
**Expression humaner
Muskarin-Rezeptoren in dem
Schleimpilz *Dictyostelium discoideum***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Von Holger Kramm
aus Limburg an der Lahn

Frankfurt am Main (2002)



Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Dictyostelium discoideum	1
1.1.1	Vegetative Wachstumsphase	2
1.1.2	Entwicklungsphase	5
1.1.3	Dictyostelium discoideum in der Biotechnologie	12
1.2	Muskarin-Rezeptoren	14
1.2.1	Allgemeine Rezeptorstruktur und Ligandenbindung	15
1.2.2	Muskarin-Rezeptor-Subtypen	17
1.2.3	Wechselwirkung zwischen Rezeptor und G-Protein	20
1.2.4	Regulation der Rezeptoraktivität	22
1.2.5	Therapeutische Aspekte	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Arbeitsgeräte und sonstige Materialien	25
2.1.3	Allgemeine Lösungen und Puffer	26
2.2	Oligonukleotide	27
2.2.1	PCR-Primer	27
2.2.2	Sequenzierprimer	29
2.3	Medien	29
2.4	Mikroorganismen	30
2.4.1	Bakterienstämme	30
2.4.2	Dictyostelium-discoideum-Stämme	31
2.5	Allgemeine Molekularbiologische Methoden	31
2.5.1	CaCl ₂ -Transformation von Bakterien	31
2.5.2	Bakterielle Elektroporation	32
2.5.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	32
2.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.5.5	Western-Blot-Analyse	34
2.5.6	DNA Sequenzierung	34

2.6	Dictyostelium discoideum	35
2.6.1	Kultivierung	35
2.6.2	Transformation	35
2.6.3	Anlegen von DMSO-Gefrierstocks	36
2.6.4	Präparation von Gesamt RNA	36
2.6.5	Northern-Blot-Analyse	37
2.6.6	Membranpräparation	38
2.7	Radioliganden-Bindungsstudien	39
2.8	Messung der β-Galaktosidaseaktivität	41
2.8.1	Versuche mit aggregationskompetenten Zellen	42
2.8.2	Versuche mit differenzierenden Zellen	42
2.9	Aktinpolymerisation	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Expressionsplasmide	45
3.1.1	Plasmide mit Aktin-15-Promotor, ohne Signalsequenz	48
3.1.2	Plasmide mit Discoidin-Promotor, ohne Signalsequenz	50
3.1.3	Plasmide mit Aktin-15-Promotor, mit Signalsequenz	51
3.1.4	Plasmide mit Discoidin-Promotor, mit Signalsequenz	52
3.1.5	Plasmide mit Ras-Promotor, mit Signalsequenz	53
3.2	Expression des M1-Rezeptors	55
3.3	Expression des M3-Rezeptors	62
3.4	Expression des M4-Rezeptors	67
3.5	Expression des M5-Rezeptors	73
3.6	Übersicht über die Expressionsergebnisse	75
3.7	Rezeptor-Effektor-Kopplung	76
3.7.1	Stimulation der GBF-abhängigen Genexpression	76
3.7.2	Beeinflussung der Dictyostelium-discoideum-Differenzierung	82
3.7.3	Beeinflussung der Aktinpolymerisation	83
4	Diskussion	86
4.1	Rezeptorexpression	86
4.1.1	Einfluss des Expressionsstammes	86
4.1.2	Einfluss der Promotoren und des Signalpeptids	87
4.1.3	Glykosylierung/ Stabilität der Transformation	90
4.2	Rezeptor-Effektor-Kopplung	94

5	<i>Zusammenfassung</i>	96
6	<i>Literatur</i>	98
7	<i>Lebenslauf und Publikationen</i>	112

Abbildungen

Abbildung 1: Lebenszyklus von <i>Dictyostelium discoideum</i>	4
Abbildung 2: Signaltransduktion während der Aggregation	7
Abbildung 3: Signaltransduktion während der Postaggregation	9
Abbildung 4: Zelltypen in <i>Dictyostelium discoideum</i>	11
Abbildung 5: Struktur der Muskarin-Rezeptoren	17
Abbildung 6: Die Expressionsvektoren <i>pDXA-3C</i> und <i>pDXD-3C</i>	45
Abbildung 7: Der Expressionsvektor <i>pER III</i>	47
Abbildung 8: Northern-Blot, <i>pDXA-3Cm1</i>	56
Abbildung 9: Northern-Blot, <i>pDXD-3Cm1</i>	56
Abbildung 10: Northern-Blot, <i>pDXA-L3Cm1</i> (1-3) und <i>pDXD-L3Hm1</i> (4-5)	56
Abbildung 11: Northern-Blot, <i>pDA-L3Cm1</i>	56
Abbildung 12: Northern-Blot, <i>pDD-L3Cm1</i>	57
Abbildung 13: Northern-Blot, <i>pAM1</i>	57
Abbildung 14: Northern-Blot, <i>pER III m1</i>	57
Abbildung 15: <i>pDXA-L3Cm1</i> , Präparation von Ganzzellen	59
Abbildung 16: <i>pDXA-L3Cm1</i> , Präparation von Membranen	60
Abbildung 17: <i>pDA-L3Cm1</i> , Präparation von Ganzzellen	60
Abbildung 18: Northern-Blot, <i>pDXA-L3Cm3</i> (1-4) und <i>pDA-L3Cm3</i> (5-7)	62
Abbildung 19: Northern-Blot, <i>pDXD-L3Hm3</i> (1-4) und <i>pDD-L3Cm3</i> (5-7)	62
Abbildung 20: <i>pDXA-L3Cm3</i> , Präparation von Ganzzellen	65
Abbildung 21: <i>pDA-L3Cm3</i> , Präparation von Ganzzellen	65
Abbildung 22: <i>pDXD-L3Hm3</i> , Präparation von Ganzzellen	66
Abbildung 23: <i>pDA-L3Cm3</i> , Präparation von Ganzzellen, Konkurrenzexperiment	66
Abbildung 24: Northern-Blot, <i>pDXA-3Cm4</i>	68
Abbildung 25: Northern-Blot, <i>pDXD-3Cm4</i>	68
Abbildung 26: Northern-Blot, <i>pDXA-L3C m4</i> (1-2) und <i>pDA-L3C m4</i> (3-5)	68
Abbildung 27: Northern-Blot, <i>pDD-L3Cm4</i> (1) und <i>pDXD-L3Hm4</i> (2-5)	68
Abbildung 28: <i>pDXA-L3Cm4</i> , Präparation von Ganzzellen	70
Abbildung 29: <i>pDA-L3Cm4</i> , Präparation von Ganzzellen	70
Abbildung 30: <i>pDA-L3Cm4</i> , Präparation von Membranen	71
Abbildung 31: Northern-Blot, <i>pDXA-3Cm5</i>	73
Abbildung 32: Northern-Blot, <i>pDXD-3Cm5</i>	73
Abbildung 33: Northern-Blot, <i>pDXA-L3Cm5</i> (1-3) und <i>pDA-L3Cm5</i> (4-5)	74
Abbildung 34: Northern-Blot, <i>pDXD-L3Hm5</i> (1-2) und <i>pDD-L3Cm5</i> (3-5)	74

Abbildung 35: Präparation von Ganzzellen einer Mehrfachtransformanden, Radioligandenbindung zum Nachweis des M2-Rezeptorproteins	79
Abbildung 36: Western-Blot zum Nachweis der humanen G-Protein-Untereinheit bei Mehrfachtransformanden.	80
Abbildung 37: Aktivität der β -Galaktosidase	81
Abbildung 38, F-Aktinanteil nach durch Stimulation mit cAMP	85
Abbildung 39: F-Aktinanteil nach durch Stimulation mit Muskarin	85

Tabellen

Tabelle 1: Rezeptor-Subtypen unterschiedlicher Spezies	19
Tabelle 2: Biochemisches Profil der Muskarin-Rezeptor-Subtypen	19
Tabelle 3: Lokalisation der Muskarin-Rezeptor-Subtypen	19
Tabelle 4: Affinitätskonstanten muskarinergere Antagonisten ($-\log K_i$ in M)	20
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Expressionsplasmide	54
Tabelle 6: Vergleich der K_D -Werte für M1	59
Tabelle 7: Vorversuch mit AX2 Transformande, Plasmid pDDL-3Cm1 in AX2	61
Tabelle 8: Vergleich der K_D - und pK_i -Werte für M3	64
Tabelle 9: Vergleich der K_D -Werte für M4	69
Tabelle 10: Vorversuch mit Transformande, Plasmid pDDL-3Cm4 in AX2	72
Tabelle 11: Glykosylierungsstellen G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren	93

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ACA	Adenylatzyklase
ATP (analog: CTP, GTP, TTP)	Adenosintriphosphat
β -ME	β -Mercaptoethanol
BP	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cAR	CAMP-Rezeptor
cDNA	DNA-Kopie eines mRNA-Moleküls
Cpm	Impulse pro Minute
CRAC	Zytosolischer Regulator der Adenylatzyklase
CSA	Contact site A

Abkürzung	Bedeutung
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
GITC	Guanidiniumisothiozyanat
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor
Hepes	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
KB	Kilobasenpaare
mA	Milliampere
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MES	Morpholinoethansulfonsäure
Met	Methionin
mRNA	Messenger RNA
NMS	N-Methylscopolamin
NSB	Nicht-sättigbare Bindung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf9	Spodoptera frugiperda
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TB	Totale Bindung
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro minute
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1 Einleitung

1.1 *Dictyostelium discoideum*

Mit der Entdeckung von *Dictyostelium mucoroides* Sporen in Pferdedung durch Oskar Brefeld im Jahre 1869 (Brefeld, 1869) begann die Forschung über die Dictyosteliidae. Der zelluläre Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* wurde zuerst im Jahre 1935 beschrieben (Raper, 1935) und ist der am besten untersuchte Vertreter der Dictyosteliidae, deren phylogenetische Einordnung allerdings bis heute umstritten ist. So gruppieren Loomis und Smith (Loomis and Smith, 1990; Loomis and Smith, 1995) *Dictyostelium discoideum* aufgrund von Proteinvergleichen evolutionär zwischen *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* ein. Baldauf und Doolittle (Baldauf and Doolittle, 1997) kommen jedoch aufgrund, ausgedehnter Protein- und RNA-Vergleiche zu dem Ergebnis, dass die Dictyosteliidae in einem phylogenetischen Stammbaum nicht zwischen den echten Pilzen und *C. elegans* einzuordnen sind, sondern vor den echten Pilzen. Die beiden Autoren haben in ihre Untersuchungen - im Gegensatz zu Loomis und Smith - eine große Gruppe an verwandten Organismen mit einbezogen. Demzufolge haben sich die echten Pilze wie *S. cerevisiae* evolutionär wahrscheinlich später von der Entwicklung des Tierreiches abgetrennt und stehen diesem näher als die echten Schleimpilze und die zellulären Schleimpilze wie *Dictyostelium discoideum*. Die Schleimpilze wiederum stehen dem Pflanzenreich näher als dem Tierreich. Zu diesem Ergebnis kommt auch eine Arbeit von Angata et al. aufgrund von Untersuchungen mitochondrialer DNA (Angata et al., 1995).

Der natürliche Lebensraum von *D. discoideum* sind humusreiche Waldböden in gemäßigten Breitengraden. Als Nahrungsquelle für Wildtypzellen dienen phagozytierte Bakterien und andere Organismen geringerer Größe, Laborstämme können sich hingegen auch durch Pinozytose von Flüssigmedium ernähren. Bei ausreichendem Nahrungsangebot leben die Zellen als amöboid bewegliche Einzeller. Ihre Beweglichkeit erhalten sie durch die Ausbildung von Pseudopodien, die durch Aktin- und Myosinfilamente gebildet werden.

Das haploide Genom von *D. discoideum* ist 34 MB groß und besteht zu 77 % aus A und T. Es enthält etwa 8.000-10.000 Gene, die in 6 Chromosomen (Parent and Devreotes, 1996;

Loomis and Kuspa, 1997) organisiert sind. Im Rahmen eines internationalen Forschungsprojektes soll dieses Genom in den nächsten Jahren komplett entschlüsselt werden.

1.1.1 Vegetative Wachstumsphase

Den Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum* kann man in zwei Abschnitte unterteilen: Die vegetative Wachstumsphase als Einzeller mit Vermehrung durch Zellteilung alle 8 - 12 Stunden und die Entwicklungsphase, die durch Ausbildung und Differenzierung eines vielzelligen Organismus aus diesen Einzellern gekennzeichnet ist (Parent and Devreotes, 1996). Die vegetative Phase wird aufrechterhalten, solange ein ausreichendes Nahrungsangebot vorhanden ist.

Dictyostelium-discoideum-Zellen bestimmen die Menge an Nahrungsangebot zum einen über einen membranständigen Rezeptor, der die Konzentration an Folsäure und verwandten Pteridinen in der Umgebung (Greiner et al., 1992) misst. Diese Verbindungen sind Stoffwechselprodukte von Bakterien und zeigen somit das Ausmaß des Nahrungsangebotes an. Binden Pteridine an den Rezeptor, so werden die Enzyme Adenylatzyklase und Guanylatzyklase aktiviert und die „second messenger“ cAMP und cGMP gebildet. Durch Polymerisation von Aktin-Filamenten sind die *D.-discoideum*-Zellen in der Lage, sich chemotaktisch auf die jeweilige Nahrungsquelle hin zu bewegen (Parent and Devreotes, 1996).

Zum anderen ist *Dictyostelium discoideum* in der Lage, die Anzahl seiner unmittelbaren Nachbarzellen zu bestimmen. Alle Zellen in der vegetativen Phase produzieren fortlaufend ein „Prestarvation factor“ (PSF) genanntes, 68 kDa großes Glykoprotein (Rathi et al., 1991; Loomis, 1996). PSF akkumuliert ohne abgebaut zu werden und dient dadurch als Indikator für die jeweils erreichte Zelldichte.

Wird ein kritisches Verhältnis von Nahrungsangebot zu Zelldichte erreicht, so kommt es zur sogenannten „Prestarvation response“, das heißt zur Expression von PSF-abhängigen Genen. Wichtige Gene sind diejenigen für Discoidin- I_{γ} und für den cAMP Rezeptor 1 (cAR 1) sowie weitere, für die frühe Aggregation (siehe nächsten Abschnitt) benötigte Gene (Clarke and Gomer, 1995). Befinden sich die Zellen erst einmal im Hungerzustand, so werden weitere Faktoren sezerniert, um die Zelldichte zu messen. Eines dieser Moleküle ist der „Conditioned medium factor“ (CMF), ein 80 kDa großes Protein. CMF wird zwar bereits von vegetativen Zellen produziert, aber erst unter Hungerbedingungen sezerniert

(Clarke and Gomer, 1995). Obwohl CMF für Chemotaxis und Aggregation benötigt wird, ist er nicht an der Regulation der Expression von Molekülen der Signaltransduktionskette beteiligt (Yuen et al., 1995).

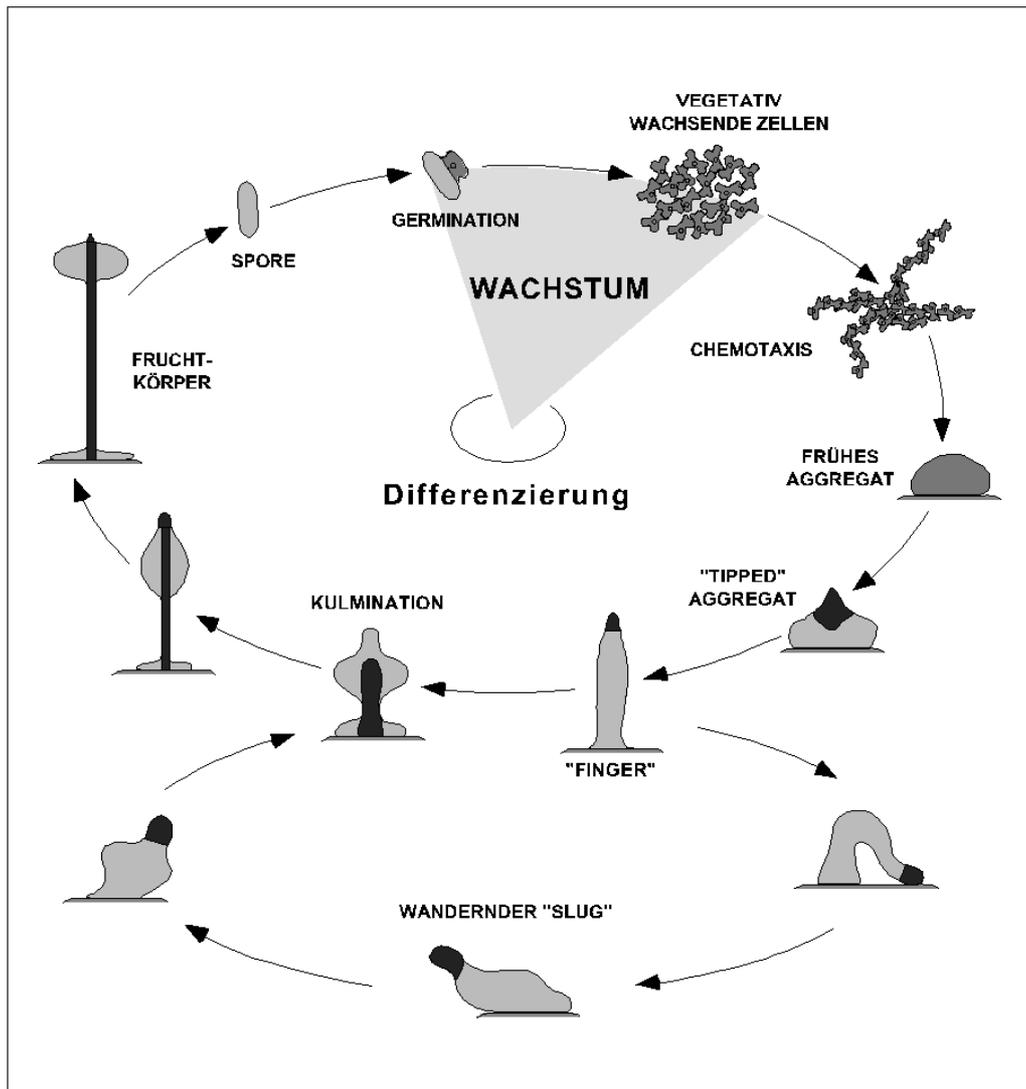


Abbildung 1: Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum*

Der Lebenszyklus von *D. discoideum* beginnt mit der Ausbringung keimfähiger Sporen. Diese vermehren sich als Einzelzellen vegetativ, solange das Nahrungsangebot groß genug ist. Bei Nahrungsmangel wird die Vermehrung gestoppt und die Zellen durchlaufen innerhalb von 24 Stunden einen kompletten Entwicklungszyklus über die verschieden stark ausdifferenzierten Aggregate bis hin zum fertigen Fruchtkörper. Statt direkt zur terminalen Differenzierung überzugehen, können *Dictyostelium discoideum* Zellen auch eine gewisse Zeit als sogenannter "migrating slug" umherwandern. Die Entscheidung darüber, welcher Weg beschritten wird, hängt vor allem von der Menge an protoniertem Ammonium im Zellinneren ab. Hohe Konzentrationen an unprotoniertem NH_3 begünstigen die slug-Phase, niedrige Konzentrationen an NH_3 begünstigen den Übergang zur Kulminierung (Gross, 1994). Eine Azidifizierung im Zellinneren kann also die Kulmination induzieren. Das Verhalten des wandernden slugs wird zusätzlich durch äußere Einflüsse wie Licht und Wärme beeinflusst.

Die durch diese Vorgänge eingeleitete Entwicklung vom Einzeller zum ausdifferenzierten Organismus kann man bei *D. discoideum* in 4 Abschnitte unterteilen: Aggregation, Postaggregation, Zelltypspezialisierung und terminale Differenzierung (Loomis, 1996).

Während der Entwicklungsphase gibt es weder Zellteilung (Firtel, 1995) noch Replikation von Kern-DNA (Shaulsky and Loomis, 1995), wohl aber Replikation mitochondrialer DNA

1.1.2 Entwicklungsphase

- **Aggregation**

Während der Aggregationsphase werden die meisten Prozesse über Sekretion und Detektion von extrazellulärem cAMP gesteuert. Dieses wird zunächst nur von wenigen sogenannten Schrittmacherzellen sezerniert und bindet an die bereits erwähnten cAMP 1 Rezeptoren benachbarter Zellen. Diese leiten das Signal dann zum einen durch eigene Sekretion von cAMP an entfernter liegende Zellen weiter, zum anderen bewegen sie sich auf die cAMP-Quelle hin. Die Sekretion von cAMP geschieht pulsatil alle 5 – 7 Minuten. Während dieser Zeit sind die Zellen durch weiteres cAMP nicht mehr erregbar, da die Rezeptoren desensibilisiert sind (Parent and Devreotes, 1996). Eine Phosphodiesterase inaktiviert während der Refraktärphase das extrazelluläre cAMP. Dadurch wird eine Akkumulation des Liganden mit einhergehender dauerhafter Desensibilisierung des Rezeptors verhindert. Durch 25 bis 30 Pulse hat sich etwa 6 Stunden nach Beginn des Nahrungsentzuges ein Aggregat aus ca. 10^5 Zellen gebildet (Loomis, 1996).

Die zellulären Antworten auf die chemotaktische Stimulation durch cAMP sind sehr vielfältig. Zum einen wird über den Rezeptor die Transkription verschiedener Gene, die an der Aggregation beteiligt sind, initiiert bzw. verstärkt und die Transkription nicht benötigter Gene unterdrückt. Zu den sogenannten „Puls-induzierten Genen“ zählen neben demjenigen für cAR 1 selbst die Gene für die Phosphodiesterase, für die $G_{\alpha 2}$ -Untereinheit, für die Adenylat- und Guanylatzyklasen und andere (Loomis, 1996). Zum anderen werden verschiedene „second messenger“-Systeme durch Stimulation von cAR 1 aktiviert. Dies führt letztlich zu Chemotaxis und Signalweitergabe. Zu diesen „second messenger“-Systemen zählen unter anderem die Phospholipase-C und die Adenylatzyklase, die für die cAMP-Generierung und damit die Signalweitergabe an Nachbarzellen essentiell ist. Guanylatzyklase und Calciuminflux sind wesentlich an der Chemotaxis beteiligt (Devreotes, 1994; Parent and Devreotes, 1996).

Alle zellulären Reaktionen auf cAMP werden in dieser Phase der Entwicklung über den bereits erwähnten Rezeptor cAR 1 vermittelt, dieser kann jedoch bei höher nanomolaren

Konzentrationen des Liganden durch den Subtyp 3 ersetzt werden, welcher ebenfalls in dieser Entwicklungsphase exprimiert wird (Insall et al., 1994b). Die beiden anderen, bei *Dictyostelium* gefundenen cAMP-Rezeptoren cAR 2 und cAR 4 werden erst während der Differenzierungsphase gebildet (Saxe III et al., 1993; Louis et al., 1994).

Die Stimulation von cAR 1 führt zur Dissoziation der $G_{\alpha 2}$ -Untereinheit von der G_{β} -Untereinheit des G-Proteins. Man kennt acht verschiedene α -Untereinheiten (Kumagai et al., 1989; Pupillo et al., 1989; Hadwiger et al., 1991; Wu and Devreotes, 1991; Wu et al., 1994), aber nur eine β -Untereinheit (Lilly et al., 1993; Wu et al., 1995) bei *D. discoideum*. Eine γ -Untereinheit konnte man bisher nicht finden. Sowohl die $G_{\alpha 2}$ -Untereinheit als auch die G_{β} -Untereinheit aktivieren dann nachgelagerte Komponenten der Signaltransduktion (Parent and Devreotes, 1996). Die von der α -Untereinheit abgetrennte β -Untereinheit bindet an ein lösliches Protein, den „cytosolic regulator of adenylyl cyclase“ (CRAC) (Lilly and Devreotes, 1994). Neben CRAC und der β -Untereinheit des G-Proteins ist auch noch die MAP-Kinase ERK2 an der Aktivierung der Adenylatzyklase A beteiligt (Insall et al., 1994a; Segall et al., 1995). Zusätzlich zur Adenylatzyklase A (Aggregation), die Ähnlichkeiten mit Adenylatzyklasen bei Säugern aufweist, bildet *D. discoideum* noch zwei weitere Adenylatzyklasen während der „slug“-Phase (ACB) (Meima and Schaap, 1999) und während der Entwicklungsphase, die „adenylyl cyclase germination“ (ACG) (Pitt et al., 1992).

Außer den G-Protein-vermittelten Reaktionen gibt es auch Rezeptor-vermittelte, aber G-Protein-unabhängige zelluläre Antworten, eine Tatsache, die man lange Zeit für ausgeschlossen hielt (Chen et al., 1996). Der erste derartige Prozess, der in *Dictyostelium discoideum* beschrieben wurde, ist der bereits erwähnte cAR 1-abhängige Einstrom von Calciumionen (Milne et al., 1995), aber auch die Aktivierung der MAP-Kinase ERK 2 erfolgt unabhängig von G-Proteinen (Maeda et al., 1996).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ausgehend von einer Hungerinduktion nanomolare cAMP-Pulse über die Stimulation von cAR 1-/ cAR 3-Rezeptoren zu einer koordinierten Ausbildung eines vielzelligen Aggregates führen. Dies bedeutet, dass aus zuvor voneinander unabhängigen Zellen innerhalb von lediglich 5 bis 6 Stunden ein Organismus bestehend aus etwa 10^5 Zellen entstanden ist. Einen Überblick über die an diesem Prozess beteiligten Komponenten gibt die folgende Abbildung.

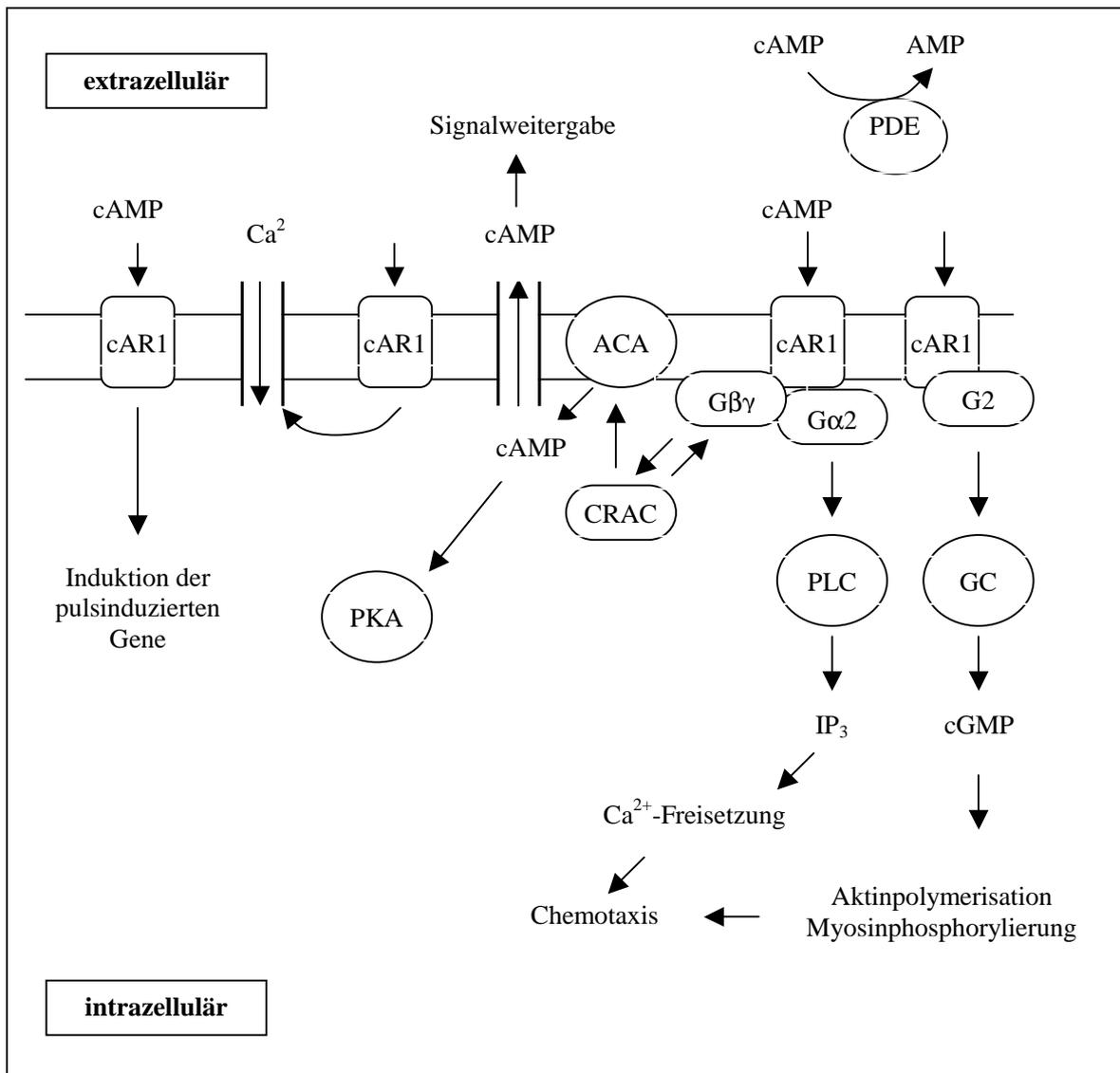


Abbildung 2: Signaltransduktion während der Aggregation

Die Stimulation der cAMP-Rezeptoren cAR 1 oder cAR 3 führt zu verschiedenen Reaktionen im Zellinneren. Unabhängig von G-Proteinen kommt es zum Calciumeinstrom und zur Tyrosinphosphorylierung der MAP-Kinase ERK 2. Die Expression der sogenannten pulsinduzierten Gene beginnt. Vermittelt über die G-Protein-Untereinheiten β und α_2 werden die „second messenger“ cAMP, cGMP und IP₃ gebildet, die schließlich zu Chemotaxis und Signalweitergabe führen.

Abkürzungen:

ACA: Adenylatzyklase A, AMP: Adenosinmonophosphat, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, cAR 1: cAMP Rezeptor Subtyp 1, cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat, CRAC: zytosolischer Regulator der Adenylatzyklase, GC: Guanylatzyklase, G2: G-Protein mit der α -Untereinheit 2; G α_2 : G-Protein α -2 Untereinheit, G $\beta\gamma$: G-Protein β -Untereinheit mit vermuteter γ -Untereinheit, IP₃: Inositol-1,4,5,-triphosphat, PDE: Phosphodiesterase, PKA: Proteinkinase A, PLC: Phospholipase C

- **Postaggregation**

Etwa 6–8 Stunden nach Beginn des Nahrungszuges haben die Zellen ein frühes Aggregat und eine Art Hügel, den sogenannten „mound“ gebildet (Abbildung 1). Dieser Zeitpunkt ist eine bedeutende Wendemarke in der Entwicklungsphase von *D. discoideum*, da er den Übergang von einem einfachen, multizellulären Organismus zu einem Organismus mit unterschiedlichen Zelltypen markiert. Diese Zelltypen sind die direkten Vorläufer der später ausdifferenzierten Zellen.

Beginnend mit dem Zeitpunkt, an dem sich der „mound“ bildet, steigen die extrazellulären cAMP-Spiegel auf mikromolare Konzentrationen an (Abe and Yanagisawa, 1983; Firtel, 1995), und die Freisetzung geschieht nicht mehr pulsatil sondern kontinuierlich. Dieser cAMP-Anstieg ist das entscheidende Signal für den Wechsel zur Postaggregationsphase bei *D. discoideum*. Hierdurch wird nämlich die Expression der pulsinduzierten Gene unterdrückt und die Expression der postaggregativen und nachfolgend der zelltypspezifischen Gene induziert (Firtel, 1996). Eine Ausnahme davon bildet das Gen für cAR 1 selbst. Dieses wird auch während der Postaggregation und den nachfolgenden Phasen exprimiert.

Die Expression der sogenannten „primary late genes“ *gbfA*, *lagC*, *rasD* und *gpaD*, die als erstes während der Postaggregation erscheinen, wird über den durch hohe cAMP-Level stimulierten Rezeptor cAR 1 vermittelt (Dynes et al., 1994; Schnitzler et al., 1994; Schnitzler et al., 1995; Firtel, 1996; Aubry and Firtel, 1999). Über einen noch nicht genau bekannten Mechanismus, der aber nicht an die Beteiligung von G-Proteinen gebunden ist (Schnitzler et al., 1995), wird dabei zunächst die Expression des Transkriptionsfaktors „G box binding factor“ (GBF) induziert. Dieser verstärkt nun zunächst im Zusammenspiel mit cAMP seine eigene Expression über eine positive Rückkopplung, um dann gemeinsam mit cAMP die Expression der anderen „ersten späten Gene“ zu induzieren (Loomis, 1996). Zur Initiierung der Postaggregation sind also sowohl ausreichend hohe Konzentrationen an GBF, als auch kontinuierlich hohe mikromolare cAMP-Spiegel notwendig. GBF enthält vermutlich zwei Zinkfingerstrukturen und bindet als Transkriptionsfaktor an einen 8 Basenpaare großen Abschnitt, die sogenannte G-box. Diese G-box hat man sowohl in den regulatorischen Abschnitten des *cprB*-Gens, als auch in den Promotorregionen anderer postaggregativer Gene und zelltypspezifischer Gene gefunden (Hjorth et al., 1989; Hjorth et al., 1990; Loomis, 1996).

Die ersten Gene, deren Expression von GBF gesteuert wird sind, *lagC* und *cprB*. Die Bildung derer Genprodukte LagC und CP2 ist gegenüber GBF um etwa 2 bis 3 Stunden verzögert (Schnitzler et al., 1994; Schnitzler et al., 1995). LagC ist ein Oberflächenprotein, das für die Ausbildungen fester Zell-Zellkontakte des zunächst losen Aggregates verantwortlich ist (Dynes et al., 1994; Sukumaran et al., 1998). Die Ausbildung dieser stabilen Zellkontakte wiederum ist essentiell für die Expression zelltypspezifischer Gene (Dynes et al., 1994; Firtel, 1995), so dass diese auch erst im Anschluss an die „primary late“-Gene exprimiert werden. Zu den zelltypspezifischen Genen gehören unter anderem das Prästielzell-typische Gen *ecmA*, das für ein Matrixprotein kodiert, und das Präsporenzell-typische Gen *pspA*, das ebenfalls für ein Matrixprotein kodiert. Einen Überblick über die Signaltransduktion während der Postaggregation gibt die folgende Abbildung.

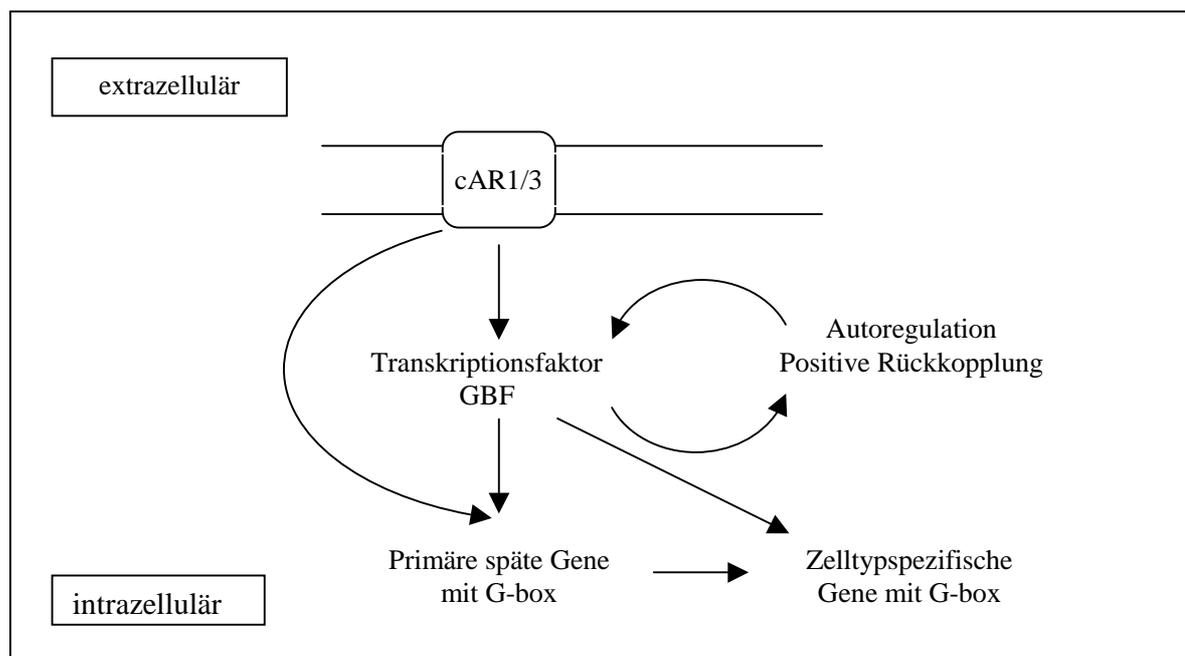


Abbildung 3: Signaltransduktion während der Postaggregation

Die Induktion der Gene der Postaggregationsphase erfolgt ebenfalls über die Rezeptoren cAR 1 und cAR 3, jedoch unabhängig von G-Proteinen. GBF verstärkt seine eigene Expression im Zusammenspiel mit extrazellulärem cAMP. cAMP und GBF sind beide für die Expression der übrigen Gene der Postaggregation verantwortlich.

• Differenzierung und Kulmination

In dem Maße, wie die Expression zelltypspezifischer Gene beginnt, differenzieren auch die zuvor gleichartigen Zellen zu unterschiedlichen Zelltypen. Dieser Prozess beginnt nach etwa 10 Stunden beim Übergang vom frühen zum „tipped“-Aggregat, siehe Abbildung 1 und vorangehender Abschnitt. Auch in dieser letzten Phase der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* werden Genexpression, Zelltyp-Differenzierung und Morphogenese durch cAMP gesteuert.

