

**Regulation des metabotropen Glutamatrezeptors 7a
durch die RGS (*Regulators of G protein Signalling*)-
Proteine 3 und 4**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von Liane Bauer
geb. in Bad Kissingen

Frankfurt am Main 2008
(D30)

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Neurochemie am Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt am Main, durchgeführt und vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Betz
Prof. Dr. Theodor Dingermann

Datum der Disputation:

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit geboten hat, diese Dissertation in der Abteilung Neurochemie des Max-Planck-Institutes für Hirnforschung zu erstellen. Besonders danke ich ihm für seine ständige Betreuung und Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Theodor Dingermann möchte ich mich für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung und sein reges Interesse am Fortschritt meiner Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Astrid Scheschonka für ihre Betreuung und Unterstützung, aber vor allem auch für das Thema dieser Arbeit, das ursprünglich aus ihrer Feder (bzw. Pipette) stammt.

Von ganzem Herzen danke ich Nicole Fürst und Dr. Bettina Himmel, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Auch den Kollegen, die die Arbeitsgruppe bereits verlassen haben, möchte ich für ihre Hilfe danken: Anne Nehring, Dr. Greta-Ann Herin, Dr. Anina Moritz, Dr. Chuansheng Zhang und Dr. Zongshu Tang.

Ina Bartnik möchte ich ganz besonders für ihre Hilfe bei der Präparation der Primärkulturen danken.

Insbesondere möchte ich mich auch bei Herrn Hofer und Frau Nam für ihre große Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten bedanken.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Neurochemie bedanken, die mir geholfen haben.

Vielen Dank auch den Mitarbeitern des Tierstalls und den Damen aus der Spülküche.

Der größte Dank gilt meinem Ehemann Andreas Bauer, denn ohne ihn wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	3
2.1.	Neurotransmission	3
2.2.	Glutamatrezeptoren	4
2.2.1.	Struktur metabotroper Glutamatrezeptoren	5
2.2.2.	Signaltransduktion metabotroper Glutamatrezeptoren	8
2.2.3.	Klassifizierung metabotroper Glutamatrezeptoren	10
2.2.4.	Funktion der Gruppe III mGluRs im ZNS	11
2.2.5.	Struktur und Funktion des mGluR7a	12
2.2.6.	Modell der Regulation der mGluR7a-vermittelten Signaltransduktion	15
2.3.	<i>Regulators of G-protein signalling (RGS)-Proteine</i>	17
2.3.1.	Struktur der RGS-Proteine	18
2.3.2.	Klassifizierung der RGS-Proteine	19
2.3.3.	Regulation der RGS-Proteine	21
2.3.4.	Spezifität der RGS-Proteine für G α -Untereinheiten und GPCRs	21
2.4.	Zielsetzung dieser Arbeit	22
3.	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1.	Materialien	25
3.1.1.	Chemikalien und Plastikmaterialien	25
3.1.2.	Enzyme	25
3.1.3.	Kits	25
3.1.4.	Membranen und Filme	26
3.1.5.	DNA-Größenstandard	26
3.1.6.	Protein-Größenstandard	26
3.1.7.	Organismen	26
3.1.7.1.	Mäuse und Ratten	26
3.1.7.2.	Zelllinien und Primärzellen	27
3.1.7.3.	Bakterien	27
3.1.8.	Vektoren	27
3.1.9.	Plasmidkonstrukte	28
3.1.10.	Oligonukleotide	29
3.1.10.1.	Oligonukleotide zur Generierung der EGFP-markierten RGS- Konstrukte	29
3.1.10.2.	Oligonukleotide zur Generierung der GST-markierten intrazellulären mGluR7a-Loops	29
3.1.10.3.	Oligonukleotide zur Generierung der myc-markierten G α_{i1} -Konstrukte	29
3.1.10.4.	Oligonukleotide zur Generierung der GST- und His $_6$ -markierten RGS3-Fragmente	30
3.1.10.5.	Oligonukleotide zur Mutagenese von RGS3, RGS4 und G α_{i1}	30
3.1.10.6.	Oligonukleotide zur Genotypisierung der RGS4-Mäuse	30
3.1.11.	Antikörper	31

3.1.11.1.	Primäre Antikörper für Western Blot (WB), Immunzytochemie (ICC) und Elektronenmikroskopie (EM)	31
3.1.11.2.	Sekundäre fluoreszenzgekoppelte Antikörper für die Immunzytochemie	31
3.1.11.3.	Sekundäre Peroxidase-gekoppelte Antikörper für Western Blot	31
3.1.11.4.	Sekundäre biotinylierte Antikörper für die Elektronenmikroskopie	32
3.1.12.	Lösungen und Medien	32
3.1.12.1.	Zellbiologische Lösungen und Medien	32
3.1.12.2.	Molekularbiologische Lösungen	32
3.1.12.3.	Proteinbiochemische Lösungen	33
3.1.12.4.	Lösungen und Puffer für Immunzytochemie (ICC) und Elektronenmikroskopie (EM)	34
3.1.12.5.	Antibiotika	35
3.2.	Molekularbiologische Methoden	35
3.2.1.	Alkohol-Fällung von Nukleinsäuren	35
3.2.2.	Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese	35
3.2.3.	Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	35
3.2.4.	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> XL1-blue	36
3.2.4.1.	Präparation von Plasmid-DNA mit dem <i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i> (QIAGEN)	36
3.2.4.2.	Präparation von Plasmid-DNA	36
3.2.4.3.	Plasmid-DNA-Präparation mit dem <i>Plasmid Midi/Maxi Kit</i> (QIAGEN)	36
3.2.4.4.	Präparation von Plasmid-DNA mittels Cäsium-Chloridgradient	37
3.2.5.	Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten	38
3.2.6.	Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	38
3.2.7.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	38
3.2.8.	Mutagenese-PCR mit QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)	39
3.2.9.	Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger <i>et al.</i> , 1977)	39
3.2.10.	Präparation elektrokompetenter Bakterienzellen	39
3.2.11.	Klonierung von DNA-Fragmenten	40
3.2.11.1.	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen	40
3.2.11.2.	Dephosphorylierung von DNA-Enden	40
3.2.11.3.	Ligation von DNA-Fragmenten	41
3.2.11.4.	Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen mittels Elektroporation	41
3.2.11.5.	Transformation chemokompetenter Zellen	41
3.2.12.	Anlegen von <i>E. coli</i> Glyzerin-Kulturen	41
3.2.13.	Genotypisierung der RGS4-defizienten Mäuse	42
3.2.13.1.	Vorbereitung von Mausschwanzproben für die Genotypisierungs-PCR	42
3.2.13.2.	Genotypisierungs-PCR	42
3.3.	Proteinbiochemische Methoden	43
3.3.1.	Kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration	43
3.3.2.	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.3.3.	Coomassiefärbung von Proteingelen	43

3.3.4.	Silberfärbung von Proteingelen _____	44
3.3.5.	Western Blot (Immunblot)-Analyse: Transfer von Proteinen auf Membranen und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern _____	44
3.3.6.	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. Coli</i> _____	45
3.3.7.	Affinitätsreinigung von GST- bzw. His ₆ -Fusionsproteinen _____	45
3.3.7.1.	Aufschluss von Bakterienzellen mittels Ultraschall (Sonifikation) _____	45
3.3.7.2.	Aufreinigung rekombinanter His ₆ -Fusionsproteine über Nickel-NTA-Agarose zur Verwendung als Antigene für die Produktion polyklonaler Antikörper _____	46
3.3.7.3.	Reinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine über Glutathionsepharose- Affinitätschromatographie _____	46
3.3.8.	Kopräzipitation mit GST-Fusionsproteinen (GST-Kopräzipitation): Analyse von Protein- Protein Interaktionen _____	47
3.3.9.	Produktion polyklonaler (Kaninchen-) Antikörper _____	47
3.3.10.	Affinitätsaufreinigung von polyklonalen Antikörpern (anti-RGS3 und -RGS4) _____	48
3.3.11.	Herstellung von Homogenat aus Maus- bzw. Rattenhirngewebe _____	48
3.4.	Zellbiologische Methoden _____	49
3.4.1.	Beschichtung von Deckgläsern und Zellkulturschalen mit Poly-L-Ornithin _____	49
3.4.2.	Kultivierung von HEK- bzw. HEK-T-Zellen _____	49
3.4.2.1.	Kulturbedingungen _____	49
3.4.2.2.	Einfrieren und Auftauen von HEK-Zellen _____	49
3.4.3.	Präparation von hippokampalen und kortikalen Primärkulturen aus Mäusen oder Wistar Ratten _____	50
3.4.4.	Transfektion von HEK-Zellen _____	50
3.4.4.1.	Calcium-Phosphat-Transfektion _____	50
3.4.4.2.	Lipofektion von HEK-Zellen _____	51
3.4.4.3.	Lipofektion von hippokampalen/kortikalen Neuronen _____	51
3.4.5.	Herstellung von Lysat aus HEK-Zellen _____	52
3.4.6.	Generierung einer stabilen mGluR7a-Zelllinie (HEK-mGluR7a) _____	52
3.4.7.	Immunzytochemie _____	53
3.4.8.	Elektronenmikroskopische Analyse von kortikalen Maushirnschnitten _____	53
3.4.9.	Signaltransduktionsanalysen _____	55
3.4.9.1.	Inositolphosphatanalyse in transfizierten HEK Zellen _____	55
3.4.9.2.	cAMP-Analyse in transfizierten HEK Zellen - <i>cAMP Biotrak Enzymimmunoassay (EIA)</i> _____	57
3.4.9.3.	cAMP-Assay in kultivierten kortikalen Neuronen- <i>cAMP Biotrak Enzymimmunoassay</i> (EIA) _____	57
4.	ERGEBNISSE _____	59
4.1.	Analyse der Protein-Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 _____	59
4.1.1.	Interaktion zwischen mGluR7a exprimiert in HEK-Zellen und GST-RGS3 bzw. GST-RGS4 _____	59
4.1.2.	Identifikation der RGS-Bindungsdomänen des mGluR7a _____	60

4.1.3.	Rolle der $G\alpha_{i1}$ -Untereinheit bei der Interaktion zwischen mGluR7a und GST-RGS3 bzw. GST-RGS4	63
4.1.4.	Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen mGluR7a und GST-RGS3 bzw. GST-RGS4	64
4.1.5.	Funktion von Calmodulin bei der Interaktion zwischen mGluR7a und GST-RGS3 bzw. GST-RGS4	66
4.1.5.1.	Interaktion von Ca^{2+} /CaM mit GST-RGS3 und GST-RGS4	66
4.1.5.2.	Einfluss von Ca^{2+} /CaM auf die Bindung des mGluR7a an GST-RGS3 bzw. GST-RGS4	67
4.1.6.	Detaillierte Analyse der Interaktionen zwischen mGluR7a, Calmodulin und GST-RGS3	68
4.1.6.1.	Calciumabhängige Interaktion zwischen GST-RGS3-NT bzw. GST-RGS3-CT mit mGluR7a und Calmodulin	69
4.1.6.2.	Interaktion des His ₆ -RGS3-NT bzw. His ₆ -RGS3-CT mit den RGS-Bindungsdomänen des mGluR7a	71
4.2.	Effekt der RGS-Proteine auf die mGluR7a-vermittelte Signaltransduktion in HEK-Zellen	73
4.2.1.	Effekt von RGS-Proteinen auf die umgeleitete mGluR7a-vermittelte Inositolphosphat-Signalkaskade	73
4.2.1.1.	Untersuchung der Effekte verschiedener RGS-Proteine auf die mGluR7a-vermittelte Inositolphosphatproduktion	74
4.2.1.2.	Analyse von GAP-inaktiven RGS3- und RGS4-Mutanten	75
4.2.2.	Effekt von RGS3 bzw. RGS4 auf die mGluR7a-vermittelte cAMP-Signaltransduktion	77
4.3.	Lokalisation von RGS3 und RGS4 sowie mGluR7a in kortikalen Mausneuronen	80
4.3.1.	Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen RGS3 und RGS4	80
4.3.1.1.	Spezifitätsnachweis des anti-RGS3- und anti-RGS4-Antikörpers mittels Western Blot	80
4.3.1.2.	Spezifitätsnachweis des anti-RGS3- und anti-RGS4-Antikörpers mittels Immunfärbung transfizierter hippocampaler Neuronen	82
4.3.2.	Elektronenmikroskopische Analyse der Lokalisation von RGS3, RGS4 und mGluR7a im Maus-Kortex	84
4.4.	Effekt von RGS4 auf die mGluR7a-vermittelte cAMP-Signaltransduktion in kortikalen Neuronen	87
5.	DISKUSSION	90
5.1.	Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4	90
5.1.1.	Direkte Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4	90
5.1.2.	Ca^{2+} -Abhängigkeit der Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 und die Rolle von Calmodulin	93
5.1.3.	Physiologische Relevanz der Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4	96
5.2.	Effekt der RGS-Proteine auf die mGluR7a-vermittelte Signaltransduktionskaskaden in HEK-Zellen	99
5.2.1.	Effekt der RGS-Proteine auf die umgeleitete mGluR7a-vermittelte Inositolphosphat-Signalkaskade	99

5.2.2.	Effekt von RGS3 und RGS4 auf die mGluR7a-vermittelte cAMP-Signalkaskade _____	101
5.3.	Kolokalisation von mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 in kortikalen Neuronen _____	102
5.4.	Effekt von RGS4 auf die mGluR7a-vermittelte cAMP-Signaltransduktion <i>in vivo</i> in kortikalen Neuronen _____	104
5.5.	Modell der Regulation des mGluR7a durch RGS3/RGS4 _____	106
6.	ANHANG _____	110
6.1.	Abbildungen _____	110
6.2.	Abkürzungsverzeichnis _____	110
6.3.	Literaturverzeichnis _____	113
6.4.	Lebenslauf _____	119
6.5.	Erklärung _____	121

1. Zusammenfassung

Glutamat ist einer der wichtigsten erregenden Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS), der ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluRs) sowie metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluRs) aktiviert. Bei den iGluRs handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle, die ein extrazelluläres Signal direkt durch Änderung der Ionenleitfähigkeit der Membran in die Zelle übermitteln können. Dagegen erfolgt die Signalübertragung der mGluRs indirekt durch Aktivierung intrazellulär gekoppelter heterotrimerer G-Proteine ($G_{\alpha\beta\gamma}$), die daraufhin zelluläre Signalprozesse beeinflussen (z.B. die Bildung sekundärer Botenstoffe). Es sind acht verschiedene mGluRs bekannt, die in drei Gruppen gegliedert werden, welche sich in ihrer Lokalisation, ihrer Struktur und ihren pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden. Die hauptsächlich präsynaptisch lokalisierten Gruppe III mGluRs sind an der Regulation der Neurotransmission an exzitatorischen Synapsen beteiligt. Sie fungieren als Autorezeptoren, die rückkoppelnd die Glutamatausschüttung hemmen.

Um eine möglichst exakte Übersetzung der extrazellulären Glutamatsignale durch mGluRs zu gewährleisten, muss die Signaltransduktion dieser Rezeptoren sehr genau kontrolliert und reguliert werden. Als Regulatoren der Signalübertragung verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) haben sich Vertreter der RGS- (*Regulators of G protein Signalling*)-Proteinfamilie erwiesen. RGS-Proteine können direkten Einfluss auf die Kinetik der Signalübermittlung eines GPCRs nehmen. Die Stimulation eines GPCRs induziert den Austausch von gebundenem GDP zu GTP an der G_{α} -Untereinheit des gekoppelten heterotrimeren G-Proteins, wodurch dieses aktiviert wird. Das G-Protein bleibt so lange aktiv, bis das gebundene GTP durch die GTPase-Aktivität der G_{α} -Untereinheit hydrolysiert wird. RGS-Proteine beschleunigen mittels ihrer GAP (*GTPase Accelerating Protein*)-Funktion die GTP-Hydrolyse, wodurch die Geschwindigkeit der Inaktivierung der G_{α} -Untereinheit und somit der Signalantwort des GPCRs deutlich erhöht wird. Bis heute wurden mehr als 30 verschiedene RGS-Proteine beschrieben, die alle eine konservierte RGS-Domäne besitzen, die die Bindung an die G_{α} -Untereinheit des G-Proteins und die GAP-Aktivität vermittelt. Für einige GPCRs wurde bereits eine spezifische und selektive Interaktion sowie Regulation durch bestimmte RGS-Proteine gezeigt. An Gruppe III mGluRs gab es bisher keine einschlägigen Untersuchungen, außer am in der Retina exprimierten mGluR6, der jedoch einen Sonderfall innerhalb dieser Rezeptorgruppe darstellt. Deshalb sollte in dieser Dissertation untersucht werden, ob Gruppe III mGluRs, mit besonderem Augenmerk auf eine der zwei bekannten Spleißvarianten des mGluR7 (mGluR7a), durch ein oder auch mehrere Mitglieder der RGS-Familie reguliert werden können. Zwei Vertreter der RGS-Protein Familie, RGS3 und RGS4, die beide im Gehirn exprimiert werden, wurden als potentielle Kandidaten ausgewählt.

Biochemische Interaktionsanalysen dieser Dissertation zeigten, dass sowohl RGS3 als auch RGS4 direkt an mGluR7a binden. Weiterführend konnten die Bindungsdomänen, an denen die Interaktion mit den RGS-Proteinen stattfinden, auf den C-Terminus und die intrazelluläre Schleife 2 des Rezeptors eingegrenzt werden. Die Bindung zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 war in Abwesenheit von Ca^{2+} deutlich verstärkt. Da Calmodulin (CaM) in Anwesenheit von Ca^{2+} sowohl an mGluR7a als auch an RGS3 und RGS4 bindet, wurde postuliert, dass gebundenes Ca^{2+} /CaM ein räumliches Hindernis für die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und RGS-Protein darstellen könnte. Die Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Bindung von Ca^{2+} /CaM an den C-Terminus des mGluR7a die Interaktion zwischen dem Rezeptor und RGS4 abschwächt. Da Ca^{2+} -Ionen eine äußerst wichtige Rolle

bei der mGluR7a-vermittelten Signaltransduktion übernehmen, würde eine Ca^{2+} -abhängige Regulation der Interaktion des mGluR7a mit RGS3 bzw. RGS4 einen eleganten Mechanismus zur Feinregulation der Rezeptorantwort darstellen.

Ein physiologischer Effekt der beiden RGS-Proteine auf die mGluR7a-vermittelte Signalübermittlung wurde zunächst in transfizierten HEK-Zellen nachgewiesen. Hierzu wurde die Signalantwort des mGluR7a in An- und Abwesenheit von RGS3 oder RGS4 durch Bestimmung der Menge der sekundären Botenstoffe gemessen und verglichen. RGS3 sowie RGS4 beschleunigten in diesem System durch ihre GAP-Aktivität die GTP-Hydrolyse an der $\text{G}\alpha$ -UE und damit die Inaktivierung der Signaltransduktion des Rezeptors.

Mittels hochauflösender Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass RGS3 und RGS4 wie auch mGluR7a *in vivo* an der präsynaptischen Membran kortikaler Maus-Neuronen zu finden sind. Da die Proteine in den Nervenzellen kolokalisieren, sollte die Interaktion und Regulation, die *in vitro* nachgewiesen wurde, auch *in vivo* möglich sein.

Ein *in vivo*-Nachweis des regulatorischen Effektes von RGS4 auf die Signaltransduktion der Gruppe III mGluRs bzw. des mGluR7a erfolgte durch Vergleich der Signalantworten dieser Rezeptoren in kultivierten kortikalen Neuronen aus Wildtyp- und RGS4-defizienten Mäusen. Mit dem Gruppe III mGluR-spezifischen Agonisten L-AP4 konnte im Vergleich zu den Wildtyp-Neuronen keine Antwort der mGluRs in den RGS4-defizienten Nervenzellen gemessen werden. Erstaunlicherweise rief der mGluR7a-spezifische allosterische Agonist AMN082 in den RGS4-defizienten Zellen den entgegengesetzten Effekt hervor als in den Wildtypzellen. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Signalübermittlung der Gruppe III mGluRs bzw. des mGluR7a ohne das RGS4-Protein nicht korrekt ablaufen kann.

Zusammenfassend kann mit den Daten der vorliegenden Arbeit das bereits bestehende Modell eines mGluR7a-Signalkomplexes erweitert werden: Dabei bildet der Rezeptor bereits vor Stimulation durch einen Agonisten einen Komplex mit dem heterotrimeren G-Protein und nachgeschalteten Effektoren, die durch den Rezeptor beeinflusst werden (z.B. Adenylatzyklase oder P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanäle). Ein RGS-Protein, wie z.B. RGS3 oder RGS4, kann als weitere Komponente einerseits die Signaltransduktion regulieren und andererseits den Komplex durch simultane Wechselwirkung mit dem Rezeptor und nachgeschalteten Effektoren stabilisieren. Durch eine solche lokale Organisation funktionell zusammengehöriger Proteine, die die Initiation (wie das G-Protein) und Termination (wie die RGS-Proteine) der Signaltransduktion bewirken, wird eine schnelle und feinregulierte Signalübermittlung gewährleistet.

2. Einleitung

Das Gehirn fungiert als das Kontrollzentrum des Körpers, das Informationen speichert, verrechnet, integriert und weiterleitet. Es besteht aus ca. 10^{12} Nervenzellen (Neuronen), die sich untereinander verknüpfen, wodurch ein äußerst kompliziertes Netzwerk entsteht. Für die enorme Leistungsfähigkeit des Gehirns scheint weniger die Gesamtzahl der Neuronen entscheidend, als vielmehr die Art und Anzahl ihrer Verknüpfungen, an denen die Kommunikation zwischen den Nervenzellen stattfindet (Jessell und Kandel, 1993).

2.1. Neurotransmission

Die Übertragung der Informationen von einer Nervenzelle auf eine andere geschieht an spezialisierten Kontaktstellen, den sogenannten Synapsen (Jessell und Kandel, 1993). Die informationsabgebenden Neuronen werden als präsynaptische Zellen und die informationsaufnehmenden Nervenzellen als postsynaptische Zellen bezeichnet. Die Kommunikation zwischen diesen Zellen erfolgt je nach Art der Verknüpfung auf chemischem oder elektrischem Weg. Nur bei einem kleinen Anteil der Synapsen stehen die Membranen der prä- und postsynaptischen Nervenzelle durch spezielle Spaltverknüpfungen (*gap junctions*) in unmittelbarem Kontakt, so dass die Information direkt übertragen werden kann (elektrische Synapsen). Diese *gap junctions* bilden Poren in der Plasmamembran beider Zellen, so dass hier ein bidirektionaler Austausch von kleinen Molekülen (z.B. Ionen) erfolgen kann. Der Ionenfluss durch die *gap junctions* ermöglicht die Übertragung der Information, die in Form eines elektrischen Impulses in der Präsynapse ankommt, direkt auf elektrischem Wege in die nachgeschaltete Nervenzelle. Bei den häufiger vorkommenden chemischen Synapsen liegt zwischen der prä- und postsynaptischen Membran ein elektronenoptisch sichtbarer synaptischer Spalt (20-30 nm) (siehe Abb. 2-1), an dem es bei einer elektrischen Transmission wegen des fehlenden direkten Kontaktes zu hohen Stromverlusten kommen würde. Deshalb wird an diesen Synapsen die Information im präsynaptischen Neuron in ein chemisches Signal umgewandelt, bei dem Botenstoffmoleküle (Neurotransmitter) die Erregungsübertragung auf die postsynaptische Zelle übernehmen (chemische Synapse) (siehe Abb. 2-1) (Dobrunz und Garner, 2002). Diese Botenstoffe sind im präsynaptischen Zellbereich (*Bouton*) in synaptischen Vesikeln enthalten. Ein elektrisches Signal bewirkt die Depolarisation der präsynaptischen Membran, wodurch es zur Öffnung spannungsabhängiger Ionenkanäle und somit u.a. zum Einstrom von Calcium-Ionen (Ca^{2+}) kommt. Die resultierende Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration induziert die Fusion von Neurotransmitter-Vesikeln, die an einer spezialisierten Region der präsynaptischen Membran (aktive Zone) angedockt haben, mit der Plasmamembran. Dies

führt zur Ausschüttung der Transmittermoleküle in den synaptischen Spalt. Durch Diffusion gelangen die Botenstoffe zur postsynaptischen Membran, wo sie schließlich an Neurotransmitter-Rezeptoren binden, über die das Signal in die nachgeschaltete Zelle transduziert wird.

Bei den Neurotransmittern handelt es sich in der Regel um einfache Aminosäuren (z.B. Glutamat, γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glyzin), Derivate von Aminosäuren (z.B. Serotonin, Dopamin), Nukleotide (z.B. ATP) oder Peptide (Matthews, 2001). Je nachdem welcher Botenstoff ausgeschüttet wird, kann eine Erregung (Exzitation) oder eine Hemmung (Inhibition) des postsynaptischen Neurons erfolgen. Während GABA und Glyzin ein inhibierendes Signal übermitteln, stellt die Aminosäure L-Glutamat den primären exzitatorischen Neurotransmitter des ZNS dar.

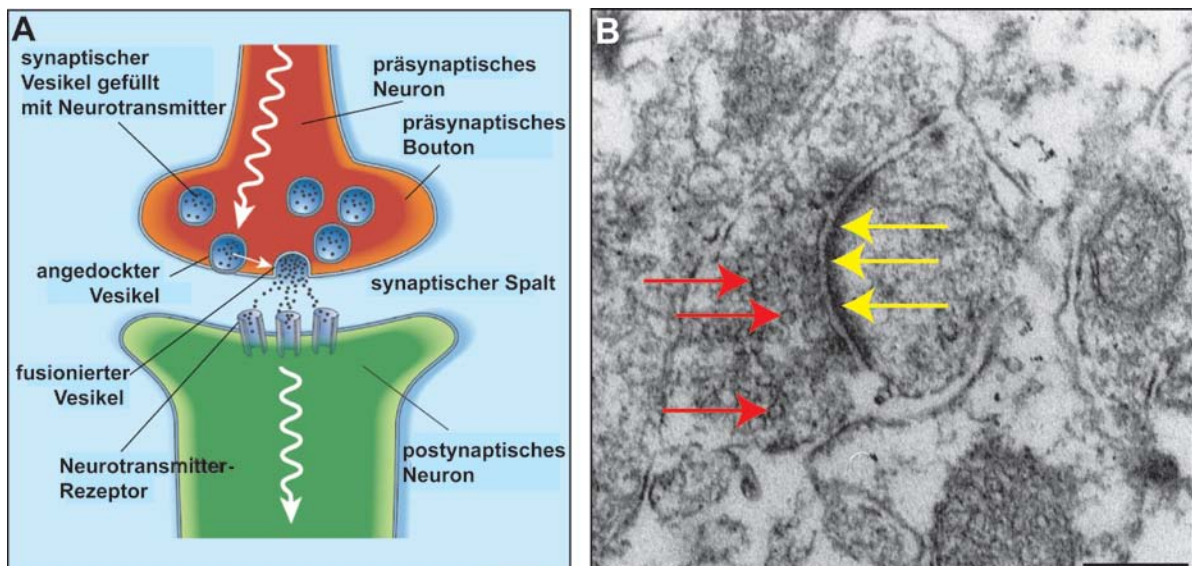


Abb. 2-1 Darstellung einer chemischen Synapse: A: Schematische Darstellung: Dargestellt ist eine chemische Synapse. Ein ankommendes Aktionspotential (weißer Pfeil) depolarisiert die präsynaptische Membran. Dies induziert die Fusion der Neurotransmitter-Vesikel mit der Membran, wodurch die Botenstoffe in den synaptischen Spalt ausgeschüttet werden. Die Neurotransmitter gelangen durch Diffusion zur postsynaptischen Membran, wo sie von Neurotransmitter-Rezeptoren gebunden werden, die das Signal in die postsynaptische Zelle weiterleiten (Abb. und Text verändert nach Dobrunz und Garner, 2002). **B: Elektronenmikroskopische Darstellung:** Dargestellt ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer chemischen Synapse im Maus-Kortex. Die roten Pfeile kennzeichnen synaptischen Vesikel, die sich in der Präsynapse befinden. Mit den gelben Pfeilen ist die postsynaptische Dichte (PSD) markiert, in der die Neurotransmitter-Rezeptoren verankert sind. Die elektronenmikroskopische Aufnahme wurde in dieser Dissertation erstellt. Der Längenstandard entspricht 0.3 μm .

2.2. Glutamatrezeptoren

Glutamat ist einer der wichtigsten erregenden Neurotransmitter im ZNS, der zwei Rezeptorklassen aktiviert, die sich unter anderem in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit unterscheiden: Bei den ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluR) handelt es sich um schnelle

ligandengesteuerte Kationenkanäle, zu denen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-, α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure (AMPA)- und Kainat-Rezeptoren gehören (Hollmann und Heinemann, 1994). Sie sind sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert. Durch die Bindung von Glutamat kommt es bei den iGluRs zu einer Konformationsänderung, bei der sich der Kanal öffnet und Ionen die Membran passieren können. Da iGluRs somit direkt das Membranpotential beeinflussen können, spielen sie eine wichtige Rolle bei der schnellen Neurotransmission, die nur wenige Millisekunden andauert. Viele Funktionen des Nervensystems dauern jedoch Sekunden oder Minuten. Diese werden durch „langsame“ Neurotransmitter-Rezeptoren, die intrazellulär an GTP-bindende Proteine (G-Proteine) gekoppelt sind, vermittelt. Bei den metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs), handelt es sich um solche G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs).

2.2.1. Struktur metabotroper Glutamatrezeptoren

MGluRs bestehen wie alle GPCRs aus einer Polypeptidkette, die 7 α -helikale (heptahelikale) Transmembrandomänen (TM), 4 extrazelluläre und 3 intrazelluläre Schleifen ausbildet (siehe Abb. 2-2) (Gether, 2000). Das N-terminale Ende befindet sich auf der extrazellulären Seite und die C-terminale Endigung auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran. Für den Kontakt mit dem G-Protein sind die hochkonservierten intrazellulären Schleifen 2 und 3 entscheidend.

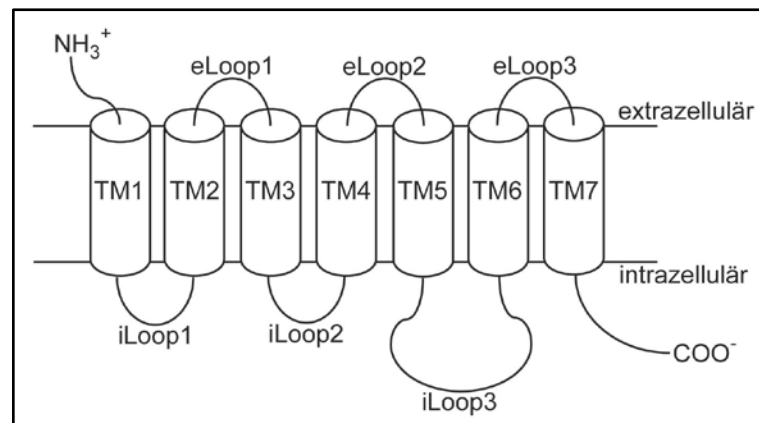


Abb. 2-2 Schematische Struktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR): Die Struktur eines GPCR in der Plasmamembran ist schematisch dargestellt. Die 7 Transmembranhelizes (TM), 3 extrazellulären (eLoop) und 3 intrazellulären (iLoop) Schleifen sowie der extrazelluläre N- und der intrazelluläre C-Terminus sind gezeigt (Abb. verändert nach Gether, 2000).

Es gibt 5 Hauptfamilien, in die die GPCRs aufgrund von Sequenzhomologien und funktioneller Ähnlichkeit eingeteilt werden (Pierce *et al.*, 2002). Zur Familie A gehören Rhodopsin-ähnliche GPCRs mit weitreichenden Funktionen als Hormon-, Neurotransmitter- oder Licht-Rezeptoren (z.B. Dopamin-, Cannabinoid-, Opioid- und Opsinrezeptoren). Die

Mitglieder der Sekretin-ähnlichen Rezeptor Familie (B) werden hauptsächlich durch Glukagon-Peptidhormone aktiviert, wie z.B.: Calcitonin- und Parathyroidhormon-Rezeptoren. Die mGluRs gehören zusammen mit verschiedenen Pheromonrezeptoren der Familie C der GPCRs an, die sich deutlich von den Vertretern anderer GPCR-Familien unterscheiden, mit denen sie keinerlei Sequenzhomologie teilen. Sie zeichnen sich vor allem durch ihren langen extrazellulären N-Terminus (NT) aus, der eine Venusfliegenfallen-ähnliche Struktur zur Bindung von Glutamat ausbildet (siehe Abb. 2-3) (Jingami *et al.*, 2003). Dagegen bilden GPCRs der anderen Familien ihre Ligandenbindungsstasche mit ihren Transmembranhelizes aus. Die GPCR-Familie D umfasst Rezeptoren aus Pilzen, während es sich bei der Familie E um cAMP-Rezeptoren aus *Dictyostelium* handelt.

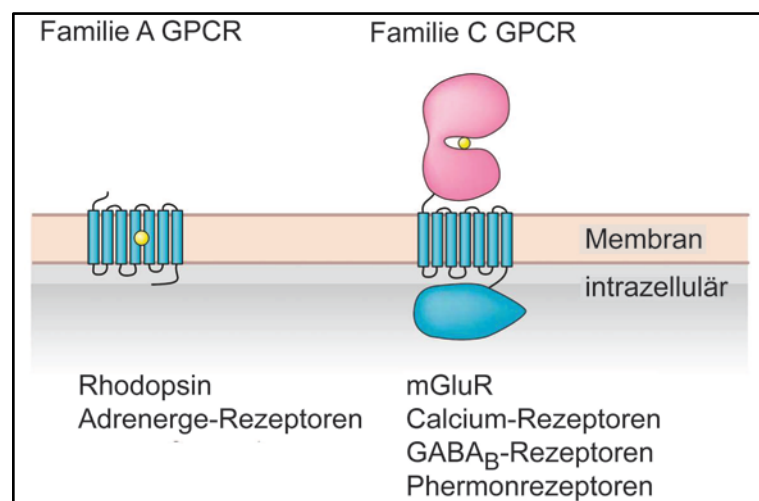


Abb. 2-3 Struktur und Liganden-Bindungsstelle von G-Protein gekoppelten Rezeptoren: Ein Vertreter der Familie A (links) und der Familie C (rechts) der GPCRs sind schematisch dargestellt. Die gelben Kreise repräsentieren einen Liganden. Während die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren ihre Ligandenbindungsdomäne mit ihren Transmembranhelizes bilden, binden die metabotropen Glutamatrezeptoren ihren Liganden mit der extrazellulären Domäne (verändert nach Jingami *et al.*, 2003).

Die Aminosäure (AS)-Sequenzen der heptahelicalen Transmembrandomäne sowie der intrazellulären Schleifen der mGluRs sind weitgehend konserviert. Vor allem die AS-Abfolge der zweiten intrazellulären Schleife, die der selektiven Erkennung des gekoppelten G-Proteins dient, ist innerhalb dieser Proteingruppe hoch konserviert (Havlickova *et al.*, 2003). Der C-Terminus (CT), der auch bei der Kopplung an das G-Protein eine Rolle spielt, ist in Länge und Struktur bei den einzelnen Vertretern der mGluRs sehr unterschiedlich (Gabellini *et al.*, 1993; Pin und Duvoisin, 1995; Prezeau *et al.*, 1996). Diese bis zu 300 AS lange intrazelluläre Domäne bietet eine Plattform zur Interaktion mit verschiedenen Proteinen, die durch den Rezeptor beeinflusst werden oder die ihrerseits den Rezeptor modulieren (siehe Tab. 2-4) (Dev *et al.*, 2001; Enz, 2006).

mGluR-Subtyp	Spleiß-Variante	Länge des C-Terminus	Interagierende Proteine
mGluR1	A	AS 841-1199 (359 AS)	Adenosinrezeptor A1, Ca _v 2.1, Caveolin-1/-2 β , GABA _{(B)1} -Rezeptor, GRK2, Homer, Optineurin, PP1 γ 1, Siah-1A, Tamalin, β -Tubulin
	B	AS 841-906 (66 AS)	GRK2
	C	AS 841-897 (57 AS)	
	D	AS 841-912 (72 AS)	
mGluR2		AS 820-872 (53 AS)	PKA, Tamalin
mGluR3		AS 829-879 (51 AS)	GRIP, PICK1, PKA, PP2 α , Tamalin
mGluR4		AS 848-912 (65 AS)	CaM, Filamin-A, GRIP, Pias, PICK1, PKA, Syntenin
mGluR5	A	AS 827-1171 (345 AS)	CaM, Filamin-A, Homer, Optineurin, PP1 γ 1, Siah-1A, Tamalin
	B	AS 827-1203 (377 AS)	CaM, Filamin-A, Homer, Optineurin, PP1 γ 1, Siah-1A, Tamalin
mGluR6		AS 840-871 (32 AS)	GRIP, Pias1, Syntenin
mGluR7	A	AS 851-915 (65 AS)	CaM, G $\beta\gamma$ -UE, GRIP, Pias1, PICK1, PKA, PKC, Syntenin, α -Tubulin
	B	AS 851-922 (72 AS)	CaM, Filamin-A, GRK 2, Pias1, PICK1, PP1 γ 1, Syntenin
mGluR8	A	AS 844-908 (65 AS)	CaM, Filamin-A, Pias1, PICK1
	B	AS 844-908 (65 AS)	CaM, Pias1, PICK1

Tab. 2-4 C-terminale Domänen der mGluRs und deren Bindungsproteine: Die Aminosäure (AS)-Länge und die Bindungsproteine der C-Termini der mGluR-Spleißvarianten sind angegeben. Ca_v2.1 = spannungsabhängiger (*voltage-gated*) Ca²⁺-Kanal; Calmodulin (CaM); GRIP = *glutamate receptor interacting protein*; G $\beta\gamma$ -UE = G $\beta\gamma$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteinkomplexes (G $\alpha\beta\gamma$); PKA = Proteinkinase A; PKC = Proteinkinase C; Pias1 = *protein inhibitor of activated Stat-1*; PICK1 = *protein interacting with C kinase 1*; PP1 γ 1 = Proteinphosphatase 1 γ 1 (Dev *et al.*, 2001; Enz, 2006).

Ein weiteres Strukturelement der mGluRs ist eine α -helikale Dimerisierungsdomäne am N-terminalen Ende der Glutamatbindungstasche. Über diese Domäne bilden die mGluRs Homodimere aus. Die Interaktion zwischen den Kontaktflächen zweier Monomere soll den schnellen Übergang von der inaktiven in die aktive Konformation fördern (Kunishima *et al.*, 2000). Durch die Bindung von Glutamat verändert sich die relative Orientierung der Dimerisierungsdomänen zueinander. Diese Konformationsänderung wird auf die heptahelikalen Transmembrandomänen übertragen, wodurch das Signal der Aktivierung des Rezeptors über die Membran auf das gekoppelte G-Protein und somit in die Zelle übermittelt wird (Hlavackova *et al.*, 2005).

2.2.2. Signaltransduktion metabotroper Glutamatrezeptoren

MGluRs transduzieren ihr Signal über das gekoppelte heterotrimere G-Protein ($G\alpha\beta\gamma$) in die Zelle. Die Stimulierung des Rezeptors bewirkt eine Änderung der relativen Positionen der Transmembranhelizes, wodurch sich auch die Konformation der intrazellulären Schleifen 2 und 3 ändert. Das G-Protein interagiert spezifisch mit diesen beiden Schleifen und wird durch deren Konformationsänderung aktiviert (Pin, 1995). Das aktive G-Protein kann nun seinerseits Effektormoleküle in der Zelle stimulieren oder inhibieren. Bei diesen nachgeschalteten Effektoren handelt es sich um Enzyme, die die Biosynthese sekundärer Botenstoffe (z.B. zyklisches Adenosinmonophosphat, cAMP oder Inositol-3-phosphat, IP_3) katalysieren oder um Ionenkanäle (z. B. spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle).

Heterotrimere G-Proteine sind Komplexe, die aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit (UE) bestehen (Hamm und Rens-Domiano, 1995). Während die β - und die γ -UEs eine stabile Einheit ($G\beta\gamma$) bilden, besitzt die $G\alpha$ -UE eine Guanin-Nukleotid-Bindungsstelle und eine intrinsische GTPase-Funktion zur Hydrolyse von gebundenem GTP. Innerhalb des GTP-Bindungsgebietes befinden sich 3 sogenannte *Switch*-Regionen (*Switch* I, II und III), in denen es während der Aktivierung durch die Bindung von GTP an die $G\alpha$ -UE zu Konformationsänderungen kommt, die die Hydrolyse des GTP begünstigen (Hamm und Rens-Domiano, 1995). Die $G\alpha$ -UE verfügt neben der GTP-Bindungsdomäne, die homolog zu den Ras-ähnlichen kleinen GTPasen ist, über eine helikale Membran-Insertionsdomäne, die einzigartig für heterotrimere G-Proteine ist (Coleman *et al.*, 1994). Die selektive Wechselwirkung mit dem jeweiligen GPCR erfolgt über den C-Terminus der $G\alpha$ -UE, wobei die letzten 3 Aminosäurereste essentiell sind (Conklin *et al.*, 1993).

Diese heterotrimeren G-Proteine übernehmen die Funktion eines molekularen Schalters (siehe Abb. 2-5) (Preininger und Hamm, 2004): In Abwesenheit eines Signals liegt das G-Protein in der ausgeschalteten GDP-Form als heterotrimerer $G\alpha\beta\gamma$ -Komplex vor. Wird der zugehörige GPCR durch ein ankommendes Signal aktiviert, so veranlasst dies den Austausch von gebundenem GDP zu GTP an der $G\alpha$ -UE und somit die Aktivierung des G-Proteins. Dies führt dazu, dass das Heterotrimer in $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -UEs dissoziiert, die ihrerseits verschiedene Effektormoleküle in der Zelle beeinflussen. Die G-Protein-UEs bleiben so lange aktiv, bis die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -UE das GTP zu GDP und freiem Phosphat (P_i) hydrolysiert. Sobald die GTP-Hydrolyse stattgefunden hat, reassoziieren die UEs des G-Proteins und bilden erneut den inaktiven heterotrimeren $G\alpha\beta\gamma$ -Komplex, was zur Beendigung der Signaltransduktion führt. Somit wird die Zeitdauer der Signalübertragung des Rezeptors durch das An- bzw. Ausschalten des gekoppelten G-Proteins bestimmt.

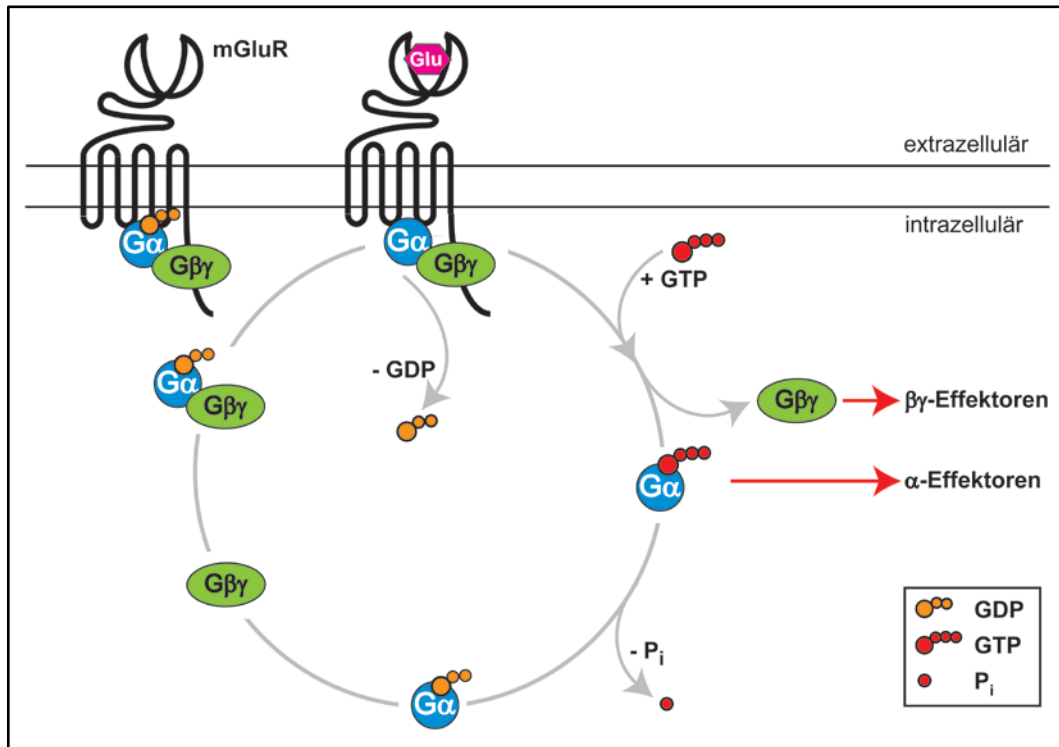


Abb. 2-5 Überblick über den G-Protein-Zyklus: In Abwesenheit eines Signals liegt das G-Protein in der ausgeschalteten GDP-Form als heterotrimerer $G\alpha\beta\gamma$ -Komplex vor. Aktivierung des GPCR (hier ist stellvertretend ein mGluR dargestellt, der durch Glutamat (Glu) aktiviert wird) führt zum Austausch von GDP zu GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit (UE). Das Heterotrimer dissoziiert in $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -UEs, die ihrerseits verschiedene Effektormoleküle in der Zelle beeinflussen. Sobald die $G\alpha$ -UE das GTP zu GDP und freiem Phosphat (P_i) hydrolysiert hat, re-assoziiieren die UEs des G-Proteins und bilden wieder den inaktiven heterotrimeren $G\alpha\beta\gamma$ -Komplex, was zur Beendigung der Signaltransduktion führt. Somit wird die Zeitdauer der Signalübertragung durch das An- bzw. Ausschalten des gekoppelten G-Proteins bestimmt. Die $G\alpha$ -UE ist in blau, die $G\beta\gamma$ -UE in grün dargestellt. GDP ist mit gelben Kreisen aufgezeigt, wobei die beiden kleineren Kreise die zwei Phosphatgruppen des Moleküls darstellen. GTP ist mit roten Kreisen aufgezeigt, wobei die drei kleineren Kreise die drei Phosphatgruppen des Moleküls darstellen (Abb. und Text verändert nach Preininger und Hamm, 2004).

Das G-Protein entscheidet allerdings nicht nur über die Zeitdauer der Signalübertragung, sondern auch darüber, welcher Signaltransduktionsweg innerhalb der Zelle aktiviert wird. Die verschiedenen Subtypen der $G\alpha$ -Protein-Familien können die unterschiedlichsten Effektormoleküle aktivieren oder inhibieren (Milligan und Kostenis, 2006) (siehe Tab. 2-6). Dadurch ist die Wirkung der GPCRs auf eine Zelle äußerst vielfältig: So bewirkt die Stimulierung eines GPCR, der eine $G\alpha_s$ -UE bindet, die Aktivierung der Adenylatzyklase und somit der Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), während die Anregung eines Rezeptors, der an G_i gekoppelt vorliegt, die Inhibition dieses Enzyms und dadurch die Hemmung der Bildung von cAMP hervorruft.

G-Protein-Familie	Subtyp	Effektoren	Expression
Gα_s	G α_s	Adenylatzyklase \uparrow	Ubiquitär
	G α_{olf}	Tubulin-GTPase \uparrow	olfaktorische Neuronen, bestimmte Ganglien im ZNS, Verdauungs- und Urogenitaltrakt
G$\alpha_{i/o}$	G α_{o1}	Adenylatzyklase \downarrow	Neuronen, neuroendokrine Zellen, Astroglia, Herz
	G α_{i1-i3}	Adenylatzyklase \downarrow	Neuronen und viele andere Zelltypen
	G α_z	Ca ²⁺ -Kanäle \downarrow	Neuronen, neurosekretorische Zellen, Blutplättchen, adrenale chromaffine Zellen
G$\alpha_{q/11}$	G α_q	Phospholipase C β \uparrow	Ubiquitär
	G α_{11}	p63-RhoGEF \uparrow	Ubiquitär
G$\alpha_{12/13}$	G α_{12}	Phospholipase D \uparrow	Ubiquitär
	G α_{13}	Phospholipase C ϵ \uparrow	Ubiquitär

Tab. 2-6 Überblick über die G α -Protein-Familien: In der Tabelle sind einige Beispiele der Subtypen verschiedener G α -Protein-Familien mit ihren jeweiligen Effektoren und ihrem Expressionsmuster angegeben. \uparrow = Aktivierung; \downarrow = Hemmung; p63-RhoGEF = RhoA-spezifischer Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (verändert nach Milligan und Kostenis, 2006).

2.2.3. Klassifizierung metabotroper Glutamatrezeptoren

Zur Familie der mGluRs zählen acht verschiedene Mitglieder, die chronologisch, entsprechend ihrer Entdeckung, durchnummeriert und in 3 Gruppen eingeteilt wurden. Die Einteilung erfolgte aufgrund ihrer Sequenzhomologien, ihrer pharmakologischen Eigenschaften (wirkungsvollster Agonist) und des Signaltransduktionsweges, über den sie ihr Signal in die Zelle transduzieren (siehe Abb. 2-7) (Conn und Pin, 1997). Die selektive Erkennung der G α -UE erfolgt bei den mGluRs über eine zentrale Domäne der intrazellulären Schleife 2 (Havlickova *et al*, 2003). So interagieren Vertreter der Gruppe I (mGluR1 und 5) spezifisch mit G α_q , so dass bei deren Stimulierung mit 3,5-Dihydroxyphenylglyzin (3,5-DHPG) eine Aktivierung der Phospholipase C und somit der Produktion des sekundären Botenstoffes IP₃ führt. Dagegen koppeln Mitglieder der Gruppe II (mGluR2 und 3) und der Gruppe III (mGluR4, 6, 7 und 8) an G α_i oder G α_o . Die spezifische Anregung der Gruppe II oder III mGluRs mittels (2S, 2'R, 3'R)-2-(2'3'-Dicarboxyzyklopropyl)-Glyzin (DCG-IV) bzw. L-2-Amino-4-Phosphonobutyrat (L-AP4) bewirkt die Inhibition der Adenylatzyklase und dadurch die Hemmung der Bildung von cAMP. Weiterhin unterscheiden sich die mGluR-Gruppen auch in ihrer vorrangigen Lokalisation an der Synapse, wodurch sie unterschiedliche Aufgaben übernehmen können. Während Gruppe I mGluRs hauptsächlich postsynaptisch zu finden sind, wo sie unter anderem an der Regulation von NMDA-Rezeptoren beteiligt sind (Alagarsamy *et al*, 1999, a-c), sind Gruppe II mGluRs sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert. Dort kommen sie vor allem in perisynaptischen Bereichen vor, so dass sie vermutlich nur indirekt die Neurotransmission beeinflussen. Die Lokalisation der Gruppe III

mGluRs ist fast exklusiv auf die präsynaptische Membran beschränkt, wo sie wahrscheinlich als Autorezeptoren fungieren und rückwirkend eine Inhibition der Glutamatausschüttung bewirken (Conn und Pin, 1997). Einen Sonderfall innerhalb der Gruppe III mGluRs stellt der mGluR6, der ausschließlich in der Retina exprimiert wird, dar, da dieser Rezeptor prä- und postsynaptisch vorkommt (Nomura *et al.*, 1994). MGlur6 beeinflusst die neuronale Transmission zwischen retinalen Photorezeptoren und ON-Bipolarzellen (Nakajima *et al.*, 1993). Die Aktivierung des mGluR6 bewirkt eine Hyperpolarisierung der ON-Bipolarzellen (Nawy *et al.*, 1990; Shiells *et al.*, 1990; Nawy *et al.*, 1991).

