

**Der heptahelikale Transmembran-Rezeptor
HC110-R aus dem parasitischen Nematoden
Haemonchus contortus als Target für das
Breitspektrum-Anthelminthikum PF1022A**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Beate Saeger
aus Düsseldorf

Düsseldorf
2000

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Auch als elektronische Version im Katalog der Universitäts- und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verfügbar.

www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2000.saeger.html

Referent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Koreferenten: Priv. Doz. Dr. Dr. A. Harder

Prof. Dr. T. Schnieder

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2000

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich betreut.

Die experimentellen Arbeiten wurden in der Abteilung für Molekulare Parasitologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Wunderlich danke ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die hilfreiche Betreuung und großzügige Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. Achim Harder und Herrn Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna aus dem Geschäftsbereich Tiergesundheit der Bayer AG, Ressort Forschung und Entwicklung, möchte ich für Ihre zahlreichen und wertvollen Anregungen und Hinweise danken. Darüber hinaus danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. Harder für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Herrn Dr. Hans-Peter Schmitt-Wrede, Abt. für Molekulare Parasitologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, danke ich ganz besonders für die ungezählten Anregungen, Denkanstöße und Diskussionen sowie für seine gründliche und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Bei Herrn Dr. Peter Benten, Abt. für Molekulare Parasitologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, bedanke ich mich für die Hilfe bei den FACS-Messungen und CLSM-Aufnahmen.

Frau Andrea Grunwald danke ich herzlich für die phototechnischen Arbeiten und die Unterstützung in der Zellkultur.

Herrn Markus Dehnhardt, Medizinisches Institut für Umwelthygiene an der Heinrich-Heine-Universität, danke ich für seine Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei zahlreichen Calcium-Messungen.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Parasitologie für Ihre Hilfsbereitschaft und sehr gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern danke ich für Ihre Unterstützung während des Studiums und der Promotion, meinem lieben Freund, Markus Warncke, für seine Geduld und sein Verständnis.

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Saeger, B., Schmitt-Wrede, H.-P., Dehnhardt, M., Benten, W. P. M., Krücken, J., Harder, A., Samson-Himmelstjerna, G. von, Wiegand, H. und Wunderlich, F., 2000. Latrophilin-like receptor from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* as target for the anthelmintic depsipeptide PF1022A.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Parasitische Nematoden als Krankheitserreger und deren Bekämpfung	1
1.2	Cyclodepsipeptide als eine neue Klasse von Breitspektrum-Anthelminthika	3
1.3	Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion	6
1.4	Latrotoxin als Ligand des Latrophilin- / CIRL-Rezeptors	11
1.5	<i>Haemonchus contortus</i> als Labormodell	15
1.6	Fragestellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Chemikalien und Enzyme	17
2.2	Lösungen und Puffer	18
2.3	Versuchstiere	21
2.4	Bakterienstämme und Vektoren	22
2.5	Nukleinsäure-Analyse	23
2.5.1	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	23
2.5.2	Isolation von RNA	23
2.5.2.1	Isolation von Gesamt-RNA	23
2.5.2.2	Isolation von polyadenylierter RNA (poly(A) ⁺ -RNA)	24
2.5.3	Elektrophorese von RNA	25
2.5.4	Isolation von Plasmid-DNA	25
2.5.5	Elektrophorese von DNA	25
2.5.6	Enzymatische Modifikation von DNA	26
2.5.7	Transformation von <i>E. coli</i>	26
2.5.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
2.5.8.1	Oligonukleotide	27
2.5.8.2	Reverse Transkription mit anschließender PCR-Reaktion (RT-PCR)	28
2.5.8.3	Plasmid-PCR	28
2.5.8.4	Klonierung von PCR-Fragmenten	29
2.5.9	DNA-Sequenzanalyse	29
2.5.9.1	Sequenzierprimer	30
2.5.9.2	Sequenzierung mit Thermo Sequenase	31
2.5.9.3	Computeranalyse von Sequenzdaten	31
2.6	Protein-Analyse	31
2.6.1	<i>In vitro</i> Transkription und Translation	31
2.6.2	Proteinextrakte aus <i>Haemonchus contortus</i>	32
2.6.3	Proteinextrakte aus <i>E. coli</i> -Zellen	33
2.6.4	Proteinextrakte aus der Zellkultur	33
2.6.5	Proteinextrakte aus <i>Latrodectus</i> -Giftdrüsen	34
2.6.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.6.7	Elektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	34
2.6.8	Coomassie-Brilliant-Blue Anfärbung von Proteinen	35
2.6.9	Renaturierung von Proteinen	35

2.6.10	Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran	35
2.6.11	Immundetektion	36
2.6.12	Induzierbare Protein-Expression in <i>E. coli</i>	38
2.6.13	Proteinaufreinigung durch Metall-Affinitätschromatographie	40
2.6.14	Immunisierung	40
2.6.15	Aufreinigung des Antiserums durch Filteradsorption	41
2.6.16	Aminosäuresequenz-Analyse	41
2.6.17	Liganden-Präzipitation mit Streptavidin-Beads	42
2.7	Zellkultur	42
2.7.1	Immortalisierte Zelllinien	42
2.7.2	Kultivierung von Säugerzelllinien	43
2.7.3	Kryokonservierung von Zellen	43
2.7.4	Auftauen von Zellen	44
2.7.5	Präparation von bovinen chromaffinen Nebennierenmarkszellen	44
2.7.6	Mykoplasmen-Test	44
2.8	Heterologe Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen	45
2.8.1	Transiente und stabile Transfektion	45
2.8.2	Transiente Expression von GFP-markierten Fusionsproteinen	46
2.8.3	Stabile Expression von Myc/His-markierten Fusionsproteinen	46
2.9	Zelluläre Lokalisation von HC110-R	47
2.9.1	Detektion von HC110-R-markierten Fusionsproteinen	47
2.9.2	Detektion von HC110-R-GFP durch biotinyliertes PF1022A	48
2.9.3	Detektion des B0457-Proteins in <i>Caenorhabditis elegans</i>	49
2.9.4	Anfärbung des Zellkerns	49
2.9.5	Anfärbung des endoplasmatischen Retikulums	50
2.9.6	Anfärbung der Zellmembran	50
2.9.7	Anfärbung der Lysosomen	50
2.9.8	Anfärbung der Mitochondrien	51
2.9.9	Inhibierung der ATP-abhängigen Sequestrierung mit NaN_3	51
2.10	Mikroskopie	51
2.10.1	Phasenkontrastmikroskopie	51
2.10.2	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	52
2.11	Analytische Durchflußcytometrie (FACS)	52
2.12	Calcium-Imaging	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Charakterisierung der HC110-R-cDNA	55
3.1.1	HC110-R-cDNA und deduzierte Aminosäuresequenz	55
3.1.2	Vergleich von HC110-R mit ähnlichen cDNA-Sequenzen	58
3.2	Charakterisierung des HC110-R-Proteins	59
3.2.1	Motive in HC110-R	59
3.2.2	HC110-R - ein Mitglied der Sekretin-GPCR-Familie	60
3.3	Heterologe Expression von HC110-R	68
3.3.1	<i>In vitro</i> Transkription und Translation	68
3.3.2	N- und C-terminale Proteinsequenzierung	69

3.3.3	Transiente HC110-R-Expression in Säugerzellen	72
3.3.3.1	Überprüfung der HC110-R-Expression	73
3.3.3.2	Zelluläre Lokalisation von HC110-R	73
3.3.4	Stabile Expression von HC110-R	84
3.4	ATP-abhängige Sequestrierung von HC110-R	87
3.5	Lokalisation des orthologen B0457-Proteins in <i>C. elegans</i>	88
3.6	Bindung von α -LTX an HC110-R	89
3.6.1	HC110-R vermittelte α -LTX Signaltransduktion	94
3.7	Bindung von PF1022A an HC110-R	103
3.7.1	Wechselwirkungen von PF1022A-Derivaten mit HC110-R vermittelter α -LTX Signaltransduktion	108
4	Diskussion	114
4.1	Charakterisierung des heptahelikalen Transmembran-Rezeptors HC110-R	114
4.2	Zelluläre Lokalisation von HC110-R	119
4.3	Interaktionen von α -LTX und PF1022A mit HC110-R	123
5	Zusammenfassung	137
6	Literatur	139
7	Lebenslauf	161

Abkürzungen

AC	‘Accession Number’
A, C, G, T, U, I	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil, Inosin
amp	Ampicillin
A_{nm}	Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin 5’-Triphosphat
AU	‘Absorption Units’
bp, kbp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare, Kilobasen
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
Bis, Bisacrylamid	N, N’-Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre freie Calcium-Konzentration
Cam	Chloramphenicol
Carbachol	Carbamylocholin-Chlorid
cDNA	„komplementäre“ DNA
CHAPS	3-[3-Cholamidopropyl-Dimethylammonio]-1-Propan sulfonat
CIRL	‘Ca ²⁺ independent receptor of α -LTX’
ConA	Concanavalin A
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]octan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	‘Dulbecco’s Modified Eagle-Medium’
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2’-Desoxyribonucleosid 5’-Triphosphat (N = A, C, G, T, U, I)
ddNTP	2’, 3’-Didesoxynucleosid 5’-Triphosphat (N = A, C, G, T, U, I)
DSM/DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiotreitol
ECL	‘enhanced chemiluminescence’
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Natriumsalz
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N’,N’-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS/FACScan	‘Fluorescent Activated Cell Sorter/Scanner’
FCA	Freund’s ‘Complete’ Adjuvanz
FCS	Fötales Kälberserum

FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFP, EGFP	'Green Fluorescent Protein', 'enhanced' GFP
Glyoxal	Glyoxalethandial
GTC	Guanidinthiocyanat
H ₂ O, bidest.	Milli Q-Wasser aus der Millipore-Anlage
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase ('horse radish peroxidase')
Ig, IgG	Immunglobuline der verschiedenen Klassen, z. B. Immunglobulin G
i. p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropylthio-β-D-galaktosid
IR	infrarotes Licht
kDa	Kilodalton
KLH	'Keyhole Limpet Hemocyanin'
LB	Luria-Bertani Medium
μCi	Mikrocurie (3,7 x 10 ⁷ Zerfälle pro s; 1 μCi = 37 kBq)
M, mM, μM	Molar, Milli- und Mikromolar
mA	Milliampère
MCS	'multi cloning site'
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
M _r	relative Molekülmasse
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NJDIST	'Neighbour Joining Phylogeny from Distance Matrix'
OD _{nm}	optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
ORF	offenes Leseraster ('Open Reading Frame')
PAA, AA, PAGE	Polyacrylamid, Acrylamid, Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion ('Polymerase Chain Reaction')
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pI	Isoelektrischer Punkt
<i>p. i.</i>	<i>post infectionem</i> (nach der Infektion)
<i>p. o.</i>	<i>per os</i> (orale Applikation)
poly(A) ⁺	Polyadenylsäure
Pos.	Position
PROTML	'Maximum Likelihood Inference of Protein Phylogeny'
pS	picoSiemens
RACE	'Rapid Amplification of cDNA Ends', Anker-PCR
Ratio	Quotient aus 340/380 nm
RLU	'Relative Light Units'

RNA, mRNA, rRNA	Ribonukleinsäure, 'messenger' und „ribosomale“ RNA
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender Polymerase Kettenreaktion
S	Svedberg-Einheit (Sedimentationskoeffizient)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAE, TBE	Tris-Acetat-EDTA- und Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TBST/TST	Tris- und Tween-20-haltiger Block- und Waschpuffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur für Nukleinsäure-Hybridisierung
TM	Transmembran-Domäne
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-Pyridylmethyl)-ethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-) Aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	Einheiten der Enzymaktivität
U-73122	1-(6-((17 β -3-metoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)-amino)-hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione
U-73343	1-(6-((17 β -3-metoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)-amino)-hexyl)-2,5-pyrrolidine-2,5-dione
UAS	'Upstream Activating Sequence'
UTR	'Untranslated Region'
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Parasitische Nematoden als Krankheitserreger und deren Bekämpfung

Parasitische Nematoden verursachen weltweit enorme klinische und ökonomische Schäden, besonders in Regionen mit geringen Hygiene-Standards. Weltweit leiden mehr als 3 Mrd. Menschen an Infektionen mit Darmnematoden. Für ca. 1 Mio. von ihnen verläuft die Infektion jedes Jahr tödlich [Walsh, 1984]. Infektionen mit dem v. a. Kinder befallenden Madenwurm *Enterobius vermicularis* [Gonzales und De La Cabada, 1987] oder aber mit dem weitaus gefährlicheren Spulwurm *Ascaris lumbricoides* [Piekarski, 1987] ereignen sich auch in unseren gemäßigten Breitengraden. Rund 90 % aller Menschen werden Schätzungen zufolge wenigstens einmal im Laufe ihres Lebens von Nematoden befallen [Harder und Wunderlich, 1991]. Derzeit sind weltweit ca. 1,3 Mrd. Menschen mit *A. lumbricoides*, 900 Mio. mit dem Peitschenwurm *Trichuris trichiura* und weitere 1,3 Mrd. mit den Hakenwürmern *Ancylostoma duodenale* und *Necator americanus* infiziert [Horton, 1990]. Insbesondere Infektionen von Darmnematoden sind sowohl in Mensch und Tier vorherrschend.

Zu den auf Zoonosen zurückzuführenden Krankheiten gehören Infektionen mit dem Hundespulwurm *Toxocara canis*, dem Katzenspulwurm *T. mystax* oder dem Hundehakenwurm *Ancylostoma brasiliensis*, die durch das Wandern ihrer Larven (5-10 cm/h) durch den Körper des Fehlwirtes zu schmerzhaften visceralen und kutanen Läsionen führen (*larva migrans visceralis* oder *larva migrans cutanea*) sowie Auslöser einer Sepsis sein können [Kayes, 1997; Overgaaauw, 1997]. In der Tier- und Koppelhaltung verursachen Nematoden-Infektionen enorme wirtschaftliche Schäden und hohe Produktivitätseinbußen durch niedrige Geburtsraten und Entwicklungsstörungen von Jungtieren, Gewichtsverlust und eine eingeschränkte Milch- und Wollproduktion [Mehlhorn, 1988]. Ökonomisch bedeutsame Nematoden sind u. a. die im Labmagen parasitierenden *Ostertagia circumcincta* für Schafe und Ziegen, *O. ostertagi* für Rinder, *Trichostrongylus axei* und *T. colubriformis*, die im Dünndarm von Wiederkäuern und Pferden, manchmal auch beim Menschen parasitieren und *Cooperia pectinata* und *C. oncophora*, die im Dünndarm des Rindes vorkommen.

Haemonchus contortus ist ein im Labmagen von Wiederkäuern, wie Schafen, Ziegen, Rindern und Schalenwild, vorkommender gastrointestinaler Trichostrongylide, der in der Magenschleimhaut lebt und Blut saugt. Eine Infektion führt zur sogenannten Haemonchose („Magenwurmseuche“), mit Symptomen wie Diarrhoe, Anämie und Leukopenie, begleitet von einem Temperaturanstieg [Adams und Beh, 1981].

Trotz genetischer Prädispositionen und einer Vielzahl an Effektormechanismen des Wirtes, wie dem GALT- ('gut associated lymphoid tissue') System [Elson *et al.*, 1986; Harder und Wunderlich, 1991], einer gesteigerten IgA- und IgE-Antikörperproduktion, bis hin zu der Ausbildung einer Immunität [Adams und Beh, 1981; Lloyd und Soulsby, 1987], verweilen Nematoden lange Zeit im Wirt und manifestieren sich sogar als chronische Infektionen mit unerwünschten Begleiterscheinungen des Immunsystems, wie Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ I-IV [Castro, 1989].

Zur Behandlung von Nematoden-Infektionen stehen verschiedene Klassen von Breitspektrum-Anthelminthika zur Verfügung, deren Wirkmechanismen mittlerweile gut untersucht sind [Martin *et al.*, 1997]. Imidazothiazole (Levamisol, Tetramisol und Butamisol) und Tetrahydropyrimidine (Pyrantel, Morantel und Oxantel) sind nicotinerge Agonisten des Acetylcholin-Rezeptors und führen zu einer spastischen Lähmung der Nematoden durch Muskelkontraktion, so daß sich die Würmer von der Darm- oder Labmagenwand lösen und ausgeschieden werden [Martin, 1997]. Die Benzimidazole (Thiabendazol, Mebendazol, Fenbendazol, Albendazol und viele andere) stören die vitalen Zellfunktionen, in dem sie die Polymerisierung des β -Tubulins zu Mikrotubuli verhindern und somit die Zellteilung beeinflussen. Die Spezifität der Benzimidazole basiert darauf, daß die Parasiten im Vergleich zum Menschen Nematoden-spezifisch unterschiedliche Anzahlen von Protofilamenten innerhalb eines Mikrotubulus haben [Gull *et al.*, 1986] und die Affinität der Benzimidazole zu Nematoden-Mikrotubuli wesentlich höher ist als zu Säugern [Lacey, 1988]. Die makrozyklischen Lactone, wie Milbemycine (Moxidectin) und Avermectine (Ivermectin, Doramectin und Eprinomectin), induzieren Invertebraten-spezifisch das Öffnen von Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanälen in Parasiten, was zu einer Hyperpolarisation und letztendlich zu einer schlaffen, finalen Paralyse des Pharynx führt [Sutherland und Campbell, 1990; Geary *et al.*, 1993; Arena *et al.*, 1995]. Organophosphate (Haloxon und Dichlorvos) hemmen die Acetylcholinesterase und sind wirksam gegen *H. contortus*, *Ostertagia spp.*, *Trichostrongylus spp.* und *Cooperia spp.*. Protonen-Ionophore, wie die Salicylanilide (Closantel, Rafoxanide und Oxyclozanide) und die substituierten Phenole (Nitroxynil) entkoppeln die oxidative Phosphorylierung, indem sie den Protonen-Gradienten über die innere Mitochondrien-Membran zur ATP-Produktion zerstören; sie richten sich v. a. gegen den Leberegel *Fasciola hepatica* und teilweise auch gegen *H. contortus* [Martin, 1997; Martin *et al.*, 1997].

Regelmäßiges Behandeln der Tiere führt unausweichlich zur Entstehung von Resistenzen gegen diese Anthelminthika-Klassen. Bereits vor mehr als 30 Jahren traten erste Resistenzen auf [Waller, 1997; 1999]. Zunehmende Anthelminthika-Resistenzen gehen einher mit der sich rasch entwickelnden Tierproduktion für Wiederkäuer in Afrika und Südamerika. Mittlerweile existieren bereits bei Schafen und Ziegen Resistenzen gegen das komplette Spektrum von Breitspektrum-Anthelminthika. In südafrikanischen Schafen wurden nur 33 Monate nach der ersten Behandlung Ivermectin-resistente *H. contortus*-Stämme angetroffen [Shoop, 1993].

Bei Rindern sind nur sehr wenige, bei Hunden, Katzen und Menschen sind bislang noch keine Resistenzen bekannt geworden [Mehlhorn *et al.*, 1993]. Tritt eine Resistenz gegen ein Anthelminthikum auf, besteht stets die Gefahr der Kreuz-Resistenz mit anderen Vertretern dieser Klasse. Erst die Kenntnis des Wirkmechanismus ermöglicht das Verständnis über die Entstehung einer Resistenz, z. B. der Benzimidazole [Martin *et al.*, 1997]. Im Falle von Levamisol und besonders der makrozyklischen Laktone scheint hingegen der Wirk- und der Resistenzmechanismus nicht identisch zu sein.

Umweltbedingte Anforderungen an die frei lebenden Stadien der Nematoden führen zu Variationen mit einer erhöhten Anzahl erfolgreich an die Umgebung und den Wirt angepaßter Stämme [Prichard, 1973; Croll und Matthews, 1977; Wakelin, 1985].

Der jährliche Weideumtrieb von Schafen und Rindern führt zu Stämmen mit reduzierter Wirtsspezifität. Saisonale Kontrolle selektiert Würmer mit unterschiedlicher Temperaturabhängigkeit, so daß es zu Infektionen zu atypischen Zeiten kommt [Jasmer *et al.*, 1986; Armour und Duncan, 1987].

Erste Erfolge konnten auf dem Gebiet der Vakzinierung erzielt werden. Primär sollen Impfstoffe die Infektionsstadien angreifen, um die Etablierung und Entwicklung zu Adulten zu verhindern. Attenuierte L₃-Larven von Hakenwürmern ermöglichen bereits in Hunden einen partiellen Schutz [Harder und Wunderlich, 1991]. Durch Röntgenstrahlung abgeschwächte infektiöse *Dictyocaulus viviparus*-Larven in Rindern erzeugen eine Antikörper-Produktion gegen die parasitischen Antigene, bevor die Larven die Lunge erreicht haben [Poynter, 1963]. Dies ist die bisher einzige erfolgreiche Vakzine gegen Nematoden. Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung einer Vakzine mit Hilfe aufgereinigter Darmproteine von Nematoden, um deren Immuneffektormechanismen zu unterwandern [Rand *et al.*, 1989; Willadsen *et al.*, 1989; Munn, 1993; Newton *et al.*, 1995]. Erste Vakzinierungsversuche mit einem aufgereinigten Hc-sL₃-Antigen, das auf der Oberfläche von infektiösen *H. contortus* L₃-Larven exprimiert wird, zeigten eine 64 %ige Reduktion der mit den Fäzes ausgeschiedenen Eier [Jacobs *et al.*, 1999]. Ferner wird an einer auf Peptiden basierenden Vakzine sowie an einer Nukleinsäure-Vakzine gearbeitet [Haynes *et al.*, 1996].

1.2 Cyclodepsipeptide als eine neue Klasse von Breitspektrum-Anthelminthika

PF1022A ist ein neues Breitspektrum-Anthelminthikum, das zur Wirkstoffklasse der 24-gliedrigen Cyclodepsipeptide, bestehend aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren, gehört [Sasaki *et al.*, 1992]. PF1022A wurde als Fermentationsprodukt aus dem Pilz *Mycelia sterilia* der Ordnung *Agonomycetales* auf den Blättern der in Japan heimischen Pflanze *Camellia japonica* isoliert [Terada, 1992; Wang *et al.*, 1994; Kachi *et al.*, 1995]. PF1022A besteht aus jeweils 2 Mol D-Milchsäure und D-3-Phenylmilchsäure sowie 4 Mol L-N-Methyllleucin.

Sein systematischer Name lautet daher: cyclo-(D-lactyl-L-N-methylleucyl-D-3-phenyllactyl-L-N-methylleucyl-D-lactyl-L-N-methylleucyl-D-3-phenyllactyl-L-N-methylleucyl) oder kurz cyclo-(D-Lac-L-N-MeLeu-D-3-PhLac-L-N-MeLeu)₂.

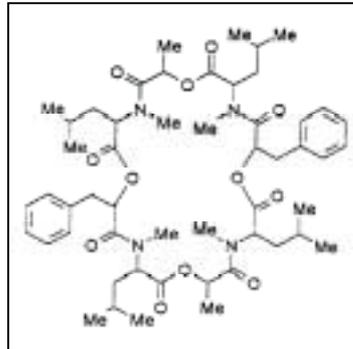


Abb. 1. Strukturformel des Cyclodepsipeptids PF1022A. Me = Methylrest

Dabei wirkt es *in vitro* wie *in vivo* paralyisierend auf verschiedene parasitische, larvale und adulte Nematoden, wie *Ancylostoma caninum*, *Angiostrongylus costaricensis*, *Ascaridia galli*, *Dictyocaulus viviparus*, *Haemonchus contortus*, *Heterakis spumosa*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Ostertagia ostertagi*, *Toxocara canis* und *T. cati*, *Trichinella spiralis*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichuris trichiura* und *Strongyloides ratti*, in Hund, Katze, Schaf, Huhn, Maus, Ratte, Rind oder Pferd [Sasaki *et al.*, 1992; Conder *et al.*, 1995; Harder *et al.*, 1997; Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2000]. Es verhält sich inaktiv gegen Gram-positive und -negative Bakterien, Hefe und andere Pilze [Fukashe *et al.*, 1990; Sasaki *et al.*, 1992; Terada, 1992; Akyol *et al.*, 1993]. Da PF1022A den Effekt von Levamisol als nicotinerger Agonist nicht beeinflusst, wird davon ausgegangen, daß PF1022A auch nicht als nicotinerger Antagonist in *A. suum* agiert [Martin *et al.*, 1996]. Es scheint jedoch neuropharmakologisch zu wirken, indem es - wie auch Piperazin - synergistisch den GABAergen Mechanismus stimuliert und den cholinergen Mechanismus inhibiert [Terada, 1992; Chen *et al.*, 1996; Nicolay *et al.*, 2000]. In Hinblick darauf nimmt man sogar an, daß PF1022A an die A-Untereinheit des GABA-Rezeptors bindet [Chen *et al.*, 1996]. Die Applikation von Piperazin in Muskelzellen von *A. suum* löst eine rasche und dosisabhängige Erhöhung der Cl⁻-Leitfähigkeit über die Membran und dabei eine starke Hyperpolarisation aus. Piperazin wirkt somit in Nematoden als ein GABA-Agonist, der Chlorid-Kanäle in der Muskulatur zu öffnen vermag [Martin *et al.*, 1997]. Eine signifikante Hyperpolarisierung der Membran wurde bei PF1022A jedoch nicht gemessen, so daß eine Wirkung von PF1022A als reiner GABA-Agonist fraglich ist [Terada *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1996]. Andere GABAerge Anthelminthika, wie Diethylcarbamazin, Milbemycin- und Avermectin-Derivate wirken antagonistisch; sie stimulieren in geringen Konzentrationen den GABA-Mechanismus und bei hohen Konzentrationen den Cholin-Mechanismus [Terada *et al.*, 1993]. Der genaue Wirkungsmechanismus von PF1022A ist jedoch bis dato noch nicht bekannt.

Es konnte gezeigt werden, daß PF1022A - wie auch andere, meist als Antibiotika wirksame Cyclodepsipeptide mit einer makrozyklischen Lactonring-Struktur, darunter das zyklische Dodecapeptid Valinomycin (36er Ring) und die beiden Cyclohexadepsipeptide Enniatin (18er Ring) und sein aromatisches Analogon Beauvericin - ionophore Aktivität besitzt [Geßner *et al.*, 1996]. Diese verwandten Cyclodepsipeptide gehen „Sandwich-Komplexe“ mit Alkali-Metall-Kationen über Ionen-Dipol-Interaktionen ein, erhöhen die Leitfähigkeit der Membran und induzieren deren Transport durch den hydrophoben Bereich von biologischen Membranen in die Mitochondrien und auch durch Modell-Phospholipidmembranen [Andreev *et al.*, 1971; Ohyama *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1996]. PF1022A ist ebenfalls ein guter Chelator von Alkali-Metallionen, v. a. von Na⁺ und K⁺ [Dutton und Nelson, 1994]. Die Komplexbildung scheint die Voraussetzung für die Wirkung der Depsipeptide zu sein, ist aber nicht der Grund für die anthelminthische Effizienz von PF1022A. So besitzt Valinomycin *in vitro* eine gute anthelminthische Wirksamkeit, ist aber *in vivo* toxisch, und Beauvericin zeigt keinerlei parasitizide Wirksamkeit [Nash *et al.*, 1998]. Der systematische Austausch der vier (L)-N-Methyl-Leucin-Reste von PF1022A durch verwandte Aminosäuren (Isoleucin, Valin, Phenylalanin) führte zu einem signifikanten bis vollständigen Verlust seiner anthelminthischen Aktivität, so daß alle vier Leucine essentiell für die hohe biologische Aktivität zu sein scheinen [Scherkenbeck *et al.*, 1998].

Die wirksame Konzentration von PF1022A liegt bei *in vitro*-Versuchen zwischen 10⁻⁹-10⁻³ mg/ml für *A. suum* [Chen *et al.*, 1996], bei 10⁻⁸-10⁻⁴ mg/ml für *Angiostrongylus cantonensis* [Kachi *et al.*, 1997], bei 10⁻³ mg/ml für *Trichinella spiralis* und *Nippostrongylus brasiliensis* [Martin *et al.*, 1996] und bei < 0,1 mg/ml für *Heterakis spumosa* [Terada, 1992]; bei *in vivo*-Versuchen bei 10 mg/kg Körpergewicht für *A. costaricensis* in der Maus [Akyol *et al.*, 1993] und bei 0,2 mg/kg Körpergewicht für *Toxocara canis* im Hund und *T. cati* in der Katze [Kachi *et al.*, 1995]. Im Vergleich mit dem natürlichen PF1022A, bei dem die Hydroxycarbonsäuren D-konfiguriert und die Aminosäuren L-konfiguriert sind, führt die Synthese des optischen Antipoden PF1022-001 (cyclo-(-L-Lac-D-N-MeLeu-L-3-PhLac-D-N-MeLeu-)₂) *in vitro* wie *in vivo* zu einem 100fach weniger wirksamen Depsipeptid [Ohyama *et al.*, 1994; Pleiss *et al.*, 1995; Geßner *et al.*, 1996]. Lediglich bei *N. brasiliensis* konnte *in vitro* in hohen Konzentrationen (100 µg/ml) eine geringe anthelminthische Aktivität des optischen Antipoden beobachtet werden [Martin *et al.*, 1996]. Der LD₅₀-Wert für PF1022A liegt bei Mäusen, Ratten und Hunden bei ≥ 2 g/kg Körpergewicht [Terada *et al.*, 1993] und damit über den Werten von Ivermectin mit 25 mg/kg Körpergewicht bei Mäusen und Milbemycin D mit ca. 1,6 g/kg Körpergewicht bei Mäusen [Kachi *et al.*, 1995]. Die schnelle Wirkung *in vitro* wie *in vivo* bei bereits geringen Dosen auf Magen-Darm- und Gewebenematoden zeigt, daß PF1022A vermutlich auch vom intestinalen Gewebe absorbiert wird und sich in den Körpergeweben verteilen kann [Akyol *et al.*, 1993].

Dies weist eher auf einen neuropharmakologischen Weg hin, als auf Eingriffe in den Energie-Metabolismus von Nematoden [Terada, 1992]. Die Untersuchung des ATP-Gehaltes von mit PF1022A paralytierten *H. contortus* zeigt, daß die Würmer nicht getötet wurden, was ebenfalls auf eine neuropharmakologischesche Wirkung von PF1022A hinweist [Conder *et al.*, 1995]. Im Gegensatz zu anderen GABAergen Anthelminthika, wie Avermectin B_{1a} [Ishii *et al.*, 1983], Ivermectin [Ishii *et al.*, 1985] und Milbemycin D [Terada *et al.*, 1987; Sutherland und Campbell, 1990] scheint PF1022A nicht in der Lage zu sein, die Blut-Hirn-Schranke in wirksamen Mengen zu passieren. Die Gabe von PF1022A führt bei *A. cantonensis*-Infektionen im ZNS von Mäusen und Ratten zu keinen signifikanten Nebenwirkungen [Akyol *et al.*, 1993; Kachi *et al.*, 1994; 1995; 1997; Cheng *et al.*, 1995]. Es ist jedoch von entscheidendem Vorteil, daß PF1022A die Blut-Hirn-Schranke von Wirtstieren und Menschen nicht passiert, wenn es GABAerge Funktionen ausübt, denn GABA ist in Vertebraten der entscheidende inhibitorische Neurotransmitter des ZNS.

Kürzlich wurde gezeigt, daß PF1022A Polymorphismen aufweist, eine amorphe (Form α) und drei kristalline polymorphe Formen (I-III). Von diesen zeigen die Formen α und III eine bessere Löslichkeit, niedrigere Schmelzpunkte, und bei *in vivo*-Versuchen mit *A. costaricensis* infizierten Mäusen eine bessere anthelminthische Wirksamkeit als die Formen I und II [Kachi *et al.*, 1998]. Eine gute Löslichkeit beeinflußt die Bioverfügbarkeit der Verbindung bei oraler Applikation. Dementsprechend von Nachteil ist die starke Hydrophobizität von PF1022A und seine damit verbundene schlechte Löslichkeit in wäßrigen Medien. Weniger hydrophobe PF1022A-Derivate sind mittlerweile entwickelt worden, eines ist BAY44-4400. Dieses enthält zwei Morpholin-Reste, die kovalent an die Benzolringe der beiden D-Phenylactyl-Reste gebunden sind [Nishiyama *et al.*, 1998].

1.3 Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion

Der Wirkungsmechanismus vieler Anthelminthika beruht auf einer Rezeptor-Bindung. So wurde bereits erwähnt, daß Imidazothiazole und Tetrahydropyrimidine an den nicotinischen Acetylcholin-Rezeptor und makrozyklische Lactone an Glutamat-gesteuerte Chloridkanal-gekoppelte Rezeptoren binden. Beim Cyclodepsipeptid PF1022A vermutet man eine Kopplung an den GABA-Rezeptor [Chen *et al.*, 1996] (Kap. 1.1). Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde bei einem Liganden-Immunscreening einer *H. contortus* cDNA-Expressionsbibliothek mit einem Konjugat aus PF1022A und KLH ('keyhole limpet hemocyanin') ein cDNA-Fragment isoliert, dessen deduzierte Aminosäure-Sequenz Ähnlichkeiten zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aufweist [Saeger, 1996].

Es lassen sich hinsichtlich des Aufbaus des Rezeptorproteins und der Signaltransduktion vier Arten von Rezeptoren unterscheiden:

1. Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität

Katalytische Rezeptoren wirken entweder selbst enzymatisch oder sind mit Enzymen assoziiert. Diese Enzyme sind meist Proteinkinasen, die in der Zielzelle spezifische Proteine phosphorylieren und die Membran nur einfach durchspannen. In diese Gruppe gehören der Insulin-Rezeptor und die Rezeptoren für verschiedene Wachstumsfaktoren (z. B. der 'epidermal growth factor' (EGF) und der 'platelet-derived growth factor', (PDGF)) [Pazin und Williams, 1992].

2. DNA-Transkription-regulierende Rezeptoren

Hierzu gehören die klassischen Rezeptoren für Steroidhormone und für das Schilddrüsenhormon, die im Cytosol oder Zellkern lokalisiert sind und die Transkription und Translation regulieren [Heldin und Purton, 1996; Lüllmann und Mohr, 1999].

3. Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren

Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren oder auch Ligand-gesteuerte Ionenkanäle öffnen und schließen sich als Antwort auf die Bindung von Neurotransmittern schnell und kurzfristig, wodurch die Permeabilität der Plasmamembran für bestimmte Ionen verändert wird [Brown, 1991]. In diese Gruppe gehören u. a. der nicotinerge Acetylcholin-Rezeptor der motorischen Endplatte von Skelettmuskelfasern, der einen Ionenkanal für Natrium- und Kalium-Ionen bildet, der Rezeptor für γ -Aminobuttersäure vom Subtyp GABA_A-Rezeptor, der einen Ionenkanal für Chlorid-Ionen enthält, der im ZNS vorkommende Glutamat-Rezeptor, der Glycin-Rezeptor sowie der Serotonin-Rezeptor (5-HT₃-Rezeptor). Die Rezeptoren bestehen aus einzelnen Untereinheiten zu je 4 Transmembran-Domänen [Brown und Birnbaumer, 1988; Barnard, 1992].

4. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

In Vertebraten existieren zwischen 1000-2000 verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), d. h. >1 % des gesamten Genoms. Davon gehören >1000 zu den sensorischen Rezeptoren und den Pheromon-Rezeptoren [Bockaert und Pin, 1999]. Das *Caenorhabditis elegans* Genom kodiert für etwa 1100 verschiedene GPCRs, d. h. ca. 5 % des mittlerweile bekannten Genoms [Bargmann, 1998]. GPCRs wirken indirekt, indem sie nach Aktivierung durch Ca²⁺, Pheromone, sensorische Signale (Licht, Geschmack und Geruch), kleine Moleküle (Aminosäuren, biogene Amine, Nukleotide, Prostaglandine, Peptide, etc.) oder Proteine (Interleukine, Chemokine, alpha-Latrotoxin, etc.), die Aktivität eines weiteren membrangebundenen Zielproteins, das ein Enzym oder Ionenkanal sein kann, regulieren [Brann, 1992; Bockaert und Pin, 1999].

Zu dieser großen Familie gehören bspw. die Rezeptoren für Rhodopsin, Noradrenalin, Adrenalin ($\alpha 1$ – $\alpha 2$ und $\beta 1$ – $\beta 3$) und Dopamin (D1–D5) sowie Histamin- (H1 und H2), muscarinische M1–M5 Acetylcholin- und Neurokinin-Rezeptoren (NK1–3), der Interleukin 8-Rezeptor (IL-8), der Angiotensin II-Rezeptor, die Opioid-, Prostaglandin- und Secretin-Rezeptoren. Sie alle durchspannen die Membran siebenfach in Form von α -Helices; der N-Terminus liegt extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär vor [Probst *et al.*, 1992; Weiss, 1998; Lüllmann und Mohr, 1999].

Die Signaltransduktion erfolgt in nahezu jedem Zelltyp höherer Eukaryonten unter Vermittlung eines von mittlerweile mehr als 100 bekannten trimeren Guanylnucleotid- (GTP-) bindenden Proteinen (G-Proteine) [Silva und Plasterk, 1990; Krauss, 1997]. Diese liegen am inneren Blatt der Phospholipid-Doppelmembran und können sich lateral bewegen. G-Proteine übermitteln die Nachricht ins Zellinnere weiter, wenn der Rezeptor einen Liganden gebunden hat. GTP-bindende Proteine gehören zu der großen Familie der regulatorischen GTPasen, die als molekulare Schalter zwei verschiedene Zustände einnehmen können, den aktiven, GTP-gebundenen und den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand. Regulatorische GTPasen sind an der Proteinbiosynthese am Ribosom, an der Signaltransduktion an Membranen, der Lichtwahrnehmung, am Geruchs- und Geschmackempfinden, bei der Kontrolle von Differenzierung und Zellteilung, der Translokation von Proteinen durch Membranen und dem Transport von Vesikeln in der Zelle beteiligt [Bourne *et al.*, 1990]. Das G-Protein besteht aus 3 Untereinheiten (UE): α (39–46 kDa), β (37 kDa) und γ (8 kDa). Bislang wurden bereits 20 α (z. B. α_s , α_i , α_q , etc.), 5 β und 12 γ -UE beschrieben [Heldin und Purton, 1996; Krauss, 1997], in *C. elegans* wurden 20 konservierte G_α , 2 G_β und 2 G_γ Gene identifiziert [Jansen *et al.*, 1999]. Die α -UE hat im Ruhezustand Guanosindiphosphat (GDP) gebunden; bei Bindung eines spezifischen extrazellulären Liganden verändert sich auf nicht näher bekannte Weise die Konformation des Rezeptorproteins, so daß dieses Kontakt mit dem G-Protein aufnehmen kann. Dabei scheint der dritte cytoplasmatische Loop für die Kontaktaufnahme mit dem G-Protein wichtig zu sein. GDP löst sich und statt dessen bindet Guanosintriphosphat (GTP) an die α -UE. Diese trennt sich von der $\beta\gamma$ -UE des G-Proteins ab und vermag mittels Diffusion mit einem benachbart liegenden Effektorprotein in Kontakt zu treten und dessen Funktionszustand zu verändern. Die α - und die γ -UE sind über Lipidanker mit der Zellmembran assoziiert. Die Spezifität eines G-Proteins für einen bestimmten Rezeptor und ein spezielles Effektorprotein scheint in der α -UE begründet zu sein. An der Signalübertragung an nachgeschaltete Effektorproteine kann aber auch der $\beta\gamma$ -Komplex beteiligt sein. Ist der Rezeptor weiterhin vom Überträgerstoff besetzt, kann er weitere G-Proteine aktivieren. Auf diese Weise erlaubt die Kopplung über G-Proteine eine Verstärkung des Stimulationssignals. Durch Hydrolyse eines Phosphorsäure-Restes vom GTP liegt GDP an der Guanylnucleotid-Bindungsstelle vor, woraufhin sich die α -UE vom Effektorprotein löst und wieder mit den beiden anderen UE Kontakt aufnimmt: der Ausgangszustand ist wiederhergestellt [Krauss, 1997].

Trimere G-Proteine können auch Ionenkanäle in der Plasmamembran direkt aktivieren oder inaktivieren durch eine Änderung der Ionendurchlässigkeit [Brown, 1991; Aidley, 1998].

Ein wichtiges G-Protein gesteuertes Effektorprotein ist die membranständige Adenylatcyclase. Sie katalysiert die Bildung von 3'-5'-zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus ATP. Die Aufgabe des cAMP ist die Aktivierung von Proteinkinasen und die Regulation des Ca^{2+} -Durchtritts durch Kationenkanäle, bspw. bei der Geruchswahrnehmung [Krauss, 1997]. cAMP kann im Cytosol diffundieren und hat die Funktion eines intrazellulären Botenstoffes. Bindet cAMP an die beiden regulatorischen UE des tetrameren Enzyms Proteinkinase A (PKA, A-Kinase), dissoziieren die beiden freien katalytischen UE ab und phosphorylieren Substratproteine an Serin- oder Threonin-Resten, wodurch sich deren Aktivität verändert. Die PKA ist u. a. an der Regulation des Glykogen-, Zucker- und Lipidstoffwechsels beteiligt [Alberts *et al.*, 1990]. Die Effekte sind reversibel: Unter Einwirkung der Phosphodiesterase wird cAMP inaktiviert und die von der PKA auf Funktionsproteine übertragenen Phosphatreste werden durch Phosphatasen abgespalten. Die Adenylatcyclase wird durch stimulatorisch wirkende, ubiquitär exprimierte G-Proteine (G_s), durch Calmodulin oder die Proteinkinase C aktiviert [Hepler und Gilman, 1992]. G_s -Proteine werden v. a. von Hormon-, Geruchs- und Geschmacksrezeptoren vermittelt. β -adrenerge Rezeptoren regulieren bspw. die Aktivierung der Adenylatcyclase und vermitteln einige Wirkungen von Adrenalin und Noradrenalin [Krauss, 1997]. Andere Hormonrezeptoren, wie bspw. der α_2 -adrenerge Rezeptor werden über inhibitorische G-Proteine (G_i) an die Adenylatcyclase gekoppelt; bei deren Rezeptoraktivierung die Adenylatcyclase gehemmt und der cAMP-Spiegel gesenkt wird. Aufgrund von Sequenzhomologien sind auch die an der Weiterleitung sensorischer Signale beteiligten G_t - (Transducine) und G_g - (Gustducine) Proteine den G_i -Proteinen zuzuordnen [McLaughlin *et al.*, 1992]. G_s -Proteine werden irreversibel durch das Cholera-Toxin aktiviert, wohingegen das Pertussis-Toxin Subtypen der G_i -Proteine irreversibel inaktiviert. Mitglieder der G_q -Subfamilie sind dagegen weder durch das Pertussis- noch durch das Cholera-Toxin modifizierbar [Krauss, 1997; Aidley, 1998]. Ein anderes Effektorprotein, die membranständige Phospholipase C, wird hingegen sowohl über G_i - als auch über G_q -Proteine reguliert. Sie setzt aus den Phosphatidylinositol- (PI-) Derivaten PI-Phosphat (PIP) und insbesondere PI-Bisphosphat (PIP_2) die beiden intrazellulären Botenstoffe Inositol(1,4,5)trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) frei. Die Aktivierung dieses Enzyms führt über IP_3 zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Reticulum (ER). Das Öffnen zusätzlicher Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran erhöht darüber hinaus die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration.

Calcium ist ein wichtiges intrazelluläres Signalmolekül zur Kontrolle vieler zellulärer Prozesse. Neben der Erzeugung eines elektrischen Signals agiert Ca^{2+} auch als cytoplasmatischer Messenger, er löst die Sekretion von Neurotransmittern oder Hormonen, die Kontraktion von Muskeln und die Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin Kinase, der Protein-Kinase C und vieler anderer Proteasen aus [Brown, 1991]. Der grundlegende Mechanismus der Ca^{2+} -Wirkung erfolgt über die Ca^{2+} -Konzentration. Bei niedrigen Konzentrationen (10-100 nM) erfolgt keine Signalwirkung. Erst wenn ein Signal vorübergehend Ca^{2+} -Kanäle in der Membran öffnet, kommt es zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentrationen auf 500-1000 nM und Ca^{2+} -abhängige Prozesse in der Zelle werden aktiviert. Der Spiegel an freiem Ca^{2+} im Cytosol wird durch Ca^{2+} -Pumpen, wie dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, Plasmamembran Ca^{2+} -ATPasen oder Ca^{2+} -ATPasen des endoplasmatischen (ER) oder sarkoplasmatischen Reticulums (SR), die Ca^{2+} gegen das Konzentrationsgefälle aus der Zelle oder in intrazelluläre Kompartimente zurückpumpen, niedrig gehalten. Ca^{2+} -Bindungsproteine, wie Calbindin, Calretinin, Calreticulin und Calsequestrin binden große Mengen intrazelluläres, freies Ca^{2+} . Wird freies Ca^{2+} aus der Zelle geschleust, dissoziieren gleiche Mengen gebundenes Ca^{2+} von den Puffern ab und werden ebenfalls entfernt [Heldin und Purton, 1996].

