

Charakterisierung intrazellulärer Bindepartner von metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe III

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Dipl. Biochem. José Manuel Airas Rodríguez

März 2001

(DF1)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Neurochemie am Max-Planck Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main unter Anleitung von Prof. Heinrich Betz durchgeführt und vom Fachbereich 14, Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften, der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Joachim Engels

Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Betz
Prof. Dr. Hugo Fasold

Datum der Disputation:

Mein primärer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz für die freundliche Überlassung des Themas, seine Betreuung und die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit in der Abteilung Neurochemie des Max Planck-Institutes für Hirnforschung.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hugo Fasold danke ich für die Übernahme der externen Betreuung und die Vertretung der Arbeit im Fachbereich 14, Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften, der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Oussama El Far, der mir zwar sein ganzes molekularbiologisches und proteinbiochemisches Wissen schenkte, als Gegenleistung aber eine große Bereitschaft zur philosophischen und religiösen Diskussion forderte.

Zudem möchte ich mich bei Dr. Vincent O'Connor, Dr. Dagmar Roth und Dr. Jesús Gomeza für ihre vielen Ideen und oft zu spät angenommenen Ratschläge danken.

Anja Niehuis und allen anderen Technischen Angestellten der Abteilung Neurochemie danke ich für ihre unterschiedlichste technische Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Den Arbeitsgruppen von Dr. Andreas Karschin und von Dr. Michael Freissmuth danke ich für die Durchführung der elektrophysiologischen Versuche bzw. der Experimente mit trimeren G-Proteinen.

Dr. Dagmar Roth, Dr. Heinrich Betz und Sonali Mhalas danke ich für die kritischen Kommentare beim Lesen dieser Arbeit, Dr. Iiris Hovatta für ihre vielen Ratschläge während des Schreibens.

Erhan Gök, Thomas Schröter und meinem Bruder Javi danke ich für die geistige und moralische Begleitung durch die schwierige Zeit einer Doktorarbeit.

Meiner Mutter und meinem Vater sei gedankt für ihre nicht zuletzt kulinarische Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Zusammenfassung

Die Aminosäure Glutamat ist der maßgebliche exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem, und glutamaterge Synapsen sind weit über das ganze Hirn verbreitet. Neben den Ionenkanal-gekoppelten (ionotropen) Glutamatrezeptoren (iGluRs) aktiviert Glutamat auch prä- und postsynaptische metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluRs), die über trimere G-Proteine und nachgeschalteten Signalkaskaden Einfluss auf die Signalverarbeitung in der Synapse nehmen können (Pin und Duvoisin, 1995). Diesen Rezeptoren werden Aufgaben bei verschiedenen Formen neuronaler Plastizität und Neurotoxizität zugeschrieben (Pizzi et al., 1993; Pin und Duvoisin, 1995; Pehltski et al., 1996; Pizzi et al., 1996a; Bushell et al., 1997; Maiese et al., 2000; Sabelhaus et al., 2000). Zur Zeit sind acht verschiedene mGluRs zuzüglich ihrer Spleißvarianten bekannt, die in drei Gruppen gegliedert werden, welche sich in ihrer Lokalisation, Struktur und pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden (Nakanishi, 1992; Pin et al., 1993).

Mitglieder der Gruppe III mGluRs sind spezifisch an der aktiven Zone der Präsynapse lokalisiert und dort an der Regulation der Neurotransmission beteiligt (Shigemoto et al., 1996; Ottersen und Landsend, 1997). Die Mechanismen, die zur spezifischen Lokalisation führen, konnten bislang noch nicht aufgezeigt werden. Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde eine Ca^{2+} -abhängige Interaktion von Calmodulin (CaM) mit mGluR7a durch Kopräzipitationsstudien gezeigt. Die CaM-Bindung ist dabei von physiologischer Relevanz für die Aktivierung des Rezeptors (O'Connor et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde nach neuen Interaktionspartnern für die Gruppe III mGluRs gesucht, um so weitere Aufschlüsse über die präsynaptische Verankerung und Regulation dieser Rezeptorgruppe zu gewinnen.

In einem Zwei-Hybrid-Screen konnten dabei die Proteine PxF und SGT, beides Genprodukte unbekannter Funktion, als zwei mögliche Interaktionspartner für mGluR4b identifiziert werden. Die Natur dieser Interaktionen konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht genauer bestimmt werden und bleibt somit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

In einem parallelem Ansatz wurde die Interaktion von mGluR7a mit CaM näher untersucht. Dabei konnte ein hochkonservierter Bereich in allen Gruppe III mGluRs mit Ausnahme von mGluR4b und mGluR6 identifiziert werden, der eine Konsensussequenz zur CaM-Bindung (1-5-10-Motiv) enthält. Neben der CaM-Bindung konnte für diesen Bereich in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Freissmuth auch

eine Interaktion mit G $\beta\gamma$ nachgewiesen werden. Die G $\beta\gamma$ -Bindung an den Rezeptor wird durch Ca²⁺-abhängige Aktivierung von CaM gehemmt. Es wird daher ein Modell zur dualen Aktivierung von Gruppe III mGluRs vorgeschlagen, welches mögliche Mechanismen zur negativen Rückkopplung der Glutamatfreisetzung aufzeigt.

Zusätzlich wurde eine mögliche Regulation der Gruppe III mGluRs durch PKC-Phosphorylierung untersucht. Dabei konnte die *in vitro*-Phosphorylierung eines einzelnen Restes (S862) im intrazellulären C-Terminus von mGluR7a nachgewiesen werden, welche zur Hemmung der CaM-Bindung führte. Aufgrund dieser Daten wird ein erweitertes Modell formuliert, in dem die Hemmung der Ca²⁺/CaM-abhängigen Aktivierung der G-Proteinsignalkaskade durch Phosphorylierung von mGluR7a eine übergeordnete Regulation des Rezeptors darstellt.

Da die Gruppe III mGluRs bei Aktivierung zu einer Selbsthemmung der Neurotransmission führen (Pin und Duvoisin, 1995; Takahashi et al., 1996), stellt deren Ca²⁺/CaM-regulierte Aktivierung und die zusätzliche Regulation durch Phosphorylierung eine Möglichkeit der Regulation von Lernprozessen dar.

Publizierte Ergebnisse dieser Arbeit

O'Connor V, El Far O, Bofill-Cardona E, Nanoff C, Freissmuth M, Karschin A, Airas JM, Betz H und Boehm S (1999) Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. *Science* 286:1180-1184.

El Far O, Airas J, Wischmeyer E, Nehring RB, Karschin A und Betz H (2000) Interaction of the C-terminal tail region of the metabotropic glutamate receptor 7 with the protein kinase C substrate PICK1. *European Journal of Neuroscience* 12:4215-4221.

Airas JM, El Far O und Betz H (2001) PKC Phosphorylation of a Conserved Serine Residue in the C-Terminus of Group III Metabotropic Glutamate Receptors Inhibits Calmodulin Binding. *FEBS Letters*. Im Druck.

El Far O, Bofill-Cardona E, Airas JM, O'Connor V, Boehm S, Freissmuth M, Nanoff C und Betz H (2001) Mapping of Calmodulin und G $\beta\gamma$ Binding Domains within the C-Terminal region of the Metabotropic Glutamate Receptor 7A. *Journal of Biological Chemistry*. Zur Publikation eingereicht.

Abstracts

Airas JM, El Far O und Betz H (1998) A search for partners interacting with group III metabotropic glutamate receptors. *European Journal of Neuroscience* 10:6301.

Airas JM, O'Connor V, El Far O, Bofill-Cardona E, Nanoff C, Freissmuth M, Karschin A, Betz H und Boehm S (1999) A Search for Proteins Interacting with Group III Metabotropic Glutamate Receptors. Meeting Report.

El Far O, Airas JM, Betz H, Bofill-Cardona E, Nanoff C, Boehm S, Freissmuth M, Karschin A und O'Connor V (2000) A conserved calmodulin target sequence in the presynaptic group III metabotropic glutamate receptors. *European Journal of Neuroscience* 12:16-16.

ZUSAMMENFASSUNG

PUBLIZIERTE ERGEBNISSE DIESER ARBEIT

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	DIE NEUROTRANSMISSION	1
1.2.	DIE GLUTAMATERGE SYNAPSE.....	2
1.3.	DIE METABOTROPEN GLUTAMATREZEPTOREN.....	4
1.3.1.	Die mGluR-Familie	5
1.3.2.	Struktur der mGluRs	7
1.3.3.	Die Gruppe III der mGluRs.....	9
1.3.4.	Ca ²⁺ /CaM-abhängigen Regulation von mGluR7a	11
1.3.4.1.	Ca ²⁺ /CaM-abhängige Proteinregulation.....	12
1.3.4.2.	Die physiologische Relevanz der Ca ²⁺ /CaM-abhängigen Regulation von mGluR7a.....	15
1.4.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	15
2.	MATERIALIEN	16
2.1.	ALLGEMEINE CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	16
2.1.1.	Enzyme.....	16
2.1.2.	Kits.....	16
2.1.2.1.	Puffer und Lösungen für Plasmid-Isolierungen nach Qiagen	17
2.1.3.	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	17
2.1.3.1.	Nährmedien und Lösungen für Bakterien- und Hefekulturen.....	18
2.1.3.2.	Nährmedien und Lösungen für eukaryotische Zellkulturen.....	18
2.1.4.	Puffer und Lösungen für das Zwei-Hybrid-System	19
2.1.5.	Puffer und Lösungen für PAGE und Western-Blots.....	19
2.1.6.	Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenzmikroskopie	20

Inhaltsverzeichnis

2.2.	NUKLEINSÄUREN	20
2.2.1.	Plasmide	20
2.2.2.	Oligonukleotide	21
2.2.3.	cDNA-Banken	22
2.2.4.	Weitere Nukleinsäuren	22
2.2.5.	Herstellung der eingesetzten Konstrukte	23
2.3.	ANTIKÖRPER	25
2.4.	ORGANISMEN	26
3.	METHODEN	27
3.1.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	27
3.1.1.	Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen	27
3.1.2.	Transformation elektrokompenter Zellen	27
3.1.3.	Transformation hitzekompenter Zellen	28
3.1.4.	Glyzerinstammkulturen von Bakterien	28
3.1.5.	Plasmidpräparation aus Bakterienzellen	28
3.1.6.	Plasmid-DNA Isolation durch alkalische Lyse	28
3.1.7.	DNA-Konzentrationsbestimmung	29
3.1.8.	Restriktionsfragmentanalyse	29
3.1.9.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
3.1.10.	Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren	29
3.1.11.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
3.1.12.	PCR-Mutagenese	30
3.1.13.	Klonierung von PCR-Fragmenten	31
3.1.14.	Ligation von DNA-Fragmenten	31

Inhaltsverzeichnis

3.1.15.	Sequenzanalyse von DNA.....	31
3.2.	BIOCHEMISCHE ARBEITSMETHODEN.....	32
3.2.1.	Proteinbestimmung nach Lowry.....	32
3.2.2.	Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen.....	32
3.2.3.	Affinitätschromatographische Aufreinigung von GST- bzw. MBP-Fusionsproteinen.....	32
3.2.4.	Kopräzipitation bakteriell exprimierter Fusionsproteine mit GST/MBP-Fusionsproteinen.....	33
3.2.5.	Kopräzipitation eukaryotisch exprimierter Proteine mit GST/MBP-Fusionsproteinen.....	34
3.2.6.	Test auf CaM-Bindung eines GST- bzw. MBP-Fusionsproteins.....	34
3.2.7.	Test auf Gβγ-Bindung eines GST-Fusionsproteins.....	35
3.2.8.	Koimmunpräzipitation von kotransfizierten Proteinen aus HEK 293-Zellen.....	35
3.2.9.	Herstellung von Zellhomogenaten.....	35
3.2.10.	Herstellung von Hirnhomogenaten.....	36
3.2.11.	Bindungsstudien mittels Kopräzipitation.....	36
3.2.12.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
3.2.13.	Färbung von SDS-Proteingelen.....	37
3.2.14.	Transfer und Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose (Western-Blot).....	37
3.2.15.	Phosphorylierungsreaktionen.....	38
3.2.16.	Präzipitationen mit <i>in vitro</i> -translatierten Proteinen.....	38
3.3.	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE ABLEITUNG VON K_{IR} -KANÄLEN IM OOZYTEN-SYSTEM.....	39
3.4.	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	39
3.4.1.	Haltung von Nierenzellkulturen.....	39
3.4.2.	Transfektion von Nierenzellkulturen.....	39
3.5.	IMMUNZYTOCHEMIE.....	40
3.5.1.	Färbung von GFP transfizierten Zellen nach Paraformaldehyd-Fixierung.....	40

Inhaltsverzeichnis

3.5.2.	Färbung nach Methanol/Eisessig-Fixierung	41
3.6.	DAS ZWEI-HYBRID-SYSTEM	41
3.6.1.	Transformation von Hefezellen.....	44
3.6.2.	Test auf Transaktivierung eines exprimierten Fusionsproteins	45
3.6.3.	Genetischer Test auf Nukleustransport.....	45
3.6.4.	Toxizitätstest von Köderproteinen	45
3.6.5.	Der LexA-Screen.....	46
4.	ERGEBNISSE	49
4.1.	NEUE INTERAKTIONSPARTNER FÜR MGLURS DER GRUPPE III	49
4.1.1.	Zwei-Hybrid-Screens mit dem Gal4-System	49
4.1.1.1.	Toxizität verschiedener mGluR-Konstrukte im Gal4-System	51
4.1.2.	Der LexA-Screen mit mGluR4b.....	53
4.1.2.1.	Interaktion von mGluR4b mit SGT und PxF	56
4.1.3.	Versuch zur genaueren Charakterisierung der Interaktion zwischen Pick1 und den Mitgliedern der Gruppe III mGluRs	60
4.2.	CALMODULIN, EIN REGULATOR DER MGLUR-AKTIVIERTEN SIGNALKASKADE	61
4.2.1.	Identifizierung einer homologen CaM-Binderegion in den zytosolischen C-Termini der Gruppe III mGluRs	61
4.2.1.1.	CaM-Bindung an andere mGluRs der Gruppe III.....	63
4.2.1.2.	Abhängigkeit der CaM-Bindung von der Präsenz der homologen Domäne	64
4.2.2.	Gβγ kompetiert mit CaM um die Bindung an mGluR7a	66
4.2.3.	Phosphorylierung von Gruppe III mGluRs.....	67
4.2.3.1.	Identifizierung der phosphorylierten Aminosäurerestes in mGluR7a.....	68
4.2.3.2.	Einfluss von P _i -analoger Substitution auf die CaM-Bindung	69
4.2.3.3.	Die PKC-Phosphorylierung spielt möglicherweise eine physiologische Rolle bei der Regulation durch CaM	70
4.2.3.4.	Direkte Interaktion von PKCα mit mGluR7a.....	73
5.	DISKUSSION	76

Inhaltsverzeichnis

5.1.	NEUE INTERAKTIONSPARTNER FÜR MGLURS DER GRUPPE III	76
5.1.1.	SGT	78
5.1.2.	PxF	80
5.1.3.	Biochemische Charakterisierung der Interaktionspartner von mGluR4b und -7a	82
5.2.	REGULATION DER AKTIVITÄT DER MGLURS DER GRUPPE III.....	83
5.2.1.	Mutuell exklusive Bindung von CaM und G β γ an C-Termini von mGluRs.....	84
5.2.2.	Regulation der CaM-Bindung durch Phosphorylierung eines konservierten Serins	88
6.	LITERATURVERZEICHNIS	95
7.	ANHANG	102
7.1.	SEQUENZ DES GEFISCHTEN KLONS AUS DEM GAL4-ZWEI-HYBRID-SCREEN.....	102
7.2.	SEQUENZEN DER GEFISCHTEN KLONE AUS DEM LEXA-ZWEI-HYBRID-SCREEN	103
7.2.1.	Klon A.....	103
7.2.2.	Klon B.....	104
7.2.3.	Klon C.....	105
7.2.4.	Klon D.....	106
7.2.5.	Klon E	107
7.2.6.	Klon F	108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LEBENS LAUF

1. Einleitung

„Cogito, ergo sum.“ (Descartes, 1637). Dieser elegante Beweis warf ein Rätsel auf, das selbst Descartes nicht zu lösen imstande war: Wie lässt sich das immaterielle Wesen des Denkens mit der physischen Substanz des Seins verbinden? Seine These, dass sich der Sitz der Seele im Zentrum des Gehirns, und zwar in der Epiphyse, befände, war jedenfalls nicht sonderlich überzeugend. Auch die modernen Neurowissenschaften beschäftigen sich mit der Lösung von Descartes' „Leib-Seele-Problem“. Doch während Descartes noch eine physische Seele im Gehirn postulierte, geht es der modernen Hirnforschung um das Verständnis der komplexen Abläufe des Denkens selbst. Die Tatsache, dass die Forschung hier noch am Anfang steht, ist sicherlich nicht zuletzt durch die Komplexität des menschlichen Gehirns begründet, „der bei weitem wunderbarsten Struktur im ganzen Universum“ – so der Pionier der Hirnforschung und Nobelpreisträger Sir John Eccles.

Im Säugerhirn kommunizieren etwa 1 Billion Nervenzellen über etwa 1 Billiarde Kontaktstellen miteinander. An diesen sogenannten Synapsen wird das präsynaptische Signal der Nervenleitung durch Neurotransmitter auf andere Neurone übertragen und so postsynaptisch in Erregung oder Hemmung umgesetzt. Die in die synaptische Transmission eingreifenden Regulationsmechanismen sind wesentlich für die höheren Leistungen des Nervensystems wie Denken, Lernen und Gedächtnis (Cajal, 1911; Hebb, 1949; Eccles, 1953).

1.1. Die Neurotransmission

Bei der neuronalen Signalübertragung wandern Nervenimpulse mit Hilfe spannungsabhängiger Na^+ - und K^+ -Kanäle entlang des Axons zur Präsynapse, wo die elektrische Information in chemische Signale umgewandelt wird. Dabei kommt es zur Ca^{2+} -induzierten Fusion präsynaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran und somit zur Freisetzung der in den Vesikeln befindlichen Neurotransmitter. Diese diffundieren durch den synaptischen Spalt und werden an der Postsynapse durch Bindung an spezifische Rezeptoren wieder in ein elektrisches Aktionspotential rückgewandelt (siehe Abbildung 1).

Neben Rezeptoren für niedermolekulare Substanzen wie beispielsweise Acetylcholin, Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin, Histamin und γ -Aminobutter-

säure (GABA) findet man im zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugetieren auch Rezeptoren für die Aminosäuren Glyzin und Glutamat.

1.2. Die glutamaterge Synapse

Die Aminosäure L-Glutamat kommt dabei im Großteil der exzitatorischen Synapsen im zentralen Nervensystem (ZNS) bei einer Vielzahl von neuronalen Prozessen wie der neuronalen Plastizität und Lernen zum Einsatz (Collingridge und Bliss, 1987; Nakanishi, 1992), spielt aber auch eine Rolle bei der Neurotoxizität durch überhöhten postsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom (Coyle und Puttfarcken, 1993).

Glutamat aktiviert bei der schnellen Neurotransmission ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluRs), zu denen die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-, die α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure (AMPA)- und die Kainat-Rezeptoren gehören (Hollmann und Heinemann, 1994). Sie kommen sowohl prä- wie auch postsynaptisch vor. Ionotrope Rezeptoren bestehen aus vier bis fünf die Membran durchspannende Untereinheiten, die zusammen einen Ionenkanal bilden. Die Aktivierung eines solchen Kanals durch Bindung des Neurotransmitters führt zu einer Konformationsänderungen und Durchlässigkeit für bestimmte Ionen. Da diese Liganden-gesteuerte Ionenkanäle direkten Einfluss auf das Potential der Zellmembran nehmen können, sind sie vor allem bei der schnellen Neurotransmission beteiligt, die nur Millisekunden andauern kann. Während postsynaptisch lokalisierte iGluRs an der Reizweiterleitung beteiligt sind, regulieren präsynaptisch lokalisierte iGluRs die Neurotransmitterausschüttung durch direkten Einfluss auf das präsynaptische Membranpotential (Abbildung 1).

Die Untereinheiten der iGluRs weisen einen extrazellulären Amino-, einen intrazellulären Carboxyterminus, drei Transmembrandomänen sowie eine porenbildende Intramembranschleife auf. Die zwei extrazellulären Domänen sind an der Ligandenbindung beteiligt (Hollmann und Heinemann, 1994; Wo und Oswald, 1994; Bennett und Dingledine, 1995).

Mitte der 80er Jahre wurde klar, dass es neben den ionotropen Glutamatrezeptoren auch G-Protein gekoppelte Glutamatrezeptoren geben müsse. Es konnte gezeigt werden, dass Glutamat (ebenso wie GABA, Serotonin und Azetylcholin) in der Lage ist, G-Proteine gekoppelte Enzyme unabhängig von den oben beschriebenen ionotropen Rezeptoren zu aktivieren (Sladeczek et al., 1985; Nicoletti et al., 1986; Pearce et al., 1986).

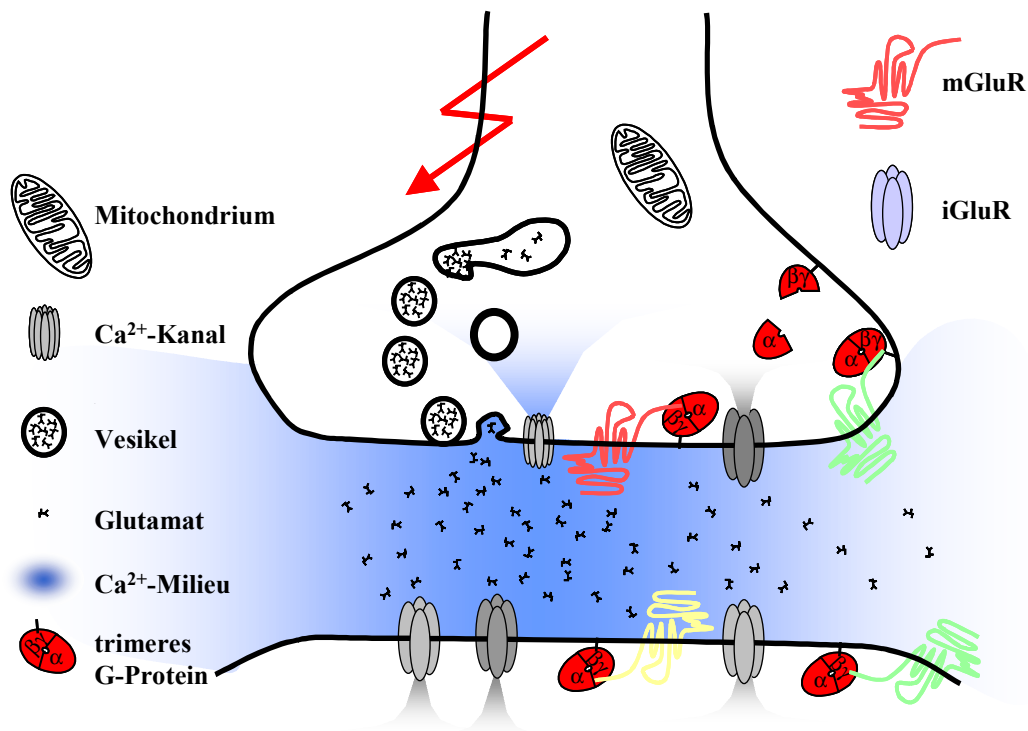


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer glutamatergen Synapse. Bei einem Aktionspotential wird Glutamat präsynaptisch ausgeschüttet und diffundiert in den synaptischen Spalt. Hier kann es sowohl prä- wie auch postsynaptisch lokalisierte iGluRs und mGluRs aktivieren. Die drei Klassen der iGluRs (NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren) sind durch verschiedene Grautöne angedeutet und über die gesamte Synapse verteilt. Während die mGluRs der Gruppe I (gelb) vorrangig an der Postsynapse lokalisiert sind, finden sich die mGluRs der Gruppe II (grün) überwiegend an der Perisynapse und die mGluRs der Gruppe III (rot) an der aktiven Zone der Präsynapse (Shigemoto et al., 1996; Ottersen und Landsend, 1997).

Zur gleichen Zeit konnte mit Hilfe des Glutamat-Analogons L-2-Amino-4-Phosphonobutytrat (L-AP4) ein neuer Typ präsynaptisch lokalisierter Glutamatrezeptoren identifiziert werden (Foster und Fagg, 1984), welche eine Hemmung der Glutamatfreisetzung bewirkten (Koerner und Johnson, 1992). Alle Rezeptoren dieser neuen Familie wirken über eine G-Protein gekoppelte Signalkaskade und wurden daher metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluRs) genannt (Abbildung 1).

Im Gegensatz zu den ionotropen bestehen die metabotropen Rezeptoren aus nur einer Polypeptidkette, weisen sieben Transmembrandomänen auf und bewirken bei Ligandenbindung die Aktivierung trimerer G-Proteine und nachgeschalteter Signalkaskaden (daher auch Sieben-Transmembran- oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren). Über die Regulation von Proteinen, die an der Exozytose beteiligt sind, können sie indirekten Einfluss auf die Neurotransmission nehmen. Sie führen daher zu langsameren aber länger anhaltenden (Sekunden bis Minuten) Änderungen der synaptischen Vorgänge.

1.3. Die metabotropen Glutamatrezeptoren

Der erste mGluR wurde 1991 parallel von zwei Gruppen mit Hilfe eines funktionellen Expressionsscreenings kloniert (Houamed et al., 1991; Masu et al., 1991). Dabei wurde die Existenz G-Protein gekoppelter Cl⁻-Kanäle in *Xenopus* Oozyten ausgenutzt, um nach Injektion eines Pools an cDNAs aus Ratten-Kleinhirn in die Oozyten die Glutamat-induzierten Cl⁻-Ströme elektrophysiologisch zu untersuchen. Durch ständige Einengung des die Cl⁻-Kanäle aktivierenden cDNA-Pools konnte so letztlich eine mGluR1a-cDNA isoliert werden. Aufgrund der ersten vorliegenden DNA-Sequenz waren andere Gruppen in der Lage, unter Einsatz degenerierter Primer verwandte mGluRs zu entdecken (Abe et al., 1992; Nakajima et al., 1993; Saugstad et al., 1994).

Die mGluRs gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die aus fünf Familien besteht. Neben den Familien A (Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren), B (Sekretin-ähnliche Rezeptoren), C (mGluRs und Pheromonrezeptoren), D (Rezeptoren aus Pilzen) und E (cAMP-Rezeptoren aus *Dictyostelium*) gibt es eine Reihe weiterer G-Protein gekoppelter Rezeptoren, die keiner der fünf Klassen zugeordnet werden kann. G-Protein gekoppelte Rezeptoren weisen eine typische Struktur mit sieben Transmembrandomänen auf und werden daher auch Sieben-Transmembran-Rezeptoren genannt. Sie interagieren über ihre zweite bzw. dritte hochkonservierte intrazelluläre Schleife spezifisch mit dem C-Terminus von G α und aktivieren dieses über eine Änderung der relativen Positionen der die Membran durchspannenden α -Helizes und der daraus folgenden Konformationsänderung der intrazellulären Schleifen (Pin et al., 1995; Gomeza et al., 1996a; Gomeza et al., 1996b). Die Untereinheiten der trimeren G-Proteine, G α und G $\beta\gamma$, können nun vom Komplex mit dem Rezeptor abdissoziieren und Effektorproteine aktivieren bzw. hemmen.

Die Familie C, zu der auch die mGluRs gehören, besteht aus vier Subfamilien (siehe Tabelle 1). Ihre Mitglieder sind wesentlich länger als andere bekannte G-Protein gekoppelte Rezeptoren und besitzen keinerlei Homologie zu Vertretern anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptorfamilien.

Tabelle 1: Die Subfamilien G-Protein-gekoppelter Rezeptoren der Familie C. Sie weisen keinerlei Homologie zu Vertretern anderer G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf und bilden daher eine eigene Familie (Horn et al., 1998).

Gruppe	Vertreter	
I	mGluRs	Eine Besonderheit dieser Subfamilie ist die Größe und Funktion der zweiten intrazelluläre Schleife, die der Interaktion mit $G\alpha$ dient. Bei allen anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren übernimmt die dritte intrazelluläre Schleife diese Aufgabe.
II	Ca^{2+} -Rezeptoren	Der vor allem in Nebenschilddrüse und Niere vorkommende Ca^{2+} -bindende Rezeptor ist zu 35% identisch zu den mGluRs und setzt über die Regulation der PLC intrazellulär gespeichertes Ca^{2+} als Antwort auf extrazelluläres Ca^{2+} frei
III	GABA _B -Rezeptoren	Die bisher bekannten GABA _B -Rezeptoren sind nur als Heterodimere funktionell. Sie interagieren über ihre zytosolischen C-Termini miteinander.
IV	putative Pheromon-Rezeptoren	Die Mitglieder dieser Gruppe werden in zwei Multi-gen-Familien gegliedert. Sie werden lediglich im vomeronasalen System exprimiert, dem man eine Aufgabe bei der Pheromon-Detektion zuschreibt (Del Punta et al., 2000).

1.3.1. Die mGluR-Familie

Heute sind acht verschiedene Mitglieder der mGluRs zuzüglich ihrer Spleißvarianten bekannt. Sie wurden chronologisch entsprechend ihrer Entdeckung von 1 bis 8 durchnummeriert (siehe Abbildung 2). Basierend auf ihrer Sequenzhomologie, den pharmakologischen Eigenschaften und den aktivierten Signalkaskaden lassen sich die acht mGluRs in drei Gruppen untergliedern (Abbildung 2). Innerhalb der gleichen Gruppe weisen die Rezeptoren eine Aminosäure-Identität von etwa 70% auf, wohingegen die verschiedenen Gruppen lediglich zu etwa 45% miteinander identisch sind (Nakanishi, 1992). Während die zur Gruppe I gehörenden mGluR1 und -5 die Phospholipa-

se C (PLC) aktivieren, führt eine Aktivierung der Mitglieder der Gruppen II (mGluR2 und -3) und III (mGluR4, -6, -7 und -8) zu einer Hemmung der Adenylat-Zyklase (AC) (Pin und Duvoisin, 1995). Die Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden resultiert aus der Kopplung unterschiedlicher G-Protein α -Untereinheiten ($G\alpha$). Während Gruppe I Rezeptoren hauptsächlich an die aktivierenden $G\alpha_a$ gekoppelt sind, interagieren die Mitglieder der Gruppen II und III mit $G\alpha_o$ und $G\alpha_i$ (Pin und Duvoisin, 1995). Auch in ihrer vorrangigen Lokalisation unterscheiden sich die drei Gruppen. Die Mitglieder der Gruppe I sind vor allem postsynaptisch lokalisiert und dort z. B. an der Regulierung kolokalisierter NMDA-Rezeptoren beteiligt (Alagarsamy et al., 1999a; Alagarsamy et al., 1999b; Alagarsamy et al., 1999c). Gruppe II-Mitglieder sind sowohl prä- wie postsynaptisch zu finden und aufgrund ihrer perisynaptischen Lokalisation möglicherweise nur indirekt an der Regulation der Neurotransmission beteiligt. Die Mitglieder der Gruppe III sind vorrangig präsynaptisch lokalisiert und wie z. B. mGluR7a direkt in der aktiven Zone zu finden (Shigemoto et al., 1996; Ottersen und Landsend, 1997) (Abbildung 1 und Abbildung 2). Eine Ausnahme bildet mGluR6, welcher ausschließlich in der Retina exprimiert wird und dort sowohl prä- wie postsynaptisch vorkommt (Nomura et al., 1994).

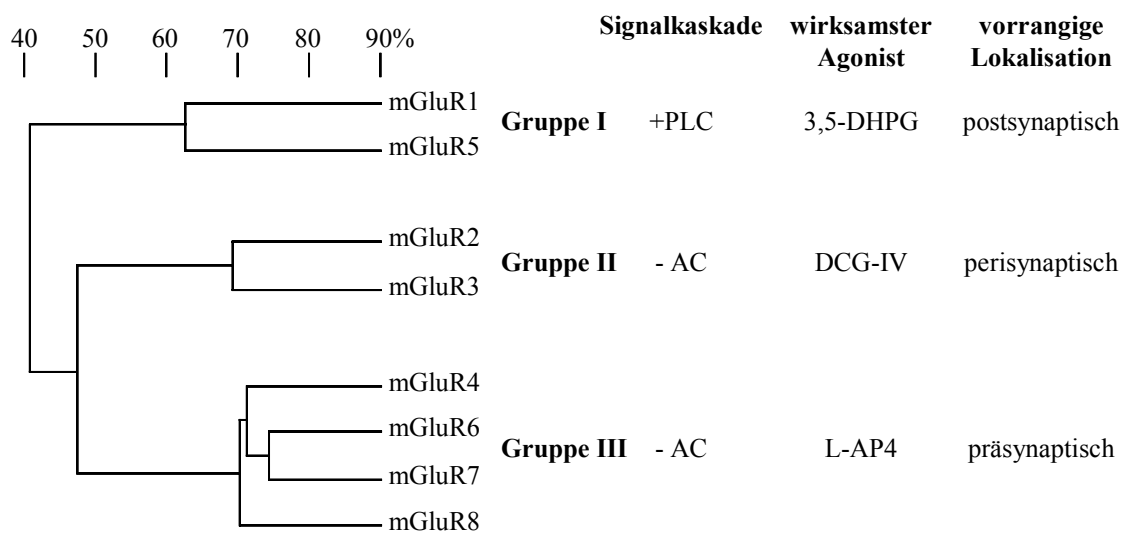


Abbildung 2: Dendrogramm und Klassifizierung der bekannten der mGluRs.

Die Prozentangaben stehen für die Sequenzidentität der Aminosäuren der einzelnen Rezeptoren (Pin und Duvoisin, 1995). Basierend auf ihrer Sequenzhomologie, den pharmakologischen Eigenschaften und der aktivierten Signalkaskaden lassen sich die acht mGluRs in die Gruppen I bis III untergliedern. +PLC: Aktivierung der PLC, - AC: Hemmung der AC, 3,5-DHPG: 3,5-Dihydroxyphenylglyzin, DCG-IV: (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-Dicarboxyzyclopropyl)-Glyzin, L-AP4: L-2-Amino-4-Phosphonobutytrat.

Die Aktivierung präsynaptisch lokalisierter mGluRs führt zu einer negativen Rückkopplung der Neurotransmission durch Hemmung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle oder direkte Regulation des Exozytoseapparates (Pin und Bockaert, 1995; Pin und Duvoisin, 1995; Ikeda, 1996; Takahashi et al., 1996). Da hauptsächlich die Mitglieder der Gruppe III an der aktiven Zone der Synapse lokalisiert sind, spielen letztere wahrscheinlich die wichtigste Rolle bei der direkten Regulation der Neurotransmission.

1.3.2. Struktur der mGluRs

Ein Homologievergleich der einzelnen mGluRs zeigt die Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Gruppen auf (siehe Abbildung 3). Sie alle besitzen ein putatives Signalpeptid, welches für die Translokation des extrazellulären N-Terminus durch die ER-Membran benötigt wird (Pin und Duvoisin, 1995).

Nach diesem langen extrazellulären Bereich mit 19 konservierten Cystein-Resten folgt der hoch konservierte Sieben-Transmembranbereich mit den besonders hoch konservierten intrazellulären Schleifen i1 und i3 (Abbildung 3). Da i2 die am wenigsten konservierte intrazelluläre Schleife darstellt (Abbildung 3), spielt sie wahrscheinlich auch die größte Rolle bei der spezifischen G-Protein-Kopplung. In der Tat konnte durch den Austausch der intrazellulären Domänen zwischen mGluR1 und mGluR3, die an unterschiedliche G-Proteine koppeln, gezeigt werden, dass i2 den größten Einfluss auf die spezifische Erkennung und Kopplung von G-Proteinen hat; die anderen beiden intrazellulären Domänen sind aber ebenfalls beteiligt (Pin et al., 1995; Gomeza et al., 1996a; Gomeza et al., 1996b). Eine amphipathische α -Helix in i2 ermöglicht dabei eine direkte Interaktion mit dem C-Terminus von α -Untereinheiten der G-Proteine (G_α) (Gomeza et al., 1996b) (siehe Skizze in Abbildung 4).

Die C-Termini der mGluRs sind sehr variabel bezüglich ihrer Länge und Struktur. Der Einsatz von chimären Rezeptoren zeigte, dass sie zusammen mit den intrazellulären Schleifen an der G-Protein-Kopplung beteiligt sind (Gabellini et al., 1993; Pin und Duvoisin, 1995; Prezeau et al., 1996). Bei einer Länge von bis zu 300 Resten ist es aber wahrscheinlich, dass sie noch andere Funktionen erfüllen und zum Beispiel an Translokation, Lokalisation und Regulation des Rezeptors beteiligt sind. So führte das Anhängen des zytosolischen C-Terminus von axonal exprimiertem mGluR7a an mGluR2 zu einer veränderten Lokalisation des sonst in die Dendriten transportierten mGluR2 im Axon (Craig und Stowell, 1999; Stowell und Craig, 1999).

