit Proteinen kovalent verknüpft, sondern auch mit Phospholipiden (vor allem Sphingomyelin) und Glycosphingolipiden, da es vermutlich – ebenso wie Cholesterin – über seine polare 3 $\beta$ -OH-Gruppe mit dem Carbonylsauerstoffatom von Phospholipidkopfgruppen wechselwirkt (diskutiert in [39]) und sich in cholesterinreiche Mikrodomänen der Plasmamembran einlagert [152]. Durch

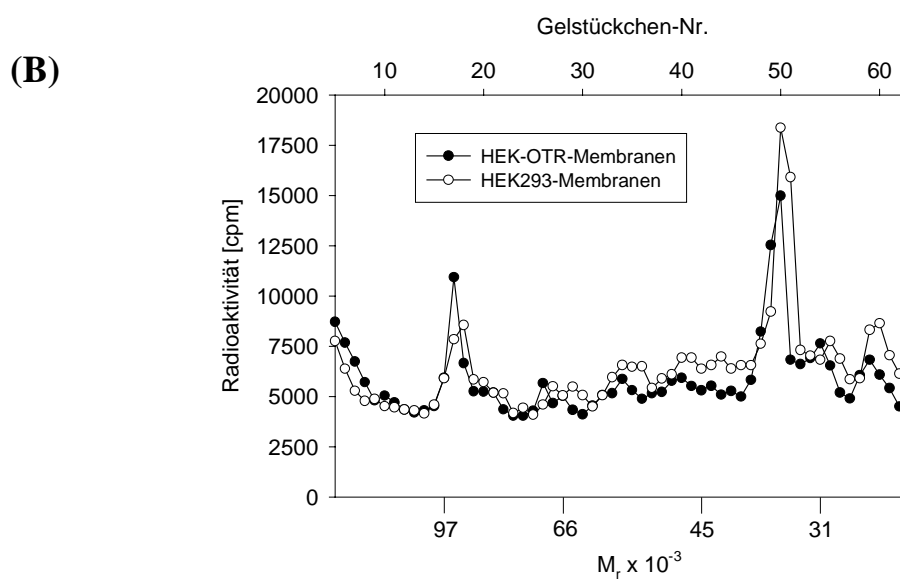
eine Proteinfällung nach der Bestrahlung wurden markierte Phospholipide sowie überschüssiges [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol entfernt. Die gefällten Proteine wurden in Probenpuffer aufgenommen und über Röhrengelle aufgetrennt. Die Radioaktivität wurde durch Szintillationszählung bestimmt.

Wie Abbildung 40 zeigt, waren die Ergebnisse für die HEK-OTRhis- und die HEK293-Membranen leider nahezu identisch, d. h. es konnte kein für die HEK-OTRhis-Membranen spezifischer Peak detektiert werden. Dies bedeutet jedoch nicht, dass der OT-Rezeptor nicht markiert worden wäre. Aufgrund nachfolgender Überlegungen ist es vielmehr wahrscheinlich, dass das Signal des markierten OT-Rezeptors durch die Vielzahl an ebenfalls durch [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol markierten Proteine überdeckt wurde. Pro Ansatz wurden Membranen mit 1 mg Protein verwendet, da dies die maximale Proteinmenge ist, die durch ein Röhrengel aufgetrennt werden kann. Die verwendeten HEK-OTRhis-Membranen enthielten 17 pmol humanen OT-Rezeptor pro mg Membranprotein, also in etwa  $1 \times 10^{13}$  OT-Rezeptormoleküle pro Ansatz. Würde bei einer 100 %igen Markierungsausbeute jeder dieser Rezeptoren mit einem Molekül [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol interagieren, so wären das 7 ng [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol, die kovalent binden würden. Diese Menge entspricht 740000 Zerfällen pro Minute (dpm) bzw. 280000 Zählereignissen pro Minute (cpm) bei der Radioaktivitätsbestimmung. Da eine spezifische Markierungsausbeute von 0,1 bis 1 % realistisch ist [122], erhält man etwa 280 bis 2800 cpm für den OT-Rezeptor, bzw. entsprechend mehr, falls es tatsächlich mehrere Cholesterinbindungsstellen am Rezeptor gibt (Diskussion zu Abbildung 29). Somit ist es wahrscheinlich, dass der Radioaktivitätspeak des OT-Rezeptors nicht detektiert wurde, da in den HEK-OTRhis-Membranen die Rezeptormenge im Vergleich mit anderen Proteinen, die spezifisch oder auch unspezifisch mit Cholesterin interagieren, offenbar zu gering war, um eine Markierung des OT-Rezeptors erkennen zu lassen. Daher musste tatsächlich – wie schon zu Beginn der Arbeit vermutet – auf jeden Fall entweder vor oder nach der Photoaffinitätsmarkierung eine Anreicherung des OT-Rezeptors durchgeführt werden.

Ermutigend war die Tatsache, dass sich immerhin 42 % des eingesetzten [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanols in die Membranen eingelagert hatten, d. h. nicht mehr durch Waschen entfernt werden konnten (Tabelle in Abbildung 40). Davon markierten 45,8 % (19,2 % des totalen eingesetzten [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanols) Proteine, waren also nicht durch eine Proteinfällung entfernbar. Besonders stark markiert wurden zwei Proteine mit einer relativen Molekülmasse von 90000 bzw. 35000.

(A)

Eingesetzte Aktivität pro Ansatz	$2,22 \cdot 10^8$ dpm	100 %	
Aktivität in Überständen nach Zentrifugation und Waschen der angereicherten Membranen	$1,29 \cdot 10^8$ dpm	58 %	42 % des [ $^3\text{H}$ ]6,6-Azocholestanols bauten in die Membran ein
Aktivität in Überständen der Proteinfällung	$0,51 \cdot 10^8$ dpm	22,8 %	19,2 % des [ $^3\text{H}$ ]6,6-Azocholestanols markierten Proteine



**Abbildung 40: Photoaffinitätsmarkierung von HEK-OTRhis-Membranen mit [ $^3\text{H}$ ]6,6-Azocholestanol mit anschließender Proteinfällung**

Je 1 mg Cholesterin-abgereicherte HEK-OTRhis bzw. HEK293-Membranen (Negativkontrolle) wurden mit  $100 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]6,6-Azocholestanol inkubiert und bei  $4^\circ\text{C}$  bestrahlt. Anschließend wurden die Membranen abzentrifugiert und gewaschen, um [ $^3\text{H}$ ]6,6-Azocholestanol zu entfernen, das nicht in die Membranen eingebaut hatte. Danach wurde eine Proteinfällung durchgeführt, um überschüssiges [ $^3\text{H}$ ]6,6-Azocholestanol und markierte Phospholipide zu entfernen (S. 35). Die Proteine wurden über Röhrengelge aufgetrennt, die Radioaktivität wurde durch Szintillationszählung bestimmt. (A) Anteile des eingesetzten [ $^3\text{H}$ ]6,6-Azocholestanols, die in Membranen eingebaut und dort Proteine markiert hatten. (B) Radioaktivitätsmuster nach Auftrennen der Proteine durch ein SDS-Polyacrylamid-Röhrengel (S. 39 und S. 68).

#### 4.6.2. Photoaffinitätsmarkierung von HEK-OTRhis-Membranen und anschließende denaturierende Reinigung des Oxytocinrezeptors über Ni-NTA-Agarose

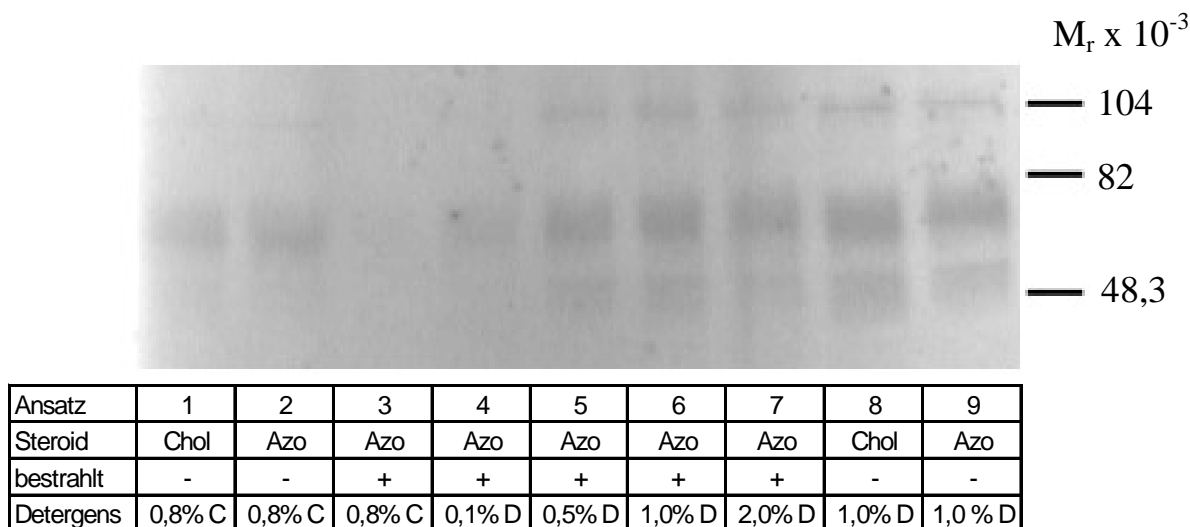
Mittels Ni-NTA-Agarose hatte der native OT-Rezeptor bei einer Ausbeute von 10,5 % maximal 6,6fach angereichert werden können (Abbildung 22). Da bei dieser Chromatographie leider nur knapp 40 % des Rezeptors an die Säule gebunden hatten, war nun geplant, den OT-Rezeptor in Membranen mit [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol zu markieren und anschließend unter denaturierenden Bedingungen zu reinigen. Es bestand hierbei die Hoffnung, dass unter denaturierenden Bedingungen, also unter Verwendung von 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidin-Hydrochlorid, das His<sub>10</sub>-tag besser exponiert wäre und somit leichter an die Matrix binden könnte.

#### Solubilisierung photoaffinitätsmarkierter Membranen

In einem Vorversuch wurden die Detergenzien DβM und CHAPSO auf ihre Effizienz getestet, den photoaffinitätsmarkierten OT-Rezeptor zu solubilisieren. Das mit der Ni-NTA-Matrix kompatible DβM vermindert/zerstört zwar die Ligandenbindung des OT-Rezeptors irreversibel (S. 90), kann aber verwendet werden, da der OT-Rezeptor bei der denaturierenden Reinigung sowieso seine Ligandenbindung verliert. Cholesterin-abgereicherte HEK-OTRhis-Membranen wurden entweder mit 6,6-Azocholestanol/MβCD- oder mit Cholesterin/MβCD-Komplexen inkubiert (S. 63) und nach folgendem Schema bestrahlt und solubilisiert (Methode: S. 55 mit folgenden Puffern):

Ansatz	Steroid	bestrahlt (5 min, 30 °C)	Detergens (in 20 mM HEPES (pH = 7,4) und 300 mM NaCl)
1	Cholesterin	–	0,8 % CHAPSO
2	6,6-Azocholestanol	–	0,8 % CHAPSO
3	6,6-Azocholestanol	+	0,8 % CHAPSO
4	6,6-Azocholestanol	+	0,1 % DβM
5	6,6-Azocholestanol	+	0,5 % DβM
6	6,6-Azocholestanol	+	1,0 % DβM
7	6,6-Azocholestanol	+	2,0 % DβM
8	Cholesterin	–	1,0 % DβM
9	6,6-Azocholestanol	–	1,0 % DβM

Der solubilisierter OT-Rezeptor wurde immunochemisch über einen Western-Blot (anti-c-myc-Antikörper) nachgewiesen:



**Abbildung 41: Vergleich der Solubilisierung des bestrahlten bzw. nichtbestrahlten menschlichen Oxytocinrezeptors mit CHAPSO und Dodecylmaltosid im Western-Blot**

Cholesterin-abgereicherte HEK-OTRhis-Membranen wurden mit Cholesterin (Chol) bzw. 6,6-Azocholestanol (Azo) wiederangereichert und bestrahlt (Ansätze 3 – 7). Die Ansätze 1 – 3 wurden mit 0,8 % CHAPSO (C), die Ansätze 4 – 9 mit D $\beta$ M (D) in den angegebenen Konzentrationen solubilisiert. Pro Ansatz wurden 5  $\mu$ l Solubilisat für einen Western-Blot gefällt (S. 35). Erstantikörper: anti-c-myc Hybridomaüberstand 9E10; Zweitantikörper: peroxidasegekoppelter anti-Maus-Antikörper; Nachweissystem: ECL (Amersham) (S. 40).

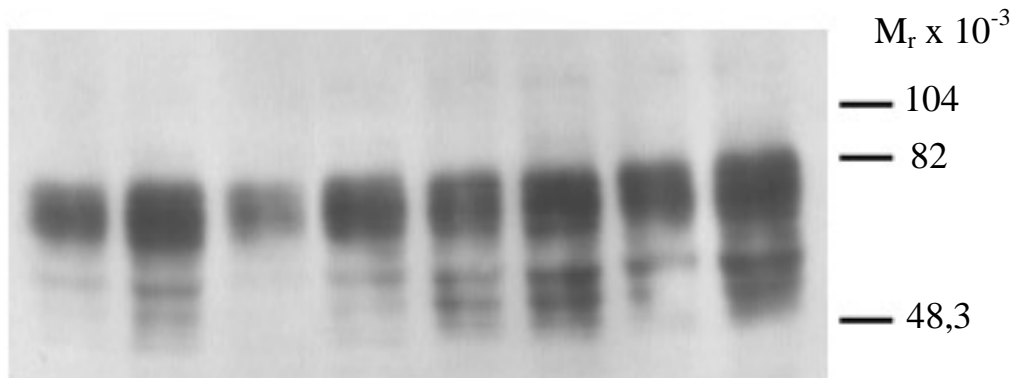
Betrachtet man die D $\beta$ M-Konzentrationsreihe (Ansätze 4 – 7), so erkennt man, dass 1,0 % D $\beta$ M zur maximalen Solubilisierung des OT-Rezeptors ausreichen. 1,0 % D $\beta$ M solubilisiert größere Mengen an OT-Rezeptor als 0,8 % CHAPSO (vgl. Ansätze 1 und 8). Interessant ist der Befund, dass aus Membranen, die mit 6,6-Azocholestanol angereichert worden waren, *nach* der Bestrahlung das Detergens CHAPSO kaum noch OT-Rezeptor solubilisieren konnte (vgl. Ansatz 3 mit Ansatz 2), wohingegen D $\beta$ M aus solchen Membranen nur geringfügig weniger OT-Rezeptor solubilisierter als aus unbestrahlten Membranen (vgl. Ansatz 6 mit Ansatz 9). Eine Zerstörung des OT-Rezeptors in einzelne niedermolekulare Bruchstücke durch die Bestrahlung als Erklärung für die geringe Menge an nachweisbarem OT-Rezeptor im CHAPSO-Solubilisat ist somit unwahrscheinlich.

Aus diesem unerwarteten Ergebnis lässt sich folgende Hypothese ableiten: Durch die Bestrahlung wird das 6,6-Azocholestanol so mit dem OT-Rezeptor verknüpft, dass Bindungsstellen für das cholesterinähnliche Gallensäurederivat CHAPSO besetzt sind und der OT-Rezeptor wesentlich schlechter solubilisierter werden kann. Alternativ hierzu könnte durch die Bestrahlung – ohne dass es zu einer kovalenten Verknüpfung mit 6,6-

Azocholestanol gekommen wäre – die Konformation des Rezeptors so verändert werden, dass er nur noch durch D $\beta$ M solubilisierbar ist. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden in einem zusätzlichen Versuch auch mit Cholesterin wiederangereicherte Membranen bestrahlt und mit CHAPSO bzw. D $\beta$ M solubilisiert:

Ansatz	Steroid	bestrahlt (10 min)	Detergens
1	Cholesterin	+	0,8 % CHAPSO
2	Cholesterin	-	
3	6,6-Azocholestanol	+	
4	6,6-Azocholestanol	-	
5	Cholesterin	+	1 % D $\beta$ M
6	Cholesterin	-	
7	6,6-Azocholestanol	+	
8	6,6-Azocholestanol	-	

Wie im vorherigen Versuch wurde der solubilierte OT-Rezeptor durch einen Western-Blot nachgewiesen:



Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
Steroid	Chol	Chol	Azo	Azo	Chol	Chol	Azo	Azo
bestrahlt	+	-	+	-	+	-	+	-
Detergens	0,8% C	0,8% C	0,8% C	0,8% C	1,0 % D	1,0 % D	1,0 % D	1,0 % D

**Abbildung 42: Einfluss der Photoaffinitätsmarkierung des menschlichen Oxytocinrezeptors auf die Solubilisierung mit CHAPSO bzw. Dodecylmaltosid**

Cholesterin-abgereicherte HEK-OTRhis-Membranen wurden mit Cholesterin (Chol) bzw. 6,6-Azocholestanol (Azo) wiederangereichert und teilweise bestrahlt. Anschließend wurden die Ansätze mit 0,8 % CHAPSO (C) bzw. mit 1,0 % D $\beta$ M (D) solubilisiert. Weitere Durchführung: s. Abbildung 41.

Vergleicht man die Ansätze 5 und 7 mit den Ansätzen 6 und 8, so erkennt man, dass die Bestrahlung die Menge an OT-Rezeptor im Solubilisat auch bei Verwendung von D $\beta$ M als Detergens verringert. Bei diesem Detergens wird jedoch bei den Membranen, die mit 6,6-Azocholestanol angereichert worden waren, ebenso viel OT-Rezeptor solubilisiert wie bei Cholesterin-angereicherten Membranen. Bei Solubilisierung mit CHAPSO ist die Menge an OT-Rezeptor im Solubilisat bei den bestrahlten Ansätzen ebenfalls schwächer, aber die Bestrahlung alleine verhindert nicht generell die Solubilisierung mit CHAPSO (Ansatz 1). Wurden die Membranen jedoch mit 6,6-Azocholestanol angereichert, bestrahlt und mit CHAPSO solubilisiert, so konnte im Solubilisat deutlich weniger OT-Rezeptor nachgewiesen werden als bei Cholesterin-angereicherten Membranen (vgl. Ansatz 3 mit Ansatz 1).

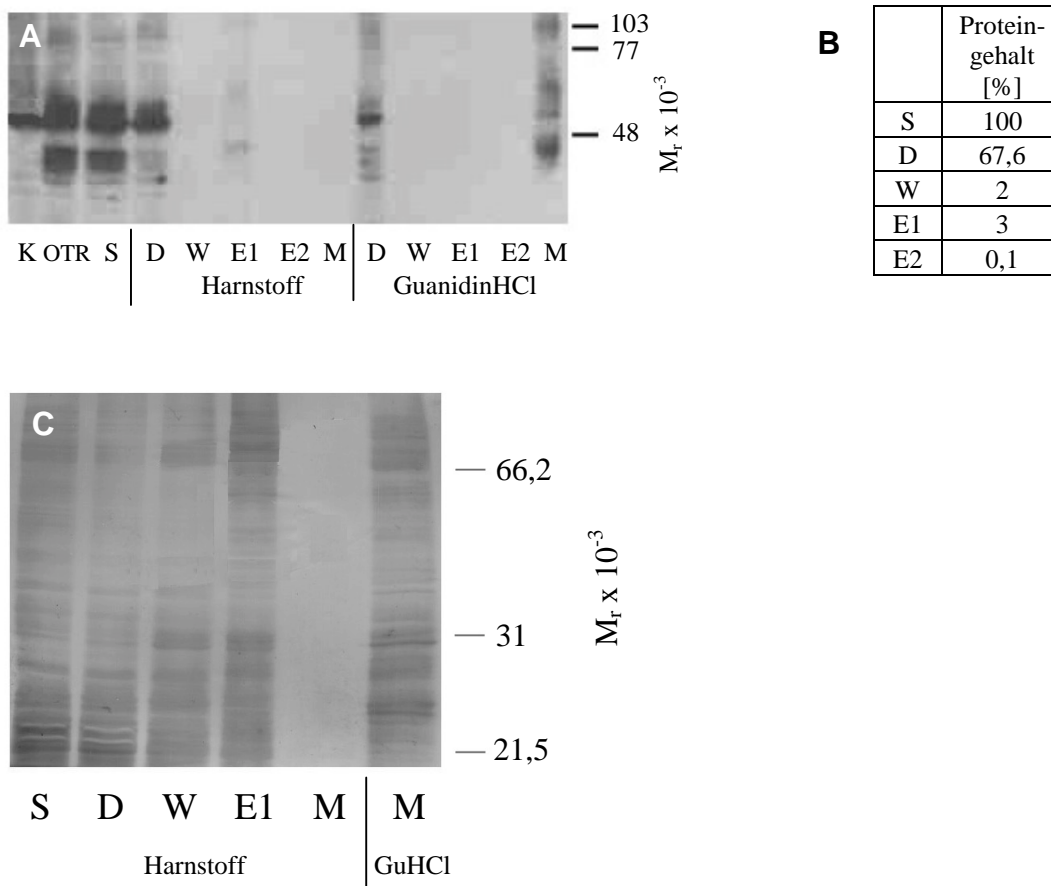
Diese Solubilisierungsversuche sprechen tatsächlich dafür, dass der OT-Rezeptor mit 6,6-Azocholestanol markiert wurde und dass durch die Markierung Bindungsstellen für das cholesterinähnliche Gallensäurederivat CHAPSO besetzt werden, so dass weniger OT-Rezeptor solubilisiert werden kann.