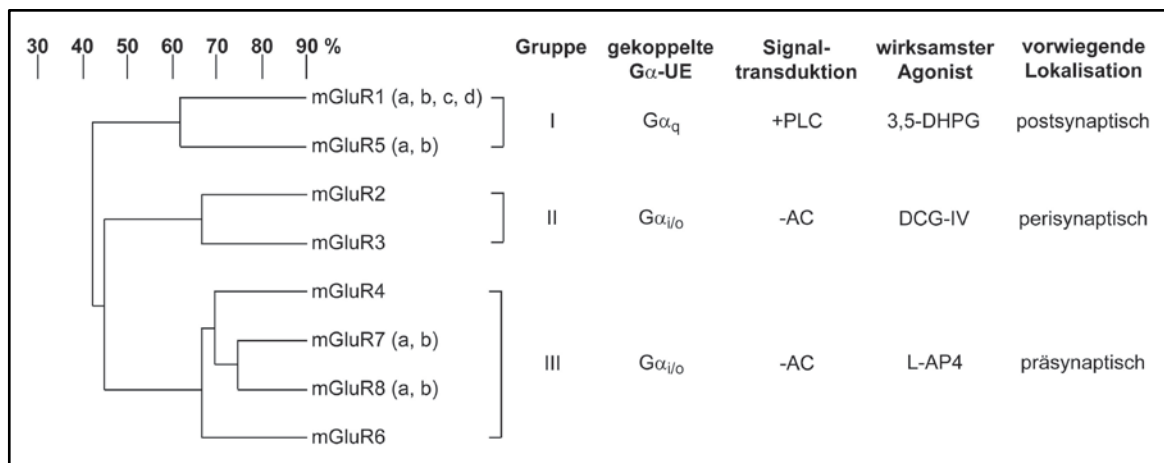


Abb. 2-7 Klassifizierung der mGluRs: Dargestellt ist ein Dendrogramm der bekannten mGluRs. Die Einteilung erfolgte entsprechend der Sequenzhomologien, der pharmakologischen Eigenschaften und des Signaltransduktionsweges, den die Rezeptoren aktivieren. Die Prozentangaben zeigen die Identitäten der Aminosäuresequenzen der Rezeptoren an. G α -UE = α -Untereinheit des G-Proteins, +PLC = Aktivierung der Phospholipase C (PLC); -PLC = Inhibition der PLC; +AC = Aktivierung der Adenylatzyklase (AC); -AC = Inhibition der AC; 3,5-DHPG = 3,5-Dihydroxyphenylglyzin; DCG-IV = (2S, 2'R, 3'R)-2-(2'3'-Dicarboxyzyklopropyl)-Glyzin; L-AP4 = L-2-Amino-4-Phosphonobutyrat (Abb. und Text verändert nach Pin und Duvoisin, 1995).

2.2.4. Funktion der Gruppe III mGluRs im ZNS

Die Entdeckung der mGluRs hat das Verständnis der glutamatergen Neurotransmission im ZNS deutlich erweitert. Diese Rezeptorfamilie reguliert verschiedene wichtige neuronale und gliale Funktionen, die von ligandengesteuerten Ionenkanälen nicht beeinflusst werden können, wie z.B. neuronale Erregbarkeit und synaptische Transmission (Conn, 2003).

Die wohl wichtigste Aufgabe der präsynaptisch lokalisierten Gruppe III mGluRs ist ihre Funktion als Autorezeptoren an glutamatergen Synapsen, wo sie rückwirkend die Glutamatausschüttung reduzieren (Cotman *et al.*, 1986; Forsythe *et al.*, 1990; Baskys *et al.*, 1991; Trombley *et al.*, 1992; Conn und Pin, 1997). Dieser negative Rückkopplungsmechanismus der synaptischen Transmission durch die Mitglieder der Gruppe III mGluRs erfolgt in verschiedenen Hirnarealen wie z.B. Hippokampus (CA1 und *Gyrus dentatus*), olfaktorischer Kortex, Amygdala, Neokortex und *Bulbus olfactorius* (Conn

und Pin, 1997). Die Inhibition der Glutamatausschüttung kann direkt durch Regulation des Exozytoseapparates oder indirekt durch die Hemmung spannungsabhängiger P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanäle erfolgen (Pin und Bockeaert, 1995; Pin und Duvoisin, 1995; Ikeda, 1996, Takahashi *et al.*, 1996). Durch Hemmung dieser Kanäle wird der Ca^{2+} -Einstrom erniedrigt, so dass die Fusion der Neurotransmitter-Vesikel mit der präsynaptischen Membran nur ineffizient erfolgt. Insbesondere der mGluR7a-Subtyp ist am Ort der Exozytose, der aktiven Zone der präsynaptischen Membran, angereichert, wo er mit spannungsabhängigen Ca^{2+} -P/Q-Kanälen kolokalisiert (Shigemoto *et al.*, 1996; Ottersen und Landsend, 1997). Aufgrund dieser beiden Eigenschaften und der relativ geringen Affinität des mGluR7a für Glutamat (Dissoziationskonstante $K_D = 1 \text{ mM}$) wird postuliert, dass mGluR7a als eine Art Tiefpassfilter fungiert: Nur bei starker Aktivität der Synapse, die zu einer hohen Glutamatausschüttung führt, hemmt mGluR7a die Neurotransmission (Shigemoto *et al.*, 1996). Die daraus resultierende Verringerung der Glutamatausschüttung bewirkt eine Reduktion der Stimulation postsynaptischer iGluRs durch die Na^+ und Ca^{2+} in die postsynaptische Zelle einströmen. Dieser inhibierende Rückkopplungsmechanismus ist äußerst wichtig, da eine übermäßige Aktivierung der iGluRs bei starker Glutamattransmission zu einer langfristig erhöhten Ca^{2+} -Konzentration im postsynaptischen Neuron führt. Dadurch werden Proteasen, Lipasen und Endonukleasen aktiviert, die eine irreversible Schädigung der Zelle oder sogar den Zelltod bewirken können. Dies könnte die neuroprotektiven Eigenschaften des mGluR7a und anderen Vertretern der Gruppe III mGluRs erklären (Pizzi *et al.*, 1996 a+b; Faden *et al.*, 1997).

Die Bedeutung der Gruppe III mGluRs wird vor allem in Maus-Modellen deutlich, bei denen je ein Subtyp deletiert wurde. So zeigen mGluR6-defiziente Mäuse eine deutliche Störung der synaptischen Transmission in der Retina, wodurch die Prozessierung der visuellen Informationen beeinträchtigt wird (Masu *et al.*, 1995). Mäuse, denen mGluR4, der prä- und postsynaptisch in hohen Mengen im Cerebellum vorkommt, fehlt, weisen eine Beeinträchtigung der zerebellären synaptischen Plastizität und der motorischen Leistungsmerkmale auf (Pekhletski *et al.*, 1996). Das Fehlen des mGluR8-Subtyps, der in hohen Konzentrationen im Vorderhirn vorliegt, führt bei den Tieren zu einem erhöhten Angst-ähnlichen Verhalten und verringertem Körpergewicht (Linden *et al.*, 2002). Die Folgen einer Deletion des mGluR7 werden im folgenden Kapitel detailliert beschrieben (siehe 2.2.5.).

2.2.5. Struktur und Funktion des mGluR7a

mGluR7a stellt den Hauptvertreter der beiden bekannten Spleißvarianten (a und b), die sich lediglich in ihrem CT unterscheiden, dar (Flor *et al.*, 1997). Analysen der Verteilung des mGluR7a-Proteins sowie der mGluR7a-RNA in Hirnschnitten adulter Ratten ergaben, dass der Rezeptor weitreichend im Gehirn verteilt ist (Kinzie *et al.*, 1995; Bradley *et al.*, 1998). Der

Rezeptor ist in hohen Konzentrationen in sensorischen Regionen wie dem piriformen Kortex, dem *Colliculus superior*, dem dorsalen *Nucleus cochlearis* und dem spinalen *Nucleus trigeminalis* zu finden. Große Mengen des mGluR7a-Proteins konnten aber auch im Hippokampus, dem *Nucleus reticularis thalami* (netzartiger Thalamuskern), dem Striatum und dem Gesichtsnerv nachgewiesen werden. Dagegen ist die Expression des mGluR7a im Neokortex, Cerebellum, Pons und der Medulla nur moderat bis gering.

Die Bedeutung des mGluR7a (und auch mGluR7b) im ZNS wird vor allem durch die mGluR7-defiziente Mauslinie deutlich: Diese Tiere zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für epileptische Anfälle, die sich wahrscheinlich durch die verstärkte Glutamatausschüttung aufgrund der fehlenden inhibierenden Wirkung des mGluR7a auf die Transmission erklären lässt (Masugi *et al.*, 1999). Eine Veränderung der Kurzzeitpotenzierung (*short-term potentiation*, STP), ein Vorgang, der wichtig für Lernprozesse ist, ist auch bei mGluR7-defizienten Mäusen zu finden und impliziert eine Beteiligung des mGluR7 bei Lernvorgängen (Bushell *et al.*, 2002).

Damit mGluR7a seine Aufgaben korrekt ausführen kann, muss gewährleistet werden, dass der Rezeptor die richtige Position in der präsynaptischen Membran einnimmt und seine Signalantwort möglichst genau kontrolliert und reguliert wird. Dies wird unter anderem durch die Interaktion mit verschiedenen intrazellulären Proteinen sichergestellt. Diese Wechselwirkungen dienen dem zielgerichteten Transport (*synaptic targeting*), der Verankerung am synaptischen Zytoskelett oder der Regulation der Sensitivität gegenüber dem Agonisten bzw. der Signaltransduktion des Rezeptors. Wie bereits erwähnt interagieren mit dem intrazellulären CT der mGluRs zahlreiche Proteine (siehe 2.2.1.). So ist auch für den mGluR7a-CT die Bindung an verschiedene Proteine, die den Rezeptor auf unterschiedliche Weise beeinflussen können, beschrieben worden (siehe Abb. 2-8) (Enz, 2007).

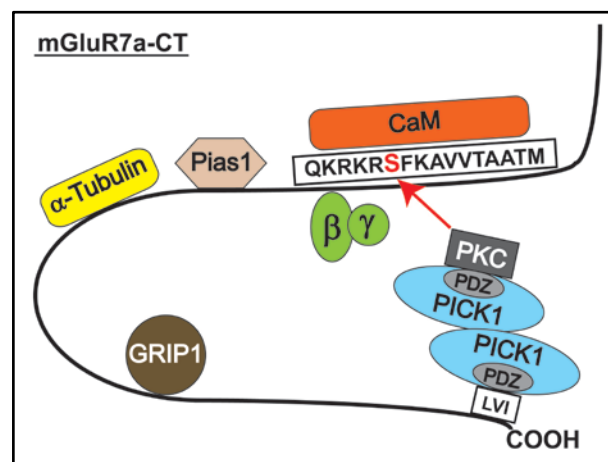


Abb. 2-8 Proteine, die mit dem mGluR7a-C-Terminus (CT) interagieren: Der mGluR7a-CT ist graphisch als schwarze Linie dargestellt. Bindungssequenzen des CT sind in den Kästen angegeben. Interagierende Proteine sind als bunte Formen in ihrer relativen Position am CT dargestellt. Die Bindungssequenz für die $\beta\gamma$ -Untereinheit und Calmodulin (CaM) überlappen. Der rote Pfeil zeigt auf die Überlappung der Bindungsstellen für CaM und $\beta\gamma$.

hervorgehobene Serinrest (Serin 862) im CaM-Bindungsmotiv kann durch die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden. PICK1 (*protein interacting with C kinase 1*) ist als Dimer dargestellt, wobei ein Monomer an den mGluR7a-CT und das andere an die PKC bindet. GRIP1 = *glutamate receptor interacting Protein 1*; Pias = *protein inhibitor of activated Stat-1* (verändert nach Enz, 2007).

Die Interaktion mit dem Zytoskelettprotein α -Tubulin findet in einer proximalen Region des mGluR7a-CT statt, die wichtig für den Transport des Rezeptors ist (Saugstad *et al.*, 2002). Interessanterweise bewirkt die Stimulierung des mGluR7a eine Schwächung der Bindung an α -Tubulin, was wiederum zu einer Veränderung der Zytoskelettarchitektur in der Präsynapse führen könnte. So wurde u.a. gezeigt, dass die Aktivierung von mGluRs zum einen eine schnelle und transiente Translokation von Tubulin aus dem Cytosol zur Plasmamembran induzieren und zum anderen die Bildung von Mikrotubuli inhibieren kann (Ciruela und McIlhinney, 2001; Huang und Hampson, 2000). Möglicherweise dient die Interaktion zwischen mGluR7a und α -Tubulin auch dazu, den Zugang zum mGluR7a-CT für andere regulatorische Proteine zu kontrollieren (Saugstad *et al.*, 2002). Weiterhin bindet das *Glutamat receptor interacting protein 1* (GRIP1), das 7 PDZ (*postsynaptic density-95/discs large/zona occludens-1*)-Domänen enthält, an den CT des Rezeptors. Da dieses Protein Dimere bilden und dadurch mit verschiedenen Proteinen gleichzeitig interagieren kann, bildet GRIP1 eine Art Plattform zur Vermittlung von Interaktion mit anderen Proteinen (Hirbec *et al.*, 2002). Die Wechselwirkung des mGluR7a-CT mit Pias1 (*protein inhibitor of activated Stat-1*), einem Mitglied der Sumoylierungskaskade könnte, wie für mGluR8 gezeigt, auch die Sumoylierung des mGluR7a vermitteln (Tang *et al.*, 2005). Die posttranslationale Modifikation von Proteinen mit SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) reguliert unter anderem den zielgerichteten Transport von Proteinen wie auch Protein-Protein-Interaktionen. Weiterhin wird der Sumoylierung eine Rolle bei der neuronalen Differenzierung und der Regulation der synaptischen Transmission zugesprochen (Scheschonka *et al.*, 2007). Im distalen Bereich des mGluR7a-CT befindet sich ein PDZ-Bindungsmotiv, an dem die Wechselwirkung mit einem weiteren PDZ-Protein PICK1 (*protein interacting with C kinase 1*) stattfindet (Dev *et al.*, 2000). PICK1 interagiert mit Proteinkinase C (PKC) und ist selbst, wie auch mGluR7a, ein Substrat dieses Enzyms (Staudinger *et al.*, 1995; Staudinger *et al.*, 1997). Da PICK1 über eine Doppelwendel (*coiled-coil*)-Domäne dimerisieren kann, verbindet es indirekt mGluR7a mit PKC, wodurch die Phosphorylierung eines spezifischen Serinrestes (Serin 862) im Rezeptor-CT gefördert wird. Die Interaktion zwischen mGluR7a und PICK1 ist essentiell für die Rezeptor-vermittelte Inhibition der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle sowie für die korrekte synaptische Aktivität des mGluR7a (Perroy *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008). Die Integrität der PDZ-Bindungsdomäne am distalen Abschnitt des mGluR7a-CT und die Phosphorylierung des Serin 862 sind entscheidend für die Stabilisierung der Expression des Rezeptors in der Membran (Suh *et al.*, 2008). Das Serin 862, das durch PKC phosphoryliert werden kann, befindet sich im Zentrum der Bindungssequenz für das Ca^{2+} -

bindende regulatorische Protein Calmodulin (CaM) (Sorensen *et al.*, 2002; El Far *et al.*, 2001, Airas *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung dieser AS verhindert die Bindung von CaM in diesem Bereich. Zusätzlich bindet in dieser Region auch die G $\beta\gamma$ -UE. Da die CaM-Interaktionsdomäne mit dem Bindungsmotiv für die G $\beta\gamma$ -UE überlappt, kompetieren die G $\beta\gamma$ -UE und CaM um den CT des mGluR7a, wodurch die Signaltransduktion des Rezeptors zusätzlich reguliert werden kann (O'Connor *et al.*, 1999; Scheschonka *et al.*, 2008): Die Ca²⁺-abhängige Bindung von CaM an den mGluR7a-CT soll die Dissoziation der am Rezeptor-CT gebundenen G $\beta\gamma$ -UE erleichtern.

2.2.6. Modell der Regulation der mGluR7a-vermittelten Signaltransduktion

Aufgrund dieser vielfältigen, sich gegenseitig beeinflussenden Interaktionen wurde folgendes Modell für die Regulation der mGluR7a-vermittelten Signaltransduktion vorgeschlagen (siehe Abb. 2-9) (El Far und Betz, 2002). Im Ruhezustand der Präsynapse (siehe Abb. 2-9, A) liegt mGluR7a an PICK1 gebunden vor, während keine Assoziation mit CaM stattfindet. Die inaktive PKC interagiert ebenfalls mit PICK1. Da PICK1 als Dimer vorliegt, entsteht eine indirekte Verknüpfung des mGluR7a und der PKC. Durch ein ankommendes Aktionspotential wird die präsynaptische Membran depolarisiert (siehe Abb. 2-9, B), so dass sich die spannungsabhängigen P/Q-Typ Ca²⁺-Kanäle öffnen, wodurch Ca²⁺-Ionen in das präsynaptische Neuron strömen. Die daraus resultierende Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration führt zur Ausschüttung von Glutamat in den synaptischen Spalt. Die hochfrequente Auslösung von Aktionspotentialen an der Präsynapse bewirkt die Freisetzung hoher Mengen an Glutamat (siehe Abb. 2-9, C), so dass schließlich die Stimulation des nieder-affinen mGluR7a erfolgt. Dadurch wird der Austausch von GDP gegen GTP an der G α_{i1} -UE induziert. Die aktive G α_{i1} -UE transduziert das Signal des Rezeptors in die Zelle durch die Inhibition der Adenylatzyklase. Durch die eingeströmten Ca²⁺-Ionen werden CaM und PKC aktiviert. Die aktive PKC bindet an die Membran und phosphoryliert das Serin 862 im CT des mGluR7a. Die Dissoziation der G $\beta\gamma$ -UE vom Rezeptor-CT wird entweder durch die Bindung von Ca²⁺/CaM an den CT oder durch Phosphorylierung des Serin 862 vermittelt (siehe Abb. 2-9, D). Die aktive G $\beta\gamma$ -UE interagiert mit dem Ca²⁺-Kanal und bewirkt dessen Schließung, so dass der Ca²⁺-Einstrom beendet wird. Eine Hemmung der Ca²⁺-Kanäle kann zusätzlich auch durch die aktive PKC erfolgen. Durch die resultierende Erniedrigung der Ca²⁺-Konzentration endet die Ausschüttung von Glutamat und somit die Stimulation des mGluR7a, so dass die Präsynapse wieder in den Ruhezustand zurückkehren kann.

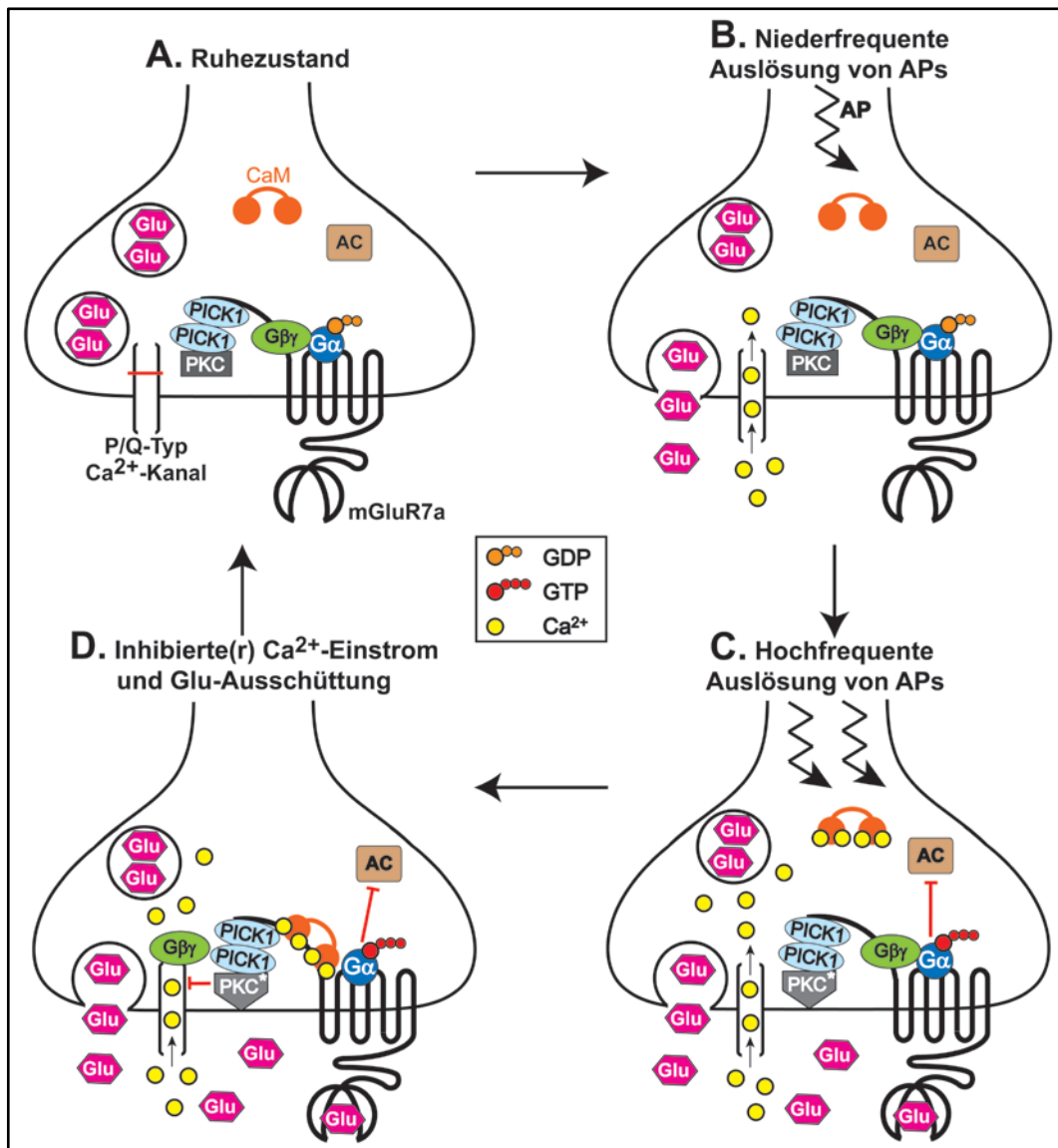


Abb. 2-9 Modell der Regulation der mGluR7a-vermittelten Signaltransduktion: A. Ruhezustand der Präsynapse: mGluR7a ist an PICK1 gebunden, während keine Assoziation mit Calmodulin (CaM) stattfindet. Die inaktive Proteinkinase C (PKC) liegt an PICK1 gebunden vor. Das inaktive $G\alpha_{i1}\beta\gamma$ -Protein ist mit dem Rezeptor assoziiert, wobei die $G\alpha_{i1}$ -UE GDP (als orange Kreise dargestellt) gebunden hat. **B. Niederfrequente Auslösung von Aktionspotentialen (APs):** Das AP depolarisiert die präsynaptische Membran, wodurch spannungsabhängige P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanäle geöffnet werden. Die resultierende Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (Ca^{2+} -Ionen sind als gelbe Kreise dargestellt) in die Präsynapse führt zur Glutamatausschüttung. **C. Hochfrequente Auslösung von Aktionspotentialen (APs):** Durch die hochfrequente Auslösung von APs werden hohe Mengen an Glu freigesetzt, wodurch mGluR7a stimuliert wird. Dies induziert den Austausch von GDP gegen GTP (als rote Kreise dargestellt) an der $G\alpha_{i1}$ -UE. Die aktive $G\alpha_{i1}$ -UE inhibiert die Adenylatzyklase (AC). Durch die eingeströmten Ca^{2+} -Ionen werden CaM und PKC aktiviert. Die aktive PKC bindet an die Membran und phosphoryliert das Serin 862 am mGluR7a-CT. **D. Inhibierte(r) Ca^{2+} -Einstrom und Glu-Ausschüttung:** Die Dissoziation der $G\beta\gamma$ -UE vom Rezeptor wird entweder durch Bindung von Ca^{2+} /CaM an den Rezeptor-CT oder durch Phosphorylierung des CT beschleunigt. Die aktive $G\beta\gamma$ -UE bindet an den Ca^{2+} -Kanal und bewirkt dessen Schließung, so dass der Ca^{2+} -Einstrom endet. Die Hemmung des Ca^{2+} -Kanals kann zusätzlich auch durch die aktive PKC erfolgen. Aufgrund der erniedrigten Ca^{2+} -Konzentration endet die Glutamatausschüttung und somit die Stimulation des mGluR7a (Abb. und Text verändert nach El Far und Betz, 2002).

2.3. *Regulators of G-protein signalling (RGS)-Proteine*

Die dynamischen und temporären Informationen, die eine Nervenzelle erhält, werden unter anderem über GPCRs in die Zelle übermittelt, die das Signal zunächst auf die intrazellulär gekoppelten G-Proteine übertragen. Die Aufgabe der G-Proteine besteht darin, diese Information mithilfe der Kinetik des Transduktionsprozesses in die entsprechende zelluläre Antwort umzuwandeln (Zerangue und Jan, 1998). Durch eine schnelle Transduktionskinetik können die Zellen genau dem Zeitverlauf des Agonisten folgen und die zeitliche Information präzise erhalten. Dagegen kann eine langsame Kinetik als Reaktion dazu nutzen, die Antworten zu filtern, zu integrieren und über einen längeren Zeitraum zu vermitteln. Aufgrund ihrer entscheidenden Funktion bei der Signalübertragung ist es wichtig, die G-Proteine genau zu regulieren. Diese Aufgabe wird unter anderem von der Proteinfamilie der RGS (*Regulators of G protein Signalling*)-Proteine übernommen. Diese Regulatoren nehmen direkten Einfluss auf die G-Proteine, indem sie durch ihre GAP (*GTPase accelerating protein*)-Aktivität die intrinsische GTPase-Aktivität der α G-UE beschleunigen (Berman und Gilman, 1998; Hollinger und Hepler, 2002). Die Hydrolyse des gebundenen GTPs kann dadurch um das hundert- bis tausendfache schneller erfolgen. Da die RGS-Proteine somit dafür sorgen, dass die α G-UE sehr schnell inaktiviert wird, können diese Regulatoren die Zeitdauer der Signaltransduktion stark verkürzen (siehe Abb. 2-10).

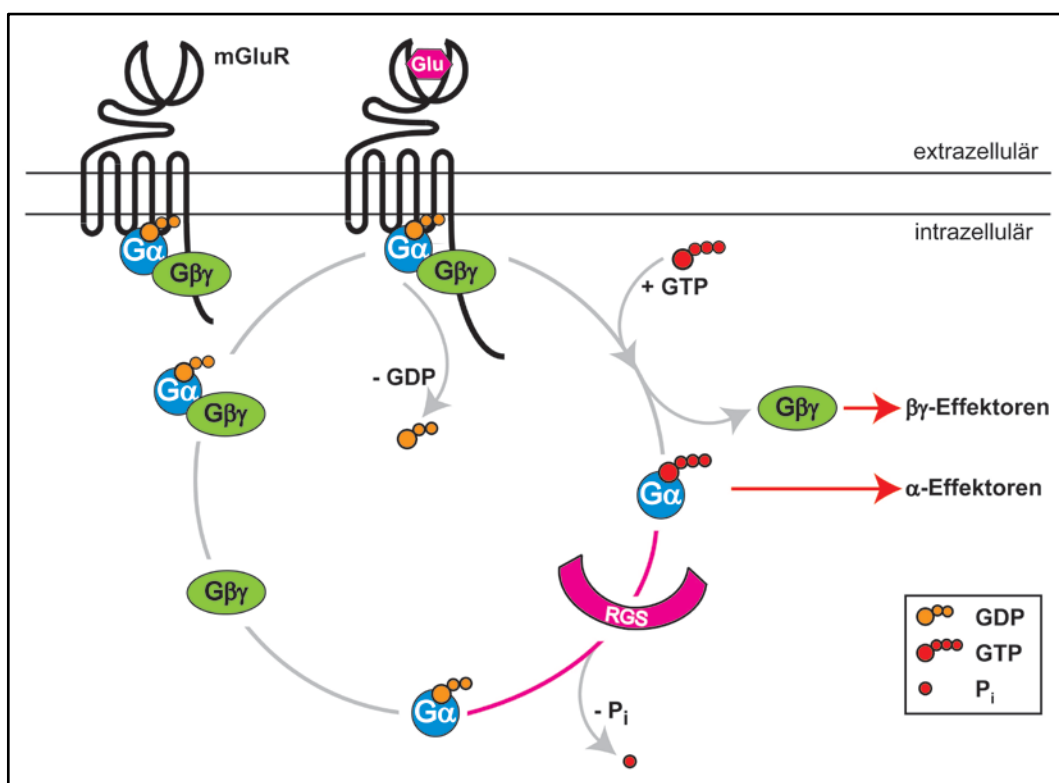


Abb. 2-10 Überblick über den G-Protein-Zyklus in Anwesenheit eines RGS-Proteins: In Abwesenheit eines Signals liegt das G-Protein in der ausgeschalteten GDP-Form als heterotrimerer $G\alpha\beta\gamma$ -Komplex vor. Aktivierung des GPCR (hier stellvertretend durch einen mGluR dargestellt, der

durch Glutamat (Glu) aktiviert wird) führt zum Austausch von GDP zu GTP an der $G\alpha$ -UE. Das Heterotrimer dissoziiert in $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -UEs, die ihrerseits verschiedene Effektormoleküle in der Zelle beeinflussen. Das RGS-Protein beschleunigt die GTP-Hydrolyse zu GDP und freiem Phosphat (P_i). Danach re-assoziiieren die UEs des G-Proteins und bilden wieder den inaktiven heterotrimeren $G\alpha\beta\gamma$ -Komplex, was die Signaltransduktion beendet. Die Zeitdauer der Signalübertragung wird durch das RGS-Protein stark verkürzt. Die $G\alpha$ -UE ist in blau, die $G\beta\gamma$ -UE in grün dargestellt. GDP ist mit gelben Kreisen aufgezeigt, wobei die beiden kleineren Kreise die zwei Phosphatgruppen des Moleküls darstellen. GTP ist mit roten Kreisen aufgezeigt, wobei die drei kleineren Kreise die drei Phosphatgruppen des Moleküls darstellen (verändert nach Preininger und Hamm, 2004).

2.3.1. Struktur der RGS-Proteine

RGS-Proteine besitzen eine aus 130 Aminosäuren bestehende RGS-Domäne, die die Bindung an die $G\alpha$ -UE und die GAP-Aktivität des Proteins vermittelt (Hollinger und Hepler, 2002). RGS-Proteine binden bevorzugt an $G\alpha$ -UEs, wenn diese sich im GTPase-Übergangszustand befindet (Zerangue und Jan, 1998). Deutlich schwächer ist die Interaktion mit $G\alpha$ -UEs in der GTP-Form. Dies weist daraufhin, dass die RGS-Proteine die GTP-Hydrolyse beschleunigen, indem sie den GTPase-Übergangszustand der αG -UE stabilisieren. Kristallstrukturanalysen von RGS4 gebunden an die $G\alpha_{i1}$ -UE, die sich im GTPase-Übergangszustand befindet, haben Aufschluss über die Struktur der RGS-Domäne sowie über die AS, die die Interaktion zwischen dem RGS-Protein und der $G\alpha$ -UE vermitteln, gegeben (siehe Abb. 2-11) (Tesmer *et al.*, 1997). Die RGS-Domäne besteht aus 9 α -helikalen Abschnitten ($\alpha 1$ - $\alpha 9$), die 2 Subdomänen bilden: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 8$ und $\alpha 9$ formen eine terminale Domäne, während $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$ ein kompaktes 4-Helix-Bündel ausbilden. Hochkonservierte AS-Reste in den Helixschleifen im unteren Bereich des 4-Helix-Bündels vermitteln die Interaktion mit den $G\alpha$ -Switch-Regionen, die wichtig für die Bindung und Hydrolyse des GTP sind (siehe 2.2.2.). Mutationen dieser AS führen zur Inhibition der Bindung des RGS-Proteins an die $G\alpha$ -Untereinheit sowie zum Verlust der GAP-Aktivität (Scheschonka *et al.*, 2000; Druey und Kehrl, 1997).

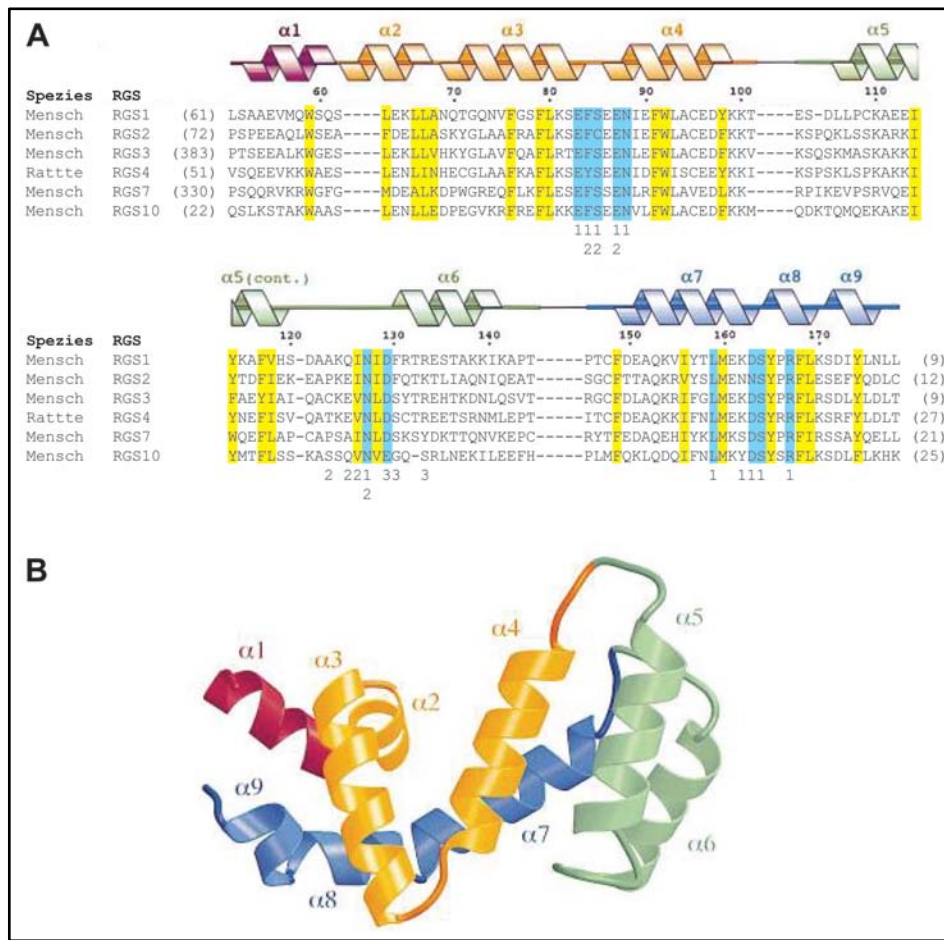


Abb. 2-11 Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur der RGS-Domäne: A: Sequenzvergleich der RGS-Domänen: Die AS-Sequenzen verschiedener RGS-Proteine wurden aufeinander abgeglichen. Angezeigt sind nur die AS-Reste, die auch in der Kristallstruktur von RGS4 beobachtet wurden. Die Zahlen über dem Sequenzabgleich geben die AS-Positionen im RGS4-Protein an. Die Sekundärstruktur von RGS4 ist schematisch dargestellt, wobei die 4 Segmente der RGS-Domäne in unterschiedlichen Farben markiert sind. Dieses Farbschema wurde auch in der Darstellung der Tertiärstruktur (siehe B) zur Wiedererkennung der Segmente verwendet. Gelb-markierte AS sind konservierte AS, die den hydrophoben Kern der RGS-Domäne bilden. Die blau hervorgehobenen AS sind konservierte AS, die direkt mit der $G\alpha_{i1}$ -UE wechselwirken. Die Zahlen unterhalb der AS-Sequenzen markieren die AS-Reste, die mit den *Switch*-Regionen der $G\alpha_{i1}$ -Untereinheit interagieren, wobei die Ziffern für die jeweilige *Switch*-Region stehen: 1 = *Switch* I, 2 = *Switch* II, 3 = *Switch* III.

B: Tertiärstruktur der RGS-Domäne von RGS4. Die RGS-Domäne besteht aus 9 α -helikalen Abschnitten ($\alpha 1$ - $\alpha 9$), die 2 Subdomänen bilden: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 8$ und $\alpha 9$ formen eine terminale Domäne (linke Seite), während $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$ ein kompaktes 4-Helix-Bündel ausbilden (rechte Seite). Hochkonservierte Aminosäurereste in den Helixschleifen im unteren Bereich der Struktur des 4-Helix-Bündels vermitteln die Interaktion mit den $G\alpha$ -*Switch*-Regionen (Tesmer *et al.*, 1997).

2.3.2. Klassifizierung der RGS-Proteine

Bis heute wurden mehr als 30 verschiedene RGS-Proteine beschrieben, die alle eine konservierte RGS-Domäne besitzen und die entsprechend der Sequenzhomologie der RGS-Domäne in 6 Unterfamilien eingeteilt werden (siehe Abb. 2-12) (Zheng *et al.*, 1999; Ross und Wilkie, 2000; Hollinger und Hepler 2002). Innerhalb einer Subfamilie sind durch diese Einteilung Proteine zusammengefasst, die ähnliche Strukturmerkmale und Funktionen

besitzen. Mitglieder der Subfamilien A und B sind relativ einfach aufgebaut, während die Vertreter der Subfamilien C, D, E und F verschiedene zusätzliche funktionelle Domänen besitzen. So verfügen die Mitglieder der Familie C über zwei Abschnitte, die Interaktion mit anderen Proteinen fördern können: Eine GGL (G-Protein γ -Untereinheit-ähnliche)-Domäne, die die Interaktion mit der G-Protein-UE $\beta 5$ (G $\beta 5$ -UE) vermittelt, und eine DEP (*Dishevelled/Egl10/Pleckstrin*)-Domäne, die als Bindungsplattform für verschiedene andere Proteine dient. RGS12 und RGS14, die der Familie D angehören, haben eine zweite α -Bindungsregion (GoLoco). Die beiden RGS-Proteine Axin und Conductin (Familie E) besitzen neben einer Bindungsdomäne für die Glykogensynthase-Kinase 3β eine weitere für β -Catenin und können außerdem aufgrund einer DIX-Domäne dimerisieren. Ein Vertreter der Familie F verfügt sogar über eine katalytische Serin/Threonin-Kinasedomäne. Diese Beispiele zeigen, dass die Funktion RGS-Proteine nicht allein auf deren GAP-Aktivität beschränkt ist. In dieser Arbeit wurden die zwei einfach aufgebauten RGS-Proteine 3 und 4 als potentielle Kandidaten, die eine Regulation der Gruppe III mGluRs bewirken könnten, ausgewählt und untersucht.

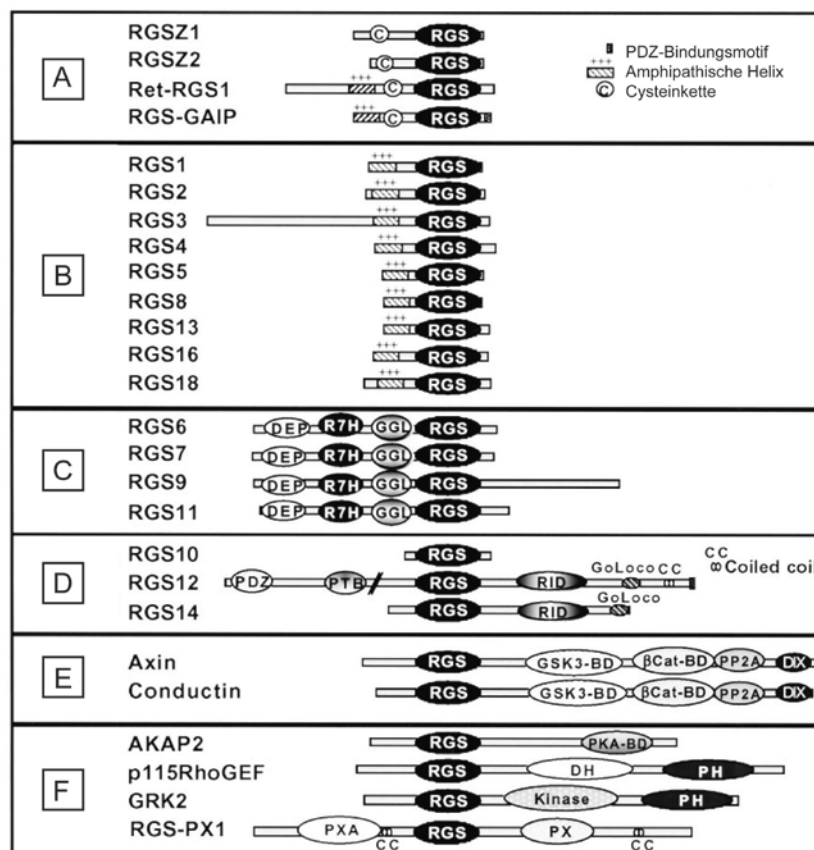


Abb. 2-12 Struktur und Klassifikation der RGS-Proteine: Die Einteilung der RGS-Proteine erfolgt entsprechend der Sequenzhomologie der RGS-Domäne. Der N-Terminus der schematisch dargestellten Proteine befindet sich auf der linken und der C-Terminus auf der rechten Seite. DEP = *Dishevelled/Egl10/Pleckstrin*; R7H = RGS7 Homologiedomäne; GGL = G-Protein γ -Untereinheit-ähnliche Domäne; GSK 3β -BD = Bindungsdomäne für *Glykogen-Synthase-Kinase 3 β* ; β Cat-BD = Bindungsdomäne für β -Catenin; PP2A = *Protein-Phosphatase 2A*-Homologiedomäne; DIX =

Dimerisierungsdomäne; PH = Pleckstrin-Homologiedomäne; PX = Phox-Homologiedomäne; PXA = Phox-assoziierte Domäne; DH = dbl (*diffuses B-Zell Lymphom*)-Homologiedomäne; Kinase = katalytische Serin/Threonin-Kinasedomäne; GoLoco = Sequenzmotiv für die Bindung an die inaktive α -GDP-Untereinheit (verändert nach Hollinger und Hepler, 2002).

2.3.3. Regulation der RGS-Proteine

Die GAP-Aktivität verschiedener RGS-Proteine kann durch die sich gegenseitig ausschließende Bindung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) und CaM an die RGS-Domäne reguliert werden (Popov *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 2005; Abramow-Newerly *et al.*, 2006). Die Wechselwirkung von PIP₃ mit der RGS-Domäne bewirkt eine Inhibition der GAP-Aktivität. Für diese Interaktion sind vor allem zwei positiv geladene Aminosäurereste (Lysin 99 und 100), die sich innerhalb der α 4-Helix der RGS-Domäne befinden und die zwischen bestimmten RGS-Proteinen konserviert sind (siehe Abb. 2-11), von Bedeutung. Diese beiden Lysinreste sind auch ausschlaggebend für die Wechselwirkung der RGS-Proteine mit der α -UE, da Mutationen dieser beiden Lysinreste die Bindung an die α -UE verhindern. Zusätzlich liegen diese AS im CaM-Bindungsmotiv, das sich ebenfalls in der RGS-Domäne befindet. Die Interaktion von Ca²⁺/CaM mit der RGS-Domäne an sich beeinflusst die GAP-Aktivität des Proteins nicht. Jedoch konkurriert Ca²⁺/CaM mit PIP₃ um die Bindung an die RGS-Domäne und durch die Wechselwirkung von Ca²⁺/CaM mit dem RGS-Protein wird die inhibierende Wirkung des PIP₃ aufgehoben.

Die sich gegenseitig ausschließende Bindung von Ca²⁺/CaM und PIP₃ impliziert einen eleganten Mechanismus für eine Ca²⁺-abhängige Rückkopplungsregulation der GPCR-Signaltransduktion *in vivo*: In Abwesenheit von Ca²⁺ im Ruhezustand der Synapse inhibiert PIP₃ die GAP-Aktivität des RGS-Proteins. Ein ankommendes Aktionspotential führt zur Depolarisation der Membran und dadurch zum Einstrom von Ca²⁺ durch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle. Die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt zur Bindung von Ca²⁺/CaM an die RGS-Domäne und zur Verdrängung des inhibierenden PIP₃, so dass das RGS-Protein nun seine GAP-Aktivität ausüben kann. Ein solcher Mechanismus wäre für RGS-Proteine an der präsynaptischen Membran von hoher Bedeutung, da dort die Ca²⁺-Konzentration aktivitätsabhängig ansteigt.

2.3.4. Spezifität der RGS-Proteine für α -Untereinheiten und GPCRs

In *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass einzelne RGS-Proteine bevorzugt mit bestimmten Vertretern der α -Familie interagieren (siehe Tab. 2-13) (Zerangue und Jan, 1998). Die meisten RGS-Proteine binden α_i - und α_o -Proteine; nur RGS2 zeigt keine Wechselwirkung mit diesen beiden Familien. α_q -Proteine werden dagegen nur von RGS2, 4 und 14 gebunden. Ret-RGS1, das in der Retina exprimiert wird, beschleunigt die GTP-

Hydrolyse des G-Proteins Transduzin ($G\alpha_t$). Keines der untersuchten RGS-Proteine zeigte eine Interaktion mit $G\alpha_s$. Weiterhin konnte für verschiedene RGS-Proteine eine spezifische und selektive Bindung an bestimmte GPCRs nachgewiesen werden (siehe Tab. 2-13) (Neitzel und Hepler, 2006). Dies lässt die Hypothese zu, dass ein GPCR selektiv ein RGS-Proteine rekrutieren kann, welches das gekoppelte G-Protein und somit die Signaltransduktion des Rezeptors reguliert. Es ist vorstellbar, dass ein GPCR zusammen mit *seinem* RGS-Protein und eventuell weiteren nachgeschalteten Proteinen einen membranständigen Komplex bildet, wodurch eine schnelle und feinregulierte Signaltransduktion gewährleistet werden könnte.

RGS-Protein	$G\alpha$ -Spezifität	GPCR-Spezifität	Expression
RET-RGS1	$G\alpha_t, G\alpha_{o1}$	mGluR6	Retina
RGS1	$G\alpha_i, G\alpha_q$	S1P (1), S1P (2), S1P (3)	ND
RGS2	$G\alpha_q \gg G\alpha_i, G\alpha_t$	CCK2R, α_1 -AR, β_2 -AR, AT1A Angiotensin II, S1P (2)	Gehirn
RGS3	$G\alpha_i, G\alpha_q$	M3 mAChR, S1P (1), S1P (2), S1P (3), Endothelin-1	Ubiquitär
RGS4	$G\alpha_i, G\alpha_q \gg G\alpha_t$	μ Opioid, mAChR, M2 mAChR, S1P (3), Endothelin-1, 5-HT1A, α_1 -AR, α_2 -AR, mGluR1, mGluR5	Gehirn
RGS5	ND	AT1A Angiotensin II	Gehirn
RGS6	ND	ND	Gehirn
RGS7	$G\alpha_i$	ND	Gehirn, Lunge
RGS8	$G\alpha_i, G\alpha_q, G\alpha_o$	M1 mAChR	Gehirn
RGS9	$G\alpha_t$	μ -Opioid, D ₂ -Dopamin	Retina, Gehirn
RGS10	$G\alpha_i \gg G\alpha_q$	5-HT1A	Gehirn
RGS11	ND	ND	ND
RGS12	$G\alpha_i$	ND	Gehirn, Lunge
RGS14	$G\alpha_i, G\alpha_q$	μ -Opioid	Gehirn, Lunge, Milz

Tab. 2-13 Überblick über die G - und GPCR-Spezifität verschiedener RGS-Proteine: Zusammenfassung verschiedener RGS-Proteine, deren Expression und/oder spezifische Interaktion mit $G\alpha$ -UE und/oder GPCRs untersucht wurde. ND = nicht definiert (Gold *et al.*, 1997; Zerangue und Jan, 1998; Saugstad *et al.*, 1998; Grafstein-Dunn *et al.*, 2001; Dhingra *et al.*, 2004; Neitzel und Hepler, 2006; Soundararajan *et al.*, 2008).

2.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Da Gruppe III mGluRs eine zentrale Rolle bei der synaptischen Transmission im ZNS haben, ist es wichtig, dass die Signaltransduktion dieser Rezeptoren möglichst genau kontrolliert und reguliert wird. Potentielle Regulatoren der Signalübertragung könnten, wie auch schon für andere GPCRs gezeigt, Vertreter der RGS-Proteinfamilie sein. Für verschiedene GPCRs wurde bereits eine spezifische und selektive Interaktion sowie

Regulation durch bestimmte RGS-Proteine gezeigt (Neitzel und Hepler, 2006). Jedoch gibt es in dieser Hinsicht noch keine Untersuchungen an den Gruppe III mGluRs, außer am in der Retina exprimierten mGluR6 (Dhingra *et al.*, 2004). Deshalb sollte in dieser Dissertation untersucht werden, ob Gruppe III mGluRs, mit besonderem Augenmerk auf mGluR7a, durch ein oder auch mehrere Mitglieder der RGS-Familie reguliert werden können. Als potentielle Kandidaten, die die Gruppe III mGluR-vermittelte Signaltransduktion beeinflussen könnten, wurden RGS3 und RGS4 ausgewählt. Diese Auswahl erfolgte anhand der bereits vorhandenen Daten über deren selektive und spezifische Wechselwirkungen mit anderen GPCRs und der bekannten Expression beider Proteine im Gehirn (siehe Tab. 2-13). RGS3 erschien als besonders interessanter Kandidat, da für dieses Protein neben der Regulation verschiedener GPCRs auch die Ca^{2+} -abhängige Beendigung der G-Protein-Signalübermittlung in sensorischen Neuronen gezeigt wurde (Tosseti *et al.*, 2003). RGS3 wird im Gehirn im stark im Thalamus und *Locus coeruleus* exprimiert, während die Expression im Hypothalamus und piriformen Kortex, wo auch mGluR7a vorkommt, nur moderat bis schwach ist (Gold *et al.*, 1997; Bradley *et al.*, 1998). RGS4 wurde als zweiter potentieller Regulator ausgewählt, da das RGS4-Protein unter anderem Gruppe I mGluRs (mGluR1 und 5) reguliert (Saugstad, 1998). Ein weiterer ausschlaggebender Punkt bei der Auswahl von RGS4 war, dass es in hohen Konzentrationen im Kortex und piriformen Kortex und in geringen Mengen auch im Hippokampus zu finden ist, wo auch mGluR7a lokalisiert ist (Gold *et al.*, 1997; Bradley *et al.*, 1998).

Zur Klärung der Frage, ob RGS3 und/oder RGS4 Gruppe III mGluRs bzw. mGluR7a regulieren, wurden folgende 3 Ansatzpunkte gewählt:

1. Nachweis einer Interaktion zwischen Rezeptor und potentiellm Regulator.
2. Nachweis eines physiologischen Effektes des potentiellen Regulators auf die Rezeptor-vermittelte Signalübertragung *in vitro* und *in vivo*.
3. Nachweis der *in vivo*-Kokalisation von Rezeptor und potentiellm Regulator an der präsynaptischen Membran.

Die Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 wurde mittels biochemischer Kopräzipitationsexperimente analysiert. Zur Untersuchung des physiologischen Effektes der beiden RGS-Proteine auf die mGluR7a-vermittelte Signaltransduktion *in vitro* wurden Säugerzellen entweder nur mit dem Rezeptor oder dem Rezeptor zusammen mit einem RGS-Protein transfiziert. Anschließend wurde die Signalantwort dieser Zellen gemessen und miteinander verglichen. Um nachzuweisen, dass die potentiellen Regulatoren *in vivo* am gleichen Ort wie mGluR7a, d.h. an der präsynaptischen Membran, zu finden sind, wurden kortikale Maushirnschnitte mittels hochauflösender Elektronenmikroskopie untersucht. Hierzu wurden sowohl für das RGS3- als auch das RGS4-Protein spezifische polyklonale Antikörper hergestellt. Der *in vivo*-Nachweis des regulatorischen Effektes von RGS4 auf die

Signaltransduktion der Gruppe III mGluRs bzw. des mGluR7a erfolgte durch Vergleich der Signalantwort dieser Rezeptoren in kultivierten kortikalen Neuronen aus Wildtyp- und RGS4-defizienten Mäusen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine Regulation der Gruppe III mGluRs durch RGS3 und 4 *in vivo* erfolgen kann, wodurch eine präzise Kontrolle der Signaltransduktion dieser Rezeptoren möglich wird.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien und Plastikmaterialien

Chemikalien wurden von den Firmen Ascent Scientific (North Somerset, UK), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Biomol (Ilvesheim), Biorad (München), Biotrend (Köln), Calbiochem Merck Biosciences (Schwalbach), Chembridge (Basel), Clontech (Heidelberg), GE Healthcare Biosciences (Freiburg), GIBCO-BRL (Bethesda Research Laboratories, Karlsruhe), DifcoLaboratories (Detroit, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Applichem (Darmstadt), Cambrex (Rockland, USA), Riedel-deHaen (Seelze), Roche (Mannheim) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p. a. (zur Analyse).

Alle Plastikmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Falcon (Le Pont De Claix, Frankreich), Perbio Sciences (Bonn), Roth (Karlsruhe), Greiner (Darmstadt) und Eppendorf (Hamburg).