Bei den entstehenden Zelltypen kann man zunächst grob zwischen zwei Arten unterscheiden: Prästielzellen, die zu Stielzellen ausdifferenzieren und Präsporenzellen, die zu Sporenzellen werden. Prästielzellen finden sich beim sogenannten „tipped“-Aggregat und im „slug“-Stadium vor allem in der Spitze. Sie bilden etwa 15 % der Zellmasse und sind in Abbildung 1 dunkel markiert. Die Präsporenzellen bilden den hinteren Abschnitt des „slugs“ und stellen mit etwa 75 % zahlenmäßig die größte Gruppe an Zellen. Innerhalb des Bereiches der Präsporenzellen verstreut liegen die etwa 5-10 % „anterior like cells“ (ALC), die eng mit den Prästielzellen verwandt sind. Während für die Präsporenzellen bisher noch keine ausgeprägte Ausbildung von Subtypen gezeigt werden konnte (Firtel, 1995), gibt es sowohl bei den ALCs als auch bei den Prästielzellen unterscheidbare Subtypen. Diese zeichnen sich durch ein jeweils eigenes Expressionsmuster für spezifische Gene, wie *ecmA/B*, *ptp1/2*, *tagB* oder *gpaD* aus (Jermyn and Williams, 1991; Howard et al., 1992; Gaskins et al., 1994; Hadwiger et al., 1994; Howard et al., 1994).

Folgende Subtypen an Prästielzellen werden bei *D. discoideum* während des „slug“-Stadiums gefunden (Firtel, 1995; Firtel, 1996; Loomis, 1996):

- PstA-Zellen zeigen eine starke Expression des *ecmA*-Genes, jedoch keine Expression des *ecmB*-Genes. Sie befinden sich im vordersten Abschnitt des „slugs“ und werden zu PstAB-Zellen (Early et al., 1993).
- PstAB-Zellen exprimieren sowohl das *ecmA*-Gen als auch das *ecmB*-Gen. Aus den PstAB-Zellen wird der Stiel des fertigen Fruchtkörpers.
- PstO-Zellen exprimieren deutlich geringere Mengen des *ecmA*-Genes als die PstA-Zellen (Jermyn et al., 1989). Zusammen mit den ALCs bilden sie den „upper“ und den „lower cup“ des reifen Fruchtkörpers.

- ALCs. Aus den ALCs rekrutieren sich die basale Platte und der oberste und der unterste Abschnitt des Sporenkopfes, also die obere und untere Hülle um die Sporenmasse.

Die Verteilung der einzelnen Zelltypen im „slug“ zeigt die folgende Abbildung:

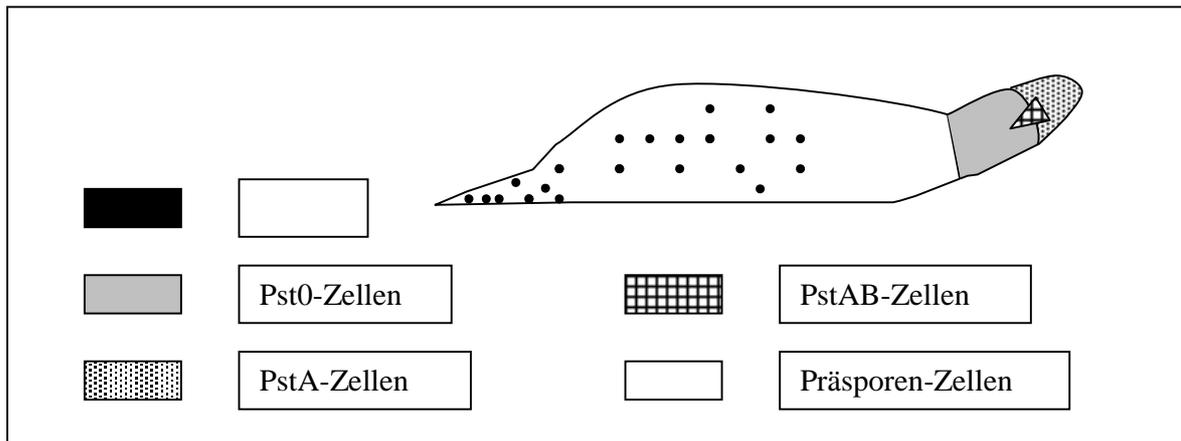


Abbildung 4: Zelltypen in *Dictyostelium discoideum*

Die terminale Differenzierung wird bei *Dictyostelium discoideum* vor allem durch das Morphogen „differentiation inducing factor“ (DIF) und durch cAMP gesteuert. Unter DIF versteht man eine Gruppe chemisch verwandter Phenylderivate, die isolierte Zellen dazu veranlassen, zu Stielzellen zu differenzieren. DIF ist essentiell für die Induktion von *ecmA* und *ecmB* und für die Prästielzell-Stielzell-Differenzierung (Town et al., 1976; Berks et al., 1991; Williams, 1991). Die Expression von Präsporenzell-Genen wird hingegen durch DIF gehemmt.

Die Wirkungen von cAMP in der späten Entwicklung sind relativ komplex. cAMP induziert die Expression der Präsporenzell-Gene (Early and Williams, 1988) und stimuliert die DIF-abhängige Expression von *ecmA*. Dagegen wird die Expression von *ecmB* in späteren Phasen der Zelltyp-Differenzierung gehemmt.

Während der terminalen Differenzierung werden alle 4 bekannten cAMP-Rezeptoren in *D. discoideum* exprimiert (Firtel, 1996). Die hochaffinen Rezeptoren cAR 1 und cAR 3 sind zu diesem Zeitpunkt mit cAMP gesättigt und vermitteln die GBF-abhängigen Antworten. cAR 2 und cAR 4 sind niedrigaffine Rezeptoren und detektieren die cAMP-Pulse. Sie werden vor allem in Prästielzellen exprimiert und inhibieren die Präsporenzellbildung (Firtel, 1996; Loomis, 1996). Eine Stimulation von cAR 2 durch

cAMP ist vermutlich eine Voraussetzung für die Induktion von *ecmB* durch DIF zu Beginn der Differenzierung. Versuche mit verschiedenen transgenen Zelllinien haben gezeigt, dass diese Funktion von cAR 2 nicht durch cAR 1 oder cAR 3 übernommen werden kann (Kim et al., 1998; Verkerke van Wijk et al., 1998).

1.1.3 *Dictyostelium discoideum* in der Biotechnologie

Der zelluläre Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* zeigt einige Eigenschaften, die es nahe legen, mit ihm biotechnologische Fragestellungen zu untersuchen. Die Entdeckung axenisch wachsender Mutanten (Sussman and Sussman, 1967; Ashworth and Watts, 1970; Watts and Ashworth, 1970) war die Grundvoraussetzung, Laborstämme relativ kostengünstig und einfach kultivieren zu können. Diese Laborstämme benötigen lediglich ein einfaches Medium aus Glucose, Salzen, Bacto-Pepton und Hefeextrakt sowie eine konstante Umgebungstemperatur von 21 bis 22°C zum Überleben und lassen sich somit in jedem Zellkulturlabor leicht etablieren (Loomis, 1982). Die Entwicklung effizienter Transformations- und Selektionsmethoden hat es schließlich ermöglicht, gezielt molekularbiologische Manipulationen an diesen axenischen Stämmen von *Dictyostelium discoideum* vorzunehmen (Nellen et al., 1984; Nellen and Firtel, 1985; Howard et al., 1988).

Dictyostelium discoideum ist im Gegensatz zu dem am häufigsten in der biotechnologischen Forschung verwendeten Organismus *E. coli* ein Eukaryont. Daher sind die potentiellen biotechnologischen Verwendungsmöglichkeiten von *D. discoideum* eher mit der ebenfalls häufig eingesetzten Bäckerhefe *S. cerevisiae* vergleichbar als mit *E. coli*. Eine wichtige gemeinsame Eigenschaft eukaryontischer Organismen ist die Fähigkeit, posttranslationale Modifikationen an Proteinen durchzuführen. So gibt es bei *Dictyostelium discoideum* N- und O-Glykosylierungen mit hohem Mannoseanteil (Freeze, 1992), nicht jedoch Hypermannosylierung mit hundert und mehr Mannosebausteinen wie bei *S. cerevisiae* (Slade et al., 1997). Die Peptidsequenzen der Glykosylierungsstellen sind zumindest bei der N-Glykosylierung die gleichen wie bei Säugerzellen, die angefügten Zucker unterscheiden sich jedoch im Aufbau geringfügig von den bei Säugern gefundenen Zuckern (Williams and al., 1995; Slade et al., 1997). Weiterhin findet man Fukoseanheftung, Phosphorylierung und Sulfatierung der Glykoproteine (Freeze, 1992; Slade et al., 1997). Die Frage, ob auch Sialinsäure in Glykoproteine eingebaut wird, ist bisher noch umstritten (Yoshida et al., 1992; Yoshida et al., 1997; Jung et al., 1998).

Nachgewiesen ist jedoch das Anheften eines GPI-Ankers an Proteine (Reymond et al., 1995). Als Eukaryont besitzt der zelluläre Schleimpilz auch ein gut untersuchtes Signaltransduktionssystem mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und nachgeschalteten Proteinen. Dieses System ist mit demjenigen von höheren Organismen durchaus vergleichbar. Die Komponenten dieser Signaltransduktionskaskade wurden im wesentlichen bereits in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben.

Die leichte Zugänglichkeit von Transformanten, verbunden mit der kostengünstigen Kultivierung und den Eigenschaften als Eukaryont haben zu Versuchen geführt, Proteine höherer Organismen in *D. discoideum* zu exprimieren. Folgende Proteine wurden mit unterschiedlicher Zielsetzung bisher mehr oder weniger erfolgreich heterolog in *Dictyostelium discoideum* exprimiert:

- Selektionsmarker: bakterielle Neomycin-Phosphotransferase (Nellen et al., 1984), bakterielle Hygromycin-Phosphotransferase (Egelhoff et al., 1989) und das Genprodukt des *ble*-Gens aus *Streptoalloteichus hindustanus* (Leiting and Noegel, 1991).
- Reportergene: Luciferase aus der Feuerfliege (Howard et al., 1988), β -Galaktosidase aus *E. coli* (Dingermann et al., 1989), Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* und die β -Glucuronidase (GUS) aus *E. coli* (Dittrich et al., 1994), green fluorescent Protein aus *Aequorea victoria* (Prasher, 1995).

Überexpression heterologer Proteine:

- humanes Antithrombin III und α_1 -Antitrypsin (Dingermann et al., 1991; Zündorf, 1995).
- Circumsporozoit Protein aus *Plasmodium falciparum* (Fasel et al., 1992; Reymond et al., 1995; van Bemmelen et al., 2000).
- YP7 Protein aus Rotavirus SA 11 (Emslie et al., 1995; Emslie et al., 1996).
- Proteinase K und Antigene aus *Pseudomonas aeruginosa* (Kuschnick et al., 1998; Kuschnick, 1999).
- Das humane Insulin-like growth factor binding Protein (hIGFBP6) (Asgari et al., 1998).
- Ein humaner IgE-Rezeptor (Wilson et al., 1998).
- Humanes Choriongonadotropin (Heikoop et al., 1998; Linskens et al., 1999; Vervoort et al., 2000).

Funktionstestung heterolog exprimierter Proteine:

- CSA-hm2 Fusionsprotein eines humanen Muskarin-Rezeptors (Voith and Dingermann, 1995b; Voith and Dingermann, 1995a; Voith et al., 1998).

- das Glucose-Transporter-Protein GLUT1 aus der Ratte (Cohen et al., 1996).
- Die beiden pollenspezifischen Profilin I und II aus *Zea mays* (Karakesisoglou et al., 1996).
- ein Aquaporin aus der Plasmamembran von *Arabidopsis* (Chaumont et al., 1997).
- eine Calciumpumpe aus der humanen Erythrozytenplasmamembran (Cubitt et al., 1998).
- Humane Prostaglandin-E₂-Rezeptoren (Walter, 1999)
- Renaler V₂-Rezeptor des Schweines (Schmidt, 1999)
- Die α_1 - und β_1 -Untereinheit der Na⁺/ K⁺-ATPase des Affen (Zhou and Fambrough, 1999).
- Die regulatorischen Untereinheiten des Leichtketten-Myosins aus der glatten Muskulatur und der Skelettmuskulatur des Huhnes (Chen et al., 1999).

Da die gesamte Entwicklung zum fertig ausdifferenzierten Fruchtkörper innerhalb von nur 24 Stunden abgeschlossen ist und der Organismus in dieser Zeit keiner weiteren Behandlung bedarf, ist *Dictyostelium discoideum* zu einem beliebten und gut zu untersuchenden Modellorganismus für Entwicklungsbiologen geworden (Mutzel, 1995), mit dessen Hilfe man fundamentale Fragen der Bildung und Differenzierung von vielzelligen eukaryontischen Organismen beispielhaft untersuchen kann. Daraus ergibt sich ein weiteres interessantes Einsatzgebiet heterolog transformierter *D. discoideum*-Zellen, die Teratogenitätstestung möglicher Arzneistoffe (Tillner et al., 1996; Tillner et al., 1998). Dabei werden Zellen während der Entwicklungsphase potentiellen Teratogenen ausgesetzt. Hierbei hat sich gezeigt, dass Stoffe mit einem teratogenen Potential auch bei *D. discoideum* zu einer „Missbildung“ führen, nämlich einem veränderten Entwicklungs- und Differenzierungsmuster der Zellen. Diese veränderte Entwicklung lässt sich durch Reportergene, die von entwicklungs- und zelltypspezifischen Promotoren gesteuert werden, nachweisen.

1.2 Muskarin-Rezeptoren

Acetylcholin ist einer der bedeutendsten Neurotransmitter im Nervensystem von Säugern. Die Wirkung von Acetylcholin wird entweder über ionotrope Nikotin-Rezeptoren oder über metabotrope Muskarin-Rezeptoren vermittelt (Caulfield and Birdsall, 1998). Bereits im Jahre 1914 hatte Sir Henry Dale zwei unterschiedliche Wirkungen von Acetylcholin entdeckt (Grimm et al., 1994). Die eine wurde von Muskarin imitiert und von Atropin

blockiert, die andere wurde durch Nikotin hervorgerufen und durch d-Tubokurarin antagonisiert. Dies führte erstmalig zum Konzept unterschiedlicher cholinergischer Rezeptoren.

Nikotin-Rezeptoren kommen sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem vor. Es handelt sich hierbei um Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, die bevorzugt Natriumionen passieren lassen. Sie sind aus fünf Untereinheiten zusammengesetzt und binden im aktivierten Zustand zwei Moleküle Acetylcholin.

Im Gegensatz dazu zählen die Muskarin-Rezeptoren zur großen Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und binden jeweils einen Liganden pro Rezeptor. Der Rezeptor besteht aus einer einzelnen Peptidkette. Mit schätzungsweise 1000 verschiedenen Rezeptoren, die damit etwa 1% der Gene bei Säugern bilden, zählen die GPCRs zu den wichtigsten Membranrezeptoren überhaupt (Bourne, 1997). Die Liganden dieser Rezeptoren sind denkbar unterschiedlich in Größe und Aufbau. So gibt es neben den biogenen Aminen wie Acetylcholin und Dopamin auch Peptide wie Angiotensin. Selbst große Glykoproteine wie das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) mit einer Molekülmasse von 34 kDa können endogene Liganden an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sein (Wess, 1998).

1.2.1 Allgemeine Rezeptorstruktur und Ligandenbindung

Die Muskarin-Rezeptor-Subtypen haben einige strukturelle Eigenschaften gemeinsam. Wie für alle anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird auch für die Muskarin-Rezeptoren eine Struktur mit sieben Transmembran-Domänen, extrazellulärem N-Terminus und intrazellulärem C-Terminus postuliert (Wess, 1993; Wess, 1998). Diese sieben Transmembran-Domänen (TMD) sind α -helikal aufgebaut und durch drei extrazelluläre (o1-o3) und drei intrazelluläre (i1-i3) Schleifen miteinander verbunden. Vom Zelläußeren aus betrachtet sind die TMD 1 bis 7 ringförmig, entgegengesetzt zum Uhrzeigersinn angeordnet. TMD 4, TMD 6 und TMD 7 liegen senkrecht zur Membranoberfläche. TMD 1, TMD 2 und TMD 5 sind etwas in Uhrzeigerichtung gekippt. TMD 3 ist stärker im Uhrzeigersinn gekippt und hat dadurch mehrere helikale Kontaktpunkte zu den anderen Transmembran-Domänen (Wess, 1998; Hulme et al., 1999). Die extrazellulären Schleifen zwei und drei sind über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft und am N-Terminus

finden sich bei allen Muskarin-Rezeptoren mehrere Glykosylierungsstellen. Abbildung 5 zeigt schematisch die Struktur eines Muskarin-Rezeptors.

Die Liganden-Bindungsdomäne für Acetylcholin liegt in der äußeren Hälfte der transmembranären Proteinanteile. Dabei sind vor allem Aminosäuren der TMD 3-7 an der Ligandenbindung beteiligt (Wess, 1996). Ein Aspartatrest in der äußeren Hälfte von TMD 3, der bei allen GPCRs mit biogenen Aminen als endogenen Liganden vorkommt, geht dabei vermutlich Ionenpaar-Wechselwirkungen mit der positiv geladenen Kopfgruppe des Acetylcholins ein. Diese Wechselwirkung wird dann durch räumlich benachbarte Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten stabilisiert. Diese aromatischen Aminosäuren sind bei allen Muskarin-Rezeptor-Subtypen konserviert. Die Bindungstasche für Antagonisten ist nicht vollkommen identisch mit derjenigen für Agonisten, da die beteiligten Aminosäuren teilweise gleich, teilweise aber auch unterschiedlich sind (Wess, 1996).

Muskarin-Rezeptoren haben zusätzlich eine im extrazellulären Bereich angesiedelte Bindungsstelle für allosterische Liganden. Diese können gleichzeitig mit Agonisten oder Antagonisten an den Rezeptor binden und sowohl die Affinität als auch die Geschwindigkeit der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung beeinflussen (Tucek and Proska, 1995; Jakubik et al., 1996; Ellis, 1997).

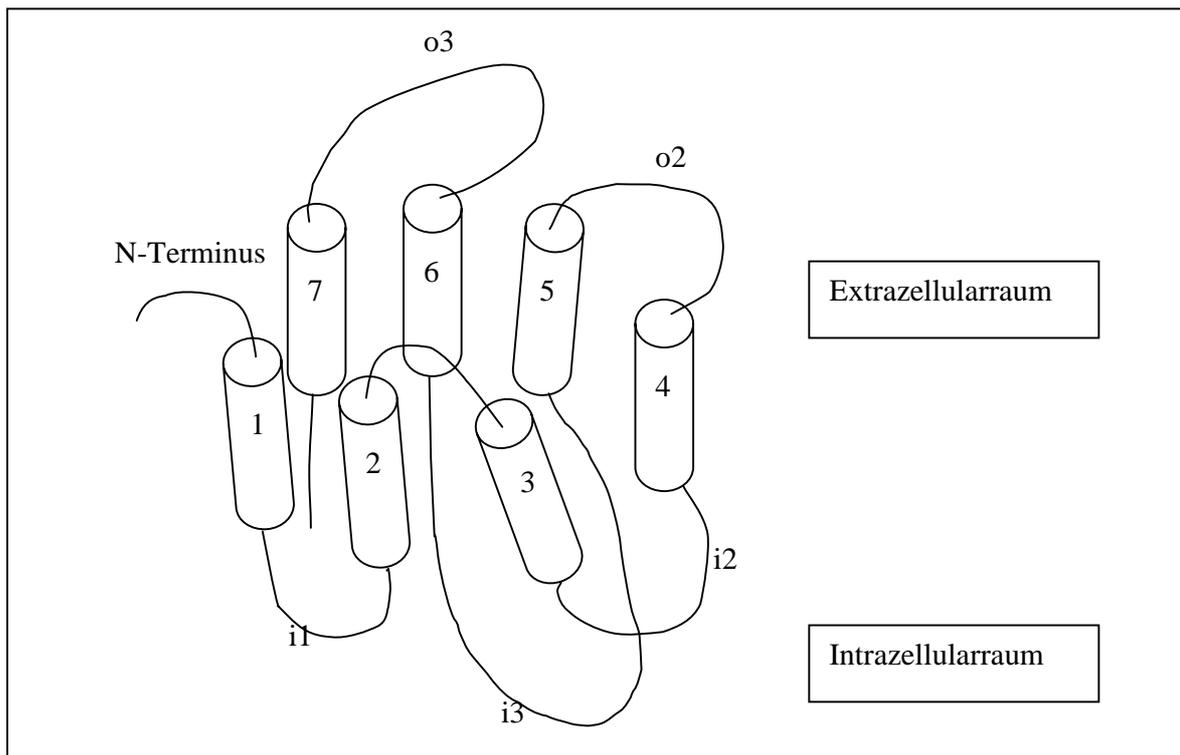


Abbildung 5: Struktur der Muskarin-Rezeptoren

1-7: Transmembran-Domänen 1-7; i1-i3: intrazelluläre Schleifen; o1-o3: extrazelluläre Schleifen

1.2.2 Muskarin-Rezeptor-Subtypen

Bisher hat man fünf verschiedene humane Muskarin-Rezeptor-Subtypen charakterisiert. Die Entdeckung des Gens für einen möglicherweise sechsten Muskarin-Rezeptor wurde inzwischen ebenfalls veröffentlicht (Eglen et al., 1999). Von den fünf nachgewiesenen Subtypen sind bisher vier pharmakologisch charakterisiert. Diese vier pharmakologisch charakterisierten Subtypen erhielten die Bezeichnungen M1, M2, M3 und M4. Die auf Gen- oder Proteinebene charakterisierten Muskarin-Rezeptoren wurden durch kleine Buchstaben mit m1-m5 bezeichnet (Mutschler et al., 1995; Caulfield and Birdsall, 1998). Da die pharmakologisch und die molekular charakterisierten Subtypen eins bis vier einander entsprechen, wird seit 1998 offiziell nur noch die große Schreibweise M1-M5 zur Bezeichnung der Muskarin-Rezeptor-Subtypen verwendet, obwohl die pharmakologische Charakterisierung von M5 weiterhin aussteht (Caulfield and Birdsall, 1998). Die einzelnen Rezeptor-Subtypen unterscheiden sich bezüglich ihrer Gewebeverteilung sowie hinsichtlich ihrer pharmakologischen und biochemischen Eigenschaften. Allerdings ist eine exakte Zuordnung einer pharmakologischen Wirkung zu einem bestimmten Rezeptor-

Subtyp meist dadurch erschwert, dass zum einen häufig zwei oder mehr Subtypen in einem Gewebe vorkommen und zum anderen die Selektivität der eingesetzten Liganden nicht besonders ausgeprägt ist.

Die Subtypen M1, M3 und M5 koppeln bevorzugt an Pertussis-Toxin (PTX) insensitive G-Proteine der $G_{q/11}$ Familie. Stimulation durch einen Agonisten steigert die Aktivität der Phospholipase C β (PLC β) und die Mobilisierung von intrazellulärem Calcium. Daneben wurden die Aktivierung von Calcium-abhängigen Ionenkanälen und Aktivierung der Phospholipasen A₂ und D sowie von Tyrosin-Kinasen gezeigt (Friebe et al., 1993; Felder, 1995; Mutschler et al., 1995; Wess, 1996). M1-Rezeptoren hemmen außerdem den sogenannten „M-current“, eine zeit- und spannungsabhängige Kaliumleitfähigkeit in sympathischen Ganglien (Jones et al., 1992; Caulfield and Birdsall, 1998).

Die Subtypen M2 und M4 koppeln bevorzugt an Pertussis-Toxin sensitive G-Proteine aus der $G_{i/0}$ Familie. Über diese G-Proteine inhibieren sie in erster Linie die Adenylatzyklase (Mutschler et al., 1995), aber auch eine schwach ausgeprägte, Pertussis-Toxin sensitive Steigerung der PLC β konnte gezeigt werden (Wess, 1996). Stimulation des M2-Rezeptors aktiviert Kalium-Kanäle am Herzen (Caulfield and Birdsall, 1998).

Außer im Menschen wurden auch in anderen Spezies unterschiedlicher Entwicklungsstufen wie Schwein, Kuh, Ratte, Maus, Huhn, Krallenfrosch oder Taufliege Muskarin-Rezeptoren gefunden. (Wess, 1996). Bei anderen Rezeptor-Typen, wie zum Beispiel dem Serotonin-Rezeptor, hat sich bereits gezeigt, dass trotz teilweise nur geringer Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen Spezies das pharmakologische Profil doch recht unterschiedlich sein kann (Caulfield and Birdsall, 1998). Insofern sind pharmakologische Daten, die mit nicht-humanen Rezeptoren erhalten wurden, kritisch zu beurteilen, auch wenn bei den Muskarin-Rezeptoren bisher keine Unterschiede in dem pharmakologischen Verhalten zwischen homologen Säuger-Rezeptoren beobachtet wurde. Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die publizierten Eigenschaften, Vorkommen und Lokalisation der Muskarin-Rezeptor-Subtypen (Jones et al., 1992; Mutschler et al., 1995; Eglen and Watson, 1996; Wess, 1996; Caulfield and Birdsall, 1998; Eglen et al., 1999).

	M1	M2	M3	M4	M5
Mensch	460	466	590	479	532
Schwein	466 (99)	466 (97)	590 (96)		
Kuh			590 (95)		
Ratte	458 (99)	466 (95)	589 (92)	478 (95)	531 (89)
Maus	460 (98)			479 (95)	
Xenopus				484 (78)	
Huhn		466 (92)	639 (87)	490 (76)	

Tabelle 1: Rezeptor-Subtypen unterschiedlicher Spezies

Anzahl der Aminosäuren, (% der identischen Aminosäuren im Vergleich zum humanen Subtyp)

	M1	M2	M3	M4	M5
G-Protein-Selektivität	q/11	i/o	q/11	i/o	q/11
PTX-Sensitivität	-	+	-	+	-
PLC β -Aktivierung	+	schwach	+	schwach	+
AC-Hemmung	-	+	-	+	-
PLA-2-Aktivierung	+	-	+	-	+
Ca ²⁺ -Freisetzung	+	-	+	-	+
Hemmung des „M-current“	+	-	+	-	+
Hemmung von Ca ²⁺ -Kanälen	-	+	-	+	-
Aktivierung K ⁺ -Kanäle am Herzen	-	+	-	-	-

Tabelle 2: Biochemisches Profil der Muskarin-Rezeptor-Subtypen

Abkürzungen:

PTX: Pertussis-Toxin, PLC β : Phospholipase C β , AC: Adenylatzyklase, PLA 2: Phospholipase A2,

	M1	M2	M3	M4	M5
Zentrales Nervensystem					
Cortex	++	+	+	+	
Hippocampus	++	+	+	+	(+)
Striatum	++	+	+	++	(+)
Thalamus	++	+	+	+	
Hirnstamm/ Cerebellum	(+)	++	+		(+)
Periphere Gewebe					
Herz		++			
Glatte Muskelzellen		++	++	+	
Exokrine Drüsen	+		++		
Periphere Ganglien	++	++			

Tabelle 3: Lokalisation der Muskarin-Rezeptor-Subtypen

Die Suche nach selektiven Liganden an Muskarin-Rezeptoren hat bisher nur zu wenigen Verbindungen mit zudem schwach ausgeprägter Selektivität geführt. Zudem handelt es sich ausnahmslos um Antagonisten, für Agonisten liegen bisher keine eindeutig selektiven Verbindungen vor. Von diesen schwach selektiven Antagonisten ist bisher lediglich Pirenzepin als Medikament zur Marktreife gelangt, vielversprechende Verbindungen für die Identifizierung von Muskarin-Rezeptor-Subtypen in Geweben sind unter anderem die beiden Schlangentoxine MT 3 und MT 7. Tabelle 4 wurde nach Eglen und Caulfield zusammengestellt (Caulfield and Birdsall, 1998; Eglen et al., 1999).

	M1	M2	M3	M4	M5
Atropin	9,0 – 9,7	9,0 – 9,3	8,9 – 9,8	9,1 – 9,6	8,9 – 9,7
Pirenzepin	7,8 – 8,5	6,3 – 6,7	6,7 – 7,1	7,1 – 8,1	6,2 – 7,1
Methoctramin	7,1 – 7,8	7,8 – 8,3	6,3 – 6,9	7,4 – 8,1	6,9 – 7,2
Himbacin	7,0 – 7,2	8,0 – 8,3	6,9 – 7,4	8,0 – 8,8	6,1 – 6,3
Tripitramin	8,4 – 8,8	9,4 – 9,6	7,1 – 7,4	7,8 – 8,2	7,3 – 7,5
Darifenacin	7,5 – 7,8	7,0 – 7,4	8,4 – 8,9	7,7 – 8,0	8,0 – 8,1
PD 102807	5,3	5,8	6,3	7,3	5,1
MT 3	7,1	<6	<6	8,7	<6
MT 7	9,8	<6	<6	<6	<6

Tabelle 4: Affinitätskonstanten muskarinerger Antagonisten (-log K_i in M)

Fettgedruckt ist die Affinitätskonstante für den von der Verbindung selektiv erkannten Rezeptor.

1.2.3 Wechselwirkung zwischen Rezeptor und G-Protein

Im Gegensatz zur Ligandenbindungs-Domäne liegt die Bindungsdomäne für die G-Proteine nicht in den äußeren transmembranären Bereichen des Rezeptors sondern im Zellinneren. Allgemein geht man heute davon aus, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren durch die reversible Bindung eines Liganden eine geringe Konformationsänderung erfahren (Wess, 1997), die in erster Linie eine leichte Auswärtsbewegung der zytoplasmatischen Abschnitte von TMD 3 und TMD 6 in Richtung Extrazellularraum nach sich zieht (Wess, 1997; Hulme et al., 1999). Diese Konformationsänderung führt dazu, dass an der α -Untereinheit des an den Rezeptor gebundenen G-Proteins GDP gegen GTP ausgetauscht wird. α -Untereinheit und $\beta\gamma$ -Untereinheit trennen sich daraufhin sowohl voneinander als auch vom Rezeptor (Neer, 1997). Beide Untereinheiten sind dann in der Lage, mit nachgeschalteten Effektor-Proteinen, wie zum Beispiel der Adenylatzyklase, in Wechselwirkung zu treten. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit

wird schließlich GTP gespalten und dadurch die Reassemblierung der beiden Untereinheiten und die Reassoziierung des G-Protein-Trimers mit dem Rezeptor eingeleitet.

Die Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein ist spezifisch, so dass ein bestimmter Rezeptor jeweils nur mit speziellen G-Proteinen wechselwirken kann. Daher hat man nach den strukturellen Voraussetzungen dieser Selektivität seitens der Rezeptoren und der G-Proteine gesucht. Unter anderem durch Untersuchungen an M2- und M3-Rezeptoren konnten einzelne Proteinabschnitte und Aminosäuren identifiziert werden, die für eine selektive Kopplung von Rezeptor und G-Protein verantwortlich sind (Kostenis et al., 1997a; Kostenis et al., 1997b; Wess, 1997; Wess and al., 1997; Kostenis et al., 1998b; Kostenis et al., 1998a; Wess, 1998; Kostenis et al., 1999). Im Subtyp M3 sind beispielsweise einzelne Aminosäuren am N-terminalen und am C-terminalen Ende der dritten intrazellulären Schleife von besonderer Bedeutung für die selektive Kopplung an G-Proteine der q/11 Klasse. Diese Aminosäuren gehören zu α -helikalen Verlängerungen der transmembranären Domänen 5 und 6 und sind bei den Subtypen M1, M3 und M5 stark konserviert. Die beiden amphiphilen α -Helices bilden dabei mit ihren hydrophoben Innenseiten eine Bindungstasche für das G-Protein. Besondere Bedeutung kommt dabei dem Tyrosin am Übergang von TMD 5 zu i3 zu. Einzelne hydrophile Aminosäuren innerhalb der zweiten intrazellulären Schleife sind ebenfalls an der selektiven Kopplung von Rezeptor und G-Protein beteiligt. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Untersuchungen mit dem Rezeptor-Subtyp M5 (Burstein et al., 1998a; Burstein et al., 1998b; Spalding et al., 1998).

Wie in ausgedehnten Mutagenese-Studien gezeigt werden konnte, sind auf der Seite der G-Proteine besonders die N-terminalen und die C-terminalen Enden der α -Untereinheiten für die selektive Kopplung an den Rezeptor wichtig (Kostenis et al., 1997a; Kostenis et al., 1997b; Kostenis et al., 1998a; Kostenis et al., 1999). Bei G-Proteinen der i/o Klasse sind die C-terminale aromatische Aminosäure (Phenylalanin oder Tyrosin) sowie die Aminosäuren Cystein und Glycin an den Positionen -4 und -3 konserviert und an der selektiven Erkennung des M2-Rezeptors beteiligt. G-Proteine der q/11 Klasse besitzen einen konservierten Asparaginrest an der Position -3 und eine charakteristische, sechs Aminosäuren große N-terminale Verlängerung, die bei anderen α -Untereinheiten fehlt. Wird dieser N-terminale Rest deletiert, erkennen diese mutierten α -Untereinheiten viele eigentlich G_{-i/o} oder G_{-s} gekoppelte Rezeptoren.

1.2.4 Regulation der Rezeptoraktivität

Werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren über längere Zeit durch einen Agonisten stimuliert, so kommt es über verschiedene Mechanismen zu einer Abschwächung der Rezeptor vermittelten Antworten (Wess, 1996). Je nach Dauer der Stimulation findet man spezifische zelluläre Vorgänge.

Innerhalb weniger Sekunden bis Minuten kann es zur Entkopplung von Rezeptor und G-Protein kommen. Dies geschieht in erster Linie durch Phosphorylierung des Rezeptors mittels verschiedener Proteinkinasen und anschließender Arrestinbindung. PKA, PKC und spezifische Proteinkinasen wurden für die Phosphorylierung von Muskarin-Rezeptoren nachgewiesen (Wess, 1996).

Bei lang anhaltender Stimulation kann man nach wenigen Minuten als zweiten Mechanismus die sogenannte Rezeptor-Internalisierung beobachten, ein Prozess, bei dem die Rezeptoren von der äußeren Zellmembran ins Zellinnere transportiert werden. Diese Art der Rezeptor-Regulation ist durch eine Abnahme der absoluten Rezeptorzahl auf der Zelle charakterisiert. Allerdings ist dieser Prozess reversibel und die Rezeptoren werden nach Entfernung des Agonisten schnell zur Zelloberfläche zurück transportiert.

Schließlich setzt nach lang anhaltender Stimulation die Rezeptor-down-Regulation ein. Sie ist durch die Abnahme der absoluten Rezeptoranzahl in der Zelle charakterisiert. Sowohl Abbau von Rezeptorprotein als auch Abnahme der mRNA sind an dem Prozess beteiligt, so dass ein erneuter Anstieg der Rezeptoranzahl eine Neusynthese von Rezeptorprotein voraussetzt.

1.2.5 Therapeutische Aspekte

Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung und der damit verbundenen unterschiedlichen physiologischen Bedeutung der Muskarin-Rezeptor-Subtypen im menschlichen Körper, erhofft man sich von selektiv wirkenden muskarinergen Pharmaka einen therapeutischen Fortschritt bei der Behandlung einiger Krankheiten. Die folgende Tabelle zeigt potentielle Einsatzgebiete dieser Verbindungen (Mutschler et al., 1995; Eglen et al., 1999; Gomeza et al., 1999).