mGluR1a	MVRLLLIFPPMIFLEMSILPRMPDRKVLGA	GASSQRSVARMDGVIIIGALFVSVHHQPPA	EVKPERKGEIREQYGIQVREAMFHTLDKINAD	PVLLPNITLIGSEIRDS	WHS	SVAL
mGluR5a	MVRLLLILSVLLKEDVRG	SAQSSERRVVAHMGDIIIGALFVSVHHQPT	VKVKHERK	GAVREQYGIQVREAMFHTLERINSDPTLLP	NTLPGTCEIRDS	WHS
mGluR2	MESLLGFALLLLGGVAABGP	AKKVLTLLEGDLVLGGFLFPVHQK		GGFAEE	GFVNEHRGIQRLAEMFALDRINADPHLLP	GLGHAHLLDS
mGluR3	MMMLTRLQIIMLALFSKGLFLSLG	DHNPMMREIKIEGDLVGLGLFPINKE		GTGTBE	GRINEDRGIQRLAEMFALDEINKNDYLLP	GVKLVGHLLDT
mGluR4a	MSGKGWAAWNRLLPCLLLSLYAPVWVSSLGK	KGHPHMNSIRIDGITLGLLFPVHGR		GSBGA	GBLKEKGIHRLAEMFALDRINADPHLLP	NTLPGTCEIRDS
mGluR6	MGR	LPVLLWLAWLWLSQA	ICACGASVRLAGGLTGLLFPVHAR		GAAGRA	GALKKEQGVHRLAEMFALDRINADPELLP
mGluR7a	MVQLGRLRLVLTLMKPPCCVLELLCVLAAAAR	QEMVAPHISIRIEGDVTLGLLFPVHAK		GPSGVP	GDIKRENGIHRLEAMFALDQINSDPNLLP	NTLPGTCEIRDS
mGluR8a	MVCBGRKLASCPCPFL	LTAQFYWILTMQQR	HSQBYAHSIRVDGDIILGLLFPVHAK		GERGVP	GBLKEKGIHRLAEMFALDQINADPHLLP
: * : * : * * * * * : * : * * : * * : * * : * *						
mGluR1a	EQSIEFIRDSLSIRDEKDLNRLCPDGQTL	PPGRTKPIAGVIGPGSSSVAIQVQLLQ	LPDIQIAYSATSIDLSDKTLKYFLR	VPVSDTLPQARAMD	IVKRYNWTYVSAVHTBGN	
mGluR5a	EQSIEFIRDSLS	EEBEGVLRVVDGSSSF	RSKPPVIGVIGPGSSSVAIQVQLLQ	LPDIQIAYSATSIDLSDKTLKYFLR	VPVSDTLPQARAMD	IVKRYNWTYVSAVHTBGN
mGluR2	EQALDFVRASLRG	ADGSRHCPDGSYATH	SDAPTAVTGVIIGSSVDSIQVANLLR	LRFQIPIQIYSASTAKLSDKSRDY	FARTVPPDFPQAKAMAEILRFNWTY	VSTVASEGDY
mGluR3	EQSLDFVRASLTK	VDEAEYMCDGSYAIO	ENIPLLIAGVIGSSVSIQVANLLR	LRFQIPIQIYSASTAKLSDKSRDY	FARTVPPDFPQAKAMAEILRFNWTY	VSTVASEGDY
mGluR4a	EQSLTFVRALIEK	DGTEVRCGGGPPII	TKP ERVVGVIAGSSSVMVANILR	LRFKPIQIYSASTAPDLSDNSRY	DFFSRVVPDSYQAQAMVD	IVRALGNWVSTLASEGNY
mGluR6	EQALSFLVQALIRGRG	DDGEASVRCGGVPPILR	SAPPERVVAVVAGSASSVMVANILR	LRFKPIQIYSASTAPELSDSTRY	DFFSRVVPDSYQAQAMVD	IVRALGNWVSTLASEGNY
mGluR7a	EQSLTFVQALIQK	DTSDVRCNGEPPVF	VKP EKVVGVIAGSSSVMVANILR	LRFQIPIQIYSASTAPELSDSTRY	DFFSRVVPDSYQAQAMVD	IVRALGNWVSTLASEGNY
mGluR8a	EQSLTFVQALIEK	DASDVRCANGDPPIF	TKP DKISGVIGAAASSVMVANILR	LRFKPIQIYSASTAPELSDSTRY	DFFSRVVPDSYQAQAMVD	IVRALGNWVSTLASEGNY
: * : * : * : * : * : * : *						
mGluR1a	GESGMDAFKELAA	QEGLCIAHSKDIY	SNAGEKSFDRLLRKLRELPKARVVV	CFCEGMTVGRLLSAMRRLGVVGEFSL	IGSDGWADRDEVIEGVE	VEANGGITT
mGluR5a	GESGMEAFKDMA	KEGICIAHSYKIY	SNAGEKSFDKLKKLRSHLPKARVVA	CFCEGMTVGRLLMAMRRLGLAGEFLL	IGSDGWADRDEVYDQY	QREAVGGITT
mGluR2	GETGIEAFLEAR	ARNCVATSEKVG	RAMSRAAFPGVVRALLO	KPSARVAVLPTSEEDARELLA	TORLINASFTWVADGWGALES	VAGSERAEGAIT
mGluR3	GETGIEAFLEAR	LRNICIATAEKVG	RSNIKRSYDSVIRELLO	KPNARVVVLPMSDDSRLEIAA	ANRNVASFTWVADGWGAQES	IVKGSSEHAYGATT
mGluR4a	GESGVEAFIQSRREAGV	CIQAQSIKIP	REPKTGEBFKIKRLE	TSNARGIIPANEDDIRR	VEAARRANQTHGFWMGSD	SWGSKSAPVLRLEAEVAGATT
mGluR6	GESGVEAFIQSRREAGV	CIQAQSIKIP	REPKTGEBFKIKRLE	TSNARGIIPANEDDIRR	VEAARRANQTHGFWMGSD	SWGSKSAPVLRLEAEVAGATT
mGluR7a	GEKGVESPTISKRAEGG	CIQAQSVRI	PQRKDRITDFDRIKQLLD	TPNSRAVVIIPANEDI	KQILAAAKRADQVGHFL	WGDSDWGSKINPLHQHE
mGluR8a	GESGVEAFIQSRREAGV	CIQAQSIKIP	REPKTGEBFKIKRLE	TPNARVIMPANEDI	IRLEIAAKINQSGHFL	WGDSDWGSKIAPVQQEIAE
: * : * : * : * : * : * : *						
mGluR1a	FLKRLDTRNTRNPF	PEFQHRFCRLPGHLE	NPNNFKVCTGNE	LEEN	VYQDSKMGFVINAIYAMA	HGLQNMHHAL
mGluR5a	YLKLRPEINLRNPF	QEFQHRFCRLGEP	QAEKSNKYNTCN	SSLTTRH	HYQDSKMGFVINAIYS	MAHGLHMGMQL
mGluR2	FQSLNPNMHRNPN	FRFEWERFHSF	RQRD	CAAH SLRAVFP	QESKIMFVNAVAYAMA	HLMHMRAL
mGluR3	FQSLNPNMHRNPN	FRFBQKFCQL	QNKNRHRQC	KHLADSSNYQESKIM	FVNAVAYAMA	HLMHMRAL
mGluR4a	FSSRTLDNRRNI	WFAEFWEDNFH	KLRSRHALK	KGSHIKCTNRERI	QDSAYQEQBKVQF	IVDAVYAMHGLHAMHRDL
mGluR6	FMTSLENNRRNI	WFAEFWEDNFH	KLRSRHALK	KGSHIKCTNRERI	QDSAYQEQBKVQF	IVDAVYAMHGLHAMHRDL
mGluR7a	FTSRTLENNRRNI	WFAEFWEDNFH	KLRSRHALK	KGSHIKCTNRERI	QDSAYQEQBKVQF	IVDAVYAMHGLHAMHRDL
mGluR8a	FRSRTLANRRNI	WFAEFWEDNFH	KLRSRHALK	KGSHIKCTNRERI	QDSAYQEQBKVQF	IVDAVYAMHGLHAMHRDL
: * : * : * : * : * : * : *						
mGluR1a	EEVWFDEKGDAP	GRYDIIMNLQYTEANR	YDVHVTWHEGLV	INDDYKIQMNK	SGMVRVSCP	LKQKIKVIRKGEVSCC
mGluR5a	DMILFDENGDS	PGRYDIIMNFKEMG	KDY	FDYINVGSDW	NGELKMDDE	VWMSKK
mGluR2	DEVFDRFDG	DIRYNIPTYLRA	SGSR	YRYQKVG	YAWB LTLTDS	FIPWASPSAGL
mGluR3	SIVKFTFDG	DIRYNIPTYLRA	SGSR	YRYQKVG	YAWB LTLTDS	FIPWASPSAGL
mGluR4a	NPVTFNENGDA	PGRYDIYQYLRNGS	AEBYKIGSW	THD LHLRIER	MQWVG SQQQL	PRSI
mGluR6	TPVMFNENGDA	PGRYDIYQYLRNGS	GGYAVGQW	ABEA LRLDME	VLRSWG DPHEV	PPSQ
mGluR7a	TPVMFNENGDA	PGRYDIYQYLRNGS	GGYAVGQW	ABEA LRLDME	VLRSWG DPHEV	PPSQ
mGluR8a	TPVTFNENGDA	PGRYDIYQYLRNGS	GGYAVGQW	ABEA LRLDME	VLRSWG DPHEV	PPSQ
: * : * : * : * : * : * : *						
mGluR1a	PIPVRYLEWSD	IESIIAIFASCL	GILVTLFVTLI	FVLYRDT	PPVKS	SSRELCYII
mGluR5a	LIPVQVLRWGD	PEPIAAVFA	CLGLLATL	FVTVIPII	YRDT	PPVKS
mGluR2	ELPQEVIRWGD	AWAGPTT	IACGALAT	LVPLVGR	VHNTPT	PPVKS
mGluR3	NLPEDYIKW	EDAWI	GPVTIAC	GLCTC	IVITVPI	KHNNT
mGluR4a	P1PIVLEWDS	PWAVL	PLFLAVG	IAATLV	FVVVT	FRVYND
mGluR6	PTPVVRL	TWSSP	WALPLLL	LAVL	IMATTT	IMATF
mGluR7a	NIPIIKLEW	SPWAV	LPVFLAM	GI	IATI	FVMTAT
mGluR8a	RPIIKLEW	SPWAV	LPVFLAM	GI	IATI	FVMTAT
: * : * : * : * : * : * : *						
mGluR1a	FMSAQV	IIASILIS	VLQTL	LVVTLI	IMEPPM	PILSYPSI
mGluR5a	FMSACQ	LVIAPI	ILICIQ	GLI	IVALF	IMEPPM
mGluR2	FISPAS	QVAIL	CLALIS	GGQL	LI	VAWLV
mGluR3	FISPSQ	VFIC	GLILVQ	IVMVS	VWVLI	LETGG
mGluR4a	FISPSQ	LAI	ITPILIS	GLLGI	CVMF	VVDPS
mGluR6	FISPTS	QLAVIT	IFGLS	QVGV	IAWL	GAQ
mGluR7a	LISPT	QLA	ITSS	ISQV	LLGV	IFW
mGluR8a	FISPAS	QLAVIT	IFGLS	QVGV	IAWL	GAQ
: * : * : * : * : * : * : *						
mGluR1a	KIITTC	PAVLS	VTVAL	GCMFT	PKMYII	IAKPERN
mGluR5a	KIITM	CFVLS	ATVAL	GCMFP	KVYII	IAKPERN
mGluR2	DYRVQ	TTC	MSVLS	SGSV	VLGCL	FAPK
mGluR3	DYRVQ	TTC	MSVLS	SGSV	VLGCL	FAPK
mGluR4a	DYRVQ	TTC	MSVLS	SGSV	VLGCL	FAPK
mGluR6	EKVIQ	TTC	MSVLS	SGSV	VLGCL	FAPK
mGluR7a	EKVIQ	TTC	MSVLS	SGSV	VLGCL	FAPK
mGluR8a	EKVIQ	TTC	MSVLS	SGSV	VLGCL	FAPK
: * : * : * : * : * : * : *						
mGluR1a	ACNQ	TA	VP	KPLK	YSYQ	SGKSL
mGluR5a	P	NQ	TA	VP	KPLK	YSYQ
mGluR2	PTSR	FGSA	PRAS	ANL	GGSG	SQV
mGluR3	HLN	R	F	SV	G	T
mGluR4a	SLK	AV	T	A	T	M
mGluR6	SLK	K	T	S	T	M
mGluR7a	SF	K	A	V	T	A
mGluR8a	SF	K	A	V	T	A
: * : * : * : * : * : * : *						
mGluR1a	GVVTF	PGSGI	PDF	HAVLAG	PGTPGNS	LRSLY
mGluR5a	SVVTR	PAN	S	ELNS	M	L
mGluR2	SV	S	G	S	S	V
mGluR3	SV	S	G	S	S	V
mGluR4a	SV	S	G	S	S	V
mGluR6	SV	S	G	S	S	V
mGluR7a	SV	S	G	S	S	V
mGluR8a	SV	S	G	S	S	V
: * : * : * : * : * : * : *						

Abbildung 3: Homologiegleich der mGluRs. Multipler Sequenzvergleich durchgeführt mit CLUSTAL W 1.81 (Thompson, 1994). Signalpeptide rot, 19 konservierte Cysteine blau, Transmembranregionen unterstrichen, intrazelluläre Domänen grün (Pin und Duvoisin, 1995). Römische Zahlen geben die sieben Transmembranbrücke an. Die drei intrazelluläre Schleifen sind mit i1 – 3 markiert.

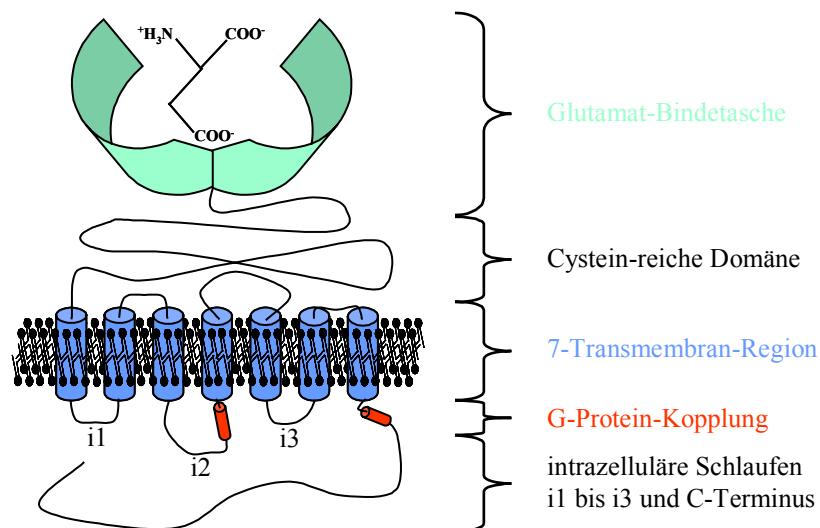


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines mGluRs (Pin und Duvoisin, 1995; Conn und Pin, 1997). Markiert sind die Bereiche mit besonders hoher Homologie zwischen den einzelnen mGluRs. In rot sind die Domänen gezeigt, die an der G-Protein-Kopplung beteiligt sind.

1.3.3. Die Gruppe III der mGluRs

Die Mitglieder der mGluRs der Gruppe III (vor allem mGluR4, -7 und -8) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Neurotransmission. Aktivierung dieser prä-synaptisch lokalisierten mGluRs führt zu einer Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung. Dies geschieht indirekt durch die Hemmung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und daraus resultierender Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration oder direkt durch Hemmung des Neurotransmissions-Apparates (Pin und Bockeaert, 1995; Pin und Duvoisin, 1995; Ikeda, 1996; Takahashi et al., 1996).

Zur Zeit sind je zwei Spleißvarianten (a- und b-Formen) von mGluR4, -7 und -8 bekannt. Die 23 Membran-nahen Reste der C-Termini von mGluR4a, -7a, -7b, -8a und -8b sind fast identisch; auch mGluR6 weist immerhin in den ersten 12 Aminosäuren noch eine fast 100%ige Homologie zu den oben genannten Spleißvarianten auf. Lediglich mGluR4b besitzt keinen homologen Bereich zu den C-Termini der anderen mGluRs der Gruppe III (siehe Abbildung 5). Die große Divergenz von mGluR4b zu den C-Termini anderen mGluRs resultiert aus einem unterschiedlichen Spleißverhalten. Im Falle von mGluR7a bzw. -8a werden nach dem homologen Bereich die C-terminalen 16 Aminosäuren durch 23 bzw. 16 alternative Reste über die Insertion eines Exons mit einem Stop-Kodon ausgetauscht. Dagegen wird im Falle von mGluR4a das gesamte DNA-Fragment, das den C-Terminus von mGluR4a kodiert, herausgespleißt, so dass ein

neuer C-Terminus entsteht. Dieser unterscheidet sich in Länge und Struktur wesentlich von den C-Termini der anderen mGluRs (Thomsen et al., 1997).

m4a	H	PEQ				NVPKRKRS LKAVVTAATMSNKFTQKGN
m4b			HIFPFC SWPSPAICPAPCPSSLS CPIPAIIFSSVPPRSHFLPAFPLLGF IHQLFHHVAKEKKKGGGES			
m6	H	PEQ				NVQKRKRS LKKTSTMAAP
m7a	H	PEL				NVQKRKRS FKAVVTAATMSSRLSHKPSD
m7b	H	PEL				NVQKRKRS FKAVVTAATMSSRLSHKPSD
m8a	H	PEQ				NVQKRKRS FKAVVTAATMQSKLIQKGN
m8b	H	PEQ				NVQKRKRS FKAVVTAATMQSKLIQKGN
m4a			FRPNGEAKSELCE	NLETP		ALATKQT YVTYT NHA I
m4b			PPTKKPKQKLILSVFRSAASSWWPVCPCGLQPARPPYPSAVCPARPPARLALPANDTEFSAWVFGDGL			
m6			PQNE	NAEDAK		
m7a			RPNGEAKTELCE	NVDPNS	P	AAKKKYVSYN NLVI
m7b			RPNGEAKTELCE	NVDPNN	C IPPVR	SVQKSVTWYT PPTV
m8a			RPNGEVKSELCE	SLETNT	S	STKTTYISYS DHSI
m8b			RPNGEVKSELCE	SLETNS	K	SSVDFQMVKS GSTS

Abbildung 5: Homologievergleich der zytosolischen C-Termini von Gruppe III

mGluRs. Homologe Bereiche zwischen mGluR4a, mGluR6, mGluR7a, mGluR7b, mGluR8a und mGluR8b sind in grün dargestellt. Nur mGluR4b weist keinen homologen Bereich auf und fällt besonders aufgrund seiner Prolin-reichen Sequenz und der Länge seines C-Terminus auf. Gezeigte Aminosäure-Positionen: mGluR4a 848-912, mGluR4b 848-983, mGluR6 840-871, mGluR7a 851-916, mGluR7b 851-923, mGluR8a 844-908, mGluR8b 844-908. Multipler Sequenzvergleich durchgeführt mit CLUSTAL W 1.81 (Thompson, 1994).

Die Mitglieder der Gruppe III der mGluRs sind vorrangig präsynaptisch lokalisiert (Shigemoto et al., 1997). Vor allem mGluR7a scheint besonders hoch an der aktiven Zone von Synapsen, also dem Ort der Exozytose, konzentriert zu sein. Die Immunreaktivität von mGluR7a ist besonders stark in sensorischen Bereichen wie dem piriformen Cortex und dem Colliculus superior, weniger stark in Hippocampus und dem Corpus striatum und kaum in Neocortex, Cerebellum, Pons und Medulla nachweisbar (Bradley et al., 1998). Die präsynaptische Kolo-kalisation von mGluR7a mit spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (Shigemoto et al., 1996) und die Tatsache, dass mGluR7 mit einer K_D von 1 mM nur eine geringe Affinität zu Glutamat aufweist, führte zur Hypothese, mGluR7a könne bei starker Aktivität der Synapse und der daraus folgenden hohen Glutamat-Konzentrationen im synaptischen Spalt die Neurotransmission hemmen (Shigemoto et al., 1996). Diese Vorstellung passt auch zu den beobachteten neuroprotektiven Eigenschaften von mGluRs der Gruppe III (Pizzi et al., 1996a; Pizzi et al., 1996b; Faden et al., 1997), da eine präsynaptische Verringerung der Glutamatfreisetzung zu einer Ver-

ringerung des Ca^{2+} -Einstromes in die Postsynapse führen würde. Gestärkt wird diese These zusätzlich durch Beobachtungen an mGluR7(a und b)-defizienten Mäusen, die aufgrund erhöhter Glutamatausschüttung zu epileptischen Anfällen neigen (Masugi et al., 1999). Neben der Reduktion von hochfrequenter Neurotransmission wurde in der CA1 Region des Hippocampus in mGluR7-defizienten Mäusen Kurzzeit-Potenzierung (short-term potentiation, STP) beobachtet (Bushell et al., 1999; Masugi et al., 1999). Somit scheint mGluR7a auch eine wichtige Rolle in Lernprozessen zu spielen, welche von kurz- bzw. längerfristigen Veränderungen in den Neurotransmissionseigenschaften von Neuronen (Kurzzeit- bzw. Langzeit-Potenzierung, long-term potentiation, LTP) begleitet zu sein scheinen.

In situ-Hybridisierungen zeigen die höchsten Konzentrationen von mGluR4-mRNA im Cerebellum (Saugstad et al., 1994; Ohishi et al., 1995). Motorische Störungen waren in mGluR4-defizienten Mäusen aber nicht zu sehen (Pekhletski et al., 1996). Statt dessen scheint auch dieser Rezeptor am Lernprozess beteiligt zu sein. Wie bei mGluR7 ist auch bei mGluR4-defizienten Mäusen die präsynaptische Hemmung der Neurotransmission verschwunden, wogegen sich eine Hemmung der post-tetanische Potenzierung beobachten lässt, eine Form von STP (Pekhletski et al., 1996). Experimente mit mGluR4-defizienten Mäusen zeigten eine Störung in der Verarbeitung räumlicher Informationen (Gerlai et al., 1998). Dies hängt wahrscheinlich mit der moderaten Expression von mGluR4 im Entorhinalen Cortex und im Gyrus dentatus zusammen, deren Projektionen am räumlichen Lernen beteiligt sind (Gerlai et al., 1998). Im Kortex wird mGluR4 fast ausschließlich in der CA2 Region des Hippocampus exprimiert (Phillips et al., 1997), wobei sich allerdings – wie bei den anderen Beobachtungen auch – nicht zwischen mGluR4a und mGluR4b unterscheiden lässt.

1.3.4. Ca^{2+} /CaM-abhängigen Regulation von mGluR7a

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit konnte in unserer Arbeitsgruppe das ubiquitäre Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin durch Bindungsstudien als Interaktionspartner von mGluR7a identifiziert werden. Durch Zugabe von CaCl_2 bzw. EGTA wurde gezeigt, dass nur aktiviertes CaM, also Ca^{2+} -gebundenes, in der Lage war, mit mGluR7a zu interagieren (O'Connor et al., 1999).

1.3.4.1. Ca²⁺/CaM-abhängige Proteinregulation

Der intrazelluläre Ca²⁺-Rezeptor Calmodulin (CaM) kommt in allen Eukaryonten vor und reguliert meist Ca²⁺-abhängig die Aktivität einer Vielzahl von Proteinen. Dieses 18 kD Protein ist unter allen Vertebraten 100% identisch auf Aminosäure-Ebene, wird von mehreren Genen kodiert und macht bis zu 1% des Gesamtproteins einer Zelle aus. Steigt die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration über 10⁻⁵ M, so binden vier Ca²⁺-Ionen an CaM. Dieser Ca²⁺/CaM-Komplex kann dann zahlreiche Effektorproteine binden und so verschiedene Signalkaskaden regulieren. CaM kann aber auch Ca²⁺-unabhängig mit einer Reihe von Proteinen interagieren. Generell ist die Affinität Ca²⁺-abhängiger CaM-Interaktionen aber höher als Ca²⁺-unabhängiger. Die K_D-Werte Ca²⁺-abhängiger CaM-Interaktionen liegen meist im Nanometer-Bereich, während die K_D-Werte Ca²⁺-unabhängiger CaM-Interaktionen bis in den µM-Bereich reichen können (Rhoads und Friedberg, 1997).

Die Kristallstruktur von CaM zeigt eine hantelartige Struktur (Babu et al., 1985; Babu et al., 1988), wobei das zentrale Verbindungsstück eine hohe Flexibilität aufweist (Barbato et al., 1992). CaM hat vier EF-Hand-Motive, die nach Ca²⁺-Bindung ihre Konformation ändern. EF-Hand-Motive bestehen aus je zwei α-Helizes, die über eine Ca²⁺ bindende Schleife verbunden sind (Yap et al., 1999) und ihre relative Position zueinander nach Ca²⁺-Bindung von einer parallelen, geschlossenen in eine senkrechte, offene Konformation ändern. Die Strukturänderung nach Ca²⁺-Bindung und der flexible Arm zwischen den beiden endständigen Ca²⁺-Bindedomänen ermöglichen CaM, seine Bindungsaffinität für eine Reihe von Proteinen in der Anwesenheit von Ca²⁺ wesentlich zu erhöhen. Durch Krümmung der zentralen Domäne um den Bindepartner nimmt CaM eine kompakte, globuläre Konformation ein. Für mehrere Bindepartner konnte dabei gezeigt werden, dass deren CaM-Bindedomänen α-Helizes bilden, die sich genau durch das kompakte CaM-Molekül durchschlängelt (Ikura et al., 1992; Meador et al., 1992, 1993).

Die CaM-Bindedomänen unterschiedlicher Interaktionspartner weisen keine besonders hohen Sequenzhomologien auf. Sie liegen oft in der Nähe von Phosphorylierungsstellen oder Interaktionsdomänen für andere Proteine und bilden meist eine etwa 20 Aminosäuren lange amphipatische α-Helix aus (Rhoads und Friedberg, 1997). Zur Zeit werden die CaM-Bindedomänen in vier Hauptklassen unterteilt, von denen eine Ca²⁺-unabhängig ist (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Klassifizierung verschiedener CaM-Bindemotive. Die Striche stehen für beliebige Aminosäuren (Rhoads und Friedberg, 1997; Ikura, 2000).

Motiv	Konsensussequenzen
1-14:	<p>1-5-8-14-Motiv (FILVW)---(FAILVW)--(FAILVW)----- (FILVW)</p> <p>1-8-14-Motiv (FILVW)----- (FAILVW)----- (FILVW)</p> <p>1-14-Motiv (FILVW)----- (FILVW)</p> <p>Hier werden 12 Aminosäuren von 2 größeren hydrophoben Aminosäuren (F, I, L, V oder W) flankiert. Die Nettoladung der 14mere liegt zwischen +3 und +6. Die CaM-Bindung ist Ca²⁺-abhängig. Beispiele für das Vorkommen solcher Motive sind Calcineurin und die NO-Synthase.</p>
1-10:	<p>1-5-10-Motiv --- (FILVW)--- (FAILVW)--- (FILVW)</p> <p>1-10-Motiv (FILVW)----- (FILVW)</p> <p>Hier werden 10 Aminosäuren von 2 größeren hydrophoben Aminosäuren flankiert. Die Nettoladung des Dekamers liegt zwischen +2 und +3. Die CaM-Bindung ist Ca²⁺-abhängig. Beispiele sind Synapsin und CAMKII (CaM-abhängige Kinase II).</p>
1-16:	<p>1-16-Motiv (FILVW)----- (FILVW)</p> <p>Dieses Motiv ist bislang nur in der CaM-abhängigen Kinase Kinase (CaMKK) gefunden worden (Osawa et al., 1999). Es werden 14 Aminosäuren von 2 größeren hydrophoben Aminosäuren flankiert. Die NMR-Struktur hat gezeigt, dass die Orientierung des Peptids zu der Orientierung der meisten anderen CaM-Interaktionen entgegengesetzt ist, da der N-Terminus des Peptids zum N-Terminus von CaM zeigt. Außerdem bildet das Ende des Peptids eine Schleife, sodass es mit sich selber interagieren kann.</p>
IQ:	<p>IQ-Motiv (IVL)Q---(RK)---(RK)</p> <p>Peptide mit diesem Motiv neigen zu einer Ca²⁺-unabhängigen CaM-Bindung, es gibt aber Ausnahmen. CaM bindet den L-Typ Ca²⁺-Kanal mittels eines IQ-Motivs und scheint diesen sowohl hemmen als auch aktivieren zu können (Zuhlke et al., 1999).</p>

Einige CaM-bindende Proteine scheinen aber keiner dieser Klassen anzugehören. Sie binden CaM vornehmlich in Ca^{2+} -Abhängigkeit. Beispiele sind CaMKIV (CaM-abhängige Kinase IV) und MARCKS (Myristoyliertes Alanin-reiches C-Kinase Substrat).

Obwohl in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse über CaM-Bindepeptide gewonnen wurden, lässt sich noch nicht vorhersagen, ob ein Protein, das alle oben genannten Bedingungen erfüllt, auch tatsächlich mit CaM interagiert. Sie helfen aber bei der Bestimmung der CaM-Bindedomäne innerhalb eines Proteins, das bekanntermaßen mit CaM interagiert.

Eine Möglichkeit der Regulation von CaM-Interaktionen stellt die Phosphorylierung der Bindepartner von CaM dar (Minakami et al., 1997; Rhoads und Friedberg, 1997; Corti et al., 1999). Diese Modifizierung führt zur Veränderung der Ladungsverteilung auf dem CaM-Bindepeptid und hat meist die Hemmung der CaM-Bindung zur Folge. Besonders häufig scheint die Proteinkinase C (PKC) bei der Regulation der CaM-Bindungen von Bedeutung zu sein, was wahrscheinlich am gemeinsamen Aktivator Ca^{2+} liegt.

Die verschiedenen Isoformen der PKC unterscheiden sich aufgrund ihrer Gewebeverteilung und ihrer Funktion. Während z. B. PKC α und δ ubiquitär vorkommen, werden PKC γ und η lediglich in bestimmten Geweben exprimiert, was auf unterschiedliche Funktionen schließen lässt (Dekker und Parker, 1994; Dekker et al., 1995). Sie alle bestehen aus einem einzigen Polypeptid, das sowohl eine katalytische wie auch eine regulatorische Untereinheit formt. In der inaktiven Konformation der PKC liegt ein Pseudosubstrat-Bereich der regulatorischen Untereinheit in der Substrat-Bindedomäne der katalytischen Untereinheit. Aktivierung durch Ca^{2+} , Diacylglycerin (DAG) und verschiedene Lipide wie Phorbolster führt zu einer Konformationsänderung, wobei sich der Pseudosubstrat-Bereich von der katalytischen Untereinheit entfernt und so die Übertragung von Phosphatgruppen auf spezifische Substrate erlaubt (Dekker und Parker, 1994). Da DAG membrangebunden ist, liegt die regulatorische Untereinheit der aktivierten PKC direkt an der Membran und bringt somit die katalytische Untereinheit in direkte Nachbarschaft zu membrangebundenen Substraten (Ng et al., 1999). Dies macht die PKC zu einem interessanten Kandidaten bei der Phosphorylierung von Membranproteinen wie z. B. Transmembranrezeptoren.

1.3.4.2. Die physiologische Relevanz der Ca^{2+} /CaM-abhängigen Regulation von mGluR7a

Um die physiologische Relevanz der CaM-Bindung von mGluR7a bei der Regulation der Neurotransmission näher zu untersuchen, waren in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Böhm (Universität Wien) mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik Ströme von hippokampalen, autaptischen Neuronen gemessen worden. Die durch Reizung der Präsynapse ausgelöste Freisetzung von Glutamat, die durch Ableitung auf der postsynaptischen Seite nachweisbar war, konnte in diesen Experimenten durch Zugabe von L-AP4, einem spezifischen Agonisten der Gruppe III mGluRs, ins Medium um etwa 30 bis 40% gehemmt werden (O'Connor et al., 1999). Zugabe der CaM-Antagonisten Ophiobolin A oder Calmidazolium führte zu einer Hemmung dieser Inhibierung der Neurotransmission (O'Connor et al., 1999). Zur Kontrolle wurde der Versuch durch Aktivierung präsynaptisch lokalisierter, CaM-unabhängiger α_2 -adrenerger Rezeptoren wiederholt. Die teilweise Inhibierung der Neurotransmission war hier nach Zugabe des CaM-Antagonisten Calmidazolium nicht verändert. Dies zeigt, dass die Inhibierung der Neurotransmission nicht generell CaM-abhängig ist, sondern dass CaM-Abhängigkeit spezifisch über Gruppe III mGluRs vermittelt wird (O'Connor et al., 1999).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Neben der genaueren Charakterisierung der Ca^{2+} -abhängigen Interaktion von CaM mit den verschiedenen Mitgliedern der Gruppe III der mGluRs und ihrer möglichen Regulation durch die Proteinkinase C sollte in dieser Arbeit mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems und biochemischer Methoden nach weiteren Interaktionspartnern dieser Rezeptoren gesucht werden. Von diesen Experimenten wurden weitere Aufschlüsse über die Mechanismen der präsynaptischen Lokalisation und die Signalkaskaden präsynaptischer mGluRs erhofft. Neben mGluR7a, einem typischem Vertreter der mGluRs der Gruppe III, wurde dabei besonderes Augenmerk auf mGluR4b gelegt, da dieser Rezeptor aufgrund seiner Länge und Struktur eine Sonderstellung unter den mGluRs dieser Gruppe einnimmt.

2. Materialien

2.1. Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (APB), Biomol, Boehringer Mannheim, Difco, Fluka, Hoechst, Gibco-BRL, Merck, New England Biolabs (NEB), Serva, Sigma, Riedel-de Haen, Roth und USB bezogen. In der Regel wurden Chemikalien höchsten Reinheitsgrades (*pro analysi*) verwendet. Spezielle Verbrauchsmaterialien wurden von Amersham Pharmacia, Becton-Dickinson, Eppendorf, Falcon, Greiner, Sarstedt und Schleicher und Schüll bezogen.

CO ₂	Messer Griesheim
Instant-Magermilchpulver	Reformhaus
γ^{32} [P]-ATP	Amersham Pharmacia
Photomaterialien	Agfa und Kodak
Protease Inhibitor Cocktail Complete®	Boehringer Mannheim

2.1.1. Enzyme

alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim
Desoxyribonuklease I	Sigma
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	Boehringer Mannheim
Restriktionsenzyme	Boehringer Mannheim
Taq DNA-Polymerase (hitzestabile DNA-Polymerase)	Gibco BRL
T4 DNA-Ligase	Boehringer Mannheim

2.1.2. Kits

ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer Applied Biosystems
SuperSignal Substrate Western Blotting	Pierce
Qiagen Plasmid Kits (Mini, Midi, Maxi)	Qiagen
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiagen PCR Purification Kit	Qiagen
TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega

2.1.2.1. Puffer und Lösungen für Plasmid-Isolierungen nach Qiagen

Puffer 1	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
Puffer 2	NaOH	200 mM
	SDS	1% (w/v)
Puffer 3	Kaliumacetat, pH 5,5	3 M
Puffer QC	MOPS, pH 7,0	50 mM
	NaCl	1 M
	Ethanol	15% (v/v)
Puffer QF	Tris/HCl, pH 8,5	50 mM
	NaCl	1,25 M
	Ethanol	15% (v/v)
Puffer QBT	MOPS, pH 7,0	50 mM
	NaCl	750 mM
	Ethanol	15% (v/v)

2.1.3. Allgemeine Puffer und Lösungen

5x DNA-Ladepuffer	Glyzerin	50% (v/v)
	EDTA	1 mM
	Bromphenolblau Xylencyanol, pH 7,0	0,01% (w/v)
10x PBS	NaCl, pH 7,4	1,75 M
	NaH ₂ PO ₄	18,6 mM
	Na ₂ HPO ₄	84,1 mM
10x SDS	SDS	10% (w/v)
10x TBE	Tris/HCl, pH 8,0	1 M
	Borat	890 mM
	EDTA	25 mM
10x TE	Tris/HCl, pH 7,5	100 mM
	EDTA	10 mM
EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH 8,0	1 M
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid (IPTG), steril filtriert	1 M
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), gewünschter pH-Wert wird mit HCl eingestellt	1 M

2.1.3.1. Nährmedien und Lösungen für Bakterien- und Hefekulturen

10x Dropout-Lösung	L-Adenin	200 mg/l
	L-Arginin	200 mg/l
	L-Isoleuzin	300 mg/l
	L-Lysin	300 mg/l
	L-Methionin	200 mg/l
	L-Phenylalanin	500 mg/l
	L-Threonin	2000 mg/l
	L-Tyrosin	300 mg/l
	L-Urazil	200 mg/l
Ampizillin-Lösung	Ampizillin	100 µg/ml
Chloramphenicol-Lösung	Chloramphenicol in Ethanol	30 µg/ml
Glukose-Lösung	Glukose	40% (w/v)
Histidin-Lösung	L-Histidin	4 mg/ml
Kanamyzin-Lösung	Kanamyzinsulfat	50 µg/ml
LB (Luria Bertani)-Agar	Bacto-Agar (in LB-Flüssigmedium)	15 g/l
LB-Flüssigmedium	Bacto-Trypton	10 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl in H ₂ O, pH 7,5	10 g/l
Leuzin-Lösung	L-Leuzin	4 mg/ml
SD-Minimalmedium	Hefestickstoffbase ohne Aminosäuren H ₂ O, pH 5,8 nach Autoklavierung:	6,7 g/l ad 850 ml/l
	10x Dropout-Lösung	100 ml
	Glukose-Lösung	50 ml
	3-Amino-1,2,4-triazol	25 mM
SD-Agar	Bacto-Agar (in SD-Minimalmedium)	20 g/l
Tryptophan-Lösung	L-Tryptophan	4 mg/ml
Urazil-Lösung	L-Urazil	4 mg/ml
YPD-Vollmedium	Pepton	20 g/l
	Hefeextrakt	10 g/l
	H ₂ O nach Autoklavierung:	ad 950 ml/l
	Glukose-Lösung	50 ml
YPD-Agar	Bacto-Agar (in YPD-Vollmedium)	18 g/l

(Alle Medien wurden für 20 min bei 121°C autoklaviert)

2.1.3.2. Nährmedien und Lösungen für eukaryotische Zellkulturen

2x BBS	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonat (BES)	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O, pH 6,95	1,5 mM

Minimum Essential Medium (MEM)-Kulturmedium	MEM fötale Kalbsserum Glutamin Penicillin/Streptomycin	500 ml 10% (v/v) 1% (w/v) 1% (v/v)
PSA-Ca ²⁺	NaCl KCl CaCl ₂ x 2 H ₂ O NaHCO ₃ Glukose	150 mM 5 mM 0,1 mM 3 mM 5 mM
Trypsin-Lösung	Trypsin (in MEM-Kulturmedium)	1% (w/v)

2.1.4. Puffer und Lösungen für das Zwei-Hybrid-System

Hefe-Lysis-Puffer	Tris/HCl, pH 8,0 SDS Triton X-100 NaCl EDTA	10 mM 1% (w/v) 2% (w/v) 100 mM 1,0 mM
PCI-Lösung	Phenol Chloroform Isoamylalkohol	50% (v/v) 48% (v/v) 2% (v/v)
TE/LiAc-Lösung	Liziumacetat (in 1x TE)	100 mM
PEG/LiAc-Lösung	PEG 4000 Liziumacetat in 1x TE	40% (w/v) 100 mM
X-Gal-Lösung	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl-β-D-Galactosid (X-Gal) (in Dimethylformamid)	20 mg/ml
Z-Puffer	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O KCl MgSO ₄ x 7 H ₂ O, pH 7,0	16,1 g/l 5,5 g/l 0,75 g/l 0,246 g/l
Z-Puffer/XGal-Lösung	Z-Puffer β-ME X-Gal-Lösung	100 ml 0,27 ml 1,67 ml

2.1.5. Puffer und Lösungen für PAGE und Western-Blots

10x Laemmli-Puffer	Tris-Base Glycin SDS	0,25 M 1,92 M 1% (w/v)
Block-Puffer	BSA Fraktion V Instant Magermilchpulver Tween 20 in 1x PBS	abhängig von Anti- körper

Coomassie-Lösung	Coomassie R 250	0,1% (w/v)
	Methanol	50% (v/v)
	Acetat	10% (v/v)
Entfärber-Lösung	Ethanol	50% (v/v)
	Acetat	10% (v/v)
Lower Tris-Puffer	Tris/HCl, pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,4% (w/v)
Ponceau S-Lösung	Ponceau S	0,2%
	Trichloressigsäure	3% (v/v)
SDS-Ladepuffer	SDS	2% (w/v)
	Glyzerin	10% (v/v)
	Bromphenolblau	0,001% ^(w/v)
	Tris/HCl, pH 6,75	62,5 mM
	(β-ME)	(5% (v/v))
Transferpuffer	Methanol (in 1x Laemmli-Puffer)	20% (v/v)
Upper Tris-Puffer	Tris/HCl, pH 6,8	0,5 M
	SDS	0,4% (w/v)
Weichmacher-Lösung	Ethanol	10% (v/v)
	Glyzerin	5% (v/v)

2.1.6. Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenzmikroskopie

Fixier-Lösung	Paraformaldehyd (in 1x PBS), pH 7,4	4% (v/v)
Antikörper-Inkubationslösung	BSA Fraktion V	abhängig
	Triton X 100 in 1 x PBS, pH 7,4	von Anti- körper
Mowiol-Lösung	Mowiol	2,4 g
	Glycerin	6 g
	Tris/HCl, pH 8,5	2 ml
	H ₂ O	ad 6 ml

2.2. Nukleinsäuren

2.2.1. Plasmide

prokaryotische Expressionsvektoren	pGEX-5X1	Pharmacia
	pMAL-c2	NEB
eukaryotische Expressionsvektoren	pBlueskript SK (-) (pBS)	Stratagene
	pBlueskript II KS (+) (pBSII)	Stratagene
	pBK-CMV	Stratagene
	pcDNA3.1 (+)	Invitrogen
	pcDNA4/HisMax C	Invitrogen
	peGFP-C2	Clontech

Vektoren des Zwei-Hybrid-Systems	pGILDA	Origene
	pJG4-5	Origene
	pSH18-34	Origene
	pSTD-BD	Stratagene
	pACT2	Stratagene

2.2.2. Oligonukleotide

Tabelle 3: In der Arbeit verwendete Oligonukleotide. Es sind jeweils die Bezeichnung der Oligonukleotide und ihre Sequenz in 5' → 3' Richtung angegeben. A, Herstellung der mGluR-C-Termini. B, Amplifikation und Sequenzierung von Fragmenten aus dem Zwei-Hybrid-System. C, Herstellung von Punktmutationen. D, Herstellung des Vollängen-Konstrukts pBK-CMV-flag-mGluR7a. E, Herstellung des Vollängen-Konstrukts pcDNA3.1-myc-mGluR4b. Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG Biotech bezogen.

	Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung
A	m7a,s	GAGAATTCCACCCTGAACTCAATGTCCAG
	m7a,as	CTGTCGACTTAGATAACCAGGTTATTATA
	m7aC27,s	GCGAATTCCCTGTCACACAAACCCAG
	m7N25,as	GCGTCGACTTACCTCGATGACATGGTG
	m7aΔCaM,s	GCGAAGCTTCTCACACAAACCCAGTGACAG
	m7aS862A,s	GCGAATTCCACCCTGAACTCAATGTCCAGAAACGGAAGCGAGACTTCAAGGCCG TAG
	m4a,s	CGGAATTCCACCCGGAGCAGAACGTGCCC
	m4a,as	TGCGGTCGACCTAGATGGCATGGTTGG
	m4b,s	GCGAATCCCATATTTTTTCCATTCTGCTCC
	m4b,as	GCGTCGACTCAGAGACCATCACAAACA
	m6,s	GCGAATTCCATCCAGAGCAGAACGTAC
	m6,as	GCGTCGACCTACTTGGCGTCCCTCTGCG
	m8a,s	CGGAATTCCATCCAGAGCAGAACGTTCAA
	m8a,as	TGCGGTCGACTCAGATTGAATGATCACTGTAGC
	m8b,as	GCGTCGACAGCACCTTCCCTTCAGATGGT
	m8aC40,s	GCGAATTCCCTGATCCAAAAGGGAAATGA
B	pAD,s	CGTCAGCAGAGCTTCACC
	pAD,as	CTGAGTGGAGATGCCTCC
	SGT,s	AGCGGATCCGACTACAAGGACGACGATGACAAGGAATTCGACAACAGGAAGCGC C
	SGT,as	GCGCGAATCCTCACTCTTGCTGCTCCTCGTG
	PxF,s	AGCGGATCCGACTACAAGGACGACGATGACAAGGAATTCGCGGCCGCTGAGGAA GG
	PxF,as	GCGCGGATTCTCACATGATCAGACACTGCT

C	phos23,s	GCCACCATGGCATCGAGGCTGGCACACAAACCCAGTGACAGGCC
	phos23,as	GGGCCTGTCACTGGGTTTGTGTGCCAGCCTCGATGCCATGGTGGC
	phos34,s	GCCACCATGTCATCGAGGCTGGCACACAAACCCGCTGACAGGCC
	phos34,as	GGGCCTGTCAAGCGGGTTTGTGTGCCAGCCTCGATGACATGGTGGC
	phos234,s	GCCACCATGGCATCGAGGCTGGCACACAAACCCGCTGACAGGCC
	phos234,as	GGGCCTGTCAAGCGGGTTTGTGTGCCAGCCTCGATGCCATGGTGGC
	phos24,s	GCCACCATGGCATCGAGGCTGTCACACAAACCCGCTGACAGGCC
	phos24,as	GGGCCTGTCAAGCGGGTTTGTGTGACAGCCTCGATGCCATGGTGGC
D	mGluR7,flag,s	GGCGGCGCGCGGCCAGGAGATGTACGCCCCGCACGACTACAAGGACGACGATGA CAAGTCGATCCGGATCGAGGGGG
	mGluR7,flag,s	GTCCAGGATCCGCGCGCCT
	mGluR7,NT,s	GACGAGCTCGAATTCATGGTCCAGCTGGGGAAGC
	mGluR7,NT,as	TGATGGAGACGGAGCTCCCCGAAGC
E	m4HindIII,s	TTGGAAGCTTCCGAAATGTCCGGAAGGG TCAGAGCCACGGCCGTGGACGGGAAACAGGCCTCCCAGTGTGATGTCCCCGTCA ATTCCGATAGACAGGTCCCTCGCTGATCAGCTTCTGCTCTCCGCCGTTTCATG TGGGGGTGACCC
	m4myc,as	
	m4KpnI,s	CTGCACCGGGTACCAGT
	m4KpnI,as	GGTCCACTTGGTACTGGTAC
	m4bAccI,s	GCTCTACATGCCCAAAGTCTACATCATCCTCTTCCATATTTTTCCATTCTGCTC
	m4bEcoRI,as	GCGAATTCTCAGAGACCATCACCAAACA

2.2.3. cDNA-Banken

Gal4	“Rat Brain Matchmaker cDNA Library” 4,0 x 10 ⁶ unabhängige Klone in pGAD10 Inserts: 1,7 kb Durchschnitt (0,6 bis 7,0 kb)	Clontech
LexA	“DupLEX-A Yeast Two-Hybrid System Library” 4,0 x 10 ⁶ unabhängige Klone in pJG4-5 Inserts: 1,3 kb Durchschnitt	Origene

2.2.4. Weitere Nukleinsäuren

Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Boehringer Mannheim
DNA-Längenstandarts	Boehringer Mannheim
Lachssperma-DNA	Sigma
T7,s	MWG Biotech
T7,as	MWG Biotech

2.2.5. Herstellung der eingesetzten Konstrukte

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Konstrukte wurden nach der Klonierung durch Sequenzierung verifiziert.

Die C-Termini der Gruppe III mGluRs und abgeleitete Deletionskonstrukte wurden mit Hilfe von PCRs und dem Einsatz der Oligonukleotide aus Tabelle 3A generiert und über *Eco* RI- und *Sal* I-Schnittstellen in die Vektoren pGEX, pMAL, pGilda bzw. pSTD-BD kloniert.

Die Konstrukte, in denen die putativen Phosphorylierungsstellen im C-Terminus mGluR7a durch Punktmutationen ausgetauscht sind, wurden durch drei sequenzielle PCRs generiert. Bei den ersten beiden unabhängigen PCRs kamen je zwei komplementäre, die Mutationen kodierende Oligonukleotide aus Tabelle 3C und die entsprechenden sense- (m7a,s) und antisense-Oligonukleotide (m7a,as) zum Einsatz. Die sich überlappenden Produkte dieser Reaktionen wurden in der zweiten PCR als Oligonukleotide eingesetzt. Das Endprodukt wurde über *Eco* RI- und *Sal* I-Schnittstellen in pGEX kloniert.

Die im LexA-Screen identifizierten Proteine SGT und PxF wurden mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide aus Tabelle 3B und der gefischten cDNA amplifiziert und über *Bam* HI-Schnittstellen in die Vektoren pGEX, peGFP, pcDNA3.1 bzw. pcDNA4/His kloniert.