#### Denaturierende Reinigung über Ni-NTA-Agarose

Die Methode der denaturierenden Reinigung mit Solubilisat photoaffinitätsmarkierter HEK-OTRhis- bzw. HEK293-Membranen ist auf S. 55 und S. 58 beschrieben bzw. in der Legende zur Abbildung 43 zusammengefasst. Der Nachweis des OT-Rezeptors über einen Western-Blot zeigt, dass bei dem Reinigungsversuch mit Guanidinhydrochlorid als denaturierendem Agens viel Rezeptor auf der Matrix hängen geblieben war (Abbildung 43 (A)). Da er selbst durch das Ni<sup>2+</sup>-komplexierende EDTA nicht eluiert werden konnte, war eine Präzipitierung wahrscheinlich. Bei der Verwendung von Harnstoff hingegen band nur wenig OT-Rezeptor an die Ni-NTA-Agarose, konnte jedoch durch die Erniedrigung des pH-Wertes (pH = 4,5) eluiert werden. Die Ausbeute war allerdings sehr gering und dürfte unter 5 % liegen. Bei der Proteinbestimmung stellte sich heraus, dass sich trotz der vom Hersteller empfohlenen Waschung bei pH = 6,5 kaum (2 %) der Proteine von der Matrix gelöst hatten (Abbildung 43 (B)). Bei der darauffolgenden Erniedrigung des pH-Wertes auf 4,5 eluierten daher zusammen mit den 5 % OT-Rezeptor auch 3 % der Proteine, so dass sich ein Anreicherungsfaktor von lediglich 1,7 ergab. Generell konnten etwa 27 % der Proteine nicht detektiert werden. Es ist möglich, dass sich die fehlenden Proteine noch auf der Matrix befanden oder dass der Harnstoff durch die Proteinfällung nicht vollständig

entfernt worden war und in der Proteinbestimmung störte. Zusätzlich wurden die Fraktionen des „Harnstoffversuchs“ und die Matrices beider Versuche durch ein Silbergel untersucht (Abbildung 43 (C)).

Das Silbergel bestätigte die hohen Mengen an kontaminierenden Proteinen im ersten Eluat des „Harnstoffversuchs“. Die „Harnstoff-Matrix“ enthielt keine Proteine mehr, wohingegen sich auf der „Guanidinhydrochlorid-Matrix“ noch etwa 5 – 10 µg Proteine befanden. Nach Abschätzungen der Signale des Western-Blots und des Silbergels ergibt sich im günstigsten Fall eine zweifache Anreicherung des OT-Rezeptors auf der „Guanidinhydrochlorid-Matrix“. Es war somit wenig aussichtsreich, den Versuch mit tritiiertem [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol zu wiederholen und die „Guanidinhydrochlorid-Matrix“ selbst auf ein Röhrchengel aufzutragen.



**Abbildung 43: Chromatographie des Oxytocinrezeptors an Ni-NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen nach Markierung von HEK-OTRhis-Membranen mit [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol**

Cholesterin-abgereicherte HEK-OTRhis-Membranen wurden mit 6,6-Azocholestanol/M $\beta$ CD inkubiert (30 °C, 30 min), bestrahlt (30 °C, 5 min) und anschließend mit D $\beta$ M solubilisiert (30 min bei RT, Puffer: 1,0 % D $\beta$ M, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 8,0), 10 mM Tris/HCl (pH = 8,0), 300 mM NaCl, 1 mM Imidazol,

Zentrifugation: 18 °C, 60 min, 100.000 x g). Nach der Denaturierung der Proteine durch 6 M Guanidinhydrochlorid (GuHCl) bzw. 8 M Harnstoff wurde das Solubilisat mit Ni-NTA-Agarose inkubiert (60 min, RT). Die Matrix wurde mit leicht saurem Puffer gewaschen (pH = 6,5) und zuerst bei pH = 4,5 und zuletzt mit 100 mM EDTA eluiert (pH = 7,4). Die Fraktionen waren wie folgt: S = Solubilisat, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, E1 = Eluat (pH = 4,5), E2 = Eluat (100 mM EDTA). **(A)** Western-Blot: 1. Antikörper: anti-c-myc 9E10 Hybridomaüberstand, 2. Antikörper: peroxidasegekoppelter anti-Maus-Antikörper, Nachweissystem: ECL (Amersham) (S. 40). Pro Spur wurde ein Probenvolumen gefällt und aufgetragen, das 15 µl unverdünntem Solubilisat entsprach (S. 35). K = Kontrolle (75 µg HEK293-Membranen), OTR = 75 µg HEK-OTRhis-Membranen, M = 10 µl Matrix in Probenpuffer. **(B)** Proteingehalt der einzelnen Fraktionen des „Harnstoffversuchs“ (S. 36), **(C)** Silbergel des „Harnstoffversuchs“ und der „Guanidinhydrochloridmatrix“ (S. 40). Pro Spur wurden 10 µg Protein (S – E1) bzw. 1/12 der Matrix (= 10 µl) aufgetragen.

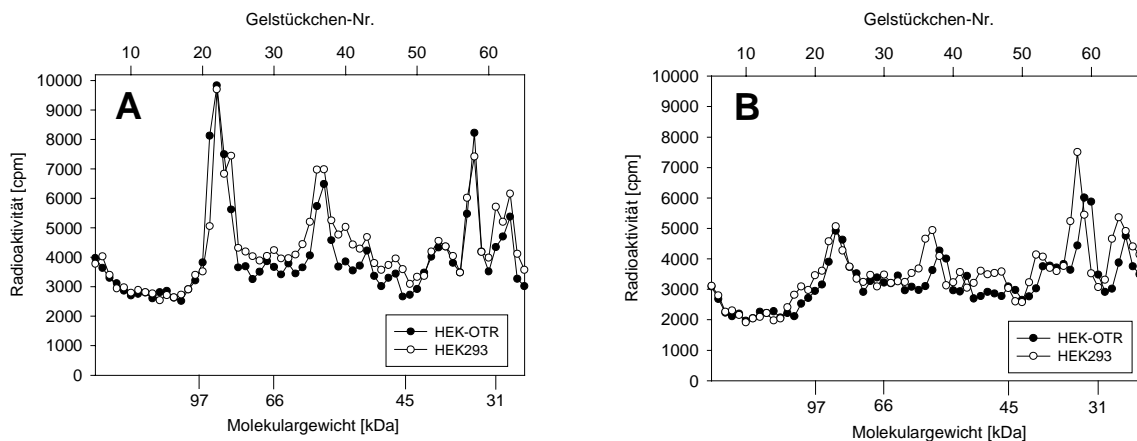
### 4.6.3. Photoaffinitätsmarkierung von WGA-Eluat

In biologischen Membranen ist die Bewegung von Transmembranproteinen und Lipiden auf eine Ebene eingeschränkt, so dass [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol auch zufällig auf ein Protein treffen und dieses unspezifisch markieren könnte. Bei solubilisierten Proteinen hingegen sollte die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Markierung geringer sein. In Vorversuchen war CHAPSO-Solubilisat unter die kritische Mizellenkonzentration (CMC) von CHAPSO verdünnt und mit [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol markiert worden. Durch die Verdünnung sollten zum einen CHAPSO-Mizellen aufgelöst werden, die ja ebenfalls eine zweidimensionale, wenn auch unilamellare Membran (Mizelle) bilden und zum anderen die Cholesterinkonzentration reduziert werden, da Cholesterin mit dem [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol um Bindungsstellen konkurriert. In diesen Versuchen wurde das Protein bei 90 kDa etwas stärker im CHAPSO-Solubilisat markiert als in Membranen, wohingegen das Protein mit der relativen Molekülmasse von 35000 im Solubilisat wesentlich schlechter markiert wurde (nicht gezeigt). Diese Reduktion kann entweder durch eine verminderte Interaktion dieses Proteins mit [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol im Solubilisat oder durch eine geringere Solubilisierungsausbeute im Vergleich zu den anderen Proteinen erklärt werden. Leider waren auch bei diesen Versuchen die Radioaktivitätsmuster der HEK-OTRhis- und der HEK293-Membranen identisch.

In weiteren Versuchen wurden 950 µl der vereinigten Eluatfraktionen der WGA-Chromatographie (Abbildung 24) mit 150 µCi [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol markiert (Durchführung: s. Legende in Abbildung 44). Die Menge an *hochaffinem* OT-Rezeptor in 950 µl Eluat entsprach derjenigen von etwa 160 µg Membranen. In einem zweiten Ansatz wurde zusätzlich ein 80facher Überschuss an nichttritiertem 6,6-Azocholestanol eingesetzt. Hierdurch sollte die Markierung von Proteinen verhindert werden, die unspezifisch und niederaffin mit [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol wechselwirken. Solche

Verdrängungsexperimente waren bereits von Taylor *et al.* bei der Photoaffinitätsmarkierung eines Oxysterolrezeptors mit 7,7-Azo-cholestan-3 $\beta$ ,25-diol erfolgreich durchgeführt worden [153].

Durch die WGA-Chromatographie wurde ein Protein mit einer relativen Molekülmasse von 61000 im Vergleich zum Solubilisat angereichert (nicht gezeigt). Wie bei den vorherigen Versuchen konnte kein OT-Rezeptor-spezifischer Peak detektiert werden. Durch einen Überschuss an nichttritiertem 6,6-Azocholestanol konnte die Markierung der Proteine bei 35 und 61 kDa um 30 % und die des Proteins bei 90 kDa um 50 % verringert werden (Abbildung 44 (B)). Um welche Proteine es sich hierbei handelt und ob diese tatsächlich spezifisch mit Cholesterin interagieren, müsste durch weitere Versuche geklärt werden.



**Abbildung 44: Photoaffinitätsmarkierung von WGA-Eluat mit [ $^3\text{H}$ ]6,6-Azocholestanol (-/+ 80facher Überschuss an nichttritiertem 6,6-Azocholestanol)**

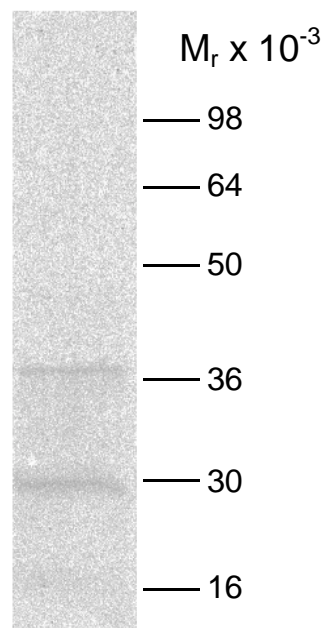
(A) Je 950  $\mu\text{l}$  WGA-Eluat (Abbildung 24) von HEK-OTRhis- und HEK293-CHAPSO-Solubilisat wurde mit 6,5  $\mu\text{M}$  (150  $\mu\text{Ci}$ ) [ $^3\text{H}$ ]6,6-Azocholestanol inkubiert (15 min, 30  $^{\circ}\text{C}$ ). (B): wie (A), jedoch wurden zusätzlich 510  $\mu\text{M}$  nichttritiertes 6,6-Azocholestanol (80facher Überschuss) eingesetzt. Die kurze Inkubationszeit wurde gewählt, um eine mögliche Denaturierung des OT-Rezeptors bei 30  $^{\circ}\text{C}$  gering zu halten. Alle Proben wurden 5 min lang bei 4  $^{\circ}\text{C}$  bestrahlt (S. 68). Weitere Versuchsdurchführung: s. Legende zu Abbildung 40.

#### 4.6.4. Photoaffinitätsmarkierung von in *E. coli* überexprimiertem, gereinigtem und rekonstituiertem Oxytocinrezeptor

Dr. H. Kiefer (Universität Hohenheim) stellte mir für diesen Versuch gereinigten, jedoch unfunktionellen menschlichen OT-Rezeptor zur Verfügung. Dieser war in *E. coli* überexprimiert, aus Einschlusskörpern solubilisiert, über ein Hexahistidin-tag an einer Ni-NTA-Säule gereinigt und in Liposomen rekonstituiert worden. Die Homogenität des gereinigten Rezeptors wurde durch ein Proteingel bestätigt (nicht gezeigt). Das Protokoll

entspricht laut Dr. Kiefer demjenigen zur Reinigung eines olfaktorischen Rezeptors (mit Modifikationen) [141].

Tatsächlich konnte mit dem in Abbildung 45 beschriebenen Protokoll ein Protein markiert werden, dessen relative Molekülmasse in etwa derjenigen des OT-Rezeptors entspricht, während die Bande bei etwa 30 kDa wahrscheinlich ein Degradationsprodukt des Rezeptors darstellt. Die Spezifität der Markierung muss in weiteren Experimenten jedoch noch überprüft werden.



**Abbildung 45: Markierung des gereinigten menschlichen Oxytocinrezeptors mit [ $^3\text{H}$ ]6,6-Azocholestanol**

In *E. coli* überexprimierter, gereinigter und rekonstituierter humaner OT-Rezeptor (20  $\mu\text{g}$ ) wurde mit 1  $\mu\text{g}$  (50  $\mu\text{Ci}$ ) [ $^3\text{H}$ ]6,6-Azocholestanol (8  $\mu\text{l}$  einer 0,3 mM [ $^3\text{H}$ ]6,6-Azocholestanol/ $M\beta\text{CD}$ -Stammlösung) bei 37  $^\circ\text{C}$  für 30 min inkubiert und bei 4  $^\circ\text{C}$  für 5 min bestrahlt ( $\lambda > 335$  nm). Die Proteoliposomen mit dem rekonstituierten OT-Rezeptor bestanden aus 69 % Phosphatidylcholin, 29 % Cholesterin und 2 % Protein (w/w). Die Proteine wurden gefällt (S. 35), in Probenpuffer aufgenommen und über ein SDS-PAGE-Minigel aufgetrennt (S. 39). Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Analyse des Versuchs über einen Phosphorimager (S. 69).

#### 4.6.5. Zusammenfassung und Diskussion

Basierend auf einer Struktur-Funktionsanalyse, in der die für die hochaffine Ligandenbindung des OT-Rezeptors wichtigen Merkmale von Cholesterin erkannt worden waren, konnte ein funktionelles photoreaktives Cholesterinderivat synthetisiert und tritiert werden. Markierungsversuche an Membranen, Solubilisaten und Eluat der WGA-Chromatographie zeigten die Notwendigkeit einer starken Anreicherung des Rezeptors vor

oder nach der Markierung, da die Menge des markierten Rezeptors zu gering war, und das Signal des markierten Rezeptors von ebenfalls markierten Proteinen verdeckt wurde. Da eine native Reinigung des hochaffinen OT-Rezeptors über die Anti-FLAG<sup>®</sup> M1-Matrix bzw. über Metallchelate-Affinitätschromatographie nicht erfolgreich war, wurde eine denaturierende Reinigung von bereits markiertem Rezeptor durch Metallchelate-Affinitätschromatographie versucht. Diese scheiterte jedoch daran, dass der OT-Rezeptor entweder kaum an die Ni-NTA-Matrix gebunden hatte oder auf der Matrix präzipitierte. Interessant waren die in diesem Zusammenhang durchgeführten Solubilisierungsversuche mit bereits markiertem Rezeptor, die indirekt zeigten, dass der OT-Rezeptor tatsächlich durch 6,6-Azocholestanol markiert wird.

In *E. coli* überexprimierter und gereinigter, jedoch unfunktionaler Oxytocinrezeptor konnte mit [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol markiert werden. Die von Dr. H. Kiefer zur Verfügung gestellte Probe war das Resultat erster Rekonstitutionsversuche. Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. H. Kiefer wollen wir in zukünftigen Experimenten Parameter der Reinigung und Rekonstitution optimieren, mit dem Ziel, einen aktiven OT-Rezeptor zu erhalten. Dieser soll dann erneut mit [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol markiert werden. Durch gezielten enzymatischen Verdau wollen wir schließlich die mit Cholesterin interagierenden Domänen des Rezeptors identifizieren.

Mit Hilfe von [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol konnten Thiele *et al.* vor kurzem Synaptophysin als Cholesterin-bindendes Protein identifizieren [152]. Synaptophysin ist ein integrales Membranprotein, das in synaptischen Vesikeln vorkommt. Thiele *et al.* postulieren eine Rolle dieses oligomerisierenden und Cholesterin-bindenden Proteins bei der Ausbildung von gekrümmten Mikrodomänen während der Vesikelbiogenese an der Plasmamembran. Darüber hinaus markierten Thiele *et al.* Caveolin, von dem bekannt ist, dass es mit Cholesterin interagiert [62] und eine Reihe weiterer Proteine. Die Identifizierung weiterer Cholesterin-bindender Proteine wird künftig durch [<sup>3</sup>H]6,6-Azocholestanol beschleunigt werden. Die Dringlichkeit hierfür wird am Beispiel des ABC-Transporters deutlich (ABC = ATP-binding-cassette). Dieses Protein, auch CERP (cholesterol-efflux regulatory protein) genannt, ist für den Transport von Cholesterin aus Zellen und für die Bildung von Lipoproteinen hoher Dichte (high density lipoprotein = HDL) wichtig. Mutationen in CERP sind z. B. die Ursache von familiärer HDL-Defizienz, die koronare Herzkrankheiten zur Folge hat [154].

## 4.7. Der Einfluss von Progesteron auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Eine wichtige Funktion des Steroidhormons Progesteron ist die Minderung der Empfindlichkeit des Uterus gegen das wehenauslösende Peptidhormon Oxytocin während der Schwangerschaft. Ausgangspunkt für die folgenden Versuche waren Befunde von Grazzini *et al.*, nach denen Progesteron direkt mit dem OT-Rezeptor der Ratte (rOTR) wechselwirkt und dadurch die Ligandenbindung und die Signalweiterleitung des Rezeptors abschwächt [34]. Nach Grazzini *et al.* sind diese nicht-genomischen Effekte sowohl steroid- als auch rezeptorspezifisch, da der menschliche OT-Rezeptor nicht durch Progesteron, wohl aber durch den Progesteronmetaboliten 5 $\beta$ -Dihydroprogesteron beeinflusst wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Untersuchungen von Grazzini *et al.* überprüft und auf eine Reihe weiterer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und auf verschiedene Zelllinien ausgeweitet. Die Ergebnisse wurden größtenteils 1999 in *FEBS Letters* veröffentlicht [155].

### 4.7.1. Verwendete Zelllinien und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Folgende Zelllinien wurden zur Untersuchung des Einflusses von Progesteron auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren verwendet:

- HEK293: untransfiziert (HEK293)  
stabil transfiziert mit dem  
menschlichen Oxytocinrezeptor (HEK-OTR)  
menschlichen V<sub>1</sub> Vasopressinrezeptor (HEK-V<sub>1</sub>R)  
menschlichen Cholecystokinin<sub>B</sub>-Rezeptor (HEK-CCKR)
- 1321N1: eine menschliche Astrocytoma-Zelllinie
- CHO-K1: untransfiziert (CHO-K1)  
stabil transfiziert mit dem  
menschlichen Oxytocinrezeptor (CHO-OTR)

HEK293-Zellen wurden verwendet, da in der Arbeitsgruppe die genannten stabil transfizierten Zelllinien bereits etabliert waren und somit mindestens drei verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und eventuell zusätzliche endogen exprimierte Rezeptoren zur Verfügung standen. 1321N1-Zellen sollten als Astrocytoma-Linie verschiedene Rezeptoren exprimieren, da Astrocyten im Gehirn vielfältige Aufgaben erfüllen. Sie stehen sowohl mit Nervenzellen als auch mit Blutgefäßen in Verbindung und haben daher wahrscheinlich eine Funktion bei der Ernährung der Zellen. Desweiteren spielen sie bei der

Bildung der Blut-Hirn-Schranke und bei der Homöostase der extrazellulären Flüssigkeit eine Rolle. CHO-K1-Zellen wurden schließlich gewählt, da sie aus Ovarien stammen, einem Gewebe, das naturgemäß hohen Progesteronkonzentrationen ausgesetzt ist (s. 175). Zudem waren sie bereits ebenso wie die HEK293-Zellen mit dem menschlichen OT-Rezeptor transfiziert worden, so dass der Einfluss der zellulären Umgebung auf die Progesteronwirkung untersucht werden konnte.