IP_3 stimuliert als intrazellulärer Botenstoff das ER durch Bindung an den Ca^{2+} -abhängigen IP_3 -Rezeptor der ER-Membran zur Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern in das Cytosol. Der IP_3 -Rezeptor wird zu einem geringen Anteil auch auf anderen intrazellulären Membranen, wie der Kernmembran, und in einigen Zelltypen (z. B. olfaktorischen Neuronen) auf der Plasmamembran exprimiert [Heldin und Purton, 1996]. Diese Kanäle ähneln den Ryanodin-Rezeptoren im SR von Muskelzellen und verschiedenen anderen mittlerweile bekannten Zelltypen in ihrer Primär- und Sekundärstruktur [McPherson und Campbell, 1993; Coronado *et al.*, 1994]. Die Kanäle werden durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus reguliert; freies Ca^{2+} bindet selbst an den Rezeptor und verstärkt den Ca^{2+} -Ausstrom. Die Reaktion wird beendet, wenn ein Teil des IP_3 dephosphoryliert wird oder Ca^{2+} ganz aus dem Cytosol herausbefördert wird. Restliches IP_3 wird zu Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat (IP_4) phosphoryliert, so daß die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher wieder mit Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum aufgefüllt werden. Das Enzym, das die Herstellung von IP_4 katalysiert, wird durch den Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aktiviert, so daß die Menge an IP_3 durch eine Art negative Rückkopplung reguliert wird [Aidley, 1998].

DAG wiederum kann weiter in Arachidonsäure umgewandelt werden, die selbst als Botenstoff dient. DAG aktiviert aber auch die Ca^{2+} -abhängige Serin-Threonin-Proteinkinase (PKC, Proteinkinase C), die - wie auch die PKA - über Phosphorylierung von Funktionsproteinen die Zellfunktion beeinflusst (z. B. Zellproliferation) oder durch Aktivierung der MAP-Kinase zu einem Anstieg der Transkription spezifischer Gene führt [Krauss, 1997; Aidley, 1998].

Andere Effektorproteine, die von GPCRs gesteuert werden, sind: diverse Ionenkanäle, (z. B. durch muscarinische Acetylcholin-Rezeptoren geöffnete K^+ -Kanäle) [Clapham, 1994], die Phospholipase A_2 , die für die Bildung von Prostaglandinen und die Freisetzung von freien Fettsäuren (z. B. Arachidonsäure) entscheidend ist [Liscovitch, 1992], und die 3'-5'-cGMP bildende Guanylatcyclase. Letztere steuert den Öffnungszustand von Kationenkanälen (z. B. den Ca^{2+} -Einstrom beim Sehvorgang) und reguliert die Aktivität von cGMP-abhängigen Proteinkinasen [Garbers, 1992].

Diese vielfältige GPCR-Proteinfamilie ist nicht so hochkonserviert wie andere Rezeptorfamilien; sie aktivieren aber die Adenylyl-Cyclase und den Phosphatidyl-Inositol-Calcium-Weg. Aufgrund von charakteristischen Sequenz-Motiven ('Fingerprints') lassen sie sich in folgende GPCR-Unterfamilien einordnen: Familie 1 (Rhodopsin-artige und β -adrenerge GPCRs), Familie 2 (Secretin-artige GPCRs), Familie 3 (GABA_B-, 'Fungal mating'-G₀-gekoppelte Pheromon- und metabotrope Glutamat-Rezeptoren), Familie 4 (G_i-assoziierte Pheromon-Rezeptoren), Familie 5 (Rezeptoren für die Embryonalentwicklung, Zellpolarität und Segmentierung) und cAMP-Rezeptoren [Attwood und Findlay, 1994; Bargmann, 1997; Bockaert und Pin, 1999].

Zu der Secretin-Unterfamilie der großen GPCRs [Ichtchenko *et al.*, 1999] gehören neben dem Leukozyten-aktivierenden Antigen CD97 [Hamann *et al.*, 1995], dem EGF-haltigen Mucin-artigen Hormonrezeptor EMR1 [Baud *et al.*, 1995], dem vasoaktiven intestinalen Peptidrezeptor VIPR [Ishihara *et al.*, 1992], auch verschiedene Wachstumshormone freisetzende Rezeptoren (GRFR) [Lin *et al.*, 1992], Calcitonin-Rezeptoren (CLR) [Lin *et al.*, 1991], den Faktor Corticotropin freisetzende Rezeptoren (CRFR) [Chen *et al.*, 1993], Rezeptoren für das parathyroide Hormon (PTHr) [Jüppner *et al.*, 1991; Weiss, 1998] und auch der sogenannte Latrophilin-/CIRL-Rezeptor, dessen natürlicher Ligand unbekannt ist, der aber alpha-Latrotoxin (α -LTX), die Hauptkomponente des Spinnengiftes der Schwarzen Witwe, bindet.

1.4 Latrotoxin als Ligand des Latrophilin- / CIRL-Rezeptors

Das Gift der Schwarzen Witwe, *Latrodectus mactans* (Amerika) und *L. tredecimguttatus* (Mittelmeergebiet), ist ein ausgesprochenes Neurotoxin, das die neuromuskulären (motorischen Endplatten), und zentralnervösen Synapsen angreift [Maretic, 1983; Grishin, 1998]. Beim Menschen treten erst nach 10-60 min infolge des Bisses starke lokale Schmerzen und Schmerzen in den Lymphknoten auf, welche rasch auf die Muskulatur übergreifen. Es kommt zu starken, lang anhaltenden Muskelkrämpfen, betroffen sind v. a. die Bauch-, Gesichts- und Atemmuskeln, die im Extremfall den Erstickungstod zur Folge haben können [Gertsch, 1979]. Offenbar kann das Gift die Blut-Hirn-Schranke passieren und direkt das zentrale Nervensystem angreifen. Ohne Behandlung halten die Symptome etwa 5 Tage an, die völlige Genesung dauert mehrere Wochen.

Todesfälle sind relativ selten, in den U.S.A. betrug sie früher 4-5 %, heute sterben weniger als 1 % [Thorp und Woodson, 1945]. Manche Tiere reagieren auf einen Biß der Schwarzen Witwe viel empfindlicher als der Mensch, obwohl die Symptome vergleichbar sind. So sind bspw. Mäuse, Katzen, Meerschweinchen sowie Pferde, Rinder und Schafe sehr empfänglich für das Gift, andere Tiere dagegen, wie Ratten, Hunde, Kaninchen und Ziegen sind erstaunlich resistent [Maretic und Habermehl, 1985].

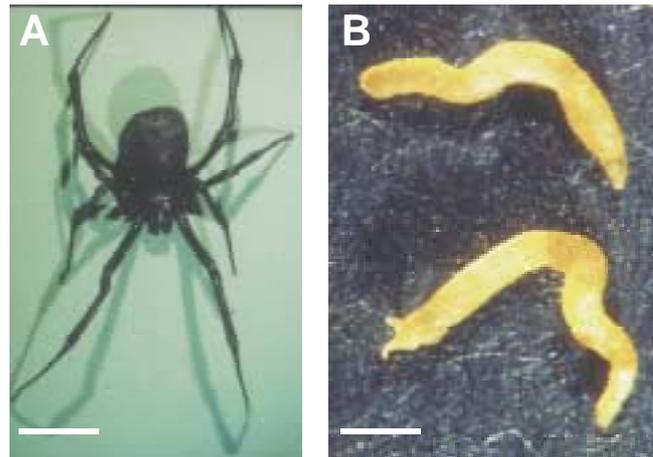


Abb. 2. (A) Schwarze Witwe (*Latrodectus revivensis*) aus Israel, Balken = 10mm.
(B) Giftdrüsen, Balken = 0,5mm

α -LTX ist ein 130 kDa großes Protein, das die Freisetzung von Neurotransmittern an den Synapsen des zentralen und peripheren Nervensystems von Vertebraten stimuliert und zu einer Blockade der Nervenweiterleitung und letztendlich zur Muskellähmung führen kann [Longenecker *et al.*, 1970; Pumplin und Reese, 1977; Rosenthal und Meldolesi, 1989]. Bislang existiert keine Homologie zu anderen bekannten Ionenkanal-Proteinen. Dabei bindet α -LTX spezifisch an präsynaptische neuronale Membranen [Valtorta *et al.*, 1984] und induziert selbst bei Konzentrationen im pM-nM Bereich [Rosenthal und Meldolesi, 1989; Grasso und Mercanti Ciotti, 1993] die Ausschüttung von Neurotransmittern wie Acetylcholin, Noradrenalin, Dopamin, γ -Aminobutyrat (GABA) oder Norepinephrin aus kleinen synaptischen Vesikeln (Synaptosomen) [Grasso *et al.*, 1980; Meldolesi, 1982; Henkel und Sankaranarayanan, 1999]. Auch bei kultivierten Neuronen des Hippocampus [Capogna *et al.*, 1996a] und bei der neurosekretorischen Zelllinie PC12 [Grasso *et al.*, 1980; Meldolesi *et al.*, 1983; Wanke *et al.*, 1986; Rosenthal *et al.*, 1990] kommt es infolge von α -LTX zu einer massiven Ausschüttung von Neurotransmittern.

Es werden verschiedene Wirkmechanismen von α -LTX diskutiert: Zum einen soll es die Exocytose synaptischer Vesikel in neuronalen Zellen durch Interaktion mit einem spezifischen α -LTX-Zelloberflächenrezeptor induzieren [Meldolesi *et al.*, 1984]. Hier konnten zwei hochaffine α -LTX-Rezeptoren aufgereinigt und kloniert werden: Ca^{2+} -abhängiges Neurexin-1 α und Ca^{2+} -unabhängiges Latrophilin/CIRL (' Ca^{2+} independent receptor of α -LTX'), bei dem anstelle von Ca^{2+} andere divalente Kationen (Mg^{2+} , Ba^{2+} ,

Sr²⁺) oder EDTA benötigt werden [Rosenthal *et al.*, 1990]. Zum anderen erfolgt die Exocytose in Abhängigkeit von Ca²⁺ durch das Öffnen bereits vorhandener nicht-spezifischer Kationen-permeabler Poren [Rosenthal und Meldolesi, 1989; Rosenthal *et al.*, 1990] oder durch deren Bildung [Nicholls *et al.*, 1982; Sabirov *et al.*, 1993]. Das Toxin scheint in der Plasmamembran von PC12-Zellen Kanäle mit geringer Leitfähigkeit (15 pS) zu öffnen, die permeabel für monovalente und divalente Kationen (Na⁺, K⁺, Ca²⁺ und Mg²⁺), aber impermeabel für Anionen sind und sich nur langsam wieder schließen. Diese durch α -LTX erzeugten nicht-selektiven Kationen-Kanäle mit einer durchschnittlichen Leitfähigkeit von einigen hundert Picosiemens (pS), die auch in künstlichen Membranen beobachtet wurden [Finkelstein *et al.*, 1976], unterscheiden sich von den klassischen spannungsabhängigen und Rezeptor-abhängigen Kanälen [Wanke *et al.*, 1986]. Lang *et al.* [1998] untersuchten, ob α -LTX Poren bzw. nichtspezifische Kanäle in Insulin-sekretierenden INS-1- β -Zellen erzeugt, wie es bereits für neuronale Zellen und Modellmembranen gezeigt werden konnte [Nicholls *et al.*, 1982; Sabirov *et al.*, 1993]. Aber α -LTX veränderte weder den cytosolischen Ca²⁺-Gehalt, noch das Membranpotential von ausdifferenzierten INS-1- β -Zellen in Suspension wie in Monolayern. Das Öffnen bereits existierender Ca²⁺-Kanäle sowie das Erzeugen nicht-selektiver Kationen-Kanäle durch α -LTX können den Effekt, daß α -LTX die Neuroexocytose auch Ca²⁺-unabhängig stimulieren kann, nicht erklären [Lang *et al.*, 1998].

Die Aufreinigung von α -LTX-Bindungsstellen führte zunächst zur Entdeckung der Neurexine, einer hoch-polymorphen Familie neuronaler Zelloberflächen-Glykoproteine (Neurexin-I α -III α und I β -III β) mit nur einer Transmembran-Domäne, einem großen extrazellulären N-Terminus mit 3 für extrazelluläre Proteine charakteristischen Repeats mit zentraler EGF-Domäne und einem kurzen cytoplasmatischen C-Terminus [Ushkaryov *et al.*, 1992; Petrenko, 1993]. Neurexin-I α (160-220 kDa) und die meisten seiner Spleißvarianten weisen in Anwesenheit von Ca²⁺ eine hochaffine Bindungsstelle (K_d = 4 nM) für α -LTX auf [Davletov *et al.*, 1995; Missler und Südhof, 1998a; 1998b]. In Anwesenheit von Ba²⁺, Sr²⁺ oder Mg²⁺ binden Neurexine dagegen kein α -LTX [Davletov *et al.*, 1996].

Kürzlich wurde ein sowohl in der Plasmamembran von Synaptosomen als auch in neuronalen Nervenenden α -LTX-bindendes heptahelikales Transmembran-Protein, das Latrophilin (AC: U78105) [Davletov *et al.*, 1996; Lelianova *et al.*, 1997] oder auch CIRL (AC: U72487) genannt [Krasnoperov *et al.*, 1996; 1997], isoliert, das weder extrazelluläres Ca²⁺ für die Interaktion mit dem Toxin, noch für die Freisetzung von Neurotransmittern, benötigt, wenn Mg²⁺ oder andere divalente Kationen vorhanden sind. Die Latrophilin-cDNA konnte kloniert werden und das abgeleitete 210 kDa große Glykoprotein zeigt Sequenzähnlichkeiten zu Vertretern der Secretin-Unterfamilie der großen GPCRs [Krasnoperov *et al.*, 1997; Lelianova *et al.*, 1997]. Viele solcher Rezeptoren binden Peptid-Hormone und stimulieren die Exocytose über einen 'second-Messenger'-Mechanismus.

Latrophilin wird posttranslational proteolytisch in eine p120- und eine p85-UE, gespalten. Beide UE bleiben aber nicht-kovalent miteinander verbunden [Krasnoperov *et al.*, 1997; Ichtchenko *et al.*, 1999]. Dabei entspricht die p120-UE dem langen extrazellulären N-Terminus von Latrophilin-1 und die p85-UE einem Membranpolypeptid mit 7-Transmembran-Domänen und einem großen intrazellulären C-Terminus. Andere Vertreter großer GPCRs der Secretinfamilie weisen ähnliche posttranslationale Modifikationen auf, so auch das Leukozyten-Antigen CD97 [Gray *et al.*, 1996]. Latrophilin mRNA läßt sich jedoch nur in neuronalen oder neuroendocrinen Geweben, chromaffinen und PC12-Zellen sowie einigen pancreatischen β -Zelllinien nachweisen, die gut auf α -LTX antworten [Kobayashi *et al.*, 1986; Lelianova *et al.*, 1997; Lang *et al.*, 1998].

Vor kurzem wurden zwei zu Latrophilin homologe Rezeptoren gefunden, Latrophilin-2/CIRL-2 (AC: AF063102) und Latrophilin-3/CIRL-3 (AC: AF063103), was darauf hindeutet, daß die Latrophiline von wenigstens 3 verschiedenen Genen kodiert werden. Latrophiline besitzen, wie man heute weiß, bis zu 7 alternative Spleißstellen; einige Spleißvarianten enthalten einen veränderten 3. cytoplasmatischen Loop oder verkürzten cytoplasmatischen C-Terminus [Matsushita *et al.*, 1999]. Latrophilin-2 wird - im Gegensatz zu Latrophilin-1/CIRL-1 (zuvor Latrophilin/CIRL) - ubiquitär exprimiert, mit einer hohen Präferenz für Plazenta, Niere, Milz, Ovarien, Pancreas, Herz und Lunge und bindet, wenngleich auch bis zu 14x weniger, Ca^{2+} -unabhängig an α -LTX. Im Gehirn, in der Leber und der Testis wird Latrophilin-2 signifikant weniger exprimiert. Wird Latrophilin-2-cDNA in chromaffinen Zellen überexprimiert, erhöht sich seine Sensitivität gegenüber α -LTX. Das heißt, daß das Nervensystem zwar der primäre Wirkungsort geringer α -LTX-Dosen ist, aber durch den Latrophilin-2-Rezeptor auch andere Gewebe empfänglich für das Toxin sind. Latrophilin-3 dagegen wird vornehmlich, wie auch Latrophilin-1, im Gehirn exprimiert [Sugita *et al.*, 1998; Ichtchenko *et al.*, 1999].

Transient exprimiertes Latrophilin-1 in der sonst Toxin-insensitiven Hamster β -Zelllinie HIT-T15 ermöglicht eine durch α -LTX-stimulierte Freisetzung von Insulin ohne den cytosolischen Ca^{2+} -Level zu beeinflussen und weist auf die Beteiligung heterotrimerer G-Proteine bei der Rezeptor-vermittelten Exocytose hin, die durch eine bislang noch unbekannt second-Messenger-Kaskade ausgelöst wird. Dabei korreliert die Sensitivität von α -LTX direkt mit der Expression von Latrophilin-1, nicht aber mit der von Synaptotagmin oder Neurexin [Lang *et al.*, 1998]. In Abwesenheit von Ca^{2+} ist das endocytotische Recycling vesikulärer Membranen blockiert, und es kommt zu einem Anschwellen präsynaptischer Nervenenden und dem Entleeren von Vesikeln [Ceccarelli und Hurlbut, 1980]. Ausreichende Mengen an Ca^{2+} unterstützen dagegen die Endocytose und ermöglichen darüber hinaus eine weitere Ausschüttung von Transmittern.

Auf die Frage, warum es nun zwei verschiedene Rezeptoren für ein Toxin gibt, die Neurexine und die Latrophiline, gibt es bislang keine definitive Antwort, aber folgendes Schema erscheint plausibel: α -Neurexin und Latrophilin binden das Toxin unter physiologischen Bedingungen, also in Anwesenheit von Ca^{2+} . Da Neurexine wesentlich häufiger auf Membranen exprimiert werden, können sie lokal in der Nähe neuronaler Plasmamembranen für hohe α -LTX-Konzentrationen sorgen, und das Toxin zu seinem physiologisch aktiven Latrophilin-Rezeptor oder molekularen Target leiten. Da α -LTX bis zu 8x stärker an Latrophilin als an Neurexin bindet, kann es vom Neurexin abdissoziieren und anschließend an das Latrophilin binden [Davletov *et al.*, 1995]. Rasche Änderungen der lokalen Ca^{2+} -Konzentration erleichtern diesen Transfer zudem [Davletov *et al.*, 1996]. Da eine Überexpression von Latrophilin-1 die Ca^{2+} -stimulierte Sekretion in permeabilisierten Zellen hemmt, wird angenommen, daß der Latrophilin-Rezeptor ein konstitutiv aktiver Rezeptor ist, dessen Funktion es ist, die Sekretion ATP-abhängig zu reduzieren [Bittner *et al.*, 1998]. Latrophilin-1 hemmt möglicherweise einen frühen Schritt des ATP-abhängigen 'Primings' und reguliert so die sich anschließende Exocytose. α -LTX wirkt dagegen antagonistisch, indem es die Sekretion anregt. Die Homologie zu anderen Vertretern der Secretin-Rezeptorfamilie läßt vermuten, daß α -LTX als artifizieller Ligand den Latrophilin-Rezeptor mittels intrazellulärer Signaltransduktion Ca^{2+} -unabhängig über heterotrimere G-Proteine beeinflusst. Dafür spricht, daß sich die α -LTX-Effekte von GABA_B -Agonisten und μ -opioiden Rezeptoren inhibieren lassen, so daß man gegebenenfalls von deren G-Proteine auf die von CIRL schließen kann [Capogna *et al.*, 1996b; Krasnoperov *et al.*, 1997]. Der endogene Ligand für Latrophilin ist noch nicht bekannt, es kann also sein, daß er ähnlich wie α -LTX die Sekretion direkt oder über einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom auslöst. Er könnte aber auch - anders als α -LTX - die Sekretion hemmen, anstatt sie zu stimulieren.

1.5 *Haemonchus contortus* als Labormodell

Die Kenntnisse über die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen Parasit und Wirt stammen vor allem aus experimentellen Arbeiten an verschiedenen Tiermodellen. Für gastrointestinale Nematoden des Labmagens eignet sich *Haemonchus contortus* als Labormodell, da dieser Trichostrongylide einen direkten Entwicklungszyklus ohne Einbeziehung von Zwischenwirten besitzt und sich durch eine gute Handhabung im Labor in Bezug auf Infektion und Gewinnung von Infektionsmaterial auszeichnet. Die Isolation der infolge ihres Blutsaugens rötlich erscheinenden Adulten im Labmagen ist gut durchzuführen. Adulte Weibchen und Männchen sind leicht zu differenzieren: Die Weibchen werden 18-30 mm lang, haben ein Hinterende mit scharfer Spitze und ihre Vulva liegt im hinteren Körperfünftel mit einem zungenförmigen Lappen (Vulvaklappe). Die Männchen sind kleiner (18-21 mm), haben zwei kurze braune Spiculae (30-50 μm), eine Bursa mit zwei Seitenlappen und einen asymmetrischen Dorsallappen [Boch und Supperer, 1983].

H. contortus bietet sich auch deshalb als Labormodell an, weil die Wirtstierhaltung von Schafen gegenüber anderen Wiederkäuern (Pferd, Rind) vorzuziehen ist und er gerade bei den kleinen Wiederkäuern große ökonomische Schäden anrichtet [Mehlhorn, 1988; Waller, 1999]. Der Erreger ist nicht humanpathogen, Menschen können sich nur oral mit freien, gescheideten L₃-Larven, z. B. über verschmutzte Pflanzennahrung, infizieren [Piekarski, 1987].

1.6 Fragestellung

Zur Identifizierung möglicher Zielproteine für das neue Anthelminthikum PF1022A wurde ein Liganden-Immunscreening mit einer cDNA-Expressionsbibliothek des parasitischen Nematoden *H. contortus* durchgeführt [Saeger, 1996]. Dabei wurde als putativer Bindungspartner für PF1022A das 110 kDa große heptahelikale Transmembranprotein HC110-R isoliert.

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob HC110-R den zellulären Rezeptor und damit das Targetprotein für PF1022A darstellt. Da bislang keine Zellkulturlinien von *H. contortus* und anderen Nematoden zur Verfügung stehen, soll ein HC110-R-Expressionsmodell in verschiedenen Säuger-Zellkulturlinien etabliert werden, um Untersuchungen zur Bindung des PF1022A-Liganden an HC110-R durchführen zu können. HC110-R zeigt Sequenzähnlichkeiten zu Vertretern der GPCR-Secretin-Familie, insbesondere zu dem Latrophilin-Rezeptor, dessen artifizieller Ligand das Neurotoxin α -Latrotoxin (α -LTX) ist. Es soll daher überprüft werden, ob PF1022A und/oder α -LTX zu Interaktionen mit HC110-R führen. Durch Bindung von α -LTX an den Latrophilin-Rezeptor werden Änderungen der Ca²⁺-Signaltransduktion hervorgerufen. Deshalb soll durch Ca²⁺-Imaging untersucht werden, ob PF1022A und/oder α -LTX Einfluß auf die Ca²⁺-Signaltransduktion in einer rekombinant den HC110-R exprimierenden Säugerzelllinie ausüben.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

- MAXIscript *in vitro* Transcription Kit: Ambion, Austin, TX, U.S.A.
- Megaprime DNA-Labeling Kit; Nylonmembran Hybond-N; pMOSBlue T-vector cloning Kit; Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit with 7-deaza-dGTP; Rapid Hyb.-Lösung; USBioClean MP Kit; ECL- und ECL Plus System; Amplify: Amersham Buchler GmbH & CoKG, Braunschweig
- U-73122 und U-73343: Biomol Research Laboratory, Plymouth, MA, U.S.A.
- BIO-RAD DC Protein Assay; BIO-RAD Protein Assay: BIORAD, München
- Agarose: Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
- G418 Sulfat (Geneticin): Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, U.S.A.
- TALONspin-Chromatographie-Säulen; Tet-Off System: Clontech, Palo Alto, U.S.A.
- Agar; Hefeextrakt; Trypton, Pepton, Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.
- Dynal M-280-Streptavidin-Beads: Deutsche Dynal GmbH, Hamburg
- Fötales Kälberserum; Hepes Lösung; 2-Mercaptoethanol; RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin; Streptomycin/Penicillin Lösung; Hanks' Balanced Salts (HBSS); TRIZOL; CONCERT High Purity Plasmid Maxiprep System: Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
- Petrischalen für Gewebekultur und Mikrobiologie: Greiner, Solingen, bzw. Waldeck, Münster
- Doxyzyklin Hydrochlorid: ICN, Meckenheim
- Zeocin: Invitrogen, Leek, NL
- MitoTrackerTMRed CMX Ros; LysoTrackerTMRed DND-99: Molecular Probes, Göttingen
- Sterilfilter: Nunc, Wiesbaden
- GeneAmp RNA PCR-Kit; Tropix Tropilon plus Nylonmembran: Perkin Elmer, Weiterstadt
- TNT Coupled Rabbit Reticulocyte Lysate System; TransFast; Luciferase Assay System: Promega, Heidelberg
- Oligo (dT)-Cellulose; Agarase; FuGENE 6 Transfektionsreagenz; Expand High Fidelity PCR-System: Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
- RotiLoad-Puffer (4x): Roth, Karlsruhe
- Nitrozellulosemembranen; Protan BA 85: Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
- Coomassie Brilliant Blue R 250: Serva, Heidelberg
- α -LTX; Biotin-Protein A; Streptavidin-Peroxidase; DMEM-Medium; Ham's F-12 Medium; Trypsin-EDTA 10x; Penicillin-Streptomycin-Lösung; Poly-L-Lysin; Prestained SDS Molecular Weight Marker Mixture; Tetrazyklin: Sigma, Deisenhofen

- cDNA Synthesis Kit, HybriZAP Two-Hybrid Predigested Vector/Gigapack Cloning Kit, Epicurian COLI XL2-Blue MRF' ultracompetent cells; ExAssist/SOLR-System; Gigapack III Gold Packaging Extract: Stratagene, Heidelberg
- Oligonukleotide/Primer: Birsner und Grob, Denzlingen; Gibco BRL, Karlsruhe; MWG, Ebersberg
- Qiagen Plasmid-DNA Isolation Kit; Qiaprep Spin Plasmid Kit; Qiaquick PCR Purification Kit; Qiagen Blood and Cell Culture Genomic DNA Purification Kit: Qiagen, Hilden
- Enzyme und Chemikalien für die Molekularbiologie: BIORAD, München; Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; MBI Fermentas, St. Leon Rot; New England Biolabs, München; Invitrogen, Leek, Niederlande; Pharmacia, Freiburg; Promega, Heidelberg; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen; Stratagene, Heidelberg; USB, Bad Homburg
- Radiochemikalien: ICN, Meckenheim; Amersham, Braunschweig
- sonstige Laborchemikalien (p. a.): Acros Organics, Geel, Belgien; Baker, J. T., Deventer, Niederlande; Bio-Rad, München; Biozym Diagnostik, Hameln; Fluka, Neu-Ulm; Grüssing GmbH, Filsum; Janssen Chimica, Geel, Belgien; Merck, Darmstadt; National Diagnostics, Atlanta, Georgia, U.S.A.; Riedel-de Häen, Seelze; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen

2.2 Lösungen und Puffer

Die Zusammensetzung folgender Puffer und Lösungen wird im Text nicht näher erläutert:

Acrylamid Stock (AA/Bis):	29,2 % Acrylamid; 0,8 % N,N-Methylenbisacrylamid in H ₂ O
AP-Substratpuffer:	100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O; 100 mM Tris-HCl, pH 9,5 in H ₂ O
Arginin-haltiges Medium:	21 g dehydriertes PPLO-Broth in 730 ml H ₂ O, autoklaviert; 100 ml 10 % Hefeextrakt, autoklaviert; 100 ml Mycoplasmen-freies Pferdeserum; 10 ml sterilfiltriertes 0,2 % Phenolrot in H ₂ O; 50 ml sterilfiltriertes 20 % L-Arginin in H ₂ O; pH 6,5-6,5 mit sterilfiltrierter 1 M HCl einstellen
BCIP-Stock:	50 mg/ml Brom-Chlor-Indolyphosphat in H ₂ O
Beladungspuffer (2x):	20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 M NaCl; 2 M EDTA in H ₂ O
Blotpuffer (Western Blot):	25 mM Tris; 190 mM Glycin; 20 % Methanol, pH 8,3 in H ₂ O
CCLR-Lysispuffer (1x):	'Luciferase Cell Culture Reagent' (Promega, Heidelberg) 25 mM Tris-HCl, pH 7,8; 2 mM EDTA; 2 mM DTT; 10 % Glycerin; 1 % Triton X-100
Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH in H ₂ O
Denhardts (50x):	5 g Ficoll 400; 5 g Polyvinylpyrrolidon; 5 g BSA (Fraction V) ad 500 ml H ₂ O
DMEM:	1 Pckg. Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 4,5 g Glucose; 3,7 g NaHCO ₃ ad 1 l H ₂ O, pH 7,3, sterilfiltriert; 10 % steriles, inaktiviertes FCS

DTT (1 M):	3,09 g in 20 ml 0,01 M Na-Acetat, pH 5,2, sterilfiltrieren
EDTA (0,5 M):	232,6 g ad 1 l H ₂ O, pH 8,0
Färbelösung (SDS-PAGE):	0,1 % Coomassie Brilliant Blue R 250 in Fixierlösung
Färbelösung (Western Blot):	10 ml AP-Substratpuffer; 66 µl NBT-Stock; 33 µl BCIP-Stock
Fixierlösung:	20 % Isopropanol; 7 % Essigsäure in H ₂ O
Glucose-haltiges Medium:	21 g dehydriertes PPLO-Broth in 730 ml H ₂ O, autoklaviert; 100 ml 10 % Hefeextrakt, autoklaviert; 100 ml Mycoplasmen-freies Pferdeserum; 10 ml sterilfiltriertes 0,2 % Phenolrot in H ₂ O; 50 ml sterilfiltrierte 20 % D(+)-Glucose in H ₂ O; pH 7,0 mit sterilfiltrierter 1 M NaOH einstellen
Glyoxal-Ladungspuffer:	50 % Glycerin; 10 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 0,25 % Bromphenolblau in H ₂ O, aus RNase-freien Stammlösungen ansetzen
GTC-Lösung:	4 M Guanidiniumthiocyanat; 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 7 % 2-Mercaptoethanol in H ₂ O
HAM's F-12:	1 Pckg. Ham's F-12 Medium; 1,176 g NaHCO ₃ ad 1 l H ₂ O, pH 7,3, sterilfiltriert; 10 % steriles, inaktiviertes FCS
Harnstoff-Lysispuffer (8 M):	8 M Harnstoff; 50 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, pH 8,0; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, pH 8,0 in H ₂ O
HBSS:	1 Pckg. Hanks' Balanced Salts; 0,35 g NaHCO ₃ ad 1 l H ₂ O, pH 7,3, sterilfiltriert
High-Salt-Puffer:	1 M NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0 in H ₂ O
Hybridisierungslösung:	6x SSC; 0,5 % SDS; 100 µg/ml denaturierte fragmentierte Heringssperma-DNA in H ₂ O
Imidazol-Elutionspuffer:	8 M Harnstoff; 50 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, pH 8,0; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 100 mM Imidazol, pH 8,0 in H ₂ O
Ladungspuffer (6x):	30 % Glycerin; 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol FF in H ₂ O
Laufpuffer (SDS-PAGE 1x):	0,025 M Tris-Base; 0,192 M Glycin; 0,1 % SDS in H ₂ O
LB-Medium:	1 % NaCl; 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt in H ₂ O, pH 7,5
LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5 % Agar
LB-Top-Agarose:	LB-Medium mit 0,7 % Agarose
Lösung D:	4 M Guanidiniumthiocyanat; 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0; 0,5 % Natrium-Lauroylsarconisat; 100 mM 2-Mercaptoethanol in H ₂ O
Low-Salt-Puffer:	200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0 in H ₂ O
MnCl ₂ -Lösung:	10 mM MnCl ₂ in Na ⁺ -HBS-Puffer, pH 7,3

Mowiol-Einbettmedium:	5 g Mowiol (Polyscience Inc., Niles, IL, U.S.A.) in 20 ml PBS ⁻ , pH 7,4; für 16 h rühren; 10 ml Glyzerin; weitere 16 h rühren; abzentrifugieren unlöslicher Partikel für 15 min bei 12000 rpm; aliquotieren und bei - 20 °C lagern; vor Gebrauch 1-2 % DABCO zusetzen.
Na ⁺ -HBS:	150 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,8 mM CaCl ₂ ; 0,8 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 20 mM D-Glucose; 20 mM Hepes in H ₂ O, pH 7,3
Na ⁺ -HBS o. Ca ²⁺ :	150 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,8 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 20 mM D-Glucose; 20 mM Hepes; 1 mM EGTA in H ₂ O, pH 7,3
NBT-Stock:	50 mg/ml Nitro-Blue-Tetrazolium-Chlorid in 70 % Dimethylformamid
Neutralisierungslösung:	1 M Tris-HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl in H ₂ O
NZY-Medium:	5 g NaCl; 2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 5 g Hefeextrakt; 10 g NZ-Amin ad 1 l H ₂ O, pH 7,5
NZY-Agar:	NZY-Medium mit 1,5 % Agar
NZY-Top-Agarose:	NZY-Medium mit 0,7 % Agarose
PBS ⁻ -Puffer (1x):	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 0,15 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l H ₂ O, pH 7,2-7,4
PFA-Lösung:	1 % bzw. 3,7 % PFA in PBS ⁻ , aufkochen, pH 7,2
Ponceau S:	0,5 % Ponceau S; 1 % Eisessig in H ₂ O
Prähybridisierungslösung:	6x SSC; 2x Denhardts; 0,1 % SDS; 100 µg/ml denaturierte fragmentierte Heringssperma-DNA in H ₂ O
Renaturierungspuffer:	4 M Harnstoff; 50 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,2 mM DTT; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 ad 1 l H ₂ O
R _{min} -Lösung:	10 mM EGTA; 130 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,8 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose; 20 mM Hepes Na ⁺ ; pH 7,3, frisch zusetzen; 10 µM Ionomycin; 35 µM TPEN; 10 µg/ml Gramicidin
R _{max} -Lösung:	8 mM CaCl ₂ ; 150 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,8 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose; 20 mM Hepes Na ⁺ ; pH 7,3, frisch zusetzen; 10 µM Ionomycin; 35 µM TPEN; 10 µg/ml Gramicidin
RPMI 1640:	1 Pckg. RPMI 1640-Medium; 25 ml 1 M Hepes; 2 g NaHCO ₃ ad 1 l H ₂ O, pH 7,2, sterilfiltriert; 10 % steriles, inaktiviertes FCS
Roti-Blue-Färbelösung:	20 ml Roti-Blue 5x-Konzentrat; 20 ml Methanol; 60 ml H ₂ O
Sammelgelpuffer (4x):	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS in H ₂ O
Sequenzgel-Lösung:	32 ml SequaGel XR Monomerlsg. (19:1 AA zu Bis); 8 ml SequaGel XR Puffer; 300 µl 10 % APS
SM-Phagenpuffer:	100 mM NaCl; 8 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,01 % Gelatine in H ₂ O

SOC-Medium:	2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O; 20 mM Glucose in H ₂ O
Sorbitolpuffer:	40 mM K ₂ HPO ₄ ; 40 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,5 mM MgCl ₂ , pH 6,5; 1,2 M Sorbitol in H ₂ O
SSC (20x):	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 in H ₂ O
TAE-Puffer (40x):	1,6 M Tris; 1,33 M Natriumacetat; 0,04 M EDTA in H ₂ O, pH 8,0
TBE-Puffer (5x):	0,445 M Tris; 0,445 M Borsäure; 0,01 M EDTA in H ₂ O, pH 8,0
TBT-Puffer (10x):	0,2 M Tris-HCl, pH 8,0; 1,5 M NaCl in H ₂ O
TBT-Puffer (1x):	20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,15 M NaCl; 0,1 % Triton X-100 in H ₂ O
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 7,5-8,0; 1 mM EDTA in H ₂ O
Transferlösung:	3 M NaCl; 8 mM NaOH, pH 11,40-11,45 in H ₂ O
Trenngelpuffer (4x):	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS in H ₂ O
Trypanblau-Färbelösung:	0,25 % Trypanblau in sterilem H ₂ O, filtrieren
TST-Puffer (1x):	0,15 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,05 % Tween-20 in H ₂ O
Vectashield-Einbettmedium:	500 µl Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.); 500 µl Glyzerin; 2 % DABCO

2.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten adulte parasitische Nematoden der Art *Haemonchus contortus*. Die Gewinnung des infektiösen Materials sowie die Infektion der Schafe wurde durch Mitarbeiter der parasitologischen Abteilung im Institut für Tiergesundheit und Forschung der BAYER AG im Pflanzenschutzzentrum Monheim vorgenommen. Hierzu wurden 3-4 Monate alte Schafe *p. o.* mit $3-4 \times 10^4$ *Haemonchus contortus* L₃-Larven infiziert. 20 Tage *p. i.* wurden die adulten Würmer aus dem Labmagen der Schafe abgesammelt und in eine auf 37 °C vorgewärmte physiologische Kochsalzlösung (0,85 %) überführt. Nach Bestimmung des Nettofeuchtgewichtes wurden die Nematoden in 0,5-1,0 g Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

2.4 Bakterienstämme und Vektoren

Bakterienstämme: - *E. coli* XL1-Blue

supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'⁺[proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10 (*tet^r*)] [Bullock *et al.*, 1987]

- *E. coli* XL1-Blue MRF'

Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac⁻ F' [proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10 (*tet^r*)] [Jerpseth *et al.*, 1992]

- *E. coli* MOSBlue

endA1 hsdR17 (^r_{K12-m}_{K12+}) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' pro A⁺ B⁺ lacI^qZΔM15::Tn10(Tc^R)]; (Amersham, Braunschweig)

- *E. coli* DH5α

F' φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-arfF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1 (Amersham, Braunschweig) [Hanahan, 1983]

- *E. coli* BL21(DE3)pLysS

F' dcm ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3) [pLysS Cam^r] (Stratagene, Heidelberg)

- *E. coli* XL0LR

Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac⁻ F'⁺[pro AB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10 (*tet^r*)] Su⁻ λ^R (Stratagene, Heidelberg)

Vektoren:

- **HybriZAP** (Stratagene, Heidelberg)

- **pBI-L** (Clontech, Palo Alto, U.S.A.) [Bonin *et al.*, 1994]

- **pBluescript[®] II SK (+/-)** [Short *et al.*, 1988]

- **pcDNA 3** (Invitrogen, Leek, NL)

- **pcDNA 3.1 (+/-)** (Invitrogen, Leek, NL)

- **pEGFP-C1** (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.)

- **pEGFP-N3** (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) [Cormack *et al.*, 1996]

- **pIRES1neo** (Clontech, Palo Alto, U.S.A.)

- **pMOSBlue T** (Amersham, Braunschweig)

- **pMycTag A** entspricht **pSecTag A** ohne Sekretionssignal (Ig κ -Kette) (Invitrogen, Leek, NL)
- **pRSET B** (Invitrogen, Leek, NL)

Helferphagen: - **ExAssist** [Hay und Short, 1992]

2.5 Nukleinsäure-Analyse

2.5.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch Messung der Absorption im Bereich von 260 nm, 280 nm und 320 nm mit einem Beckman DU 640 Spektralphotometer. Die Absorption bei 280 nm gibt den Proteingehalt der Lösung, die Absorption bei 320 nm dagegen die Streuung an. Durch Erstellen des Quotienten A_{260}/A_{280} erhält man die Reinheit der Nukleinsäureproben, dieser liegt für saubere Aufarbeitungen bei $\geq 1,8$. Der Meßwert der Absorption bei 320 nm wird von den Meßwerten bei 260 nm und 280 nm abgezogen. Die Konzentration und Reinheit wurde nach Sambrook *et al.* [1989] berechnet. Für hochmolekulare DNA entspricht eine Absorption A_{260} von 1 genau 50 μg DNA/ml, für RNA genau 40 μg RNA/ml. Plasmid-DNA zur Transfektion von Zellen wurde einer zusätzlichen Mengenbestimmung in einem 1 %igen TBE-Agarosegel durch den Vergleich mit 1 μg Standard λ -DNA unterzogen.

2.5.2 Isolation von RNA

2.5.2.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte nach der leicht modifizierten Methode der sauren Guanidinthiocyanat-Phenol/Chloroform-Extraktion gemäß Chomczynski und Sacchi [1987]. Adulte *H. contortus*-Würmer mit einem Feuchtgewicht von 1 g wurden in 5 ml Lösung D lysiert und in einem Glas-Teflon-Potter auf Eis homogenisiert, bis die Viskosität der Lösung abgenommen hatte. Nacheinander wurden zur Extraktion der Proteine und der genomischen DNA 0,1 Vol. 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 1 Vol. saures, wassergesättigtes Phenol und 0,2 Vol. Chloroform zugegeben, wobei nach Zugabe jeder Komponente vorsichtig gemischt wurde. Die Suspension wurde 10 s gevortext und 15 min auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch 30minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15000 rpm (Beckman JA-20 Rotor mit Corex-Adapter-Einsätzen). Der wäßrige Überstand wurde vorsichtig in ein DEPC-behandeltes JA-20-Röhrchen überführt und die RNA mit 1 Vol. eiskaltem, RNase-freien Isopropanol gefällt. Das RNA-Pellet wurde nach einer Zentrifugation für 1 h bei 11000 rpm und 4 °C im Beckman JS 13.1 Rotor mit 80 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 300 μl Lösung D resuspendiert. Danach wurde die RNA erneut mit 1 Vol. Isopropanol gefällt und bis zum Gebrauch bei - 20 °C gelagert.

Für den Gebrauch wurde die RNA bei 14000 rpm, 4 °C (Biofuge 15R, Heraeus Christ, Osterode) präzipitiert, mit 75 % RNase-freiem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 0,1 % DEPC-H₂O resuspendiert. Die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurden photometrisch bestimmt.

Alternativ hierzu wurde die Isolation von Gesamt-RNA mit TRIZOL (Gibco, Karlsruhe), einem Ein-Phasen-Gemisch aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, in Anlehnung an Chomczynski und Sacchi [1987] durchgeführt [Coombs *et al.*, 1990; Chomczynski, 1993]. 50-100 mg in flüssigem Stickstoff eingefrorene adulte *H. contortus*-Würmer, 1 konfluente 35 mm Zellkulturschale adhärenter Zellen, 0,5-1 x 10⁷ nicht-adhärente Säugerzellen oder 1 x 10⁷ *E. coli*-Zellen wurden in 1 ml TRIZOL aufgenommen. Die Nematoden wurden 3x für 15 s in einem Glas-Potter homogenisiert und für 5 min bei RT inkubiert. In FCS-haltigem Medium kultivierte Zellen wurden zuvor mit einer Pipette abgespült oder mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abtrypsinisiert (Kap. 2.7.2), in ein Eppendorfgefäß überführt, für 10 s bei 13000 rpm und RT pelletiert, 2x mit PBS⁻ gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml TRIZOL aufgenommen, durch kräftiges vortexen lysiert und für 5 min bei RT inkubiert. Alternativ hierzu wurden die Zellen durch die Kanüle einer Einwegspritze lysiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml TRIZOL und Schütteln der Probe für 15 s wurde der Ansatz für weitere 2-3 min bei RT inkubiert, bevor er für 10 min bei 7000-12000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Die obere wäßrige Phase enthält die RNA, die Interphase die genomische DNA, die rote organische Phase die Proteine. Die wäßrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol pro ml TRIZOL für 10 min bei RT gefällt und - wie zuvor beschrieben - gewaschen, luftgetrocknet und in DEPC-H₂O gelöst.

2.5.2.2 Isolation von polyadenylierter RNA (poly(A)⁺-RNA)

Polyadenylierte RNA wurde nach Aviv und Leder [1972] und modifiziert nach Sambrook *et al.* [1989] für die Konstruktion einer *H. contortus* cDNA-Bibliothek gewonnen. 1 g Oligo-(dT)-Cellulose-Pulver wurde für 2 h in RNase-freiem TE-Puffer (pH 7,4) gequollen und in eine 5 ml Eppendorfpipettenspitze überführt. Diese Säule wurde mit 1x Beladungspuffer auf pH 7,5 äquilibriert. Die zu chromatographierende RNA wurde auf 1x Beladungspuffer eingestellt, für 5 min bei 65 °C denaturiert, für 3 min auf Eis und dann bei RT auf die Säule gegeben. Diese wurde anschließend mit einem Säulenvolumen 1x Beladungspuffer gespült. Das Eluat wurde denaturiert (5 min, 65 °C) und erneut über die Säule gegeben. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Die Säule wurde solange mit 1x Beladungspuffer gewaschen, bis die Absorptionsmessung bei 260 nm ein Minimum erreichte. Die gebundene RNA wurde mit 65 °C warmen DEPC-H₂O eluiert. Um die poly(A)⁺-RNA weiter von ribosomaler RNA zu befreien, wurde der Vorgang nochmals wiederholt. Die eluierte poly(A)⁺-RNA wurde - wie zuvor beschrieben - umgefällt und in 0,1 % DEPC-H₂O gelöst. Die Konzentration und die Reinheit wurde photometrisch bestimmt.