Selektive Verbindung	Medizinische Anwendung
Zentral wirksame M1-Agonisten	Morbus Alzheimer
Zentral wirksame M4-Antagonisten	Morbus Parkinson
Peripher wirksame M1-Antagonisten	Hemmung der Magensäuresekretion
Peripher wirksame M2-Antagonisten	Bradykardie, AV Block
Peripher wirksame M2-Agonisten	Tachykardie
quartäre M1-/ M3-Antagonisten	Obstruktive Atemwegserkrankungen
Peripher wirksame M3-Antagonisten	Spasmen der glatten Muskulatur
Peripher wirksame M3-Agonisten	Darm- und Blasenatonie

Zur Zeit laufen einige klinische Studien mit selektiven M1-Agonisten zur Behandlung des Morbus Alzheimer. Ob diese Verbindungen allerdings wirklich einen therapeutischen Fortschritt bringen, lässt sich momentan noch nicht mit Sicherheit sagen, da einige Studien wegen mangelnder Wirksamkeit in Phase III abgebrochen wurden (Eglen et al., 1999; Thal et al., 2000). Bei den Muskarin-Rezeptor-Subtypen in der glatten Muskulatur herrschte lange Zeit Unklarheit über die Bedeutung der beiden Subtypen M2 und M3. Andere Untersuchungen deuten auf eine kombinierte Wirkung der beiden Rezeptoren hin. Man geht heute davon aus, dass M3 eine direkte Muskelkontraktion bewirkt, während M2-Rezeptoren über einen antagonistischen Mechanismus die relaxierende Wirkung anderer Rezeptoren wie z. B. β -Rezeptoren abschwächt (Ehlert et al., 1999; Hedge and Eglen, 1999). Aus diesem Grund ist momentan noch nicht eindeutig geklärt, ob für therapeutische Eingriffe an der glatten Muskulatur M3-selektive oder kombiniert M2-/ -M3 selektive Verbindungen vorzuziehen sind. Zu Bedenken ist auf jeden Fall das Vorhandensein von M2-Rezeptoren am Herzen. Klarheit über den therapeutischen Wert selektiver, muskarinerner Verbindungen kann hier letztlich aber nur durch klinische Studien mit derartigen Verbindungen erreicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen

2.1.1 Chemikalien

Material	Lieferant/ Hersteller
$[\gamma^{32}\text{P}]$ -ATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mMol)	Fa. Amersham Buchler
$[\alpha^{32}\text{P}]$ -dATP (10 mCi/ml, 800 Ci/mMol)	Fa. Amersham Buchler
$[\text{H}^3]$ -N-Methylscopolamin	Fa. Nen Dupont
Agar	Fa. IMA
Atropin	Fa. RBI
Bacto Trypton, Bacto Pepton, Yeast Extract, Pferdeserum	Fa. Unipath
Ampicillin	Fa. Roth
cAMP	Fa. Boehringer Mannheim
Chemikalien vom Reinheitsgrad „pro analysi“	Fa. E. Merck, Fa. Roth, Fa. Sigma, Fa. Serva
Carbachol	Fa. RBI
CPRG	Fa. Boehringer Mannheim
DTT	Fa. Roth
ECL	Fa. Amersham Buchler
Ethidiumbromid	Fa. Sigma
Geneticin (G418)	Fa. Gibco BRL
Glycerin	Fa. Roth
Muskarin	Fa. RBI

Ponceau S	Fa. Sigma
Restriktionsendonukleasen, Polymerasen, T4-Polynukleotidkinase, DNA-Ligasen, alkal. Phosphatase, pankreatische RNase	Fa. Boehringer Mannheim, Fa. Pharmacia, Fa. Gibco BRL, Fa. New England Biolabs
Streptomycin	Fa. Sigma
Tetracyclin	Fa. Sigma
Triton-X 100	Fa. Sigma
X-Gal	Fa. Roth

2.1.2 Arbeitsgeräte und sonstige Materialien

Arbeitsgerät/ Material	Lieferant/ Hersteller
3MM Chromatographiepapier	Fa. Whatman
CASY 1-Cell Analyser System	Fa. Schärfe System, Reutlingen
Dialyseschläuche Visking	Fa. Roth
ELISA-Platten	Fa. Nunc
ELISA-Reader	Fa. Dynatech
Gene Pulser	Fa. Biorad
Glasfaserfilter GF/B	Fa. Whatman
J2-HS, J6-HC-Zentrifugen	Fa. Beckman
L-70 Ultrazentrifuge	Fa. Beckman
Liquid Scintillation Cocktail „Quicksafe A“	Fa. Zinsser Analytic
Mikroskop	Fa. Nikon
Netzgerät	Fa. Consort
Nitrozellulose	Fa. Schleicher & Schüll
Nylonmembran Hybond-N	Fa. Amersham-Buchler
PCR Gerät Omn-E	Fa. Hybaid
Polaroidfilme Typ 667	Fa. Polaroid
Polyallomer- Zentrifugenröhrchen, 5 ml	Fa. Beckman
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Fa. Brand

Arbeitsgerät/ Material	Lieferant/ Hersteller
Röntgenfilme X-Omat™	Fa. Kodak
Rotationsschüttler	Fa. Infors
Rotixa/ P-Zentrifuge	Fa. Hettich
Speed Vac Concentrator	Fa. Heraeus
Spektralphotometer Hitachi U2000	Fa. Colora
Sterilfilter 0,2 µM	Fa. Schleicher & Schüll
Szintillationszähler Wallac 1409	Fa. Wallac
Tischzentrifuge	Fa. Eppendorf
Zählfläschchen: Polypropylentubes 6 ml	Fa. Greiner
Zählkammer	Fa. Fuchs (Rosenthal)
Zellfiltrationsvorrichtung	Fa. Brandel

2.1.3 Allgemeine Lösungen und Puffer

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung		
Aufschlußpuffer	1	x	Phosphatpuffer pH 6,5
	0,1	%	Triton
Auftragungspuffer 1, nativ	50	%	Sucrose
	0,1	M	EDTA pH 8,0
	0,1	%	BPB
	0,1	%	XCCF
Auftragungspuffer 2, denaturierend	95	%	Formamid
	10	mM	EDTA pH 8,0
	0,1	%	BPB
	0,1	%	XCCF
10 x β-ME	60	mM	β-ME
"Chloroform"	Chloroform/ Isoamylalkohol 24+1 (v/v)		
CPRG Lösung	0,2	mg	Chlorophenolrot-β-D-galactopyranosid
	0,2	µl	β-ME
	1	ml	Immunologischer HEPES-Puffer
50 x Denhardt´s	1	%	BSA
	1	%	PVP
	1	%	Ficoll

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung		
DNA/ RNA Elutionspuffer	0,3	M	NaCl
	10	mM	Tris/HCl pH 7,5
	1	mM	EDTA
	1	%	Phenol
50 x E-Puffer (HOAc pH 7,9)	2	M	Tris
	100	nM	EDTA
	250	mM	Natriumacetat
Ethidiumbromid-Lösung	10	mg	Ethidiumbromid ad 1ml H ₂ O
Immunologischer Hepes-Puffer	100	mM	Hepes pH 7,5
	10	mM	MgCl ₂
	150	mM	NaCl
	0,05	%	Tween 20
	1	mM	β-ME
Low TE	10	mM	Tris/HCl pH 8,0
	1	mM	EDTA
„Phenol“	Phenol, wäßrig, 80 %, Low TE gesättigt		
50 x Phosphatpuffer	100	mM	Na ₂ HPO ₄
	735	mM	KH ₂ PO ₄
20 x SSC	3	M	NaCl
	0,3	M	Natriumcitrat
10 x TBS, pH 7,4	20	mM	Tris
	500	mM	NaCl
TTBS	0,05	%	Tween 20 in TBS
10 x YTBE	1	M	Tris
	20	mM	EDTA
	0,5	M	H ₃ BO ₃

2.2 Oligonukleotide

2.2.1 PCR-Primer

Primer (Bindeort)	Sequenz
Hm 1.1 (5'-Ende)	GCC CCA CCT GGA TCC CAT GAA CAC TTC

Primer (Bindeort)	Sequenz
Hm 1.3 (3'-Ende)	GGA GGG ATG <i>CTC GAG</i> AGG GGA C
Hm 3.1 (5'-Ende)	CCC TAT GTC AAG <i>GGA TCC</i> AAT GAC CTT GC
Hm 3.3 (3'-Ende)	GCT ATT GAT ACA AAT <i>GCA TTC</i> TAC AAG G
Hm 4.1 (5'-Ende)	CCA CCC CTG <i>GAT CCC</i> AAC ATG GCC
Hm 4.3 (3'-Ende)	CTA GGG CAC <i>TCG AGC</i> CTG CCT AC
Hm 5.1 (5'-Ende)	ATG GAA GGG <i>GAT CCT</i> TAC CAC AAT GC
Hm.5.3 (3'-Ende)	GGT CAT TGT TCT <i>CTC GAG</i> AGG AGT T
M1 Hind (5'-Ende)	CCA <i>AGC TTA</i> AAA AAT GAA CAC TTC AGC CCC AC
M1 Nsi (3'-Ende)	TAA <i>TGC ATC</i> GCA TTG GCG GGA GGG AGT G
VS 1	AGC TTA AAA AAT GTC TAG AG
VS 2	GTA CCT CTA GAC ATT TTT TA
CSA-for	CGG <i>GGT ACC</i> ATG TCA AGA TTT TTA GTA TTG ATA ATA TTA TAT AAT ATT TTA AAT AGT GCA CAT TCA GCT
CSA-back	CCA <i>ATG CAT</i> TGA TCA CTC GAG AAT TCT GGA TCC GAG CTC AAA GCT GAA TGT GCA CTA TT
Not-Linker	GCGGCCGG Fa. New England Biolabs

Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Oligonukleotide von der Firma MWG Biotech (Ebersberg bei München) synthetisiert. Sie sind in 5'-3'-Richtung dargestellt und dienen der Amplifizierung der jeweiligen Muskarin-Rezeptor-Subtypen. Primer, die am 5'-Ende des Gens binden, entsprechen also dem kodierenden Strang, Primer, die an das 3'-Ende des Gens binden entsprechen dem nichtkodierenden Strang. Neu eingeführte Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind kursiv gesetzt. Dabei wurde bei den Primern Hm 1.1, 3.1, 4.1 und 5.1 eine *Bam*H-I-Schnittstelle zur Klonierung in die Expressionsvektoren neu eingeführt. „Hm 1.1“ bedeutet, dass es sich bei dem zugehörigen Rezeptorgen um den humanen M1-Rezeptor handelt, die anderen Bezeichnungen sind entsprechend gewählt. Bei den Primern 1.3, 4.3 und 5.3 wurde zum gleichen Zweck eine *Xho*-I-Schnittstelle hinter das Gen-eigene-Stoppodon eingeführt. Bei Primer 3.3 wurde eine *Nsi*-I-Schnittstelle gewählt, da die Gensequenz des M3-Rezeptors bereits eine *Xho*-I-Schnittstelle enthält. Die Primer M1 Hind und M1 Nsi führen die im Namen genannten Schnittstellen an Enden des humanen Rezeptorgens ein. Primer M1 Nsi ist dabei so

konstruiert, dass nicht das Gen-eigene-Stoppcodon verwendet wird, sondern das Stoppcodon der Expressionsvektoren. Die Verwendung der Primer CSA-for und -back wird im Abschnitt Ergebnisse erläutert. Die Primer VS 1 und VS 2 sind komplementär zueinander. Sie generieren je eine *Hind*-III- und eine *ASP*-718-Schnittstelle und dienen der Erzeugung von Zwischenklonierungsplasmiden mit der entsprechenden Basenabfolge.

2.2.2 Sequenzierprimer

Primer	Sequenz
M1 Seq	TTG CCA GGG ACC CTT TCC
M3 Seq	AGG GGC TGT GTA TCC AGG
M4 Seq	TGG GAT GAT GAC GTG ACC
M5 Seq	TGG CGT TCC AAA GGC TGG
Disc 1 γ	CCA ATT AAA AAA AGA AAA AGT ATA AAA AG
RSP, Fa. New Eng. Biolabs	AAC AGC TAT GAC CAT G
SP3, Fa. New Eng. Biolabs	GTT TTC CCA GTC ACG AC

Mit Hilfe der Sequenzierprimer wurde die korrekte Inserierung der Rezeptorgene in die Expressionsplasmide bzw. in die Zwischenklonierungsplasmide (Primer SP3 und RSP) überprüft.

2.3 Medien

Medium	Zusammensetzung
YT-Medium	10 g Bacto Trypton 5 g Yeast Extract 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O
YT-Agar	YT-Medium mit 1,2 % Agar
YT/ amp Medium	YT-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin
YT-Topagar	YT-Medium mit 0,7 % Agar
HL5-Medium	14,3 g Bacto-Pepton 7,1 g Yeast Extract 0,64 g Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O; 0,49 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l H ₂ O, sterilisieren

Medium	Zusammensetzung
	komplettieren mit: 25 ml 40 % Glucose sowie ggf. Ampicillin
HL5-Medium mit G-418	Wie HL-5, zusätzlich 10 (20) µg/ml Geneticin
SM-Agar	13 g Agar 10 g Bacto-Pepton 1 g Yeast Extract 2,2 g KH ₂ PO ₄ 1,3 g K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O ad 1 l H ₂ O, sterilisieren komplettieren mit: 25 ml 40 % Glucose 4 ml 1 M MgSO ₄ x 7 H ₂ O

2.4 Mikroorganismen

2.4.1 Bakterienstämme

Folgende *E. coli* K12-Stämme wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet: Prokaryotae; Bacteria; Gracilicutes; Scotobacteria; fakultativ anaerobe Stäbchen; Enterobacteriaceae; *Escherichia*:

Bakterienstamm	Genotyp
DH5α	<i>supE44, ΔlacU196, (φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>
JM83	<i>F' ara Δ(lac-proAB), rpsL(Str^r) [φ80dlacΔ(lacZ)M15] thi</i>
JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi, Δ(lac-proAB), F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, Δ(lacZ)M15]</i>
JM110	<i>dam, dcm, supE44, hsdR17, thi, leu, rpsL, lacY, galK, galT, ara, tonA, thr, tsx, Δ(lac-proAB), F' traD36, proAB⁺, lacI^q, Δ(lacZ)M15</i>
RZ1032	<i>F'cat (=pCJ105; M13^sCm^r)/ dut ungI thi-1 relA1 spoT1 mcrA</i>
TG1	<i>F' traD36, lacI^q, lacZ ΔM15, proAB⁺/ supE ΔhsdM-mcrB)5 (r_K-m_K-McrB-), thi Δ(lac-proAB)</i>
X11-Blue	<i>RecA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, Δ(lacZ)M15, Tn10 (tet^r)]</i>

Klebsiella aerogenes wurde als Substrat für *Dictyostelium discoideum* verwendet:

Prokaryotae; Bacteria; Gracilicutes; Scotobacteria; fakultativ anaerobe Stäbchen; Enterobacteriaceae; *Klebsiella*

Genotypen nach Sambroock (Sambrook et al., 1989).

2.4.2 *Dictyostelium-discoideum*-Stämme

Verwendet wurden die axenischen Stämme AX2, AX3-ORF+ (Loomis, 1982) und die AX2 Mutante VI88 (Wetterauer et al., 1993a; Wetterauer et al., 1993b). Stamm AX3-ORF+ exprimiert das Rep-Protein, das Plasmide mit einem Ddp2-Replikationsursprung extrachromosomal persistieren lässt. Stamm VI88 ist eine Mutante, die Gene unter der Kontrolle des Discoidin-1 γ Promotors stärker transkribiert.

Taxonomie von *Dictyostelium discoideum* :

Eukaryotae; Animalia; Protozoa; Sarcomastigophora; Sarcodina; Rhizopoda; Eumycetozoa; Dictyostelia; Dictyosteliida; Dictyosteliidae

2.5 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

Die allgemeinen molekularbiologischen Methoden wurden, sofern nicht anders erwähnt nach Maniatis (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

2.5.1 *CaCl*₂-Transformation von Bakterien

Transformationspuffer	10	mM	Tris/HCl pH 7,5
	10	mM	MgCl ₂
	10	mM	CaCl ₂

1-5 μ l Plasmid DNA (50-500 ng) bzw. 5 μ l eines Ligationsansatzes wurden zusammen mit 100 μ l Transformationspuffer und 200 μ l kompetenten *E. coli* Zellen 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Durch einen raschen Temperaturwechsel (4 min 37 °C, 10 min Raumtemperatur) wurde die Aufnahme der DNA eingeleitet. Nach Zugabe von 500 μ l YT-Medium wurde der Transformationsansatz 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend auf YT-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert.

2.5.2 Bakterielle Elektroporation

Medium/ Puffer	Zusammensetzung		
Regeneratioossalzlösung	0,1	M	MgCl ₂
	0,1	M	MgSO ₄
	1	M	NaCl
SOC-Medium	20	g	Bacto Trypton
	5	g	Yeast Extract
	5	ml	20 % Glucose
	ad	1 l	H ₂ O

2 µl Plasmid DNA (entsprechend 500 ng DNA) aus einem Ligationsansatz oder einer DNA Präparation wurden zusammen mit 50 µl salzfreien *E.-coli*-Zellen 1 min auf Eis in einer Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand inkubiert. Die angelegte Spannung des Gene Pulsers der Firma Biorad betrug 2,5 kV, die Kapazität des Plattenkondensators wurde auf 25 µF eingestellt und es wurde ein zusätzlicher paralleler Widerstand von 200 Ω geschaltet. Durch Entladung des Plattenkondensators wurde die DNA von den Zellen aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium und 30 µl Regenerationssalzlösung wurden die Zellen 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend auf YT-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert.

2.5.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR lassen sich DNA-Abschnitte sequenzspezifisch amplifizieren. Außerdem kann man gerichtete Mutationen am 5'-Ende und am 3'-Ende durchführen, z.B. um neue Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme zu schaffen. Zu diesem Zweck wurde mit den Primern 1.1-5.3 folgende PCR-Reaktion durchgeführt. In einem 100 µl Ansatz befanden sich:

10	ng	Ausgangs-DNA
20	pmol	je Primer
10	µl	10 x Taq-Puffer (Fa. USB)
15	mM	MgCl ₂
0,25	mM	dNTP's

Nach Erhitzen auf 96 °C für 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 U Taq-Polymerase der Firma USB gestartet und dabei folgender Reaktionszyklus 25fach durchlaufen:

0:40 min	50 °C
2:30 min	72 °C
0:40 min	95 °C

Das amplifizierte Produkt wurde mittels Gelelektrophorese und anschließender Aufreinigung durch DNA/ RNA-Elutionspuffer über Nacht bei 37 °C oder Elektroelution in 1 x E-Puffer bei 50mA konstanter Stromstärke unter Verwendung von Dialyseschläuchen erhalten.

2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung		
Trenngel 10 %	7	ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4 % SDS
	9,3	ml	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
	11,6	ml	H ₂ O
	10	µl	TEMED
	100	µl	10 % APOD
Sammelgel 3 %	2,5	ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4 % SDS
	1	ml	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
	6,4	ml	H ₂ O
	10	µl	TEMED
	30	µl	10 % APOD
2 x Auftragspuffer	30	ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4 % SDS
	20	ml	Glycerin
	5	ml	20 % SDS
	1	ml	0,5 % Bromphenolblau in Ethanol
	1	ml	DTT
	ad 100 ml		H ₂ O
Laufpuffer	25	mM	Tris
	0,19	M	Glycin
	0,1	%	SDS
Coomassie-Färbelösung	0,1	%	Coomassie Brillant Blue R 250
	25	%	Ethanol
	10	%	Essigsäure
Entfärber	10	%	Methanol
	7	%	Essigsäure

Bei einer denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) werden Proteine nach der Größe ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. In der vorliegenden Arbeit wurden 10 %ige Gele verwendet. Die Probenlösungen wurden mit dem gleichen Volumen

2 x Auftragspuffer versetzt, 5 Minuten aufgekocht und dann aufgetragen. Zum Färben wurde 1 Stunde mit Färbelösung inkubiert und für 3-6 Stunden entfärbt.

2.5.5 Western-Blot-Analyse

Puffer	Zusammensetzung		
Anodenpuffer 1	0,3	M	Tris
	20	%	Methanol
Anodenpuffer 2	25	mM	Tris
	20	%	Methanol
Kathodenpuffer	20	mM	Tris
	40	mM	ϵ -Amino-n-Caproinsäure
	20	%	Methanol
Ponceau-Färbelösung	Ponceau S in 3 % TCA		

Um Proteine spezifisch mit Antikörpern detektieren zu können, wurden sie nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durch Elektro-Blot auf eine Nitrozellulosemembran (BA85) transferiert. Der Blotaufbau war von unten nach oben wie folgt: 6 Filterpapiere (FP) mit Anodenpuffer 1, 3 FP mit Anodenpuffer 2, Nitrozellulosemembran, Gel, 6 FP mit Kathodenpuffer. Der Transfer erfolgte bei ca. 2 mA/cm² für 60 min. Die transferierten Proteine wurden mit Ponceau-Färbelösung gefärbt, der Größenstandard mit einem wasserfesten Stift markiert und die Membran durch Wässern wieder entfärbt. Anschließend wurde 1 Stunde mit 3 % BSA in TTBS bei Raumtemperatur blockiert. Der 1. Antikörper wurde mit 3 % BSA in TTBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit TTBS gewaschen und mit 5 % Milchpulver in TTBS vorinkubiert, bevor der 2. Antikörper als Peroxidase-Konjugat für eine Stunde zugegeben wurde. Nach dreimaligem Waschen mit TTBS wurde gebundener Antikörper durch den ECL™-Kit der Firma Amersham über Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm nachgewiesen.

2.5.6 DNA Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung wurde nach dem Sanger (Dideoxy)-Verfahren unter Verwendung des Taq cyclist™ DNA Sequencing kits (Fa. Stratagene) durchgeführt.

2.6 *Dictyostelium discoideum*

2.6.1 Kultivierung

Dictyostelium discoideum Zellen wurden entweder in 5 ml und 10 ml Petrischalen oder bei 150 upm in Schüttelkultur mit HL-5 Medium (Watts and Ashworth, 1970) bei einer Temperatur von 22 °C gezüchtet. Transformierte Zellen wurden in Anwesenheit von 10 µg/ml Geneticin kultiviert. Die Zelldichte wurde mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer oder mit dem CASY 1-Cell Analyser der Firma Schärfe System bestimmt und die Zellen bei einer Zelldichte von $3-6 \times 10^6$ Zellen/ml geerntet.

2.6.2 Transformation

Medium/ Puffer	Zusammensetzung		
2 x HBS-Puffer	16	g/l	NaCl
	0,72	g/l	KCl
	0,25	g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	10	g/l	HEPES pH 7,05
	2	g/l	Glucose
MES-HL5-Medium	12	g/l	Bacto-Pepton
	0,6	g/l	Yeast Extract
	1,3	g/l	MES pH 7,1
	Das Medium wird nach dem Autoklavieren mit 25 ml/l 40 % Glucose komplettiert		

Die Transformation von *Dictyostelium discoideum* erfolgte nach der Calciumphosphat-Methode (Nellen et al., 1984; Nellen and Firtel, 1985; Early and Williams, 1987). Dazu wurden 1×10^7 Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Zellkultur auf eine 10 ml Petrischale ausplattiert. Nach 60 Minuten wurde das Medium für 45 Minuten durch MES-HL5-Medium ersetzt. In der Zwischenzeit wurden 6-10 µg in 600 µl HBS-Puffer unter starkem Mischen mit 38 µl 2 M CaCl₂ versetzt und 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium wurde abgezogen und die gefällte DNA vorsichtig auf die an der Petrischale haftenden Zellen getropft. Nach weiteren 25 Minuten wurden 10 ml MES-HL5-Medium zugegeben. Nach 3 Stunden wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit 2 ml einer 18 % Glycerinlösung in 1 x HBS für 8 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Glycerinlösung durch 10 ml HL5-Medium ohne Antibiotikum ersetzt. Am darauffolgenden Tag wurde die Selektion durch HL5-Medium mit 20 µg/ml Geneticin

begonnen. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und tote Zellen dabei entfernt. Nach 5 Tagen wurde die Konzentration des Antibiotikums halbiert und nach etwa 10 Tagen waren Klone sichtbar, die mit Hilfe einer Pipette in 24-Well-Platten (Greiner) überführt wurden.

2.6.3 Anlegen von DMSO-Gefrierstocks

1,5 ml einer spätlogarithmischen *D. discoideum* - Kultur wurden in einem Kryoröhrchen in Eiswasser gekühlt. Nach Zugabe von 12 % (v/v) DMSO wurden die Zellen zunächst kräftig gevortext und für 2 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Lagerung erfolgte dann bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zum Anlegen einer neuen Kultur aus diesen Stocks wurden die Zellen schnell aufgetaut, 10 s in der Tischzentrifuge sedimentiert und nach Abkippen des DMSO-haltigen Überstandes in HL5-Medium ohne Selektionsantibiotikum auf Petrischale kultiviert. Geneticin wurde in Abhängigkeit von der Vitalität der Zellen nach 2-4 Tagen zugegeben.

2.6.4 Präparation von Gesamt RNA

Puffer	Zusammensetzung		
TES-Puffer	10	mM	Tris/HCl pH 7,0
	5	mM	EDTA
	1	%	SDS
4 M GITC-Lösung	100	g	Guanidinium-Isothiocyanat
	10,6	ml	1 M Tris/HCl pH 7,6
	10,6	ml	0,2 M EDTA
	ad		100 ml H ₂ O
			filtrieren, dann Zusatz von:
	21,2	ml	20 % Sarkosyl
	2,1	ml	4 M β -ME
ad		212 ml H ₂ O	

5×10^7 Zellen einer logarithmisch wachsenden Schüttelkultur wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei $250 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ geerntet und in 3 ml $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem 17 mM Phosphatpuffer pH 6,5 gewaschen. Für die Lyse wurden die Zellen in 3,2 ml eiskalter GITC-Lösung aufgenommen und 4 min kräftig gemischt, um die DNA zu scheren. In 5 ml Zentrifugenröhrchen wurden dann 1,3 ml einer 5,7 M CsCl-Lösung vorgelegt und vorsichtig mit den lysierten Zellen überschichtet. Die RNA sedimentierte während einer 16-stündigen Zentrifugation bei $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $130.00 \times g$. Der Überstand wurde bis auf ca. 100 μl entfernt und die Zentrifugationsröhrchen kurz auf dem Kopf stehend getrocknet. Anschließend wurde das RNA-Pellet in 360 μl TES-Puffer resuspendiert und durch

Zugabe von 40 µl 3 M Natriumacetat pH 7,5 und 1 ml Ethanol bei -80 °C gefällt. Nach Zentrifugation und Trocknung wurde die RNA in 360 µl H₂O mit 0,2 % DEPC gelöst und erneut gefällt. Das aus dieser Fällung hervorgegangene Pellet wurde in 150 µl DEPC-behandeltem H₂O gelöst und die RNA-Konzentration bei 260 nm bestimmt (1 A 260 nm = 40 µg RNA). Die RNA wurde als wässrige Lösung oder als Ethanolpräzipitat bei -80 °C gelagert.

2.6.5 Northern-Blot-Analyse

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung		
10 x MOPS-Puffer	2	M	MOPS
	0,5	M	Natriumacetat
	10	mM	EDTA
Hybridisierungspuffer	50	%	Formamid
	5	x	SSC
	1	%	SDS
	1	x	Denhardt's
Prähybridisierungspuffer	50	%	Formamid
	5	x	SSC
	1	%	SDS
	2	x	Denhardt's
RNA Trenngel	20	%	Formaldehyd (35%)
	1,2	%	Agarose
	in Mops Puffer		
	Ethidiumbromid		

Bei einem Northern-Blot werden RNA-Moleküle gelelektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Trägermembran übertragen und dort immobilisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde dazu je Transformante ein Pellet mit 70 µg *D. discoideum* Gesamt RNA in 8,2 µl Aqua bidest. aufgenommen und nach Zugabe von 3,5 µl 10 x MOPS-Puffer, 5,8 µl 35 % Formaldehyd und 17,5 µl Formamid 10 min bei 65 °C denaturiert.

Nach Zugabe von 2 µl denaturierendem Auftragspuffer wurde die RNA bei 15-40 V konstanter Spannung mit einer Laufzeit von 6-16 h elektrophoretisch in einem denaturierenden MOPS-Gel aufgetrennt. Als Größenmarker dienten die unter Beleuchtung mit UV Licht von 254 nm Wellenlänge sichtbaren Banden der ribosomalen RNA mit einer Größe von 4,1 und 1,9 kB.

Die RNA wurde auf eine Nylonmembran geblottet, luftgetrocknet und durch 2-stündiges Erhitzen auf 80 °C auf der Membran immobilisiert. Der Nachweis spezifischer RNA-Moleküle erfolgte durch Hybridisierung mit rezeptorspezifischer DNA, die entweder über Nicktranslation mit α -[³²P]-dATP oder über Phosphorylierung von Oligonukleotiden mit γ -[³²P]-ATP markiert wurde. Dazu wurde die Membran zunächst 2 h bei 42 °C in Prähybridisationspuffer (für Nicktranslatierte Proben) bzw. in Oligonukleotidpuffer und anschließend 8-16 h bei 42 °C in Hybridisationspuffer (Nicktranslatierte Proben) bzw. Oligonukleotidpuffer mit der markierten DNA inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener radioaktiver DNA wurde bei nicktranslatierten Proben zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSC und dann 10 Minuten bei 65 °C in 2 x SSC, 0,5 % SDS gewaschen. Bei radioaktiv phosphorylierten Oligonukleotiden wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur in 4 x SSC, 0,1 % SDS und 10 Minuten bei einer vom jeweiligen Primer abhängigen Temperatur in 4 x SSC gewaschen. Die gebundene Radioaktivität konnte dann auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

2.6.6 Membranpräparation

Puffer	Zusammensetzung		
Puffer 1	25	mM	Na-Phosphat pH 7,4 25°C
	10	mM	EDTA
	1	mM	EGTA
	0,2	mM	DTT
	mit 30 % bzw. 35 % oder 55 % Saccharose (m/v)		
Puffer 2	100	mM	Na-Phosphat pH 7,4, 25°C
	2	mM	EDTA
	1	mM	EGTA
	0,2	mM	DTT

Die hier beschriebene Methode der Membranpräparation beruht auf einem Protokoll von Stratford bzw. Spudich (Spudich, 1974; Stratford and Brown, 1985). Zellen einer logarithmisch wachsenden Zellkultur wurden durch 4-minütige Zentrifugation bei 250 x g und 4 °C geerntet und zweimal mit eiskaltem 17 mM Phosphatpuffer pH 6,5 gewaschen. Zur Membranpräparation wurden zwischen 200 ml und 500 ml einer Zellsuspension mit einer Dichte von etwa 1 bis 5 x 10⁶ Zellen/ml herangezogen. Das resultierende Zellpellet wurde im gleichen Volumen Puffer 1 mit 30 % Saccharose aufgenommen und durch Einfrieren bei -80 °C und Auftauen lysiert. In 5 ml Zentrifugenröhrchen wurde ein

Stufengradient aus Puffer 1 mit 55 % Saccharose und Puffer 1 mit 35 % Saccharose vorgelegt (je 2 ml), vorsichtig mit 1 ml der lysierten Zellen überschichtet und eine Stunde bei 4 °C und 150.000 x g zentrifugiert. An der Phasengrenze wurden die Membranen mit einer Pasteurpipette abgezogen, anschließend zweimal mit eiskaltem Puffer 2 gewaschen und bei 4 °C und 25.000 x g für jeweils 20 min zentrifugiert. Das Membranpellet wurde anschließend in eiskaltem Bindepuffer resuspendiert und die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford bestimmt. Man erhält mit der beschriebenen Methode etwa 30 µg Membranfraktion je 1×10^7 Zellen als Ausgangsmaterial.

2.7 Radioliganden-Bindungsstudien

- **Sättigungsexperimente**

Puffer/ Material	Zusammensetzung
„Bindepuffer“	25 mM Na-Phosphat pH 7,4, 25 °C 5 mM MgCl ₂
EDV Programm Prism 2.01	Fa. GraphPad

Radioliganden-Bindungsstudien sind eine Methode, um Wechselwirkungen zwischen Rezeptorproteinen mit ihren spezifischen Liganden zu charakterisieren. Im wesentlichen besteht eine solcher Versuch aus zwei Teilen: zum einen wird die zu untersuchende Gewebepräparation mit steigenden Mengen an radioaktivem Liganden inkubiert, zum anderen wird die gleiche Versuchsanordnung in Anwesenheit eines 100-1000fachen Überschusses (bezogen auf den jeweiligen K_D -Wert) nicht radioaktiven Liganden durchgeführt. Im ersten Fall bindet der radioaktive Ligand sowohl an spezifische Bindestellen mit hoher Affinität als auch an unspezifische Bindestellen mit niedriger Affinität. Im zweiten Fall werden alle spezifischen Bindestellen durch den starken Überschuss an nichtradioaktiv markiertem Liganden besetzt, so dass radioaktiv markierte Ligandenmoleküle nur noch an unspezifische Bindestellen binden können. Bildet man die Differenz der entsprechenden Werte aus der ersten Versuchsanordnung und der zweiten Versuchsanordnung, so erhält man die Menge an Radioaktivität, die durch spezifische Bindeproteine gebunden wird. Diese Menge ist ein direktes Maß für die spezifische Bindung und die entsprechenden Rezeptoren. Da die Anzahl an spezifischen Bindezellen für Liganden begrenzt ist, ist eine solche Bindung sättigbar, das heisst sie erreicht einen Maximalwert. Unspezifische Bindestellen hingegen sind in so großer Anzahl vorhanden,

dass sie unter den Versuchsbedingungen nicht alle besetzt werden können, das heisst, eine solche Bindung ist nicht sättigbar.

Die nach dem oben beschriebenen Verfahren erhaltenen Daten wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes ausgewertet. Dadurch kann man zum einen die Anzahl der Rezeptorproteine (über den B_{\max} -Wert) in der Gewebepräparation errechnen, zum anderen kann man die Stärke der Wechselwirkung von Rezeptor und Ligand beschreiben (über den K_D -Wert).

Als Radioligand wurde in der vorliegenden Arbeit [^3H]-N-Methylscopolamin in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 15, 30, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 und 6400 pM. Als nicht radioaktiv markierter Ligand wurde Atropin in einer Konzentration von 1,5 μM verwendet. Die Inkubationsdauer betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Versuche wurden mit 2×10^6 Zellen bzw. 60 μl Gewebepräparation (entsprechend etwa 2×10^7 Zellen) je Versuchsansatz durchgeführt. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm Prism 2.01 der Firma GraphPad. Dabei werden die Werte für K_D und B_{\max} mittels nicht-linearer Regression über folgende Gleichung, die sogenannte Langmuir-Isotherme, ermittelt:

$$Y = B_{\max} * X / (K_D + X)$$

K_D = Äquilibriumdissoziationskonstante

B_{\max} = maximale Bindungskapazität

Y = Gebundener Ligand

X = Freier Ligand

B_{\max} hat die gleiche Einheit wie Y, (cpm bzw. fmol/ Zellen), K_D die gleiche Einheit wie X (pM oder nM).

• **Kompetitionsexperimente**

Zur Identifizierung eines Rezeptor-Subtypen können Kompetitionsexperimente mit Rezeptor-Subtypspezifischen Liganden (Kompetitoren) durchgeführt werden. Dabei setzt man eine gleichbleibende Menge an radioaktiv markiertem Liganden und gleichzeitig steigende Mengen eines nicht radioaktiv markierten Kompetitors ein. Durch die steigenden Mengen an Kompetitor wird der Radioligand zunehmend von seinen Bindungsstellen verdrängt.

Auch zur Auswertung der Daten aus Konkurrenzexperimenten wurde das EDV-Programm Prism 2.01 verwendet.

Die Werte für IC_{50} , (die Konzentration an unmarkiertem Liganden, welche die Hälfte der Spezifischen Bindung des markierten Liganden blockiert) ermittelt das Programm über nicht-lineare Regression nach folgender Gleichung:

$$Y = NSB + (TB - NSB) / (1 + 10^{(X - \log IC_{50})})$$

NSB: Nicht-Spezifische Bindung

TB: Totale Bindung

Mit Hilfe des IC_{50} -Wertes kann dann der Wert für K_i (der Äquilibriumsdissoziationskonstanten des unmarkierten Kompetitors) nach der Gleichung von Cheng-Prusoff berechnet werden:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [R] / K_d)$$

R: Konzentration des eingesetzten Radioliganden

Analog zu B_{max} hat IC_{50} die gleiche Einheit wie Y, (cpm bzw. fmol/Zellen), K_d hat die gleiche Einheit wie X (pM oder nM)

Der Hill-Koeffizient wurde bei Konkurrenzexperimenten über nicht-lineare Regression mit folgender Gleichung ermittelt:

$$Y = NSB + (TB - NSB) / (1 + 10^{((\log IC_{50} - X) * n_H)})$$

n_H = Hill-Koeffizient

2.8 Messung der β -Galaktosidaseaktivität

Mit den in diesem Abschnitt beschriebenen Versuchen sollte untersucht werden, ob die endogenen Komponenten der Signaltransduktion in *Dictyostelium discoideum* heterolog exprimierte Muskarin-Rezeptoren erkennen. Dazu wurde das Gen für die β -Galaktosidase als Reporter gen verwendet (Dingermann et al., 1989) und zusätzlich zu dem Gen für den Muskarin-Rezeptor in *Dictyostelium-discoideum*-Zellen transformiert. Die Transformation erfolgte simultan mit äquimolaren Mengen der einzelnen Plasmide.

2.8.1 Versuche mit aggregationskompetenten Zellen

Zellen einer logarithmisch wachsenden Zellkultur von Mehrfachtransformanden wurden geerntet und mit 17 mM Phosphatpuffer pH 6,5 gewaschen. Die Zellen wurden in Phosphatpuffer in einer Zelldichte von $0,5-1,0 \times 10^7$ aufgenommen und unter diesen Hungerbedingungen für 6-7 Stunden bei 150 upm geschüttelt. Zellen, die zusätzlich mit dem GBF-Konstrukt („G box binding factor“, siehe Ergebnisteil) transformiert waren, wurden nur 30 min in Phosphatpuffer inkubiert, da die GBF-Bildung unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Aktin-15-Promotors erfolgte und somit auch ohne Hungerinduktion ausreichende Mengen an GBF gebildet wurden.

Dann wurde cAMP in einer Endkonzentration von 200 μ M oder 300 μ M bzw. Muskarin oder Carbachol in Endkonzentrationen zwischen 10 μ M und 2 mM zugegeben und für weitere 90 Minuten geschüttelt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die keine weitere Behandlung durch cAMP, Muskarin oder Carbachol erfahren hatten. Nach dem Ernten der Zellen durch 4-minütiges Zentrifugieren bei 250 x g wurde das Pellet in Aufschlusspuffer resuspendiert (1x Phosphatpuffer pH6,5 und 0,1 % Triton, 50 μ l Puffer für 1×10^6 Zellen) und die Zellsuspension eingefroren.

Die Zellsuspension wurde zur Lyse aufgetaut, jeweils 50 μ l davon mit 50 μ l CPRG-Lösung versetzt und anschließend mit dem ELISA-Reader vermessen. Als Nullwert diente eine Mischung aus 50 μ l CPRG-Lösung und 50 μ l Aufschlusspuffer.

2.8.2 Versuche mit differenzierenden Zellen

Zellen einer logarithmisch wachsenden Zellkultur von Mehrfachtransformanden wurden geerntet, mit 17 mM Phosphatpuffer pH 6,5 gewaschen und auf eine Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml eingestellt.