In die folgenden Untersuchungen wurden ausschließlich Rezeptoren einbezogen, die über  $G_q$  an den Phosphatidyl-Inositolphosphatweg koppeln. Bindung von Agonisten an diese Rezeptoren führt zu einem Anstieg der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration, die durch den fluoreszierenden Farbstoff Fura-2/AM beobachtet werden kann (S. 72). In der folgenden Tabelle ist aufgelistet, welche Liganden an HEK293-, 1321N1- bzw. CHO-K1-Zellen getestet wurden und welche von ihnen ein Calciumsignal hervorriefen:

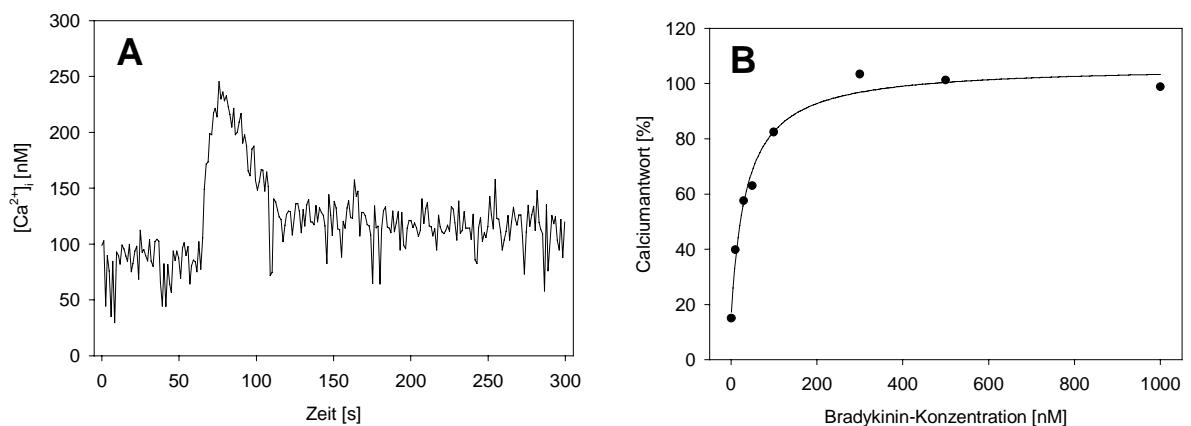
**Tabelle 9: Test verschiedener Liganden an HEK293-, 1321N1- und CHO-K1-Zellen**

An Fura-2/AM-beladenen HEK293, 1321N1- bzw. CHO-K1-Zellen wurde wie auf S. 72 beschrieben die Calciumantwort auf verschiedene Liganden gemessen. Peptidische Liganden (●) wurden in einer Endkonzentration von 100 nM, alle anderen in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M getestet. Abkürzungen: ACPD = Aminocyclopentandicarboxylat (selektiver Agonist metabotroper Glutamatrezeptoren), AVP = Arginin-Vasopressin, CCK8 = sulfatiertes Cholecystokin-8 (Oktapeptid), PACAP38 = pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide, RH = releasing hormone; SFLLRNP = Agonist für Thrombinrezeptor. ( $Ca^{2+}$ -Signal): sehr schwaches Calciumsignal.

Ligand	HEK293	1321N1	CHO-K1
Acetylcholin	$Ca^{2+}$ -Signal	$Ca^{2+}$ -Signal	–
ACPD	–	–	–
Adrenalin	$Ca^{2+}$ -Signal	–	–
● AngiotensinII	$Ca^{2+}$ -Signal	–	–
● AVP	–	–	–
● Bombesin	–	–	–
● Bradykinin	$Ca^{2+}$ -Signal	$Ca^{2+}$ -Signal	–
● CCK8	–	–	$Ca^{2+}$ -Signal
Dopamin	–	–	–
● Endothelin-1	–	–	–
Histamin	–	$Ca^{2+}$ -Signal	–
● Neurotensin	–	–	–
● Oxytocin	–	–	–
● PACAP38	( $Ca^{2+}$ -Signal)	–	–
Serotonin	( $Ca^{2+}$ -Signal)	–	–
● SFLLRNP	( $Ca^{2+}$ -Signal)	–	$Ca^{2+}$ -Signal
● Substanz P	–	–	–
● Thyrocalcitonin	–	–	–
● Thyrotropin-RH	–	–	–

Zusätzlich konnte in den transfizierten Zellen (HEK-OTR und CHO-OTR, HEK-CCKR, HEK-V<sub>1</sub>R) eine Calciumantwort auf die entsprechenden Agonisten (Oxytocin, CCK8, AVP) gemessen werden.

In Abbildung 46 (A) ist beispielhaft die Calciumantwort von 1321N1-Zellen auf 1  $\mu$ M Bradykinin gezeigt. Innerhalb von 15 Sekunden nach Ligandenzugabe zur Zellsuspension stieg die cytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von durchschnittlich 85 nM auf 245 nM an. Anschließend fiel die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration etwas langsamer auf durchschnittlich 110 nM ab und blieb über den gesamten restlichen Messzeitraum von etwa 200 s auf diesem Wert. Die genauen Mechanismen der Erhöhung der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration als Antwort auf bestimmte Liganden wurden bereits in der Einleitung auf S. 10 ausführlich erläutert. Abbildung 46 (B) zeigt eine Bradykinin-Konzentrationsreihe an 1321N1-Zellen, durch die die Ligandenkonzentration ermittelt wurde, die zu einem maximalen Calciumsignal führte. Bei allen späteren Experimenten wurden Ligandenkonzentrationen verwendet, die eine maximale Antwort hervorriefen. Die cytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration stieg nach Ligandenzugabe jeweils auf das 2 bis 5fache des basalen Wertes an. Die Höhe des Anstiegs war vom Zelltyp und vom verwendeten Liganden abhängig.



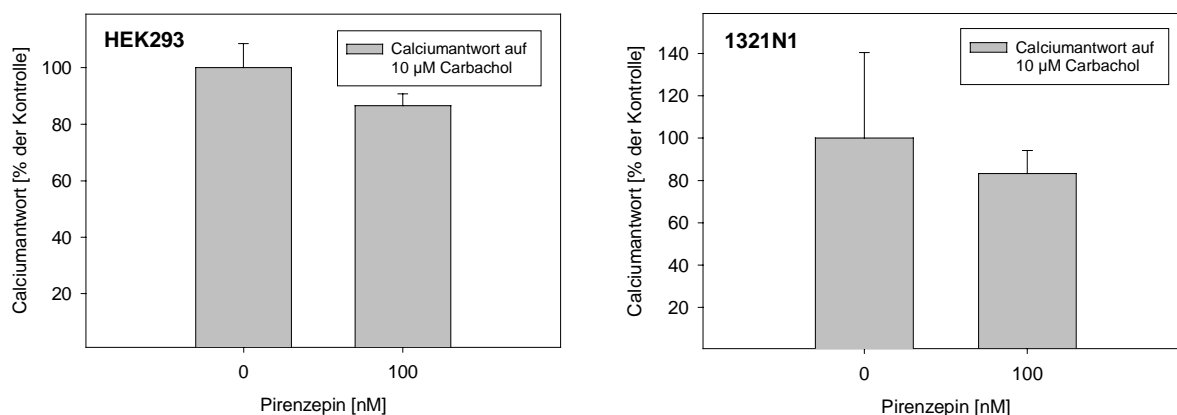
**Abbildung 46: Bradykinin-induzierte Calciumantworten von 1321N1-Zellen**

1321N1-Astrocytomazellen wurden mit dem Calcium-bindenden Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM beladen, von den Zellkulturschalen abgelöst und in Calciumpuffer resuspendiert. Die Änderung der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration  $[Ca^{2+}]_i$  als Antwort auf Bradykinin wurde gemessen wie auf S. 72 beschrieben. (A) Calciumantwort auf 1  $\mu$ M Bradykinin (Ligandenzugabe bei t = 60 s), (B) Bradykininkonzentrationsreihe: Als Calciumantwort wurde die Differenz zwischen maximaler cytosolischer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration als Antwort auf Bradykinin und der basalen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bezeichnet.

Zusätzlich wurde untersucht, ob das Calciumsignal als Antwort auf Acetylcholin durch den nikotinischen oder den G-Protein-gekoppelten muscarinischen Acetylcholinrezeptor evoziert worden war. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor ist kein G-Protein-gekoppelter Rezeptor sondern ein Ionenkanal, der neben  $K^+$ - und  $Na^+$ -Ionen, die z. B. das neuromuskuläre Endplattenpotential hervorrufen, auch für Calciumionen durchlässig ist. Zur Unterscheidung zwischen beiden Acetylcholinrezeptoren wurde 30 s vor der Zugabe von Acetylcholin die gleiche Menge  $\alpha$ -Bungarotoxin, ein hochaffiner irreversibler Antagonist des nikotinischen Acetylcholinrezeptors, zu den Zellen gegeben. Da  $\alpha$ -Bungarotoxin weder bei HEK293- noch bei 1321N1-Zellen die Calciumantwort auf Acetylcholin verhindern konnte, exprimieren beide Zelllinien mit hoher Wahrscheinlichkeit den muscarinischen Acetylcholinrezeptor. Dies wurde später durch die Calciumantwort beider Zelllinien auf Carbachol, einen subtypenspezifischen Agonisten für den muscarinischen AChR bestätigt (Abbildung 47).

Ergebnisse der Progesteronwirkung auf den in HEK293- bzw. 1321N1-Zellen endogen exprimierten muscarinischen Acetylcholinrezeptor sind nur dann miteinander vergleichbar, wenn es sich auch um den gleichen Rezeptorsubtyp handelt. Von den fünf bekannten Subtypen führen drei ( $M_1$ ,  $M_3$  und  $M_5$ ) nach Ligandenbindung zur Erhöhung der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Da vom  $M_5$ -Subtyp bisher nur die mRNA im ZNS detektiert wurde, sollte hier zwischen dem  $M_1$  und dem  $M_3$  muscarinischen AChR unterschieden werden. Verwendet wurde Pirenzepin, ein Antagonist mit schwacher Selektivität für den  $M_1$ -Subtypen mit einem  $K_i$ -Wert von etwa 3 nM. 100 nM Pirenzepin führte weder in HEK293- noch in 1321N1-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Calciumantwort auf 10  $\mu$ M Carbachol (Abbildung 47), so dass beide Zelllinien wahrscheinlich den  $M_3$ -Subtypen des muscarinischen Acetylcholinrezeptors exprimieren.

Dies bedeutet, dass durch einen Vergleich der Progesteronwirkung auf Acetylcholin-induzierte Calciumantworten bei HEK293- und 1321N1-Zellen mögliche zelltypspezifische Effekte detektiert werden können. Gleiches gilt für Antworten von HEK-OTR- und CHO-OTR-Zellen auf Oxytocin. Sollte ein Rezeptor hingegen unabhängig von seiner zellulären Umgebung von Progesteron beeinflusst werden, könnten die unterschiedlichen Rezeptoren der verschiedenen Zelllinien direkt miteinander verglichen werden.



**Abbildung 47: Bestimmung des Subtyps des endogenen in HEK293 bzw. 1321N1-Astrocyten exprimierten muscarinischen Acetylcholinrezeptors**

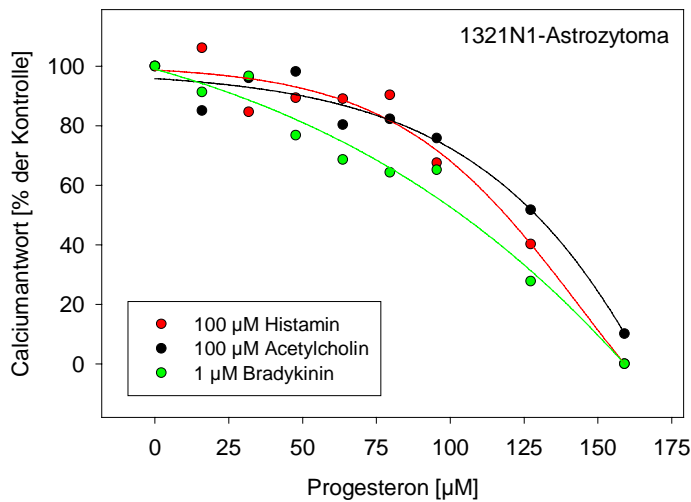
Die Calciumantworten Fura-2/AM-beladener HEK293- bzw. 1321N1-Zellen auf 10 µM Carbachol ( $EC_{50} = 3$  µM [156]), einem Agonisten des muscarinischen Acetylcholinrezeptors, wurden gemessen. Der Einfluss von 100 nM Pirenzepin, einem Antagonisten schwacher Selektivität für den  $M_1$  muscarinischen Acetylcholinrezeptor ( $K_i = 2,9 \pm 1,15$  nM [157]) wurde untersucht. Die Calciummessungen wurden durchgeführt wie im Methodenteil beschrieben.

1321N1-Zellen und HEK293-Zellen exprimieren wahrscheinlich den  $B_2$ -Bradykinin-Rezeptor, da der  $B_3$ -Subtyp bisher nur in trachealem Gewebe des Meerschweinchens nachgewiesen werden konnte ( $B_3$  des Meerschweinchens ist evtl. homolog zu humanem  $B_2$ ) und der  $B_1$ -Subtyp nur unter inflammatorischen Bedingungen induziert exprimiert wird [158]. Desweiteren exprimieren 1321N1-Zellen den  $H_1$  Histaminrezeptor, da keine Calciumantwort auf 100 µM Dimaprit, einem selektiven Agonisten des  $H_2$ -Subtyps, erhalten werden konnte (Daten nicht gezeigt).

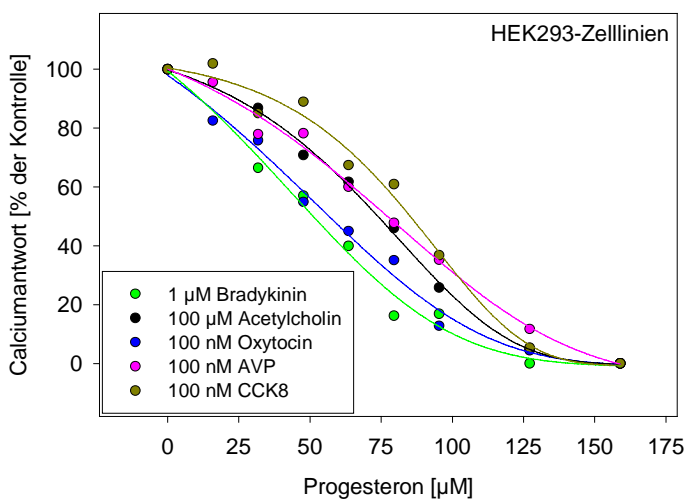
**4.7.2. Wirkung von Progesteron auf die Liganden-induzierten Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in verschiedenen Zelllinien**

Fura-2/AM-beladene Zellen wurden für insgesamt 20 min mit unterschiedlichen Progesteronkonzentrationen (10 – 200 µM) vorbehandelt (S. 62). Wie Abbildung 48 zeigt, schwächte eine Progesteronbehandlung von 1321N1-Zellen und von HEK293-Zelllinien die Agonisten-induzierte Calciumantwort aller Rezeptoren ab. 160 µM Progesteron führten schließlich zu einer vollständigen Unterdrückung der Liganden-induzierten Calciumsignale aller Rezeptoren in beiden Zelltypen. In Abbildung 48 sind die  $IC_{50}$ -Werte von Progesteron für alle Rezeptoren aufgelistet. Da die  $IC_{50}$ -Werte von Progesteron bezüglich der Calciumantworten des muscarinischen Acetylcholinrezeptors in allen HEK293-Zelllinien gleich waren, konnten die übrigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in den verschiedenen HEK293-Zelllinien direkt miteinander verglichen werden. Die  $IC_{50}$ -Werte für Progesteron

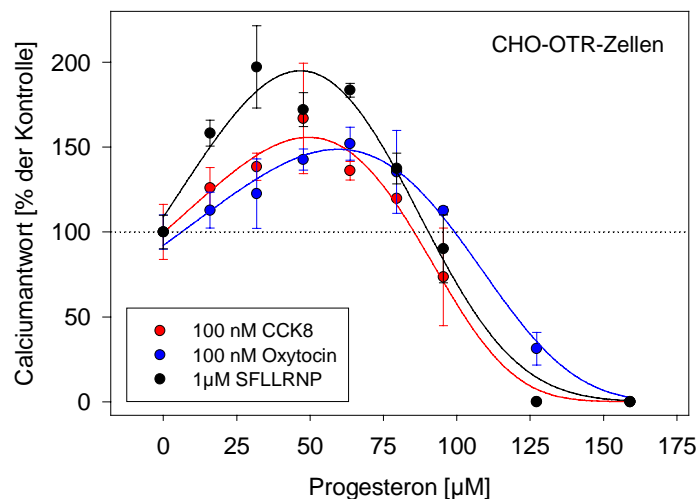
waren in HEK293-Zellen generell niedriger als in 1321N1-Zellen und deuteten somit auf einen eher zelltyp- als rezeptorspezifischen Wirkungsmechanismus von Progesteron hin. Diese Annahme wurde durch Calciummessungen an Progesteron-behandelten CHO-OTR-Zellen bestätigt. In diesen Zellen wurden die höchsten Liganden-induzierten Calciumantworten gemessen, wenn die Zellen mit etwa 50  $\mu\text{M}$  Progesteron vorbehandelt worden waren. Erst ab etwa 60  $\mu\text{M}$  Progesteron wurden die Calciumantworten dosisabhängig vermindert. Wie bei den 1321N1-Zellen und den verschiedenen HEK293-Zelllinien verhinderten 160  $\mu\text{M}$  Progesteron vollständig die Liganden-induzierten Calciumsignale.



Rezeptor für	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ] (Progesteron)
Histamin	117 $\pm$ 3,2
Acetylcholin	125 $\pm$ 2,5
Bradykinin	103 $\pm$ 8,3



Rezeptor für	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ] (Progesteron)
Bradykinin	53 $\pm$ 11,3
Acetylcholin	73 $\pm$ 6,7
Oxytocin	56 $\pm$ 6,1
AVP	77 $\pm$ 6,2
CCK8	86 $\pm$ 4,3



**Abbildung 48: Einfluss steigender Progesteronkonzentrationen auf Liganden-induzierte Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren**

1321N1-Astrocytoma, verschiedene HEK293-Zelllinien und CHO-OTR-Zellen wurden mit den angegebenen Progesteronkonzentrationen vorbehandelt (S. 62). Anschließend wurden die Liganden-induzierten Calciumsignale gemessen und in Prozent der Calciumantwort Ethanol-behandelter Kontrollzellen angegeben (S. 72). Bei den Versuchen mit den CHO-OTR-Zellen sind die Standardabweichungen der Messpunkte angegeben (Messpunkt entspricht Mittelwert aus 3 unabhängigen Messungen  $\pm$  Standardabweichung), die bei den anderen Graphen der Übersichtlichkeit halber weggelassen wurden. Die verwendeten HEK293-Zelllinien sind auf S. 153 aufgelistet. Die Calciumantworten auf Acetylcholin und Bradykinin wurden an nichttransfizierten Zellen gemessen und unterscheiden sich nicht von denjenigen der anderen HEK293-Zelllinien (nicht gezeigt). Neben den Graphen sind die  $IC_{50}$ -Werte von Progesteron aufgelistet. AVP = (Arg<sup>8</sup>)-Vasopressin, CCK8 = sulfatiertes Cholecystokinin-Oktapeptid (26 – 33), SFLLRNP = Agonist des Thrombinrezeptors.

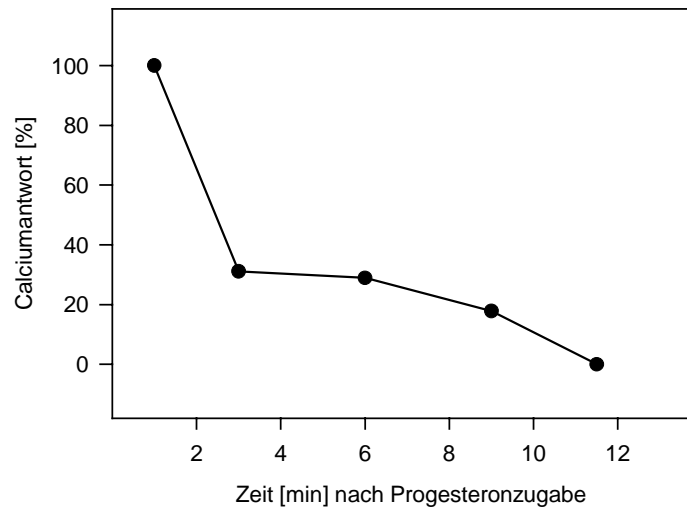
#### 4.7.3. Eigenschaften der Progesteronwirkung

Die rasche Wirkung (20 min) von Progesteron in den oben beschriebenen Versuchen deutete auf einen nicht-genomischen Mechanismus hin. Daher sollte als nächstes die Kinetik der Progesteronwirkung untersucht werden. Darüber hinaus interessierte mich, ob die Progesteronwirkung reversibel wäre und ob sie durch Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, beeinflusst werden würde.