2.5.3 Elektrophorese von RNA

Die Elektrophorese der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen [McMaster und Carmichael, 1977; Sambrook *et al.*, 1989]. Die RNA wurde in 4 μl DEPC-H₂O gelöst, mit 3,6 μl 40%igem Glyoxal, 10,4 μl DMSO (50 %) und 2 μl 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) versetzt und für 1 h bei 50 °C inkubiert, 5 min auf Eis gekühlt und mit 4 μl Glyoxal-Ladungspuffer versetzt. Als Längenstandard wurden 10 μg EcoRI/HindIII doppelt restringierte λ -DNA mitbehandelt. Die Auftrennung der Gesamt-RNA (30 μg) bzw. poly(A)⁺-RNA (10 μg) erfolgte bei 3–4 V/cm, für ca. 4 h in 1,2 %igen Agarosegelen in 10 mM Natriumphosphat (pH 7,0), der auch als Laufpuffer diente. Um die Ausbildung eines pH-Gradienten zu vermeiden, wurde der Puffer mit Hilfe eines Magnetrührers in jedem Tank ständig durchmischt. Nach dem Gellauf wurde die aufgetrennte RNA oder aber die abgetrennte Markerspur zur Überprüfung der Qualität zunächst für 30 min in 50 mM NaOH, für 2x 20 min mit 10 mM Natriumphosphat (pH 7,0) inkubiert und schließlich mit 20 μl Ethidiumbromid (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in 200 ml 10 mM Natriumphosphat (pH 7,0) angefärbt.

2.5.4 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Purification Kit (Qiagen, Hilden) basierend auf der modifizierten alkalischen Lyse von Birnboim [1983]. Hierzu wurden 5 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium mit einer plasmidtragenden Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA sowie die Abtrennung von chromosomaler DNA und Zellproteinen erfolgte dann aus 3 ml der stationären 5 ml Kultur nach den Angaben des Herstellers mittels Anionenaustauschchromatographie über eine QIAprep-Spin-Säule. Größere Plasmid-Präparationen wurden mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) aus einer 25 ml Über-Nacht-Kultur oder mit dem CONCERT High Purity Plasmid Maxiprep System (Gibco, Karlsruhe) aus einer 100 ml Über-Nacht-Kultur durchgeführt. Die eluierte Plasmid-DNA wurde mit dem 0,7fachen Vol. Isopropanol bei -20 °C präzipitiert, 1 h bei 10000 rpm und 4 °C (Beckman JS-13.1 Rotor) pelletiert, in 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 100 μl TE-Puffer bzw. Milli Q-Wasser gelöst. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (Kap. 2.5.1).

2.5.5 Elektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese in einer horizontalen Flachbettkammer nach Sambrook *et al.* [1989]. Als Elektrophoresepuffer und für die Gelherstellung wurden 1x TBE-Puffer oder 1x TAE-Puffer verwendet. Die DNA wurde mit 1/6 Vol. 6x Ladungspuffer versetzt und in 0,8-2 %igen Agarosegelen mit 0,5 μg Ethidiumbromid/ml Gellösung bei 10 V/cm aufgetrennt. Als Längenstandard dienten 2 μg EcoRI/HindIII doppelt restringierte λ -DNA oder bei kleinen Fragmenten 2 μg des Φ X174 DNA-HaeIII-Markers.

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel, wurde - je nach Größe des Fragmentes - ein 0,8-2 %iges TAE-Agarosegel mit einem Fenster aus gleichprozentiger 'low melting point'-Agarose (Biozym, Oldendorf) gegossen. Nach dem Einlaufen der gewünschten Fragmente in dieses Fenster wurden sie unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und durch den Verdau mit dem Enzym β -Agarase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Überprüfung der Qualität erfolgte durch das Auftragen von 1/10 des Probenvolumens auf ein Agarosegel, die Konzentrationsbestimmung durch Vergleich der Markerbanden.

Alternativ wurden Restriktionsfragmente, die >100 bp waren, mit dem USBioClean™ MP-Kit (Amersham/USB, Braunschweig) nach Hersteller-Angaben aufgereinigt. Dieser Methode liegt das Prinzip der Adsorption von DNA an eine spezielle Silikat-Matrix zugrunde, wie sie von Vogelstein und Gillespie [1979] vorgestellt wurde.

2.5.6 Enzymatische Modifikation von DNA

Für die Restriktion von DNA wurden die vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen für die jeweilige Restriktionsendonuklease gewählt. Die Restriktionen erfolgten für 2-5 h oder über Nacht.

Die 5'-Phosphatgruppen von 'blunt end' bzw. nicht doppelt restringierter Vektor-DNA wurden zur Vermeidung von Selbstligation und Rezirkularisierung mit Hilfe von alkalischer 'Shrimp'-Phosphatase (USB, Bad Homburg) nach Hersteller-Angaben für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Danach wurde nochmals Enzym zugefügt und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch 30minütige Inkubation bei 65 °C wurde die Dephosphorylierungsreaktion abgestoppt und die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt, gefällt, abzentrifugiert und in TE-Puffer aufgenommen.

Die Ligation von DNA-Molekülen in 50 ng eines modifizierten Vektors erfolgte mit Hilfe der T4 DNA Ligase (MBI Fermentas, St. Leon Rot; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) in 1x Ligasepuffer (66 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 1 mM DTT) in einem Gesamtvolumen von 5 oder 10 μ l über Nacht bei 12-16 °C. Jeweils 1 μ l der Ligationsansätze wurde für die Transformation in *E. coli* (Kap.2.5.7) verwendet.

2.5.7 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von Plasmid-DNA nach Hanahan [1985] wurden *E. coli* XL1-Blue MRF 'subcloning grade competent cells' bzw. 'subcloning grade ultracompetent cells' (Stratagene, Heidelberg) oder aber kompetente DH5 α -Zellen (Amersham, Braunschweig) eingesetzt. 25 μ l kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 5-15 ng ligierter Plasmid-DNA (1/5 - 1/10 des Ligationsansatzes) für 30 min auf Eis gestellt. Es erfolgte ein Hitzeschock für 40 s bei 42 °C und eine Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 80 μ l SOC-Medium

wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 280 rpm auf dem Schüttler inkubiert, auf Antibiotika-haltige LB-Platten ausgebracht und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.5.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem PTC 150-16 oder PTC 150-25 MiniCycler (MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf) durchgeführt.

2.5.8.1 Oligonukleotide

Zur Amplifizierung von HC110-R-Fragmenten für Klonierungen wurden Oligonukleotide der Firmen Gibco BRL (Karlsruhe), Birsner und Grob (Denzlingen) sowie MWG Biotech (Ebersberg) verwendet (Tab. 1).

Primerpaar	Sequenz	TM (°C)	Ann. (°C)	PCR
P83MycTag_ATGBamHI-5' P3058MycTag_oTGAXbaI-3'	5'-ATA GGA TCC TTC GGT TTA ATA CCA <u>ACA TGA</u> GG-3' 5'-CCT GTC TAG AAA CAT TTC GCC AAT AGT TAG G-3'	63 62	56 / 60	Plasmid-PCR
P83_ATGNotI-5' PmycHis_TGABamHI-3'	5'-ATA TTG CGG CCG CTT CGG TTT AAT ACC AAC ATG-3' 5'-CGC GGA TCC TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'	64 62	56 / 60	Plasmid-PCR
P83cDNA3.1_ATGBamHI-5' P3060cDNA3.1_TGAXbaI-3'	5'-ATA GGA TCC TTC GGT TTA ATA CCA <u>ACA TGA</u> GG-3' 5'-GCA GTC TAG ATC AAA CAT TTC GCC AAT AGT TAG G-3'	63 64	55 / 60	Plasmid-PCR
P83EGFP_ATGHindIII-5' P3057EGFP_oTGASaI-3'	5'-GGT AGA AGC TTT TCG GTT TAA TAC CAA <u>CAT GAG</u> G-3' 5'-CTG TGT CGA CAA CAT TTC GCC AAT AGT TAG G-3'	65 65	56 / 61	Plasmid-PCR
P2486_ATGBamHI-5' P3121_TGAHindIII-3'	5'-CTA TCG GAT CCC AAC <u>ATG</u> GCT GGC TCC CGT GAT ACC TCT AGG-3' 3'-GCA CTA AGC TTG ACT GAA GCG CAC AAC CTC G-3'	67 61	56 / 62 58 / 62	Plasmid-PCR RT-PCR
P84_ATGBamHI-5' P593_5RACE-3'	5'-CTG CCG GAT CCT CGG TTT AAT ACC AAC <u>ATG</u> AGG-3' 5'-GTC GAT GGT GCA GAT TTC GC-3'	61 62	56	RT-PCR
P84_ATGBamHI-5' P3121_TGAHindIII-3'	5'-CTG CCG GAT CCT CGG TTT AAT ACC AAC <u>ATG</u> AGG-3' 5'-GCA CTA AGC TTG ACT GAA GCG CAC AAC CTC G-3'	61 61	56 / 62	Plasmid-PCR
P84_ATGBamHI-5' P1434_TGAHindIII-3'	5'-CTG CCG GAT CCT CGG TTT AAT ACC AAC <u>ATG</u> AGG-3' 5'-GGC TCA AGC TTA TCA GAG AAC AAG CGA CAC GGC-3'	61 62	56 / 62	Plasmid-PCR
P70HumM1RezXhoI-5' P1465HumM1RezEcoRI-3'	5'-ATA TCT CGA GAG CCC CAC CTA GCC ACC <u>ATG</u> AAC A-3' 5'-GAC GAA TTC CAT TGG CGG GAG GGA GTG CGG T-3'	62 63	55 / 60	Plasmid-PCR
P117Mausβ ₂ ARXhoI-5' P1349Mausβ ₂ AREcoRI-3'	5'-TAC CTC GAG CTG CTA ACC TGC CAG CCA <u>TG</u> -3' 5'-TGT AGA ATT CTT CCT TCC TTG GGA GTC AAC GCT-3'	61 58	55 / 60	Plasmid-PCR
P83_ATGSaI-5' P3121RS424_TGASaI-3'	5'-GCA GCC CGT CGA CTT CGG TTT AAT ACC AAC <u>ATG</u> AGG-3' 5'-TGG TGT CGA CGA CTG AAG CGC ACA ACC TCG-3'	63 62	64	Plasmid-PCR
P83_ATGSaI-5' P1418_oTGASaI-3'	5'-GCA GCC CGT CGA CTT CGG TTT AAT ACC AAC <u>ATG</u> AGG-3' 5'-AAC TTG TCG ACG CCA CCA CAC GTG AAA CAA TTC G-3'	63 61	64	Plasmid-PCR
P2470SaI-5' P3121RS424_TGASaI-3'	5'-TAG CGT CGA CTT TCA TGT ATC AGC TCT GGC TCC CG-3' 5'-TGG TGT CGA CGA CTG AAG CGC ACA ACC TCG-3'	63 62	64	Plasmid-PCR
P2185EcoRI-5' P2287SaI-3'	5'-TGG CCG AAT TCA CTA TGT GCA TTG TAT ACA GAC ATT C-3' 5'-ATA GAG TCG ACC CAG ACC CAT CGC TCC TTT GAC CC-3'	68 74	55 / 67	Plasmid-PCR
P87_ATGNheI-5' PMycHis_TGASaI-3'	5'-CGT GGC TAG CTGT TTA ATA CCA <u>ACA TGA</u> GG-3' 5'-ACT TGA GCT CTA GAA GGC ACA GTC GAG GCT GAT C-3'	70 72	55 / 63	High Fidelity-PCR
P87_ATGNheI-5' PEGFP_TGASaI-3'	5'-CGT GGC TAG CTGT TTA ATA CCA <u>ACA TGA</u> GG-3' 5'-ACT TGA GCT CGC GGC CGC TTT ACT TGT ACA GC-3'	70 72	55 / 63	High Fidelity-PCR

Tab. 1: Zusammensetzung der Oligonukleotide.

Die Tabelle gibt die verwendeten Primerpaare, deren Schmelztemperatur (T_m), die eingesetzte Annealing-Temperatur und die Art der PCR an. Angehängte Restriktionsschnittstellen sind fett markiert, Start- und Stop-Codon unterstrichen.

Die Primerpaare wurden zuvor mit Hilfe der Programmpakete PC/Gene Version 6.7 (IntelliGenetics, Mountain View, CA, U.S.A.) und Oligo 4.1-Primer Analysis Software (National Biosciences Inc., Plymouth, U.S.A.) bestimmt. Die Primer sollten eine Länge zwischen 15-30 Basen aufweisen, einen GC-Gehalt zwischen 40-60 % besitzen und weder komplementär zueinander, noch zu sich selbst sein. Am 3'-Ende wurde darauf geachtet, daß die Primer einen GC-‘Clamp’ besitzen und möglichst keine ‘Repeats’ bzw. Purin- oder Pyrimidin-Abschnitte aufweisen [Kawasaki, 1991]. Die Schmelztemperatur (T_m-Wert) der PCR-Primer wurde wegen der großen Nukleotidlänge gemäß der % GC-Methode: $T_m (°C) = 81,5 + 16,6 \times [50 \text{ mM Na}^+] + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - 675/\text{Länge} - 0,65 \times (\% \text{ Formamid}) - (\% \text{ ‘mismatch’})$ berechnet.

2.5.8.2 Reverse Transkription mit anschließender PCR-Reaktion (RT-PCR)

Für die reverse Transkription mit anschließender PCR-Reaktion wurde das GeneAmp RNA PCR-Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet, bei dem beide Reaktionen in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden konnten. Bei der RT-PCR wurden je 1 µg Gesamt-RNA mit je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 5 mM MgCl₂, 1 U RNase-Inhibitor, 1x PCR-Puffer II und 2,5 U MuLV-Reverse Transkriptase in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Als Initiator der cDNA-Synthese wurde 2,5 µM Random-Hexamer-Primer eingesetzt. Auf eine Inkubation für 10 min bei 22 °C folgte die cDNA-Synthese für 1 h bei 42 °C. Das Enzym wurde für 5 min bei 95 °C inaktiviert. Für die anschließende Amplifikation wurde der 20 µl-Reaktionsansatz mit 1x PCR-Puffer II, 2 mM MgCl₂, je 0,5-2 µM sequenzspezifische Strang- und Gegenstrang-Primer (Tab. 1) sowie mit 2,5 U Ampli Taq-DNA-Polymerase versetzt, auf ein Gesamtvolumen von 100 µl gebracht und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation erfolgte über 30 Zyklen zu je 1 min bei 95 °C, 1 min bei der entsprechenden Annealing-Temperatur der Primer (Tab. 1 in Kap. 2.5.8.1) sowie 1 min bei 72 °C und einer abschließenden Elongation für 10 min bei 72 °C. 1/5 des Reaktionsansatzes wurde in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Klonierung der Fragmente erfolgte wie in Kap. 2.5.8.4 beschrieben. Als Negativkontrolle wurden jeweils Ansätze ohne RNA oder ohne MuLV-Reverse Transkriptase durchgeführt. In einem Ansatz wurde die RNA zuvor mit DNase-freier RNase A (10 mg/ml) (Sigma, Deisenhofen) für 1 h bei 37 °C verdaut, Phenol/Chloroform-extrahiert und gefällt.

2.5.8.3 Plasmid-PCR

Für die Amplifikation eines Fragmentes ausgehend von einem Plasmid wurden 50 ng Plasmid-DNA, 1x Pfu-Polymerasepuffer, 200 µM dNTP-Mix, je 300 nM der beiden sequenzspezifischen Primer (Tab. 1) und 2,5 U Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) in einem Volumen von 100 µl eingesetzt und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Enthielten die Primer eine Restriktionsschnittstelle, so wurde der Ansatz für 5 min bei 95 °C denaturiert und dann einer zusätzlichen 6fachen Amplifikation von 1 min bei 95 °C, 1 min bei einer um 5-6 °C reduzierten Annealing-

Temperatur der entsprechenden Primer (Tab. 1 in Kap. 2.5.8.1) und 2 min bei 72 °C unterworfen, bevor weitere 30 Zyklen zu 1 min bei 95 °C, 1 min bei der entsprechenden höheren Annealing-Temperatur (Tab. 1) und 2 min bei 72 °C folgten. Anschließend beendete eine 10minütige Elongation bei 72 °C die Reaktion. Bei Verwendung der Taq-DNA-Polymerase erfolgte die Reaktion in 1x PCR-Puffer unter Zugabe von 1,5 mM MgCl₂ unter ansonsten gleichen Bedingungen.

Fragmente >1500 bp, insbesondere die Deletionsklone von HC110-R, wurden mit Hilfe des 'Expand High Fidelity' PCR-Systems (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) amplifiziert. In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurden 0,5 µg Plasmid-DNA mit je 200 µM dNTP's, 300 nM 5'- und 3'-Primer (Tab. 1) sowie 1x Expand HF Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ und 2,6 U eines Mixes aus Pwo- und Taq-DNA-Polymerase versetzt. 1/10 eines Reaktionsansatzes wurde zur Überprüfung der PCR-Fragmente auf einem 0,8-2 %igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Ein-Primer-Amplifikationen wurden durch jeweils einen zusätzlichen Ansatz mit nur einem Primer ausgeschlossen.

2.5.8.4 Klonierung von PCR-Fragmenten

PCR-Fragmente, die mit der Taq-DNA-Polymerase amplifiziert worden waren, konnten direkt in den pMOS*Blue* T-Vektor (Amersham, Braunschweig) ligiert werden, da die Taq-DNA-Polymerase bei der Amplifikation zu 30 % einen zusätzlichen Desoxyadenosin-Rest an die 3'-Enden der doppelsträngigen DNA, anhängt [Clark, 1988]. Dazu wurden die Fragmente, wie in Kap. 2.5.5 beschrieben, aufgereinigt, bei 16 °C in 50 ng des T-Vektors [Marchuk *et al.*, 1991; Holton und Graham, 1991] ligiert und in kompetente *E. coli* MOS*Blue*-Zellen transformiert (Kap. 2.5.7). Sollten dagegen PCR-Fragmente kloniert werden, denen über die Primersequenz beidseitig eine Restriktionsschnittstelle eingefügt worden war, wurden diese zuerst über ein Agarosegel aufgereinigt (Kap. 2.5.5), mit der entsprechenden Restriktions-endonuklease geschnitten (Kap.2.5.6), Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA aus dem Überstand gefällt. Die modifizierten DNA-Fragmente wurden in den entsprechend verdauten Vektor ligiert und 1/5-1/10 des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF⁻- oder DH5α-Zellen transformiert (Kap. 2.5.7). Die Überprüfung der Klonierung bzw. des richtigen und durchgängigen Leserasters insbesondere für Fusionsproteine wurde durch Sequenzanalyse überprüft.

2.5.9 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse der klonierten DNA erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* [1977] auf nicht-radioaktive Weise. Hierzu wurde das 'Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP' (Amersham, Braunschweig) und sequenzspezifische 5'-IR-gekoppelte Primer (IRD41 oder IRD800, MWG, Ebersberg) für die LICOR DNA Sequenzierungs-Apparatur Modell 4000 (MWG, Ebersberg) verwendet.

2.5.9.1 Sequenzierprimer

Sequenzspezifische 5'-IR-gekoppelte Sequenzierprimer mit einer durchschnittlichen Nukleotidlänge von 20 Basen wurden mit dem PC/Gene-Programm (Version 6.7) „PCRPLAN“ (IntelliGenetics, Mountain View, CA, U.S.A.) und dem Programmpaket Oligo 4.1-Primer Analysis Software (National Biosciences Inc., Plymouth, U.S.A.) ausgewählt (Tab. 2).

Die Berechnung der Schmelztemperatur (T_m-Wert) der Sequenzierprimer bis 20 nt erfolgte nach der Formel: $4 \times GC + 2 \times AT + 3,3$.

Primer	Sequenz	Position	T _m -Wert	GC-Gehalt
1R565-5'	5'-GAT ATG AGC GCG AAA TCT GC-3'	565 - 584	63 °C	50 %
2R743-5'	5'-TAG AGT GTC GCA GTG ATT GG-3'	743 - 762	63 °C	50 %
3R1119-5'	5'-GAA CTA TGT GCA ACC GTT GG-3'	1119 - 1138	63 °C	50 %
4R1524-5'	5'-ACC TGA ATG TTC TTG GTG GG-3'	1524 - 1543	65 °C	55 %
5R1815-5'	5'-CGC TTC TCT TGG TAT AGC CG-3'	1815 - 1834	65 °C	55 %
6R2826-5'	5'-GAT CTT CCA TCA TCG CCC TCC-3'	2826 - 2846	62 °C	57 %
6U592-3'	5'-TCG ATG GTG CAG ATT TCG CG-3'	573 - 592	65 °C	55 %
5U771-3'	5'-CTG AAT GGT CCA ATC ACT GC-3'	752 - 771	63 °C	50 %
4U2252-3'	5'-TCA CCT CCA TTA TCC GCA GC-3'	2233 - 2252	65 °C	55 %
3U2511-3'	5'-ATC CCT AGA GGT ATC ACG GG-3'	2492 - 2511	65 °C	55 %
2U2897-3'	5'-GAA GGT GTT GTA CCC TGG GC-3'	2878 - 2897	67 °C	60 %
1U3213-3'	5'-CCG GAA GAC GAT GAA AGC CC-3'	3193 - 3213	67 °C	60 %
5RACE190-5'	5'-GTA TGC GAA GGT GGT ACA GC-3'	190 - 209	65 °C	55 %
5RACE266-5'	5'-GAT ATT CGG CTC GGG TTT GC-3'	266 - 285	65 °C	55 %
5RACE363-3'	5'-TTT CCT AAG GGT CGG CAT CG-3'	344 - 363	65 °C	55 %
5RACE592-3'	5'-TCG ATG GTG CAG ATT TCG CG-3'	573 - 592	65 °C	55 %
GAL4BD-5'	5'-GTG CGA CAT CAT CAT CGG AAG-3'	-	67 °C	52 %
GAL4BD-3'	5'-CCT AAG AGT CAC TTT AAA ATT-3'	-	57 °C	29 %
GAL4AD-5'	5'-AGG GAT GTT AAT ACC ACT AC-3'	-	58 °C	40 %
GAL4AD-3'	5'-GCA CAG TTG AAG TGA ACT TGC-3'	-	65 °C	48 %
MycTag-5'	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	-	59 °C	40 %
MycTag-3'	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'	-	59 °C	56 %
EGFP-N3-3'	5'CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G-3'	-	67 °C	73 %
EGFP-C1-5'	5'-CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G-3'	-	59 °C	59 %
PRSET B-3'	5'-AGC AAA AAA CCC CTC AAG ACC CGT-3'	-	62 °C	50 %

Tab. 2: 5'-IR-markierte Sequenzierprimer.

Angegeben sind die Sequenzen der Oligonukleotide, ihre Schmelztemperatur (T_m) und der GC-Gehalt (in %). Der Primernamenname gibt an, ob das Oligonukleotid an den codogenen (5') oder anticodogenen (3') Strang bindet. Mit Ausnahme von Primern, die in der MCS von Vektoren binden, ist bei den sequenzspezifischen HC110-R-Primern, die Position angegeben.

2.5.9.2 Sequenzierung mit Thermo Sequenase

Pro Reaktionsansatz wurden 0,5-2µg Plasmid-DNA bzw. 1 µg PCR-Produkt in 20 µl H₂O eingesetzt. Je 5 µl Plasmid-DNA wurden mit 2 µl A-, C-, G- oder T-Mix und 1 µl 5'-IR-markiertem Primer (0,1-0,3 pmol/µl) versetzt und mit Mineralöl überschichtet. In einem PTC-100 Thermocycler (MJ Research, BIOZYM, Oldendorf) wurde die Plasmid-DNA für 5 min bei 94 °C denaturiert und dann einer als 'cycle sequencing' bezeichneten Methode unterzogen. Diese setzt sich aus 30 repetitiven Zyklen zu je 1 min bei einer Annealing-Temperatur von 50-70 °C (meist 60 °C) und einer Denaturierung von 30 s bei 94 °C unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase zusammen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Formamid-Ladepuffer abgestoppt. Je 1,5 µl der IR-markierten DNA-Fragmente wurden in 40 cm langen, 0,4 mm dünnen 6 %igen Gelen aus modifiziertem Polyacrylamid (Ultra Pure Sequagel XR, National Diagnostics, Atlanta, U.S.A.) mit 8 M Harnstoff bei 1500 V und 50 °C in 1x TBE-Puffer aufgetrennt und in Echtzeit über eine Laser-Photomultiplier-Einheit detektiert. Die Auswertung des IR-Signals erfolgte mit dem Programm BaseImageIR, Version 4.0, von LICOR (MWG, Ebersberg).

2.5.9.3 Computeranalyse von Sequenzdaten

Für die Sequenzanalysen und Datenbankvergleiche auf Nukleinsäure- sowie Aminosäure-Ebene wurde das Programmpaket PC/Gene, Version 6.85, der Firma IntelliGenetics Inc. (Mountain View, CA, U.S.A.) eingesetzt. Weiterhin fanden die online Datenbanken des 'European Molecular Biology Laboratory' (EMBL, Heidelberg) sowie GenBank™, Release 93.0 und Swiss-Prot, Release 31.0 Verwendung. Hierzu wurden die Programme Mail-Quicksearch und GAP [Devereux *et al.*, 1984], BLITZ [Smith und Waterman, 1981], BLAST [Altschul und Lipman, 1990] und FASTA [Lipman und Pearson, 1985; Pearson und Lipman, 1988] hinzugezogen. Die Proteinsequenzen wurden mit SAPS [Brendel *et al.*, 1992], PROSITE und Prot-Param [Appel *et al.*, 1994] analysiert.

2.6 Protein-Analyse

2.6.1 *In vitro* Transkription und Translation

Zur *in vitro* Synthese eines RNA-Transkriptes aus in pBluescript SK klonierter HC110-R-cDNA wurde das 'MAXIscript *In Vitro* Transcription Kit' von Ambion (TC, Heidelberg) herangezogen. 4 µg HC110-R-Plasmid-DNA wurden mit dem Restriktionsenzym HindIII oder SalI hinter dem Stop-Codon linearisiert, mit Phenol/Chloroform extrahiert, in 3 Vol. Ethanol gefällt und in DEPC-H₂O gelöst. In einem 50 µl Reaktionsansatz wurden 2 µg HC110-R-cDNA mit 2,5 µl 200 mM DTT, je 2,5 µl 10 mM ATP, CTP, GTP und UTP, 5 µl 10x Transkriptionspuffer, 1,6 µl RNasin-Inhibitor (40 U/µl) (Promega, Heidelberg) und 2 µl T3-Phagen-Polymerase (10 U/µl)

versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach 1 h wurde noch einmal 2 µl T3-Phagen-Polymerase (10 U/µl) hinzugegeben. Der Ansatz wurde mit 1,5 µl RNase-freier DNase I (2 U/µl) und 1 µl RNasin-Inhibitor (40 U/µl) versetzt, für 15 min bei 37 °C inkubiert, mit Phenol/Chloroform extrahiert, in 3 Vol. Ethanol gefällt und in 25 µl DEPC-H₂O resuspendiert. 1/5 Vol. der Probe wurde in einem Glyoxalgel (Kap. 2.5.3) analysiert.

Für die zellfreie *in vitro* Translation wurde das ‘TNT Coupled Rabbit Reticulocyte Lysate System’ von Promega (Heidelberg) verwendet. Das mit Mikrococcus-Nuclease behandelte Retikulozyten-Lysat aus dem weißen Neusseland-Kaninchen enthält alle notwendigen zellulären Komponenten für die Proteinsynthese [Pelham und Jackson, 1976; Jackson und Hunt, 1983]. Es ermöglichte eine gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation ausgehend von 1 µg zirkularisierter oder mit HindIII bzw. Sall linearisierter HC110-R-Plasmid-DNA in einem einzigen Reaktionsgefäß. In einem 50 µl Reaktionsansatz wurden 1 µg HC110-R-Plasmid-DNA in 16 µl DEPC-H₂O mit 25 µl Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, 2 µl TNT-Reaktionspuffer, 1 µl T3-Phagen-Polymerase (10 U/µl), 1 µl RNasin-Inhibitor (40 U/µl), 1 µl Aminosäure-Mix ohne Methionin (1 mM) und 4 µl Translabel-Mix (85 % L-[³⁵S]-Methionin, 15 % L-[³⁵S]-Cystein; 10 µCi/µl, spez. Aktivität >1000 Ci/mmol, ICN, Meckenheim) auf Eis versetzt und für 90 min bei 30 °C inkubiert. Die Positivkontrolle enthielt 1 µg T3-Luziferase-Kontroll-DNA in 16 µl DEPC-H₂O, die Negativkontrolle nur 16 µl DEPC-H₂O. 1/10 des Proteinansatzes wurde mit 4x RotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) versetzt, für 3 min gekocht und auf 4,5 %ige SDS-Sammelgele geladen. Als Proteinstandard diente der ‘Prestained SDS Molecular Weight’-Marker (Sigma, Deisenhofen). Die Reaktionsprodukte wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) [Lämmli, 1970] in einem 10 %igen SDS-Trenngel der Größe 19 x 15 cm und einer Geldicke von 1,5 mm in 1x SDS-Laufpuffer für ca. 4 h bei 20 mA aufgetrennt (Kap. 2.6.7). Das Gel wurde für 30 min in die Fixierlösung und für 1 h in die Färbelösung gelegt. Über Nacht wurde nichtgebundener Farbstoff mit der Fixierlösung aus dem Gel entfernt (Kap. 2.6.8). Zur gesteigerten Detektion der eingebauten radioaktiv markierten ³⁵S-Aminosäuren wurde das Gel für 30 min in 1 M Natriumsalicylat-Lösung (pH 7,0) [Chamberlain, 1979] oder in einer Fluorophor-Lösung (Amplify, Amersham, Braunschweig) geschwenkt, kurz in H₂O gewaschen und auf einem Gelrockner unter Vakuum für 4-6 h bei 60 °C getrocknet. Die Exposition erfolgte auf einseitig beschichteten ³⁵S-sensitiven Kodak BIOMAX MR Röntgenfilmen mit Verstärkerfolie bei - 80 °C.

2.6.2 Proteinextrakte aus *Haemonchus contortus*

50-100 mg in flüssigem Stickstoff eingefrorene adulte *H. contortus*-Würmer wurden in 1 ml TRIZOL (Gibco, Karlsruhe) aufgenommen. Die Nematoden wurden zusammen mit dem TRIZOL 3x für 15 s in einem Glas-Potter homogenisiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml TRIZOL und Schütteln der Probe für 15 s wurde der Ansatz für weitere 2-3 min bei RT inkubiert.

Danach wurde er für 10 min bei 7000-12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase enthält die RNA, die Interphase die genomische DNA, die rote organische Phase die Proteine [Coombs *et al.*, 1990; Chomczynski, 1993]. Die wäßrige Phase wurde entfernt und separat aufbereitet (Kap. 2.5.2.1). Die Interphase und organische Phase wurden mit 300 µl 100 % Ethanol pro ml TRIZOL versetzt, gut durchmischt und für 2-3 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min und 4 °C wurde der Proteinüberstand vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol für 10 min bei RT gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet 3x mit je 2 ml 0,3 M Guanidin-Hydrochlorid-Lösung in 95 % Ethanol versetzt, gevortext, für 20 min bei RT inkubiert und für 5 min bei 7500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 2 ml 100 % Ethanol gelöst, für 20 min bei RT gefällt und für 5 min bei 7500 rpm und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde kurz vakuumgetrocknet und in 8 M Harnstoff-Lysispuffer (pH 8,0) resuspendiert. Unlösliches Material wurde durch eine Zentrifugation für 10 min bei 10000 rpm und 4 °C entfernt, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nach Bestimmung der Proteinkonzentration bis zur Weiterverarbeitung bei - 20 °C gelagert.

2.6.3 Proteinextrakte aus *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurden 100 µl einer 5 ml Über-Nacht-Kultur für 5 min bei 5000 rpm und 4 °C in einer Heraeus-Untertischzentrifuge pelletiert, mit 5 ml PBS⁻ gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml TRIZOL (Gibco, Karlsruhe) resuspendiert und - wie in Kap. 2.6.2 beschrieben - weiter aufgearbeitet. In Anschluß an die Proteinbestimmung (Kap. 2.6.6) wurde 4x RotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) zugegeben und 10-20 µg Protein pro Spur auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Kap. 2.6.7).

2.6.4 Proteinextrakte aus der Zellkultur

Adhärente Säugerzellen wurden zuvor entweder mechanisch durch Ablösen der Zellen mit einer Glaspipette (z. B. HEK-293) oder nach Kälteeinwirkung (1 h, 4 °C) mit einem Zellschaber (z. B. CHO-K1, COS-7, HeLa) gelöst oder aber mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abtrypsiniert (z. B. HepG2). Die Zellen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, für 10 s bei 13000 rpm und RT pelletiert, 2x mit PBS⁻ gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach Aufnahme von 5-10 x 10⁶ Zellen in 1 ml TRIZOL wurden diese durch kräftiges Vortexen oder durch mehrfaches Ziehen der Zellen durch die Kanüle einer Einwegspritze lysiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Kap. 2.6.2 beschrieben. Alternativ hierzu wurde das Zellpellet auch in 1 ml PBS⁻ oder 8 M Harnstoff-Lysispuffer (pH 8,0) resuspendiert und einer kurzen Ultraschallbehandlung (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, U.S.A.) unterzogen werden. Der Proteingehalt wurde nach Bradford [1976] oder Lowry *et al.* [1951] bestimmt (Kap. 2.6.6).

2.6.5 Proteinextrakte aus *Latrodectus*-Giftdrüsen

Die Prosoma von 30 *Latrodectus revivensis* „Schwarzen Witwen“ (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dipl. Biol. Bettina Berendonck, Institut für Zoomorphologie und Zellbiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurden vom Opistosoma getrennt, in eiskaltes PBS⁻ (pH 7,3) getaucht und unter Zuhilfenahme eines Binokulars (20fache Vergrößerung wurde das Sternum entfernt. Die beiden paarigen, weißlichen 1,6-2,0 mm langen Giftdrüsen reichen, ausgehend von den Cheliceren, weit in das Prosoma hinein. Die insgesamt 60 präparierten Giftdrüsen wurden in 200 µl 8 M Harnstoff-Lysispuffer (pH 8,0) aufgenommen und mit Hilfe von Ultraschall (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, U.S.A.) zerkleinert. Zelltrümmer wurden für 5 min bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 C) abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der Proteingehalt nach Bradford [1976] oder Lowry *et al.* [1951] ermittelt (Kap. 2.6.6).

2.6.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen nach Bradford [1976] wurde mit Hilfe des BIORAD-Protein-Assay (BIORAD, München) bestimmt, sofern der die Proteine enthaltende Puffer relativ frei von Detergentien wie SDS, Triton und Nonidet P-40 war (<0,1 %), die die Bildung des Farbkomplexes beeinflussen. Der zu bestimmende Proteinextrakt wurde mit H₂O auf 800 µl gebracht und mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt. Die Extinktion des Farbstoff-Proteinkomplexes wurde nach 10 min bei 595 nm in einem Beckman Spektrophotometer DU 640 gemessen [Compton und Jones, 1985] und die Proteinkonzentration durch den Vergleich mit einer BSA-Standardgeraden bestimmt.

Bei Verwendung von SDS-, Triton- oder Nonidet P-40-haltigen Puffern wurde die Proteinbestimmung nach Lowry *et al.* [1951] mit dem BIO-RAD DC Protein Assay (BIORAD, München) durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 200 µl der zu bestimmenden Proteinprobe, 100 µl Lösung A' (= 1 ml Lösung A + 20 µl Lösung S) und 800 µl Lösung B zusammen. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 750 nm gemessen.

2.6.7 Elektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte durch vertikale, diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli [1970]. Aus einer 30%igen Polyacrylamid-Stocklösung wurde das Sammelgel mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 4,5 % und das Trenngel je nach Größe der aufzutrennenden Proteine mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 8-20 % angesetzt. Die Polymerisation der Gellösung erfolgte mit 10 µl APS (10 %) und 1 µl TEMED pro ml Gellösung. Die Auftrennung von Proteinen in Gelen mit einer Größe von 19 x 15 cm und einer Geldicke von 1 mm erfolgte in der von Reid und Bielecki [1968] beschriebenen vertikalen Elektrophorese-Apparatur in 1x Laufpuffer für

ca. 4 h bei einer Stromstärke von 20 mA. Diese wurde auf 30 mA erhöht, sobald die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Außerdem wurde die 'Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell'-Apparatur (BIORAD, München) mit einer Gelgröße von 8 x 10 cm und einer Geldicke von 1 mm eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte auch hier in 1x Laufpuffer für ca. 1-2 h bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA. Die Proteine wurden hierzu mit 4x RotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) versetzt, 3 min bei 95 °C denaturiert und auf das Sammelgel geladen. Als Proteinstandard diente der 'Prestained SDS Molecular Weight'-Marker (Sigma, Deisenhofen).

2.6.8 Coomassie-Brilliant-Blue Anfärbung von Proteinen

Die Anfärbung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Heidelberg) bzw. Roti-Blue (Roth, Karlsruhe), einer kolloidalen Coomassie-Färbelösung. Die Empfindlichkeit der Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue liegt bei 0,3-1 µg Protein pro Bande. Hierzu wurde das Gel nach dem Lauf für 2 h bzw. über Nacht vorsichtig in der Färbelösung geschüttelt und danach solange in der Fixierlösung entfärbt, bis alle nichtgebundenen Farbstoffkomplexe entfernt worden waren. Eingespannt zwischen zwei Lagen Zellophanpapier ließ sich das Gel vollständig trocknen und verwahren.

2.6.9 Renaturierung von Proteinen

Durch SDS-PAGE denaturierte Proteine zeigten mitunter kein klares Signal bei der Immundetektion, wenn sich der Antikörper gegen ein zerstörtes konformationsabhängiges Epitop richtete. Die Renaturierung der Polypeptide nach Lee *et al.* [1982] kann im Trenngel oder auf der Blot-Membran erfolgen. Ein Harnstoffhaltiger Renaturierungspuffer bewirkte durch Aufhebung hydrophober Wechselwirkungen eine partielle Entfernung des SDS [Eckert und Kartenbeck, 1997]. Das Trenngel wurde hierzu nach Beendigung der Elektrophorese insgesamt 4x in ca. 250 ml Renaturierungspuffer unter leichten Schüttelbewegungen für je 30-60 min bei RT und abschließend noch einmal für 30 min in dem Blotpuffer inkubiert, bevor es - wie in Kap. 2.6.10 beschrieben - geblottet wurde. So wurden 10-15 %ige SDS-Trenngele für Bindungsstudien zwischen HC110-R und den Liganden α -Latrotoxin bzw. PF1022A-Biotin und BAY44-4400 mitunter zuvor renaturiert.

2.6.10 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran

Im Anschluß an die SDS-PAGE wurden die Proteine nach der horizontalen Semi-Dry-Methode auf eine Nitrozellulosemembran (Protan Cellulosenitrat BA 85, Schleicher und Schuell, Dassel) geblottet [Kyhse-Anderson, 1984]. Hierzu wurde das kontinuierliche Puffer-System nach Bjerrum und Schafer-Nielsen [1986] herangezogen, bei dem nur die in Blotpuffer getränkten Lagen Whatman-Papier (Whatman Ltd., Maidstone, England) zwischen den beiden Graphitplatten des Biometra Fast Blot

(Göttingen) als Pufferreservoir dienten. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 1 mA/cm^2 Blotfläche in 1,5-2 h vom SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran geblotet. Zur Kontrolle des Transfers wurden die transferierten Proteine anschließend durch Ponceau S reversibel angefärbt und unter fließendem Millipore-H₂O wieder entfärbt.

2.6.11 Immundetektion

Die geblotete Nitrocellulosemembran wurde für 1 h oder über Nacht in TST-Puffer mit 1 % BSA oder RotiBlock-Lösung (Roth, Karlsruhe) geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. Antiserum gegen HC110-R (1:100-1:10000 in TST-Puffer) für 2 h bei RT (Tab. 3). Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. Antiserum wurde die Membran für 3x 10 min in TST-Puffer gewaschen und dann für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Tab. 3). Als Sekundärantikörper dienten Alkalische Phosphatase- (AP-) bzw. 'Horse Radish' Peroxidase- (HRP-) gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen IgG-, Ziege-anti-Maus IgG- oder Kaninchen-anti-Maus IgG-Antikörper meist in einer Verdünnung von 1:25000. Für den Nachweis mit Alkalischer Phosphatase wurde die Membran anschließend für 2x 10 min in TST-Puffer und einmal für 10 min in Substratpuffer gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte in 10 ml NBT-BCIP-haltiger Färbelösung unter Bildung eines tiefblauen, unlöslichen Niederschlages, dem 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo [McGadey, 1970; Blake *et al.*, 1984]. Der Nachweis mit 'Horse Radish' Peroxidase erfolgte durch Erzeugung von Chemilumineszenz mit Hilfe des ECL Western Blotting Detektionssystems (Amersham, Braunschweig) in Anlehnung an Roswell und White [1978]. Hierzu wurden gleiche Volumina der Detektionsreagentien 1 und 2 gemischt und direkt auf die Proteinseite der Membran gegeben (0,125 ml des Gemisches / cm^2 Membran), so daß die Flüssigkeit durch die Oberflächenspannung der Membran zurückgehalten wurde. Nach einer Inkubation für 1 min bei RT wurde die Flüssigkeit abgenommen und der noch feuchte Blot luftblasenfrei zwischen 2 Overheadfolien gelegt. Die Exposition erfolgte auf einem ECL Hyperfilm bzw. Hyperfilm MP (Amersham, Braunschweig) für 10 s bis 1 h bei RT in der Dunkelkammer unter Rotlicht. Ferner fand das 'ECL Plus Western Blotting'-System (Amersham, Braunschweig) Verwendung. Hierbei entsteht durch enzymatische Reaktionen Licht mit höherer Intensität und länger andauernder Emissionszeit. Mit diesem System konnte eine 10–20fache Steigerung der Sensitivität gegenüber dem herkömmlichen ECL-System erzielt werden [Akhavan-Tafti *et al.*, 1994]. Die Detektionsreagentien A und B wurden im Verhältnis 40:1 in TST-Puffer verdünnt, auf die Proteinseite der Membran aufgebracht, nach 5 min Inkubationszeit entfernt und - wie oben beschrieben - exponiert.

Für Bindungsassays wurden geblottete Membranen mit denaturierten bzw. renaturierten Proteinen nach dem Blocken zunächst für 2 h mit den in Tab. 3 aufgeführten Liganden α -Latrotoxin, PF1022A-Biotin oder BAY44-4400 inkubiert. Die Detektion erfolgte bei α -LTX (20 nM) über einen polyklonalen Kaninchen-anti- α -LTX IgG-Primär- (1:5000) und Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Sekundärantikörper (1:25000), bzw. Biotin-Protein A (1:100) und Streptavidin-HRP (1:3000); die Bindung an PF1022A-Biotin (100, 500 und 1000 μ g/ml) wurde ebenfalls über Streptavidin-HRP (1:3000), die an BAY44-4400 (20 μ g/ml) mit Hilfe eines Kaninchen-anti-KLH-PF1022A-Immunsersums (1:1000) und einem Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Sekundärantikörpers (1:25000) nachgewiesen.

Ligand	Endkonzentration	Firma
Biotinyliertes PF1022A (JES-3311)	0,5, 1, 10, 100, 500, 1000 μ g/ml	BAYER AG, Leverkusen
BAY44-4400	20 μ g/ml	BAYER AG, Leverkusen
α -Latrotoxin	20 nM	RBI, Natick; Sigma, Deisenhofen

Erstantikörper	Endkonzentration	Firma
Maus-anti-His IgG, monoklonal	0,1 μ g/ml	Invitrogen, Leek, NL; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Maus-anti-Myc IgG, monoklonal	0,3 μ g/ml	Invitrogen, Leek, NL
Maus-anti-c-Myc 9E10-SC-40 IgG, monoklonal	0,5 μ g/ml	Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.
Kaninchen-anti-c-Myc IgG (A-14), polyklonal	0,5 μ g/ml	Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.
Maus-anti-GFP IgG, monoklonal	0,4 μ g/ml	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Biotin-Protein A	1:100	Sigma, Deisenhofen; Calbiochem- Novabiochem, La Jolla, CA, U.S.A.
Kaninchen-Immunsersum-anti-KLH- PF1022A SJB2140 D94348, polyklonal	1:1000	BAYER AG, Leverkusen
Kaninchen-Prä- und Immunsersum-anti- HC110-R N-Term. und C-Term., gegen <i>E. coli</i> präabsorbiert, polyklonal	1:100; 1:500; 1:1000; 1:10000	BioGenes, Gesellschaft für Biopolymere mbH, Berlin; Max Planck Institut, Immunbiologie, Labor Dr. Müller, Freiburg
Kaninchen-anti- α -Latrotoxin IgG, polyklonal	1:5000	Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, U.S.A.

Zweitantikörper	Endkonzentration	Firma
Ziege-anti-Kaninchen IgG-Alkalische Phosphatase (AP), polyklonal	1:10000	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; Sigma, Deisenhofen
Ziege-anti-Kaninchen IgG-Horseradish-Peroxidase (HRP), polyklonal	1:25000	Santa Cruz Biotechnology; CA, U.S.A.
Kaninchen-anti-Maus IgG-Alkalische Phosphatase (AP), monoklonal	1:20000 – 1:30000	JacksonImmuno Research Laboratories, West Grove, U.S.A.
Kaninchen-anti-Maus IgG-Horseradish-Peroxidase (HRP), monoklonal	1:25000	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG-Horseradish-Peroxidase (HRP), polyklonal	1:25000	JacksonImmuno Research Laboratories, West Grove, U.S.A.
Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP)	1:3000 – 1:5000	Sigma, Deisenhofen
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (HRP)	1:3000 – 1:5000	Amersham, Braunschweig

Tab. 3: Für die Immundetektion eingesetzte Liganden, Primär- und Sekundärantikörper.