3.1.2. Enzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammten von Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt), T4-DNA-Ligase, T4-Polynukleotidkinase, T4-DNA-Polymerase, Proteinase K und Glutamat-Pyruvat-Transaminase von Roche (Mannheim), Taq-Polymerase und Desoxyribonukleotide von Invitrogen (Karlsruhe).

3.1.3. Kits

Name	Beschreibung	Firma
QIAfilter-Maxi-Kit	DNA-Präparation	QIAGEN (Hilden)
QIAfilter-Midi-Kit	DNA-Präparation	QIAGEN (Hilden)
QIAquick-Mini-Kit	DNA-Präparation	QIAGEN (Hilden)
QIAGEN-PCR-Purification-Kit	Aufreinigung von DNA-Produkten aus PCR-Reaktionen	QIAGEN (Hilden)
QIAGEN-Gelextraction Kit	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	QIAGEN (Hilden)
cAMP Biotrak Enzymimmunoassays (EIA) System	Bestimmung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen	GE Healthcare (Freiburg)
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Generierung mutierter DNA-Fragmente	Stratagene (La Jolla, USA)
Vectastain ABC Kit	Immunperoxidase-reaktion	Vectorlabs (Burlingame, USA)

3.1.4. Membranen und Filme

Für Western Blots wurden Nitrozellulosemembranen mit einer Porengröße von 0.45 µm der Firma Schleicher und Schuell GmbH (Dassel) verwendet. Autoradiographien wurden mittels BIOMAX MR (Kodak, Cedex, Frankreich) oder Hyperfilm™ MP (GE Healthcare Limited, Little Calfont, UK) erstellt.

3.1.5. DNA-Größenstandard

Als DNA-Größenstandard wurde der *SmartLadder*-Marker (Eurogentec, Köln) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Dieser Marker enthält folgende DNA-Fragmente: 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.8, 0.6, 0.4 und 0.2 kbp.

3.1.6. Protein-Größenstandard

Als Protein-Größenstandard wurde der *SeeBlue2*-Marker von Invitrogen (Carlsbad, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dieser Marker enthält folgende Proteine:

Protein	Molekulargewicht (kDa)
Myosin	250
Phosphorylase	148
BSA	98
Glutamatdehydrogenase	64
Alkoholdehydrogenase	50
Kohlenoxidanhydrase	36
Myoglobin	22
Lysozym	16
Aprotinin	6
Insulin (B-Kette)	4

3.1.7. Organismen

3.1.7.1. Mäuse und Ratten

Die in dieser Arbeit verwendete RGS4-defiziente ($RGS4^{lacZ/lacZ}$) Mauslinie wurde von Grillet *et al.* (2005) unter Verwendung von E14-1 embryonalen Stammzellen (129/OLA) hergestellt. Es wurden zwei heterozygote Weibchen zur Verfügung gestellt (Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Lluis Fajas, Unité 540, Montpellier, Frankreich). Diese Tiere wurden zur Verwendung für die vorliegende Arbeit über 5 Generationen auf einen C57BL/6J Hintergrund rückgekreuzt wurden.

Für die Präparation von Rattengehirnen und Primärneuronen wurden Wistar Ratten verwendet.

3.1.7.2. Zelllinien und Primärzellen

Name	Spenderorganismus	Herkunft
HEK-CHA (Humane embryonale Nierenzellen, stabil transfiziert mit GIRK1/2 und M2 muskarinischem Azetylcholinrezeptor)	Mensch	Lilly Jan (University of San Francisco, CA)
HEK-T (Humane embryonale Nierenzellen, exprimieren das SV40 large T-Antigen)	Mensch	ATCC, Manassas, USA, #CRL-1573
Hippokampale und kortikale Ratten-Primärneuronen	Wistar Ratten Embryonen (E18)	Tierzucht am MPI für Hirnforschung
Hippokampale und kortikale Maus-Primärneuronen	RGS4-defiziente (RGS4 ^{lacZ/lacZ}) Maus Embryonen (E18)	Grillet <i>et al.</i> , 2005 + Tierzucht am MPI für Hirnforschung

3.1.7.3. Bakterien

Name	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	supE44 hsdR17 recA1 gyrA46 thi relA1 lac F' [proAB+ lacIq lacZ DM15 Tn10(tetr)]	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLys	B F ⁻ dcm ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal λ(DE3) [pLysS Cam ^r]	Stratagene, La Jolla, USA

3.1.8. Vektoren

Name	Herkunft/Referenz
pBK-CMV	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
pcDNA3.1 (+)	Invitrogen (Karlsruhe)
pEGFP-C3	Clontech (Heidelberg)
pET-28a (+)	Novagen Merck Biosciences (Schwalbach)
pGEX-4T-1	GE Healthcare Biosciences (Freiburg)
pGEX-5x-1	GE Healthcare Biosciences (Freiburg)
pGEX-RB	Optimierter pGEX-Vektor (GE Healthcare) von Dr. Ingo Paarmann zur Verfügung gestellt
pPUR	Clontech (Heidelberg)
pQE-30	QIAGEN (Hilden)
pQE-32	QIAGEN (Hilden)
pPUR	Clontech (Heidelberg)

3.1.9. Plasmidkonstrukte

Name	Herkunft/Referenz
pBK-Flag-mGluR7a	Airas, José (Dissertation, 2001)
pBK-Flag-mGluR7a-S862E	Airas, José (Dissertation, 2001)
pcDNA3.1-RGS2	UMR cDNA Resource Center (USA)
pcDNA3.1-RGS3	UMR cDNA Resource Center (USA)
pcDNA3.1-RGS4	UMR cDNA Resource Center (USA)
pcDNA3.1-RGS7	UMR cDNA Resource Center (USA)
pcDNA3.1-RGS8	UMR cDNA Resource Center (USA)
pcDNA3.1-RGS10	UMR cDNA Resource Center (USA)
pcDNA3.1-G α_{i1}	UMR cDNA Resource Center (USA)
pcDNA3.1-G α_{i1} -C351I	UMR cDNA Resource Center (USA)
pcDNA-3.1 (+)-3xmyc-G α_{i1}	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pcDNA-3.1 (+)-3xmyc-G α_{i1} -G183S	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pcDNA-3.1 (+)-3xmyc-RGS3	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pcDNA-3.1 (+)-3xmyc-RGS4	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pcDNA-3.1 (+)-3xmyc-RGS7	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pEGFP-C3-Calmodulin	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pEGFP-C3-RGS2	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pEGFP-C3-RGS3	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pEGFP-C3-RGS4	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pEGFP-C3-RGS7	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pEGFP-C3-RGS8	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pEGFP-C3-RGS10	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pEGFP-C3-RGS3-E419A/N420A	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pEGFP-C3-RGS3-R499A/F500A	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pEGFP-C3-RGS3-N88S	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pEGFP-C3-RGS3-S164Q	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pGEX-4T-1-mGluR7a-iLoop2	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pGEX-4T-1-mGluR7a-iLoop2	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pGEX-4T-1-RGS3-CT	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pGEX-RB-RGS3-NT	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pQE-30-RGS3-NT	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pQE-30-RGS4	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pQE-32-RGS3-CT	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pGEX-4T-1-RGS4	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pGEX-5x-1-RGS3	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pGEX-5x-1-mGluR7a-CT	Klonierung erfolgte in dieser Doktorarbeit
pRK-Gq _o CI	Drs. J.-P. Pin und H. Conklin (University of San Fransisco, CA, USA) (Bourne <i>et al.</i> , 1993)
pRK-Gq _z IC	Drs. J.-P. Pin und H. Conklin (University of San Fransisco, CA, USA) (Bourne <i>et al.</i> , 1993)

3.1.10. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen. Sie dienen als Primer für PCR-Reaktionen, Genotypisierungen oder Mutagenese.

3.1.10.1. Oligonukleotide zur Generierung der EGFP-markierten RGS-Konstrukte

Name	Sequenz (5'-3')	Konstrukt
RGS2-FW	CATCTCGAGATGCAAAGTGCTATGTTCTT	pEGFP-C3-RGS2
RGS2-REV	CGCGGATCCTCATGTAGCATGAGGC	
RGS3-se	ATTATACTCGAGTTTGAGACGGAGGCAGATGAG	pEGFP-C3-RGS3
RGS3-as	ATTATAGGTACCCTAAAGCGGGGGACTCAT	
RGS4-se	AATTATGAGCTCTGCAAAGGGCTTGCAGGT	pEGFP-C3-RGS4
RGS4-as	ATATTAGGATCCTTAGGCACACTGAGGGAC	
RGS7-FW	CATCTCGAGATGGCCCAGGGGAATAAT	pEGFP-C3-RGS7
RGS7-REV	CGCGGATCCTTAGTAAGACTGAGCAA	
RGS8-FW	CATCTCGAGATGGCGGCCTTACTGATG	pEGFP-C3-RGS8
RGS8-REV	CGCGGATCCCTAACTGAGCCTCCTCTG	
RGS10-FW	CATCTCGAGATGGAACACATCCAC	pEGFP-C3-RGS10
RGS10-REV	CGCGGATCCTCATGTGTTATAAAT	

3.1.10.2. Oligonukleotide zur Generierung der GST-markierten intrazellulären mGluR7a-Loops

Name	Sequenz (5'-3')	Konstrukt
iL2-se	GCGGAATTCAAGACCAATCGGATTTAT	pGEX-4T-1-mGluR7a-iLoop2
iL2-as	CATCTCGAGTTGTGACGTTGGGCTTAT	
iL3-se	CAT GAATTCAAGACTCGGGGCGTA	pGEX-4T-1-mGluR7a-iLoop2
iL3-as	GCGCTCGAGCTTGGCTTCATTAAT	

3.1.10.3. Oligonukleotide zur Generierung der myc-markierten $G\alpha_{i1}$ -Konstrukte

Name	Sequenz (5'-3')	Konstrukte
myc-FW	CGCGCTAGCATGGAACAAAAGTTG	pcDNA3.1-3xmyc- $G\alpha_{i1}$ -wt
myc-REV	CGCAAGCTTGTTC AAGTCTTC	pcDNA3.1-3xmyc- $G\alpha_{i1}$ -G183S

3.1.10.4. Oligonukleotide zur Generierung der GST- und His₆-markierten RGS3-Fragmente

Name	Sequenz (5'-3')	Konstrukte
RGS3-CT-FW	CATGAATTCATGCACCACCTTTCCCTC	pGEX-4T-1-RGS3-CT
RGS3-CT-REV	CATCTCGAGCTAAAGCGGGGGACTCAT	
RGS3-Nco-FW	CATCCATGGAGTTTGAGACGGAG	pGEX-RB-RGS3-NT
RGS3-Hind-REV	CATAAGCTTGGAGCCACCATT	

3.1.10.5. Oligonukleotide zur Mutagenese von RGS3, RGS4 und G α_{i1}

Name	Sequenz (5'-3')	Konstrukte
RGS3-EN-se	CGCACTGAGTTCAGTGAGGCGGCTCTGGA GTTCTGGTTGGC	pEGFP-C3-RGS3- E419A/N420A
RGS3-EN-as	GCCAACCAGAACTCCAGAGCCGCCTCACT GAACTCAGTGCG	
RGS3-RF-se	GAAAAGGACTCGTACCCTGCCGCTCTCCGT TCTGACCTCTAC	pEGFP-C3-RGS3- R499A/F500A
RGS3-RF-as	GTAGAGGTCAGAACGGAGAGCGGCAGGGT ACGAGTCCTTTTC	
RGS4-N88S-se	GTCTGAATATAGTGAGGAGTCTATTGACTT CTGGATCAGCTG	pEGFP-C3-RGS4- N88S
RGS4-N88S-as	CAGCTGATCCAGAAGTCAATAGACTCCTCA CTATATTCAGAC	
RGS4-S164Q-se	CAACCTGATGGAGAAGGATCAGTACCGCC GCTTCCTCAAGTC	pEGFP-C3-RGS4- S164Q
RGS4-S164Q-as	GACTTGAGGAAGCGGCGGTACTGATCCTTC TCCATCAGGTTG	
G α_{i1} -G183S-se	CTCAGAACTAGAGTGAAAACCTACATCAATT GTTGAAACCC	pcDNA3.1-G α_{i1} - G183S
G α_{i1} -G183S-as	GGGTTTCAACAATTGATGTAGTTTTCACTCT AGTTCTGAG	

3.1.10.6. Oligonukleotide zur Genotypisierung der RGS4-Mäuse

Name	Sequenz (5'-3')
SensInt2	GGTGAGGGTACACAATTGTAG
AntiLacZ	GGCGCATCGTAACCGTGAT
SensEx4	CAACGAGTTCATCTCAGTGCCA
AntiEx5	TGGGCTGTAACATGTTCCGG

3.1.11. Antikörper

3.1.11.1. Primäre Antikörper für Western Blot (WB), Immunzytochemie (ICC) und Elektronenmikroskopie (EM)

Antigen	Spezies	Verdünnung			Quelle/Referenz
		WB	ICC	EM	
Flag	Maus	1:1000	1:500		SIGMA (München)
GFP	Maus	1:1000			BD Biosciences (Heidelberg)
GFP	Kaninchen	1:500			Clontech (Heidelberg)
His₆	Maus	1:1000			Novagen
mGluR4	Kaninchen	1:1000			Chemicon Millipore (Schwalbach)
mGluR7	Kaninchen	1:2500	1:500	1:400/1:800	Upstate Millipore (Schwalbach)
myc-9E10	Maus	1:1000			Evan <i>et al.</i> , 1985
RGS3	Kaninchen	1:1000	1.400	1:400/1:800	Generierung erfolgte in dieser Arbeit
RGS4	Kaninchen	1:1000	1.400	1:400/1:800	
RGS4	Hühnchen	1:500		1:400	Acris (Hiddenhausen)
RGS4	Kaninchen				Abcam (Cambridge, UK)
Synapsin	Maus		1:100 0		Synaptic Systems (Göttingen)
VGLUT1	Meerschwein		1:100 0		Chemicon International (Temecula, USA)
GST	Ziege	1:10 000			GE Healthcare (Freiburg)

3.1.11.2. Sekundäre fluoreszenzgekoppelte Antikörper für die Immunzytochemie

Name	Verdünnung	Quelle/Referenz
Alexa 488-anti-Kaninchen	1:500	Molecular Probes (Eugene, USA)
Alexa 546-anti-Maus	1:500	Molecular Probes (Eugene, USA)
Alexa 546-anti-Meerschwein	1:500	Molecular Probes (Eugene, USA)

3.1.11.3. Sekundäre Peroxidase-gekoppelte Antikörper für Western Blot

Name	Verdünnung	Quelle/Referenz
HRP-anti-Maus	1:7500	Promega (Madison, USA)
HRP-anti-Kaninchen	1:7500	Promega (Madison, USA)

3.1.11.4. Sekundäre biotinylierte Antikörper für die Elektronenmikroskopie

Name	Verdünnung	Quelle/Referenz
Biotin-anti-Kaninchen	1:100	Vector Laboratories, Camon (Wiesbaden)
Biotin-anti-Hühnchen	1:100	Vector Laboratories, Camon (Wiesbaden)

3.1.12. Lösungen und Medien

3.1.12.1. Zellbiologische Lösungen und Medien

Name	Zusammensetzung
BES, 2x	50 mM N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-Amino-Ethansulfonsäure (BES), 280 mM NaCl, 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 6.95
Einfriermedium	10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) in Kulturmedium
Kulturmedium (HEK-T)	10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS), 50 Einheiten/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin in Minimum Essential Medium (MEM) (Invitrogen, Karlsruhe)
Kulturmedium (HEK, COS, K11, CHA)	10% (v/v) FCS, 50 Einheiten/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin in Dulbecco´s Modified Eagle Medium (MEM) (Invitrogen, Karlsruhe)
Neurobasalmedium zur Kultivierung von Neuronen	2% (v/v) BL-27 25 µg/ml Natriumpyruvat, 50 Einheiten/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin in Neurobasalmedium (Invitrogen, Karlsruhe)
Kulturmedium zur Präparation von Neuronen	10% (v/v) FCS, 50 Einheiten/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 2 mM/L-Glutamin, 25 µg/ml Natriumpyruvat in Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, Karlsruhe)
Verdaulösung zur Präparation von Neuronen	10 µg/ml DNase, 0.5 mg/ml Papain, 10 mM Glucose in PBS, pH 7.5
Transfektionsmedium für Neuronen (T ₀)	33 mM Glucose in Neurobasalmedium

3.1.12.2. Molekularbiologische Lösungen

Name	Zusammensetzung
DNA-Probenpuffer, 10x	30% (v/v) Glyzerin, 0.25% (w/v) Bromphenolblau in TE-Puffer, pH 8.0
LB-Medium	1% (w/v) Pepton 140, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, pH 7.4
LB-Agar	LB Medium mit 1.5% (w/v) Agar
Gitschierpuffer, 10x	166 mM Ammoniumsulfat, 67 mM MgCl ₂ , 50 mM β-Mercaptoethanol, 67 µM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 670 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), pH 8.8
Lysepuffer für Mausschwänze	1.7 µM Natriumdodecylsulfat (SDS), 100 µg/ml Proteinase K, 1x Gitschierpuffer
PCR-Reaktionspuffer für Genotypisierung	166 mM Ammoniumsulfat, 31 mM MgCl ₂ , 0.1% (v/v) Tween-20, 650 mM Tris, pH 8.8

Name	Zusammensetzung
PCR-Enhancer	10 mM Dithiothreitol (DTT), 10% (v/v) DMSO
Salz-gesättigtes Isopropanol	3 Volumen 100% (v/v) Isopropanol, 1 Volumen 5 M NaCl
TE-Elektrophorese-puffer, 1x	50 mM EDTA, 17.5% (v/v) Eisessig, 2 M Tris, pH 8.0
TE-Puffer	100 mM EDTA, 250 mM Tris, pH 8.0

3.1.12.3. Proteinbiochemische Lösungen

Name	Zusammensetzung
Blockierlösung für Western Blot	5% (w/v) Magermilchpulver (Frema) in PBS-T oder TBS-T
Coomassie-Färbelösung	0.1% (w/v) Coomassie R250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	20% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Elutionspuffer für His ₆ -Proteine	300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 50 mM Tris, pH 8.0
GPI-Elutionspuffer für Inositolphosphatassay	30 mM Ammoniumformiat
HEPES-EDTA	2.5 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, pH 7.4
HEPES-KOH	75 mM HEPES, 1.5 M KOH
InsP-Elutionspuffer für Inositolphosphatassay	700 mM Ammoniumformiat, 100 mM Ameisensäure
Homogenisierungspuffer 1 (Maus-/Rattenhirn)	50 mM NaCl, Complete EDTA-free Proteaseinhibitor-Cocktail (1 Tablette für 50 ml Puffer), 100 µM PMSF, 150 mM Tris, pH 7.4
Kopräzipitationspuffer 1	150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4
Kopräzipitationspuffer 2	150 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.5% (v/v) Triton X-100, 15 mM HEPES, pH 8.0
Homogenisierungspuffer 2 (Maus-/Rattenhirn)	50 mM NaCl, 50 mM HEPES, 10 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, Complete EDTA-free Proteaseinhibitor-Cocktail (1 Tablette für 50 ml Puffer), 1mM PMSF, pH 8.0
Krebs-HEPES-Puffer	146 mM NaCl, 4.2 mM KCl, 0.5 mM MgCl ₂ , 20 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-pierazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 0.1% (w/v) Glucose, pH 7.4
Laemmli (SDS-PAGE-Laufpuffer), 10x	2 M Glyzin, 3% (w/v) SDS, 440 mM Tris, pH 8.3
Lysepuffer für Bakterien (GST-Fusionsproteine)	1 Complete EDTA-free Proteaseinhibitor-Cocktail-Tablette in 50 ml PBS (pH 7.5)
Lysepuffer für Bakterien (His ₆ -RGS4)	10 mM Imidazol, Complete EDTA-free Proteaseinhibitor-Cocktail (1 Tablette für 50 ml Puffer) in PBS, pH 8.0
Lysepuffer für Bakterien (His ₆ -RGS3)	500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5 mM β-Mercaptoethanol, Complete EDTA-free Proteaseinhibitor-Cocktail (1 Tablette für 50 ml Puffer), 50 mM Tris, pH 7.4
Lysepuffer für HEK-Zellen	Entspricht dem Kopräzipitationspuffer
PBS, 10x	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.4 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.5
PBS-T	1% (v/v) Tween-20 in PBS, pH 7.5
Ponceau- Färbelösung	3% TCA, 2% Ponceau S

Name	Zusammensetzung
SDS-Gel-Weichmacher	5% (v/v) Glyzerin, 10 % (v/v) Ethanol
SDS-Proteinprobenpuffer, 8x	20% (v/v) Glyzerin, 2% (w/v) SDS, 20% (v/v) β -Mercaptoethanol, 50 mM DTT, 125 mM Tris, pH 6.8
SDS-Sammelgelpuffer (5%)	5% (v/v) Acrylamid, 0.1% (w/v) SDS, 130 mM Tris, pH 6.8
SDS-Trenngelpuffer (8, 10 oder 15%)	8, 10 bzw. 15% (v/v) Acrylamid, 0.1% (w/v) SDS, 390 mM Tris, pH 8.8
Solubilisierungspuffer für Inositolphosphatassay	10% (v/v) Triton X-100, 0.1 M NaOH
TBS	150 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 7.5
TBS-T	1% (v/v) Tween-20 in TBS
Transferpuffer (Western-Blot)	80% (v/v) 1x Laemmli, 20% (v/v) Methanol
Waschpuffer für Aufreinigung von His ₆ -Protein	Entspricht dem Bakterienlysepuffer für His ₆ -RGS3 bzw. His ₆ -RGS4

3.1.12.4. Lösungen und Puffer für Immunzytochemie (ICC) und Elektronenmikroskopie (EM)

Name	Zusammensetzung
Antikörperlösung ICC	7.5% (v/v) Ziegenserum, 1% (w/v) BSA, 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS, pH 7.5
Antikörperlösung für EM	3% (v/v) Ziegenserum, 1% (w/v) BSA, 15 mM Na-Azid in PBS, pH 7.5
Blockierlösung für EM	10% (v/v) Ziegenserum, 1% (w/v) BSA in PBS, pH 7.5
Fixierlösung für ICC	4% (w/v) PFA in PBS, pH 7.5
Fixierlösung für EM	4% (w/v) PFA, 0.1% Glutaraldehyd in PBS, pH 7.5
Präinkubationslösung für ICC	7.5% (v/v) Ziegenserum, 1% (w/v) BSA, 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS, pH 7.5
DAB-Lösung	0.05% (w/v) 3,3'-Diamino-Benzidinhydrochlorid, 0.01% (v/v) H ₂ O ₂ , 0.05 M Tris, pH 7.5
Osmierungslösung	0.5% (w/v) OsO ₄ (Osmiumtetroxid), 0.1 M Cacodylatpuffer
Saccharoselösung 1 zur Infiltration	10 % (w/v) Saccharose in PBS (pH 7.5)
Saccharoselösung 2 zur Infiltration	20 % (w/v) Saccharose in PBS (pH 7.5)
Saccharoselösung 3 zur Infiltration	30 % (w/v) Saccharose in PBS (pH 7.5)
Silberintensivierungs-Lösung A	3% (w/v) Hexamethylentetramin in ddH ₂ O
Silberintensivierungs-Lösung B	3% (w/v) Silbernitrat in ddH ₂ O
Silberintensivierungs-Lösung C	2.5% (w/v) Dinatriumtetraborat (Borax) in ddH ₂ O
Silberintensivierungs-Lösung D	0.05% (v/v) Gold(III)-chlorid-chlorwasserstoffsäure in ddH ₂ O
Silberintensivierungs-Lösung A	2.5% (w/v) Natriumthiosulfat in ddH ₂ O

3.1.12.5. Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Tetracyclin	15 mg/ml	15 µg/ml
Geneticin (G418)	50 mg/ml	500 µg/ml
Puromycin	50 g/ml	1 µg/ml

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Alkohol-Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden durch Zugabe des 2.5-fachen Volumen Ethanol (100% v/v) gefällt und für 30 min bei 8000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Präzipitat mit Ethanol (70% (v/v)) gewaschen, um ausgefallene Salze zu entfernen. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 8000 x g (4°C) erneut pelletiert. Das Pellet wurde unter Vakuum getrocknet und in einem geeigneten Volumen (ca. 30 µl) ddH₂O aufgenommen.

3.2.2. Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA (Plasmide, PCR-Produkte) wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 1-1,5% (w/v) Agarose-Gele (Biozym, Hess. Oldendorf) verwendet. Zur Visualisierung der DNA wurde dem Gel vor der Polymerisation Ethidiumbromid (0.5 mg/ml) zugesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer (10x) versetzt und bei 5 V/cm aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Bestrahlung des Gels mit ultraviolettem Licht (302 nm).

3.2.3. Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde in einem Spektrophotometer Nanodrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemäß den Herstellervorschriften analysiert.

3.2.4. Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* XL1-blue

3.2.4.1. Präparation von Plasmid-DNA mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN)

Eine 5 ml-Kultur transformierter *E. coli* XL1-blue Bakterien wurde über Nacht in Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums bei 37°C geschüttelt. Diese Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation bei 5000 x g für 15 min geerntet. Die Aufreinigung der DNA erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (QIAGEN, Hilden). Die DNA wurde schließlich in 30 µl ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.4.2. Präparation von Plasmid-DNA

Eine 5 ml-Kultur transformierter *E. coli* XL1-blue wurde über Nacht in Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums bei 37°C geschüttelt. Diese Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation bei 5000 x g für 15 min geerntet. Nachdem das Bakterienpellet in 200 µl P1-Resuspensionspuffer (QIAGEN, Hilden) resuspendiert worden war, wurden 200 µl P2-Lysispuffer (QIAGEN, Hilden) zugegeben. Die Suspension wurde sechsmal invertiert und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden 200 µl P3-Neutralisationspuffer (QIAGEN, Hilden) hinzugegeben und die Lösung für 10 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 8000 x g wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß mit 600 µl Isopropanol überführt und mehrfach invertiert. Anschließend wurde die DNA für mindestens 40 min bei 8000 x g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1 ml Ethanol (70% (v/v)) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 8000 x g wurde der Überstand wiederum abgesaugt, das Pellet luftgetrocknet und schließlich in 30 µl ddH₂O gelöst. Die DNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

3.2.4.3. Plasmid-DNA-Präparation mit dem *Plasmid Midi/Maxi Kit* (QIAGEN)

Eine 200 ml- bzw. 500 ml-Kultur transformierter *E. coli* XL1-blue wurde über Nacht in Anwesenheit entsprechenden Antibiotikums bei 37°C geschüttelt. Diese Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation bei 5000 x g für 20 min geerntet. Die Aufreinigung der DNA erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (QIAGEN, Hilden). Die DNA wurde in 300 µl bzw. 500 µl ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.4.4. Präparation von Plasmid-DNA mittels Cäsium-Chloridgradient

Um DNA mit sehr hohem Reinheitsgrad und frei von Endotoxinen für die Transfektion von Neuronen (siehe 3.4.4.3.) zu erhalten, wurde die Plasmid-DNA über einen Cäsium-Chloridgradienten aufgereinigt.

Zunächst wurde eine 3 ml-Vorkultur transformierter *E. coli* XL1-blue für einige Stunden bei 37°C angeimpft. Diese Kultur wurde anschließend in 200 ml LB-Medium überführt und über Nacht in Anwesenheit entsprechenden Antibiotikums bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 5000 x g pelletiert und das Pellet in 16 ml TE-Puffer resuspendiert. Um die Bakterien zu lysieren, wurden 32 ml P2-Lysispuffer (QIAGEN, Hilden) zugegeben und die Suspension mehrfach invertiert. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden 24 ml P3-Neutralisationspuffer (QIAGEN, Hilden) hinzugefügt und für 10 min bei 6000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Faltenrundfilter in 200 ml Ethanol (95% (v/v)) überführt und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Die DNA wurde mittels Zentrifugation für 10 min bei 15 000 x g pelletiert und das Pellet in 5 ml TE-Puffer resuspendiert. Es wurden 2.5 ml NH₄Ac (7.5 M) hinzugefügt, die Lösung für 10 min auf Eis inkubiert und danach für 10 min bei 15 000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß mit 20 ml Ethanol (100% (v/v)) überführt und nach Inkubation für 10 min auf Eis wiederum für 10 min bei 15 000 x g (4°C) zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde luftgetrocknet und in 2 ml Cäsium-Chloridlösung (0.74 mg/ml CsCl in ddH₂O) aufgenommen. Nach Zugabe von 200 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde die Cäsium-Chlorid-DNA-Lösung für ca. 18 h bei 35 000 x g (20°C) ultrazentrifugiert. Die in dem Gradienten entstandenen DNA-Banden (chromosomale und Plasmid-DNA) wurden mit UV-Licht (302 nm) visualisiert und die untere der beiden Banden (Plasmid-DNA) mit Hilfe einer Spritze aus dem Gradienten gezogen. Das Ethidiumbromid wurde durch mehrfache Extraktion mit je 1 ml Salz-gesättigtem Isopropanol entfernt. Um die DNA zu präzipitieren, wurde die DNA-Lösung mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 4 ml aufgefüllt. Desweiteren wurden 400 µl NaOHAc (3 M, pH 5.2) und 9 ml eiskaltes Ethanol (100% (v/v)) zugegeben. Die Präzipitation erfolgte durch Inkubation der Lösung für ca. 30 min bei -20 °C. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 15 000 x g (4°C) pelletiert, mit Ethanol (70% (v/v)) gewaschen und erneut für 10 min bei 15 000 x g (4°C) zentrifugiert. Schließlich wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet, in 500 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.2.5. Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach der Amplifikation des gewünschten Fragments durch PCR wurde der Ansatz mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden) durch reversible Bindung an eine Silica-Matrix von störenden Salzen, Enzymen und freien Nukleotiden gemäß der Herstellervorschriften gereinigt.

3.2.6. Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Um nach einem Restriktionsverdau das gewünschte DNA-Fragment aus der Probe zu isolieren und aufzureinigen, wurde der Restriktionsansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.2.) aufgetrennt. Die Nukleinsäurefragmente wurden unter UV-Licht (302 nm) visualisiert und das Fragment mit der entsprechenden Größe des Produktes aus dem Gel ausgeschnitten. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden) nach Herstellervorschrift.

3.2.7. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Polymerasekettenreaktion stellt ein von Mullis *et al.* (1986) entwickeltes Verfahren dar, bei dem unter Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen eine DNA-Matrize in einer zyklischen Reaktion exponentiell amplifiziert werden kann. Als Ausgangsmaterial dient die zu amplifizierende doppelsträngige DNA-Sequenz, zu der hohe Konzentrationen von synthetischen Oligonukleotidprimern zugesetzt werden, deren Sequenz je zum 3'-Ende einer der beiden Stränge komplementär ist. Außerdem werden Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) und eine hitzestabile DNA-Polymerase hinzugefügt. Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer: sie sollte 5°C unter der Schmelztemperatur des Primers mit der geringeren Schmelztemperatur liegen. (Die primerspezifische Hybridisierungstemperatur kann nach der folgenden Formel angenähert werden: $T_m(^{\circ}\text{C}) = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$). Die Elongationszeit wurde je nach Länge des zu amplifizierenden Fragmentes und nach der Polymerisationsgeschwindigkeit der verwendeten Polymerase gewählt.

Standard PCR-Ansatz (50 µl Volumen):

Komponente	Menge
DNA-Matrize	200 ng
3'-Primer	200 pmol
5'-Primer	200 pmol
dNTP-Mix	10 mM
Reaktionspuffer (10x, Invitrogen)	5 µl
Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen)	0.5-2.5 Einheiten
ddH ₂ O	ad 50 µl

Standardprogramm:

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Start	94°C	1 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	25-30
Annealing	50°C	1 min	
Elongation	68°C	4 min	
Finale Elongation	68°C	10 min	1

3.2.8. Mutagenese-PCR mit QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

Um gezielt Mutationen in DNA einzuführen, wurde das *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene (La Jolla, USA) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurden ein 3'- und ein 5'-Mutations-Primer mit der gewünschten veränderten Basensequenz konstruiert. Diese Primer sind mit ihren Enden komplementär zu beiden Seiten neben der Mutationsstelle, so dass sie hier mit der DNA des Zielgens Basenpaare ausbilden können. Unter Verwendung dieser Primer in einer PCR wird das DNA-Fragment mit der mutierten Basenabfolge amplifiziert. Anschließend wird die nicht mutierte (methylierte) DNA mittels des Enzyms DpnI verdaut. Die erhaltene DNA mit der gewünschten Mutation wurde direkt zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue verwendet (siehe 3.2.11.4.).

Standardprogramm (25 Zyklen)

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Start	95°C	30 sec	1
Denaturierung	95°C	30 sec	25
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	68°C	1 min/kb DNA	
Finale Elongation	68°C	10 min	1

3.2.9. Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierreaktion, Auftrennung und Detektion der Reaktionsprodukte wurde von einem kommerziellen Service-Anbieter durchgeführt (Agowa GmbH, Berlin oder MWG-Biotech AG, Ebersberg).

3.2.10. Präparation elektrokompenter Bakterienzellen

E. coli XL-1 Blue wurden aus einer Glycerin-Stammsuspension auf LB-Platten mit Tetracyclin (15 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurde eine 100 ml-Vorkultur (15 µg/ml Tetracyclin) angeimpft und über Nacht

bei 37°C geschüttelt. 50 ml dieser Vorkultur wurden in 1 l LB-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (gemessen bei 600 nm, OD₆₀₀) von 0.5-0.6 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 30 min auf Eis gekühlt und anschließend 15 min bei 5000 x g (4°C) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 500 ml eiskaltem ddH₂O auf Eis resuspendiert und erneut zentrifugiert (5000 x g, 4°C). Dieser Waschschrift wurde mit 250 ml ddH₂O und anschließend mit 50 ml Glycerin (10% (v/v)) wiederholt. Schließlich wurde das Bakterienpellet in 15-20 ml Glycerin (10% (v/v)) aufgenommen und in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.2.11. Klonierung von DNA-Fragmenten

3.2.11.1. Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur sequenzspezifischen Spaltung doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsenzyme und die entsprechenden Puffer der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Die Restriktionspaltungen erfolgten gemäß den Herstellerangaben. Pro 1 µg DNA wurden 2-5 Einheiten Restriktionsenzym eingesetzt. Um unspezifische Spaltaktivität der Endonuklease zu verhindern, wurde darauf geachtet, dass das Reaktionsvolumen mindestens das Zehnfache der in Glycerin gelösten Enzyme betrug. Die Dauer der Restriktionsspaltung betrug bei der vom Hersteller für das jeweilige Enzym angegebenen optimalen Temperatur mindestens 2 h.

DNA-Spaltungen mit zwei Restriktionsenzymen erfolgten wenn möglich (gemäß den Angaben des Herstellers) gleichzeitig; andernfalls wurden sie seriell durchgeführt, wobei nach dem Verdau mit dem ersten Enzym eine Alkohol-Fällung der DNA durchgeführt wurde (siehe 3.2.1.).

3.2.11.2. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um die Religation eines linearisierten Plasmidvektors zu verhindern, wurden die freien Enden des Vektors vor der Ligation mit einem DNA-Fragment möglichst vollständig dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde ohne Pufferwechsel direkt an die Linearisierung des Vektors durch die geeignete Restriktionsendonuklease angeschlossen. Dazu wurde der Restriktionsansatz mit 3 Einheiten Kalbsdarmphosphatase (CIAP) pro 1 µg eingesetztem Vektor versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer (10x) beendet und das Produkt mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.2.) aufgereinigt.

3.2.11.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung eines DNA-Fragments mit einem Plasmidvektor über kohäsive DNA-Enden wurden 50-100 ng Plasmid-DNA und ein dreifach molarer Überschuss des DNA-Fragments mit 2 µl Ligasepuffer (10x), 2.5 Einheiten T4-DNA-Ligase und ddH₂O zu einem Endvolumen von 20 µl pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.2.11.4. Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen mittels Elektroporation

Ein 100 µl-Aliquot gefrorener elektrokompetenter *E. coli* wurden 10 min auf Eis aufgetaut. In eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Eurogentec, Köln) wurden entweder 2-5 µl einer Ligationsreaktion oder 1 µg Plasmid-DNA vorgelegt und anschließend die aufgetaute Bakteriensuspension dazugegeben. Die Bakterien wurden mit einem Gene Pulser (Biorad) bei 25 µF, 2.5 kV und 200Ω elektroporiert. Die transformierten Bakterien wurden sofort in 1 ml LB-Medium gegeben und 30-60 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.11.5. Transformation chemokompetenter Zellen

Ein 100 µl-Aliquot gefrorener chemokompetenter *E. coli* BL21 (D3) (Stratagene, La Jolla, USA) wurde für 10 min auf Eis aufgetaut. Danach wurden der Bakteriensuspension 5-10 µl eines Ligationsansatzes oder 1-2 µg eines Plasmidkonstruktes zugegesetzt. Die Suspension wurde gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42°C in einem Wasserbad. Der Ansatz wurde sofort für 2 min auf Eis gestellt und anschließend in 1 ml LB-Medium überführt. Die Bakterien wurden 30-60 min bei 37°C geschüttelt und anschließend auf einer Agarplatte (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.12. Anlegen von *E. coli* Glyzerin-Kulturen

Zur langfristigen Lagerung von transformierten *E. coli* wurden 500 µl einer Bakterienkultur (OD₆₀₀ = 0.6-0.8) mit 500 µl Glycerin gemischt und danach sofort ~~in~~ ^{in einem} Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden diese Glycerin-Kulturen bei -70 °C gelagert.

3.2.13. Genotypisierung der RGS4-defizienten Mäuse

Die RGS4-defiziente Mauslinie (RGS4^{lacZ/lacZ}) wurde von Grillet *et al.* (2005) generiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die kodierende Sequenz des RGS4-Allels ist bei dieser Mauslinie unterbrochen: Exon 3, 4 und 5, die für die RGS-Domäne kodieren, sind durch das LacZ-Gen ersetzt.

3.2.13.1. Vorbereitung von Mausschwanzproben für die Genotypisierungs-PCR

Zur Gewinnung einer DNA-Probe der zu analysierenden Mäuse wurden ca. 2 cm einer Schwanzspitze über Nacht bei 56 °C unter Schütteln in 200-300 µl Lysepuffer inkubiert. Um die im Puffer enthaltene Proteinase K zu inaktivieren, wurde das Lysat für 15 min auf 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 8000 x g. Der Überstand wurde abgenommen und direkt für die Genotypisierungs-PCR (siehe 3.2.13.2.) eingesetzt.

3.2.13.2. Genotypisierungs-PCR

Zur Analyse der Mausschwanzproben wurden 2 verschiedene PCR-Reaktionen durchgeführt (Grillet *et al.*, 2005): eine Wildtyp-PCR (Primerpaar: SensEx4 und AntiEx5), um das Wildtyp-RGS4-Allel nachzuweisen, und eine *Knock-out*-PCR (Primerpaar: SensInt2 und AntiLacZ), um das *Knock-out*-Allel zu identifizieren.

Pro PCR-Ansatz (30 µl-Volumen) wurden folgende Komponenten auf Eis zusammengegeben:

Komponente	Menge
DNA-Probe	2 µl
PCR- Enhancer	4 µl
Primer 1	0.6 µmol
Primer 2	0.6 µmol
dNTP-Mix	0.17 mM
Reaktionspuffer	3 µl
Taq (2,5U; Invitrogen)	0.75 µl
ddH ₂ O	ad 30 µl

Sowohl die Wildtyp- als auch die *Knock-out*-PCR wurden nach folgendem Programm durchgeführt:

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Start	95°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	40 s	30
Annealing	60°C	40 s	
Elongation	72°C	1 min 30 s	
Finale Elongation	72°C	7 min	1

Die PCR-Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Puffer (10x) versetzt. 20 µl der Proben wurden auf ein Agarosegel (1% (w/v)) geladen und einer Gelelektrophorese unterzogen (siehe 3.2.2.).

Erwartete Größen der amplifizierten DNA-Fragmente:

Genotyp	Größe (bp)
Wildtyp	519
Knock-out	780

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Konzentration einer Proteinlösung zu bestimmen, wurde das *DC Protein Assay Kit* der Firma Biorad verwendet. Die Bestimmung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers in 96-Wellplatten, wobei pro Proteinprobe vier Replikate analysiert wurden. Die Messung der Absorption wurde am *Fluostar Galaxy* (BMG Labtech, Offenburg) bei einer Wellenlänge von 750 nm durchgeführt.

3.3.2. Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) werden Proteine zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel (5%) fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel (8-15%) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Das polymerisierte Gel wurde in eine Vertikal-Mini-Elektrophoresekammer (Mini-Protean II/II, Biorad, München) eingebaut und die Reservoirs mit Laemmli-Puffer (SDS-PAGE-Laufpuffer) gefüllt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 1/8 Volumen SDS-Proteinprobenpuffer (8x) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Gel für 1-2 h. Die Proteine wurden anschließend entweder mittels Coomassie-Färbelösung (siehe 3.3.3.) oder Silberfärbung (siehe 3.3.4.) visualisiert oder für einen Western-Blot auf Nitrozellulose transferiert (siehe 3.3.5.).

3.3.3. Coomassiefärbung von Proteingelen

Bei der Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau (Serva Blue R250) lagert sich dieser Farbstoff in einem sauren Milieu an positiv geladenen Aminosäurereste an. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 100 ng Protein pro Bande im Gel.

Das Gel wurde zum Färben der aufgetrennten Proteine 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend 20 min in Coomassie-Entfärbelösung entfärbt. Über Nacht wurde das Gel in einer SDS-Gel-Weichmacherlösung geschwenkt.

3.3.4. Silberfärbung von Proteingelen

Bei der Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit einer Silbernitratlösung lagern sich Silberionen an die Proteine an. Diese Ionen werden anschließend zu elementarem Silber reduziert, wodurch eine Schwarzfärbung der Proteinbanden entsteht. Die Nachweisgrenze dieser sensitiven Methode liegt bei 0.1-1 ng Protein pro Bande im Gel.

Die Silberfärbung der SDS-Proteingele erfolgte mit dem Silver Stain Plus-Kit der Firma Biorad (München) gemäß den Herstellerangaben.

3.3.5. Western Blot (Immunblot)-Analyse: Transfer von Proteinen auf Membranen und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (siehe 3.3.2.) wurden mittels Elektrottransfer in einer Mini-Protean-II-Transferapparatur der Firma Biorad aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert.

Hierzu wurden folgende Bestandteile in Transferpuffer vorinkubiert und danach auf die zur Kathode der Apparatur weisende Seite der Transfer-Kassette in der genannten Reihenfolge luftblasenfrei aufgeschichtet: ein Whatman-Papier, das Proteingel, eine Nitrozellulose-Membran und wiederum ein Whatman-Papier. Der Transfer erfolgte je nach Proteingröße für 1-1.5 h bei 100 V. Zur Sichtbarmachung der transferierten Proteine wurde die Membran ca. 10 min in Ponceau-Färbelösung inkubiert. Da der Azofarbstoff Ponceau reversibel an positiv geladene Aminogruppen der Proteine bindet, kann die Membran zur weiteren Verarbeitung anschließend wieder mit ddH₂O entfärbt werden.

Der spezifische Nachweis von Proteinbanden erfolgte mittels indirekter Immundetektion. Zunächst wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen abgesättigt, indem die Membran für mindestens 60 min bei Raumtemperatur in Blockierlösung (PBS-T bzw. TBS-T mit 5% (w/v) Magermilchpulver) geschwenkt wurde. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (verdünnt in entsprechender Blockierlösung) inkubiert. Die Nitrozellulose-Membran wurde dreimal für je 10 min mit Blockierlösung gewaschen und mit einem, gegen den ersten Antikörper gerichteten, an Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (1:7500 in entsprechender Blockierlösung verdünnt) für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden 3-5 zehnmütige Waschschrirte mit PBS-T bzw. TBS-T durchgeführt. Die Sichtbarmachung der Proteine, an die der Primärantikörper spezifisch gebunden hatte, erfolgte über Chemolumineszenz. Hierzu wurde

die Membran mit *Enhanced-Chemoluminescence* (ECL)-Lösung (Super Signal West Pico, Perbio Science GmbH, Bonn) gemäß den Angaben des Herstellers für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gegen einen Röntgenfilm exponiert.

3.3.6. Expression rekombinanter Proteine in *E. Coli*

Zur Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien wurden die entsprechenden Plasmidkonstrukte in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) transformiert, anschließend auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurden 200 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 20 ml dieser Bakteriensuspension wurden in 1 l LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) überführt und bei 37°C bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0.6-0.8$) geschüttelt. Zur späteren Analyse wurde eine 1 ml-Probe gezogen, bei 5000 x g abzentrifugiert und mit 1/8 Volumen SDS-Proteinprobenpuffer (8x) versetzt. Die Proteinexpression wurde nun durch Zugabe von IPTG (1 mM) für 4-5 h bei 37°C induziert. Danach wurde wiederum eine Probe gezogen und wie oben beschrieben bearbeitet. Die Bakteriensuspension wurde 20 min bei 5000 x g abzentrifugiert, einmal in PBS (pH 7.5) resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde entweder direkt aufgearbeitet (siehe 3.3.7.) oder bei -20°C gelagert.

Die vor und nach der Induktion gezogenen Proben wurden mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.2.), Coomassiefärbung (siehe 3.3.3.) und Western-Blot (siehe 3.3.5.) auf die Expression des jeweiligen Proteins hin analysiert.

3.3.7. Affinitätsreinigung von GST- bzw. His₆-Fusionsproteinen

Alle Schritte wurden zur Verminderung von Proteaseaktivität auf Eis bzw. in vorgekühlten Zentrifugen und mit eisgekühlten Puffern durchgeführt. Proteine wurden rekombinant als GST- oder His₆-Fusionsproteine aus pGEX-5x-1, pGEX-4T-1, pQE-30, pQE-32 oder pET-28a in *E. coli* BL21 (D3) exprimiert (siehe 3.3.6.).

3.3.7.1. Aufschluss von Bakterienzellen mittels Ultraschall (Sonifikation)

Das Bakterienpellet (siehe 3.3.6.) wurde in entsprechendem Lysepuffer resuspendiert und die Suspension auf ein Gesamtvolumen von ca. 20 ml aufgefüllt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch viermaliges Sonifizieren für je 30 sec (bei 90% Beschallungsstoß und Output 4-6) auf Eis. Zur Abtrennung der bakteriellen Zelltrümmer wurde die Proteinlösung 45 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

3.3.7.2. Aufreinigung rekombinanter His₆-Fusionsproteine über Nickel-NTA-Agarose zur Verwendung als Antigene für die Produktion polyklonaler Antikörper

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine, die an den Affinitätsmarker bestehend aus 6 aufeinanderfolgenden Histidinresten (His₆) fusioniert worden waren, erfolgte mittels einer Nickel-Nitriloessigsäure (Ni-NTA)-Agarose-Matrix (QIAGEN, Hilden). Es wurden pro 10 ml Bakterienhomogenat (siehe 3.3.7.1.) 600 µl Ni-NTA-Agarose eingesetzt. Die Agarose wurde einmal mit PBS (pH 8.0) gewaschen und danach 2 h bei 4°C auf einem Überkoprotator mit dem Lysat inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (pH 8.0) wurden Verunreinigungen durch das bakterielle Hitzeschockproteine DnaK entfernt. Hierzu wurden die an der Matrix immobilisierten Proteine mit dem zehnfachen Volumen DnaK-Puffer für 10 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Proteine einmal mit DnaK-Puffer, zweimal mit PBS (pH 8.0) und anschließend zweimal mit His₆-Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Proteine in 5 Elutionsschritten (je Elutionsschritt 70 µl Elutionspuffer pro 100 µl Ni-NTA-Agarose) von der Matrix gelöst und die Eluate miteinander vereinigt. Zur Entfernung von Imidazol und β-Mercaptoethanol aus der Proteinlösung wurde diese gegen den entsprechenden Elutionspuffer (ohne β-Mercaptoethanol und Imidazol) 24 h dialysiert, wobei der Dialysepuffer sechsmal gewechselt wurde. Die dialysierte Lösung wurde anschließend mittels gröÙenselektiver Filterzentrifugation (Centricons der Firma Amicon, Houston, USA) gemäß den Angaben des Herstellers auf 0.4-0.5 µg/ml konzentriert. Die Proteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.3.7.3. Reinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine über Glutathionsepharose-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine, die an Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert waren, erfolgte mittels einer Glutathion-Sepharose (GSH)-Matrix (GE Healthcare, Freiburg). Eine geeignete Menge an Glutathion-Sepharose (ca. 30 µl Glutathion-Sepharose pro 300 µl Proteinlösung) wurde zweimal mit PBS (pH 7.5) gewaschen. Die Sepharose-Matrix wurde anschließend 1-2 h bei 4°C auf einem Überkoprotator mit dem Bakterienhomogenat (siehe 3.3.7.1.) inkubiert. Die an der Matrix immobilisierten Proteine wurden dreimal mit dem Kopräzitationspuffer gewaschen, auf Eis gelagert und anschließend für GST-Kopräzitationsexperimente verwendet (siehe 3.3.8.).

3.3.8. Kopräzipitation mit GST-Fusionsproteinen (GST-Kopräzipitation): Analyse von Protein-Protein Interaktionen

Zur Analyse von Interaktionen zwischen Proteinen wurde einer der Interaktionspartner als GST-Fusionsprotein an einer GSH-Matrix immobilisiert (siehe 3.3.7.3.). Das immobilisierte Protein (ca. 30 µl Matrix) wurden mit 200 µl einer Proteinlösung, die den möglichen Bindungspartner enthielt (Lysat aus Zellen, Hirnhomogenat oder Bakterienlysate), versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Überkoprotator inkubiert, um den Interaktionspartner an das GST-Protein zu binden. Am nächsten Tag erfolgten 4 Waschschriffe mit je 1 ml Kopräzipitationspuffer. Nach dem letzten Waschschriff wurde der Puffer möglichst vollständig entfernt und es wurden 5 µl SDS-Probenpuffer (8x) zugegeben, um die präzipitierten Proteine von der Matrix zu eluieren. Um eine möglichst vollständige Elution der Proteine zu erreichen, wurden die Proben intensiv gemischt und anschließend ca. 20 min bei 37°C geschüttelt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 800 x g wurde der Überstand vollständig auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Analyse der GST-Kopräzipitation erfolgte mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.2.) und Western Blot (siehe 3.3.5.).

3.3.9. Produktion polyklonaler (Kaninchen-) Antikörper

Die Produktion polyklonaler (Kaninchen-) Antikörper gegen RGS3 und RGS4 erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma MFD Diagnostics (Mainz). Zunächst wurden die Präimmunsereen von 8 Kaninchen per Western Blot auf unspezifische Kreuzreaktivität getestet. Es wurden 2 Tiere, deren Seren nur geringe Hintergrundfärbungen produzierten, ausgewählt. Diese beiden Kaninchen wurden fünfmal mit je 400 µg Antigen (siehe 3.3.7.2.) nach folgendem Protokoll immunisiert:

Tag	Prozedur
0	1. Injektion
10	2. Injektion
20	3. Injektion
30	1. Serumprobe
35	4. Injektion
45	2. Serumprobe
60	5. Injektion
70	Entblutung

Die gewonnen Serumproben wurden ebenso wie die Präimmunsereen per Western Blot analysiert, wobei folgende Antigene getestet wurden: bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes His₆-RGS3 bzw. His₆-RGS4; untransfizierte HEK-T-Zellen (Negativkontrolle); HEK-T-Zellen transfiziert mit pEGFP-RGS3 bzw. pEGFP-RGS4 oder pcDNA-RGS3 bzw. pcDNA-RGS4; Ratten- und Maushirnhomogenat.