#### Geschwindigkeit der Progesteronwirkung

Die Calciumantwort Acetylcholin-stimulierter 1321N1-Astrocytoma wurde zu verschiedenen Zeiten nach der Zugabe von 160 µM Progesteron zu Fura-2/AM-beladenen Zellen gemessen. Bereits nach 3 min konnten nur noch 30 % der Calciumantwort im Vergleich zu Kontrollzellen (Ethanol-behandelt) gemessen werden (Abbildung 49). Nach 11-minütiger Progesteronbehandlung antworteten die Zellen überhaupt nicht mehr auf Acetylcholin. Diese überaus rasche Reaktion auf Progesteron war das erste Indiz für eine

nicht-genomische Wirkung, da Veränderungen der Proteinbiosynthese als zelluläre Antwort auf Steroidhormone frühestens nach 10 Minuten beobachtbar sind [25].

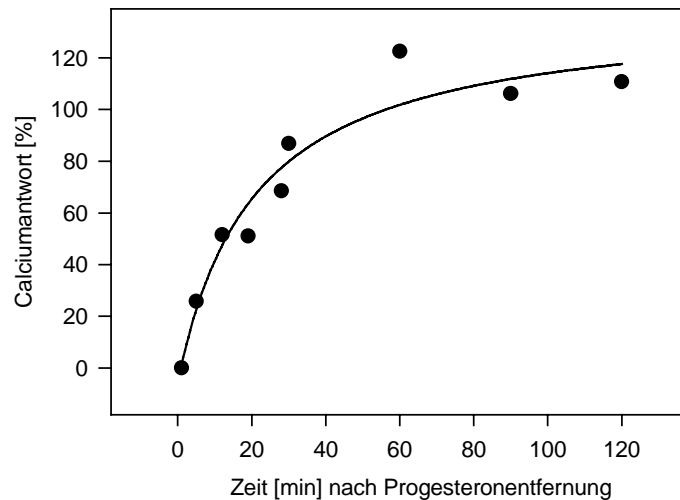


**Abbildung 49: Geschwindigkeit der Progesteronwirkung**

Zu Fura-2/AM-beladenen 1321N1-Astrocytoma wurden final 160  $\mu\text{M}$  einer ethanolischen Progesteronlösung (Endkonzentration an Ethanol = 0,8 % (v/v)) gegeben. Die Calciumantwort auf 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin wurde zu verschiedenen Zeiten nach der Progesteronzugabe gemessen (S. 72). 100 % entspricht der Calciumantwort von Ethanol-behandelten Kontrollzellen.

**Reversibilität der Progesteronwirkung**

1321N1-Zellen wurden mit 160  $\mu\text{M}$  Progesteron vorbehandelt (S. 62). 13 min nach Entfernung des Progesterons durch Zentrifugation und Waschen der Zellen mit progesteronfreiem Calciumpuffer war die Calciumantwort der Zellen auf 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin bereits halb so stark wie die der Ethanol-behandelten Kontrollzellen (s. folgende Abbildung). Nach etwa einer Stunde antworteten die mit Progesteron behandelten Zellen ebenso wie die Kontrollzellen auf Acetylcholin.



#### **Abbildung 50: Reversibilität der Progesteronwirkung**

Fura-2/AM-beladene 1321N1-Astrocytoma wurden mit 160  $\mu\text{M}$  Progesteron vorbehandelt (S. 62). Anschließend wurde das Progesteron durch Zentrifugation und Waschen der Zellen mit progesteronfreiem Calciumpuffer entfernt. Die Calciumantwort der Zellen auf 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Progesteronentfernung gemessen (S. 72). 100 % entspricht der Calciumantwort von Ethanol-behandelten Kontrollzellen.

#### Einfluss von Cycloheximid auf die Progesteronwirkung

Cycloheximid ist ein Inhibitor der Peptidyltransferaseaktivität der ribosomalen Untereinheit 60S, wobei genomische Effekte von Progesteron, die durch eine veränderte Proteinexpression zustande kommen, ausgeschaltet werden.

Adhärente 1321N1- bzw. HEK293-Zellen wurden mit final 160  $\mu\text{M}$  Cycloheximid im Kulturmedium 4 Stunden lang bei 37 °C inkubiert (Kontrolle: Medium ohne Cycloheximid). Anschließend wurden die Zellen wie auf S. 72 beschrieben mit Fura-2/AM beladen und zur Calciummessung vorbereitet. Nach der Vorbehandlung mit 160  $\mu\text{M}$  Progesteron wurde die Calciumantwort der Zellen auf 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin gemessen. Cycloheximid hatte keinen Einfluss auf die Abschwächung des Acetylcholin-induzierten Calciumsignals durch Progesteron (Daten nicht gezeigt). Progesteron wirkt in diesem Fall also nicht über eine Veränderung der Proteinexpression.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Progesteronwirkung auf Liganden-induzierte Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren über einen sehr schnellen Mechanismus erfolgt, reversibel ist und nicht durch Blockierung der Proteinbiosynthese inhibiert werden kann. Somit liegt ein nicht-genomischer Wirkungsmechanismus vor, der in den folgenden Experimenten näher untersucht wurde.

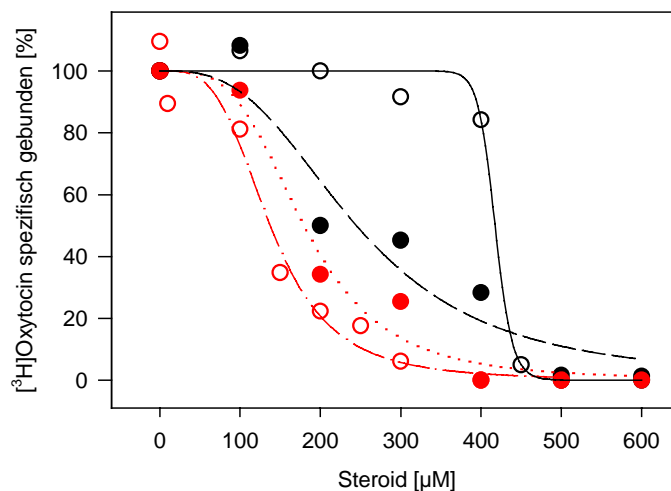
#### 4.7.4. Wirkung von Progesteron auf die Ligand-Rezeptor-Interaktion

Ein möglicher Wirkungsmechanismus von Progesteron auf die Signalweiterleitung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ist eine Beeinflussung der Ligand-Rezeptor-Interaktion, die durch den Ligandenbindungstest ermittelbar ist. Als Beispiel wählte ich Membranen von HEK-OTR-Zellen und CHO-OTR-Zellen, die beide den menschlichen OT-Rezeptor exprimierten. Membranen von CHO-Zellen wurden verwendet, um die Ergebnisse direkt mit denen von Grazzini *et al.* vergleichen zu können. Dies erschien mir auch insofern notwendig, da die Experimente auf S. 157 eine Abhängigkeit der Ergebnisse von Zelltyp gezeigt hatten. Beide Membranen wurden mit steigenden Mengen an Progesteron und dem Progesteronmetaboliten 5 $\beta$ -Dihydroprogesteron angereichert (S. 63, Strukturformel s. Abbildung 58) und anschließend im Ligandenbindungstest mit [<sup>3</sup>H]Oxytocin eingesetzt (S. 70). 5 $\beta$ -Dihydroprogesteron wurde verwendet, da Grazzini *et al.* gezeigt hatten, dass die Ligandenbindung des menschlichen OT-Rezeptors in Membranen von CHO-Zellen durch 5 $\beta$ -Dihydroprogesteron, nicht aber durch Progesteron selbst inhibiert wird ( $K_i = 32 \pm 5$  nM).

Im Gegensatz zu Grazzini *et al.* benötigte ich jedoch eine etwa 6000fach höhere 5 $\beta$ -Dihydroprogesteronkonzentration, um die spezifische Ligandenbindung des OT-Rezeptors zu reduzieren (Abbildung 51). Die Konzentrationen für halbmaximale Inhibition waren wie folgt:

- Progesteron: HEK-OTR-Membranen:  $417 \pm 4,2 \mu\text{M}$   
CHO-OTR-Membranen:  $138 \pm 6,9 \mu\text{M}$
- 5 $\beta$ -Dihydroprogesteron: HEK-OTR-Membranen:  $244 \pm 28,0 \mu\text{M}$   
CHO-OTR-Membranen:  $180 \pm 12,6 \mu\text{M}$

Die Steigungen der Kurven am Umkehrpunkt waren in allen Experimenten recht hoch (Abbildung 51). Bei Progesteron-behandelten HEK-OTR-Membranen gab es einen regelrechten Schwellenwert der Progesteronkonzentration (bei etwa 400  $\mu\text{M}$ ), oberhalb dessen es zu einem starken Abfall der OT-Bindung kam. Diese Beobachtung könnte mit Änderungen der biophysikalischen Eigenschaften der HEK-OTR-Membranen, wie z. B. Fluiditätsänderungen, oberhalb bestimmter Progesteronkonzentrationen zusammenhängen (siehe folgendes Kapitel).



**Abbildung 51: Wirkung von Progesteron und 5β-Dihydroprogesteron auf die [<sup>3</sup>H]Oxytocin-Bindung von HEK-OTR- bzw. CHO-OTR-Membranen**

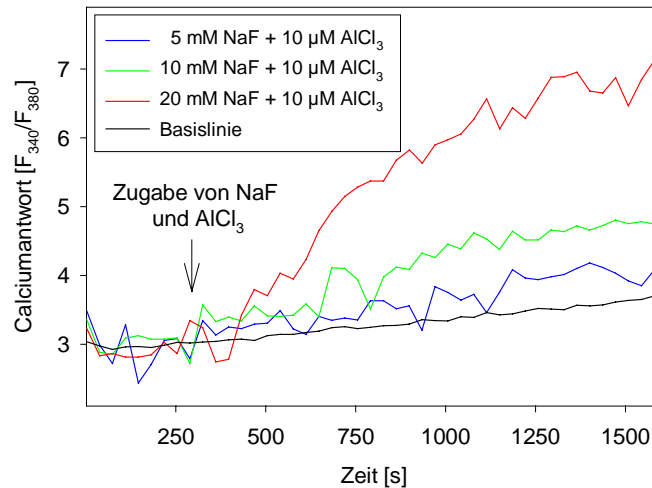
Membranen von HEK-OTR- (schwarze Symbole) bzw. CHO-OTR-Zellen (rote Symbole) wurden jeweils mit steigenden Mengen an Progesteron (○/○) bzw. 5β-Dihydroprogesteron (●/●) behandelt (S. 63). Anschließend wurde die [<sup>3</sup>H]OT-Bindung gemessen (S. 70) und auf den Wert Ethanol-behandelter Membranen (100 %) bezogen.

#### 4.7.5. Einfluss von Progesteron und 5β-Dihydroprogesteron auf die Fluidität von HEK-OTR-Membranen

Fura-2/AM-beladene HEK-OTR-Zellen wurden mit Progesteron und 5β-Dihydroprogesteron behandelt (S. 62). Hierfür wählte ich die Konzentration, die dem durchschnittlichen IC<sub>50</sub>-Wert von Progesteron für die Inhibierung der Liganden-induzierten Calciumantwort von HEK293-Zelllinien entsprach (70 µM, Abbildung 48) bzw. die Konzentration, die bei Verwendung von Progesteron zu einem völligen Verlust der [<sup>3</sup>H]OT-Bindung an HEK-OTR-Membranen (450 µM), geführt hatte. Nach der Progestinbehandlung wurden die Zellen durch 30 Ultraschallpulse lysiert und für die Anisotropiemessungen vorbereitet (S. 69). Bei Membranen von Zellen, die mit 70 µM Progestin behandelt worden waren, war noch keine Veränderung der Fluidität im Vergleich zu Membranen Ethanol-behandelter Kontrollzellen messbar ( $r = 0,1813 \pm 0,00327$ ). Bei 450 µM nahm die Anisotropie jedoch leicht ab auf  $r = 0,1719 \pm 0,00064$  bei Progesteron- bzw. auf  $r = 0,1752 \pm 0,00983$  bei 5β-Dihydroprogesteronbehandlung. Als zusätzliche Kontrollen wurden Membranen Ethanol-behandelter Zellen mit 10 mM MβCD bzw. mit 0,3 mM Cholesterin/MβCD behandelt (10 min bei 30 °C), um Cholesterin aus den Membranen zu entfernen bzw. um zusätzliches Cholesterin in die Membranen einzubauen.



15 mM NaF/10  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ , da sich herausstellte, dass die Stärke dieser Calciumantwort etwa derjenigen auf natürliche Liganden entsprach und gut messbar war.



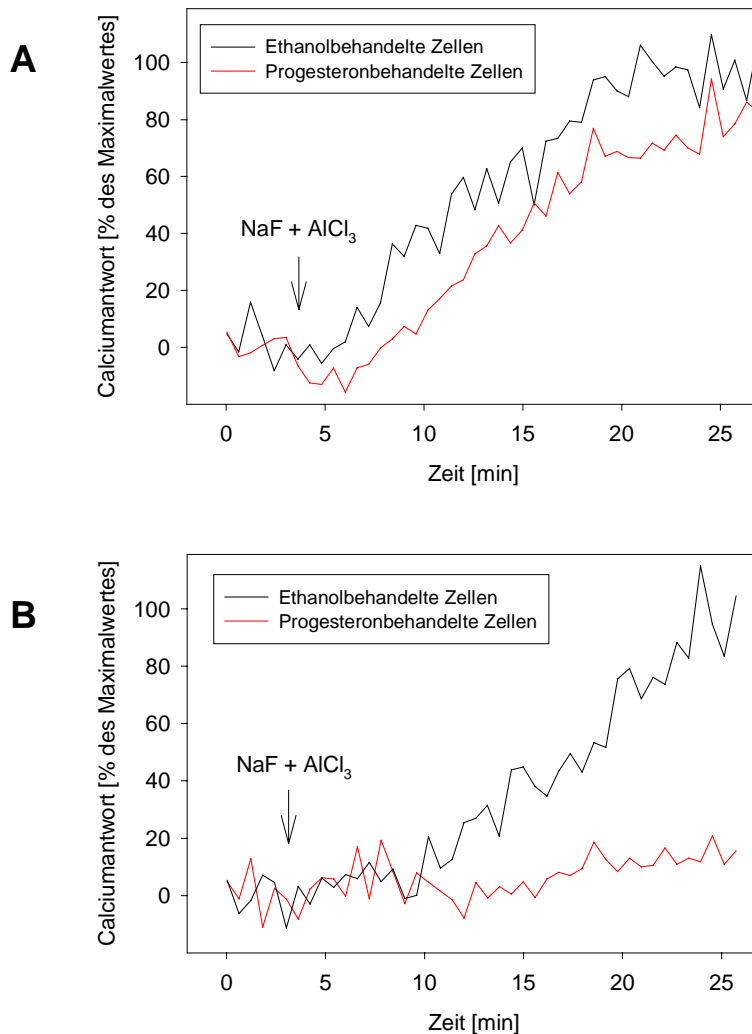
**Abbildung 53: Calciumantwort von 1321N1-Astrocytoma auf verschiedene  $\text{AlF}_4^-$ -Konzentrationen**

Zu Fura-2/AM-beladenen und in Calciumpuffer resuspendierten 1321N1-Zellen wurden 10  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  zusammen mit 5, 10 oder 20 mM NaF gegeben (beides in HBS). Der Calciumpuffer (S. 33) enthielt bei diesen Experimenten lediglich 0,8 mM  $\text{CaCl}_2$  statt 1,5 mM, da sich sonst unlösliches  $\text{CaF}_2$  bildet. Die Messung der Änderungen der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist im Methodenteil auf S. 72 beschrieben.

$\text{AlCl}_3$  bzw. NaF alleine führten auch schon zu Calciumantworten, die aber deutlich schwächer ausfielen als diejenigen auf  $\text{AlF}_4^-$  (nicht gezeigt). Dies liegt wahrscheinlich an Verunreinigungen von  $\text{Al}^{3+}$  bzw.  $\text{F}^-$  in den Puffern. Marc *et al.* jedenfalls konnten Calciumsignale auf NaF durch Deferoxamin, das tervalente Metallionen chelatiert, verhindern [159].

Abbildung 54 zeigt die Wirkung von 160  $\mu\text{M}$  Progesteron auf das  $\text{AlF}_4^-$ -induzierte Calciumsignal. Wurden Progesteron-behandelte Zellen zu progesteronfreiem Puffer in die Messküvette gegeben, konnte eine geringfügige Abschwächung des Calciumsignals beobachtet werden. Diese Abschwächung war stärker und führte zu einer vollständigen Unterdrückung des Signals, wenn auch der Puffer in der Messküvette Progesteron enthielt, so dass die Progesteronkonzentration während der gesamten Messzeit 160  $\mu\text{M}$  betrug. Diese Beobachtung ist durch die rasche Reversibilität der Progesteronwirkung zu erklären (Abbildung 50), die sich bemerkbar macht, wenn die Progesteronkonzentration durch die 1:6fache Verdünnung mit dem progesteronfreien Puffer in der Messküvette auf etwa 27  $\mu\text{M}$  gesenkt wird – eine Konzentration, die die Liganden-induzierten Calciumantworten von 1321N1-Zellen kaum beeinflusst (Abbildung 48). Progesteron schwächt offensichtlich

Calciumsignale ab, die am Ende einer Signalkette stehen, die durch Aluminiumfluorid-induzierte Aktivierung von G-Proteinen ausgelöst wird. Dieser Befund war neben den Radioligandenbindungstests (Abbildung 51) ein weiterer Hinweis darauf, dass Progesteron auf einer den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nachgeschalteten Ebene der Signaltransduktion wirkt.

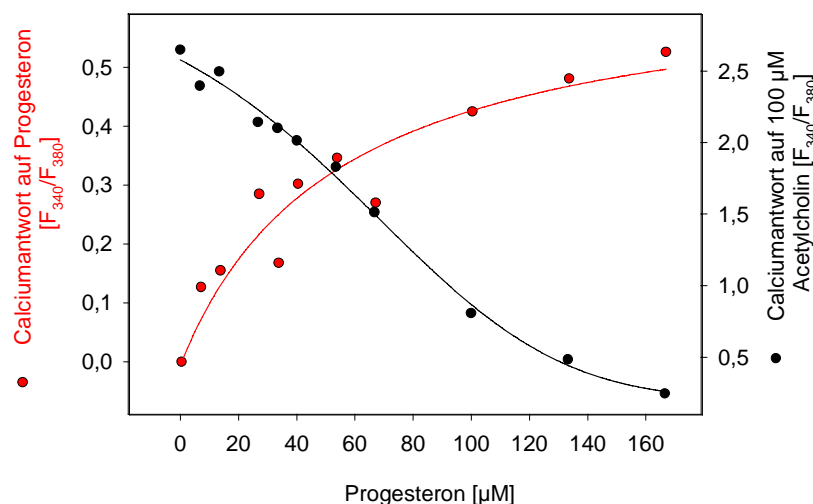


**Abbildung 54: Wirkung von Progesteron auf Aluminiumfluorid-induzierte Calciumsignale von 1321N1-Astrocytoma**

Fura-2/AM beladene 1321N1-Zellen wurden mit 160  $\mu\text{M}$  Progesteron behandelt (S. 62). 500  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit  $1 \cdot 10^6$  Zellen wurden in eine Messküvette zu 2,5 ml Calciumpuffer (S. 33, 0,8 mM CaCl<sub>2</sub>) gegeben. Der Calciumpuffer in der Messküvette war in einem Experiment (A) progesteronfrei, in einem zweiten Experiment enthielt er 160  $\mu\text{M}$  Progesteron (B). Zum angegebenen Zeitpunkt wurden 15 mM NaF und 10  $\mu\text{M}$  AlCl<sub>3</sub> zu den Zellen gegeben. Die Calciumantworten wurden wie auf S. 72 erläutert gemessen. Kontrolle: Ethanol-behandelte Zellen.

#### 4.7.7. Progesteron-induzierte Calciumsignale

Am intensivsten wurden Progesteron-induzierte Calciumsignale bisher bei der Acrosomenreaktion menschlicher Spermien untersucht (S. 13). Die folgenden Experimente zeigen, dass Progesteron auch in HEK293-Zellen schon ab 10  $\mu\text{M}$  eine deutliche Calciumantwort evoziert (Abbildung 55). Steigende Progesteronkonzentrationen führten zu einem Anstieg der Calciumantworten mit einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 33  $\mu\text{M}$  für Progesteron. Bei etwa 160  $\mu\text{M}$  Progesteron antworteten die Zellen maximal auf das Steroid, wobei die Stärke der Calciumantwort gut im Bereich von peptidischen Liganden für G-Proteingekoppelte Rezeptoren lag. Parallel zum Anstieg der Calciumantwort auf Progesteron kam es zu einer Abnahme Acetylcholin-induzierter Calciumsignale, die wie gewohnt bei >160  $\mu\text{M}$  Progesteron völlig unterdrückt wurden.