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden in 24-Wellplatten durchgeführt. Es wurden 500 mg 1 %iger Phosphatagar pro Vertiefung bei einer Temperatur von 40 °C ausgegossen. Als Vergleich zu den Transformanden auf Platten mit Carbachol oder Acetylcholin, die in verschiedenen Konzentrationen zwischen 20 nM und 500 μ M im Agar gelöst vorlagen, dienten Transformanden auf Platten ohne jeden weiteren Zusatz. Nach dem Trocknen der gegossenen Platten wurden je Well 30 μ l einer Zellsuspension von 1×10^8 Zellen/ml in Phosphatpuffer aufgetropft und zum Trocknen stehengelassen. Diese Zellen entstammten Schüttelkulturen mit einer maximalen Zelldichte von 5×10^6

Zellen/ml. Die Entwicklung der Zellen erfolgte dann in einem mit Wasser befeuchteten Exsikkator. Nach verschiedenen Zeiten zwischen 6 und 24 Stunden wurden die Zellaggregate durch Zugabe von 150 µl Aufschlusspuffer und Schütteln bei 140 upm für 2 Stunden lysiert. 50 µl aus jedem Well wurden mit 50 µl CPRG Lösung gemischt und im ELISA-Reader vermessen.

2.9 Aktinpolymerisation

Puffer/ Gerät	Zusammensetzung/ Hersteller		
Protease Inhibitor Mix P-2714	Fa. Sigma		
2 x TX-Lysispuffer pH 7,0	2	%	Triton X-100
	20	mM	EGTA
	4	mM	NaN ₃
	20	mM	KCl
	20	mM	Imidazol
	1	%	Protease Inhibitor Mix
Gel Doc 1000	Bio Rad		

Die in diesem Abschnitt behandelte Methode der Aktinpolymerisation wurde zuerst im Jahre 1983 beschrieben und ermöglicht es, den cAMP vermittelten Anstieg an F-Aktin zu ermitteln (McRobbie and Newell, 1983; Brink et al., 1990).

Die gewählte Versuchsdurchführung war wie folgt:

Logarithmisch wachsende Zellen mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml wurden zweimal mit Phosphatpuffer pH 6,5 gewaschen und anschließend im gleichen Puffer bei einer Dichte von 5×10^7 Zellen/ml für 6,5 Stunden bei 150-170 upm und 22 °C geschüttelt. Eine 24-Well-Platte wurde in einen Vortexer eingespannt und mit 270 µl der Zellsuspension pro Well geschüttelt. Die Zellen wurden mit 30 µl einer 1 oder 10 mM cAMP-Lösung oder 30 µl einer 0,1, 1, 10 oder 50 mM Muskarin-Lösung stimuliert und die Reaktion nach 0/1/3/5/8/10/12/15/20/30 und 60 s durch Zugabe von 300 µl 2 x TX Lysispuffer und Lyse der Zellen gestoppt. Die lysierten Zellen wurden dann für 10-15 Minuten auf Eis und anschließend 10-20 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach 10-minütiger Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 14.000 upm wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 300 µl 1 x Auftragspuffer (siehe Abschnitt SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgenommen. Nach SDS-Gelelektrophorese wurde die Stärke der Banden bzw. der Aktinanstieg mit Hilfe des Gerätes Gel Doc 1000 der Firma Biorad und des Computerprogrammes Molecular Analyst durch Scannen bestimmt. Dabei

wird über jede Bande eine Fläche in Form einer Ellipse gelegt, für alle Banden ist die Fläche in Form und Größe exakt gleich. Das Programm ermittelt nun den Intensitätsunterschied der Färbung/ Grad der Dunkelheit zwischen Ellipsenrand und Inhalt und berechnet daraus einen Zahlenwert, der proportional zur Proteinmenge der Bande ist.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden mit folgenden Muskarin-Rezeptor-Subtypen gearbeitet:

Humaner M1-Rezeptor

Humaner M2-Rezeptor

Humaner M3-Rezeptor

Humaner M4-Rezeptor

Humaner M5-Rezeptor

Die cDNA wurde freundlicherweise von den Herren Dr. T.I. Bonner (M1, M3, M4, M5) und Dr. J. Wess (M2), Bethesda, USA überlassen. Die jeweiligen cDNAs waren Bestandteil von Expressionsplasmiden für Säugerzellen.

3.1 Expressionsplasmide

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden *Dictyostelium-discoideum*-Expressionsplasmide mit unterschiedlichen Promotoren verwendet. Grundlage der Plasmide mit Aktin-Promotor und mit Discoidin-Promotor waren die Plasmide pDXA-3C, pDXD-3C und pDXD-3H, die in der Arbeitsgruppe um Dieter Manstein entwickelt wurden und sich bei der Expression homologer Proteine bewährt haben (Manstein et al., 1995). Sie haben alle einen gemeinsamen Ursprungsvektor (pB10TP2) (Early and Williams, 1987).

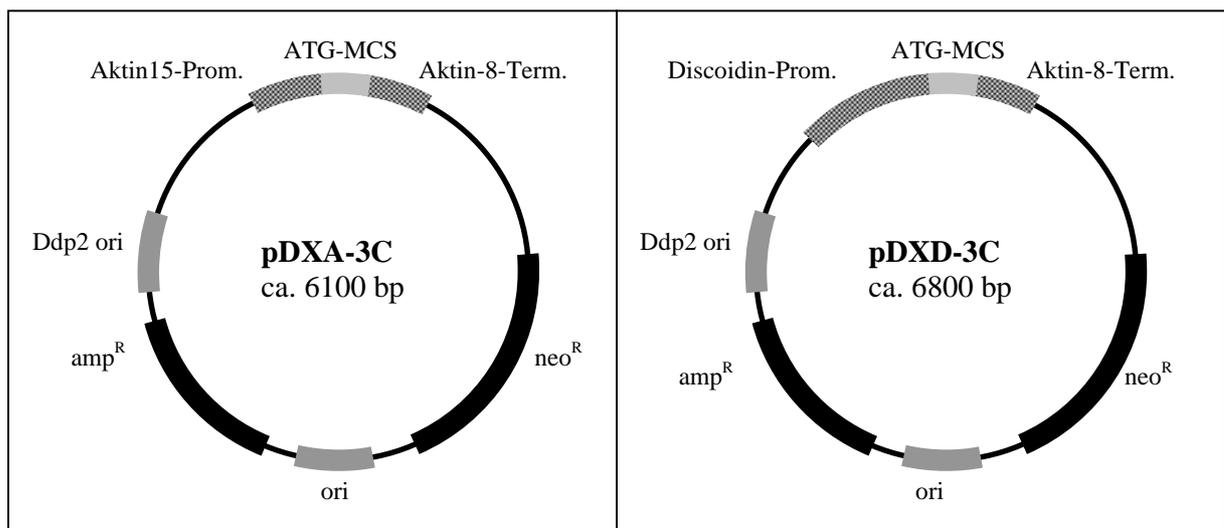


Abbildung 6: Die Expressionsvektoren pDXA-3C und pDXD-3C

Abgesehen von der unterschiedlichen Promotorsequenz und geringen Unterschieden in der multiple-cloning-site (MCS) sind die Vektoren identisch. Das „A“ bzw. das „D“ im

3. Ergebnisse

Plasmidnamen deutet auf den verwendeten Promotor hin. Bei dem Aktin-15-Promotor handelt es sich um einen starken konstitutiven Promotor, während der Discoidin-1- γ -Promotor ein schwächeres und durch hohe Zelldichten induzierbares Kontrollelement ist. „3C“ steht für das c-myc-Epitop am 3'-Ende der Klonierungsstelle, „3H“ weist auf eine Histidinfolge am C-Terminus des exprimierten Proteins hin. Über beide Fusionsanteile lassen sich die exprimierten Proteine nachweisen bzw. aufreinigen. Die Sequenz der multiple-cloning-site von pDXA-3C lautet:

CAA	GCT	TAA	AAA	ATG	GAT	GGT	ACC	GAG	CTC	GGA	TCC	ACT	CGA	GAT
<i>Hind III</i>						<i>Kpn I</i>		<i>Sac I</i>		<i>BamHI</i>		<i>Xho I</i>		<i>Nsi I</i>
GCA	TTA	GAA	CAA	AAA	TTA	TTA	TCA	GAA	GAA	GAT	TTA	AAT	TAA	TCT
AGA	AAA	TTA	TTA	TCA	GAA	GAA	GAT	TTA	AAT	TAA	TCT	AGA		<i>Xba I</i>

DNA-Sequenz 1: Multiple-cloning-site von pDXA-3C

Die MCS des Vektors pDXD-3C unterscheidet sich davon lediglich im Abschnitt zwischen dem Start-ATG und der *Kpn I* Schnittstelle:

ATG	TCT	AGT	GGT	ACC	GAG	CTC	TAA	TCT	AGA
		<i>Kpn I</i>			<i>Sac I</i>				<i>Xba I</i>	

DNA-Sequenz 2: Multiple-cloning-site von pDXD-3C

Beide Vektoren besitzen in der MCS ein eigenes Start- und Stoppcodon, die jeweils durch Fettdruck hervorgehoben sind. Am C-Terminus befindet sich zwischen der Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *Nsi I* und dem TAA-Stoppcodon die Sequenz des c-myc-Epitopes. Dieses Epitop wird aber lediglich dann exprimiert, wenn kein Gen-eigenes Stoppcodon sondern dasjenige des Vektors verwendet wird. Zur Selektion in *Dictyostelium discoideum* dient in diesen Expressionsvektoren das Resistenzgen gegen Neomycin und verwandte Substanzen wie Geneticin (G418). Der Ddp 2 ori ermöglicht bei geeigneten *Dictyostelium-discoideum*-Stämmen die Erzeugung von Transformanten mit extrachromosomal persistierenden Plasmiden (siehe Abschnitt Material und Methoden), die dann in geringer Kopienzahl von bis zu 10 Plasmiden vorliegen (Manstein et al., 1995).

Expressionsplasmide mit Ras-Promotor wurden ausgehend von dem Plasmid pER III (Fasel et al., 1992) kloniert. Der Ras-Promotor ist ein starker Promotor, der während Wachstums- und früher Entwicklungsphase inaktiv ist. Er ist durch 6-stündiges Schütteln

3. Ergebnisse

in Phosphatpuffer und anschließende Zugabe von cAMP in einer Endkonzentration von 200 µM induzierbar. Die DNA-Sequenz vom Startcodon bis zum Ende der MCS ist im Folgenden dargestellt, wobei die DNA-Sequenz des CSA-Signalpeptides unterstrichen ist. Das CSA-Signalpeptid ist in *Dictyostelium discoideum* für den Membrantransport eines Oberflächenadhäsionsproteins verantwortlich (Noegel et al., 1986) und wird beim Übertritt in das Endoplasmatische Retikulum abgespalten.

<u>ATG TCT AGA TTT</u> TTA GTA TTG ATA ATA TTA TAT AAT ATT TTA AAT
<i>Xba I</i>
AGT GCA CAT TCA GCT CCA ACC CAG GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG
<i>BamHI</i> <i>Kpn I</i> <i>Sac I</i>
AAT TCA TCG TCT CGA G
<i>Eco RI</i> <i>Xho I</i>

DNA-Sequenz 3: Signalpeptid und MCS in pER III

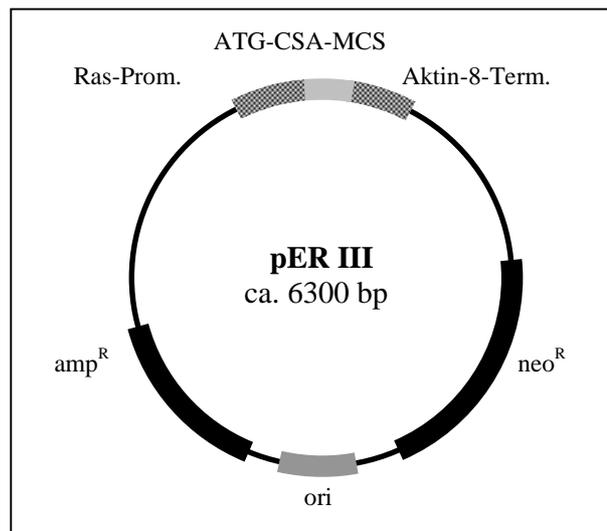


Abbildung 7: Der Expressionsvektor pER III

Abgesehen von Plasmid pAM 1 wurden alle Expressionsplasmide so konstruiert, dass das jeweils Gen-eigene-Stoppcodon genutzt wurde. Zur Klonierung der entsprechenden Rezeptor-DNA in die Expressionsplasmide wurde am 3'-Ende der Gene für den jeweiligen Rezeptor-Subtyp stets die gleiche Restriktionsschnittstelle verwendet. Die Erkennungssequenz liegt auf der cDNA 3' vom Stoppcodon, so dass die Carboxyenden der rekombinanten Proteine denen der nativen Proteine entsprechen. Die verschiedenen DNA-Abschnitte zwischen Gen und Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease sehen somit folgendermaßen aus:

3. Ergebnisse

M1-cDNA TGA TAG TCC CCT CTC GAG..... Aktin-8-Terminator Stop Xho I
--

DNA-Sequenz 4: 3'-Ende bei M1

M3-cDNA TAG AAT GCA T..... Aktin-8-Terminator Stop Nsi I
--

DNA-Sequenz 5: 3'-Ende bei M3

M4-cDNA TAG GCA GGC TCG AG..... Aktin-8-Terminator Stop Xho I

DNA-Sequenz 6: 3'-Ende bei M4

M5-cDNA TGA AAA GTC AAC AAC TCC TCT CGA G.... Aktin-8-Terminator Stop Xho I

DNA-Sequenz 7: 3'-Ende bei M5

3.1.1 Plasmide mit Aktin-15-Promotor, ohne Signalsequenz

- **pDXA-3Cm1/ m4/ m5**

Die cDNA der Muskarin-Rezeptor-Subtypen M1, M3, M4 und M5 wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pGem-7ZF zwischenkloniert. Dazu wurden die Primerpaare 1.1/ 1.3, 3.1/ 3.3, 4.1/ 4.3 und 5.1/ 5.3 verwendet. Anschließend wurde die Rezeptor-DNA der Subtypen 1, 4 und 5 durch die Restriktionsendonukleasen *BamH* I und *Xho* I aus den jeweiligen pGem-Vektorkonstrukten isoliert, aufgereinigt und in den Vektor pDXA-3C kloniert. Dabei liegt die *Xho*-I-Erkennungssequenz jeweils hinter dem Gen-eigenen Stoppcodon, so dass der Carboxyterminus des Proteins genau dem nativen Protein entspricht. Bei den Subtypen M1 und M4 liegt die *BamH*-I-Erkennungssequenz jeweils direkt vor dem Gen-eigenen Startcodon, bei dem Subtyp M5 im 3. Codon nach dem Start-ATG (siehe Abschnitt PCR-Primer). Alle drei Vektoren weisen zwei ATG-Startcodons nach der Promotorsequenz auf und enthalten sechs Codons zusätzlich am 5'-Ende der jeweiligen Rezeptor-DNA. Die DNA-Abschnitte an den 5'- und der 3'-Enden sehen somit folgendermaßen aus:

3. Ergebnisse

Promotor	AAA TGG ATG GTA CCG AGC TCG <i>GAT</i> CCC ATG M1/M4-cDNA
	<i>BamH I</i>
<i>CTC GAG</i>	Terminator
<i>Xho I</i>	

DNA-Sequenz 8: Bereich 5'-Ende von M1 und M4 in pDXA-3Cm1/m4

Promotor	AAA TGG ATG GTA CCG AGC TCG <i>GAT</i> CCC M5-cDNA
	<i>BamH I</i>
<i>CTC GAG</i>	Terminator
<i>Xho I</i>	

DNA-Sequenz 9: Bereich 5'-Ende von M5 in pDXA-3Cm5

- **pAM1**

Um den eventuell störenden Einfluss Rezeptor-fremder Aminosäuren am 5'-Ende auszuschließen, wurde für den Subtyp M1 ein Vektor konstruiert, der keine Rezeptor-fremden Codons am 5'-Ende enthält. Dieser Vektor wurde pAM 1 genannt und leitet sich ebenfalls von dem Vektor pDXA-3C ab. Das ATG in pAM 1 ist identisch mit dem ATG des Rezeptors, das heißt, die Rezeptor-DNA beginnt direkt am Ende des Promotors. Am 3'-Ende wird im Gegensatz zu allen anderen in dieser Arbeit erwähnten Konstrukten nicht das Gen-eigene-Stoppocodon verwendet, sondern dasjenige des Ausgangsvektors.

Wiederum ausgehend von dem Säugerplasmid Hm1pCD wurde unter Verwendung der PCR-Primer M1 Hind und M1 Nsi die Rezeptor-DNA amplifiziert, dabei mit den entsprechenden Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme versehen und in den Vektor pGem-7ZF zwischenkloniert. Aus diesem Vektor wurde die Rezeptor-DNA durch Behandlung mit *Hind* III und *Nsi* I isoliert und in den Vektor pDXA-3C kloniert.

Die *Hind*-III-Erkennungssequenz befindet sich im Vektor direkt 5' vor dem Start-ATG. 5'- und 3'-Ende haben somit folgende Nukleotidsequenz:

Promotor...	CAA <i>GCT</i> TAA AAA ATG M1-cDNA <i>GAT</i> GCA TTA GAA.....	TAA
	<i>Hind III</i>	<i>Nsi I</i>
<i>TCT AGA</i>	Terminator	
<i>Xba I</i>		

DNA-Sequenz 10: Bereich 5'- und 3'-Ende M1 in pAM1

3. Ergebnisse

3.1.2 Plasmide mit Discoidin-Promotor, ohne Signalsequenz

- **pDXD-3Cm1/ m4/ m5**

Die Plasmide dieser Gruppe wurden analog zu denen mit Aktin-Promotor und ohne Signalsequenz konstruiert. Die Rezeptor-DNA wurde wiederum durch *BamH I* und *Xho I* aus dem pGem-Zwischenvektor isoliert und in den Expressionsvektor pDXD-3C kloniert. Das ATG des Expressionsvektors steht nicht im Leserahmen der Rezeptor-DNA. Somit ist bei M1 und bei M4 das erste ATG im korrekten Leserahmen das Start-ATG der Rezeptor-DNA. Für M1 und M4 ergibt sich somit folgende Nukleotidabfolge:

Promotor... AAA TGT CTA GTG GTA CCG AGC TCG GAT CCC ATG.....
<i>Kpn I</i> <i>Sac I</i> <i>BamH I</i>
M1/ M4-cDNA CTC GAG.... Terminator
<i>Xho I</i>

DNA-Sequenz 11: Bereich 5'-Ende von M1 und M4 in pDXD-3Cm1/m4

Da das PCR-Produkt der M5-Rezeptor-DNA kein eigenes ATG besitzt, musste der Leserahmen des Expressionsvektors entsprechend angeglichen werden. Versuche, den Vektor durch Behandlung mit „Mung Bean Nuklease“ um vier vor dem Rezeptorabschnitt liegende Basen zu verkürzen, was die cDNA für den Rezeptor in den gleichen Leserahmen wie das Vektor-eigene ATG gebracht hätte, schlugen fehl. Als Alternative wurde daher mit Hilfe des Enzyms *Ecl136 II*, das die gleiche Nukleotidsequenz erkennt wie *Sac I*, der Vektor blunt end geschnitten und mit dem 8 Basenpaare langen *Not*-Linker aufgefüllt. Somit besitzt der Vektor nur ein ATG, das im Leserahmen der Rezeptor-cDNA steht und zusätzlich 3 Triplets, die über die *Not*-Linker-Sequenz eingeführt wurden. Diese Triplets kodieren für die Aminosäure Alanin und verwenden in *Dictyostelium discoideum* selten benutzte Codons. Die Nukleotidabfolge des Vektors pDXA-3Cm5 sieht folgendermaßen aus:

Promotor... ATG TCT AGT GGT ACC GAG <u>GCG GCC GCC</u> TCG GAT CCT
<i>Kpn I</i> <i>Not-Linker</i>
M5-cDNA..... Terminator

DNA-Sequenz 12: Bereich 5'-Ende von M5 in pDXD-3Cm5

3.1.3 Plasmide mit Aktin-15-Promotor, mit Signalsequenz

- **pDXA-L3Cm1/ m3/ m4/ m5**

Zunächst wurden die beiden Primer CSA-for und CSA-back durch eine „Annealing“-Reaktion miteinander verknüpft und anschließend die überhängenden Enden mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt. Das entstehende Produkt wurde mit den Enzymen *Kpn* I und *Nsi* I inkubiert und in den ebenso behandelten Vektor pDXA-3C kloniert. Der neu gebildete Expressionsvektor erhielt den Namen pDXA-L3C. Er besitzt vor dem DNA-Abschnitt für die CSA-Signalsequenz noch drei aus dem Expressionsvektor stammende Triplets und ein zusätzliches ATG im gleichen Leserahmen. In diesem Vektor fehlt das durchgestrichene Triplet (~~TTA~~), das in dem Primer und der nativen DNA-Sequenz für das Leader-Peptid vorkommt. Eventuell wurden die Basen bei der Reaktion mit Klenow-Polymerase nicht mit amplifiziert.

In diesen Vektor wurden die jeweiligen DNA-Abschnitte der Muskarin-Rezeptor-Subtypen über *Bam*H I/ *Xho* I (M1/ M4 und M5) bzw. *Bam*H I/ *Nsi* I (M3) inseriert. Am 5'-Ende haben die Expressionsvektoren die folgende, identische Nukleotidabfolge, dargestellt bis zur Erkennungssequenz des Restriktionsenzymes *Bam*H I. Ab *Bam*H I sind die Vektoren identisch mit den Vektoren der Reihe pDXA-3C.

ATG GAT GGT ACC ATG TCA AGA TTT TTA GTA TTG ATA ATA TTA TAT	
<i>Kpn</i> I	CSA-leader-Sequenz
AAT ATT TTA AAT AGT GCA CAT TCA GCT TTG AGC TCG GAT CC	
<i>Sac</i> I	<i>Bam</i> H I

DNA-Sequenz 13: Bereich zwischen ATG und BamH-1 in pDXA-L3C

- **pDA-L3Cm1/ m3/ m4/ m5**

Eine zweiter Weg, Expressionsplasmide mit Signalsequenz und Aktin-15-Promotor zu erhalten, wurde mit der Klonierung des Plasmides pDA-L3C beschritten. Hierzu wurden, basierend auf dem kommerziell erhältlichen Vektor pUC 19, zwei Plasmide als Vorstufen kloniert.

Zunächst wurden unter Generierung einer *Hind*-III- und einer *Asp*-718-Schnittstelle die beiden Primer VS1 und VS2 durch Annealing zu einem DNA-Doppelstrang vereinigt und in den durch die Restriktionsenzyme *Hind*-III und *Asp*-718 behandelten Vektor pUC 19

3. Ergebnisse

kloniert. Dieser Vektor wurde pUC-VS genannt. Er besitzt zwischen den beiden genannten Schnittstellen noch die Erkennungssequenz für das Enzym *Xba* I.

Aus dem Vektor pDDL-3C wurden Signalsequenz und MCS über *Xba*-I-Behandlung isoliert und in den Vektor pUC-VS kloniert. Nach Überprüfung auf richtige Orientierung wurde dieser Vektor mit „pUC-LMM“ bezeichnet.

Aus pUC-LMM wurde ein *Hind*-III-/ *Xho*-I-Fragment isoliert und in pDXA-3C kloniert. Der resultierende Expressionsvektor ist so aufgebaut, dass direkt nach dem Start-ATG die Signalsequenz ohne zusätzliche Codons folgt. Der DNA-Abschnitt bis zum Start-ATG ist identisch zum Vektor pDXA-3C und bildet das 3'-Ende des Aktin-15-Promotors. In diesen Vektor wurden die DNA-Abschnitte der Muskarin-Rezeptor-Subtypen wiederum mittels Behandlung durch *Bam*H I und *Xho* I (M1, M4 und M5) bzw. *Bam*H I und *Nsi* I (M3) inseriert.

Promotor	CAA	GCT	TAA	AAA	ATG	TCT	AGA	TTT	TTA	GTA	TTG	ATA	ATA
	<i>Hind III</i>					<i>Xba I</i>		CSA-Signalsequenz					
	TTA	TAT	AAT	ATT	TTA	AAT	AGT	GCA	CAT	TCA	GCT	CCA	ACC
	CSA-Signalsequenz												
	CAG	GAT	CC	MCS	TCT	AGA	Terminator						
	<i>BamHI</i>				<i>Xba I</i>								

DNA-Sequenz 14: Bereich zwischen ATG und BamH I in pDA-L3C

3.1.4 Plasmide mit Discoidin-Promotor, mit Signalsequenz

- pDXD-L3Hm1/ m3/ m4/ m5

Zunächst wurde der Expressionsvektor pDXD-L3H parallel zu pDXA-L3C konstruiert und analog zu dem dort beschriebenen Verfahren die jeweilige Rezeptor-DNA inseriert. Aufgrund des geringfügig anderen Aufbaus des Ausgangsvektors besitzt pDXD-L3H im Vergleich zu pDXA-L3C vier anstatt drei zusätzliche Triplets zwischen den beiden ATGs. Folgende Struktur liegt am 5'-Ende vor.

ATG	TCT	AGT	GGT	ACC	ATG	TCA	AGA	TTT	TTA	GTA	TTG	ATA	ATA	TTA	
	<i>Kpn I</i>						CSA-leader-Sequenz								
	TAT	AAT	ATT	TTA	AAT	AGT	GCA	CAT	TCA	GCT	TTG	AGC	TCG	GAT	CC
											<i>Sac I</i>		<i>BamHI</i>		

DNA-Sequenz 15: Bereich zwischen ATG und BamH-1 in pDXD-L3C

3. Ergebnisse

- **pDD-L3Cm1/ m3/ m4/ m5**

Als erstes wurden der Discoidin-1 γ -Promotor, die anhängende CSA-Signalsequenz und die multiple Klonierungsstelle aus dem Vektor pVEII-CSA hm2 von G. Voith (Voith and Dingermann, 1995b) über die Schnittstellen *Bam*H I und *Xho* I isoliert. Dieses Fragment wurde in den mit *Bam*H I und *Sal* I hydrolysierten Vektor pDXA-3C kloniert. Die beiden Restriktionsenzyme *Sal* I und *Xho* I bilden nach der Hydrolyse dieselben Nukleotidüberhänge. Dadurch lassen sich mit ihnen generierte DNA-Fragmente ligieren, jedoch anschließend nicht wieder durch sie hydrolysieren. Somit wurde die Sequenz des Aktin-15-Promotors im Vektor durch den Discoidin-Promotor mit anhängender Signalsequenz ersetzt. Der so gebildete Vektor wurde pDDL-3C genannt und hat nachfolgende Nukleotidabfolge in dem betreffenden Abschnitt. Auch in diesen Vektor wurden die DNA-Abschnitte der Muskarin-Rezeptor-Subtypen durch Behandlung mit *Bam*H I und *Xho* I oder *Nsi* I inseriert.

ATG TCT AGA TTT TTA GTA TTG ATA ATA TTA TAT AAT ATT TTA AAT	
<i>Xba</i> I	CSA-Signalsequenz
AGT GCA CAT TCA GCT CCA ACC CAG GAT CC MCS TCT AGA	
<i>Bam</i> H I	<i>Xba</i> I

DNA-Sequenz 16: Bereich zwischen ATG und BamH-I in pDD-L3C

3.1.5 Plasmide mit Ras-Promotor, mit Signalsequenz

- **pER III m1**

Zunächst wurde die Rezeptor-DNA über die Restriktionsenzyme *Bam*H I und *Xba* I in den Vektor pBluescript II KS kloniert. Aus diesem Vektor wurde die DNA durch Behandlung mit *Eco*R I und *Xho* I isoliert und in den Expressionsvektor pER III integriert. Klonierungsbedingt befinden sich einige zusätzliche Codons zwischen der Signalsequenz und der Rezeptor-DNA, der Abschnitt zwischen *Eco*R I und der zweiten *Bam*H I Erkennungsstelle stammt aus pBluescript.

ATG TCT AGA TTT TTA GTA TTG ATA ATA TTA TAT AAT ATT TTA AAT	
<i>Xba</i> I	CSA-Signalsequenz
AGT GCA CAT TCA GCT CCA ACC CAG GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG	
<i>Bam</i> H I	<i>Kpn</i> I
AAT TCC TGC AGC CCG GGG GAT CCC ATG m1-cDNA	
<i>Eco</i> R I	<i>Bam</i> H I

DNA-Sequenz 17: Bereich zwischen ATG und m1-cDNA in pER III m1

3. Ergebnisse

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die klonierten Expressionsplasmide.

Plasmid	Rezeptor-Subtyp	Promotor	Signalsequenz
pDXA-3Cm1	1	Aktin-15	-
pAM1	1	Aktin-15	-
pDXD-3Cm1	1	Discoidin	-
pDXA-L3Cm1	1	Aktin-15	*
pDA-L3Cm1	1	Aktin-15	+
pDXD-L3Hm1	1	Discoidin	*
pDD-L3Cm1	1	Discoidin	+
pER IIIm1	1	Ras	+
pDXA-L3Cm3	3	Aktin-15	*
pDA-L3Cm3	3	Aktin-15	+
pDXD-L3Hm3	3	Discoidin	*
pDD-L3Cm3	3	Discoidin	+
pDXA-3Cm4	4	Aktin-15	-
pDXD-3Cm4	4	Discoidin	-
pDXA-L3Cm4	4	Aktin-15	*
pDA-L3Cm4	4	Aktin-15	+
pDXD-L3Hm4	4	Discoidin	*
pDD-L3Cm4	4	Discoidin	+
pDXA-3Cm5	5	Aktin-15	-
pDXD-3Cm5	5	Discoidin	-
pDXA-L3Cm5	5	Aktin-15	*
pDA-L3Cm5	5	Aktin-15	+
pDXD-L3Hm5	5	Discoidin	*
pDD-L3Cm5	5	Discoidin	+

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Expressionsplasmide

- : ohne Signalsequenz
- +: mit vollständiger Signalsequenz
- *: Signalsequenz mit fehlendem Triplet

3.2 Expression des M1-Rezeptors

- **Nachweis der mRNA (Northern-Blot)**

Für die heterologe Expression des menschlichen M1-Rezeptors wurden die Plasmide pDXA-3Cm1, pAM1, pDXD-3Cm1, pDXA-L3Cm1, pDA-L3Cm1, pDXD-L3Hm1, pDD-L3Cm1 und pER III_{m1} in den *Dictyostelium-discoideum*-Stamm AX2 transformiert und die Transformanden untersucht (Abbildung 8 bis Abbildung 14). Parallel dazu wurden einige Plasmide in den Stamm AX3 transformiert (Abbildung 11). Da sich aber im Vergleich zu AX2 keine Unterschiede bezüglich des Expressionsverhaltens zeigten, wurde AX2 als Standard-Stamm für Transformationen beibehalten.

Zum Nachweis der Aufnahme der transformierten M1-Plasmid-DNA in *Dictyostelium discoideum* und der korrekten Transkription wurde von den transgenen Stämmen aus logarithmisch wachsenden Schüttelkulturen Gesamt-RNA präpariert und mittels Northern-Blot die jeweilige Rezeptor-RNA nachgewiesen. Die Effizienz der Transformationen war bei allen verwendeten Plasmiden sehr hoch, so dass reproduzierbar für verschiedene Transformationsansätze mit M1-Rezeptor-DNA bei jeweils nahezu allen im Selektionsantibiotikum überlebenden Zelllinien eine Transkription der M1-RNA nachgewiesen werden konnte. Alle Plasmide mit M1-Rezeptor-DNA führten zur Bildung von RNA in der korrekten Größe von etwa 1400 Basenpaaren (siehe Abbildungen in diesem Abschnitt).

Allgemein war die nachweisbare RNA-Menge bei Klonen mit Discoidin-Promotor-Konstrukten deutlich geringer als bei Zellen, die den Aktin-Promotor zur Expressionskontrolle tragen, so dass die Belichtungszeit des Röntgenfilms länger gewählt wurde (Abschnitt 2.6.5). Dies zeigt sich in einer etwas geringeren Bildqualität der Abbildungen (z.B. Abbildung 9, Abbildung 10 und Abbildung 12). Bei Plasmiden mit gleichem Promotor aber sonst verschiedenem Aufbau zeigen sich keine Unterschiede in der gebildeten RNA-Menge. Somit ist in Bezug auf die Transkriptionsrate dem Aktin-Promotor eindeutig der Vorzug zu geben, da er zu gleichmäßiger, stärkerer und reproduzierbarer Transkription der DNA führt.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen Northern-Blots von Transformanden der eingesetzten Plasmide mit m1-cDNA.

3. Ergebnisse

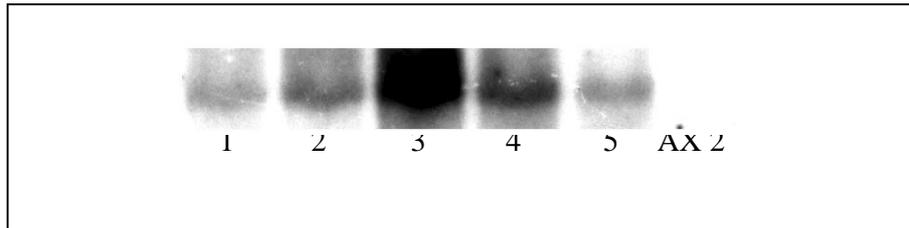


Abbildung 8: Northern-Blot, pDXA-3Cm1

Spur 1-5: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

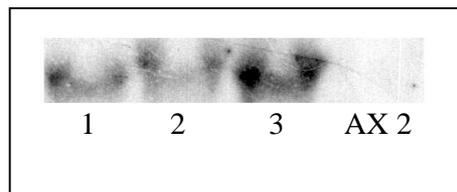


Abbildung 9: Northern-Blot, pDXD-3Cm1

Spur 1-3: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

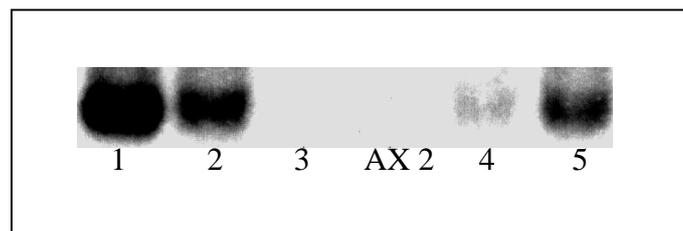


Abbildung 10: Northern-Blot, pDXA-L3Cm1 (1-3) und pDXD-L3Hm1 (4-5)

Spur 1-5: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

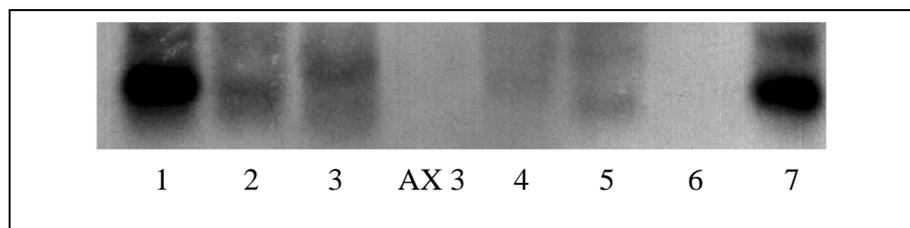


Abbildung 11: Northern-Blot, pDA-L3Cm1

Spur 1-7: RNA verschiedener Transformanden in AX3; Kontrolle: AX3, nicht transformiert

3. Ergebnisse

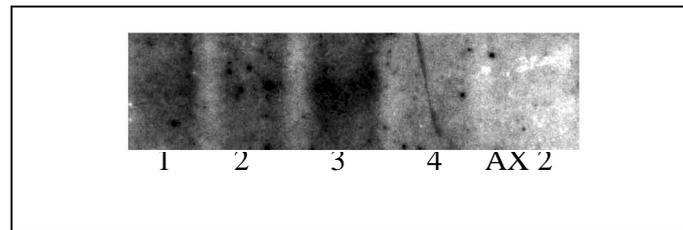


Abbildung 12: Northern-Blot, pDD-L3Cm1

Spur 1-4: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

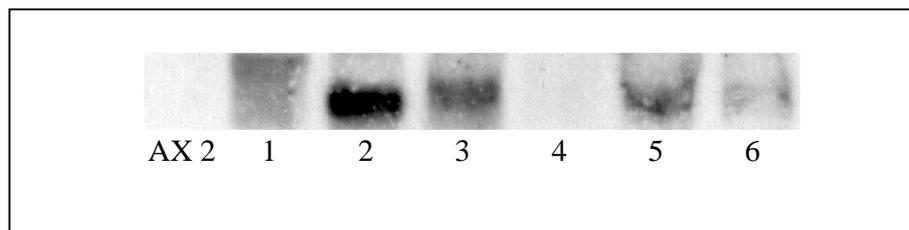


Abbildung 13: Northern-Blot, pAM1

Spur 1-6: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

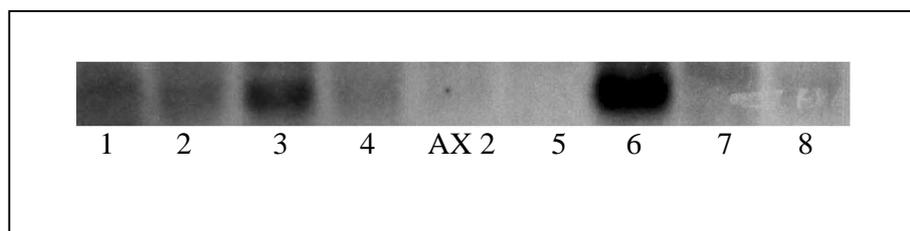


Abbildung 14: Northern-Blot, pER III m1

Spur 1-8: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

Bei pER III m1 wurden abweichend zur in Kapitel 2.6.4 beschriebenen Methode aggregationskompetente Zellen verwendet. Der Ras-Promotor wurde, wie in Abschnitt 2.8.1 erläutert, vor Gewinnung der RNA durch Hungern der Zellen in Phosphatpuffer und anschließender Inkubation mit cAMP induziert.