3.3.10. Affinitätsaufreinigung von polyklonalen Antikörpern (anti-RGS3 und -RGS4)

Die aufgereinigten Antigene (siehe 3.3.7.2.) wurden zunächst an eine präaktivierte kommerzielle Matrix (Affi-Gel 10, Biorad) gekoppelt. Hierzu wurde eine geeignete Menge des Affi-Gels (1 ml pro 5 ml gereinigtes Antigen) zweimal mit eiskaltem ddH₂O und einmal mit His₆-Elutionspuffer gewaschen. Die Matrix wurde über Nacht bei 4°C mit dem Antigen auf einem Überkoprotator inkubiert und danach zweimal mit PBS (pH 7.5) gewaschen. Um freie Bindungsstellen am Affi-Gel abzusättigen, erfolgte danach eine Inkubation mit 100 µl Ethanolamin (1 M) pro 1 ml Matrix für 1.5 h bei 4°C. Anschließend wurde 1 ml dieser Matrix in eine Glassäule überführt und intensiv gewaschen: zweimal mit PBS (pH 7.5), einmal mit Glyzin-HCl (100 mM, pH 2.9) und danach drei- bis fünfmal mit PBS (pH 7.5), bis wieder ein pH-Wert von 7.5 erreicht wurde. Nachdem 6 ml Serum zugegeben worden waren, wurde die Antigen-Säule dicht verschlossen und 4 h bei 4°C auf einem Überkoprotator inkubiert, um die spezifischen Antikörper des Serums an das immobilisierte Antigen zu binden. Anschließend wurde die Säule zweimal mit PBS (pH 7.5) gewaschen. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte, indem 7 ml Glyzin-HCl (100 mM, pH 2.9) über die Säule geschickt wurden. Das Eluat wurde zur Neutralisation direkt in Tris (1M, pH 8.0) aufgefangen. Der pH-Wert wurde sofort überprüft (sollte bei ca. pH 8.0 liegen) und gegeben falls mit Tris (1M, pH 8.0) nachtitriert. Das Eluat wurde schließlich in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

3.3.11. Herstellung von Homogenat aus Maus- bzw. Rattenhirngewebe

Vor Beginn der Präparation wurden alle Gefäße und Puffer auf 4°C vorgekühlt und der gekühlte Puffer mit den Proteaseinhibitoren versetzt. Die Maus bzw. Ratte wurde mittels eines Inhalationsanästhetikums (Isofluran) betäubt und dann sofort per Genickbruch getötet. Der Kopf wurde vom Körper getrennt und das Gehirn vollständig entnommen. Das Gehirn wurde abgewogen, und pro 100 mg Gehirn wurden 1 ml Homogenisierungspuffer zugegeben. Das Gehirn wurde mit Hilfe eines Rotor-Stator-Homogenisierers (Polytron) der Firma Glenmills für ca. 45 sec homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wurde 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand (S1) wurde abgenommen und nochmals für 30 min bei 12 000 x g zentrifugiert. Der Überstand (S2; zytosolische Fraktion) wurde wieder abgenommen und das Pellet (P2; membranhaltige Fraktion) in Puffer mit Triton X-100 (1% (v/v)) resuspendiert und mindestens 1 h bei 4°C auf einem Überkoprotator inkubiert. Das solubilisierte P2-Pellet wurde 25 min bei 12 000 x g zentrifugiert. Der Überstand (solubilisiertes P2) wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Die Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.4. Zellbiologische Methoden

3.4.1. Beschichtung von Deckgläsern und Zellkulturschalen mit Poly-L-Ornithin

Zellkulturschalen, -platten oder Deckgläser (in 24-Well-Platten) wurden mindestens 2 h mit Poly-L-Ornithin (15 µg/ml in PBS, pH 7.5) bei 37°C (5% CO₂) inkubiert. Vor Gebrauch wurden diese zweimal mit PBS (pH 7.5) gewaschen.

3.4.2. Kultivierung von HEK- bzw. HEK-T-Zellen

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank mit sterilen Lösungen und Medien (MEM, DMEM) durchgeführt. Die Lösungen und Medien zur Kultivierung der Zellen wurden stets in einem Wasserbad bei 37°C vorgewärmt.

3.4.2.1. Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in einem wassergesättigten Inkubator bei 37°C (5% CO₂) kultiviert. Ein- bis zweimal pro Woche wurden die Zellen (bei einer Konfluenz von ca. 70-90%) passagiert. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS (pH 7.5) gewaschen und anschließend mit einer geeigneten Menge PBS (pH 7.5) mittels einer 5 ml-Glaspipette von der Kulturschale gespült und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden in der gewünschten Menge in frischem Medium ausgesät. Nach ca. 30 Passagen wurden die Zellen verworfen.

3.4.2.2. Einfrieren und Auftauen von HEK-Zellen

Die Zellen einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser (ca. 80-90% Konfluenz) wurden einmal mit PBS (pH 7.5) gewaschen und mit einer geeigneten Menge an Einfriermedium von der Zellkulturschale gespült. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml-Glaspipette wurden die Zellen vereinzelt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellsuspension wurde mit Einfriermedium so verdünnt, dass eine Zellkonzentration von 10⁶-10⁷ Zellen pro ml Medium erhalten wurde. Die verdünnten Zellen wurden in 1 ml-Aliquots in Kryoröhrchen überführt und in einem mit Isopropanol gefüllten Kryocontainer bei -70 °C über Nacht eingefroren; in diesem Container wurden die Zellsuspensionen mit einer Geschwindigkeit von -1 °C pro Minute vorsichtig auf -70°C abgekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Um eingefrorene Zellen zu revitalisieren, wurden diese möglichst schnell aufgetaut und auf eine Temperatur von 37°C erwärmt. Hierzu wurde das 1 ml-Kryogefäß mit der gefrorenen Zellsuspension in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C eingetaucht. Die aufgetaute

Zellsuspension wurde anschließend sofort in eine Zellkulturschale mit vorgewärmtem Medium gegeben und wie unter 3.4.2.1. angegeben kultiviert.

3.4.3. Präparation von hippokampalen und kortikalen Primärkulturen aus Mäusen oder Wistar Ratten

Zur Isolierung von hippokampalen und kortikalen Neuronen aus Maus- oder Rattenembryonen (Fuhrmann *et al.*, 2002) wurde ein schwangeres Muttertier am Embryonaltag 18 der Schwangerschaft mittels eines Inhalationsanästhetikums (Isofluran) betäubt und dann sofort per Genickbruch getötet. Nach Entnahme der Embryonen wurde diesen der Kopf abgetrennt und sofort auf Eis in PBS/Glucose (10 mM) überführt. Das Gehirn wurde vollständig entnommen und zur weiteren Präparation wieder in PBS/Glucose (10 mM) gelegt. Die Hemisphären wurden getrennt und anschließend der Kortex bzw. der Hippokampus herauspräpariert. Die präparierten Hirnteile wurden in PBS/Glucose (10 mM) auf Eis gesammelt. Anschließend wurden die Kortices bzw. Hippokampi in 250-500 µl Verdauungslösung transferiert und 15-20 min bei 37°C inkubiert. Das verdaute Gewebe wurde einmal mit ca. 10 ml Präparationsmedium gewaschen. Um die Zellen zu vereinzeln wurde die Lösung in 1 ml frischem Präparationsmedium durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer 100 µl-Gilsonpipette trituriert. Nachdem die Zellzahl mittels einer Neubauerkammer bestimmt worden war, wurden die Zellen je nach Bedarf verdünnt und anschließend auf Poly-L-Ornithin-beschichteten 96-Well-Platten oder beschichteten Deckgläsern in 24-Well-Platten (siehe 3.4.1.) ausplattiert, in denen bereits eine ausreichende Menge Präparationsmedium vorgelegt worden war. Nach 3-4 h wurde das Medium durch Neurobasalmedium ersetzt. Um das Wachsen von Gliazellen zu verhindern wurde drei Tage nach der Präparation 1-[β-D-Arabinofuranosyl]cytosin (AraC), das die Zellproliferation hemmt, in einer Endkonzentration von 3 µM pro Well dem Medium zugesetzt.

3.4.4. Transfektion von HEK-Zellen

3.4.4.1. Calcium-Phosphat-Transfektion

Bei der Calcium-Phosphat-Transfektion wird eine Natrium-Phosphat-Lösung (BES) zu einer Calciumchloridlösung, die die zu transfizierende DNA enthält, gegeben. Dabei fällt Calcium-Phosphat aus, an das sich die DNA anlagert. Diese Kristalle werden von den Zellen per Endozytose aufgenommen.

Die Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK-T Zellen erfolgte in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 50-70% konfluent. 2 h vor Transfektionsbeginn wurde das Medium abgenommen und durch 9 ml frisches Medium ersetzt. Für eine Schale wurden 5 µg DNA mit 375 µl ddH₂O und 125 µl Calciumchlorid (1M)

vermischt. Zu dieser Mischung wurde unter Schwenken tropfenweise 500 µl BES-Puffer (2x) gegeben. Anschließend wurde dieser Transfektionsansatz ca. 20 sec intensiv gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde vorsichtig zu den Zellen gegeben. Die Schale wurde kurz geschwenkt und über Nacht bei 37°C (3% CO₂) inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch ausreichend frisches Medium ersetzt. Die transfizierten Zellen wurden noch weitere 24 h kultiviert (37°C, 5% CO₂). Danach wurden die Zellen mit einer ausreichenden Menge PBS (pH 7.5) von der Zellkulturschale gelöst und in ein 15 ml-Plastikgefäß überführt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 100 x g wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

3.4.4.2. Lipofektion von HEK-Zellen

Das Lipofektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) bildet kationische Lipidvesikel, an deren Oberfläche die negativ geladene DNA komplexiert wird. Diese Komplexe werden von den Zellen per Endozytose aufgenommen.

Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in Medium ohne Antibiotikum ausgesät. Die Transfektion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe).

3.4.4.3. Lipofektion von hippokampalen/kortikalen Neuronen

Zur Transfektion von hippokampalen Neuronen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Jaskolski *et al.* (2005) verwendet. Die Zellen wurden am 10. Tag nach ihrer Präparation transfiziert (10 *days in vitro*, DIV 10). Mindestens 1 h vor Transfektionsbeginn wurde das Transfektionsmedium (T₀) vorbereitet und im Inkubator (37°C, 5% CO₂) äquilibriert.

Nach Äquilibrierung des T₀-Mediums wurden 125 µl T₀-Medium mit 2.5 µl Lipofectamine 2000 versetzt, 3 min intensiv gemischt und 1 min bei 2000 x g zentrifugiert. Diese Lipofectamine-Mischung wurde 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden zu weiteren 125 µl T₀-Medium 1.25 µg der zu transfizierenden DNA gegeben. Diese DNA-Mischung wurde 1 min intensiv gemischt und 1 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Lipofectamine- und der DNA-Ansatz wurden zusammengegeben und vorsichtig gemischt. Nach kurzer Zentrifugation (30-60 Sekunden bei 2000 x g) erfolgte eine zehnmütige Inkubation bei Raumtemperatur. Während der Inkubationsphase wurde das Neurobasalmedium von den zu transfizierenden Neuronen abgenommen und durch je 500 µl T₀-Medium pro Well ersetzt. Das abgenommene Medium wurde gesammelt und im Inkubator (37°C, 5% CO₂) aufbewahrt. Es wurden 100 µl des Transfektionsansatzes pro Well zugegeben und die Neuronen damit 40 min im Inkubator (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit T₀-Medium gewaschen

und schließlich das aufbewahrte Neurobasalmedium auf die Neuronen gegeben. Die Zellen wurden für weitere 24 h im Inkubator kultiviert und dann fixiert (siehe 3.4.7.).

3.4.5. Herstellung von Lysat aus HEK-Zellen

Die Zellen wurden mit einer geeigneten Menge PBS (pH 7.5) von der Zellkulturschale gelöst, in ein 15 ml Plastikgefäß überführt und für 8 min bei 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die sedimentierten Zellen bei -20°C eingefroren. Das gefrorene Zellpellet wurde auf Eis mit Lysepuffer versetzt (300-500 µl Lysepuffer pro Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser) und langsam aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren im Puffer resuspendiert, bis eine homogene Suspension erhalten wurde. Das Lysat wurde in ein vorgekühltes Glasgefäß überführt und mittels eines passenden Pistills auf Eis homogenisiert (20 Hübe). Zur Solubilisierung wurde das Homogenat 1 h bei 4°C mit 0.2% Triton auf einem Überkoprotator inkubiert. Anschließend wurde das solubilierte Lysat 25 min bei 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und entweder direkt verwendet oder bei -20°C eingefroren.

3.4.6. Generierung einer stabilen mGluR7a-Zelllinie (HEK-mGluR7a)

Um eine möglichst gleichbleibende Expressionsstärke eines bestimmten Proteins in Zellkultur zu erhalten, ist es sinnvoll, das gewünschte Gen stabil in das Genom der Zellen einzubauen. Dies ist möglich, indem man die Zellen mit dem linearisierten Plasmidkonstrukt, welches das gewünschte Gen enthält, und einem zweiten ebenfalls linearisierten Resistenzvektor kotransfiziert. Nur Zellen, die das Resistenzgen in ihr Genom einbauen können, überleben langfristig unter der Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum. Klone dieser Zellen werden gepickt und per Western Blot mit einem Antikörper daraufhin analysiert, ob sie auch das gewünschte Gen in ihr Genom integriert haben.

Zur Generierung der stabilen mGluR7a-Zelllinie (wird im Folgenden mit HEK-mGluR7a bezeichnet) wurde eine HEK-Zelllinie verwendet, die bereits den muskarinischen Rezeptor 2 (M2) stabil exprimiert (Selektion mit 500 µg/ml Geneticin). Diese Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 6-Well-Platten ausgesät. Diese Zellen wurden mit dem linearisierten pBK-Flag-mGluR7a-Konstrukt und einem pPUR-Vektor, der das Resistenzgen gegen Puromycin trägt, mittels Lipofectamine 2000 kotransfiziert. Aus dem pBK-Flag-mGluR7a-Plasmid wurde zuvor das Geneticin-Resistenzgen entfernt, da Geneticin bereits zur Selektion des stabil ins Genom integrierten M2-Rezeptors verwendet wird. Hierzu wurde die Neomycin/Kanamycin-Kassette mittels Restriktionsverdau aus dem Vektorkonstrukt ausgeschnitten. Durch diesen Schritt ist eine spezifische Selektion der Zellen, die das Flag-mGluR7a-Konstrukt und das Puromycin-Resistenzgen stabil exprimieren, mit Puromycin möglich. 24 h nach der

Transfektion wurden die Zellen eines 6-Well in eine 10 cm-Zellkulturschale mit frischem DMEM⁺⁺⁺ überführt. Zur Selektion von Zellen, die das Puromycingen exprimieren, wurde nach weiteren 4 Tagen Puromycin (1 µg/ml) zugesetzt. Um den M2-Rezeptor ebenfalls im Genom zu erhalten, wurde zusätzlich auch die halbe Menge Geneticin (250 µg/ml) zugegeben. Nach 3 Tagen wurde das Medium mit der vollen Konzentration an Geneticin (500 µg/ml) und weiterhin Puromycin (1 µg/ml) versetzt; mit diesem Medium wurden die Zellen alle 2-3 Tage frisch versorgt. Nach 3 Wochen Selektion wurden die gewachsenen Klone von der Kulturschale gepickt und separat weiter kultiviert. Die Analyse der Klone erfolgte mittels Immunzytochemie (siehe 3.4.7.) und Western-Blot (siehe 3.3.5.) mit einem anti-mGluR7a und anti-Flag-Antikörper.

3.4.7. Immunzytochemie

HEK-Zellen oder Neuronen (kultiviert auf Poly-L-Ornithin-beschichteten Deckgläsern in 24-Well-Platten; siehe 3.4.1.) wurden einmal mit PBS (pH 7.5) gewaschen und anschließend für 10-15 min bei Raumtemperatur mit Paraformaldehydlösung (0.5 ml pro Well) auf den Deckgläsern fixiert. Danach wurden sie zweimal kurz und dreimal je 10 min mit PBS (pH 7.5) gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit Präinkubationslösung zur Permeabilisierung der Zellmembran und Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen. Die Zellen wurden dann über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (verdünnt in Antikörperlösung) inkubiert. Nach zweimaligem kurzem und dreimaligem Waschen für je 10 min mit PBS (pH 7.5) wurden die Zellen 1-2 h bei Raumtemperatur in Dunkelheit mit dem entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (verdünnt in Antikörperlösung) versetzt. Anschließend wurden die Zellen einmal kurz und einmal 10 min gewaschen. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Zellen 5 min in Dunkelheit mit DAPI-Lösung (1:1000 verdünnt in Antikörperlösung) inkubiert und wiederum zweimal kurz und dreimal je 10 min gewaschen. Nach kurzem Eintauchen der Deckgläser in ddH₂O und Abtropfen der Flüssigkeit wurden die Zellen in einem Tropfen Aquamount auf einem Objektträger eingedeckelt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem *Apotome Axio Imager* der Firma Zeiss.

3.4.8. Elektronenmikroskopische Analyse von kortikalen Maushirnschnitten

Für elektronenmikroskopische Analysen wurden 3-4 Monate alte Mäuse verwendet. Die Maus wurde mit einem Inhalationsanästhetikum (Isofluran) betäubt und sofort per Genickbruch getötet. Der Kopf wurde vom Körper abgetrennt und das Gehirn vollständig entnommen. Die Hemisphären wurden getrennt und der Kortex möglichst vollständig

präpariert. Der Kortex wurde in ca. 0.5 cm große Stücke zerteilt und diese 15 min bei Raumtemperatur in Fixierlösung vorfixiert. Die Kortexstücke wurden nochmals geteilt und zur vollständigen Fixierung nochmals für 1 h und 20 min bei Raumtemperatur in Fixierlösung inkubiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Präparate in PBS (pH 7.5) bei 4°C gelagert. Die fixierten Hirnteile wurden in Agar (4% (w/v)) (Merck) eingebettet. Von den eingebetteten Präparaten wurden 60 µm dicke Vibratonschnitte angefertigt, die zur Infiltration sofort in Saccharoselösung 1 gelegt wurden. Nachdem die Schnitte abgesunken waren, wurde die Lösung durch Saccharoselösung 2 ersetzt und anschließend durch Saccharoselösung 3. Zur Permeabilisierung wurden die Schnitte mittels schnellem Einfrieren und Auftauen (Gefrierbruch-Methode) aufgebrochen. Hierzu wurden die Präparate mit etwas Saccharoselösung 3 auf einen Objektträger überführt, der zum schnellen Einfrieren der Schnitte auf einen in flüssigem Stickstoff abgekühlten Messingblock gelegt wurde. Nachdem die Flüssigkeit vollständig gefroren war, wurden die Proben bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Danach wurden die Hirnschnitte 30 min bei Raumtemperatur mit Blockierlösung inkubiert und anschließend 4 Tage mit dem primären Antikörper (verdünnt in Antikörperlösung) bei 4°C vorsichtig geschwenkt. Die Schnitte wurden dreimal je 15 min mit PBS (pH 7.5) gewaschen und dann 2 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Biotin-gekoppelten Antikörper (1:100 verdünnt in Antikörperlösung ohne Na-Azid) inkubiert. Die darauffolgende Immunperoxidasereaktion zur Visualisierung der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem *Vectastain ABC Kit* der Firma Vectorlabs (Burlingame, USA) gemäß den Angaben des Herstellers, wobei die Präparate 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit mit den Reagenzien des Kits versetzt wurden. Es folgten zwei fünfzehnminütige Waschschriffe mit PBS (pH 7.5) und zwei weitere mit Tris (0.05 M, pH 7.5). Schließlich wurde das Peroxidasesubstrat 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) zugegeben. Nach ausreichender Braunfärbung wurde die Reaktion mit Tris (0.05 M, pH 7.5) gestoppt. Die gefärbten Hirnschnitte wurden erneut viermal gewaschen: zweimal je 15 min mit Tris (0.05 M, pH 7.5) und zweimal je 15 min mit Cacodylatpuffer (0.1 M). Die Proben wurden 1 h bei 4°C mit Glutaraldehyd (2.5% (v/v)) in Cacodylatpuffer (0.1 M) nachfixiert und danach einmal 15 min mit Cacodylatpuffer (0.1 M) gewaschen. Die Schnitte wurden in Schnappdeckelgläser überführt und viermal je 15 min in ddH₂O geschwenkt. Um die Auflösung von zellulären Strukturen zu verbessern, wurde das DAB Produkt silberverstärkt. Hierzu wurden 5 ml von Lösung A mit 250 ml Lösung B und 500 µl Lösung C versetzt. Die Präparate wurden mit dieser Mischung für 10 min bei 60°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 3 min mit ddH₂O, wurde zu den Schnitten für 3 min bei Raumtemperatur Lösung D gegeben. Es folgte wiederum dreimaliges Waschen für je 3 min mit ddH₂O und eine zehnminütige Inkubation bei RT mit Lösung E. Zur Fixierung und Kontrastverstärkung von Lipiden und somit der Zellmembranen wurden die Hirnschnitte für

30 min bei 4°C osmiert und danach dreimal je 10 min mit Cacodylatpuffer (0.1 M) gewaschen. Um sämtliches Wasser aus den Proben zu entfernen, wurden sie mittels folgender Alkoholreihe dehydriert: Inkubation für je 15 min in 30%, 50%, 70%, 90%, zweimal 15 min in 100% (v/v) Ethanol und schließlich zweimal 5 min in Propylenoxid. Zur Flacheinbettung der Präparate in Eponharz (Fluka, Taufkirchen) wurden diese zunächst für 30 min in einer 1:1 Propylenoxid/Epon-Mischung vorinkubiert und danach über Nacht in reines Eponharz gegeben. Am folgenden Tag wurden die Hirnschnitte mit frischem Eponharz zwischen zwei silikonisierten Objektträgern flach eingebettet. In einem 60°C Wärmeschrank wurde das Harz für 48 h auspolymerisiert. Die Schnitte wurden aus dem Eponharz herausgelöst und mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 60-80 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt. Die Kontrastierung dieser Ultradünnschnitte mit Uranylazetat und Bleicitrat erfolgte in einem *EM Stain*-Gerät der Firma Leica Mikrosysteme (Wetzlar) gemäß den Herstellerangaben. Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte an einem Elektronenmikroskop der Firma Zeiss.

3.4.9. Signaltransduktionsanalysen

3.4.9.1. Inositolphosphatanalyse in transfizierten HEK Zellen

Zur Analyse der mGluR7a-vermittelten Signaltransduktion wurde nach Stimulation des Rezeptors die Veränderung der Menge an sekundärem Botenstoff, in diesem Fall Inositolphosphate (InsP), gemessen.

Die InsP-Kaskade wird durch das G-Protein $G\alpha_q$ vermittelt. Stimulation eines GPCR, der an $G\alpha_q$ koppelt, führt zur Aktivierung der Phospholipase C, die die Produktion von InsP katalysiert. Dieses Enzym spaltet Phosphatidyl-myoinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diazylglyzerin und myo-Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). IP_3 wird anschließend durch Kinasen und Phosphatasen in myo-Inositol-1,4-diphosphat (IP_2) und in myo-Inositol-4-monophosphat (IP) umgewandelt. Da mGluR7a jedoch an $G\alpha_{i1}$ koppelt und somit sein Signal über die cAMP-Kaskade transduziert (Pin und Duvoisin, 1995), war eine Umleitung auf den InsP-Weg notwendig. Hierzu wurde ein chimäres αG_q -Protein herangezogen, das durch mGluR7a aktiviert werden kann und so die Stimulierung der InsP-Kaskade induziert (Conklin *et al.* 1993). Bei diesem $G\alpha_q$ -Protein sind die letzten 3 C-terminalen AS, die die spezifische Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor vermitteln, durch eine Sequenz ersetzt worden, die von mGluR7a erkannt wird. Es wurde gezeigt, dass bei $G\alpha_q$ durch die Substitution dieser 3 Aminosäurereste mit denen des αG_z -Proteins ($G\alpha_{q/z}$ -Chimäre) eine Bindung an Rezeptoren, die natürlicherweise an $G\alpha_i$ oder $G\alpha_o$ koppeln, erreicht wird. Durch Expression dieser $G\alpha_{q/z}$ -Chimäre in HEK-mGluR7a-Zellen kann mGluR7a die InsP-Kaskade nutzen und die Produktion der InsP induzieren.

Für diese Experimente wurden die Zellen (HEK-mGluR7a oder HEK als Negativkontrolle) am Tag vor der Transfektion auf 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mittels Lipofectamine 2000 (siehe 3.4.4.2.) mit dem chimären G-Protein ($G\alpha_{q/z}$) und einem GFP-RGS-Konstrukt bzw. nur GFP als Kontrolle transfiziert, wobei die beiden Konstrukte in einem Verhältnis von 3 (G-Protein) : 1 (GFP-Konstrukt) eingesetzt wurden. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen auf Poly-L-Ornithin beschichtete 12-Well-Platten (siehe 2.4.1.) verteilt (ca. 10^6 Zellen pro Well). Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit radioaktiv markiertem myo- $[^3\text{H}]$ -Inositol (1 $\mu\text{Ci/ml}$) inkubiert. In dieser Zeit bauen die Zellen dieses Inositol in ihre Membranen ein, so dass radioaktiv markiertes Phosphatidyl-myoinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) gebildet wird. Wird in diesen Zellen die InsP-Kaskade stimuliert, so wird durch die aktive Phospholipase C dieses PIP_2 in Diazylglyzerin und IP_3 gespalten, die nun die radioaktive Markierung tragen. Die Zellen wurden nach der über Nacht Inkubation myo- $[^3\text{H}]$ -Inositol zunächst einmal mit vorgewärmtem Krebs-HEPES-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie zur Entfernung von freiem Glutamat für 2 h mit Glutamat-Pyruvat-Transaminase (1 Einheit/ml) und Natriumpyruvat (2 mM) in Krebs-HEPES-Puffer inkubiert. Um den Abbau von Inositolphosphaten während des Experiments durch das Enzym myo-Inositol-1-Phosphatase zu verhindern, wurden die Zellen 15 min mit Lithiumchlorid (10 mM) versetzt. Schließlich wurden die Zellen für 20 min mit dem Gruppe III mGluR-spezifischen Agonisten L-AP4 (1 mM) stimuliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μl eiskalter Trichloressigsäure (5% (w/v)) und anschließendes Einfrieren bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ für ca. 20 min abgestoppt. Die Zellen wurden nach dem Auftauen mit der Trichloressigsäure in ein Plastikgefäß überführt. Jedes Well wurde nochmals mit 1 ml Trichloressigsäure (1% (w/v)) ausgespült und das Material mit dem restlichen Zelllysate vereint. Das Lysat wurde 10 min bei $2500 \times g$ zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Das Pellet wurde in 1 ml Trichloressigsäure (1% (w/v)) resuspendiert und nochmals 10 min bei $2500 \times g$ zentrifugiert und mit dem vorherigen Überstand vereint. Das Pellet (Membranfraktion) wurde in 500 μl Solubilisierungspuffer resuspendiert und für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Überkoprotator inkubiert. Die Suspension wurde anschließend mit 7 ml HEPES-EDTA und 0.5 ml HCl (0.1 M) versetzt. In einem Szintillationsgerät LS 6500 (Beckman Coulter, Fullerton, USA) wurde die gesamte Radioaktivität der Membranfraktion gemessen. Nachdem die vereinigten Überstände (zytosolische Fraktion) mit einem Tropfen pH-Indikator versetzt und mit HEPES-KOH neutralisiert worden waren, wurden 4 ml HEPES-EDTA zugegeben. Diese Mischung wurde über eine Säule, die mit 400 mg Dowex AG 1-X8 (Biorad, München) befüllt worden war, per Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Nach Durchlauf des Ansatzes wurde die Säule mit 4 ml HEPES-EDTA gewaschen. Zunächst wurden mit GPI-Elutionspuffer die Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker eluiert. Schließlich erfolgte die Elution der gesamten InsP (IP_3 , IP_2 und IP) mit 12 ml InsP-Elutionspuffer. Die Radioaktivität

der InsP wurde im Szintillationsgerät gemessen. Die Ergebnisse wurden dargestellt als die Menge an produzierten InsP (entspricht der Radioaktivität im InsP-Eluat) im Verhältnis zur gesamten Radioaktivität in der Membranfraktion.

3.4.9.2. cAMP-Analyse in transfizierten HEK Zellen - *cAMP Biotrak Enzymimmunoassay (EIA)*

Zur Analyse der mGluR7a-vermittelten Signaltransduktion wurde nach Stimulation des Rezeptors die Veränderung der Menge des sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bestimmt. Die Stimulation des mGluR7a führt zur Inhibition der Adenylatzyklase und somit zur Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration (Pin und Duvoisin, 1995).

Hierzu wurden die Zellen (HEK-mGluR7a oder HEK als Negativkontrolle) in 12-Well-Platten ausgesät und transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion (siehe 3.4.4.2.) wurden die Zellen auf eine Poly-L-Ornithin-beschichtete 96-Well-Platte (siehe 3.4.1.) verteilt (80 000 Zellen pro Well). Nach weiteren 24 h wurden die Zellen einmal mit Krebs-HEPES-Puffer gewaschen. Zur Entfernung von freiem Glutamat wurden die Zellen 2 h mit Glutamat-Pyruvat-Transaminase (1 Einheit/ml) und Natriumpyruvat (2 mM) inkubiert. Um den inhibierenden Effekt des mGluR7a auf die Adenylatzyklase deutlich erkennen zu können, wurde die cAMP-Bildung auf ein mögliches Maximum angehoben durch direkte Aktivierung der Adenylatzyklase mit Forskolin (10 μ M). Zugleich wurde der Rezeptor 15 min mit L-AP4 (1 mM) stimuliert. Um den Abbau des gebildeten cAMP durch die Phosphodiesterase zu verhindern, erfolgte zusätzlich eine Inhibition dieses Enzyms durch Anwesenheit von 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX) (0.75 mM). Die Durchführung des *cAMP Enzymimmunoassays (EIA)* zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Menge erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (GE Healthcare, Freiburg). Die Absorptionmessung wurde an einem *Fluostar Galaxy* (BMG Labtech, Offenburg) durchgeführt.

3.4.9.3. cAMP-Assay in kultivierten kortikalen Neuronen- *cAMP Biotrak Enzymimmunoassay (EIA)*

Um die Signaltransduktion des endogenen mGluR7a bzw. der Gruppe III mGluRs zu untersuchen, wurden kortikale Neuronen aus RGS4-Wildtyp- und RGS4-defizienten Mäusen für 3 Wochen in Poly-L-Ornithin-beschichteten 96-Well-Platten (siehe 2.4.1.) kultiviert (70.000 Zellen pro Loch). Diese Neuronen wurden am Tag des Experiments zunächst einmal mit Krebs-HEPES-Medium gewaschen und danach 2 h mit Glutamat-Pyruvat-Transaminase (1 Einheit/ml) und Natriumpyruvat (2 mM) inkubiert, um freies Glutamat zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen 15 min mit Forskolin (10 μ M) und zugleich mit dem

entsprechenden Agonisten stimuliert. Zur Inhibition des Abbaus von gebildetem cAMP durch die Phosphodiesterase wurde zusätzlich der Inhibitor IBMX (0.75 mM) zugegeben. Die Durchführung des *cAMP Enzymimmunoassays (EIA)* zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Menge erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (GE Healthcare, Freiburg). Die Absorptionsmessung wurde an einem *Fluostar Galaxy* (BMG Labtech, Offenburg) durchgeführt.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation sollte die potentielle Regulation der Signaltransduktion der Gruppe III metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs), insbesondere des mGluR7a, durch die *Regulators of G-protein signalling* (RGS)-Proteine RGS3 und RGS4 untersucht werden.

Mittels biochemischer Kopräzitationsexperimente wurde die Interaktion zwischen Regulator und Rezeptor analysiert (siehe 4.1.). Zur Beantwortung der Frage, ob RGS-Proteine die Signalübertragung der Gruppe III mGluRs bzw. des mGluR7a regulieren, wurden Signaltransduktionsanalysen in HEK-Zellen (siehe 4.2.) sowie in Neuronen durchgeführt (siehe 4.4.). Die Kolokalisation der Proteine *in vivo* wurde mit Hilfe elektronenmikroskopischer Analysen von kortikalen Neuronen untersucht (siehe 4.3.).

4.1. Analyse der Protein-Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurden Bindungsstudien mit GST-Fusionsproteinen durchgeführt (GST-Kopräzitation). Hierfür wurde einer der beiden Interaktionspartner als GST-Fusionsprotein in Bakterien (*E. coli* BL21) exprimiert und an eine Glutathion-Sepharose (GSH)-Matrix gebunden. Das immobilisierte GST-Protein wurde anschließend mit einer Proteinlösung, die den möglichen Interaktionspartner enthält (Input), 2 h bei 4°C inkubiert. Sofern eine Wechselwirkung stattfand, konnten die gebundenen Proteine mit dem an der Matrix fixierten GST-Fusionsprotein kopräzitiert werden. Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem Antikörper, der spezifisch das kopräzipitierte Protein erkennt. Um die Spezifität der Bindung zu verifizieren, wurde GST als Negativkontrolle eingesetzt. Zum Vergleich wurden jeweils 10% des Inputs ebenfalls auf das SDS-Gel aufgetragen.

4.1.1. Interaktion zwischen mGluR7a exprimiert in HEK-Zellen und GST-RGS3 bzw. GST-RGS4

Um die Frage zu klären, ob zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 eine Interaktion stattfinden kann, wurde an einer GSH-Matrix immobilisiertes GST-RGS3 bzw. GST-RGS4 mit Homogenat aus HEK-mGluR7a-Zellen und als Kontrolle mit Homogenat aus untransfizierten HEK-Zellen inkubiert. Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem anti-mGluR7a-Antikörper.

Der Rezeptor konnte aus dem Homogenat der HEK-mGluR7a-Zellen sowohl mit GST-RGS3 als auch mit GST-RGS4 kopräzipitiert werden (siehe Abb. 4-1, Spuren 3 und 5), während an GST keine Bindung erfolgte (Spur 7). Dies zeigt, dass der Rezeptor spezifisch an GST-RGS3 sowie GST-RGS4 bindet. Allerdings scheint diese Interaktion relativ schwach zu sein, da die densitometrische Analyse der Bandenstärke ergab, dass nur ca. 4% der eingesetzten Menge an Rezeptor aus dem HEK-mGluR7a-Zellhomogenat, das je Ansatz eingesetzt worden war, präzipitiert werden konnten.

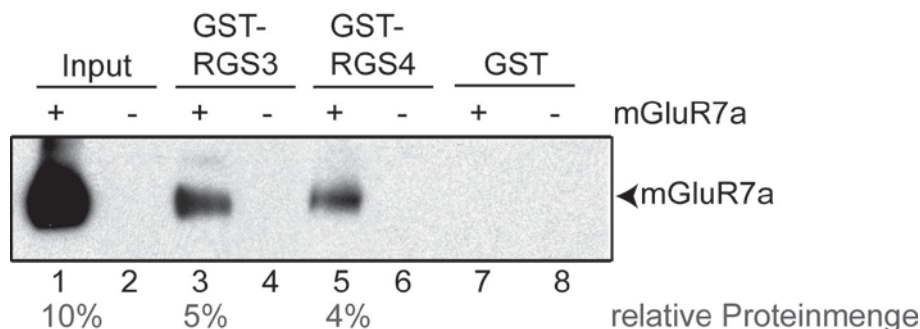


Abb. 4-1 Interaktion zwischen mGluR7a exprimiert in HEK-Zellen und GST-RGS3 bzw. GST-RGS4: An einer GSH-Matrix wurden folgende GST-Fusionsproteine immobilisiert: GST-RGS3, GST-RGS4 und GST. Diese wurden mit Homogenat aus HEK-mGluR7a-Zellen (+) oder aus untransfizierten HEK-Zellen (-) 2 h (4°C) inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit Proteinprobenpuffer von der Matrix eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western Blot mit einem anti-mGluR7a-Antikörper analysiert. Input: 10% des HEK-mGluR7a-Homogenates, das pro Ansatz verwendet wurde. Die Prozentzahlen (grau) geben die relativen Mengen (bezogen auf den Input) an präzipitiertem Protein an (densitometrische Analyse der Proteinbanden). Der Rezeptor konnte mit GST-RGS3 (Spur 3) bzw. GST-RGS4 (Spur 5), aber nicht mit GST (Spur 7) kopräzipitiert werden.

4.1.2. Identifikation der RGS-Bindungsdomänen des mGluR7a

mGluR7a besitzt mehrere intrazelluläre Domänen, an denen eine Interaktion mit intrazellulären Proteinen stattfinden kann, wie den C-Terminus (CT) und die intrazellulären Schleifen 1 (iLoop1), 2 (iLoop2) und 3 (iLoop3) (siehe Abb. 4-2).

Um die Bereiche zu identifizieren, an die das RGS3- bzw. RGS4-Protein bindet, wurden die intrazellulären Schleifen 2 und 3 sowie der CT als GST-Fusionsproteine kloniert, exprimiert und aufgereinigt (GST-mGlu7a-CT, GST-mGlu7a-iLoop2 und GST-mGlu7a-iLoop3) (siehe Abb. 4-3). Die Schleifen 2 und 3 wurden ausgewählt, da diese die selektive Bindung des Rezeptors an die $G\alpha$ -Untereinheit (UE) vermitteln und sie bei anderen GPCRs direkt mit bestimmten RGS-Proteinen wechselwirken (Havlickova *et al.*, 2003; Neitzel und Hepler, 2006). Der CT wurde als potentielle Bindungsdomäne mit untersucht, da an diesem zahlreiche Wechselwirkungen mit intrazellulären Proteinen stattfinden, die den Rezeptor beeinflussen können und da auch für diese Domäne bei anderen GPCRs ebenfalls eine direkte Interaktion mit RGS-Proteinen nachgewiesen wurde (Dev *et al.*, 2001; Enz, 2006;

Neitzel und Hepler, 2006).

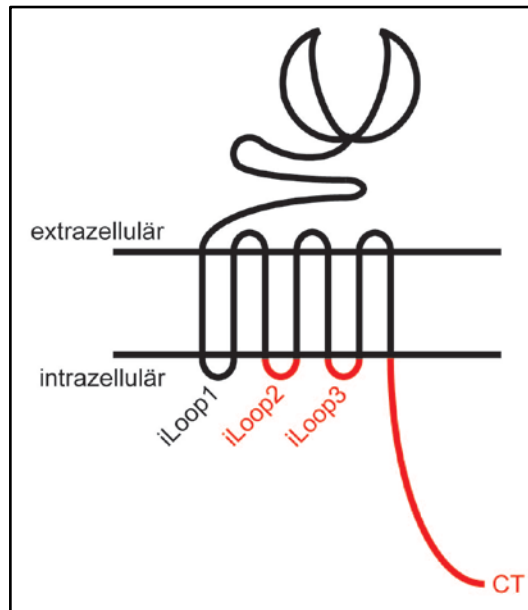


Abb. 4-2 Schematische Darstellung des mGluR7a-Rezeptors: MGLuR7a ist schematisch dargestellt. Die rot gekennzeichneten intrazellulären Schleifen 2 und 3 sowie der CT wurden für Interaktionsanalysen als GST-Fusionsproteine kloniert.

Die GST-markierten mGluR7a-Fragmente wurden im GST-Kopräzipitationsansatz daraufhin untersucht, ob diese mit RGS3 und/oder RGS4, die als His₆-markierte Proteine in Bakterien exprimiert worden waren, wechselwirken können. Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem anti-RSG3- bzw. anti-RGS4-Antikörper.

Sowohl mit GST-mGluR7a-CT als auch mit GST-mGluR7a-iLoop2 konnten die beiden His₆-markierten RGS-Proteine kopräzipitiert werden (siehe Abb. 4-3, A und B, Spuren 2 und 3). Mit GST-mGluR7a-iLoop3 oder mit der Negativkontrolle GST war keine Interaktion nachweisbar (siehe Abb. 4-3, A und B, Spuren 4 und 5). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Bindung der beiden RGS-Proteine an mGluR7a am CT und an der intrazellulären Schleife 2 des Rezeptors stattfindet. Es ist zu erwähnen, dass wie auch im vorangegangenen Experiment (siehe 4.1.1.) nur relativ geringe Mengen Protein präzipitiert werden konnten. Eine densitometrische Analyse der Proteinbanden (Daten nicht gezeigt) ergab, dass nur ca. 1-5% der eingesetzten Menge an His₆-RGS3 bzw. His₆-RGS4 aus dem Proteinlysate, das je Ansatz eingesetzt worden war, isoliert wurde. Der hier gezeigte Immunblot des Experiments lässt die Vermutung zu, dass sich die Proteinmengen, die an den CT und die intrazellulären Schleife 2 gebunden haben unterscheiden. Da die Proteinmengen der verschiedenen GST-mGluR7a-Fragmente jedoch nicht exakt aufeinander abgeglichen wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Bindung an eines der beiden Rezeptorfragmente stärker war.

Dieses Experiment gibt - neben der Identifikation des CT und der intrazellulären Schleife 2 des Rezeptors als RGS-Bindungsdomänen - auch Aufschluss über den Charakter der Bindung zwischen RGS-Protein und mGluR7a: Da sowohl mGluR7a als auch RGS3 und RGS4 mit der $G\alpha_{i1}$ -UE interagieren (Pin und Duvoisin, 1995; Berman und Gilman, 1998), ist es möglich, dass die Interaktion zwischen Rezeptor und RGS-Protein nicht direkter Natur ist, sondern indirekt durch die $G\alpha_{i1}$ -UE vermittelt wird. Für das vorliegende Experiment wurden jedoch beide Interaktionspartner in Bakterien, die selbst keine $G\alpha_{i1}$ -UE besitzen, exprimiert. Somit erfolgte die Kopräzipitation in Abwesenheit der $G\alpha_{i1}$ -UE, was darauf hinweist, dass die UE nicht für die Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 notwendig ist. Eine detailliertere Analyse der Relevanz der $G\alpha_{i1}$ -UE bei der Bindung von mGluR7a an RGS3 bzw. RGS4 wurde im Folgenden (siehe 4.1.3.) durchgeführt.

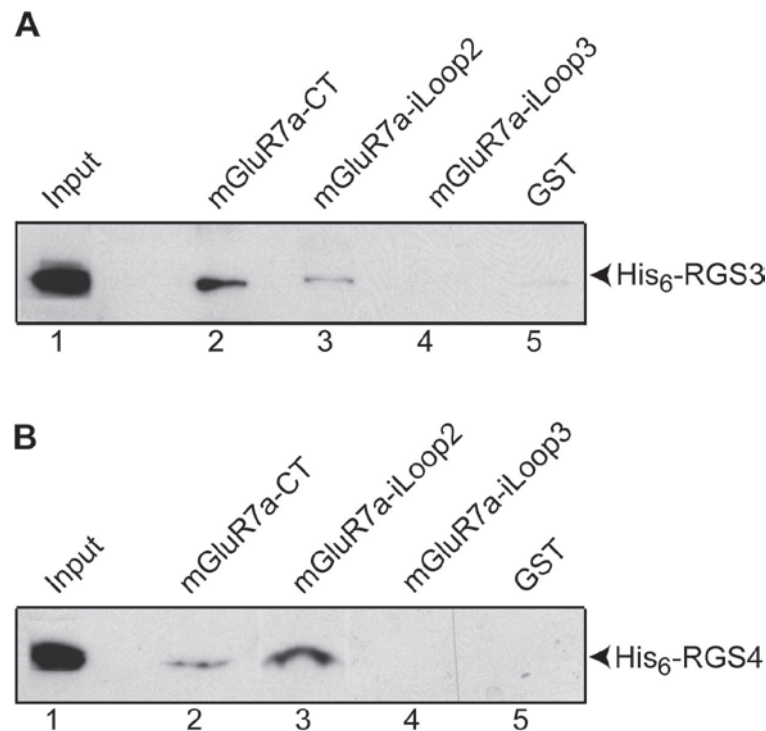


Abb. 4-3 Identifikation der RGS-Bindungsdomänen des mGluR7a: An einer GSH-Matrix wurden folgende GST-Fusionsproteine immobilisiert: GST-mGluR7a-CT, GST-mGluR7a-iLoop2, GST-mGluR7a-iLoop3 und GST. Diese wurden mit bakteriell exprimiertem His₆-RGS3 (**A**) oder His₆-RGS4 (**B**) 2 h (4°C) inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit Proteinprobenpuffer von der Matrix eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western Blot mit einem anti-RGS3- bzw. anti-RGS4-Antikörper analysiert. Input: 10% der His₆-RGS3- bzw. His₆-RGS4-Proteinlösung, die pro Ansatz verwendet wurde. Die beiden RGS-Proteine konnten mit GST-mGluR7a-CT (Spur 2) und GST-mGluR7a-iLoop2 (Spur 3), jedoch nicht mit GST-mGluR7a-iLoop3 (Spur 4) oder GST (Spur 5) aus dem Lysat kopräzipitiert werden.

4.1.3. Rolle der $G\alpha_{i1}$ -Untereinheit bei der Interaktion zwischen mGluR7a und GST-RGS3 bzw. GST-RGS4

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt (siehe 4.1.2.) beschrieben, interagieren sowohl mGluR7a als auch RGS3 und RGS4 mit der $G\alpha_{i1}$ -UE (Pin und Duvoisin, 1995; Berman und Gilman, 1998). Deshalb besteht die Möglichkeit, dass die $G\alpha_{i1}$ -UE die Interaktion zwischen Rezeptor und RGS-Protein vermittelt wird. Teilweise erfolgte die Charakterisierung der Bindung bereits unter 4.1.2.: Hier wurde gezeigt, dass His₆-RGS3 und His₆-RGS4 in Abwesenheit der $G\alpha_{i1}$ -UE mit dem CT und der intrazellulären Schleife 2 des mGluR7a interagieren können. Dies weist bereits daraufhin, dass die Bindung wahrscheinlich direkt erfolgt und die $G\alpha_{i1}$ -UE nicht dafür benötigt wird. Um die Relevanz der $G\alpha_{i1}$ -UE bei der Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 genauer zu untersuchen, wurde eine bereits beschriebene RGS-insensitive $G\alpha_{i1}$ -UE herangezogen (DiBello *et al.*, 1998; Lan *et al.*, 1998): Durch die Substitution eines singulären Glyzinrestes (Glyzin183) in der *Switch*-Region I, die für die GTPase-Funktion notwendig ist, durch die Aminosäure Serin bleibt die $G\alpha_{i1}$ -UE zwar voll funktionsfähig, jedoch können RGS-Proteine diese UE weder binden noch regulieren (RGS-insensitiv). Mittels Mutagenese-PCR wurde diese Punktmutation (G183S) in ein Konstrukt für eine myc-markierte $G\alpha_{i1}$ -UE eingeführt. Die Wildtyp ($G\alpha_{i1}$ -WT)-UE und die RGS-insensitive ($G\alpha_{i1}$ -G183S)-UE wurden separat in HEK-mGluR7a-Zellen exprimiert. Anschließend wurde an einer GSH-Matrix immobilisiertes GST-RGS3 bzw. GST-RGS4 mit Homogenaten dieser Zellen inkubiert. Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem anti-mGluR7a- und einem anti-myc-Antikörper.

Sowohl in Anwesenheit der RGS-insensitiven $G\alpha_{i1}$ -UE als auch der $G\alpha_{i1}$ -WT-UE konnte mGluR7a mit GST-RGS3 und GST-RGS4 kopräzipitiert werden, wobei jeweils vergleichbare Mengen des Rezeptors gebunden wurden (siehe Abb. 4-4, A). Die Analyse desselben Blots mit einem anti-myc-Antikörper machte deutlich, dass - wie erwartet - keinerlei Bindung der RGS-Proteine an die RGS-insensitive $G\alpha_{i1}$ -UE stattfand (siehe Abb. 4-4, B). Diese Befunde zeigen, dass die Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 auch dann erfolgen kann, wenn die Bindung des RGS-Proteins an die $G\alpha_{i1}$ -UE verhindert wird. Da also die $G\alpha_{i1}$ -UE nicht notwendig zu sein scheint für die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und RGS-Protein, besteht die Möglichkeit, dass die Proteine direkt miteinander interagieren.

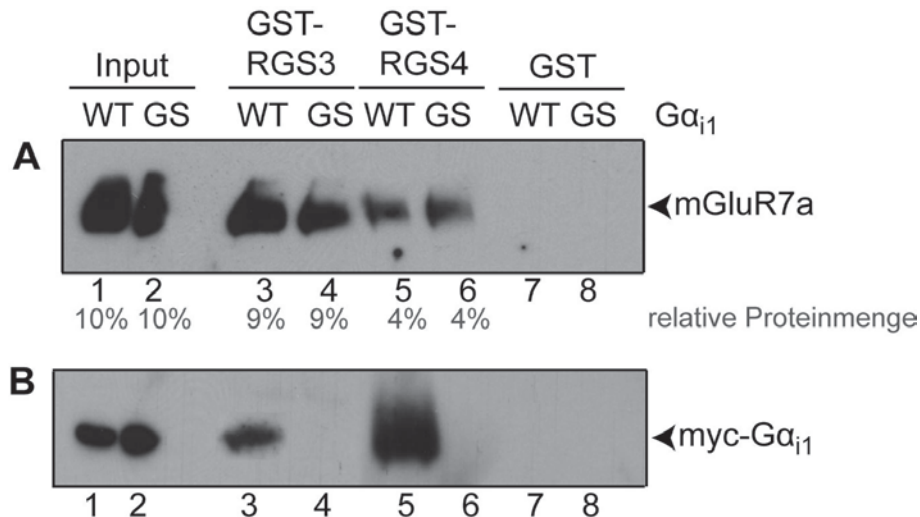


Abb. 4-4 Relevanz der $G\alpha_{i1}$ -UE bei der Interaktion zwischen mGluR7a und GST-RGS3 bzw. GST-RGS4: An einer GSH-Matrix wurden folgende GST-Fusionsproteine immobilisiert: GST-RGS3, GST-RGS4 und GST. Diese wurden mit Homogenat aus HEK-mGluR7a-Zellen, welche entweder mit dem Konstrukt der myc-markierten Wildtyp- $G\alpha_{i1}$ -UE (WT) oder der RGS-insensitiven $G\alpha_{i1}$ -UE (GS) transfiziert worden waren, 2 h (4°C) inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit Proteinprobenpuffer von der Matrix eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western Blot mit anti-mGluR7a- (**A**) und anti-myc-Antikörper (**B**) analysiert. Input: 10% des HEK-mGluR7a-Homogenates, das pro Ansatz verwendet wurde. Die Prozentzahlen (grau) geben die relativen Mengen (bezogen auf den Input) an präzipitiertem Protein an (densitometrische Analyse der Proteinbanden). **A:** MGLuR7a wurde in Gegenwart von $G\alpha_{i1}$ -WT sowie $G\alpha_{i1}$ -GS aus dem Homogenat in vergleichbaren Mengen mit GST-RGS3 und GST-RGS4 kopräzipitiert (Spuren 3-6, A). **B:** Nur $G\alpha_{i1}$ -WT, jedoch nicht $G\alpha_{i1}$ -GS, wurde mit GST-RGS3 bzw. GST-RGS4 kopräzipitiert (Spuren 3-6, B).

4.1.4. Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen mGluR7a und GST-RGS3 bzw. GST-RGS4

Da Calcium-Ionen (Ca^{2+}) eine äußerst wichtige Rolle bei der synaptische Transmission übernehmen (Katz und Miledi, 1970), wurde im Folgenden die Wirkung von Ca^{2+} auf die Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 untersucht. Hierzu wurde an einer GSH-Matrix immobilisiertes GST-RGS3 bzw. GST-RGS4 mit Homogenat aus HEK-mGluR7a-Zellen oder mit Rattenhirnhomogenat inkubiert. Das Experiment wurde zum einen in Anwesenheit von Ca^{2+} (0.3 mM) und zum anderen in Abwesenheit von Ca^{2+} durch Einsatz von EGTA (5 mM), welches zweiwertige Kationen effizient komplexiert, durchgeführt. Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem anti-mGluR7a-Antikörper.

Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ca^{2+} konnte mGluR7a aus Homogenat der HEK-mGluR7a-Zellen und auch aus Rattenhirnhomogenat mit GST-RGS3 und GST-RGS4 isoliert werden, während keine Bindung an GST stattfand (siehe Abb. 4-5, A und B). Allerdings ist die Kopräzipitation des mGluR7a deutlich effizienter in Ca^{2+} -freiem (EGTA, 5 mM) als in Ca^{2+} -haltigem (0.3 mM) Milieu (siehe Abb. 4-5, A und B, Spuren 3 und 5). Eine densitometrische Analyse der Proteinbanden ergab, dass in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen die

-----ERGEBNISSE-----

Menge an kopräzipitiertem mGluR7a aus Homogenat der HEK-mGluR7a-Zelllinie doppelt so hoch und aus Hirnhomogenat sogar sieben- bis neunfach höher war. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 Ca^{2+} -abhängig ist, wobei die Bindung in Abwesenheit von Ca^{2+} effizienter zu erfolgen scheint.

Die zweite mGluR7a-Bande, die in den Spuren 1 und 3 der Abb. 4-5, A zu sehen ist (durch einen Stern gekennzeichnet), ist womöglich dadurch entstanden, dass in diesen Spuren sehr viel Protein geladen wurde. Ein Teil des mGluR7a-Proteins könnte deshalb im Übergang vom Sammel- zum Trenngel, der sich in diesem Bereich befindet, hängen geblieben sein.