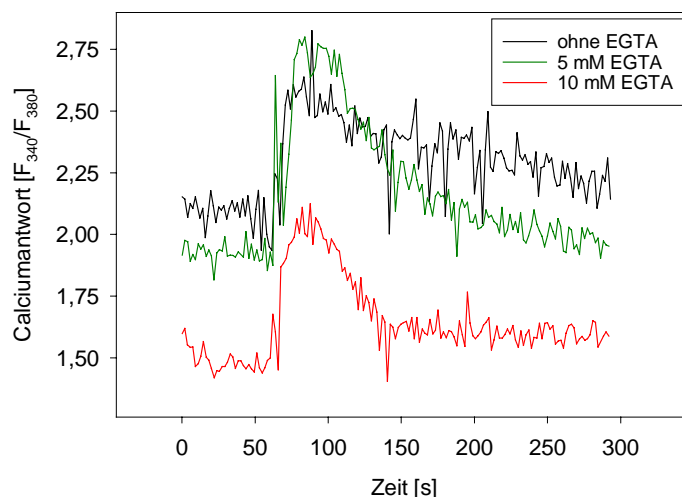


**Abbildung 55: Dosis-Wirkungskurve Progesteron-induzierter Calciumantworten von HEK293-Zellen und der Progesteronwirkung auf Acetylcholin-induzierte Calciumsignale**

HEK293-Zellen wurden mit Fura-2/AM beladen und für die Calciummessung vorbereitet (S. 72). Bei  $t = 60$  s nach Beginn der Messung wurden zu 3 ml Zellsuspension in der Messküvette 10  $\mu\text{l}$  einer ethanolischen Progesteronlösung gegeben, wobei die Endkonzentrationen an Progesteron zwischen 0 und 160  $\mu\text{M}$  lagen (●). Zusätzlich wurde 4 min nach Progesteronzugabe die Calciumantwort auf 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin gemessen (●) (S. 72).

Da Progesteron einfach zu einem unspezifischen Calciumeinstrom z. B. durch Schädigung der Zellen führen könnte, überprüfte ich, ob auch nach Zusatz des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators EGTA zum Calciumpuffer Progesteron-induzierte Calciumsignale nachweisbar wären. Diese müssten dann durch Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern zustande kommen und sollten rasch durch die Zelle wieder abgeschaltet werden. Abbildung 56 zeigt, dass genau das passiert: der Progesteron-induzierte Peak bei Verwendung von 10

mM EGTA ist genauso hoch ist wie bei Zellen in EGTA-freiem Puffer. In dieser Abbildung erkennt man auch, dass die Zellen auf Progesteron fast ebenso rasch reagieren wie auf Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Auch hier findet eine starke Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration statt, die nach kurzer Zeit auf einen für längere Zeit stabilen Wert oberhalb der ursprünglichen Basislinie absinkt. Bei Verwendung von EGTA geht die Basislinie von  $F_{340}/F_{380} = 2,1$  auf 1,9 (5 mM EGTA) bzw. 1,5 (10 mM EGTA) zurück. Wahrscheinlich ist die freie intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration in diesen Fällen niedriger, da die Zellen keine Calciumionen aus der Umgebung aufnehmen können, sondern eher noch Ionen verlieren. Der Rückgang der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration läuft bei Zellen in EGTA-haltigem Puffer schneller ab, da die Zellen die Calciumionen nicht gegen einen Konzentrationsgradienten aus der Zelle transportieren müssen.



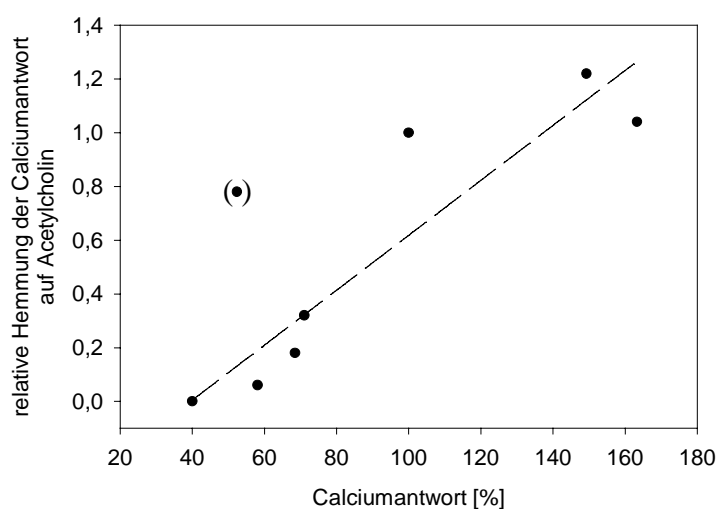
**Abbildung 56: Effekt von EGTA auf die Progesteron-induzierte Calciumantwort von HEK293-Zellen**

Zu Fura-2/AM-beladenen Zellen in der Messküvette wurden bei  $t = 60$  s nach Messbeginn  $160 \mu\text{M}$  Progesteron gegeben. Das Calciumsignal wurde gemessen wie auf S. 72 beschrieben. Der Versuch wurde bei 0, 5 und 10 mM EGTA im Calciumpuffer (S. 33) durchgeführt.

Progesteron und Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren scheinen ähnliche Signaltransduktionswege in der Zelle auszulösen (S. 13). Somit könnte Progesteron eine Desensibilisierung der Zelle gegenüber Liganden induzieren. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, testete ich folgende Steroide auf ihre Fähigkeit, intrazelluläre Calciumsignale zu induzieren und gleichzeitig Acetylcholin-induzierte Calciumsignale zu hemmen: Progesteron, Dihydroprogesteron, Pregnenolon,  $\beta$ -Östradiol, Hydrocortison, Dehydroepiandrosteron (DHEA),  $11\alpha$ - und  $11\beta$ -Hydroxyprogesteron (Abbildung 57).

11 $\alpha$ - und 11 $\beta$ -Hydroxyprogesteron sind als mögliche Edukte der Synthese fluoreszierender Progesteronderivate interessant.

Steroid	Calciumantwort [%]	relative Hemmung der Acetylcholin-induzierten Calciumantwort
Progesteron	100	1
Pregnenolon	163,3	1,04
5 $\beta$ -Dihydroprogesteron	149,3	1,22
Dehydroepiandrosteron	71,1	0,32
11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	68,5	0,18
11 $\beta$ -Hydroxyprogesteron	58,1	0,06
$\beta$ -Östradiol	52,4	0,78
Hydrocortison	40,0	0



**Abbildung 57: Zusammenhang zwischen der Calciumantwort von HEK293-Zellen auf verschiedene Steroide und der Fähigkeit dieser Steroide den Acetylcholin-induzierten Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration zu hemmen**

Fura-2/AM-beladene HEK293-Zellen wurden zur Calciummessung vorbereitet (S. 72). Zum Zeitpunkt  $t = 60$  s nach Messbeginn wurden zur Zellsuspension in der Messküvette jeweils  $100 \mu\text{M}$  des angegebenen Steroids gegeben. Bei  $t = 4$  min wurden zusätzlich  $100 \mu\text{M}$  Acetylcholin zu den Zellen gegeben, und der Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde gemessen (S. 72). Die Calciumantwort auf Progesteron wurde auf 100 % gesetzt. Die Hemmung der Acetylcholin-induzierten Calciumantwort durch Progesteron betrug 53 % (d. h. die Zellen zeigten noch 47 % der Antwort Ethanol-behandelter Kontrollzellen) und wurde auf 1 gesetzt. Die Daten wurden mittels linearer Regression (gestrichelte Linie) angepasst:  $y = 0,0102x - 0,4042$ ; Koeffizient  $r^2 = 0,854$ . Bei der linearen Regression wurde der Messpunkt für  $\beta$ -Östradiol nicht berücksichtigt (•).

Die Fähigkeit der Steroide, die Acetylcholin-induzierte Calciumantwort zu inhibieren, hing von der Stärke der Steroid-induzierten Calciumantwort ab. Steroide, die eine schwache Calciumantwort hervorriefen, wie z. B. Hydrocortison, inhibierten nur schwach die Calciumantwort auf Acetylcholin. Eine Ausnahme bildete  $\beta$ -Östradiol, das bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt wurde. Die Ergebnisse deuten also an, dass die Hemmung Liganden-induzierter Calciumsignale durch Progesteron durch eine Desensibilisierung der Zellen erfolgen könnte, da Progesteron möglicherweise über ähnliche Signaltransduktionswege wie die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren Calciumsignale auslöst. Jedoch schien dies nicht der alleinige Mechanismus zu sein, da Steroide, die eine stärkere Calciumantwort hervorriefen als Progesteron (5 $\beta$ -Dihydroprogesteron und Pregnenolon) das Acetylcholin-induzierte Calciumsignal nicht stärker abschwächten.

#### 4.7.8. Struktur-Funktionsanalyse verschiedener Steroide am Oxytocinrezeptor

Um die Spezifität der Progesteronwirkung am OT-Rezeptor nachzuweisen, wurden verschiedene Steroide auf ihre Wirkung getestet, das Oxytocin-induzierte Calciumsignal von HEK-OTR-Zellen zu vermindern. Hierzu wurden die Zellen mit verschiedenen Steroiden (jeweils 60  $\mu$ M) vorbehandelt. Die verwendeten Steroide und das Ergebnis des Experiments sind in Abbildung 58 und Abbildung 59 dargestellt. Progesteron und 5 $\beta$ -Dihydroprogesteron waren am wirksamsten und reduzierten die Calciumantwort der Zellen auf  $29 \pm 5$  % bzw.  $26 \pm 5$  % im Vergleich zu Ethanol-behandelten Kontrollzellen. Deutlich weniger wirksam waren Pregnenolon ( $75 \pm 4$  %),  $\beta$ -Östradiol ( $81 \pm 4$  %) und Dehydroepiandrosteron (DHEA) ( $85 \pm 6$  %). Cholesterin hingegen erhöhte geringfügig die Calciumantwort auf 100 nM Oxytocin, wohingegen das Cholesterinderivat Lanosterol keinen Effekt zeigte. RU486 („Abtreibungspille“), ein synthetischer Antagonist des „klassischen“ Progesteronrezeptors, war weniger wirksam als Progesteron. 70  $\mu$ M bzw. 160  $\mu$ M reduzierten die Calciumantwort auf  $82 \pm 6$  % bzw.  $64 \pm 3$  % im Vergleich zur Kontrolle. Interessant war jedoch, dass RU486 in diesen Versuchen *nicht* als Antagonist von Progesteron wirkte, was ebenfalls ein Hinweis auf eine nicht-genomische Progesteronwirkung war.

Abbildung 60 fasst die Ergebnisse der Struktur-Funktionsanalyse zusammen. Die Wirksamkeit von 5 $\beta$ -Dihydroprogesteron zeigt, dass die  $\Delta^4$ -Doppelbindung auf die

Progesteronwirkung keinen Einfluss hat. Für die Inhibierung des Oxytocin-induzierten Calciumsignals ist die 3-Ketogruppe essentiell, wie das nur schwach wirksame Steroid Pregnenolon zeigt. Generell vermindern Hydroxylgruppen die Wirksamkeit von Progesteron, so dass z. B. Hydrocortison (11- und 17-OH), Dehydroepiandrosteron (3-OH) und  $\beta$ -Östradiol (3-OH und 17-OH), aber auch  $11\alpha$ - und  $11\beta$ -Hydroxyprogesteron (vorheriger Versuch) nur einen schwachen oder keinen Einfluss auf Oxytocin-induzierte Calciumsignale haben. Die Acetylgruppe in Position 17 ist für die Progesteronwirkung wahrscheinlich essentiell, jedoch müssen hier noch weitere Experimente mit einer größeren Anzahl an Steroiden durchgeführt werden.

Bei den vorherigen Versuchen zur Abschwächung des Acetylcholin-induzierten Calciumsignals waren Pregnenolon und  $\beta$ -Östradiol ebenso bzw. fast genauso gute Inhibitoren wie Progesteron. Inwieweit hier eine Rezeptorspezifität der Steroidwirkung vorliegt, müsste noch in weiteren Versuchen geklärt werden.

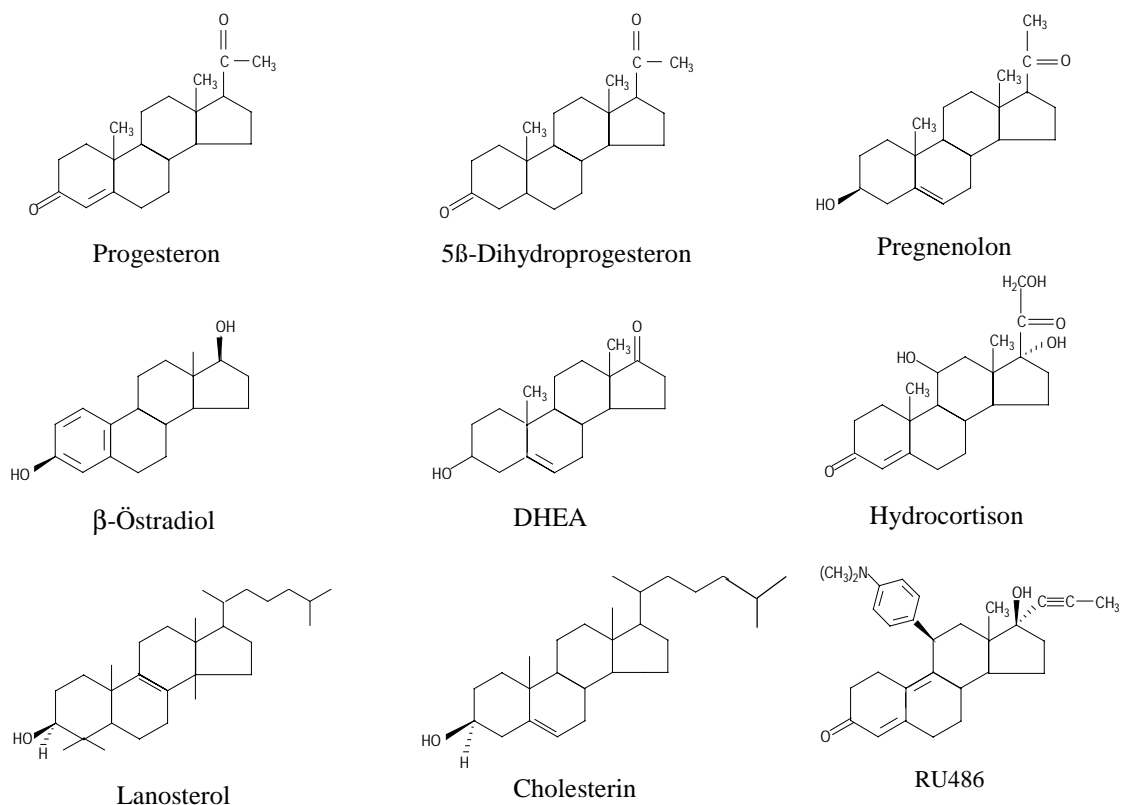
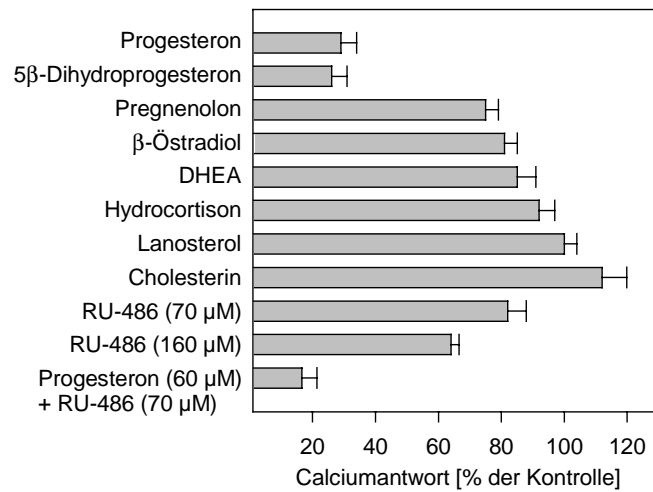
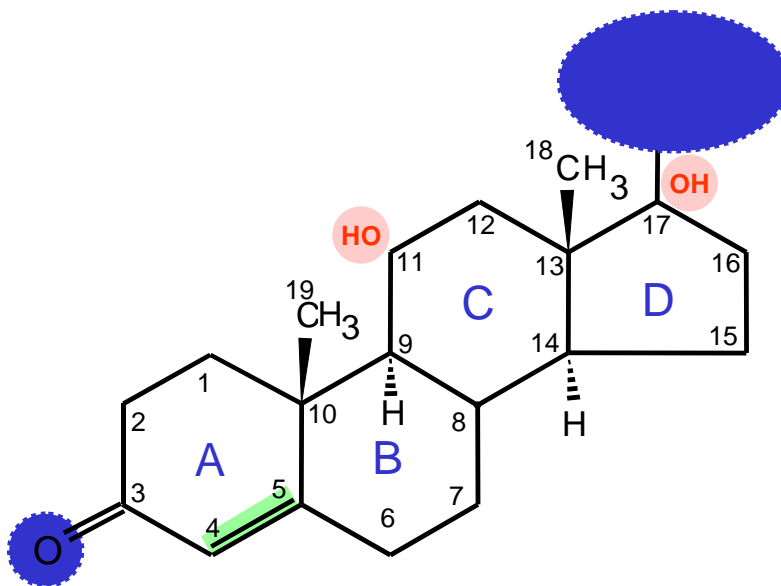


Abbildung 58: Verwendete Steroide für die Struktur-Funktionsanalyse von Progesteron



**Abbildung 59: Struktur-Funktionsanalyse von Steroiden bezüglich der Abschwächung des Oxytocin-induzierten Calciumsignals von HEK-OTR-Zellen**

Fura-2/AM beladene HEK-OTR-Zellen wurden mit verschiedenen Steroiden (60 μM in Ethanol, falls nicht anders angegeben) vorbehandelt (S. 62). Die Calciumantwort auf 100 nM Oxytocin wurde gemessen (S. 72) und in Prozent der Calciumantwort von Ethanol-behandelten Kontrollzellen angegeben.



**Abbildung 60: Strukturelle Merkmale von Progesteron, die wichtig sind für die Abschwächung Oxytocin-induzierter Calciumsignale in HEK-OTR-Zellen**

Die Versuchsdurchführung ist in Abbildung 59 beschrieben. Die Fähigkeit von 5β-Dihydroprogesteron, die Oxytocin-induzierte Calciumantwort der HEK-OTR-Zellen genauso gut wie Progesteron zu inhibieren, zeigt, dass die Δ<sup>4</sup>-Doppelbindung (grün) für den Progesteroneffekt nicht nötig ist. Hydroxylgruppen in Position 11 oder 17 (rot) interferieren hingegen mit der Progesteronwirkung. Notwendig für die Inhibierung Oxytocin-induzierter Calciumsignale sind die 3-Keto- und die 17-Acetylgruppe des Progesterons (blau).