Die Liganden und Antikörper wurden mit 1x TST-Puffer (mit 0,05 % Tween-20 und 0,1 % Natriumazid) auf die angegebene Endkonzentration eingestellt.

2.6.12 Induzierbare Protein-Expression in *E. coli*

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen das HC110-R-Protein wurden drei HC110-R-Fragmente - die komplette HC110-R-cDNA, das N-terminale Ende ohne TM-Domänen und das C-terminale Ende nach der 7. TM-Domäne - in den Expressionsvektor pRSET B (Invitrogen, Leek, NL) kloniert und so N-terminal mit einem 6xHis-Tag unter Berücksichtigung des Leserasters fusioniert.

Der komplette kodierende Bereich von HC110-R (AS 1-986) wurde mit dem P84_ATGBamHI 5'-Primer 5'-CTG CCG GAT CCT CGG TTT AAT ACC AAC ATG AGG-3' und dem P3121_TGAHindIII 3'-Primer 5'-GCA CTA AGC TTG ACT GAA GCG CAC AAC CTC G-3', der N-Terminus bis zur 1. TM-Domäne (AS 1-445) wurde mit den Primern P84_ATGBamHI 5'-Primer (s. o.) und dem P1434_TGAHindIII 3'-Primer 5'-GGC TCA AGC TTA TCA GAG AAC AAG CGA CAC GGC-3', und der C-Terminus beginnend nach der 7. TM-Domäne (AS 797-986) wurde mit dem P2486_ATGBamHI 5'-Primer 5'-CTA TCG GAT CCC AAC ATG GCT GGC TCC CGT GAT ACC TCT AGG-3' und dem P3121_TGAHindIII 3'-Primer (s. o.) (Kap. 2.5.8.1) amplifiziert. Die Annealing-Temperatur betrug zunächst über 5 Zyklen 56 °C und dann über 30 Zyklen 62 °C (Kap. 2.5.8.3). Die PCR-Produkte wurden mit den Enzymen BamHI und HindIII verdaut und gerichtet in den ebenfalls BamHI/HindIII linearisierten pRSET B-Expressionsvektor ligiert.

In dem pRSET B-Vektor wird die Expression über einen viralen Promotor des Bakteriophagen T7 kontrolliert. Die Klonierung erfolgte deshalb in dem *E. coli* Stamm XL1-Blue, der kein Gen der T7 RNA Polymerase enthält. Das rekombinante Plasmid

wurde danach in T7 Polymerase exprimierenden BL21(De3)pLysS *E. coli*-Zellen transformiert, die zusätzlich das Plasmid pACYC184 enthalten, das über eine Chloramphenicolresistenz stabilisiert wird, und in geringen Mengen das T7-Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase, exprimieren. Da diese Zellen unter der Kontrolle des lacUV5 Promotors stehen, erfolgt bei IPTG-Induktion die Expression der T7 RNA Polymerase und damit auch die des Fusionsproteins.

Eine Einzelkolonie mit dem gewünschten HC110-R-Plasmid wurde von einer frischen LB-Platte mit 50 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol in 50 ml LB-Medium unter gleichem Selektionsdruck überimpft und über Nacht bei 37 °C und 280 rpm bis zur stationären Phase geschüttelt. Diese Über-Nacht-Kultur wurde anschließend auf OD₆₀₀ = 0,3 verdünnt und 100 ml der Kultur bei 37 °C und 280 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 weitergeschüttelt. 1 OD₆₀₀ -Einheit wurde abgenommen, die nicht-induzierten Zellen kurz abzentrifugiert und in 150 µl 8 M-Harnstoff-Lysispuffer (pH 8,0) oder 150 µl PBS⁻ und 50 µl 4xRotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) aufgenommen. Die nicht-induzierte Probe wurde für 2 min denaturiert, die genomische DNA durch kurze Ultraschallimpulse von wenigen Sekunden im Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Company, Danbury, U.S.A.) geschert und unlösliche Partikel durch eine 3minütige Zentrifugation bei 14000 rpm pelletiert.

Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die 100 ml Kultur für weitere 3-4 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die induzierten Zellen für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C (Heraeus-Untertischzentrifuge) abzentrifugiert, das Pellet in PBS⁻ gewaschen und anschließend in 8 ml 8 M-Harnstoff-Lysispuffer (pH 8,0) oder unter nativen Bedingungen in PBS⁻ (pH 8,0) resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch 3maliges Eintauchen der Zellen in flüssigen Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 37 °C. Nach der ersten Stickstoffbehandlung wurden 0,75 mg/ml Lysozym zugesetzt. Nach der letzten Inkubation in flüssigem Stickstoff erfolgte eine Inkubation für 20 min bei 16 °C, gefolgt von einigen kurzen Ultraschallimpulsen zu je 10 s und einer Abkühlung im Eiswasserbad, bis die Lösung eine wasserähnliche Viskosität aufwies. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C (Beckman J2-21; JS 13.1-Rotor) wurden 150 µl einer induzierten Probe entnommen, mit 50 µl 4xRotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) versetzt und die Induktion des jeweiligen HC110-R-Proteinfragmentes zusammen mit der nicht-induzierten Probe durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung bzw. Western Blot-Analyse mit einem Maus-anti-His-Antikörper überprüft (Tab. 3). Der Überstand wurde für die weitere Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Kap. 2.6.13) in ein frisches Gefäß überführt und bei - 20 °C gelagert.

2.6.13 Proteinaufreinigung durch Metall-Affinitätschromatographie

Die Anreicherung erfolgte unter denaturierenden oder wahlweise unter nativen Bedingungen über das N-terminale 6xHis-Tag mit Hilfe des IMAC-Systems ('Immobilized Metal Affinity Chromatography') über TALONspin-Säulen von Clontech (Palo Alto, U.S.A.). Das Harz der Säule wurde zunächst separat mit 5 Vol. 8 M-Harnstoff-Lysispuffer (pH 8,0) oder PBS⁻ (pH 8,0) äquilibriert, für 4 min bei 3000 rpm und 4 °C sedimentiert und zusammen mit dem HC110-R-Proteinüberstand für 20 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Harz 3x mit dem 10fachen Vol. 8 M-Harnstoff-Lysispuffer oder PBS⁻ für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln gewaschen und abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 1 ml 8 M Harnstoff-Lysispuffer oder PBS⁻ aufgenommen und damit die Säule beladen; diese wurde im folgenden noch 2x mit dem 3fachen Vol. 8 M-Harnstoff-Lysispuffer oder PBS⁻ gewaschen, bevor die Elution mit Imidazolhaltigem (100 mM) 8 M Harnstoff-Lysispuffer (pH 8,0) oder PBS⁻ (pH 8,0) in mehreren Fraktionen zu je 150 µl erfolgte. Der Gehalt von Fusionsprotein in den Fraktionen wurde durch Gelanalyse und Proteinbestimmung nach Bradford [1976] ermittelt (Kap. 2.6.6). Die beiden aufgereinigten Proteine wurden über Centricon-Röhrchen (Millipore Corp., Bedford, MA, U.S.A.) bzw. Slide-A-Lyzer Dialyserahmen (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.), die jeweils Moleküle oberhalb von 10 kDa zurückhielten, nach Angaben des Herstellers entsalzt, lyophilisiert und in einer PBS⁻-Lösung aufgenommen.

2.6.14 Immunisierung

Immundominante Domänen des HC110-R wurden mit dem PC/Gene-Programm (Version 6.7) „ANTIGEN“ (IntelliGenetics, Mountain View, CA, U.S.A.) nach der Methode von Hopp und Woods [1981] bestimmt. Peptide, bestehend aus insgesamt 13 Aminosäuren eines ausgewählten immundominanten Bereichs des deduzierten HC110-R-Proteins, wurden von der Firma Biotech GmbH (Denzlingen) synthetisiert und über Tri-Lysine an eine Polystyrol-Polyoxyethylen-Matrix (TentaGel™ 4 MAP) gekoppelt [Butz *et al.*, 1994]. Je 1 mg des TentaGel™-gekoppelten HC110-R-Peptides wurde in 2 ml PBS⁻ resuspendiert, bei - 80 °C eingefroren und nach dem Auftauen mit 2 ml FCA versetzt. Die Immunisierung von 2 Kaninchen mit den so gekoppelten Peptiden wurde von Herrn Dr. Horst Mossmann (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg) durchgeführt. Ferner wurden dort, wie bei der Firma BioGenes (Gesellschaft für Biopolymere mbH, Berlin) je 2 Kaninchen nach der ersten Blutentnahme und Gewinnung des Präimmunsersums zunächst 50 µg des C-terminalen 21 kDa großen HC110-R-Proteins sowie des 54 kDa großen N-terminalen HC110-R-Proteins in einer zu gleichen Teilen aus PBS⁻ und FCA bestehenden Suspension subkutan injiziert. Zwei weitere Immunisierungen mit je 100 µg Antigen erfolgten 4 und 8-11 Wochen nach der ersten Immunisierung.

Eine erste Blutentnahme wurde 4-6 Wochen, eine zweite Blutentnahme und Serumgewinnung 8-10 Wochen nach der ersten Immunisierung durchgeführt.

2.6.15 Aufreinigung des Antiserums durch Filteradsorption

Die Aufreinigung des jeweiligen Antiserums gegen kreuzreagierende *E. coli*-Proteine erfolgte durch Filteradsorption. Dazu wurden nicht induzierte *E. coli*-Rohextrakte (je 30 µg/Spur) (Kap. 2.6.12) über ein 12,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Im Anschluß an eine Ponceau S-Färbung wurde die Spur ausgeschnitten, in H₂O entfärbt und der Membranstreifen in TST-Puffer mit 1 % BSA für 1 h geblockt. Das 1:20 in TST-Puffer verdünnte Serum wurde 2x für je 2 h mit einem Membranstreifen inkubiert. Die doppelt aufgereinigten Antiseren wurden mit 0,1 % Natriumazid versetzt und bei 4 °C aufbewahrt.

2.6.16 Aminosäuresequenz-Analyse

Zur Überprüfung der deduzierten Aminosäure-Sequenz HC110-R wurde der in *E. coli* induzierte, aufgereinigte und entsalzte C-Terminus von HC110-R eingesetzt.

Wegen des N-terminalen 6xHis-Tags wurde eine C-terminale Protein-Ansequenzierung von 1 nmol des 21 kDa C-terminalen HC110-R-Proteins nach dem schrittweisen Schlack-Kumpf-Abbau [Schlack und Kumpf; 1926] in einer Modifikation von Boyd *et al.* [1992] von der Firma TopLab (Martinsried) durchgeführt. Die Sequenzierung der abgespaltenen Aminosäuren erfolgte in einem Aminosäuresequenzierer PROCISE 492 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) und wurde mit dem PROCISE C 'Reversed phase' HPLC-System, bestehend aus einem ABI 140C Mikrogradienten-System und einem ABI 785A UV/VIS Detektor, analysiert und mit der PROCISE C Kontrollsoftware sowie der ABI Data Analysis Software identifiziert.

Weitere 25 pmol des C-terminalen HC110-R-Proteinfragmentes wurden durch 2 % Trypsin (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) bei 37 °C über Nacht intern gespalten. Insgesamt wurden vier Peptidfragmente durch einen Vergleich des HC110-R-Standardchromatogrammes nach dem Trypsin-Verdau mit dem Chromatogramm des Trypsin-Blankverdaus ausgewählt, um die Sequenzierung von tryptischen Autolyseprodukten auszuschließen. Diese vier Peptidfragmente wurden einer N-terminalen Protein-Ansequenzierung nach dem Verfahren des schrittweisen Edman-Abbaues in einer Modifikation nach Hunkapiller *et al.* [1983] durch die Firma TopLab (Martinsried) unterzogen. Die gespaltenen Peptidfragmente wurden mittels HPLC aufgetrennt und fraktioniert. Die auf Immobilon geblottete Peptidfraktion wurde in die Reaktionskammer des Aminosäuresequenzierers PROCISE 492 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) eingebracht und die Aminosäuren in einem 140 C-PTH-Analyser und UV-Detektor 785 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) abgetrennt. Die Aminosäuren wurden quantitativ durch 'Reversed Phase' HPLC erfaßt und über Retentionszeitvergleich mit einem vor der Sequenzanalyse erstellten Standardchromatogramm identifiziert.

2.6.17 Liganden-Präzipitation mit Streptavidin-Beads

Doppelt-Ansätze zu je 2 mg und 4 mg Dynal M-280-Streptavidin-Beads (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg) wurden 2x für 5 min mit PBS⁻ gewaschen und der Überstand nach Einbringen der Beads für 3 min in einen Dynal MPC-E1 Magneten (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg) abgehoben. Anschließend wurden die Streptavidin-Beads mit je 500 µg PF1022A-Biotin in einem Gesamtvolumen von 1 ml TST-Puffer für 30 min bei RT unter gleichmäßigem Durchmischen inkubiert. Ein Kontrollansatz wurde nur in TST-Puffer inkubiert. Nach Abheben des Überstandes und 3 Waschschritten zu je 5 min mit TST-Puffer und 0,1 % BSA wurden pro Ansatz ein Gemisch aus 40 µg des in *E.coli* exprimierten und nach nativem Protokoll über Affinitätschromatographie gereinigten HC110-R N-Terminus und 60 µg des C-Terminus (Kap. 2.6.12) in 500 µl PBS⁻ zugesetzt und für 1 h bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschritten zu je 5 min mit TST-Puffer und 0,1 % BSA wurden die Beads in 1x RotiLoad-Puffer (Roth, Karlsruhe) aufgenommen, für 2 min aufgekocht und der noch warme Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, um ein Reannealing der biotinylierten Fragmente an die Dynal M-280-Streptavidin-Beads zu verhindern. Jeweils die halben Reaktionsansätze sowie ein Aliquot des HC110-R-Gemisches aus N- (20 µg) und C-Terminus (30 µg) vor der magnetischen Separation wurden in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion der Proteine erfolgte - wie in Kap. 2.6.11 beschrieben - mit einem monoklonalen Maus-anti-His IgG-Primär- (0,1 µg/ml; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) und einem Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP-Sekundäntikörper (1:25000; Dianova, Hamburg).

2.7 Zellkultur

2.7.1 Immortalisierte Zelllinien

Die folgenden in Tab. 4 aufgeführten Zellkulturlinien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) bzw. über die Amerikanische Zellkultur Sammlung (ATCC; Manassas, VA, U.S.A) bezogen [Drexler *et al.*, 1995]:

Zelllinie	Registrier-Nr.	Organismus	Gewebe	Zelltyp
CHO-K1	ATCC: CCL-61 DSM: ACC-110	Chinesischer Hamster (<i>Cricetulus griseus</i>),	Ovar	Epithelzelle
HeLa	ATCC: CCL-2	Mensch	Cervix-Karzinom	Epithelzelle
HepG2	ATCC: HB-8065 DSM: ACC-180	Mensch	Leber-Karzinom	Epithelzelle
COS-7	ATCC: CRL-1651 DSM: ACC-60	Affe (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	Niere	Fibroblast
HEK-293	ATCC: CRL-1573	Mensch, embryonal	Niere	Epithelzelle

Tab. 4: Verwendete immortalisierte Säugerzelllinien.

Mit aufgeführt sind die Registrier-Nummer des ATCC bzw. DSM, der Organismus, das Gewebe und der Zelltyp.

2.7.2 Kultivierung von Säugerzelllinien

Die Kultivierung der adhärennten Zelllinien CHO-K1, HeLa, COS-7, HEK-293 und HepG2 erfolgte in Gewebekulturschalen (\varnothing 110 mm; Greiner, Solingen) in einem Volumen von 10 ml Medium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zur Aufrechterhaltung der Zellkultur wurden CHO-K1-Zellen in vorgewärmtem Ham's F-12 Medium, HeLa-, HepG2- und COS-7-Zellen in RPMI 1640-Medium und HEK-293-Zellen in DMEM-Medium jeweils mit 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin sowie 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zur Subkultivierung der CHO-K1- und COS-7-Zellen wurden diese für 1-2 h bei 4 °C gelagert und anschließend mechanisch mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst. HeLa- und HEK-293-Zellen ließen sich direkt mit einem Strahl aus einer Glaspipette vom Boden der Kulturschale ablösen. Für die Subkultivierung der HeLa- und HepG2-Zellen wurden diese für 5 min bei RT in HBSS-Medium gewaschen, um das FCS zu inaktivieren, und anschließend für 15 min mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen) in HBSS-Medium bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und FCS-haltiges Medium zugegeben. Abtrypsinisierte HepG2-Zellen wurden mit einer sterilen 10 ml-Einwegspritze (Becton Dickinson) und einer Injektionskanüle (20 G; Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen) vereinzelt. Zur Einstellung der Zellzahl wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C mit 1200 rpm in einer Beckman CPKR-Zentrifuge pelletiert und in wenig Medium aufgenommen. Ein 100 µl Aliquot wurde mit 100 µl Trypanblau (0,4 % in PBS⁻) vermischt und in einer Neubauerzählkammer die Anzahl lebender Zellen ermittelt. Auf eine große Gewebekulturschale (\varnothing 110 mm) wurden ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen, auf eine mittlere Gewebekulturschale (\varnothing 55 mm) ca. $0,5-1 \times 10^6$ Zellen und auf eine kleine Gewebekulturschale (\varnothing 35 mm) ca. $2,5 \times 10^5$ Zellen ausgebracht und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit weiterkultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage erneuert und die Zellen bei einer Konfluenz von 80-90 % passagiert.

2.7.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden nur Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zellen wurden wie in Kap. 2.7.2 beschrieben abgelöst und ihre Zellzahl ermittelt. Nach der Pelletierung der Zellen bei 4 °C und 1200 rpm für 15 min in einer Beckman CPKR-Zentrifuge wurden diese mit 70 % Medium, 20 % FCS und 10 % DMSO auf eine Zellzahl von $1-6 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und in 1,8 ml Kryogefäße (Nunc, Wiesbaden) aliquotiert. Diese wurden in einem bei 4 °C vorgekühlten Stratacooler (Stratagene, Heidelberg) über Nacht langsam auf - 80 °C heruntergekühlt und 24 h später in flüssigen Stickstoff (- 196 °C) überführt.

2.7.4 Auftauen von Zellen

Ein Kryoröhrchen mit eingefrorenen Zellen wurde direkt in einem Wasserbad mit 37 °C aufgetaut, die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Medium überführt und für 10 min bei 1200 rpm und 4 °C in einer Beckman CPKR-Zentrifuge pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Kulturmedium mit 10-20 % FCS aufgenommen und auf einer großen Gewebekulturschale (Ø 110 mm) ausgebracht. Alternativ wurden die Zellen - insbesondere die gegen Scherkräfte empfindlichen HEK-293-Zellen - direkt auf eine Gewebekulturschale ausgebracht und das DMSO-haltige Medium nach 4 h abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach 24 h wurde die Kultur mit einem Inversmikroskop (Zeiss, Oberkochen) begutachtet, subkultiviert oder mit frischem Medium versetzt.

2.7.5 Präparation von bovinen chromaffinen Nebennierenmarkszellen

Primär-Kulturen von dissoziierten chromaffinen Zellen wurden aus Rinder-Nebennieren mithilfe einer Collagenase-haltigen Lösung nach der Methode von Marxen *et al.* [1989] in der Abteilung Neurotoxikologie von Herrn Prof. Dr. H. Wiegand im Medizinischen Institut für Umwelthygiene an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf präpariert. 2×10^6 akut dissoziierte chromaffine Zellen wurden auf collagenbeschichteten Deckgläschen (Ø 42 mm) in mittleren Gewebekulturschalen (Ø 55 mm) mit 5 ml DMEM-Medium und 10 % FCS sowie 100 U/ml Penicillin und Streptomycin über maximal 3 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.7.6 Mykoplasmen-Test

Zur Überprüfung der einzelnen Zelllinien auf eine Kontamination mit Mykoplasmen wurden in einem sterilen 10 ml Gefäß (Greiner, Solingen) $0,5-1 \times 10^6$ Zellen in 1 ml 10 % FCS-haltigem Kulturmedium mit 5 ml L-Arginin-haltigem Medium, und weitere $0,5-1 \times 10^6$ Zellen in 1 ml 10 % FCS-haltigem Kulturmedium mit 5 ml D-Glucose-haltigem Medium versetzt. Zur Kontrolle wurden je 1 ml 10 % FCS-haltiges Kulturmedium ohne Zellen mit 5 ml L-Arginin- bzw. D-Glucose-haltigem Medium angesetzt. Die Ansätze wurden für 1-2 Wochen in einen 37 °C Inkubator gestellt und täglich auf eine Veränderung des Mediums überprüft. Mykoplasmenkontaminierte Kulturen bewirken in Arginin-haltigem Medium einen Farbumschlag von gelb-orange nach rot oder aber in Glucose-haltigem Medium von rot nach gelb.

2.8 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen

2.8.1 Transiente und stabile Transfektion

Um Fremd-DNA in Säugerzellen einzubringen, wurde das nicht-liposomale, polykationische Transfektionsreagenz FuGENE 6 von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) eingesetzt [Kurachi *et al.*, 1998]. Dazu wurden ca. $0,5-1,5 \times 10^5$ Zellen in 2 ml Medium auf kleine Gewebekulturschalen (\varnothing 35 mm) ausgebracht, in die für die spätere konfokale Laserscanning-Mikroskopie (Kap. 2.10.2) ein steriles, 1 % gelatinebeschichtetes Deckgläschen gelegt wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit über Nacht kultiviert. Vor der transienten Transfektion wurde noch einmal das Medium gewechselt. Für die Transfektion wurden pro Reaktionsansatz 3 µl FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemicals) in 97 µl serumfreiem Medium verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Tropfenweise wurden je 100 µl des verdünnten FuGENE 6 pro Ansatz zu 1-2 µg Plasmid-DNA (0,5-1 µg/µl) pipettiert, vorsichtig gemischt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde der komplette Reaktionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken der Schale die Transfektionsmischung gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden ohne Mediumwechsel für 1-2 Tage weiterkultiviert. Bei jeder Transfektion wurden stets folgende 3 Negativkontrollen durchgeführt: Eine kleine Gewebekulturschale (\varnothing 35 mm) mit $0,5-1,5 \times 10^5$ Zellen wurde nicht transfiziert, einer zweiten Schale wurde zwar DNA, aber kein FuGENE 6 im Transfektionsansatz zugesetzt und einer dritten Schale wurde FuGENE 6, aber keine DNA zugefügt.

Lediglich bei den HeLa-Zellen erwies sich eine Transfektion mit dem kationischen liposomalen Transfektionsreagenz TransFast (Promega, Heidelberg) als besser geeignet. Hierzu wurden 1-3 µg DNA in 1 ml Medium ohne FCS verdünnt, 1-6 µl TransFast-Reagenz im Verhältnis 1:1 oder 1:2 (DNA:TransFast) zugefügt und durchmischt. Nach 15minütiger Inkubation bei RT wurde der Reaktionsansatz tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben, deren FCS-haltiges Medium zuvor entfernt worden war. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit wurde 1 ml FCS-haltiges Medium zugegeben und die Zellen für weitere 48 h weiterkultiviert.

Für eine stabile Transfektion wurden spezielle Expressionsvektoren mit einem Resistenzgen als Selektionsmarker (Kap. 2.8.3) gewählt, so daß bei Zugabe von Antibiotika, wie bspw. Zeocin, Geneticin (G418), Hygromycin, Tetrazyklin oder Doxzyklin, 48–72 h nach der transienten Transfektion und bei jedem folgenden Mediumwechsel nur erfolgreich transfizierte Zellen, die das Resistenzgenprodukt dauerhaft exprimieren, überleben. Die optimale Konzentration des zur Selektion zugegebenen Antibiotikums wurde zuvor durch Anlegen einer Verdünnungsreihe für die jeweilige Zelllinie ermittelt.

2.8.2 Transiente Expression von GFP-markierten Fusionsproteinen

Die Vektoren pEGFP-C1 (AC: U55763) und pEGFP-N3 (AC: U55762) (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) exprimieren das grün fluoreszierende Protein EGFP unter der Kontrolle des starken konstitutiven CMV-Promotors, ohne dazu exogene Substrate oder Kofaktoren zu benötigen, und können N- oder C-terminal mit anderen Proteinen fusioniert werden ohne das Fluoreszenzverhalten wesentlich zu verändern [Chalfie *et al.*, 1994]. EGFP stellt eine genetische Variante des Wildtyp-GFP aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* dar. Durch Austausch der Aminosäure Ser⁶⁵ durch Thr verschob sich das Anregungsmaximum von 395 nm auf 490 nm und erhöhte sich die Intensität des EGFP-Fluoreszenzsignals [Yang *et al.*, 1996b].

Die Amplifizierung der HC110-R-cDNA erfolgte mit dem P83EGFP_ATGHindIII-5'-Primer 5'-GGT AGA AGC TTT TCG GTT TAA TAC CAA CAT GAG G-3' und dem P3057EGFP_o.TGASalI-3'-Primer 5'-CTG TGT CGA CAA CAT TTC GCC AAT AGT TAG G-3' bei einer Annealing-Temperatur von zunächst 56 °C und später 61 °C (Tab. 1 in Kap. 2.5.8.1). Das PCR-Produkt sowie die beiden EGFP-Vektoren wurden mit den Enzymen HindIII und SalI geschnitten und das Insert unter Erzeugung eines offenen Leserasters gerichtet in den jeweiligen Vektor ligiert (Kap.2.5.6) und transformiert (Kap. 2.5.7).

Das entstehende 137 kDa große Fusionsprotein mit dem N-terminalem EGFP-Tag wurde GFP-HC110-R, das mit dem C-terminalem EGFP-Tag HC110-R-GFP genannt. Ein β_2 -adrenerger Rezeptor aus der Maus (AC: P18762) [Nakada *et al.*, 1989] wurde mit einem C-terminalem EGFP-Tag fusioniert, indem seine cDNA mit dem P117Maus β_2 ARXhoI-5'-Primer 5'-TAC CTC GAG CTG CTA ACC TGC CAG CCA TG-3' und dem P1349Maus β_2 AREcoRI-3'-Primer 5'-TGT AGA ATT CTT CCT TCC TTG GGA GTC AAC GCT-3' (Tab. 1 in Kap. 2.5.8.1) mit einer Annealing-Temperatur von 55/60 °C (Kap. 2.5.8.3) amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI geschnitten und in den XhoI/EcoRI linearisierten pEGFP-N3 ligiert wurde. Ebenfalls in den XhoI/EcoRI geschnittenen pEGFP-N3-Vektor wurde die für einen humanen muscarinischen Rezeptors 1 (AC: Y00508) [Allard *et al.*, 1987] kodierende cDNA ligiert, die zuvor mit dem P70HumM1RezXhoI-5'-Primer 5'-ATA TCT CGA GAG CCC CAC CTA GCC ACC ATG AAC A-3' und dem P1465HumM1RezEcoRI-3'-Primer 5'-GAC GAA TTC CAT TGG CGG GAG GGA GTG CGG T-3' (Tab. 1 in Kap. 2.5.8.1) bei 55/60 °C (Kap. 2.5.8.3) amplifiziert wurde. Die resultierenden Fusionsproteine mit offenem Leseraster wurden β_2 -R-GFP (75 kDa) und M1-R-GFP (78 kDa) genannt.

2.8.3 Stabile Expression von Myc/His-markierten Fusionsproteinen

Der Vektor pMyc6xHis leitet sich von dem Vektor pSecTagA (Invitrogen, Leek, NL) ab, nachdem das Signalpeptid durch Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen NheI und SfiI, 'blunting' der 5'- bzw. 3'-überhängenden Enden mit Sojabohnen-

Nuclease nach Sambrook *et al.* [1989] und Religation des Vektors eliminiert wurde. Die codierende Region von HC110-R wurde mit Hilfe der PCR-Primer P83MycTag_ATGBamHI-5'-Primer 5'-ATA GGA TCC TTC GGT TTA ATA CCA ACA TGA GG-3' und P3058MycTag_o.TGAXbaI-3'-Primer 5'-CCT GTC TAG AAA CAT TTC GCC AAT AGT TAG G-3' (Tab. 1 in Kap.2.5.8.1) bei einer Annealing-Temperatur von 56/60 °C (Kap. 2.5.8.3) amplifiziert, mit den Enzymen BamHI und XbaI geschnitten und in den gleichfalls BamHI/XbaI linearisierten pMyc6xHis-Vektor ligiert (Kap.2.5.6) und in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert (Kap. 2.5.7). Im folgenden wurden HepG2- sowie COS-7-Zellen stabil mit dem 116 kDa großen HC110-R-Myc/His-Konstrukt transfiziert und unter 0,4 mg/ml Zeocin für HepG2- bzw. 0,3 mg/ml Zeocin für COS-7-Zellen selektioniert (Kap. 2.8.1).

Außerdem wurde die HC110-R-Myc/His-cDNA mit den Primern P83_ATGNotI-5' 5'-ATA TTG CGG CCG CTT CGG TTT AAT ACC AAC ATG-3' und pMycHis_TGABamHI-3' 5'-CGC GGA TCC TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3' (Tab. 1 in Kap. 2.5.8.1) bei einer Annealing-Temperatur von 56/60 °C (Kap. 2.5.8.3) amplifiziert, nachgeschnitten und in den gleichfalls BamHI und NotI restringierten bicistronischen Expressionsvektor pIRES1neo (AC: U89673; Clontech, Palo Alto, U.S.A.) ligiert. Der pIRES1neo Vektor enthält zusätzlich eine interne Ribosomen-Bindestelle (IRES) des Enzephalomyocarditis-Virus (ECMV) vor dem Start-ATG des Neomycin-Resistenzgens [Rees *et al.*, 1996].

Auf diese Weise wurden zwei offene Leseraster, das des HC110-R und das des Antibiotika-Resistenzmarkers, von nur einer mRNA mit einem humanen Cytomegalovirus- (CMV-) Promotor translatiert [Jang *et al.*, 1988; Jackson *et al.*, 1990]. Nach der Bestimmung der maximalen G418-Konzentration (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, U.S.A.) für die einzelnen, noch nicht-transfizierten Zelllinien, erfolgte die Selektion durch 0,5 mg/ml G418 in HepG2- und 1 mg/ml G418 in COS-7- oder HEK-293-Zellen.

2.9 Zelluläre Lokalisation von HC110-R

2.9.1 Detektion von HC110-R-markierten Fusionsproteinen

GFP und Fusionsproteine mit einem C- oder N-terminalen GFP-Tag (Kap. 2.8.2) können bereits 24 h nach der Transfektion *in vivo* unter dem Phasenkontrastmikroskop (Kap. 2.10.1) betrachtet werden. Für Kolokalisationsexperimente (Kap. 2.9.3) und Schnittserien durch die Zelle mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops (Kap. 2.10.2) wurden die auf 1 % gelatinebeschichteten Deckgläschen ausgesäten und transfizierten Zellen 3x mit PBS⁻ gewaschen, mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS⁻ (pH 7,2) für 30 min bei 37 °C fixiert und in einer 1:1 Mixtur (v/v) aus Glycerin und Vectashield (Serva, Heidelberg) sowie einer Endkonzentration von 2 % (w/v) DABCO (Merck, Darmstadt), auf einem Objektträger eingebettet.

Die das HC110-R-Myc/His-Fusionsprotein stabil exprimierenden COS-7-, HEK-293- und HepG2-Zellen wurden 3x mit PBS⁻ gewaschen und für 30 min bei 37 °C mit 3,7 % Paraformaldehyd (pH 7,2), 0,2 % Triton X-100 und 0,02 % Glutardialdehyd in PBS⁻ (pH 7,2) fixiert. Danach wurden freie Aldehydgruppen durch 2maliges Waschen für je 10 min bei RT mit 0,1 % Natriumborhydrid in PBS⁻ (pH 8,0) reduziert. Unspezifische Bindungen wurden für 1 h bei RT in einer Blocklösung (0,5 % BSA, 0,2 % Triton X-100 in PBS⁻) auf einem Schüttler abgesättigt.

Die Zellen wurden für 2 h mit 0,13 µg/ml eines monoklonalen Maus-anti-c-Myc Erstantikörpers (9E10-SC-40, Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.) und nach dreimaligem Waschen in Blocklösung, für 1 h in einer feuchten Kammer im Dunkeln mit 20 µg/ml eines monoklonalen Ziege-anti-Maus IgG (H+L) F(ab')₂ Fragment Konjugat-Alexa 488-Zweitantikörpers (Molecular Probes, Göttingen) inkubiert, noch weitere 3x mit PBS⁻ gewaschen, - wie oben beschrieben - eingebettet und im konfokalen Lasermikroskop betrachtet.

2.9.2 Detektion von HC110-R-GFP durch biotinyliertes PF1022A

Transient das HC110-R-GFP exprimierende COS-7 und HEK-293-Zellen wurden 24 h und 48 h nach ihrer Transfektion auf ihre Fähigkeit untersucht, PF1022A zu binden. Hierzu wurden die auf 1 % Gelatine adhärierenden Zellen (Kap. 2.8.1) - wie zuvor beschrieben - gewaschen, fixiert, freie Aldehydgruppen mit 0,1 % Natriumborhydrid reduziert und für 2 h geblockt. Als Ligand diente biotinyliertes PF1022A (JES-3311; 20 mg/ml in DMSO; BAYER AG, Leverkusen) in Konzentrationen von 0,1; 1; 5; 10; 20; 50; 100; 250; 500; 750 und 1000 µg/ml in 1x TST-Puffer mit 0,5 % BSA und 0,05 % Tween-20. Nach einer 2stündigen Inkubation bei RT, dreimaligem Waschen in Blockpuffer, wurden die Zellen für 1 h mit Streptavidin-Texas-Rot (1:100) (Amersham, Braunschweig), bzw. mit Streptavidin-Phycoerythrin (1:50) (Amersham, Braunschweig) versetzt und - wie zuvor beschrieben - auf einem Objektträger eingebettet. Um auszuschließen, daß die Fixierung die Bindungsfähigkeit der Zellen beeinflusst, wurde das biotinylierte PF1022A direkt ins Medium gegeben. Nach einer Inkubation für 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen 3x mit HBSS gewaschen, fixiert und eingebettet. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte sowie den Maus β₂-adrenergen Rezeptor (β₂-R-GFP) exprimierende COS-7- oder HEK-293-Zellen unter den gleichen Bedingungen mit und ohne biotinyliertes PF1022A inkubiert. Die Zellen wurden dann im konfokalen Lasermikroskop (Kap. 2.10.2) auf eine mögliche Kollokalisierung von HC110-R und A hin untersucht.

2.9.3 Detektion des B0457-Proteins in *Caenorhabditis elegans*

Wegen der hohen Sequenzidentität von HC110-R zu dem B0457-Protein aus *C. elegans* sollte überprüft werden, ob die gegen den N- bzw. C-Terminus von HC110-R gerichteten Kaninchen-Seren (BioGenes, Gesellschaft für Biopolymere mbH, Berlin) auch das B0457-Protein spezifisch detektieren.

Embryonierte *C. elegans* Eier wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Olaf Bossinger, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, auf polylysinbeschichtete Objektträger gebracht, mit einem Deckgläschen versehen, kurz mit H₂O gespült und in flüssigem Stickstoff oder bei - 80 °C eingefroren. Die Deckgläschen wurden anschließend mit Hilfe einer Rasierklinge wieder entfernt. Für die Fixierung der Embryos wurden die Objektträger in die folgenden eiskalten Lösungsmittel (- 20 °C) getaucht: 10 min in Methanol, 20 min in Aceton, 10 min in 90 %iges Ethanol und 10 min in 60 %iges Ethanol. Zuletzt wurden die Embryos für weitere 10 min in auf RT vorgewärmtem 30 %igen Ethanol inkubiert und insgesamt 3x für 10 min in 1x TBT-Puffer mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen. Die verschiedenen Kaninchen-Präimmunsereen und Antiseren gegen den N- und C-Terminus von HC110-R wurden 1:500 in 1x TBT-Puffer, 1 % Instant Magermilchpulver (Reformhaus) und 1 % BSA verdünnt. Die Embryos auf ihren Objektträgern wurden mit 100 µl des Serums überschichtet, zusätzlich mit einem Deckgläschen versehen und für 2-3 h bei RT oder aber über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschrritten zu je 15 min in 1x TBT-Puffer wurden die Objektträger mit 100 µl eines Esel-anti-Kaninchen IgG-Cy3-Sekundärantikörpers (JacksonImmuno Research Laboratories, West Grove, U.S.A.) überschichtet, erneut mit einem Deckgläschen versehen und für 2-3 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde zuvor 1:1 mit Glycerin versetzt und schließlich 1:200 in 1x TBT-Puffer mit 1 % Magermilchpulver und 1 % BSA verdünnt eingesetzt. Nach 4 Waschschrritten zu je 15 min in 1x TBT-Puffer wurden die Embryos in einem vor Ausbleichung schützenden Mowiol-haltigen Einbettmedium (Polyscience Inc., Niles, IL, U.S.A.) mit 1-2 % DABCO (Merck, Darmstadt) eingebettet und die Färbung im konfokalen Lasermikroskop (Kap. 2.10.2) überprüft.

2.9.4 Anfärbung des Zellkerns

Auf 1 % gelatinebeschichtete Deckgläschen ausgebrachte und mit diversen pEGFP-Konstrukten (Kap. 2.8.2) transient transfizierte Säugerzellen wurden 24 h und 48 h nach der Transfektion 3x mit PBS⁻ gewaschen und mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS⁻ (pH 7,2) für 30 min bei 37 °C fixiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS⁻ wurden die Zellen für 30 min bei RT mit einer 0,1 %igen Triton X-100-Lösung permeabilisiert und nach erneutem Waschen die RNA für 1 h mit 0,1 mg/ml RNase A in PBS⁻ verdaut. Die Zellen wurden schließlich in einer 1:1-Mischung (v/v) aus Glycerin

und Vectashield (Serva, Heidelberg), die eine Endkonzentration von 2 % (w/v) DABCO (Merck, Darmstadt) und 5 µg/ml Propidiumiodid enthielt, eingebettet.

2.9.5 Anfärbung des endoplasmatischen Retikulums

24 h und 48 h nach der Transfektion mit verschiedenen pEGFP-Konstrukten (Kap. 2.8.2) wurden die auf gelatinebeschichtete Deckgläschen ausgesäten Zellen 3x mit PBS⁻ gewaschen und, wie in Kap. 2.9.1 beschrieben, fixiert und freie Aldehydgruppen reduziert. Unspezifische Bindungen wurden durch 30minütiges Blocken bei RT mit 0,5 % BSA und 0,2 % Triton X-100 in PBS⁻ auf einem Schüttler abgesättigt. Der monoklonale Maus-anti-KDEL 78kDa (Grp/Bip) IgG-Primärantikörper (StressGen Biotechnology Corp., Victoria, British Columbia, CA, U.S.A.) wurde 1:600 in Blocklösung verdünnt, und die Deckgläschen mit 70 µl des Antikörpers überschichtet. Inkubiert wurde für 1,5 h bei RT in einer feuchten Kammer. Nach 3maligem Waschen der Zellen für je 5 min in der Blocklösung, wurden die Zellen mit 2 µg/ml eines monoklonalen Ziege-anti-Maus IgG (H + L) F(ab')₂ Fragment Konjugat-Alexa 568-Sekundärantikörpers (Molecular Probes, Göttingen) für 1 h in einer feuchten Kammer im Dunklen inkubiert und anschließend in einer 1:1 Mixtur (v/v) aus Glycerin und Vectashield (Serva, Heidelberg) sowie einer Endkonzentration von 2 % (w/v) DABCO (Merck, Darmstadt) auf einem Objektträger eingebettet.

2.9.6 Anfärbung der Zellmembran

Zur Kolokalisationsanalyse wurde die Plasmamembran von transient mit pEGFP-Konstrukten transfizierten Zellen (Kap. 2.8.2) nach einer 30minütigen Fixierung bei 37 °C mit 3,7 % Paraformaldehyd, 3x kurz mit PBS⁻ gewaschen und für 15 min mit einer 1:50 in PBS⁻ verdünnten ConA-Rhodamin-Lösung (Vector, Burlingame, CA, U.S.A.) angefärbt. Nach 3 weiteren kurzen Waschschritten wurden die Zellen - wie zuvor beschrieben - auf einen Objektträger aufgebracht.

2.9.7 Anfärbung der Lysosomen

Zellen, die auf 1 % gelatinebeschichtete Deckgläschen ausgebracht und transient mit diversen EGFP-Konstrukten transfiziert worden waren (Kap. 2.8.2), wurden nach 24 h und 48 h mit 100 nM LysoTrackerTMRed DND-99 (Molecular Probes, Göttingen) in frischem, vorgewärmten Medium mit 10 % FCS für 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 3maligem kurzen Waschen mit PBS⁻ wurden die Zellen mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS⁻ (pH 7,2) für 30 min bei 37 °C fixiert und - wie oben beschrieben - auf einem Objektträger eingebettet.

2.9.8 Anfärbung der Mitochondrien

Für Kolokalisationsexperimente mit EGFP-Fusionsproteinen (Kap. 2.8.2) wurden transient transfizierte Zellen auf gelatinebeschichteten Deckgläschen nach 24 h und 48 h mit 200 nM MitoTrackerTMRed CMX Ros (Molecular Probes, Göttingen) in frischem, vorgewärmten Medium mit 10 % FCS für 1 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend - wie zuvor beschrieben - fixiert und eingebettet.

2.9.9 Inhibierung der ATP-abhängigen Sequestrierung mit NaN₃

COS-7-Zellen wurden - wie zuvor in Kap. 2.8.1 beschrieben - auf gelatinebeschichtete Deckgläschen ausgesät und 24 h später transient mit dem C-terminal GFP-markierten HC110-R transfiziert. Um intrazelluläres ATP, das für eine Sequestrierung von GPCRs erforderlich ist, partiell zu inhibieren, wurden nach von Zastrow und Kobilka [1992; 1994] in verschiedenen Versuchsansätzen 0,04 % Natriumazid zum einen direkt in das RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS, und zum anderen in FCS-freies HBSS gegeben. Dabei erfolgte die Zugabe 1 h bzw. 18 h vor der Transfektion für 1 h, 18 h bzw. 42 h oder aber 6 h nach der Transfektion für 1 h, 18 h bzw. 42 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte. Kontrollansätze erhielten kein Natriumazid. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3x mit HBSS gespült und mit einer 3,7 % PFA-Lösung in PBS⁻ (pH 7,2) für 30 min bei 37 °C fixiert. Im konfokalen Lasermikroskop (Kap. 2.10.2) wurden 3x je 200 transfizierte COS-7-Zellen auf die Lokalisation von HC110-R-GFP in der Plasmamembran bzw. in den Vesikeln untersucht.

2.10 Mikroskopie

2.10.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die Expression transient transfizierter Säugerzellen mit GFP oder diversen rekombinanten GFP-Fusionskonstrukten (Kap. 2.8.2) läßt sich *in vivo* nach Anregung der Fluoreszenz des GFP-Proteins bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm in einem inversen Zeiss-Mikroskop IM 35 (Zeiss, Oberkochen) betrachten und fotografieren (Agfa HDC 100, Agfa-Gevaert, Leverkusen). Die Expression HC110-R-MycHis stabil transfizierter Zellen (Kap. 2.8.3) ließ sich mit Hilfe monoklonaler anti-Myc- oder anti-His-Primärantikörper und FITC- oder Alexa 488-gekoppelter Sekundärantikörper (Kap. 2.9.1) nach Fixierung der Zellen ebenfalls im Phasenkontrastmikroskop kontrollieren.

2.10.2 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde ein Zeiss IM 35 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einem Leica CLSM-Aufsatz TCS NT ('Confocal Laser Scanning Microscope Unit', Leica Lasertechnik, Heidelberg), Version 1.5.451, verwendet. Die Fluoreszenz des GFP-Proteins sowie des Farbstoffes Fluorescein-isothiocyanat (FITC) oder Alexa 488 wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm mit einem Argon-Laser, die für Rhodamin, Texas-Rot, Phycoerythrin, Alexa 568, LysoTrackerTMRed DND-99, MitoTrackerTMRed CMX Ros oder Propidiumiodid bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm mit einem Krypton-Laser angeregt. Z-Serien von optischen Schnitten durch die Zelle wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel gescannt [Celis, 1998]. Die Auswertung erfolgte mit der AVS Software (Advanced Visual Systems Inc., Waltham, MA, U.S.A.), Adobe Photoshop 5.0 und Corel Draw 8.0 für Windows.

2.11 Analytische Durchflußcytometrie (FACS)

Je 5×10^5 CHO-K1-, COS-7-, HEK-293- oder HepG2-Zellen wurden auf kleinen Zellkulturschalen (\varnothing 35 mm) ausgesät und 24 h später Dreifach-Ansätze mit 2 μ g der verschiedenen GFP-markierten Konstrukte transfiziert (Kap.2.8.2). Als Positivkontrolle wurden Dreifach-Ansätze mit je 2 μ g GFP-Plasmid-DNA transfiziert. Als Negativkontrollen dienten die folgenden Dreifach-Ansätze: Nicht transfizierte Zellen; Zellen ohne Plasmid, aber mit FuGENE; Zellen mit einem nicht getaggten HC110-R-Konstrukt, aber mit FuGENE; und Zellen, die mit dem GFP-Konstrukt, aber ohne FuGENE, transfiziert wurden. 24 h und 48 h nach der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen, die Zellen 2x mit PBS⁻ gespült, mit 2 ml eiskaltem PBS⁻ von dem Boden der Zellkulturschale gelöst und in ein FACS-Röhrchen (Falcon 2052, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, U.S.A.) überführt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm und 4 °C in der CPKR-Zentrifuge (Beckman) wurde der Überstand verworfen, das Pellet 2x mit 2 ml PBS⁻ gewaschen, erneut für 10 min, 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in 150 μ l PBS⁻ aufgenommen.