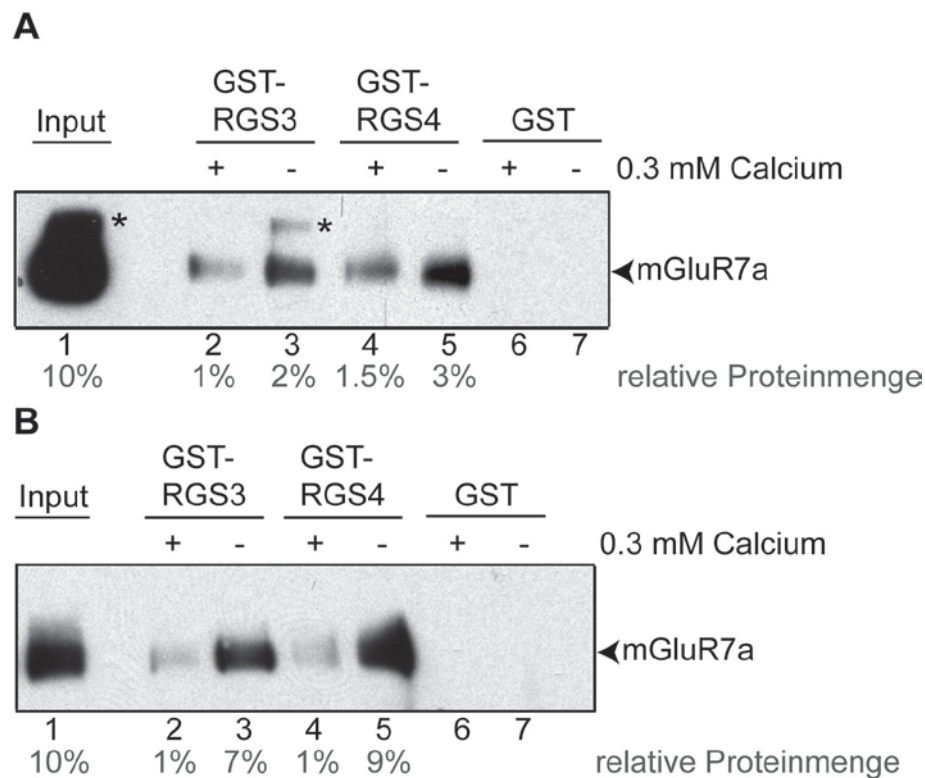


Abb. 4-5 Calciumabhängigkeit der Interaktion zwischen mGluR7a und GST-RGS3 bzw. GST-RGS4: An einer GSH-Matrix wurden folgende GST-Fusionsproteine immobilisiert: GST-RGS3, GST-RGS4 und GST. Diese wurden mit Homogenat aus HEK-mGluR7a-Zellen (**A**), oder mit Rattenhirnhomogenat, das endogenes mGluR7a-Protein enthält (**B**), in Anwesenheit von Ca^{2+} (0.3 mM) oder EGTA (5 mM) 2 h (4°C) inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit Proteinprobenpuffer von der Matrix eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western Blot mit anti-mGluR7a-Antikörper analysiert. Input: 10% des HEK-mGluR7a-Homogenates, das pro Ansatz verwendet wurde. Die Prozentzahlen (grau) geben die relative Menge (bezogen auf den Input) an präzipitiertem Protein an (densitometrische Analyse der Proteinbanden). In Anwesenheit von EGTA wurde eine größere Menge mGluR7a mit GST-RGS3 (Spur 3, A und B) bzw. GST-RGS4 (Spuren 5, A und B) als in Anwesenheit von Ca^{2+} (0.3 mM) kopräzipitiert. Es erfolgte keine Bindung an GST (Spuren 6 und 7, A und B). Die Sterne in A kennzeichnen eine zusätzliche mGluR7a-Bande, die vom Antikörper erkannt wurde (wahrscheinlich Überladungsartefakt).

4.1.5. Funktion von Calmodulin bei der Interaktion zwischen mGluR7a und GST-RGS3 bzw. GST-RGS4

Aufgrund der postulierten Ca^{2+} -Abhängigkeit der Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 (siehe 4.1.4.) stellte sich die Frage, wie die Wirkung der Ca^{2+} -Ionen auf die Bindungseffizienz zustande kommt. Es ist bekannt, dass das Ca^{2+} -bindende regulatorische Protein Calmodulin (CaM) sowohl an den CT des mGluR7a als auch an die RGS-Domäne verschiedener RGS-Proteine bindet (O'Connor *et al.*, 1999, Popov *et al.*, 2000). Beide Interaktionen sind Ca^{2+} -abhängig. Aufgrund dieser Fakten wurde vermutet, dass in den Homogenaten vorhandenes Ca^{2+} /CaM die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und RGS-Protein beeinflussen könnte.

4.1.5.1. Interaktion von Ca^{2+} /CaM mit GST-RGS3 und GST-RGS4

Innerhalb der RGS-Domäne von RGS3 und RGS4 wurde eine putative Ca^{2+} -abhängige Bindungsdomäne für CaM identifiziert (Popov *et al.*, 2000). Jedoch nur für RGS4 wurde die Interaktion mit Ca^{2+} /CaM mittels Kopräzipitation nachgewiesen. Deshalb wurde hier zunächst mittels eines GST-Kopräzipitationsexperimentes gezeigt, dass Ca^{2+} /CaM auch von RGS3 gebunden werden kann. Sowohl GST-RGS3 als auch GST-RGS4 als Postivkontrolle wurden mit Homogenat aus HEK-T-Zellen, die transient mit einem GFP-CaM-Konstrukt transfiziert worden waren, inkubiert. Das Experiment erfolgte sowohl in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen (0.3 mM) als auch in Ca^{2+} -freiem Milieu (5 mM EGTA). Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem anti-GFP-Antikörper.

Mit GST-RGS3 wurde - wie auch mit GST-RGS4 - GFP-CaM in Anwesenheit von Ca^{2+} kopräzipitiert (siehe Abb. 4-6). Dies zeigt, dass auch RGS3 - wie bereits aufgrund der identifizierten CaM-Bindungsdomäne postuliert - mit Ca^{2+} /CaM interagieren kann.

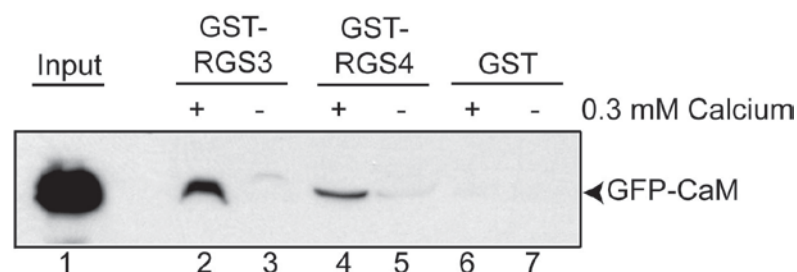


Abb. 4-6 Ca^{2+} -abhängige Interaktion von CaM mit GST-RGS3 und GST-RGS4: An einer GSH-Matrix wurden folgende GST-Fusionsproteine immobilisiert: GST-RGS3, GST-RGS4 und GST. Diese wurden mit Homogenat aus HEK-T-Zellen, die GFP-CaM exprimierten, in Anwesenheit von entweder Ca^{2+} (0.3 mM) oder EGTA (5 mM) 2 h (4°C) inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit Proteinprobenpuffer von der Matrix eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western Blot mit anti-GFP-Antikörper analysiert. Input: 10% des HEK-T-Homogenates, das pro Ansatz verwendet wurde. GFP-CaM wurde in Anwesenheit von Ca^{2+} mit GST-RGS3 und GST-RGS4, jedoch nicht mit GST kopräzipitiert.

4.1.5.2. Einfluss von Ca^{2+} /CaM auf die Bindung des mGluR7a an GST-RGS3 bzw. GST-RGS4

Die Ergebnisse des vorangegangenen Experiments haben gezeigt, dass GST-RGS3 und GST-RGS4 in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen schwächer mit mGluR7a interagieren (siehe 4.1.4.). Deshalb wurde postuliert, dass Ca^{2+} /CaM durch seine Bindung an den CT des Rezeptors und/oder an die RGS-Proteine für die Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 ein sterisches Hindernis darstellen könnte.

Im distalen Bereich des mGluR7a-CT wird das PDZ-Protein PICK1 gebunden, das durch Dimerisierung und Interaktion mit Proteinkinase C (PKC) den Rezeptor mit der PKC koppelt (Staudinger *et al.*, 1995; Staudinger *et al.*, 1997; Dev *et al.*, 2000). Dies fördert die Phosphorylierung von Serin 862 im CT des Rezeptors. Dieser Serinrest befindet sich im Zentrum der Bindungssequenz für CaM (siehe Abb. 4-7) (Sorensen *et al.*, 2002; El Far *et al.*, 2001, Airas *et al.*, 2001) und seine Phosphorylierung blockiert die Bindung von Ca^{2+} /CaM an den CT des Rezeptors. Durch Substitution des Serins 862 durch Glutamat, das aufgrund seiner negativen Seitenkette einen phosphorylierten Serinrest imitiert, entsteht ein an dieser Stelle „konstitutiv phosphorylierter“ Rezeptor (siehe Abb. 4-7). Diese Rezeptor-Mutante kann keine Interaktion mit Ca^{2+} /CaM über den CT eingehen, wodurch ein „ Ca^{2+} /CaM-freier“ Rezeptor entsteht.

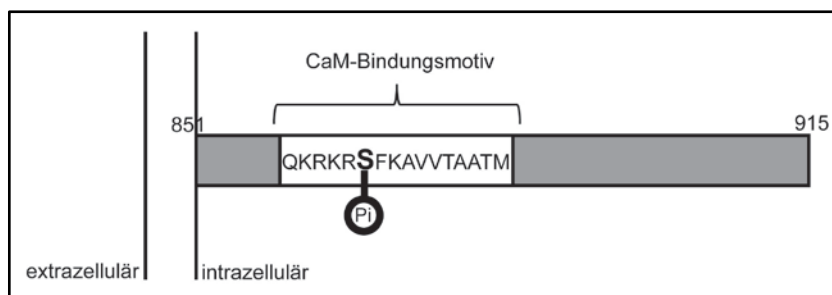


Abb. 4-7 Schematische Darstellung des mGluR7a-CT: Der intrazelluläre mGluR7a-CT, der aus den Aminosäuren 815-951 des Rezeptors besteht, ist schematisch dargestellt. Das CaM-Bindungsmotiv ist gekennzeichnet. Das Serin an Position 862 ist im phosphorylierten Status dargestellt (verändert nach El Far und Betz, 2002).

Diese mGluR7a-S862E-Mutante wurde hier herangezogen, um die Hypothese einer räumlichen Hinderung der Wechselwirkung zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 durch C-terminal gebundenes Ca^{2+} /CaM zu untersuchen. Träfe diese Hypothese zu, so sollten RGS3 und RGS4 mit dieser „ Ca^{2+} /CaM-freien“ mGluR7a-Mutante effizienter interagieren können als mit dem Wildtyp-Rezeptor. Um dies zu überprüfen, wurden an einer GSH-Matrix immobilisiertes GST-RGS3 bzw. GST-RGS4 mit Homogenat aus HEK-T-Zellen, die entweder mit dem mGluR7a-WT- oder dem mGluR7a-S862E-Konstrukt transient transfiziert worden waren, inkubiert. Diese Experimente erfolgten in Anwesenheit von Ca^{2+} (0.3 mM),

sodass $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ an die RGS-Proteine sowie an den CT des Wildtyp-Rezeptors binden sollte. Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem anti-mGluR7a-Antikörper.

GST-RGS4 zeigte das aufgrund der Hypothese erwartete Bindungsverhalten: GST-RGS4 wechselwirkte effizienter mit der mGluR7a-Mutante als mit dem WT-Rezeptor (siehe Abb. 4-8, A, Spuren 5 und 6). Eine densitometrische Analyse der Proteinbanden ergab, dass die doppelte Menge des Wildtyprezeptors im Vergleich zur Mutante präzipitiert wurde. Diese Daten weisen daraufhin, dass an den Rezeptor gebundenes $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ein räumliches Hindernis für die Interaktion mit RGS4 darstellen könnte.

GST-RGS3 wies jedoch andere Eigenschaften auf: mGluR7a-WT wurde wirksamer mit GST-RGS3 kopräzipitiert als die „ $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -freie“ mGluR7a-Mutante (siehe Abb. 4-8, A, Spuren 3 und 4). Somit scheint an den Rezeptor gebundenes $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ die Bindung von RGS3 an den Rezeptor nicht zu behindern, sondern eventuell zu vermitteln bzw. zu fördern.

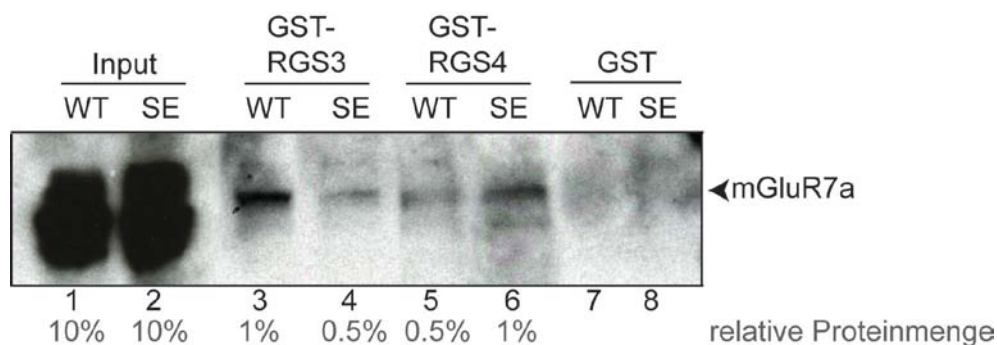


Abb. 4-8 Effekt der S862E-Substitution auf die Interaktion zwischen mGluR7a und GST-RGS3 bzw. GST-RGS4: An einer GSH-Matrix wurden folgende GST-Fusionsproteine immobilisiert: GST-RGS3, GST-RGS4 und GST. Diese wurden mit Homogenaten aus HEK-T-Zellen, die entweder Wildtyp-mGluR7a (WT) oder mGluR7a-S862E (SE) exprimierten, 2 h (4°C) inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit Proteinprobenpuffer von der Matrix eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western Blot mit anti-mGluR7a-Antikörper analysiert. Input: 10% des HEK-T-mGluR7a-Homogenates, das pro Ansatz verwendet wurde. Die Prozentzahlen (grau) geben die Menge (bezogen auf den Input) an präzipitiertem Protein an (densitometrische Analyse der Proteinbanden). GST-RGS4 interagiert effizienter mit mGluR7a-S862E als mit Wildtyp-mGluR7a (Spuren 3 und 4, B), während GST-RGS3 gegenteilige Bindungseigenschaften aufwies (Spuren 5 und 6, B).

4.1.6. Detaillierte Analyse der Interaktionen zwischen mGluR7a, Calmodulin und GST-RGS3

Die vorangegangene Analyse des Einflusses von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ auf die Interaktion zwischen RGS3 und mGluR7a hatte ergeben, dass GST-RGS3 effektiver mit dem Wildtyp- als der „ $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -freien“ mGluR7a-Mutante interagiert. Somit scheint in diesem Fall das am CT des Rezeptors gebundene $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ kein räumliches Hindernis für die Bindung zwischen RGS3 und mGluR7a darzustellen. Da das Experiment in Anwesenheit von Ca^{2+} stattfand,

könnte im Zellhomogenat vorhandenes $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ an das RGS3-Protein gebunden haben (siehe 4.1.5.1.), das die RGS3-mGluR7a-Interaktion beeinflusst. Es stellte sich allerdings die Frage, warum dies nicht auch für RGS4, an dessen RGS-Domäne $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ebenfalls bindet, zutrifft. Der offenkundigste Unterschied zwischen dem RGS3- und dem RGS4-Protein besteht in der Länge des N-terminalen Proteinabschnittes, der nicht die RGS-Domäne enthält (siehe Abb. 4-9). RGS4 besteht aus insgesamt 205 Aminosäuren (AS), wobei die C-terminale RGS-Domäne von den AS 58-177 gebildet wird, so dass die N-terminale Domäne lediglich aus 57 AS besteht. Das RGS3-Protein dagegen umfasst 520 AS und besitzt somit zusätzlich zur C-terminalen RGS-Domäne (AS 394-510) einen relativ langen N-terminalen Proteinabschnitt, der mehr als 300 AS umfasst. Diese N-terminale Domäne könnte dem RGS3-Protein zusätzliche Funktionen verleihen. So könnte dieser Bereich auch die Bindung an $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ und/oder mGluR7a beeinflussen bzw. vermitteln. Deshalb wurden die C-terminale (AS 314-520) (RGS3-CT) und die N-terminale (AS 1-313) (RGS3-NT) Proteinhälfte des RGS3-Proteins (siehe Abb. 4-9) getrennt voneinander bezüglich ihrer Wechselwirkungen mit mGluR7a und mit $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ untersucht. Hierzu wurden die beiden Fragmente als GST- und als His₆-markierte Proteine kloniert (GST-RGS3-CT, GST-RGS3-NT, His₆-RGS3-CT und His₆-RGS3-NT) in Bakterien exprimiert und mittels GST-Kopräzipitation analysiert.

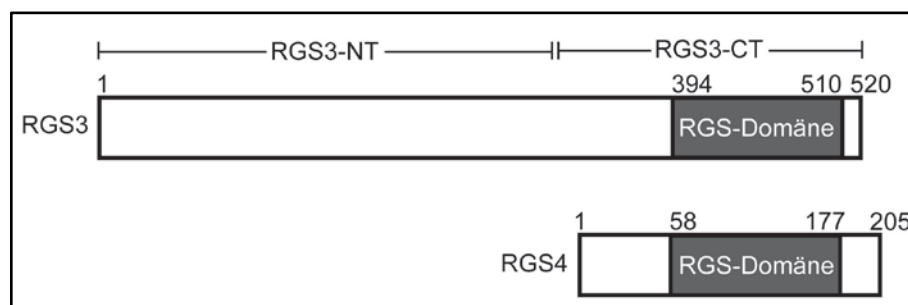


Abb. 4-9 Schematische Darstellung des RGS3- und RGS4-Struktur: RGS3 und RGS4 sind schematisch dargestellt. Die Zahlen zeigen die Aminosäurepositionen an. Die RGS-Domäne ist grau unterlegt. Die N- (NT) sowie C-terminale (CT) Abschnitte des RGS3-Proteins, die als GST- und His₆-markierte Proteine kloniert wurden, sind eingezeichnet.

4.1.6.1. Calciumabhängige Interaktion zwischen GST-RGS3-NT bzw. GST-RGS3-CT mit mGluR7a und Calmodulin

Zunächst wurde untersucht, ob die N-terminale und die C-terminale Hälfte des RGS3-Proteins mit dem Rezeptor und/oder $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ interagieren und inwieweit diese Interaktionen Ca^{2+} -abhängig sind. Hierzu wurden an einer GSH-Matrix immobilisiertes GST-RGS3-CT bzw. GST-RGS3-NT mit Homogenat aus HEK-mGluR7a-Zellen oder aus HEK-T-Zellen, die transient mit einem GFP-CaM-Konstrukt transfiziert worden waren, inkubiert. Als Positivkontrolle wurde auch das GST-Fusionsprotein des gesamten RGS3-Proteins eingesetzt (RGS3-FL). Zur Analyse des Effektes der Ca^{2+} -Ionen auf die Bindung erfolgten

die Experimente sowohl in Anwesenheit von Ca^{2+} (0.3 mM) als auch in Ca^{2+} -freiem Milieu (5 mM EGTA). Die Analyse präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem anti-mGluR7a- bzw. anti-GFP-Antikörper.

Sowohl das C-terminale als auch das N-terminale RGS3-Fragment interagiert, wie auch das Gesamtlängen-Protein, Ca^{2+} -abhängig mit dem Rezeptor: Mit beiden RGS3-Proteinhälften konnte in Abwesenheit von Ca^{2+} mGluR7a effizienter kopräzipitiert werden als in Gegenwart von Ca^{2+} (siehe Abb. 4-10, A, Spuren 6-8). Eine densitometrische Analyse der Proteinbanden ergab, dass in Ca^{2+} -freiem Milieu mit RGS3-NT und RGS3-CT sowie auch dem Gesamtlängenprotein ca. die doppelte Menge der Rezeptors gebunden wurde.

Die Analyse der Bindung von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ an die beiden RGS3-Teilstücke ergab, dass beide RGS3-Proteinhälften wie auch das Gesamtlängen-Protein von RGS3, in Anwesenheit von Ca^{2+} mit $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ interagieren (siehe Abb. 4-10, B, Spuren 2 und 4). Der hier gezeigte Immunblot des Experiments lässt die Vermutung zu, dass sich die Proteinmengen, die an das C-terminale und das N-terminale RGS3-Fragment gebunden haben, unterscheiden. Da die Proteinmengen der verschiedenen GST-RGS3-Fragmente jedoch nicht exakt aufeinander abgeglichen wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Bindung an eines der beiden Fragmente stärker war.

Zusammenfassend weisen die Daten dieser Experimente darauf hin, dass RGS3 zwei räumlich getrennte Bindungsstellen für mGluR7a und für $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ besitzt. Dies könnte eventuell erklären, weshalb RGS3 nicht - wie RGS4 - effizienter an die mGluR7a-S862E-Mutante bindet, deren CT kein $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ gebunden hat (siehe 4.1.5.2.): Durch eine Wechselwirkung mit zwei $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Proteinmolekülen zugleich könnte das RGS3-Protein möglicherweise daran gehindert werden, an den mutierten Rezeptor, dessen CT kein $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ gebunden hat und somit frei zugänglich ist, zu binden. Die räumliche Hinderung durch zwei $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Moleküle könnte von solchem Ausmaß sein, dass es, um eine starke Bindung von RGS3 an mGluR7a zu erwirken, nicht ausreicht, das an den Rezeptor gebundene $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ zu entfernen. Nur die Dissoziation von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ von RGS3 und vom Rezeptor in Abwesenheit von Ca^{2+} würde demnach eine effiziente Interaktion zwischen RGS3 und mGluR7a ermöglichen (siehe 4.1.4.).

-----ERGEBNISSE-----

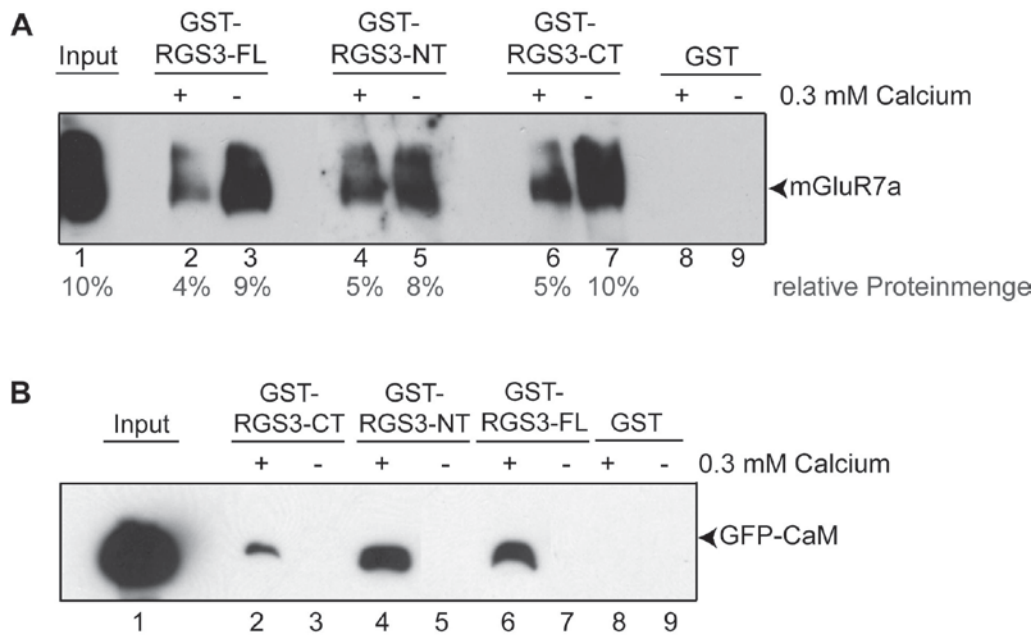


Abb. 4-10 Ca²⁺-abhängige Interaktion von GST-RGS3-CT und GST-RGS3-NT mit mGluR7a und GFP-CaM: An einer GSH-Matrix wurden folgende GST-Fusionsproteine immobilisiert: GST-RGS3-FL, GST-RGS3-CT, GST-RGS3-NT und GST. Diese wurden mit Homogenat aus HEK-mGluR7a-Zellen (**A**) oder aus HEK-T-Zellen, die transient GFP-CaM exprimierten (**B**), 2 h (4°C) inkubiert. Die Experimente erfolgten jeweils in Anwesenheit von entweder Ca²⁺ (0.3 mM) oder EGTA (5 mM). Die präzipitierten Proteine wurden mit Proteinprobenpuffer von der Matrix eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western Blot mit anti-mGluR7a- (**A**) bzw. anti-GFP-Antikörper (**B**) analysiert. Input: 10% des HEK-mGluR7a-Homogenates, das pro Ansatz verwendet wurde. Die Prozentzahlen (grau) geben die relative Menge (bezogen auf den Input) an präzipitiertem Protein an (densitometrische Analyse der Proteinbanden). MGlur7a wurde stärker in Anwesenheit von EGTA mit GST-RGS3-FL, GST-RGS3-CT und GST-RGS3-NT kopräzipitiert (Spuren 3, 5 und 7) (**A**). Es erfolgte keine Bindung an GST (Spuren 8 und 9) (**A**). GFP-CaM wurde in Anwesenheit von Ca²⁺ mit GST-RGS3-FL, GST-RGS3-CT und GST-RGS3-NT, jedoch nicht mit GST kopräzipitiert (**B**).

4.1.6.2. Interaktion des His₆-RGS3-NT bzw. His₆-RGS3-CT mit den RGS-Bindungsdomänen des mGluR7a

Weiterhin stellte sich nun die Frage, welche der beiden RGS3-Hälften an welche Bereiche des mGluR7a-Proteins bindet. Die vorangehenden Experimente hatten gezeigt, dass RGS3 sowohl mit dem CT als auch der intrazellulären Schleife 2 (iLoop2) des Rezeptors wechselwirken kann (siehe 4.1.2.). Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob die N-terminale und die C-terminale Hälfte des RGS3-Proteins mit einer oder möglicherweise beiden RGS-Bindungsdomänen des mGluR7a interagieren können. Hierfür wurden an einer GSH-Matrix immobilisierte GST-Fusionsproteine des mGluR7a-CT, mGluR7a-iLoop2 und mGluR7a-iLoop3 mit den bakteriell exprimierten Proteinen His₆-RGS3-CT oder His₆-RGS3-NT inkubiert. Die Auswertung der präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem anti-His₆-Antikörper.

Der N-terminale Abschnitt des RGS3-Proteins kopräzipitierte sowohl mit GST-mGluR7a-CT (siehe Abb. 4-11, A, Spur 2) als auch mit GST-mGluR7a-iLoop2 (siehe Abb. 4-11, A,

-----ERGEBNISSE-----

Spur 3). Der hier gezeigte Immunblot des Experiments lässt die Vermutung zu, dass sich die Proteinmengen, die an den CT und die intrazellulären Schleife 2 des mGluR7a gebunden haben unterscheiden. Da die Proteinmengen der verschiedenen GST-mGluR7a-Fragmente jedoch nicht exakt aufeinander abgeglichen wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Bindung an eines der beiden Rezeptorfragmente stärker war.

Dagegen interagierte die C-terminale Hälfte von RGS3 nur mit GST-mGluR7a-CT, wobei diese Bindung sehr effizient war, wie eine densitometrische Analyse der Proteinbanden ergab (siehe Abb. 4-11, B, Spur 2).

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Interaktion zwischen RGS3 und mGluR7a hauptsächlich durch die Wechselwirkungen der N- sowie C-terminalen RGS-Proteinhälfte mit dem CT des mGluR7a vermittelt wird. Diese Bindung scheint durch eine zusätzliche Wechselwirkung zwischen dem N-terminalen RGS3-Abschnitt, der nicht die RGS-Domäne beinhaltet, und der intrazellulären Schleife 2 des Rezeptors, unterstützt zu werden.

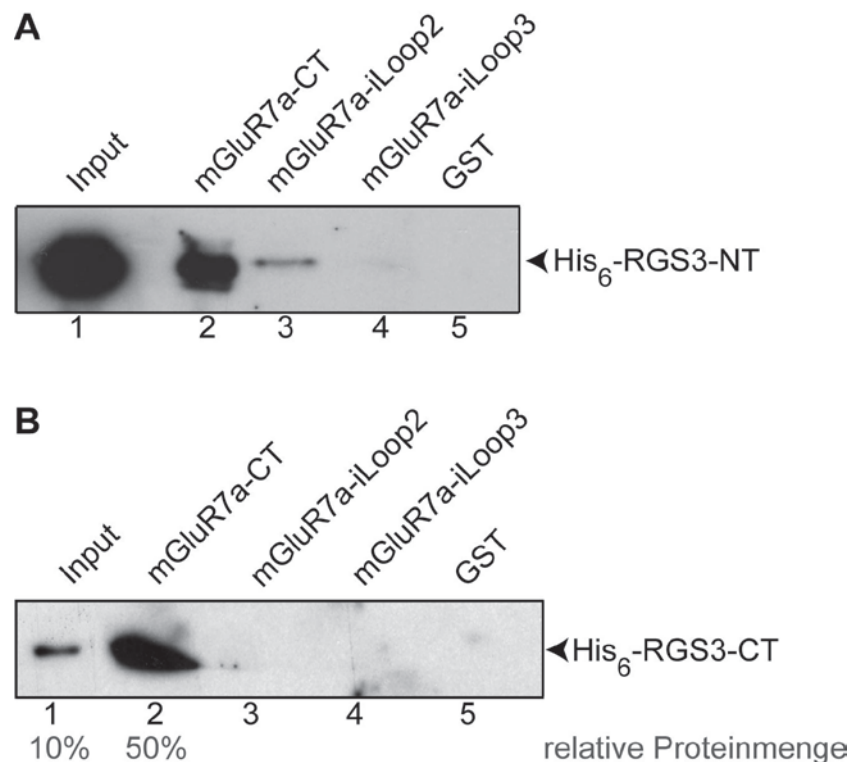


Abb. 4-11 Interaktion des His₆-RGS3-NT bzw. His₆-RGS3-CT mit den RGS-Bindungsdomänen des mGluR7a: An einer GSH-Matrix wurden folgende GST-Fusionsproteine immobilisiert: GST-mGluR7a-CT, GST-mGluR7a-iLoop2, GST-mGluR7a-iLoop3 und GST. Diese wurden mit bakteriell exprimierten His₆-RGS3-NT (**A**) oder His₆-RGS3-CT (**B**) 2 h (4°C) inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit Proteinprobenpuffer von der Matrix eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western Blot mit anti-His-Antikörper analysiert. Input: 10% des His₆-Proteinlysates, das pro Ansatz verwendet wurde. Die Prozentzahlen (grau) geben die relative Menge (bezogen auf den Input) an präzipitiertem Protein an (densitometrische Analyse der Proteinbanden). His₆-RGS3-NT konnte mit GST-mGluR7a-CT (A, Spur 2) und GST-mGluR7a-iLoop2 (A, Spur 3), aber nicht mit GST-mGluR7a-iLoop3 und GST (A, Spuren 4 und 5) kopräzipitiert werden. Dagegen wurde His₆-RGS3-CT nur mit GST-mGluR7a-CT kopräzipitiert (**B**) (Spur 2), jedoch nicht mit GST-mGluR7a-iLoop2, -iLoop3 und GST (B, Spuren 3, 4 und 5)

4.2. Effekt der RGS-Proteine auf die mGluR7a-vermittelte Signaltransduktion in HEK-Zellen

Nachdem die Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 gezeigt und charakterisiert worden war (siehe 4.1.), sollte im Folgenden untersucht werden, ob die RGS-Proteine einen physiologisch nachweisbaren Effekt auf die mGluR7a-vermittelte Signalübertragung haben. Hierzu wurde die Signaltransduktion in HEK-mGluR7a-Zellen in An- und Abwesenheit der RGS-Proteine gemessen.

4.2.1. Effekt von RGS-Proteinen auf die umgeleitete mGluR7a-vermittelte Inositolphosphat-Signalkaskade

Die Inositolphosphat (InsP)-Kaskade wird durch das G-Protein $G\alpha_q$ vermittelt. Stimulation eines GPCR, der an $G\alpha_q$ koppelt, führt zur Aktivierung der Phospholipase C, die die Produktion von InsP katalysiert. Dieses Enzym spaltet Phosphatidyl-myoinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diazylglyzerin und myo-Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). IP_3 wird anschließend durch Kinasen und Phosphatasen in myo-Inositol-1,4-diphosphat (IP_2) und in myo-Inositol-4-monophosphat (IP) umgewandelt. Da mGluR7a jedoch an $G\alpha_{i1}$ koppelt und somit sein Signal über die cAMP-Kaskade transduziert (Pin und Duvoisin, 1995), war eine Umleitung auf den InsP-Weg notwendig. Hierzu wurde ein chimäres G_q -Protein herangezogen, das durch mGluR7a aktiviert werden kann und so die Stimulierung der InsP-Kaskade induziert (Conklin *et al.* 1993). Bei diesem $G\alpha_q$ -Protein sind die letzten 3 C-terminalen AS, die die spezifische Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor vermitteln, durch eine Sequenz ersetzt worden, die von mGluR7a erkannt wird. Es wurde gezeigt, dass bei $G\alpha_q$ durch die Substitution dieser 3 Aminosäurereste mit denen des $G\alpha_z$ -Proteins ($G\alpha_{q/z}$ -Chimäre) eine Bindung an Rezeptoren, die natürlicherweise an G_i oder G_o koppeln, erreicht wird. Durch Expression dieser $G\alpha_{q/z}$ -Chimäre in HEK-mGluR7a-Zellen kann mGluR7a die InsP-Kaskade nutzen und die Produktion der InsP (IP_3 , IP_2 und IP) induzieren. Da RGS-Proteine mittels ihrer GAP-Funktion die GTP-Hydrolyse an der $G\alpha$ -UE und damit die Inaktivierung dieser UE beschleunigen, können sie eine rasche Termination der Signaltransduktion bewirken. Somit sollte die zusätzliche Expression eines RGS-Proteins, das mGluR7a bzw. dessen gekoppelte $G\alpha$ -UE (hier: $G\alpha_{q/z}$ -Chimäre) regulieren kann, in diesem Experiment dazu führen, dass die InsP-Signalkaskade schnell beendet wird, so dass weniger InsP gebildet werden.

Um zu untersuchen, ob RGS3 und RGS4 sowie einige weitere RGS-Proteine (2, 7, 8 und 10) einen hemmenden Effekt auf die mGluR7a-vermittelte Signalübermittlung ausüben können, wurden HEK-mGluR7a-Zellen mit dem chimären $G_{q/z}$ - und einem GFP-RGS-Konstrukt oder nur GFP als Negativkontrolle kotransfiziert. Nach 24 h wurden die

transfizierten Zellen über Nacht mit radioaktiv markiertem myo-[³H]-Inositol (1 µCi/ml) inkubiert. Durch den Einbau dieses Inositols in die Zellmembranen wird radioaktiv markiertes PIP₂ gebildet. Wird in diesen Zellen die InsP-Kaskade stimuliert, so wird durch die aktive Phospholipase C dieses PIP₂ in Diazylglyzerin und IP₃ gespalten, die nun die radioaktive Markierung tragen. Die Zellen wurden nach der über Nacht Inkubation myo-[³H]-Inositol mit dem Gruppe III mGluR-spezifischen Agonisten L-AP4 (1 mM) stimuliert, um mGluR7a zu aktivieren. Anschließend wurden die membranhaltigen und die zytosolischen Zellfraktionen voneinander getrennt. Als Referenzwert wurde die gesamte Radioaktivität in den solubilisierten Membranen bestimmt. Die freien InsP (IP₃, IP₂ und IP) wurden aus dem zytosolischen Lysat isoliert und anschließend deren Radioaktivität gemessen. Die Ergebnisse wurden als die Menge an produzierten InsP (entspricht der Radioaktivität in der InsP-Fraktion) im Verhältnis zum Referenzwert (entspricht der gesamten Radioaktivität in der Membranfraktion) dargestellt.

4.2.1.1. Untersuchung der Effekte verschiedener RGS-Proteine auf die mGluR7a-vermittelte Inositolphosphatproduktion

Zunächst wurde der Effekt von acht verschiedenen RGS-Proteinen auf die mGluR7a-vermittelte InsP-Kaskade untersucht. Hierzu wurden HEK-mGluR7a-Zellen mit dem chimären $\alpha_{q/z}$ -Konstrukt und mit einem der folgenden GFP-markierten Konstrukte kotransfiziert: GFP-RGS2, GFP-RGS3, GFP-RGS4, GFP-RGS7, GFP-RGS8, GFP-RGS10 oder nur GFP (Negativkontrolle). Die Zellen wurden wie oben beschrieben behandelt, und nach Stimulation für 20 min mit L-AP4 (1 mM) wurden die intrazellulären InsP-Konzentrationen in den verschiedenen Ansätzen bestimmt und miteinander verglichen. Proben mit einem RGS-Protein, das die mGluR7a-Signaltransduktion beeinflussen kann, sollten aufgrund der GAP-Aktivität des Proteins eine geringere InsP-Menge aufweisen.

RGS2, RGS3 und RGS4 beeinflussten die mGluR7a-vermittelte InsP-Signalübermittlung, da in deren Anwesenheit statistisch signifikant weniger InsP gebildet wurde als in der Negativkontrolle (GFP) (siehe Abb. 4-12). RGS7 und RGS8 zeigten keinen Effekt, während in Gegenwart von RGS10 eine leicht erhöhte InsP-Konzentration gemessen wurde.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass RGS2, RGS3 und RGS4 die mGluR7a-vermittelte Signalübermittlung regulieren können. RGS2 ist jedoch kein geeigneter Kandidat für die *in vivo* mGluR7a-Signalübertragung, die durch α_i vermittelt wird, da RGS2 selektiv nur mit $G\alpha_q$ und nicht mit $G\alpha_i$ interagiert (Soundararajan *et al.*, 2008). Dagegen können RGS3 und RGS4 sowohl mit $G\alpha_q$ als auch mit $G\alpha_i$ wechselwirken (Soundararajan *et al.*, 2008), was dafür spricht, dass diese beiden RGS-Proteine auch die *in vivo*-Signaltransduktion beeinflussen können. Da für RGS3 und RGS4 die Interaktion mit mGluR7a gezeigt wurde (siehe 4.1.), konzentrieren sich alle folgenden Untersuchungen auf

diese beiden RGS-Proteine.

Dass in Anwesenheit von RGS10 mehr sekundärer Botenstoff gebildet wurde als ohne RGS-Protein weist daraufhin, dass dieses RGS-Protein nicht - wie erwartet - die GTP-Hydrolyse an der $G\alpha$ -UE und damit die Inaktivierung dieser UE beschleunigt sondern verhindert, so dass mehr InsP produziert werden kann.

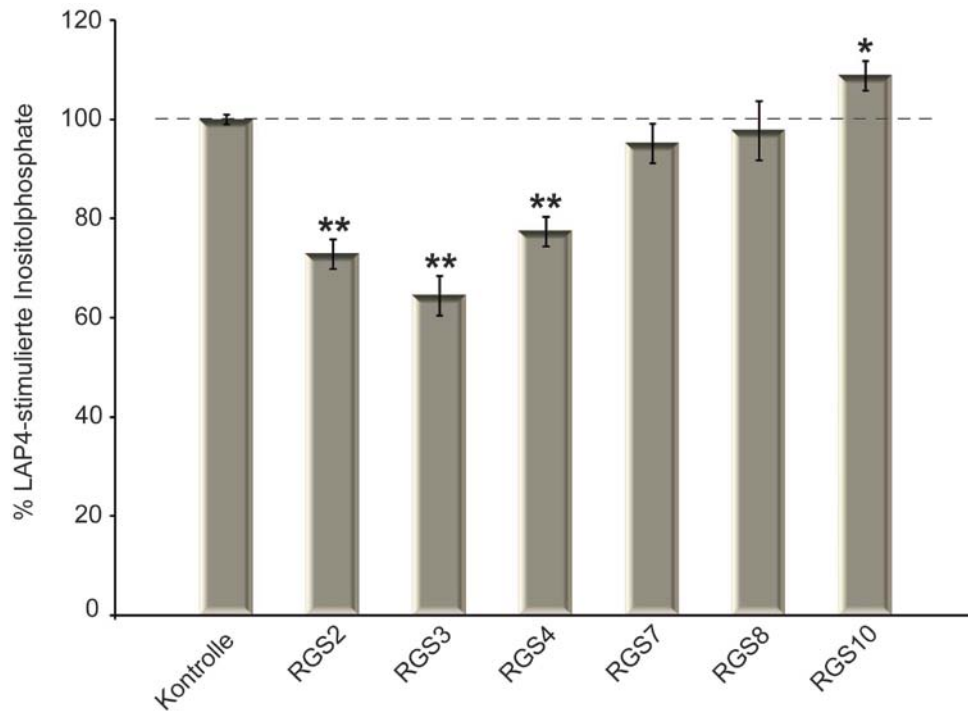


Abb. 4-12 Effekte verschiedener RGS-Proteine auf die mGluR7a-vermittelte Inositolphosphatproduktion in HEK-Zellen: HEK-mGluR7a-Zellen wurden mit dem chimären $G\alpha_{q/z}$ und je einem GFP-RGS-Konstrukt bzw. nur GFP (Negativkontrolle) kotransfiziert. Nach 24 h wurden diese Zellen über Nacht mit myo- $[^3H]$ -Inositol (1 μ Ci/ml) inkubiert. Nach weiteren 24 h wurden sie 20 min mit L-AP4 (1 mM) stimuliert. Es wurde für jeden Ansatz die Radioaktivität im Membrananteils (als Referenzwert) und in der aufgereinigten InsP-Fraktion bestimmt. Die Ergebnisse wurden als die Menge an produzierten InsP (entspricht der Radioaktivität in der InsP-Fraktion) im Verhältnis zum Referenzwert (entspricht der Radioaktivität in der Membranfraktion) dargestellt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten mit je 3 Replikaten pro Ansatz dar (+/- SEM; * = $p < 0.01$; ** = $p < 0.001$). RGS2, RGS3, RGS4 und RGS10 zeigten einen signifikanten Effekt auf die mGluR7a-vermittelte InsP-Produktion.

4.2.1.2. Analyse von GAP-inaktiven RGS3- und RGS4-Mutanten

Im Folgenden wurde untersucht, ob der Effekt von RGS3 bzw. RGS4 auf die mGluR7a-vermittelte InsP-Kaskade (siehe 4.2.1.1.) allein auf der GAP-Aktivität der beiden Proteine beruht. Hierzu wurden bereits beschriebene GAP-inaktive RGS3- bzw. RGS4-Mutanten herangezogen, die nicht an die $G\alpha_{i1}$ -UE binden können und keine GAP-Aktivität besitzen (Scheschonka *et al.*, 2000; Druey und Kehrl, 1997).

Analog zu den publizierten Mutationen wurden Aminosäuresubstitutionen mittels Mutagenese-PCR in die GFP-RGS-Konstrukte eingeführt. In den beiden Mutanten RGS3-

E419A/N420A (EN) und RGS4-N88S (N) erfolgten die Punktmutationen in einem Bereich der RGS-Domäne, der mit dem *Switch* 1 und 2 der $G\alpha_{i1}$ -UE interagieren (Tesmer *et al.*, 1997) (siehe Abb. 4-13). Dagegen befinden sich die Mutationen bei den Konstrukten RGS3-R499A/F500A (RF) und RGS4-S164Q (S) in einem Abschnitt der RGS-Domäne, der nur mit dem *Switch* 1 der $G\alpha_{i1}$ -UE wechselwirkt (siehe Abb. 4-13).

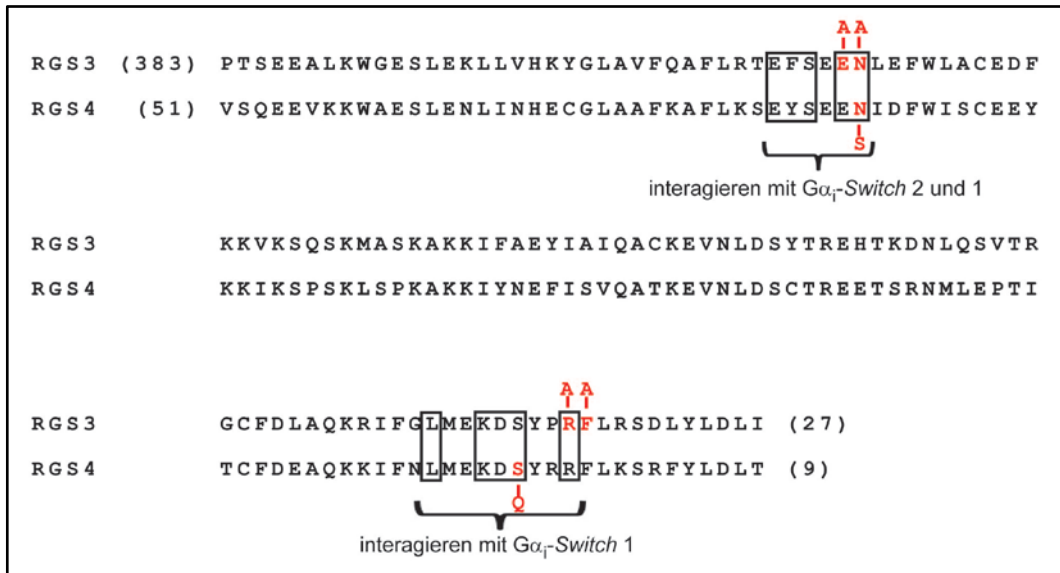


Abb. 4-13 Lokalisation der GAP-inaktivierenden Mutationen innerhalb der RGS-Domänen von RGS3 und RGS4: Dargestellt sind die AS-Sequenzen der RGS-Domänen von RGS3 (AS 394-510) und RGS4 (AS 58-177). Die rot-markierten AS wurden mittels Mutagenese-PCR durch die angegebenen AS substituiert. Die schwarzen Rahmen kennzeichnen die AS, die direkt mit dem *Switch* 1 und/oder 2 der $G\alpha_{i1}$ -UE wechselwirken. Die Zahlen in den Klammern geben die AS-Position an (verändert nach Tesmer *et al.*, 1997).

Vermittelt allein die GAP-Aktivität den Effekt von RGS3 und RGS4 auf die Signaltransduktion des mGluR7a, so sollten die GAP-inaktiven Mutanten der beiden Proteine keinen Einfluss darauf nehmen können. Je eine der Mutanten oder das Wildtyp-Protein als Kontrolle wurde mit dem chimären $G_{q/z}$ -Protein in HEK-mGluR7a-Zellen koexprimiert und diese anschließend wie oben beschrieben behandelt. Nach Stimulation mit L-AP4 (1 mM) wurde die intrazelluläre InsP-Konzentration in den verschiedenen Ansätzen bestimmt und miteinander verglichen.

Die Inaktivierung der GAP-Aktivität des RGS3- und des RGS4-Proteins führte dazu, dass diese im Vergleich zu den Wildtyp-Proteinen keinen Einfluss auf die mGluR7a-vermittelte InsP-Produktion (siehe Abb. 4-14) nehmen konnten. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass RGS3 und RGS4 die Signaltransduktion des mGluR7a allein durch die GAP-Aktivität regulieren.

Nur eine der beiden RGS3-Mutanten (RGS3-EN) übte einen geringen Effekt aus, der jedoch verglichen mit dem RGS3-Wildtyp stark reduziert war. Eventuell ist bei dieser Mutation noch eine geringe Interaktion mit der $G\alpha$ -UE möglich, so dass RGS3 einen

messbaren Effekt auf die GTP-Hydrolyse an der $G\alpha$ -UE ausüben kann.

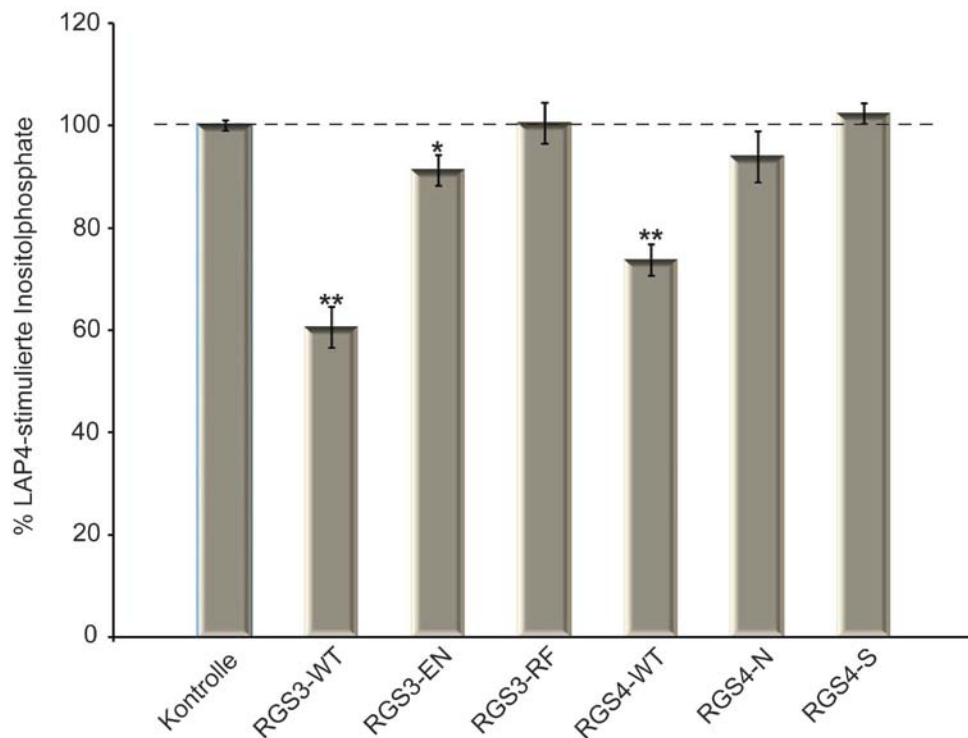


Abb. 4-14 Analyse der GAP-inaktiven RGS3- bzw. RGS4-Mutanten: HEK-mGluR7a-Zellen wurden mit dem chimären $G\alpha_{q/z}$ -Konstrukt und einem Konstrukt eines GFP-RGS-Wildtyp (RGS-WT)-Proteins bzw. einer GAP-inaktiven GFP-RGS-Mutante (RGS3-EN bzw. RGS3-RF, RGS4-N bzw. RGS4-S) kotransfiziert. Nach 24 h in Kultur wurden die Zellen über Nacht mit myo- ^3H -Inositol (1 $\mu\text{Ci/ml}$) inkubiert. Nach weiteren 24 h wurden sie 20 min mit L-AP4 (1 mM) stimuliert. Es wurde für jeden Ansatz die Radioaktivität im Membrananteil (als Referenzwert) und in der aufgereinigten InsP-Fraktion bestimmt. Die Ergebnisse wurden als die Menge an produzierten InsP (entspricht der Radioaktivität in der InsP-Fraktion) im Verhältnis zum Referenzwert (entspricht der Radioaktivität in der Membranfraktion) dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten mit je 3 Replikaten pro Ansatz dar (+/- SEM; * = $p < 0.01$; ** = $p < 0.001$). Die GAP-inaktiven Mutanten RGS3-EN, RGS4-N und RGS4-S zeigten keinen Effekt auf die mGluR7a-Signaltransduktion. Die RGS3-RF-Mutante reduzierte die Signalübermittlung nur wenig im Vergleich zum Wildtyp-Protein.