#### 4.7.9. Zusammenfassung und Diskussion

Wie die vorangegangenen Versuche gezeigt haben, beeinflusst Progesteron spezifisch Liganden-induzierte Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Verschiedene mögliche Mechanismen der nicht-genomischen zelltypspezifischen Progesteronwirkung treffen in unserem Fall wahrscheinlich nicht zu:

- (1) Progesteron könnte direkt mit Rezeptoren wechselwirken und dadurch die Ligandenbindung beeinflussen. Progesteron bindet zum Beispiel an eine extrazelluläre Stelle des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (ein Ionenkanal) des Gehirns und inhibiert auf diese Weise Acetylcholin-induzierte Ionenströme ( $IC_{50} \approx 10 \mu M$ ) [160]. Im Falle des von mir untersuchten OT-Rezeptors waren jedoch die Progesteronkonzentrationen, die zur Reduktion der Ligandenbindung nötig waren, sieben- bis achtfach höher als diejenigen, die bereits die Calciumsignale beeinflussten (vgl. Abbildung 51 mit Abbildung 48). Insbesondere stellen die Ergebnisse des Ligandenbindungstests die Studie von Grazzini *et al.* infrage, in der eine direkte hochaffine Wechselwirkung zwischen  $5\beta$ -Dihydroprogesteron und dem menschlichen OT-Rezeptor postuliert wurde ( $K_i = 32 \pm 5 \text{ nm}$ ) [34]. Dennoch gab es geringfügige Unterschiede in den Empfindlichkeiten der Liganden-induzierten Calciumsignale der einzelnen Rezeptoren gegenüber Progesteron, die sich in unterschiedlich hohen  $IC_{50}$ -Werten bemerkbar machten (Abbildung 48). Diese Unterschiede konnten in etlichen Experimenten reproduziert werden, so dass ein zusätzlicher rezeptorspezifischer Einfluss nicht völlig auszuschließen ist.
- (2) Progesteron könnte auch die Rezeptoreigenschaften über Änderungen der Membranfluidität beeinflussen. Tatsächlich wird die Fluidität von Membranen durch  $450 \mu M$  Progesteron bzw.  $5\beta$ -Dihydroprogesteron leicht erhöht (S. 163). Dies könnte zum Rückgang der [ $^3H$ ]OT-Bindung in progestinbehandelten HEK-OTR- bzw. CHO-OTR-Membranen beitragen. Allerdings konnte ich keine Fluiditätsänderungen bei Progesteronkonzentrationen feststellen, die zum Rückgang der Liganden-induzierten Calciumantworten in Zellen führten.
- (3) Ein bekanntes Progesteron-bindendes Protein ist das „multidrug resistance“ (MDR) P-Glycoprotein [36], das cytotoxische Substanzen unter ATP-Verbrauch aus der Zelle hinaus transportiert und auf diese Weise bei vermehrter Expression z. B. für die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Cytostatika verantwortlich ist [161]. MDR P-

Glycoproteine sind darüber hinaus am intrazellulären Steroidtransport beteiligt [162]. Progesteron inhibiert die Aktivität des P-Glycoproteins und somit die Cholesterinbiosynthese (s. S. 13), so dass Cholesterinvorläufer wie Lanosterol in der Zelle akkumulieren [49]. Lanosterol selbst beeinflusst jedoch nicht das Liganden-induzierte Calciumsignal des OT-Rezeptors. Darüber hinaus wird das P-Glycoprotein durch DHEA stark inhibiert [162], welches Calciumsignale nur schwach beeinflusste (Abbildung 59). Daher erscheint eine Progesteronwirkung über das P-Glycoprotein eher unwahrscheinlich, obwohl ein Progesteroneffekt über andere Transporter aus dieser großen Proteinfamilie nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Befunde der Studie lassen sich durch folgende Beobachtungen erklären:

- (1) Bei den verwendeten Konzentrationen reduziert Progesteron innerhalb weniger Minuten den Cholesteringehalt von Caveolae [43]. In diesen Mikrodomänen sind, wie auf S. 18 erläutert, viele G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und andere Moleküle der Signalkaskaden angereichert. Untersuchungen dieser Arbeit ergaben, dass die Calciumsignale nicht nur des OT-Rezeptors sondern auch vieler anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, vom Cholesteringehalt der Zellen abhängig sind (Abbildung 31). Daher könnten Progesteron-bedingte Änderungen des Cholesteringehaltes von Caveolae durchaus Veränderungen in den Liganden-induzierten Calciumantworten von Rezeptoren zur Folge haben.
- (2) Progesteron könnte auch an nachgeschalteten Stufen der Signalkaskaden angreifen, also zum Beispiel direkt die Calciumkanäle der Plasmamembran oder des endoplasmatischen Retikulums regulieren. Bei glatten Muskelzellen aus dem Darm reduzieren Progesteron und  $5\beta$ -Dihydroprogesteron zum Beispiel spannungsabhängige Calciumströme [163].
- (3) Ein weiteres Indiz dafür, dass Progesteron auf einer den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren *nachgeschalteten* Stufe der Signaltransduktion wirkt, ist die Abschwächung der Aluminiumfluorid-induzierten Calciumsignale durch Progesteron (Abbildung 54), da diese Calciumsignale rezeptorunabhängig auf der Ebene der G-Proteine ausgelöst werden [159]. Alternativ hierzu könnte Progesteron jedoch auch einfach die Diffusion oder den Transport der Ionen ins Zellinnere inhibieren.
- (4) Für eine Progesteronwirkung auf spätere Schritte in der Signaltransduktion spricht auch, dass die Stärke der Steroid-induzierten Calciumantworten mit der Fähigkeit der Steroide korreliert, Acetylcholin-induzierte Calciumsignale zu inhibieren (Abbildung

57). Progesteron-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale könnten somit zu einer Desensibilisierung der Zelle gegenüber Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren führen. Dies scheint allerdings nicht der alleinige Mechanismus zu sein, da ab einer gewissen Stärke der Steroid-induzierten Calciumantwort die Hemmung des Acetylcholin-induzierten Signals nicht weiter zunimmt.

- (5) Die zelltypspezifischen Unterschiede der Progesteronwirkung und die geringen Unterschiede zwischen den Rezeptoren einer Zelllinie, deuten ebenfalls auf einen weitgehend rezeptorunabhängigen Mechanismus hin (Abbildung 48).

Die Progesteronkonzentrationen, die nötig sind, um die von mir beschriebenen Effekte auf die Calciumantworten zu induzieren, sind auf jeden Fall höher als die Konzentrationen, die im Blutplasma oder in nichtsteroidogenen Geweben gemessen wurden (dort liegen sie im nanomolaren Bereich, s. z. B. [164]). In steroidogenen Geweben, wie z. B. in der Placenta oder im Corpus luteum, liegen hingegen außerordentlich hohe Progesteronkonzentrationen vor. So sezerniert die menschliche Placenta bis zu 300 mg (!) Progesteron pro Tag und weist Progesteronkonzentrationen von bis zu 7  $\mu\text{g/g}$  Gewebe auf [165]. Im menschlichen Corpus luteum sind die Progesteronkonzentrationen zyklusabhängig und erreichen kurz nach der Ovulation und in der frühen Lutealphase Werte von etwa 25  $\mu\text{g/g}$  Gewebe [166]. Diese Werte liegen im Bereich der Konzentrationen, die in dieser Studie wirksam waren. Somit könnte Progesteron in steroidogenen Zellen und in deren Umgebung die Liganden-induzierten Calciumsignale durch einen nicht-genomischen Mechanismus beeinflussen. Gerade in diesen Geweben spielt das Oxytocinsystem eine wichtige physiologische Rolle. In Ovarien von Primaten fungiert Oxytocin wahrscheinlich als parakriner Vermittler im Luteinisierungsprozess. Humanes Choriogonadotropin, das am Beginn der Schwangerschaft vom Trophoblasten gebildet wird, regt die Synthese von Oxytocin in Granulosazellen an, was wiederum die Progesteronproduktion in diesen Zellen erhöht [167]. Progesteron bewirkt auf genomischem Weg die Synthese von Oxytocin, so dass eine positive Rückkopplung in Gang kommt, die letztendlich dem Erhalt der frühen Schwangerschaft dient [168]. Ein weiteres Beispiel ist die Expression von OT-Rezeptoren im chorio-dezidualen Gewebe, die am Ende der Schwangerschaft hochreguliert wird [169]. Die exakte Funktion von Oxytocin in diesen Geweben und auch die Wechselwirkung mit Progesteron muss jedoch in weiteren Studien erst geklärt werden, ebenso wie der genaue Mechanismus der nicht-genomischen Progesteronwirkung und mögliche Interaktionen mit „klassischen“ genomischen Progesteroneffekten.



## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Der Einfluss von Cholesterin auf die physikalischen Eigenschaften biologischer Membranen ist seit längerer Zeit bekannt. Wohl aufgrund seiner hohen Konzentration in Plasmamembranen wurde Cholesterin früher eher als Strukturmolekül von Membranen, denn als Modulator der Funktion von Membranproteinen angesehen. Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass Cholesterin G-Protein-gekoppelte Rezeptoren über mindestens zwei verschiedene Mechanismen beeinflusst: zum einen indirekt über die Membranfluidität, wie im Falle des CCK-Rezeptors, und zum anderen, wie für den OT-Rezeptor gezeigt, über spezifische molekulare Wechselwirkungen. Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren hatte Cholesterin einen positiven Einfluss auf die Funktionalität, sei es auf die Bindungskapazität (CCK-Rezeptor), auf die Ligandenaffinität (OT-Rezeptor) oder auf die Liganden-induzierten Calciumsignale (alle Rezeptoren). Rhodopsin, ebenfalls ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, wird hingegen durch Cholesterin inhibiert.

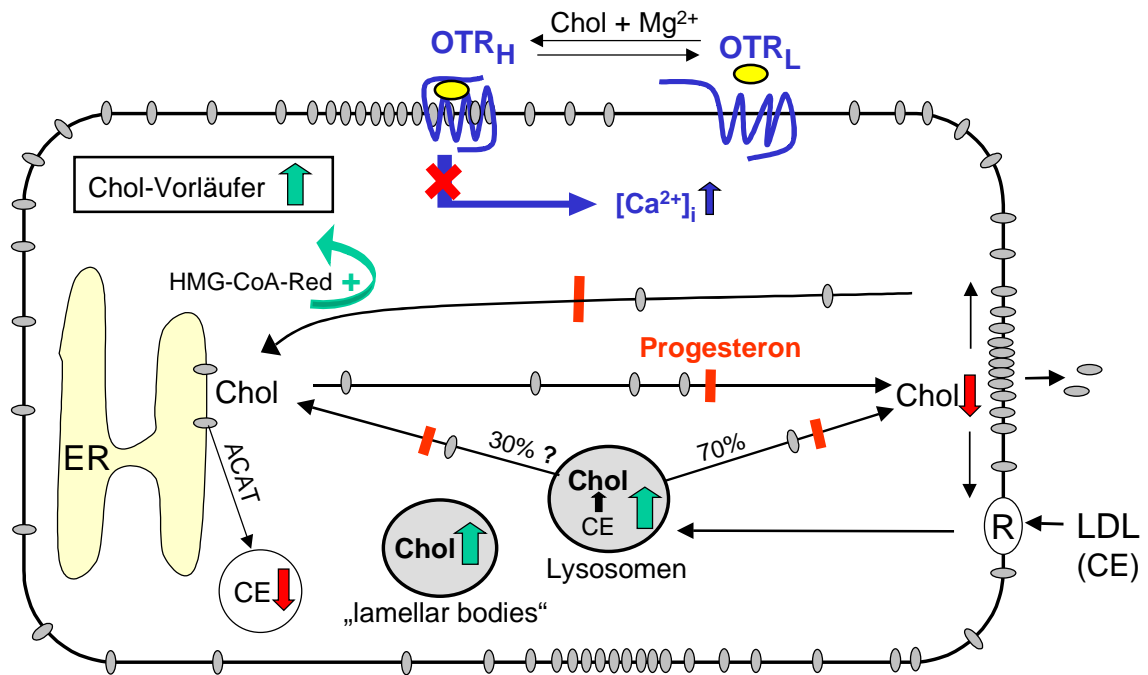
Membranproteine unterscheiden sich darüber hinaus in ihren Anforderungen an die Struktur des Cholesterins. So zeigte sich, dass die Ligandenbindung des OT-Rezeptors stark von bestimmten Strukturmerkmalen des Cholesterins abhängig ist. Der CCK-Rezeptor ist dagegen nicht auf bestimmte funktionellen Gruppen des Cholesterins angewiesen, sondern darauf, dass ein Steroid die hohe Anisotropie der Membran erhalten kann. Die Parameter der Interaktion eines Membranproteins mit Cholesterin (direkte/indirekte Wechselwirkung, hohe/geringe Spezifität, Steigerung/Reduktion der Proteinfunktion) lassen verschiedene Kombinationsmöglichkeiten zu (siehe folgende Abbildung).



Möglichkeit, den OT-Rezeptor in Insektenzellen funktionell zu überexprimieren, wäre die Co-Expression von Caveolin, das als Cholesterin-bindendes Strukturprotein cholesterinreicher Subdomänen (Caveolae) der Plasmamembran die Ausbildung dieser Domänen auch in mit Cholesterin angereicherten Insektenzellen ermöglichen könnte. Eventuell könnte dies sogar den Transport intrazellulärer Rezeptoren zur Zelloberfläche unterstützen. Signale im Western-Blot zeigen, dass die Gesamtmenge exprimierter Rezeptoren viel höher ist als die Menge der funktionellen (hochaffinen) Rezeptoren. Eine weitere Möglichkeit, den OT-Rezeptor in großen Mengen zu gewinnen, bietet die Transfektion suspensionsadaptierter HEK293S-Zellen. In diesen Zellen wurde bereits das Rinderopsin in hohen Mengen exprimiert [170] und der PACAP-Rezeptor der Ratte, ebenfalls ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (Frau Diplom-Chemikerin Corinna Buro, Universität Mainz, persönliche Mitteilung).

Erfolgreich verlief die Herstellung des photoreaktiven Cholesterinderivats. Durch Struktur-Funktionsanalysen konnten die funktionellen Gruppen und Bereiche des Cholesterinmoleküls ermittelt werden, die für die hochaffine Ligandenbindung des OT-Rezeptors von Bedeutung sind. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde das funktionelle photoreaktive 6,6-Azocholestanol synthetisiert, das den gereinigten OT-Rezeptor markierte und bereits von Thiele *et al.* zur Identifizierung Cholesterin-bindender Proteine in synaptischen Vesikeln verwendet wurde. Herrn Diplom-Chemiker Volker Wiegand aus der Arbeitsgruppe von Prof. Fahrenholz gelang darüber hinaus die Synthese eines funktionellen fluoreszierenden Cholesterinderivats (Cholestanol-6-Dansylhydrazon). Damit kann nun z. B. der in der Literatur beschriebene Einfluss von Progesteron auf die Cholesterinverteilung in Zellen *in vivo* untersucht werden. Das fluoreszierende Cholesterinderivat hat somit einen großen Vorteil gegenüber Filipin, das cytotoxisch ist und nur an fixierten Präparaten eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse der Struktur-Funktionsanalysen werden auch die Grundlage zur Synthese von Detergenzien bilden. Ziel ist hierbei, den OT-Rezeptor unter Erhaltung der hochaffinen Ligandenbindung zu solubilisieren, so dass der Zusatz von Cholesterin/M $\beta$ CD-Komplexen bei der Proteinreinigung überflüssig werden würde. Mit solchen neuen Detergenzien sollen erneut Experimente zur Anreicherung des menschlichen OT-Rezeptors durchgeführt werden. Parallel hierzu wird Dr. Kiefer (Universität Hohenheim) versuchen, den bereits in *E. coli* überexprimierten und gereinigten OT-Rezeptor funktionell zu rekonstituieren.

Ein weiteres wichtiges Ziel bleibt die Aufklärung der Mechanismen, durch die Progesteron die Liganden-induzierten Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren beeinflusst. Experimente dieser Arbeit zeigen, dass Progesteron rasch, nicht-genomisch und reversibel auf einer der Ligand-Rezeptor-Interaktion nachgeschalteten Ebene der Signaltransduktion wirkt. Die hierfür wichtigen Bereiche des Progesterons konnten ermittelt werden, und die Information aus diesen Struktur-Funktionsanalysen wird für die Synthese eines fluoreszierenden Progesteronderivats genutzt werden. Dieses Derivat soll zur Untersuchung der subzellulären Verteilung von Progesteron verwendet werden. Es ist zum Beispiel denkbar, dass sich Progesteron in Membranen des endoplasmatischen Retikulums anreichert und dort  $IP_3$ -gesteuerte Calciumkanäle beeinflusst, oder dass sich die beobachteten zelltypspezifischen Unterschiede der Progesteronwirkung in einer unterschiedlichen Progesteronverteilung widerspiegeln. Ein weiterer möglicher Mechanismus, über den Progesteron die Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren beeinflussen könnte, ist die Veränderung der Cholesterinverteilung in der Zelle und insbesondere die Reduktion des Cholesteringehaltes der Caveolae (Abbildung 62). Zum einen sind in diesen cholesterinreichen Subdomänen der Plasmamembran zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und weitere Proteine der Signalkaskaden angereichert, und zum anderen hängen, wie ich zeigen konnte, die Calciumsignale vieler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren von Cholesterin ab. In diesem Zusammenhang sollen in Zukunft Steroltransporter wie das P-Glycoprotein und der ABC1-Transporter als (mögliche) Interaktionspartner für Progesteron in Betracht gezogen werden. Die nachgewiesene Progesteronbindung an das P-Glycoprotein stimuliert dessen ATPase-Aktivität, inhibiert jedoch dessen Transportfunktion. Sollte Progesteron über das P-Glycoprotein und eine dadurch veränderte Cholesterinverteilung auf die Calciumsignale wirken, so müssten andere Inhibitoren des P-Glycoproteins (z. B. PSC833) gleiche Effekte wie Progesteron haben. Desweiteren soll untersucht werden, ob eine induzierte Überexpression der Cholesterin-Efflux-Pumpe ABC1 den Progesteroneffekt beeinflusst.



**Abbildung 62: Möglicher Zusammenhang zwischen dem Einfluss von Progesteron auf den intrazellulären Cholesterintransport und der Abschwächung Liganden-induzierter Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren**

Indem Progesteron zahlreiche Schritte des intrazellulären Cholesterintransports inhibiert (s. auch Abbildung 4), wird der Cholesteringehalt cholesterinreicher Mikrodomänen (Caveolae, Rafts) der Plasmamembran verringert. Durch die Abhängigkeit Liganden-induzierter Calciumsignale G-Protein-gekoppelter Rezeptoren von Cholesterin, könnte Progesteron auf diese Weise die Calciumantworten der Zellen abschwächen.

ACAT = Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase, CE = Cholesterinester, Chol = Cholesterin (⊖), ER = endoplasmatisches Retikulum, HMG-CoA-Red = Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, LDL = low density lipoprotein,  $OTR_H$  = hochaffiner OT-Rezeptor,  $OTR_L$  = niederaffiner OT-Rezeptor, R = LDL-Rezeptor.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommen in allen Organismen außer Bakterien vor. Sollte Progesteron die z. B. durch den Paarungs-Faktor  $\alpha$  induzierte Signaltransduktion in Hefezellen beeinflussen, würde das für ein allgemeingültiges Regulationsprinzip sprechen. Durch die gut erforschte Genetik dieser Organismen würde außerdem die Suche nach unbekanntem Interaktionspartnern für Progesteron erleichtert werden.

Fünfundsiebzig Jahre sind vergangen, seit Gorter und Grendel postulierten, dass biologische Membranen aus Lipiddoppelschichten bestehen [171]. Durch eine Fülle von Studien erkennen wir heute die vielfältigen Aufgaben von Membranlipiden in ihrer Rolle als Strukturgeber, Signalmoleküle und Modulatoren von Membranproteinen. Neuere Ergebnisse über nicht-genomische Wirkungen von Steroidhormonen lassen zusätzliche Mechanismen erahnen, über die Steroidhormone selbst Signalkaskaden einleiten, Lipidverteilungen verändern oder in Signaltransduktionsprozesse von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eingreifen.



## Literaturverzeichnis

- 1 Eckert, R., Randall, D., and Augustine, G. (1993) *Tierphysiologie*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- 2 Vaughan, M. (1998) G protein-coupled receptors minireview series. *J.Biol.Chem.* **273**: 17297
- 3 Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M. and Schertler, G.F. (1997) Arrangement of rhodopsin transmembrane  $\alpha$ -helices. *Nature* **389**: 203-206
- 4 Mizobe, T., Maze, M., Lam, V., Suryanarayana, S. and Kobilka, B.K. (1996) Arrangement of transmembrane domains in adrenergic receptors. Similarity to bacteriorhodopsin. *J.Biol.Chem.* **271**: 2387-2389
- 5 Schertler, G.F., Villa, C. and Henderson, R. (1993) Projection structure of rhodopsin. *Nature* **362**: 770-772
- 6 Krauss, G. (1999) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- 7 Gimpl, G. and Fahrenholz, F. (2000) The oxytocin-receptor system: structure, function and regulation. *Physiol.Rev.*(im Druck)
- 8 Ji, T.H., Grossmann, M. and Ji, I. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J.Biol.Chem.* **273**: 17299-17302
- 9 Gether, U. and Kobilka, B.K. (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J.Biol.Chem.* **273**: 17979-17982
- 10 Farrens, D.L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W.L. and Khorana, H.G. (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* **274**: 768-770
- 11 Probst, W.C., Snyder, L.A., Schuster, D.I., Brosius, J. and Sealfon, S.C. (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* **11**: 1-20
- 12 Hamm, H.E. (1998) The many faces of G protein signaling. *J.Biol.Chem.* **273**: 669-672
- 13 Klages, B., Brandt, U., Simon, M.I., Schultz, G. and Offermanns, S. (1999) Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J.Cell Biol.* **144**: 745-754
- 14 Voyno, Y.T., Conklin, B.R., Gilbert, R.L., Hooley, R., Bourne, H.R. and Barber, D.L. (1994)  $G_{\alpha 13}$  stimulates  $Na^+H^+$  exchange. *J.Biol.Chem.* **269**: 4721-4724
- 15 Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and  $\beta$ -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J.Biol.Chem.* **273**: 18677-18680
- 16 Luttrell, L.M., Daaka, Y., Della, R.G. and Lefkowitz, R.J. (1997) G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. *J.Biol.Chem.* **272**: 31648-31656
- 17 Daaka, Y., Luttrell, L.M., Ahn, S., Della, R.G., Ferguson, S.S., Caron, M.G. et al. (1998) Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* **273**: 685-688