3. Ergebnisse

- **Nachweis des Rezeptorproteins (Radioliganden-Bindungsexperimente), Plasmide mit Aktin-Promotor**

Parallel zum Nachweis der RNA wurden etwa 20 Klone pro Transformationsansatz eines Plasmides über Radioliganden-Bindungsexperimente auf funktionelle Rezeptorexpression untersucht. Um die Varianz zwischen den unterschiedlichen Transformationen auszugleichen, wurden pro Plasmid mindestens zwei verschiedene Transformationsansätze untersucht. Zunächst wurde ein erstes Screening mit einer Konzentration von 800 pM [³H]-NMS als Radioligand durchgeführt. Zur Bestimmung der Totalen Bindung wurden hierbei zwei Inkubationsansätze von 2×10^6 Zellen mit radioaktiv markiertem Liganden versetzt. Zur Bestimmung der Unspezifischen Bindung wurden zwei Inkubationsansätze von 2×10^6 Zellen mit radioaktiv markiertem Liganden und mit nicht markiertem Liganden (1,5 µM Atropin) inkubiert. Transformanden, bei denen ein deutlicher Unterschied zwischen Totaler und Unspezifischer Bindung nachweisbar war, wurden dann einer näheren Untersuchung unterzogen (Abschnitt 2.7).

Für die Transformanden mit den Plasmiden pDXA-L3Cm1 und pDA-L3Cm1 konnte durch Radioliganden-Bindungsexperimente korrekt gefaltetes und in die Membran integriertes Rezeptorprotein sowohl bei Untersuchungen an Ganzzellen als auch in Versuchen mit Membranpräparationen nachgewiesen werden. Abbildung 15 bis Abbildung 17 zeigen die entsprechenden Sättigungskurven und die jeweiligen K_D - und B_{max} -Werte. Als *Dictyostelium-discoideum*-Stämme wurden dabei AX2 bei Plasmid pDXA-L3Cm1 und AX3 für das Plasmid pDA-L3Cm1 verwendet.

Aus den ermittelten Werten für B_{max} bei Versuchen mit Ganzzellen lässt sich eine Anzahl von etwa 400 Rezeptoren pro Zelle errechnen. Für Membranpräparationen liegt die errechnete Anzahl an Rezeptoren pro Zelle, vermutlich durch Gewebeverluste bei der Aufreinigung und die versuchsbedingt längere Kultivierung der Transformanden, mit etwa 100 Rezeptoren pro Zelle um den Faktor vier niedriger als bei Ganzzellen. Für die Klone, die mit den anderen Plasmiden transformiert wurden, konnte kein funktionelles Protein nachgewiesen werden.

Die Anzahl der heterolog exprimierten M1-Rezeptoren liegt damit etwa um den Faktor 1000 unter der Anzahl an endogen gebildeten cAMP-Rezeptoren. Allerdings waren die M1-Transformanden nicht stabil. Bereits eine Woche nach den positiven Radioliganden-Bindungsexperimenten mit Ganzzellen ließen sich bei den entsprechend weiter kultivierten Transformanden keine spezifischen Bindungsstellen an Ganzzellen oder

3. Ergebnisse

Membranpräparationen mehr nachweisen. Versuche, diesem Effekt durch Erhöhung der Konzentration des Selektionsantibiotikums entgegenzutreten, schlugen fehl. Weitergehende Untersuchungen mit den Transformanden, wie zum Beispiel Konkurrenzexperimente mit Subtyp-selektiven Liganden konnten daher nicht durchgeführt werden.

Die ermittelten Affinitätskonstanten von etwa 600 pM entsprechen in der Größenordnung in etwa denjenigen, die auch in anderen Expressionssystemen gefunden wurden. So wurde bei Sf9-Zellen, die mit dem Baculovirus-System transformiert wurden, ein Wert von 530 pM für den Rezeptor-Subtyp M1 berichtet (Dong et al., 1995), bei transfizierten CHO-K1-Zellen ein um den Faktor 10 niedrigerer Wert von 54 pM (Dörje et al., 1991).

	<i>D. discoideum</i>	Sf9	CHO-K1
K_D -Wert	565 – 840 pM	530 pM	54 pM
Rezeptoren/ Zelle	100 - 400		

Tabelle 6: Vergleich der K_D -Werte für M1

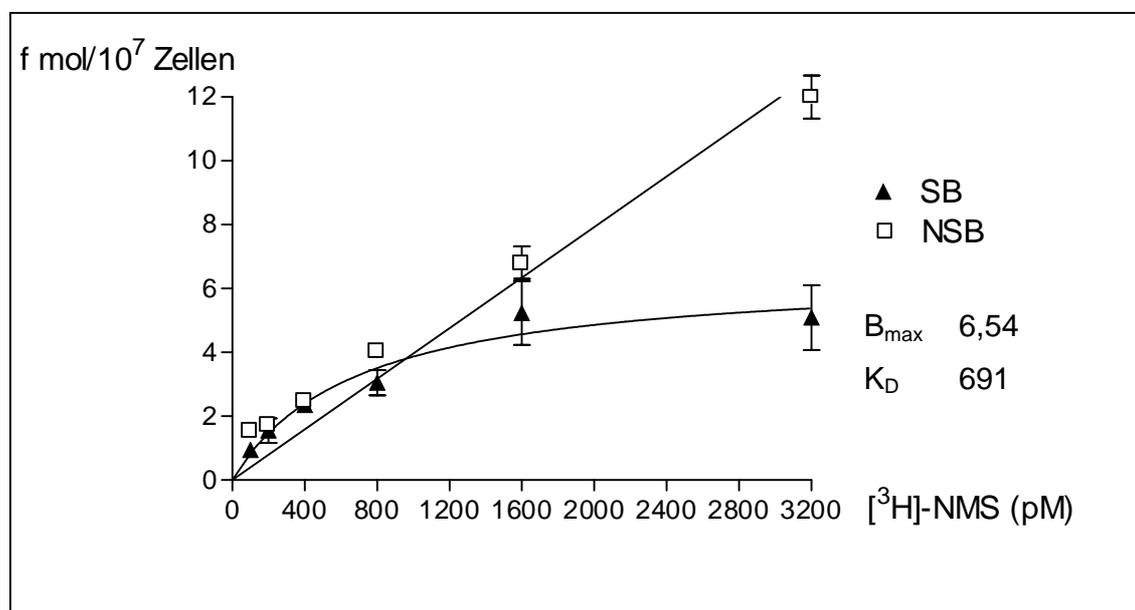


Abbildung 15: pDXA-L3Cm1, Präparation von Ganzzellen

SB: Spezifische Bindung
 B_{max} : fmol/ 10⁷ Zellen

NSB: Nicht-Spezifische Bindung
 K_D : pM [³H] NMS

3. Ergebnisse

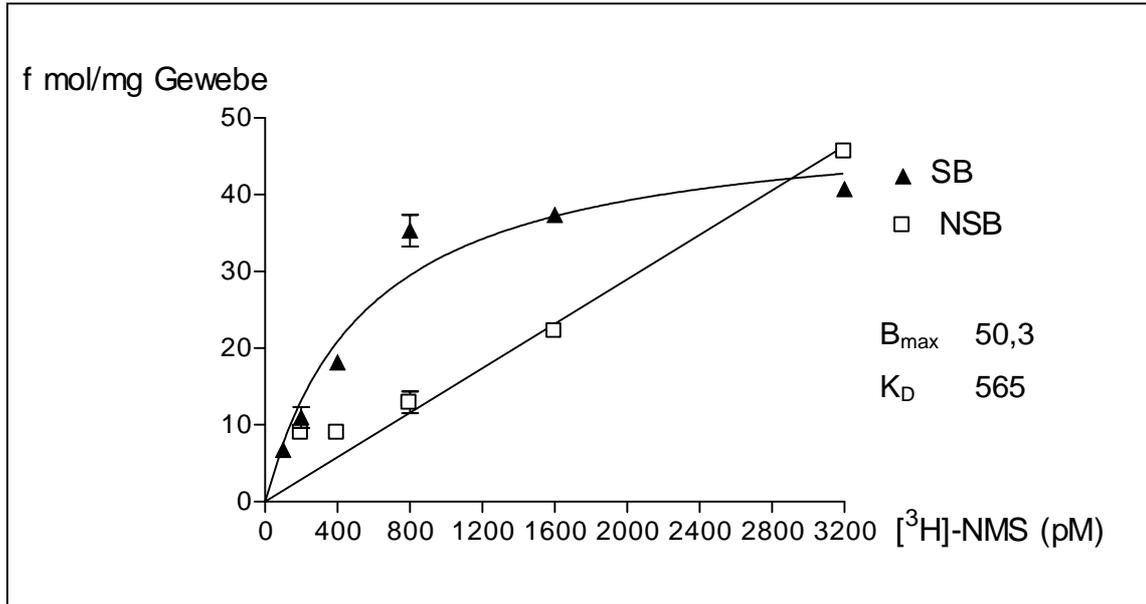


Abbildung 16: pDXA-L3Cm1, Präparation von Membranen

SB: Spezifische Bindung
 B_{max} : fmol/ mg Gewebe

NSB: Nicht-Spezifische Bindung
 K_D : pM [³H] NMS

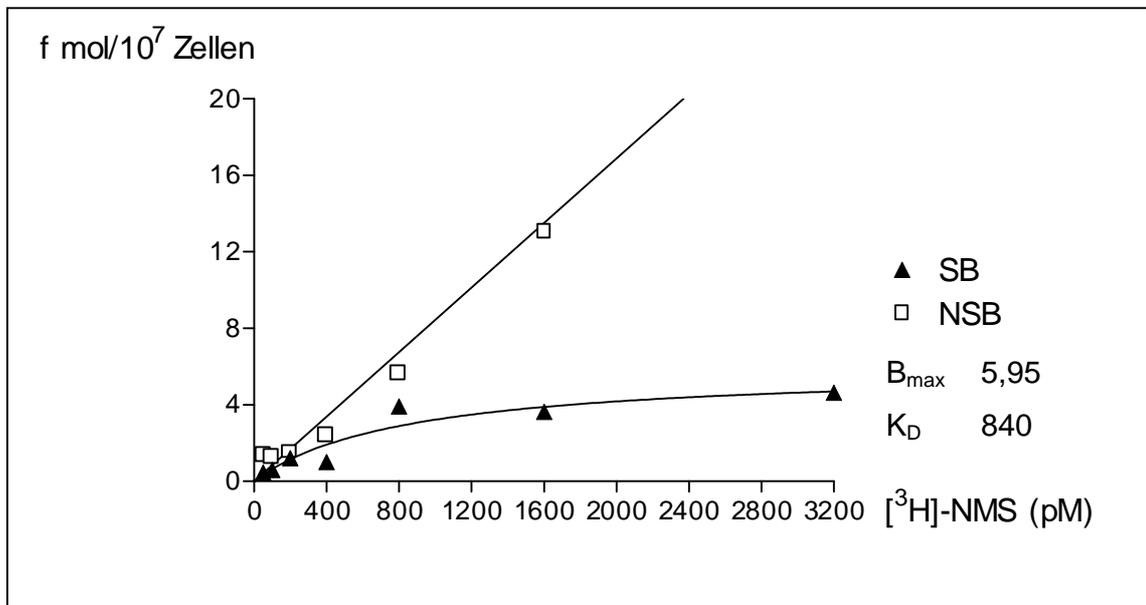


Abbildung 17: pDA-L3Cm1, Präparation von Ganzzellen

SB: Spezifische Bindung
 B_{max} : fmol/ 10⁷ Zellen

NSB: Nicht-Spezifische Bindung
 K_D : pM [³H] NMS

3. Ergebnisse

- **Nachweis des Rezeptorproteins (Radioliganden-Bindungsexperimente), Plasmide mit Discoidin-Promotor und mit Ras-Promotor**

Bei Plasmiden mit Discoidin- oder mit Ras-Promotor konnte in den meisten Fällen keine spezifische Bindung und damit funktionelles Rezeptorprotein sicher nachgewiesen werden. Einzig bei Verwendung des Plasmides pDDL-3Cm1 gab es in Vorversuchen Hinweise auf das Vorhandensein von Rezeptoren. Diese Versuche wurden in der Regel bei einer Konzentration von 800 pM [³H]-NMS, bzw. 160 pM bis 1600 pM durchgeführt. Hierbei zeigten die Werte von Totaler Bindung und Nicht-Spezifischer Bindung erkennbare Unterschiede, die nur durch spezifische Bindestellen für den Radioliganden hervorgerufen werden können. Diese geringen Unterschiede konnten jedoch mit nachfolgenden Radioliganden-Bindungsstudien nicht bestätigt werden, was eventuell ebenfalls auf die Instabilität der Klone zurück zu führen war.

Konz. [³ H]-NMS	TB (CPM)	NSB (CPM)
160 pM	30,2	21,8
480 pM	47,7	36,8
1600 pM	124,6	90,7

Tabelle 7: Vorversuch mit AX2 Transformande, Plasmid pDDL-3Cm1 in AX2

TB: Totale Bindung, Mittelwert aus Doppelbestimmung
NSB: Nicht-Spezifische Bindung, Mittelwert aus Doppelbestimmung
CPM: Counts per minute

Die Vorversuche wurden mit drei Konzentrationen des Radioliganden jeweils als Doppelbestimmung für TB und NSB durchgeführt. Bei den anschließenden Radioliganden-Bindungsstudien konnten die Unterschiede zwischen TB und NSB nicht mehr gezeigt werden. Obwohl die mit steigender Konzentration wachsenden Unterschiede zwischen Totaler Bindung und Nicht-Spezifischer Bindung deutlich zu erkennen sind, kann mit den in der Tabelle gezeigten Werten keine sinnvolle Bestimmung von K_D und B_{max} durchgeführt werden, so dass hier auf eine grafische Darstellung verzichtet wird.

Auch mit dem *Dictyostelium-discoideum*-Stamm VI88, in dem vom Discoidin-1 γ -Promotor kontrollierte Gene stärker exprimiert werden sollen, ließ sich mit dem Discoidin-Promotor kein Rezeptorprotein nachweisen, Versuche zum Nachweis der RNA wurden mit diesem Stamm nicht durchgeführt.

3.3 Expression des M3-Rezeptors

- **Nachweis der mRNA (Northern-Blot)**

Die Plasmide pDXA-L3Cm3, pDA-L3Cm3, pDXD-L3Hm3, pDD-L3Cm3 wurden zur heterologen Expression des humanen M3-Rezeptors in *Dictyostelium-discoideum*-Zellen transformiert. Auch für die Plasmide mit dem M3-Rezeptor wurde untersucht, ob die rezeptorspezifische RNA gebildet wird. Wie Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen, wurde die M3-Plasmid-DNA von den Zellen aufgenommen und in RNA übersetzt. Im Vergleich zum Subtyp M1 waren die gebildeten RNA-Mengen jedoch sowohl für Aktin- als auch den Discoidin-Promotor etwas niedriger, der Anteil an Transformanden ohne nachweisbare Transkription war etwas größer. Die gebildeten Transkripte besitzen jedoch die korrekte Größe, die bei etwa 1800 Basenpaaren liegt. Nachfolgend sind die Northern-Blots der untersuchten Transformanden abgebildet.

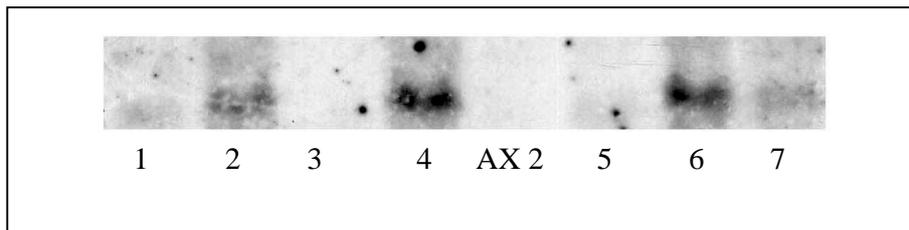


Abbildung 18: Northern-Blot, pDXA-L3Cm3 (1-4) und pDA-L3Cm3 (5-7)

Spur 1-7: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

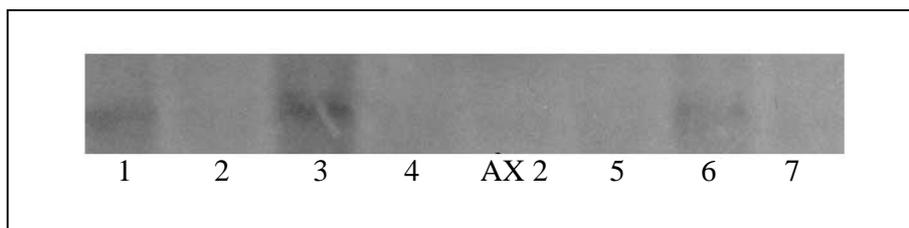


Abbildung 19: Northern-Blot, pDXD-L3Hm3 (1-4) und pDD-L3Cm3 (5-7)

Spur 1-7: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

- **Nachweis des Rezeptorproteins (Radioliganden-Bindungsexperimente)**

Wie bei dem M1-Rezeptor beschrieben, wurde auch für M3 zunächst ein erstes Screening mit [³H]-NMS als Radioliganden in einer Konzentration von 800 pM durchgeführt. Klone mit deutlichen Unterschieden zwischen Totaler und Spezifischer Bindung wurden dann einer näheren Untersuchung unterzogen (Abschnitt 2.7).

Bei Transformanten mit den Plasmiden pDXA-L3Cm3, pDA-L3Cm3 und pDXD-L3Hm3 konnte durch Radioliganden-Bindungsexperimente Rezeptorprotein nachgewiesen werden. Abbildung 20 bis Abbildung 22 zeigen die entsprechenden Sättigungskurven und die jeweiligen K_D - und B_{max} -Werte aus dem Sättigungsexperiment. In Abbildung 23 ist ein Konkurrenzexperiment mit den beiden Antagonisten p-F-HHSiD und AQ-RA 741 dargestellt. Als *Dictyostelium-discoideum*-Stamm wurde jeweils AX2 verwendet.

Aus den ermittelten Werten für B_{max} lässt sich eine Anzahl von etwa 200 Rezeptoren pro Zelle bei Verwendung des Plasmides mit Discoidin-Promotor und von etwa 3000 bis 7000 Rezeptoren pro Zelle bei Verwendung von Plasmiden Aktin-Promotor bestimmen. Die Anzahl der heterolog exprimierten M3-Rezeptoren liegt damit bei Verwendung des Aktin-Promotors etwa zehnfach über der ermittelten Anzahl an M1- bzw. M4-Rezeptoren. Zwar liegt die M3-Rezeptoranzahl bei Verwendung des Discoidin-Promotors deutlich unter der Rezeptoranzahl mit dem Aktin-Promotor, im Gegensatz zu M1 und M4 ist die Anzahl der Rezeptoren aber hoch genug, um Sättigungsexperimente durchführen und K_D und B_{max} -Werte bestimmen zu können.

Die ermittelten Affinitätskonstanten von etwa 1330 bis 6370 pM entsprechen in der Größenordnung in etwa den 1380 pM, die bei Sf9-Zellen, die mit dem Baculovirus-System transformiert wurden, gefunden werden (Dong et al., 1995). Sie liegen damit aber deutlich höher als der Wert von 52 pM, der bei transfizierten CHO-K1-Zellen für den Rezeptor-Subtyp M3 angegeben wird (Dörje et al., 1991).

Als Affinitätskonstanten für die Antagonisten wurden im Konkurrenzexperiment pK_i -Werte von 4,5 (p-F-HHSiD) und 5,0 (AQ-RA 741) ermittelt. Damit liegen die Affinitätskonstanten um einige Zehnerpotenzen niedriger als bei CHO-K1-Zellen. Im Gegensatz zu *Dictyostelium-discoideum*-Zellen zeigt bei den Säugerzellen p-F-HHSiD mit einem pK_i -Wert von 7,8 außerdem eine höhere Affinität zum M3-Rezeptor als AQ-RA 741, das einen pK_i -Wert von 7,2 hat (Dörje et al., 1991; Jones et al., 1992).

3. Ergebnisse

Die folgende Tabelle gibt noch einmal einen Überblick über die Bindungsdaten für den M3-Rezeptor.

	<i>D. discoideum</i>	Sf9	CHO-K1
K_D -Wert	1330 – 6370 pM	1380 pM	52 pM
pK _i -Wert p-F-HHSiD	4,5	7,2	7,8
pK _i -Wert AQ-RA 741	5,0		7,2
Rezeptoren/ Zelle	200 - 7000		

Tabelle 8: Vergleich der K_D - und pK_i-Werte für M3

3. Ergebnisse

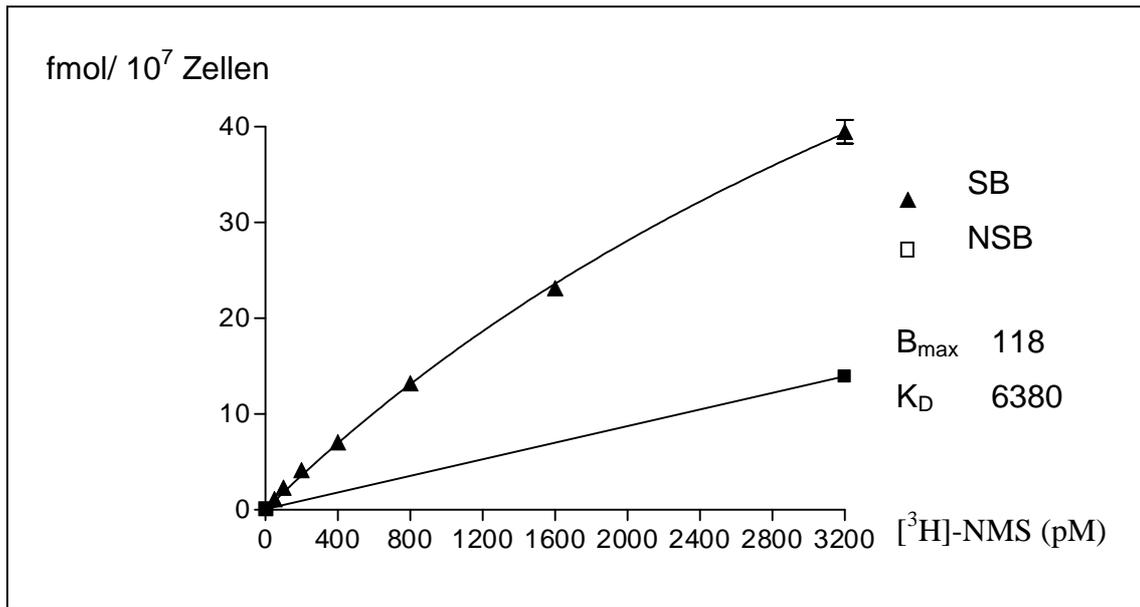


Abbildung 20: pDXA-L3Cm3, Präparation von Ganzzellen

SB: Spezifische Bindung
 B_{max} : $\text{fmol}/10^7$ Zellen

NSB: Nicht-Spezifische Bindung
 K_D : pM $[^3\text{H}]\text{NMS}$

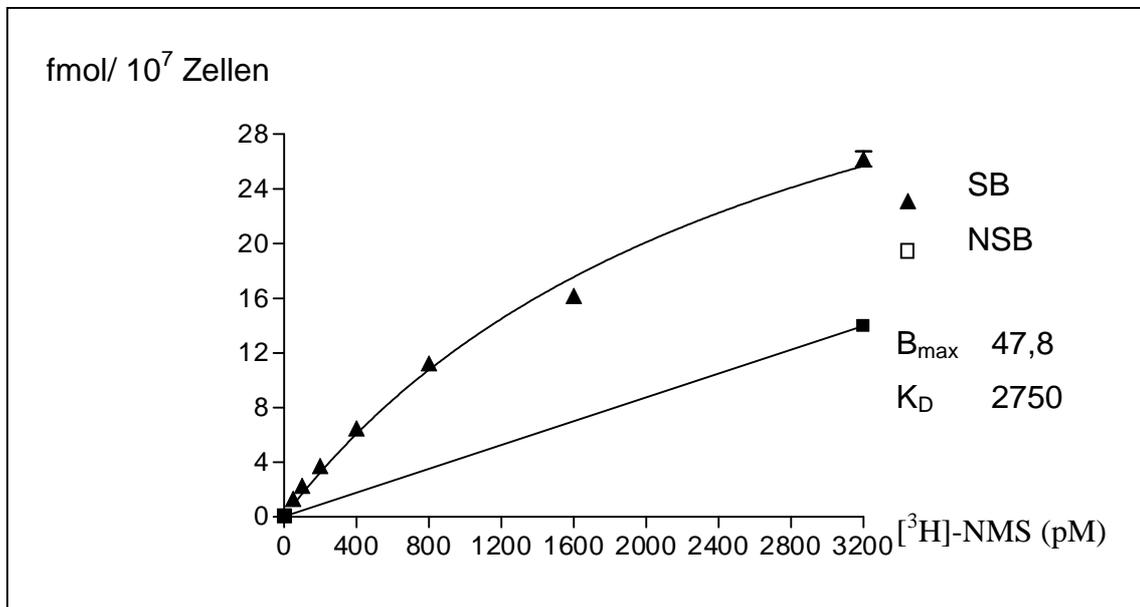


Abbildung 21: pDA-L3Cm3, Präparation von Ganzzellen

SB: Spezifische Bindung
 B_{max} : $\text{fmol}/10^7$ Zellen

NSB: Nicht-Spezifische Bindung
 K_D : pM $[^3\text{H}]\text{NMS}$

3. Ergebnisse

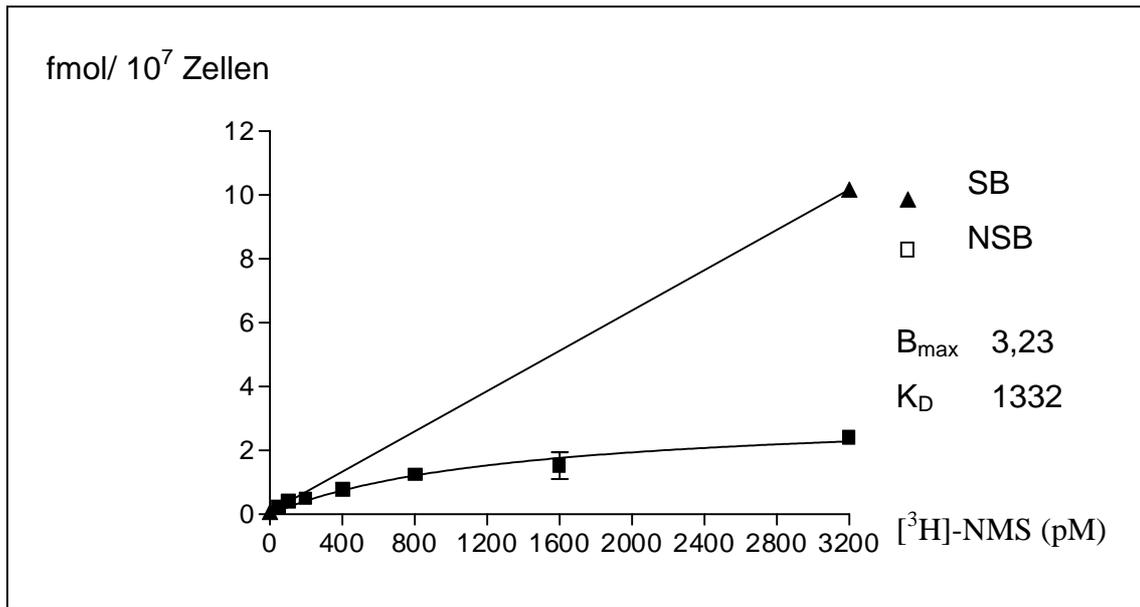


Abbildung 22: pDXD-L3Hm3, Präparation von Ganzzellen

SB: Spezifische Bindung
 B_{max} : fmol/ 10^7 Zellen

NSB: Nicht-Spezifische Bindung
 K_D : pM [³H] NMS

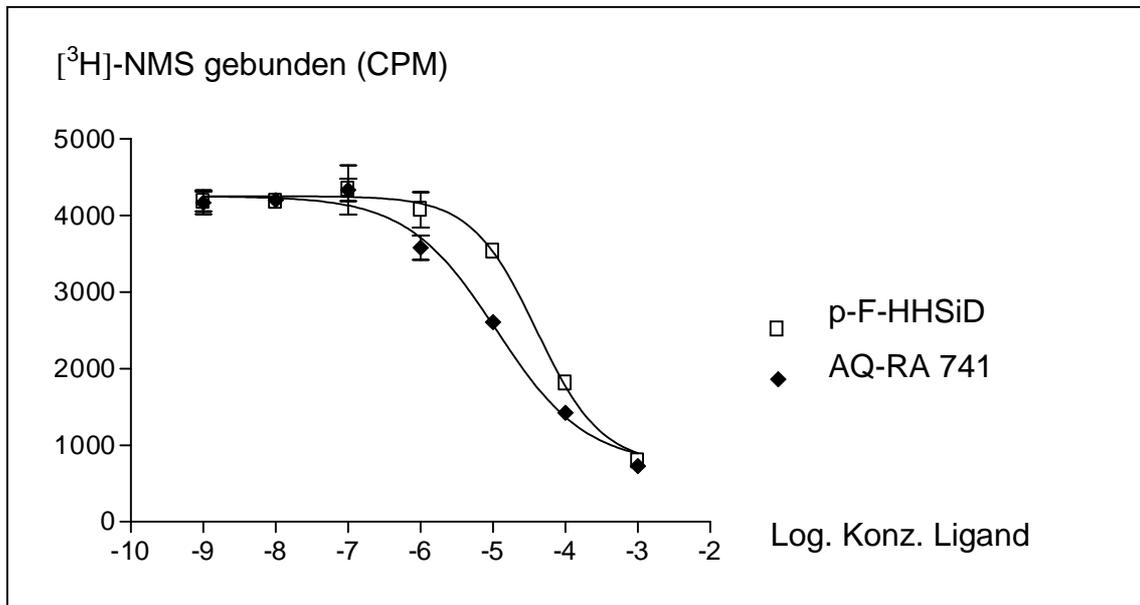


Abbildung 23: pDA-L3Cm3, Präparation von Ganzzellen, Konkurrenzexperiment

Log. Konz. Ligand: Logarithmus der Konzentration des Liganden (M)
 $[^3\text{H}]$ -NMS gebunden (CPM): Counts per minute durch gebundenen Radioliganden

pKi-Werte: p-F-HHSiD: 4,5 AQ-RA 741: 5,0
Hill-Koeffizienten: p-F-HHSiD: 0,97 AQ-RA 741: 0,70

3.4 Expression des M4-Rezeptors

- **Nachweis der mRNA (Northern-Blot)**

Zur heterologen Expression des humanen M4-Rezeptors wurden die Plasmide pDXA-3Cm4, pDXD-3Cm4, pDXA-L3Cm4, pDA-L3Cm4, pDXD-L3Hm4, pDD-L3Cm4 in den *Dictyostelium-discoideum*-Stamm AX2 transformiert. Die resultierenden Transformanden wurden auf RNA-Bildung (Abbildung 24 bis Abbildung 27) und Rezeptorexpression untersucht (Abbildung 28 und Abbildung 30). Parallel dazu wurden einige Plasmide in den Stamm AX3 transformiert (Abbildung 29). Im Vergleich zu AX2 zeigt der Stamm AX3 keine Vorzüge im Expressionsverhalten. Daher wurde AX2 als Standard-Stamm für Transformationen verwendet.

Auch bei dem Muskarin-Rezeptor-Subtyp M4 wurde zum Nachweis der Aufnahme der Plasmid-DNA in die *Dictyostelium-discoideum*-Zellen und zum Nachweis der korrekten Übersetzung in RNA aus den transgenen Stämmen von logarithmisch wachsenden Schüttelkulturen Gesamt-RNA präpariert. Die jeweilige Rezeptor-RNA wurde mittels Northern-Blot nachgewiesen. Die Effizienz der Transformationen war für den M4 mit denjenigen vergleichbar, die mit den entsprechenden Konstrukten der M1-Rezeptor-DNA erzielt wurde. Transformation von Plasmiden mit Subtyp M4 führte zur Bildung von RNA in der korrekten Größe von etwa 1450 Basenpaaren (siehe Abbildungen dieses Abschnitts). Allgemein war die nachweisbare RNA-Menge bei Plasmiden mit Discoidin-Promotor wie bei M1 geringer als bei Plasmiden mit Aktin-Promotor. Mit Hilfe ausreichender Belichtungszeit ließ sich aber auch für die Transformanden mit vom Discoidin-Promotor gesteuerter Transkription die Rezeptor-RNA sicher zeigen. Zusammen mit den Ergebnissen beim Nachweis des Rezeptorproteins zeigen sich die Vorteile des Aktin-Promotors gegenüber dem Discoidin-Promotor auch bei M4.

Im folgenden sind die Northern-Blots der entsprechenden Transformanden abgebildet.

3. Ergebnisse

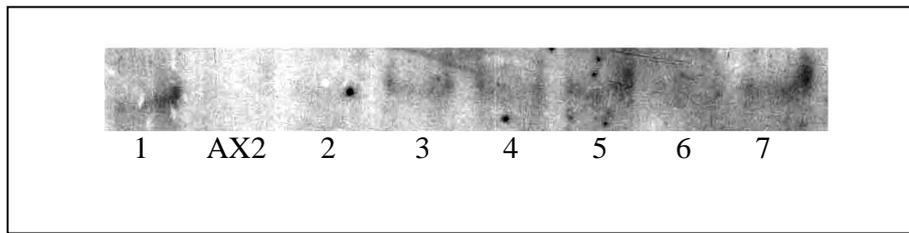


Abbildung 24: Northern-Blot, pDXA-3Cm4

Spur 1-7: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

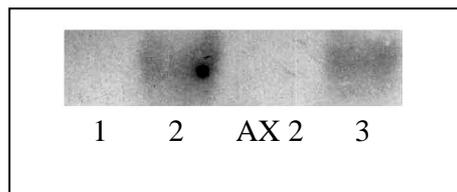


Abbildung 25: Northern-Blot, pDXD-3Cm4

Spur 1-3: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

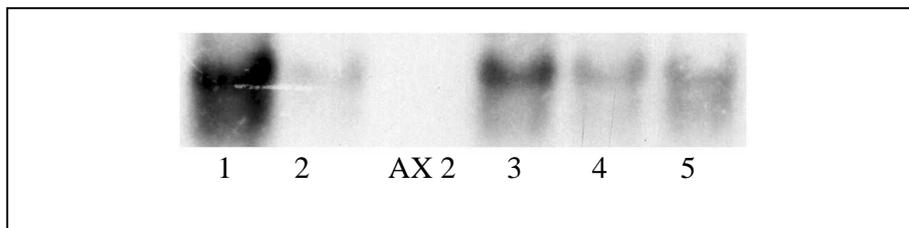


Abbildung 26: Northern-Blot, pDXA-L3C m4 (1-2) und pDA-L3C m4 (3-5)

Spur 1-5: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

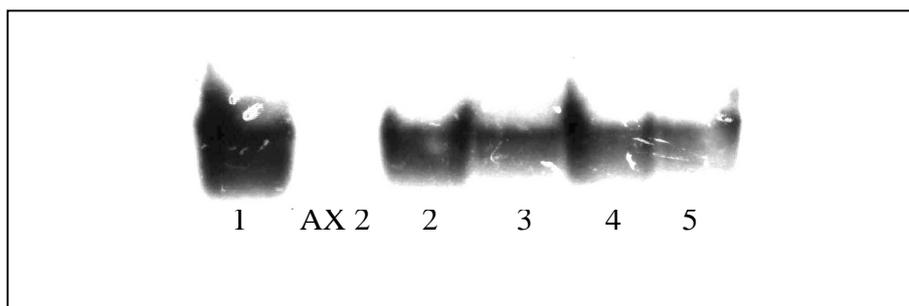


Abbildung 27: Northern-Blot, pDD-L3Cm4 (1) und pDXD-L3Hm4 (2-5)

Spur 1-5: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

3. Ergebnisse

- **Nachweis des Rezeptorproteins (Radioliganden-Bindungsexperimente), Plasmide mit Aktin-Promotor**

Für die Transformanden mit den Plasmiden pDXA-L3Cm4 und pDA-L3Cm4 konnte durch Radioliganden-Bindungsexperimente korrekt gefaltetes und in die Membran integriertes Rezeptorprotein nachgewiesen werden. Die Abbildungen auf den folgenden Seiten zeigen die aus den Versuchen resultierenden Bindungskurven und die errechneten Werte für K_D und B_{max} . Die Auswahl der Klone erfolgte nach Screening einer größeren Anzahl an Transformanden, wie bei Rezeptor-Subtyp M1 beschrieben. Die Rezeptoren konnten in Versuchen mit isolierten Membranen und auch in Experimenten mit intakten Zellen nachgewiesen werden. Aus den gefundenen Werten für B_{max} in Versuchen mit Ganzzellen lässt sich wie bei dem Subtyp M1 eine Anzahl von etwa 400 Rezeptoren pro Zelle ermitteln, für Membranen ergeben sich 40 Rezeptoren pro Zelle. Wie bereits bei M1 beobachtet, ließ sich auch hier die Rezeptorexpression nicht über längere Zeit aufrecht erhalten, so dass auch für M4 weitergehende Untersuchungen mit den Transformanden wie zum Beispiel Konkurrenzexperimente nicht durchgeführt werden konnten.

Die in den Radioliganden-Bindungsexperimenten mit *Dictyostelium discoideum* gefundenen Werte der Affinitätskonstanten entsprechen in etwa denjenigen, die auch mit anderen Expressionssystemen ermittelt werden. So werden die K_D -Werte bei transformierten Sf9-Zellen mit 440 pM (Dong et al., 1995) und bei CHO-K1-Zellen mit 26 pM (Dörje et al., 1991) angegeben. Man kann also auch bei M4 von einem korrekt gefalteten Rezeptor ausgehen. Wie bei diesen beiden Systemen hat auch bei *Dictyostelium discoideum* der Radioligand [3 H]-NMS eine etwas größere Affinität zum Subtyp M4 als zum Subtyp M1.