In einem anderen Versuchsansatz wurden nicht transfizierte, transient mit GFP, HC110-R-GFP, GFP-HC110-R, β_2 -R-GFP oder M1-R-GFP transfizierte sowie transient mit HC110-R-Myc/His und GFP kotransfizierte HEK-293-Zellen - wie oben beschrieben - gewaschen, in FACS-Röhrchen überführt und für 1 h mit 15 nM α -LTX (Sigma, Deisenhofen) bzw. 0,5 μ g/ml PF1022A-Biotin als Liganden bei RT inkubiert. Nach 2 weiteren Waschschrritten wurden die mit α -LTX behandelten Proben mit einem 1:5000 in PBS⁻ verdünnten polyklonalen Kaninchen-anti- α -LTX IgG-Primärantikörper (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, U.S.A.) für 45 min und einem 1:80 in PBS⁻ verdünnten polyklonalen Ziege-anti-Kaninchen IgG-TRITC-Sekundärantikörper (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, U.S.A.) für 30 min inkubiert.

Die mit dem PF1022A-Biotin behandelten Proben wurden mit 1:300 verdünntem Streptavidin-Phycoerythrin (Amersham, Braunschweig) für 45 min inkubiert. Überschüssiger Fluoreszenzfarbstoff wurde durch 3maliges Waschen mit PBS⁻ und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 1000 rpm in einer CPKR-Zentrifuge (Beckman) entfernt. Abschließend wurden die Zellen mit einer 1 %igen PFA-Lösung in PBS⁻ (pH 7,2) für 20 min bei 37 °C im Dunkeln fixiert.

Die Fluoreszenzanalyse der EGFP- und ggf. TRITC oder Phycoerythrin-markierten Proben erfolgte nach sorgfältigem Aufschütteln der Zellen mit dem Durchflußcytometer (FACScan, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, U.S.A.) mit einem Argon-Ionenlaser bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Ein überlappendes Absorptionsspektrum bei verschiedenen Emissionsspektren zweier Fluorochrome erlaubt die gleichzeitige Anregung beider Farbstoffe bei nur einer Wellenlänge. Pro Messung wurden 10000 Zellen hinsichtlich ihrer Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzfärbung analysiert. Zelltrümmer wurden bei der Auftragung der Granularität gegen die Zellgröße durch das Setzen eines 'Gate' auf die Haupt-Zellpopulation von der Messung der Fluoreszenzintensität ausgeschlossen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der FACScan-Software (Becton Dickinson) nach Shapiro [1988].

2.12 Calcium-Imaging

Je 2×10^5 COS-7- oder HEK-293-Zellen wurden auf 1 % gelatinebeschichtete Deckgläschen (\varnothing 42 mm) in mittleren Gewebekulturschalen (\varnothing 55 mm) mit 5 ml RPMI 1640- bzw. DMEM-Medium (mit 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 μ g/ml Streptomycin) ausgebracht. Die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wurde in nicht-transfizierten und transient mit den GFP-, GFP-HC110-R-, HC110-R-GFP-, β_2 -R-GFP-, bzw. M1-R-GFP-Konstrukten transfizierten COS-7- oder HEK-293-Zellen sowie mit HC110-R-Myc/His stabil transfizierten HEK-293-Zellen (Kap. 2.8.1) mit Hilfe der Calcium-Imaging-Methode gemessen. Außerdem wurden 2×10^5 nicht-transfizierte, bovine chromaffine Nebennierenmarkszellen auf collagenbeschichteten Deckgläschen (\varnothing 42 mm) in mittleren Gewebekulturschalen (\varnothing 55 mm) mit 5 ml DMEM-Medium und 10 % FCS ausgesät (Kap. 2.7.5).

Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion 2x mit einer Na^+ -HBS-Lösung (pH 7,3) gewaschen und mit 1 μ M Fura-2/Acetoxymethylester (Fura-2/AM) (Sigma, Deisenhofen) in Na^+ -HBS für 30 min bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit beladen. In Versuchsansätzen, in denen die Zellen mit BAY44-4400 bzw. dem optischen Antipoden PF1022-001 für 90 min vorinkubiert wurden, wurde nach 60 min 1 μ M Fura-2/AM für die restlichen 30 min zupipettiert. Nicht transfizierte bovine chromaffine Nebennierenmarkszellen wurden 48 h nach dem Ausbringen auf Objektträger für 45 min mit 1 μ M Fura-2/AM unter sonst gleichen Bedingungen beladen. Nach der Inkubation wurde nicht aufgenommenes Fura-2/AM durch 2maliges kurzes Waschen der Zellen mit Na^+ -HBS entfernt. Das Deckglas mit den Zellen wurde in die Apparatur eingebracht, mit 1,2-1,5 ml Na^+ -HBS überschichtet, in einem

Inversmikroskop (Axiovert, Zeiss, Oberkochen) betrachtet und parallel hierzu in einem digitalen 'Imaging'-Fluoreszenzmikroskop (PTI, Photon Technology International Inc., New Jersey, U.S.A.) mit der Image Master 1.333-Software für Windows aufgenommen. Bei einer Anregungswellenlänge von 440 bzw. 490 nm wurden transfizierte von nicht transfizierten Zellen unterschieden. Die Anregung der Extinktion für die Ca^{2+} -Imaging-Messungen erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm (Calcium-gebundenes Fura-2) und 380 nm (freies Fura-2), die Messung der Emission bei 510 nm. Die $[Ca^{2+}]_i$ errechnete sich durch Bildung des Quotienten aus 340/380 nm ('background corrected images') als eine Funktion des zugefügten Agens nach Grynkiewicz *et al.* [1985] mit der Formel:

$$\left[Ca^{2+} \right]_i = K_d \cdot \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \cdot \frac{S_{f380}}{S_{b380}}$$

Zur Kalibrierung von Einzelzellen nach McCormack und Cobbold [1991] wurden Fura-2 beladene HEK-293-Zellen in die Anlage gebracht, mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,6 ml Na^+ -HBS/min umspült und die Fluoreszenz separat bei den Wellenlängen 340:510 nm und 380:510 nm gemessen. $R_{\min} = 0,468$ erhielt man durch Umspülen der Zellen über mehrere Minuten mit einer Ca^{2+} -freien, EGTA/Ionomycin-haltigen R_{\min} -Lösung (pH 7,3), $R_{\max} = 5,325$ durch Umspülen der Zellen mit einer Ca^{2+} -gesättigten, Ionomycin-haltigen R_{\max} -Lösung (pH 7,3). Mit einer 10 mM $MnCl_2$ -Lösung wurden die Zellen bis auf ihre Autofluoreszenz gequenchet. Dieser Wert wurde von allen Kalibrierungswerten abgezogen. Nach Grynkiewicz *et al.* [1985] beträgt $K_d [Ca^{2+}] = 224$ nM. $S_{f380}/S_{b380} = 3,061$ wurde durch Bildung des Quotienten aus den Fluoreszenzen $F_{\min(380\text{ nm})}/F_{\max(380\text{ nm})}$ nach Subtraktion der Autofluoreszenz ermittelt und R ergab sich durch Bildung des Quotienten der Fluoreszenz von 340/380 nm für die einzelnen Meßwerte.

Die Zugabe von Agentien erfolgte stets 6 min nach Beginn der Messung durch Abnahme eines Volumens Na^+ -HBS-Puffer und Zugabe eines gleichen Volumens an Agens für weitere 24-44 min. Bei Zugabe zweier Substanzen wurde die erste zu Beginn der Messung und die zweite nach 6 min zugesetzt. Eine 300 nM Stammlösung α -Latrotoxin (Sigma, Deisenhofen) wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) angesetzt. Stammlösungen von BAY44-4400 und dem optischen Antipoden PF1022-001 (BAYER AG, Leverkusen), Nifedipin und EGTA (Sigma, Deisenhofen) wurden in reinem DMSO angesetzt und mit Na^+ -HBS-Puffer auf die gewünschte Endkonzentration mit maximal 0,1 % DMSO eingestellt. Arecolin-, Carbamylcholin-Chlorid- (Carbachol-), $CdCl_2$ - und Isoproterenol-Lösungen (Sigma, Deisenhofen) wurden direkt in Na^+ -HBS-Puffer gelöst. Die Meßwerte wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2000 importiert und ausgewertet. Die Ergebnisse resultieren aus wenigstens 2-4 reproduzierten Versuchen zu je 4-8 transfizierten und nicht-transfizierten Zellen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der HC110-R-cDNA

3.1.1 HC110-R-cDNA und deduzierte Aminosäuresequenz

Um mögliche Target-Proteine für das neue Breitspektrum-Anthelminthikum PF1022A zu identifizieren, wurde im Rahmen einer Diplomarbeit [Saeger, 1996; Harder *et al.*, 1998] eine EcoRI/EcoRI ungerichtete λ ZAPII Expressions-cDNA-Bank des adulten, parasitären Nematoden *H. contortus* konstruiert und einem Liganden-Immunscreening mit einem PF1022A-KLH-Konjugat als Liganden unterzogen. Die Detektion möglicher positiver Klone erfolgte mit Hilfe eines *E. coli*-präadsorbierten polyklonalen Kaninchen-Serums gegen das PF1022A-KLH-Konjugat. Die Überprüfung von etwa $1,5 \times 10^6$ nicht-amplifizierten rekombinanten Klonen resultierte in einem immunpositiven cDNA-Klon, pHC-1, bestehend aus 3063 bp. Dieser hybridisierte mit einer 3,6 kbp großen mRNA aus adulten *H. contortus*. Fehlende Sequenzen zu der korrespondierenden mRNA wurden mit Hilfe der RACE-PCR-Technik ermittelt. Durch 5'-RACE-PCR konnten 447 nt, durch 3'-RACE-PCR weitere 29 nt bestimmt werden. Die vervollständigte cDNA-Sequenz weist nunmehr eine Länge von 3539 bp auf und wird im folgenden als HC110-R bezeichnet (AC: AJ272270; Abb. 3). Das längste offene Leseraster beginnt nach 3 vorgeschalteten Stopkodons (Pos. 55, 67 und 76) mit dem ATG-Startkodon in Position 100 und weist um den Translationsstart eine Sequenz (CCAACATGA, Position 95-103) mit großer Identität zu der „Kozak“-Konsensus-Sequenz auf, die wichtig für die Anlagerung der ribosomalen 40 S Untereinheit und somit für die optimale Initiation der Translation bei eukaryontischen Ribosomen ist [Kozak, 1986; 1989]. Das Leseraster endet mit dem TGA-Stopkodon in Position 987. Damit kann dem aus 986 AS bestehenden deduzierten HC110-R-Protein eine Molekularmasse von 110 kDa zugeordnet werden. Im 3'-nicht-kodierenden Bereich befindet sich 13 bp vom poly(A)⁺-Schwanz entfernt das Polyadenylierungssignal (AATAAA) der HC110-R-cDNA in Position 3505-3510. Bei eukaryontischen mRNAs liegt dieses Signal in der Regel 10-30 Nukleotide strangaufwärts vom eigentlichen poly(A)⁺-Schwanz entfernt [Baralle, 1983; Birnstiel *et al.*, 1985]. Der 3'-UTR von HC110-R weist eine Länge von 467 bp auf. Eine genaue Charakterisierung der Aminosäuresequenz bzw. der Protein-Motive und Datenbankvergleiche sind in Kap. 3.2.1 zu finden.

TTCTGGCCGTCATCCCGGTTGATGCTGTGCGCTTTTCAGAACGTCCTTCTATTACTAATTCGAAAATTGACGTGAATGACGAGTTCGGTIT	90
AATACCAACATGAGGAATGTATATATCTTCTGCTATCCGTCGTTGGGACGTTTACCGTCGCAGAGAATTGCCAGCTCAATCAAACAGT	180
M R N V Y I L L L S V V G T F T V A E E L P A Q S N S	27
TCCATITGTAGTATGCGAAGGTGGTACAGCCGAATTGGAAATGTCOCATGGIATGGICATTTCAATAGCTCTGGCAAATITATGGCCGATAT	270
S I V V C E G G T A E L E C P H G M V I S I A L A N Y G R Y	57
TGGCTCGGGTTTGCTACGAGAACGAGGAAGTGGACGATGGTACCGATGACTCAATGCCATAACCTTAAACAGATGCCGACCCCTTAGG	360
S A R V C Y E N E E L D D V V P M T Q C H N P K T M P T L R	87
AAAAGTTGTGATGGACGTCGTTGAATGTCATTTTGTGGTTGGTAAACGACTTCTTCGTACATGATCCATGCCAGGAGTGAAGAAATACCTT	450
K S C D G R R E C H F V V G N D F F V H D P C P G V K K Y L	117
GAAATCACAATATCTGTGTGTGCTGATGTGACTACCACAACAACCTACGACGACGACCCACCACTACCCTACATCCACCACAACA	540
E V T Y L C V A D V T T T T T T T T T T T T T T T T S T T T	147
GAGGTGGAGGATGATGTTAAAGAAGATATGAGCGGAAATCTGCACCATCGAGTGTGCAGCGACTTCGAGAAGAGGAATCGAATGGCCT	630
E V E D D V K E D M S A K S A P S T C A A T S R R G I E W P	177
GCGACCATTTCTGGGACGACGGTGAACCGGCCATGTCCCGAAGCGACAGAGGCAAGTCTCTCATGGAAATGTTCCGCCGAGGGCTGTGG	720
A T I S G T T V N R P C P E G T R G T S S W K C S A E G L W	207
TCTGAACCTGGTCCAAATACAATAGATGTGTCGAGTGAATGGACCATTCAGCGGCAGGATGCTCTTGAAGAGACGATAAAAGATCAGGAT	810
S E P G P N T I E C R S D W T I Q R Q D A L E E T I K D Q D	237
GCAAGCGGAATTCGGAGCTTCTTCGAGCGATGACGTCGATACCCGAGACCTATGGTAGCTGGTGAATTTGCCAAAATCTTCAAACAT	900
A S G I P E L L R A M T S D T R R P M V A G D L P K L L N I	267
CTTGACATCGTTCAAGATGTTGTGGCAGAGAAGTGTGGGCAAAAAGTAGCCAGAAGTGGTGAACCGCTTATTTGTGAATGTGCTACAT	990
L D I V Q D V V G R E V W A K S S Q K L V N Q L I V N V V H	297
AATGCCCTTCGAGCGAAGGAATGTGGCAGAACTGGCCGTCAGTGAAGCGTCAAACCTTTCGCCACAAGACTTTTGAATGGTGTGAACGA	1080
N A L R A K E M W Q N W P S V K R Q T F A T R L L N G V E R	327
GCCATGACCTCTCTCAACAACCTGCTATTTGCTGAGAACTATGTGCAACCGTTGGTGAATGACAGAGATGAGCGAAGCAATTCGGACT	1170
A M T S S S T T V Y S S E N Y V Q P L V M T E M S E S I R T	357
TCTTCGCAACCATCGAACTACTTCTTATTCCTTCAATGGCCTTGTGGGCTGGTGAATAACGGTGGATAGCGTTGACGTTCCAAGGGAA	1260
S S Q P S N Y F L F P S M A L W A G E N N V D S V D V P R E	387
GCTCTCGAAATGACAGGATTTGGACCGTCCCGAGTCTACTATGCGTCTTTTGGAAACATTTGGTGAAGAAATGGAACCTCCGGTGGAGATA	1350
A L E M T G L D R A R V Y Y A S F A N I G E E M E P P V E I	417
TCAGCAGGATCTGAACAGAGCCGACTGGACTAGAAAAGCGTCCCGAATTTGTTTCAAGTGTGGTGGCCGTTGCTGTTTCTCGATGCC	1440
S A G S E Q K P T G L E R R R R I V S R V V A V S L V L D G	447
AAAGTCATAAGGCTACCAATACTTCTTAAGCCGATCATCATCATTCATCATACCTTACCGTGGCTTTTACGGCCGATGCTCCACCTGAA	1530
K V I R L P I L P K P I I I T F H H Y P E A L R R M S S P E	477
TGTTCTTGGTGGGATACTGAAGACATGAAGTGGTCTAAGTGGATGCTCCCTACAATCGCATAATTTCTACTCATAACCGTATGCGCTTGT	1620
C S W W D T E D M K W S T S G C S L Q S H N S T H T V C A C	507
AGTCATATGACTCACTTTTCCGTTTGTGATGGAATTTGTGGTATGATGTTTCTCCGAGGATAATCAGCTTCTTACATTTCTCACATAT	1710
S H M T H F A V L M D Y V G H E I S S E D N Q L L T F L T Y	537
ACCGGTTGACGCTGTCAATAGTCTGCTTACTCTGACATTTCTTCTGTTTGTGTTTCTCATCAAGGAGGAGGCGATAGGGTITTTCAIT	1800
T G C T L S I V C L T L T F F C F V V F I K G G G D R V F I	567
CATAAAAATCTCTGCGCTTCTCTTGGTATAGCCGAACCTGGTGTCTCTGCTGGAATTTGGAGGACAGAAAAGTTTGAATGCGGTATG	1890
H K N L C A S L G I A E L V F L A G I W R T E E K F E C G M	597
ATCGCTGGTTGCTCTTATTTCTTCTATCGGCTTTAACCTGGATGTTACTCGAGGGCTACCAGCTTTACCAGATGCTTGTGTGAGGTG	1980
I A G C L L Y F F L S A L T W M L L E G Y Q L Y Q M L V E V	627
TTCCCTGCTCGGACGTCGATTCACCTTTTTTCTTGTGGCTATGGCTGCCAGCTATCATTTACGGAGCCGCTTATTTACGACCCG	2070
F P A S R R R F T F F L V G Y G L P A I I T G A A A Y Y D P	657
ACTGGTTTTGGAACACGCAATCATTTGCTGGTTACGACCCGACAACCTTTTTTCAATTTTATTTCTTTTGTGCGCACCCAGCTGTGATTTTACTG	2160
T G F G T R N H C W L R T D N L F I L F F V A P A A V I L L	687
ACGAATACGATGTTCTGTTTATGACTATGTGCAATGTATACAGACATTCGAAGTATATCCCTGTAGGCAATGCTGCGGATAATGAGGT	2250
T N T M F L F M T M C I V Y R H S K Y I P C R H A A D N G G	717
GACATAAGGACTTTGGTCAAAGGACGATGGGTCTGGTCTGCTTACTTTGGTGTACATGGACTTTGGCCCTTCTCTGGATCGATGATGCC	2340
D I R T W V K G A M G L V C L L G V T W T C G L L W I D D G	747
CATTCGATAGTGAATGCGATACCGGTTTACCAATGGGAATTCCTTTCAGGGTCTTTTCACTTTTGTCTTCCATGTCCTGCTCAGAGAAG	2430
H S I V M A Y A F T I A N S L Q G L F I F V F H V L C S E K	777
ATCGGTTACGATTTGCCGATGGTGTGGCAAGCATGGCTTTTCAATGATCAGCTCTGGCTCCCGTGTACCTCTAGGGATCTACAAAAA	2520
M R Y D I A R W C G K H G L S C I S S G S R D T S R D L Q K	807

CGTGGAACTATGTACCCGTCGGAGAGGAGTGGCAGCGAATTCATCTATCCACATCGGAGAGATGCACACATCTCCTCGTGGATTGGAA	2610
R G T M S P S E R S G S E F I Y P T S E K M H T S P R G L E	837
TCCCTCTCAGCTCGGCTATCCTCAACAACCACTCATCCCACTATCAGCGTCGTCACCGCAACAGCCCTAATGGAACTTATGACTAC	2700
S S L S S A Y P Q Q P L I H H Y Q R R P P Q Q P N G T Y D Y	867
GCAACAATGGGTATGGCGAGATGGTACCAGGCCATATGTTACCAGGCATGGCCCTCCTCGTTTCTCATCCAGGTTGGTCCATCCATTAT	2790
A T I A Y G E M V P G H M L P R M A S S S F P H P G V A I H Y	897
CCCTCAITCGATCTGGATTCTCTACCAACCCAGATCTTCATCATCGCCCTCCACAGACTTTTCTCCACCACCGCCACCTCCTGCC	2880
P S F D L D S S Y Q P Q I F H H R P P P D F S P P P P P P A	927
CAGGGTACACACCTTCAAAGTAATCCGTCGCCCATCATCCAAGATGAGTGACGACTCGGCTATTCCGATGGTGGATCGTCTCGCGTA	2970
Q G T T P S K V I R P P S S K M S D D S A Y S D G G S S S V	957
CTCACCGGAAAGTCACACCGTCTGGAGCGACTGTGCTTGAATGGATTTGGGCAGAAATCAACCGCTAACTATTGGCGAAATGTTTGA	3060
L T T E V T P S G A T V L R M D L G R N Q P P N Y W R N V -	986
GCATGTGCCCTGTAAATGTTTCTCGAGAGATTTTGGCCAGGTTGTGGCCTCAGTCAAGGTTTATGACGATCCGGTGTCTTTTGC	3150
AATCATTTTGTATGTGTGATTGTCTTCTTCTGGTATCCAAGGGCTTTCATCGTCTTCCGACATTCGTCACTTTTCTACACTCTAAT	3240
GCTCCACTGTGTAAATATCAGCATATCATCGTCACAATTATGCGCCATTTTCTCAGATTAACGGTTTCCCTTGTACATTGTGGAT	3330
TGTAGTTGTAGCTAAACTGTAGCTATTTCAGAGGATTTTGTATCTAGTGTGATAATAGCGCAATATGTTTACTAATTACTAAGTACTAA	3420
TTGTTTTTTAAGTCCGATTCCTGCCCTTCTATGGAAAAATTTGTGTTTCCATCCGATCATACTTTTAGGTTGAGATCAATAAA	3510
AACGTAAAATTGT(A) _n	3524

Abb. 3. cDNA-Sequenz und deduzierte Aminosäuresequenz von HC110-R.

Die HC110-R-Nukleotidsequenz (AC: AJ272270) ist entsprechend der 5'→3'-Orientierung der mRNA dargestellt. Das „Kozak“-Motiv (Pos. 95-103) [Kozak, 1986; 1989] und das Polyadenylierungssignal (Pos. 3505-3510) sind unterstrichen dargestellt. Das ATG-Startkodon liegt in Pos. 100 (fett), das TGA-Stopkodon in Pos. 3058. Die deduzierte Aminosäuresequenz zeigt das offene Leseraster im Einbuchstaben-Code. Strukturelle Protein-Motive sind wie folgt gekennzeichnet: N-terminales Signalpeptid (Pos. 1-21, schwarz und fett) mit Spaltstelle zwischen Pos. 18 und 19; Lectin-homologe Sequenz (Pos. 22-125, pink und gepunktet); Thr-reiche Region (Pos. 128-147, grau hinterlegt); Cys-reiche Signatur der Struktur CX₉WX₁₂CX₉WXCX₃WX₉CX₃W (Pos. 166-221, rot und unterschlingelt, 4 Cys-Reste blau, fett und gelb hinterlegt, 4 Trp-Reste fett); 4-Cys-Region der Struktur CXWWX₆WX₄CX₁₁CXC (Pos. 478-524, rot und unterstrichen, 4 Cys-Reste blau, fett und gelb hinterlegt, 3 Trp-Reste fett); 7 Transmembran-Domänen (zwischen Pos. 536-772, grün, fett und unterstrichen); Pro-reiche Region (Pos. 845-861, blau und grau hinterlegt); PEST-Region (Pos. 915-933, blau und grau hinterlegt); 3 N-Glykosylierungsstellen (Pos. 26, 499 und 862, fett); und das unter Sekretin-GPCRs eine hoch konservierte putative Disulfid-Bindung ausbildende Cys-Cys-Paar (Pos. 595 und 666, blau, fett, gelb hinterlegt und doppelt unterstrichen).

Da zunächst nur die pHc1-cDNA mit 3063 bp vorlag, die zwar große Teile des 3'-nicht kodierenden Bereiches bis auf den poly(A)⁺-Schwanz und zum 5'-Ende ein zwar durchgängiges, aber offenes Leseraster enthielt, mußte für die Charakterisierung des HC110-R-Proteins eine funktionale cDNA konstruiert werden. Mit Hilfe des 3'-RACE-Systems, das den natürlichen poly(A)⁺-Schwanz der mRNA als Primerseite für die PCR-Amplifikation nutzt, um Regionen mit unbekanntem Sequenzen, die zwischen dem 3'-UTR und dem poly(A)⁺-Schwanz liegen, zu charakterisieren, wurde eine 256 bp lange cDNA-Sequenz amplifiziert, die das bisherige 3'-Ende mit Polyadenylierungssignal und 29 neue Nukleotide inklusive poly(A)⁺-Schwanz (Abb. 3, Pos. 3513-3523) enthält. Das 5'-RACE-System wurde eingesetzt, um fehlende Sequenzen strangaufwärts des bisherigen 5'-Endes zu lokalisieren. Hiermit konnte ein 641 bp großes PCR-Fragment mit 447 neuen Nukleotiden strangaufwärts des ursprünglichen 5'-Endes (Pos. 1-447), mit neuem ATG und optimaler Kozak-Sequenz [Kozak, 1986; 1989] sowie 3 'upstream' und im gleichen offenen Leseraster gelegene Stop-Codons (Pos. 55, 67 und 76) amplifiziert werden.

Das in die Sall-Schnittstelle des pBlueskript-Vektors klonierte 3063 bp große pHc-1-cDNA-Fragment wurde zunächst mit Sall geschnitten und über Gelelektion vom Vektor befreit. Danach wurde das pHc-1 Insert mit XcmI (Pos. 93) restringiert und das nunmehr 2970 bp große Fragment über Agaraseverdau aufgereinigt. Das amplifizierte 641 bp große 5'-RACE-PCR-Fragment wurde mit Hilfe seiner durch die Taq DNA-Polymerase angefügten überstehenden Adenosinreste in den pMosBlueT-Vektor kloniert. Durch Restriktion mit den Enzymen BamHI und SfiI wurde eine durch den 5'-RACE-Anker-Primer eingebrachte interne Sall-Schnittstelle (Pos. 21-26) wieder entfernt. Erst jetzt konnte das um 55 bp verkürzte linearisierte Vektor-Insert-Fragment auch Sall/XcmI verdaut werden. Über die gemeinsame sequenzinterne XcmI- und die Sall-Schnittstelle des pMOSBlueT-Vektors erfolgte die Ligation mit dem 2970 bp großen pHc-1 Fragment. Durch eine Restriktionsanalyse und Sequenzierung wurde überprüft, ob der auf diese Weise zusammengesetzte cDNA-Klon, der im folgenden HC110-R genannt wird, die richtige Orientierung und ein durchgehendes Leseraster besitzt. Im Gegensatz zu der in Abb. 3 dargestellten cDNA-Sequenz fehlen die ersten 46 bp des 5'-UTR und die letzten 11 bp mit dem poly(A)⁺-Schwanz des 3'-UTR. Für *in vitro* Transkriptions- und Translationsexperimente wurde das HC110-R-Insert durch Restriktion mit den Enzymen SacI und PstI wieder aus dem pMOSBlueT-Vektor herausgeschnitten und in den SacI/PstI verdauten pBluescript SK-Vektor ligiert. Dieses HC110-R-Konstrukt wurde als Templat für alle nachfolgenden Experimente verwendet.

3.1.2 Vergleich von HC110-R mit ähnlichen cDNA-Sequenzen

Der Vergleich der HC110-R-cDNA-Sequenz mit 671680 veröffentlichten Nukleotidsequenzen in den EMBL-Datenbanken (Heidelberg, Stand: Dezember 1999) hat ergeben, daß die höchste Sequenzidentität zu einem Sequenzabschnitt des *C. elegans* Cosmidklons B0457 (AC: Z54306) besteht. Der Cosmidklon B0457 liegt auf Chromosom III und enthält insgesamt 8 Exons, die ein Protein aus 1014 AS (Abb. 4) mit Homologien zu diversen GPCR-Vertretern kodieren [Wilson *et al.*, 1994]. Auf Nukleinsäure-Ebene besitzt HC110-R 3 große Bereiche mit hoher Sequenzidentität zu B0457: 57 % über 1259 bp in dem für den N-Terminus bis zu den 7 Transmembran-Domänen kodierenden Bereich (Pos. 100-1359); 62 % über 776 bp in dem für die 7 Transmembran-Domänen kodierenden Abschnitt (Pos. 1705-2481) und weitere 61 % über einen 370 bp großen Bereich, der für den C-Terminus nach der 7. Transmembran-Domäne kodiert (Pos. 2682-3052).

Neben dem B0457-Cosmidklon existieren noch weitere cDNAs mit einer großen Sequenzidentität zu HC110-R: Diverse Latrophilin-1 Spleißvarianten aus *Bos taurus* (AC: AF111097; AF111098) [Leliana *et al.*, 1997; Matsushita *et al.*, 1999], deren cDNAs je nach Spleißvariante etwa 5100 bp lang sind, weisen eine 59 %ige Sequenzidentität über 415 bp in einem Bereich auf, der für die 3. intrazelluläre Schleife und die Transmembran-Domänen VI und VII kodiert (Pos. 2252-2667). Eine 5693 bp große cDNA, die für Latrophilin-1 aus *Rattus norvegicus* kodiert (AC: U78105)

[Davletov *et al.*, 1996; Lelianova *et al.*, 1997], weist eine 54 %ige Identität über 892 bp auf, die für die gesamten 7 Transmembran-Domänen kodieren (Pos. 1654-2546). Latrophilin-2 Spleißvarianten aus *Bos taurus* (z. B. AC: AF111069-AF111084) [Matsushita *et al.*, 1999], deren cDNAs zwischen 4900-5400 bp groß sind, weisen eine 63 %ige Identität über 252 bp auf, die ebenfalls für die 3. intrazelluläre Schleife und die Transmembran-Domänen VI und VII kodieren (Pos. 2203-2455). Eine 58 %ige Identität über 929 bp, die den kompletten für die 7 Transmembran-Domänen kodierenden Abschnitt umfaßt (Pos. 1605-2534) sowie eine 66 %ige Identität über 96 bp, die für einen Lectin-ähnlichen Bereich kodiert (Pos. 383-479), besteht zu zahlreichen zwischen 4900-5300 bp großen Latrophilin-3 Spleißvarianten aus *Bos taurus* (AC: AF111085-AF111093) [Matsushita *et al.*, 1999]. Auch Latrophilin-3 Vertreter aus *Rattus norvegicus* (z. B. AC: AF063103; U72487) mit einer ca. 5400 bp großen cDNA [Ichtchenko *et al.*, 1999] weisen eine 59 %ige Identität über den für die 2. extrazelluläre Schleife und die Transmembran-Domänen IV-VII kodierenden Abschnitt aus 730 bp (Pos. 2011-2741) sowie eine 64 %ige Identität über 96 bp für einen ebenfalls Lectin-ähnlichen Bereich auf (Pos. 383-479).

3.2 Charakterisierung des HC110-R-Proteins

3.2.1 Motive in HC110-R

Das HC110-R-Protein weist mit seinen 986 AS ein Molekulargewicht von 110 kDa auf (Abb. 3) und zeigt folgende besonderen Merkmale: Der N-Terminus beginnt mit einem hydrophoben Signalpeptid aus 21 AS und einer Spaltstelle in Position 18. Darauf folgt ein Cystein-reicher Bereich (AS 22-125) mit starker Ähnlichkeit zu einem D-Galactose-bindenden Lectin aus dem Seeigel (AC: P22031) [Ozeki *et al.*, 1991] und ein sogenannter 'Thr-Stretch' (AS 128-147), der nur durch ein Serin in Position 144 unterbrochen wird. Nach Kyte und Doolittle [1982], wie auch nach Klein *et al.* [1985] wurden mit dem PC/Gene-Programm 'SOAP' neben dem hydrophoben Signalpeptid noch insgesamt 7 hydrophobe Transmembran-Domänen zwischen den Resten 536 und 772 charakterisiert (Abb. 7A). Charakteristisch für 7 Transmembran-Rezeptoren ist das Vorkommen von 7 Sequenzabschnitten bestehend aus je 20-25 hydrophoben Aminosäuren, von denen angenommen wird, daß sie die Transmembran-Domänen in Form von α -Helices durchspannen [Horn *et al.*, 1998]. Die Transmembran-Elemente sind jeweils durch 3 unterschiedlich große hydrophile Schleifen auf der extra- und intrazellulären Seite verbunden. HC110-R besitzt 3 extrazelluläre Schleifen zwischen den Transmembran-Domänen II und III (Pos. 587-597), IV und V (Pos. 654-673) sowie VI und VII (Pos. 743-749), und 3 intrazelluläre Schleifen zwischen den Transmembran-Domänen I und II (Pos. 559-569), III und IV (Pos. 627-636) und V und VI (Pos. 696-724). Bedingt durch die 7-Transmembran-Struktur ergibt sich daraus ein extrazellulärer N-Terminus aus 535 AS (59 kDa) und ein intrazellulärer C-Terminus aus 214 AS (24 kDa), der einen prolinreichen Teil (AS 845-861) und eine PEST-Region

(AS 915-933) einschließt. Schließlich gibt es noch 3 putative N-Glykosylierungsstellen an den Resten 26, 499 und 862 sowie 14 mögliche Phosphorylierungsstellen in den abgeleiteten, intrazellulären Schleifen und dem C-Terminus: 2 cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase Phosphorylierungsstellen (R/KX₂S/T) in Pos. 633 und 807; 7 Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen (S/TXR/K) in Pos. 631, 775, 801, 814, 826, 832 und 940; 3 Caseinkinase II Phosphorylierungsstellen (S/TX₂D/E) in Pos. 801, 812 und 817; und 2 Tyrosinkinase Phosphorylierungsstellen (R/KX₂₋₃D/EX₂₋₃Y) in Pos. 816 und 942. Phosphorylierungsstellen spielen unter physiologischen Bedingungen eine Rolle bei der Desensitivierung von Rezeptoren mit ihren endogenen Liganden [Krauss, 1997].

Vergleicht man den prozentualen Anteil der einzelnen Aminosäuren von HC110-R mit 1021 zufällig ausgesuchten Proteinen mit bekannter Aminosäuresequenz und Zugehörigkeit zu 1021 verschiedenen Proteinfamilien [McCaldon und Argos, 1988], so fällt der hohe Anteil der Aminosäuren Serin mit 9,1 % gegenüber 6,9 %, Threonin mit 8,6 % gegenüber 5,8 %, und Cystein mit 3,0 % gegenüber 1,7 % der durchschnittlichen Häufigkeit auf. Die Erhöhung geht u. a. mit 3 Cys-reichen-Regionen (Pos. 22-125; 166-221 und 478-524), dem 'Thr-Stretch' und den vielen putativen Phosphorylierungsstellen einher. Trotz zweier Pro-reicher Regionen im C-terminalen Ende ist der Pro-Anteil mit 6,3 % gegenüber 5,1 % nur unwesentlich erhöht; der Lys-Anteil ist mit nur 2,8 % gegenüber 5,7 %, und der Gln-Anteil mit 2,8 % gegenüber 4,0 % sogar deutlich reduziert.

3.2.2 HC110-R - ein Mitglied der Sekretin-GPCR-Familie

Datenbankvergleiche mit HC110-R ergaben eine 48 %ige Identität und 76 %ige Ähnlichkeit (Ähnlichkeit bedeutet hier, daß eine Aminosäure ähnliche chemische Eigenschaften besitzt) des HC110-R-Proteins mit einem unbekanntem heptahelikalem Transmembranprotein (1014 AS), welches aus dem genomischen Klon B0457 (AC: Z54306) des Nematoden *C. elegans* abgeleitet wurde [Wilson *et al.*, 1994], und der - wie bereits in Kap. 3.1.2 beschrieben - auch auf Nukleinsäure-Ebene die höchste Sequenzidentität zur HC110-R-cDNA aufweist. Der Vergleich beider Sequenzen zeigt, daß beide Proteine über gemeinsame in Kap. 3.2.1 beschriebene Motive verfügen, so z. B. das N-terminale Signalpeptid, die Lectin-ähnliche Sequenz, den ausgedehnten 'Thr-Stretch', die 7 Transmembran-Domänen, die Pro-reiche Region und die PEST-Sequenz (Abb. 4). Die höchste Identität zwischen HC110-R und B0457 liegt bei 62 % (147/237 AS) im Bereich der 7 Transmembran-Domänen, und weist dort sogar eine 90 %ige Ähnlichkeit (214/237 AS) auf. Der N-Terminus von HC110-R ist immerhin noch zu 44 % (235/535 AS) identisch und zu 76 % (404/535 AS) ähnlich, der C-Terminus ist zu 50 % (107/214 AS) identisch und zu 74 % (158/214 AS) ähnlich mit dem B0457-Protein.

	SP	Lectin	
HC110-R	MR-N--VY-----IL--LLSVGTFVAEEL	PAQS--NSSIVVCEGGTAELECPHGMVISIALANYGRYS	58
CE-B0457	MRRNKITYSLIQITILVACLIVVPTFASNKPTTDESGTISHITICDGEAAELSCPAGKVLISIVLGNVGRFS		70
HC110-R		ARVCYENEELDDVVP--MTQCHNPKIMPILRKSCDGRRECHFVVGNDFFVHDPCPGVKKYLEVITYLCVADV	127
CE-B0457	VAVCLPD---NDIVPSNINCONHKTKSILEKKKNGDSMCYFIVDKKTFTEDEPCNTPKYLEVYKNCVPA		137
HC110-R	T-reich	C-Signatur	
HC110-R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTEVEDDVKED--MSAKSAPST-----CAATSRRGLEWPAATISGTTVNR		189
CE-B0457	TTTTTTTTTTSTTTTDSLSLIVDEEEEAQKDALNSDVIKPVKKKEDVFCSATNRRRGVNWQNKSGITSSAPC		207
HC110-R	PEGTRGTSSWKCSAEGLWSEPGENTIECRSDWTIQRODALEETIKDQDASGPELLRAMTSDIRRPVAG		259
CE-B0457	PEGSSGKQLWACTEEGQWLTEFPNSAGCESNWSRNSVLSGVISSDVSGLPEFLRNLSGSETRRPVVG		277
HC110-R	DLPKLLNILDIVQDVGREVWAKSSQKLVNQLIVNVVHNALRAKEMWQNWPSVKRQTFATRLLNGVERAM		329
CE-B0457	DLPKVLHLLLEKTVNVIAEESWAYQHLPLSNKGAVEVMNMYMLRNQEIWGSWDVVKRKEFASRFLAAEKAM		347
HC110-R	TSSST-TVYSSE--NY-VQPLVMTEMSESRITSSQPSNYFLFPSMALWAGENNVDSVDVPREALEMIGLDR		396
CE-B0457	VASAKGMMTSAESNVIVQPAITVEISHKIKMSSQPTDYILFPSAALWNGQN--VDNVIIPRDAILKINKDE		416
HC110-R	ARVYASAFANIGEEMEP--PVEIS--AGSEQKPTGLERRRIRVSRVAVSLVLDGKVIKRLPILPKPIITFH		464
CE-B0457	TQVFFSFDNLGAQMTPSDVI VALAGTDQTEV---RKRVRVSRIVGASLLENGKERRVENLITQPVRIIFY		483
HC110-R		4 C-Region	
HC110-R	HYPEALRRMSSPEC SW NDTE M W ST SG CS LQ SH NS TH IV CAC SH MI HF AV LM DY V G HE IS SE DN QL LT F		534
CE-B0457	HKESSVRHLSNPTCVVWVNHHELKWKPSGCKLSYHNKIMTSCDCIHLTHFAVLMVVRGHDLINEIDQTLITL		553
HC110-R	LTYTGCTLSIVCLHLTFFCFVVFITKGGDRVFIHKNLCASLIGIAELVFLAGIWRTEEKFE CG MTAGCLLY		604
CE-B0457	LTYVGCITISTICLLTFFAYLIFSRNGDRVFIHKNLCISLATAEITFLAGITRTEDSLQCGITAVALMY		623
HC110-R	FFLSALTWMLLEGYQLYQMLVEVFPASRRRFTFFLVGVGLPAITIGAAAAYDPTGFGIRNHCWLRDNL		674
CE-B0457	MFLSALTWMLLEGYHHRMLTEVFPSPDRRFTYLLVGYTPPATITLVAYLYNSDGFPTDHCWLSQNNF		693
HC110-R	ILFFVAPAAVILLINIMFLMIMCIVYRHSK--YIPCRHAADNGDIRI W V K GM GL V CL L G V W IC GL L		742
CE-B0457	IWFAGPACFLFCANSLVLRILCTIVYQHTSGGYLPCRHDVDSGRSIRNWKGSIALASLLGVWIFGLF		763
HC110-R	WIDDGHSIVMAYAFTIANSLOGLFIFVHVLCSKEMRYDIARWCQKHLSCISSGSRDTSRDLOKRGIMS		812
CE-B0457	WVEDSRIVMAYVFTIINSLOGLFIFLHVVFVFAEKMRKDVGHMWRGCGSSNSSPNHKRHNVRDILMS		833
HC110-R		P-reich	
HC110-R	P--SERSGSEFTYPTSEKMT-----SPR----GLESS--LSSAY PO PL TH HY OR RR PP Q PN GT Y DIATI		870
CE-B0457	PGVNSSTGSDFLYNINDKYLINSDTINRLVYNGIMNHPNQMSVYQHP--HH-QIYE-QOP-GTYDIATI		898
HC110-R		PEST	
HC110-R	AYGEMVPGHMLPRMASSFPHPGVA--IHYPFDLSSYQP-QIFHHR PP PD F SP PP PP PA QGT-----T		931
CE-B0457	AYGEMVPGHMLPRMASSFPHPGVA--IHYPFDLSSYQP-QIFHHR PP PD F SP PP PP PA QGT-----T		962
HC110-R	PSKVIRPPSSKMSDDSAISYDGGSSSVLTTEVTPSGATVLRMDLGRNQPPNYWRNV		986
CE-B0457	GSSGRPPSSKMSDDSAISYDGGSSSVLTTEVTPSGATVLRMDLGRNQPPNYWRNV		1014

Abb. 4. Aminosäurevergleich der deduzierten Aminosäuresequenzen von *H. contortus* HC110-R und dem *C. elegans* Cosmidklon B0457 (AC: Z54306).

Strukturelle Protein-Motive sind wie folgt gekennzeichnet: N-terminales Signalpeptid (SP, Pos. 1-21, schwarz und fett); Lectin-homologe Sequenz (Lectin, Pos. 22-125, pink und gepunktet); Thr-reiche Region (T-reich, Pos. 128-147, grau hinterlegt); Cys-reiche Signatur der Struktur CX₉WX₁₂CX₉WXCX₅WX₉CX₃W (C-Signatur, Pos. 166-221, rot und unterschlängelt, 4 Cys-Reste blau, fett und gelb hinterlegt, 4 Trp-Reste fett); 4-Cys-Region der Struktur CX~~W~~WX₆WX₄CX₁₁CXC (4 C-Region, Pos. 478-524, rot und unterstrichen, 4 Cys-Reste blau, fett und gelb hinterlegt, 3 Trp-Reste fett); 7 Transmembran-Domänen (zwischen Pos. 536-772, grün, fett und unterstrichen); Pro-reiche Region (P-reich, Pos. 845-861, blau und grau hinterlegt); PEST-Region (PEST, Pos. 915-933, blau und grau hinterlegt); 3 N-Glykosylierungsstellen (Pos. 26, 499 und 862, fett); und das unter Sekretin-GPCRs eine hoch konservierte putative Disulfid-Bindung ausbildende Cys-Cys-Paar (Pos. 595 und 666, blau, fett, gelb hinterlegt und doppelt unterstrichen). Identische AS sind mit einem Sternchen, stark verwandte AS mit einem Doppelpunkt und verwandte AS mit einem einzelnen Punkt gekennzeichnet.

Eine weitere auffällige Identität und Ähnlichkeit auf AS-Ebene besteht zu Latrophilin, einem Mitglied der Sekretin-Unterfamilie aus Säugern, wie dem Menschen (AC: E1360690), dem Rind (z. B. AC: G416021, G416053 und G4185804), und der Ratte (AC: U78105 oder U72487). So weist der Latrophilin-Rezeptor mit seinen ca. 210 kDa eine 31 %ige Identität (231/740 AS) und eine 48 % Ähnlichkeit (352/740 AS) zu dem mit 110 kDa halb so großen HC110-R auf. Vor allem die hydrophoben 7 Transmembran-Regionen zeigen eine Sequenzidentität von etwa 48 % (114/233 AS) und eine Ähnlichkeit von 66 % (156/233 AS). Der N-Terminus ist noch zu ca. 24 % (97/400) identisch und zu 42 % (175/407 AS) ähnlich, wohingegen der C-Terminus nur vereinzelte identische AS aufweist (Abb. 5).