- 18 Tuppy, H. and Michl, H. (1953) Über die chemische Struktur des Oxytocins. *Monatsh.Chem.* **84**: 1011
- 19 Du Vigneaud, V., Ressler, C. and Trippett, S. (1953) The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J.Biol.Chem.* **205**: 949-957
- 20 Clapham, D.E. and Neer, E.J. (1993) New roles for G-protein  $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365**: 403-406
- 21 Watson, S. and Arkininstall, S. (1994) *The G-protein linked receptor Facts Book*, Academic Press Limited, London
- 22 Anonymous(1990) *Psyhyrembel - Klinisches Wörterbuch*, Walter deGruyter, Berlin, New York
- 23 Milad, M., Sullivan, W., Diehl, E., Altmann, M., Nordeen, S., Edwards, D.P. et al. (1995) Interaction of the progesterone receptor with binding proteins for FK506 and cyclosporin A. *Mol.Endocrinol.* **9**: 838-847
- 24 Slayden, O.D., Rubin, J.S., Lacey, D.L. and Brenner, R.M. (2000) Effects of keratinocyte growth factor in the endometrium of rhesus macaques during the luteal-follicular transition. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **85**: 275-285
- 25 Wehling, M. (1997) Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu.Rev.Physiol.* **59**: 365-393
- 26 Schreiber, J.R., Hsueh, A.J. and Baulieu, E.E. (1983) Binding of the anti-progestin RU-486 to rat ovary steroid receptors. *Contraception* **28**: 77-85
- 27 Wasserman, W.J., Pinto, L.H., O'Connor, C.M. and Smith, L.D. (1980) Progesterone induces a rapid increase in  $[Ca^{2+}]_{in}$  of *Xenopus laevis* oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **77**: 1534-1536
- 28 Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Maggi, M., Francavilla, S., Gabriele, A. et al. (1999) Nongenomic progesterone receptor on human spermatozoa: biochemical aspects and clinical implications. *Steroids* **64**: 143-148
- 29 Bonaccorsi, L., Krausz, C., Pecchioli, P., Forti, G. and Baldi, E. (1998) Progesterone-stimulated intracellular calcium increase in human spermatozoa is protein kinase C-independent. *Mol.Hum.Reprod.* **4**: 259-268
- 30 Luconi, M., Krausz, C., Barni, T., Vannelli, G.B., Forti, G. and Baldi, E. (1998) Progesterone stimulates p42 extracellular signal-regulated kinase (p42erk) in human spermatozoa. *Mol.Hum.Reprod.* **4**: 251-258
- 31 Meyer, C., Schmid, R., Scriba, P.C. and Wehling, M. (1996) Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur.J.Biochem.* **239**: 726-731
- 32 Buddhikot, M., Falkenstein, E., Wehling, M. and Meizel, S. (1999) Recognition of a human sperm surface protein involved in the progesterone-initiated acrosome reaction by antisera against an endomembrane progesterone binding protein from porcine liver. *Mol.Cell Endocrinol.* **158**: 187-193
- 33 Rapid responses to steroid hormones. 1st International meeting. Mannheim, Germany, September 18-20, 1998. Abstracts. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 106(6), A39-A61. 1998.
- 34 Grazzini, E., Guillon, G., Mouillac, B. and Zingg, H.H. (1998) Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone [see comments]. *Nature* **392**: 509-512
- 35 Liscum, L. and Munn, N.J. (1999) Intracellular cholesterol transport. *Biochim.Biophys.Acta* **1438**: 19-37

- 36 Qian, X.D. and Beck, W.T. (1990) Progesterone photoaffinity labels P-glycoprotein in multidrug-resistant human leukemic lymphoblasts. *J.Biol.Chem.* **265**: 18753-18756
- 37 Ambudkar, S.V. (1995) Purification and reconstitution of functional human P-glycoprotein. *J.Bioenerg.Biomembr.* **27**: 23-29
- 38 Garrigos, M., Mir, L.M. and Orłowski, S. (1997) Competitive and non-competitive inhibition of the multidrug-resistance-associated P-glycoprotein ATPase--further experimental evidence for a multisite model. *Eur.J.Biochem.* **244**: 664-673
- 39 Yeagle, P.L. (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim.Biophys.Acta* **822**: 267-287
- 40 Harris, J.S., Epps, D.E., Davio, S.R. and Kezdy, F.J. (1995) Evidence for transbilayer, tail-to-tail cholesterol dimers in dipalmitoylglycerophosphocholine liposomes. *Biochemistry* **34**: 3851-3857
- 41 Lange, Y., Echevarria, F. and Steck, T.L. (1991) Movement of zymosterol, a precursor of cholesterol, among three membranes in human fibroblasts. *J.Biol.Chem.* **266**: 21439-21443
- 42 Fielding, P.E. and Fielding, C.J. (1995) Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* **34**: 14288-14292
- 43 Smart, E.J., Ying, Y., Donzell, W.C. and Anderson, R.G. (1996) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J.Biol.Chem.* **271**: 29427-29435
- 44 Norum, K.R., Lilljeqvist, A.C. and Drevon, C.A. (1977) Coenzyme-A-dependent esterification of cholesterol in intestinal mucosa from guinea-pig. Influence of diet on the enzyme activity. *Scand.J.Gastroenterol.* **12**: 281-288
- 45 Civen, M., Leeb, J., Hill, M. and Sekhon, S. (1984) Effects of excess dietary cholesterol on adrenal cholesterol accumulation and steroidogenesis. *J.Steroid Biochem.* **20**: 893-899
- 46 Lange, Y., Ye, J. and Steck, T.L. (1998) Circulation of cholesterol between lysosomes and the plasma membrane. *J.Biol.Chem.* **273**: 18915-18922
- 47 Lange, Y. (1994) Cholesterol movement from plasma membrane to rough endoplasmic reticulum. Inhibition by progesterone. *J.Biol.Chem.* **269**: 3411-3414
- 48 Lange, Y. and Steck, T.L. (1994) Cholesterol homeostasis. Modulation by amphiphiles. *J.Biol.Chem.* **269**: 29371-29374
- 49 Metherall, J.E., Waugh, K. and Li, H. (1996) Progesterone inhibits cholesterol biosynthesis in cultured cells. Accumulation of cholesterol precursors. *J.Biol.Chem.* **271**: 2627-2633
- 50 Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731
- 51 Op den Kamp, J.A.F. (1979) Lipid asymmetry in membranes. *Annu.Rev.Biochem.* **48**: 47-71
- 52 Devaux, P.F. (1991) Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* **30**: 1163-1173
- 53 Boesze-Battaglia K., Clayton, S.T. and Schimmel, R.J. (1996) Cholesterol redistribution within human platelet plasma membrane: evidence for a stimulus-dependent event. *Biochemistry* **35**: 6664-6673
- 54 Schroeder, F. and Nemezc, G. (1990) Transmembrane cholesterol distribution. In "Advances in Cholesterol Research", pp. 47-87, Esfahani, M. and Swaney, J. (eds.), Telford Press, West Caldwell, NJ

- 55 Boesze-Battaglia K. and Schimmel, R. (1997) Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. *J.Exp.Biol.* **200**: 2927-2936
- 56 Backer, J.M. and Dawidowicz, E.A. (1981) Transmembrane movement of cholesterol in small unilamellar vesicles detected by cholesterol oxidase. *J.Biol.Chem.* **256**: 586-588
- 57 Schroeder, F. and Wood, W.G. (1995) Lateral lipid domains and membrane function. In "Cell Physiology Source Book", pp. 36-44, Sperelakis, N. (ed.), Academic Press, San Diego
- 58 Simons, K. and van Meer, G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**: 6197-6202
- 59 Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572
- 60 Harder, T. and Simons, K. (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**: 534-542
- 61 Kurzchalia, T.V. and Parton, R.G. (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**: 424-431
- 62 Murata, M., Peränen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V. and Simons, K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**: 10339-10343
- 63 Shaul, P.W. and Anderson, R.G. (1998) Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am.J.Physiol.* **275**: L843-L851
- 64 Anderson, R.G.W. (1998) The caveolae membrane system. *Annu.Rev.Biochem.* **67**: 199-225
- 65 Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E. and Lisanti, M.P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J.Biol.Chem.* **273**: 5419-5422
- 66 Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T. and Lisanti, M.P. (1997) Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J.Biol.Chem.* **272**: 6525-6533
- 67 Isshiki, M., Ando, J., Korenaga, R., Kogo, H., Fujimoto, T., Fujita, T. et al. (1998) Endothelial Ca<sup>2+</sup> waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**: 5009-5014
- 68 Uittenbogaard, A., Ying, Y. and Smart, E.J. (1998) Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J.Biol.Chem.* **273**: 6525-6532
- 69 Fielding, C.J. and Fielding, P.E. (1997) Intracellular cholesterol transport. *J.Lipid Res.* **38**: 1503-1521
- 70 Klein, U. and Fahrenholz, F. (1994) Reconstitution of the myometrial oxytocin receptor into proteoliposomes. Dependence of oxytocin binding on cholesterol. *Eur.J.Biochem.* **220**: 559-567
- 71 Galzi, J.L., Revah, F., Bessis, A. and Changeux, J.P. (1991) Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **31**: 37-72
- 72 Giraudat, J., Montecucco, C., Bisson, R. and Changeux, J.P. (1985) Transmembrane topology of acetylcholine receptor subunits probed with photoreactive phospholipids. *Biochemistry* **24**: 3121-3127
- 73 Blanton, M.P. and Wang, H.H. (1990) Photoaffinity labeling of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor with an aryl azide derivative of phosphatidylserine. *Biochemistry* **29**: 1186-1194

- 74 Fernandez-Ballester, G., Castresana, J., Fernandez, A.M., Arrondo, J.L., Ferragut, J.A. and Gonzalez-Ros, J.M. (1994) A role for cholesterol as a structural effector of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **33**: 4065-4071
- 75 Dalziel, A.W., Rollins, E.S. and McNamee, M.G. (1980) The effect of cholesterol on agonist-induced flux in reconstituted acetylcholine receptor vesicles. *FEBS Lett.* **122**: 193-196
- 76 Sunshine, C. and McNamee, M.G. (1992) Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of neutral and negatively charged lipids. *Biochim.Biophys.Acta* **1108**: 240-246
- 77 Ochoa, E.L., Dalziel, A.W. and McNamee, M.G. (1983) Reconstitution of acetylcholine receptor function in lipid vesicles of defined composition. *Biochim.Biophys.Acta* **727**: 151-162
- 78 Criado, M., Eibl, H. and Barrantes, F.J. (1984) Functional properties of the acetylcholine receptor incorporated in model lipid membranes. Differential effects of chain length and head group of phospholipids on receptor affinity states and receptor-mediated ion translocation. *J.Biol.Chem.* **259**: 9188-9198
- 79 Fong, T.M. and McNamee, M.G. (1986) Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes. *Biochemistry* **25**: 830-840
- 80 Ellena, J.F., Blazing, M.A. and McNamee, M.G. (1983) Lipid-protein interactions in reconstituted membranes containing acetylcholine receptor. *Biochemistry* **22**: 5523-5535
- 81 Arias, H.R., Sankaram, M.B., Marsh, D. and Barrantes, F.J. (1990) Effect of local anaesthetics on steroid-nicotinic acetylcholine receptor interactions in native membranes of *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochim.Biophys.Acta* **1027**: 287-294
- 82 Fong, T.M. and McNamee, M.G. (1987) Stabilization of acetylcholine receptor secondary structure by cholesterol and negatively charged phospholipids in membranes. *Biochemistry* **26**: 3871-3880
- 83 Artigues, A., Villar, M.T., Fernandez, A.M., Ferragut, J.A. and Gonzalez-Ros, J.M. (1989) *Biochim.Biophys.Acta* **985**: 325-330
- 84 Middlemas, D.S. and Raftery, M.A. (1987) Identification of subunits of acetylcholine receptor that interact with a cholesterol photoaffinity probe. *Biochemistry* **26**: 1219-1223
- 85 Corbin, J., Wang, H.H. and Blanton, M.P. (1998) Identifying the cholesterol binding domain in the nicotinic acetylcholine receptor with [<sup>125</sup>I]azido-cholesterol. *Biochim.Biophys.Acta* **1414**: 65-74
- 86 Simmonds, A.C., East, J.M., Jones, O.T., Rooney, E.K., McWhirter, J. and Lee, A.G. (1982) Annular and non-annular binding sites on the (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-ATPase. *Biochim.Biophys.Acta* **693**: 398-406
- 87 Jones, O.T. and McNamee, M.G. (1988) Annular and nonannular binding sites for cholesterol associated with the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **27**: 2364-2374
- 88 Narayanaswami, V. and McNamee, M.G. (1993) Protein-lipid interactions and *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor function. 2. Membrane fluidity and ligand-mediated alteration in the accessibility of  $\gamma$  subunit cysteine residues to cholesterol. *Biochemistry* **32**: 12420-12427
- 89 Fernandez, A.M., Fernandez-Ballester, G., Ferragut, J.A. and Gonzalez-Ros, J.M. (1993) Labeling of the nicotinic acetylcholine receptor by a photoactivatable steroid probe: effects of cholesterol and cholinergic ligands. *Biochim.Biophys.Acta* **1149**: 135-144
- 90 Addona, G.H., Sandermann, H., Kloczewiak, M.A., Husain, S.S. and Miller, K.W. (1998) Where does cholesterol act during activation of the nicotinic acetylcholine receptor? *Biochim.Biophys.Acta* **1370**: 299-309

- 91 Stryer, L. (1986) Cyclic GMP cascade of vision. *Annu.Rev.Neurosci.* **9**: 87-119
- 92 Straume, M. and Litman, B.J. (1987) Influence of cholesterol on equilibrium and dynamic bilayer structure of unsaturated acyl chain phosphatidylcholine vesicles as determined from higher order analysis of fluorescence anisotropy decay. *Biochemistry* **26**: 5121-5126
- 93 Straume, M. and Litman, B.J. (1988) Equilibrium and dynamic bilayer structural properties of unsaturated acyl chain phosphatidylcholine-cholesterol-rhodopsin recombinant vesicles and rod outer segment disk membranes as determined from higher order analysis of fluorescence anisotropy decay. *Biochemistry* **27**: 7723-7733
- 94 Mitchell, D.C., Straume, M., Miller, J.L. and Litman, B.J. (1990) Modulation of metarhodopsin formation by cholesterol-induced ordering of bilayer lipids. *Biochemistry* **29**: 9143-9149
- 95 Boesze-Battaglia K. and Albert, A.D. (1990) Cholesterol modulation of photoreceptor function in bovine retinal rod outer segments. *J.Biol.Chem.* **265**: 20727-20730
- 96 Attwood, P.V. and Gutfreund, H. (1980) The application of pressure relaxation to the study of the equilibrium between metarhodopsin I and II from bovine retinas. *FEBS Lett.* **119**: 323-326
- 97 Albert, A.D., Young, J.E. and Yeagle, P.L. (1996) Rhodopsin-cholesterol interactions in bovine rod outer segment disk membranes. *Biochim.Biophys.Acta* **1285**: 47-55
- 98 Boesze-Battaglia K., Hennessey, T. and Albert, A.D. (1989) Cholesterol heterogeneity in bovine rod outer segment disk membranes. *J.Biol.Chem.* **264**: 8151-8155
- 99 Boesze-Battaglia K. and Albert, A.D. (1992) Phospholipid distribution among bovine rod outer segment plasma membrane and disk membranes [letter]. *Exp.Eye Res.* **54**: 821-823
- 100 Albert, A.D., Boesze-Battaglia K., Paw, Z., Watts, A. and Epand, R.M. (1996) Effect of cholesterol on rhodopsin stability in disk membranes. *Biochim.Biophys.Acta* **1297**: 77-82
- 101 Dowling, J.E. and Sidman, R.L.S. (1962) Inherited retinal dystrophy in the rat. *J.Cell Biol.* **14**: 73-109
- 102 Boesze-Battaglia K., Organisciak, D.T. and Albert, A.D. (1994) RCS rat retinal rod outer segment membranes exhibit different cholesterol distributions than those of normal rats. *Exp.Eye Res.* **58**: 293-300
- 103 Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K. and Pitha, J. (1989) Differential effects of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur.J.Biochem.* **186**: 17-22
- 104 Klein, U., Gimpl, G. and Fahrenholz, F. (1995) Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with  $\beta$ -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* **34**: 13784-13793
- 105 Kelley, R.I. and Hennekam, R.C. (2000) The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J.Med.Genet.* **37**: 321-335
- 106 Morris, J.A. and Carstea, E.D. (1998) Niemann-Pick C disease: cholesterol handling gone awry. *Mol.Med.Today* **4**: 525-531
- 107 Scott, J. (1999) Heart disease. Good cholesterol news [news]. *Nature* **400**: 816-7,819
- 108 Gura, T. (1999) Gene linked to faulty cholesterol transport [news]. *Science* **285**: 814-815
- 109 Gut, S.H., Demoliou-Mason, C.D., Hunter, J.C., Hughes, J. and Barnard, E.A. (1989) Solubilization and characterisation of the cholecystokininB binding site from pig cerebral cortex. *Eur.J.Pharmacol.* **172**: 339-346

- 110 Thiele, C. and Fahrenholz, F. (1993) Photoaffinity labeling of central cholecystokinin receptors with high efficiency. *Biochemistry* **32**: 2741-2746
- 111 Windaus, A. (1909) Über die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. *Ber.dt.Chem.Ges.* **42**: 238-246
- 112 Gimpl, G., Burger, K. and Fahrenholz, F. (1997) Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* **36**: 10959-10974
- 113 Wessel, D. and Flügge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal.Biochem.* **138**: 141-143
- 114 Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**: 248-254
- 115 Bligh, E.D. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 911-917
- 116 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- 117 Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P. and Hancock, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal.Biochem.* **118**: 197-203
- 118 Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**: 5463-5467
- 119 King, L.A. and Possee, R.D. (1992) *The Baculovirus Expression System*, Chapman & Hall, London
- 120 Klein, U. (1994) *Proteinchemische Untersuchungen am Oxytocin-Rezeptor aus dem Myometrium*, (Dissertation), Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- 121 El Yandouzi, E.H. and Le Grimellec, C. (1992) Cholesterol heterogeneity in the plasma membrane of epithelial cells. *Biochemistry* **31**: 547-551
- 122 Kramer, W. and Kurz, G. (1983) Photolabile derivatives of bile salts. Synthesis and suitability for photoaffinity labeling. *J.Lipid Res.* **24**: 910-923
- 123 Iredale, P.A. and Dickenson, J.M. (1995) Measurement of Intracellular Free Calcium Ion Concentration in Cell Populations Using Fura-2. In "Methods in Molecular Biology, Vol. 41: Signal Transduction Protocols", pp. 203-213, Kendall, D.A. and Hill, S.J. (eds.), Humana Press Inc., Totowa, N.J.
- 124 Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J.Biol.Chem.* **260**: 3440-3450
- 125 Ohtaki, T., Ogi, K., Masuda, Y., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Kitada, C. et al. (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 *Sf 9* insect cells. *J.Biol.Chem.* **273**: 15464-15473
- 126 Doi, T., Hiroaki, Y., Arimoto, I., Fujiyoshi, Y., Okamoto, T., Satoh, M. et al. (1997) Characterization of human endothelin B receptor and mutant receptors expressed in insect cells. *Eur.J.Biochem.* **248**: 139-148
- 127 O'Reilly, D.R., Miller, L.K., and Luckow, V.A. (1992) *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, W.H. Freeman and Company, New York

- 128 George, S.T., Arbabian, M.A., Ruoho, A.E., Kiely, J. and Malbon, C.C. (1989) High-efficiency expression of mammalian  $\beta$ -adrenergic receptors in baculovirus-infected insect cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **163**: 1265-1269
- 129 Kobilka, B.K. (1995) Amino and carboxyl terminal modifications to facilitate the production and purification of a G protein-coupled receptor. *Anal.Biochem.* **231**: 269-271
- 130 Gimpl, G., Klein, U., Reiländer, H. and Fahrenholz, F. (1995) Expression of the human oxytocin receptor in baculovirus-infected insect cells: high-affinity binding is induced by a cholesterol-cyclodextrin complex. *Biochemistry* **34**: 13794-13801
- 131 Kusui, T., Hellmich, M.R., Wang, L.H., Evans, R.L., Benya, R.V., Battey, J.F. et al. (1995) Characterization of gastrin-releasing peptide receptor expressed in *Sf 9* insect cells by baculovirus. *Biochemistry* **34**: 8061-8075
- 132 Aeed, P.A. and Elhammer, A.P. (1994) Glycosylation of recombinant prorenin in insect cells: the insect cell line *Sf 9* does not express the mannose 6-phosphate recognition signal. *Biochemistry* **33**: 8793-8797
- 133 Kimura, T., Makino, Y., Bathgate, R., Ivell, R., Nobunaga, T., Kubota, Y. et al. (1997) The role of N-terminal glycosylation in the human oxytocin receptor. *Mol.Hum.Reprod.* **3**: 957-963
- 134 Prickett, K.S., Amberg, D.C. and Hopp, T.P. (1989) A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques* **7**: 580-589
- 135 Summers, M.D. and Smith, G.E. (1987) *A manual for methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures*, Texas Agric. Exp. Stn. Bull. 1555,
- 136 Kimura, T., Makino, Y., Saji, F., Takemura, M., Inoue, T., Kikuchi, T. et al. (1994) Molecular characterization of a cloned human oxytocin receptor. *Eur.J.Endocrinol.* **131**: 385-390
- 137 Kojro, E., Hackenberg, M., Zsigo, J. and Fahrenholz, F. (1991) Identification and enzymatic deglycosylation of the myometrial oxytocin receptor using a radioiodinated photoreactive antagonist. *J.Biol.Chem.* **266**: 21416-21421
- 138 Hackenberg, M. (1987) *Biochemische Untersuchungen an Oxytocin-Rezeptoren des Meerschweinchenuterus: Strukturwirkungsbeziehungen, Affinitätsmarkierung, Solubilisierung*, (Diplomarbeit), Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- 139 Gimpl, G. and Fahrenholz, F. (2000) Human oxytocin receptors in cholesterol-rich vs. cholesterol-poor microdomains of the plasma membrane. *Eur.J.Biochem.* **267**: 2483-2497
- 140 Pearlmutter, A.F. and Soloff, M.S. (1979) Characterization of the metal ion requirement for oxytocin-receptor interaction in rat mammary gland membranes. *J.Biol.Chem.* **254**: 3899-3906
- 141 Kiefer, H., Krieger, J., Olszewski, J.D., Von, H.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
- 142 Gimpl, G., Anders, J., Thiele, C. and Fahrenholz, F. (1996) Photoaffinity labeling of the human brain cholecystokinin receptor overexpressed in insect cells. Solubilization, deglycosylation and purification. *Eur.J.Biochem.* **237**: 768-777
- 143 Clejan, S., Bittman, R., Deroo, P.W., Isaacson, Y.A. and Rosenthal, A.F. (1979) Permeability properties of sterol-containing liposomes from analogues of phosphatidylcholine lacking acyl groups. *Biochemistry* **18**: 2118-2125