	<i>D. discoideum</i>	Sf9	CHO-K1
K_D -Wert	80,5 -203 pM	440 pM	26 pM
Rezeptoren/ Zelle	40 - 400		

Tabelle 9: Vergleich der K_D -Werte für M4

3. Ergebnisse

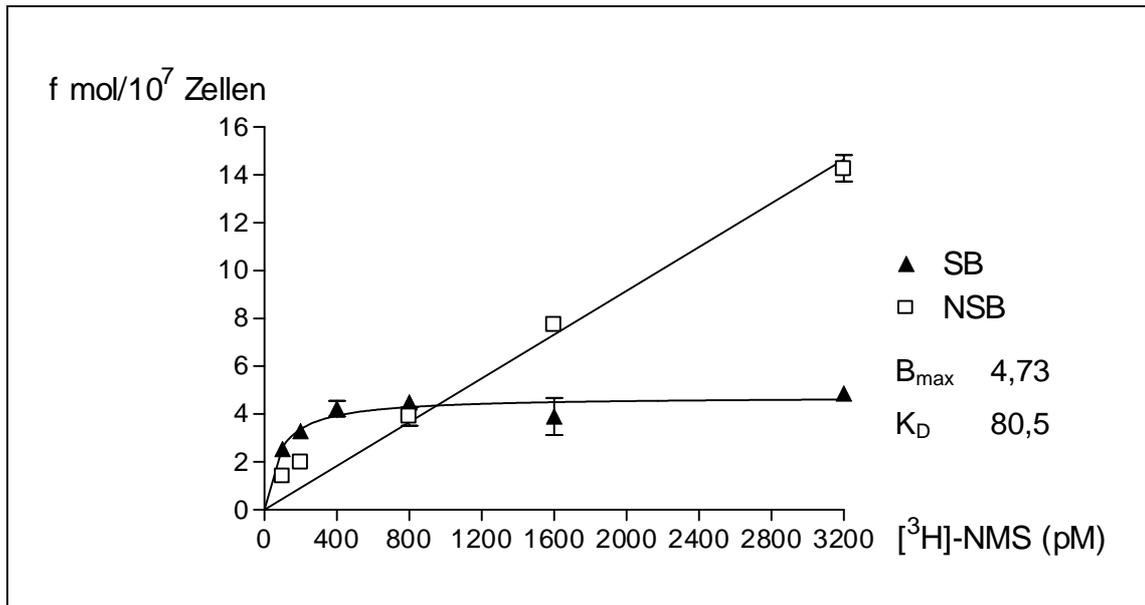


Abbildung 28: pDXA-L3Cm4, Präparation von Ganzzellen

SB: Spezifische Bindung
B_{max}: fmol/ 10⁷ Zellen

NSB: Nicht-Spezifische Bindung
K_D: pM [³H] NMS

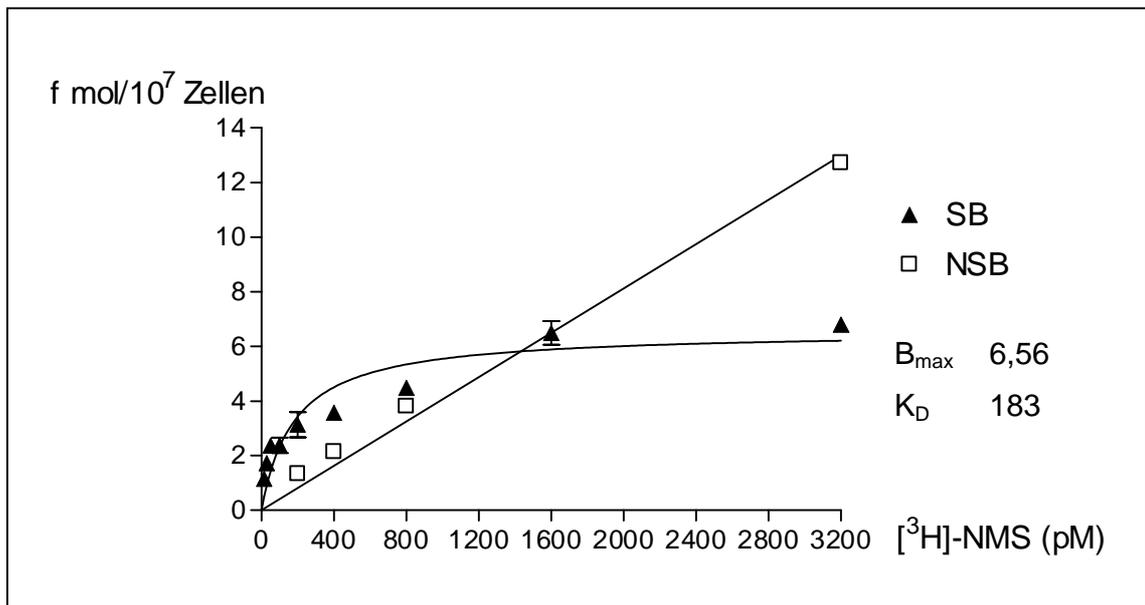


Abbildung 29: pDA-L3Cm4, Präparation von Ganzzellen

SB: Spezifische Bindung
B_{max}: fmol/ 10⁷ Zellen

NSB: Nicht-Spezifische Bindung
K_D: pM [³H] NMS

3. Ergebnisse

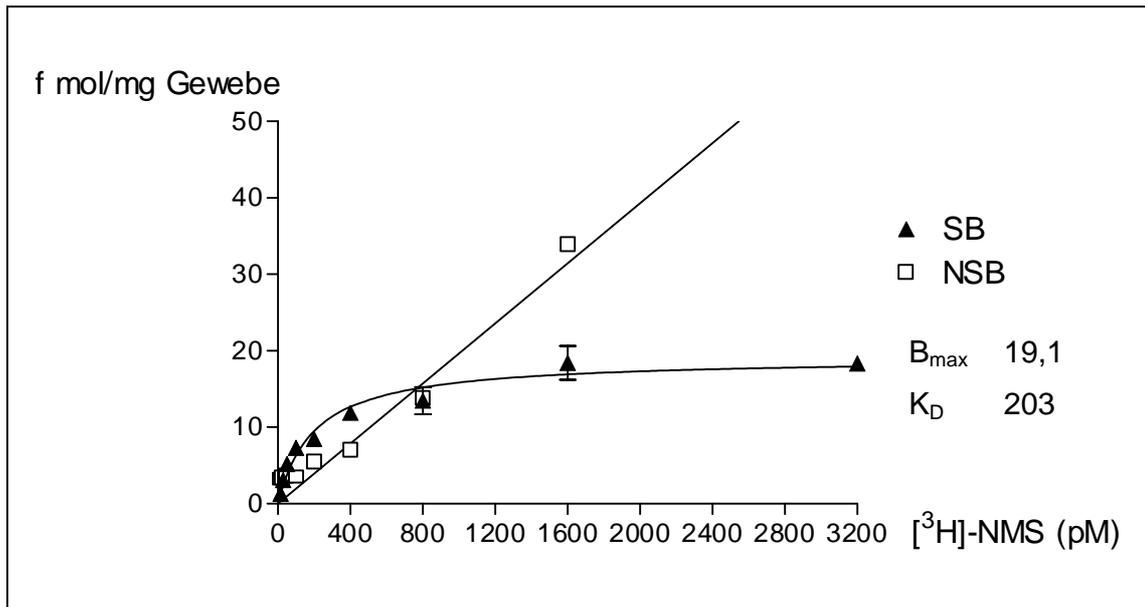


Abbildung 30: pDA-L3Cm4, Präparation von Membranen

SB: Spezifische Bindung
 B_{max} : fmol/ mg Gewebe

NSB: Nicht-Spezifische Bindung
 K_D : pM $[^3\text{H}]\text{NMS}$

3. Ergebnisse

- **Nachweis des Rezeptorproteins (Radioliganden-Bindungsexperimente), Plasmide mit Discoidin-Promotor**

Wie beim Subtyp M1 konnte auch beim M4 bei keinem der Plasmide mit Discoidin-Promotor spezifische Bindung und damit die Bildung von korrekt gefaltetem und in die Membran integriertem Rezeptorprotein sicher nachgewiesen werden. In Vorversuchen, die bei Konzentrationen von 160 bis 1600 pM [³H]-NMS durchgeführt wurden, gab es jedoch auch bei M4 Hinweise auf das Vorhandensein von Rezeptoren bei Transformanden. Die Werte von Totaler Bindung und Nicht-Spezifischer-Bindung zeigten erkennbare Unterschiede. Diese Unterschiede waren jedoch so gering, dass sich aus den Ergebnissen der Experimente keine B_{\max} -Werte und keine K_D -Werte ermitteln ließen.

Konz. [³ H]-NMS	TB (CPM)	NSB (CPM)
160 pM	24,7	17,1
480 pM	43,8	34,7
1600 pM	129,9	104,4

Tabelle 10: Vorversuch mit Transformande, Plasmid pDDL-3Cm4 in AX2

TB: Totale Bindung, Mittelwert aus Doppelbestimmung
NSB: Nicht-Spezifische Bindung, Mittelwert aus Doppelbestimmung
CPM: Counts per minute

Die Vorversuche wurden mit drei Konzentrationen des Radioliganden jeweils als Doppelbestimmung für TB und NSB durchgeführt. Bei den anschließenden Radioliganden-Bindungsstudien konnten die Unterschiede zwischen TB und NSB nicht mehr gezeigt werden. Mit den in der Tabelle gezeigten Werten lässt sich keine sinnvolle Bestimmung von K_D und B_{\max} durchführen, so dass auf eine grafische Darstellung verzichtet wird.

Mit dem *Dictyostelium-discoideum*-Stamm VI88 war die Bildung von Rezeptorprotein bei Verwendung von Plasmiden mit dem Discoidin-Promotor nicht nachweisbar, Versuche zum Nachweis der RNA wurden mit diesem Stamm nicht durchgeführt.

3.5 Expression des M5-Rezeptors

- **Nachweis der mRNA (Northern-Blot)**

Für die heterologe Expression des menschlichen M5-Rezeptors wurden die Plasmide pDXA-3Cm5, pDXD-3Cm5, pDXA-L3Cm5, pDA-L3Cm5, pDXD-L3Hm5 und pDD-L3Cm5 in den *Dictyostelium-discoideum*-Stamm AX2 transformiert.

G418-resistente Transformanden wurden auf die Bildung der spezifischen Transkripte des Subtyps M5 untersucht (Abbildung 31 bis Abbildung 34).. Sowohl die RNA-Menge als auch der Anteil an Transformanden mit nachweisbarer Bildung spezifischer RNA waren insgesamt zwar etwas geringer als bei den Subtypen M1 und M4, aber alle verwendeten Plasmide führten sicher und reproduzierbar zu Transformanden, die M5-Rezeptor-RNA bildeten. Auch für den M5 gilt, dass Plasmide mit Aktin-Promotor zu einer stärkeren Transkription führten als die entsprechenden Plasmide mit Discoidin-Promotor. Die nachfolgenden Abbildungen von Transformanden mit Plasmiden des Subtyps M5 zeigen Transkripte in der korrekten Größe von etwa 1600 Basenpaaren.

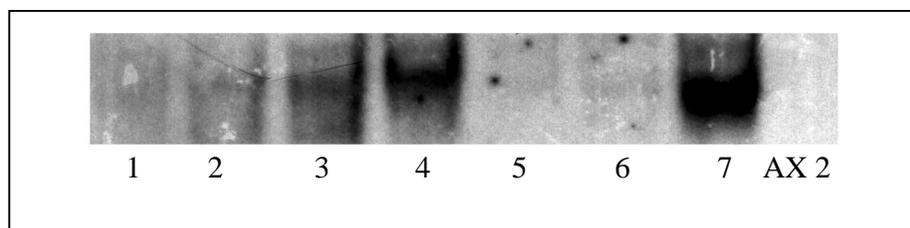


Abbildung 31: Northern-Blot, pDXA-3Cm5

Spur 1-6: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

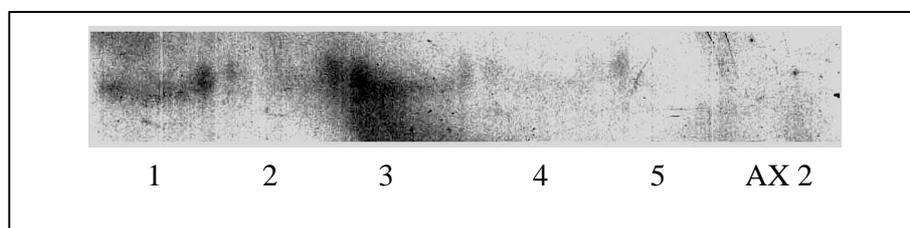


Abbildung 32: Northern-Blot, pDXD-3Cm5

Spur 1-5: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

3. Ergebnisse

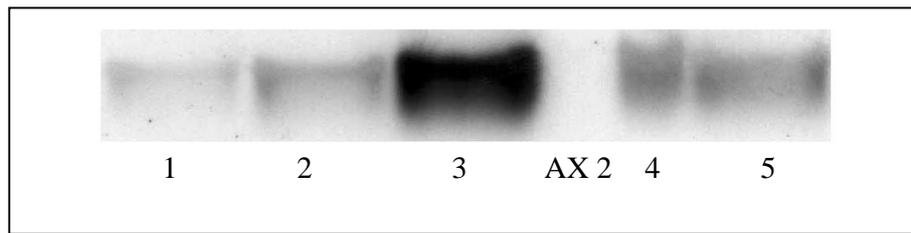


Abbildung 33: Northern-Blot, pDXA-L3Cm5 (1-3) und pDA-L3Cm5 (4-5)

Spur 1-5: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

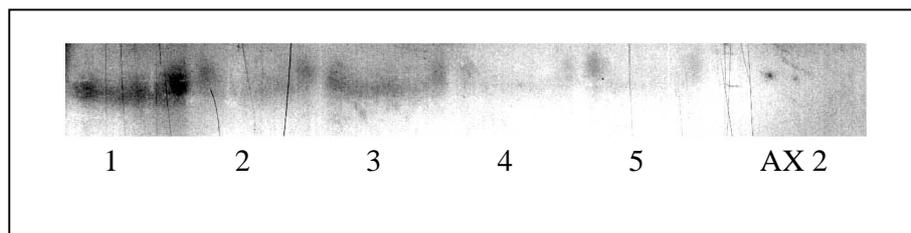


Abbildung 34: Northern-Blot, pDXD-L3Hm5 (1-2) und pDD-L3Cm5 (3-5)

Spur 1-5: RNA verschiedener Transformanden in AX2; Kontrolle: AX2, nicht transformiert

- **Nachweis des Rezeptorproteins (Radioliganden-Bindungsexperimente)**

Mit keinem der eingesetzten Plasmide (Aktin- und Discoidin-Promotor) ergaben sich in den Voruntersuchungen Hinweise auf die Bildung von Rezeptorprotein bei den Transformanden. Radioliganden-Bindungsexperimente mit unterschiedlichen Konzentrationen des Radioliganden wurden daher nicht durchgeführt.

3.6 Übersicht über die Expressionsergebnisse

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die erhaltenen Expressionsergebnisse. Details und genaue Beschreibung der verwendeten Expressionsplasmide finden sich in den vorangegangenen Abschnitten. Deutlich zu erkennen ist die stärkere Transkriptionsrate bei Plasmiden mit Aktin-Promotor gegenüber Plasmiden mit dem Discoidin-Promotor bei allen Rezeptor-Subtypen. Funktionelle Rezeptoren konnten nur bei Plasmiden mit Signalpeptid nachgewiesen werden.

Rezeptor-Subtyp/ Promotor	mRNA	Rezeptoren
M1/ Aktin	+++	+
M1/ Discoidin	+	0
M1/ Ras	+++	-
M3/ Aktin	++	++
M3/ Discoidin	+	+
M4/ Aktin	+++	+
M4/ Discoidin	+	0
M5/ Aktin	++	-
M5/ Discoidin	+	-

+++: stark vorhanden
++: vorhanden
+: schwach vorhanden
0: nicht sicher nachweisbar, Hinweise vorhanden
-: nicht vorhanden

3.7 Rezeptor-Effektor-Kopplung

Durch die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche sollte untersucht werden, ob die heterolog exprimierten und durch Agonisten stimulierten Muskarin-Rezeptoren in der Lage sind, mit endogenen Zellbestandteilen aus *Dictyostelium discoideum* zu interagieren. Diese Interaktion sollte durch ein möglichst einfaches Detektionssystem nachweisbar sein. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Versuchsanordnungen gewählt.

3.7.1 Stimulation der GBF-abhängigen Genexpression

Der „G box binding factor“ (GBF) (Dynes et al., 1994) ist ein entwicklungsabhängiger Transkriptionsfaktor aus *Dictyostelium discoideum*, der für den Wechsel von aggregativer zu postaggregativer Genexpression benötigt wird und an GC-reiche Promotorregionen bindet. Die Bildung von GBF wird durch nanomolare cAMP-Konzentrationen, die den G-Protein-gekoppelten Rezeptor cAR 1 (cAMP Rezeptor, Subtyp 1) stimulieren, induziert. GBF seinerseits ist zusammen mit mikromolaren Konzentrationen an cAMP (Rezeptoren cAR 1 und cAR 3) für die postaggregative und die zelltypspezifische Genexpression verantwortlich (Firtel, 1995; Schnitzler et al., 1995, Gollop, 1997 #31; Firtel, 1996). Somit ist auch die Aktivität des postaggregativen, aber nicht zelltypspezifischen CPRB-Promotors (Pears et al., 1985; Presse et al., 1986; Cotter et al., 1992; Mehta et al., 1995) abhängig von GBF und cAMP. Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor, der durch stimulierte cAMP-Rezeptoren aktiviert wird, ist das sogenannte *Dictyostelium discoideum* STATa Protein (Aubry and Firtel, 1999; Brown and Firtel, 1999; Early, 1999).

Allgemein lässt sich die Aktivität eines Promotors dadurch nachweisen, dass man die Expression eines Reporterproteins unter die Kontrolle des entsprechenden Promotors stellt. In diesem Fall wurde das bakterielle β -Galaktosidasegen mit dem CPRB-Promotor kombiniert (Dingermann et al., 1989; Kuspa et al., 1995). Durch β -Galaktosidase umgesetzte Farbstoffe lassen sich dann problemlos photometrisch bestimmen und zur Ermittlung der Promotoraktivität in den *Dictyostelium-discoideum*-Zellen heranziehen.

Sollte es in den transformierten *Dictyostelium-discoideum*-Zellen zu einer Kopplung der rekombinanten Muskarin-Rezeptoren an die endogene Signalkaskade kommen, dann würde die Bindung eines entsprechenden agonistischen Liganden die cAMP-induzierte

3. Ergebnisse

Genexpression imitieren können. Als Folge davon würde der CPRB-Promotor aktiviert, was sich in den transgenen *Dictyostelium-discoideum*-Zellen anhand der β -Galaktosidase-Aktivität nachweisen lässt. Die Signalweitergabe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren cAR 1 und cAR 3 erfolgt sowohl über G-Proteine als auch unabhängig davon (Firtel, 1995; Schnitzler et al., 1995; Chen et al., 1996; Firtel, 1996) über noch unbekannte Signaltransduktionswege. Wie die Signalweitergabe des rekombinanten Muskarin-Rezeptors in die Zelle erfolgen kann, ist somit nicht exakt vorhersehbar.

Für diese Versuche wurden die *Dictyostelium-discoideum*-Zellen folgendermaßen mehrfach transformiert. Selektionsantibiotikum bei allen Transformationen war G418 in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, da alle Plasmide das G418-Resistenzgen tragen.

1. Plasmid mit Muskarin-Rezeptorgen M2 (bzw. M1/ M4) unter Kontrolle des Aktin-15-Promotors (Voith and Dingermann, 1995b; Voith and Dingermann, 1995a)
2. Plasmid mit β -Galaktosidasegen unter Kontrolle des CPRB-Promotors freundlicherweise von Dr. J. G. Williams zur Verfügung gestellt (Tillner et al., 1996). Im einfachsten Fall wurden nur diese beiden Plasmide transformiert, um eine direkte Kopplung nachzuweisen.
3. Plasmid mit dem Gen für die humane $G_{\alpha i3}$ -Untereinheit unter Kontrolle des Aktin 15 Promotors (optional enthalten), freundlicherweise von Frau Dr. Lijun Wu, Firma LeukoSite zur Verfügung gestellt.
4. Plasmid mit GBF-Gen unter Kontrolle des Aktin-15-Promotors (optional enthalten), freundlicherweise von Dr. R. A. Firtel zur Verfügung gestellt (Schnitzler et al., 1994).

Die Plasmide mit Rezeptorgen und mit β -Gal-Gen wurden bei allen hier beschriebenen Mehrfachtransformationen eingesetzt, da sie unerlässliche Bestandteile des Versuchsaufbaus sind. Die Auswahl des CPRB-Promotors für das β -Gal-Gen wurde getroffen, weil die Aktivität dieses Promotors bereits im frühen postaggregativen Stadium und in allen Zellen etwa gleich stark ansteigt. Durch den zusätzlichen Einsatz des Plasmides mit dem GBF-Gen (Plasmide 1, 2 und 4 gleichzeitig transformiert) konnten zum einen die Versuchsbedingungen vereinfacht werden (30 Minuten Hungerbedingungen versus 6-7 Stunden), zum anderen sollte durch erhöhte GBF-Expressionsraten eine höhere Aktivität des CPRB-Promotors erzielt werden. Um möglicherweise die Erkennung von Rezeptor und G-Protein zu erleichtern, wurde alternativ oder zusätzlich hierzu als drittes

3. Ergebnisse

(Plasmide 1, 2 und 3) beziehungsweise viertes Plasmid (Plasmide 1-4) dasjenige mit dem Gen für die humane G-Protein-Untereinheit transformiert, da M2-Rezeptoren über diese Untereinheit in humanen Zellen Signale weiterleiten. (Wess, 1996; Murthy and Makhlof, 1997).

- **Nachweis der Proteine von simultan transformierten Genen**

Nach simultaner Transformation der Plasmide musste zunächst die erfolgreiche Expression der jeweiligen Proteine gezeigt werden. Die betreffenden Proteine wurden dabei direkt oder indirekt nachgewiesen. Die Expression des Muskarin-Rezeptors konnte über Radioligandenbindung mit [³H]-N-Methylscopolamin als spezifischem Liganden überprüft werden. Hierbei wurden alle Klone einem Screening unterzogen, eine vollständige Analyse mit Bestimmung von KD und Bmax wurde exemplarisch an einem Klon durchgeführt (Abbildung 35). Die Expression der humanen G-Protein-Untereinheit wurde mittels Western-Blot überprüft (Abbildung 36). Die erfolgreiche Translation von GBF und β -Galaktosidase wurde simultan durch die Umsetzung der CPRG-Farbstofflösung nach vorangegangenen 30 Minuten Hungerbedingungen mit anschließender Aktivierung durch Zugabe von cAMP nachgewiesen (Abbildung 37). Pro Versuchsansatz wurden etwa 10 bis 12 Klone untersucht, wobei mehr als 90% der Klone alle entsprechenden Plasmide erfolgreich aufgenommen hatten.

3. Ergebnisse

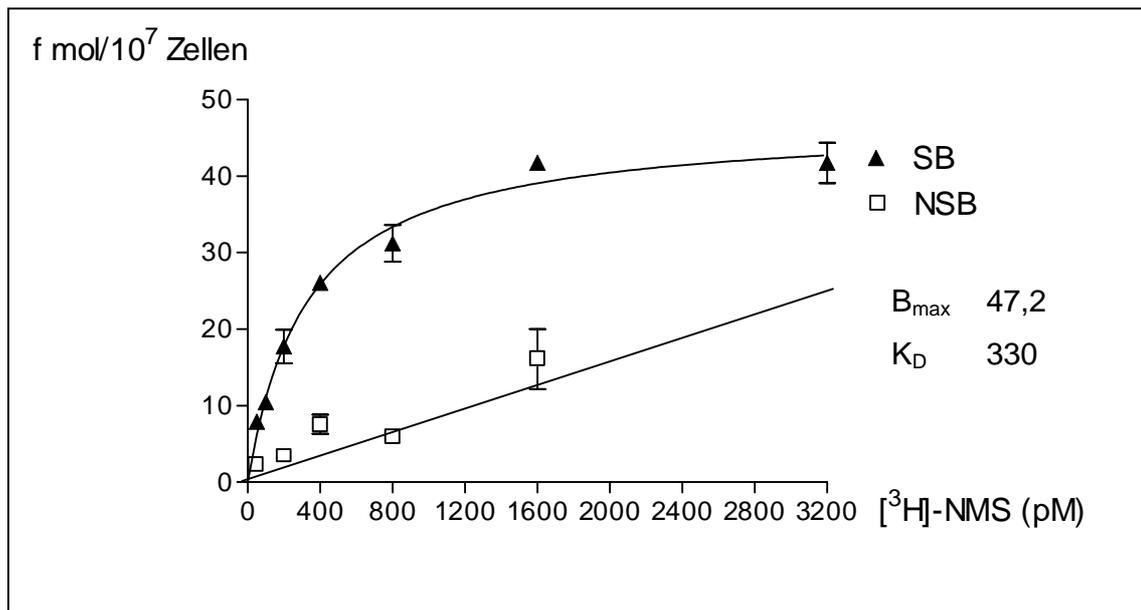


Abbildung 35: Präparation von Ganzzellen einer Mehrfachtransformatanten, Radioligandenbindung zum Nachweis des M2-Rezeptorproteins

SB: Spezifische Bindung

NSB: Nicht-Spezifische Bindung

Verwendete Plasmide mit: Muskarin-Rezeptorgen, β -Galaktosidasegen; Gen für humane G_{oi3}-Untereinheit
Abbildung 35 zeigt den Nachweis des humanen M2-Rezeptors mittels Bindung von [³H]-NMS bei einer Dreifachtransformatanten. Die ermittelte Anzahl von etwa 2200 Rezeptoren pro Zelle entspricht ungefähr derjenigen von etwa 3000 bis 6000 Rezeptoren pro Zelle, die bei Einfachtransformatanten gefunden werden (Voith, 1996).

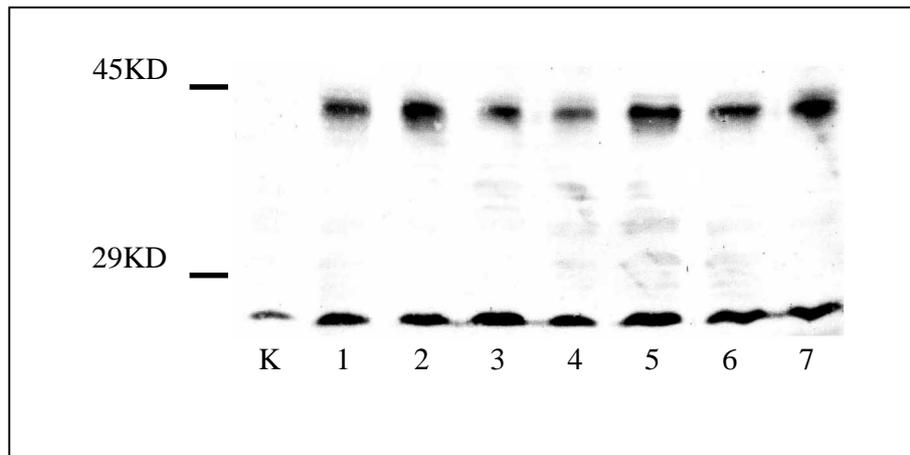


Abbildung 36: Western-Blot zum Nachweis der humanen G-Protein-Untereinheit bei Mehrfachtransformanden.

7 Dreifachtransformanden in AX2 (1-7); Kontrolle: Zweifachtransformande ohne G-Protein-Untereinheit
Verwendete Plasmide mit: Muskarin-Rezeptorgen, β -Galaktosidasegen; Gen für humane $G_{\alpha 3}$ -Untereinheit

Der Western-Blot zeigt den Nachweis der humanen $G_{\alpha 3}$ -Untereinheit bei der korrekten Größe von etwa 45 KD. Im Bereich kleiner 29 KD zeigen alle Transformanden und die Kontrolle ein Protein, das ebenfalls positiv mit dem Antikörper reagiert und vermutlich von einem *Dictyostelium discoideum* eigenen Protein stammt. Alle überprüften Mehrfachtransformanden (1-7) exprimieren die humane G-Protein-Untereinheit. Diese 7 Transformanden zeigten auch Bindung von $[3H]$ -NMS und eine Aktivität der β -Galaktosidase, so dass man von einer sehr effizienten Mehrfachtransformation ausgehen kann, bei der praktisch alle in Gegenwart des Selektionsantibiotikums überlebenden Transformanden auch die entsprechenden Plasmide korrekt aufgenommen haben.

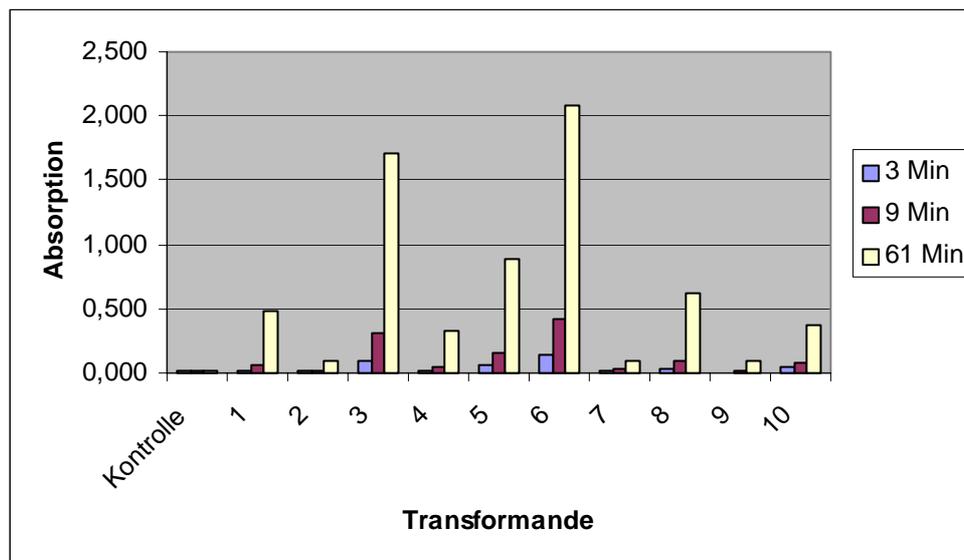


Abbildung 37: Aktivität der β -Galaktosidase

10 Vierfachtransformanden in AX2 (1-10); Kontrolle: Transformante ohne β -Galaktosidasegen

Abbildung 37 zeigt die im ELISA-Reader gemessene Umsetzung von CPRG-Lösung in Abhängigkeit von der Zeit. Die gezeigten Absorptionswerte dienen lediglich dazu, eine Enzymaktivität zu detektieren und einen ungefähren Vergleich der einzelnen Transformanden hinsichtlich der Enzymaktivität zu erhalten. Alle Transformanden bilden eine aktive β -Galaktosidase bereits nach 30 Minuten Hungerbedingungen, so dass beide Plasmide (mit GBF-Gen und mit β -Galaktosidasegen) aufgenommen wurden. Bei Transformanden ohne GBF-Gen zeigt sich eine Enzymaktivität erst nach mindestens 12 Stunden Hungerbedingungen auf Phosphatagar. Deutlich zu erkennen ist, dass die Aktivität der β -Galaktosidase bei den einzelnen Klonen unterschiedlich stark ausgeprägt ist, eine Tatsache, die auch bei der Rezeptorexpression festgestellt werden konnte.

Die beschriebenen Mehrfachtransformationen wurden auch mit den Plasmiden pDXA-L3Cm1 (Subtyp M1) und pDXA-L3Cm4 (Subtyp M4) anstelle des Plasmides pDXA-CSA hm2 (M2) durchgeführt, jedoch konnte bei keiner der untersuchten Transformanden Rezeptorprotein sicher nachgewiesen werden, so dass die eigentlichen Stimulationsversuche zur Rezeptor-Effektor-Kopplung nicht durchgeführt wurden.

- **Stimulation der Muskarin-Rezeptoren von Mehrfachtransformanden**

Die eigentliche Versuchsdurchführung erfolgte dann mit Transformanden, die die jeweils transformierten Plasmide korrekt aufgenommen hatten. Es wurden solche Klone ausgewählt, die sowohl eine große Anzahl an Rezeptoren als auch eine starke Aktivität der β -Galaktosidase zeigten. Um mit möglichst frischen Transformanden zu arbeiten, wurde dabei zum Teil auf eine exakte Bestimmung der Rezeptoranzahl verzichtet, wenn die

3. Ergebnisse

Vorversuche eine vergleichbaren Expressionsrate an Muskarin-Rezeptoren wie in Abbildung 35 beschrieben anzeigten.

Die so selektierten Transformanten wurden dann zunächst bis zur logarithmischen Phase kultiviert und danach in Phosphatpuffer unter Hungerbedingungen für unterschiedliche Zeiten geschüttelt. Anschließend erfolgte die Stimulation des Rezeptors und der Aufschluss der Zellen. Bei fünf verschiedenen Transformationsansätzen wurden so jeweils zwei bis sechs unterschiedliche Klone untersucht. Die Versuchsbedingungen wurden in Wiederholungen zum Teil noch bezüglich einzelner Parameter wie Hungerzeit oder Konzentration des Liganden variiert.

Eine Induzierung der β -Galaktosidase durch Zugabe von Carbachol oder Muskarin nach der in Abschnitt 2.8.1 beschriebenen Methode und damit der Nachweis einer Kopplung zwischen Muskarin-Rezeptor und Bestandteilen der Signaltransduktionskette in *Dictyostelium discoideum* konnte mit der gewählten Versuchsanordnung bei keiner der untersuchten Mehrfachtransformanten gezeigt werden.

3.7.2 Beeinflussung der *Dictyostelium-discoideum*-Differenzierung

Aktiviert cAMP-Rezeptoren sind auch an der Differenzierung in verschiedene Zelltypen bei *Dictyostelium discoideum* beteiligt. Stimulation von cAR 2 (Saxe III et al., 1993) und cAR 4 (Louis et al., 1994) in der späten Entwicklung ist vor allem für die korrekte Ausbildung von Stielzellen wichtig (Loomis, 1996; Ginsburg and Kimmel, 1997).

Ein alternativer Test auf funktionelle Kopplung der rekombinanten Rezeptoren wäre also, die Transformanten auf Veränderungen der üblichen Zelldifferenzierung nach Stimulation dieser Rezeptoren zu untersuchen. Diese Veränderungen müssten sich dann auch in einer veränderten Aktivität von zelltypspezifischen Promotoren äußern (Versuchsdurchführung gemäß Abschnitt 2.8.2).

Der Versuchsansatz lehnte sich an eine bereits etablierte Methode in unserem Labor an (Tillner et al., 1996; Tillner, 1997). Auch bei dieser Versuchsanordnung wurde mit 2- und 3-fach-Transformanten gearbeitet. Bei Zweifachtransformanten wurden ein Plasmid mit Rezeptor-DNA und ein Plasmid mit β -Galaktosidasegen gemeinsam transformiert, bei Dreifachtransformanten zusätzlich das Plasmid mit dem Gen der humanen G-Protein-Untereinheit. Das Plasmid mit dem GBF-Gen wurde nicht verwendet. Folgende Rezeptor-Plasmide wurden verwendet:

3. Ergebnisse

- pDXA-L3Cm1
- pDXA-CSA hm2
- pDXA-L3Cm4

Zusätzlich zu den Versuchen mit dem Plasmid mit CPRB-Promotor als Kontrolleinheit für das β -Galaktosidasegen wurden in parallelen Versuchen auch Plasmide mit den Prästielzellpromotoren *ecmA* oder *ecmB* sowie ein Plasmid mit dem Präsporenzellpromotor *pspA* als Kontrollregion für das β -Galaktosidasegen verwendet (Tillner et al., 1996; Tillner, 1997).

Die Überprüfung auf die korrekte Bildung der gewünschten Fremdproteine wurde wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben durchgeführt. Die selektierten Transformanden wurden auch in diesem Versuchsansatz bis zur logarithmischen Phase kultiviert und anschließend in Phosphatpuffer aufgenommen. Danach wurden sie zur Differenzierung auf Phosphatagarplatten gegeben. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die Zellen dann lysiert und anschließend untersucht. Insgesamt wurden etwa 30 Klone aus sechs verschiedenen Transformationsansätzen untersucht.

Ein Einfluss auf die Aktivität entwicklungs- oder zelltypspezifischer Promotoren durch Zugabe von muskarinergen Liganden zu den Agarplatten konnte für keinen der Promotoren und keinen der 3 Rezeptor-Subtypen gezeigt werden. In den Versuchen waren Zeitpunkt und Ausmaß der β -Galaktosidase-Bildung von stimulierten Mehrfachtransformanden, unstimulierten Mehrfachtransformanden und Transformanden ohne Rezeptorgen vergleichbar. Zeitpunkt und Ausmaß der β -Galaktosidase-Bildung waren also durch Transformation der Plasmide und anschließende Stimulation der Rezeptoren nicht manipulierbar, so dass eine Rezeptor-Effektor-Kopplung nicht nachgewiesen werden konnte.

3.7.3 Beeinflussung der Aktinpolymerisation

Aktin repräsentiert nahezu 8 % der zellulären Proteine in *Dictyostelium discoideum* und liegt in einer Konzentration von ca. 100 μ M vor. Es gibt etwa 20 verschiedene Aktin-Gene, alle ergeben jedoch das gleiche Protein (Noegel and Luna, 1995). In ruhenden Zellen liegen G-Aktin und F-Aktin zu etwa gleichen Anteilen vor. Stimuliert man aggregationskompetente Zellen mit cAMP, so steigt der Anteil an F-Aktin innerhalb von

3. Ergebnisse

etwa 10 Sekunden um 50 bis 100 % an, um nach ca. 20 Sekunden auf den Ausgangswert zurückzugehen. 30 Sekunden nach Stimulation steigt die Konzentration an F-Aktin erneut an und erreicht nach einer knappen Minute einen, diesmal etwas niedrigeren, Gipfel, der für wenige Minuten bestehen bleibt (Noegel and Luna, 1995; Zigmond et al., 1997). Dieser Anstieg wird bei intakten Zellen über heterotrimere G-Proteine vermittelt (Devreotes, 1994; Chen et al., 1996; Zigmond et al., 1997).