4.2.2. Effekt von RGS3 bzw. RGS4 auf die mGluR7a-vermittelte cAMP-Signaltransduktion

MGluR7a koppelt *in vivo* an $G\alpha_{i1}$, so dass das Signal über die cAMP-Kaskade in die Zelle transduziert wird (Pin und Duvoisin, 1995): Wird der Rezeptor und somit auch seine $G\alpha_{i1}$ -UE stimuliert, so erfolgt eine Hemmung der Adenylatzyklase, wodurch der cAMP-Spiegel in der Zelle sinkt. Die GAP-Aktivität eines RGS-Proteins, das den Rezeptor beeinflussen kann, würde dazu führen, dass die $G\alpha_{i1}$ -UE inaktiviert und somit die Hemmung der Adenylatzyklase schnell beendet wird, wodurch wieder cAMP produziert werden kann. Mittels einer cAMP-Analyse wurde hier untersucht, ob RGS3 und RGS4 Einfluss auf diesen natürlich vorkommenden Signalübertragungsweg nehmen. Dabei wurde versucht zu zeigen,

dass die beiden RGS-Proteine diesen Effekt erreichen, indem sie durch ihre GAP-Aktivität das durch mGluR7a aktivierte $G\alpha_{i1}$ -Protein beeinflussen. Hierzu wurde eine bereits beschriebene RGS-insensitive Mutante des $G\alpha_{i1}$ -Proteins herangezogen (DiBello *et al.*, 1998; Lan *et al.*, 1998) (siehe auch 4.1.3.): Durch die Substitution eines singulären Glyzinrestes (Glyzin183) in der *Switch*-Region I des $G\alpha_{i1}$ -Proteins mit einem Serinrest bleibt die $G\alpha_{i1}$ -UE zwar voll funktionsfähig, jedoch können RGS-Proteine diese UE weder binden noch regulieren. Sofern RGS3 und RGS4 die mGluR7a-Signaltransduktion mittels ihrer GAP-Funktion regulieren, sollten sie in Anwesenheit der RGS-insensitive $G\alpha_{i1}$ -UE keinen Effekt ausüben können.

Es wurden HEK-mGluR7a-Zellen transient mit einem GFP-markierten RGS3- bzw. RGS4-Konstrukt (oder GFP als Kontrolle) und entweder dem Wildtyp (WT)- $G\alpha_{i1}$ - oder dem RGS-insensitiven (G183S)- $G\alpha_{i1}$ -Konstrukt kotransfiziert. Nach 48 h in Kultur wurde durch direkte Aktivierung der Adenylatzyklase mit Forskolin (10 μ M) die Produktion von cAMP auf das mögliche Maximum angehoben. Zugleich wurden die Zellen mit dem Gruppe III mGluR-spezifischen Agonisten L-AP4 (1 mM) stimuliert, wodurch mGluR7a aktiviert wird, was zur Inhibition der Adenylatzyklase und somit zur Hemmung der cAMP-Produktion führen sollte. Die Menge an intrazellulärem cAMP wurde mittels eines *cAMP Enzymimmunoassays* (GE Healthcare, Freiburg) gemäß den Herstellerangaben bestimmt.

In den Kontrollzellen, die mit einem GFP- und dem Wildtyp (WT)- $G\alpha_{i1}$ -Konstrukt kotransfiziert wurden, erfolgte nach Aktivierung der Adenylatzyklase eine deutliche Zunahme der cAMP-Konzentration (siehe Abb. 4-15, A). Diese cAMP-Erhöhung konnte durch Aktivierung des mGluR7a mit L-AP4 (1 mM) inhibiert werden, so dass die intrazelluläre cAMP-Konzentration um 48% reduziert wurde (diese Reduktion entspricht im Folgenden einer hundertprozentigen Inhibition der Adenylatzyklase). Die gleichen Ergebnisse wurden auch mit dem RGS-insensitiven $G\alpha_{i1}$ erhalten (Daten nicht gezeigt). In Anwesenheit von RGS3 bzw. RGS4 und der Wildtyp- $G\alpha_{i1}$ -UE wurde eine Reduktion des inhibierenden mGluR7a-Effektes um ca. 20% gemessen (siehe Abb. 4-15, B). Die beiden RGS-Proteine beeinflussten die mGluR7a-vermittelte Hemmung der cAMP-Produktion jedoch nicht in Anwesenheit der RGS-insensitiven $G\alpha_{i1}$ -UE.

Diese Daten lassen darauf schließen, dass RGS3 und RGS4 die *in vivo* vorkommende mGluR7a-Signaltransduktion beeinflussen können. Weiterhin wurde in diesem Test bestätigt, dass die Wirkung der beiden RGS-Proteine die GAP-Aktivität erfordert, da sie in Gegenwart der RGS-insensitiven $G\alpha_{i1}$ -Mutante die Signalübermittlung des mGluR7a nicht beeinflussten. Daraus lässt sich schließen, dass die beiden RGS-Proteine die mGluR7a-Signalübermittlung beeinflussen, indem sie die Inaktivierung der gekoppelten $G\alpha_{i1}$ -UE beschleunigen.

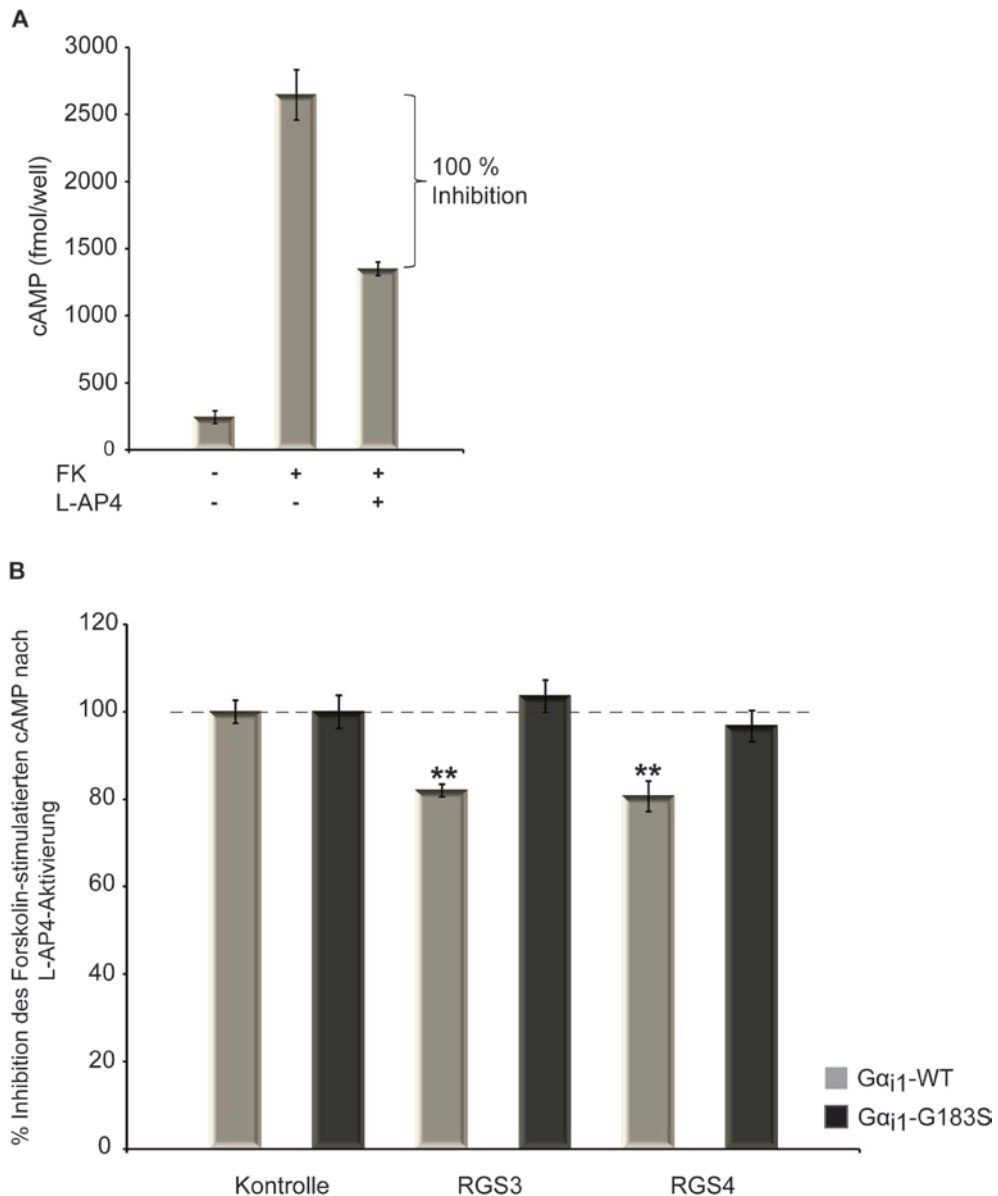


Abb. 4-15 Effekt von RGS3 bzw. RGS4 auf die mGluR7a-vermittelte cAMP-Signaltransduktionskaskade: Zur Kontrolle wurden HEK-mGluR7a-Zellen mit GFP und dem Wildtyp (WT)-Gα_{i1}-Konstrukt kotransfiziert **(A)**. Zur Analyse des RGS-Effektes wurden HEK-mGluR7a-Zellen mit einem GFP-markierten RGS3- bzw. RGS4-Konstrukt und entweder dem WT- oder RGS-insensitiven (G183S)-Gα_{i1}-Konstrukt kotransfiziert **(B)**. Nach 48 h erfolgte die Aktivierung der Adenylatzyklase mit Forskolin (10 μM) und zugleich die Stimulation des Rezeptors für 15 min mit L-AP4 (1 mM). Der Abbau von produziertem cAMP wurde durch Anwesenheit von IBMX (0.75 mM) inhibiert. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde mittels *cAMP-Enzymimmunoassays* (GE Healthcare, Freiburg) bestimmt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 4 Replikaten pro Ansatz dar (+/- SEM; * = p<0.01; ** = p<0.001). Die Aktivierung des mGluR7a bewirkte eine Reduktion der Forskolin-stimulierten cAMP-Menge um 48% **(A)**. RGS3 und RGS4 reduzieren den mGluR7a-Effekt nur in Anwesenheit des Wildtyp-Gα_i **(B)**.

4.3. Lokalisation von RGS3 und RGS4 sowie mGluR7a in kortikalen Mausneuronen

Damit die beschriebenen Interaktionen zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 (siehe 4.1.) sowie die Regulation des Rezeptors (4.2.) durch die beiden RGS-Proteine *in vivo* erfolgen können, ist es essentiell, dass diese Proteine sich am gleichen Ort befinden. Da mGluR7a präsynaptisch in der aktiven Zone lokalisiert ist (Shigemoto *et al*, 1996), sollte hier gezeigt werden, dass RGS3 und RGS4 dort ebenfalls zu finden sind.

Die detaillierte Untersuchung erfolgte mittels hochauflösender elektronenmikroskopischer Analysen von kortikalen Maushirnschnitten. Zum spezifischen Nachweis des RGS3- und des RGS4-Proteins wurden in Zusammenarbeit mit der Firma MFD Diagnostics (Mainz) polyklonale Kaninchenantikörper hergestellt.

4.3.1. Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen RGS3 und RGS4

Als Antigene zur Immunisierung von Kaninchen dienten das RGS4-Gesamtlängenprotein und die N-terminale RGS3-Proteinhälfte (AS 1-313, siehe Abb. 4-9). Diese wurden als His₆-markierte Proteine in Bakterien exprimiert und anschließend mittels Ni-NTA-Agarose unter stringenten Bedingungen aufgereinigt. Es wurden Tiere ausgewählt, deren Präimmunseren in einer Western Blot-Analyse nur geringe Hintergrundfärbungen aufgewiesen hatten. Jeweils 2 Kaninchen pro Antigen wurden fünfmal mit je 400 µg Antigen immunisiert. Die spezifischen Antikörper wurden nach Beendigung der Immunisierung aus dem Serum mittels einer Antigen-Affinitätschromatographie (wie unter 3.3.10. beschrieben) aufgereinigt.

4.3.1.1. Spezifitätsnachweis des anti-RGS3- und anti-RGS4-Antiköpers mittels Western Blot

Um die Spezifität der aufgereinigten Antikörper nachzuweisen, wurden diese zunächst in einer Western Blot-Analyse getestet. Dabei wurde überprüft, ob die Antikörper das Zielantigen, exprimiert in Bakterien oder HEK-T-Zellen, und das endogen vorkommende RGS-Protein in Hirnhomogenat erkennen. Weiterhin wurde untersucht, ob die beiden Antikörper mit RGS-Proteinen ähnlicher AS-Sequenz wie das Ziel-Antigen kreuzreagieren. Es wurden folgende Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-Blot mit dem anti-RGS3- bzw. anti-RGS4-Antikörpern analysiert (siehe Abb. 4-16, A und 4-17, A): bakterielles His₆-RGS3- und His₆-RGS4-Lysat, Homogenat aus HEK-T-Zellen transfiziert mit RGS3, RGS4, GFP, GFP-RGS2, GFP-RGS3, GFP-RGS4, GFP-RGS7, GFP-RGS8 oder GFP-RGS10, und zusätzlich Maushirnhomogenat. Zum Nachweis der Präsenz der GFP-

RGS-Proteine wurde der Blot, nach der Inkubation mit dem entsprechenden anti-RGS-Antikörper, entfärbt und erneut mit einem anti-GFP-Antikörper inkubiert (siehe Abb. 4-16, B und 4-17, B).

Sowohl mit dem RGS3- als auch mit dem RGS4-Antikörper wurde spezifisch das entsprechende Antigen in bakteriellen Lysaten sowie in Homogenaten aus transfizierten HEK-T-Zellen detektiert (siehe Abb. 4-16, A und 4-17, A). Es trat keine Kreuzreaktion mit RGS-Proteinen, die eine ähnliche AS-Sequenz wie das antigene Protein aufweisen, auf. Mit dem RGS3-Antikörper konnte auch das endogen exprimierte RGS3-Protein in Maushirnhomogenat identifiziert werden (siehe Abb. 4-16, C). Hier erkannte der Antikörper neben dem ca. 90 kDa großen RGS3 auch eine ca. 130 kDa große Protein-Isoform, wobei es sich um das PDZ-RGS3 handeln könnte, das ebenfalls endogen vorkommt (Kehrl *et al.*, 2002). Mit dem anti-RGS4-Antikörper konnte das endogene RGS4-Protein im Hirnhomogenat nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

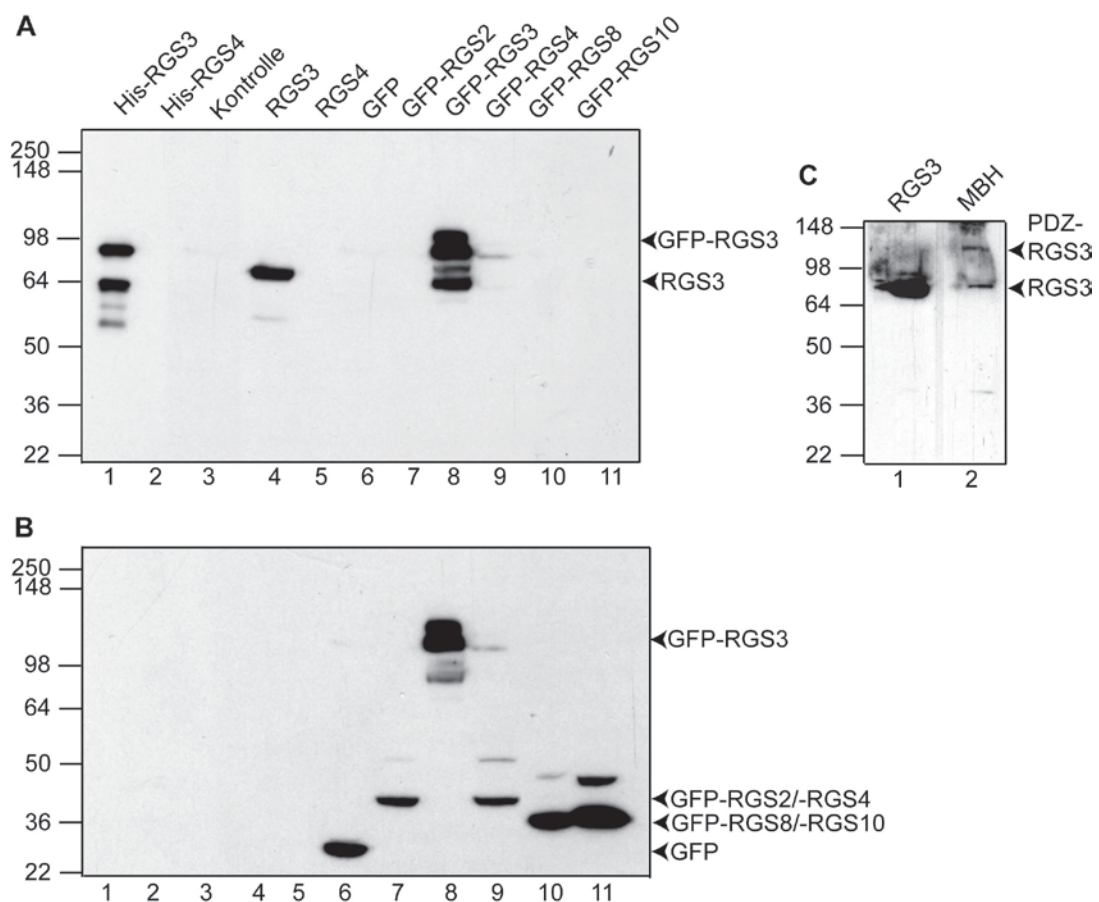


Abb. 4-16 Spezifitätsnachweis des anti-RGS3-Antikörpers mittels Western Blot: Folgende Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western Blot mit anti-RGS3-Antikörper (**A**) und nach Entfärbung des Blots mit anti-GFP-Antikörper (**B**) analysiert: bakterielles His₆-RGS3- (1) und His₆-RGS4-Lysat (2), Homogenat aus untransfizierten HEK-T-Zellen (3), Homogenat aus HEK-T-Zellen transfiziert mit RGS3 (4), RGS4 (5), GFP (6), GFP-RGS2 (7), GFP-RGS3 (8), GFP-RGS4 (9), GFP-RGS8 (10) und GFP-RGS10 (11). Zusätzlich wurde auch Maushirnhomogenat (MBH) analysiert (**C**). Mit dem anti-RGS3-Antikörper wurde spezifisch His₆-RGS3 (A, Spur 1), RGS3 (A, Spur 4), GFP-RGS3 (A, Spur 8) und endogenes RGS3 (C, Spur 2) erkannt.

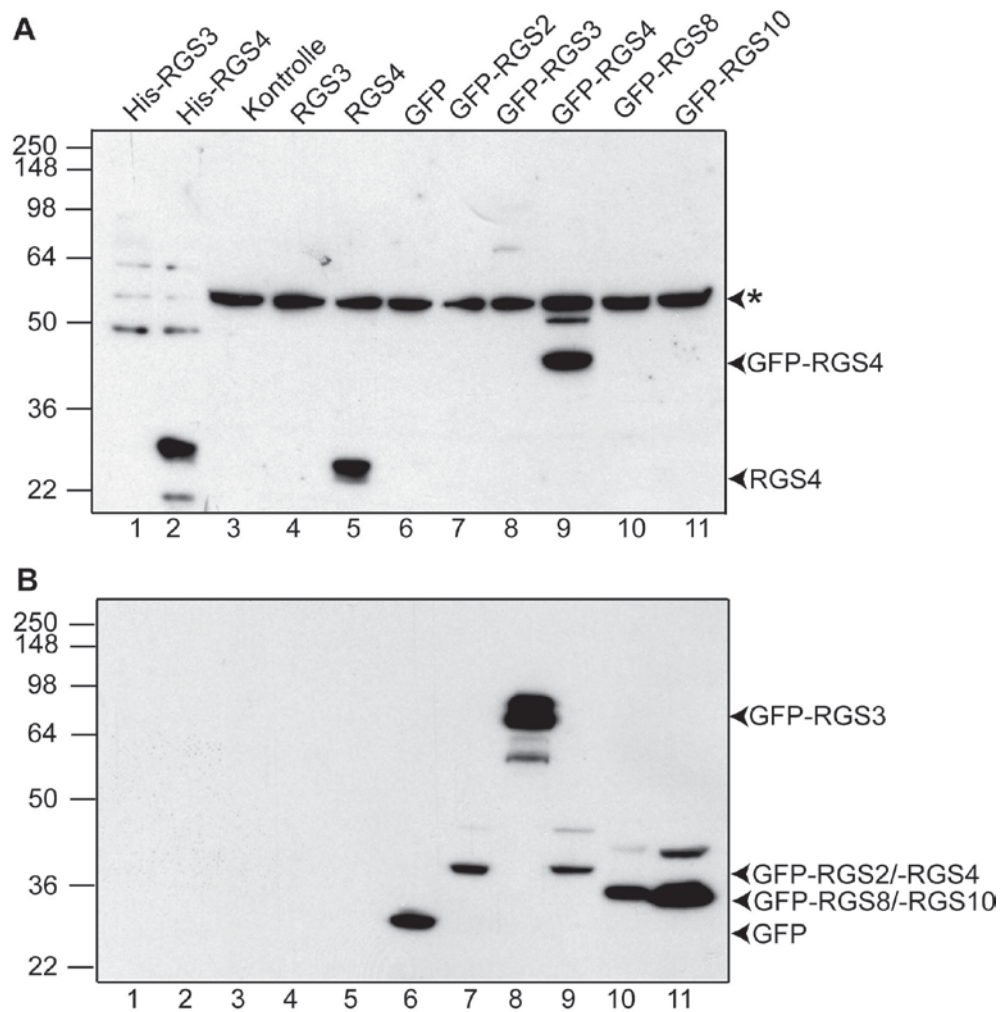


Abb. 4-17 Spezifitätsnachweis des anti-RGS4-Antikörpers mittels Western Blot: Folgende Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western Blot mit anti-RGS4-Antikörper (**A**) und nach Entfärbung des Blots mit anti-GFP-Antikörper (**B**) analysiert: bakterielles His₆-RGS3- (1) und His₆-RGS4-Lysat (2), Homogenat aus untransfizierten HEK-T-Zellen (3), Homogenat aus HEK-T-Zellen transfiziert mit RGS3 (4), RGS4 (5), GFP (6), GFP-RGS2 (7), GFP-RGS3 (8), GFP-RGS4 (9), GFP-RGS8 (10) und GFP-RGS10 (11). Mit dem anti-RGS4-Antikörper wurde spezifisch His₆-RGS4 (A, Spur 2), RGS4 (A, Spur 5), GFP-RGS4 (A, Spur 9) erkannt. Der Stern markiert eine unspezifische Proteinbande, die mit dem Antikörper in HEK-Zellhomogenaten detektiert wurde.

4.3.1.2. Spezifitätsnachweis des anti-RGS3- und anti-RGS4-Antikörpers mittels Immunfärbung transfizierter hippocampaler Neuronen

Zum weiteren Nachweis der Spezifität des anti-RGS3- bzw. anti-RGS4-Antikörpers wurden diese zusätzlich mittels Immunfärbung transfizierter hippocampaler Neuronen aus Ratten getestet. Die Nervenzellkulturen wurden nach 10 Tagen in Kultur mit einem GFP-, GFP-RGS3- oder GFP-RGS4-Konstrukt transfiziert und 24 h später fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-RGS3- bzw. anti-RGS4-Antikörper inkubiert, um zu testen, ob diese spezifisch das GFP-markierte Zielantigen erkennen. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem *Apotome Axio Imager* der Firma Zeiss.

Beide Antikörper wiesen eine deutliche Spezifität für das jeweilige antigene Protein auf. Mit dem anti-RGS3-Antikörper wurden nur Neuronen detektiert, die mit GFP-RGS3 transfiziert worden waren, während untransfizierte Zellen oder Nervenzellen, die GFP oder GFP-RGS4 exprimierten, nicht erkannt wurden (siehe Abb. 4-18). Analog erfolgte mit dem anti-RGS4-Antikörper eine spezifische Detektion der Neuronen, die GFP-RGS4 exprimierten, jedoch nicht von untransfizierten oder GFP- bzw. GFP-RGS3-exprimierenden Zellen (siehe Abb. 4-19).

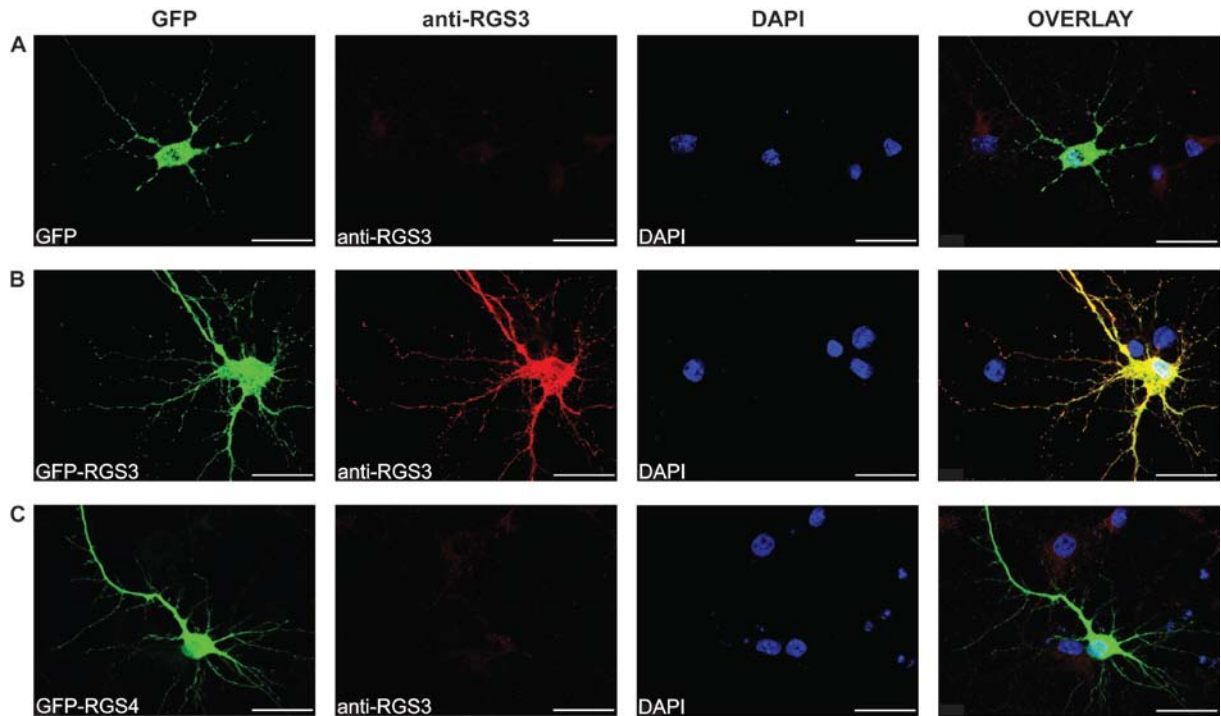


Abb. 4-18 Spezifitätsnachweis des anti-RGS3-Antikörpers mittels Immunfärbung von transfizierten hippocampalen Neuronen: Hippokampale Neuronen wurden mit einem GFP- (A), GFP-RGS3- (B) oder GFP-RGS4-Konstrukt (C) transfiziert (GFP, grüner Kanal). Nach 24 h wurden die Zellen fixiert. Darauf folgte eine Inkubation mit anti-RGS3-Antikörper und danach mit Alexa-546-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (roter Kanal). Zusätzlich wurde eine Zellkernfärbung mittels DAPI durchgeführt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem *Apotome Axio Imager* der Firma Zeiss. Mit dem anti-RGS3-Antikörper wurden nur Neuronen detektiert, die GFP-RGS3 exprimierten. Der Längensstandard entspricht 30 µm.

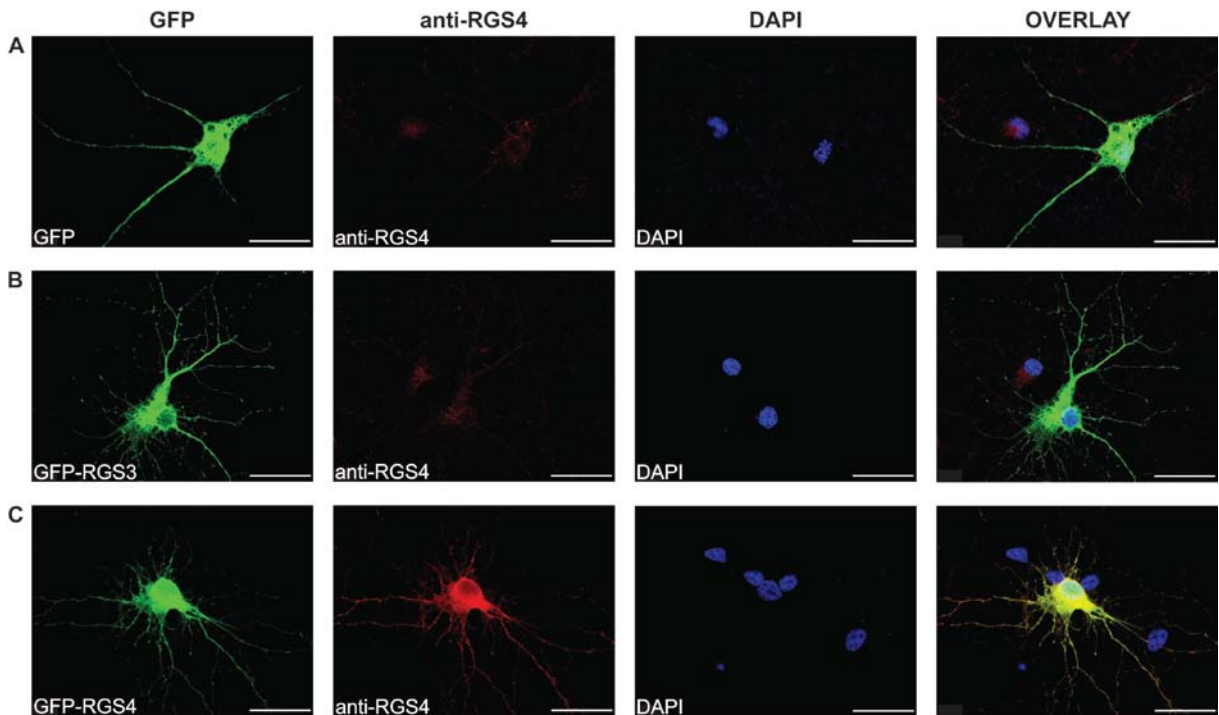


Abb. 4-19 Spezifitätsnachweis des anti-RGS4-Antikörpers mittels Immunfärbung von transfizierten hippocampalen Neuronen: Hippocampale Neuronen wurden mit einem GFP- (A), GFP-RGS3- (B) oder GFP-RGS4-Konstrukt (C) transfiziert (grüner Kanal). Nach 24 h wurden die Zellen fixiert. Darauf folgte die Inkubation mit anti-RGS4-Antikörper und danach mit Alexa-546-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (roter Kanal). Zusätzlich wurde eine Zellkernfärbung mittels DAPI durchgeführt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem *Apotome Axio Imager* der Firma Zeiss. Mit dem anti-RGS4-Antikörper wurden nur Neuronen detektiert, die GFP-RGS4 exprimierten. Der Längenstandard entspricht 30 μ m.

4.3.2. Elektronenmikroskopische Analyse der Lokalisation von RGS3, RGS4 und mGluR7a im Maus-Kortex

Die charakterisierten polyklonalen RGS3- und RGS4-Antikörper (siehe 4.3.1.) sowie ein kommerziell erhältlicher mGluR7a-Antikörper wurden für die immunelektronische Färbung von kortikalen Maushirnschnitten verwendet. Hierzu wurde der Kortex von 3-4 Monate alten Wildtyp (WT)- bzw. RGS4-defizienten (*knock-out*, KO)-Mäusen präpariert. Es wurden Vibratomschnitte des Kortex angefertigt und diese mit anti-RGS3-, anti-RGS4- oder anti-mGluR7a-Antikörpern inkubiert. Schließlich wurden Ultradünnschnitte (60-80 nm) dieser Präparate angefertigt, die an einem Elektronenmikroskop der Firma Zeiss ausgewertet wurden.

Mit dem anti-RGS4-Antikörper wurden RGS4-Wildtyp (WT)- und als Negativkontrolle RGS4-KO-Schnitte gefärbt. Auch der mGluR7a-Antikörper wurde zur Färbung der WT- und RGS4-KO-Präparate verwendet. Dies sollte zeigen, ob sich die Lokalisation des Rezeptors in den transgenen Tieren aufgrund des fehlenden RGS4-Proteins verändert. Mit dem anti-RGS3-Antikörper wurden nur Hirnschnitte von Wildtyp-Mäusen analysiert, da für dieses Protein keine KO-Mauslinie zur Verfügung stand. Als Negativkontrolle für den RGS3-

Antikörper wurde vor der Immunfärbung die anti-RGS3-Antikörperlösung über eine Antigensäule (His₆-RGS3 immobilisiert an einer Nickel-NTA-Matrix) geschickt. Dabei sollten die RGS3-spezifischen Antikörper aus der Lösung extrahiert werden. Nach dieser Antikörperdepletion sollte mit dem RGS3-abgereicherten Überstand keine spezifische Detektion des RGS3-Proteins in den Präparaten auftreten.

Die elektronenmikroskopische Auswertung der kortikalen Maushirnschnitte ergab sowohl für den anti-RGS3- als auch den anti-RGS4-Antikörper eine spezifische Färbung von präsynaptischen (siehe Abb. 4-20, A und Abb. 4-21, A) und postsynaptischen Strukturen (siehe Abb. 4-20, B und 4-21, B). Dagegen erfolgte keine Detektion dieser Zellstrukturen in den jeweiligen Negativkontrollen (siehe Abb. 3-20, C und D sowie Abb. 3-21, C und D). Bei der Färbung der Hirnpräparate mit dem anti-mGluR7a-Antikörper wurde der Rezeptor, wie erwartet, an Präsynapsen lokalisiert (siehe Abb. 4-22, A und B). Diese Daten weisen daraufhin, dass die beiden RGS-Proteine in kortikalen Neuronen mit mGluR7a in präsynaptischen Zellbereichen kolokalisieren.

RGS-Proteine könnten einen Effekt auf die Lokalisation des Rezeptors, mit dem sie selektiv interagieren, ausüben. Die Färbung des mGluR7a-Proteins zeigte in den RGS4-KO-Präparaten, trotz des fehlenden RGS4-Proteins, jedoch keine Veränderung in der Lokalisation des Rezeptors (siehe Abb. 4-22, C und D).

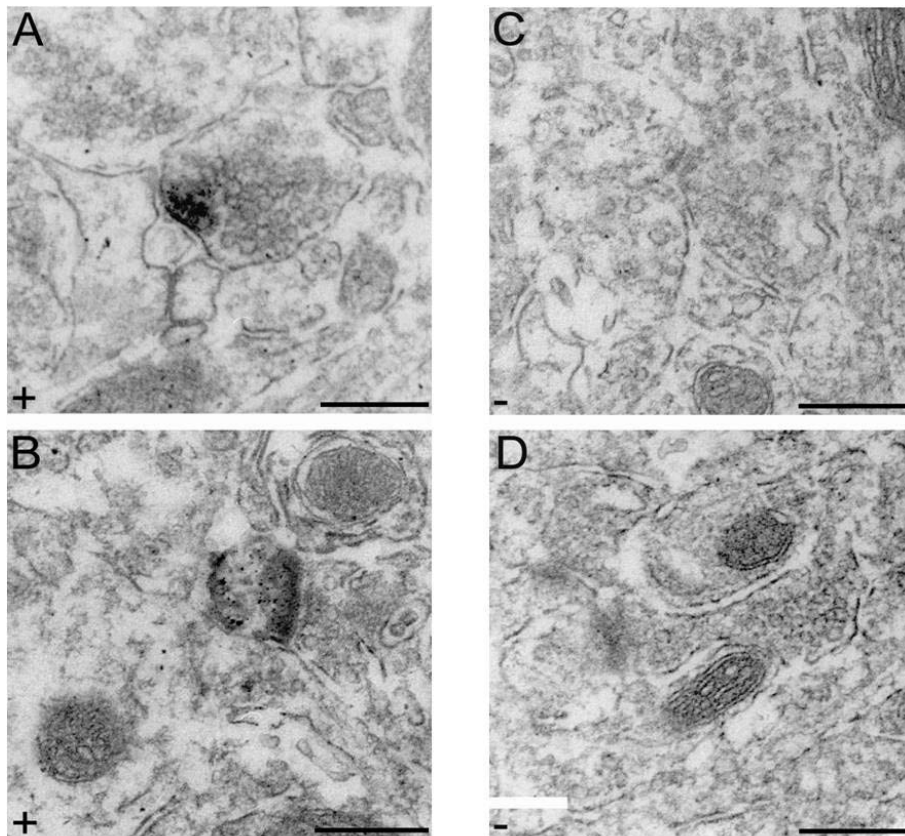


Abb. 4-20 Elektronenmikroskopische Analyse der Lokalisation von RGS3 in kortikalen Hirnschnitten von Wildtyp (WT)-Mäusen: Kortikale Hirnschnitte von 3-4 Monate alten WT-Mäusen

wurden mittels der Gefrierbruch-Methode permeabilisiert und anschließend 4 Tage bei 4 °C mit anti-RGS3-Antikörper (+) oder als Negativkontrolle mit abgereichertem RGS3-Überstand (-) inkubiert. Nach Inkubation mit Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper wurden von den Präparaten Ultradünnschnitte (60-80 nm) angefertigt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Elektronenmikroskop der Firma Zeiss. Sowohl prä- (A) als auch postsynaptische (B) Strukturen wurden in den Präparaten, die mit dem anti-RGS3-Antikörper behandelt worden waren, spezifisch detektiert. Mit dem RGS3-abgereicherten Überstand war keine spezifische Immunfärbung nachweisbar (C und D). Der Längenstandard entspricht 0.3 µM.

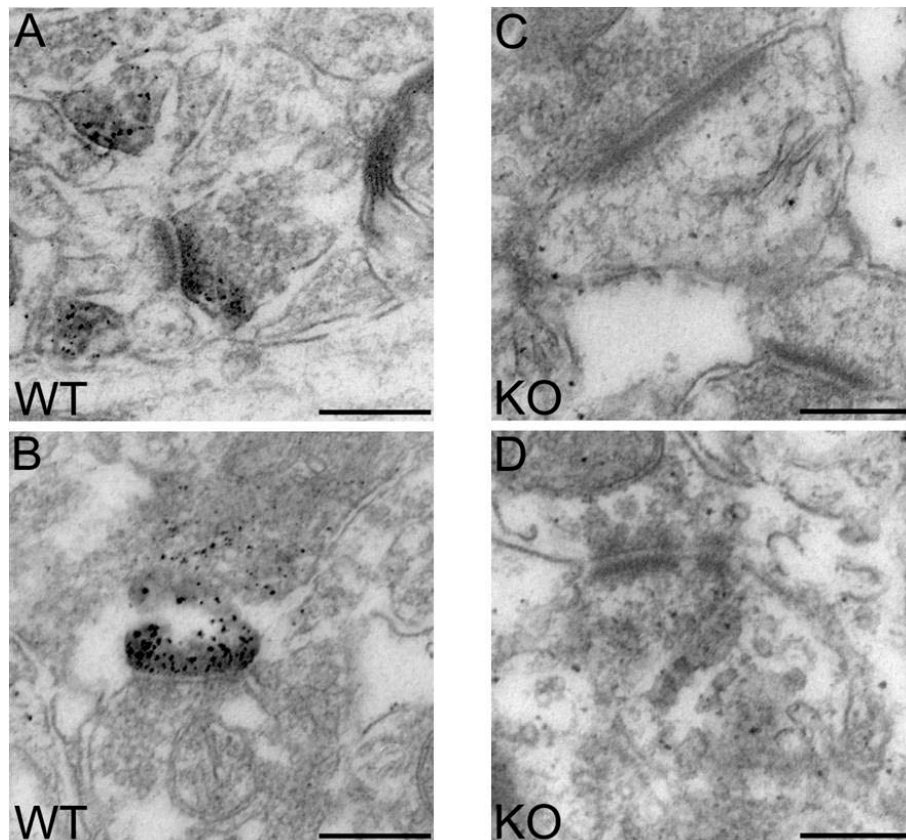


Abb. 4-21 Elektronenmikroskopische Analyse der Lokalisation von RGS4 in kortikalen Hirnschnitten von Wildtyp (WT)- und RGS4-knock-out (KO)-Mäusen: Kortikale Hirnschnitte von 3-4 Monate alten WT- bzw. RGS4-KO-Mäusen wurden mittels der Gefrierbruch-Methode permeabilisiert und anschließend 4 Tage bei 4 °C mit anti-RGS4-Antikörper inkubiert. Nach Inkubation mit Biotin-gekoppeltem Sekundärantikörper wurden von den Präparaten Ultradünnschnitte (60-80 nm) angefertigt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Elektronenmikroskop der Firma Zeiss. In den WT (A und B), jedoch nicht in den RGS4-KO-Präparaten (C und D), wurden mit dem anti-RGS4-Antikörper sowohl prä- (A) als auch postsynaptische (B) Strukturen spezifisch detektiert. Der Längenstandard entspricht 0.3 µM

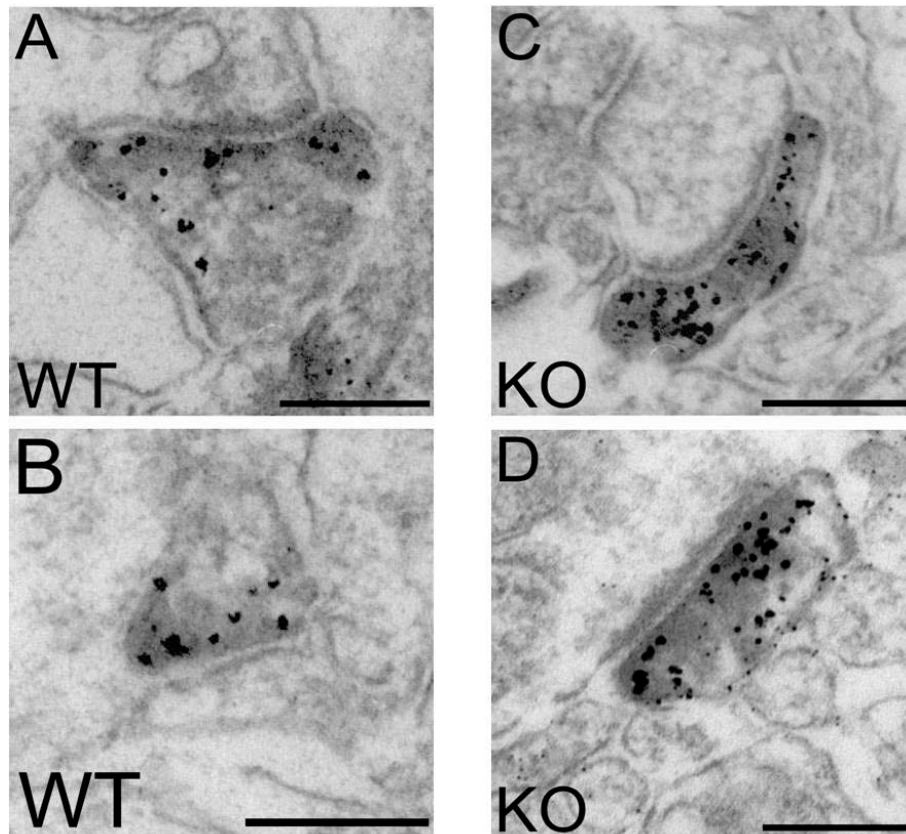


Abb. 4-22 Elektronenmikroskopische Analyse der Lokalisation des mGluR7a-Proteins in kortikalen Hirnschnitten von Wildtyp (WT)- und RGS4-knock-out (KO)-Mäusen: Kortikale Hirnschnitte von 3-4 Monate alten Wildtyp- bzw. RGS4-Knock-out-Mäusen wurden mittels der Gefrierbruch-Methode permeabilisiert und anschließend 4 Tage bei 4 °C mit anti-mGluR7a-Antikörper inkubiert. Nach Inkubation mit Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpern wurden von den Präparaten Ultradünnschnitte (60-80 nm) angefertigt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Elektronenmikroskop der Firma Zeiss. Sowohl in den WT- (A und B) als auch in den KO-Präparaten (C und D) wurden mit dem anti-mGluR7a-Antikörper präsynaptische Strukturen spezifisch detektiert. Der Längenstandard entspricht 0.25 μ M

4.4. Effekt von RGS4 auf die mGluR7a-vermittelte cAMP-Signaltransduktion in kortikalen Neuronen

In einem vorangegangenen Experiment wurde bereits gezeigt, dass RGS3 und RGS4 in einem rekombinanten System (transfizierte HEK-mGluR7a-Zellen) die mGluR7a-vermittelte cAMP-Signaltransduktion beeinflussen können (siehe 4.2.2.). Dabei wurde nachgewiesen, dass RGS3 und RGS4 mittels ihrer GAP-Funktion die Inaktivierung der $G\alpha_{i1}$ -UE, die durch mGluR7a aktiviert wurde, beschleunigen können. Um nachzuweisen, dass die beiden RGS-Protein diesen Effekt auch *in vivo* ausüben können, wurden Signaltransduktionsanalysen in kortikalen Neuronen, in denen eine Kolokalisation des Rezeptors mit den beiden RGS-Proteinen gezeigt worden war (siehe 4.3.2.), durchgeführt.

Die Aktivierung der Gruppe III mGluR- bzw. mGluR7a-vermittelten cAMP-Signaltransduktion führt zu einer Inhibition der Adenylatzyklase. Somit sollte durch

Stimulation der endogenen Rezeptoren eine Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration, verglichen mit nicht stimulierten Zellen, erhalten werden. Wenn RGS4 diese Transduktion *in vivo* regulieren kann, so sollte das RGS-Protein durch seine GAP-Aktivität die Signalkaskade durch Deaktivierung des G-Proteins relativ schnell beenden. Dies sollte dazu führen, dass die Inhibition der Adenylatzyklase aufgehoben wird, so dass mehr cAMP produziert werden kann. Dagegen kann in Neuronen von RGS4-defizienten Mäusen, die das RGS4-Protein nicht exprimieren, die schnelle Deaktivierung des G-Proteins durch RGS4 nicht stattfinden, so dass die Inhibition der Adenylatzyklase so lange anhält bis das gebundene GTP durch die relativ langsame intrinsische GAP-Aktivität des G-Proteins hydrolysiert ist. Deshalb sollte die Stimulation der Gruppe III mGluRs in den RGS4-defizienten Zellen zu einer stärkeren Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration führen verglichen mit WT-Nervenzellen.

Hierzu wurden Kulturen kortikaler Neuronen aus Wildtyp (WT)- und RGS4-defizienten (*knock-out*, KO)-Mäusen angelegt. Nach 21 Tagen in Kultur wurde durch direkte Aktivierung der Adenylatzyklase mit Forskolin (10 μ M) die cAMP-Produktion zunächst auf das mögliche Maximum angehoben. Zugleich wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Gruppe III mGluR-spezifischen Agonisten L-AP4 (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M oder 1 mM) oder dem mGluR7a-spezifischen Agonisten AMN082 (10 μ M) stimuliert (Mitsukawa *et al.*, 2005). Die Menge an intrazellulärem cAMP wurde dann mittels eines *cAMP Enzymimmunoassays* (GE Healthcare, Freiburg) gemäß den Herstellerangaben bestimmt.

In kultivierten kortikalen Neuronen von WT-Mäusen erfolgte mit dem Gruppe III mGluR-spezifischen Agonisten L-AP4 bei einer Konzentration von 100 μ M eine Reduktion der intrazellulären cAMP-Menge um 40% (siehe Abb. 4-23). Mit einer höheren L-AP4-Konzentration (1 mM) konnte eine Verringerung um bis zu 50% erreicht werden. Der mGluR7a-spezifische Agonist AMN bewirkte eine Abnahme um 32%.

In den RGS4-defizienten Neuronen konnte eine gleichwertige Aktivierung der Adenylatzyklase mit Forskolin erzielt werden wie in WT-Zellen. Ebenso war die basale cAMP-Konzentration in unstimulierten Neuronen aus RGS4-KO- und WT-Mäusen vergleichbar (Daten siehe Anhang Abb. 6-1). Jedoch erfolgte in den RGS4-defizienten Nervenzellen weder mit 100 μ M noch mit 1 mM L-AP4 eine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration (siehe Abb. 4-23). Bei Stimulation der KO-Zellen mit dem mGluR7a-spezifischen Agonisten AMN082 oder geringen Mengen an L-AP4 (1 μ M) wurde, entgegen der erwarteten verstärkten Reduktion der cAMP-Konzentration, ein Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels erhalten. So wurde mit 1 μ M L-AP4 eine Steigerung um 37% und mit 10 μ M AMN082 sogar um 71% erhalten.

Auch wenn die Daten der RGS4-defizienten Neuronen nicht mit der aufgrund der Hypothese erwarteten Ergebnisse übereinstimmen, ist festzustellen, dass die

Signaltransduktion der Gruppe III mGluRs durch den Verlust des RGS4-Proteins eindeutig gestört wird. RGS4 scheint somit für den geordneten und korrekten Ablauf der Gruppe III mGluR-vermittelten Signaltransduktion notwendig zu sein.

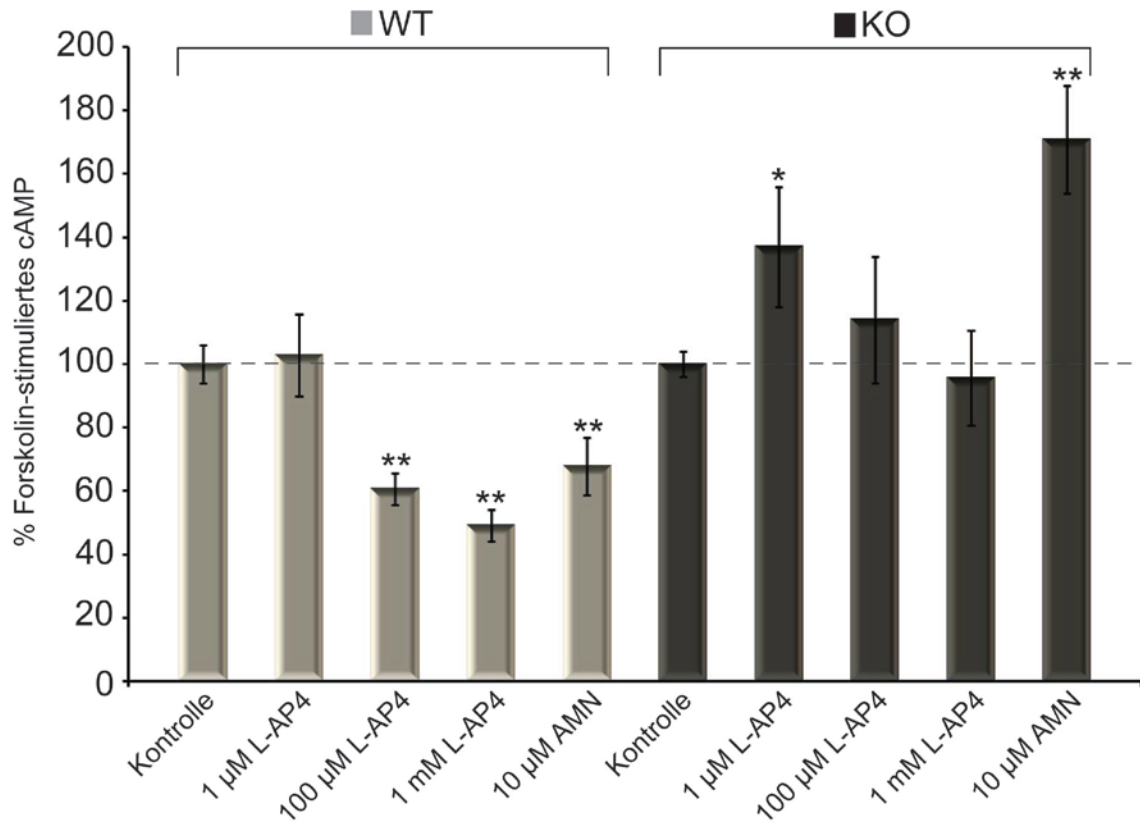


Abb. 4-23 Gruppe III mGluR bzw. mGluR7a-vermittelte cAMP-Signaltransduktion in kortikalen Wildtyp (WT)- und RGS4-knock-out (KO)-Neuronen: Kortikale Neuronen von WT- und RGS4-KO-Mäusen wurden 21 Tage kultiviert. Die Adenylatzyklase wurde mit Forskolin (10 µM) aktiviert und zugleich erfolgte die Stimulation der Gruppe III mGluRs mit L-AP4 (1 µM, 100 µM oder 1 mM) bzw. des mGluR7a mit AMN082 (10 µM) für 15 min. Der Abbau von produziertem cAMP wurde durch Anwesenheit von IBMX (0.75 mM) während der Rezeptor-Stimulation inhibiert. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde mittels eines *cAMP-Enzymimmunoassays* (GE Healthcare, Freiburg) bestimmt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten mit je 4 Replikaten pro Ansatz dar (+/- SEM; * = $p < 0.01$; ** = $p < 0.001$). Sowohl mit L-AP4 (ab einer Konzentration von 100 µM) als auch mit AMN082 (10 µM) wurde eine Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration in WT-Neuronen erhalten. In den KO-Neuronen wurde kein Effekt mit 0.1 bzw. 1 mM L-AP4 erzielt. Ein unerwarteter Anstieg der cAMP-Konzentration wurde mit 1 µM L-AP4 oder 10 µM AMN082 ausgelöst.