- 144 Bittman, R. and Blau, L. (1972) The phospholipid-cholesterol interaction. Kinetics of water permeability in liposomes. *Biochemistry* **11**: 4831-4839
- 145 Mukherjee, S., Zha, X., Tabas, I. and Maxfield, F.R. (1998) Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophys.J.* **75**: 1915-1925
- 146 Gimpl, G., Burger, K., Politowska, E., Ciarkowski, J. and Fahrenholz, F. (2000) Oxytocin receptors and cholesterol: interaction and regulation. *Exp.Physiol.* **85S**: 41S-49S
- 147 Cimino, M., Vantini, G., Algeri, S., Curatola, G., Pezzoli, C. and Stramentinoli, G. (1984) Age-related modification of dopaminergic and  $\beta$ -adrenergic receptor system: restoration to normal activity by modifying membrane fluidity with S-adenosylmethionine. *Life Sci.* **34**: 2029-2039
- 148 Heron, D.S., Shinitzky, M., Hershkowitz, M. and Samuel, D. (1980) Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **77**: 7463-7467
- 149 Pang, L., Graziano, M. and Wang, S. (1999) Membrane cholesterol modulates galanin-GalR2 interaction. *Biochemistry* **38**: 12003-12011
- 150 Murphy, C.R. and Dwarthe, D.M. (1987) Increase in cholesterol in the apical plasma membrane of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat. *Acta Anat.Basel.* **128**: 76-79
- 151 Church, R.F.R., Kende, A.S. and Weiss, M.J. (1965) Diazirines. I. Some observations on the scope of the ammonia-hydroxylamine-O-sulfonic acid diaziridine synthesis. The preparation of certain steroid diaziridines and diazirines. *J.Am.Chem.Soc.* **87**: 2665-2671
- 152 Thiele, C., Hannah, M.J., Fahrenholz, F. and Huttner, W.B. (2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles [see comments]. *Nat.Cell Biol.* **2**: 42-49
- 153 Taylor, F.R., Kandutsch, A.A., Anzalone, L., Phirwa, S. and Spencer, T.A. (1988) Photoaffinity labeling of the oxysterol receptor. *J.Biol.Chem.* **263**: 2264-2269
- 154 Marcil, M., Brooks, W.A., Clee, S.M., Roomp, K., Zhang, L.H., Yu, L. et al. (1999) Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet* **354**: 1341-1346
- 155 Burger, K., Fahrenholz, F. and Gimpl, G. (1999) Non-genomic effects of progesterone on the signaling function of G protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* **464**: 25-29
- 156 Chew, C.S., Safsten, B. and Flemstrom, G. (1998) Calcium signaling in cultured human and rat duodenal enterocytes. *Am.J.Physiol.* **275**: G296-G304
- 157 Larocca, J.N., Rodriguez, G.A., Rashbaum, W.K., Weidenheim, K.M. and Lyman, W.D. (1995) Muscarinic receptor-dependent activation of phospholipase C in human fetal central nervous system organotypic tissue culture. *Brain Res.* **701**: 135-141
- 158 Marceau, F., Barabe, J., St.Pierre S. and Regoli, D. (1980) Kinin receptors in experimental inflammation. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* **58**: 536-542
- 159 Marc, S., Leiber, D. and Harbon, S. (1988) Fluoroaluminates mimic muscarinic- and oxytocin-receptor-mediated generation of inositol phosphates and contraction in the intact guinea-pig myometrium. Role for a pertussis/cholera-toxin-insensitive G protein. *Biochem.J.* **255**: 705-713
- 160 Valera, S., Ballivet, M. and Bertrand, D. (1992) Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**: 9949-9953

- 161 Ling, V. (1992) Charles F. Kettering Prize. P-glycoprotein and resistance to anticancer drugs. *Cancer* **69**: 2603-2609
- 162 Debry, P., Nash, E.A., Neklason, D.W. and Metherall, J.E. (1997) Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol esterification. *J.Biol.Chem.* **272**: 1026-1031
- 163 Bielefeldt, K., Waite, L., Abboud, F.M. and Conklin, J.L. (1996) Nongenomic effects of progesterone on human intestinal smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* **271**: G370-G376
- 164 Smith, R., Chan, E.C., Bowman, M.E., Harewood, W.J. and Phippard, A.F. (1993) Corticotropin-releasing hormone in baboon pregnancy. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **76**: 1063-1068
- 165 Simpson, E.R. and Burkhardt, M.F. (1980) Acyl CoA:cholesterol acyl transferase activity in human placental microsomes: inhibition by progesterone. *Arch.Biochem.Biophys.* **200**: 79-85
- 166 Swanston, I.A., McNatty, K.P. and Baird, D.T. (1977) Concentration of prostaglandin F<sub>2α</sub> and steroids in the human corpus luteum. *J.Endocrinol.* **73**: 115-122
- 167 Einspanier, A., Jurdzinski, A. and Hodges, J.K. (1997) A local oxytocin system is part of the luteinization process in the preovulatory follicle of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Biol.Reprod.* **57**: 16-26
- 168 Lioutas, C., Einspanier, A., Kascheike, B., Walther, N. and Ivell, R. (1997) An autocrine progesterone positive feedback loop mediates oxytocin upregulation in bovine granulosa cells during luteinization. *Endocrinology* **138**: 5059-5062
- 169 Takemura, M., Kimura, T., Nomura, S., Makino, Y., Inoue, T., Kikuchi, T. et al. (1994) Expression and localization of human oxytocin receptor mRNA and its protein in chorion and decidua during parturition. *J.Clin.Invest.* **93**: 2319-2323
- 170 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
- 171 Gorter, E. and Grendel, F. (1925) On bimolecular layers of lipids on the chronocytes of the blood. *J.Exp.Med.* **41**: 439-443

## Sachverzeichnis

- #
- β-adrenerger Rezeptor ..... 127
- α-Bungarotoxin ..... 156
- β-Östradiol ..... 168, 170
- β-Sitosterol ..... 120
- I**
- 1,2-Diacylglycerin ..... 10
- 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien (DPH) ..... 27, 69
- 11-Hydroxyprogesteron ..... 168
- 1321N1-Zellen ..... 32, 129, 153
- 4**
- 4-Cholesten-3-on ..... 121, 122, 123
- 5**
- 5β-Dihydroprogesteron ..... 153
- Einfluss ..... 162
- Einfluss auf Ligand-Rezeptor-Interaktion .. 162
- Einfluss auf Membranfluidität ..... 163
- Einfluss auf spannungsabhängige  
        Calciumströme ..... 174
- 5-Cholesten ..... 113
- 5-Cholesten-3-on ..... 113
- 6**
- 6,6-Azo-cholestan-[3α-<sup>3</sup>H]-3β-ol
- Autoradiogramm ..... 137
- Strukturformel ..... 138
- Synthese ..... 66
- 6,6-Azo-cholestan-3β-ol ..... 64
- Dünnschichtchromatographie,  
        Absorptionsspektrum, Massenspektrum 136
- EC<sub>50</sub>-Wert bei solubilisiertem  
        Oxytocinrezeptor ..... 140
- Eigenschaften ..... 134
- Halbwertszeit ..... 138
- Herstellung der hochaffinen Ligandenbindung  
        des Oxytocinrezeptors ..... 139
- Strukturformel ..... 135
- Synthese ..... 64
- 6-Ketocholestanol ..... 121
- A**
- ABC-Superfamilie ..... 13
- ABC-Transporter ..... 152
- Absorptionsmessungen ..... 35
- Abtreibungspille ..... 13
- Acetylcholinrezeptor, muscarinischer ..... 156
- Acetylcholinrezeptor, nikotinischer ..... 19, 156
- Interaktion mit Cholesterin ..... 20
- Progesteronbindung ..... 173
- AcMNPV ..... 76
- Acrosomenreaktion ..... 13, 167
- Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase ..... 181
- Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT)  
    ..... 15
- Agonist ..... 6
- inverser ..... 6
- partieller ..... 7
- Aluminiumfluorid ..... 164
- Aminophospholipidtranslokase ..... 17
- Anisotropie ..... 123
- Anisotropie *r*
- Bestimmung ..... 69
- Anisotropiemessung ..... 69

- Anti-FLAG<sup>®</sup> M1-Affinitätschromatographie 58, 106
- Elutionsmöglichkeiten ..... 106
- Arrestin ..... 8
- B**
- Baculoviren ..... 75
- C**
- Calciumantwort ..... 155
- Calmodulin ..... 10
- Campesterol ..... 120, 123
- Carbachol ..... 156
- Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation 45
- Caveolae ..... 18
- Entstehung von Calciumsignalen ..... 19
- Rolle im Cholesterintransport ..... 19
- Caveolin ..... 18, 152
- Wechselwirkung mit Proteinen der  
    Signalkaskaden ..... 18
- CHAPSO ..... 89
- CHO-K1-Zellen ..... 32, 153, 154
- Cholecystokinin<sub>B</sub>-Rezeptor ..... 112
- Cholestanol-6-Dansylhydrazon ..... 179
- Cholesterin
- Dimerbildung ..... 14, 120
- Einfluss auf Membranfluidität ..... 15
- Einfluss auf Sekundärstrukturen von Proteinen  
    ..... 21
- flip-flop ..... 18
- Interaktion mit Phospholipiden ..... 14
- intrazellulärer Transport ..... 15, 181
- laterale Verteilung in Membran ..... 18
- Membrandicke und -permeabilität ..... 15
- molares Verhältnis zu Phospholipiden ..... 14
- Schutz für Proteine vor thermischer  
    Denaturierung ..... 21
- Cholesterin/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexe .61
- Cholesterinbestimmung ..... 37
- Cholesterinbindungsstelle ..... 126
- Cholesterinhemisuccinat ..... 84
- Cholesterinoxidase ..... 63
- Cholesterinquellen der Zelle ..... 15
- cholesterol-efflux regulatory protein (CERP) .. 152
- Cholesterylethylether ..... 121, 122, 123
- CHO-OTR-Zellen ..... 32, 153
- chorio-deziduales Gewebe ..... 175
- Clathrin ..... 8
- computergestütztes „Modeling“ ..... 126
- Coprostanol ..... 121
- Corpus luteum ..... 12, 175
- Cyclodextrine ..... 60
- Cycloheximid ..... 161
- Cytostatika ..... 173
- D**
- Deferoxamin ..... 165
- Dehydroepiandrosteron (DHEA) ..... 168, 170
- Dehydroergosterol ..... 121
- Dekahistidin-tag ..... 78
- denaturierende Reinigung ..... 58, 147
- Desmosterol ..... 120, 122, 123
- Digitonin ..... 25, 112
- Dihydrocholesterol ..... 121, 122
- Dihydroprogesteron ..... 168

Dimaprit .....	157	Untereinheiten .....	7
DNA .....	46	G-Protein-gekoppelter Rezeptor, GPCR	
Agarosegelelektrophorese .....	47	basale Aktivität .....	6
alkalische Denaturierung .....	48	Ligandenklassen .....	6
Auffüllreaktion .....	47	Ligand-Rezeptor-Interaktion .....	6
Konzentrationsbestimmung .....	49	Merkmale .....	4
Ligation .....	47	physiologische Wirkung .....	11
Phosphorylierung .....	46	Rezeptoraktivierung .....	7
Sequenzierung .....	48	Rezeptorkonformationen .....	6
Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid .....	90	signal switching .....	8
DRY-Motiv .....	7	Signalabschaltung, Desensibilisierung .....	8
Dünnschichtchromatographie .....	38	Granulosazellen .....	175
<b>E</b>		Guanidinhydrochlorid .....	147
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	32, 42	<b>H</b>	
Herstellung kompetenter Zellen .....	42	Harnstoff .....	147
Kultivierung .....	42	HDL-Defizienz .....	152
Transformation .....	42	HEK293 $\underline{S}$ -Zellen (suspensionsadaptiert) .....	179
Einbaurate eines Steroids .....	116, 118	HEK293-Zellen .....	32, 87, 129, 153
Epicholesterol .....	121, 123	HEK-CCKR-Zellen .....	32, 130, 153
Epicoprostanol .....	121	HEK-OTR-Zellen .....	32, 129, 153
Ergosterol .....	121	HEK-V $_1$ R-Zellen .....	32, 130, 153
<b>F</b>		Hill-Koeffizient .....	125
Filipin .....	64	HMG-CoA-Reduktase .....	16
FLAG-Epitop .....	78	Hormone .....	3
fluid mosaic model .....	17	Hybridomazelllinie .....	33
Fucosterol .....	120	Hydrocortison .....	168
Fura-2/AM .....	72	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase .....	181
<b>G</b>		Hydroxysterole .....	120, 122
Galaninrezeptor 2 (GalR2) .....	128	<b>I</b>	
G-Proteine, heterotrimere .....	7	Iminodiessigsäure .....	95
Subfamilien .....	7	Inositol-1,4,5-Trisphosphat .....	10

**K**

- Keratinocyten-Wachstumsfaktor ..... 12  
 kooperative Bindung ..... 125

**L**

- Lanosterol ..... 121, 170  
 Lektin-Chromatographie ..... 59, 109  
 Lektine ..... 109  
 Ligandenbindungsstudien ..... 70  
 Lipidasymmetrie ..... 17  
 Lipidomänen ..... 20  
   "annulare" Bindungsstellen ..... 20  
   "interstitial sites" ..... 20  
   "nichtannulare" Bindungsstellen ..... 20  
   "periannular sites" ..... 20  
   bulk lipids ..... 20  
 Lipidextraktion ..... 37  
 low density lipoprotein ..... 181  
 Luteinisierungsprozess ..... 175

**M**

- Membranpräparation ..... 54  
 Metallchelate-Affinitätschromatographie ..... 56, 95  
   Elutionsmethoden ..... 97  
   Matrices ..... 97  
   Parameter ..... 96  
 Metallchelate-Affinitätschromatographie  
   Zusammenfassung der Ergebnisse ..... 104  
 multidrug resistance ..... 173  
 Multiplizität der Infektion (MOI) ..... 52  
 Myoepithelzelle ..... 10  
   Kontraktion ..... 10  
 Myosin ..... 10

**N**

- N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosamin ..... 60, 109  
 Neurophysin ..... 9  
 Niemann-Pick-C-Krankheit ..... 16  
 Nitrilotriessigsäure ..... 95  
 Nukleokapsid ..... 75

**O**

- Oxytocin ..... 9  
   Struktur ..... 9  
   Wirkungen ..... 10  
 Oxytocinrezeptor  
   Aminosäuresequenz ..... 5  
   Einfluss von Cholesterin auf  
     Dissoziationskonstante ..... 23  
   Einfluss von Imidazol ..... 99  
   Einfluss von Nickel- und Cobaltionen ..... 97  
   Expression in HEK293-Zellen ..... 87  
   Expression in Insektenzellen und Einfluss von  
     Cholesterin ..... 81  
   Expression in *Sf9*-Zellen ..... 75  
   Glycosylierung in Insektenzellen ..... 82  
   Interaktion mit Cholesterin ..... 23  
   Reinigungsversuche (Zusammenfassung) ... 110  
   Rekonstitution ..... 23  
   Rezeptordichte und Dissoziationskonstante in  
     HEK293-Zellen ..... 87  
   Rezeptordichte und Dissoziationskonstante in  
     *Sf9*-Zellen ..... 86  
   Signaltransduktion ..... 10  
   Solubilisierungsversuche ..... 89  
   thermische Stabilität ..... 94  
   Zeitverlauf der Expression in Insektenzellen 81

**P**

- Paarungs-Faktor  $\alpha$  ..... 181  
 Palmitoylierung ..... 4

pFlagMychOTR .....	78	Einfluss auf spannungsabhängige	
P-Glycoprotein .....	13, 173	Calciumströme .....	174
Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat .....	10	genomische Wirkungen .....	12
Phospholipase .....	10	genomische Wirkungen, Kennzeichen .....	12
Phosphorimager .....	69	Hormone Responsive Element .....	12
Photoaffinitätsmarkierung .....	68, 141	Inhibierung des intrazellulären	
Bestrahlung .....	68	Cholesterintransports .....	13, 16
Detektion der Radioaktivität .....	68	Konzentration in Plasma oder	
gereinigter Oxytocinrezeptor .....	150	nichtsteroidogenen Geweben .....	175
Membranen .....	141	Konzentration in steroidogenen Geweben .....	175
Membranen mit anschließender		nicht-genomische Wirkungen .....	13
denaturierender Reinigung .....	144	nicht-gnomische Wirkungen, Kennzeichen .....	14
WGA-Eluat .....	149	Progesteron-induzierte Calciumsignale .....	167
Zusammenfassung und Diskussion .....	151	Struktur-Funktionsanalyse .....	171, 172
Pirenzepin .....	156	Proteinbestimmung .....	36
Plaque-Assay .....	52	Proteinfällung .....	35
Plasmid-DNA .....	43	Proteinkinasen .....	8
Isolierung .....	43	PSC833 .....	180
Reinigung .....	45	Puffer .....	33
Polyhedrin .....	75	pVLMelFlagOTRHis <sub>10</sub> .....	28, 49, 77, 78, 79
Präpromellitin .....	77	<b>Q</b>	
Pregnenolon .....	113, 168, 170	Quecksilberdampfampe .....	68
Progesteron		<b>R</b>	
Einfluss auf Aluminiumfluorid-induzierte -		Raft .....	18
Calciumsignale .....	164	Restriktionshydrolyse .....	46
Einfluss auf Caveolae .....	16	Rhodopsin .....	21
Einfluss auf Cholesterin-Veresterung .....	16	Inaktivierung durch Cholesterin .....	21
Einfluss auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren		Royal College of Surgeons-Rattenstamm .....	22
.....	153	RU486 .....	13, 14, 170
Einfluss auf HMG-CoA-Reduktase .....	16	<b>S</b>	
Einfluss auf Liganden-induzierte		Scatchard-Gleichung .....	71
Calciumsignale .....	159	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	39
Einfluss auf Ligand-Rezeptor-Interaktion ..	162		
Einfluss auf Membranfluidität .....	163, 173		
Einfluss auf P-Glycoprotein .....	174		

Sehzelle .....	22	Synaptophysin.....	152
Cholesteringehalt der Scheibchen .....	22	<b>T</b>	
Phosphatidylethanolamingehalt der		Trophoblast.....	175
Scheibchen.....	22	<b>V</b>	
Serpentinrezeptoren.....	4	V <sub>2</sub> Vasopressinrezeptor.....	128
<i>Sf</i> 9-Zellen.....	32, 75	Virustiter .....	52
Adaption an Cholesterin.....	84	<b>W</b>	
Cholesterinauxotrophie .....	77	Weizenkeim-Agglutinin (WGA) .....	109
Lyse .....	77	Western-Blotting.....	40
posttranslationale Modifikationen .....	76	<b>Z</b>	
Silberfärbung.....	40	Zellkultur .....	50
Solubilisierung .....	55	Bestimmung von Zelldichten .....	50
photoaffinitätsmarkierte Membranen .....	144	Kryokonservierung.....	50
Sphingomyelinase .....	63	Säugetierzellen.....	53
Steroid/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexe .....	60	<i>Sf</i> 9-Insektenzellen .....	50
Stigmasterol .....	113, 120	Zellkulturmedien.....	34
Struktur-Funktionsanalyse		Ziele der Arbeit.....	24
Cholesterin .....	113		
Progesteron.....	170		

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Gimpl, G., Burger, K. and Fahrenholz, F. (1997) Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* **36**: 10959 – 10974

Burger, K., Fahrenholz, F. and Gimpl, G. (1999) Non-genomic effects of progesterone on the signaling function of G protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* **464**: 25 – 29

Gimpl, G., Burger, K., Politowska, E., Ciarkowski, J. and Fahrenholz, F. (2000) Oxytocin receptors and cholesterol: interaction and regulation. *Exp. Physiol.* **85**: 41 – 50

Burger, K., Gimpl, G. and Fahrenholz, F. (2000) Regulation of receptor function by cholesterol (Review). *Cell Mol. Life Sci.* **57**: 1577 - 1592

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Mainz, 11.10.2000

Katja Burger