Durch die Versuche zur Aktinpolymerisation sollte ein Anstieg des F-Aktins durch Zugabe von muskarinergen Liganden untersucht werden. Die Versuche wurden nur mit dem Subtyp M2 durchgeführt, wobei Zweifachtransformanden (Muskarin-Rezeptorgen und Gen für die humane $G_{\alpha i3}$ -Untereinheit) und Dreifachtransformanden (Muskarin-Rezeptorgen, β -Galaktosidasegen; Gen für humane $G_{\alpha i3}$ -Untereinheit) verwendet wurden. Das β -Galaktosidasegen wird in diesem Versuchsansatz nicht benötigt, die jeweiligen Transformanden wurden jedoch zum Teil parallel bei den verschiedenen Versuchen zur Rezeptor-Effektor-Kopplung verwendet.

Zunächst wurde in Vorversuchen mit dem Stamm AX2 und cAMP als Stimulans die Methode der Aktinpolymerisation in unserem Labor etabliert. Der Anstieg des F-Aktins um etwa 50 bis 100 % ist mit dem bloßen Auge nicht eindeutig zu identifizieren. Daher wurde bei nachfolgenden Untersuchungen die Intensität der Banden mit Hilfe eines Computerprogrammes ausgewertet (Abbildung 38, Abschnitt 2.9).

Auch bei der Messung der Aktinpolymerisation wurden logarithmisch wachsende Zellen in Phosphatpuffer aufgenommen und anschließend für 6,5 Stunden geschüttelt. Nach Stimulation mit cAMP wurde die Polymerisation des Aktins nach vorher festgelegten Zeiten gestoppt und anschließend die zeitabhängige Menge des F-Aktins über Bandenvergleich eines SDS-Gels bestimmt.

Nach Etablierung der Methode wurden die Versuche mit den M2- und $G_{\alpha i3}$ -Mehrfachtransformanden durchgeführt, wobei die Expression der G-Protein-Untereinheit mittels Western-Blot überprüft und die Bildung von Rezeptorprotein durch Bindungsversuche bestätigt worden war. Auf eine exakte Bestimmung der Rezeptoranzahl und -affinität (K_D und B_{max}) wurde bei diesen Experimenten verzichtet, die erhaltenen Werte aus den Vorversuchen zu den Radioliganden-Bindungsstudien zeigen aber eine Expressionsrate vergleichbar mit derjenigen aus Abbildung 35 an.

Ein durch Muskarin induzierter Anstieg des Anteiles an F-Aktin, wie er durch cAMP ausgelöst wird, konnte durch die Versuchsanordnung jedoch nicht gezeigt werden.

3. Ergebnisse

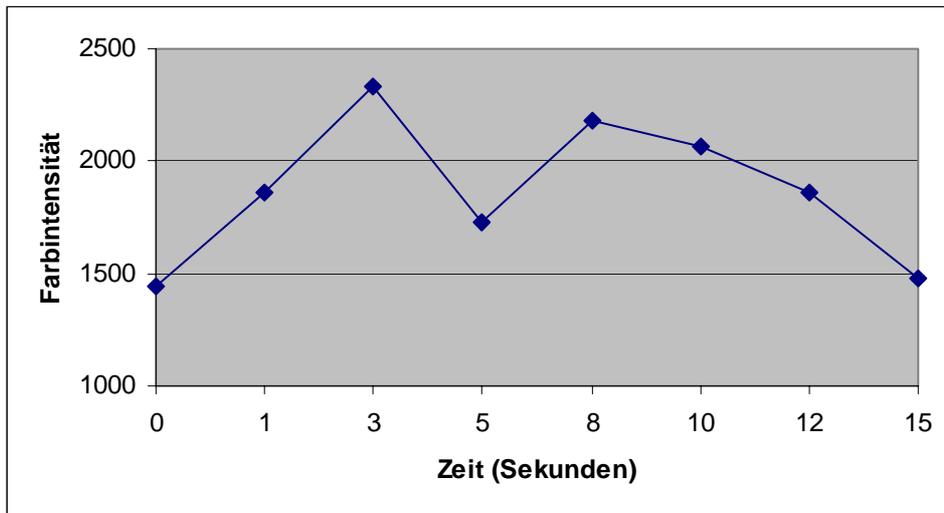


Abbildung 38, F-Aktinanteil nach durch Stimulation mit cAMP

Klon: AX2

Stimulans: 1mM cAMP, Werte jeweils als Doppelbestimmung

Abbildung 38 zeigt den Anstieg im Anteil des F-Aktins um etwa 60 % (Ausgangswert 1440 auf 2331). Nach etwa 15 Sekunden ist der Anteil des F-Aktins wieder auf den Ausgangswert zurück gefallen. Der niedrige Wert bei 5 Sekunden beruht auf einem Riss im Gel, der zu einem Messfehler führt.

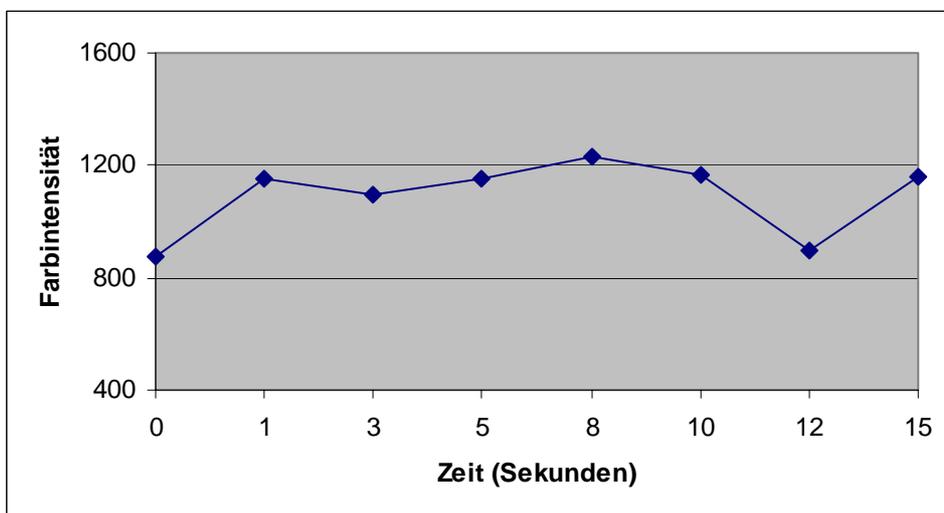


Abbildung 39: F-Aktinanteil nach durch Stimulation mit Muskarin

Klon: AX2-Transformante mit humanem M2-Rezeptor, β -Galaktosidasegen, Gen für humane $G_{\alpha 13}$ -Untereinheit

Stimulans: 100 μ M Muskarin, Werte jeweils als Doppelbestimmung

Abbildung 39 zeigt, dass im Vergleich zu Abbildung 38 der Anstieg im Anteil des F-Aktins nach Stimulation durch Muskarin fehlt.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte der Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* auf seine Eignung zum Aufbau eines High-Throughput-Screening-Testsystems für Muskarin-Rezeptoren im speziellen und für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren im allgemeinen untersucht werden. Hierzu wurde die DNA der humanen Rezeptor-Subtypen M1, M3, M4 und M5 in *Dictyostelium-discoideum*-Expressionsplasmide kloniert und unterschiedliche Stämme mit diesen Plasmiden transformiert. Die Expression dieser Rezeptor-Subtypen wurde sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene untersucht. Mit den humanen Subtypen M1, M2 (Voith, 1996) und M4 wurden die Untersuchungen zur Rezeptor-Effektor-Kopplung durchgeführt.

4.1 Rezeptorexpression

Mit den verwendeten Plasmiden konnte die Expression von Rezeptorprotein bei den Subtypen M1, M3 und M4 nachgewiesen werden. Für den Rezeptor-Subtyp M5 konnte trotz Verwendung der gleichen Ursprungsplasmide wie bei den Subtypen M1, M3 und M4 keine Rezeptorexpression erreicht werden. In den folgenden Abschnitten soll auf die verschiedenen variablen Parameter eingegangen werden, die eine heterologe Rezeptorexpression beeinflussen.

4.1.1 Einfluss des Expressionsstammes

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit drei verschiedenen Expressionsstämmen gearbeitet. Die Verwendung der beiden Stämme AX2 und AX3-ORF+ lieferte hierbei Transformanten mit nachweisbarer Rezeptorexpression und korrekt gefaltetem Protein. In AX2 und AX3 konnte für die Rezeptor-Subtypen M1 und M4 jeweils vergleichbare Werte für Affinitätskonstante und Rezeptoranzahl pro Zelle erhalten werden, bei Subtyp M5 lieferten weder AX2 noch AX3 Transformanten mit Rezeptorexpression. Die beiden Stämme unterscheiden sich sowohl in der Anzahl der vorhandenen Rezeptor-DNA-Kopien als auch in der zellulären Lokalisierung der Rezeptor-DNA. So liegt die Anzahl der extrachromosomalen DNA-Kopien bei AX3-ORF+ unter 10 pro Zelle und bei AX2 liegt die Anzahl der chromosomalen Kopien zwischen 10 und 50 je Zelle (Manstein et al., 1995). Da diese Unterschiede sich nicht in einer unterschiedlich starken Ausbildung von

Rezeptor-RNA oder -Protein widerspiegeln, scheinen weder Lokalisation noch Anzahl der Kopien der Fremd-DNA einen deutlichen Einfluss auf die Rezeptorexpression zu haben. Bei Subtyp M3 wurde lediglich der Stamm AX2 verwendet.

Sowohl bei Transformation von Plasmiden mit Aktin-Promotor als auch bei Plasmiden mit Discoidin-Promotor konnte mit dem Expressionsstamm VI 88 keine Rezeptorexpression nachgewiesen werden (Versuche mit M1 und M4), obwohl dieser Stamm als Discoidin-Überexprimierer gilt (Wetterauer et al., 1993a; Wetterauer et al., 1993b). Da jedoch auch bei AX2 und AX3 nicht jeder Transformationsansatz zu positiven Transformanden führt, scheint es prinzipiell nicht ausgeschlossen, auch mit dem Stamm VI 88 eine Proteinexpression zu erreichen. Der Stamm VI 88 lässt sich jedoch wesentlich schlechter kultivieren als AX2 oder AX3. Deswegen wurden die meisten Versuche mit den AX-Stämmen durchgeführt. Erkennbare Vorteile bei der Expression heterologer G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren gegenüber dem Stamm AX2 kann man aufgrund der Ergebnisse jedoch sicher ausschließen.

Insgesamt kann also der Einfluss des Expressionsstammes bei der Expression der in dieser Arbeit untersuchten heterologen G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren in *Dictyostelium discoideum* als relativ gering angesehen werden, sicher ist aber je nach Protein der optimale Expressionsstamm experimentell zu ermitteln, da Untersuchungen mit anderen Proteinen zum Teil einen erheblichen Einfluss des verwendeten Stammes auf die Proteinexpression zeigten (Kuschnick, 1999).

4.1.2 Einfluss der Promotoren und des Signalpeptids

- **Promotoren**

Wie die in dieser Arbeit erzielten Resultate eindeutig belegen, hat die Wahl des Promotors einen deutlichen Einfluss auf die Expression der heterologen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in *Dictyostelium discoideum*. Von den drei untersuchten Promotoren hat sich der Aktin-Promotor als der am besten geeignete Promotor zur Expression der untersuchten Muskarin-Rezeptoren erwiesen. Der Aktin-15-Promotor ist auch der in unserer und in anderen Arbeitsgruppen am häufigsten verwendete Promotor zur heterologen Expression in *Dictyostelium discoideum* überhaupt (Dittrich et al., 1994; Emslie et al., 1995; Cohen et al., 1996; Karakesisoglou et al., 1996; Voith, 1996; Chaumont et al., 1997; Cubitt et al., 1998; Heikooop et al., 1998; Kuschnick, 1999; Walter, 1999; Zhou and Fambrough, 1999).

Die Vorteile des Aktin-15-Promotors gegenüber anderen Promotoren sind vor allem darin zu sehen, dass er bei axenisch wachsenden Kulturen praktisch während der gesamten Wachstumsphase eine gleichmäßig starke Aktivität zeigt, während der Discoidin-Promotor insgesamt eine deutlich niedrigere Aktivität aufweist und der Ras-Promotor erst zu einem Zeitpunkt aktiviert wird, zu dem bereits eine deutliche Umstellung des Stoffwechsels und der Zusammensetzung der Zellmembran zu erwarten ist. Letzteres kann zum Abbau von Rezeptorprotein oder zu unphysiologischem Einbau des Rezeptors in die Zellmembran führen, obwohl bei Verwendung von M2-Konstrukten auch nach über sechsständigem Hungern von *Dictyostelium-discoideum*-Zellen in Phosphatpuffer noch Rezeptoren nachweisbar sind. Auf jeden Fall nachteilig ist die Tatsache, dass unter Ras-Promotor-Kontrolle die Expression des heterolog exprimierten Rezeptors erst zu einem Zeitpunkt beginnt, wo bereits eine Konkurrenz zum endogenen cAMP-Rezeptor auftritt. Somit wäre eine Kopplung der Signalweiterleitung nicht mehr eindeutig nachweisbar.

Der Discoidin-Promotor führte bereits zu deutlich geringeren Rezeptoranzahlen als der Aktin-Promotor, mit dem Ras-Promotor ließ sich keinerlei Rezeptorexpression erreichen. Aus den ermittelten Rezeptoranzahlen für M3 und den Hinweisen auf sehr geringe Rezeptorexpression bei M1 und M4 lässt sich eine um den Faktor 10 bis 20 niedrigere Expressionsrate für Muskarin-Rezeptoren bei Plasmiden mit Discoidin-Promotor gegenüber dem Aktin-Promotor abschätzen. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit denjenigen überein, die durch J. Walter und C. Kuschnick für Prostaglandin-E₂-Rezeptoren bzw. Proteinase K und *Pseudomonas-aeruginosa*-Antigene aus unserer Arbeitsgruppe erzielt wurden (Kuschnick, 1999; Walter, 1999), lediglich G. Voith konnte auch mit den Discoidin-Promotor befriedigende Expressionsleistungen zeigen (Voith, 1996).

Fasst man die Expressionsergebnisse mit heterolog exprimierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in unserer Arbeitsgruppe zusammen, so lassen sich mit den verwendeten Promotoren Rezeptoranzahlen zwischen etwa 200 und 7000 Rezeptoren pro Zelle erreichen. Um brauchbare Aussagen aus Radioliganden-Bindungsexperimenten zu erhalten sollten Transformanden mit Expressionsraten von mehr als 1000 Rezeptoren pro Zelle über mehrere Wochen stabil zur Verfügung stehen. Dies ist allerdings bei den meisten untersuchten Rezeptoren nicht gegeben.

- **Signalsequenz und Codonpräferenzen**

Die verwendeten Plasmide aus dieser Arbeit lassen sich einteilen in Plasmide mit CSA-Signalsequenz und Plasmide ohne Signalsequenz. Bei den Plasmiden mit CSA-

Signalsequenz kann man noch unterscheiden zwischen vollständiger und unvollständiger Signalsequenz. Den Plasmiden der Reihe pDXA-L3C fehlt im Vergleich zu den Plasmiden der Reihe pDA-L3C das Triplet TTA, das für die Aminosäure Leucin codiert (siehe Abschnitt 3.1). Ein negativer Einfluss des fehlenden Triplets im CSA-Leaderpeptid z.B. bei den Vektoren pDXA-L3C m1/4/5 kann ausgeschlossen werden, da die Expressionsergebnisse mit denjenigen bei pDA-L3C m1/4/5 vergleichbar sind.

Für keines der verwendeten Plasmide ohne Signalsequenz konnte funktionelles Rezeptorprotein nachgewiesen werden. Jedoch ist hierbei zu berücksichtigen, dass in dieser Arbeit keine Angleichung der Rezeptor-DNA an den *Dictyostelium discoideum* Codon Usage vorgenommen wurde. Es ist seit längerem bekannt, dass eine Anpassung der ersten 5 bis 17 Codons an die üblicherweise in *D. discoideum* verwendeten Codons bei manchen Proteinen eine deutliche Steigerung der Expressionsraten von Fremdproteinen zur Folge hat bzw. eine Proteinexpression überhaupt erst ermöglicht (Dittrich et al., 1994; Emslie et al., 1995; Zündorf, 1995; Cohen et al., 1996; Voith, 1996; Cubitt et al., 1998; Kuschnick, 1999; Walter, 1999; Zhou and Fambrough, 1999; Vervoort et al., 2000).

Prinzipiell ist es auch möglich, die Signalsequenz des heterologen Proteins zu verwenden, wie Zündorf (Zündorf, 1995) und Heikoop zeigen konnten. Im Falle des hCG lag die Proteinmenge bei Verwendung der im Codon Usage angeglichenen Signalsequenz des Fremd-Proteins sogar um den Faktor 50 höher als bei Verwendung der PsA-Signalsequenz aus *Dictyostelium discoideum* (Heikoop et al., 1998; Linskens et al., 1999; Vervoort et al., 2000).

Jedoch scheint die alleinige Anpassung an den Codongebrauch ohne Verwendung einer Signalsequenz nicht in jedem Falle ausreichend zu sein, wie unter anderem die negativen Ergebnisse mit Plasmiden ohne CSA-Leader von G. Voith und C. Reymond belegen (Reymond et al., 1995; Voith, 1996). Die Untersuchungen mit rekombinantem GST und PsA-Signalsequenz von Dittrich zeigen, daß *Dictyostelium discoideum* die Signalsequenz vor dem heterolog exprimierten Protein korrekt entfernen kann, so dass dieses den erwarteten N-Terminus besitzt (Dittrich et al., 1994).

Die Verwendung der endogenen Signalsequenzen bedeutet per se schon eine Anpassung an Codongebrauch von *Dictyostelium discoideum*. Andererseits bringt eine weitergehende Anpassung an den Codongebrauch keine zusätzliche Steigerung der Expressionsergebnisse, wie die Arbeiten von Kuschnick und Vervoort belegen (Kuschnick, 1999; Vervoort et al., 2000). Somit erscheint die Verwendung von Plasmiden mit

Signalsequenz, wie sie bei den Plasmiden mit Leaderpeptid in dieser Arbeit erfolgte hinsichtlich Signalsequenz und Codon Usage weitgehend optimiert zu sein.

Die Resultate dieser Arbeit bestätigen damit die bereits mit Prostaglandin-E2-Rezeptoren erzielten Ergebnisse, nach denen die Verwendung der *Dictyostelium discoideum* eigenen Signalsequenz, die per se die korrekten Codons benutzt, für eine Expression ausreichend ist (Walter, 1999). Eine allgemeingültige Voraussage über die zu verwendeten Signalsequenzen bzw. der nötigen Anpassungen an den Codongebrauch lässt sich aus den Ergebnissen dieser und anderer Arbeiten aber nicht immer ziehen, vielmehr müssen die optimalen Bedingungen jeweils experimentell ermittelt werden.

4.1.3 Glykosylierung/ Stabilität der Transformation

Posttranslationale Modifizierung ist für die Funktion der meisten eukaryontischen Proteine, die durch das ER transportiert werden, essentiell (Trombetta and Helenius, 1998). Durch Modifikationen wie Phosphorylierungen, Sulfatierungen oder Glykosylierungen werden die Eigenschaften der Proteine meist stark beeinflusst. So ist bekannt, dass z.B. Proteinfaltung, Assemblierung zu Oligomeren oder Sekretionsprozesse von der korrekten Glykosylierung der primären Proteinsequenzen abhängen (Jenkins, 1996).

Von besonderem Interesse bei den Modifikationen sind die Glykosylierungen, wobei je nach Anheftungsstelle der Zuckerkomponenten zwischen N-Glykosylierung und O-Glykosylierung unterschieden wird. Diese Glykosylierungen variieren aber zum Teil erheblich zwischen einzelnen Zelltypen bzw. unterschiedlichen Organismen. Zum einen werden unterschiedliche Zuckermoleküle wie Galaktose, Glucose, Fukose oder Sialinsäure angehängt (Jenkins, 1996; Jung et al., 1997; Jung et al., 1998), zum anderen ist bekannt, dass die primär angehefteten Zuckerketten zum Teil noch im ER durch Glukosidasen oder andere Enzyme modifiziert werden (Trombetta and Helenius, 1998). Auch für *Dictyostelium discoideum* sind sowohl bei den N-Glykosylierungen als auch bei den O-Glykosylierungen unterschiedliche Glykosylierungsmuster im Vergleich zu höheren Eukaryonten bekannt, auch wenn die Glykosylierungsstellen identisch bzw. ähnlich sind (Freeze, 1992; Slade et al., 1997; Jung et al., 1998).

Unter Berücksichtigung der erwähnten unterschiedlichen Glykosylierungsmuster verschiedener Organismen einerseits und dem Einfluss auf die Proteineigenschaften andererseits darf man annehmen, dass die je nach Rezeptor unterschiedlichen Ergebnisse

dieser Arbeit nicht zuletzt mit der Art der Glykosylierung in *Dictyostelium discoideum* erklärbar sind. Den Einfluss der Glykosylierung auf die heterologe Expression von Muskarin-Rezeptoren konnten J. Behr et. al. sehr schön mit dem M3 der Ratte und Baculovirus-infizierten Insektenzellen nachweisen (Behr et al., 1998). Das von den Sf9 Zellen für die N-Glykosylierung verwendete Asn-X-Ser/ Thr Motiv ist identisch mit dem Motiv bei *Dictyostelium discoideum*, Säugerzellen und anderen Eukaryonten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die heterolog exprimierte Rezeptoren ohne N-terminale N-Glykosylierung die gleiche Affinität zu NMS besitzen wie glykosylierte Rezeptoren und somit trotz fehlender Glykosylierung im Endzustand korrekt gefaltet sind. Die Anzahl nachweisbarer Bindungsstellen für NMS wurde im Gegensatz zur Affinität deutlich reduziert. Dies bedeutet, dass eine Beeinträchtigung von Primärfaltung, Targeting und/ oder vor allem Rezeptorstabilität vorliegen muss.

Es ist denkbar, dass die Glykosylierung in *Dictyostelium discoideum* bei den verschiedenen Rezeptor-Subtypen jeweils unterschiedliche Auswirkungen auf die Proteineigenschaften hat, die sich dann in den Versuchsergebnisse widerspiegeln. Obwohl nämlich bei M1, M3, M4 und M5 die gleichen Ausgangsplasmide verwendet wurden, variieren die nachweisbaren Rezeptorzahlen sehr deutlich (siehe Abschnitt Ergebnisse). Denkbar ist hierbei, dass Proteinfaltung, Proteinstabilität und Proteintransport für die einzelnen Rezeptoren unterschiedlich betroffen sind, da die einzelnen Subtypen zwischen zwei und fünf Motive zur N-Glykosylierung am N-Terminus an unterschiedlichen Positionen besitzen. So lassen sich die guten Werte der Affinitätskonstanten für NMS, die vergleichsweise niedrigen Rezeptorzahlen und die Instabilität der Transformanten bei M1 und bei M4 mit korrekter Faltung und Transport bei gleichzeitig beeinträchtigter Proteinstabilität erklären. Die im Vergleich zu Säugerzellen abweichenden Affinitäten für M3 und der fehlende Rezeptornachweis bei M5 scheinen jedoch eher auf inkorrekte Faltung und/ oder Transport hinzuweisen. Die abweichenden Affinitäten und die nicht befriedigend ermittelbare Sättigung für den Subtyp M3 decken sich aber sehr gut mit den Ergebnissen, die bereits für den M3 der Ratte gefunden wurden (Voith et al., 1998).

Das Phänomen der unterschiedlichen Expressierbarkeit verschiedener Rezeptor-Subtypen in *Dictyostelium discoideum* hat bereits Jochen Walter aus unserer Arbeitsgruppe mit ähnlichen Rezeptorzahlen zwischen Null und einigen Tausend Rezeptoren pro Zelle für die jeweiligen Subtypen des Prostaglandin-E₂-Rezeptors gefunden (Walter, 1999), während in

der Arbeit von Schmidt keine Expression von V₂-Rezeptoren gezeigt werden konnte (Schmidt, 1999).

Fasst man nun die Ergebnisse zur Expression von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren von Schmidt, Walter und aus dieser Arbeit zusammen, so scheint es eine direkte Abhängigkeit der nachweisbaren Rezeptoranzahlen von der Anzahl der N-Glykosylierungsstellen im Extrazellularraum zu geben. Alle Rezeptoren mit starker nachgewiesener Expression besitzen vier oder fünf Glykosylierungsstellen, die Rezeptoren mit schwacher nachgewiesener Expression besitzen 2 Glykosylierungsstellen, während sich bei Rezeptoren mit nur einer Glykosylierungsstelle keine Rezeptoren nachweisen ließen. Dies bedeutet, dass in Analogie zu den Ergebnissen mit Insektenzellen (Behr et al., 1998) ein gewisses Mindestmass an Glykosylierung offensichtlich die Voraussetzung für eine genügende Stabilität der Rezeptoren ist.

Rezeptor	AS	N-Terminus	Glykosylierung	S-S	Bindung
M1	460	24	2	1	+
M2	466	22	4	1	+++
M3	590	67	5	1	+++
M3 Ratte	589	66	5	1	+++
M4	479	31	2	1	+
M5	532	29	1	1	0
EP1	408	35	2	1	0
EP2	358	23	4	1	+++
EP3	390	53	2	/	+
EP4	488	19	1	1	0
V2	371	38	1	/	0

Tabelle 11: Glykosylierungsstellen G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren

Die Angaben der Tabelle sind der Proteindatenbank SWISS-PROT (<http://www.expasy.ch/>) entnommen.

AS: Anzahl Aminosäuren Gesamtprotein

N-Terminus: Länge des N-Terminus

Glykosylierung: Anzahl Glykosylierungsstellen, alle Glykosylierungsstellen liegen N-terminal; Ausnahme: bei EP2 liegt je eine Glykosylierungsstelle in der 3 und der 4 extrazellulären Domäne.

S-S: potentielle Disulfidbrücke zwischen den extrazellulären Domänen 2 und 3.

Bindung: 0: kein Rezeptorprotein nachweisbar

+: bis zu etwa 400 Rezeptoren pro Zelle nachweisbar

+++ : mehr als 2000 Rezeptoren pro Zelle nachweisbar

Obwohl die Ergebnisse für andere heterolog in *Dictyostelium discoideum* exprimierte Membranproteine aufgrund der völlig anders gearteten Struktur sicher nicht vergleichbar mit denen der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren sind, so ist doch die Arbeit von Zhou und Fambrough (Zhou and Fambrough, 1999) bezüglich Glykosylierung und Proteinstabilität sehr interessant. In dieser Arbeit wurde versucht die Na⁺/ K⁺-ATPase funktionell zu exprimieren. Während die Expression der extrazellulär dreifach glykosylierten β -Untereinheit sowohl alleine als auch nach Kotransformation mit der α -Untereinheit nachgewiesen wurde, war die nicht glykosylierte α -Untereinheit erst nach Kotransformation und Assoziierung mit der β -Untereinheit nachweisbar. Die Autoren zogen den Schluss, dass die primär instabile α -Untereinheit durch die Anwesenheit und Assemblierung der β -Untereinheit stabilisiert wurde. Obwohl aber die Protein-Untereinheiten korrekt glykosyliert und in der richtigen Konformation vorlagen, konnte

letztendlich ein Transport der Na^+/K^+ -ATPase an die äußere Zellmembran und eine Na^+/K^+ -ATPase Aktivität nicht gezeigt werden.

Das Problem der unterschiedlichen Expressierbarkeit von Rezeptor-Subtypen ist allerdings nicht auf *Dictyostelium discoideum* beschränkt, es tritt ist auch bei anderen Expressionssystemen auf. So ließen sich in einer Arbeit zur heterologen Expression von Muskarin-Rezeptoren in Tabak sowohl der Subtyp M1 als auch verschiedene Rezeptor-Chimären zwischen M2- und β -Rezeptoren exprimieren, nicht jedoch der Muskarin-Rezeptor-Subtyp M2, obwohl vergleichbare Mengen an mRNA gebildet wurden (Mu et al., 1997).

4.2 Rezeptor-Effektor-Kopplung

Eine der wichtigsten Voraussetzungen zur Entwicklung eines High-Throughput-Screening-Testsystems ist die Verfügbarkeit eines einfachen, möglichst auch kostengünstigen Detektionssystems. Dieses sollte in der Lage sein, positive von negativen Wirkstoffkandidaten sicher zu unterscheiden. Zur Detektion wird daher häufig eine Farbreaktion herangezogen, die durch einen potenziellen Wirkstoff induziert und dann photometrisch gemessen werden kann. Diese Anordnung steht auch als Grundidee hinter den gewählten Versuchsanordnungen zur Rezeptor-Effektor-Kopplung in dieser Arbeit.

Eine Kopplung der stimulierten Muskarin-Rezeptoren (M1, M2 und M4) konnte nicht gezeigt werden. Ausschlaggebend hierfür dürfte die fehlende ausreichende Bindung der heterolog exprimierten Muskarin-Rezeptoren an die endogenen G-Proteine sein. Bei der Konkurrenz um die Bindung der Rezeptoren an die G-Proteine haben die Muskarin-Rezeptoren gleich einen doppelten Nachteil gegenüber ihren endogenen Konkurrenten (Folat-Rezeptoren und vor allem cAMP-Rezeptoren):

- Zum einen liegt ihre Anzahl um zwei bzw. drei Zehnerpotenzen niedriger als die der gleichzeitig exprimierten homologen Rezeptoren (Milne et al., 1997).
- Zum anderen ist ihre Affinität zu den G-Proteinen vermutlich deutlich geringer. Im Gegensatz zu den G-Proteinen von Säugerzellen lassen sich diejenigen aus *Dictyostelium discoideum* nicht in eine der üblichen Gruppen wie zum Beispiel G_S oder G_Q einteilen. Die acht α -Untereinheiten besitzen eine Homologie von kleiner 50% zu den Untereinheiten der Säugerzellen, die β -Untereinheit besitzt eine Homologie von etwa 70% zu β -Untereinheiten aus Säugerzellen (Parent and Devreotes, 1996).

Eine grundsätzliche Problematik in der Versuchsanordnung mit differenzierenden Zellen, bei der die *Dictyostelium-discoideum*-Zellen auf Phosphatagar aufgebracht und zur Differenzierung über 6 bis 24 Stunden stehen gelassen wurden, ist in der Tatsache zu sehen, dass ein möglicherweise sichtbarer Effekt einer Stimulation der Muskarin-Rezeptoren stets in Konkurrenz zum Effekt von endogen gebildetem cAMP treten müsste. Da nämlich unter den gewählten Versuchsbedingungen *Dictyostelium-discoideum*-Zellen natürlicherweise cAMP bilden, kann ein potenzieller Effekt eines muskarinergen Liganden durch die große Anzahl an cAMP-Rezeptoren überdeckt werden.

Dieser Nachteil sollte jedoch mit Hilfe der Versuchsanordnung mit aggregationskompetenten Zellen, insbesondere in der Variante mit zusätzlicher Transformation des GBF-Plasmides ausgeschlossen werden. Da hier die Zellen in Schüttelkultur gehungert werden und somit kein direkter Zell-Zellkontakt möglich ist, wird auch kein endogenes cAMP zur Stimulierung der cAMP-Rezeptoren als Konkurrenz zu Muskarin gebildet. Zur weiteren Optimierung des letztgenannten Versuchsansatzes wurde dann versucht, mittels Kotransformation der humanen G-Protein-Untereinheit die Affinität des G-Proteins zu dem Muskarin-Rezeptor zu erhöhen.

Um erfolgreich ein High-Throughput-Screening-Testsystem mit transgenen *Dictyostelium-discoideum*-Zellen aufzubauen, müssten noch mindestens drei Punkte optimiert werden..

- Zum ersten müsste die Rezeptoranzahl um den Faktor 10 erhöht werden können, um in etwa die Größenordnung der cAMP-Rezeptoren zu erreichen.
- Zum zweiten benötigte man einen cAR1/ cAR3-Minus-Stamm, um in dem Versuchsansatz mit aggregationskompetenten Zellen mit einer ausreichenden Anzahl an Muskarin-Rezeptoren, aber frei von störenden endogenen Rezeptoren arbeiten zu können.
- Als dritte Maßnahme müsste mit einer humanen G-Protein- α -Untereinheit oder einer chimären Untereinheit gearbeitet werden, alternativ hierzu mit einem chimären Rezeptor.

Hierbei würde es sich dann allerdings um ein höchst artifizielles System handeln, dessen Wert und Brauchbarkeit nicht sicher voraussagbar ist.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das biotechnologische Potenzial des zellulären Schleimpilzes *D. discoideum* in Bezug auf die Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im allgemeinen und von Muskarin-Rezeptoren im besonderen zu untersuchen. Langfristiges Ziel war dabei, mit Hilfe von *Dictyostelium discoideum* ein leicht zugängliches und kostengünstiges Screeningsystem zur Testung potenzieller muskarinerner Liganden zu entwickeln.

Im Rahmen der Arbeit wurden alle humanen Muskarin-Rezeptor-Subtypen M1 bis M5 untersucht. Ausgehend von entsprechenden Expressionsplasmiden für Säugerzellen wurde zunächst mittels PCR die DNA der jeweiligen Rezeptor-Subtypen amplifiziert (Plasmide des Subtyps M2 wurden aus den Arbeiten von Herrn Dr. Guido Voith aus unserer Arbeitsgruppe übernommen). Die DNA wurde dabei zusätzlich mit Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme versehen, die eine nachfolgende Klonierung in Expressionsplasmide für *Dictyostelium discoideum* ermöglichten. Zur Klonierung wurden in erster Linie Expressionsplasmide verwendet, die in der Arbeitsgruppe um D. Manstein entwickelt wurden. Diese Plasmide ermöglichen die Expression der klonierten Gene unter der Kontrolle verschiedener Promotoren. Dies sind zum einen der starke, konstitutive Aktin-15 Promotor und zum anderen der schwache und in gewissen Grenzen regulierbare Discoidin-1 γ Promotor. Außerdem wurde in Expressionsplasmiden der starke und induzierbare Ras-Promotor eingesetzt.

Mit den klonierten Plasmiden wurden dann transgene *Dictyostelium-discoideum*-Stämme erzeugt. Die Stämme wurden zunächst mittels Northern-Blot auf das Vorhandensein und die Transkription der entsprechenden DNA der Muskarin-Rezeptor-Subtypen untersucht. Für alle Muskarin-Rezeptor-Subtypen konnten die jeweiligen Transkripte nachgewiesen werden. Als Nachweis für korrekt in die Zellmembran eingebaute Rezeptormoleküle dienten Bindungsstudien mit dem Radioliganden [3H]-N-Methylscopolamin. Für den humanen Subtyp M5 konnte kein funktionelles Rezeptorprotein nachgewiesen werden, unabhängig von der Art des Expressionsplasmides oder des verwendeten *D.-discoideum*-Stammes. Die funktionelle Expression der Rezeptoren M1, M3 und M4 konnte bei den beiden axenischen Stämmen AX2 und AX3 nachgewiesen werden. Bei Plasmiden mit Aktin-15-Promotor, welche zusätzlich zum Rezeptorgen eine *Dictyostelium discoideum* eigene Signalsequenz

zwischen Promotor-DNA und Rezeptor-DNA enthielten, wurden etwa 300 Rezeptoren pro Zelle für M1 und M4 gefunden. In Abhängigkeit vom verwendeten Plasmid konnten für M3 etwa 200 bis 7000 Rezeptoren pro Zelle nachgewiesen werden.

Parallel zu den Radioliganden-Bindungsstudien wurde mit den Rezeptor-Subtypen M1, M2 und M4 am Aufbau von Assays gearbeitet, mit denen eine mögliche Kopplung zwischen stimuliertem Rezeptor und endogenen G-Proteinen nachgewiesen werden könnte. Zum einen wurde untersucht, ob die Stimulation der Muskarin-Rezeptoren zu einer Polymerisation von Aktin-Filamenten führt, wie dies durch den endogenen Liganden cAMP geschieht. Zum anderen wurde durch mehrfach transformierte *D. discoideum*-Stämme, die neben dem Rezeptorgen noch das β -Galaktosidasegen als Reportergen, die α -Untereinheit eines humanen G-Proteins und einen endogenen Transkriptionsfaktor exprimierten untersucht, ob durch Stimulation der Muskarin-Rezeptoren eine Expression des Rezeptorgens induziert werden kann. Diese wäre dann in einem automatisierbaren Testsystem über Messung der β -Galaktosidaseaktivität leicht nachweisbar. Als Variante dieses Testsystem wurde schließlich der von Joachim Tillner (Tillner, 1997) bereits zur Untersuchung teratogener Stoffeigenschaften verwendete Versuchsaufbau herangezogen. In keinem der verwendeten Assays konnte jedoch eine Kopplung von fremd exprimiertem Rezeptor an endogene G-Protein-vermittelte Signaltransduktionswege nachgewiesen werden.

Als mögliche Gründe für diese Ergebnisse wurden folgende Punkte diskutiert:

Zum einen sind die in unserem Expressionssystem erreichbaren Rezeptorzahlen von 300 bis 7000 heterolog exprimierten Rezeptoren pro Zelle vermutlich zu gering im Vergleich zu den um zwei Zehnerpotenzen höher liegenden endogenen Rezeptoren, zum anderen sind die Säugerzellen evolutionär wahrscheinlich zu weit von *D. discoideum* entfernt, als dass eine effektive Wechselwirkung des stimulierten Rezeptors mit der Zelle stattfinden kann.