HC110-R und der 1466 AS große Latrophilin-1 GPCR aus der Ratte verfügen - wie auch B0457 - über zahlreiche gemeinsame Merkmale (Abb. 5 und Abb. 7B, C): Der extrazelluläre N-Terminus, der bei HC110-R 535 AS und bei Latrophilin-1 849 AS umfaßt, beginnt ebenfalls mit einem hydrophoben Signalpeptid, gefolgt von einer Cys-reichen Lectin-ähnlichen Domäne (Abb. 6), einer für große Sekretin-Rezeptoren spezifischen Cys-reichen Signatur der Struktur $CX_{9-10}WX_{9-12}CX_{9-17}WXCX_{4-6}WX_{8-16}CX_{3-4}W$, wie sie auch bei HC110-R mit $CX_9WX_{12}CX_9WXCX_5WX_9CX_3W$ (Pos. 166-221) vorkommt, und einem unmittelbar vor den 7 Transmembran-Domänen liegenden hochkonservierten 4-Cys-Motiv der Struktur $CX_{1-3}W(W)X_{6-10}WX_4CX_{11}CXC$, wie sie ebenso mit $CXWWX_6WX_4CX_{11}CXC$ in HC110-R (Pos. 478-524) zu finden ist. Das 4-Cys-Motiv wurde vor kurzem als GPS-Motiv (GPCR proteolytische Stelle) von Latrophilin und anderen großen GPCRs der Sekretin-Familie vorgeschlagen [Krasnoperov *et al.*, 1999]. Das charakteristische Kennzeichen der GPS-Domäne ist die Cys-Signatur CXC, mit 2 flankierenden Trp- und 2 weiteren Cys-Resten [Krasnoperov *et al.*, 1997; 1999; Ichtchenko *et al.*, 1999; Lelianova *et al.*, 1999].

Weitere Vergleiche zwischen HC110-R und Latrophilin-1 zeigen, daß neben Latrophilin-1 auch der lange N-Terminus von HC110-R putative Glykosylierungsstellen aufweist (Pos. 26 und 499) und die C-Termini über ähnliche PEST- und Prolin-reiche Regionen verfügen. Jedoch enthält der N-Terminus von HC110-R nicht die für Latrophilin-1 charakteristische größere Region mit Ähnlichkeit zu dem löslichen neuronalen Olfactomedin (AC: L13595) [Karnik *et al.*, 1993; Yokoe und Anholt, 1993]. Olfactomedin ist ein 57 kDa großes, glykosyliertes, extrazelluläres Matrix-Protein, welches von Bowman'schen Drüsen und sustentakulären Zellen im olfaktorischen Neuroepithel des Ochsenfrosches (*Rana catesbeiana*) exprimiert wird, Dimere und Multimere ausbildet und das Wachstum und die Differenzierung chemosensorischer Cilien beeinflusst [Yokoe und Anholt, 1993]. Die sich in Latrophilin anschließende Pro-Thr-reiche Region mit Ähnlichkeit zu Mucin und anderen Pro-reichen Proteinen [Cyster *et al.*, 1991; Gum *et al.*, 1994], ist in dieser Form in HC110-R auch nicht zu finden. Aber HC110-R weist seinerseits einen der PT-Region möglicherweise entsprechenden 'Thr-Stretch' auf (Pos. 128-147, Abb. 5 und Abb. 7B, C).

	SP	Lectin	
HC110-R	-----MRNVYILLLSVVGITVAEELPAQSNSSIVVCEGGTAELECPHGMVISTAL		51
Latrophilin-1	MARLAAALWSLCVITVLTISATQGLSRAGLPFGLMRRELACEGYPTELRCPGSDVMVVEN		60
HC110-R	ANYGRYSARVCYENEELDDVPMIQCHNPKTMTPLRKSCDGRRECHFVVGNDFFVHDP		111
Latrophilin-1	ANYGRITDDKICDADP---FQEMNVQCYLPDAFKIMSQRNNRTOCVVAGSDAFD-DPCP		116
HC110-R	GVKKYLEVYLCVA---DVITTTT-----		131
Latrophilin-1	GIYKYLEVOYDCVPYIFVCPGTLQKVLLEPTSTHESEHQSGAWCKDPLQAGDRIYVMPWIP		176
HC110-R	YRIDTLTEYASWEDYVAARHTTYYRLPNRVDGTGFVVYDGAVFYFKERTRNIVKYDLRTR		236
Latrophilin-1	IKSGETVINTANYHDTSPYRWGCKTIDLDLAVDENGLWVIYATEGNNGRLVVSQINPYTLR		296
HC110-R	FEGTWEETGYDKRSASNAFVCGVLYVLRVSVYVDDSEAGNRVDYAFNINANREEEPVSLA		356
Latrophilin-1	FPNPYQFVSSVDYNPRDNQLYVWNNYFVVRYSLFPGPPDPSAGPATSPPLSTTTTARPTP	T-reich TTTTTTTTTT	141 416
HC110-R	TTSTTTEVEDDVKEDMSAKSAPS-----TCA		167
Latrophilin-1	LITSTASPAATTPLRRAPLITHPVGAINQLGPDLPATAPAPSTRPPAPNLHVSPPELFC		476
HC110-R	ATSRGIEWPATISGTVNRPCEPGRGTSSWKC---AEGLWSEPCPNTIECRSDWTIQRO	C-Signatur	226
Latrophilin-1	PREVRRVQWPATIQGMLVERPCPKGIRGTIASFOCLPALGLWNPGRGPDLSNCTSPWVNVQA		536
HC110-R	DALEETIKDQ---DASGPELLRAMTSDTRRPMVAGDLPKLLNILDIVQDVVG---REVWAK		282
Latrophilin-1	QKIKSGENAAANIASELARHTRGSIYAGDVSSSVKLMQQLDILDALQALRPIERESAGK		596
HC110-R	SSQKLVN-----QLIVNVVHNALR---AKEMWQNWPSVKRQTFATRLINGVERAMTS		331
Latrophilin-1	NYNKMHKRERTCKDYIKAVVETVDNLLRPEALESWKDMNATEQVHTATMLLDVLEEGAF		656
HC110-R	SSTIVYSSENYVQPLVMTMEMSEIRTSQPSNYFLFPSMALWAGENNVDSVDVPREALEM		391
Latrophilin-1	LADNVREPARFLAAKQNVVLEVIVLSTEGVQELVFPQEYASESSIQLSANTIK---QN		712
HC110-R	TGLDRARVYASAFANIGEEMEPVEISAGSEQKPTGLERRRRIVSRVAVSLVLDGKVIR		451
Latrophilin-1	SRNGVVKVVFILYNNLGLFLSTENATVKLAGEAGTGGPGGASLVVNSQVIAASINKESSR		772
HC110-R	LPILPKPIIITFHYPEALRRMSSPEC---SMDTED---MKWSTSCSLSQSHNSTHIVCAC	4 C-Region	507
Latrophilin-1	VFLMDPVIFIVAHLEAKNHFAN---CSFWNYSESRMLGYWSTGGRLVESNKTHITTCAC		829
HC110-R	SHMTHFAVLMDYVGHEI---SSEDNQLLITFLTYTGCTLSIVCLITLFFCFVVFIKGGDRVFI		567
Latrophilin-1	SHLINFAVLMAHREIYQGRINELLVLTWVGLVLSLVCLALCISIFCFRLGLQIDRNTI		889
HC110-R	HKNLCASLGIAELVFLAGIWRTEEFKFCGMIAGCLLYFFLSALITWMLLEGYQLYQMLVEV		627
Latrophilin-1	HKNLCINLFLAELLFLVGLDKTQYEVACPIFAGLLHYFFLAASFWLCLLEGVHLVLLLVEV		949
HC110-R	FPASRRRFTEFFLVG-YGLPATITGAAAYDPTGFGTRNH---CWLRTDNLFTLFFVAPAAVIL		686
Latrophilin-1	FESEYSRIKYYIYLGGYCFPALVVGIAAALDYRSYGTEKACWLRVDNYFIWFSFIGVSVFI		1009
HC110-R	LITNIMFLEMIMCIVYRHSKYIPCRHAADNGDIRTIWVKGAMGLVCLLGVVIWICGLLWIDD		746
Latrophilin-1	VVNLVFLVITLHKMIRSSVLKPDSSRLDN---IKSWALGATALLFLGLTWAFGLLFINK		1067
HC110-R	GHSIVMAYAFTIANSLOGLFIFVHFVHLCSEKMRYDIARWCKHGLSCTSSG-----		797
Latrophilin-1	-ESVVMAYLFTTFNAFGVFLFVHFCALQKVKHKEYS-KCLRHSYCCIRSPPGGAHGLSK		1125
HC110-R	-SRDTSRDLOKRGTIMSPSERSGSEFTYPTSEKMHTS-----		832
Latrophilin-1	TSAMRSNIRYYTGTQSRIRRMWINDIVRKQTESSEFMAGDINSPTTLNRGIMGNHLLINPVL		1185
HC110-R	-PRGLESSLSSAYPOOP-----LTHHYQRRPPQOENG-----T	P-reich	864
Latrophilin-1	QPRGGTSPYNTLIAESVGFNPPSPPVFNPSGYSYREPKHPLGGREACGMDTLPLNGFNNS		1245
HC110-R	YDYATLAYGEMVPGHMLPRMASSFPHGVAIHYPDFDLSSYQPQIFHHRPPPDFSPPPP	PEST	924
Latrophilin-1	YSLRSGDFPPGDCGPEPRGRNLADAFAFEKMIISELVHNNLRGASGGAKGPPPEPPVPP		1305
HC110-R	PP-----AQTTPSKVIRPPSSKMSDDSAYS		951
Latrophilin-1	VPGVSEDEAGGPGGADRAEIELLYKALEEPLLLPRAQSVLYQSDLDESESCAEDGATSR		1365
HC110-R	GGSSSVLITEVTPSGATVLRMDLGRNQPPNYWRNV-----		986
Latrophilin-1	PLSSPPGRDSLAYSANLRDPSYPDSSPEGPNALPPPPAPPGPEEYYTSRPPALVA		1425
HC110-R	RNPLQGYQVRRPSHEGYLAAPSLEGEFGDGDGMQLVTS		1466

Abb. 5. Aminosäurevergleich der deduzierten Aminosäuresequenzen von *H. contortus* HC110-R und *Rattus norvegicus* Latrophilin-1 (AC: U78105).

Strukturelle Protein-Motive sind wie folgt gekennzeichnet: N-terminales Signalpeptid (SP, Pos. 1-21, schwarz und fett); Lectin-homologe Sequenz (Lectin, Pos. 22-125, pink und gepunktet); Thr-reiche Region (T-reich, Pos. 128-147, grau hinterlegt); Cys-reiche Signatur der Struktur **CX₉WX₁₂CX₉WXCX₅WX₉CX₃W** (C-Signatur, Pos. 166-221, rot und unterschlängelt, 4 Cys-Reste blau, fett und gelb hinterlegt, 4 Trp-Reste fett); 4-Cys-Region der Struktur **CXWWX₆WX₄CX₁₁CXC** (4 C-Region, Pos. 478-524, rot und unterstrichen, 4 Cys-Reste blau, fett und gelb hinterlegt, 3 Trp-Reste fett); 7 Transmembran-Domänen (zwischen Pos. 536-772, grün, fett und unterstrichen); Pro-reiche Region (P-reich, Pos. 845-861, blau und grau hinterlegt); PEST-Region (PEST, Pos. 915-933, blau und grau hinterlegt); 3 N-Glykosylierungsstellen (Pos. 26, 499 und 862, fett); und das unter Sekretin-GPCRs eine hoch konservierte putative Disulfid-Bindung ausbildende Cys-Cys-Paar (Pos. 595 und 666, blau, fett, gelb hinterlegt und doppelt unterstrichen). Identische AS sind mit einem Sternchen, stark verwandte AS mit einem Doppelpunkt und verwandte AS mit einem einzelnen Punkt markiert.

Die N-Termini der untereinander sequenzähnlichen Proteine HC110-R, B0457 und Latrophilin-1, -2 und -3 weisen eine signifikante Ähnlichkeit zu der kompletten Aminosäuresequenz (105 AS; AC: P22031) der 11,5 kDa großen UE des D-Galactose-bindenden Lectins aus Seeigeleiern (*Anthocidaris crassispina*) auf [Ozeki *et al.*, 1991]. Dieses Lectin liegt als Homodimer vor und spielt eine Rolle bei der Entwicklung des Seeigels [Ozeki *et al.*, 1995]. Für die ersten 126 AS des N-Terminus von HC110-R besteht eine 27 %ige Identität (34/126 AS) und 41 %ige Ähnlichkeit (56/126 AS) zu dem D-Galactose-bindenden Seeigel-Lectin. Das B0457-Protein weist eine 24 %ige Identität (32/136 AS) und 39 %ige Ähnlichkeit, Latrophilin-1, -2 und -3 (stellvertretend sei hier Latrophilin-3 angegeben) eine 26 %ige Identität (33/126 AS) und 46 %ige Ähnlichkeit (58/126 AS) zu dem Seeigel-Lectin auf (Abb. 6).

HC110-R	MR-N---VYILLLSVVG-----TFTVAEELPAQSNS---SIVVCEGGTAELECPHGMVISIALANYGRY	57
CEB0457	MR-RNKTTYSLIQTILVACLIVPTIFASNKPTTDESGTISHTICDGEAAELSCPAGKVISIVLQNYGRF	69
BTLAT-3	MMPSQLLVFMMLLAPIIH-----AFSRAPIPMAVRR-----ELSCESYPIELRCPGIDVIMLESANYGRIT	61
ECLECTIN	-----ELVSEFCLKKER-----VCEDSLITLSCPREGIVTYDAILYGRK	39
:	: : : : * : . . . : ** . . * * : .***	
HC110-R	SARVCYENEELDDVWP-MIQCHNPKTIPMLRKSCDGRRECHFVVGNDFFVHDPCEPGVKKYLEVTYLCVAD	126
CEB0457	SVAVCLPD---NDIVPSNINCQNHKTKSILEKKCNQDSMCYFTVDKKTFTEDPCENTPKYLEVKYNCVVP	136
BTLAT-3	DDKICDSD---PAQMNIRCYLPDAYKIMSQRNNRTOCAVVAGPDVFP-DPCPGTYKYLEVQYECVPY	126
ECLECTIN	RGEVCPGL---FGAFTKNRKRSSNSQOVWENSCEGKSSCIVLASNSVFG-DPCPGTAKYLAVTYICSFLL	105
:	:* :..* : : :* : * ***** : *** * * * :	

Abb. 6. Aminosäurevergleich von HC110-R zu anderen Proteinen mit Lectin-homologer Sequenz.

HC110-R, *H. contortus* HC110-R; CEB0457, *C. elegans* deduzierte Aminosäuresequenz des Cosmidklons B0457 (AC: Z54306; Wilson *et al.*, 1994); BTLAT-3, *Bos taurus* Latrophilin-3 Spleißvariante (AC: AF111085; Matsushita *et al.*, 1999); ECLECTIN, *Echinocardium cordatum* D-Galactose-bindendes Lectin (AC: P22031; Ozeki *et al.*, 1991).

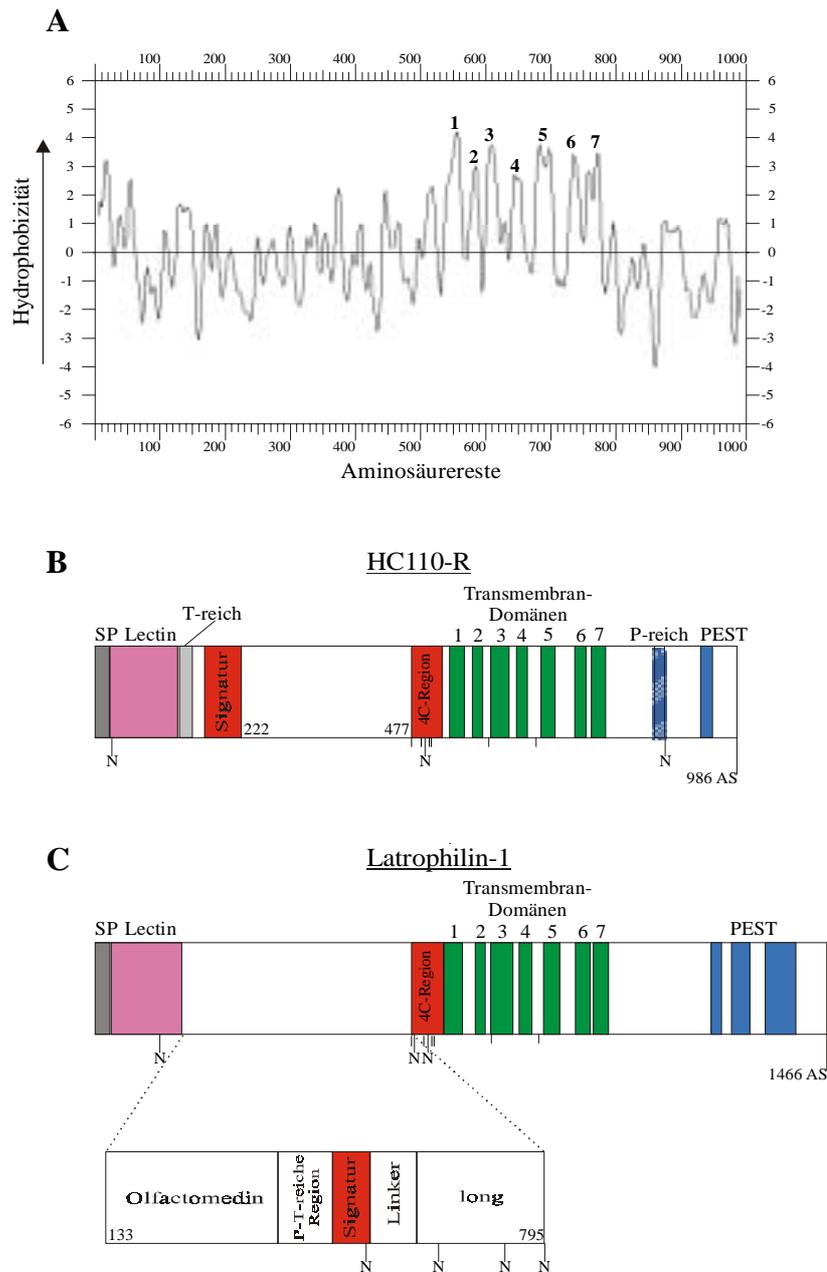


Abb. 7. Struktur-Modell von *Haemonchus contortus* HC110-R und *Rattus norvegicus* Latrophilin-1.

- (A) Hydrophobizitätsplot von HC110-R, der die Position der 7 Transmembran-Domänen (1-7) nach Kyte und Doolittle [1982] und Klein *et al.* [1985] angibt.
- (B) Protein-Struktur von HC110-R, die die charakteristischen Motive schematisch darstellt: Signal-Sequenz (SP, dunkelgrau), Lectin-Domäne (Lectin, pink), 'Thr-Stretch' (T-reich, hellgrau), Cys-Signatur (Signatur, rot), 4 Cys-Motiv (4 C-Region, rot), 7 Transmembran-Domänen (TM-Domänen 1-7, grün), Pro-reiche Domäne (P-reich, blau mit weißen Schrägstreifen) und PEST-Region (PEST, dunkelblau). Die 3 putativen N-Glykosylierungsstellen (N), die 4 Cys-Reste der 4 C-Signatur und die 2 konservierten, eine putative Disulfid-Bindung ausbildenden Cys-Reste (dünne Linie ohne Großbuchstaben) sind unterhalb des Diagramms eingezeichnet.
- (C) Protein-Struktur von Latrophilin-1. Zu HC110-R homologe Motive sind wie in (B) dargestellt. Dem Latrophilin-1-Rezeptor fehlt der 'Thr-Stretch', aber er verfügt über einige zusätzliche Motive: ein Olfactomedin Binde-Motiv (Olfactomedin), eine Pro-Thr-reiche Region (P-T-reiche Region), eine Linker-Domäne (Linker) und eine ausgedehnte Region mit mehreren Repeats (Long).

Ein Datenabgleich auf Protein-Ebene mit dem Programm „PRINTS BLAST“ (31860 Sequenzen; Version 1.4.9MP, Dezember 1999) nach Altschul *et al.* [1990] ergab, daß 40 von 60 GPCRs mit einer Sequenzähnlichkeit zu HC110-R zur Sekretin-Familie gehören (Tab. 5). Einige Mitglieder der Sekretin-Familie sind auffallend groß und besitzen einen für GPCRs langen N-Terminus; neben den Latrophilinen mit durchschnittlich 210 kDa, B0457 mit 113 kDa und HC110-R mit 110 kDa, gehören auch die Celsr1-Rezeptoren mit 337 kDa, die EMR1-Hormon-Rezeptoren mit 100 kDa und die CD97-Rezeptoren mit durchschnittlich 90 kDa zu der Unterfamilie der „großen Sekretin-Rezeptoren“.

Sekretin-Vertreter	Organismus	AS	Literatur	% Sequenzidentität / Ähnlichkeit über		
				N-Term.	7-TM	Gesamt
EMR1-Hormon-Rezeptor	Mensch (AC: Q14246)	886	Baud <i>et al.</i> , 1995	30/58	33/49	31/49
	Maus (AC: Q61549)	931	McKnight <i>et al.</i> , 1996; Lin <i>et al.</i> , 1997	38/42	33/49	33/52
CD97 Leukozyten-Antigen-7-TM-Rezeptor	Mensch (AC: P94630; P48960)	835	Hamann <i>et al.</i> , 1995; 1996	27/48	34/49	30/45
Cadherin-7-TM-Rezeptor (Celsr1)	Maus (AC: O35161; G3800738)	3034	Hadjantonakis <i>et al.</i> , 1998	48/50	30/49	32/48
Corticotropin-freisetzender Rezeptor (CRF-1 und -2)	Mensch (AC: P34998)	444	Chen <i>et al.</i> , 1993; Vita <i>et al.</i> , 1993;	-	26/41	26/42
	Ratte (AC: P35353; P47866)	415	Chang <i>et al.</i> , 1993; Perrin <i>et al.</i> , 1993;	-	24/40	24/41
	Maus (AC: P35347; A56726)	415	Vita <i>et al.</i> , 1993	-	25/41	25/41
	Afrikan. Klauenfrosch <i>Xenopus laevis</i> (AC: O42602)	415	Dautzenberg <i>et al.</i> , 1997	36/44	24/41	23/41
Calcitonin-Rezeptor	Mensch (AC: P30988)	490	Kuestner <i>et al.</i> , 1994	-	22/40	23/42
	Schwein (AC: P25117)	498	-	-	24/42	25/43
	Ratte (AC: Q63118)	464	Njuki <i>et al.</i> , 1993	-	25/39	25/39
	Maus (AC: Q60755)	515	Yamin <i>et al.</i> , 1994	-	26/41	26/43
Vasoaktiver intestinaler Polypeptid-Rezeptor (VIP-R-2)	Mensch (AC: P41587)	438	Svoboda <i>et al.</i> , 1994; Wei und Mofsov, 1996	-	24/39	23/38
	Ratte (AC: P35000)	437	Lutz <i>et al.</i> , 1993; Usdin <i>et al.</i> , 1994	-	24/41	24/41
	Maus (AC: P41588)	437	Inagaki <i>et al.</i> , 1994; Delgado <i>et al.</i> , 1996	-	24/41	24/41
Parathyroider Hormon-Rezeptor	Mensch (AC: Q03431)	593	Schipani <i>et al.</i> , 1993; Schneider <i>et al.</i> , 1993	-	24/39	24/40
	Nordamerik. Opossum (AC: P25107)	585	Jüppner <i>et al.</i> , 1991	-	22/39	23/40
Wachstumshormone-freisetzender Hormon-Rezeptor (GHRH-R)	Mensch (AC: Q02643)	423	Mayo, 1992; Gaylinn <i>et al.</i> , 1993	33/42	26/46	21/40
	Ratte (AC: Q02644)	464	Lin <i>et al.</i> , 1992; Mayo, 1992	-	25/41	25/43
	Maus (AC: P32082)	423	Lin <i>et al.</i> , 1992; 1993	-	24/39	25/40
Diuretischer Hormon-Rezeptor (DH-R)	Tabak-Hornwurm <i>Manduca sexta</i> (AC: P35464)	395	Reagan, 1994	-	24/40	24/40

Tab. 5. Vertreter der Sekretin-Rezeptorfamilie mit Sequenzidentität zu HC110-R.

Aufgeführt sind 9 verschiedene Vertreter der Sekretin-Unterfamilie in verschiedenen Organismen, die Größe ihrer Aminosäuresequenz sowie die prozentuale Sequenzidentität und -ähnlichkeit zu HC110-R über den N-Terminus (N-Term.), die 7 Transmembran-Domänen (7-TM) und die komplette Aminosäuresequenz (Gesamt).

	I	i ₁	II	e ₁		
HC110-R	TFLTYTGCTLSIVCLLTLFFCFVWF	IKGGGDRVFIHKNLCSLGLAELVFLA	-----	GIWRTTEEK-	592	
BTLAT-3	DVTITWVGILLSLVCLLICIFTF	CFRGLQSDRNTIHKNLCSLFAVELLFLI	-----	GINRITQPI	938	
RNLAT-1	SVITWVGIVISLVCLAICISTFC	FLRGLQIDRNTIHKNLCSLFLAELLLV	-----	GIDKIQYEV	915	
MMEMR1	YILSHVGVISLVCLALATATFL	LCRAVQNHNTYMHILCVCLFLAKILFLI	-----	GIDKIDNQT	708	
HSCD97	TLITRVGLALSFLCILLCLITL	FLVLRPIQGSRTITHLHLCLFLVGSITFLA	-----	GIENEGGQP	515	
MMCADH	KITLYVALGVTLAALMLTFL	FLTLRALRSNQHGRNLTALGLAQLVFL	-----	GINQADLP	525	
XLCRF1	IVINFLGHSISLICALLVAFIL	FLRLRSIRCLRNIHWNLTAFILRNVIWFV	QLITLSHEA	-----	HDSN	
RNVIP2	KATYTLGYSVLSMSLTIGSII	ICLFRKLHCTIRNYTHNLFLSFM	LRAISVLVKDSVLYSSSGITLRCHDQP		195	
HSGHRH	KIITYTVGHSISIVALFVAIT	LVALRRLHCPRNYPHTQLFTTFFIL	KAGAVFLKDAALFHSDDTIDHC	---	196	
	--i--vG--iSlvcl-l----	f---r-l--m-iH-nLc--l-la---	fl-----	gi--t----		
	III	i ₂	IV			
HC110-R	---FECGM	IAGCLLYFFLSALTWMLLEGYQLYQML	----	VEVFPASRRRFTFF-LVGYGLPAITTGAAA	653	
BTLAT-3	A---CAVFAAL	LHFFFLAAFTWMLFEGVQLYIML	----	VEVFESEHSRRKYFYLVGYPALIVAVSA	999	
RNLAT-1	A---CPIFAGL	LHYFFLAAFSWLCLEGVHLYLLL	----	VEVFESEYSRIKYYYLGGYCFPALVWGIAA	976	
MMEMR1	A---CAITAG	FLHYLFLACFFWMLVEAVMLFLMVRNL	KVVNYFSSRNILKMLHLCAGFYGLPVLVLIISA		774	
HSCD97	G--LRCLV	VAGLLHYCFLAFCWMSLEGLELYFLV	----	VRVFQOGLSTRWLCILGYGVPLLIVGVS	578	
MMCADH	---FACIV	IAILLHFLYLCIFSWALLEALHLYRALTEVRDVA	----	SPMRFYYMLGWGVPFITGLAV	587	
XLCRF1	VW--CRLV	TTAHNYFYVINFFWFMFEGCYLHTAI	----	VLTYSTDKLRKMMFICIGWCIPFPIVAWA	247	
RNVIP2	GSWVGCK	LSLVFFQYCIAMNFYWLVEGLYLHTLL	----	VAILPPSR-CFLAYLLIGWGIPSVICIGAWI	259	
HSGHRH	FSTVLC	CKVSAASHFATMINFSLWLA	EAVYLNCLL	----	ASTSPSSRAFWMLVAGMGLPVLFTGIWV	
	----	C--a--lhy-fl--f-WmlleG--Ly--l	----	v-vf-----r-----l-GyG-Pa-i-g-a		
	e ₂	V	i ₃			
HC110-R	YYDPTGF	GIRNHCWLRIDNLFILFFV	--	APAAVILLINIMFLFMIMCIVYRHSK--	YIPCRHADNGGDI	
BTLAT-3	AVDYRSYG	IDKVCWLRRLDTYFIWSFI	--	GPATLIIIMNVIFLGIALYKMFHHTAIL	----	KPESGCLDNI
RNLAT-1	AIDYRSYG	IEKACWLRVDNYFIWSFI	--	GPVSFVIVNVLVFLMVLHKMIRSSSVL	----	KPDSSRLDNI
MMEMR1	SVQPRGY	GMHNRCLWLNTEIGFIWSFL	--	GPVCMITINSVLLAWTLWVLRQKLCV	----	SSEVSKLKD
HSCD97	AIYKSGY	GRPRYCWLDFOGFLWSFL	--	GPVFTIILCNAVIFVTIWKLTQKFSEI	----	NPDMMKLKA
MMCADH	GLDPEGY	GNPDFCWLSDYDILWSFA	--	GPVAFVMSVFLYILS	-----	ARASCAAQRQGFEEKGPV
XLCRF1	ICKL--Y	YDNEK-CWFGK	KAGVYIDFTYQGPVILVLLINFL	IFLNFIVRITMILKLR	----	ASTTS--ETIQY
RNVIP2	ATRL--S	LEDTG-CWDINDHSIPW	--	WIRMPILLISIVNFAFLFISIVRILLQKLT	----	SPDVGNDQSQY
HSGHRH	SCKL--A	FEEDIA-CWLD	DDTSPYW-WIKGPIVLSVGNFGLFLNI	IRILVRKLE	----	PAQGSLSHTQSQY
	-----	yg---CwL-----fiw-f---gp	---	ii--N---l-----l-----		
	VI	e ₃	VII			
HC110-R	RIWVK	GAMGLVCLLGVITWICGLLWIDDGHSIVMAYA	--	FTIANSIQGLFITVVFHVCSEKMR		
BTLAT-3	KSWVIG	AIALCLLGLTWAFGLMYINES	--	TVIMAY--LFTIFNSIQGMFIFIFHCVLQKQVR	1117	
RNLAT-1	KSWAL	GAIALLFLIGLTWAFGLLFINKE	--	SVIMAY--LFTIFNAFQGVFIFVFCALQKQVH	1094	
MMEMR1	RLITF	KATAQIFILGCSWLGIFQIGPL	--	ASIMAY--LFTIINSIQCAFIFLHCLINRQVR	897	
HSCD97	RALIT	TATAQLFLIGCTWVFGFLIFDDR	--	SLVITY--VFTIINCLIQGAFYLLHCLINRQVR	701	
MMCADH	SG--LR	SFTVLRLLSATWLLALLSVNSD	---	TLFHYLFAACNCVQGPXIFXSIVVXSKEVR	706	
XLCRF1	RKAVK	ATLVLLPLIGITYMLFFVTPGEDEIS	RVFTYFNSFLQSPQGFVSVFYCFINSEVR		371	
RNVIP2	KRLAK	STLLLPLFGVHYMFAAFP	--	IGISSTYQILFELCVGSFQGLWAVLYCFINSEVQ	382	
HSGHRH	WRLSK	STLFLPLFGIHYIFNFLP	--	DNAGLGRLELGLGSFQGFIVAILLYCFINQEV	384	
	----	k----ll-LlG-tw--gl-----	----	ay---fti--ns-QG-fif--hc-l--vr		

Abb. 8. Aminosäurevergleich des 7 Transmembran-Rezeptors HC110-R und verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren der Sekretin-Subfamilie.

HC110-R, *H. contortus* orphaner heptahelikaler Transmembran-Rezeptor (AC: AJ272270); BTLAT-3, *Bos taurus* Latrophilin-3 (diverse Spleißvarianten, AC: G4164053-G4164075); RNLAT-1, *Rattus norvegicus* Latrophilin-1 (AC: U78105; U72487); MMEMR1, *Mus musculus* EMR1 Hormonrezeptor-Vorläufer (AC: Q61549); HSCD97, *Homo sapiens* Leukozyten aktivierendes Antigen CD97 (AC: P48960); MMCADH, *M. musculus* Cadherin 7 Transmembran-Rezeptor-Vorläufer (AC: G3800738); XLCRF1, *Xenopus laevis* Corticotropin freisetzender Rezeptor-Vorläufer 1 (AC: O42602); RNVIP2, *R. norvegicus* vasoaktiver intestinaler Polypeptid-Rezeptor-Vorläufer 2 (AC: P35000) und HSGHRH, *H. sapiens* Wachstumshormone freisetzender Hormonrezeptor-Vorläufer (AC: Q02643). Die 7 Transmembran-Domänen sind grau-hinterlegt (I-VII) und die beiden hochkonservierten, eine putative Disulfidbindung ausbildenden Cysteine sind fett dargestellt. e₁-e₃ sowie i₁-i₃ (fett) über den Sequenzen kennzeichnen die 3 extra- und intrazellulären Loops. Identische Aminosäuren wurden mit Großbuchstaben und Aminosäuren, die in nahezu allen Sequenzen vorkommen, mit kleinen Buchstaben unter dem Sequenzabgleich hervorgehoben.

So weist der komplette heptahelikale HC110-R eine 21-33 %ige Identität, bzw. 38-52 %ige Ähnlichkeit zu den Gesamtsequenzen diverser heptahelikaler GPCRs der Sekretin-Unterfamilie auf. Die höchste Sequenzidentität zwischen HC110-R und diversen Sekretin-Vertretern liegt aber mit einer Sequenzidentität von 22-34 %, bzw. Ähnlichkeit von 39-49 % im Bereich der 7 Transmembran-Elemente (Tab. 5), wobei die hydrophilen intra- und extrazellulären Schleifenregionen eine stärkere Divergenz zwischen verschiedenen Rezeptoren zeigen (Abb. 8). Die C-Termini der einzelnen Sekretin-Mitglieder weisen dagegen keine signifikante Sequenzidentität untereinander auf, und selbst bei den N-Termini sind nur einzelne Bereiche oder Motive ähnlich. HC110-R, B0457, die Latrophiline und die in Tab. 5 aufgeführten Mitglieder der Sekretin-Familie besitzen viele charakteristische Kennzeichen innerhalb der 7 Transmembran-Regionen, wie bspw. negativ geladene AS in der 3. Transmembran-Domäne (E, C, S, T, Y), ein Gly-Pro-Motiv **GXGXP** in der 4. Transmembran-Domäne (mit Ausnahme von XLCRF1 mit **GXCXP**, Abb. 8), einen konservierten Pro- und Asn-Rest in der 5. Transmembran-Domäne und 2 hochkonservierte Cysteine in den extrazellulären Loops 1 und 2 (Abb. 8).

3.3 Heterologe Expression von HC110-R

Im folgenden sollte die Integrität der HC110-R-cDNA überprüft werden. Hierzu galt es nachzuweisen, ob die konstruierte HC110-R-cDNA das erwartete Produkt von 110 kDa erzeugt, und ob die deduzierte Aminosäuresequenz in einem geeigneten Expressionssystem tatsächlich exprimiert wird und sogar funktional ist.

3.3.1 *In vitro* Transkription und Translation

Mit Hilfe des zellfreien TNT T7/T3 gekoppelten Kaninchen-Retikulocytenlysatsystems wurde die vollständige HC110-R-Sequenz in Gegenwart von ³⁵S-markiertem Methionin und Cystein *in vitro* transkribiert (Abb. 9A) und translatiert. Die Translationsprodukte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 9B).

Das Hauptprodukt bildet erwartungsgemäß eine Bande bei 110 kDa. Weitere zusätzliche Produkte kleineren Molekulargewichtes, die möglicherweise durch Initiation an einem strangabwärts gelegenen ATG-Kodon hätten zustande kommen können, wurden nicht beobachtet. Als Positivkontrolle wurde Luziferase-DNA mittranskribiert und die mRNA, die für ein Protein aus 61 kDa kodiert, anschließend translatiert. Die Negativkontrolle ohne DNA schließt unspezifische Reaktionsprodukte aus (Abb. 9B).

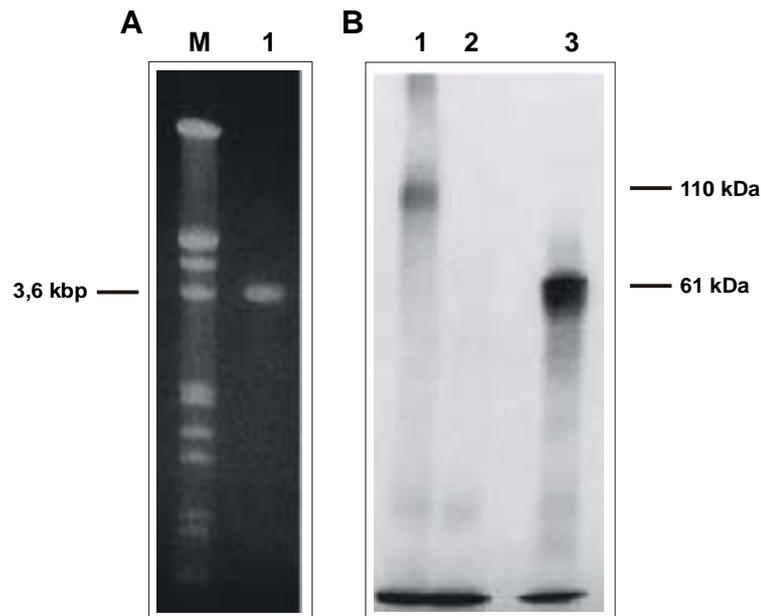


Abb. 9. *In vitro* Transkription und Translation.

- (A) *In vitro* Transkription. 2 µg der mit HindIII bzw. Sali hinter dem Stop-Codon linearisierten und aufgereinigten HC110-R Plasmid-DNA wurden mit T3-Phagen-Polymerase für 2 h bei 37 °C *in vitro* transkribiert (Spur 1). Die resultierende mRNA wurde in einem denaturierenden 1,2 %igen Glyoxalgel mit glyoxyliertem EcoRI/HindIII doppelt verdauten λ-DNA-Marker als Längenstandard aufgetrennt (Spur M) und das Gel nachträglich mit Ethidiumbromid gefärbt.
- (B) *In vitro* Translation von *in vitro* transkribierter HC110-R-mRNA. Die *in vitro* Translation erfolgte mit dem Kaninchen Retikulozytenlysat in Gegenwart von ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein Translabel. Die Produkte wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde für 30 min in 1 M Natriumsalizylat inkubiert, unter Vakuum getrocknet und mit Verstärkerfolie bei - 80 °C exponiert. Spur 1: *In vitro* Translationsansatz von *in vitro* transkribierter HC110-R-RNA. Spur 2: Negativ-Kontrolle; *in vitro* Translationsansatz ohne RNA. Spur 3: Positiv-Kontrolle; *in vitro* Translation der Luziferase-Kontroll-RNA.

3.3.2 N- und C-terminale Proteinsequenzierung

Um ausreichende Proteinmengen für eine Ansequenzierung des HC110-R-Proteins und eine Immunisierung zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen HC110-R zu erhalten, wurde *E. coli* als Wirtssystem gewählt. Für die Proteinexpression in *E. coli* wurden drei HC110-R Fragmente erzeugt: Zum einen wurde die 2958 bp lange HC110-R-cDNA, die den kodierenden Bereich von HC110-R (AS 1-986) umfaßt, mit den Primern P84_ATGBamHI und P3121_TGAHindIII amplifiziert und gerichtet in den pRSET B-Expressionsvektor ligiert. Ein Fragment aus 1335 bp, das für den HC110-R N-Terminus bis vor das 4-Cys-Motiv (AS 1-445) kodiert, wurde mit den Primern P84_ATGBamHI und P1434_TGAHindIII amplifiziert; und ein weiteres Fragment aus 643 bp, das für den C-Terminus nach der 7. Transmembran-Domäne (AS 797-986) kodiert, wurde mit den Primern P2486_ATGBamHI und P3121_TGAHindIII amplifiziert. Mit Hilfe der mitamplifizierten Restriktionsschnittstellen wurden die Konstrukte gerichtet in den Expressionsvektor pRSET B kloniert und mit dem N-terminalen 6x His-Tag unter Beachtung des Leserasters fusioniert. Die Überprüfung des Leserasters der klonierten cDNAs erfolgte durch Sequenzierung mit

sequenzspezifischen IR-Primern. Die jeweilige cDNA kodiert damit unter Berücksichtigung des aus 38 AS bestehenden N-terminalen His-Tags für ein 114 kDa großes HC110-R-Fusionsprotein, ein 54 kDa großes N-terminales und ein 21 kDa großes C-terminales HC110-R Proteinfragment. Der pRSET-Expressionsvektor wird über einen viralen Promotor des Bakteriophagen T7 kontrolliert. Die Klonierung erfolgte daher zunächst in den *E. coli* XL1-Blue-Stamm, der kein Gen der T7 RNA-Polymerase enthält, und anschließend in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS, der zusätzlich ein über eine Chloramphenicol-Resistenz stabilisiertes Plasmid pACYC184 enthält, welches in geringen Mengen das T7-Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase, exprimiert. Da die BL21(DE3)pLysS-Zellen unter der Kontrolle des lacUV5 Promotors stehen, erfolgte die Expression der 3 verschiedenen HC110-R-Fusionsproteine durch Zugabe von IPTG. Nach Gewinnung der *E. coli*-Gesamtproteine aus den jeweiligen induzierten und nicht-induzierten Fraktionen, wurde die Expression der 3 HC110-R-Fragmente zum einen durch Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen (Abb. 10A), und zum anderen durch Western Blot-Analyse mit einem Maus-anti-His IgG-Primär- und einem Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP-Sekundärantikörper (Abb. 10C) überprüft.

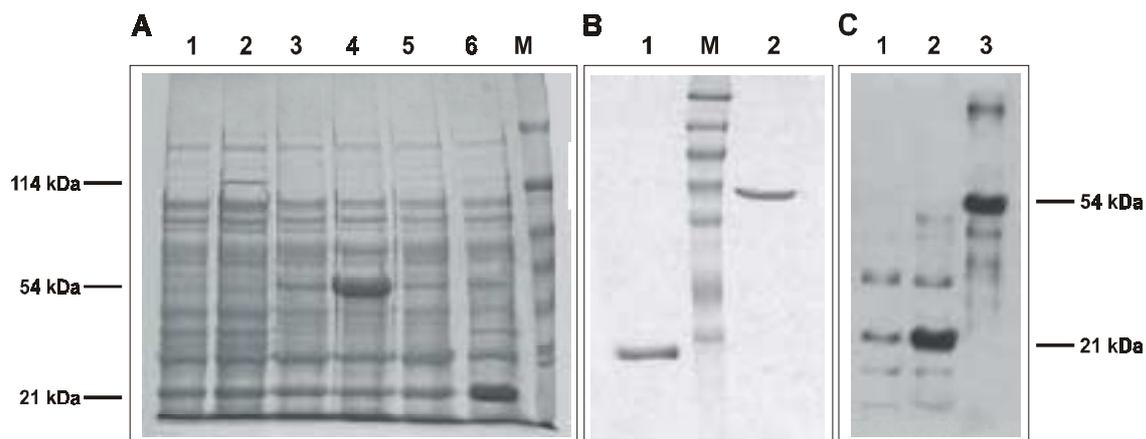


Abb. 10. Heterologe Expression von HC110-R in *E. coli*.

- (A) Coomassie-gefärbtes 12 %iges SDS-Trenngel mit je 20 μg Gesamtprotein mit nicht-induziertem und IPTG-induziertem 114 kDa HC110-R (Spur 1 und 2); 54 kDa HC110-R N-Terminus (Spur 3 und 4) und 21 kDa HC110-R C-Terminus (Spur 5 und 6). Als Längenstandard diente der Prestained SDS-Marker (Spur M).
- (B) Coomassie-gefärbte, über IMAC-Affinitätschromatographie aufgereinigte Eluate (je 5 μg /Spur) des 21 kDa großen HC110-R C-Terminus (Spur 1) und des 54 kDa großen HC110-R N-Terminus (Spur 2). Als Größenstandard wurde der Prestained SDS-Marker (Spur M) mit aufgetragen.
- (C) Je 15 μg Gesamtprotein des nicht-induzierten und induzierten N-terminal mit einem His-Tag fusionierten 21 kDa (Spur 1 und 2), und 54 kDa (Spur 3) großen HC110-R Fragment wurden im Western Blot mit einem monoklonalen Maus-anti-His IgG-Primärantikörper (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und einem monoklonalen Kaninchen-anti-Maus-IgG-HRP-Sekundärantikörper (1:25000) auf ihre Expression hin untersucht.

In zwei Fällen, dem 54 kDa großen N-terminalen und dem 21 kDa großen C-terminalen HC110-R-Proteinfragment konnte das gewünschte Protein nach IPTG-Induktion in ausreichender Qualität (Abb. 10A, C) exprimiert werden. Das 114 kDa große HC110-R-Protein mit N-terminalem His-Tag wurde nach der Induktion nur mit geringer Ausbeute exprimiert (Abb. 10A). Auch in Abwesenheit von IPTG erfolgte durch die T7 RNA-Polymerase eine geringe Basalexpression der 3 HC110-R-Proteinfragmente in den „nicht-induzierten“ Proben (Abb. 10A).

Das 54 kDa große N-terminale sowie das 21 kDa große C-terminale HC110-R-Fusionsprotein mit N-terminalem His-Tag wurden im Anschluß an die Induktion über eine immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) angereichert (Abb. 10B). Über Centricon-Röhrchen oder Dialyse wurde das Imidazol und ggf. der Harnstoff aus den Eluaten entfernt. Die Qualität der aufgereinigten Proteine wurde in Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen überprüft (Abb. 10B).