5. Diskussion

MGluRs müssen schnell und präzise auf rasch ändernde extrazelluläre Glutamatkonzentrationen reagieren und diese Signale über ihr gekoppeltes G-Protein in die Zelle transduzieren. Die Umwandlung der Bindung eines Agonisten in die entsprechende zelluläre Antwort erfolgt durch heterotrimere G-Proteine ($G\alpha\beta\gamma$), die die Kinetik des Transduktionsprozesses bestimmen (Zerangue und Jan, 1998). Um eine möglichst exakte Übersetzung der Information zu gewährleisten, muss die Signalübermittlung dieser Rezeptoren sehr genau kontrolliert und reguliert werden. Als Regulatoren der Signalübertragung verschiedener GPCRs haben sich Vertreter der RGS-Proteinfamilie erwiesen, die durch ihre GAP-Funktion direkten Einfluss auf den G-Protein-Zyklus und damit auf die Kinetik der Signalübertragung nehmen können (Berman und Gilman, 1998; Hollinger und Hepler, 2002). Für einige GPCRs wurde bereits eine spezifische und selektive Interaktion sowie Regulation durch bestimmte RGS-Proteine gezeigt (Neitzel und Hepler, 2006). Jedoch gibt es bisher noch keine Untersuchungen an Gruppe III mGluRs, außer am in der Retina exprimierten mGluR6 (Dhingra *et al.*, 2004), der jedoch einen Sonderfall innerhalb dieser Rezeptorgruppe darstellt. Deshalb sollte in dieser Dissertation untersucht werden, ob Gruppe III mGluRs, mit besonderem Augenmerk auf mGluR7a, durch ein oder auch mehrere Mitglieder der RGS-Familie reguliert werden können. Als Kandidaten, die die Signaltransduktion der Gruppe III mGluRs beeinflussen könnten, wurden RGS3 und RGS4 ausgewählt.

Der Nachweis einer Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 erfolgte mittels biochemischer Kopräzipitationsexperimente. Der physiologische Effekt der beiden RGS-Proteine auf Gruppe III mGluRs bzw. mGluR7a wurde zunächst *in vitro* durch Signaltransduktionsanalysen in transfizierten HEK-Zellen gezeigt und anschließend auch *in vivo* durch Analysen der Signalantwort kortikaler Wildtyp- und RGS4-defizienter Neuronen. Weiterhin wurde eine Kolo-kalisation des mGluR7a mit den beiden RGS-Proteinen an der präsynaptischen Membran mit Hilfe immunoelektronenmikroskopischer Methoden in kortikalen Nervenzellen nachgewiesen.

5.1. Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4

5.1.1. Direkte Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen zwischen RGS-Proteinen und mGluR7a wurden Bindungsexperimente mit GST-markierten Proteinen durchgeführt (GST-Kopräzipitation). Sowohl für RGS3 als auch für RGS4 konnte eine Interaktion mit endogenem und in HEK-Zellen exprimiertem mGluR7a gezeigt werden: Der Rezeptor wurde

aus Homogenaten eines Rattengehirns oder transfizierter HEK-Zellen mit beiden GST-fusionierten RGS-Proteinen kopräzipitiert. Die Bindungsdomänen des mGluR7a für RGS3 bzw. RGS4 konnten auf den CT und die intrazelluläre Schleife 2 (iLoop2), die auch die Erkennung der $G\alpha$ -Untereinheit (UE) vermittelt (Havlickova *et al.*, 2003), eingegrenzt werden. Allerdings scheint die Interaktion relativ schwach zu sein, da die densitometrische Analyse der Bandenstärke ergab, dass nur ca. 4% der eingesetzten Menge an Rezeptor aus dem jeweiligen Homogenat, das je Ansatz eingesetzt worden war, isoliert werden konnten. Rezeptoren, die sich in der synaptischen Membran befinden, sind dort nicht statisch fixiert, sondern aufgrund lateraler Diffusion, Internalisierung und Insertion relativ beweglich (Ferguson, 2001; Pelkey *et al.*, 2005). Um eine solche Fluidität zu ermöglichen, ist es unter anderem notwendig, dass Interaktionen zwischen den Rezeptoren und intrazellulären Proteinen flexibel sind. Somit unterstützt eine niedrig affine, aber spezifische Bindung, wie sie zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 nachgewiesen wurde, den Erhalt dieser Beweglichkeit der Rezeptoren.

Da sowohl mGluR7a als auch RGS3 und RGS4 mit der $G\alpha_{i1}$ -UE interagieren (Pin und Duvoisin, 1995; Berman und Gilman, 1998), ist es vorstellbar, dass die Interaktion zwischen Rezeptor und RGS-Protein nicht direkter Natur ist, sondern indirekt durch die $G\alpha_{i1}$ -UE vermittelt wird. Zur Identifizierung der RGS-Bindungsdomänen des mGluR7a für RGS3 und RGS4 wurden nur Proteine verwendet, die im bakteriellen System exprimiert worden waren (GST- mGluR7a-CT, GST-mGluR7a-iLoop2, His₆-RGS3 und His₆-RGS4). Da Bakterien keine $G\alpha_{i1}$ -UE besitzen, an welche mGluR7a *in vivo* koppelt (Pin und Duvoisin, 1995), erfolgte die Kopräzipitation der beiden RGS-Proteine in diesem Experiment in Abwesenheit dieser UE. Dies gab einen ersten Hinweis darauf, dass die $G\alpha_{i1}$ -UE nicht essentiell für die Interaktion zwischen Rezeptor und RGS3 bzw. RGS4 ist. Um die Relevanz der $G\alpha_{i1}$ -UE genauer zu analysieren, wurde eine RGS-insensitive $G\alpha_{i1}$ -UE herangezogen (DiBello *et al.*, 1998, Lan *et al.*, 1998). Durch die Substitution des Glyzinrestes 183 in der *Switch*-Region I der $G\alpha_{i1}$ -UE durch die Aminosäure Serin wird die Bindung an RGS-Proteine inhibiert, während die UE selbst voll funktionsfähig bleibt. Da auch in Anwesenheit dieser RGS-insensitiven $G\alpha_{i1}$ -UE die Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 ungestört erfolgte, scheint die Bindung nicht durch $G\alpha_{i1}$ vermittelt zu werden. Es ist allerdings in Betracht zu ziehen, dass in diesem Experiment neben der mutierten $G\alpha_{i1}$ -UE auch die endogene Wildtyp-Version der $G\alpha_{i1}$ -UE in den HEK-Zellen vorhanden war. Die endogene $G\alpha_{i1}$ -UE könnte die Vermittlung der Interaktion auch in Anwesenheit der RGS-insensitiven $G\alpha_{i1}$ -UE übernehmen. Doch der Nachweis der Expressionsstärke der transfizierten RGS-insensitiven $G\alpha_{i1}$ -UE zeigte, dass das Protein in hohem Maße in den Zellen exprimiert wird und somit effizient mit dem endogenen $G\alpha_{i1}$ um die Bindung am Rezeptor konkurrieren kann. Würde die $G\alpha_{i1}$ -UE die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und RGS-Protein vermitteln, so sollte die Effizienz der

Proteinbindung zumindest vermindert sein in Anwesenheit der RGS-insensitiven $G\alpha_{i1}$ -UE, was jedoch nicht beobachtet wurde.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Interaktionsstudien, dass RGS3 und RGS4 direkt an mGluR7a binden durch die Wechselwirkung mit dem CT und der intrazellulären Schleife des Rezeptors. Diese beiden Regionen sind sehr wichtig für die Interaktion des Rezeptors mit anderen intrazellulären Proteinen, die essentiell für die Signaltransduktion sind (u.a. $G\alpha$ -UE des heterotrimeren G-Proteins, Ca^{2+} /CaM, PICK1). Die Herausforderung besteht nun darin, die zeitliche und räumliche Organisation all dieser interagierenden Proteine zu verstehen. Der Nachweis der direkten und selektiven Bindung von RGS3 und RGS4 an mGluR7a lässt, wie auch für andere GPCRs, die eine ähnliche Interaktion mit bestimmten RGS-Proteinen aufweisen (siehe Tab. 2-13) (Neitzel und Hepler, 2006), die Hypothese der Bildung eines Signalkomplexes zu: Ein solcher Komplex besteht aus dem Rezeptor, dem G-Protein, weiteren nachgeschalteten Proteinen (wie z.B. Ionenkanälen) und einem ausgewählten RGS-Protein, wobei sich diese Komponenten schon vor Stimulation des Rezeptors zusammenlagern. In einem solchen funktionellen Komplex kann zum einen die Signalübertragung ohne Zeitverzögerung erfolgen und zum anderen kann das RGS-Protein schnell und selektiv den Rezeptor und dessen G-Protein modulieren (Sierra *et al.*, 2000; Hepler, 2003; Abramow-Newerly *et al.*, 2006). Durch die Bindung des RGS-Proteins an den Rezeptor bereits vor dessen Aktivierung (Roy *et al.*, 2003; Bernstein *et al.*, 2004; Hague *et al.*, 2005) wird eine umgehende und präzise Regulation der Signalübertragung nach Stimulation gewährleistet. Da die RGS-Proteine außer GPCRs auch mit nachgeschalteten Proteinen (z.B. Ionenkanälen) wechselwirken, könnten sie durch die simultane Interaktion mit Rezeptor und nachgeschalteten Proteinen den Komplex stabilisieren (Doupnik *et al.*, 1997; Jeong und Ikeda, 1998; Jeong und Ikeda, 2000; Mark *et al.*, 2000; Ulens *et al.*, 2000). Dies könnte zusätzlich durch die Bindung von RGS3 und RGS4 an die Membran unterstützt werden (Srinivasa *et al.*, 1998; Dulin *et al.*, 1999; Dulin *et al.*, 2000; Tu *et al.*, 2001; Georgoussi *et al.*, 2006). In einem mGluR7a-Signalkomplex, der das heterotrimere G-Protein und bestimmte Effektoren, die durch den Rezeptor beeinflusst werden (z.B. die Adenylatzyklase, P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanäle), sowie RGS3 bzw. RGS4 enthält, würden funktionell zusammengehörige Proteine zur Initiation (wie das G-Protein) und Termination (wie die RGS-Proteine) der Signaltransduktion lokal organisiert werden (Brady *et al.*, 2002; Neitzel und Hepler, 2006). Der Nettoeffekt eines solchen Komplexes läge in der geordneten Struktur (*Assembly*) und stringenten sowie direkten Regulation aller Proteine, die an der Signalübertragung beteiligt sind.

5.1.2. **Ca²⁺-Abhängigkeit der Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 und die Rolle von Calmodulin**

Da Ca²⁺-Ionen eine äußerst wichtige Rolle bei der synaptische Transmission übernehmen (Katz und Miledi, 1970), wurde die Wirkung von Ca²⁺ auf die Bindung zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 untersucht. Die Interaktion erfolgte in Ca²⁺-freiem Medium deutlich verstärkt. Da das Ca²⁺-bindende regulatorische Protein Calmodulin (CaM) sowohl an den CT des mGluR7a als auch an RGS-Proteine bindet, wurde postuliert, dass CaM die Wirkung der Ca²⁺-Ionen auf die Wechselwirkung vermittelt. CaM bindet ausschließlich in Anwesenheit von Ca²⁺ (Ca²⁺/CaM) sowohl an den C-Terminus (CT) des mGluR7a als auch an die RGS-Domäne von RGS4 (O'Connor *et al.*, 1999, Popov *et al.*, 2000). In dieser Dissertation wurde weiterhin gezeigt, dass Ca²⁺/CaM auch mit RGS3 interagieren kann. Das CaM-Bindungsmotiv des Rezeptors liegt in dessen CT, in dem sich auch eine der RGS-Interaktionsdomänen befindet. Deshalb wurde die Theorie entwickelt, dass am mGluR7a-CT gebundenes Ca²⁺/CaM ein räumliches Hindernis für die Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor-CT und den RGS-Proteinen darstellt. Dies würde bedeuten, dass in Abwesenheit von Ca²⁺ die RGS-Proteine ungehinderten Zugang zum „Ca²⁺/CaM-freien“ CT des Rezeptors hätten. Zum Beweis dieser Hypothese wurde eine Mutante des mGluR7a herangezogen, bei der die Bindung an Ca²⁺/CaM inhibiert ist. Dies ist möglich durch die Mutation eines Serinrestes (Serin 862), das sich im Zentrum des Ca²⁺/CaM-Bindungsmotives im CT des mGluR7a befindet (Sorensen *et al.*, 2002; El Far *et al.*, 2001, Airas *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung dieser AS z.B. durch die Proteinkinase C (PKC) verhindert die Bindung von Ca²⁺/CaM in diesem Bereich. Durch die Substitution des Serin 862 durch Glutamat, das aufgrund seiner Struktur einem phosphorylierten Serinrest ähnelt, entsteht ein an dieser Stelle „konstitutiv phosphorylierter“ Rezeptor, der nicht mit Ca²⁺/CaM wechselwirken kann (siehe Abb. 4-7).

Wie erwartet band RGS4 effizienter an diese „Ca²⁺/CaM-freien“ mGluR7a-Mutante als an den Wildtyp-Rezeptor. Somit scheint Ca²⁺/CaM, das an den Rezeptor-CT gebunden hat, die Bindung von RGS4 zu hemmen. Dies würde erklären, warum RGS4 in Ca²⁺-freiem Milieu, in dem CaM nicht an mGluR7a binden kann, stärker mit dem Rezeptor wechselwirkt (siehe Abb. 5-1). RGS3 wies jedoch ein Bindungsverhalten auf, das diesem Schema nicht entsprach: RGS3 interagierte stärker mit dem Wildtyp-mGluR7a, der Ca²⁺/CaM am CT gebunden hatte, als mit dem mutierten Rezeptor. Deshalb wurde in diesem Fall weiterführend postuliert, dass eventuell Ca²⁺/CaM, das an das RGS3-Protein gebunden hat, die Interaktion mit dem Rezeptor stört. Es stellte sich allerdings die Frage, warum dies nicht auch für RGS4, an dessen RGS-Domäne Ca²⁺/CaM ebenfalls bindet, zutrifft.

Was macht den Unterschied zwischen den beiden RGS-Proteinen aus? Die offenkundigste Verschiedenheit zwischen dem RGS3- und dem RGS4-Protein besteht in der

Länge des Proteins bzw. des N-terminalen Proteinabschnitts, der nicht die RGS-Domäne beinhaltet (siehe Abb. 4-9). RGS4 besteht nur aus insgesamt 205 AS, wobei die RGS-Domäne mit 120 AS den größten Teil des Proteins ausmacht. Der N-terminale Proteinbereich besteht somit lediglich aus 57 AS. Das RGS3-Protein dagegen umfasst 520 AS, so dass es zusätzlich zur C-terminalen RGS-Domäne (AS 394-510) eine relativ lange N-terminale Domäne besitzt, die von mehr als 300 AS gebildet wird. Deshalb wurde in Betracht gezogen, dass diese dem RGS3-Protein zusätzliche Funktionen verleiht. So könnte dieser N-terminale Proteinabschnitt die Bindung an $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ und/oder mGluR7a beeinflussen bzw. vermitteln. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die N-terminale als auch die C-terminale RGS3-Proteinhälfte unabhängig voneinander mit mGluR7a und $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ interagieren. Auch diese Wechselwirkungen sind alle Ca^{2+} -abhängig, d.h. die Interaktion erfolgte - wie auch schon für das RGS3-Gesamtlängenprotein gezeigt - deutlich stärker in Ca^{2+} -freiem Milieu. RGS3 besitzt somit mindestens zwei räumlich getrennte Bindungsstellen für mGluR7a und $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Durch eine Wechselwirkung mit zwei $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Proteinmolekülen zugleich könnte das RGS3-Protein möglicherweise daran gehindert werden, an mGluR7a, dessen CT kein $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ gebunden hat und somit frei zugänglich ist, zu binden. Die $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -Moleküle könnten ein so starkes räumliches Hindernis darstellen, dass es, um eine starke Bindung des RGS3-Proteins an mGluR7a zu erwirken, nicht ausreicht, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ nur am Rezeptor-CT zu entfernen. Nur die Dissoziation von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ vom RGS3-Protein und vom Rezeptor würde demnach eine effiziente Interaktion zwischen RGS3 und mGluR7a ermöglichen (siehe Abb. 5-1).

Da Ca^{2+} -Ionen eine äußerst wichtige Rolle bei der mGluR7a-vermittelten Signaltransduktion übernehmen, würde eine Ca^{2+} -abhängige Regulation der Interaktion des mGluR7a mit RGS3 bzw. RGS4 einen eleganten Mechanismus zur Feinregulation der Rezeptorantwort darstellen. In Abb. 5-1 sind die hier beschriebenen Ca^{2+} -abhängigen Interaktionen zwischen mGluR7a, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ und RGS3 bzw. RGS4 zusammengefasst dargestellt. Die physiologischen Konsequenzen der verschiedenen Komplexe werden später genauer erläutert (siehe 5.5.).

Weiterhin wurde analysiert, an welche Bereiche des mGluR7a-Proteins die C-terminale und die N-terminale Hälfte des RGS3-Proteins binden. Da bereits klar war, dass das RGS3-Gesamtlängenprotein mit dem CT und der intrazellulären Schleife 2 des Rezeptors wechselwirken können, wurde untersucht, ob die N- und die C-terminale RGS3-Proteinhälfte mit einer oder möglicherweise beiden RGS-Bindungsdomänen des mGluR7a interagieren können. Es konnte gezeigt werden, dass der N-terminale RGS3-Proteinabschnitt an den mGluR7a-CT und auch an die intrazelluläre Schleife 2, während die C-terminale RGS3-Hälfte ausschließlich mit dem Rezeptor-CT wechselwirkt. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Interaktion zwischen RGS3 und mGluR7a hauptsächlich durch die

Wechselwirkungen der N- sowie C-terminalen RGS-Proteinhälfte mit dem CT des mGluR7a vermittelt wird. Diese Bindung scheint durch eine zusätzliche Wechselwirkung zwischen dem N-terminalen RGS3-Abschnitt, der nicht die RGS-Domäne beinhaltet, und der intrazellulären Schleife 2 des Rezeptors, unterstützt zu werden.

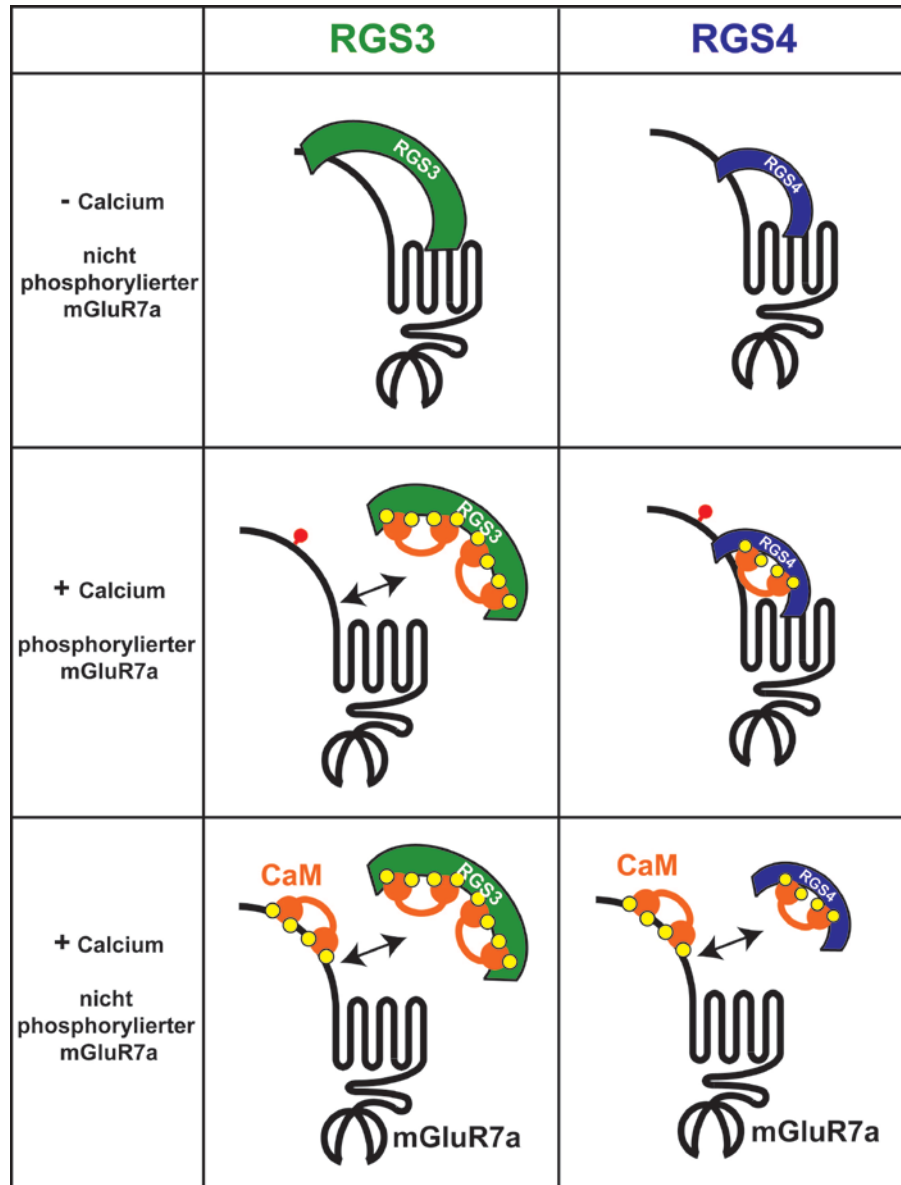


Abb. 5-1 Modell der Ca^{2+} -abhängigen Interaktion zwischen mGluR7a, Ca^{2+} /CaM und RGS3 bzw. RGS4: In Anwesenheit von Ca^{2+} (dargestellt als gelbe Kreise) bindet Ca^{2+} /CaM an den nicht phosphorylierten CT des mGluR7a und an RGS3 (grün dargestellt) bzw. RGS4 (blau dargestellt). Dadurch wird die Bindung des RGS-Proteins an den Rezeptor räumlich behindert. Ist in Anwesenheit von Ca^{2+} der Rezeptor-CT phosphoryliert (dargestellt als roter Kreis), so kann Ca^{2+} /CaM nicht an den CT binden. Unter diesen Bedingungen kann RGS4, nicht jedoch RGS3, effizient an mGluR7a binden. In Ca^{2+} -freiem Milieu kann CaM weder an den Rezeptor noch an die RGS-Protein binden, so dass beide RGS-Proteine mit dem Rezeptor interagieren. Beide RGS-Proteine wechselwirken mit dem CT und der intrazellulären Schleife 2 des Rezeptors.

5.1.3. Physiologische Relevanz der Interaktion zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4

Für Vertreter der Gruppe III mGluRs wäre die Bildung eines Signalkomplexes (wie unter 5.1.1. beschrieben), in dem das RGS-Protein eine funktionelle Verknüpfung des mGluR mit nachgeschalteten spannungsabhängigen P/Q-Typ Ca^{2+} - oder GIRK (*G protein-regulated inwardly rectifying K^+ -channel*) -Kanälen herstellt und stabilisiert, von Vorteil (Cotman *et al.*, 1986; Forsythe *et al.*, 1990; Baskys *et al.*, 1991; Trombley *et al.*, 1992; Conn und Pin, 1997; Mark und Herlitze, 2000; Lei *et al.*, 2003). Die präsynaptisch lokalisierten Gruppe III mGluRs fungieren als Autorezeptoren, die rückkoppelnd durch die Inhibition spannungsabhängiger P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanäle die Glutamatausschüttung hemmen (Cotman *et al.*, 1986; Forsythe *et al.*, 1990; Baskys *et al.*, 1991; Trombley *et al.*, 1992; Conn und Pin, 1997). Durch die Bindung der aktiven $G\beta\gamma$ -UE an diese Kanäle wird die Öffnung dieser Kanäle inhibiert (De Waard *et al.*, 1997; Zamponi *et al.*, 1997; El Far und Betz, 2002). Die resultierende Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verhindert die Fusion der Neurotransmitter-Vesikel mit der präsynaptischen Membran, so dass die Glutamatausschüttung endet (Pin und Bockaert, 1995; Pin und Duvoisin, 1995; Ikeda, 1996, Takahashi *et al.*, 1996). Da mGluR7a, der in der aktiven Zone der Präsynapse angereichert ist, mit spannungsabhängigen P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanälen kolokalisiert (Shigemoto *et al.*, 1996; Ottersen und Landsend, 1997), sind die räumlichen Bedingungen vorhanden, damit ein RGS-Protein die Assoziation des Rezeptors mit den Kanälen vermitteln könnte (siehe Abb. 5-2). Es ist bereits gezeigt worden, dass verschiedene RGS-Proteine (u.a. RGS4) die Rezeptor-vermittelte Inhibition der Ca^{2+} -Kanäle beschleunigen können (Jeong und Ikeda, 1998; Jeong und Ikeda, 2000; Mark *et al.*, 2000). Somit wäre es vorstellbar, dass RGS3 bzw. RGS4 auch die mGluR7a-vermittelte Hemmung der Ca^{2+} -Kanäle regulieren.

Weitere nachgeschaltete Effektoren der Gruppe III mGluRs, die Teil eines Signalkomplexes sein könnten, sind GIRK-Kanäle, die die Hyperpolarisierung erregbarer Zellen vermitteln. In heterologen Systemen (HEK-Zellen oder Oozyten) können mGluRs (u.a. auch mGluR7a) koexprimierte GIRK-Kanäle aktivieren (Saugstad *et al.*, 1996; Saugstad *et al.*, 1997; Sorensen *et al.*, 2002). Die Kopplung von Gruppe III mGluRs *in vivo* an GIRK-Kanäle konnte bisher nur in einer speziellen Neuronen-Subpopulation in Vögeln (Zebrafinken) gezeigt werden (Dutar *et al.*, 1998). Diese Kanäle werden primär durch Interaktion der aktiven $G\beta\gamma$ -UE mit deren N- und C-Termini aktiviert (Mark und Herlitze, 2000; Lei *et al.*, 2003). In rekombinanten Systemen ist die Aktivierung der GIRK-Kanäle (Frequenz der Kanalöffnung) und die Deaktivierung (Frequenz der Kanalschließung) deutlich langsamer als unter physiologischen Bedingungen (Stanfield *et al.*, 2002). Die physiologische Kinetik kann jedoch durch die Expression bestimmter RGS-Proteine (u.a. RGS3 und RGS4) wiederhergestellt werden (Doupnik *et al.*, 1997; Ulens *et al.* 2000). Die

Selektivität eines bestimmten RGS-Proteins für GIRK-Kanäle ist stark davon abhängig, welcher GPCR mit welchem G-Protein den Ionenkanal kontrolliert. So konnte für eine kurze Spleißvariante von RGS3, die abundant in neuronalem Gewebe exprimiert wird, gezeigt werden, dass diese GIRK-Kanäle, die durch den muskarinischen M2- oder den 5-HT_{1A}-Serotonin-Rezeptor aktiviert werden, unterschiedlich moduliert (Jaen und Doupnik, 2005). RGS4 kann selektiv die Deaktivierung von GIRK-Kanälen, die an μ - oder κ -Opioid-Rezeptoren gekoppelt sind, beschleunigen (Ulens *et al.*, 2000; Ippolito *et al.*, 2002). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass RGS3 bzw. RGS4 die mGluR7a-vermittelte Aktivierung der GIRK-Kanäle beeinflussen können.

RGS-Proteine können spezifisch die Deaktivierung und die Aktivierung von GIRK-Kanälen beschleunigen. Die beschleunigte Deaktivierung dieser Kanäle kann durch die GAP-Aktivität der RGS-Proteine erklärt werden. Die GIRK-Kanäle werden durch die G $\beta\gamma$ -UE eines stimulierten GPCR aktiviert. Da RGS-Proteine die Inaktivierung der G α -UE und damit der Signalantwort beschleunigt, endet auch der aktivierende Effekt der G $\beta\gamma$ -UE auf die Kanäle rasch. Der Einfluss des RGS-Proteins auf die Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Kanäle lässt sich allerdings nicht auf die GAP-Aktivität zurückführen. Während für die Beschleunigung der Kanalschließung eine intakte RGS-Domäne, die die GAP-Aktivität vermittelt, essentiell ist, wird diese für die Beschleunigung der Kanalöffnung nicht benötigt (Ulens *et al.*, 2000; Mark *et al.*, 2000; Ippolito *et al.*, 2002). Somit ist der Effekt auf die Öffnungskinetik der Kanäle auf einen Bereich außerhalb der C-terminalen RGS-Domäne zurückzuführen, wie z.B. den N-terminalen Bereich des Proteins. Dieser Proteinabschnitt könnte die Interaktion des RGS-Proteins mit dem Rezeptor bzw. nachgeschalteten Effektoren vermitteln. In der vorliegenden Arbeit, konnte für die N-terminale Proteinhälfte des RGS3-Proteins eine solche Funktion nachgewiesen werden: Es wurde gezeigt, dass dieser Proteinbereich unabhängig von der C-terminalen RGS-Domäne mit mGluR7a interagieren kann. Würde das RGS-Protein als eine Art Adapterprotein fungieren, das den Rezeptor indirekt mit den Kanälen verbindet, so könnte nach Stimulation eine schnelle Wirkung auf die Ionenkanäle ausgeübt werden. Durch Bildung eines Signalkomplexes, in dem der Rezeptor und sein G-Protein funktionell über ein RGS-Protein mit dem nachgeschalteten Ionenkanal verbunden sind, würde die Diffusionszeit, die die G $\beta\gamma$ -UE zur Kanalaktivierung benötigt wird verkürzt. Dadurch könnte eine Beschleunigung der Kanalöffnung erzielt werden (siehe Abb. 5-2) (Hollinger und Hepler, 2002; Doupnik *et al.*, 1997; Sadjja *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der Interaktionsstudien dieser Arbeit weisen zusammen mit den hier zusammengetragenen Ergebnissen der Literatur darauf hin, dass RGS3 sowie RGS4 Gruppe III mGluRs mit nachgeschalteten Ionenkanälen funktionell verknüpfen könnten.

Zusätzlich ist in Betracht zu ziehen, dass neben der G $\beta\gamma$ -UE auch die G α_i -UE eine Rolle bei der Kontrolle der GIRK-Kanäle spielt (Peleg *et al.*, 2002). Die G α_i -UE inhibiert die basale

GIRK-Aktivität durch Schließung der Kanäle. Diese Inhibition bewirkt die G_{i1} -UE entweder unabhängig und separat von der $G_{\beta\gamma}$ -UE in der inaktiven GDP-Form oder als ein Mitglied des heterotrimeren $G_{\alpha_{i1}\beta\gamma}$ -Komplexes. Dies unterstützt wiederum die Existenz eines makromolekularen Komplexes bestehend aus Rezeptor, G-Protein-Heterotrimer, das durch seine Interaktion mit dem GIRK auch den Kanal mit in den Komplex einbindet, und einem RGS-Protein (Kovoor und Lester, 2002).

Aus diesen Daten und Hypothesen lässt sich folgendes Model postulieren (siehe Abb. 5-2) (Kovoor und Lester, 2002): In Abwesenheit von Glutamat bindet das heterotrimere $G_{\alpha_{i1}\beta\gamma}$ -Protein an mGluR7a und den GIRK-Kanal. Die $G_{\alpha_{i1}}$ -UE hat GDP gebunden und vermittelt die Wechselwirkung des G-Proteins mit dem GIRK-Kanal. Das RGS-Protein stabilisiert den Rezeptor-Kanal-Komplex, indem es mit dem Rezeptor und dem Ionenkanal zugleich wechselwirkt. Bindung von Glutamat an mGluR7a induziert den Austausch von GDP gegen GTP an der $G_{\alpha_{i1}}$ -UE. Dies führt zur Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in $G_{\alpha_{i1}}$ - und $G_{\beta\gamma}$ -UEs. Durch die Bindung von $G_{\beta\gamma}$ an den GIRK-Kanal wird dieser aktiviert, so dass sich der Kanal öffnet und Kalium-Ionen hindurchfließen können. Das RGS-Protein interagiert nun zusätzlich mit der $G_{\alpha_{i1}}$ -UE, die sich im GTP-Übergangszustand befindet, und beschleunigt die GTP-Hydrolyse, wodurch die Signalübertragung beendet wird. Durch Komplexbildung der beteiligten Komponenten wird gewährleistet, dass sich der zeitliche Ablauf der Ausschüttung und der Entfernung des Neurotransmitters möglichst exakt in der Antwort des Ionenkanals widerspiegelt.

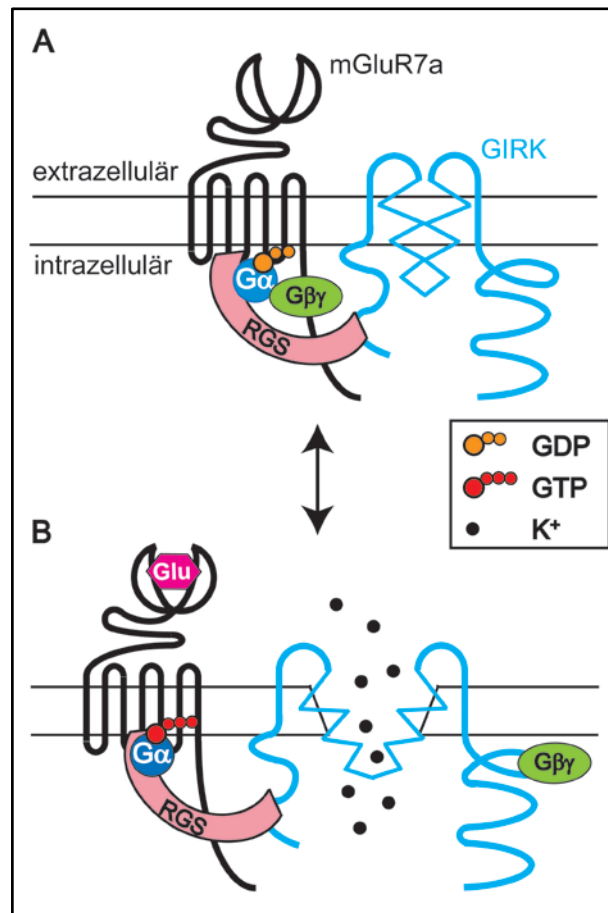


Abb. 5-2 Modell eines makromolekularen mGluR7a-Signalkomplexes: **A:** In Abwesenheit von Glutamat (Glu) bindet das heterotrimeres G α _{i1} β γ -Protein an mGluR7a und den GIRK-Kanal. Die G α _{i1}-UE hat GDP (dargestellt als orange Kreise) gebunden. Das RGS-Protein stabilisiert den Komplex, in dem es mit dem Rezeptor und dem Ionenkanal wechselwirkt. **B:** Bindung von Glu an mGluR7a induziert Austausch von GDP gegen GTP (dargestellt als rote Kreise) an der G α _{i1}-UE-Einheit. Das G-Protein dissoziiert in die G α _{i1}-UE und die G β γ -UE, die an GIRK bindet, wodurch der Kanal aktiviert wird, so dass Kalium-Ionen (dargestellt als schwarze Kreise) hindurchfließen können. Das RGS-Protein interagiert mit der G α _{i1}-UE, die sich im GTP-Übergangszustand befindet, und beschleunigt die GTP-Hydrolyse, so dass die Signalübertragung beendet wird (verändert nach Kovoor und Lester, 2002)

5.2. Effekt der RGS-Proteine auf die mGluR7a-vermittelte Signaltransduktionskaskaden in HEK-Zellen

5.2.1. Effekt der RGS-Proteine auf die umgeleitete mGluR7a-vermittelte Inositolphosphat-Signalkaskade

Nachdem gezeigt worden war, dass RGS3 und RGS4 direkt und Ca²⁺-abhängig mit mGluR7a interagieren, musste im nächsten Schritt demonstriert werden, dass beide RGS-Proteine einen physiologisch nachweisbaren Effekt auf die mGluR7a-vermittelte Signalübertragung haben. Zunächst wurde der Einfluss verschiedener RGS-Proteine (RGS2, 3, 4, 7, 8 und 10) auf die mGluR7a-vermittelte Inositolphosphat (InsP)-Signalkaskade untersucht. Da mGluR7a jedoch *in vivo* an G α _{i1} koppelt und somit sein Signal über die

cAMP-Kaskade transduziert (Pin und Duvoisin, 1995), war eine Umleitung auf den InsP-Weg notwendig. Hierzu wurde ein chimäres α_q -Protein herangezogen, das durch mGluR7a aktiviert werden kann und so die Stimulierung der InsP-Kaskade induziert (Conklin *et al.* 1993). Bei diesem α_q -Protein sind die letzten 3 C-terminalen AS, die die spezifische Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor vermitteln, durch eine Sequenz ersetzt worden, die von mGluR7a erkannt wird. Es wurde gezeigt, dass bei α_q durch die Substitution dieser 3 Aminosäurereste mit denen des α_z -Proteins ($\alpha_{q/z}$ -Chimäre) eine Bindung an Rezeptoren, die natürlicherweise an α_i oder α_o koppeln, erreicht wird.

Durch Expression der $\alpha_{q/z}$ -Chimäre in HEK-mGluR7a-Zellen konnte bei Stimulierung des mGluR7a eine Aktivierung der InsP-Signaltransduktionskaskade und somit der Produktion von InsP erzielt werden. Da RGS-Proteine mittels ihrer GAP-Funktion die GTP-Hydrolyse an der α -UE und damit die Inaktivierung dieser UE beschleunigen, können sie eine rasche Termination der Signaltransduktion bewirken. Somit sollte die zusätzliche Expression eines RGS-Proteins, das mGluR7a bzw. dessen gekoppelte α -UE (hier: $\alpha_{q/z}$ -Chimäre) regulieren kann, in diesem Experiment dazu führen, dass die InsP-Signalkaskade schnell beendet wird, so dass weniger InsP gebildet werden. Von den hier getesteten RGS-Proteinen bewirkten nur RGS2, RGS3 und RGS4 diesen Effekt. In Anwesenheit dieser RGS-Proteine wurde deutlich weniger InsP produziert als in deren Abwesenheit. RGS2 ist jedoch kein geeigneter Kandidat für die *in vivo* mGluR7a-Signalübertragung, die durch α_i vermittelt wird, da RGS2 selektiv nur mit α_q und nicht mit α_i interagiert (siehe 2.3.4., Tab. 2-13; Soundararajan *et al.*, 2008). Dagegen können RGS3 und RGS4 sowohl mit α_q als auch mit α_i wechselwirken (siehe 2.3.4., Tab. 2-13; Soundararajan *et al.*, 2008), was dafür spricht, dass diese beiden RGS-Proteine auch die *in vivo*-Signaltransduktion beeinflussen können. RGS7 hatte in diesem Experiment keinen Einfluss auf die mGluR7a-Signalantwort, was dadurch erklärt werden kann, dass RGS7 nicht an α_q bindet (siehe 2.3.4., Tab. 2-13; Soundararajan *et al.*, 2008) und somit den über das $\alpha_{q/z}$ -Chimäre umgeleiteten Signalweg nicht aktivieren kann. Auch in Anwesenheit von RGS8 erfolgte keine Änderung der Signalantwort, wobei RGS8 allerdings wie auch RGS3 und RGS4, mit α_{i1} und α_q wechselwirken kann (siehe 2.3.4., Tab. 2-13; Soundararajan *et al.*, 2008). Eine mögliche Erklärung, warum RGS8 trotzdem nicht die durch mGluR7a stimulierte InsP-Kaskade regulieren kann, ist, dass RGS8 eventuell nicht, wie RGS3 und RGS4, spezifisch mit diesem Rezeptor interagieren kann.

Interessanterweise wurde in Anwesenheit von RGS10 ein unerwarteter Effekt erzielt: es wurde mehr sekundärer Botenstoff gebildet als ohne RGS-Protein. RGS10 bindet mit hoher Affinität an α_{i1} und nur sehr schwach an α_q (Soundararajan *et al.*, 2008). Jedoch scheint die niedrig affine Bindung an α_q in diesem Experiment nicht zur Beschleunigung der Inaktivierung der $\alpha_{q/z}$ -Chimäre zu führen. Vielmehr scheint RGS10 in diesem Fall die GTP-

Hydrolyse und damit das Ausschalten der $G\alpha_{q/z}$ -UE zu verhindern, so dass mehr InsP produziert werden kann.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden von den getesteten RGS-Proteinen RGS3 und RGS4 als wahrscheinlichste Kandidaten zur Regulation der mGluR7a-vermittelten Signaltransduktion *in vivo* ausgewählt.

Weiterführend sollte gezeigt werden, dass der Effekt von RGS3 bzw. RGS4 auf die mGluR7a-vermittelte InsP-Kaskade allein auf der GAP-Aktivität der beiden RGS-Proteine beruht. Hierzu wurden bereits beschriebene RGS3- bzw. RGS4-Mutanten herangezogen, die nicht an die $G\alpha$ -UE binden können und keine GAP-Aktivität besitzen (GAP-inaktive Mutanten) (Scheschonka *et al.*, 2000; Druey und Kehrl, 1997). Bei diesen Mutanten sind AS innerhalb der RGS-Domäne, die wichtig für die Vermittlung der Interaktion mit den *Switch*-Regionen des $G\alpha$ -Proteins sind, mutiert (Tesmer *et al.*, 1997). Dies führt zur Inhibition der Bindung des RGS-Proteins an die $G\alpha$ -UE sowie zum Verlust der GAP-Aktivität. In den beiden Mutanten RGS3-E419A/N420A (EN) und RGS4-N88S (N) erfolgten die Punktmutationen in einem Bereich der RGS-Domäne, die mit dem *Switch* 1 und 2 der $G\alpha_{i1}$ -UE interagieren (Tesmer *et al.*, 1997) (siehe Abb. 4-13). Dagegen befinden sich die Mutationen bei den Konstrukten RGS3-R499A/F500A (RF) und RGS4-S164Q (S) in einem Abschnitt der RGS-Domäne, die nur mit dem *Switch* 1 der $G\alpha_{i1}$ -UE wechselwirkt (siehe Abb. 4-13).

Die Inaktivierung der GAP-Aktivität führte dazu, dass weder RGS3 noch RGS4 einen Einfluss auf die mGluR7a-Signalübermittlung nehmen konnten. Somit scheint allein die GAP-Aktivität den Effekt von RGS3 und RGS4 auf die Signaltransduktion des mGluR7a zu vermitteln. Nur eine der beiden RGS3-Mutanten (EN) übte einen geringen Effekt aus, der jedoch verglichen mit dem RGS3-Wildtyp stark reduziert war (siehe Abb. 4-14). Eventuell ist bei dieser Mutation noch eine geringe Interaktion mit der $G\alpha_{i1}$ -UE möglich, so dass RGS3 einen messbaren Effekt auf die GTP-Hydrolyse ausüben kann.

5.2.2. Effekt von RGS3 und RGS4 auf die mGluR7a-vermittelte cAMP-Signalkaskade

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob RGS3 und RGS4 die *in vivo* vorkommende mGluR7a-vermittelte cAMP-Signalkaskade regulieren können. mGluR7a koppelt *in vivo* an $G\alpha_{i1}$, so dass das Signal über die cAMP-Kaskade in die Zelle transduziert wird (Pin und Duvoisin, 1995): Wird der Rezeptor und somit auch seine $G\alpha_{i1}$ -UE stimuliert, so erfolgt eine Hemmung der Adenylatzyklase, wodurch der cAMP-Spiegel in der Zelle sinkt. Die GAP-Aktivität eines RGS-Proteins, das den Rezeptor beeinflussen kann, würde dazu führen, dass die $G\alpha_{i1}$ -UE inaktiviert und somit die Hemmung der Adenylatzyklase schnell beendet wird, wodurch wieder cAMP produziert werden kann. Sowohl RGS3 als auch RGS4 bewirkten

einen Anstieg der cAMP-Menge, was darauf hinweist, dass beide Proteine die mGluR7a-vermittelte Inhibition der Adenylatzyklase beeinflussen können.

Weiterhin wurde bestätigt, dass die Wirkung von RGS3 und RGS4 die GAP-Aktivität erfordert. Hierzu wurde eine Mutante des $G\alpha_{i1}$ -Proteins eingesetzt, bei der die Bindung an RGS-Proteine verhindert wird (RGS-insensitive $G\alpha_{i1}$ -UE) (DiBello *et al.*, 1998; Lan *et al.*, 1998). Durch die Substitution eines singulären Glyzinrestes (Glyzin183) in der *Switch*-Region I des $G\alpha_{i1}$ -Proteins, die wichtig ist für die Wechselwirkung zwischen RGS- und $G\alpha$ -Protein, mit einem Serinrest bleibt die $G\alpha_{i1}$ -UE zwar voll funktionsfähig, jedoch können RGS-Proteine diese UE weder binden noch regulieren. In Gegenwart dieser Mutante konnte weder RGS3 noch RGS4 die Signaltransduktion des mGluR7a beeinflussen. Daraus lässt sich schließen, dass die beiden RGS-Proteine die mGluR7a-Signalübermittlung beeinflussen, indem sie die Inaktivierung der gekoppelten $G\alpha_{i1}$ -UE beschleunigen.

5.3. Kolokalisation von mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 in kortikalen Neuronen

Damit die beschriebenen Interaktionen zwischen mGluR7a und RGS3 bzw. RGS4 (siehe 5.1.) sowie die Regulation des Rezeptors (5.2.) durch die beiden RGS-Proteine *in vivo* erfolgen können, ist es essentiell, dass diese Proteine sich am gleichen Ort befinden. Da mGluR7a präsynaptisch in der aktiven Zone lokalisiert ist (Shigemoto *et al.*, 1996), sollte hier gezeigt werden, dass RGS3 und RGS4 dort ebenfalls zu finden sind. Dazu wurden hochauflösende elektronenmikroskopische Analysen kortikaler Maushirnschnitte erstellt. Für diese Untersuchungen wurde der Kortex ausgewählt, da in diesem Hirnareal die Expression aller drei Proteine beschrieben ist (Kinzie *et al.*, 1995; Gold *et al.*, 1997; Bradley *et al.*, 1998): mGluR7a sowie RGS4 sind hier in relativ hohen Konzentrationen zu finden, während RGS3 in geringem Ausmaß im Kortex exprimiert wird.

Da nur für mGluR7a ein verlässlicher Antikörper kommerziell erhältlich war, jedoch nicht für RGS3 und RGS4, wurden in Zusammenarbeit mit der Firma MFD Diagnostics (Mainz) polyklonale Kaninchenantikörper gegen diese beiden RGS-Proteine hergestellt. Die Spezifität dieser Antikörper wurde, nach deren Affinitätsaufreinigung aus dem jeweiligen Kaninchenserum, sowohl im Western Blot als auch in immunzytochemischen Untersuchungen an transfizierten hippokampalen Neuronen nachgewiesen. Beide Antikörper erkannten spezifisch das entsprechende Zielantigen und wiesen keine Kreuzreaktion mit anderen RGS-Proteinen, die eine ähnliche AS-Sequenz wie das jeweilige Antigen besitzen, auf.

Mit dem RGS3-Antikörper konnte im Western Blot das endogen exprimierte RGS3-Protein in Maushirnhomogenat identifiziert werden. Der Antikörper erkannte im

Hirnhomogenat neben dem ca. 90 kDa großen RGS3 auch eine ca. 130 kDa große Protein-Isoform, wobei es sich um das PDZ-RGS3-Protein handeln könnte, das ebenfalls endogen im Gehirn vorkommt (Kehrl *et al.*, 2002). Mit dem RGS4-Antikörper war es nicht möglich, im Western Blot das endogene RGS4-Protein in Maushirnhomogenat nachzuweisen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das RGS4-Protein aufgrund des „N-End“-Gesetzes eine sehr kurze Halbwertszeit hat und sehr schnell abgebaut wird (Lee *et al.*, 2005). Das Ubiquitin-abhängige „N-End“-Gesetz korreliert die Halbwertszeit eines Proteins in der Zelle mit der Natur seines N-terminalen Restes (Varshavsky, 1992). Eine spezifische Gruppe von E3-Ligasen erkennt basische oder hydrophobe N-terminale Reste, wodurch diese ubiquitiniert werden und schließlich das Protein degradiert wird. Aufgrund dieses Degradationsprozesses scheint bei der Herstellung des Hirnhomogenates eine große Menge an RGS4-Protein verloren zu gehen, sodass die verbleibende Menge an Protein zu gering ist, um sie mit dem RGS4-Antikörper detektieren zu können. Auch durch den Einsatz verschiedener Proteasom- sowie Proteaseinhibitoren zur Verhinderung des Proteinabbaus und eine starke Verkürzung der Herstellungszeit des Homogenates konnte dieses Detektionsproblem nicht behoben werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Wahrscheinlich konnte keine für den Antikörper detektierbare Proteinmenge erhalten werden. Dennoch wurde der RGS4-Antikörper erfolgreich in elektronenmikroskopischen Analysen von Hirnschnitten verwendet: Der RGS4-Antikörper ergab eine spezifische Färbung in Hirnschnitten von Wildtyp-Mäusen, während diese in Präparaten von RGS4-defizienten Tieren, die als Negativkontrolle dienten, nicht erhalten wurde.

Sowohl mit dem RGS3- als auch mit dem RGS4-Antikörper wurden prä- und postsynaptische Strukturen kortikaler Neuronen angefärbt. Beide RGS-Proteine scheinen somit spezifisch an Synapsen lokalisiert zu sein, wobei mit dem RGS3-Antikörper deutlich weniger Synapsen in den Kortexschnitten angefärbt wurden als mit dem RGS4-Antikörper, was der publizierten geringen Expression des RGS3-Proteins im Kortex entspricht. mGluR7a wurde - wie erwartet - an der Präsynapse kortikaler Neuronen, mit einem ähnlichen Verteilungsmuster wie RGS3 und RGS4, nachgewiesen. Diese Daten zeigen dass, die beiden RGS-Proteine und der mGluR7a an der präsynaptischen Membran kolokalisieren. Es ist daher vorstellbar, dass im Kortex die Regulation des mGluR7a hauptsächlich durch das RGS4-Protein kontrolliert wird, während RGS3 diese Funktion in anderen Hirnbereichen, in denen es stärker exprimiert wird - wie z.B. dem Hippokampus -, übernimmt.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Lokalisation des mGluR7a in den RGS4-defizienten Tieren aufgrund des fehlenden RGS4-Proteins verändert. Es wäre durchaus vorstellbar, dass RGS4, das an die Plasmamembran bindet (Srinivasa *et al.*, 1998; Tu *et al.*, 2001), durch seine Wechselwirkung mit dem Rezeptor dessen Verteilungsmuster beeinflusst. Da das Lokalisationsmuster des Rezeptors jedoch in Präparaten von Wildtyp- und RGS4-

defizienten Mäusen vergleichbar aussah, scheint RGS4 die Menge und Verteilung des mGluR7a-Proteins nicht zu beeinflussen.

5.4. Effekt von RGS4 auf die mGluR7a-vermittelte cAMP-Signaltransduktion *in vivo* in kortikalen Neuronen

Der *in vivo*-Nachweis des regulatorischen Effektes von RGS4 auf die Signaltransduktion der Gruppe III mGluRs bzw. des mGluR7a erfolgte durch Vergleich der Signalantwort dieser Rezeptoren in kultivierten kortikalen Neuronen aus Wildtyp- und RGS4-defizienten (*knock-out*, KO) Mäusen. Dies war für RGS3 nicht möglich, da bisher noch keine RGS3-defiziente Mauslinie zur Verfügung steht.

Die Aktivierung der Gruppe III mGluR- bzw. mGluR7a-vermittelten cAMP-Signaltransduktion führt zu einer Inhibition der Adenylatzyklase, wodurch der intrazelluläre cAMP-Spiegel sinkt. In kultivierten kortikalen Neuronen aus WT-Mäusen konnte dieser Effekt erzielt werden: Mit dem Gruppe III mGluR-spezifischen Agonisten L-AP4 erfolgte bei einer Konzentration von 100 μ M eine Reduktion der intrazellulären cAMP-Menge um 40%. Mit einer höheren L-AP4-Konzentration (1 mM) konnte eine Verringerung um bis zu 50% erreicht werden. Der mGluR7a-spezifische Agonist AMN082 bewirkte eine Abnahme um 32%.