Der Volllängenrezeptor flag-mGluR7a wurde in mehreren Schritten aus pBS in pBK-CMV umklont und dabei mit einem Flag-Epitop markiert (Abbildung 6). Zunächst wurde ein *Eco* RI/*Hind* III-Fragment aus pGEX-mGluR7a (C-Terminus von mGluR7a in pGEX) durch ein anderes Fragment aus pBS-mGluR7a (Volllängenkonstrukt in pBS) ausgetauscht. Über *Eco* RI/*Sal* I-Schnittstellen wurde das so neu zusammengesetzte Konstrukt in pBK-CMV, einen eukaryotischen Expressionsvektor, kloniert. Zur Insertion des Flag-Epitops wurde mit Hilfe der PCR ein Fragment generiert und anschließend über *Bst* XI-Schnittstellen mit der Wildtyp-Sequenz ausgetauscht (rot in Abbildung 6). Da dieses Konstrukt eine schlechte Expression in eukaryotischen Zellen aufwies (hier nicht gezeigt), wurde mit Hilfe von PCR und anschließendem Austausch des Fragmentes über *Sac* I-Schnittstellen (grün in Abbildung 6) eine 5'-nicht translatierte Sequenz (5'-untranslated region, 5'-UTR) herausgeschnitten. Der flag-markierte Volllängenrezeptor mGluR7a liegt somit zwischen *Sac* I/*Sal* I-Schnittstellen in pBK-CMV vor.

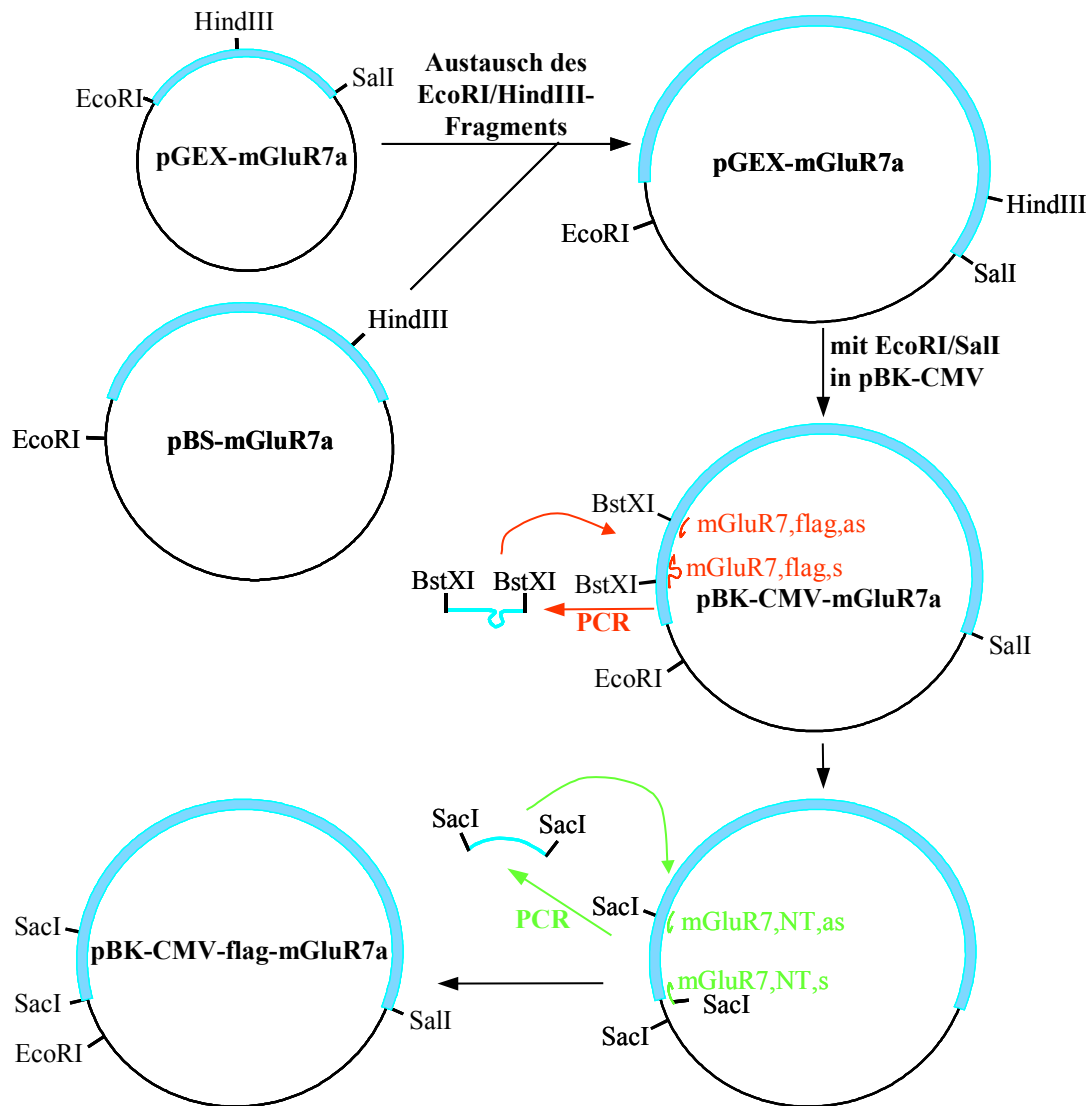


Abbildung 6: Generierung von pBK-CMV-flag-mGluR7a. Bei der Umklonierung aus pBS in pBK-CMV wurde der Vollängenrezeptor mGluR7a mit einem Flag-Epitop markiert (rot) und zur besseren Expression von einer 5'-UTR befreit (grün).

Die Herstellung von pcDNA3.1-myc-mGluR4b lief über zwei unabhängig generierte Hälften, die durch eine Trippelligation letztlich über *Hind III/Kpn I/Eco RI*-Schnittstellen in pcDNA3.1 kloniert wurden. Die N-terminale Hälfte entstand durch zwei sequenzielle PCRs, wobei mit der ersten das myc-Fragment eingebracht wurde (rot). Die C-terminale Hälfte des Rezeptors wurde zunächst komplett aus pBS-mGluR4 (entspricht der Spleißvariante a) über *Kpn I/Eco RI*-Schnittstellen in pBSII kloniert. In einem zweiten Schritt wurde der C-Terminus von mGluR4a durch den durch PCR generierten C-Terminus (grün) von mGluR4b über *Acc I/Eco RI*-Schnittstellen ersetzt.

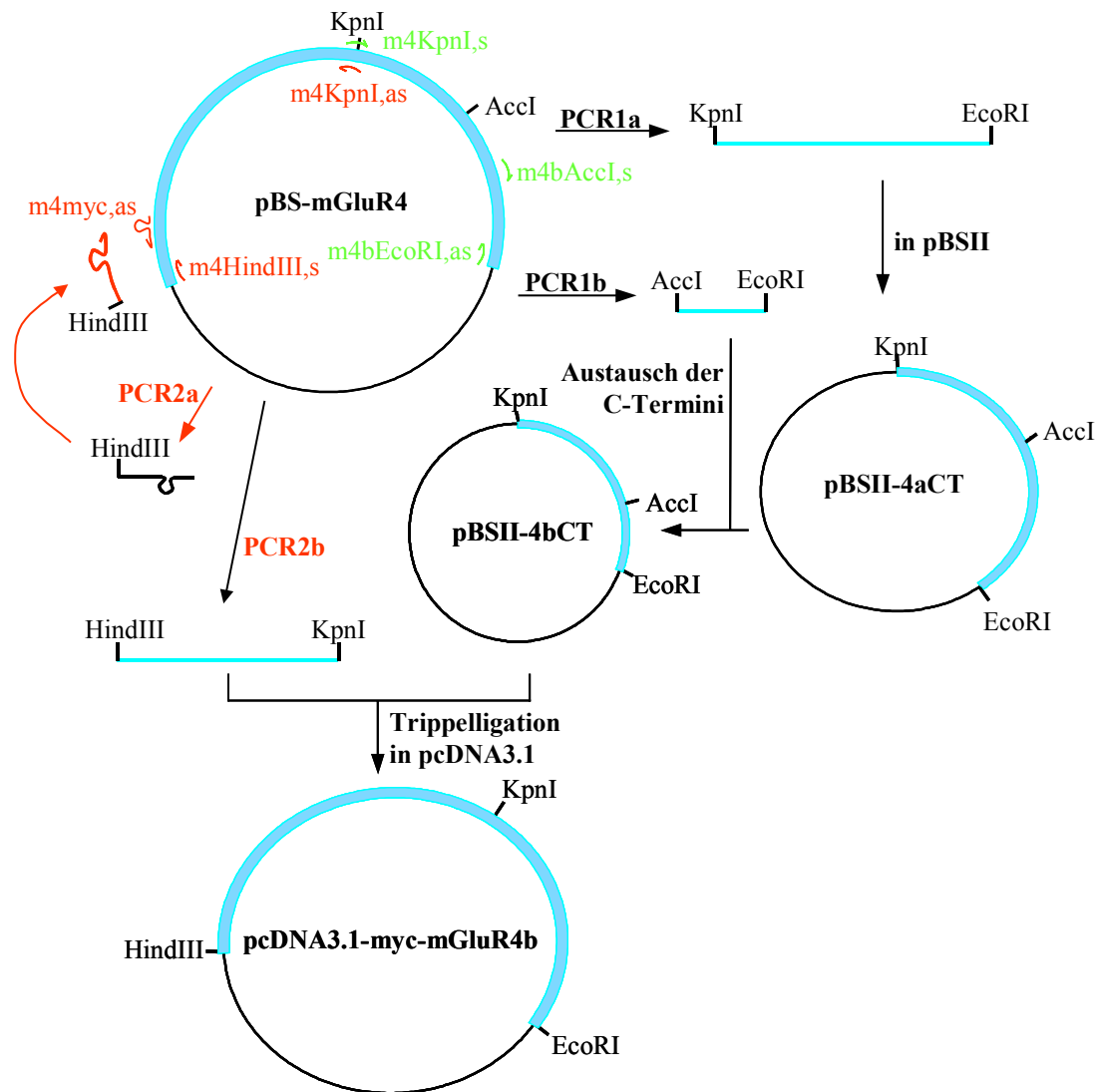


Abbildung 7: Herstellung von pcDNA3.1-mGluR4b. Über eine Reihe von PCRs entstand die N-terminale (rot) und die C-terminale Hälfte (grün) des Rezeptors. Beide Fragmente wurden durch Trippelligation in pcDNA3.1 kloniert.

2.3. Antikörper

ABP	α GST	Antikörper gegen α GST, Kaninchen
Clontech	α GFP	Antikörper gegen α GFP, Kaninchen
Dianova	polyklonaler Peroxidase (HRP)- α Kaninchen IgG	Antikörper gegen Kaninchen-IgG, Ziege
Mabtec	Alexa Flour 488- α Maus-Immunglobulin G (IgG)	Flour 488-gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG, Ziege (grüne Fluoreszenz)
	Alexa Flour 594- α Maus-IgG	Flour 594-gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG, Ziege (rote Fluoreszenz)
NEB	α MBP	Antikörper gegen α MBP, Kaninchen
Santa Cruz	α myc	monoklonaler Antikörper gegen myc-Epitop, Maus

Sigma α flag monoklonaler Antikörper gegen flag-Epitop, Maus

2.4. Organismen

E. coli XL-1 Blue *supE44 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) recA1 endA1 gyrA 46 Stratagene
thi relA1, lac-F'[proAB⁺ *lacI*^q *lacZ*D_{M15},
Tn10(tet^r)]*

E. coli BL21 B F⁻ *dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻)gal* Stratagene

Y190 MAT α , *ura3-52, his3-200, lys 2-801, ade2-101, Clontech
trp1-901, leu2-3,112, gal4 Δ , gal80 Δ , cyh^r2,
LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3,
URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ*

EGY48 MAT α , *trp1, his3, ura3, Leu2::6, LexAop-LEU2* Origene

HEK (human embry- American Type Culture Collection (ATCC)- ATCC
onic kidney) 293-Zellen Nummer: CRL-1573

3. Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden, sofern nicht anders beschrieben, nach Sambrook et al. (Maniatis, 1982) durchgeführt.

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen

Eine über Nacht in LB-Medium angezogene Bakterienkultur wurde in 1 l desselbigen Mediums auf $OD_{600} = 0,2$ verdünnt und erneut in einem Bakterieneschüttler bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen der exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,6 - 0,7$) wurde die Zellsuspension auf Eis für 30 min abgekühlt, die Bakterien durch Zentrifugation bei 5.000 g und 4°C für 15 min sedimentiert und durch kräftiges Schütteln in 500 ml eiskaltem, sterilem H_2O resuspendiert. Es folgten drei weitere Waschschrirte in 250 ml eiskaltem H_2O , dann in 50 ml 10% (v/v) autoklaviertem, eisgekühltem Glycerin. Letztlich wurden die Zellen in 5 ml Glycerinlösung aufgenommen. Die elektrokompetenten Bakterienzellen wurden in 100 μl Aliquots schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.1.2. Transformation elektrokompetenter Zellen

Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation mit dem "Gene Pulser" (BioRad) in die Bakterien eingebracht. Dazu wurde die gefrorene Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut, mit maximal 2 μl Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationskuvette (Eurogentech) transferiert. Nach erfolgter Elektroporation bei einer Spannung von 2,5 kV wurden die Bakterienzellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 30 bis 45 min bei 37°C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation der Bakterien bei 5.000 g für 1 min und anschließender Resuspension in ca. 100 μl LB-Medium wurden die Bakterienzellen auf LB-Agar, dem das selektionierende Antibiotikum zugesetzt war, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.3. Transformation hitzekompetenter Zellen

Hitzekompetente Bakterienzellen wie der BL21-Stamm von *E. coli* wurden nach dem Hitzeschock-Verfahren transformiert. Ein 100 μl gefrorenes Bakterienaliquot wur-

de auf Eis aufgetaut, in ein vorgekühltes 15 ml Polypropylen-Gefäß transferiert und mit 8,9 μ l 14,2 M β -ME versetzt. Nach vorsichtiger Durchmischung wurde das Reaktionsgefäß für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann mit 100 ng Vektor-DNA versetzt, erneut vorsichtig durchmischt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte für 45 sec bei 42°C. Nach einer Inkubation von 2 min auf Eis wurden die Bakterienzellen in 0,9 ml LB-Medium aufgenommen, für 1 h bei 37°C in einem Rotationsschüttler inkubiert und danach auf LB-Agar-Platten mit selektionierendem Antibiotikum ausgestrichen.

3.1.4. Glyzerinstammkulturen von Bakterien

Zur längerfristigen Lagerung von Bakterien wurde Aliquots einer Übernachtskultur unter sterilen Bedingungen in 40 % (v/v) Glyzerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.1.5. Plasmidpräparation aus Bakterienzellen

Die Isolation hochgereinigter Plasmid-DNA wurde mit den DNA-Isolationskits der Firma Qiagen durchgeführt. Die Aufreinigung basierte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und anschließender Anionenaustauscherchromatographie. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

3.1.6. Plasmid-DNA Isolation durch alkalische Lyse

Die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA für Kontrollanalysen wurde mit alkalischen Lyse und anschließender Ethanol-Fällung durchgeführt. Aus 1 ml einer Übernachtskultur wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 5000 g für 10 s pelletiert und in 150 μ l Puffer 1 aufgenommen. Die Zellen durch Zugabe von 200 μ l Lysispuffer aufgeschlossen und durch mehrmaliges Invertieren durchmischt. Nach der Zugabe von 150 μ l Neutralisationslösung und erneuter Durchmischung wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 20.000 g für 3 min sedimentiert. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand zu 1 ml 100% Ethanol gegeben, 2 min bei RT inkubiert und 1 min bei 20.000 g abzentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml 70% Ethanol aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Nach erneuter Dekantierung des Überstandes wurde das Pellet in der Speed-Vac getrocknet und in 10 μ l H₂O gelöst.

3.1.7. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration sowie der Kontaminationsgrad der Probe mit Proteinen wurde mit 1:100 verdünntem DNA-Ansatz photometrisch in einem Photometer (Beckman) bestimmt. Die Extinktionmessung in einer Quarzküvette bei 260 nm erlaubt die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration., wobei eine OD_{260} von 1 ca. 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA entspricht. Das Verhältnis der Messung bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) liefert einen guten Anhaltspunkt über die Kontamination der Probe mit Proteinen. Bei einem Verhältnis unter 1,8 ist die Probe mit Proteinanteilen kontaminiert.

3.1.8. Restriktionsfragmentanalyse

Für die Restriktion eines Plasmids wurden 1 μg DNA mit 1 bis 3 U Restriktionsenzym und dem entsprechenden Puffer des Herstellers versetzt. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur.

3.1.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsansätze wurden DNA-Fragmente zur weiteren Klonierung mit einem Skalpell aus dem Gel isoliert. Die Isolation der DNA-Fragmente aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des "Gel-Extraction-Kits" (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

3.1.10. Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Um die Religation linearisierten Vektors zu verhindern, wurde das für die Ligation benötigte 5'-Phosphat der doppelsträngigen DNA mit Hilfe der alkalische Phosphatase entfernt. Für die Dephosphorylierung wurden etwa 3 μg linearisierter Vektor (etwa 1 pmol freie Enden eines 3 kb Fragments) mit 1 U Enzym nach den Angaben des Herstellers angesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde das Enzym durch eine anschließende Inkubation bei 65°C für 20 min inaktiviert.

3.1.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die hitzestabile DNA-Polymerase des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus* verwendet. In einem 0,5 ml

Reaktionsgefäß wurden 50 ng Template-DNA, PCR-Puffer (GIBCO BRL), 0,2 mM jedes dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, je 10 pmol Sense- und Antisense-Oligonukleotide und 2,5 U der Taq-DNA-Polymerase in 50 bzw. 100 µl Endvolumen vermischt und die anschließenden Reaktionszyklen in einem "Thermo-Cycler" (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Parameter der einzelnen Inkubationsschritte wurden dabei wie folgt gewählt:

- o Denaturierung: 35 min, 94°C
 - o Denaturierung: 45 sec, 94°C
 - o Hybridisierung: 1 min, T_m (s.u.)
 - o Elongation: 1,5 min, 72°C
 - o Elongation: 10 min, 72°C
- } 30 Zyklen

Die Hybridisierungstemperatur ermittelte sich aus der Schmelztemperatur T_m der Primer, die aus der Formel:

$$T_m = 4 \cdot (G + C) + 2 \cdot (A + T) \quad (1)$$

errechnet werden konnte. Die Schmelztemperatur repräsentiert die maximale Hybridisierungstemperatur.

3.1.12. PCR-Mutagenese

Punkt-Mutationen, Insertionen oder Deletionen wurden mit Hilfe der PCR-Technik generiert. Endständige Punktmutationen wurden durch PCR mit Mutagenese-Oligonukleotiden eingeführt, die entsprechende Änderungen der Nukleinsäuresequenz kodierten. Zur Einführung größerer Insertionen oder Deletionen wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass in deren 3'-Bereich mindestens 25 Nukleotide der Template-cDNA komplementär waren, wohingegen der 5'-Bereich Insertionen wie Restriktionsschnittstellen, Kozak-Sequenz, Startkodon und evtl. Epitop trug. Der Antisense-Primer hierzu wurde so gewählt, dass er zu der Sequenz einer singulären Restriktionsschnittstelle des Templates komplementär war und so zur späteren Klonierung Insertionsstellen lieferte.

Die Hybridisierungstemperatur der Primer wurde nur aus dem komplementären DNA-Fragment abgeleitet.

3.1.13. Klonierung von PCR-Fragmenten

Das PCR-Reaktionsprodukt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, das PCR-Fragment isoliert und mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Menge des benötigten Enzyms wurde dabei aus dem Verhältnis der Anzahl x der Schnittstellen im PCR-Produkt und der Anzahl y der Schnittstellen im Phagen λ ermittelt:

$$\frac{U \text{ Enzym}}{\mu\text{g Fragment}} = \frac{48.502 \cdot x}{\text{Fragment} \cdot y} \quad (2)$$

Abschließend wurden die geschnittenen PCR-Fragmente mit dem „PCR-Purification-Kit“ (Qiagen) aufgereinigt und für die Ligation eingesetzt.

3.1.14. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T₄-DNA-Ligase (GIBCO BRL) eingesetzt. Bei der Insertion eines DNA-Fragmentes in einen Vektor sollte die Insert-Menge die des Vektors etwa 10fach überwiegen. Die DNA-Fragmente wurde mit 1 U Enzym nach den Angaben des Herstellers entweder für 1 bis 6 h bei RT oder, bei Insertionen größer als 2 kb, über Nacht bei 17°C inkubiert.

3.1.15. Sequenzanalyse von DNA

Zur endgültigen Verifizierung einer Klonierung wurde die Nukleinsäure nach dem Didesoxyverfahren mit einem automatischen Sequenziergerät (Applied Biosystem 373A DNA Sequencer) analysiert. Die Sequenzierreaktion, die mit einem Sequenzier-Kit (DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer) angesetzt wurde, sowie die anschließende Aufreinigung der Proben erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.2. Biochemische Arbeitsmethoden

3.2.1. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentrationen von Proteinextrakten wurden mittels dem „DC-Proteinassay“ (BioRad) nach einer Methode ähnlich der von Lowry bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Anfertigung einer Eichge-

raden wurde analog die Absorption einer definierten Konzentration von BSA, das in dem jeweiligen Puffer vorlag, in einem Titertek MCC340 Elisa-Reader gemessen.

3.2.2. Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen

Die bakterielle Überexpression einer cDNA oder eines cDNA-Fragments erfolgte nach dessen Klonierung in den Vektor pGEX-4T1 (Pharmacia Biotech) zur Herstellung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen bzw. in pMAL-c2 (NEB) zur Herstellung von Maltose bindenden Protein (MBP)-Fusionsproteinen und der Transformation in den Protease-defizienten *E. coli*-Stamm BL21.

Eine Übernachtskultur wurde auf $OD_{600} = 0,2$ herunterverdünnt und auf $OD_{600} = 0,8$ unter kräftigem Schütteln bei 37°C hochgezogen. Nach Zugabe von $0,2\text{ mM}$ Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) wurde die Kultur für weitere 4 bis 5 h inkubiert. Nach dem Ernten durch Pelletieren bei 4.000 upm für 10 min wurden die Bakterien in Aufschlußpuffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,6) aufgenommen und die Zellen bei 4°C in der "French Press" bei einem Druck von 500 psi aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 1 h bei 4°C über Kopf rotierend inkubiert und anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 20.000 g von groben Zelltrümmern und Membranen befreit. Nach einer anschließenden Ultrazentrifugation bei 100.000 g und 4°C wurde der Überstand aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Expression und Löslichkeit der exprimierten Proteine konnten auf PAGE-Gelen sichtbar gemacht werden.

3.2.3. Affinitätschromatographische Aufreinigung von GST- bzw. MBP-Fusionsproteinen

Eine elegante Methode zum Nachweis von Proteininteraktionen ist die Kopräzipitation eines Interaktionspartners mit an einer Matrix immobilisierten Proteinen. Für die Kopräzipitation bakteriell exprimierter Proteine wurden die zu untersuchenden Proteine an GST bzw. MBP fusioniert. Diese Fusionsproteine können an eine Glutathion-Sepharose-4B-Matrix (Pharmacia) bzw. eine Amylose-Matrix (NEB) hoch affin binden und mit gelöstem Glutathion bzw. Maltose wieder eluiert werden. Durch Inkubation eines möglichen Interaktionspartners mit einem immobilisiertem Fusionsprotein kann eine spezifische Interaktion beider Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 8).

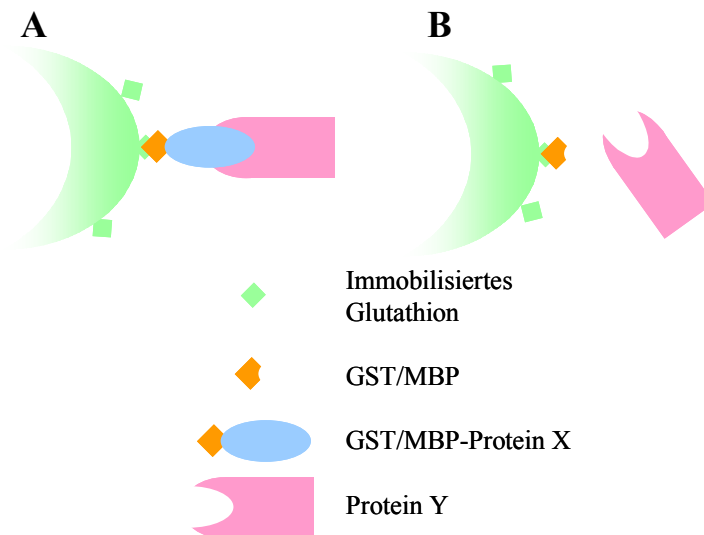


Abbildung 8: Prinzip einer Kopräzipitation mit bakteriell exprimiertem GST/MBP-Fusionsprotein. A, Ein GST- bzw. MBP-fusioniertes Protein X wird an eine Glutathion- bzw. Maltose-Matrix immobilisiert. Protein Y kann nun bei Bindung an Protein A kopräzipitiert werden. B, Bei Immobilisierung von GST bzw. MBP allein als Negativkontrolle kann Protein Y nicht an die Matrix binden und wird nicht kopräzipitiert.

Hierzu wurden 20 μl einer 75%igen Glutathion-Sepharose-Suspension bzw. einer 50%igen Amylose-Suspension, die nach den Angaben der Hersteller in Puffer equilibriert wurde, mit 100 bis 500 μl des zytosolischen Extrakts für 1 h bei 4°C über Kopf rotiert. Nach dreimaligem Waschen in kaltem Puffer wurden die immobilisierten GST/MBP-Fusionsproteine für Bindungsstudien verwendet.

3.2.4. Kopräzipitation bakteriell exprimierter Fusionsproteine mit GST/MBP-Fusionsproteinen

Zur Kopräzipitation von GST-Fusionsproteinen und MBP-Fusionsproteinen wurden je 100 μl Proteinlösung der GST- und MBP-Fusionsproteine in 500 μl Gesamtvolumen (20 mM Hepes-KOH, pH 7,0, 100 mM KCl, 0,2 mM β -ME) für 4 h bei 4°C inkubiert. Zu den Lösungen wurde anschließend 10 μl Glutathion-Sepharose bzw. 15 μl Amylose gegeben und für weitere 2 h inkubiert. Nach zwei Waschstufen in obigem Puffer mit 2 mM ATP und 10 mM MgCl_2 und drei weiteren ohne ATP/ MgCl_2 wurden die acht Pellets in je 100 μl 2x- SDS-Ladepuffer gelöst. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend durch Coomassie-Färbung (Überprüfung der eingesetzten Proteinmengen) bzw. Western-Blot mit α MBP- bzw. mit α GST-Antikörpern detektiert.

3.2.5. Kopräzipitation eukaryotisch exprimierter Proteine mit GST/MBP-Fusionsproteinen

Die Zellen von zehn 10cm-Kulturschälchen wurden 10 min bei 500 upm pelletiert und in 2 ml Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, Protease Inhibitor Cocktail Complete® und 1% Triton-X-100) resuspendiert. Nach 2 min Vortexen bei 4°C zur Zellyse und 1 h Inkubation über Kopf bei 4°C wurden die Zelltrümmer durch 45 min Zentrifugation bei 45.000 upm pelletiert. Der Überstand mit den solubilisierten Proteinen wurde gleichmäßig zu immobilisiertem GST, GST-mGluR7a oder GST-mGluR7aAAA gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Puffer wurde die Glutathion-Sepharose in SDS-Ladepuffer resuspendiert, auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und anschließend im Western-Blot analysiert.

3.2.6. Test auf CaM-Bindung eines GST- bzw. MBP-Fusionsproteins

Die CaM-Bindung eines bakteriell exprimierten GST- bzw. MBP-Fusionsproteins erfolgte nach zwei unterschiedlichen Methoden: durch Immobilisierung der Fusionsproteine und anschließende Kopräzipitation von gereinigtem CaM oder durch Präzipitation der Fusionsproteine an CaM-Agarose. Im ersten Fall wurden 10 µg gereinigtes CaM mit an 10 µg Glutathion-Sepharose bzw. 15 µg Amylose immobilisierten Fusionsproteinen für 1 h bei 4°C in 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, Protease Inhibitor Cocktail Complete®, 0,2 % (w/v) Triton-X-100 und 2 mM CaCl₂ bzw. 5 mM EGTA im Rotationsschüttler inkubiert. Bei der Präzipitation der Fusionsproteine an CaM-Agarose wurden 100 bis 200 µl zytosolischen Extrakts der Fusionsproteine mit 10 µl CaM-Agarose in gleichem Puffer inkubiert. Nach mehreren Waschschritten in Puffer ohne Triton-X-100 wurden die Proteine in SDS-Ladepuffer gelöst und in einem 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.7. Test auf Gβγ-Bindung eines GST-Fusionsproteins

Die Versuche zur Gβγ-Bindung von GST-Fusionsproteinen wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. M. Freissmuth durchgeführt. Hierzu wurden je 30 mg GST-m7a bzw. GST als Negativkontrolle in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 8 mM CHAPS und 10 mM GTP mit einem CHAPS-solubilisiertem Proteinogenat aus Schweinehirn in einem Gesamtvolumen von 140 µl für 1 h bei 30°C inku-

biert. Nach drei Waschschritten wurden die Proteine in 30 mM Glutathion eluiert, durch PAGE aufgetrennt und mit Antiserum 7 (unspezifischer G β -Antikörper) im Western-Blot detektiert (O'Connor et al., 1999).

3.2.8. Koimmunpräzipitation von kotransfizierten Proteinen aus HEK 293-Zellen

Die Zellen von sechs 10 cm-Kulturschälchen wurden wie unter 3.2.5 in 1,5 ml Puffer solubilisiert und durch Ultrazentrifugation von den groben Zellfragmenten gereinigt. Zur Bestimmung der Löslichkeit der solubilisierten Proteine wurden je 20 μ l des Überstandes zu SDS-Ladepuffer ohne β -ME gegeben, 30 min bei RT inkubiert, auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und auf Nitrozellulose transferiert. Für die Koimmunpräzipitation wurden je 700 μ l der verbleibenden Proteinlösung über Nacht mit dem Erstantikörper bzw. einem unspezifischen Antikörper als Negativkontrolle inkubiert. Nach Zugabe von je 20 μ l Protein-A/G-Sepharose, die über Nacht mit 5% BSA in PBS geblockt wurde, und Inkubation für eine weitere Stunde wurde die Sepharose 5 mal mit PBS gewaschen, ebenfalls in SDS-Ladepuffer ohne β -ME resuspendiert und wie obige Proben analysiert.

3.2.9. Herstellung von Zellhomogenaten

Transfizierte HEK-293 Zellen in 10 cm Gewebekulturschalen wurden nach 36 h für Bindungsanalysen homogenisiert. Dazu wurden die konfluenten Zellen mit 5 ml 1 x PBS (RT) gewaschen und in 1 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (1 x PBS, Protease Inhibitor Cocktail Complete®, 0,2% (v/v) TritonX100) aufgenommen. Zum Zellaufschluß wurden die Zellen 2 min gevortext, größere Membranfragmente und Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 1.000 g für 2 min sedimentiert, und anschließend der Überstand für 1 h über Kopf rotiert. Die dabei solubilisierten Proteine, sowie die zytoplasmatischen Komponenten, wurden durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 45 min von größeren Partikeln getrennt. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde für anschließende Präzipitationsanalysen verwandt.

3.2.10. Herstellung von Hirnhomogenaten

Zur Extraktion von Proteinen aus dem Hirn adulter Ratten wurden tiefgefrorene Hirne in dem 5fachen Volumen des Frischgewichts mit eiskaltem Homogenisierungs-

puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, Protease Inhibitor Cocktail Complete®) auf Eis in einem Homogenisator bei 800 upm bis zur Homogenisierung des Gewebes zerkleinert. Durch anschließende Zentrifugation bei 1.000 g für 3 min bei 4°C wurden größere Zellfragmente sedimentiert. Der Überstand wurde mit 1 % Triton-X100 (v/v) versetzt und für 1 h bei 4°C über Kopf rotiert. Solubilisierte membranständige Proteine und zytoplasmatische Proteine wurden durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 1 h bei 4°C von ungelösten Membranfragmenten getrennt. Dieses kombinierte Gewebehomogenat wurde bis zur Verwendung kontinuierlich auf Eis gehalten.

3.2.11. Bindungsstudien mittels Kopräzipitation

Immobilisierte Fusionsproteine wurden mit den angegebenen Gewebe- bzw. Zellhomogenaten verschiedener Fraktionen über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 2.000 g für 1 min bei 4°C wurde die Matrix mit gebundenen Proteinen vom Überstand getrennt. Die Matrix wurde im 10fachen Matrixvolumen in Bindungspuffer gewaschen und erneut bei 2.000 g für 1 min pelletiert. Nach dreimaligem Wiederholen des Waschschritts wurden die Matrix-gebundenen Proteine, sofern nicht anders angegeben, in SDS-Probenpuffer eluiert. Die Proteine der Eluate, der Überstände und Anteile des eingesetzten Homogenats wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und immunologisch oder durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht.

3.2.12. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gelelektrophoretische Analysen erfolgten im diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli in Polyacrylamidgelen. Für das Trenngel wurde 0,25x Lower-Tris-Puffer mit 30% (w/v) Acrylamid/0,8% (w/v) N,N,-Methylen-bisacrylamidlösung zur erwünschten Acrylamid-Endkonzentration versetzt, mit H₂O auf das Endvolumen gebracht und zum Auslösen der Polymerisation mit 0,025% (w/v) Ammoniumpersulfat sowie mit 0,002% bis 0,003% (v/v) TEMED versetzt. Zur Herstellung des 4,5%igen Sammelgels wurde mit 0,25x Upper-Tris-Puffer und H₂O die 30% (w/v) Acrylamid/0,8% (w/v) N,N,-Methylen-bisacrylamidlösung auf 4,5%ige Endkonzentration gebracht und zum Starten der Polymerisation 0,01% (w/v) Endkonzentration Ammoniumpersulfat (APS) und 0,003% (v/v) Endkonzentration N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED) hinzugegeben. Die Proben wurden in Probenpuffer mit oder ohne 5% (v/v) β-

Mercaptoethanol aufgenommen. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Proben vor dem Auftrag für 3 min bei 96°C zusätzlich denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in Laemmli-H Elektrophoresepuffer bei 25 mA für "Minigele" (7 x 10 cm) und bei 55 mA für "Midigele" (12 x 17 cm). Zur Größenbestimmung wurden 7 µl Proteinmarker in einer Spur des Gels aufgetragen.

3.2.13. Färbung von SDS-Proteingelen

Zur direkten Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurden die Gele für 30 min in Coomassie-Lösung inkubiert und der ungebundene Farbstoff durch 30 minütige Inkubation in Entfärberlösung und anschließender Inkubation über Nacht in Weichmacherlösung herausgewaschen. Die gefärbten Gele kamen in eine Spannapparatur zwischen angefeuchteter Einweckfolie und wurden so durch Lufttrocknung konserviert.

3.2.14. Transfer und Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose (Western-Blot)

Zur immunologischen Detektion wurden die getrennten Proteine auf Nitrozellulosemembranen in Transferpuffer in einer Feuchtblotkammer (BioRad) elektrophoretisch überführt. Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 1 mA/cm² Gel für 1 bis 2 h. Die Nitrozellulosemembran wurde für 5 min in Ponceau S-Lösung getaucht und so die transferierten Proteine nach Spülen mit H₂O sichtbar gemacht. Die Größenmarker wurden mit einem wasserfesten Stift nachgezogen.

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Transfer der Proteine in Block-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Konzentration von BSA und Milchpulver hing dabei vom eingesetzten Antikörper ab und schwankte von 1% bis 5% (w/v). Die Detektion erfolgte mit einem in Block-Puffer verdünntem primären Antikörper für 1 h bei RT, wobei die Konzentration von der Spezifität des Antikörpers abhing. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch wiederholtes Waschen in PBS bzw. PBST für je 10 min entfernt. Ein weiterer Inkubationsschritt erfolgte mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Zweitantikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet war, in einer 1:10.000 Verdünnung in PBB für 45 min. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion des Zweitantikörpers durch eine Chemolumineszenz-Reaktion der Peroxidase, die mit Hilfe des ECL-Systems (Pierce) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

3.2.15. Phosphorylierungsreaktionen

0,25 mg immobilisierte Fusionsproteine wurden über Nacht in 100 μ l Phosphorylierungspuffer [50 mM MES pH 6,0, 12,5 mM $MgCl_2$, 1,25 mM EGTA, 0,125 mM γ [^{32}P]-ATP (3000 cpm/pmol), 10 ng PKM (Boehringer Mannheim)] bei 30°C inkubiert. Die phosphorylierten Proteine wurden nach 2 Waschschritten in SDS-Ladepuffer eluiert und auf ein 12% SDS-Proteingel aufgetragen. Die getrockneten Gele wurden auf Kodak BioMax MR-1 Film autoradiographisch analysiert.

3.2.16. Präzipitationen mit *in vitro*-translatierten Proteinen

Bei der *in vitro*-Translation werden Proteine während der Translation im extrazellulärem System durch Zugabe einer radioaktiven Aminosäure markiert und sind so leicht durch Autoradiographie detektierbar. Die Reaktion wurde mit dem Retikulozyten-System der Firma Promega durchgeführt. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Zur Verifizierung der Translation wurde 1 μ l der translatierten Proteine auf ein 10%iges Polyacrylamid-Gel geladen, welches getrocknet autoradiographisch analysiert wurde. Für die Kopräzipitation von *in vitro*-translatiertem Proteinen mit GST- bzw. MBP-Fusionsproteinen wurde 10 μ l *in vitro*-translatierte Proteinlösung mit an 10 μ l Glutathion-Sepharose bzw. 15 μ l Amylose immobilisiertem Fusionsprotein in 45 μ l Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM KCl, 0,2 mM Triton-X-100, Protease Inhibitor Cocktail Complete®) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden zwei mal mit Puffer höherer Ionenkonzentration (25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl) mit 1% BSA und 0,2% Triton-X-100 und anschließend drei mal ohne gewaschen, in SDS-Ladepuffer gelöst, auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gele geladen und anschließend autoradiographisch detektiert.

3.3. Elektrophysiologische Ableitung von K_{ir} -Kanälen im Oozyten-System

Zur Bestimmung der Funktionalität verschiedener punktmutierter Rezeptorkonstrukte wurden diese in der Arbeitsgruppe von Dr. A. Karschin mit $K_{ir3,1/3,2}$ -Kanälen („einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle“) in Oozyten koexprimiert und hinsichtlich ihrer Aktivität elektrophysiologisch untersucht (Wischmeyer et al., 1997; Karschin, 1999). Da K_{ir} -Kanäle durch $G\alpha_{O/I}$ aktiviert zu einem messbaren, einwärtsgerichtete K^+ -Strom führen,

lassen sie sich zur Bestimmung der Funktionalität der kotransfizierten Rezeptorkonstrukte nutzen.

3.4. Zellbiologische Methoden

3.4.1. Haltung von Nierenzellkulturen

Menschliche embryonale Nierenzelllinien (HEK-293) wurden in 10 ml MEM-Kulturmedium unter Zusatz von 10 % (v/v) fötalem Kalbsserum, 1 % (w/v) Glutamin und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5 % CO₂/Luftgemisch in 10 cm Schalen kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit geringerer Zelldichte in neue Kulturschalen passagiert. Dafür wurden die adhärenenten Zellen in 5 ml Ca²⁺/PSA gewaschen und anschließend mit 1 ml 1%iger Trypsin-Lösung versetzt. Nach etwa 3-minütiger Inkubation bei RT wurden die abgelösten Zellen im Verhältnis 1:4 mit Kulturmedium verdünnt und je 1 ml dieser Zellsuspension zum erneuten Auswachsen in 10 ml auf 37°C vorgewärmtes Kulturmedium gegeben.

3.4.2. Transfektion von Nierenzellkulturen

Zur heterologen Expression rekombinanter Proteine wurden die HEK-293 Zellen mit Plasmid-DNA nach der Kalzium-Phosphat-Präzipitationsmethode transfiziert. Für die Transfektion einer halbkonfluenten 10 cm Kulturschale wurden 0,3 ml 1 M CaCl₂ mit 1,0 ml H₂O versetzt und 10 µg Plasmid-DNA hinzugegeben. Zur Ausbildung eines Präzipitats wurde diese Lösung nochmals mit 1,25 ml auf 37°C vorgewärmtes 2x BBS gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit 7,5 ml Kulturmedium auf 10 ml Endvolumen gebracht und auf die Zellen appliziert, die anschließend bei 37°C und 3% CO₂ über Nacht inkubiert wurden. Am folgenden Tag wurde das Transfektionsmedium entfernt, die Zellen mit Ca²⁺/PSA gewaschen und mit frischem Kulturmedium genährt. Die Zellen wurden zur Expression der Proteine für weitere 24 h bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

3.5. Immunzytochemie

Die zelluläre Lokalisation von heterolog exprimierten Proteinen wurde in HEK-293 Zellen immunzytochemisch bestimmt. Dazu wurde die konfluenten HEK-293 Zel-

len einer 10 cm Gewebekulturschale mit 1 ml Trypsinlösung von der Schale gelöst. 200 µl dieser Lösung wurden zu 13 ml Medium gegeben und gut vermischt. Anschließend wurden je 0,5 ml davon auf sterile Glasplättchen in "24-well Schalen" (d = 2 cm) passagiert und für 48 h im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Die adhären-ten Zellen wurden mit 500 ng Plasmid-DNA/well nach der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode transfiziert und nach weiteren 48 h angefärbt.

3.5.1. Färbung von GFP transfizierten Zellen nach Paraformaldehyd-Fixierung

Mit einem GFP-Konstrukt transfizierte Zellen wurden zum Erhalt der grünen Fluoreszenz mit Paraformaldehyd fixiert. Dazu wurden die transfizierten Zellen mit kaltem PBS gewaschen und für 7 min in 500 µl 4% (w/v) Paraformaldehyd unter dem Abzug fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift in 1 ml kaltem PBS wurden die Deckgläschen in einer Hybridisierungsküvette mit 50 mM NH₄Cl für 20 min inkubiert. Nach den folgenden drei Waschschriften in kaltem PBS wurden freie Bindungsstellen durch eine 30minütige Inkubation in 4% BSA (w/v) in PBS blockiert. Zwischenzeitlich wurde eine feuchte Kammer aufgebaut, in die 25 µl des primären Antikörpers vorgelegt waren. Nach vorsichtigem Abtupfen wurden die Deckgläschen in eine feuchte Kammer auf 25 µl einer Antikörpersuspension (Erstantikörper mit 4% (w/v) BSA und 0,13% (w/v) Triton-X100 (1:1.000) in PBS) gelegt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem anschließenden dreimaligen Waschvorgang in kaltem PBS wurde die zelltragende Oberseite der Deckgläschen mit dem Zweitantikörper im Dunkeln für 2 h bei RT inkubiert. Nach einigen letzten Waschschriften in PBS von mindestens 45 min wurden die fixierten Zellen in H₂O getaucht, abgetupft und mit Mowiol (Hoechst) auf Objektträger aufgezogen. Die Präparate wurden bei -20°C gelagert.

3.5.2. Färbung nach Methanol/Eisessig-Fixierung

Diese Fixierungsmethode war aufgrund der besseren Zellhaftung der oben beschriebenen vorzuziehen und wurde deshalb für die Fixierung von Zellen eingesetzt, die kein GFP-Protein exprimierten.

Die adhären-ten Zellen wurden in 200 ml eines im Trockeneisbad gekühlten Methanol/Eisessig-Gemisches (95% (v/v) Methanol, 5% (v/v) Eisessig) für 5 min fixiert, vollständig luftgetrocknet und für 20 min in Blockpuffer (4% (w/v) BSA in PBS) inku-

biert. Die Deckgläschen wurden 3 mal für 5 min in PBS gewaschen und mit dem Erstantikörper in Blockpuffer in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen von 3 mal 5 min in PBS wurde mit dem Zweitantikörper analog verfahren. Die abschließenden Schritte erfolgten wie bereits 3.5.1 beschrieben.