Für die Verifizierung der deduzierten Aminosäuresequenz von HC110-R wurde 1 nmol des in *E. coli* exprimierten, aufgereinigten und entsalzten 21 kDa großen C-Terminus eingesetzt. Wegen des N-terminalen 6x His-Tags wurde das HC110-R-Fragment zum einen C-terminal nach dem schrittweisen Schlack-Kumpf-Abbau [Schlack und Kumpf, 1926] in einer Modifikation von Boyd *et al.* [1992] sequenziert, und zum anderen wurden insgesamt 4 verschiedene Peptide des HC110-R C-Terminus nach einem tryptischen Verdau von insgesamt 25 pmol Protein N-terminal nach Hunkapiller *et al.* [1983] ansequenziert.

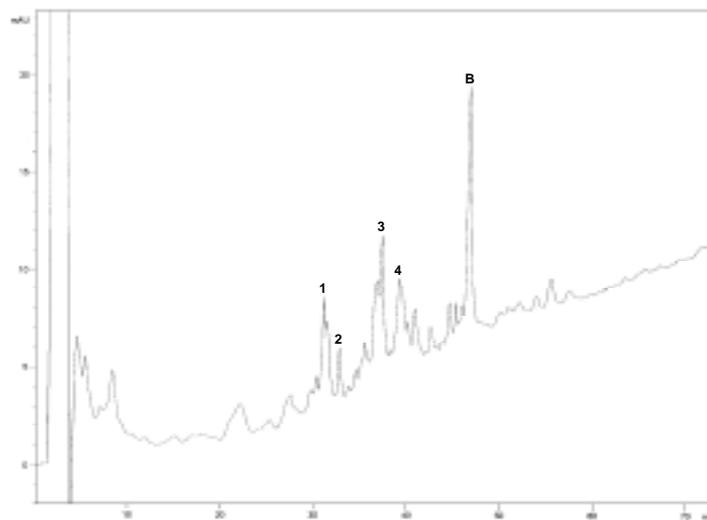


Abb. 11. HPLC-Standardchromatogramm des HC110-R C-Terminus nach dem Trypsin-Verdau.

25 pmol des in *E. coli* exprimierten, aufgereinigten und entsalzten C-Terminus von HC110-R wurden mit 2 % Trypsin bei 37 °C über Nacht verdaut. Durch den Vergleich des HPLC-Standardchromatogramms von HC110-R mit dem Chromatogramm des Trypsin-Blankverdaus ohne HC110-R (nur 1 Peak, **B**) wurden 4 HC110-R-Peptide (**1-4**) für die N-terminale Sequenzierung ausgewählt. Auf der Abszisse ist die Zeit in min, auf der Ordinate sind die Absorptionseinheiten in mAU aufgetragen.

Mit Hilfe der C-terminalen Sequenzierung konnten die letzten beiden AS - ein Valin in Position -1 und ein Asparagin in Position -2 - identifiziert werden. Die Sequenz brach nach dem zweiten Zyklus ab; möglicherweise erniedrigten Asparagin- oder Serinreste die Ausbeute.

Nach einer tryptischen Spaltung des aus 192 AS bestehenden 21 kDa HC110-R-Proteins, wurden insgesamt 4 Peptidfraktionen durch den Vergleich des HC110-R-HPLC-Standardchromatogrammes (Abb. 11; Fraktionen 1-4) mit dem Chromatogramm des Trypsin-Blankverdaus ausgewählt (vgl. Abb. 11; Trypsin-Peak B) und somit tryptische Autolyseprodukte von der N-terminalen Sequenzierung ausgeschlossen. Die abgespaltenen Aminosäuren wurden quantitativ durch 'Reversed Phase' HPLC erfaßt und über Retentionszeitvergleich mit dem vor der Sequenzanalyse erstellten Standardchromatogramm identifiziert. Die N-terminale Sequenzierung (Tab. 6) des ersten Peptids ergab Aufschluß über die 4 AS Glu-Phe-Ile-Tyr in Position 820-823. Vom zweiten Peptid konnten die 12 AS Ser-Ala-Tyr-Pro-Gln-Gln-Pro-Leu-Ile-His-His-Tyr in Position 842-853, die zum großen Teil die Pro-reiche Region umfassen, erfolgreich bestimmt werden. Das dritte Peptid beginnt mit den 8 AS Arg-Pro-Pro-Gln-Gln-Pro-Asn-Gly in Position 856-863, die auch noch Teil der Pro-reichen Region sind und die N-Glykosylierungsstelle in Position 862 erfassen. Das vierte Peptid in Position 927-933 ist mit den 7 AS Ala-Gln-Gly-Thr-Thr-Pro-Ser Teil der PEST-Region.

Fraktion 1	EFIY	Pos. 820-823
Fraktion 2	SAYPQQPLIHHY	Pos. 842-853
Fraktion 3	RPPQQPNG	Pos. 856-863
Fraktion 4	AQGTTPS	Pos. 927-933

Tab. 6. N-terminale Aminosäuresequenzierung von 4 HC110-R-Peptiden nach Trypsin-Verdau. 4 verschiedene HC110-R-Peptide (Fraktionen 1-4) wurden über HPLC isoliert und nach Hunkapiller *et al.* [1983] N-terminal ansequenziert.

Die Ermittlung der zwei letzten C-terminalen AS-Reste und die korrekte Bestimmung von vier nach interner enzymatischer Spaltung N-terminal ansequenzierten Peptidfraktionen bestätigte die von der HC110-R-cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz aus 986 AS. Verschiebungen des Leserasters durch nicht aufgetrennte Basenpaare bei der Nukleinsäuresequenzierung konnten somit ausgeschlossen werden.

3.3.3 Transiente HC110-R-Expression in Säugerzellen

Im folgenden sollte untersucht werden, wo HC110-R zellulär lokalisiert ist. Die heterologe Expression in Säugerzellen wurde gewählt, da bislang noch keine Zelllinie aus *H. contortus* oder *C. elegans* etabliert worden ist. Um das Expressionsverhalten von HC110-R besser einschätzen zu können, wurden zur Kontrolle 2 andere GPCRs, ein β_2 -adrenerger Rezeptor und ein muscarinischer M1-Acetylcholin-Rezeptor, im gleichen System lokalisiert.

Um eine geeignete Zelllinie für die konstitutive Expression von HC110-R in Säugerzellen zu finden, wurde zunächst das GFP-System verwendet. Wildtyp-GFP aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* ist ein 27 kDa Monomer aus 238 AS, das nach Anregung mit UV-Licht (360–400 nm; Max. bei 395 nm) oder blauem Licht (440–480 nm; Max. bei 475 nm) grünes Licht mit einem Maximum von 509 nm emittiert, ohne dazu exogene Substrate oder Kofaktoren zu benötigen [Chalfie *et al.*, 1994]. Dank seiner zylinderartigen β -Faltblatt-Struktur (β -Can), mit dem durch α -Helizes rundum geschützten Chromophor im Inneren, behält GFP seine Fluoreszenz sogar nach längerer Inkubation in stark denaturierenden Agentien wie 6 M Guanidin-HCl, 8 M Harnstoff, 1 % SDS oder nach einer Fixierung mit 3,7 % Formaldehyd bei [Bokman und Ward, 1981; Yang, *et al.*, 1996a]. Diese Struktur verhindert, daß der Chromophor dem Lösungsmittel ausgesetzt ist [Cody *et al.*, 1993; Shimomura, 1979]. Somit läßt sich GFP *in vivo* fluoreszenzmikroskopisch leicht nachweisen und sein Fluoreszenzverhalten bleibt auch als Teil eines Fusionsproteins im wesentlichen unverändert.

EGFP ('enhanced' GFP) stellt eine genetische Variante des Wildtyp-GFP dar, bei der das Ersetzen der AS Phenylalanin in Position 64 durch Leucin (F64L) und Serin durch Threonin in Position 65 (S65T) zu einer verbesserten Faltung und einer um das 35fache verstärkten Fluoreszenz führt [Yang *et al.*, 1996a; 1996b]. Verglichen mit dem Wildtyp-GFP bleichen die Modifikationen weniger schnell aus, da ihre Anzahl an korrekt gefalteten und fluoreszierenden GFP-Proteinen bei 37 °C stark erhöht ist. EGFP wird deshalb bevorzugt zur Transfektion von Säugerzellen eingesetzt. Das Anregungsmaximum von EGFP wurde durch die Substitution von 395 nm bzw. 470 nm beim Wildtyp-GFP auf nur ein Maximum von 490 nm verschoben (Rot-Shift-Variante). Die für eine transiente Transfektion eingesetzten Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N3 können anstelle einer Kotransfektion zweier Plasmide zur Fusion von anderen Proteinen an den N- bzw. C-Terminus von EGFP verwendet werden, ohne seine Fluoreszenz dabei einzubüßen [Alexander *et al.*, 1997]. Diese Tatsache macht EGFP zu einem Fluoreszenzmarker, der die Frequenz einer transienten Transfektion aufzeigt und subzelluläre Vorgänge wie Genexpression, Protein-Trafficking und Lokalisation *in vivo* und *in situ* ermöglicht [Chalfie *et al.*, 1994].

Die HC110-R-cDNA (Pos. 83-3057) wurde hierzu mit den Primern P83EGFP_ATGHindIII-5' und P3057EGFP_o.TGASall-3' amplifiziert und unter Berücksichtigung des Leserasters über die HindIII- und Sall-Schnittstellen gerichtet in die beiden Expressionsvektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N3 kloniert. Durch eine sequenzinterne Restriktion und eine Sequenzierung mit sequenzinternen Primern wurde die richtige Orientierung und das Leseraster überprüft. Damit wurde die in den pEGFP-C1-Vektor klonierte HC110-R-cDNA N-terminal und die in den pEGFP-N3-Vektor klonierte HC110-R-cDNA C-terminal mit einem EGFP-Tag fusioniert. Es wurde berücksichtigt, daß das Entfernen von bereits einer AS am N-Terminus oder von 10–15 AS am C-Terminus bereits zum vollständigen Verlust der GFP-Fluoreszenz geführt hätte.

Für vergleichende Expressionsversuche wurde die für einen β_2 -adrenergen Rezeptor (β_2 -R) aus der Maus kodierende cDNA (AC: P18762) [Nakada *et al.*, 1989] mit einem C-terminalen EGFP-Tag fusioniert, indem die β_2 -R-cDNA (Pos. 117-1349) mit dem P117Maus β_2 ARXhoI-5'- und dem P1349Maus β_2 AREcoRI-3'-Primer amplifiziert und über die Schnittstellen XhoI und EcoRI gerichtet in den pEGFP-N3-Vektor kloniert wurde. Auf diesem Wege wurde auch die für den humanen muscarinischen Rezeptors 1 (M1-R; AC: Y00508) [Allard *et al.*, 1987] kodierende cDNA mit den Primern P70HumM1RezXhoI-5' und P1465HumM1RezEcoRI-3' amplifiziert (Pos. 70-1465) und C-terminal mit einem EGFP-Tag fusioniert. Auch hier wurden die jeweiligen Leseraster durch Sequenzierung überprüft. Die resultierenden Fusionsproteine wurden gemäß ihres N- oder C-terminalen EGFP-Tags GFP-HC110-R, HC110-R-GFP, β_2 -R-GFP oder M1-R-GFP genannt.

3.3.3.1 Überprüfung der HC110-R-Expression

Transiente Transfektionsexperimente mit einem HC110-R-GFP-Fusionsprotein wurden in den Säugerzelllinien CHO-K1, HepG2, HeLa, COS-7 und HEK-293 durchgeführt.

Mittels RT-PCR wurde 48 h nach der Transfektion überprüft, ob die HC110-R-mRNA in den verschiedenen Säugerzelllinien nachgewiesen werden konnte (Abb. 12A-C). Hierzu wurden die P2486_ATGBamHI-5'- und P3121_TGAHindIII-3'-Primer zur Amplifizierung eines 665 bp-HC110-R-Fragmentes eingesetzt (Pos. 2486-3121; Abb. 12A, B). Außerdem wurde mit den P84_ATGBamHI-5'- und P593_5RACE-3'-Primern ein weiteres 521 bp-HC110-R-Fragment amplifiziert (Pos. 84-593; Abb. 12C). In Abb. 12A wurden exemplarisch für die mit HC110-R-GFP transfizierte COS-7-Zelllinie die stets mit durchgeführten Kontrollen dargestellt: Jeweils ein Reaktionsansatz enthielt keine RNA (Spur 5), in einem zweiten wurde die RNA zuvor mit DNase-freier RNase verdaut (Spur 6), in einem dritten wurde bei der RT-PCR keine MuLV-Reverse Transkriptase zusetzt (Spur 7) und Ein-Primer-Amplifikate wurden durch Verwendung nur eines Primers, des 5'- (Spur 8) oder 3'-Primers (Spur 9), ausgeschlossen. Weitere Kontrollen enthielten Gesamt-RNA nicht transfizierter oder GFP transfizierter Zellen (Abb. 12B, C). Die amplifizierten 665 bp-Fragmente wurden zusätzlich durch Agarase-Verdau aufgereinigt und mit EcoRI geschnitten, um zu zeigen, daß die HC110-R-Fragmente an ihrer internen EcoRI-Schnittstelle (Pos. 2557-2562) in 2 definierte Teilfragmente von 90 bp und 575 bp zerfielen (nicht gezeigt). Außerdem ließen sich die 665 bp-Fragmente mit den internen Sequenzierprimern 6R2826-5' oder 2U2897-3' ansequenzieren. Somit konnte der Nachweis erbracht werden, daß es sich bei den amplifizierten 665 bp- oder 521 bp-Fragmenten eindeutig um spezifische HC110-R-Fragmente handelte. Lediglich für die HeLa-Zelllinie konnte die Expression von HC110-R nicht über den Nachweis der HC110-R-mRNA erfolgen (Abb. 12A, Spur 3).

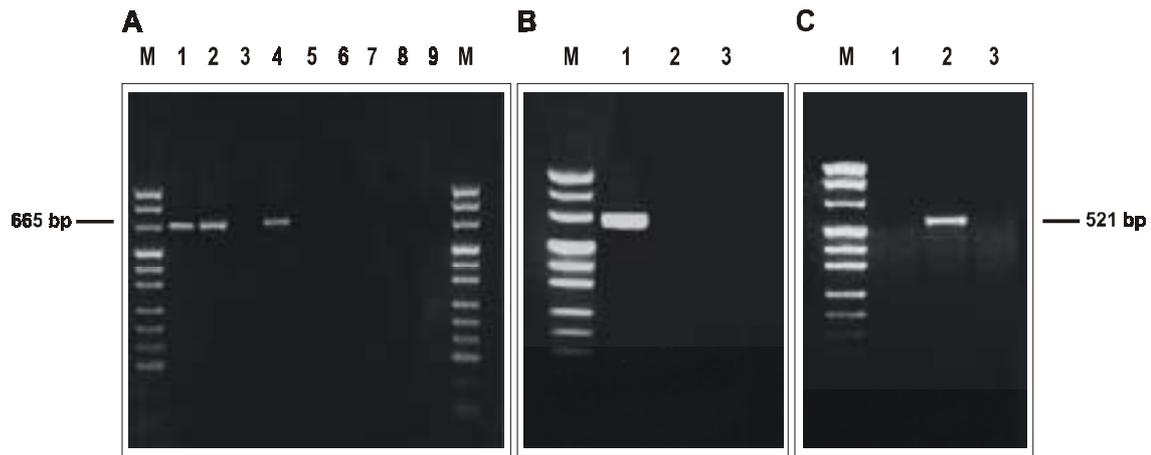


Abb. 12. Nachweis von HC110-R spezifischen Sequenzen in transfizierten HEK-293-Zellen.

- (A) Durch RT-PCR wurde aus Gesamt-RNA transient HC110-R-GFP transfizierter CHO-K1- (1), HepG2- (2), HeLa- (3) und COS-7-Zellen (4) ein 665 bp großes HC110-R-Fragment mit den Primern P2486_ATGBamHI-5' und P3121_TGAHindIII-3' amplifiziert und im 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden exemplarisch für die HC110-R-GFP transfizierten COS-7-Zellen die Kontrollansätze ohne RNA (5); mit zuvor RNase-verdauter RNA (6); ohne MuLV-Reverse Transkriptase (7) und zur Ermittlung von Ein-Primer-Amplifikaten die Reaktionsansätze nur mit dem 5'-Primer (8) oder dem 3'-Primer (9) mit auf das Gel aufgetragen.
- (B) Durch RT-PCR wurde aus Gesamt-RNA transient HC110-R-GFP transfizierter HEK-293-Zellen (1) ein 665 bp großes HC110-R-Fragment mit den Primern P2486_ATGBamHI-5' und P3121_TGAHindIII-3' amplifiziert und im 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde Gesamt-RNA nicht transfizierter (2) sowie GFP transfizierter HEK-293-Zellen (3) unter gleichen Bedingungen amplifiziert.
- (C) Aus Gesamt-RNA transient HC110-R-GFP transfizierter HEK-293-Zellen (2) wurde durch RT-PCR ein weiteres 521 bp großes HC110-R-Fragment mit den Primern P84_ATGBamHI-5' und P593_5RACE-3' amplifiziert und im 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde Gesamt-RNA nicht transfizierter (1) sowie GFP transfizierter HEK-293-Zellen (3) unter gleichen Bedingungen amplifiziert.

Die Längenbestimmung erfolgte jeweils durch 2 µg pUC-Marker (M).

Die Expression des HC110-R-GFP-Proteins wurde zunächst mit Hilfe der Western Blot-Analyse überprüft. Gesamtprotein aus GFP, HC110-R-GFP, β_2 -R-GFP bzw. M1-R-GFP transfizierten sowie nicht transfizierten COS-7- oder HEK-293-Zellen wurde 24 h (Abb. 13A, B) und 48 h (nicht gezeigt) nach der transienten Transfektion durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem Maus-anti-GFP IgG-Primär- und einem Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP-Sekundärantikörper detektiert. Gesamtprotein GFP transfizierter HEK-293- und COS-7-Zellen wies eine starke Bande bei 27 kDa auf (Abb. 13A). Gesamtprotein HC110-R-GFP transfizierter HEK-293-Zellen zeigte eine signifikante Bande bei 137 kDa und eine weitere bei 27 kDa; diese GFP-Bande entsteht, wenn bei der Translation der HC110-R-GFP-cDNA auch das 3'-upstream gelegene Start-ATG mit optimaler Kozak-Sequenz [Kozak, 1986; 1989] genutzt wird. Im Falle von Gesamtprotein aus HC110-R-GFP transfizierten COS-7-Zellen dagegen wurde ausschließlich das 137 kDa Translationsprodukt erkannt (Abb. 13A). Die beiden in HEK-293-Zellen exprimierten Fusionsproteine β_2 -R-GFP und M1-R-GFP wiesen je eine scharfe Bande bei 74 kDa bzw. 78 kDa auf (Abb. 13B). Gesamtprotein aus nicht transfizierten HEK-293-Zellen ergab kein Signal (n. t., Abb. 13A, B).

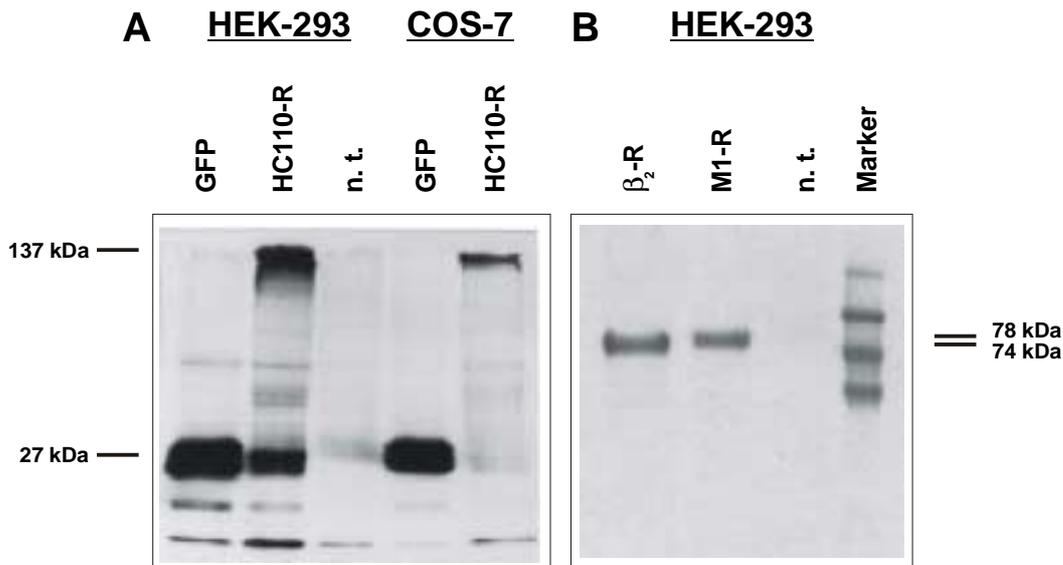


Abb. 13. Überprüfung der Expression von GFP-Fusionsproteinen mittels Western Blot-Analyse.

(A) Gesamtprotein aus transient mit GFP (GFP) oder HC110-R-GFP (HC110-R) transfizierten sowie nicht transfizierten (n. t.) HEK-293- und COS-7-Zellen wurde 24 h nach der Transfektion über die Trizol-Methode isoliert.

(B) Gesamtprotein aus transient mit β_2 -R-GFP (β_2 -R) oder M1-R-GFP (M1-R) transfizierten sowie nicht transfizierten (n. t.) HEK-293-Zellen wurde 24 h nach der Transfektion über die Trizol-Methode isoliert. SDS-Marker-Banden bei 116, 90, 70 und 55 kDa (Marker).

Je 20 μ g Gesamtprotein pro Spur wurden über ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Nach dem Blocken in RotiBlock-Lösung über Nacht erfolgte die Immundetektion mit dem monoklonalen Maus-anti-GFP IgG-Primär- (0,4 μ g/ml) und dem monoklonalen Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP-Sekundärantikörper (1:25000) durch das ECL-System.

Die Methode der analytischen Durchflußcytometrie (FACS) lieferte Daten über den prozentualen Anteil HC110-R exprimierender Zellen (Tab. 7). Dreifach-Ansätze zu je 5×10^5 CHO-K1-, COS-7-, HEK-293- oder HepG2-Zellen wurden transient mit GFP, HC110-R-GFP oder GFP-HC110-R transfiziert. Weitere COS-7- und HEK-293-Zellen wurden mit den beiden anderen GPCRs, dem β_2 -R-GFP oder dem M1-R-GFP, transfiziert. Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen (n. t.), Zellen ohne Plasmid, aber mit dem Transfektionsreagenz FuGENE (o. P. + F.), ferner Zellen mit GFP-Plasmid und ohne FuGENE (GFP o. F.) sowie Zellen mit HC110-R-pBlueskript-Plasmid-DNA und FuGENE (HC110-R-pBlue + F.) eingesetzt.

Die Fluoreszenzanalyse erfolgte 24 h und 48 h nach der Transfektion in einem FACScan bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Pro Messung wurden 10000 Zellen hinsichtlich ihrer Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzfärbung analysiert [Shapiro, 1988]. Durch das Setzen eines 'Gate' auf die Haupt-Zellpopulation wurden Zelltrümmer von der Messung der Fluoreszenzintensität ausgeschlossen. Die Versuche wurden jeweils zweimal unabhängig voneinander unter gleichen Bedingungen durchgeführt und entsprechend gemittelt ($n \geq 3$). Bei der Auswertung fiel auf, daß einige Zellen das jeweilige Fusionsprotein unterschiedlich stark exprimierten, so daß sowohl 24 h als auch 48 h nach der Transfektion jeweils ein 'Gate' auf die gesamten fluoreszierenden und auf die stark fluoreszierenden Zellen gesetzt wurde.

Zelllinie + Plasmid	Fluoreszenz in % (24 h)	n	Starke Fluoreszenz in % (24 h)	n	Fluoreszenz in % (48 h)	n	starke Fluoreszenz in % (48 h)	n
CHO-K1 n. t.	1,67 +/- 0,11	3	0,02 +/- 0,01	3	0,91 +/- 0,18	3	0,01 +/- 0,01	3
CHO-K1 GFP	84,63 +/- 0,91	3	50,68 +/- 0,83	3	62,82 +/- 0,70	3	33,93 +/- 0,58	3
CHO-K1 HC110-R-GFP	34,75 +/- 0,85	3	17,10 +/- 0,62	3	16,37 +/- 0,25	3	4,93 +/- 0,51	3
CHO-K1 GFP-HC110-R	23,48 +/- 0,43	4	10,77 +/- 0,51	4	13,54 +/- 0,18	4	3,82 +/- 0,29	4
CHO-K1 o. P. + F.	1,76 +/- 0,12	3	0,02 +/- 0,01	3	0,89 +/- 0,06	3	0,00 +/- 0,01	3
CHO-K1 GFP o. F.	1,67 +/- 0,17	3	0,01 +/- 0,01	3	0,85 +/- 0,07	3	0,01 +/- 0,00	3
CHO-K1 HC110-R-pBlue + F.	2,04 +/- 0,19	3	0,03 +/- 0,02	3	1,47 +/- 0,31	3	0,02 +/- 0,01	3
HepG2 n. t.	0,91 +/- 0,18	6	0,16 +/- 0,06	6	0,37 +/- 0,29	6	0,17 +/- 0,07	6
HepG2 GFP	6,93 +/- 0,89	6	2,29 +/- 0,74	6	9,51 +/- 0,81	6	2,89 +/- 0,67	6
HepG2 HC110-R-GFP	2,36 +/- 0,63	6	0,72 +/- 0,33	6	4,42 +/- 0,72	6	1,11 +/- 0,15	6
HepG2 GFP-HC110-R	2,05 +/- 0,45	6	0,64 +/- 0,26	6	3,77 +/- 0,58	6	0,89 +/- 0,09	6
HepG2 o. P. + F.	0,33 +/- 0,06	6	0,12 +/- 0,09	6	0,67 +/- 0,43	6	0,19 +/- 0,09	6
HepG2 GFP o. F.	1,07 +/- 0,35	6	0,10 +/- 0,09	6	1,47 +/- 0,38	4	0,11 +/- 0,06	4
HepG2 HC110-R-pBlue + F.	0,53 +/- 0,09	6	0,15 +/- 0,08	6	0,83 +/- 0,47	5	0,25 +/- 0,14	5
COS-7 n. t.	1,87 +/- 0,21	6	0,01 +/- 0,01	6	1,73 +/- 0,15	5	0,08 +/- 0,03	5
COS-7 GFP	13,98 +/- 0,34	6	4,82 +/- 0,22	6	28,38 +/- 0,92	5	12,67 +/- 0,10	5
COS-7 HC110-R-GFP	7,34 +/- 0,47	6	2,44 +/- 0,37	6	12,96 +/- 0,61	5	3,22 +/- 0,49	5
COS-7 GFP-HC110-R	4,48 +/- 0,33	6	1,82 +/- 0,29	6	9,20 +/- 0,54	6	2,68 +/- 0,24	6
COS-7 o. P. + F.	2,64 +/- 0,41	6	0,01 +/- 0,01	6	1,98 +/- 0,09	3	0,00 +/- 0,01	3
COS-7 GFP o. F.	2,78 +/- 0,11	6	0,00 +/- 0,01	6	2,22 +/- 0,06	3	0,02 +/- 0,02	3
COS-7 HC110-R-pBlue + F.	2,20 +/- 0,32	6	0,01 +/- 0,01	6	2,13 +/- 0,21	3	0,01 +/- 0,01	3
COS-7 β_2 -R-GFP	6,31 +/- 0,36	4	1,61 +/- 0,19	4	11,13 +/- 0,73	4	2,94 +/- 0,22	4
COS-7 M1-R-GFP	8,74 +/- 0,84	4	2,87 +/- 0,53	4	16,37 +/- 0,46	4	4,38 +/- 0,12	4
HEK-293 n. t.	1,80 +/- 0,33	5	0,20 +/- 0,05	5	1,55 +/- 0,25	6	0,08 +/- 0,04	6
HEK-293 GFP	27,45 +/- 0,99	4	17,77 +/- 0,68	4	57,43 +/- 0,92	4	39,56 +/- 0,74	4
HEK-293 HC110-R-GFP	12,63 +/- 0,26	4	4,89 +/- 0,13	4	23,27 +/- 0,61	4	10,32 +/- 0,51	4
HEK-293 GFP-HC110-R	8,48	4	3,05 +/- 0,27	4	15,41 +/- 0,33	4	6,15 +/- 0,39	4
HEK-293 o. P. + F.	1,88 +/- 0,49	6	0,21 +/- 0,09	6	1,33 +/- 0,34	4	0,09 +/- 0,06	4
HEK-293 GFP o. F.	1,37 +/- 0,48	6	0,09 +/- 0,05	6	1,74 +/- 0,48	4	0,15 +/- 0,07	4
HEK-293 HC110-R-pBlue + F.	1,90 +/- 0,41	6	0,11 +/- 0,04	6	1,10 +/- 0,37	4	0,09 +/- 0,01	4
HEK-293 β_2 -R-GFP	10,94 +/- 0,61	4	4,69 +/- 0,48	4	30,88 +/- 0,81	4	17,08 +/- 0,61	4
HEK-293 M1-R-GFP	14,32 +/- 0,94	4	6,69 +/- 0,65	4	33,75 +/- 0,79	4	19,36 +/- 0,54	4

Tab. 7. FACS-Analyse von GFP-Fusionsproteinen in Säugerzellen.

Die Zelllinien CHO-K1, HepG2, COS-7 und HEK-293 wurden transient mit GFP, HC110-R-GFP und GFP-HC110-R transfiziert. Die COS-7- und HEK-293-Zellen wurden außerdem noch mit den beiden GPCRs β_2 -R-GFP oder M1-R-GFP transfiziert. Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte (n. t.) Zellen, Zellen ohne Plasmid, aber mit FuGENE (o. P. + F.), Zellen mit GFP und ohne FuGENE (GFP o. F.) oder mit HC110-R-pBlueskript-Plasmid-DNA und FuGENE (HC110-R-pBlue + F.) transfiziert. Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm wurden die gesamten fluoreszierenden Zellen sowie die stark fluoreszierenden Zellen 24 h und 48 h nach der Transfektion in % gemessen. n = Anzahl der Reproduktionen

Die transiente Transfektion in CHO-K1-Zellen mit dem polykationischen Transfektionsreagenz FuGENE lieferte bereits nach 24 h eine hohe Expressionsrate: Rund 85 % der Zellen exprimierten GFP, 51 % sogar stark; nach 48 h zeigten nur noch 63 % der Zellen eine GFP-Fluoreszenz, 34 % eine starke. Auch im Falle der HC110-R-GFP-Fusionsproteine betrug die gesamte Fluoreszenz nach 24 h rund 35 % mit 17 % stark fluoreszierenden Zellen, nach 48 h betrug die Fluoreszenz nur noch 16 % mit 5 % stark fluoreszierenden Zellen. GFP-HC110-R wurde nach 24 h mit rund 23 % deutlich geringer exprimiert, nur etwa 11 % der Zellen zeigten eine starke Fluoreszenz; nach 48 h fluoreszierten lediglich 14 % der Zellen, 4 % stark. Die HepG2- und COS-7-Zellen exprimierten bereits das GFP-Kontrollprotein deutlich geringer: Nur rund 7 % der GFP transfizierten HepG2-Zellen fluoreszierten nach 24 h, darunter 2 % stark. Anders als bei den CHO-K1-Zellen erhöhte sich die Fluoreszenz nach 48 h auf 10 %, mit 3 % stark fluoreszierenden Zellen. Und auch für die Fusionsproteine HC110-R-GFP und GFP-HC110-R bestätigte sich diese Tendenz: Nach 24 h (48 h) fluoreszierten 2 % (4 %) der HC110-R-GFP transfizierten HepG2-Zellen, rund 1 % (1 %) stark. Nach 24 h (48 h) exprimierten 2 % (4 %) der COS-7-Zellen GFP-HC110-R, darunter 1 % (1 %) stark. COS-7-Zellen ließen sich besser als HepG2-Zellen transfizieren: Nach 24 h (48 h) exprimierten 15 % (28 %) der Zellen GFP mit 5 % (13 %) stark fluoreszierenden Zellen. HC110-R-GFP exprimierten nach 24 h (48 h) immerhin 7 % (2 %) der Zellen, 2 % (3 %) fluoreszierten stark. Auch hier ließ sich GFP-HC110-R mit 4 % (9 %) nach 24 h (48 h), darunter 2 % (3 %) stark fluoreszierende Zellen, deutlich schwächer transfizieren. Um zu sehen, ob andere C-terminal mit einem GFP-Tag fusionierte GPCRs ähnliche Expressionswerte zeigten, wurden die beiden GPCRs, β_2 -R-GFP und M1-R-GFP, mitgemessen. Nach 24 h (48 h) exprimierten 6 % (11 %) der COS-7-Zellen β_2 -R-GFP, 2 % (3 %) stark. Im Falle des M1-R-GFP fluoreszierten 9 % (16 %) der Zellen, darunter 3 % (4 %) stark. Gute Transfektionsergebnisse nach 24 h und 48 h wurden mit den HEK-293-Zellen erzielt: Nach 24 h (48 h) exprimierten 27 % (57 %) der Zellen GFP, mit 18 % (40 %) stark fluoreszierenden Zellen. HC110-R-GFP wurde nach 24 h (48 h) zu 13 % (23 %) exprimiert, zu 5 % (10 %) stark; GFP-HC110-R wurde zu 8 % (15 %) exprimiert, darunter 3 % (6 %) stark fluoreszierende Zellen. Vergleichbare Werte lieferte auch der β_2 -R-GFP-Rezeptor mit 11 % (31 %) fluoreszierenden und 5 % (17 %) stark fluoreszierenden Zellen sowie der M1-R-GFP-Rezeptor mit 14 % (34 %) fluoreszierenden, darunter 7 % (19 %) stark fluoreszierende Zellen nach 24 h (48 h). Für HeLa-Zellen konnte ähnlich wie bei dem RT-PCR-Ansatz keine signifikante Expression ausgemacht werden (nicht gezeigt). Die stets mit durchgeführten Negativkontrollen, d. h. nicht transfizierte Zellen (n. t.), Zellen ohne Plasmid und mit FuGENE (o. P. + F.), Zellen mit dem HC110-R-pBlueskript-Plasmid und FuGENE (HC110-R-pBue + F.) und Zellen mit GFP, aber ohne FuGENE (GFP o. F.) zeigten jeweils signifikant niedrigere, und damit zu vernachlässigende Hintergrundfluoreszenzen (Tab. 7).

3.3.3.2 Zelluläre Lokalisation von HC110-R

Nachdem gezeigt werden konnte, daß transfierte CHO-K1-, COS-7-, HepG2- und HEK-293-Zellen HC110-R exprimierten, wenngleich auch in unterschiedlichem Ausmaß, wurde überprüft, wo HC110-R in der Zelle lokalisiert ist (Abb. 14).

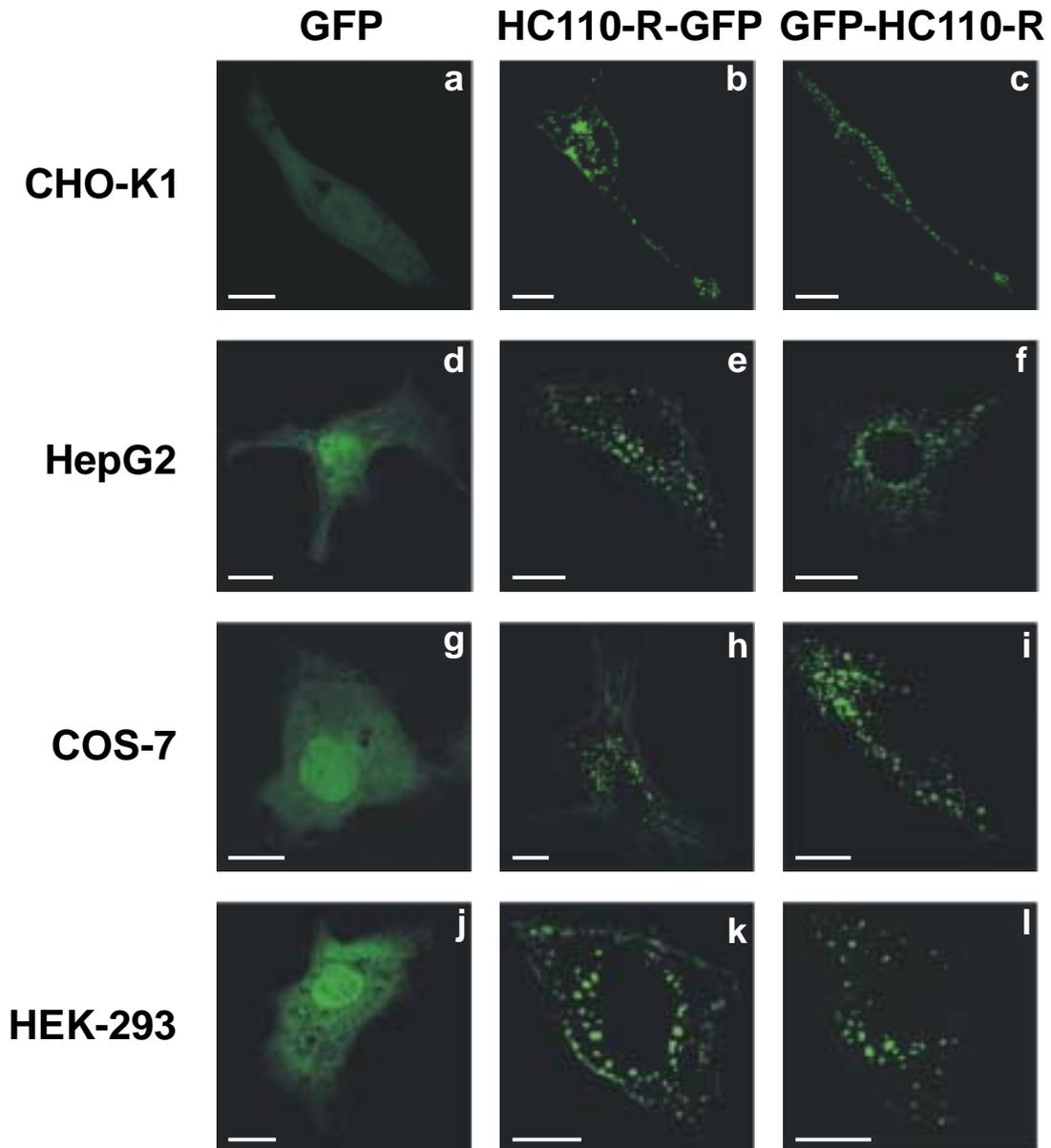


Abb. 14. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie von GFP und HC110-R.

CHO-K1-, HepG2-, COS-7- und HEK-293-Zellen wurden transient mit GFP bzw. dem C- oder N-terminalen Fusionsprotein HC110-R-GFP bzw. GFP-HC110-R transfiziert: GFP, HC110-R-GFP und GFP-HC110-R in CHO-K1- (a, b und c), in HepG2- (d, e und f), COS-7 (g, h und i) und HEK-293-Zellen (j, k und l). Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für 24 h auf 1 % gelatinebeschichteten Deckgläschen. Danach wurden die Zellen mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS⁻ (pH 7,2) für 30 min bei 37 °C fixiert. GFP und die HC110-R-Fusionsproteine wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt und mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel gescannt. Der Balken entspricht 10 µm.

Die Methode der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie erlaubt gegenüber der Phasenkontrastmikroskopie optische Schnittserien durch die Zelle [Celis, 1998]. Durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie konnten die einzelnen Expressionsorte von GFP, HC110-R-GFP und GFP-HC110-R in CHO-K1- (Abb. 14a-c), HepG2- (Abb. 14d-f), COS-7- (Abb. 14g-i) und HEK-293-Zellen (Abb. 14j-l) lokalisiert werden. Das GFP-Protein wurde gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt und gelangte durch die geringe Größe von 27 kDa sowie durch eine Überexpression möglicherweise auch passiv in den Zellkern (Abb. 14a, d, g und j) [Celis, 1998]. HC110-R-GFP trat in unterschiedlichem Ausmaß an der Plasmamembran und in Vesikeln auf (Abb. 14b, e, h und k). GFP-HC110-R wurde dagegen ausschließlich in Vesikeln beobachtet (Abb. 14c, f, i und l). Des weiteren beobachtete man bei vielen mit HC110-R-GFP und GFP-HC110-R transfizierten Zellen vermehrt größere fluoreszierende Cluster in der Nähe des Zellkerns (Abb. 14b, c; Abb. 15A). Mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie wurden 3x 200 mit HC110-R-GFP transient transfizierte COS-7-Zellen nach 24 h und 48 h auf ihre Expression in der Plasmamembran und/oder in Vesikeln untersucht (Tab. 8).

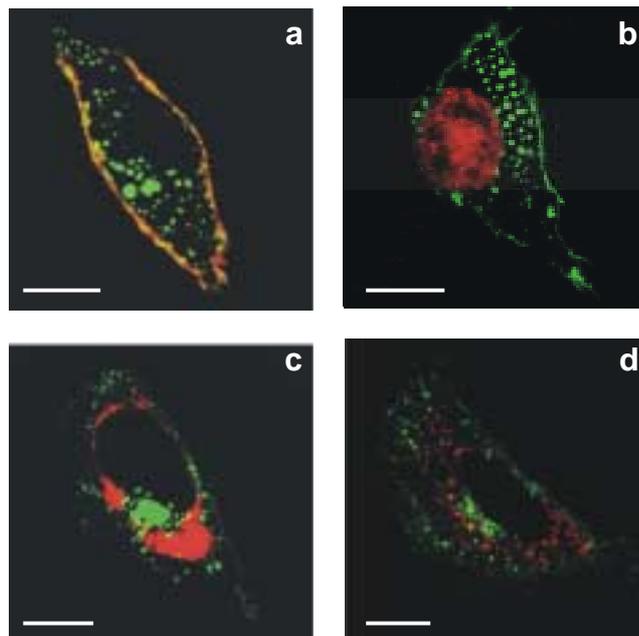
Zelllinie + Plasmid	24 h nach der Transfektion			48 h nach der Transfektion		
	Vesikel	Ves. + Mem.	Membran	Vesikel	Ves. + Mem.	Membran
CHO-K1 HC110-R-GFP	92 %	8 %	0 %	96 %	4 %	0 %
HepG2 HC110-R-GFP	66 %	26 %	8 %	85 %	11 %	4 %
COS-7 HC110-R-GFP	64 %	30 %	6 %	83 %	14 %	3 %
HEK-293 HC110-R-GFP	76 %	21 %	3 %	85 %	12 %	3 %
CHO-K1 β_2 -R-GFP	76 %	4 %	20 %	48 %	38 %	14 %
HepG2 β_2 -R-GFP	70 %	5 %	25 %	65 %	23 %	12 %
COS-7 β_2 -R-GFP	79 %	8 %	13 %	64 %	28 %	8 %
HEK-293 β_2 -R-GFP	60 %	16 %	24 %	54 %	36 %	10 %
CHO-K1 M1-R-GFP	1	12 %	87 %	0	11 %	89 %
HepG2 M1-R-GFP	2	8 %	90 %	2	12 %	86 %
COS-7 M1-R-GFP	4	3 %	93 %	2	4 %	94 %
HEK-293 M1-R-GFP	3	20 %	77 %	4	25 %	71 %

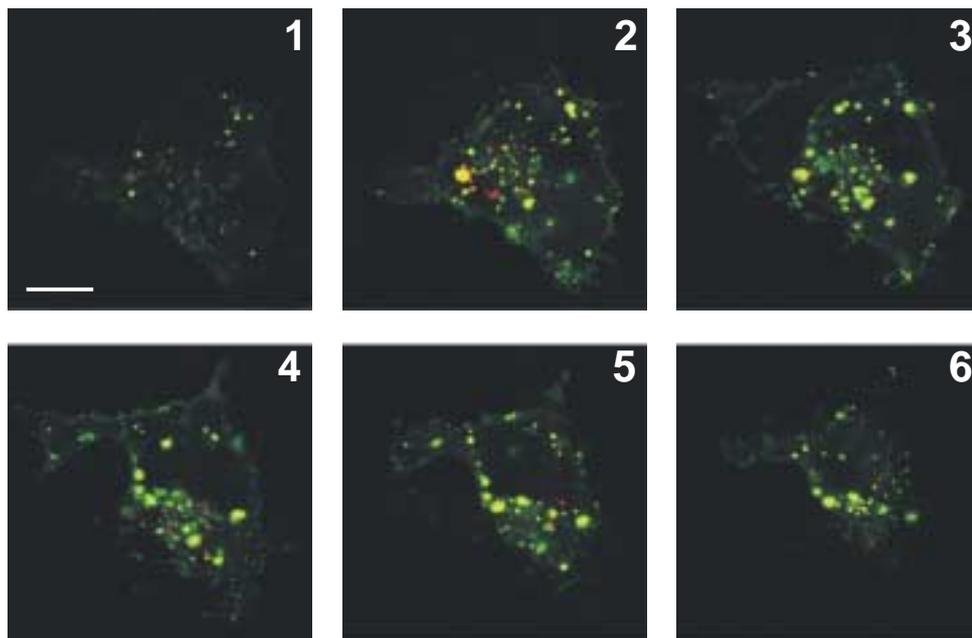
Tab. 8. Prozentuale Verteilung von GFP-Fusionsproteinen in Vesikeln und/oder der Membran. Je 3x 200 mit HC110-R-GFP, β_2 -R-GFP oder M1-R-GFP transient transfizierte CHO-K1-, HepG2-, COS-7- oder HEK-293-Zellen wurden 24 h und 48 h nach der Transfektion fixiert und im konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht, ob sie das Fusionsprotein ausschließlich in den Vesikeln (Vesikel), in Vesikeln und an der Plasmamembran (Ves. + Mem.) oder nur an der Plasmamembran (Membran) exprimieren. Die Ergebnisse wurden gemittelt und in Prozent angegeben.