Wenn RGS4 diese Transduktion *in vivo* regulieren kann, so sollte das RGS-Protein durch seine GAP-Aktivität die Signalkaskade durch Deaktivierung des G-Proteins relativ schnell beenden. Dies sollte dazu führen, dass die Inhibition der Adenylatzyklase aufgehoben wird, so dass mehr cAMP produziert werden kann. Dagegen kann in Neuronen von RGS4-defizienten Mäusen, die das RGS4-Protein nicht exprimieren, diese schnelle Deaktivierung des G-Proteins durch RGS4 nicht stattfinden, so dass die Inhibition der Adenylatzyklase so lange anhält bis das gebundene GTP durch die relativ langsame intrinsische GAP-Aktivität des G-Proteins hydrolysiert ist. Deshalb sollte die Stimulation der Gruppe III mGluRs in den RGS4-KO-Zellen zu einer stärkeren Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration führen verglichen mit WT-Nervenzellen.

Zunächst ist zu erwähnen, dass die basale cAMP-Konzentration unstimulierter Neuronen aus RGS4-defizienten und Wildtyp-Mäuse vergleichbar war. Auch konnte eine ähnliche Aktivierung der Adenylatzyklase mit Forskolin in Zellen aus WT- und RGS4-KO-Tieren erzielt werden. Jedoch erfolgte in den RGS4-defizienten Nervenzellen weder mit 100 μ M noch mit 1 mM L-AP4 eine Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration, während mit diesen L-AP4-Konzentrationen in den WT-Zellen eine Verringerung des cAMP-Menge um bis zu 50% erreicht wurde.

Bei Stimulation der RGS4-KO-Zellen mit dem mGluR7a-spezifischen Agonisten AMN082 oder geringen Mengen an L-AP4 (1 μ M) wurde ein Anstieg des cAMP-Spiegels erhalten: Mit

1 μM L-AP4 wurde eine Steigerung um 37% und mit 10 μM AMN082 sogar um 71% erzielt. Diese Ergebnisse waren unerwartet, da eine verstärkte Reduktion des intrazellulären cAMP-Gehaltes aufgrund des fehlenden RGS4-Proteins vorausgesagt worden war.

Auch wenn die Daten der RGS4-defizienten Neuronen nicht mit der aufgrund der Hypothese erwarteten Ergebnisse übereinstimmen, ist festzustellen, dass die Signaltransduktion der Gruppe III mGluRs durch den Verlust des RGS4-Proteins eindeutig gestört wird. RGS4 scheint somit für den geordneten und korrekten Ablauf der Gruppe III mGluR-vermittelten Signaltransduktion notwendig zu sein. Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich durch das bereits vorgestellte Modell des Signalkomplexes erklären: Bereits vor Stimulation durch einen Agonisten besteht ein Komplex aus Rezeptor, G-Protein, nachgeschalteten Effektoren und RGS-Protein, wobei das RGS-Protein den Signalkomplex stabilisiert. Somit könnte das Fehlen des RGS-Proteins zu einer Instabilität des Komplexes führen. Dies könnte zur Folge haben, dass der Komplex zerfällt oder überhaupt nicht gebildet werden kann. Durch die fehlende räumliche Zusammenführung und Organisation des Rezeptors, seiner nachgeschalteten Effektoren und Modulatoren könnte bei Stimulation des Rezeptors keine geordnete Signaltransduktion erfolgen. Dies würde erklären, weshalb in den RGS4-KO-Neuronen keine Signalantwort wie in den WT-Zellen erzielt wurde.

Es stellt sich nun noch die Frage, wie sich die Ergebnisse erklären lassen, die mit sehr geringen Mengen an L-AP4 (1 μM), die in den Wildtyp-Neuronen keine Aktivierung der mGluRs bewirkten, und dem mGluR7a-spezifischen Agonisten AMN082 erhalten wurden. Bei Behandlung der RGS4-KO-Zellen mit 1 μM L-AP4 oder 10 μM AMN082 wurde in beiden Fällen eine Erhöhung der cAMP-Konzentration verglichen mit unstimulierten RGS4-KO-Neuronen erhalten. Dies bedeutet, dass nicht nur keine mGluR-vermittelte Inhibition der Adenylatzyklase stattfindet, sondern sogar der entgegengesetzte Effekt ausgelöst wird: eine Aktivierung der cAMP-Produktion. Es ist bekannt, dass durch die Aktivierung von mGluRs durch einen Agonisten, der alle drei Gruppen der mGluRs stimuliert (trans-APCD = trans-1-Aminozyklopentan-1,3-dicarboxyl Säure), ein Anstieg der cAMP-Menge im Gehirn bewirkt wird (Winder und Conn, 1992; Winder und Conn, 1993; Cartmell *et al.*, 1997). Es gibt eine Reihe von GPCRs, die nicht direkt an die Adenylatzyklase gekoppelt sind, deren Aktivierung jedoch die cAMP-Produktion erhöhen kann (Magistretti und Schorderet, 1985; Pilc und Enna 1986; Johnson und Minnemann, 1987). Dies wird dadurch möglich, dass diese Rezeptoren die cAMP-Antwort anderer Rezeptoren, die an G_{α_s} koppeln und somit die Adenylatzyklase stimulieren, potenzieren. So führt die synergistische Interaktion der mGluRs mit Rezeptoren, die via G_{α_s} direkt an die Adenylatzyklase gekoppelt sind und diese aktivieren (z.B. A_2 -Adenosin-, α_1 -Adreno- oder H_1 -Histamin-Rezeptoren), zur Potenzierung der cAMP-Produktion (Magistretti und Schorderet, 1985; Pilc und Enna 1986; Johnson und Minnemann, 1987; Garbag und Schwartz, 1988). Ein möglicher Mechanismus, durch den die mGluRs die

cAMP-Produktion dieser Rezeptoren potenzieren, ist, dass die $G\alpha_s$ -vermittelte Aktivierung der Typ II Adenylatzyklase durch die freie $G\beta\gamma$ -UE des aktivierten mGluR beeinflusst wird (Tang und Gilman, 1991; Feinstein *et al.*, 1991). Somit könnte die Koaktivierung von mGluRs und Rezeptoren, die an $G\alpha_s$ gekoppelt sind, zu einem synergistischen Anstieg der cAMP-Produktion führen abhängig davon, welcher Adenylatzyklase-Typ vorhanden ist. Wahrscheinlich wird die beschriebene Potenzierung der cAMP-Bildung durch den mGluR-Agonisten trans-APCD in Neuronen durch einen Vertreter der Gruppe II mGluRs vermittelt (mGluR2 oder 3), die eigentlich - wie auch die Gruppe III mGluRs - negativ an die Adenylatzyklase koppeln und somit die Reduktion der cAMP-Menge bewirken.

Wie ist es möglich, dass ein Rezeptor zwei so gegensätzliche Signalantworten auslösen kann? Es wird postuliert, dass die Aktivierung eines Rezeptors abhängig von den spezifisch nachgeschalteten Enzymen, äußerst verschiedene Effekte auf das sekundäre Botenstoffsystem haben kann (Winder und Conn, 1995). So konnte z.B. für den α_2 -Adrenorezeptor, der eigentlich die cAMP-Produktion inhibiert, gezeigt werden, dass dieser, wenn er in Zellen mit der Typ II Adenylatzyklase koexprimiert wird, die Erhöhung des cAMP-Levels induzieren kann (Federmann *et al.*, 1992). Diese Daten zeigen, dass es nicht abwegig ist, davon auszugehen, dass auch die Gruppe III mGluRs, die eigentlich negativ an die Adenylatzyklase koppeln, auch den gegenteiligen Effekt einer Steigerung der cAMP-Menge, wie in den RGS4-KO-Neuronen gesehen, hervorrufen können. Welcher Effekt durch die Aktivierung der Rezeptoren ausgelöst wird, ist nach den eben beschriebenen Ergebnissen allein davon abhängig, welche Effektoren sich zum Zeitpunkt der Stimulation in der Nähe des Rezeptors befinden. Würde durch das Fehlen des RGS4-Proteins, das den Signalkomplex - bestehend aus mGluR und nachgeschalteten Effektor - stabilisiert, dieser Komplex aufgelöst, so würde die direkte Nachbarschaft zwischen Rezeptor und Effektor gestört werden. Es wäre in diesem Fall möglich, dass andere Effektorenzyme in die Nachbarschaft des Rezeptors gelangen. So auch vielleicht Rezeptoren, die an $G\alpha_s$ koppeln und die Aktivierung der Adenylatzyklase bewirken. Würde eine synergistische Wechselwirkung der Gruppe III mGluRs mit diesen stattfinden, so könnte eine Potenzierung der cAMP-Produktion bewirkt werden. Da die Steigerung des cAMP-Levels in den RGS4-defizienten Nervenzellen sehr deutlich durch spezifische Aktivierung des mGluR7a mit AMN082 erhalten wurde (71% Anstieg), könnte dieser Effekt eventuell hauptsächlich durch diesen mGluR-Subtyp hervorgerufen werden.

5.5. Modell der Regulation des mGluR7a durch RGS3/RGS4

Aus den Daten dieser Dissertation wurde ein Modell erstellt, dass das bereits bestehende Modell der Regulation der mGluR7a-Signaltransduktion (siehe 2.2.6.) durch die Wirkung von RGS3 bzw. RGS4 erweitert und verfeinert (siehe Abb. 5-3). Danach liegt im

Ruhezustand der präsynaptischen Membran mGluR7a an PICK1 gebunden vor, während keine Assoziation mit CaM stattfindet. Die inaktive PKC interagiert ebenfalls mit PICK1. Da PICK1 dimerisiert, entsteht eine indirekte Verknüpfung des mGluR7a und der PKC. Bereits jetzt besteht ein Signalkomplex aus Rezeptor, heterotrimerem $G\alpha_{i1}\beta\gamma$ -Protein, spannungsabhängigen P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanal und dem RGS-Protein (RGS3 bzw. RGS4), das den Komplex durch Wechselwirkung mit mGluR7a und dem Ca^{2+} -Kanal stabilisiert. Die GAP-Aktivität des RGS-Proteins wird durch die Bindung von PIP_3 an die RGS-Domäne inhibiert (siehe Abb. 5-3, A).

Durch ein ankommendes Aktionspotential wird die präsynaptische Membran depolarisiert, so dass sich die spannungsabhängigen P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanäle öffnen und Ca^{2+} -Ionen in das präsynaptische Neuron einströmen. Die daraus resultierende Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt zur Ausschüttung von Glutamat in den synaptischen Spalt (siehe Abb. 5-3, B).

Die hochfrequente Auslösung von Aktionspotentialen bewirkt die Freisetzung hoher Mengen an Glutamat, so dass schließlich die Stimulation des nieder-affinen mGluR7a erfolgt. Dadurch wird der Austausch von GDP gegen GTP an der $G\alpha_{i1}$ -UE induziert. Die aktive $G\alpha_{i1}$ -UE transduziert das Signal des Rezeptors in die Zelle durch die Inhibition der Adenylatzyklase. Durch die eingeströmten Ca^{2+} -Ionen werden CaM und PKC aktiviert (siehe Abb. 5-3, C).

Ca^{2+} /CaM bindet an den CT des mGluR7a und an das RGS-Protein. Die Bindung von Ca^{2+} /CaM an die RGS-Domäne hebt die Inhibition der GAP-Aktivität durch PIP_3 auf. Die Termination der mGluR7a-Signalantwort durch die GAP-Aktivität des RGS-Proteins erfolgt jedoch noch nicht, da die Interaktion zwischen dem RGS-Protein und mGluR7a durch die gebundenen Ca^{2+} /CaM-Moleküle inhibiert wird. Die aktive PKC bindet an die Membran und phosphoryliert das Serin 862 im CT des mGluR7a. Die Dissoziation der $G\beta\gamma$ -UE vom Rezeptor-CT wird entweder durch die Bindung von Ca^{2+} /CaM an den CT oder durch Phosphorylierung des Serin 862 vermittelt. Die aktive $G\beta\gamma$ -UE interagiert mit dem Ca^{2+} -Kanal und bewirkt dessen Schließung, so dass der Ca^{2+} -Einstrom beendet wird. Eine Hemmung der Ca^{2+} -Kanäle kann zusätzlich auch durch die aktive PKC erfolgen (siehe Abb. 5-3, D).

Die resultierende Erniedrigung des Ca^{2+} -Spiegels bewirkt die Termination der Glutamatausschüttung und der Interaktion von Ca^{2+} /CaM mit dem Rezeptor und dem RGS-Protein. Das RGS-Protein kann nun ungehindert an mGluR7a binden und die Hydrolyse des GTP an der $G\alpha_{i1}$ -UE beschleunigen, wodurch die Signalantwort schnell terminiert wird, so dass die Präsynapse wieder in den Ruhezustand zurückkehren kann (siehe Abb. 5-3, E).

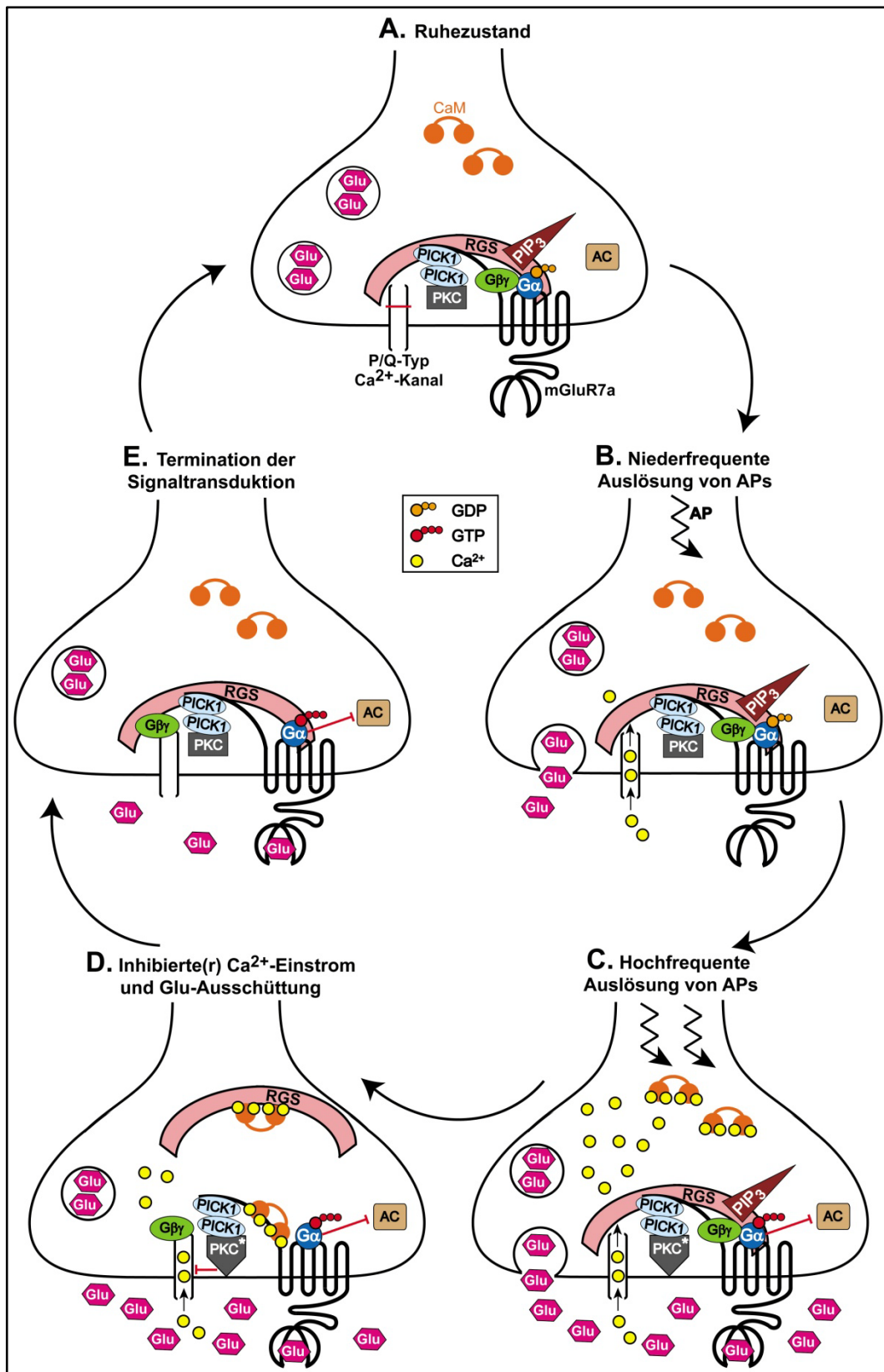


Abb. 5-3 Modell der Regulation der mGluR7a-Signaltransduktion: A. Ruhezustand der Präsynapse: mGluR7a bindet an PICK1, während keine Assoziation mit CaM stattfindet. Das inaktive $G\alpha_{i1}\beta\gamma$ -Protein ist mit dem Rezeptor assoziiert, wobei die $G\alpha_{i1}$ -UE GDP (als orange Kreise dargestellt) gebunden hat. Die inaktive Proteinkinase C (PKC) bindet an das PICK1-Dimer. Der Signalkomplex besteht aus Rezeptor, heterotrimerem $G\alpha_{i1}\beta\gamma$ -Protein, spannungsabhängigen P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanal und dem RGS-Protein (RGS3 bzw. RGS4), das den Komplex durch Wechselwirkung mit mGluR7a und

dem Ca^{2+} -Kanal stabilisiert. Die GAP-Aktivität des RGS-Proteins wird durch die Bindung von PIP_3 an die RGS-Domäne inhibiert. **B. Niederfrequente Auslösung von Aktionspotentialen (APs):** Das AP depolarisiert die präsynaptische Membran, wodurch spannungsabhängige P/Q-Typ Ca^{2+} -Kanäle geöffnet werden. Die resultierende Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (Ca^{2+} -Ionen sind als gelbe Kreise dargestellt) in der Präsynapse führt zur Ausschüttung von Glutamat (Glu). **C. Hochfrequente Auslösung von Aktionspotentialen (APs):** Durch die hochfrequente Auslösung von APs werden hohe Mengen an Glu freigesetzt. mGluR7a wird jetzt stimuliert, worauf an der $\text{G}\alpha_{i1}$ -UE der Austausch von GDP gegen GTP (als rote Kreise dargestellt) induziert wird. Die aktive $\text{G}\alpha_{i1}$ -UE inhibiert die Adenylatzyklase (AC). Durch die eingeströmten Ca^{2+} -Ionen werden CaM und PKC aktiviert. Die aktive PKC bindet an die Membran und phosphoryliert das Serin 862 am mGluR7a-CT. **D. Inhibierte(r) Ca^{2+} -Einstrom und Glu-Ausschüttung:** Die Bindung von Ca^{2+} /CaM an die RGS-Domäne hebt die Inhibition der GAP-Aktivität durch PIP_3 auf. Die Interaktion zwischen dem RGS-Protein und mGluR7a wird durch die gebundenen Ca^{2+} /CaM-Moleküle inhibiert. Die Dissoziation der $\text{G}\beta\gamma$ -UE vom Rezeptor-CT wird entweder durch die Bindung von Ca^{2+} /CaM an den Rezeptor-CT oder durch Phosphorylierung des CT vermittelt. Die aktive $\text{G}\beta\gamma$ -UE bindet an den Ca^{2+} -Kanal und bewirkt dessen Schließung, so dass der Ca^{2+} -Einstrom endet. Die Hemmung des Ca^{2+} -Kanals kann zusätzlich auch durch die aktive PKC erfolgen. Durch die Erniedrigung des Ca^{2+} -Spiegels endet die Ausschüttung von Glu. **E. Termination der Signaltransduktion:** Die erniedrigte Ca^{2+} -Konzentration bewirkt die Inaktivierung von PKC und CaM. CaM dissoziiert vom Rezeptor-CT und vom RGS-Protein. Das RGS-Protein bindet an mGluR7a und beschleunigt die GTP-Hydrolyse an der $\text{G}\alpha_{i1}$ -UE und somit die Termination der Signalantwort, so dass die Präsynapse wieder in den Ruhezustand zurückkehren kann.

Zusammengefasst konnte mit den Ergebnissen dieser Arbeit das bestehende Modell der Regulation präsynaptischer Aktivität durch mGluR7a erweitert werden. Als neue Komponenten des Signalkomplexes wurden RGS3 bzw. RGS4 und PIP_3 identifiziert. Auch die Funktionen des aktivitätsabhängigen Modulators CaM werden durch die hier beschriebenen Interaktionen mit den beiden RGS-Proteinen vielfältiger. Durch die Gesamtheit dieser komplexen intrazellulären Wechselwirkungen kann die mGluR7a-vermittelte Signaltransduktion noch feiner reguliert werden.

6. Anhang

6.1. Abbildungen

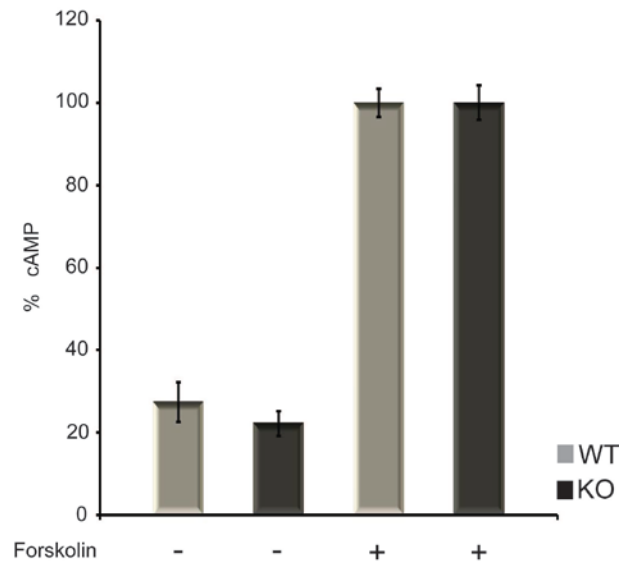


Abb. 6-1 Vergleich der basalen und der Forskolin-stimulierte cAMP-Konzentration in kortikalen Wildtyp (WT)- und RGS4-defizienten (*knock-out*, KO)-Neuronen: Kortikale Neuronen von WT-Mäusen und RGS4-KO-Mäusen wurden 21 Tage kultiviert. Die Aktivierung der Adenylatzyklase erfolgte mit Forskolin (10 μ M). Der Abbau von produziertem cAMP wurde durch Anwesenheit von IBMX (0.75 mM) inhibiert. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde mittels eines *cAMP-Enzymimmunoassays* (GE Healthcare, Freiburg) bestimmt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten mit je 4 Replikaten pro Ansatz dar (+/- SEM). Sowohl die basale als auch die Forskolin-stimulierte cAMP-Konzentration war in den WT- und KO-Neuronen gleich hoch.

6.2. Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-Amino-Ethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi
ca.	circa
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat

Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde)
cpm	Einheiten pro Minute (<i>counts per minute</i>)
d	destilliert
Da	Dalton
DAG	Diazylglyzerin
DCG-IV	(2S, 2'R, 3'R)-2-(2'3'-Dicarboxyzyklopropyl)-Glyzin
DDT	Dithiothreitol
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxy ribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
ECL	gesteigerte Chemolumineszenz (<i>enhanced chemoluminescence</i>)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
EGTA	1,2-Bis-(2-Aminoethoxyethan)-Tetraessigsäure
et al	und andere (<i>et altera</i>)
FCS	fötales Kälberserum
g	maximale Erdbeschleunigung
G α	α -Untereinheit trimerer G-Proteine
GAP	<i>GTPase-accelerating protein</i>
G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -Untereinheit trimerer G-Proteine
GABA	γ -Aminobuttersäure (<i>γ-amino butyric acid</i>)
GDP	Guanosindiphosphat
GIRK	G-Protein regulierter, „einwärtsgerichteter“ K ⁺ -Kanal (<i>G protein-regulated inwardly rectifying K⁺-channel</i>)
Glu	Glutamat
GluR	Glutamatrezeptor
GSH	Glutathion-Sepharose
GRIP	<i>Glutamat receptor interacting protein 1</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HEK 293	humane embryonale Nierenzelllinie (<i>human embryonic kidney</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-pierazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse reddish peroxidase</i>)
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
iLoop	intrazelluläre Schleife
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
K _D	Dissoziations-Konstante
k	Kilo
KO	Mausnullmutante (<i>knockout</i>)
L	Liter
L-AP4	L2-Amino-4-Phosphonobutyrat
LB	Luria Bertani
μ	mikro
m	milli
M	molar
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>

mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
min	Minute(n)
n	nano
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-spezifischer Glutamatrezeptor
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>poly chain reaction</i>)
PDZ	<i>postsynaptic density-95/discs large/zona occludens-1</i> -Proteindomänen
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration (<i>potentium Hydrogenii</i>)
Pias1	<i>protein inhibitor of activated Stat-1</i>
PICK1	<i>protein interacting with C kinase 1</i>
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RGS	<i>regulators of G protein signalling</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde(n)
Ser	Serin
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TCA	Trichlor-Essigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TMD	Transmembrandomäne
trans-APCD	trans-1-Aminozyklopentan-1,3-dicarboxyl Säure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit (<i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

6.3. Literaturverzeichnis

- Abramow-Newerly, M., A. A. Roy, et al. (2006).** "RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins." *Cell Signal* 18(5): 579-91.
- Airas, J. M., H. Betz, et al. (2001).** "PKC phosphorylation of a conserved serine residue in the C-terminus of group III metabotropic glutamate receptors inhibits calmodulin binding." *FEBS Lett* 494(1-2): 60-3.
- Alagarsamy, S., C. Junge, et al. (1999).** "NMDA inhibits mGluR5 function by activating protein kinase C." *Neuropharmacology* 38(5).
- Alagarsamy, S., M. J. Marino, et al. (1999).** "Activation of NMDA receptors reverses desensitization of mGluR5 in native and recombinant systems." *Nat Neurosci* 2(3): 234-40.
- Alagarsamy, S., S. T. Rouse, et al. (1999).** "Activation of N-methyl-D-aspartate receptors reverses desensitization of metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in native and recombinant systems." *Ann N Y Acad Sci* 868: 526-30.
- Baskys, A. und R. C. Malenka (1991).** "Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus." *J Physiol* 444: 687-701.
- Benzing, T., M. B. Yaffe, et al. (2000).** "14-3-3 interacts with regulator of G protein signaling proteins and modulates their activity." *J Biol Chem* 275(36): 28167-72.
- Berman, D. M. und A. G. Gilman (1998).** "Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate." *J Biol Chem* 273(3): 1269-72.
- Bernstein, L. S., S. Ramineni, et al. (2004).** "RGS2 binds directly and selectively to the M1 muscarinic acetylcholine receptor third intracellular loop to modulate G $G_{\alpha_{i_q/11}}$ signaling." *J Biol Chem* 279(20): 21248-56.
- Brady, A. E. und L. E. Limbird (2002).** "G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction." *Cell Signal* 14(4): 297-309.
- Bruns, R. F., F. Pons, et al. (1980).** "Glutamate- and veratridine-elicited accumulations of cyclic AMP in brain slices: a role for factors which potentiate adenosine-responsive systems." *Brain Res* 189(2): 550-5.
- Bunemann, M. and M. M. Hosey (1998).** "Regulators of G protein signaling (RGS) proteins constitutively activate $G_{\beta\gamma}$ -gated potassium channels." *J Biol Chem* 273(47): 31186-90.
- Bushell, T. J., G. Sansig, et al. (2002).** "Altered short-term synaptic plasticity in mice lacking the metabotropic glutamate receptor mGlu7." *ScientificWorldJournal* 2: 730-7.
- Cartmell, J., H. Schaffhauser, et al. (1997).** "mGluR-evoked augmentation of receptor-mediated cyclic AMP formation in neonatal and adult rat striatum." *Br J Pharmacol* 121(7): 1263-8.
- Coleman, D. E., A. M. Berghuis, et al. (1994).** "Structures of active conformations of $G_{\alpha_{i1}}$ and the mechanism of GTP hydrolysis." *Science* 265(5177): 1405-12.
- Conklin, B. R., Z. Farfel, et al. (1993).** "Substitution of three amino acids switches receptor specificity of G_{α_q} to that of G_{α_i} ." *Nature* 363(6426): 274-6.
- Conn, P. J. (2003).** "Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors." *Ann N Y Acad Sci* 1003: 12-21.
- Conn, P. J. und J. P. Pin (1997).** "Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-37.
- Cotman, C. W., J. A. Flatman, et al. (1986).** "Effects of excitatory amino acid antagonists on evoked and spontaneous excitatory potentials in guinea-pig hippocampus." *J Physiol* 378: 403-15.
- De Vries, L., B. Zheng, et al. (2000).** "The regulator of G protein signaling family." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 235-71.
- De Waard, M., H. Liu, et al. (1997).** "Direct binding of G-protein $\beta\gamma$ complex to voltage-dependent calcium channels." *Nature* 385(6615): 446-50.
- Dev, K. K., Y. Nakajima, et al. (2000).** "PICK1 interacts with and regulates PKC phosphorylation of mGluR7." *J Neurosci* 20(19): 7252-7.
- Dev, K. K., S. Nakanishi, et al. (2001).** "Regulation of mglu(7) receptors by proteins that interact

- with the intracellular C-terminus." *Trends Pharmacol Sci* 22(7): 355-61.
- Dhingra, A., E. Faurobert, et al. (2004).** "A retinal-specific regulator of G-protein signaling interacts with $G\alpha_o$ and accelerates an expressed metabotropic glutamate receptor 6 cascade." *J Neurosci* 24(25): 5684-93.
- DiBello, P. R., T. R. Garrison, et al. (1998).** "Selective uncoupling of RGS action by a single point mutation in the G protein α -subunit." *J Biol Chem* 273(10): 5780-4.
- Diverse-Pierluissi, M., W. E. McIntire, et al. (2000).** "Selective coupling of G protein $\beta\gamma$ complexes to inhibition of Ca^{2+} channels." *J Biol Chem* 275(37): 28380-5.
- Dobrunz, L. E. und C. C. Garner (2002).** "Priming plasticity." *Nature* 415(6869): 277-8.
- Doupnik, C. A., N. Davidson, et al. (1997).** "RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of $G\beta\gamma$ -activated inwardly rectifying K^+ channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19): 10461-6.
- Druey, K. M. und J. H. Kehrl (1997).** "Inhibition of regulator of G protein signaling function by two mutant RGS4 proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 12851-6.
- Dulin, N. O., P. Pratt, et al. (2000).** "Regulator of G protein signaling RGS3T is localized to the nucleus and induces apoptosis." *J Biol Chem* 275(28): 21317-23.
- Dulin, N. O., A. Sorokin, et al. (1999).** "RGS3 inhibits G protein-mediated signaling via translocation to the membrane and binding to $G\alpha_{11}$." *Mol Cell Biol* 19(1): 714-23.
- Dutar, P., H. M. Vu, et al (1999).** "Pharmacological characterization of an unusual mGluR-evoked neuronal hyperpolarization mediated by activation of GIRK channels." *Neuropharmacology* 38(4):467-75.
- El Far, O. und H. Betz (2002).** "G-protein-coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes." *Biochem J* 365(Pt 2): 329-36.
- El Far, O., E. Bofill-Cardona, et al. (2001).** "Mapping of calmodulin and $G\beta\gamma$ binding domains within the C-terminal region of the metabotropic glutamate receptor 7A." *J Biol Chem* 276(33): 30662-9.
- Enz, R. (2007).** "The trick of the tail: protein-protein interactions of metabotropic glutamate receptors." *Bioessays* 29(1): 60-73.
- Faden, A. I., S. A. Ivanova, et al. (1997).** "Neuroprotective effects of group III mGluR in traumatic neuronal injury." *J Neurotrauma* 14(12): 885-95.
- Federman, A. D., B. R. Conklin, et al. (1992).** "Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through G_i -protein $\beta\gamma$ subunits." *Nature* 356(6365): 159-61.
- Feinstein, P. G., K. A. Schrader, et al. (1991).** "Molecular cloning and characterization of a Ca^{2+} /calmodulin-insensitive adenylyl cyclase from rat brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(22): 10173-7.
- Ferguson, S. S. (2001).** "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." *Pharmacol Rev* 53(1): 1-24.
- Flor, P. J., H. Van Der Putten, et al. (1997).** "A novel splice variant of a metabotropic glutamate receptor, human mGluR7b." *Neuropharmacology* 36(2): 153-9.
- Forsythe, I. D. and J. D. Clements (1990).** "Presynaptic glutamate receptors depress excitatory monosynaptic transmission between mouse hippocampal neurones." *J Physiol* 429: 1-16.
- Fu, H., R. R. Subramanian, et al. (2000).** "14-3-3 proteins: structure, function, and regulation." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 617-47.
- Gabellini, N., R. M. Manev, et al. (1993).** "Carboxyl domain of glutamate receptor directs its coupling to metabolic pathways." *Neuroreport* 4(5): 531-4.
- Garbarg, M. und J. C. Schwartz (1988).** "Synergism between histamine H1- and H2-receptors in the cAMP response in guinea pig brain slices: effects of phorbol esters and calcium." *Mol Pharmacol* 33(1): 38-43.
- Georgoussi, Z., L. Leontiadis, et al. (2006).** "Selective interactions between G protein subunits and RGS4 with the C-terminal domains of the μ - and δ -opioid receptors regulate opioid receptor signaling." *Cell Signal* 18(6): 771-82.
- Gether, U. (2000).** "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors." *Endocr Rev* 21(1): 90-113.
- Gold, S. J., Y. G. Ni, et al. (1997).** "Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain." *J Neurosci* 17(20): 8024-37.

- Grafstein-Dunn, E., K. H. Young, et al. (2001).** "Regional distribution of regulators of G-protein signaling (RGS) 1, 2, 13, 14, 16, and GAIP messenger ribonucleic acids by in situ hybridization in rat brain." *Brain Res Mol Brain Res* 88(1-2): 113-23.
- Hague, C., L. S. Bernstein, et al. (2005).** "Selective inhibition of α 1A-adrenergic receptor signaling by RGS2 association with the receptor third intracellular loop." *J Biol Chem* 280(29): 27289-95.
- Havlickova, M., J. Blahos, et al. (2003).** "The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptors recognizes C termini of G-protein α -subunits." *J Biol Chem* 278(37): 35063-70.
- Hepler, J. R. (2003).** "RGS protein and G protein interactions: a little help from their friends." *Mol Pharmacol* 64(3): 547-9.
- Hirbec, H., O. Perestenko, et al. (2002).** "The PDZ proteins PICK1, GRIP, and syntenin bind multiple glutamate receptor subtypes. Analysis of PDZ binding motifs." *J Biol Chem* 277(18): 15221-4.
- Hlavackova, V., C. Goudet, et al. (2005).** "Evidence for a single heptahelical domain being turned on upon activation of a dimeric GPCR." *Embo J* 24(3): 499-509.
- Hollinger, S. and J. R. Hepler (2002).** "Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling." *Pharmacol Rev* 54(3): 527-59.
- Hollmann, M. and S. Heinemann (1994).** "Cloned glutamate receptors." *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108.
- Ikeda, S. R. (1996).** "Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits." *Nature* 380(6571): 255-8.
- Ippolito, D. L., P. A. Temkin, et al. (2002).** "N-terminal tyrosine residues within the potassium channel Kir3 modulate GTPase activity of $G\alpha_i$." *J Biol Chem* 277(36): 32692-6.
- Ishii, M., S. Fujita, et al. (2005).** "Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Ca^{2+} /calmodulin competitively bind to the regulators of G-protein-signalling (RGS) domain of RGS4 and reciprocally regulate its action." *Biochem J* 385(Pt 1): 65-73.
- Jaen, C. and C. A. Doupnik (2005).** "Neuronal Kir3.1/Kir3.2a channels coupled to serotonin 1A and muscarinic m2 receptors are differentially modulated by the "short" RGS3 isoform." *Neuropharmacology* 49(4): 465-76.
- Jeong, S. W. and S. R. Ikeda (2000).** "Endogenous regulator of G-protein signaling proteins modify N-type calcium channel modulation in rat sympathetic neurons." *J Neurosci* 20(12): 4489-96.
- Jessell, T. M. and E. R. Kandel (1993).** "Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication." *Cell* 72 Suppl: 1-30.
- Jingami, H., S. Nakanishi, et al. (2003).** "Structure of the metabotropic glutamate receptor." *Curr Opin Neurobiol* 13(3): 271-8.
- Johnson, R. D. and K. P. Minneman (1987).** "Differentiation of α 1-adrenergic receptors linked to phosphatidylinositol turnover and cyclic AMP accumulation in rat brain." *Mol Pharmacol* 31(3): 239-46.
- Katz, B. und R. Miledi (1970).** "Further study of the role of calcium in synaptic transmission." *J Physiol* 207(3): 789-801.
- Kehrl, J. H., D. Srikumar, et al. (2002).** "Additional 5' exons in the RGS3 locus generate multiple mRNA transcripts, one of which accounts for the origin of human PDZ-RGS3." *Genomics* 79(6): 860-8.
- Kinzie, J. M., J. A. Saugstad, et al. (1995).** "Distribution of metabotropic glutamate receptor 7 messenger RNA in the developing and adult rat brain." *Neuroscience* 69(1): 167-76.
- Kovoor, A. und H. A. Lester (2002).** "Gi Irks GIRKs." *Neuron* 33(1): 6-8.
- Kunishima, N., Y. Shimada, et al. (2000).** "Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor." *Nature* 407(6807): 971-7.
- Lee, M. J., T. Tasaki, et al. (2005).** "RGS4 and RGS5 are in vivo substrates of the N-end rule pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(42): 15030-5.
- Lei, Q., M. B. Jones, et al. (2003).** "Molecular mechanisms mediating inhibition of G protein-coupled inwardly-rectifying K⁺ channels." *Mol Cells* 15(1): 1-9.

- Li, X., E. L. Gardner, et al. (2008).** "The metabotropic glutamate receptor 7 (mGluR(7)) allosteric agonist AMN082 modulates nucleus accumbens GABA and glutamate, but not dopamine, in rats." *Neuropharmacology* 54(3): 542-51.
- Linden, A. M., B. G. Johnson, et al. (2002).** "Increased anxiety-related behavior in mice deficient for metabotropic glutamate 8 (mGlu8) receptor." *Neuropharmacology* 43(2): 251-9.
- Magistretti, P. J. and M. Schorderet (1985).** "Norepinephrine and histamine potentiate the increases in cyclic adenosine 3':5'-monophosphate elicited by vasoactive intestinal polypeptide in mouse cerebral cortical slices: mediation by α 1-adrenergic and H1-histaminergic receptors." *J Neurosci* 5(2): 362-8.
- Mark, M. D. und S. Herlitze (2000).** "G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels." *Eur J Biochem* 267(19): 5830-6.
- Mark, M. D., S. Wittemann, et al. (2000).** "G protein modulation of recombinant P/Q-type calcium channels by regulators of G protein signalling proteins." *J Physiol* 528 Pt 1: 65-77.
- Masu, M., H. Iwakabe, et al. (1995).** "Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene." *Cell* 80(5): 757-65.
- Masugi, M., M. Yokoi, et al. (1999).** "Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion." *J Neurosci* 19(3): 955-63.
- Matthews, G. G. (2001).** "Neurobiology." Blackwell Publishing 2nd edition.
- Milligan, G. und E. Kostenis (2006).** "Heterotrimeric G-proteins: a short history." *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S46-55.
- Mitsukawa, K., R. Yamamoto, et al. (2005).** "A selective metabotropic glutamate receptor 7 agonist: activation of receptor signaling via an allosteric site modulates stress parameters in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51): 18712-7.
- Nakajima, Y., H. Iwakabe, et al. (1993).** "Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate." *J Biol Chem* 268(16): 11868-73.
- Nawy, S. und C. E. Jahr (1990).** "Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells." *Nature* 346(6281): 269-71.
- Nawy, S. und C. E. Jahr (1991).** "cGMP-gated conductance in retinal bipolar cells is suppressed by the photoreceptor transmitter." *Neuron* 7(4): 677-83.
- Neitzel, K. L. und J. R. Hepler (2006).** "Cellular mechanisms that determine selective RGS protein regulation of G protein-coupled receptor signaling." *Semin Cell Dev Biol* 17(3): 383-9.
- Niu, J., A. Scheschonka, et al. (2002).** "RGS3 interacts with 14-3-3 via the N-terminal region distinct from the RGS (regulator of G-protein signalling) domain." *Biochem J* 365(Pt 3): 677-84.
- Nomura, A., R. Shigemoto, et al. (1994).** "Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells." *Cell* 77(3): 361-369.
- O'Connor, V., O. El Far, et al. (1999).** "Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling." *Science* 286(5442): 1180-4.
- Ottersen, O. P. and A. S. Lansend (1997).** "Organization of glutamate receptors at the synapse." *Eur J Neurosci* 9(11): 2219-24.
- Pekhletski, R., R. Gerlai, et al. (1996).** "Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor." *J Neurosci* 16(20): 6364-73.
- Peleg, S., D. Varon, et al. (2002).** "G α_i controls the gating of the G protein-activated K(+) channel, GIRK." *Neuron* 33(1): 87-99.
- Pelkey, K. A., G. Lavezzari, et al (2005).** "mGluR7 is a metaplastic switch controlling bidirectional plasticity of feedforward inhibition." *Neuron* 46(4): 89-102.
- Perroy, J., O. El Far, et al. (2002).** "PICK1 is required for the control of synaptic transmission by the metabotropic glutamate receptor 7." *Embo J* 21(12): 2990-9.
- Pierce, K. L., R. T. Premont, et al. (2002).** "Seven-transmembrane receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 639-50.
- Pilc, A. und S. J. Enna (1986).** "Activation of α 2 adrenergic receptors augments

- neurotransmitter-stimulated cyclic AMP accumulation in rat brain cerebral cortical slices." *J Pharmacol Exp Ther* 237(3): 725-30.
- Pin, J. P. und J. Bockaert (1995).** "Get receptive to metabotropic glutamate receptors." *Curr Opin Neurobiol* 5(3): 342-9.
- Pin, J. P. und R. Duvoisin (1995).** "The metabotropic glutamate receptors: structure and functions." *Neuropharmacology* 34(1): 1-26.
- Pizzi, M., O. Consolandi, et al. (1996).** "Activation of multiple metabotropic glutamate receptor subtypes prevents NMDA-induced excitotoxicity in rat hippocampal slices." *Eur J Neurosci* 8(7): 1516-21.
- Pizzi, M., P. Galli, et al. (1996).** "Metabotropic and ionotropic transducers of glutamate signal inversely control cytoplasmic Ca^{2+} concentration and excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells: pivotal role of protein kinase C." *Mol Pharmacol* 49(4): 586-94.
- Popov, S. G., U. M. Krishna, et al. (2000).** " Ca^{2+} /Calmodulin reverses phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate-dependent inhibition of regulators of G protein-signaling GTPase-activating protein activity." *J Biol Chem* 275(25): 18962-8.
- Preininger, A. M. und H. E. Hamm (2004).** "G protein signaling: insights from new structures." *Sci STKE* 2004(218): re3.
- Prezeau, L., J. Gomeza, et al. (1996).** "Changes in the carboxyl-terminal domain of metabotropic glutamate receptor 1 by alternative splicing generate receptors with differing agonist-independent activity." *Mol Pharmacol* 49(3): 422-9.
- Rens-Domiano, S. und H. E. Hamm (1995).** "Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins." *Faseb J* 9(11): 1059-66.
- Ross, E. M. und T. M. Wilkie (2000).** "GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling and RGS-like proteins." *Annu Rev Biochem* 69: 795-827.
- Roy, A. A., K. E. Lemberg, et al. (2003).** "Recruitment of RGS2 and RGS4 to the plasma membrane by G proteins and receptors reflects functional interactions." *Mol Pharmacol* 64(3): 587-93.
- Sadja, R., N. Alagem, et al. (2003).** "Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex." *Neuron* 39(1): 9-12.
- Saugstad, J. A., T. P. Segerson, et al (1996).** "Metabotropic glutamate receptors activate G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in *Xenopus* oocytes." *J Neurosci* 16(19): 5979-85.
- Saugstad, J. A., J. M. Kinzie, et al (1997).** "Cloning and expression of rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals a distinct pharmacological profile." *Mol Pharmacol* 51(1): 119-25.
- Saugstad, J. A., M. J. Marino, et al. (1998).** "RGS4 inhibits signaling by group I metabotropic glutamate receptors." *J Neurosci* 18(3): 905-13.
- Saugstad, J. A., S. Yang, et al. (2002).** "Interaction between metabotropic glutamate receptor 7 and α -tubulin." *J Neurochem* 80(6): 980-8.
- Scheschonka, A., C. W. Dessauer, et al. (2000).** "RGS3 is a GTPase-activating protein for $G\alpha_i$ and $G\alpha_q$ and a potent inhibitor of signaling by GTPase-deficient forms of $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$." *Mol Pharmacol* 58(4): 719-28.
- Scheschonka, A., S. Findlow, et al. (2008).** "Structural determinants of calmodulin binding to the intracellular C-terminal domain of the metabotropic glutamate receptor 7A." *J Biol Chem* 283(9): 5577-88.
- Scheschonka, A., Z. Tang, et al. (2007).** "Sumoylation in neurons: nuclear and synaptic roles?" *Trends Neurosci* 30(3): 85-91.
- Schmidt, M. J., J. F. Thornberry, et al. (1977).** "Effects of kainate and other glutamate analogues on cyclic nucleotide accumulation in slices of rat cerebellum." *Brain Res* 121(1): 182-9.
- Shiells, R. A. und G. Falk (1990).** "Glutamate receptors of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G-protein." *Proc Biol Sci* 242(1304): 91-4.
- Shigemoto, R., A. Kulik, et al. (1996).** "Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone." *Nature* 381(6582): 523-5.
- Shimizu, H., H. Ichishita, et al. (1974).** "Stimulated formation of cyclic adenosine 3':5'-

- monophosphate by aspartate and glutamate in cerebral cortical slices of guinea pig." *J Biol Chem* 249(18): 5955-62.
- Sierra, D. A., S. Popov, et al. (2000).** "Regulators of G-protein signaling in receptor complexes." *Trends Cardiovasc Med* 10(6): 263-8.
- Sorensen, S. D., T. A. Macek, et al. (2002).** "Dissociation of protein kinase-mediated regulation of metabotropic glutamate receptor 7 (mGluR7) interactions with calmodulin and regulation of mGluR7 function." *Mol Pharmacol* 61(6): 1303-12.
- Soundararajan, M., F. S. Willard, et al. (2008).** "Structural diversity in the RGS domain and its interaction with heterotrimeric G protein α -subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(17): 6457-62.
- Srinivasa, S. P., L. S. Bernstein, et al. (1998).** "Plasma membrane localization is required for RGS4 function in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10): 5584-9.
- Stanfield, P. R., S. Nakajima, et al. (2002).** "Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K⁺ channels: Kir2.0 and Kir3.0." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 145: 47-179.
- Staudinger, J., J. Lu, et al. (1997).** "Specific interaction of the PDZ domain protein PICK1 with the COOH terminus of protein kinase C α ." *J Biol Chem* 272(51): 32019-24.
- Staudinger, J., J. Zhou, et al. (1995).** "PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system." *J Cell Biol* 128(3): 263-71.
- Suh, Y. H., K. A. Pelkey, et al. (2008).** "Corequirement of PICK1 binding an PKC phosphorylation for stable surface expression of metabotropic glutamate receptor mGluR7." *Neuron* 58: 736-748.
- Takahashi, T., I. D. Forsythe, et al. (1996).** "Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor." *Science* 274(5287): 594-7.
- Tang, W. J. und A. G. Gilman (1991).** "Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein $\beta\gamma$ subunits." *Science* 254(5037): 1500-3.
- Tang, Z., O. El Far, et al. (2005).** "Pias1 interaction and sumoylation of metabotropic glutamate receptor 8." *J Biol Chem* 280(46): 38153-9.
- Tesmer, J. J., D. M. Berman, et al. (1997).** "Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G α_{i1} : stabilization of the transition state for GTP hydrolysis." *Cell* 89(2): 251-61.
- Tosetti, P., N. Pathak, et al. (2003).** "RGS3 mediates a calcium-dependent termination of G protein signaling in sensory neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12): 7337-42.
- Trombley, P. Q. und G. L. Westbrook (1992).** "L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G-protein-coupled glutamate receptor." *J Neurosci* 12(6): 2043-50.
- Tu, Y., J. Woodson, et al. (2001).** "Binding of regulator of G protein signaling (RGS) proteins to phospholipid bilayers. Contribution of location and/or orientation to Gtpase-activating protein activity." *J Biol Chem* 276(23): 20160-6.
- Ulens, C., P. Daenens, et al. (2000).** "Changes in GIRK1/GIRK2 deactivation kinetics and basal activity in the presence and absence of RGS4." *Life Sci* 67(19): 2305-17.
- Varshavsky, A. (1992).** "The N-end rule." *Cell* 69(5): 725-35.
- Winder, D. G. und P. J. Conn (1992).** "Activation of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus increases cyclic AMP accumulation." *J Neurochem* 59(1): 375-8.
- Winder, D. G. und P. J. Conn (1993).** "Activation of metabotropic glutamate receptors increases cAMP accumulation in hippocampus by potentiating responses to endogenous adenosine." *J Neurosci* 13(1): 38-44.
- Winder, D. G. und P. J. Conn (1995).** "Metabotropic glutamate receptor (mGluR)-mediated potentiation of cyclic AMP responses does not require phosphoinositide hydrolysis: mediation by a group II-like mGluR." *J Neurochem* 64(2): 592-9.
- Zamponi, G. W., E. Bourinet, et al. (1997).** "Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel $\alpha 1$ subunit." *Nature* 385(6615): 442-6.
- Zerangue, N. and L. Y. Jan (1998).** "G-protein signaling: fine-tuning signaling kinetics." *Curr Biol* 8(9): R313-6.
- Zheng, B., L. De Vries, et al. (1999).** "Divergence of RGS proteins: evidence for the existence of six mammalian RGS subfamilies." *Trends Biochem Sci* 24(11): 411-4.

6.4. Lebenslauf

Name: Liane Bauer
Adresse: Humperdinckstrasse 8
 63225 Langen
Telefon: 06103 4694973 (Festnetz)
 0179 5116754 (Mobil)
E-Mail: info@lianebauer.de
Geburtstag: 07.03.1980
Nationalität: Deutsch
Familienstand: Verheiratet

AUSBILDUNG

- 02/05 – HEUTE** **Promotion**
Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt,
 « Regulation der Signaltransduktion der Gruppe III metabotropen
 Glutamatrezeptoren durch RGS (Regulators of G protein signalling)-
 Proteine »
 Abteilung: Neurochemie, Arbeitsgruppe: Molekulare Interaktion und
 funktionelle Regulation metabotroper Glutamatrezeptoren (Dr. Astrid
 Scheschonka)
- 05/00 – 01/05** **Diplom in Biologie**
(Hauptfach: Biochemie; Nebenfächer: Zell- und Mikrobiologie)
Julius-Maximilians-Universität, Würzburg - Note: 1.3
- 03/04 – 12/04** **Diplomarbeit**
Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
 « Funktion und Regulation der Phosphorylierung des SMN- und
 PRMT5-Komplexes »
 Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Utz Fischer (*Assembly of molecular
 machines and the cause of Spinal Muscular Atrophy*) - Note: 1.0
- 03/03 – 04/03** **Praktikum**
Max-Planck-Institut für Biochemie, München
 Unabhängige Forschungsgruppe von Dr. Utz Fischer im Bereich der
 RNA-Biologie (verschiedene biochemische und molekulare Methoden)
- 10/99 – 04/00** **Chemiestudium für 1 Semester**
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen/Nürnberg
- 1999** **Abitur**
Franz-Miltenberger-Gymnasium, Bad Brückenau - Note: 1.8

PUBLIKATIONEN

- EMBO Reports,**
2005 Phosphorylation regulates the activity of the SMN-complex during assembly of spliceosomal U snRNPs (Grimmler *et al.*)
- SfN Meeting 2007**
(San Diego) RGS3 and RGS4 regulate signalling through mGluR7a and differentially bind to the receptor in a Ca²⁺-dependent manner (Bauer *et al.*)
- Journal of**
Neuroscience,
2008 Knock-in mice lacking the PDZ-ligand motif of mGluR7a show impaired PKC-dependent auto-inhibition of glutamate release, spatial working memory deficits and increased susceptibility to pentylentetrazol (Zhang *et al.*)

6.5. Erklärung

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

Frankfurt am Main, den.....

Liane Bauer