3.6. Das Zwei-Hybrid-System

Das Zwei-Hybrid-System (Fields und Song, 1989) ermöglicht, Interaktionen zwischen zwei beliebigen löslichen Proteinen in Hefezellen zu testen. Die DNA-Bindungs- und die RNA-Polymerase II-Aktivierungsdomänen eines Transkriptionsfaktors (Gal4 bzw. LexA) werden voneinander getrennt, so dass zwei eigenständige, räumlich voneinander getrennte funktionelle Proteine entstehen (Buratowski et al., 1988). Durch die Interaktion eines an die DNA-Bindungsdomäne fusionierten Köder-Proteins mit einem weiteren, an die Aktivierungsdomäne fusionierten Proteins wird der funktionelle Transkriptionskomplex rekonstituiert, der nun in der Lage ist, die Transkription von Reportergenen zu induzieren. In diesem Falle wird die Transkription der Reportergene für die Produktion von Histidin (HIS3) bzw. Leuzin (LEU2) zur Komplementierung einer Auxotrophie des eingesetzten Hefestamms und von β -Galaktosidase (lacZ) induziert, was zu einer Blaufärbung der Zellen führt. Das Zwei-Hybrid-System kann zur Identifizierung neuer Interaktionspartner für ein bekanntes Protein aus einer ganzen DNA-Bank oder zur Verifizierung einer Interaktion zweier bekannter Proteine eingesetzt werden.

In dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Zwei-Hybrid-Systeme zum Einsatz. Die prinzipielle Funktionsweise des Gal4-Zwei-Hybrid-Systems (Stratagene) und des LexA-Zwei-Hybrid-Systems (Origene) ist die gleiche. Beide Systeme unterscheiden sich dennoch in einigen wichtigen Punkten (Tabelle 4). Im Gal4-System werden das Köder-Protein in den Vektor pSTD-BD, das die DNA-Bindedomäne kodiert, und das Fisch-Protein in den Vektor pACT2, das die Aktivierungsdomäne kodiert, kloniert und in den Hefestamm Y190 transformiert, wonach die Synthese beider Fusionsproteine sofort einsetzt (siehe Abbildung 9). Nur wenn beide Proteine in den Zellkern transportiert werden und dort interagieren, kann es zu einer Bindung an die Gal4-Promotoren vor den Reportergenen lacZ und HIS3 kommen, die im Genom des Hefestammes integriert sind.

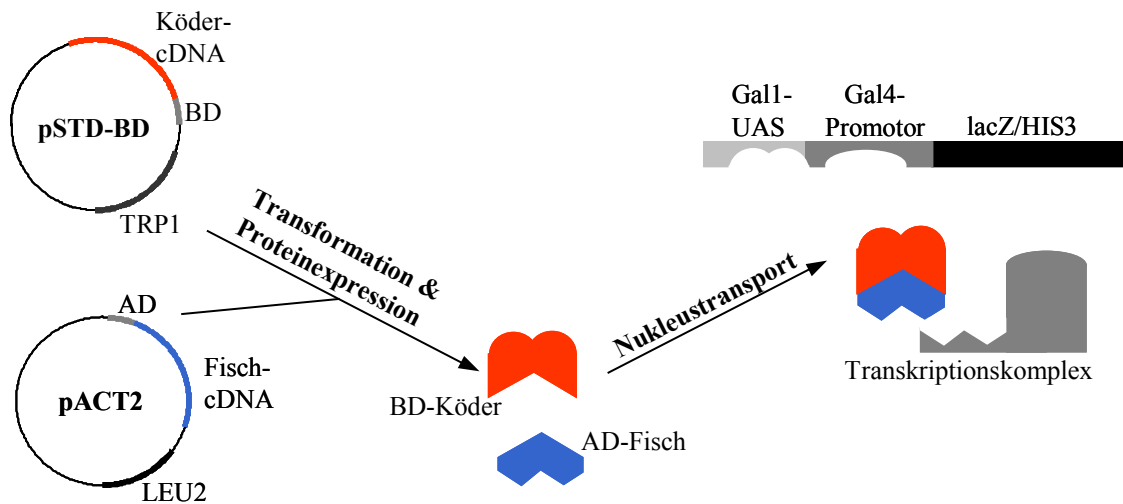


Abbildung 9: Das Gal4-Zwei-Hybrid-System. Köder- und Fisch-Protein werden sofort nach der Transformation transkribiert. Bei Interaktion beider Proteine im Zellkern kommt es zu einer Bindung an die Gal4-Promotoren vor den Reportergenen *lacZ* und *HIS3*, die im Genom des Hefestammes integriert sind.

Im LexA-System werden das Köder-Protein in den Vektor pGilda und das Fisch-Protein in den Vektor pJG4-5 kloniert und zusammen mit dem Vektor pSH18-34, der das Reportergen *lacZ* kodiert, in den Hefestamm EGY48 transformiert (siehe Abbildung 10). Da sowohl Binde- wie Aktivierungsdomäne Gal1-Promotoren haben, ist die Transkription der Fusionsproteine mit Glukose hemm- und mit Galaktose induzierbar. Die transformierten Hefezellen replizieren daher zunächst auf Glukose-haltigem Medium die transformierten Vektoren zu einer hohen Replikationszahl und transkribieren die Fusionsproteine, welche die Vektorsequenzen kodieren, erst nach Umplattieren der Zellen auf Galaktose-haltiges Medium. Da sowohl Binde- wie Aktivierungsdomäne Kerntransportsequenz tragen, ist eine Translokation der Fusionsproteine in den Zellkern wahrscheinlich. Dies lässt sich mit Hilfe eines genetischen Tests verifizieren. Er führt nach Transformation in die Hefezellen zu einer Aktivierung des Reportergens *lacZ*, welches durch Bindung des Köder-Fusionsproteins im Zellkern gehemmt wird. Interagieren beide Proteine im Zellkern, so bindet der Transkriptionsfaktor die LexA-Operatoren der Gal1-Promotoren und induziert die Aktivierung der Reportergene *lacZ* und *LEU2*. Letzterer liegt im Genom der Hefezellen.

Das LexA- hat gegenüber dem Gal4-System einige Vorteile. So stammt der Transkriptionsfaktor LexA aus dem Bakterienstamm *E. coli*, wogegen Gal4 aus Hefe stammt (Tabelle 4). Dies hat zum Vorteil, dass weniger falsch positive Klone auftreten, da der bakterielle Transkriptionsfaktor weniger mit dem Wirtsorganismus interagiert.

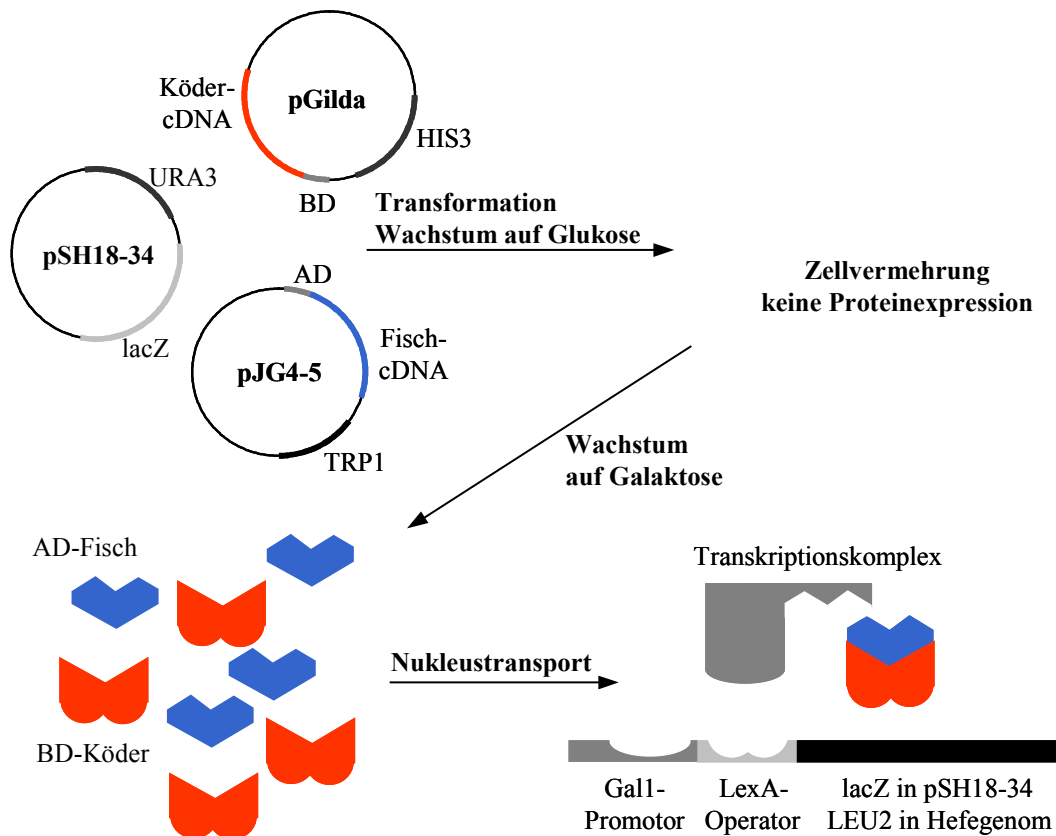


Abbildung 10: Das LexA-Zwei-Hybrid-System. Die Fusionsproteine werden erst nach Induktion mit Galaktose transkribiert. Bei einer Interaktion beider Proteine im Zellkern induziert der Transkriptionsfaktor die Aktivierung der Reportergene lacZ (im Vektor pSH18-34 kodiert) und LEU2 (im Genom der Hefezellen kodiert).

Ein weiterer großer Vorteil ist die Induzierbarkeit der Expression der Fusionsproteine. Da bereits vor der Proteinexpression große Mengen an Vektor-DNA vorliegen, werden sofort nach Induktion der Zellen große Mengen an Fusionsproteinen hergestellt. Im Falle einer Interaktion der untersuchten Proteine kommt es daher zu einer schnellen und starken Blaufärbung der Zellen. Dies erlaubt die Identifizierung einer positiven Kolonie, auch wenn es sich um für Hefe toxische Proteine handelt und die Kolonie die Induktion solcher Proteine nicht lange überleben wird. Ein weiterer Vorteil des LexA-Systems ist, dass das Reportergen lacZ nicht wie im Gal4-System im Hefegenom integriert ist, sondern es sich auf einem Vektor befindet, der in den Zellen repliziert wird. So können mehrere Gene gleichzeitig aktiviert werden, und es kommt zu einer schnelleren und stärkeren Bildung von β -Galaktosidase. Der letzte Vorteil des LexA-Systems ist die Integration einer Kerntransportsequenz in das Köder-Fusionsprotein und die Möglichkeit, die Translokation des Proteins in den Zellkern mittels eines einfachen genetischen Tests zu überprüfen. So ist ein Vorhandensein des Proteins im Zellkern gewährleistet, was eine Voraussetzung für die Aktivierung der Reportergene ist.

Tabelle 4: Unterschiede zwischen dem Gal4- und dem LexA-Zwei-Hybrid-System. Letzteres weist Vorteile auf, die besonders bei toxischen Köderproteinen wichtig sind.

Unterschiede	Gal4	LexA
Herkunft des Transkriptionsfaktors	aus Hefe	aus <i>E. coli</i>
Induzierbarkeit der Transkription	nein	ja
Replikation des Reportergens lacZ	nein	ja
Test auf Nukleustransport	nein	ja

3.6.1. Transformation von Hefezellen

Die Generierung kompetenter Hefezellen und deren Transformation mit einem Plasmid zur Expression eines bestimmten Proteins erfolgte nach einem modifiziertem Protokoll der Firma Clontech.

Eine Übernachtskultur wurde auf OD₆₀₀ von 0,3 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei 1.000 upm pelletiert und in 25 ml TE resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 100 µl TE/LiAc resuspendiert. Zu den Zellen wurde ein Mix aus je 0,1 µg zu transformierende DNA und 0,1 mg Carrier-DNA gegeben, die zuvor 10 min bei 96°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt worden war. Nach Zugabe von 0,6 ml PEG/LiAc wurde der Ansatz gevortext und dann 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 70 µl DMSO zugegeben und die Zellen 15 min bei 42°C unter leichtem Schütteln hitzegeschockt. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis gekühlt, die Zellen 5 s bei 14.000 upm pelletiert, in 100 µl TE gelöst und auf eine Platte mit geeignetem Minimalmedium ausplattiert.

3.6.2. Test auf Transaktivierung eines exprimierten Fusionsproteins

Unter Transaktivierung versteht man die Aktivierung der Reportergene des Zwei-Hybrid-Systems durch ein einzelnes Protein, also ohne dass Köder- und Fischhybridproteine miteinander zu wechselwirken brauchen. Typische transaktivierende Proteine sind zum Beispiel einige Transkriptionsfaktoren. Um ein Protein auf Transaktivierung zu testen, wurde eine dieses Protein exprimierende Kolonie von einer Platte gepickt und in 100 µl H₂O gelöst. Je 50 µl wurden nun auf eine Platte mit Minimalmedium mit bzw. ohne vom Reportergen kodierte Aminosäure plattiert (Tryptophan, im Gal4-, Histidin im LexA-System). Zellen, die nicht transaktivierende Proteine exprimierten, wurden nur

auf der Platte mit der vom Reporter gen kodierte Aminosäure wachsen, wogegen Zellen mit transaktivierenden Proteinen auch ohne Zugabe dieser Aminosäure überlebensfähig waren.

3.6.3. Genetischer Test auf Nukleustransport

Das LexA-Zwei-Hybrid-System bietet die Möglichkeit, die Translokation des Köderproteins in den Zellkern genetisch zu testen. Hierzu wurden EGY48 mit pJK101 transformiert. Dieser Vektor enthält das Reporter gen lacZ, das in Abwesenheit von LexA transkribiert wird. Wird zusätzlich ein Köderprotein exprimiert und in den Zellkern transportiert, so hemmt dieses die Bildung von β -Galaktosidase, in dem es an den LexA-Operator bindet, der zwischen dem Promotor und dem Reporter gen liegt. Zur Positivkontrolle wurden die Zellen mit pRFHM1 statt mit pGilda transformiert. Dieser Vektor kodiert ein in den Zellkern transportiertes Protein, was zur einer Hemmung der Bildung von β -Galaktosidase führt.

3.6.4. Toxizitätstest von Köderproteinen

Die Toxizität des Köderproteins wurde mit Hilfe des Verhältnisses von auf Minimalmedium (SD) und auf Vollmedium YPD wachsenden Kolonien nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Toxizität} = 100 - \frac{\text{Kolonien}_{-Trp}}{\text{Kolonien}_{YPD}} \quad (3)$$

Hierbei bedeutet eine Toxizität von z. B. 30% ein Wachstum von 70% der Zellen auf Minimalmedium im Vergleich zum Wachstum auf Vollmedium.

3.6.5. Der LexA-Screen

Vor dem Screen wurde das Köderfusionsprotein auf Transaktivierung und Nukleustransport getestet (siehe 3.6.2 und 3.6.3). Der anschließende Screen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Clontech. Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurden 150 ml einer Übernackultur von EGY48, die mit Köderprotein und pSH18-34 transfiziert waren, in SD mit 2% Glukose +Trp +Leu bei 30°C inkubiert. Die Übernack-

kultur wurde in 1 l YPD auf eine OD_{600} von 0,2 bis 0,3 verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 1,0 (3 bis 5 h) inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei 1000 g und RT in 50 ml Falcon-Röhrchen pelletiert und in 500 ml TE resuspendiert. Der Waschschrift wurde zwei mal wiederholt und die Zellen danach nacheinander in 30 ml bzw. 20 ml TE/LiAc resuspendiert.

Zur Transformation der kompetenten Hefezellen mit der cDNA-Bank durch Hitzeschock wurden 2,5 mg der cDNA-Bank und 20 mg Carrier-DNA mit einem Volumenäquivalent an 10x TE vermischt und zu den 20 ml kompetenten Hefezellen gegeben. Nach Zugabe von 150 ml PEG/LiAc wurde der Ansatz 30 min bei 30°C und leichtem Schütteln inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte nach Zugabe von 17,5 ml DMSO für 15 min bei 42°C und leichtem Schütteln. Die Zellen wurden 5 min auf Eis abgekühlt, für 5 min bei 1000 g pelletiert und in 20 ml TE resuspendiert, wobei darauf geachtet wurde, möglichst keine Zellen zu verlieren. Die Zellen wurden auf 80 15 cm-Platten mit SD +2% Glukose +Leu ausplattiert und für 2 bis 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Zur Bestimmung der Kolonie formenden Einheiten (colony forming units, cfu) musste die Transformationseffizienz bestimmt werden. Für einen erfolgreichen Screen sollte etwa die dreifache Anzahl unabhängiger cDNA-Klone der cDNA-Bank (bei der eingesetzten cDNA-Bank etwa $4,5 \times 10^6$) an Zellen gescreent werden. Hierzu wurden 100 μ l von 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnungen der transformierten Zellen auf SD +Glukose +Leu ausplattiert. Die cfu bestimmt sich nach folgender Formel:

$$cfu = \frac{cfu/Platte \cdot Gesamtvolumen \cdot 10^3 \frac{\mu l}{ml}}{ausplattiertes\ Volumen \cdot Verdünnung} \quad (4)$$

Bei einem Gesamtvolumen von 20 ml, 500 cfu auf einer Platte mit einer 1:100-Verdünnung und 100 μ l an ausplattiertem Volumen ergab sich bei dem Screen $cfu = 10^7$, was nicht ganz der dreifachen Menge der unabhängigen cDNA-Klone entspricht.

Nun wurden die Zellen mit je 2,5 ml H₂O pro Platte von den Platten gewaschen und wie oben pelletiert. Nach erneutem Waschen in 75 ml H₂O wurden die Zellen in 20 ml Puffer (65% Glycerin, 100 mM Mg(SO₄), 10 mM Tris, pH 8,0) resuspendiert und in Aliquots zu je 1 ml bei -80°C eingefroren. Da etwa die siebenfache Anzahl der cfu gescreent werden sollte (hier also 10^7 Zellen), wurden zur Bestimmung der Zahl überlebender Zellen 100 μ l einer 1:100- und einer 1:1000-Verdünnung auf SD +Glukose +Leu

ausplattiert. Es ergab sich eine Zahl von etwa $1,7 \times 10^7$ cfu/ml.

Nun erfolgte der eigentliche Zwei-Hybrid-Screen durch Induktion der Proteinexpression. Die Bestimmung des einzusetzenden Volumens lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{zu screenendes Volumen} = \frac{\text{zu screenende Menge an Zellen}}{\text{cfu / ml}} \quad (5)$$

In dieser Arbeit mussten 4,1 ml Zellsuspension langsam auf Eis aufgetaut und 4 h bei 30°C inkubiert werden. Danach wurden je 10^6 Zellen auf 15 cm-Platten mit SD +0,5% Galaktose/1% Raffinose +XGal ausplattiert. Alle 12 h wurden nun neu auftretende blauen Kolonien auf eine frische Platte SD +Galaktose/Raffinose +XGal umplattiert, bis keine neuen blauen Kolonien mehr auftraten.

Da Hefezellen mehrere unterschiedliche Vektoren aufnehmen können, wurden die Kolonien vier mal auf frische Platten mit SD +Galaktose/Raffinose umplattiert. Dabei sollten die Zellen neben den nicht benötigten Plasmiden auch ihre blaue Färbung verlieren.

Vor dem Einfrieren der Kolonien zur Aufbewahrung wurde die Aktivierung des LacZ-Promotors noch in einem „Filter-Lift-Assay“ auf Blaufärbung getestet. Hierzu wurde ein in Z-Puffer/XGal-Lösung getränkter Whatman-Filter in eine 10cm-Schälchen gelegt. Ein anderer autoklavierter Whatman-Filter wurde kurz auf die zu testenden Kolonien gelegt und leicht angedrückt. Nach Abziehen des Filters von der Platte wurde er samt den darauf haften gebliebenen Kolonien drei mal 10 s in flüssigen Stickstoff getaucht, um so die Zellwände der Hefen zu brechen. Anschließend wurde der wieder aufgetaute Filter mit den Kolonien nach oben auf den mit der Färbelösung getränkten Filter gelegt und bei RT inkubiert. Kolonien mit zwei interagierenden Proteinen färbten sich so nach spätestens einem Tag blau.

Zur Aufbewahrung der einzelnen, gepickten Kolonien wurden diese direkt von der Platte in 20 µl 40% Glycerin gelöst und bei -80°C eingefroren.

Zur Isolierung der Vektoren mit der unbekanntem cDNA wurden 5 ml einer gesättigten Hefekultur, die unter Selektionsbedingungen hochgezogen worden war, bei 1.000 g sedimentiert. Das Pellet wurde mit 0,2 ml Hefe-Lysis-Puffer, 0,2 ml PCI-Lösung sowie 0,3 g säuregewaschenen Glaskügelchen versetzt. Anschließend wurden die Zellen durch zweiminütiges Vortexen lysiert und weitere 10 min geschüttelt. Nach Zentrifuga-

tion bei 20.000 g für 5 min wurde die abgesetzte wässrige Phase abgenommen, zu einem zehntel Volumen 3 M NaAc (pH 5,2) gegeben und gevortext. Nach Zugabe des 2,5fachen Volumens an Ethanol wurde erneut zentrifugiert und anschließend 1 min bei 14.000 upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 70% Ethanol aufgenommen, erneut zentrifugiert, luftgetrocknet und in 20 μ l H₂O aufgenommen.

Um die isolierten Vektoren grob zu klassifizieren, wurden *E. coli* mit der gewonnenen DNA transformiert und dann mit Hilfe von Restriktionsanalysen und von PCRs klassifiziert. Bei der PCR-Reaktion in 20 μ l Gesamtvolumen PCR-Ansatz (50 pmol Primer pAD,s, 50 pmol Primer pAD,as, 0,4 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 10x Polymerase-Puffer, 1 U *Taq*-Polymerase) diente 1 μ l Miniprep-DNA als Template. Die PCR-Reaktionen wurden nach dem Schema in 3.1.11 mit einer 0,5minütigen Hybridisierung bei 55°C durchgeführt. Die gereinigte cDNA der unterschiedlichen Klone wurde in Hefe mit dem Ködervektor retransformiert und auf Selektionsmedium (1% Galaktose, 0,5% Raffinose -His, -Leu, -Trp, -Ura, XGal) ausplattiert.

4. Ergebnisse

Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems und mittels Kopräzipitationen sollte in dieser Arbeit nach neuen intrazellulären Interaktionspartnern für mGluRs der Gruppe III gesucht werden. Besonderes Gewicht wurde dabei auf mGluR4b gelegt, da dieser Rezeptor im Vergleich zu den übrigen Mitgliedern der Gruppe III mGluRs wegen der unterschiedlicher Länge und Struktur seines zytosolischen C-Terminus eine Sonderstellung einnimmt (Abbildung 5).

Bereits vor Beginn dieser Arbeit war Calmodulin als erster Interaktionspartner für mGluR7a, dem typischen Vertreter der mGluRs der Gruppe III, identifiziert worden (siehe 1.3.4). Diese Wechselwirkung, ihre mögliche Regulation über die PKC und ihre physiologischen Bedeutung wurden in dieser Arbeit ebenfalls genauer charakterisiert.

4.1. Neue Interaktionspartner für mGluRs der Gruppe III

Für einen generellen Ansatz zur Identifikation bislang unbekannter intrazellulärer Interaktionspartner wurde das Zwei-Hybrid-System gewählt. Mit Hilfe dieses genetischen Ansatzes ist es möglich, eine ganze cDNA-Bank nach Bindepartnern für ein Köderprotein zu screenen (siehe 3.6).

4.1.1. **Zwei-Hybrid-Screens mit dem Gal4-System**

Zunächst wurde das Gal4-Zwei-Hybrid-System von Stratagene, das einzige zu diesem Zeitpunkt kommerziell erhältliche Zwei-Hybrid-System, eingesetzt. Hierbei werden das Köder-Protein (in pSTD-BD) und das Fisch-Protein (in pACT2) in den Hefestamm Y190 transformiert. Bei einer Interaktion beider Fusionsproteine bindet der rekonstituierte Transkriptionsfaktor an Gal4-Promotoren im Hefegenom und aktiviert so die Reportergene lacZ und HIS3 (siehe Abbildung 9).

Zunächst sollte nach Interaktionspartnern für mGluR4b, den „untypischsten“ Vertreter der Gruppe III mGluRs, gesucht werden. Außerdem weist die Primärstruktur des C-Terminus von mGluR4b verschiedene Merkmale auf, die auf eine Reihe von Interaktionspartnern hindeuten und in Abbildung 11 angedeutet sind.

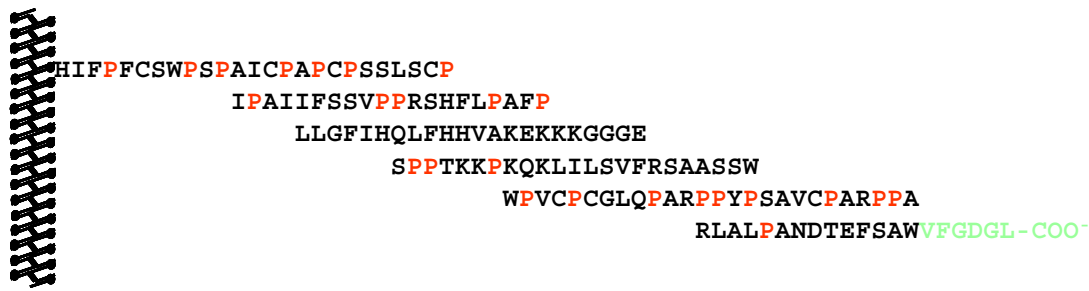


Abbildung 11: Die Aminosäuresequenz von mGluR4b. Der hydrophobe Carboxy-Terminus (grün) des 136 Aminosäure langen, zytosolischen C-Terminus von mGluR4b enthält typische Merkmale verschiedener Protein-Interaktionsdomänen, wie z. B. viele geklusterte Prolin-Reste (rot).

Nach Kotransformation von pSTD-BD-mGluR4b mit einer cDNA-Bank aus adultem Rattenhirn ($4,0 \times 10^6$ unabhängige Klone in pGAD10, Clontech) in den Hefestamm Y190 wurden kotransformierte Hefezellen auf SD-Agar +Glukose selektiert. Die Kotransformationseffizienz wurde auf Platten mit SD-Agar (2% Glukose, -Leu, -Trp, 25 mM 3AT) bestimmt und lag bei ca. $7,15 \times 10^6$ gescreenten Klonen (siehe Abbildung 12). Vier bis sechs Tage nach der Kotransformation wurden die 14 erschienen Kolonien auf eine frische Platte mit Selektionsmedium umplattiert (siehe 3.6.1). Nach viermaligem Umplattieren der Kolonien, um eventuell für die Hefen unnötige Plasmide zu entfernen, konnten noch sieben dieser Kolonien auf dem Selektionsmedium wachsen. Im anschließenden Filter-Lift-Assays, einem Test zur Aktivierung des lacZ-Promotors und somit zum Nachweis interagierender Proteine, färbten sich nur noch zwei der sieben Kolonien blau (siehe 3.6.5). Nach weiterem zweimaligem Umplattieren beider Kolonien und erneutem Filter-Lift-Assay blieb letztlich nur noch eine Kolonie übrig, die sich in der XGal-Lösung blau verfärbte.

Nach der Plasmid-Isolierung, der Transformation der extrahierten cDNA in *E. coli* XL1 und anschließender Aufreinigung wurde das cDNA-Fragment aus dem isolierten cDNA-Klon mit *Eco* RI zur Restriktionsanalyse herausgeschnitten. Die Sequenzierung des 1,5 kb großen Inserts zeigte, dass es sich bei der cDNA um ein etwa 400 bp großes Fragment des murinen Orthologs von Gelsolins handelte, das allerdings in versetztem Leseraster (+2) in pACT2 vorlag (siehe 7.1). Nach Retransformation des Vektors in Hefe war keine Blaufärbung mehr zu sehen. Trotz mehrfacher Versuche zur Rekonstitution der Blaufärbung konnte die zuvor beobachtete Interaktion nicht verifiziert werden. Es handelte sich daher mit großer Wahrscheinlichkeit um einen falsch positiven Klon.

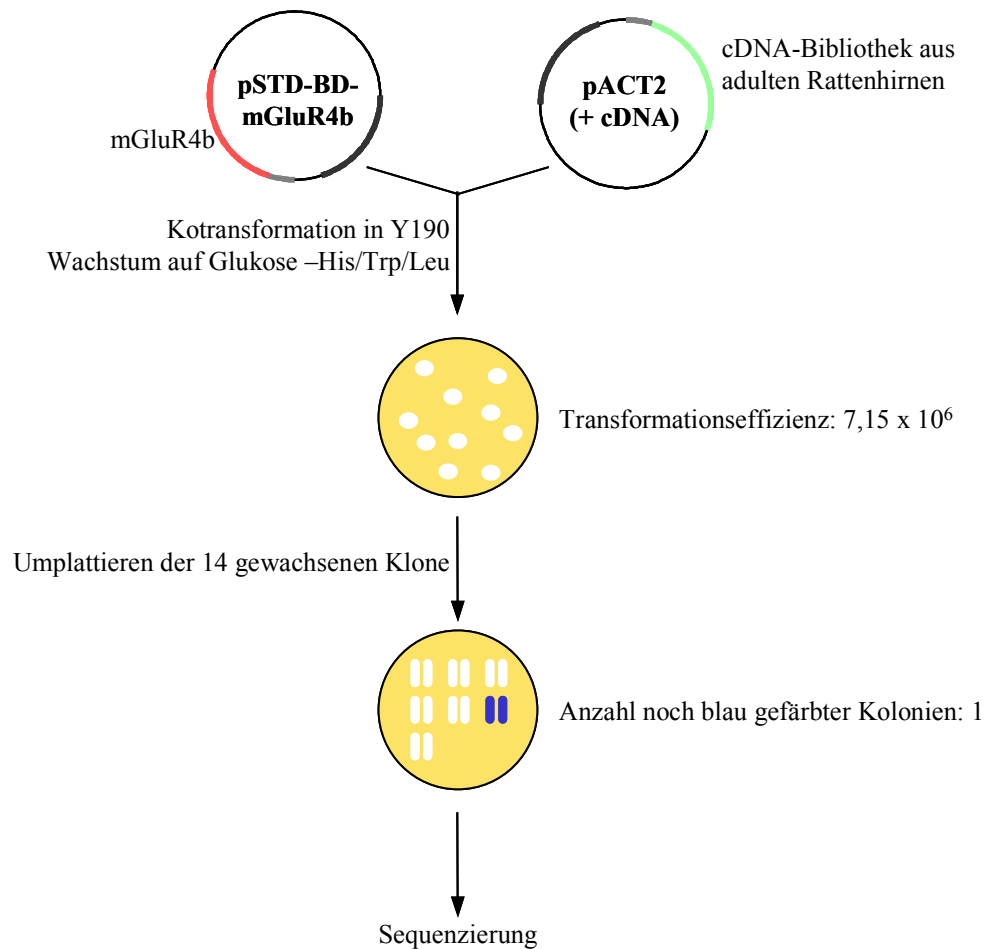


Abbildung 12: Gal4-Screen mit pSTD-BD-mGluR4b. Aus einer cDNA-Bank aus adultem Rattenhirn mit $4,0 \times 10^6$ unabhängigen Klonen blieb nur einer übrig, der letztlich aber nicht verifizierbar war.

4.1.1.1. Toxizität verschiedener mGluR-Konstrukte im Gal4-System

Bereits vor dem Screen mit mGluR4b als Köder wurden Gal4-Zwei-Hybrid-Screens mit C-Termini anderer mGluRs der Gruppe III durchgeführt, die aber ebenfalls zu keinem positiven Ergebnis führten. Bei diesen Screens kamen sowohl die vollständigen zytosolischen C-Termini von mGluR7b und mGluR8a wie auch der C-Terminus von mGluR8a, bei dem die CaM-Bindedomäne entfernt wurde (mGluR8aC40), zum Einsatz. Allerdings waren bereits nach der Kotransformation von Köder-cDNA und cDNA-Bank in die Hefezellen keine Kolonien auf Selektionsmedium gewachsen, bzw. die Blaufärbung der wenigen gewachsenen Kolonien verschwand bereits nach dem Umplattieren. Dies lies ein generelles Problem mit den gewählten Ködersequenzen vermuten.

Da ein möglicher Grund für den erfolglosen Einsatz dieser Köderproteine im

Gal4-Screen eine hohe Toxizität derselben in sein könnte, wurde die Toxizität mit Hilfe des Verhältnisses von auf Minimalmedium und auf Vollmedium wachsenden Kolonien nach Gleichung (siehe 3.6.4) bestimmt. Um zu testen, ob ein weiterer Gal4-Zwei-Hybrid-Screen mit einem C-Terminus eines anderen Mitglieds der Familie der Gruppe III mGluRs aufgrund einer niedrigeren Toxizität mehr Aussicht auf Erfolg hätte, wurde auch die Toxizität verschiedener anderer Köderproteine getestet.

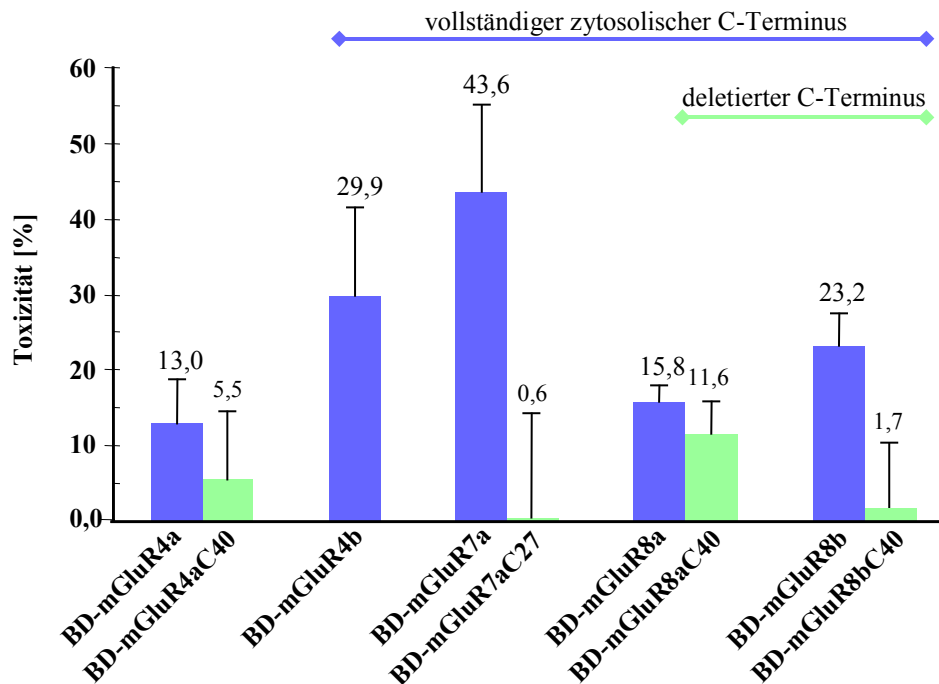


Abbildung 13: Bestimmung der Toxizität verschiedener Köderkonstrukte im Gal4-System. Hierbei kamen vollständige C-Termini (blau) und Deletionskonstrukte (grün) zum Einsatz, bei denen die ersten 25 Aminosäuren fehlen (Aminosäuren sind in Klammern angegeben). mGluR4a (848-912), mGluR4aC40 (873-912), mGluR4b (848-983), mGluR7a (851-916), mGluR7aC38 (879-916), mGluR8a (844-908), mGluR8aC40 (869-908), mGluR8b (844-908), mGluR8bC40 (869-908). Die Toxizitäten stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen dar.

Die Abbildung 13 zeigt, dass die getesteten C-Termini der mGluRs der Gruppe III in der Tat eine hohe Toxizität für die Hefezellen aufwiesen. Die hohen Standardabweichungen resultieren wahrscheinlich aus unterschiedlichen Transfektionseffizienzen in den verschiedenen Versuchen. Im Vergleich zu den vollständigen C-Termini (blau) sind die getesteten Köderproteine, bei denen nur der C-terminale Bereich der zytosolischen C-Termini der mGluRs in pSTD-BD kloniert wurde (grün), deutlich weniger toxisch. Eine besonders hohe Toxizität konnte bei BD-mGluR4b und BD-mGluR7a beobachtet

werden. Die niedrigsten Toxizitäten wiesen BD-mGluR7aC38 und BD-mGluR8bC40 (Abbildung 13) auf, die somit die für einen Gal4-Zwei-Hybrid-Screen am besten geeigneten Köderproteine darstellten. Da es aber sinnvoller erschien, mit dem ganzen zytosolischen C-Terminus eines Rezeptors statt nur mit einem verkürztem zu screenen, wurde ein anderer Ansatz zur Lösung des Toxizitäts-Problems gewählt, nämlich die Verwendung eines induzierbaren Zwei-Hybrid-Systems.

4.1.2. Der LexA-Screen mit mGluR4b

Im Gegensatz zum Gal4-System bietet das LexA basierte Zwei-Hybrid-System wichtige Vorteile (siehe Tabelle 4). Besonders hervorzuheben sind hier die Replikation des Reportergens lacZ, was eine wesentlich sensitivere Detektion einer Interaktion erlaubt, und die Induzierbarkeit der Transkription der Köderproteine, was bei toxischen Proteinen sehr hilfreich ist (siehe 3.6). Aufgrund dieser Vorteile wurde daher der Zwei-Hybrid-Screen mit mGluR4b im LexA-System wiederholt.

Zunächst wurde das Köderprotein mGluR4b in pGilda kloniert (siehe 2.2.5) und auf Transaktivierung und auf Nukleustransport geprüft (siehe 3.6.3). Hierzu wurden der Ködervektor (pGilda-mGluR4b) und der Reportervektor (pSH18-34) in den Hefestamm EGY48 kotransformiert. Da keine Transaktivierung zu sehen war und das Köderprotein in den Nukleus transportiert wurde, konnte das Fusionsprotein als Köder im LexA basierten Zwei-Hybrid-Screen eingesetzt werden. Nach Transformation der cDNA-Bank aus adultem Rattenhirn ($4,5 \times 10^6$ unabhängige Klone in pJG4-5, Origene) wurden die Zellen auf Platten mit Selektionsmedium (2% Glukose, -His, -Trp, -Ura) ausplattiert. Die Transformationseffizienz wurde auf gleichem Medium bestimmt und lag bei 1×10^7 Kolonien (siehe Abbildung 14).

Nach dreitägigem Wachstum wurden die Zellen geerntet und eingefroren (siehe 3.6.5). Die Zahl der diese Prozedur überlebenden Zellen lag bei $1,7 \times 10^7$ cfu. Um die siebenfache Anzahl an transformierten Klonen zu screenen, mussten daher 4,1 ml der tiefgefrorenen Zellsuspension auf Selektionsmedium mit XGal ausplattiert werden (siehe 3.6.5). Vier bis sechs Tagen nach Ausplattierung wurden 330 erschienene blaue Kolonien auf eine frische Platte mit Selektionsmedium mit XGal umplattiert. Trotz fünfmaligem Umplattieren konnte die hohe Zahl positiver Kolonien nicht verringert werden (siehe Abbildung 14). Alle 330 Kolonien wurden nach dreimaligem Umplattieren auf Selektionsmedium ohne XGal (notwendig, um blaue Färbung der Zellen zu verlieren) nochmals im Filter-Lift-Assay auf Blaufärbung überprüft. Auch dies

nochmals im Filter-Lift-Assay auf Blaufärbung überprüft. Auch dies führte zu keiner Verringerung der Zahl positiver Klone.

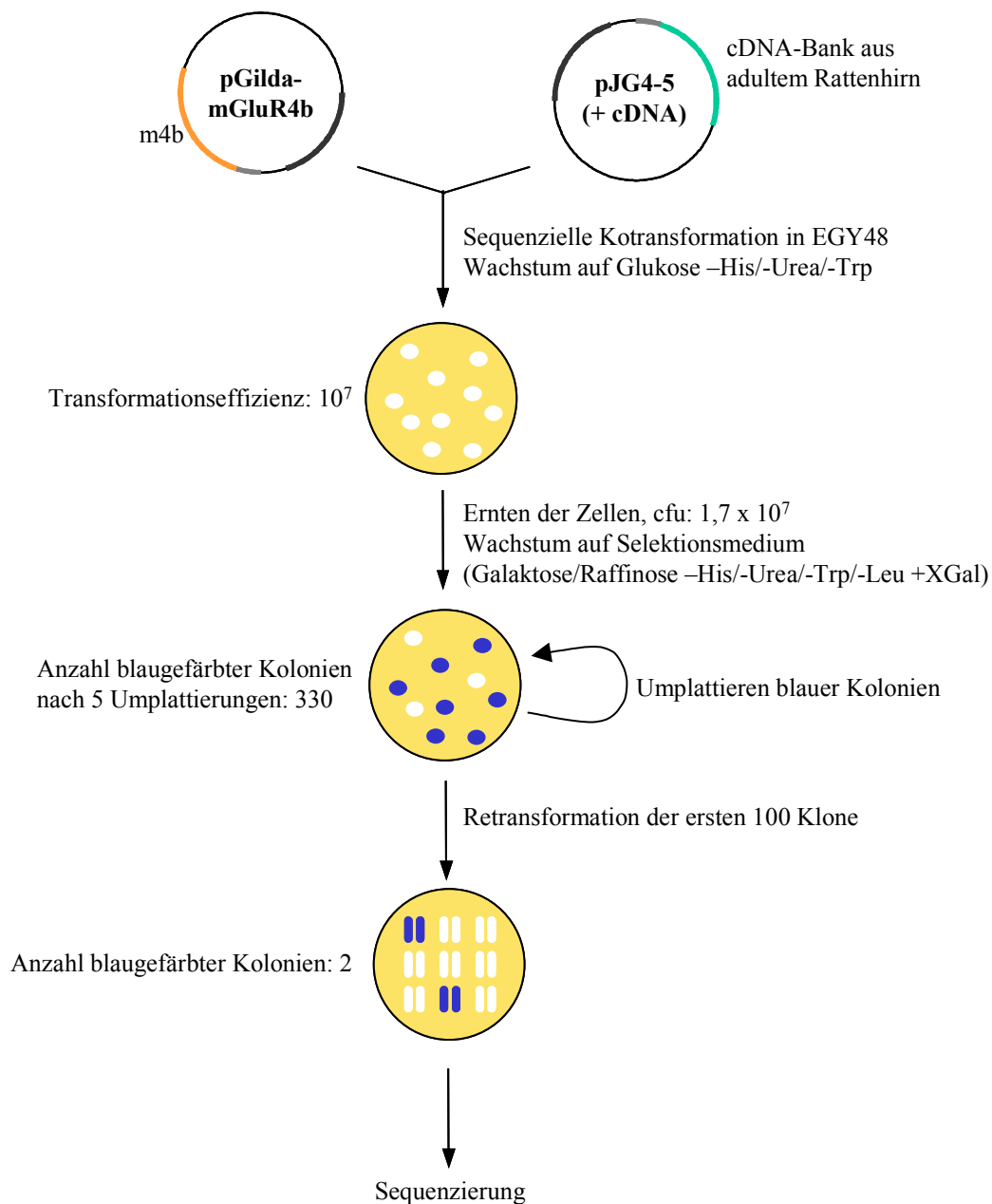


Abbildung 14: Der LexA-Screen mit pGilda-mGluR4b. Von 100 untersuchten blauen Kolonien waren zwei für die weiteren biochemischen Untersuchungen interessant.