Dictyostelium discoideum hat sich daher als kaum geeignetes Testsystem zur Untersuchung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aus Säugern herausgestellt. Ich möchte daher am Ende dieser Zusammenfassung noch aus dem Paper von Zhou und Fambrough zitieren, da die dort gemachten Angaben auch für diese Arbeit gültig sind:

„During the course of our studies we learned of a number of unsuccessful attempts to express membrane proteins in Dictyostelium. However, to our knowledge, none of these has been reported in the literature. It is hoped that the observations reported here will be useful to those who are contemplating or involved in similar studies“ (Zhou and Fambrough, 1999).

6 Literatur

- Abe, K. and Yanagisawa, K.:** A new class of rapid developing mutants in *Dictyostelium discoideum*: Implications for cyclic AMP metabolism and cell differentiation. *Dev. Biol.* 95 (1983) 200-210.
- Angata, K., Kuroe, K., Yanagisawa, K. and Tanaka, Y.:** Codon usage, genetic code and phylogeny of *Dictyostelium discoideum* mitochondrial DNA as deduced from a 7.3-kb region. *Curr. Genet.* 27 (1995) 249-256.
- Asgari, S., Slade, M., Wheldrake, J. and Williams, K.:** Expression of human insulin-like growth factor binding protein 6 (hIGFBP6) in *Dictyostelium discoideum*. (1998) .
- Ashworth, J.M. and Watts, D.J.:** Metabolism of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* grown in axenic culture. *Biochem. J.* 119 (1970) 175-182.
- Aubry, L. and Firtel, R.:** Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15 (1999) 469-517.
- Baldauf, S.L. and Doolittle, W.F.:** Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 12007-12012.
- Behr, J., Haase, W., Maul, G., Vasudevan, S. and Reilander, H.:** Effect of N-glycosylation on production of the rat m3 muscarinic acetylcholine receptor in baculovirus-infected insect cells. *Biochem Soc Trans* 26 (1998) 704-709.
- Berks, M., Traynor, D., Carrin, I., Insall, R.H. and Kay, R.R.:** Diffusible signal molecules controlling cell differentiation and patterning in *Dictyostelium*. *Development Suppl.* 1 (1991) 131-139.
- Bourne, H.R.:** How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9 (1997) 134-142.
- Brefeld, O.:** *Dictyostelium mucoroides*. Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft Frankfurt* 7 (1869) 85-107.
- Brink, M., Gerisch, G., Isenberg, G., Noegel, A.A., Segall, J.E., Wallraff, E. and Schleicher, M.:** A *Dictyostelium* mutant lacking an F-actin cross-linking protein, the 120-kD gelation factor. *J. Cell Biol.* 111 (1990) 1477-1489.
- Brown, J.M. and Firtel, R.A.:** Regulation of cell-fate determination in *Dictyostelium*. *Dev. Biol.* 216 (1999) 426-441.

- Burstein, E.S., Spalding, T.A. and Brann, M.R.:** The second intracellular loop of the m5 muscarinic receptor is the switch which enables G-protein coupling. *J Biol Chem* 273 (1998a) 24322-27.
- Burstein, E.S., Spalding, T.A. and Brann, M.R.:** Structure/ function relationships of a G-protein coupling pocket formed by the third intracellular loop of the m5 muscarinic receptor. *Biochemistry* 37 (1998b) 4052-58.
- Caulfield, M.P. and Birdsall, N.J.M.:** International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50 (1998) 279-290.
- Chaumont, F., Loomis, W.F. and Chrispeels, M.J.:** Expression of an Arabidopsis plasma membrane aquaporin in Dictyostelium results in hypoosmotic sensitivity and developmental abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 6202-6209.
- Chen, M.Y., Insall, R.H. and Devreotes, P.N.:** Signaling through chemoattractant receptors in Dictyostelium. *Trends Genet. (TIG)* 12 (1996) 52-57.
- Chen, P.X., Chaudoir, B.M., Trybus, K.M. and Chisholm, R.L.:** Expression of chicken gizzard RLC complements the cytokinesis and developmental defects of Dictyostelium RLC null cells. *J Muscle Res Cell Motil* 20 (1999) 177-186.
- Clarke, M. and Gomer, R.H.:** PSF and CMF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of Dictyostelium. *Experientia* 51 (1995) 1124-1134.
- Cohen, N.R., Knecht, D.A. and Lodish, H.F.:** Functional expression of rat GLUT 1 glucose transporter in Dictyostelium discoideum. *Biochem. J.* 315 (1996) 971-975.
- Cotter, D.A., Sands, T.W., Viridy, K.J., North, M.J., Klein, G. and Satre, M.:** Patterning of development in Dictyostelium discoideum - Factors regulating growth, differentiation, spore dormancy, and germination. *Biochem. Cell Biol.* 70 (1992) 892-919.
- Cubitt, A.B., Reddy, I., Lee, S., McNally, J.G. and Firtel, R.A.:** Coexpression of a constitutively active plasma membrane calcium pump with GFP identifies roles for intracellular calcium in controlling cell sorting during morphogenesis in Dictyostelium. *Dev. Biol.* 196 (1998) 77-94.
- Devreotes, P.N.:** G protein-linked signaling pathways control the developmental program of Dictyostelium. *Neuron* 12 (1994) 235-241.

- Dingermann, T., Reindl, N., Werner, H., Hildebrandt, M., Nellen, W., Harwood, A., Williams, J. and Nerke, K.:** Optimization and in situ detection of Escherichia coli beta-galactosidase gene expression in Dictyostelium discoideum. *Gene* 85 (1989) 353-362.
- Dingermann, T., Troidl, E.M., Broker, M. and Nerke, K.:** Expression of human antithrombin-III in the cellular slime mould Dictyostelium discoideum. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35 (1991) 496-503.
- Dittrich, W., Williams, K.L. and Slade, M.B.:** Production and secretion of recombinant proteins in Dictyostelium discoideum. *Biotechnol.* 12 (1994) 614-618.
- Dong, G.Z., Kameyama, K., Rinken, A. and Haga, T.:** Ligand Binding Properties of Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtypes (m1-m5) Expressed in Baculovirus-Infected Insect Cells. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 274 (1995) 378-384.
- Dörje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E. and Brann, M.:** Antagonist Binding Profiles of Five Cloned Human Muscarinic Receptor Subtypes. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 256 (1991) 727-733.
- Dynes, J.L., Clark, A.M., Shaulsky, G., Kuspa, A., Loomis, W.F. and Firtel, R.A.:** LagC is required for cell-cell interactions that are essential for cell-type differentiation in Dictyostelium. *Genes Devel.* 8 (1994) 948-958.
- Early, A.:** Signalling pathways that direct prestalk and stalk cell differentiation in Dictyostelium. *Sem. Cell Dev. Biol.* 10 (1999) 587-595.
- Early, A.E., Gaskell, M.J., Traynor, D. and Williams, J.G.:** Two distinct populations of prestalk cells within the tip of the migratory Dictyostelium slug with differing fates at culmination. *Development* 118 (1993) 353-362.
- Early, A.E. and Williams, J.G.:** Two vectors which facilitate gene manipulation and a simplified transformation procedure for Dictyostelium discoideum. *Gene* 59 (1987) 99-106.
- Early, V.E. and Williams, J.G.:** A Dictyostelium prespore-specific gene is transcriptionally repressed by DIF in vitro. *Development* 103 (1988) 519-524.
- Egelhoff, T.T., Brown, S.S., Manstein, D.J. and Spudich, J.A.:** Hygromycin resistance as a selectable marker in Dictyostelium discoideum. *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 1965-1968.
- Eglen, R.M., Choppin, A., Dillon, M.P. and Hegde, S.:** Muscarinic receptor ligands and their therapeutic potential. *Curr Opin Chem Biol* 3 (1999) 426-432.

- Eglen, R.M. and Watson, N.:** Selective muscarinic receptor agonists and antagonists. *Pharmacol Toxicol* 78 (1996) 59-68.
- Ehlert, F., Sawyer, G. and Esqueda, E.:** Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal smooth muscle. *Life Sci* 64 (1999) 387-394.
- Ellis, J.:** Allosteric binding sites on muscarinic receptors. *Drug Develop Res* 40 (1997) 193-204.
- Emslie, K.R., Coukell, M.B., Birch, D. and Williams, K.L.:** Calcium influences the stability and conformation of rotavirus SA11 glycoprotein VP7 expressed in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biotechnol.* 50 (1996) 149-159.
- Emslie, K.R., Miller, J.M., Slade, M.B., Dormitzer, P.R., Greenberg, H.B. and Williams, K.L.:** Expression of the rotavirus SA11 protein VP7 in the simple eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *J. Virol.* 69 (1995) 1747-1754.
- Fasel, N., Begdadirais, C., Bernard, M., Bron, C., Corradin, G. and Reymond, C.D.:** *Dictyostelium discoideum* as an expression host for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Gene* 111 (1992) 157-163.
- Felder, C.C.:** Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB* 9 (1995) 619-625.
- Firtel, R.A.:** Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in *Dictyostelium*. *Genes Devel.* 9 (1995) 1427-1444.
- Firtel, R.A.:** Interacting signaling pathways controlling multicellular development in *Dictyostelium*. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 6 (1996) 545-554.
- Freeze, H.H.:** Developmental glycobiology of *Dictyostelium discoideum*. In: Cell surface carbohydrates and cell development, M. Fukuda, ed CRC Press, Boca Raton, FL., 285-317. (1992) .
- Friebe, T.P., Mutschler, E. and Lambrecht, G.:** Muskarinrezeptor-Subtypen: Pharmakologische Charakterisierung, molekulare Struktur, Lokalisation, Funktion und Rezeptor-Effektor-Kopplung. *PZ-Wissenschaft* 138 (1993) 3-11.
- Gaskins, C., Maeda, M. and Firtel, R.A.:** Identification and functional analysis of a developmentally regulated extracellular signal-regulated kinase gene in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 6996-7012.
- Ginsburg, G.T. and Kimmel, A.R.:** Autonomous and nonautonomous regulation of axis formation by antagonistic signaling via 7-span cAMP receptors and GSK3 in *Dictyostelium*. *Genes Devel.* 11 (1997) 2112-2123.

- Gomez, J., Zhang, L., Kostenis, E., Felder, C., Bymaster, F., Brodin, J., Shannon, H., Xia, B., Deng, C. and Wess, J.:** Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 10483-10488.
- Greiner, R.A., Jacobskrahnen, D., Mutzel, R., Malchow, D. and Wurster, B.:** A 138-kDa glycoprotein from Dictyostelium membranes with folate deaminase and folate binding activity. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 5096-5101.
- Grimm, U., Moser, U., Mutschler, E. and Lambrecht, G.:** Muscarinic receptors: focus on presynaptic mechanisms and recently developed novel agonists and antagonists. *Pharmazie* 49 (1994) 711-726.
- Gross, J.D.:** Developmental decisions in Dictyostelium discoideum. *Microbiol. Rev.* 58 (1994) 330-351.
- Hadwiger, J.A., Lee, S. and Firtel, R.A.:** The G(alpha) subunit G(alpha)4 couples to pterin receptors and identifies a signaling pathway that is essential for multicellular development in Dictyostelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 10566-10570.
- Hadwiger, J.A., Wilkie, T.M., Strathmann, M. and Firtel, R.A.:** Identification of Dictyostelium Galpha genes expressed during multicellular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 8213-8217.
- Hedge, S. and Eglon, M.:** Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. *Life Sci* 64 (1999) 417428.
- Heikoop, J.C., Grootenhuis, P.D.J., Blaauw, M., Veldema, J.S., van Haastert, P.J.M. and Linskens, M.H.K.:** Expression of a bioactive, single-chain choriogonadotropin in Dictyostelium discoideum. *Eur. J. Biochem.* 256 (1998) 359-363.
- Hjorth, A.L., Khanna, N.C. and Firtel, R.A.:** A trans-acting factor required for cAMP-induced gene expression in Dictyostelium is regulated developmentally and induced by cAMP. *Genes Develop.* 3 (1989) 747-759.
- Hjorth, A.L., Pears, C., Williams, J.G. and Firtel, R.A.:** A developmentally regulated trans-acting factor recognizes dissimilar G/C-rich elements controlling a class of cAMP-inducible Dictyostelium genes. *Genes Devel.* 4 (1990) 419-432.
- Howard, P.K., Ahern, K.G. and Firtel, R.A.:** Establishment of a transient expression system for Dictyostelium discoideum. *Nucl. Acids Res.* 16 (1988) 2613-2623.

- Howard, P.K., Gamper, M., Hunter, T. and Firtel, R.A.:** Regulation by protein-tyrosine phosphatase PTP2 is distinct from that by PTP1 during *Dictyostelium* growth and development. *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 5154-5164.
- Howard, P.K., Sefton, B.M. and Firtel, R.A.:** Analysis of a spatially regulated phosphotyrosine phosphatase identifies tyrosine phosphorylation as a key regulatory pathway in *Dictyostelium*. *Cell* 71 (1992) 637-647.
- Hulme, E.C., Lu, Z.L., Ward, S.D.C., Allman, K. and Curtis, C.A.M.:** The conformational switch in 7-transmembrane receptors: the muscarinic receptor paradigm. *Eur J Pharmacol* 375 (1999) 247-260.
- Insall, R., Kuspa, A., Lilly, P.J., Shaulsky, G., Levin, L.R., Loomis, W.F. and Devreotes, P.:** CRAC, a cytosolic protein containing a pleckstrin homology domain, is required for receptor and G protein-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 126 (1994a) 1537-1545.
- Insall, R.H., Soede, R.D.M., Schaap, P. and Devreotes, P.N.:** Two cAMP receptors activate common signaling pathways in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell* 5 (1994b) 703-711.
- Jakubik, J., Bacakova, L., Lisa, V., Elfakahany, E.E. and Tucek, S.:** Activation of muscarinic acetylcholine receptors via their allosteric binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 8705-8709.
- Jenkins, N.P., R., und James, D:** Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nature Biotechnology* 14 (1996) 975-981.
- Jermyn, K.A., Duffy, K.T. and Williams, J.G.:** A new anatomy of the prestalk zone in *Dictyostelium*. *Nature* 340 (1989) 144-146.
- Jermyn, K.A. and Williams, J.G.:** An analysis of culmination in *Dictyostelium* using prestalk and stalk-specific cell autonomous markers. *Development* 111 (1991) 779-787.
- Jones, S.V.P., Levey, A.I., Weiner, D.M., Ellis, J., Novotny, E., Yu, S., Dörje, F., Wess, J. and Brann, M.R.:** Muscarinic Acetylcholine Receptors. In: Brann, M.R. (Ed.), *Molecular biology of G-protein coupled receptors*, 1992, pp. 170-197.
- Jung, E., Gooley, A.A., Packer, N.H., Karuso, P. and Williams, K.L.:** Rules for the addition of O-linked N-acetylglucosamine to secreted proteins in *Dictyostelium discoideum* - In vivo studies on glycosylation of mucin MUC1 and MUC2 repeats. *Eur. J. Biochem.* 253 (1998) 517-524.

- Jung, E., Gooley, A.A., Packer, N.H., Slade, M.B., Williams, K.L. and Dittrich, W.:** An in vivo approach for the identification of acceptor sites for O-glycosyltransferases: Motifs for the addition of O-GlcNAc in *Dictyostelium discoideum*. *Biochemistry* 36 (1997) 4034-4040.
- Karakesisoglou, I., Schleicher, M., Gibbon, B.C. and Staiger, C.J.:** Plant profilins rescue the aberrant phenotype of profilin- deficient *Dictyostelium* cells. *Cell. Motil. Cytoskel.* 34 (1996) 36-47.
- Kim, J.Y., Borleis, J.A. and Devreotes, P.N.:** Switching of chemoattractant receptors programs development and morphogenesis in *Dictyostelium*: Receptor subtypes activate common responses at different agonist concentrations. *Dev Biol* 197 (1998) 117-128.
- Kostenis, E., Degtyarev, M.Y., Conklin, B.R. and Wess, J.:** The N-terminal extension of G alpha(q) is critical for constraining the selectivity of receptor coupling. *J Biol Chem* 272 (1997a) 19107-19110.
- Kostenis, E., Gomeza, J., Lerche, C. and Wess, J.:** Genetic analysis of receptor-G alpha(q) coupling selectivity. *J Biol Chem* 272 (1997b) 23675-23681.
- Kostenis, E., Zeng, F.Y. and Wess, J.:** Functional characterization of a series of mutant G protein alpha(q) subunits displaying promiscuous receptor coupling properties. *J Biol Chem* 273 (1998a) 17886-17892.
- Kostenis, E., Zeng, F.Y. and Wess, J.:** Structure-function analysis of muscarinic acetylcholine receptors. *J Physiology Paris* 92 (1998b) 265-268.
- Kostenis, E., Zeng, F.Y. and Wess, J.:** Structure-function analysis of muscarinic receptors and their associated G proteins. *Life Sci* 64 (1999) 355-362.
- Kumagai, A., Pupillo, M., Gundersen, R., Miake-Lye, R., Devreotes, P.N. and Firtel, R.A.:** Regulation and function of Galpha protein subunits in *Dictyostelium*. *Cell* 57 (1989) 265-275.
- Kuschnick, C.:** Der niederere Eukaryont *Dictyostelium discoideum* als alternatives Expressionssystem eines *in vitro* synthetisierten *Proteinase K* Gens und zweier artifiziereller *Pseudomonas aeruginosa*-Antigene. Dissertation, Frankfurt am Main (1999) 25ff.
- Kuschnick, C., Müller, I., Winckler, T. and Dingermann, T.:** Expression of native artificial *Pseudomonas aeruginosa* antigens in the lower eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *Pharmazie* 53 (1998) 25ff.

- Kuspa, A., Dingermann, T. and Nellen, W.:** Analysis of gene function in Dictyostelium. *Experientia* 51 (1995) 1116-1123.
- Laemmli, U.K.:** Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.
- Leiting, B. and Noegel, A.A.:** The ble gene of *Streptoalloteichus hindustanus* as a new selectable marker for *Dictyostelium discoideum* confers resistance to phleomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180 (1991) 1403-1407.
- Lilly, P., Wu, L.J., Welker, D.L. and Devreotes, P.N.:** A G-protein beta-subunit is essential for *Dictyostelium* development. *Genes Devel.* 7 (1993) 986-995.
- Lilly, P.J. and Devreotes, P.N.:** Identification of CRAC, a cytosolic regulator required for guanine nucleotide stimulation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 14123-14129.
- Linskens, M.H.K., Grootenhuis, P.D.J., Blaauw, M., HuismanDeWinkel, B., VanRavestein, A., VanHaastert, P.J.M. and Heikoop, J.C.:** Random mutagenesis and screening of complex glycoproteins: expression of human gonadotropins in *Dictyostelium discoideum*. *Faseb J* 13 (1999) 639-645.
- Loomis, W.F.:** The development of *Dictyostelium discoideum*. Ac. Press, New York, 1982.
- Loomis, W.F.:** Genetic networks that regulate development in *Dictyostelium* cells. *Microbiol. Rev.* 60 (1996) 135.
- Loomis, W.F. and Kuspa, A.:** The genome of *Dictyostelium discoideum*. In: Maeda, Y., Inouye, K. and Takeuchi, I. (Eds.), *Dictyostelium - A model system for cell and developmental biology*. Universal Academy Press, Tokyo, Japan, 1997, pp. 15-30.
- Loomis, W.F. and Smith, D.W.:** Molecular phylogeny of *Dictyostelium dscoideum* by protein sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 9093-9097.
- Loomis, W.F. and Smith, D.W.:** Consensus phylogeny of *Dictyostelium*. *Experientia* 51 (1995) 1110-1115.
- Louis, J.M., Ginsburg, G.T. and Kimmel, A.R.:** The cAMP receptor CAR4 regulates axial patterning and cellular differentiation during late development of *Dictyostelium*. *Genes Devel.* 8 (1994) 2086-2096.
- Maeda, M., Aubry, L., Insall, R., Gaskins, C., Devreotes, P.N. and Firtel, R.A.:** Seven helix chemoattractant receptors transiently stimulate mitogen-activated protein kinase in *Dictyostelium* - Role of heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 3351-3354.

- Manstein, D.J., Schuster, H.P., Morandini, P. and Hunt, D.M.:** Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene* 162 (1995) 129-134.
- McRobbie, S.J. and Newell, P.C.:** Changes in actin associated with cytoskeleton following chemotactic stimulation of *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115 (1983) 351-359.
- Mehta, D.P., Etchison, J.R. and Freeze, H.H.:** Characterization, subcellular localization, and developmental regulation of a cysteine proteinase from *Dictyostelium discoideum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 321 (1995) 191-198.
- Meima, M.E. and Schaap, P.:** Fingerprinting of adenylyl cyclase activities during *Dictyostelium* development indicates a dominant role for adenylyl cyclase B in terminal differentiation. *Develop Biol* 212 (1999) 182-190.
- Milne, J.L.S., Caterina, M.J. and Devreotes, P.N.:** Random mutagenesis of the cAMP chemoattractant receptor, cAR1, of *Dictyostelium* - Evidence for multiple states of activation. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 2069-2076.
- Milne, J.L.S., Wu, L.J., Caterina, M.J. and Devreotes, P.N.:** Seven helix cAMP receptors stimulate Ca²⁺ entry in the absence of functional G proteins in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5926-5931.
- Mu, J.H., Chua, N.H. and Ross, E.M.:** Expression of human muscarinic cholinergic receptors in tobacco. *Plant Mol Biol* 34 (1997) 357-362.
- Murthy, K.S. and Makhlof, G.M.:** Differential coupling of muscarinic m(2) and m(3) receptors to adenylyl cyclases V/VI in smooth muscle. *J Biol Chem* 272 (1997) 21317-21324.
- Mutschler, E., Moser, U., Wess, J. and Lambrecht, G.:** Muscarinic receptor subtypes- pharmacological, molecular biological and therapeutical aspects. *Pharm Acta Helv* 69 (1995) 243-258.
- Mutzel, R.:** Molecular biology, growth and development of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Experientia* 51 (1995) 1166-1174.
- Neer, E.J.:** Intracellular signalling: Turning down G-protein signals. *Curr Biol* 7 (1997) R31-R33.
- Nellen, W. and Firtel, R.A.:** High-copy-number transformants and co-transformation in *Dictyostelium*. *Gene* 39 (1985) 155-163.

- Nellen, W., Silan, C. and Firtel, R.A.:** DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol. Cell. Biol.* 4 (1984) 2890-2898.
- Noegel, A., Gerisch, G., Stadler, J. and Westphal, M.:** Complete sequence and transcript regulation of a cell adhesion protein from aggregating *Dictyostelium* cells. *EMBO J.* 5 (1986) 1473-1476.
- Noegel, A.A. and Luna, J.E.:** The *Dictyostelium* cytoskeleton. *Experientia* 51 (1995) 1135-1143.
- Parent, C.A. and Devreotes, P.N.:** Molecular genetics of signal transduction in *Dictyostelium*. *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996) 411-440.
- Pears, C.J., Mahbubani, H.M. and Williams, J.G.:** Characterization of two highly diverged but developmentally coregulated cysteine proteinases in *Dictyostelium discoideum*. *Nucl. Acids Res.* 13 (1985) 8853-8866.
- Pitt, G.S., Milona, N., Borleis, J., Lin, K.C., Reed, R.R. and Devreotes, P.N.:** Structurally distinct and stage-specific adenylyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development. *Cell* 69 (1992) 305-315.
- Prasher, D.C.:** Using GFP to see the light. *Trends Genet* 11 (1995) 320-323.
- Presse, F., Bogdanovsky-Sequeval, D., Mathieu, M. and Felenbok, B.:** Analysis of the expression of two genes of *Dictyostelium discoideum* which code for developmentally regulated cysteine proteinases. *Mol. Gen. Genet.* 203 (1986) 333-340.
- Pupillo, M., Kumagai, A., Pitt, G.S., Firtel, R.A. and Devreotes, P.N.:** Multiple alpha subunits of guanine nucleotide-binding proteins in *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 4892-4896.
- Raper, K.B.:** *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* 50 (1935) 135-147.
- Rathi, A., Kayman, S.C. and Clarke, M.:** Induction of gene expression in *Dictyostelium* by prestarvation factor, a factor secreted by growing cells. *Dev. Genet.* 12 (1991) 82-87.
- Reymond, C.D., Beghdadirais, C., Roggero, M., Duarte, E.A., Desponds, C., Bernard, M., Groux, D., Matile, H., Bron, C., Corradin, G. and Fasel, N.J.:** Anchoring of an immunogenic *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein on the surface of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 12941-12947.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.:** Molecular cloning: A laboratory manual, ,, 2nd Edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,, New York, 1989.
- Saxe III, C.L., Ginsburg, G.T., Louis, J.M., Johnson, R., Devreotes, P.N. and Kimmel, A.R.:** CAR2, a prestalk cAMP receptor required for normal tip formation and late development of *Dictyostelium discoideum*. *Genes Devel.* 7 (1993) 262-272.
- Schmidt, H.:** Expression des renalen V2-Rezeptors aus dem Schwein in den zellulären Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*. Dissertation, Frankfurt am Main (1999) .
- Schnitzler, G.R., Briscoe, C., Brown, J.M. and Firtel, R.A.:** Serpentine cAMP receptors may act through a G protein-independent pathway to induce postaggregative development in *Dictyostelium*. *Cell* 81 (1995) 737-745.
- Schnitzler, G.R., Fischer, W.H. and Firtel, R.A.:** Cloning and characterization of the G-box binding factor, an essential component of the developmental switch between early and late development in *Dictyostelium*. *Genes Devel.* 8 (1994) 502-514.
- Segall, J.E., Kuspa, A., Shaulsky, G., Ecke, M., Maeda, M., Gaskins, C. and Firtel, R.A.:** A MAP kinase necessary for receptor-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 128 (1995) 405-413.
- Shaulsky, G. and Loomis, W.F.:** Mitochondrial DNA replication but no nuclear DNA replication during development of *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 5660-5663.
- Slade, M.B., Emslie, K.R. and Williams, K.L.:** Expression of recombinant glycoproteins in the simple eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *Biotechnol. Genetic Engin. Rev.* 14 (1997) 1-35.
- Spalding, T.A., Burstein, E.S., Henderson, S.C., Ducote, K.R. and Brann, M.R.:** Identification of a ligand-dependent switch within a muscarinic receptor. *J Biol Chem* 273 (1998) 21563-21568.
- Spudich, J.:** Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non-muscle cells. 2. Purification, properties and membrane association of actin from amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 6013-6020.
- Stratford, C.A. and Brown, S.S.:** Isolation of an actin-binding protein from membranes of *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* 100 (1985) 727-735.

- Sukumaran, S., Brown, J.M., Firtel, R.A. and McNally, J.G.:** lagC-null and gbf-null cells define key steps in the morphogenesis of Dictyostelium mounds. *Dev Biol* 200 (1998) 16-26.
- Sussman, R. and Sussman, M.:** Cultivation of Dictyostelium discoideum in axenic culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29 (1967) 53-55.
- Thal, L., Forrest, M., Loft, H. and H, M.:** Lu 25-109, a muscarinic agonist, fails to improve cognition in Alzheimer's disease. Lu25-109 Study Group. *Neurology.* 54 (2000) 421-426.
- Tillner, J.:** Der zelluläre Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* als Testsystem für teratogene Arzneistoffe. Dissertationsverlag NG Kopierladen GmbH, München, 1997.
- Tillner, J., Nau, H., Winckler, T. and Dingermann, T.:** Evaluation of the teratogenic potential of valproic acid analogues in transgenic Dictyostelium discoideum strains. *Toxicol. in Vitro* 12 (1998) 463-469.
- Tillner, J., Winckler, T. and Dingermann, T.:** Developmentally regulated promoters from Dictyostelium discoideum as molecular markers for testing potential teratogens. *Pharmazie* 51 (1996) 902-906.
- Town, C.D., Gross, J.D. and Kay, R.R.:** Cell differentiation without morphogenesis in Dictyostelium discoideum. *Nature* 262 (1976) 717-719.
- Trombetta, E.S. and Helenius, A.:** Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol* 8 (1998) 587-592.
- Tucek, S. and Proska, J.:** Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *TiPS* 16 (1995) 205-212.
- van Bemmelen, M., Beghdadi-Rais, C., Desponds, C., Vargas, E., Herrera, S., Reymond, C.D. and Fasel, N.J.:** Expression and one-step purification of Plasmodium proteins in dictyostelium. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111 (2000) 377-390.
- Verkerke van Wijk, I., Kim, J.Y., Brandt, R., Devreotes, P.N. and Schaap, P.:** Functional promiscuity of gene regulation by serpentine receptors in Dictyostelium discoideum. *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 5744-5749.
- Vervoort, E.B., van Ravestein, A., van Peij, N.N.M.E., Heikoop, J.C., van Haastert, O.J.M., Verheijden, G.F. and Linskens, M.H.K.:** Optimizing heterologous expression in Dictyostelium: importance of 5' codon adaptation. *Nucl. Acids Res.* 28 (2000) 2069-2074.

- Voith, G.:** Expression muskarinenger Acetylcholinrezeptoren in *Dictyostelium discoideum*. Dissertation. Shaker Verlag, Aachen (1996) .
- Voith, G. and Dingermann, T.:** Expression of CSA-hm2 fusion in Dictyostelium discoideum under the control of the Dictyostelium ras promoter reveals functional muscarinic receptors. Pharmazie 50 (1995a) 758-762.
- Voith, G. and Dingermann, T.:** Expression of the human muscarinic receptor gene M2 in Dictyostelium discoideum. Biotechnol. 13 (1995b) 1225-1229.
- Voith, G., Kramm, H., Zundorf, I., Winkler, T. and Dingermann, T.:** Expression of the rat muscarinic receptor gene m3 in Dictyostelium discoideum. Pharmazie 53 (1998) 707-710.
- Walter, J.:** Expression humaner Prostaglandin-E2-Rezeptoren in *Dictyostelium discoideum*. Dissertation, Frankfurt am Main (1999) .
- Watts, D.J. and Ashworth, J.M.:** Growth of myxamoebae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture. Biochem. J. 119 (1970) 171-174.
- Wess, J.:** Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. TiPS 14 (1993) 308-313.
- Wess, J.:** Molecular biology of muscarinic actylcholine receptors. Crit Rev Neurobiol 10 (1996) 69-99.
- Wess, J.:** G-protein-coupled receptors: Molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. FASEB J 11 (1997) 346-354.
- Wess, J.:** Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. Pharmacol Ther 80 (1998) 231-264.
- Wess, J. and al., e.:** Sructural basis of receptor/G Protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model systems. Life Sci 60 (1997) 1007-101462.
- Wetterauer, B., Jacobsen, G., Morandini, P. and MacWilliams, H.:** Mutants of Dictyostelium discoideum with defects in the regulation of discoidin-I expression. Dev. Biol. 159 (1993a) 184-195.
- Wetterauer, B.W., Salger, K. and MacWilliams, H.K.:** Use of a transactive regulatory mutant of Dictyostelium discoideum in a eucaryotic expression system. Nucl. Acids Res. 21 (1993b) 1397-1401.
- Williams, J.G.:** Regulation of cellular differentiation during Dictyostelium morphogenesis. Curr. Opin. Genet. Devel. 1 (1991) 358-362.

- Williams, K.L. and al., e.:** Recombinant glycoprotein production in the slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Curr opin Biotechnol* 6 (1995) 538-542.
- Wilson, I., Slade, M., Coukell, B. and Williams, K.:** Expression, purification and characterization of human IgE Receptor in *Dictyostelium discoideum*. International *Dictyostelium* meeting 1998; Irsee, Germany (1998) .
- Wu, L.J. and Devreotes, P.N.:** *Dictyostelium* transiently expresses eight distinct G-protein alpha-subunits during its developmental program. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179 (1991) 1141-1147.
- Wu, L.J., Gaskins, C., Zhou, K.M., Firtel, R.A. and Devreotes, P.N.:** Cloning and targeted mutations of Galpha7 and Galpha8, two developmentally regulated G protein alpha-subunit genes in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell* 5 (1994) 691-702.
- Wu, L.J., Valkema, R., van Haastert, P.J.M. and Devreotes, P.N.:** The G protein beta subunit is essential for multiple responses to chemoattractants in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 129 (1995) 1667-1675.
- Yoshida, M., Fuse, G., Matsui, T. and Ouchi, S.:** Identification of sialic acids in cell adhesion molecule, contact site A from *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188 (1992) 794-798.
- Yoshida, M., Yokota, S. and Ouchi, S.:** Characterization and distribution of O-glycosylated carbohydrates in the cell adhesion molecule, contact site A, from *Dictyostelium discoideum*. *Exp. Cell Res.* 230 (1997) 393-398.
- Yuen, I.S., Jain, R., Bishop, J.D., Lindsey, D.F., Deery, W.J., van Haastert, P.J.M. and Gomer, R.H.:** A density-sensing factor regulates signal transduction in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 129 (1995) 1251-1262.
- Zhou, X. and Fambrough, D.M.:** Expression of the avian Na,K-ATPase subunits in *Dictyostelium discoideum*. *J Membrane Biol* 167 (1999) 19-24.
- Zigmond, S.H., Joyce, M., Borleis, J., Bokoch, G.M. and Devreotes, P.N.:** Regulation of actin polymerization in cell-free systems by GTPgammaS and Cdc42. *J. Cell Biol.* 138 (1997) 363-374.
- Zündorf, I.:** Charakterisierung von Promotorelementen in *Dictyostelium discoideum* zur Expression der menschlichen Serumproteine Antithrombin III und α 1-Antitrypsin, Dissertation. Dissertation. Shaker Verlag, Aachen (1995) .

7 Lebenslauf und Publikationen

Persönliche Daten:	Name:	Holger Kramm
	geboren am:	06.01.1966 in Limburg an der Lahn
	Eltern:	Erich Kramm, Architekt Maria Kramm, geb. Stillger, Hausfrau
Schulbildung:	1972 - 1976	Grundschule Niederbrechen
	1976 - 1985	Tilemannschule Limburg Abschluß: allgemeine Hochschulreife
Zivildienst:	12/1985 - 07/1987	Altenpflegehelfer in Limburg
Studium:	08/1987 - 03/1991	Musik- und Musikwissenschaft in Detmold/ Paderborn und Frankfurt Abschluß: Grundstudium
	04/1991 - 04/1995	Pharmazie in Frankfurt am Main Abschluß: 2. Staatsexamen
Praktika:	05/1995 - 10/1995	Amtsapotheke Diez
	11/1995 - 04/1996	Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Frankfurt am Main
	06/1996	Approbation als Apotheker
Dissertation:	11/1995 - 10/1998	Stipendiat der DFG im Rahmen des Graduiertenkollegs Arzneimittel: Entwicklung und Analytik
	11/1998 - 09/1999	wissenschaftlicher Angestellter an der Universität Frankfurt am Main Betreuung: Prof. Dr. Th. Dingermann
Beruflicher Werdegang:	seit 10/1999	Eintritt als Betriebsassistent im Bereich Fertigung Frankfurt der HMR Deutschland GmbH, heute Aventis Pharma Deutschland GmbH
	seit 10/2001	Meldung als Herstellungsleiter für den Bereich Fertigungsprozesseinheit Liquida I, Insuline und Sterile Mehrfachentnahmeflaschen
Akademische Lehrer:	G. Dannhardt, Th. Dingermann, H. Hoffmann, H. Linde, J. Kreuter, G. Lambrecht, E. Mutschler	

Publikationen

Kramm, H., Voith G., Zündorf I., Dingermann, Th.: „Expression von Muskarinrezeptoren in *Dictyostelium discoideum*, Posterpräsentation Doktorandentagung der DPhG, Würzburg 1997

Kramm, H., Zündorf I., Voith G., Dingermann, Th.: „*Dictyostelium discoideum* as expression system for muscarinic receptors, Posterpräsentation European Graduate Students Meeting der DPhG, Frankfurt 1998, in Pharmazie Volume 53 (1998), Supplement 1

Voith, G., Kramm, H., Zündorf, I., Winkler, T. and Dingermann, T.: Expression of the rat muscarinic receptor gene m3 in *Dictyostelium discoideum*. Pharmazie 53 (1998) 707-710.

Kramm, H., Zündorf I., Dingermann, Th.: „Expression of human muscarinic receptors in *Dictyostelium discoideum*, Posterpräsentation International *Dictyostelium* Conference, Kloster Irsee 1998

Danksagungen

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Theodor Dingermann möchte ich für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, für seine stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion und für die wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit danken.

Herrn Privatdozent Dr. Thomas Winckler möchte ich für die Begutachtung der Arbeit und für seine hilfreichen Anregungen im Laboralltag danken.

Frau Dr. Ilse Zündorf möchte ich für ihre hilfreichen Anregungen und ihre Unterstützung beim Erstellen der Arbeit danken.

Herrn Professor Dr. Steinhilber und Herrn Professor Dr. Schubert-Zsilavec danke ich für ihre Bereitschaft, sich als Mitglieder des Prüfungsausschusses zur Verfügung zu stellen.

Herrn Professor Dr. Lambrecht danke ich für die Überlassung von Muskarin-Testsubstanz und für wertvolle Hinweise zum Thema Muskarin-Rezeptoren.

Bei der DFG bedanke ich mich für die Unterstützung in Form eines Stipendiums im Rahmen eines Graduiertenkollegs.

Bei allen Mitdoktoranden und den TAs des Arbeitskreises Dingermann möchte ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre und viele schöne gemeinsame Stunden bedanken. Ich habe es stets als ein besonderes Glück empfunden, gute wie auch schlechte Zeiten mit solch netten Kollegen teilen zu können.

Am Ende aber nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Freundin Dorothee und meiner Familie für die immerwährende Unterstützung während der Promotion. Ohne diese Unterstützung wäre die Promotion mit ihren vielen Höhen und Tiefen kaum durchführbar gewesen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, denen ich die vorliegende Arbeit widmen möchte.