Aufgrund der hohen Zahl blau gefärbter Kolonien konnte in dieser Arbeit lediglich etwa die Hälfte der gefischten Klone genauer untersucht werden. Nach Extraktion und Aufreinigung der Vektoren aus den 100 zuerst erschienenen Hefekolonien wurden diese zunächst mit Hilfe der PCR in Klassen mit unterschiedlich großen Inserts gegliedert (siehe 3.6.5). So konnten 44 verschiedene Inserts unterschieden werden. Die gerei-

nigten cDNAs dieser Klone wurden in Hefe mit pSH18-34 und pGilda-mGluR4b bzw. pGilda-GT (klonierte Aminosäuren 1 bis 201 des Glyzin-Transporters in pGilda, (Horiuchi et al., 2000)) als Negativkontrolle kotransformiert und auf Selektionsmedium ausplattiert. Von den 44 Klonen verfärbten sich zwölf Kolonien blau. Sequenzierung dieser zwölf Klone ergab, dass sie insgesamt sechs verschiedene cDNAs (Klone A bis F) enthielten (Tabelle 5).

Tabelle 5: Klone, die auch nach Retransformation mit pGilda-mGluR4b auf Selektionsmedium wuchsen. BF Blaufärbung auf Selektionsmedium, W Wachstum auf Selektionsmedium. Die Sequenzen sind im Anhang (siehe 7.2) gezeigt. Die Homologievergleiche wurden mit BLAST (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997) durchgeführt.

im LexA-Screen isolierte Klone	Häufigkeit	Interaktion	
		W	BF
Klon A (unbekanntes Protein)	1	++	++
Klon B (wahrscheinlich Psma3)	1	+	+
Klon C (mögliches Ortholog von PLZF aus Maus)	3	++	++
Klon D (PxF)	2	++	-
Klon E (SGT)	4	++	-
Klon F (mögliches Ortholog zu C3IP1 aus Mensch)	1	++	+

Bei Klon A weist ein Bereich von über 29 Aminosäuren eine 86%ige Homologie mit dem GATA-Repressor (GI10946742), einem Transkriptionsfaktor, aus Maus auf. Außerdem ist noch eine geringere Homologie zu Zink-Finger-Proteinen zu finden, bei denen es sich ebenfalls typischerweise um Transkriptionsfaktoren handelt. Klon B weist über den gesamten sequenzierten Bereich eine 100%ige Homologie und ist somit wahrscheinlich identisch zur 299 Aminosäure großen Untereinheit α des Typs 3 eines Proteasom-Komplexes (proteasome subunit, alpha type 3, Psma3, GI8394065) auf. Der dritte gefischte Klon weist über 129 Aminosäuren eine 100%ige Identität mit dem 673 Aminosäuren großen Promyelozyten-Leukämie Zink-Finger Protein (PLZF, GI1582322) aus Maus auf und stellt somit wahrscheinlich das orthologe Protein aus Ratte dar. Bei Klon D handelt es sich um das 33 kD große peroxisomale, farnesylierte Protein (peroxisomal farnesylated protein, PxF, GI6010290). Klon E kodiert für das 34 kD kleine, Glutaminreiche Protein mit TPR-Motiv (small glutamine rich tetratricopeptide repeat containing

protein, SGT, GI12083666). Klon F weist über 148 Aminosäuren eine 99%ige Homologie zum Kelch-ähnlichem Protein C3IP1 (GI12722541) aus Mensch auf und stellt somit wahrscheinlich das orthologe Protein aus Ratte dar.

Die Klone A, B, C und F verfärbten sich bei Kotransformation nicht nur mit pGilda-mGluR4b, sondern auch mit pGilda-GT blau und wurden daher nicht weiter untersucht, da es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um falsch positive Klone handelte. Die beiden spezifisch mit BD-mGluR4b interagierenden Proteine SGT und PxF unbekannter Funktion wurden vier- bzw. zweimal gefischt. Bei den Klonen handelte es sich jeweils um identische, also nicht unabhängige Klone. Da die kodierten Proteine in voller Länge vorlagen, ist keinerlei Aussage über wahrscheinliche Interaktionsdomänen möglich. Die mögliche Interaktion von mGluR4b mit SGT und PxF wurde nachfolgend proteinbiochemisch und immunzytochemisch genauer untersucht.

4.1.2.1. Interaktion von *mGluR4b* mit *SGT* und *PxF*

Eine elegante Methode zum Nachweis von Proteininteraktionen ist die Kopräzipitation eines Interaktionspartners mit an einer Matrix immobilisierten Fusionsproteinen (siehe 3.2.3). Bei der Verifizierung der im Zwei-Hybrid-System gefundenen Interaktionen wurde zunächst versucht, GST-fusioniertes SGT bzw. PxF (siehe 2.2.5) mit immobilisiertem MBP-mGluR4b zu kopräzipitieren. Hierzu wurde bakteriell exprimiertes GST-SGT bzw. GST-PxF mit MBP-mGluR4b bzw. MBP als Negativkontrolle inkubiert. Anschließend wurden die vier Ansätze (siehe Skizzen in Abbildung 15) mit Glutathion-Sepharose bzw. Amylose präzipitiert und die Bindungen im Western-Blot mit MBP- bzw. α GST-Antikörpern analysiert (Abbildung 15).

Obwohl in den Coomassie-Färbungen ausreichend lösliches Fusionsprotein zu sehen war, konnte in beiden Versuchen im Western-Blot kein spezifisch kopräzipitiertes Protein detektiert werden. In Abbildung 15A sind zwar im Western-Blot Banden an erwarteter Stelle bei GST-SGT zu sehen, diese sind aber sowohl mit MBP-mGluR4b als auch mit MBP allein vorhanden (blaue Sternchen) und somit nicht spezifisch. Bei GST-PxF ist an erwarteter Stelle kein kopräzipitiertes Protein zu sehen (blaue Pfeile). Die auf etwa gleicher Höhe auftretenden Flecke sind vom Antikörper unspezifisch erkannte Artefakte. In Abbildung 15B ist sowohl bei GST-SGT als auch bei GST-PxF kopräzipitiertes MBP-mGluR4b (rote Sternchen) und MBP allein (rote Pfeile) zu sehen. Die Präzipitation war also auch hier unspezifisch.

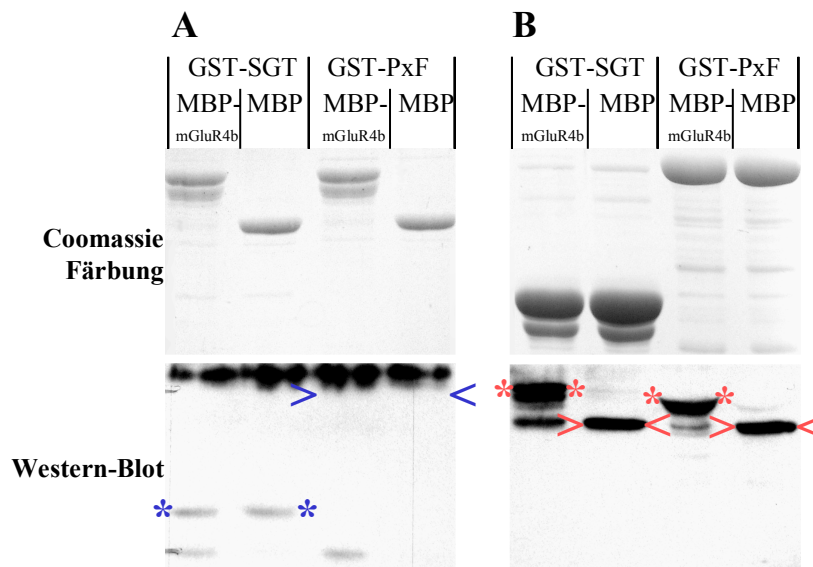


Abbildung 15: Kopräzipitation bakteriell exprimierter Fusionsproteine. Coomassie-Färbungen zeigen Mengen und Laufhöhen der eingesetzten Fusionsproteine. A, GST-SGT (blau Sternchen) bindet unspezifisch sowohl an MBP-mGluR4b wie an MBP allein. GST-PxF (blaue Pfeile) dagegen kopräzipitiert gar nicht mit dem immobilisiertem MBP-mGluR4b. B, Sowohl MBP-mGluR4b (rote Sternchen) wie auch MBP allein (rote Pfeile) kopräzipitiert mit immobilisiertem GST-SGT und GST-PxF. Auch unter diesen Bedingungen sind also nur unspezifische Bindungen zu beobachten.

In einem anderem Ansatz zur Überprüfung der im Zwei-Hybrid-System gefundenen Interaktionen wurden die beteiligten Interaktionspartner in eukaryotischen HEK 293-Zellen koexprimiert und anschließend koimmunpräzipitiert.

Die GFP-Fusionsproteine von SGT und PxF wurden mit Hilfe von PCRs auf den jeweiligen pGEX-Konstrukten und anschließender Klonierung in peGFP-C2 hergestellt (siehe 2.2.5). Der Rezeptor mGluR4b wurde in mehreren Klonierungsschritten mit dem Epitop Myc markiert und in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert (siehe 2.2.5). Nach Expression und Solubilisierung der Proteine wurde die Löslichkeit der Fusionskonstrukte im Western-Blot überprüft (siehe 3.2.14), wobei α GFP-, α myc- bzw. α flag-Antikörper eingesetzt wurden (Abbildung 16).

Das Vollängenkonstrukt myc-mGluR4b war unter diesen Bedingungen nicht löslich. In Abbildung 16A ist deutlich eine Immunreaktion im Gesamtprotein (E) zu erkennen, die aber in der löslichen Proteinfraction (S) fehlt. Zum Vergleich ist in Abbildung 16B flag-mGluR7a, der mit einem flag-Epitop markierte Vollängenrezeptor (siehe 2.2.5), unter identischen Bedingungen gezeigt. Hier ist auch in der löslichen Proteinfraction eine deutliche Immunreaktion zu sehen.

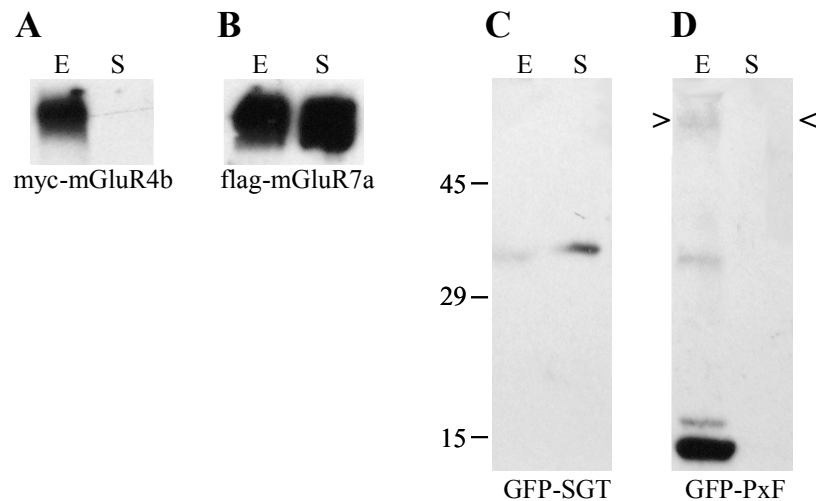


Abbildung 16: Löslichkeit solubilisierter Proteine aus HEK 293-Zellextrakt. Löslichkeit von (A) myc-mGluR4b, (B) flag-mGluR7a, (C) GFP-SGT und (D) GFP-PxF. Pfeile geben erwartete Laufhöhe von GFP-PxF an. E Proteinextrakt, S solubilierte Proteinfraction.

Aufgrund der Unlöslichkeit konnte myc-mGluR4b daher im Gegensatz zu flag-mGluR7a nicht für Präzipitationsstudien verwendet werden. Während das Fusionsprotein GFP-SGT eine hohe Löslichkeit aufwies (Abbildung 16C), konnte für GFP-PxF keine Immunreaktion an der erwarteten Laufhöhe (etwa 57 kD) in der löslichen Proteinfraction detektiert werden (Pfeile in Abbildung 16D). Statt dessen war eine deutliche Bande bei etwa 15 kD zu sehen. Das seltsame Laufverhalten und eventuell auch die Unlöslichkeit von GFP-PxF hängen wahrscheinlich mit dessen Farnesylierung (James et al., 1994) im eukaryotischen Zellsystem zusammen. Da sowohl myc-mGluR4b wie auch GFP-PxF unter den getesteten Bedingungen unlöslich zu sein schienen, war eine Koimmunpräzipitation mit diesen Proteinen nicht möglich.

Statt der Koimmunpräzipitation mit eukaryotisch exprimiertem mGluR4b wurde daher eine Kopräzipitation von *in vitro*-translatiertem SGT bzw. PxF mit MBP-mGluR4b versucht. Bei der *in vitro*-Translation wurden die Proteine während der Translation im extrazellulärem System radioaktiv durch Zugabe von [³⁵S]-Methionin markiert (siehe 3.2.16). Hierzu wurden SGT in pcDNA4/His und PxF in pcDNA3/His umkloniert. Ein Teil des *in vitro*-Translationsansatzes wurde zur Verifizierung auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und autoradiographisch analysiert (Abbildung 17A).

Im Gegensatz zu His-PxF ist in der Autoradiographie in Abbildung 17A kein translatiertes Produkt im Falle von pcDNA4/His-SGT zu sehen, obwohl mehrere Methi-

onine in der Aminosäuresequenz von SGT vorliegen. Eine mögliche Erklärung könnte der verwendete Vektor pcDNA4/His sein, in dem im Gegensatz zu pcDNA3/His eine längere Enhancer-Sequenz vor dem Startkodon liegt.

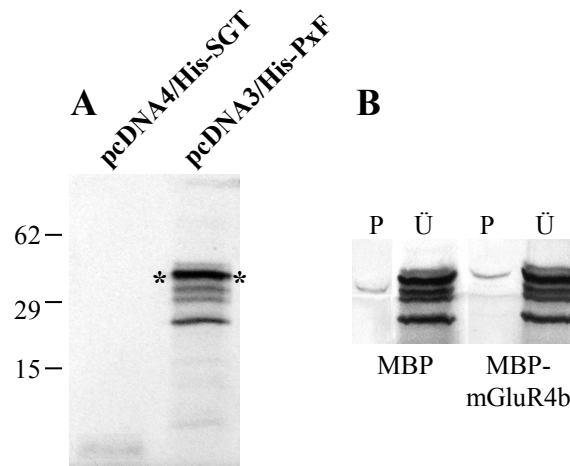


Abbildung 17: *in vitro*-Translationen von pcDNA4/His-SGT und pcDNA3/His-PxF. A, Kontrolle zur *in vitro*-Translation Nur His-PxF wurde unter diesen Bedingungen translatiert (Sternchen). B, Bindung von *in vitro*-translatiertem His-PxF an MBP-mGluR4b und MBP allein als Negativkontrolle. P Pellet, Ü Überstand.

Für die Kopräzipitation von *in vitro*-translatiertem His-PxF mit bakteriell exprimiertem MBP-mGluR4b und MBP als Negativkontrolle wurde das radioaktiv markierte His-PxF mit den immobilisierten Fusionsproteinen inkubiert und nach dem Pelletieren der gebundenen Proteine autoradiographisch analysiert (3.2.16). Das *in vitro*-translatierte His-PxF konnte sowohl mit MBP wie mit MBP-mGluR4b unspezifisch in geringen Mengen präzipitiert werden (Pellet in Abbildung 17B). Der Hauptteil des *in vitro*-translatierten His-PxF, der etwa dem eingesetzten Material entspricht (hier nicht gezeigt), war im Überstand zu finden. Auch mit dieser Methode konnte unter den getesteten Bedingungen also keine direkte Interaktion von SGT bzw. PxF mit den zytosolischen C-Terminus von mGluR4b demonstriert werden.

Als letzter Versuch zur Verifizierung der Daten aus dem Zwei-Hybrid-System wurden die in Abbildung 16A, C und D gezeigten Fusionsproteine in HEK 293-Zellen kotransformiert und anschließend die Lokalisation der verschiedenen Proteine immunzytochemisch analysiert (Daten nicht gezeigt). Das myc-markierte Vollängenkonstrukt myc-mGluR4b konnte nicht spezifisch an der Membran der Zellen detektiert werden. Statt dessen war es hauptsächlich mit Golgi-ähnlichen Strukturen assoziiert. Dies deckt sich mit der Unlöslichkeit dieses Konstruktes im vorangegangenen Solubilisierungsexperiment (Abbildung 16A). GFP-SGT und GFP-PxF dagegen waren gleichmäßig über

die gesamte Zelle verteilt. Die Kotransformation dieser Konstrukte änderte die Lokalisation von myc-mGluR4b nicht.

Die Ergebnisse aus dem Zwei-Hybrid-Screen konnten daher unter den hier getesteten Bedingungen weder mit bakteriell exprimierten (Abbildung 15) noch mit eukaryotisch (Abbildung 16) oder *in vitro*-exprimierten Fusionsproteinen (Abbildung 17) bestätigt werden. Auch eine Kotransformation eukaryotischer Zellen mit den untersuchten Proteinen (Daten nicht gezeigt) führte zu keinem Ergebnis. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei SGT und PxF um falsch positive Klone handelt und die im Zwei-Hybrid-System beobachteten Interaktionen mit mGluR4b somit Artefakte dieser Methode darstellen.

4.1.3. Versuch zur genaueren Charakterisierung der Interaktion zwischen Pick1 und den Mitgliedern der Gruppe III mGluRs

In einem parallelem LexA-Zwei-Hybrid-Screen mit mGluR7a, einem Vertreter der „typischen“ mGluRs der Gruppe III konnte in Zusammenarbeit mit Oussama El Far das Protein Pick1 (protein interacting with C kinase) identifiziert werden (Daten hier nicht gezeigt) (El Far et al., 2000). Pick1 interagiert spezifisch über seine PDZ-Domäne mit den endständigen Aminosäuren des C-Terminus von mGluR7a. Typisch für Proteine, die an PDZ-Domänen binden, ist ihr hydrophober Carboxy-Terminus. Sowohl der Austausch der letzten drei Reste von mGluR7a gegen drei Alanine wie eine Mutation in der PDZ-Domäne von Pick1 führten zu einem drastischem Verlust der Pick1-Bindung (Boudin et al., 2000; El Far et al., 2000).

Um eine mögliche Interaktion von Pick1 mit anderen Mitgliedern der Gruppe III der mGluRs zu überprüfen, wurde *in vitro*-translatiertes Pick1 mit GST-Fusionsproteinen kopräzipitiert. Außerdem sollte so untersucht werden, ob für die Interaktion mit Pick1 zusätzlich zu den C-terminal endständigen noch weitere Aminosäuren im C-Terminus von mGluR7a von Bedeutung sind.

Die zu testenden immobilisierten GST-Fusionsproteine, GST allein und GST-Synaptoporin (siehe Abbildung 18) als Negativkontrolle wurden mit *in vitro*-translatiertem Pick1 (siehe 3.2.16) inkubiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen mit Coomassie gefärbt. Abbildung 18 zeigt neben der Coomassie-Färbung die anschließende Autoradiographie des Gels.

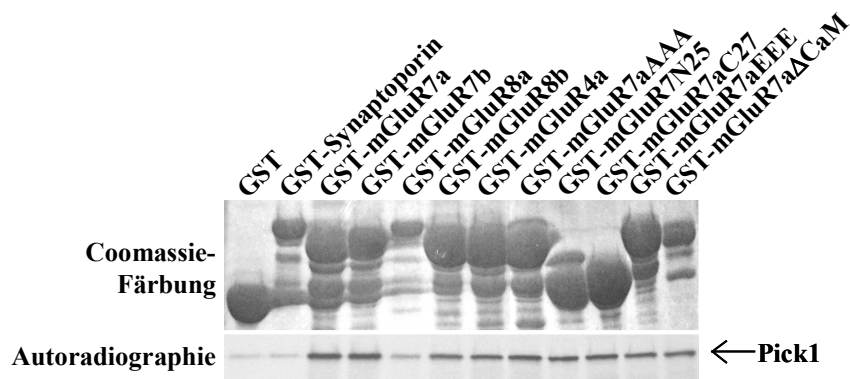


Abbildung 18: Interaktion mit *in vitro*-translatiertem Pick1. Als Negativkontrollen dienten GST allein und zusätzlich GST-Synaptoporin, einem mit mGluR7a nicht verwandtem Protein, das an der Exozytose beteiligt ist. Während die Coomassie-Färbung alle eingesetzten Proteine zeigt (oben), ist in der Autoradiographie lediglich das radioaktiv markierte Pick1 zu sehen (unten).

Der obere Teil von Abbildung 18 zeigt eine vergleichbare Beladung der Glutathion-Sepharose mit den verschiedenen GST-Fusionsproteinen. Im unteren Teil der Abbildung ist Pick1 in der Autoradiographie zu sehen. [³⁵S]-Methionin-markiertes Pick1 wurde außer mit den Negativkontrollen mit allen getesteten Konstrukten kopräzipitiert. Dies widerspricht den Ergebnissen von Kopräzipitationsstudien mit eukaryotisch exprimiertem Pick1 (nicht gezeigt) (El Far et al., 2000). Diese Versuche zeigen, dass Bindestudien mit *in vitro*-translatierten Proteinen offensichtlich nur geringe Spezifität aufweisen. Diese Experimente wurden daher nicht weiter verfolgt.

4.2. Calmodulin, ein Regulator der mGluR-aktivierten Signalkaskade

Zur bereits im Vorfeld dieser Arbeit aufgezeigten Ca²⁺-abhängigen Interaktion von mGluR7a mit CaM war der C-Terminus von mGluR7a durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide mittels PCR (siehe 3.1.12) aus der cDNA von Mäusehirn amplifiziert und an GST fusioniert worden (O'Connor et al., 1999). GST-mGluR7a und GST allein als Negativkontrolle wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert, mit einem zytosolischem Lysat aus adulten Rattenhirnen inkubiert und anschließend mehrmals gewaschen. GST-mGluR7a, nicht aber GST allein, band CaM in Ca²⁺-abhängiger Weise.

4.2.1. Identifizierung einer homologen CaM-Binderegion in den zytosolischen C-Termini der Gruppe III mGluRs

Um den Bereich der CaM-Interaktion auf dem C-Terminus von mGluR7a genauer zu bestimmen, wurden die Deletionskonstrukte GST-mGluR7N25, GST-mGluR7N38 und GST-mGluR7aC27 (siehe Abbildung 19A) an GST-Sepharose immobilisiert und mit gereinigtem CaM in Bindepuffer (siehe 3.2.6) und 2 mM CaCl₂ bzw. 5 mM EGTA inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die Proteine mit SDS-Ladepuffer versetzt, in einem 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und Coomassie-gefärbt (siehe 3.2.12 und 3.2.13).

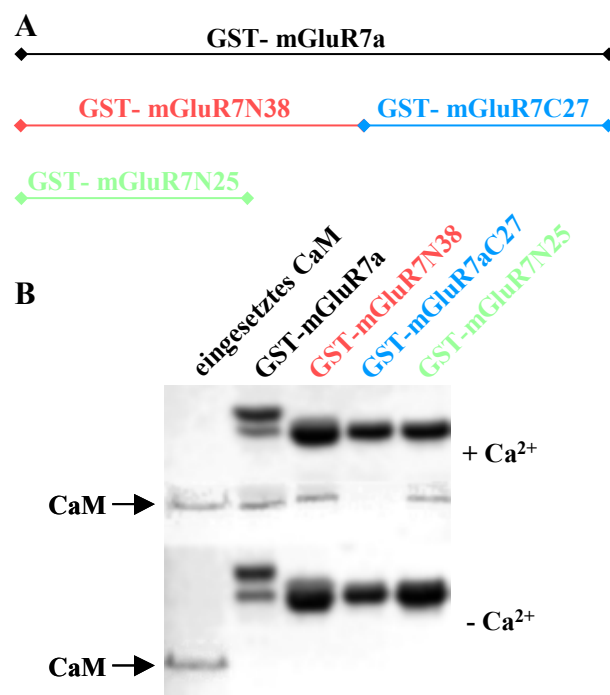


Abbildung 19: Eingrenzung der CaM-Bindedomäne bei mGluR7a. A, Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte. Hierbei steht mGluR7N25/38 für die N-terminalen 25/38 Aminosäuren und mGluR7aC27 für die C-terminalen 27 Aminosäuren des zytosolischen C-Terminus von mGluR7a. B, Bindung von CaM an GST-mGluR7a und dessen Deletionskonstrukte in Anwesenheit von 2 mM Ca²⁺ (+Ca²⁺) bzw. 5 mM EGTA (-Ca²⁺). Das eluierte Protein wurde nach SDS-PAGE mit Coomassie Blue sichtbar gemacht.

Die Coomassie-Färbung in Abbildung 19B zeigt deutlich, dass CaM nur mit GST-mGluR7a, GST-mGluR7N38 und GST-mGluR7N25 koprizipitiert wurde, nicht aber mit GST-mGluR7aC27. Die CaM-Bindedomäne auf mGluR7a muss sich also innerhalb der ersten 25 Aminosäuren des C-Terminus befinden. Sie weist eine strikte Spezifität für Ca²⁺/CaM auf, da in der Anwesenheit von EGTA keine Bindung mehr zu sehen war.

Durch den Einsatz von dansyliertem CaM konnte die Affinität von CaM zu GST-mGluR7a mit einer K_D von 57 nM bestimmt werden (O'Connor et al., 1999). Eine derart hohe Affinität ist typisch für eine Ca^{2+} -abhängige CaM-Bindung (Rhoads und Friedberg, 1997). Dass diese hohe Affinität auch bei GST-mGluR7N25 zu beobachten war, bestärkt die Hypothese, dass sich die CaM-Bindedomäne ausschließlich innerhalb der ersten 25 Aminosäuren der C-Terminus von mGluR7a befindet.

4.2.1.1. CaM-Bindung an andere mGluRs der Gruppe III

Da die ersten 25 Aminosäuren innerhalb der Gruppe III mGluRs hochkonserviert sind (siehe Abbildung 5), wurden nachfolgend auch die anderen Mitglieder dieser Gruppe auf CaM-Bindung getestet.

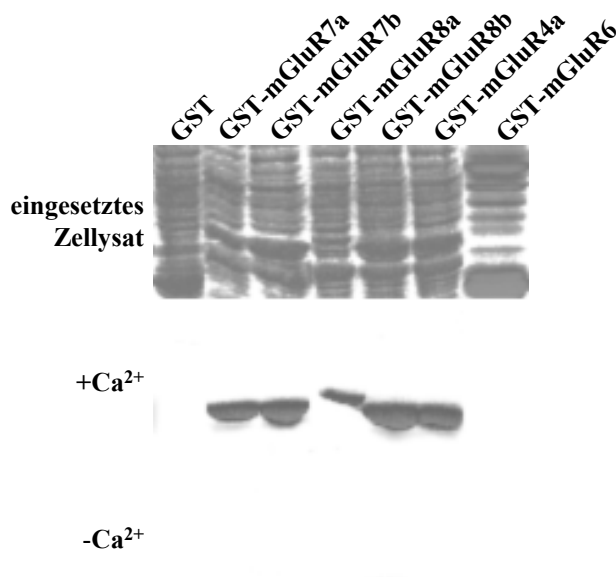


Abbildung 20: Coomassie-Färbung und CaM-Agarose kopräzipitierter Mitglieder der Gruppe III der mGluRs (außer mGluR4b). CaM-Bindung ist in Anwesenheit von 2 mM Ca^{2+} (+Ca²⁺) bzw. 5 mM EGTA (-Ca²⁺) gezeigt. GST alleine diente als Negativkontrolle.

Neben GST (Negativkontrolle) und GST-mGluR7a (Positivkontrolle) wurden hierzu die C-Termini von mGluR7b, mGluR8a, mGluR8b, mGluR4a und mGluR6 analog zu mGluR7a an GST fusioniert und bakteriell exprimiert (siehe 2.2.5). Anschließend wurden die Zellysate direkt mit CaM-Agarose in Bindepuffer und 2 mM $CaCl_2$ bzw. 5 mM EGTA inkubiert und die so gebundenen Proteine elektrophoretisch analysiert.

Wie in der Coomassie-Färbung in Abbildung 20 zu erkennen ist, konnten die C-terminalen Fusionsproteine aller getesteten Gruppe III mGluRs außer GST-mGluR6 mit

CaM-Agarose präzipitiert werden. Dies ist konsistent mit der Tatsache, dass der zytosolische C-Terminus von mGluR6 nicht homolog zu den anderen getesteten C-Termini ist (siehe Abbildung 5). Neben mGluR6 zeigt auch der mGluR4b-Terminus nur geringe Homologie zu den anderen Gruppe III mGluRs. Um mGluR4b auf eine mögliche CaM-Interaktion zu testen, wurde daher auch der C-Terminus dieses Rezeptors bakteriell exprimiert und einer Analyse auf CaM-Bindung unterzogen.

4.2.1.2. Abhängigkeit der CaM-Bindung von der Präsenz der homologen Domäne

Zunächst wurde mGluR4b analog zu den anderen C-Termini als GST-Fusionsprotein exprimiert. Dabei zeigte sich, dass der C-Terminus von mGluR4b sehr schlecht als GST-Fusionsprotein exprimiert wird. In Abbildung 21A links ist eine Coomassie-Färbung von Zellysaten nicht induzierter und induzierter GST-mGluR4b exprimierender *E. coli* BL 21 zu sehen. In einem zweiten Ansatz wurde der C-Terminus von mGluR4b daher an MBP fusioniert (siehe 2.2.5), da ein solches Konstrukt aufgrund seiner Größe eine bessere Löslichkeit als das GST-Fusionsprotein versprach.

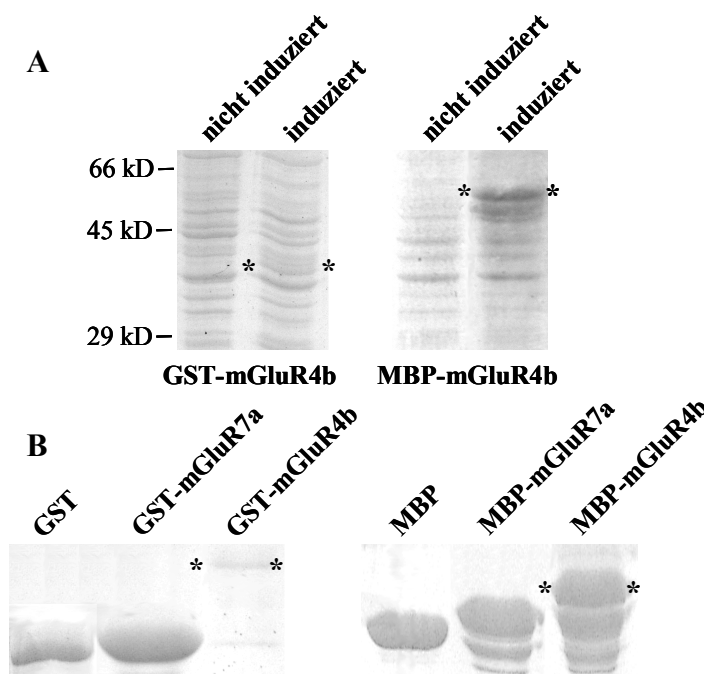


Abbildung 21: Löslichkeit und Präzipitierbarkeit von mGluR4b-Fusionsproteinen. A, Expression der Fusionsproteine. Die erwarteten Laufhöhen sind etwa 42 kD für GST- und etwa 60 kD für MBP-mGluR4b. B, Bindung von GST-mGluR4b an Glutathion-Sepharose bzw. von MBP-mGluR4b an Amylose (mGluR4b-Fusionsproteine mit Sternchen gekennzeichnet).

Tatsächlich war MBP-mGluR4b besser löslich als GST-mGluR4b (Abbildung 21A). Entsprechend wies MBP-mGluR4b auch eine wesentlich höhere Präzipitierbarkeit mit CaM-Agarose auf als das GST-Fusionsprotein (Abbildung 21B). Während GST-mGluR4b nur in wesentlich geringeren Mengen an Glutathion-Sepharose band als die Kontrollen GST und GST-mGluR7a, ließ sich MBP-mGluR4b in vergleichbaren Mengen wie die Kontrollproteine MBP und MBP-mGluR7a an Amylose-Kügelchen binden. Für alle weiteren Versuche mit mGluR4b-Fusionsprotein wurde daher MBP-mGluR4b verwendet.

Die Untersuchung der CaM-Bindung von MBP-mGluR4b erfolgte nach den beiden bereits eingeführten Methoden, zunächst analog zu 4.2.1.1 durch Bindung des Fusionsproteins an CaM-Agarose und anschließend analog zu 4.2.1 durch Immobilisierung der Fusionsproteine an Amylose und anschließende Kopräzipitierung von gereinigtem CaM (siehe 3.2.6). Weder eine Bindung des Fusionsproteins an CaM-Agarose (Abbildung 22A) noch eine Bindung von gereinigtem CaM (Abbildung 22B) konnte für MBP-mGluR4b nachgewiesen werden. MBP-mGluR7a dagegen konnte in Anwesenheit von Ca^{2+} sowohl mit CaM-Agarose präzipitiert werden (Abbildung 22A) als auch gereinigtes CaM binden (Abbildung 22B).

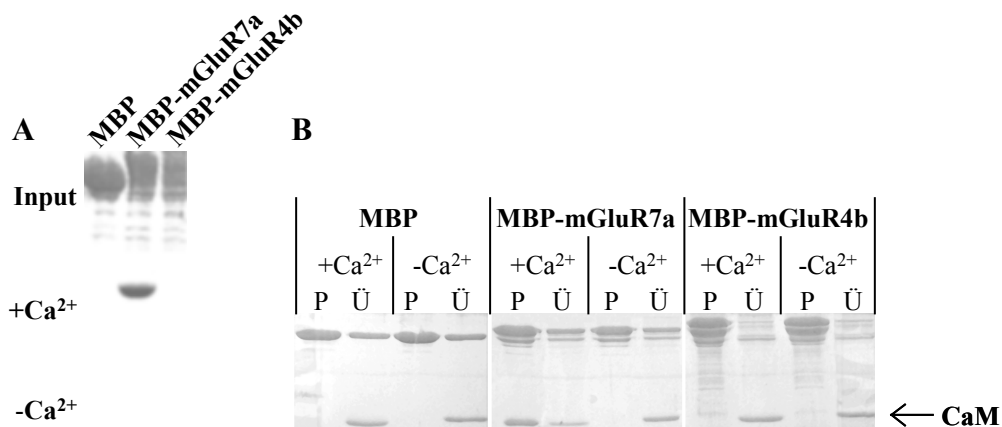


Abbildung 22: Coomassie-Färbung zweier CaM-Bindungsversuche mit MBP-mGluR4b. A, Präzipitation von MBP-Fusionsproteinen mit CaM-Agarose. B, Kopräzipitation von gereinigtem CaM mit immobilisierten MBP-Fusionsproteinen. P Pellet; Ü Überstand.

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass mGluR4b ebenso wie mGluR6 nicht mit CaM interagiert.

4.2.2. G $\beta\gamma$ kompetiert mit CaM um die Bindung an mGluR7a

Neben CaM konnten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. M. Freissmuth die $\beta\gamma$ -Untereinheiten trimerer G-Proteine (G $\beta\gamma$) als weitere Interaktionspartner von mGluR7a identifiziert werden. Dazu wurde immobilisiertes GST-mGluR7a mit einem CHAPS-solubilisiertem Proteinhomogenat aus Schweinehirn inkubiert, gewaschen, mit 30 mM Glutathion eluiert und anschließend mit Antiserum 7 (unspezifischer G β -Antikörper) im Western-Blot detektiert (O'Connor et al., 1999).

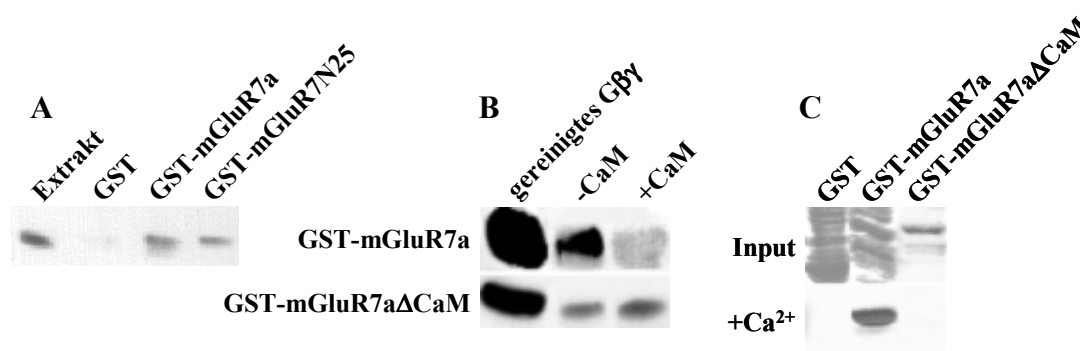


Abbildung 23: Kopräzipitation von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten mit GST-mGluR7a und Kompetition durch CaM. A Sowohl GST-mGluR7a wie auch GST-mGluR7N25 binden CaM. B, Gereinigtes G $\beta\gamma$ bindet GST-mGluR7a nur in Abwesenheit von CaM. Diese Kompetition ist an GST-mGluR7a Δ CaM nicht mehr zu sehen. C, GST-mGluR7a Δ CaM bindet kein CaM. CaM und G $\beta\gamma$ binden also nicht an die gleiche Sequenz.

In Abbildung 23A ist eine spezifische Bindung von G $\beta\gamma$ an GST-mGluR7a zu sehen. Mit Hilfe von GST-mGluR7N25 konnten die G $\beta\gamma$ -Bindedomäne von mGluR7a auf die ersten 25 Aminosäuren eingegrenzt werden. Da hier auch die CaM-Bindedomäne liegt, wurde im folgenden der Einfluss von CaM auf die Interaktion von GST-mGluR7a und G $\beta\gamma$ getestet. Hierzu wurde G $\beta\gamma$ chromatographisch an immobilisiertem G α gereinigt (O'Connor et al., 1999). 30 pmol gereinigtes oligomeres G $\beta\gamma$ wurden allein oder mit 200 pmol CaM und 2 mM CaCl₂ mit GST-mGluR7a inkubiert. Nur in Abwesenheit von CaM war eine Bindung von G $\beta\gamma$ an GST-mGluR7a nachzuweisen (Abbildung 23B, obere Reihe). Um zu überprüfen, ob CaM und G $\beta\gamma$ um die gleiche Bindedomäne kompetieren, wurden in GST-mGluR7a Δ CaM die Aminosäuren 864 bis 876 deletiert (siehe 2.2.5) und das Experiment mit dieser Mutante wiederholt.

Während die Bindung von G $\beta\gamma$ an GST-mGluR7a durch CaM gehemmt wurde,

war bei GST-mGluR7a Δ CaM keine Konkurrenz durch CaM zu sehen (Abbildung 23B, untere Spalte). Abbildung 23C zeigt, dass GST-mGluR7a Δ CaM auch die Fähigkeit zur CaM-Bindung verloren hat. Die Bindedomänen für CaM und G $\beta\gamma$ auf mGluR7a liegen also nahe beieinander bzw. überlappen. Allerdings müssen zum Teil unterschiedliche Reste in mGluR7a für die Bindung von CaM und G $\beta\gamma$ verantwortlich sein.

4.2.3. Phosphorylierung von Gruppe III mGluRs

Ein weitverbreiteter Mechanismus zur Regulation von CaM-Bindungen ist die Phosphorylierung der jeweiligen Interaktionspartner (Minakami et al., 1997; Rhoads und Friedberg, 1997). In verschiedenen Publikationen konnte bereits eine PKC-Abhängigkeit der von mGluRs der Gruppe III getriggerten Signalkaskade gezeigt werden (Macek et al., 1998, 1999). Nach dem Nachweis einer Regulation der G $\beta\gamma$ -Bindung durch CaM sollte daher eine mögliche Epiregulation der mGluRs durch PKC untersucht werden.

Wie eine Sequenzanalyse zeigte, liegt in allen Mitgliedern der mGluRs der Gruppe III mindestens eine mögliche Konsensus-Sequenz für Phosphorylierung durch PKC vor (siehe Abbildung 24A). Zum Nachweis einer möglichen PKC-Phosphorylierung wurden die C-Termini der Mitgliedern der Gruppe III mGluRs *in vitro* durch PKM, die katalytische Untereinheit der PKC, phosphoryliert. Hierzu wurden GST- und MBP-Fusionsproteine 2 h in Phosphorylierungspuffer (siehe 3.2.15) mit [γ ³²P]-ATP und PKM inkubiert und anschließend auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert. Der Einsatz von radioaktivem Phosphat erlaubte die einfache Detektion der Phosphorylierung der Fusionsproteine durch Autoradiographie. Abbildung 24B zeigt eine Coomassie-Färbung und die dazugehörige Autoradiographie der phosphorylierten Proteinansätze.

Nur GST-mGluR7a, MBP-mGluR7a, GST-mGluR7b, GST-mGluR8a, GST-mGluR8b und GST-mGluR4a konnten *in vitro* phosphoryliert werden, nicht aber GST-mGluR6 oder MBP-mGluR4b. Dies spiegelt die Fähigkeit der Rezeptoren wieder, mit CaM interagieren zu können. Nur die Mitglieder mit homologem, membranahem Bereich konnten CaM binden und nur diese konnten unter den getesteten Bedingungen phosphoryliert werden.

A

```

mGluR4a H.....PEQ.....NVPKRKRS LKAVVTAATMS NKFTQKGN.....
mGluR4b HIFPFCSWSPAICPAPCPSSLSCP I PAIIFSSVPPRSHFLPAFPLLGFIHQLFHHVAKEKKKGGGES
mGluR6 H.....PEQ.....NVQKRKRS LKKTSTMAAP.....
mGluR7a H.....PEL.....NVQKRKRS FKAVVTAATMS SRLSHKPSD.....
mGluR7b H.....PEL.....NVQKRKRS FKAVVTAATMS SRLSHKPSD.....
mGluR8a H.....PEQ.....NVQKRKRS FKAVVTAATMQSKLIQKGN.....
mGluR8b H.....PEQ.....NVQKRKRS FKAVVTAATMQSKLIQKGN.....

mGluR4a .....FRPNGEAKSELCE·NLETP.....ALATKQT·YVITYT·NHAI·
mGluR4b PPTKKPKQKLILSVFRSAASSWWPVCPCGLQPARPPYPSAVCPARPPARLALPANDTEFSAWVFGDGL
mGluR6 .....PQNE.....NAEDAK.....
mGluR7a .....RPNGEAKTELCE·NVD PNS.....P.....AAKKKYVSYN·NLVI·
mGluR7b .....RPNGEAKTELCE·NVD PNN.....C·IPPVR.....SVQKSVTWYT·PPTV·
mGluR8a .....RPNGEVKSELCE·SLETNT.....S.....STKTTYISYS·DHSI·
mGluR8b .....RPNGEVKSELCE·SLETNS.....K.....SSVDFQMVKS·GSTS·

```

B

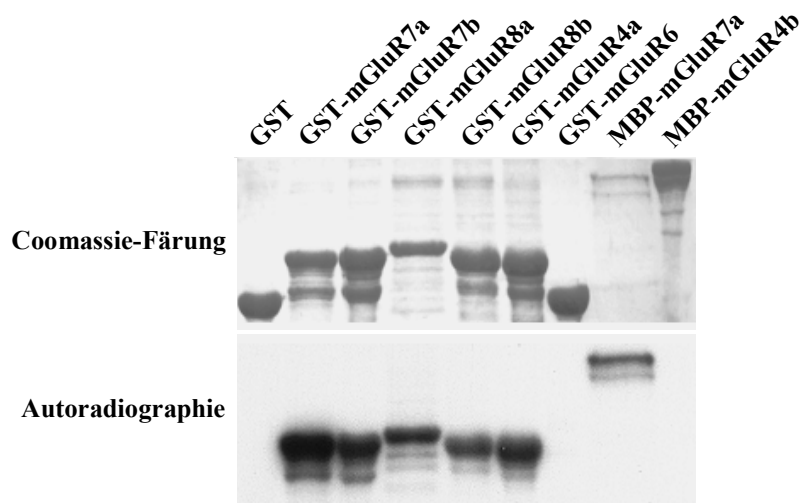


Abbildung 24: *In vitro*-Phosphorylierung der C-Termini aller Mitglieder der Gruppe III der mGluRs. A, Alle mGluRs der Gruppe III weisen Konsensussequenzen für PKC-Phosphorylierung auf (farbige Aminosäuren). Eine davon (rot, S862 in mGluR7a) ist in allen phosphorylierten Rezeptoren konserviert. B, Während die Coomassie-Färbung vergleichbare Mengen der verschiedenen Fusionsproteine zeigt, ist in der Autoradiographie eine Phosphorylierung nur von mGluR4a, -7a, -7b, -8a und -8b zu sehen. Die mGluR4b und mGluR6-Fusionsproteine sind nicht phosphoryliert.

In allen phosphorylierten Rezeptoren ist nur ein Serin (S862 in mGluR7a) konserviert, und dieses liegt innerhalb der CaM-Bindedomäne der Rezeptoren (siehe Abbildung 24A).

4.2.3.1. Identifizierung der phosphorylierten Aminosäurereste in mGluR7a

Da in den meisten der untersuchten Proteine mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen liegen, wurden zur Identifizierung der tatsächlich phosphorylierten Reste Punktmutationen in den C-Terminus von mGluR7a eingeführt (siehe 2.2.5). Dabei wur-

den dir vier Serine, die mit der Konsensus-Sequenz der PKC-Phosphorylierung übereinstimmen, alternierend durch Alanine ersetzt (siehe Schema in Abbildung 25A).



Abbildung 25: Phosphorylierung des hochkonservierten Restes S862. A, Schema der Mutationen in mGluR7a. Die Zahlen in den Konstrukten a bis e stehen für die vier möglichen Phosphorylierungsstellen S862 (rot), S873, S877 und S881 in mGluR7a. In mGluR7aS862A ist die Aminosäure S862 durch Alanin, in mGluR7aEEE sind K864, A865 und V866 durch Glutamate substituiert. B, *In vitro*-Phosphorylierung der in A genannten Konstrukte a bis g.

Die Phosphorylierung der mutierten Proteine ist in Abbildung 25B gezeigt. Nur der Wildtyp GST-mGluR7a und das Konstrukt GST-mGluR7aS234A konnten unter diesen Bedingungen phosphoryliert werden. Eine nennenswerte Inkorporation von [³²P] in die Fusionsproteine GST-mGluR7aS1234A (a), GST-mGluR7aS123A (b), GST-mGluR7aS124A (d) und GST-mGluR7aS134A (e) war dagegen nicht nachweisbar. Diese tragen alle eine Aminosäuresubstitutionen in Position 862. Der alleinige Austausch von S862 zu Alanin (mGluR7aS862A, f) oder eine Mutation innerhalb der Konsensus-Sequenz für PKC-Phosphorylierung (mGluR7aEEE, g) führte ebenfalls zum Verlust der Phosphorylierung. Diese beiden Konstrukte belegen, dass Serin 862 die einzige Aminosäure im C-Terminus von mGluR7a ist, die *in vitro* durch PKC phosphoryliert wird.

4.2.3.2. Einfluss von P_i-analoger Substitution auf die CaM-Bindung

Bei der weiteren Untersuchung der Regulation der CaM-Bindung an mGluR7a wurde getestet, ob die Phosphorylierung von S862 ausreichend ist, um die Interaktion

des Rezeptors mit CaM zu unterbinden. Mit Hilfe von Präzipitationsstudien an CaM-Agarose analog zu 4.2.1.1 wurden Konstrukte mit Substitution von S862 gegen Alanin (in GST-mGluR7N25S862A) bzw. gegen Glutamat (in GST-mGluR7N25S862E) auf ihre CaM-Bindung getestet. Das negativ geladene Glutamat sollte die negative Ladung der Phosphatgruppe imitieren.

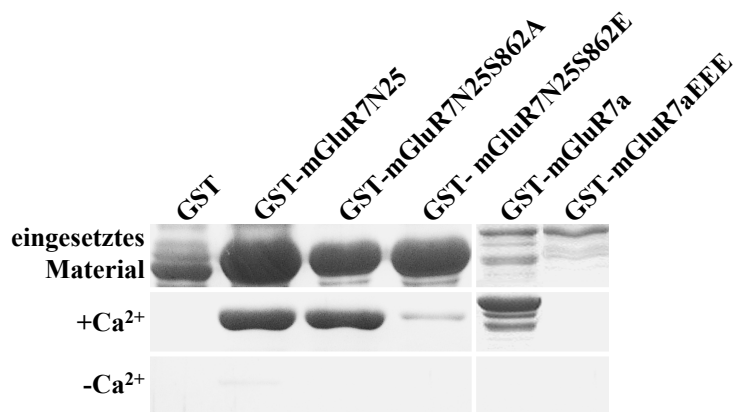


Abbildung 26: Ca^{2+} -abhängige CaM-Bindung an mGluR7a-Mutanten mit P_i -analoger Substitution. Coomassie-Färbungen zeigen die eingesetzten Mengen an Fusionsproteinen (oben) und deren Bindung an CaM-Agarose in An- (Mitte) und Abwesenheit von Ca^{2+} (unten). Der Austausch von S862 in mGluR7a durch Glutamat, nicht aber durch Alanin, führt zu einem drastischem Verlust der CaM-Bindung. Nicht der Austausch von S862 per se ist ausschlaggebend für den Verlust der CaM-Interaktion, sondern die Erhöhung der Ladung in dessen Nachbarschaft.

In Abbildung 26 ist eine deutliche Abnahme der CaM-Bindung bei GST-mGluR7N25S862E zu sehen. Der Austausch des gleichen Restes durch die hydrophobe Aminosäure Alanin (GST-mGluR7N25S862A) zeigte dagegen keine verminderte CaM-Bindung. Der Austausch von S862 ist per se also nicht ausschlaggebend für den Verlust der CaM-Interaktion. Eine Erhöhung der Anzahl negativer Ladungen in der Nachbarschaft von S862 (GST-mGluR7aEEE) führte zum vollständigen Verlust der CaM-Bindung. Da negative Ladungen die Inkorporation einer Phosphatgruppe durch Phosphorylierung imitieren, ist zu erwarten, dass unter physiologischen Bedingungen CaM nur an den nicht phosphorylierten Rezeptor binden kann.

4.2.3.3. Die PKC-Phosphorylierung spielt möglicherweise eine physiologische Rolle bei der Regulation durch CaM

Die Interaktion von mGluR7a mit CaM und eine mögliche Regulation durch Phosphorylierung von S862 sollte unter physiologischen Bedingungen im heterologen

Oozytensystem getestet werden. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Karschin wurden hierzu Wildtyp-Rezeptor und Konstrukte mit Punktmutationen mit $K_{ir3,1/3,2}$ -Kanälen („einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle“) in Oozyten koexprimiert und hinsichtlich ihrer Aktivität elektrophysiologisch untersucht. K_{ir} -Kanäle sind wie die mGluRs der Gruppe III $G\alpha_{O/1}$ -gekoppelt und führen nach Aktivierung durch diese $G\alpha$ -Untereinheiten zu einem einwärtsgerichteten K^+ -Strom. Sie lassen sich daher zur Bestimmung des Aktivierungszustandes des kotransfizierten Rezeptors nutzen: der aktivierte Rezeptor führt zur Freisetzung aktivierter $G\alpha_{O/1}$, die nach Kopplung und Aktivierung der K_{ir} -Kanäle zu einem messbaren K^+ -Strom führen.

Zur Bestimmung der physiologischen Relevanz der CaM-Bindung von mGluR7a wurde das Vollängenkonstrukt mGluR7a Δ CaM bzw. der Wildtyp-Rezeptor mit dem K_{ir} -Kanal koexprimiert. Nach Aktivierung der Rezeptoren durch Zugabe von L-AP4, dem spezifischen Agonisten der Gruppe III mGluRs, konnte nur bei mGluR7a (blau Kurve) ein deutlicher K^+ -Einstrom gemessen werden (Abbildung 27). Dieser war bei mGluR7a Δ CaM (rote Kurven) stark vermindert oder fehlte ganz. Diese Ergebnisse belegen eine deutliche CaM-Abhängigkeit der mGluR7a-vermittelten G-Protein-Aktivierung.

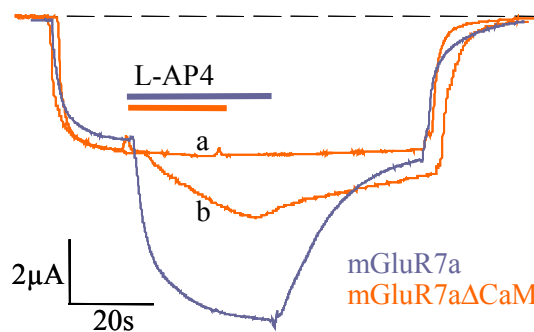


Abbildung 27: Bestimmung der physiologischen Relevanz der CaM-Bindung im Oozyten-System. Wildtyp-Rezeptor ist blau, Δ CaM-Konstrukt rot markiert. Für mGluR7a Δ CaM sind zwei Messungen (a und b) gezeigt, da dessen Messung im Gegensatz zum Wildtyp-Rezeptor eine hohe Varianz aufwies.

Zur Bestimmung einer möglichen Regulation von mGluR7a durch Phosphorylierung von S862 wurde mGluR7aS862A mit dem K_{ir} -Kanal koexprimiert. Dieses Konstrukt kann *in vitro* zwar noch an CaM binden, aber nicht durch die PKC phosphoryliert werden (Abbildung 25 und Abbildung 26). In Abbildung 28A sind die Ströme nach Aktivierung von Wildtyp-Rezeptor bzw. mGluR7aS862A zu sehen.

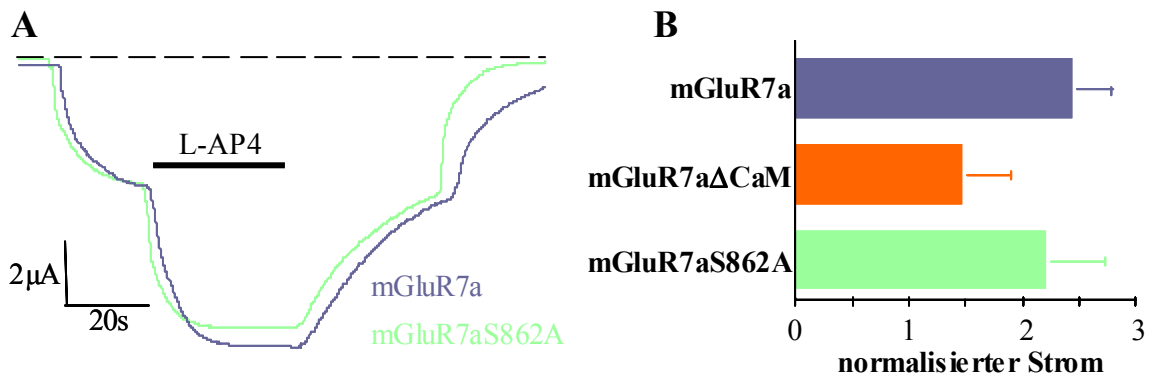


Abbildung 28: Bestimmung der Funktionalität von mGluR7aS862A. A, Ströme nach Aktivierung von mGluR7a bzw. mGluR7aS862A. B, Vergleich der normalisierten Ströme von mGluR7a, mGluR7a Δ CaM und mGluR7aS862A. Normalisierte Ströme geben das Verhältnis von Gesamtstrom zu durch L-AP4 induziertem Strom wieder und sind somit ein Maß für die Aktivität der Rezeptoren.

Wildtyp-Rezeptor und modifizierte Konstrukte lieferten praktisch identische Ströme. Dies verdeutlicht auch das Balkendiagramm der normalisierten Ströme in Abbildung 28B. Während mGluR7a Δ CaM im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor eine deutliche Verminderung (ca. 30 - 40%) des normalisierten Stromes aufweist, ist nur ein sehr geringer Unterschied zwischen Wildtyp-Rezeptor und mGluR7aS862A zu sehen.

Zur Bestimmung des Einflusses der PKC auf die Aktivierung von mGluR7a und mGluR7aS862A wurden die Ströme von koexprimiertem mGluR7a und K_{ir} -Kanälen vor Zugabe und 2 min nach Zugabe (PMA), einem Aktivator der PKC, gemessen. Die Zugabe von PMA alleine führte zur Hemmung des einwärtsgerichteten K^+ -Stroms (Abbildung 29A), was auf eine Verringerung des Gesamtstromes und eine Hemmung der K_{ir} -Kanälen durch Aktivierung der PKC und anschließender Phosphorylierung der Kanäle zurückzuführen ist (Wischmeyer et al., 1998). Da statt der absoluten aber die relativen Ströme miteinander verglichen wurden, sollte diese Hemmung der K_{ir} -Kanäle keinen Einfluss auf die Kopplung mit den mGluRs haben.

Unter diesen Bedingungen war in Oozyten wider Erwarten kein Einfluss auf die relativen L-AP4-induzierten Ströme nach Aktivierung der PKC zu sehen. Mit beiden Rezeptorkonstrukten (mGluR7a und mGluR7aS862A) wurde eine ähnliche Aktivierung nach PMA-Behandlung gefunden. Die relativen Ströme vor und nach Aktivierung der Rezeptoren erwiesen sich als unabhängig von der Aktivierung der PKC (Abbildung 29B).

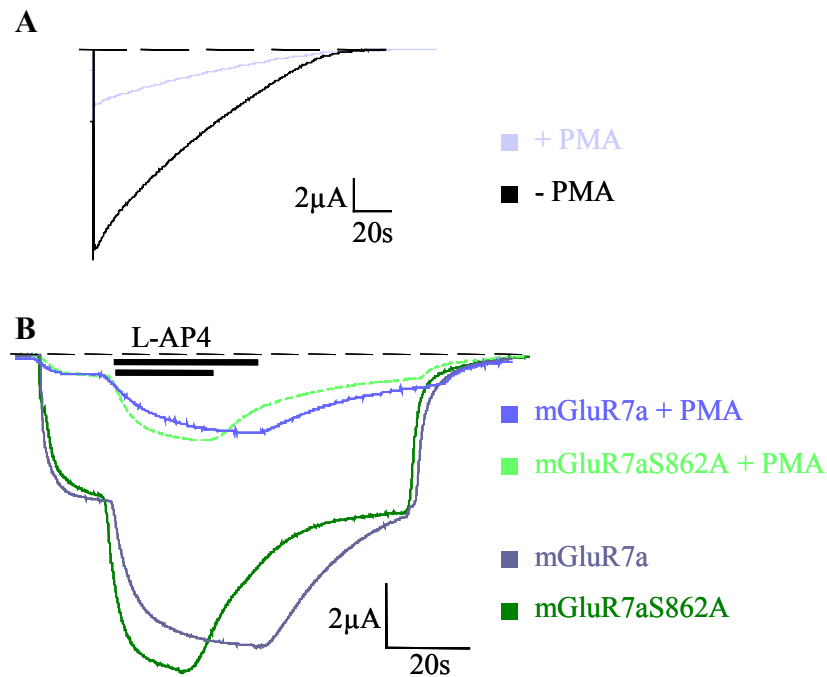


Abbildung 29: Eine Aktivierung der PKC zeigt keinen Einfluss auf die mGluR7a-Aktivität in Oozyten. A, Hemmung der K_{ir} -Kanäle durch PKC-Phosphorylierung. B, Fehlender Einfluss von PMA auf die mGluR7a- und mGluR7aS862A-vermittelte K_{ir} -Aktivierung.

Offensichtlich hat im Oozytensystem die Aktivierung der Kinase keinen großen Einfluss auf die CaM-abhängige Signaltransduktion. Dies ließ vermuten, dass vielleicht zusätzliche regulatorische Proteine für die PKC-Phosphorylierung von mGluRs wichtig sind.

4.2.3.4. Direkte Interaktion von $PKC\alpha$ mit mGluR7a

In verschiedenen Publikationen wurde bereits eine indirekte Interaktion von mGluR7a mit $PKC\alpha$, einer ubiquitär exprimierten Isoform der PKC (Dekker und Parker, 1994; Dekker et al., 1995), im Komplex mit Pick1 postuliert (Boudin et al., 2000; Dev et al., 2000; El Far et al., 2000). $PKC\alpha$ interagiert über ihren C-Terminus mit Pick1 und kann daher in einem trimeren Komplex mit mGluR7a und Pick1 kopräzipitiert werden kann (Dev et al., 2000). Zur weiteren Analyse der Phosphorylierung von mGluR7a durch die PKC wurde eine direkte Wechselwirkung beider Proteine miteinander untersucht, da dies von großer Relevanz bei der Phosphorylierung von mGluR7a sein könnte.

Hierzu wurde die mit einem flag-Epitop markierte katalytische Untereinheit der $PKC\alpha$ (PKC7, Aminosäuren 302-661 in pFlag, Vektor überlassen von Dr. Staudinger

überlassen (Staudinger et al., 1995)) heterolog in eukaryotischen HEK 292-Zellen exprimiert und anschließend mit bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteinen kopräzipitiert. Die mit Triton-X-100 solubilisierete Proteinfraction wurde mit immobilisiertem GST, GST-mGluR7a und GST-mGluR7aAAA, einem Konstrukt, bei dem die letzten drei Reste durch Alanine ersetzt wurden und das daher nicht mehr mit Pick1 interagieren kann (siehe 2.2.5), inkubiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot mit α flag-Antikörpern analysiert (siehe 2.3).

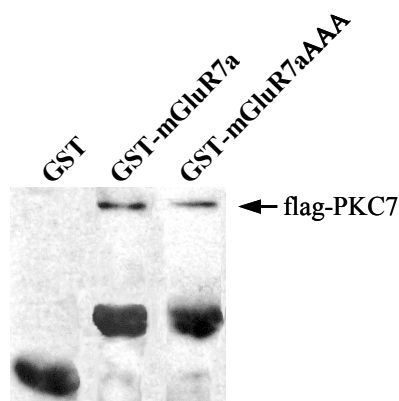


Abbildung 30: Interaktion von flag-PKC7 mit GST-mGluR7a und GST-mGluR7aAAA. Die größeren Banden in der unteren Hälfte des Western-Blots stellen die unspezifisch gefärbten GST-Fusionsproteine dar. Diese Banden zeigen die vergleichbaren Mengen an eingesetzten Fusionsproteinen.

In Abbildung 30 ist eine spezifische Interaktion von flag-markiertem PKC7 mit GST-mGluR7a, nicht aber mit der Negativkontrolle GST allein zu sehen. Trotz des Austausches der letzten 3 Reste gegen Alanine band flag-PKC7 auch an GST-mGluR7aAAA. Für die Interaktion scheint daher in mGluR7a eine andere Domäne zuständig zu sein als für die Interaktion mit Pick1 (Boudin et al., 2000; Dev et al., 2000; El Far et al., 2000).

Da diese Ergebnisse bei Versuchen, sie unter den gleichen oder ähnlichen Bedingungen zu wiederholen, nicht reproduziert werden konnten, wurde in einem weiteren Ansatz eine Koimmunpräzipitation mit eukaryotisch exprimierten vollständigem Rezeptor mGluR7a (siehe 4.1.2.1) und PKC7 versucht. Hierzu wurde der mit einem flag-Epitop markierte Rezeptor in den Expressionsvektor pBK-CMV und PKC7 zur Markierung mit GFP in peGFP-C2 kloniert (siehe 2.2.5). Nach Kotransformation und Expression beider putativer Interaktionspartner in HEK 293-Zellen wurden die Zellen lysiert und die Löslichkeit beider Proteine im Western-Blot mit α GFP- bzw. α flag-Antikörpern bestimmt (siehe 2.3). Die Abbildung 31A zeigt trotz guter Expression beider Proteine

(hier nicht gezeigt) zwar eine gute Löslichkeit von solubilisiertem flag-mGluR7a (Pfeile), nicht aber von GFP-PKC7 (Sternchen).

Für die Koimmunpräzipitation wurden die solubilierten Proteinlösungen mit α flag- bzw. α Syntaxin-Antikörpern als Negativkontrolle inkubiert und mit Protein-A/G-Sepharose präzipitiert. Das Präzipitat wurde anschließend mit α GFP-Antikörpern im Western-Blot analysiert (siehe 2.3).

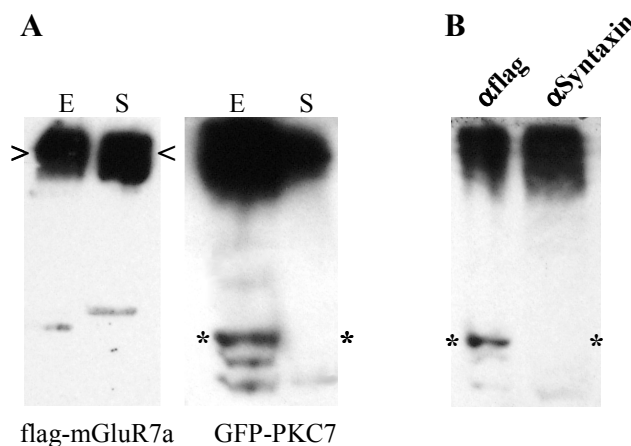


Abbildung 31: Expression und Koimmunpräzipitation von GFP-PKC7 mit flag-mGluR7a. A, Nur flag-mGluR7a (Pfeile), nicht aber GFP-PKC7 (Sternchen) kann in solubilisierter Proteinfraktion detektiert werden. B, spezifische Koimmunpräzipitation von GFP-PKC7 mit α flag- nicht aber mit α Syntaxin-IgGs. E eingesetztes Material, S solubilierte Proteinfraktion.

GFP-PKC7 konnte spezifisch mit α flag-Antikörpern mit flag-mGluR7a koimmunpräzipitiert werden, nicht aber mit der Negativkontrolle, dem α Syntaxin-Antikörper (Abbildung 31B). Trotz der relativ schlechten Löslichkeit von solubilisiertem GFP-PKC7 konnte es durch Aufkonzentrierung an immobilisiertem flag-mGluR7a (linke Spur in Abbildung 31B) sichtbar gemacht werden. Dies spricht für eine hohe Affinität und Spezifität dieser Interaktion.

Wie schon bei der Kopräzipitation mit bakteriellen GST-Fusionsproteinen in Abbildung 30 konnten diese Ergebnisse aber bei Wiederholung der Versuche unter identischen Bedingungen nicht reproduziert werden. Eine mögliche Ursache für die Schwierigkeiten beim Nachweis der Interaktion zwischen mGluR7a und PKC könnte der Einsatz des Deletionskonstruktes PKC7 darstellen. Versuche mit dem gesamten PKC-Protein konnten im Verlauf dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Die Beobachtung einer Interaktion von mGluR7a und PKC7 in zwei verschiedenen Systemen lässt aber dennoch auf eine spezifische Interaktion beider Proteine schließen.

5. Diskussion

Die meisten mGluRs der Gruppe III sind spezifisch an der aktiven Zone der Präsynapse lokalisiert (Shigemoto et al., 1996; Ottersen und Landsend, 1997) und dort an der Regulation der Neurotransmission beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde nach neuen Interaktionspartnern für mGluRs der Gruppe III gesucht, um Aufschlüsse über deren Lokalisation und/oder ihre nachgeschalteten Signalkaskaden zu erhalten. Dabei konnten die Proteine SGT und PxF als mögliche Bindungspartner für mGluR4b in einem Zwei-Hybrid-Screen identifiziert werden. Die Interaktionen beider Proteine mit dem Rezeptor konnten allerdings bio- und immunzytochemisch nicht bestätigt werden. Die physiologische Bedeutung dieser Interaktionen bleibt somit unklar. Weiterhin wurde eine Ca^{2+} /CaM-abhängige Regulation der Bindung heterotrimerer G-Proteine an mGluR7a untersucht, welche sich bei den meisten mGluRs der Gruppe III findet. Außerdem konnte eine Phosphorylierung der C-Termini der untersuchten Rezeptoren als zusätzliche Regulationsebene charakterisiert werden. Hierbei ergab sich, dass PKC-Phosphorylierung eines einzelnen, hoch konservierten Serin-Restes die CaM-Bindung des Rezeptors durch Veränderung der Ladungsverteilung in der CaM-Bindedomäne hemmt.

Aufgrund dieser Daten wird ein Modell zur Regulation der Exozytose durch präsynaptische mGluRs postuliert, bei dem die mGluR-vermittelte Hemmung der Glutamatfreisetzung durch Phosphorylierung abschaltbar ist.

5.1. Neue Interaktionspartner für mGluRs der Gruppe III

Zu Beginn dieser Arbeit war nur wenig über intrazelluläre Interaktionspartner für mGluRs der Gruppe III und deren Funktionsweise bekannt. Deshalb wurde zunächst ein Zwei-Hybrid-Screen in Hefe mit den C-Termini verschiedener mGluRs gestartet. Bei einer Länge von bis zu 300 Resten erschien es wahrscheinlich, dass diese intrazellulären Rezeptor-Domänen eine Reihe von Funktionen erfüllen und zum Beispiel an Translokation, Lokalisation und Regulation des Rezeptors beteiligt sind.

Bei der Suche nach neuen Interaktionspartnern von mGluRs der Gruppe III kam zunächst das Gal4-Zwei-Hybrid-System zum Einsatz. Trotz hoher Transformationseffizienzen konnten dabei weder mit dem C-Terminus von mGluR4b noch mit denen anderer mGluRs der Gruppe III spezifisch mit dem Köderprotein interagierende Klone iden-

tifiziert werden. Dabei wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Oussama El Far noch mit den C-Termini von mGluR7a, mGluR7b, mGluR4a, mGluR8a und zusätzlich mit einigen Deletionskonstrukten der genannten Rezeptoren gescreent.

Ein Test auf Toxizität der eingesetzten Köderproteine für die Hefezellen lieferte eine mögliche Erklärung für die erfolglose Suche. Das Diagramm in Abbildung 13 zeigt mit 30 bis 45% besonders hohe Toxizitäten für BD-mGluR4b und BD-mGluR7a, aber auch die anderen getesteten Köderproteine mit vollständigen zytosolischen C-Termini wiesen eine hohe Toxizität auf. Lediglich die Köderproteine, bei denen die N-terminalen 25 Aminosäuren fehlen, waren in den Hefezellen weniger toxisch. So hat z. B. BD-mGluR7aC27 das Wachstum der Hefen wenig beeinträchtigt. Der membrannaher Bereich der C-Termini der mGluRs scheint also eine entscheidende Rolle bei der Toxizität für Hefezellen zu spielen. Der Homologievergleich in Abbildung 5 zeigt, dass alle mGluRs der Gruppe III mit Ausnahme von mGluR4b gerade in diesem Bereich eine Identität auf Aminosäure-Ebene von annähernd 100% aufweisen. Durch den Einsatz von Deletionskonstrukten konnte gezeigt werden, dass in diesem Bereich die CaM- und die G $\beta\gamma$ -Interaktionsdomänen der mGluRs der Gruppe III liegen (Abbildung 19 und Abbildung 23). Eine mögliche Ursache für die hohe Toxizität dieser Domäne könnte daher eine Interaktion der überexprimierten Köderproteine mit endogenem CaM bzw. G-Proteinen und die resultierende Störung des Ca²⁺-Haushaltes bzw. der G-Proteingekoppelten Signalkaskaden in der Hefe sein. Eine derartige Interaktion mit endogenen Proteinen könnte auch die Translokation der Köderproteine in den Zellkern hemmen, was die Detektion einer Interaktion ebenfalls verhindern sollte. Da mGluR4b aber weder mit CaM noch mit G $\beta\gamma$ interagiert, müssen noch weitere Faktoren eine Rolle bei der hohen Varianz der beobachteten Toxizitäten spielen. Im Fall von mGluR4b könnte z. B. der hohe Gehalt an hydrophoben Aminosäuren und die daraus resultierende mangelnde Löslichkeit des C-Terminus eine entscheidende Rolle spielen (Abbildung 11).

Zur Umgehung des Problems der hohen Toxizitäten der Köderkonstrukte für die Hefezellen wurde das LexA-Zwei-Hybrid-System zur Identifikation neuer Interaktionspartner eingesetzt. Dieses erlaubt unter anderem die regulierte Expression der Köderproteine in der postreplikativen Wachstumsphase und eine wesentlich sensitivere Detektion positiver Klone (Tabelle 4). Mit Hilfe dieses Systems konnten 330 potentielle Interaktionspartner-Klone für mGluR4b gefunden werden. Nach Analyse der ersten 100 Klone erschienen zwei spezifisch mit dem Köderkonstrukt interagierende Genprodukte interes-

sant, SGT und PxF. Für beide Proteine wurden zwar mehrmals Klone gefischt, es handelte sich aber dabei nicht um unabhängige, sondern um identische, jeweils das gesamte Protein kodierende cDNAs, sodass keinerlei Information zu den Interaktionsdomänen in diesen Proteinen gewonnen werden konnten. Im Folgenden werden SGT und PxF näher eingeführt und ihre Interaktionen mit mGluR4b diskutiert.

5.1.1. SGT

Das 34 kD große Protein SGT (small glutamine rich tetratricopeptide repeat containing protein) wurde in einem Zwei-Hybrid-Screen mit NS1, einem Protein aus Parvovirus H-1, das an der Amplifikation der viralen DNA und der Genexpression in der Wirtszelle beteiligt ist, als Köderprotein aus einer Ratten-cDNA-Bank gefischt (Cziepluch et al., 1998; Kordes et al., 1998). Außer mit NS1 kann SGT auch mit sich selbst interagieren und so Homodimere bilden. Die kodierende mRNA ist 2,4 kb groß, ubiquitär in allen Geweben zu finden und sowohl im Nukleus wie im Zytoplasma lokalisiert. In mit H-1 infizierten Zellen kolokalisiert SGT mit NS1 in vom Virus induzierten Bereichen des Zellkerns, in denen die virale DNA transkribiert wird (Cziepluch et al., 2000). Da zudem eine NS1-induzierte Modifizierung (wahrscheinlich Phosphorylierung) von SGT *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Cziepluch et al., 1998), geht man davon aus, dass eine Funktion von SGT bei der Transkription der viralen Proteine liegt. Welche physiologische Rolle SGT in den Wirtszellen spielt und warum es auch im Zytoplasma der Zellen vorkommt, ist unbekannt.

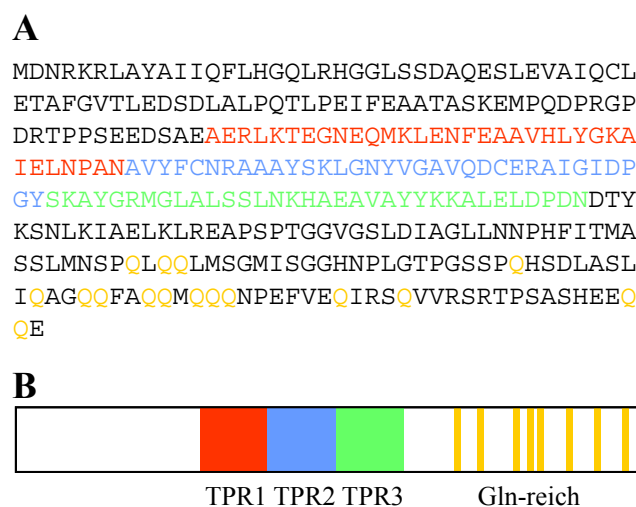


Abbildung 32: Struktur von SGT. A, Aminosäuresequenz aus Ratte. B, Schema zur Verteilung der TPR- und Gln-reichen Domänen. Die TPR-Motive sind rot (TPR1), blau (TPR2) bzw. grün (TPR3) markiert, der Gln-reiche Bereich ist gelb.

festgestellt werden. Es war weder durch Immobilisierung von GST-SGT noch von MBP-mGluR4b eine spezifische Kopräzipitation nachweisbar (Abbildung 15). Da eine mögliche Erklärung hierfür das Fehlen eventuell wichtiger posttranslationaler Modifikationen im eingesetzten bakteriellen System sein könnte, wurde SGT daher in einem zweiten Ansatz in eukaryotischen Zellen exprimiert. Unter diesen Bedingungen war jedoch myc-mGluR4b nicht solubilisierbar (Abbildung 16). Die Koimmunpräzipitation dieser eukaryotisch exprimierten Fusionsproteine war daher nicht möglich.

In einem weiteren Ansatz zur Verifizierung der im Zwei-Hybrid-System beobachteten Interaktionen sollte *in vitro* translatiertes, His-markiertes SGT mit immobilisiertem MBP-mGluR4b kopräzipitiert werden. Leider konnte SGT jedoch im Retikulozyten-System nicht translatiert werden (Abbildung 17A). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der verwendete Vektor pcDNA4/His sein, der vor dem Startkodon eine lange Enhancer-Sequenz besitzt. Eventuell auftretenden Sekundärstrukturen in dieser Sequenz mögen zu einem Stop der T7-Polymerase und somit zu einer Hemmung der Transkription führen.

Zusätzlich zu diesen biochemischen Ansätzen wurden Transfektionsexperimente an HEK 293-Zellen durchgeführt, um die Verteilung von GFP-SGT und myc-mGluR4b *in vivo* zu untersuchen. Bei einer direkten Interaktion der Proteine wäre eine zumindest partielle Kolokalisation oder eine Umorganisation der beteiligten Proteine nach deren Kotransformation zu erwarten. Das myc-markierte Volllängenkonstrukt myc-mGluR4b wurde unter den getesteten Bedingungen aber nicht an die Plasmamembran der transfizierten HEK 293-Zellen transportiert (Daten nicht gezeigt). Dies könnte z. B. am Myc-Epitop liegen, das hinter das Signalpeptid in den Rezeptor kloniert wurde (2.2.5). Eine so ausgelöste Störung der Signalsequenz würde die Translation des Rezeptors im endoplasmatischen Retikulum beeinträchtigen und zu einem falsch gefalteten Protein führen. Dies würde sich mit der Tatsache decken, dass im gleichen Zellsystem exprimiertes myc-mGluR4b nicht solubilisierbar war (Abbildung 16). Auch war keine Reorganisation des gleichmäßig in der Zelle verteilten GFP-SGTs zu sehen.

5.1.2. PxF

Das farnesylierte Protein PxF (peroxisomal farnesylated protein) ist an der zytoplasmatischen Seite von Peroxisomenmembranen lokalisiert (James et al., 1994; Kammerer et al., 1997). Peroxisomen besitzen nur eine Membran und weder DNA noch

Ribosomen. Sie kommen in allen Zellen vor, sind aber in Leberzellen mit einem Durchmesser von bis zu 0,5 μm besonders groß, da sie an einer Reihe oxidativer Prozesse beteiligt sind. Das 33 kD große Protein PxF wurde durch radioaktive Markierung bei der Suche nach unbekanntem farnesylierten Proteinen in einer Zelllinie aus Hamster identifiziert. Inzwischen konnten vier Varianten von PxF isoliert werden, die durch alternatives Spleißen entstehen (Kammerer et al., 1997). Nur zwei davon konnten *in vitro* farnesyliert werden.

Die kovalente Modifizierung von Proteinen durch Einbau von Prenylgruppen (Farnesyl- bzw. Geranylgeranyl-Reste) mittels spezifischer Transferasen stellt einen wichtigen Schritt im gerichteten Transport von Proteinen innerhalb einer Zelle dar. Die Farnesylierung erfolgt am Cystein-Rest einer sogenannten CAAX-Box, welche durch zwei aliphatische Aminosäuren vom Carboxy-Terminus getrennt ist (Lowy und Willumsen, 1989). Typische Vertreter von Proteinen mit einer CAAX-Box sind kleine und große G-Proteine.

Die Aminosäure-Sequenz von PxF aus Ratte ist in Abbildung 34 dargestellt. Neben der C-terminalen CAAX-Box fallen lediglich die repetitiven Leuzine auf, die eine starke Ähnlichkeit zur Konsensussequenz von Leuzin-Reissverschlüssen (L-X(6)-L-X(6)-L-X(6)-L) aufweisen (Landschulz et al., 1988; Busch und Sassone-Corsi, 1990). Diese Motive bilden α -Helizes aus, die dann über die auf einer Seite der Helizes liegenden Leuzine wechselwirken und so zu einer Dimerisierung führen (O'Shea et al., 1989).

```

MAAAEGGCGAGVEADRELEELLESALDDDFDKAKPSPAPSPTISAPDASGP
QKRSPGDTAKDALFASQEKFFQELFDSELASQATAEFEKAMKELAESEPH
LVEQFQKLSEAAGRVS DASSQQEFTSCLKETLSGLAKNATDLQNSGMSE
EELTKAMEGLGMDEGDGEGNILPIMQSLMQNLLSKDVLVPSLKEITEKYP
EWLQSHQESIPPEQFEKYQQQHSVMGKICEQFEAETPTDSEATHRARFEA
VLDLMQQLQDLGHPPKELAGEMPPGLNFDLDA LNLSGPPGANGEQCLIM

```

Abbildung 34: Die Aminosäure-Sequenz von PxF aus Ratte. Leuzine sind rot, die C-terminale CAAX-Box ist grün markiert. Bereiche mit Homologie zu Leuzin-Reissverschlüssen sind unterstrichen.

PxF ist auf Aminosäure-Ebene zu 93% identisch mit dem humanen, ebenfalls ubiquitär vorkommendem HK33 (Braun et al., 1994; Kammerer et al., 1997). HK33 scheint das humane Ortholog von Pex19p aus *S. cerevisiae* zu sein, da ein Austausch ihrer C-Termini ihre Funktion nicht beeinträchtigt (Gotte et al., 1998). Pex19p ist ein 39,7 kD Protein, dessen Expression durch die Fettsäure Oleat induzierbar ist und das eine wich-

tige Rolle bei der Entstehung von Peroxisomen spielt. Aufgrund der hohen Homologie zu HK33 wird angenommen, dass PxF ebenfalls bei der Entstehung von Peroxisomen beteiligt ist (Kammerer et al., 1997). Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, dass eine Mutation des humanen PxF-Gens durch Insertion eines Nukleotids und daraus resultierendem Verschiebung des Leserahmens zum Zellwege-Syndrom führt (Matsuzono et al., 1999), bei dem die Bildung von Peroxisomen gestört zu sein scheint. In CHO-Zellen (Chinese hamster ovary, Goldhamster-Ovarien) mit einer vergleichbaren Mutation wie der beim Zellwege-Syndrom werden weder Peroxisomen noch deren Vorläufer gefunden (Kinoshita et al., 1998). PxF/HK33/Pex19 scheint daher eine frühe Rolle bei der Entstehung von Peroxisomen zu spielen.

Auch im Fall von PxF sollten die im Zwei-Hybrid-System beobachtete Interaktion mit mGluR4b durch den Einsatz biochemischer Techniken verifiziert werden. Wie schon bei GST-SGT aber konnte bei der Kopräzipitation von GST-PxF mit MBP-mGluR4b lediglich eine unspezifische Bindung an MBP-mGluR4b sowie an MBP allein festgestellt werden (Abbildung 15). Aufgrund der Unlöslichkeit von myc-mGluR4b im eukaryotischen Zellsystem konnte weder eine Koimmunpräzipitation noch eine immunzytochemische Analyse der Interaktion mit GFP-PxF untersucht werden (5.1.1). Zudem war auch GFP-PxF nicht unter den hier getesteten Bedingungen solubilisierbar (Abbildung 16D).

Zur Umgehung des Problems mit der Solubilisierbarkeit von myc-mGluR4b und GFP-PxF wurde auch hier eine Kopräzipitation von *in vitro* translatiertem His-PxF mit MBP-mGluR4b versucht. Die Kopräzipitation führte lediglich zu einer schwachen, jedoch unspezifischen Bindung, welche sowohl mit MBP-mGluR4b wie auch mit MBP allein nachweisbar war (Abbildung 17B).

5.1.3. Biochemische Charakterisierung der Interaktionspartner von mGluR4b und -7a

Die im Zwei-Hybrid-System beobachteten Interaktionen zwischen mGluR4b und PxF bzw. SGT waren zwar hochspezifisch, konnten aber außerhalb dieses System nicht verifiziert werden. Dies könnte an der schlechten Solubilisierbarkeit und der Prolinreichen Sequenz liegen. Bei der Computer-Analyse von PxF und SGT fällt eine Gemeinsamkeit beider Proteine auf. Beide Proteine weisen Protein-Interaktions-Domänen auf, die sich strukturell sehr ähneln. Sowohl die TPR-Motive in SGT wie auch die Leu-

zin-Reißverschluss-ähnlichen Motive in PxF bilden α -Helizes aus, die typischerweise an Sekundärstrukturen anderer Proteine wie α -Helizes oder Coiled-Coil-Sequenzen binden. Eine Computeranalyse der Zusammensetzung der Sekundärstrukturen des C-Terminus von mGluR4b nach der Gibrat-Methode ergab eine Zusammensetzung der Sequenz aus 29% α -Helizes, 13% β -Faltblätter, und 59% Coiled-Coil-Sequenzen. Da also mit hoher Wahrscheinlichkeit sowohl α -Helizes wie auch Coiled-Coil-Sequenzen vorhanden sind, könnten die im Zwei-Hybrid-System beobachteten Interaktionen also durchaus über die α -helikalen Strukturen der gefischten Proteine und den Sekundärstrukturen von mGluR4b vermittelt werden. Interessanterweise weist auch Gelsolin, das im Gal4-Screen mit mGluR4b gefischte Protein, einen hohen Anteil an α -Helizes und Coiled-Coil-Sequenzen auf (hier nicht gezeigt). Es ist sogar eine Sequenz im Protein vorhanden, die auf die in Abbildung 33 gezeigte Konsensus-Sequenz für TPR-Motive passt. Auch die kurzfristig beobachtete Interaktion zwischen mGluR4b und Gelsolin könnte also über vergleichbare Sekundärstrukturen zu SGT und PxF erfolgt sein.

Im Gegensatz zu den im LexA-Screen mit mGluR4b beobachteten Interaktionen ließ sich die im mGluR7a-Screen beobachtete Interaktion von mGluR7a mit Pick1 sowohl biochemisch als auch immunzytochemisch verifizieren (El Far et al., 2000). Die zur weiteren Analyse dieser Interaktion und der Bindung von Pick1 an andere Mitglieder der Gruppe III mGluRs durchgeführte Kopräzipitation mit *in vitro*-translatiertem Pick1 erwies sich als wenig spezifisch. *In vitro*-translatiertes Pick1 band an alle getesteten Konstrukte, was allen anderen Experimenten und bereits publizierten Daten widerspricht (Boudin et al., 2000; El Far et al., 2000).

Eine mögliche Ursache für die unspezifische Bindung von *in vitro*-translatiertem Pick1 könnte in Problemen bei der Proteinfaltung im *in vitro*-System liegen, was zu einem aberranten Protein führen würde. Dies wird auch durch die Unlöslichkeit bakteriell exprimierter Fusionsproteine von Pick1 gestützt (Daten nicht gezeigt). Interaktionen mit Pick1 könnten in diesem Fall nur mit in eukaryotischen Zelllinien exprimiertem Protein untersucht werden (El Far et al., 2000).

5.2. Regulation der Aktivität der mGluRs der Gruppe III

Wie aus Untersuchungen im Vorfeld dieser Arbeit bereits hervorging, binden die präsynaptisch lokalisierten mGluRs der Gruppe III an aktiviertes CaM (O'Connor et al., 1999). Dies erlaubt eine Regulation der Rezeptoren bei der Hemmung der Glutamatfrei-

setzung. Zudem führt die Aktivierung der PKC zu einer Hemmung der Regulation der Adenylat-Zyklase durch diese Rezeptoren (Macek et al., 1998, 1999). Diese Daten legen eine Koregulation der mGluRs der Gruppe III durch CaM und Phosphorylierung nahe; deren biochemische Grundlagen wurden in dieser Arbeit genauer untersucht.

5.2.1. **Mutuell exklusive Bindung von CaM und G β an C-Termini von mGluRs**

Bei der Untersuchung der CaM-abhängigen Regulation der Mitglieder der Gruppe III wurde zunächst die CaM-Bindedomäne durch den Einsatz von Deletionskonstrukten genauer charakterisiert. Hierbei wurde festgestellt, dass die 25 N-terminalen Aminosäuren von mGluR7a zur CaM-Bindung genügen (Abbildung 19). Da dieser Bereich sehr homolog innerhalb der mGluRs der Gruppe III ist (Abbildung 3), wurden auch die restlichen Mitglieder auf CaM-Bindung untersucht. Tatsächlich konnten alle Rezeptoren, die den homologen Bereich aufweisen, mit CaM-Agarose präzipitiert werden (Abbildung 20 und Abbildung 22). Nur bei mGluR4b und mGluR6 konnte keine CaM-Bindung festgestellt werden; diese beiden Rezeptoren zeigen keine Homologie im N-terminalen Bereich des C-Terminus auf. Dies festigt die Vorstellung, dass der in den meisten Gruppe III mGluRs homologe Bereich nach Transmembrandomäne VII die CaM-Bindedomäne enthalten müsse. Eine Überprüfung der entsprechenden Sequenz auf eine mögliche Konsensussequenz für die CaM-Bindung ergab, dass nur das 1-5-10-Motiv (siehe Tabelle 2) exakt zu den CaM-bindenden mGluRs passt. Bei diesem Motiv sind an Positionen 1, 5 und 10 hydrophobe Aminosäuren zu finden, und die Nettoladung liegt zwischen +2 und +6 (Abbildung 35).

Interessanterweise passt das CaM-Bindemotiv nur auf die Rezeptoren mit der homologen Domäne. Bei mGluR4b liegt die Nettoladung innerhalb des 1-5-10-Motivs mit +1 zu niedrig, und bei mGluR6 fehlt eine hydrophobe Aminosäure an Position 10 des CaM-Bindemotivs. Dies entspricht exakt den Ergebnissen der CaM-Bindestudien, die zeigen, dass nur die Rezeptoren mit hochkonservierten Sequenzen im N-terminalen Bereich der zytosolischen Domäne an CaM binden, was die Vermutung nahe legt, dass einige Mitglieder der Gruppe III mGluRs unterschiedlich reguliert werden. Die bei mGluR7a bereits demonstrierte Ca²⁺/CaM-abhängige Aktivität (O'Connor et al., 1999) ist wahrscheinlich bei allen Mitgliedern mit konservierter CaM-Binderegion zu beobachten. Diese Rezeptoren sind daher wahrscheinlich direkt an der Regulation aktivitäts- und somit Ca²⁺-abhängiger Glutamatfreisetzung beteiligt. Da mGluR4b und

mGluR6 nicht direkt mit CaM interagieren können, werden sie wahrscheinlich durch einen Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismus oder nur indirekt durch Ca^{2+} reguliert. Beide Rezeptoren könnten somit vorrangig an anderen Prozessen als der direkten Regulation der Glutamatfreisetzung beteiligt sein. Während mGluR6 ausschließlich in der Retina vorkommt und dort über $\text{G}\alpha_0$ an der Weiterleitung optischer Signale in ON-Bipolarzellen beteiligt ist (Masu et al., 1995; Nawy, 1999), kennt man bei mGluR4b weder die Gewebeverteilung noch die Prozesse, an denen dieser Rezeptor beteiligt ist.

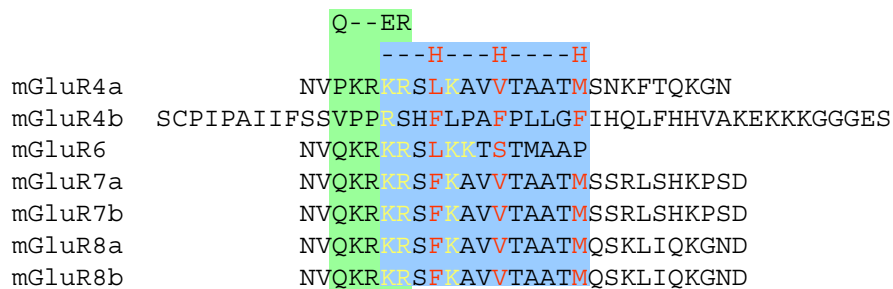


Abbildung 35: CaM- und $\text{G}\beta\gamma$ -Bindemotive finden sich in den meisten mGluRs der Gruppe III. Ein 1-5-10-Motiv findet sich nur in den mGluRs mit homologem Bereich. Auch mGluR4b und mGluR6 weisen eine hohe Homologie zum 1-5-10-Motiv auf. Sie weichen aber mit einer zu niedrigen Nettoladung (mGluR4b) bzw. mit einer fehlenden hydrophoben Aminosäure an Position 10 vom 1-5-10-Motiv ab und binden daher nicht an CaM. Das 1-5-10-Motiv ist blau, das $\text{G}\beta\gamma$ -Motiv grün unterlegt. Die konservierten hydrophoben Aminosäuren des 1-5-10-Motivs sind rot und die geladenen gelb dargestellt. Zu sehen sind die Aminosäuren 855 bis 882 von mGluR7a und die diesem Segment entsprechenden Regionen der anderen Gruppe III mGluRs.

Auf der Suche nach weiteren Interaktionspartnern der mGluRs der Gruppe III konnte eine direkte Bindung der $\text{G}\beta\gamma$ -Untereinheiten trimerer G-Proteine an mGluR7a nachgewiesen werden. Die Bindedomäne für $\text{G}\beta\gamma$ befindet sich wie auch die für die CaM-Bindung innerhalb der ersten 25 Aminosäuren des C-Terminus (Abbildung 23A). Eine solche Bindung von $\text{G}\beta\gamma$ konnte bislang nicht für andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren gezeigt werden und stellt somit eher eine Ausnahme für die mGluRs der Gruppe III dar. Bei der Untersuchung einer möglichen direkten Interaktion von CaM und $\text{G}\beta\gamma$ am C-Terminus von mGluR7a konnte durch den Einsatz eines Konstruktes, welches zwar noch $\text{G}\beta\gamma$ aber nicht mehr CaM binden konnte (GST-mGluR7a Δ CaM), eine Konkurrenz um die Bindung von CaM aufgezeigt werden (Abbildung 23A und B). Man kann daher davon ausgehen, dass die Bindedomänen beider Interaktionspartner auf mGluR7a

nahe beieinander liegen oder sich sogar überlappen. Tatsächlich konnte durch den Einsatz punktmutierter Konstrukte gezeigt werden, dass die G $\beta\gamma$ -Bindedomäne direkt vor dem 1-5-10-Motiv der CaM-Bindung liegen muss (Daten hier nicht gezeigt). Hier ist auch eine leicht abgewandelte Konsensus-Sequenz der G $\beta\gamma$ -Bindung (QXXER) (Chen et al., 1995) zu finden (Abbildung 35). Im Verlauf dieser Arbeit konnte nur mGluR7a auf G $\beta\gamma$ -Interaktion getestet werden. Da die Konsensussequenz der G $\beta\gamma$ -Bindung jedoch innerhalb des hochkonservierten Bereiches der zytoplasmatischen Region der Gruppe III mGluRs liegt, ist eine Bindung an andere Mitglieder dieser Rezeptorfamilie wahrscheinlich. Lediglich bei mGluR4a und -b weichen die Aminosäure-Sequenzen stärker von der Konsensus-Sequenz ab. Ähnlich wie bei der CaM-Bindung lässt sich also auch eine unterschiedliche Regulation der verschiedenen Rezeptoren durch unterschiedliche G $\beta\gamma$ -Bindung vorstellen.

Die im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur CaM- und G $\beta\gamma$ -Bindung an mGluR7a lassen die Formulierung eines Modells zur dualen Regulation von mGluR7a bei der Hemmung der Glutamatfreisetzung zu. Dieses berücksichtigt die Ca²⁺-abhängige CaM-Bindung des Rezeptors, sowie die Konkurrenz von CaM mit G $\beta\gamma$ um die Bindung (Abbildung 36). Danach sind in einer inaktiven glutamatergen Synapse die präsynaptischen Ca²⁺-Kanäle geschlossen und somit die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration auf einem niedrigen Ruhenniveau (Abbildung 36A). Beim Eintreffen eines Aktionspotentials depolarisiert die präsynaptische Membran, was zur Öffnung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle führt und somit aufgrund steigender Ca²⁺-Konzentration zur Glutamatfreisetzung (Abbildung 36B). Glutamat kann nun sowohl an postsynaptische ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren wie auch an die präsynaptisch lokalisierten mGluRs der Gruppe III binden. Gleichzeitig bindet das aufgrund der gestiegenen Ca²⁺-Konzentration aktivierte Ca²⁺/CaM von der intrazellulären Seite an den präsynaptischen mGluR7a. Dabei werden die Untereinheiten der trimeren G-Proteine vom mGluR7a-C-Terminus verdrängt und können nun ihrerseits an Effektorproteine binden (Abbildung 36C). Während freigesetztes G α z. B. die Adenylat-Zyklase hemmt und somit die cAMP-Konzentration in der Zelle verringert, kann die G $\beta\gamma$ -Untereinheit durch Interaktion mit Proteinen, die bei der Exozytose beteiligt sind, die Freisetzung von Glutamat inhibieren. Beispiele für solche Interaktionspartner von G $\beta\gamma$ sind z. B. Proteine der Exozytosemaschinerie (Hay et al., 2000) oder die spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle selbst (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996). Letzteres führt zu einer Verringerung

der Ca^{2+} -Konzentration und somit zur Hemmung der Neurotransmission (Abbildung 36D). Nach diesem Modell reguliert CaM also die Aktivierung präsynaptischer mGluRs, die eine bereits gut belegte Rolle bei der Selbsthemmung der Glutamatfreisetzung spielen (Scanziani et al., 1997).

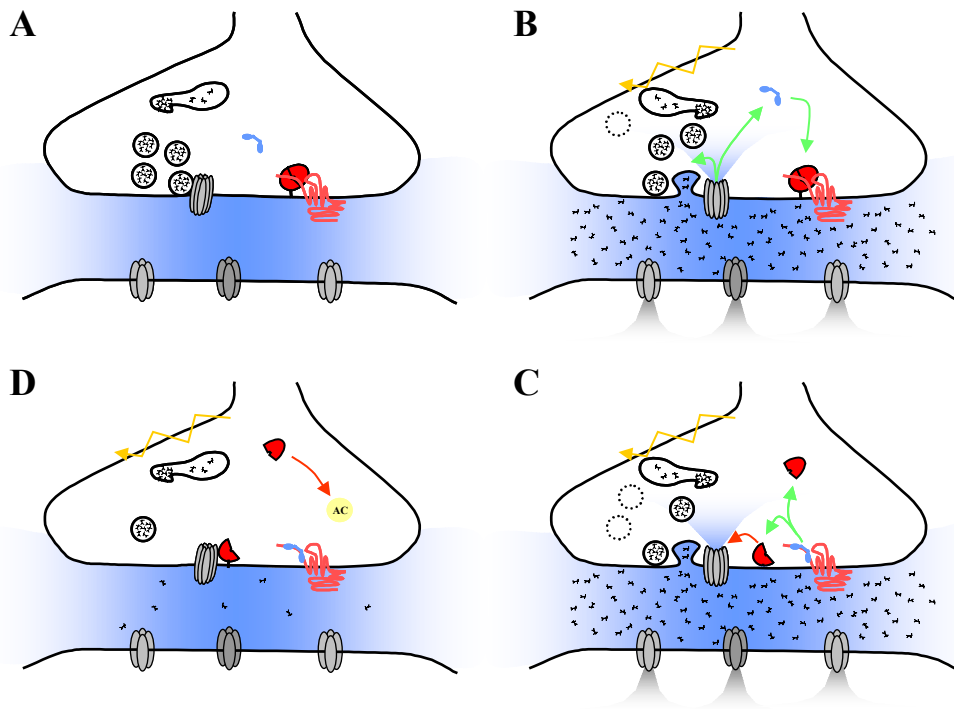


Abbildung 36: Modell des Rückkopplungseffektes der Glutamatfreisetzung durch duale Aktivierung von präsynaptischen Gruppe III mGluRs. Die Aktivierung erfolgt extrazellulär durch Glutamat- und intrazellulär durch CaM-Bindung. Die CaM-Bindung erlaubt eine Hemmung der Neurotransmission trotz depolarisierter Membran (siehe Text für Details). Legende wie in Abbildung 1.

Ein Einfluss von CaM auf die Feinregulation der Neurotransmission konnte bereits gezeigt werden. So benötigen Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle nach ihrer Hyperpolarisation CaM für die Regeneration (Xia et al., 1998), und auch die Hemmung von Ca^{2+} -Kanälen des P/Q-Typs ist CaM-abhängig (Lee et al., 1999). Das hier vorgestellte Modell zeigt einen Mechanismus auf, der eine direkte Verbindung zwischen extrazellulärer Neurotransmitter- und intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration zur synergistischen Regulation präsynaptischer mGluRs nutzt.

Aus Versuchen mit dem nicht hydrolysierbarem G-Protein-Agonisten [^{35}S]GTP γ S ist bekannt, dass eine CaM-Bindung des Rezeptors zur Aktivierung von $\text{G}\alpha$ nicht nötig ist, da das Deletionskonstrukt mGluR7a Δ CaM $\text{G}\alpha$ im gleichem Maße aktivieren kann

wie der Wildtyp-Rezeptor (O'Connor et al., 1999). Einige weitere Punkte in dem hier vorgestellten Modell konnten im Verlauf dieser Arbeit aber noch nicht geklärt werden. So konnte zwar in den Bindungsstudien eine Konkurrenz von CaM und G $\beta\gamma$ beobachtet werden, der Einfluss der CaM-Bindung auf die Interaktion der trimeren G-Proteine mit dem Rezeptor bleibt aber ungeklärt, da G $\beta\gamma$ nicht nur über den C-Terminus, sondern indirekt über G α auch mit der zweiten intrazellulären Schleife des Rezeptors interagiert. Weiterhin offen bleibt auch, ob G α nach Aktivierung des Rezeptors durch extrazelluläres Glutamat vom Rezeptor abdissoziiert und Effektorproteine binden kann, oder ob G α über G $\beta\gamma$ weiterhin am Rezeptor verankert bleibt, bis aktiviertes Ca²⁺/CaM beide Untereinheiten vom Rezeptor verdrängt. Interessant wäre auch die Klärung der Frage, welche Rolle die von anderen gezeigte direkte Bindung von CaM an G $\beta\gamma$ spielt (Liu et al., 1997). Eine gezeigte Bindung von CaM an die Gruppe III mGluRs und an G $\beta\gamma$ könnte wichtig bei der Regulation der G-Protein-Aktivierung sein. Diese Fragestellungen sollen in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

5.2.2. Regulation der CaM-Bindung durch Phosphorylierung eines konservierten Serins

Ein zusätzlicher Mechanismus zur Regulation von CaM-Bindungen ist die Phosphorylierung der jeweiligen Interaktionspartner (Rhoads und Friedberg, 1997). Für eine derartige Regulation der Interaktion von CaM mit seinem Bindepartner gibt es eine Reihe von Beispielen. So führt zum Beispiel die Bindung von CaM an NR1, eine Untereinheit des NMDA-Rezeptors, zur Verminderung der Aktivität des Ionenkanals (Ehlers et al., 1996; Zhang et al., 1998). PKC-Phosphorylierung von NR1 führt zu einer Hemmung der CaM-Bindung an NR1 und somit zu einer Abschaltung der Regulation durch CaM. Da bereits eine PKC-Abhängigkeit der Aktivität der mGluRs der Gruppe III gezeigt werden konnte (Macek et al., 1998, 1999) und Phosphorylierung eine übergeordnete Regulation der CaM- und G $\beta\gamma$ -Bindung an die Rezeptoren ermöglichen würde, wurden die Gruppe III mGluRs *in vitro* auf eine mögliche Phosphorylierung durch PKC getestet.

Obwohl alle Mitglieder der mGluRs der Gruppe III mindestens eine Konsensussequenz für PKC-Phosphorylierung (^S/_T-X-^K/_R) (Kishimoto et al., 1985; Woodgett et al., 1986) im zytosolischem C-Terminus aufweisen (Abbildung 24A), konnten nicht alle

Rezeptoren unter den getesteten Bedingungen phosphoryliert werden (Abbildung 24B). Analog zu den Resultaten bezüglich der CaM-Bindung konnten nur die Rezeptoren, die einen hochkonservierten Bereich in Membrannähe aufweisen, phosphoryliert werden, nicht aber mGluR4b und mGluR6. Wie bei der CaM-Bindung scheinen diese beiden Rezeptoren auch eine Sonderstellung bei der Phosphorylierung einzunehmen. Dies macht durchaus Sinn, da bei diesen beiden Rezeptoren eine Regulation der CaM-Bindung durch Phosphorylierung nicht nötig ist.

Am Beispiel von mGluR7a wurde anschließend getestet, welche der möglichen Phosphorylierungsstellen *in vitro* tatsächlich phosphoryliert wurde. Mit Hilfe erschöpfender Punktmutationen konnte gezeigt werden, dass nur ein einziger Rest im C-Terminus von mGluR7a (S862) phosphorylierbar war (Abbildung 25). Dieser liegt exakt in der CaM-Bindedomäne. Die Phosphorylierung von S862 könnte somit Einfluss auf die CaM-Regulation und somit auf die Aktivität des Rezeptors nehmen.

Um diese Hypothese zu testen, wurden Affinitätsbindestudien mit mGluR7a-Fusionsproteinen durchgeführt, bei denen entweder das phosphorylierbare S862 durch Alanin bzw. Glutamat ersetzt oder die Konsensus-Sequenz der CaM-Bindung mutiert worden war. Abbildung 26 zeigt, dass die Substitution von S862 durch Alanin in GST-mGluR7N25S862A keinen Einfluss auf die CaM-Bindung nimmt. Dagegen war eine Bindung von GST-mGluR7N25S862E an CaM kaum noch nachweisbar und bei GST-mGluR7aEEE gänzlich verschwunden. Dies bestätigt die Annahme, dass nicht der Austausch von S862 per se ausschlaggebend für den Verlust der CaM-Bindung ist, sondern die Erhöhung der negativen Ladung in dessen unmittelbarer Nachbarschaft. Das Einbringen negativer Ladungen auf der α -Helix der CaM-Bindedomäne führt wahrscheinlich über gleichmäßige Verteilung von positiv geladenen und hydrophoben Aminosäuren zu einem Verlust der amphipatischen Natur der α -Helix (Abbildung 37).

Im Fall der Substitution von S862 durch Glutamat verringert sich die Nettoladung von +3 auf +2. Dies entspricht zwar noch der Konsensussequenz eines 1-5-10-Motivs, reicht aber aus, die Ladungsverteilung zu stören (S862E in Abbildung 37). Bei der Verteilung von drei Glutamaten über die gesamte α -Helix wird nicht nur die Nettoladung komplett neutralisiert; auch die ursprünglich amphiphile Ladungsverteilung des Wildtyps ist nun völlig verschwunden, was den völligen Verlust der CaM-Bindung erklärt (EEE in Abbildung 37) (Rhoads und Friedberg, 1997). Da die Ladungsverteilung nach Phosphorylierung des Rezeptors an Position 862 in etwa mit der Substitution von S862

durch Glutamat vergleichbar ist, lässt sich die beobachtete Hemmung der CaM-Bindung nach Phosphorylierung des Rezeptors (Daten nicht gezeigt) (Nakajima et al., 1999) ebenfalls durch die Störung in der amphiphilen α -Helix erklären. Die im Vergleich zur Carboxyl-Gruppe des Glutamats stärker geladene Phosphat-Gruppe sollte sogar zu einer stärkeren Änderung der Ladungsverteilung in der CaM-Bindedomäne als im S862E-Konstrukt führen.

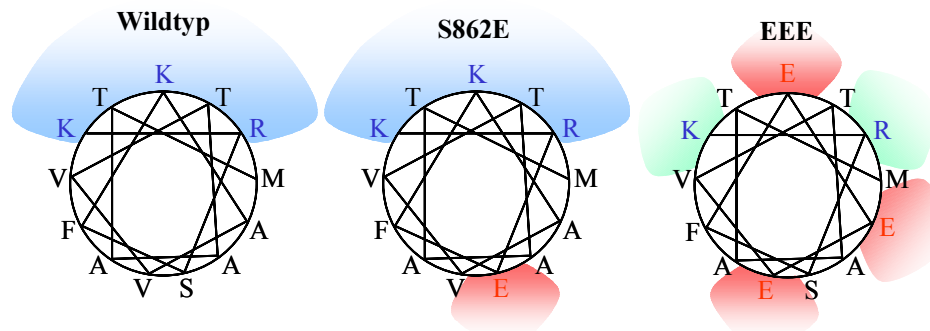


Abbildung 37: Einfluss negativer Ladungen auf die CaM-Bindedomäne von mGluR7a. Die Veränderung der Ladungsverteilung in der amphiphilen α -Helix führt zur einem Verlust der CaM-Bindung. Der Austausch von S862 gegen Glutamat ahmt die Phosphorylierung an dieser Stelle nach. Blau: positive Ladungen, rot: negative Ladungen.

Zur Bestimmung der physiologischen Relevanz der CaM-Bindung an mGluR7a und der Phosphorylierung der CaM-Bindedomäne wurden Wildtyp-Rezeptor und verschiedene Konstrukte im Oozyten-System elektrophysiologisch untersucht. Wie zu erwarten, führte die Aktivierung von mGluR7a Δ CaM im Gegensatz zum Wildtyp-Rezeptor zu einem stark verminderten K^+ -Strom. Dies könnte daran liegen, dass der Rezeptor aufgrund fehlender der CaM-Bindung funktionell inaktiv blieb, obwohl er weiterhin $G\beta\gamma$ binden kann (Abbildung 27 und Abbildung 28B). Dieser verminderte K^+ -Strom war bei dem nicht phosphorylierbaren Rezeptorkonstrukt mGluR7aS862A nicht zu beobachten, da CaM dieses mutierte Protein mit gleicher Affinität wie den Wildtyp-Rezeptor bindet (Abbildung 28A und B). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Ca^{2+} /CaM-Bindung in der Tat wichtig für das Triggern der nachgeschalteten Signalkaskade ist.

Nach der Bestimmung der physiologischen Relevanz der CaM-Bindung auf mGluR7a im Oozyten-System sollte der Einfluss der Phosphorylierung des Rezeptors unter identischen, physiologischen Bedingungen untersucht werden. Aktivierung der

PKC sollte zu einem ähnlichen Effekt führen wie die Deletion der CaM-Bindedomäne, da der phosphorylierte Rezeptor ebenso wie mGluR7a Δ CaM nicht mehr mit CaM interagieren kann. Zur Bestimmung des Einflusses der PKC auf die Aktivität von mGluR7a und der Rolle, die S862 dabei spielt, wurde daher zunächst die Aktivierung des Wildtyp-Rezeptors bei aktivierter PKC untersucht. Jedoch war in Abbildung 29 kein direkter Einfluss der PKC auf dessen Aktivität zu sehen. Wie zu erwarten war, blieb auch mGluR7aS862A von der PKC-Aktivierung unbeeinflusst. Ein möglicher Grund für das Ausbleiben der erwarteten Hemmung des Rezeptors nach Aktivierung der PKC könnte darin liegen, dass die *in vitro* beobachtete Phosphorylierung der Mitglieder der mGluRs der Gruppe III durch die PKC in Oozyten nicht stattfindet bzw. von einer anderen Kinase katalysiert wird. Neben der Konsensus-Sequenz für PKC-Phosphorylierung weist mGluR7a auch eine für Phosphorylierung durch Protein Kinase A (PKA) auf. Eine Phosphorylierung durch diese Kinase konnte aber im *in vitro*-Experiment nicht nachgewiesen werden (Nakajima et al., 1999). Leider konnten im Rahmen dieser Arbeit neben der PKC keine anderen Kinasen auf eine Regulation der CaM-Bindung *in vivo* getestet werden. Vielversprechende Kandidaten für die Phosphorylierung von mGluR7a sind z. B. G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen, die spezifisch eine Phosphorylierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren vermitteln.

Die Ergebnisse der Phosphorylierungs-Studien der Gruppe III mGluRs lassen die Erweiterung des in Abbildung 36 dargestellten Mechanismus zu. Hierbei stellt die Phosphorylierung der CaM-Bindedomäne einen zusätzlichen, übergeordneten Regulationsmechanismus dar. In dem erweiterten Model wird neben der Konkurrenz von CaM und G $\beta\gamma$ um die Bindung an den Rezeptor auch die Regulation dieser Konkurrenz berücksichtigt. In Abbildung 38A wird vom gleichen Ausgangszustand ausgegangen wie im Model von Abbildung 36. Nach erfolgter Exozytose bindet Glutamat extrazellulär an den präsynaptischen mGluR7a (Abbildung 38B). Im Fall einer Phosphorylierung kann die für die Aktivierung des Rezeptors nötige G $\beta\gamma$ -Verdrängung durch CaM-Bindung aber nicht erfolgen, der Rezeptor bleibt daher trotz Glutamat-Bindung inaktiv (Abbildung 38B). Es kann so nicht zur Selbsthemmung der Glutamatfreisetzung über G $\beta\gamma$ kommen und die Postsynapse bleibt weiterhin aktiviert (Abbildung 38C).

Auch in diesem erweiterten Model bleiben Fragestellungen offen, die es durch künftige Versuche zu beantworten gilt. So konnte die physiologische Rolle der PKC in dieser Arbeit leider nicht verifiziert werden. Neben der *in vitro*-Phosphorylierung von

mGluR7a durch PKC spricht auch die beobachtete direkte Interaktion des Rezeptors mit der katalytischen Untereinheit der Kinase für die physiologische Rolle der PKC-Phosphorylierung.

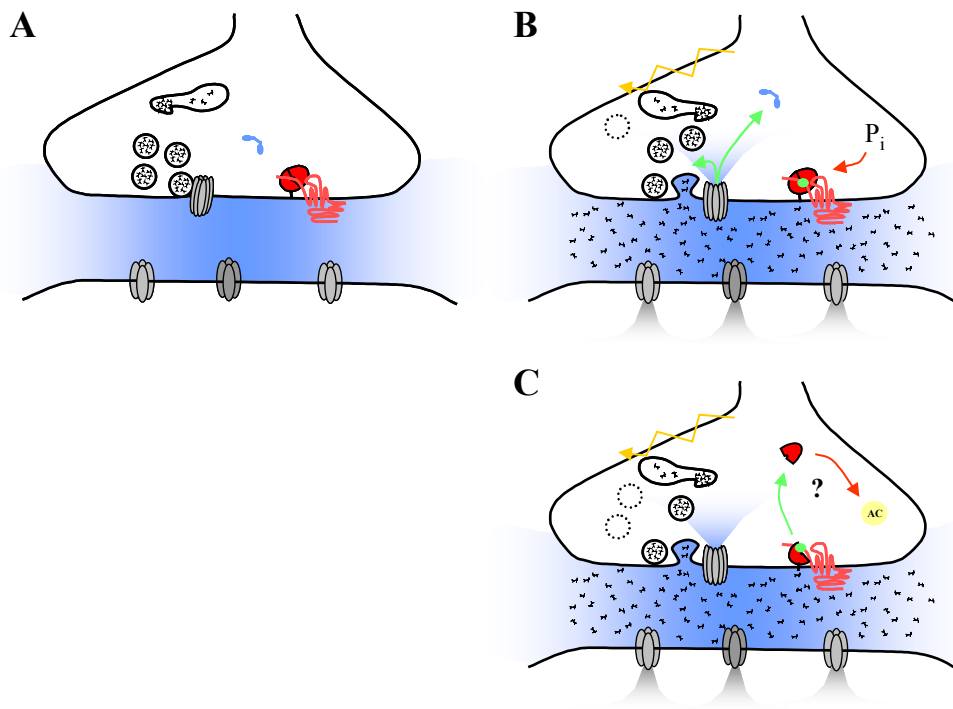


Abbildung 38: Modell der Epiregulation der CaM- und Gβγ-Bindung durch Phosphorylierung der CaM-Bindedomäne. Da der phosphorylierte Rezeptor kein CaM binden kann, wird auch kein Gβγ mehr freigesetzt. Der Rezeptor bleibt somit inaktiviert und die Glutamatfreisetzung wird nicht gestoppt. Der Einfluss der Phosphorylierung auf die Aktivierung von Gα und daran gekoppelte Signalkaskaden ist nicht geklärt.

Sowohl mit bakteriellen GST-Fusionsproteinen (Abbildung 30) als auch mit dem eukaryotisch exprimiertem Vollängenkonstrukt flag-mGluR7a (Abbildung 31B) konnte eine spezifische Interaktion gezeigt werden. Eine direkte Interaktion von mGluR7a und PKC könnte eine wichtige Rolle bei der Regulation der Phosphorylierung von mGluR7a in der präsynaptischen Membran spielen. Eine solche Interaktion würde eine rasche und spezifisch regulierte Phosphorylierung des Rezeptors durch die assoziierte Kinase erlauben. Eine ähnliche Regulation der Phosphorylierung ist bereits bei der PKA bekannt, die indirekt an ihre Substrate binden kann. Diese Interaktion wird durch PKA-assoziierte Proteine (AKAPs, A kinase associated proteins) vermittelt und konnte bereits für eine Vielzahl verschiedener Substrate gezeigt werden (Gray et al., 1998; Colledge und Scott, 1999; Colledge et al., 2000).

Neben der Identifizierung der tatsächlich die Gruppe III mGluRs regulierenden

Kinase wäre die Regulation der Phosphorylierung dieser Rezeptoren besonders interessant. So ist es z. B. noch ungeklärt, ob mGluRs nur bei aktivierter Neurotransmission phosphoryliert werden, um ein Abschalten der Synapse zu verhindern. Denkbar wäre schließlich auch eine Phosphorylierung der Rezeptoren in einer noch inaktiven Synapse, um die Neurotransmission von vornherein auf höchstem Niveau zu halten. Die *in vitro*-beobachtete Hemmung der Phosphorylierung von mGluR7a durch bereits gebundenes CaM (Nakajima et al., 1999) dürfte *in vivo* wohl keine große Rolle spielen, da es sich bei der Bindung von CaM an ein Effektorprotein nur um einen transienten Zustand handelt. Während aktiviertes CaM also ständig erneut an den Rezeptor binden muss, bleibt die Modifizierung des Rezeptors durch Phosphorylierung so lange bestehen, bis sie durch eine spezifische Phosphatase rückgängig gemacht wird. Diese kritischen Unterschiede könnten für die differentielle Regulation der Neurotransmitterausschüttung durch neuronale Aktivität wichtig sein.

Da die Gruppe III mGluRs bei Aktivierung zu einer Selbsthemmung der Synapse führen, stellt die Regulation ihrer Phosphorylierung eine Möglichkeit der Regulation von LTP und LTD dar. Eine Rolle von mGluR7a beim Lernen konnte bereits gezeigt werden (Bushell et al., 1999; Masugi et al., 1999). Phosphorylierung dieser präsynaptischen Rezeptoren führt zu einer anhaltenden Hemmung der Neurotransmission und somit zu einer verstärkten Glutamatfreisetzung. Die nachgeschaltete Postsynapse wird hierdurch effizienter aktiviert, was postsynaptisch LTP und LTD induzieren kann. Um den Einfluss der Phosphorylierung von mGluR7a auf LTP und LTD genauer zu analysieren, sollen in zukünftigen Experimenten transgene Mäuse generiert werden, die statt des Wildtyp-mGluR7a den nicht phosphorylierbaren Rezeptor mGluR7aS862A exprimieren. Diese Mäuse sollten nicht mehr in der Lage sein, die Hemmung der Neurotransmission durch Phosphorylierung von mGluR7a zu regulieren.

Neben den hier untersuchten mGluRs der Gruppe III werden eine Vielzahl weiterer prä- und postsynaptischer Proteine phosphoryliert. So können neben den Rezeptoren auch alle anderen in dem hier vorgestellten Modellen wichtigen Proteine durch Phosphorylierung reguliert werden. Die Phosphorylierung von CaM durch die Kaseinkinase II führt z. B. zur Steigerung der Affinität zu einigen Interaktionspartnern (Quadroni et al., 1998). Der Einfluss einer Phosphorylierung der direkten und indirekten Interaktionspartner von Gruppe III mGluRs auf die vorgestellten Modelle bleibt aber ungeklärt und muss daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Letztlich ist auch der Me-

chanismus zur Reaktivierung der CaM-abhängigen Regulation von mGluR7a nach Dephosphorylierung der CaM-Bindedomäne unbekannt. Hier werden mGluR7a-spezifische Phosphatasen zu identifizieren sein. Da die Phosphorylierung von mGluR7a zu einer Steigerung der Glutamatfreisetzung und somit zu einer Überaktivierung der Postsynapse führt, müssten solche Phosphatasen neuroprotektive Eigenschaften aufweisen. Neben einer Rolle bei der Generierung von LTP könnten Phosphatasen also auch bei der Neuroprotektion und damit bei praktisch-medizinischen Aspekten Bedeutung haben.

6. Literaturverzeichnis

Abe T, Sugihara H, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N und Nakanishi S (1992) Molecular Characterization of a Novel Metabotropic Glutamate Receptor mGluR5 Coupled to Inositol Phosphate/Ca²⁺ Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry* 267:13361-13368.

Alagarsamy S, Junge C, Hubert GW, Gutman D und Conn PJ (1999a) NMDA inhibits mGluR5 function by activating protein kinase C. *Neuropharmacology* 38:5.

Alagarsamy S, Marino MJ, Rouse ST, Gereau RW, Heinemann SF und Conn PJ (1999b) Activation of NMDA receptors reverses desensitization of mGluR5 in native und recombinant systems. *Nature Neuroscience* 2:234-240.

Alagarsamy S, Rouse ST, Gereau RW, Heinemann SF, Smith Y und Conn PJ (1999c) Activation of N-methyl-D-aspartate receptors reverses desensitization of metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in native und recombinant systems. *Molecular und Functional Diversity of Ion Channels und Receptors* 868:526-530.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW und Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W und Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.

Babu YS, Bugg CE und Cook WJ (1988) Structure of Calmodulin Refined at 2.2 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 204:191-204.

Babu YS, Sack JS, Greenhough TJ, Bugg CE, Means AR und Cook WJ (1985) 3-Dimensional Structure of Calmodulin. *Nature* 315:37-40.

Barbato G, Ikura M, Kay LE, Pastor RW und Bax A (1992) Backbone Dynamics of Calmodulin Studied by N-15 Relaxation Using Inverse Detected 2-Dimensional Nmr-Spectroscopy - the Central Helix Is Flexible. *Biochemistry* 31:5269-5278.

Bennett JA und Dingledine R (1995) Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains und a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron* 14:373-384.

Boudin H, Doan A, Xia J, Shigemoto R, Haganir RL, Worley P und Craig AM (2000) Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron* 28:485-497.

Bradley SR, Rees HD, Yi H, Levey AI und Conn PJ (1998) Distribution und developmental regulation of metabotropic glutamate receptor 7a in rat brain. *Journal of Neurochemistry* 71:636-645.

Braun A, Kammerer S, Weissenhorn W, Weiss EH und Cleve H (1994) Sequence of a Putative Human Housekeeping Gene (Hk33) Localized on Chromosome-1. *Gene* 146:291-295.

Buratowski S, Hahn S, Sharp PA und Guarente L (1988) Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system. *Nature* 334:37-42.

Busch SJ und Sassone-Corsi P (1990) Dimers, leucine zippers und DNA-binding domains. *Trends in Genetics* 6:36-40.

Bushell TJ, Collet VJ, vanderPutten H und Collingridge GL (1997) Altered high frequency synaptic transmission und short-term potentiation in mice lacking mGlu(7) receptors: Studies in the hippocampus in vitro. *Journal of Physiology-London* 501P:P8-P8.

Bushell TJ, Lee CC, Shigemoto R und Miller RJ (1999) Modulation of synaptic transmission und differential localisation of mGluR in cultured hippocampal autapses. *Neuropharmacology* 38:1553-1567.

- Cajal SR** (1911) *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Paris: Maloine.
- Chen J**, DeVivo M, Dingus J, Harry A, Li J, Sui J, Carty DJ, Blank JL, Exton JH, Stoffel RH und et al. (1995) A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. *Science* 268:1166-1169.
- Thompson JD**, Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Colledge M** und **Scott JD** (1999) AKAPs: from structure to function. *Trends in Cell Biology* 9:216-221.
- Colledge M**, Dean RA, Scott GK, Langeberg LK, Haganir RL und **Scott JD** (2000) Targeting of PKA to glutamate receptors through a MAGUK-AKAP complex. *Neuron* 27:107-119.
- Collingridge GL** und **Bliss TVP** (1987) Nmda Receptors - Their Role in Long-Term Potentiation. *Trends in Neurosciences* 10:288-293.
- Conn PJ** und **Pin JP** (1997) Pharmacology und functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology und Toxicology* 37:205-237.
- Corti C**, L'Hostis EL, Quadroni M, Schmid H, Durussel I, Cox J, Hatt PD, James P und **Carafoli E** (1999) Tyrosine phosphorylation modulates the interaction of calmodulin with its target proteins. *European Journal of Biochemistry* 262:790-802.
- Coyle JT** und **Puttfarcken P** (1993) Oxidative stress, glutamate, und neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.
- Craig AM** und **Stowell JN** (1999) Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains (vol 22, pg 525, 1999). *Neuron* 24:U16-U16.
- Cziepluch C**, Kordes E, Poirey R, Grewenig A, Rommelaere J und **Jauniaux JC** (1998) Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1. *Journal of Virology* 72:4149-4156.
- Cziepluch C**, Lampel S, Grewenig A, Grund C, Lichter P und **Rommelaere J** (2000) H-1 parvovirus-associated replication bodies: A distinct virus-induced nuclear structure. *Journal of Virology* 74:4807-4815.
- Das AK**, **Cohen PW** und **Barford D** (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO Journal* 17:1192-1199.
- Dekker LV** und **Parker PJ** (1994) Protein kinase C--a question of specificity. *Trends in Biochemical Sciences* 19:73-77.
- Dekker LV**, **Palmer RH** und **Parker PJ** (1995) The protein kinase C und protein kinase C related gene families. *Current Opinion in Structural Biology* 5:396-402.
- Del Punta K**, **Rothman A**, **Rodriguez I** und **Mombaerts P** (2000) Sequence diversity und genomic organization of vomeronasal receptor genes in the mouse. *Genome Research* 10:1958-1967.
- Descartes R** (1637) "Cogito, ergo sum". In: *Discours de la Méthode* ((1596-1650) RD, ed).
- Dev KK**, **Nakajima Y**, **Kitano J**, **Braithwaite SP**, **Henley JM** und **Nakanishi S** (2000) PICK1 interacts with und regulates PKC phosphorylation of mGLUR7. *Journal of Neuroscience* 20:7252-7257.
- Eccles JC** (1953) *The principles of neurophysiology*. Oxford: Carendon Press.
- Ehlers MD**, **Zhang S**, **Bernhardt JP** und **Haganir RL** (1996) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84:745-755.

- El Far O**, Airas J, Wischmeyer E, Nehring RB, Karschin A und Betz H (2000) Interaction of the C-terminal tail region of the metabotropic glutamate receptor 7 with the protein kinase C substrate PICK1. *European Journal of Neuroscience* 12:4215-4221.
- Faden AI**, Ivanova SA, Yakovlev AG und Mukhin AG (1997) Neuroprotective effects of group III mGluR in traumatic neuronal injury. *Journal of Neurotrauma* 14:885-895.
- Fields S** und Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246.
- Foster AC** und Fagg GE (1984) Acidic Amino-Acid Binding-Sites in Mammalian Neuronal Membranes - Their Characteristics und Relationship to Synaptic Receptors. *Brain Research Reviews* 7:103-164.
- Gabellini N**, Manev RM, Candeo P, Favaron M und Manev H (1993) Carboxyl Domain of Glutamate Receptor Directs Its Coupling to Metabolic Pathways. *Neuroreport* 4:531-534.
- Gerlai R**, Roder JC und Hampson DR (1998) Altered spatial learning und memory in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *Behavioral Neuroscience* 112:525-532.
- Gomez J**, Joly C, Kuhn R, Knopfel T, Bockaert J und Pin JP (1996a) The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptor 1 cooperates with the other intracellular domains to control coupling to G-proteins. *Journal of Biological Chemistry* 271:2199-2205.
- Gomez J**, Mary S, Brabet I, Parmentier ML, Restituito S, Bockaert J und Pin JP (1996b) Coupling of metabotropic glutamate receptors 2 und 4 to G(alpha 15), G(alpha 16), und chimeric G(alpha q/i) proteins: Characterization of new antagonists. *Molecular Pharmacology* 50:923-930.
- Gotte K**, Girzalsky W, Linkert M, Baumgart E, Kammerer S, Kunau WH und Erdmann R (1998) Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis. *Molecular und Cellular Biology* 18:616-628.
- Horn F**, Weare J, Beukers MW, Hörsch S, Bairoch A, Chen W, Edvardsen Ø, Campagne F, und Vriend G (1998) GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Research* 26(1):277-281.
- Gray PC**, Scott JD und Catterall WA (1998) Regulation of ion channels by cAMP-dependent protein kinase und A-kinase anchoring proteins. *Current Opinion in Neurobiology* 8:330-334.
- Hay M**, Hoang CJ, Hasser EM und Price EM (2000) Activation of metabotropic glutamate receptors inhibits synapsin I phosphorylation in visceral sensory neurons. *Journal of Membrane Biology* 178:195-204.
- Hebb DO** (1949) *The organization of behavior*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Herlitze S**, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T und Catterall WA (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:258-262.
- Hollmann M** und Heinemann S (1994) Cloned Glutamate Receptors. *Annual Review of Neuroscience* 17:31-108.
- Horiuchi M**, El Far O und Betz H (2000) Ulip6, a novel unc-33 und dihydropyrimidinase related protein highly expressed in developing rat brain. *FEBS Letters* 480:283-286.
- Houamed KM**, Kuijper JL, Gilbert TL, Haldeman BA, Ohara PJ, Mulvihill ER, Almers W und Hagen FS (1991) Cloning, Expression, und Gene Structure of a G-Protein-Coupled Glutamate Receptor from Rat-Brain. *Science* 252:1318-1321.
- Ikeda SR** (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:255-258.
- Ikura M** (2000) Calmodulin Target Database. In.

Ikura M, Clore GM, Gronenborn AM, Zhu G, Klee CB und Bax A (1992) Solution Structure of a Calmodulin-Target Peptide Complex by Multidimensional Nmr. *Science* 256:632-638.

James GL, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson RGW und Brown MS (1994) Pxf, a Prenylated Protein of Peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry* 269:14182-14190.

Kammerer S, Arnold N, Gutensohn W, Mewes HW, Kunau WH, Hofler G, Roscher AA und Braun A (1997) Genomic organization und molecular characterization of a gene encoding HsPXF, a human peroxisomal farnesylated protein. *Genomics* 45:200-210.

Karschin A (1999) G protein regulation of inwardly rectifying K⁺ channels. *News in Physiological Sciences* 14:215-220.

Kinoshita N, Ghaedi K, Shimozawa N, Wanders RJA, Matsuzono Y, Imanaka T, Okumoto K, Suzuki Y, Kondo N und Fujiki Y (1998) Newly identified Chinese hamster ovary cell mutants are defective in biogenesis of peroxisomal membrane vesicles (peroxisomal ghosts), representing a novel complementation group in mammals. *Journal of Biological Chemistry* 273:24122-24130.

Kishimoto A, Nishiyama K, Nakanishi H, Uratsuji Y, Nomura H, Takeyama Y und Nishizuka Y (1985) Studies on the Phosphorylation of Myelin Basic-Protein by Protein-Kinase C und Adenosine 3'-5'-Monophosphate-Dependent Protein-Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 260:2492-2499.

Koerner JF und Johnson RL (1992) L-AP4 receptor ligands. In: *Excitatory Amino Acid Receptors; Design of Agonists und Antagonists* (P. K-L, J. HJ, eds), pp 308-330. West Sussex, U.K.: Ellis Horwood Limited.

Kordes E, Savelyeva L, Schwab M, Rommelaere J, Jauniaux JC und Cziepluch C (1998) Isolation und characterization of human SGT und identification of homologues in *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* 52:90-94.

Landschulz WH, Johnson PF und McKnight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759-1764.

Lee A, Wong ST, Gallagher D, Li B, Storm DR, Scheuer T und Catterall WA (1999) Ca²⁺/calmodulin binds to und modulates P/Q-type calcium channels. *Nature* 399:155-159.

Liu M, Yu B, Nakanishi O, Wieland T und Simon M (1997) The Ca²⁺-dependent binding of calmodulin to an N-terminal motif of the heterotrimeric G protein beta subunit. *Journal of Biological Chemistry* 272:18801-18807.

Lowy DR und Willumsen BM (1989) Protein Modification - New Clue to Ras Lipid Glue. *Nature* 341:384-385.

Macek TA, Schaffhauser H und Conn PJ (1998) Protein kinase C und A(3) adenosine receptor activation inhibit presynaptic metabotropic glutamate receptor (mGluR) function und uncouple mGluRs from GTP-binding proteins. *Journal of Neuroscience* 18:6138-6146.

Macek TA, Schaffhauser H und Conn PJ (1999) Activation of PKC disrupts presynaptic inhibition by group II und group III metabotropic glutamate receptors und uncouples the receptor from GTP-binding proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868:554-557.

Maiese K, Vincent A, Lin SH und Shaw T (2000) Group I und group III metabotropic glutamate receptor subtypes provide enhanced neuroprotection. *Journal of Neuroscience Research* 62:257-272.

Maniatis TF, E., F.; Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R und Nakanishi S (1991) Sequence und Expression of a Metabotropic Glutamate Receptor. *Nature* 349:760-765.

- Masu M**, Iwakabe H, Tagawa Y, Miyoshi T, Yamashita M, Fukuda Y, Sasaki H, Hiroi K, Nakamura Y, Shigemoto R, Takada M, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M und Nakanishi S (1995) Specific Deficit of the on Response in Visual Transmission by Targeted Disruption of the Mglur6 Gene. *Cell* 80:757-765.
- Masugi M**, Yokoi M, Shigemoto R, Muguruma K, Watanabe Y, Sansig G, van der Putten H und Nakanishi S (1999) Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response und conditioned taste aversion. *Journal of Neuroscience* 19:955-963.
- Matsuzono Y**, Kinoshita N, Tamura S, Shimozawa N, Hamasaki M, Ghaed K, Wanders RJA, Suzuki Y, Kondo N und Fujiki Y (1999) Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, und potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:2116-2121.
- Meador WE**, Means AR und Quijcho FA (1992) Target Enzyme Recognition by Calmodulin - 2.4-Angstrom Structure of a Calmodulin-Peptide Complex. *Science* 257:1251-1255.
- Meador WE**, Means AR und Quijcho FA (1993) Modulation of Calmodulin Plasticity in Molecular Recognition on the Basis of X-Ray Structures. *Science* 262:1718-1721.
- Minakami R**, Jinnai N und Sugiyama H (1997) Phosphorylation und calmodulin binding of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) are antagonistic in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 272:20291-20298.
- Nakajima Y**, Yamamoto T, Nakayama T und Nakanishi S (1999) A relationship between protein kinase C phosphorylation und calmodulin binding to the metabotropic glutamate receptor subtype 7. *Journal of Biological Chemistry* 274:27573-27577.
- Nakajima Y**, Iwakabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N und Nakanishi S (1993) Molecular Characterization of a Novel Retinal Metabotropic Glutamate Receptor Mglur6 with a High Agonist Selectivity for L-2-Amino-4-Phosphonobutyrate. *Journal of Biological Chemistry* 268:11868-11873.
- Nakanishi S** (1992) Molecular Diversity of Glutamate Receptors und Implications for Brain-Function. *Science* 258:597-603.
- Nawy S** (1999) The metabotropic receptor mGluR6 may signal through G(o), but not phosphodiesterase, in retinal bipolar cells. *Journal of Neuroscience* 19:2938-2944.
- Ng T**, Squire A, Hansra G, Bornancin F, Prevostel C, Hanby A, Harris W, Barnes D, Schmidt S, Mellor H, Bastiaens PIH und Parker PJ (1999) Imaging protein kinase C alpha activation in cells. *Science* 283:2085-2089.
- Nicoletti F**, Meek JL, Iadarola MJ, Chuang DM, Roth BL und Costa E (1986) Coupling of Inositol Phospholipid-Metabolism with Excitatory Amino-Acid Recognition Sites in Rat Hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 46:40-46.
- Nomura A**, Shigemoto R, Nakamura Y, Okamoto N, Mizuno N und Nakanishi S (1994) Developmentally-Regulated Postsynaptic Localization of a Metabotropic Glutamate-Receptor in Rat Rod Bipolar Cells. *Cell* 77:361-369.
- O'Connor V**, El Far O, Bofill-Cardona E, Nanoff C, Freissmuth M, Karschin A, Airas JM, Betz H und Boehm S (1999) Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. *Science* 286:1180-1184.
- Ohishi H**, Akazawa C, Shigemoto R, Nakanishi S und Mizuno N (1995) Distributions of the Messenger-Rnas for L-2-Amino-4-Phosphonobutyrate-Sensitive Metabotropic Glutamate Receptors, Mglur4 und Mglur7, in the Rat-Brain. *Journal of Comparative Neurology* 360:555-570.
- Osawa M**, Tokumitsu H, Swindells MB, Kurihara H, Orita M, Shibamura T, Furuya T und Ikura M (1999) A novel target recognition revealed by calmodulin in complex with Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase kinase. *Nature Structural Biology* 6:819-824.

- O'Shea** EK, Rutkowski R und Kim PS (1989) Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* 243:538-542.
- Ottersen** OP und Landsend AS (1997) Organization of glutamate receptors at the synapse. *European Journal of Neuroscience* 9:2219-2224.
- Pearce** B, Albrecht J, Morrow C und Murphy S (1986) Astrocyte Glutamate Receptor Activation Promotes Inositol Phospholipid Turnover und Calcium Flux. *Neuroscience Letters* 72:335-340.
- Pekhletski** R, Gerlai R, Overstreet LS, Huang XP, Agopyan N, Slater NT, Abramow-Newerly W, Roder JC und Hampson DR (1996) Impaired cerebellar synaptic plasticity und motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *Journal of Neuroscience* 16:6364-6373.
- Phillips** T, Makoff A, Brown S, Rees S und Emson P (1997) Localization of mGluR4 protein in the rat cerebral cortex und hippocampus. *Neuroreport* 8:3349-3354.
- Pin** JP und Bockaert J (1995) Get Receptive to Metabotropic Glutamate Receptors. *Current Opinion in Neurobiology* 5:342-349.
- Pin** JP und Duvoisin R (1995) The Metabotropic Glutamate Receptors - Structure und Functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
- Pin** JP, Ahern S und Jolly C (1993) Metabotropic Glutamate Receptors - Differences from Other G-Protein Coupled Receptors. *Journal of Neurochemistry* 61:S117-S117.
- Pin** JP, Gomeza J, Joly C und Bockaert J (1995) The Metabotropic Glutamate Receptors - Their 2nd Intracellular Loop Plays a Critical Role in the G-Protein Coupling Specificity. *Biochemical Society Transactions* 23:91-96.
- Pizzi** M, Consolandi O, Memo M und Spano PF (1996a) Activation of multiple metabotropic glutamate receptor subtypes prevents NMDA-induced excitotoxicity in rat hippocampal slices. *European Journal of Neuroscience* 8:1516-1521.
- Pizzi** M, Fallacara C, Arrighi V, Memo M und Spano PF (1993) Attenuation of excitatory amino acid toxicity by metabotropic glutamate receptor agonists und aniracetam in primary cultures of cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry* 61:683-689.
- Pizzi** M, Galli P, Consolandi O, Arrighi V, Memo M und Spano PF (1996b) Metabotropic und ionotropic transducers of glutamate signal inversely control cytoplasmic Ca²⁺ concentration und excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells: pivotal role of protein kinase C. *Molecular Pharmacology* 49:586-594.
- Prezeau** L, Gomeza J, Ahern S, Mary S, Galvez T, Bockaert J und Pin JP (1996) Changes in the carboxyl-terminal domain of metabotropic glutamate receptor 1 by alternative splicing generate receptors with differing agonist-independent activity. *Molecular Pharmacology* 49:422-429.
- Quadroni** M, L'Hostis EL, Corti C, Myagkikh I, Durussel I, Cox J, James P und Carafoli E (1998) Phosphorylation of calmodulin alters its potency as an activator of target enzymes. *Biochemistry* 37:6523-6532.
- Rhoads** AR und Friedberg F (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB Journal* 11:331-340.
- Sabelhaus** CF, Schroder UH, Breder J, Henrich-Noack P und Reymann KG (2000) Neuroprotection against hypoxic/hypoglycaemic injury after the insult by the group III metabotropic glutamate receptor agonist (R, S)-4-phosphonophenylglycine. *British Journal of Pharmacology* 131:655-658.
- Saugstad** JA, Kinzie JM, Mulvihill ER, Segerson TP und Westbrook GL (1994) Cloning und Expression of a New Member of the L-2-Amino-4-Phosphonobutyric Acid-Sensitive Class of Metabotropic Glutamate Receptors. *Molecular Pharmacology* 45:367-372.

- Scanziani M**, Salin PA, Vogt KE, Malenka RC und Nicoll RA (1997) Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature* 385:630-634.
- Shigemoto R**, Kulik A, Roberts JDB, Ohishi H, Nusser Z, Kaneko T und Somogyi P (1996) Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* 381:523-525.
- Shigemoto R**, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S und Mizuno N (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience* 17:7503-7522.
- Sladeczek F**, Pin JP, Recasens M, Bockaert J und Weiss S (1985) Glutamate Stimulates Inositol Phosphate Formation in Striatal Neurons. *Nature* 317:717-719.
- Staudinger J**, Zhou J, Burgess R, Elledge SJ und Olson EN (1995) PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *Journal of Cell Biology* 128:263-271.
- Stowell JN** und Craig AM (1999) Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains. *Neuron* 22:525-536.
- Takahashi T**, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M und Onodera K (1996) Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* 274:594-597.
- Thomsen C**, Pekhletski R, Haldeman B, Gilbert TA, Ohara P und Hampson DR (1997) Cloning and characterization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR4b. *Neuropharmacology* 36:21-30.
- Wischmeyer E**, Doring F und Karschin A (1998) Acute suppression of inwardly rectifying Kir2.1 channels by direct tyrosine kinase phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 273:34063-34068.
- Wischmeyer E**, Doring F, Spauschus A, Thomzig A, Veh R und Karschin A (1997) Subunit interactions in the assembly of neuronal Kir3.0 inwardly rectifying K⁺ channels. *Molecular and Cellular Neuroscience* 9:194-206.
- Wo ZG** und Oswald RE (1994) Transmembrane topology of two kainate receptor subunits revealed by N-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:7154-7158.
- Woodgett JR**, Gould KL und Hunter T (1986) Substrate-Specificity of Protein-Kinase-C - Use of Synthetic Peptides Corresponding to Physiological Sites as Probes for Substrate Recognition Requirements. *European Journal of Biochemistry* 161:177-184.
- Xia XM**, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J und Adelman JP (1998) Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395:503-507.
- Yap KL**, Ames JB, Swindells MB und Ikura M (1999) Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins-Structure Function and Genetics* 37:499-507.
- Zhang S**, Ehlers MD, Bernhardt JP, Su CT und Huganir RL (1998) Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuron* 21:443-453.
- Zuhlke RD**, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW und Reuter H (1999) Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399:159-162.

7. Anhang

7.1. Sequenz des gefischten Klons aus dem Gal4-Zwei-Hybrid-Screen

```

gaattc gcgccgcgtcgact
ggctccgtattgctcctcgctgcgctctgcgctcgtcctggcgctgtgcgcactgtcgccgtcccatgcagccaccg
catcgcggggcagggcccaagagagggcgccccaaagtcggggtgtctgagacgcggcccagcaccatgggtggggagcac
cccgaattcctgaaggcaggaaggagcctggcctgcagatctggcgtgtggagaagtttgacctggctgtgcccc
caacctctatggagacttcttcacgggtgacgcctatgtcatcctaaagacgggtgcagctgaggaatgggaatctgcagt
atgacctccacattgccaacgtggagcgcgtgcctttcgatgctgtacactgcacacctccaccgcatggctgcccag
cagggcatggatgatgacggaactggccagaacagatctggagaattgaaggttccaacaaggtactgggtggaccccg
cacatacggccagttctatggaggtgacagctacatcattctgtacaactaccgcatgggtggccgagggacagatca
tctacaactggcaggggtgccagctctaccangatgaagtctgctcagccatcctgatgccactggatgaagactggga
agaatcctgtccaaaccgaatggtccaggcaaaaacctgccacctcatgacttggt

```

Identität = 196 von 200 Basen (98%)

```

Fisch: 132 cgcgcccgagcaccatgggtggggagcaccgcaattcctgaaggcagggaggagcctg 191
      |||
Gelsolin: 5 cgcgcccgagcactatgggtggggagcaccgcaattcctgaaggcagggaggagcctg 64

Fisch: 192 gcctgcagatctggcgtgtggagaagtttgacctggctgtgcccccaacctctatg 251
      |||
Gelsolin: 65 gcctgcagatctggcgtgtggagaagtttgacctggctgtgcccccaacctctatg 124

Fisch: 252 gagacttcttcacgggtgacgcctatgtcatcctaaagacgggtgcagctgaggaatggga 311
      |||
Gelsolin: 125 gagacttcttcacgggtgatgctatgtcatcctgaagactgtgcagctgaggaatggga 184

Fisch: 312 atctgcagtatgacctccac 331
      |||
Gelsolin: 185 atctgcagtatgacctccac 204

```

Identität = 246 von 262 Basen (93%)

```

Fisch: 328 ccacattgccaacgtggagcgcgtgcctttcgatgctgctacactgcacacctccaccgc 387
      |||
Gelsolin: 1101 ccacattgccaacgtggagcgcgtacctttcgatgcccggcagctgcacacctccaccgc 1160

Fisch: 388 catggctgcccagcagcggcatggatgatgacggaactggccagaaacagatctggagaat 447
      |||
Gelsolin: 1161 catggcgcctcagcagcggcatggatgatggaactggccagaaacagatctggagaat 1220

Fisch: 448 tgaaggttccaacaaggtactgggtggaccccgccacatacggccagttctatggaggtga 507
      |||
Gelsolin: 1221 tgaaggttccaacaaggtgacagtgaccctgcccacatacggacagttctatggagggca 1280

Fisch: 508 cagctacatcattctgtacaactaccgcatgggtggccgcccagggacagatcatctaaa 567
      |||
Gelsolin: 1281 cagctacatcattctgtacaactaccgcccaggtggccgcccagggacagatcatctaaa 1340

Fisch: 568 ctggcaggggtgccagctctacc 589
      |||
Gelsolin: 1341 ctggcaggggtgctcagctctacc 1362

```

Abbildung 39: Sequenz des gefischten Klons aus dem Gal4-Screen mit pSTD-BD-mGluR4b. Oben ist die Aminosäure-Sequenz gezeigt (*Eco* RI-Schnittstelle und Linker-Sequenz in erster Zeile). Unten ist ein Homologievergleich mit der cDNA von Gelsolin aus Maus (GI6754077) gezeigt. Das Protein sitzt nicht im korrekten Leseraster.

7.2. Sequenzen der gefischten Klone aus dem LexA-Zwei-Hybrid-Screen

Im Folgenden sind die cDNA-Sequenzen (oben), die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen (Mitte) und Homologievergleiche (unten) gezeigt. Die cDNA-Sequenzen beginnen direkt nach der *Eco* RI-Schnittstelle (gaattc) und der Linker-Sequenz (ggcagagg).

7.2.1. Klon A

```
ctggcttctctagccccactccaggatcttttctcagggcactgaaaaactcagcccttgggaggcagaagagtctgg
gcaaggggtacacaggcactctggcaacctggtgagaagtcaaggaaaccgccaagggtttggaaacctggcccaatctc
aaccgaagcaaccccccttccctttnaaccccccttcttccctgggcccttccggccttcccttccgggggccccccctt
aaaanntcccntnngggcccttccctnngngcccttggggcgnggggaaaaaaaaggaaaagggggtntctntnmn
ccaaanccntnccaaaaaggcccccaatccccaaaaggaaaaatgggggggggaaaaggaaaaccacaacccaaantnt
taaacccccccggaaaaggatttccccccaaaaccacaacccaaaagggggaaaagnaaaggaaaaaaaaggcccc
cccccttntncccttccccctnnggggnnaaaaaagncccccccttncctnnggggnnncccccttcccaaa
aggncgggcccttccccccccgggggggnnaaaactntntcccttnccttnggggcccccaaatnngggg
aaaccccccaaaaaaggncccccaaccccccttggggaaaagggggaaacccaaaacccaaaatgggggggggggg
cccttgggnccctatncccccccccttataaaatccccgggncttggggnacccccccttccctgggnnggg
ncccaaanngggggggcccttnggggggccccttggggnacccccccttataaaagccccccctnnggggggccc
cccttnccttataaatggggncccaaaagggggcccnggncccccaaacnaaaatngggncnccngggggggcccc
caaaccttccgggcccccccccaangancccccggncttnggnccccgggnccccnggggggnaaatnggg
ggaaccccccaattaaacnngcccttncncaaacctttnccccctcctnaacctncttccccctccnnaaagg
gnccccggaaaanaaccggggccccttcccaaatentcctccccnggggaaangntccccntaaccaaaccttctng
gncnggcccaacccccnggaccggngngmnttggggcaagcctnttntaagccttcggacaagaagcccccaacc
caaaaataaacngaaaaaggcaacggaannggctncnacnccgggccccctggctnctangggccaacccggccaaaat
ttaaaccnccgnaaaaacctgccngggaacnaggaagctnccaaacccccctntccgggaangaaccnaagtntggcag
aaaaagccnctnngccnagccctggaaaanaagcccccaangntngnanggaccaaggtaaacccccngggnaaaanac
naccgggggagnaaccnnc
```

```
LASSSPTPGSFPQGTEKLSPWAEAESGQGVHRHSGNLVRSQGNRQGFNLAQSQPKQPPSLXTPLLPLGPGSGLPFRGPPL
KXXXPXGPFXXPLGRGEKKRKRGLXXQXXXKKGPQIPKRKNGGGKGNPNPXXLKPPrKRI SPQNPnPKGKXKRRKKKAP
PPFXPSPPXGKXKXPLXLGGXPPFPKGGGXNXXPLXLGPPNXGKTPKRXPNPPLGKRGETQNPKLGGGG
PLWXPPXPPL*KSPGXLGXPPPLGXGPKXGGALXGGPLGXPLKPPPPXGGPPLXXKIGXPKGGPGPKPKXGXXGGAP
QTLGPPPPXXPGXLXPRXPXGGKXGEPPIKPGFPXKPLXFXPXTXLSPSXKGPXKXPGAPSQIXLPGEXXPXTPKPFX
XXPNPXTPGXXWGKPSFXSLR TKKPQPQN* XKKGNXGXXXGLVXXGQPGQKFKPPXKPAEXGXSQTPXSGXEPXVWQ
KKPXXPSPGXKPKQXXXTKVNPXXXSTRGXN
```

Identität = 25 von 29 Aminosäuren (86%)

```
Klon A:          1  LASSSPTPGSFPQGTEKLSPWAEAESGQ 29
                  LASSSPTPGSFPQTE LSPW+ E SGQG
GATA-Repressor: 288 LASSSPTPGSFPQGTESLSPWQIETSGQG 316
```

Abbildung 40: Homologievergleich mit GATA Repressor aus Maus (GI10946742).

7.2.2. Klon B

ggagcggcgcttgaggcctggaagcgttctgtggcctgccgggtcagcaccatgagctccattggcactgggtatgacct
 gtcagcctctacattctctcctgatggaagagtttccaagtgaatatgctatgaaggctgtggaaaacagtagtacag
 ctattgggatcagatgtaaagatgggtgtgtgtttgggtagaaaaactagtccttctaaactttatgaagaaggctcc
 aataaacgtcttttcaatgttgatcgacatgttggaaatggcagtgccaggtttgttggcagatgctcgttccttggcaga
 catagcaagagaagaagcgtccaacttttaggtctaactttggctataaacatcctctaaaacatcttgcagacagagtgg
 ccatgtatgtacacgcgtatacactctacagtgtgttagaccttttggctgcagtttcatgttggggtcttacagtgtg
 aatgatgggtgcacagctctatatgatcgatccatcaggtgttccataggttactggggctgtgccattggcaagccag
 gcaagctgcaaaagacagaaatagaaaagcttcagatgaaggaaatgacctgccgtgatgtagttaaagaagttgcaaaaa
 taatttacatagtagatgaagttaaggataaagcttttgaactagagctcagctgg

GAALEAWKRSVACRVSTMSSIGTGYDLSASTFSPDGRVVFQVEYAMKAVENSSTAIGIRCKDGVVFGVEKLVLSKLYEEGS
 NKRLFNVDHRHVGMAVAGLLADARSLADIAREEASNFRSNFGYNIPLKHLADRVAMYVHAYTLYSAVRPFGCSFMLGSYSV
 NDGAQLYMIDPSGVSYGYWGCAIGKARQAAKTEIEKLMKEMTCRDVVKEVAKIIYIVHDEVKDKAFELELSW

Identität = 216 von 216 Aminosäuren (100%)

Klon B:	18	MSSIGTGYDLSASTFSPDGRVVFQVEYAMKAVENSSTAIGIRCKDGVVFGVEKLVLSKLYE	77
		MSSIGTGYDLSASTFSPDGRVVFQVEYAMKAVENSSTAIGIRCKDGVVFGVEKLVLSKLYE	
Psma3:	1	MSSIGTGYDLSASTFSPDGRVVFQVEYAMKAVENSSTAIGIRCKDGVVFGVEKLVLSKLYE	60
Klon B:	78	EGSNKRLFNVDHRHVGMAVAGLLADARSLADIAREEASNFRSNFGYNIPLKHLADRVAMYV	137
		EGSNKRLFNVDHRHVGMAVAGLLADARSLADIAREEASNFRSNFGYNIPLKHLADRVAMYV	
Psma3:	61	EGSNKRLFNVDHRHVGMAVAGLLADARSLADIAREEASNFRSNFGYNIPLKHLADRVAMYV	120
Klon B:	138	HAYTLYSAVRPFGCSFMLGSYSVNDGAQLYMIDPSGVSYGYWGCAIGKARQAAKTEIEKL	197
		HAYTLYSAVRPFGCSFMLGSYSVNDGAQLYMIDPSGVSYGYWGCAIGKARQAAKTEIEKL	
Psma3:	121	HAYTLYSAVRPFGCSFMLGSYSVNDGAQLYMIDPSGVSYGYWGCAIGKARQAAKTEIEKL	180
Klon B:	198	QMKEMTCRDVVKEVAKIIYIVHDEVKDKAFELELSW	233
		QMKEMTCRDVVKEVAKIIYIVHDEVKDKAFELELSW	
Psma3:	181	QMKEMTCRDVVKEVAKIIYIVHDEVKDKAFELELSW	216

Abbildung 41: Homologievergleich mit Psma3 aus Ratte (GI8394065).

7.2.3. Klon C

gagcacctagagctcctcggctcggcactgagttctgctggtgtaattatgcaaggccacagtcattccagtaacaaggt
 aactccagcgggtgcccagaagcctttgtatgtgatcagtggtggcgcccagttctcaaaggaagatgcctcggagacacaca
 gacagaccatactggcacggacatggctgtctctgtctgctgtggtgggaagcgtttcaggcacagagtgcaactccag
 caacacatggaggtccacgcaggcgtgcgagctatatctgcagcagtgcaaccgcacctccccagccacacggctct
 caagcgcaccttccgctcacatacaggtgaccacccatagagtggtgagttctgtggcagctgctccgggatgagagca
 cactcaagagccacaagcgcacacacaggggagaaacccatagagtgtaatggctgtggcaagaagttcagccctnna
 agcaccagcttggaaagccgcacttacaggggnttcacaccanggtgaagaaagcctttttgaaingcaaaacctnt
 ggccaccaagcggcttccccgaaaaattacttnggccatggantcaaagccaccttgannaaaccccccaatgggg
 ggccttnancccccttaccctaaatnggccccantctggnccnccngnaanaacttngncccccaaacccctttttc
 ccttccaattggcccaaaaancccccttgaanaanggggnccnccccaaagccccggaaaggggaaaaaacccccnngn
 cctnngaacttggnaangggnatnnggaagnaaaannaccctttaccctttttanccnccnggggggttnanangn
 ggggngnaaaaaatggggggggaaccacaaaacccccntttcccccccccaanaacttaantggct

EHELELGSALSAGVIMQGHSHSSNKVTPAGAKAFVCDQCGAQFSKEDALETHRQTHGTDMAVFCLLCGKRFQAQSALQ
 QHMEVHAGVRSYICSECNRTFPSHTALKRHLRSHTGDHPYECEFCGSCFRDESTLKSHKRIHTGEKPYECNGCGKKFSPX
 STKLGRPHLQGXHTXVKKALFEVAKPXATKRLPRKITXAHGXKATP*KNPPNGGPXXPLPKXAPXSGXXXXXNXXPNPFF
 PSNWPKXPPLKXGXXPKPPERGKNPPXLXXLXXGXXEXKXPFTPFXPXGGVXXXGXKKMGGGNHQNPFPPPKXLXW

Identität = 129 von 129 Aminosäure (100%)

Klon C: 30 AGAKAFVCDQCGAQFSKEDALETHRQTHGTDMAVFCLLCGKRFQAQSALQHMEVHAGV 89
 AGAKAFVCDQCGAQFSKEDALETHRQTHGTDMAVFCLLCGKRFQAQSALQHMEVHAGV
 Sbjct: 456 AGAKAFVCDQCGAQFSKEDALETHRQTHGTDMAVFCLLCGKRFQAQSALQHMEVHAGV 515

Klon C: 90 RSYICSECNRTFPSHTALKRHLRSHTGDHPYECEFCGSCFRDESTLKSHKRIHTGEKPYE 149
 RSYICSECNRTFPSHTALKRHLRSHTGDHPYECEFCGSCFRDESTLKSHKRIHTGEKPYE
 Sbjct: 516 RSYICSECNRTFPSHTALKRHLRSHTGDHPYECEFCGSCFRDESTLKSHKRIHTGEKPYE 575

Klon C: 150 CNGCGKKFS 158
 CNGCGKKFS
 Sbjct: 576 CNGCGKKFS 584

Abbildung 42: Homologievergleich mit PLZF aus Maus (GI1582322).

7.2.4. Klon D

```
aagatggcgggctgctgaaggaggttgcggngctgggggtcgaagcggaccgggaattggaggagcttttgaaagtgctct
tgatgattttgataaaagcctcccccagcaccctctcctaccatctcggccccgatgcttcaggccccagaaga
gatcgccaggagacactgccaagatgctctctttgcctccaagagaaattttccaggaactgttcgacagtgagctg
gcttccaagccaccgagagtttgagaaagcaatgaaagagctggcngaggaagagccccatctggctcgagcagttcca
gaaagcttctcanagccacctggggacaagtgggcagcnatgcaaggttctcaccaagaaatttacnttccttgccct
aaaaggggagaccatttaaagtngggggcttaagccccaaaaaaatggcccccaactggacccttncnaggaaaaaccnc
cnaangggcccnattnngnttccntngnaaaggnaaaacnaaaaccctnggnaccnnaaaaaagcccccatgggggca
aanagggggcccttggggggcccaactcgggggcaactgnaaaaangnggggaacnanaaccngggngggcanaaangg
ngggnaaanccaatttctttccccccanatanannggccannaagccccctcaaancgnccanggaaaaaccctt
cttngggcctnaaaaggggacngnnaacnnggcaatccccatccccctggaaaggggaanaaatcccccnaaaaaaa
ggcnattcccagnaaatngggccttncananganccccccanggaaagntcnaanttccccccccannnccaaan
tctntngaanaaacgctatccnaccaccncccccaannngggcnaatngggggcnaaaanntcttnggccaccn
agcntctccaaaggncannaaaaaanccnccccncaactccaaggcctaacnaccnaggggcctnncctntn
ngangggccgggaccnngaaacntttaanccnancangattncc
```

```
KMAAEGGCGAGVEADRELEELLESALDDFDKAKPSPAPSPTISAPDASGPQKRSPGD TAKDALFASQEKFFQELFDSSEL
ASQATAEFEKAMKELAE EEPHLVEQFQKASXRHPGDKWASXARFSPRNLXSLP*KGRPFKVGGLSPKKMAPTWTPXXENX
XXGPIXFXXKGKXKTLGTXXKAPHWGQXGGPWGGPXRGLXKXGNXTXGXAXXXGKXNFLSPPXXXGPXKPPQXXXGKTL
LXAXKGDXXXQSPSPLE RGNPPXKKAIPKXGLXXXXPPXEXSXXPPXKXXXXXNAIPTNPXPXXGXGAKXXXGQP
SXSXKXXXXXPPTTPRPNXPXGPXLXXGPGTXKXLXXXX
```

Identität = 118 von 118 Aminosäuren (100%)

```
Fisch: 2 MAAEAGGCGAGVEADRELEELLESALDDFDKAKPSPAPSPTISAPDASGPQKRSPGD TAK 61
        MAAEAGGCGAGVEADRELEELLESALDDFDKAKPSPAPSPTISAPDASGPQKRSPGD TAK
PxF: 1 MAAEAGGCGAGVEADRELEELLESALDDFDKAKPSPAPSPTISAPDASGPQKRSPGD TAK 60
```

```
Fisch: 62 DALFASQEKFFQELFDSSELASQATAEFEKAMKELAE EEPHLVEQFQK 119
        DALFASQEKFFQELFDSSELASQATAEFEKAMKELAE EEPHLVEQFQK
PxF: 61 DALFASQEKFFQELFDSSELASQATAEFEKAMKELAE EEPHLVEQFQK 118
```

Abbildung 43: Homologievergleich mit PxF aus Ratte (GI6010290).

7.2.5. Klon E

ggtcgactgagagatcctgagcagtgccacctcaccagcctcgagatggacaacaggaagcgcctggcctatgccatcat
 ccagttcctgcatggccagctgcccagctgggcacgggtggctctcgctccgacgcccaggagagcctagaggttgccatccagtgtc
 tggaaacagcctttggggtgacgctggaggacagtgacctgctctcccgcagaccctgccagagatatttgaagcagcc
 actgccagcaaggagatgccacaggacccgaggggcccctgacaggacaccacccctctgaggaggactcagctgaggcaga
 gcgccttaaaacagaaggtaacgagcagatgaagtggaaaactttgaggcagcagctgcacctctatggcaaagccattg
 agctcaacccccgcaacgcctttacttctgtaacagagctgcccgcctacagcaagctgggaaactcgtggggggcggt
 caggactgtgagcgcgccattggcattgatcccgggtacagcaaggcctatggccgcctgggccccttgcgctgtccagcct
 gaacaaacatgcccgggctgtggcgtactacaagaaggccctggagctggaccctgacaacgacacgtacaagtccaacc
 tcaagatcgcagagctgaagttacggggagcgcagcctacggcggcgtggcagcttaaca

GRLRDPEQCHLTSLEMDNRKRLAYAI IQFLHGQLRHGGLSSDAQESLEVAIQCLETAFGVTLESDLALPQTLPEIFEA
 TASKEMPQDPRGPDRTPPSEEDSAEAERLKTEGNEQMKLENFEAAVHLYGKAIELNPANAVYFCNRAAAYSKLGNYVGAV
 QDCERAIGIDPGYSKAYGRMGLALSSLNKHAEAVA YKKALELDPDNDTYKSNLKI AELKLREAPSLRRRGLN

Identität = 211 von 211 Aminosäuren (100%)

SGT:	16	MDNRKRLAYAI IQFLHGQLRHGGLSSDAQESLEVAIQCLETAFGVTLESDLALPQTLPE	75
		MDNRKRLAYAI IQFLHGQLRHGGLSSDAQESLEVAIQCLETAFGVTLESDLALPQTLPE	
Klon E:	1	MDNRKRLAYAI IQFLHGQLRHGGLSSDAQESLEVAIQCLETAFGVTLESDLALPQTLPE	60
SGT:	76	IFEAATASKEMPQDPRGPDRTPPSEEDSAEAERLKTEGNEQMKLENFEAAVHLYGKAIEL	135
		IFEAATASKEMPQDPRGPDRTPPSEEDSAEAERLKTEGNEQMKLENFEAAVHLYGKAIEL	
Klon E:	61	IFEAATASKEMPQDPRGPDRTPPSEEDSAEAERLKTEGNEQMKLENFEAAVHLYGKAIEL	120
SGT:	136	NPANAVYFCNRAAAYSKLGNYVGAVQDCERAIGIDPGYSKAYGRMGLALSSLNKHAEAVA	195
		NPANAVYFCNRAAAYSKLGNYVGAVQDCERAIGIDPGYSKAYGRMGLALSSLNKHAEAVA	
Klon E:	121	NPANAVYFCNRAAAYSKLGNYVGAVQDCERAIGIDPGYSKAYGRMGLALSSLNKHAEAVA	180
SGT:	196	YKKALELDPDNDTYKSNLKI AELKLREAPS	226
		YKKALELDPDNDTYKSNLKI AELKLREAPS	
Klon E:	181	YKKALELDPDNDTYKSNLKI AELKLREAPS	211

Abbildung 44: Homologievergleich mit SGT aus Ratte (GI12083666).

7.2.6. Klon F

```

tttnengagggttgatcattnnctggctagcgcttaaacttaagcttagcgagaggcttggggcagccgagcggca
gccagggccccggttcgggctcggtccagaagggagaggagcccgccaaagcgcgcaagagagcgggctgcctcgagc
ccgagccggagagggagcgcgagccgcccgggacggcctccgaaacctggggggttctcatcatcatcatcat
catggtagggctagcatgactggtagcagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacgataaggtaccaggatccgc
tgaaactcacaattgcggttgacctgatgcaagcagctgaggttttagccagaagcattttcctgaagtggtacagcacg
aagagttcattctctgagtcaaggagaggtggagaagctaatcaagtgcgatgagattcaggtggattctgaagagcca
gtcttgaggctgtcatcaactgggtgaagcatgccaaagaaggagcgagaggagtcttgcctgacctcctgcagtatgt
tcggatgccccctgctgacctaggtacattacagatgtgatgatgctgagcctttatccgctgtagttacagtgca
gggacctagttgatgaagccaagaagtttcacctgaggcctgaacttcggagttagatgcaaggaccaggacaagagcc
cgactaggagccaatgaagtgcctctggtggttgggggcttcgnaacc

```

```

FXEGLYHXPG*RLNLSLAQRLGAAERQPGPSGLGSRRRERSPPRRARERAASQSEPEREREPRRPTASETMGGSHHHH
HGMASTGGQQMGRDLYDDDDKVPGSAETHNCVDLMQAAEVFSQKHFPEVVQHEEFILLSQGEVEKLIKDEIQVDSEEP
VFEAVINWVKHAKKEREESLPDLLQYVRMPLLTTPRYITDVIDAEPFIRCSLQCRDLVDEAKKFHLRPELRSQMGPRTA
RLGANEVLLVVGGFXT

```

Identität = 147 von 148 Aminosäuren (99%)

```

Klon F: 107 AETHNCVDLMQAAEVFSQKHFPEVVQHEEFILLSQGEVEKLIKDEIQVDSEEPVFEAVI 166
          AETHNCVDLMQAAEVFSQKHFPEVVQHEEFILLSQGEVEKLIKDEIQVDSEEPVFEAVI
PLZF:   193 AETHNCVDLMQAAEVFSQKHFPEVVQHEEFILLSQGEVEKLIKDEIQVDSEEPVFEAVI 252

Klon F: 167 NWVKHAKKEREESLPDLLQYVRMPLLTTPRYITDVIDAEPFIRCSLQCRDLVDEAKKFHLR 226
          NWVKHAKKEREESLP+LLQYVRMPLLTTPRYITDVIDAEPFIRCSLQCRDLVDEAKKFHLR
PLZF:   253 NWVKHAKKEREESLPNLLQYVRMPLLTTPRYITDVIDAEPFIRCSLQCRDLVDEAKKFHLR 312

Klon F: 227 PELRSQMGPRTARLARGANEVLLVGGF 254
          PELRSQMGPRTARLARGANEVLLVGGF
PLZF:   313 PELRSQMGPRTARLARGANEVLLVGGF 340

```

Abbildung 45: Homologievergleich mit C3IP1 aus Mensch (GI12722541). Aufgrund der zu schlechten Sequenz am 5'-Ende der Sequenz konnten hier weder *Eco* RI-Schnittstelle noch Linker-Sequenz identifiziert werden. Daher konnte das Leseraster nicht bestimmt werden. Aminosäure-Sequenz und Homologievergleich zeigen Produkt des einzigen Leserasters, welches ein Ergebnis in BLAST lieferte.

Abkürzungsverzeichnis

3,5-DHPG	3,5-Dihydroxyphenylglyzin
5'-UTR	5'-nicht translatierte Sequenz (engl. 5'-untranslated region)
ADP	Adenosin-Diphosphat
AKAP	PKA-assoziierte Proteine (engl. A kinase associated protein)
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
cDNA	komplementäre DNA
cfu	Kolonie formende Einheit (engl. colony forming unit)
CHO	Goldhamster-Ovarien (engl. chinese hamster ovary)
Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde)
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion
CPA	Zyklopentyladenosin (engl. cyclopentyladenosine)
cpm	Einheiten pro Minute (engl. counts per minute)
DAG	Diacylglycerin
DCG-IV	(2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-Dicarboxycyclopropyl)-Glyzin
DDT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxy ribonucleic acid)
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
ECL	gesteigerte Chemolumineszenz (engl. enhanced chemoluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	verstärkt grün fluoreszierende Protein (engl. enhanced green fluorescent protein)
EGTA	1,2-Bis-(2-Aminoethoxyethan)-Tetraessigsäure
engl.	englisch
GABA	β -Aminobuttersäure
GluR	Glutamatrezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
G α	α -Untereinheiten trimerer G-Proteine
G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -Untereinheiten trimerer G-Proteine
HEK 292	humane embryonale Nierenzelllinie (engl. human embryonic kidney)
HEPES	2-Hydroxyethylpiperazin-2-Ethan Sulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. horse reddish peroxidase)
Ig	Immunglobulin
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
K _D	Dissoziations-Konstante
kD	Kilodalton
K _{ir}	„einwärtsgerichtete“ K ⁺ -Kanal (engl. inward rectified K ⁺ -channel)
L-AP4	L2-Amino-4-Phosphonobutyrat
LB	Luria Bertani oder Luthero Broth
Leu	Leuzin
LTD	Langzeitdepression (engl. long term depression)
LTP	Langzeitpotenzierung (engl. long term potentiation)
MES	2-N-Morpholinoethansulfat
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
NCBI	national center for biotechnology information
NLS	Kerntransportsequenz (engl. nuclear localization sequence)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-spezifischer Glutamatrezeptor
OD	optische Dichte

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. poly chain reaction)
PDZ	Proteindomäne, zuerst beschrieben in den Proteinen PSD95, Dlg1 und ZO-1
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i	PO ₄ ²⁻ -Ionen (anorganisches Phosphat)
Pick1	mit PKC interagierendes Protein (engl. protein interacting with C kinase)
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
PxF	peroxysomales und farnesyliertes Protein (engl. peroxysomal farnesylated protein)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute (eng. rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGT	kleines, Glutamin-reiches Protein mit TPR-Motiv (engl. small glutamine rich TPR containing protein)
STP	Kurzzeit-Potenzierung (engl. short-term potentiation)
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TCA	Trichlor-Essigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TPR	Proteindomäne (engl. tetratricopeptide repeat)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
upm	Umdrehungen pro Minute
Ura	Urazil
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (eng. weight per volume)
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl-β-D-Galaktosid
ZNS	Zentralnervensystem
β-ME	β-Merkaptoethanol

Die Abkürzungen für Aminosäuren folgen dem internationalen Ein-Buchstaben-Kode.

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Doktorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Frankfurt am Main, den 15.03.2001

Lebenslauf

Geburtsort	Orense (Spanien)
Geburtsdatum	24.06.1971
Staatsangehörigkeit	spanisch
Familienstand	ledig

Schulbildung	Grundschule	1977 – 1982, Liebfrauenschule, Frankfurt
	Gymnasium	1982 – 1991, Musterschule, Frankfurt
	Schulabschlüsse	12.06.1991, Allgemeine deutsche Hochschulreife
		12.09.1991, Spanische Hochschulreife
Studium	Grundstudium	1991 – 1993, Biologie
		27.10.1993, Vordiplom Biologie
	Hauptstudium	1993 – 1996, Biochemie
		1996, Diplomarbeit in Abteilung Kinematische Zellforschung bei Prof. Dr. Jürgen Bereiter-Hahn in der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
	16.12.1996, Diplom Biochemie	
Promotion		1997 – 2001, Doktorarbeit in Abteilung Neurochemie des Max Planck-Institutes für Hirnforschung, Frankfurt am Main