Beim Vergleich HC110-R-GFP transfizierter Zellen nach 24 h mit denen nach 48 h fiel auf, daß HC110-R in allen 4 untersuchten Zelllinien nach 48 h verstärkt in den Vesikeln und insbesondere in großen Clustern beim Nukleus exprimiert wurde. Lediglich bei den CHO-K1-Zellen, die mit einem HC110-R-Fusionsprotein transfiziert worden waren, konnte bereits 24 h nach der Transfektion bei einem Teil der Zellen ein Abrunden und Ablösen von den Zellkulturschalen beobachtet werden.

In den durchgeführten Kolokalisationsstudien erschienen diejenigen Kompartimente, die das GFP-Fusionsprotein exprimierten, durch gleichzeitige Anregung der GFP-Fluoreszenz bei 488 nm (grün) und der gegen ein bestimmtes Zellkompartiment gerichteten rot-fluoreszierenden Antikörper bei 568 nm (rot) gelblich. Kolokalisationsexperimente mit ConA-Rhodamin belegten eindeutig, daß HC110-R zum Teil an der Plasmamembran exprimiert wurde (Abb. 15Aa). Eine Färbung mit Propidiumiodid dagegen zeigte, daß HC110-R nicht im Zellkern vorkommt (Abb. 15Ab). Ferner konnte durch Anfärbung des ERs mit Hilfe eines Maus-anti-KDEL IgG-Antikörpers (Abb. 15Ac) und der Mitochondrien mit einem MitoTracker™ Red CMX Ros (Abb. 15Ad) eine Expression von HC110-R in diesen Kompartimenten ausgeschlossen werden. Markierte man dagegen die sauren Kompartimente (Lysosomen, Endosomen) mit einem LysoTracker™ Red DND-99, so ließen sich über die gescaanten Schichten (je 0,5 µm) nahezu alle HC110-R exprimierenden Vesikel den sauren Vesikeln zuordnen (Abb. 15B).

A



B**Abb. 15. Kolokalisationsexperimente mit HC110-R.**

(A) Kolokalisation HC110-R-GFP transfizierter COS-7-Zellen mit ConA-Rhodamin (a), durch Anfärbung des Zellkerns mit Propidiumiodid nach vorausgegangenem Verdau der RNA mit RNase A (b); Kolokalisation von HC110-R-GFP mit einem gegen das ER gerichteten Maus-anti-KDEL 78 kDa (Grp/Bip) IgG-Primär- und einem Ziege-anti-Maus IgG Alexa 568-Konjugat-Sekundärantikörper (c) und mit einem gegen Mitochondrien gerichteten MitoTracker™ Red CMX Ros (d). Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für 24 h auf gelatinebeschichteten Deckgläschen. Danach wurden die Zellen mit 3,7 % Paraformaldehyd und 0,02 % Glutardialdehyd fixiert und freie Aldehydgruppen mit 0,1 % Natriumborhydrid reduziert.

(B) Schnittserie (je 0,5 µm) HC110-R-GFP transfizierter COS-7-Zellen 24 h nach der Transfektion. Kolokalisation mit einem gegen saure Kompartimente gerichteten LysoTracker™ Red DND-99.

Die HC110-R-GFP-Fusionsproteine wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm (grün) mit einem Argon-Laser und die mit rot-fluoreszierenden Antikörpern markierten Kompartimente wurden bei 568 nm (rot) mit einem Krypton-Laser zur Fluoreszenz angeregt. Die Zellen wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel gescannt. Der Balken entspricht jeweils 10 µm.

In nachfolgenden Transfektionsversuchen sollte überprüft werden, ob auch andere C-terminal mit GFP fusionierte GPCRs in ähnlicher Weise ihr Protein exprimieren. Hierzu wurden die beiden Rezeptoren β_2 -R-GFP (74 kDa) und M1-R-GFP (78 kDa) in CHO-K1-, HepG2-, COS-7- oder HEK-293-Zellen transient transfiziert. Der β_2 -R-GFP-Rezeptor wurde ebenfalls in unterschiedlichem Ausmaß an der Plasmamembran und in Vesikeln exprimiert: 24 h nach der Transfektion exprimierten 60-76 % der 4 verschiedenen untersuchten Zelllinien β_2 -R-GFP ausschließlich vesikulär, 4-16 % wiesen es sowohl in Vesikeln, als auch an der Membran auf, und 13-25 % ausschließlich an der Plasmamembran (Tab. 8). Nach 48 h reduzierte sich der Anteil derjenigen Zellen, die β_2 -R-GFP ausschließlich vesikulär exprimierten signifikant auf 48-65 %. Auffällig ist, daß sich der prozentuale Anteil der Zellen, die β_2 -R nur an der Plasmamembran exprimierten von 13-25 % nach 24 h auf 8-14 % nach 48 h reduzierte und dafür nach 48 h vermehrt Protein sowohl an der Plasmamembran als auch in

Vesikeln auftrat. Es traten also 2 Effekte auf: Zum einen wurde - anders als bei HC110-R-GFP - nach 48 h weniger β_2 -R-GFP ausschließlich in Vesikeln exprimiert als nach 24 h, und zum anderen wurde dafür mehr β_2 -R in Vesikeln und Membran, und weniger nur in der Plasmamembran exprimiert (Tab. 8). Der Zellkern β_2 -R-GFP transfizierter Zellen zeigte keine GFP-Fluoreszenz (Abb. 16a). Aber es bestand ein signifikanter Unterschied in der Expression verglichen mit HC110-R: Der β_2 -R ließ sich zwar teilweise mit den sauren Kompartimenten über den LysoTracker™ Red DND-99 kolokalisieren (Abb. 16b), aber er wurde auch im ER über Maus-anti-KDEL IgG-Antikörper detektiert (Abb. 16c).

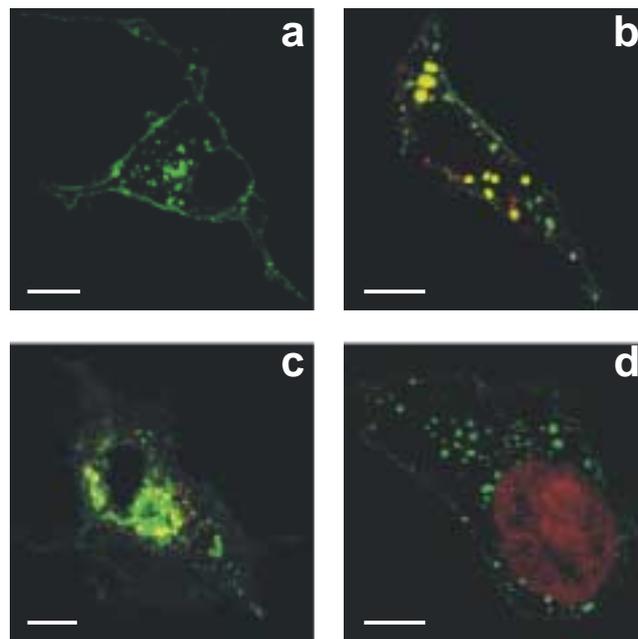


Abb. 16. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie der GFP-Fusionsproteine β_2 -R und M1-R. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für 24 h auf gelatinebeschichteten Deckgläschen. Danach wurden die Zellen mit 3,7 % Paraformaldehyd und 0,02 % Glutardialdehyd fixiert und freie Aldehydgruppen mit 0,1 % Natriumborhydrid reduziert. Die GFP-Fusionsproteine wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm (grün) mit einem Argon-Laser und die mit einem rot-fluoreszierenden Antikörper markierten Kompartimente bei 568 nm (rot) mit einem Krypton-Laser zur Fluoreszenz angeregt. Die Zellen wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel gescannt. Der Balken entspricht jeweils 10 μ m.

- (a) β_2 -R-GFP transfizierte COS-7-Zellen.
- (b) Kolokalisation β_2 -R-GFP transfizierter COS-7-Zellen mit einem gegen saure Kompartimente gerichteten LysoTracker™ Red DND-99.
- (c) Kolokalisation β_2 -R-GFP transfizierter COS-7-Zellen mit einem gegen das ER gerichteten Maus-anti-KDEL 78 kDa (Grp/Bip) IgG-Primär- und einem Ziege-anti-Maus IgG Alexa 568-Konjugat-Sekundärantikörper.
- (d) M1-R-GFP transfizierte COS-7-Zellen. Anfärbung des Zellkerns mit Propidiumiodid nach vorausgegangenem Verdau der RNA mit RNase A.

Anders als bei HC110-R-GFP und β_2 -R-GFP wiesen nur 0-4 % der CHO-K1-, HepG2-, COS-7- oder HEK-293-Zellen sowohl 24 h als auch 48 h nach der Transfektion ausschließlich M1-R-GFP vesikulär sowie nur 3-25 % in Vesikeln und an der Plasmamembran auf. Zum überwiegenden Teil konnte M1-R-GFP mit 71-94 % nur an der Plasmamembran lokalisiert werden (Tab. 8 und Abb. 16d). Dabei zeigte sich bei keiner der untersuchten Zelllinien ein signifikanter Unterschied im Verteilungsmuster M1-R-GFP transfizierter Zellen nach 24 h verglichen mit dem nach 48 h.

3.3.4 Stabile Expression von HC110-R

Für nachfolgende Untersuchungen, insbesondere Bindungs- und physiologische Studien der Signaltransduktion mittels Ca^{2+} -Imaging bot sich die stabile Expression von HC110-R in Säugerzellen an. Der Vorteil einer stabilen Zelllinie gegenüber einer transient transfizierten ist, daß jede Zelle das gewünschte Protein dauerhaft und in gleichbleibender Qualität exprimiert und eine Isolation des Proteins nach der Lokalisation möglich wird.

Für die Klonierung wurde das Signalpeptid des Expressionsvektors pSecTagA durch NheI/SfiI-Doppelverdau eliminiert. Der religierte Vektor wurde im folgenden als pMyc6xHis bezeichnet. Die mit den Primern P83MycTag_ATGBamHI-5' und P3058MycTag_o.TGAXbaI-3' amplifizierte HC110-R-Plasmid-DNA (Pos. 83-3058) wurde unter Berücksichtigung des Leserasters über die BamHI- bzw. XbaI-Schnittstelle gerichtet in den pMyc6xHis-Vektor kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Im folgenden wurde die optimale Zeocin-Konzentration zur Selektion durch Erstellen einer 'Killing Curve' für die HepG2- und COS-7-Zelllinie ermittelt. 48 h nach der transienten Transfektion des Plasmids wurden transfizierte Zellen durch Zugabe von 0,4 mg/ml Zeocin zu den HepG2-, bzw. 0,3 mg/ml Zeocin zu den COS-7-Zellen selektioniert. Nach etwa 2 Wochen konnten einzelne Zeocin-resistente Kolonien ausgemacht und subkultiviert werden. Diese wurden auf kleinen Gewebekulturplatten (\varnothing 35 mm), bzw. 32er oder 96er Zellkulturmikrotestplatten nahezu vereinzelt und weiterhin unter Selektionsdruck gehalten.

Des weiteren wurde die in den pMyc6xHis-Vektor klonierte HC110-R-cDNA zusammen mit dem C-terminalen Myc/His-Tag mit den Primern P83_ATGNotI-5' und pMycHis_TGABamHI-3' amplifiziert und in den NotI/BamHI doppelt verdauten bicistronischen Expressionsvektor pIRES1neo kloniert. Die Überprüfung des Leserasters erfolgte auch hier durch Sequenzierung der aufgereinigten Plasmid-DNA. 48 h nach der transienten Transfektion des Plasmids in HepG2-, COS-7- oder HEK-293-Zellen wurde die zuvor ermittelte optimale Neomycin-Konzentration (G418) als Selektionsmarker zugesetzt: Sie betrug für HepG2-Zellen 0,5 mg/ml, und für COS-7- bzw. HEK-293-Zellen 1 mg/ml. Nach 2-4 Wochen wurden einzelne G418-resistente Kolonien isoliert und, wie oben beschrieben, subkultiviert.

Mit Hilfe der RT-PCR wurde untersucht, ob sich ausgehend von Gesamt-RNA stabil HC110-R-Myc/His transfizierter COS-7- (Abb. 17A) und HEK-293-Zellen (nicht gezeigt) HC110-R spezifische Sequenzen amplifizieren ließen. Als Positivkontrolle wurde Gesamt-RNA von *H. contortus* eingesetzt. So konnte mit den Primerpaaren P2486_ATGBamHI und P3121_TGAHindIII-3' ein 665 bp-Fragment (Pos. 2486-3121; Abb. 17A, Spuren 2-4), und mit P84_ATGBamHI-5' und P593_5RACE-3' ein 521 bp-HC110-R-Fragment (Pos. 84-593; Abb. 17A, Spuren 5-7) in der Gesamt-RNA von *H. contortus* und stabil transfizierten COS-7-Zellen nachgewiesen werden. In nicht transfizierten COS-7-Zellen wurde kein HC110-R-spezifisches Fragment amplifiziert (Abb. 17A, Spuren 1 und 8). Bei den gefundenen Banden handelte es sich um spezifische Produkte der HC110-R-mRNA, denn es konnten weder Ein-Primer-Amplifikate, noch Produkte ausgemacht werden, nachdem die RNA zuvor durch DNase-freie RNase verdaut wurde, von vornherein fehlte oder dem Reaktionsansatz keine MuLV-Reverse Transkriptase zugesetzt wurde.

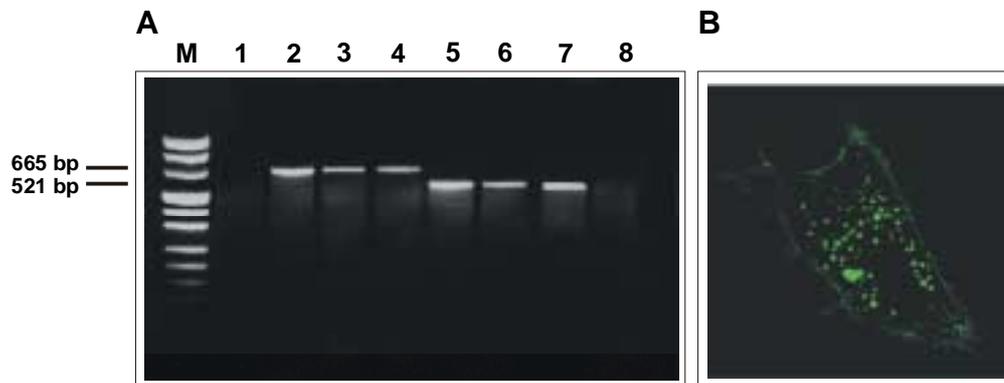


Abb. 17. Nachweis der HC110-R-Myc/His-Sequenz durch RT-PCR und Lokalisation von stabil exprimiertem HC110-R-Myc/His durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie.

- (A) Je 1 µg Gesamt-RNA von *H. contortus* (Spuren 2 und 5) sowie von nicht transfizierten (Spuren 1 und 8) und stabil mit dem HC110-R-Myc/His-Konstrukt in dem pIRES1neo- (Spuren 3 und 6) bzw. pMyc6xHis-Vektor (Spuren 4 und 7) transfizierten COS-7-Zellen wurden zunächst einer RT-PCR unterzogen. Die anschließende Amplifikation eines 665 bp Fragmentes erfolgte mit je 2 µM der Primer P2486_ATGBamHI-5' und P3121_TGAHindIII-3' bei einer Annealing-Temperatur von 58/62 °C (Spuren 1-4), bzw. die eines 521 bp Fragmentes mit je 2 µM der Primer P84_ATGBamHI-5' und P593_5RACE-3' bei einer Annealing-Temperatur von 56 °C (Spuren 5-8). In einem 2 %igen TBE-Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid wurden neben 2 µg pUC-Marker (Spur M) jeweils 1/10 der PCR-Ansätze aufgetragen.
- (B) Stabil mit dem HC110-R-Myc/His-Konstrukt in dem pIRES1neo-Vektor transfizierte COS-7-Zellen wurden fixiert, freie Aldehydgruppen mit 0,1 % Natriumborhydrid reduziert, mit 0,13 µg/ml eines Maus-anti-c-Myc 9E10-SC-40 IgG- und 20 µg/ml eines Ziege-anti-Maus IgG F(ab')₂ Fragment Konjugat-Alexa 488-Antikörpers detektiert. Die Fusionsproteine wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm mit einem Argon-Laser zur Fluoreszenz angeregt. Mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel wurden die Zellen gescannt. Der Balken entspricht 10 µm.

Die stabile Expression des HC110-R-Myc/His-Proteins wurde zunächst durch Western Blot-Analyse überprüft (Abb. 18). Das 116 kDa große HC110-R-Myc/His-Fusionsprotein konnte mit dem Maus-anti-c-Myc IgG- und einem Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP-Antikörper in stabil transfizierten COS-7- (Abb. 18A, Spuren 2 und 3), und HEK-293-Zellen (Abb. 18C, Spur 2) detektiert werden. Auch über den Maus-anti-His IgG-Antikörper (Abb. 18B, Spuren 2 und 3) ließ sich der HC110-R-Myc/His-Rezeptor detektieren. Somit konnte für COS-7- und HEK-293-Zellen gezeigt werden, daß das HC110-R-Myc/His-Konstrukt sowohl nach der Klonierung in den pIRES1neo- (Abb. 18A-C, je Spur 2), als auch in den pMyc6xHis-Expressionsvektor (Abb. 18A, B, je Spur 3) zu einer HC110-R-Expression in ausreichender Qualität führte.

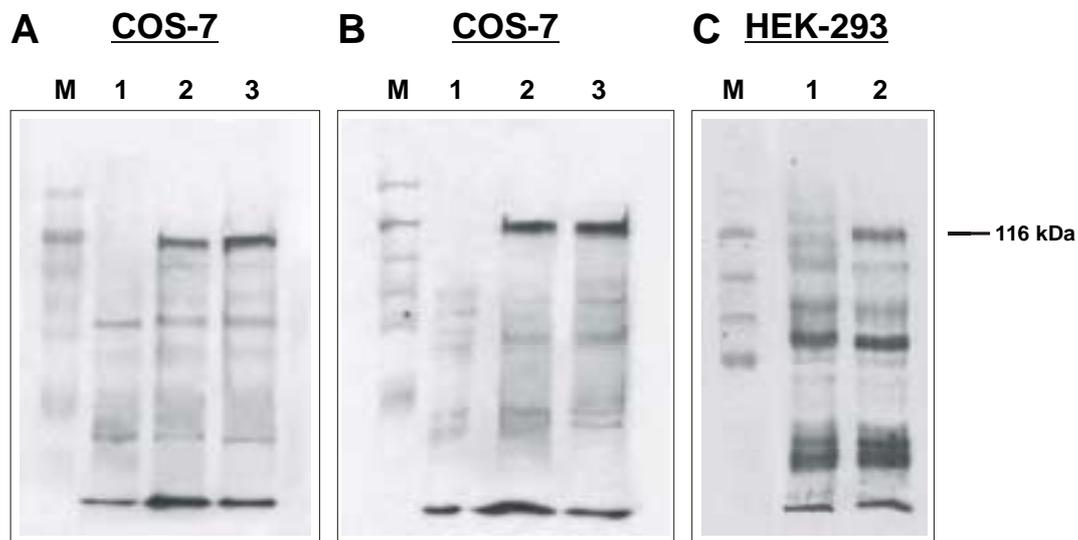


Abb. 18. Nachweis der stabilen Expression von HC110-R-Myc/His durch Western Blot-Analyse.

Gesamtprotein (20 µg/Spur) nicht transfizierter (1) sowie stabil mit dem HC110-R-Myc/His-Konstrukt in dem pIRES1neo- (2) oder dem pMyc6xHis-Vektor (3) transfizierter COS-7- (A1-3 und B1-3) bzw. HEK-293-Zellen (C1 und 2) wurde in 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und geblottet. Die Expression des 116 kDa großen HC110-R-Myc/His-Proteins wurde mit 0,5 µg/ml eines Maus-anti-c-Myc 9E10-SC-40 IgG-Primär- (A und C) oder aber 0,1 µg/ml eines Maus-anti-His IgG-Primär- (B) und jeweils einem Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP-Sekundärantikörper (1:25000) und dem ECL-System detektiert. 5 µg des Sigma-‘Prestained’ SDS-Markers (M) dienen der Größenbestimmung (196, 116, 90, 70, 55, 38 und 32 kDa).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß stabil mit dem HC110-R-Myc/His-Konstrukt in dem pIRES1neo-Vektor transfizierte COS-7- (Abb. 17B), wie auch HEK-293-Zellen (nicht gezeigt) HC110-R-Myc/His in der Plasmamembran und in Vesikeln exprimierten. Dabei wurde HC110-R über seinen C-terminalen Myc/His-Tag mit einem Maus-anti-c-Myc IgG-Antikörper und einem Ziege-anti-Maus IgG Alexa 488-Konjugat detektiert. Schnittserien durch die Zelle zeigten, daß HC110-R in der Plasmamembran exprimiert wurde, wenngleich auch nicht gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt. Verglichen mit den transienten Transfektionen wurde HC110-R nur in wenigen Vesikeln detektiert, die auch keine ausgeprägten Cluster in der Nähe des Nucleus ausbildeten.

3.4 ATP-abhängige Sequestrierung von HC110-R

Die Beobachtung, daß transient mit HC110-R-GFP transfizierte CHO-K1-, HepG2-, COS-7- und auch HEK-293-Zellen HC110-R bereits 24 h nach der Transfektion vermehrt in sauren Lysosomen aufweisen (64-92 %), und sich dieser Anteil nach weiteren 24 h noch einmal signifikant erhöht (83-96 %; Kap. 3.3.3.2), läßt auf einen energieabhängigen Transport von HC110-R in den Zellen schließen. Von zahlreichen in der Plasmamembran assoziierten GPCRs ist bekannt, daß sie desensitiviert werden: Es handelt sich dabei um einen Mechanismus, mit dem sowohl eine kurzfristige als auch eine langfristige Regulation der Rezeptoraktivität und der Signaltransduktion möglich ist [Yu *et al.*, 1993; von Zastrow und Kobilka, 1994; Pippig *et al.*, 1995; Koenig und Edwardson, 1997].

Um nun einen Zusammenhang zwischen einer möglichen Internalisierung von HC110-R in saure Lysosomen und dem Energiemetabolismus der Zellen auszumachen, wurde die Konzentration an intrazellulärem ATP nach von Zastrow und Kobilka [1992; 1994] durch Behandlung der COS-7-Zellen mit NaN_3 erniedrigt, welches u. a. für die Sequestrierung und den Abbau von Rezeptoren benötigt wird. COS-7-Zellen wurden für dieses Experiment ausgewählt, da sie im Gegensatz zu den HepG2-Zellen HC110-R-GFP in ausreichender Menge an der Plasmamembran exprimieren und anders als in HEK-293-Zellen die Anlage, intrazelluläre Cluster zu bilden, ausgeprägt ist. Die Zugabe von NaN_3 erfolgte 1 h und 18 h vor der Transfektion für jeweils 1 h, 18 h bzw. 42 h, oder 6 h nach der Transfektion für 1 h, 18 h bzw. 42 h. Insgesamt wurden 600 HC110-R-GFP transient transfizierte COS-7-Zellen in 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten 24 h und 48 h nach der Transfektion im konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht, ob HC110-R in der Plasmamembran und/oder in Vesikeln exprimiert wurde.

Die Gabe von NaN_3 1 h vor bzw. nach der Transfektion für jeweils 1 h führte noch zu keiner signifikanten Verschiebung der HC110-R-Expression in Richtung Plasmamembran. Wurde NaN_3 18 h vor der Transfektion für 18 h oder 42 h zugesetzt, blieb die Expression von HC110-R-GFP und der GFP-Kontrolle aus. D. h., es wurde nicht nur aufgrund eines unzureichend gebildeten GFP-Chromophors keine GFP-Eigenfluoreszenz mehr beobachtet, sondern HC110-R-GFP und auch die GFP-Kontrolle ließen sich nicht mehr durch Western Blot-Analyse oder konfokale Laserscanning-Mikroskopie mit einem Maus-anti-GFP IgG- und einen Ziege-anti-Maus IgG Konjugat-Alexa 488-Antikörper detektieren. Möglicherweise führte die Zugabe von NaN_3 vor der Transfektion zu Zellschädigungen, die die Expression von HC110-R-GFP und GFP verhinderten. Dagegen erhöhte sich bei Zugabe von NaN_3 6 h nach der Transfektion für 18 h (42 h) der Anteil HC110-R exprimierender Zellen mit Fluoreszenz sowohl in der Plasmamembran als auch in den Vesikeln signifikant von 36 % auf 48 % (17 % auf 24 %) im Vergleich zu unbehandelten HC110-R transfizierten COS-7-Zellen. In Übereinstimmung damit sank der prozentuale Anteil derjenigen Zellen, die HC110-R

nach 18 h (42 h) ausschließlich in Vesikeln exprimiert hatten von 64 % auf 52 % (83 % auf 76 %). Die Expression von GFP blieb hingegen unverändert. Durch Erniedrigung intrazellulären ATPs wurde verstärkt mehr HC110-R-GFP in der Plasmamembran nachgewiesen werden.

3.5 Lokalisation des orthologen B0457-Proteins in *C. elegans*

Immunsereen gegen HC110-R wurden in Kaninchen erzeugt, um HC110-R detektieren zu können. Für die *in vivo* Lokalisation bot sich der freilebende und auf Agarplatten gut kultivierbare Nematode *C. elegans* an, denn bei dem B0457-Genprodukt mit höchster Sequenzidentität zu HC110-R handelt es sich wahrscheinlich um das orthologe Protein zu HC110-R in *C. elegans*.

Das Austesten der gegen HC110-R gerichteten Immunsereen erfolgte mit Hilfe der Western Blot-Analyse. Dafür wurde Gesamtprotein adulter *H. contortus* Nematoden, des in *E. coli* exprimierten N- und C-Terminus von HC110-R sowie Gesamtprotein aus HC110-R stabil transfizierten und nicht transfizierten HEK-293-Zellen durch SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Immunsereen, die sich zum einen gegen den in *E. coli* exprimierten und über Affinitätschromatographie aufgereinigten 21 kDa großen C-Terminus (Abb. 19A), und zum anderen gegen den 54 kDa großen N-Terminus von HC110-R richteten (Abb. 19B), erkannten die jeweilige Domäne nach dem 3. Boost - im Gegensatz zu den zugehörigen Präimmunsereen - signifikant in der jeweils induzierten *E. coli*-Gesamtprotein-Fraktion wieder.

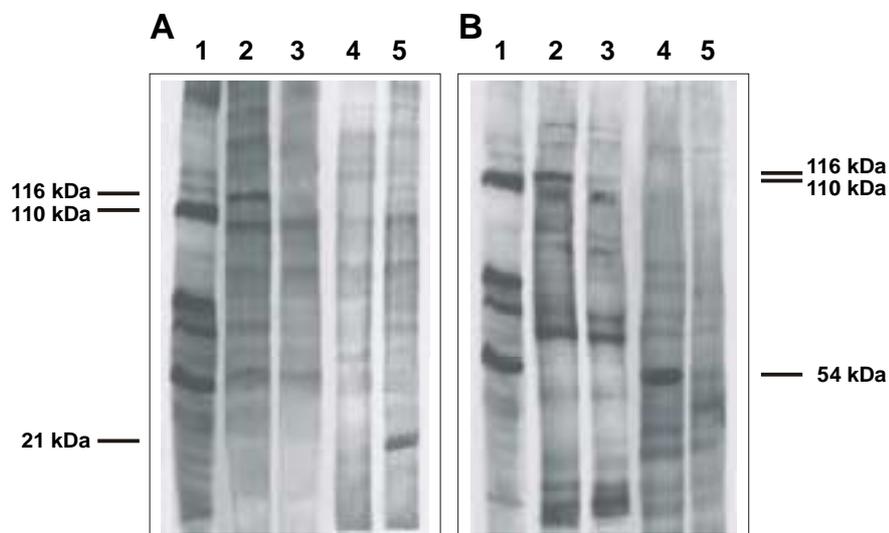


Abb. 19. Nachweis der Spezifität verschiedener Immunsereen gegen HC110-R.

Je 20 µg Gesamtprotein aus *H. contortus* (1), HC110-R-Myc/His stabil exprimierenden HEK-293-Zellen (2), nicht transfizierter HEK-293-Zellen (3) und des in *E. coli* induzierten N- (4) und C-Terminus von HC110-R (5) wurden je in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet, mit einem 1:1000 verdünnten Kaninchen-Immunsereum gegen den 21 kDa großen C-Terminus (A) oder den 54 kDa großen N-Terminus von HC110-R (B) inkubiert und mit einem 1:25000 verdünnten Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP detektiert.

In der Gesamtprotein-Fraktion adulter *H. contortus* Nematoden konnte durch beide Immunsereen je eine 110 kDa große Bande detektiert werden. Ferner erkannten beide Immunsereen eine 116 kDa große Bande in HC110-R-Myc/His stabil exprimierenden HEK-293-Zellen, die in der Proteinfraction mit den nicht transfizierten Zellen fehlte (Abb. 19A, B). Somit konnte gezeigt werden, daß die sich gegen den N- und C-Terminus von HC110-R richtenden Kaninchen-Immunsereen ausreichend spezifisch waren, um HC110-R im Western Blot zu erkennen.

In embryonierten *C. elegans* Eiern wurden die sich gegen den N- oder C-Terminus von HC110-R richtenden Antisereen nach dem 3. Boost und die zugehörigen Präimmunsereen getestet, ob sie auch das B0457-Protein lokalisieren können. Die Eier wurden auf polylysinbeschichtete Objektträger gebracht, fixiert und mit den einzelnen Präimmun- oder Immunsereen inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem Esel-anti-Kaninchen IgG-Cy3-Sekundärantikörper durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie. Abb. 20 zeigt, daß sowohl die gegen den C-Terminus (Abb. 20A), als auch die gegen den N-Terminus von HC110-R gerichteten Immunsereen (Abb. 20B) im Gegensatz zu den Präimmunsereen (Abb. 20C) das homologe B0457-Protein im Pharynx von *C. elegans* detektieren konnten. Der Zweitantikörper allein wies nur eine geringe, zu vernachlässigende unspezifische Färbung der Eihülle auf (nicht gezeigt).

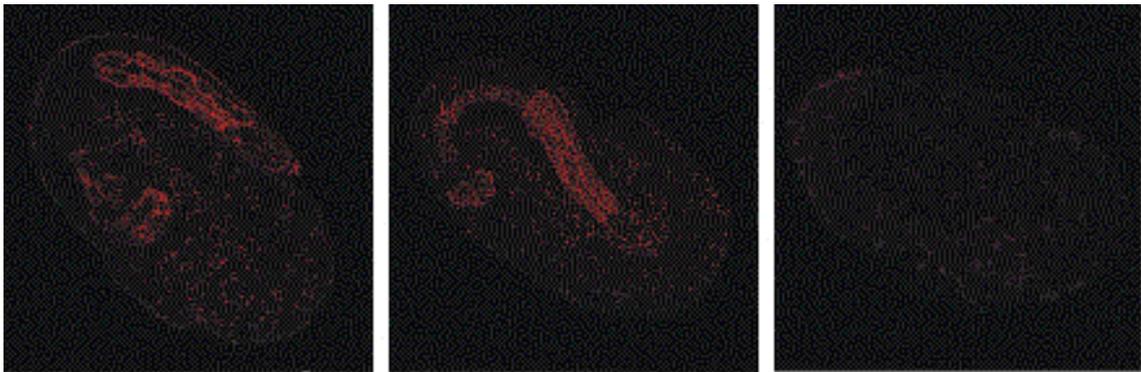


Abb. 20. Lokalisation des orthologen B0457-Proteins in *C. elegans*.

Fixierte embryonierte *C. elegans* Eier wurden mit den 1:500 verdünnten Kaninchen-Immunsereen gegen den C-Terminus (A) oder den N-Terminus von HC110-R (B) oder aber mit den jeweiligen Präimmunsereen, hier dargestellt gegen den N-Terminus (C), inkubiert und mit einem 1:400 verdünnten Esel-anti-Kaninchen IgG-Cy3-Sekundärantikörper durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie detektiert.

3.6 Bindung von α -LTX an HC110-R

Das präsynaptisch wirkende Neurotoxin α -LTX ist die Hauptkomponente aus dem Gift der Schwarzen Witwe (*Latrodectus mactans*). Es konnte gezeigt werden, daß die Toxizität des α -LTX auf dessen Fähigkeit beruht, als artifizieller Ligand mit einem Orphan-GPCR, dem Latrophilin, zu interagieren [Krasnoperov *et al.*, 1997; Lelianova *et al.*, 1997]. Latrophilin-Rezeptoren vermitteln normalerweise die Wirkung endogener Hormone oder Neuropeptide [Holz und Habener, 1998].

Wegen der strukturellen Ähnlichkeit zwischen HC110-R und Latrophilin sollte im folgenden überprüft werden, ob der heptahelikale HC110-R α -LTX als artifiziellen Liganden bindet und physiologische Studien der Signaltransduktion erlaubt. Hierzu wurde Gesamtprotein aus einer stabilen HEK-293-Zelllinie, die HC110-R-Myc/His exprimiert (Abb. 21A, Spur 3), ferner aus nicht transfizierten HEK-293-Zellen (Abb. 21A, Spur 4), und aus Zellen, die den murinen C-terminal mit GFP fusionierten β_2 -adrenergen Rezeptor exprimieren (Abb. 21A, Spur 5) sowie Gesamtprotein des in *E. coli* exprimierten 54 kDa großen N-Terminus (Abb. 21A, Spur 6) und 21 kDa großen C-Terminus von HC110-R (Abb. 21A, Spur 7), in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, geblottet und mit reinem α -LTX inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Gesamtprotein einer Fraktion aus isolierten Giftdrüsen von *Latrodectus revivensis* (Abb. 21A, Spur 1) und hochaufgereinigtes α -LTX (Abb. 21A, Spur 2) durch SDS-PAGE mitaufgetrennt. Der Nachweis von gebundenem α -LTX erfolgte mit einem Kaninchen-anti- α -LTX IgG- und einem Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Antikörper.

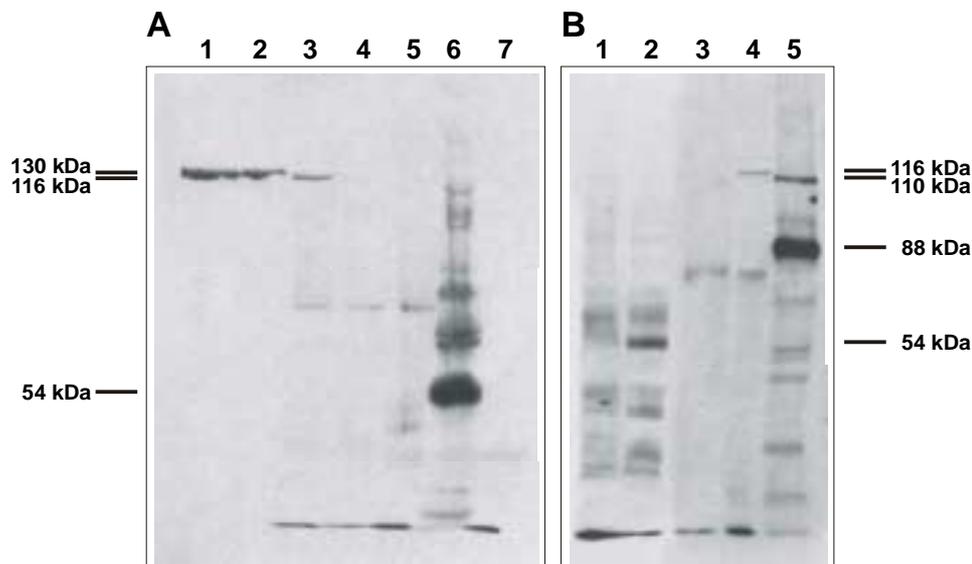


Abb. 21. Nachweis der HC110-R spezifischen α -LTX-Bindung.

- (A) 5 μ g Gesamtprotein isolierter *Latrodectus revivensis* Giftdrüsen (1) sowie reines 130 kDa großes α -LTX (2), ferner je 40 μ g Gesamtprotein stabil mit dem HC110-R-Myc/His-Konstrukt in dem pIRES1*neo*-Vektor transfizierter HEK-293-Zellen (3), nicht transfizierter HEK-293-Zellen (4), transient mit dem β_2 -R-GFP transfizierter HEK-293-Zellen (5) und des in *E. coli* induzierten 54 kDa großen N-Terminus (6) und 21 kDa großen C-Terminus (7) von HC110-R wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und über Nacht geblockt. Die denaturierten Proteine wurden für 2 h mit 20 nM α -LTX inkubiert und mögliche Bindungen von α -LTX mit einem Kaninchen-anti- α -LTX IgG- (1:5000), einem Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Antikörper (1:25000) und dem ECL-System detektiert.
- (B) Je 40 μ g Gesamtprotein des in *E. coli* induzierten C- (1) und N-Terminus (2) von HC110-R sowie nicht transfizierter (3) und stabil mit HC110-R-Myc/His transfizierter HEK-293-Zellen (4) und adulter *H. contortus* Nematoden (5) wurde in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit einem 4 M Harnstoff-haltigem Renaturierungspuffer partiell renaturiert. Der Blot wurde über Nacht geblockt, mit 20 nM reinem α -LTX inkubiert und α -LTX bindende Proteine mit einem Kaninchen-anti- α -LTX IgG-Antikörper (1:5000), Biotin-Protein A (1:100), Streptavidin-Peroxidase (1:3000) und dem ECL-System nachgewiesen.

Die Spuren mit nicht transfizierten HEK-293-Zellen und mit dem C-terminal mit GFP fusioniertem β_2 -adrenergen Rezeptor zeigten keine spezifische α -LTX-Bindung, wohingegen bei der stabilen HC110-R-Myc/His Zelllinie eine scharfe Bande bei 116 kDa zu erkennen war, die etwas unterhalb der 130 kDa großen Bande von aufgereinigtem α -LTX bzw. aus der *Latrodectus*-Giftdrüsen-Gesamtfraction lief. Ferner konnte gezeigt werden, daß α -LTX an den 54 kDa großen N-Terminus von HC110-R band, der die ersten 445 AS bis vor die 4 Cys-Region umfaßte, wohingegen keine Bindung an den 21 kDa großen C-Terminus erfolgte.

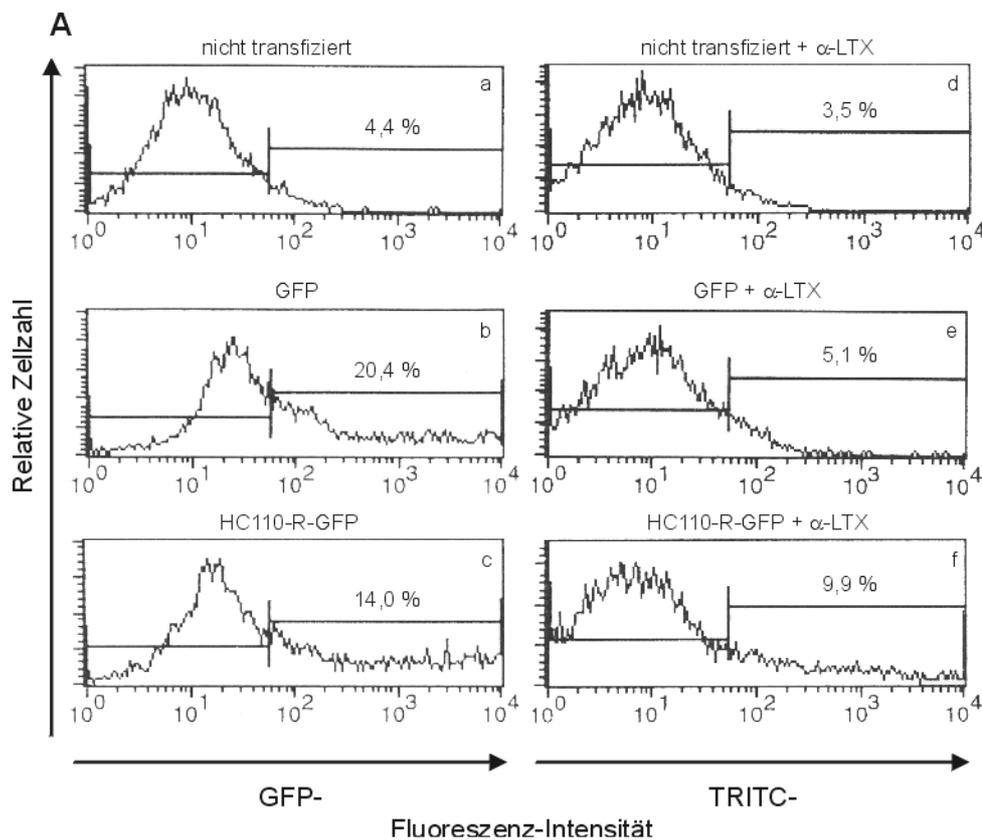
Wurden die denaturierten Proteine im Trenngel nach der SDS-PAGE mit Hilfe eines Harnstoff-haltigen Renaturierungspuffers wieder partiell renaturiert und anschließend wie gehabt geblottet und mit α -LTX, einem Kaninchen-anti- α -LTX IgG-Antikörper, Biotin-Protein A und Streptavidin-Peroxidase inkubiert, so erfolgte auch hier der Nachweis der α -LTX-Bindung an den 116 kDa großen HC110-R-Myc/His-Rezeptor (Abb. 21B, Spur 4), im besonderen an den N-Terminus (Abb. 21B, Spur 2). Nicht transfizierte HEK-293-Zellen (Abb. 21B, Spur 3) sowie der C-Terminus von HC110-R (Abb. 21B, Spur 1) wiesen keine spezifische α -LTX-Bindung auf. In der Proteinfraction adulter *H. contortus* Nematoden (Abb. 21B, Spur 5) konnten zwei deutliche Signale ausgemacht werden: eine 110 kDa und eine ca. 88 kDa große Bande. Bei der 110 kDa großen Bande handelte es sich um ein α -LTX bindendes Protein in der Größe von HC110-R, da Experimente ohne α -LTX, bzw. ohne den Kaninchen-anti- α -LTX IgG-Antikörper kein Signal in dieser Größe aufwiesen. Das ca. 88 kDa große Protein ist höchstwahrscheinlich biotinyliert, wie es bereits für ein 83 kDa großes Protein in dem Nematoden *Heterakis spumosa* gezeigt werden konnte [Pfaff, 1993], da es sich auch allein durch Streptavidin-Peroxidase detektieren ließ (nicht gezeigt).

Die α -LTX-Bindung *in vivo* an HC110-R wurde des weiteren mit Hilfe des FACScan überprüft (Abb. 22). Hierzu wurden HEK-293-Zellen transient mit HC110-R-GFP, GFP-HC110-R oder aber mit HC110-R-Myc/His und GFP kotransfiziert. Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte sowie transient mit dem adrenergen β_2 -R-GFP oder dem muscarinischen M1-R-GFP transfizierte HEK-293-Zellen eingesetzt. 24 h nach der Transfektion wurden die noch nicht-fixierten Zellen mit dem Liganden α -LTX inkubiert, α -LTX-bindende Zellen mit einem Kaninchen-anti- α -LTX IgG-Primär- und einem Ziege-anti-Kaninchen IgG-TRITC-Sekundärantikörper detektiert und abschließend fixiert. Weitere Kontrollen, bei denen HC110-R-GFP transfizierte Zellen (i) ohne α -LTX, aber mit dem Primär- und Sekundärantikörper, (ii) mit α -LTX und dem Sekundärantikörper, und (iii) nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, sollten unspezifische Bindungen des Primär- und Sekundärantikörpers ausschließen.

Die FACS-Analyse von je 10000 HEK-293-Zellen erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm hinsichtlich ihrer Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzfärbung. Da der Fluoreszenzfarbstoff TRITC ein mit EGFP überlappendes Absorptionsspektrum bei ausreichend getrennten Emissionsspektren besitzt, können mit

einer einzigen Anregungswellenlänge Signale für 2 verschiedenfarbige Fluorochrome erzeugt werden. Durch das Setzen eines 'Gate' auf die Haupt-Zellpopulation wurden Zelltrümmer von der Messung der Fluoreszenzintensität ausgeschlossen. Zur quantitativen Auswertung wurden mit einer Kontrollmessung der nicht transfizierten Zellen die Grenzen für negative, ungefärbte und positive, GFP-fluoreszierende Zellen festgelegt. Die Autofluoreszenz der HEK-293-Zellen, d. h. die 4,4 % grünfluoreszierenden, nicht transfizierten Zellen (Abb. 22Aa) wurden zur Berechnung der α -LTX-Bindung (Abb. 22B) von den GFP-fluoreszierenden Proben (u. a. Abb. 22Ab, Ac) abgezogen.

Der Wert für die unspezifische Färbung der mit α -LTX inkubierten Zellen durch den TRITC-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG-Sekundärantikörper lag mit 3,4 % (nicht gezeigt) annähernd genauso hoch wie die 3,5 % vermeintlich α -LTX-bindenden nicht transfizierten HEK-293-Zellen (Abb. 22Ad) und wurde ebenfalls für die Berechnung der α -LTX-Bindung (Abb. 22B) von allen rotfluoreszierenden Zellen (u. a. Abb. 22Ad-f) abgezogen.



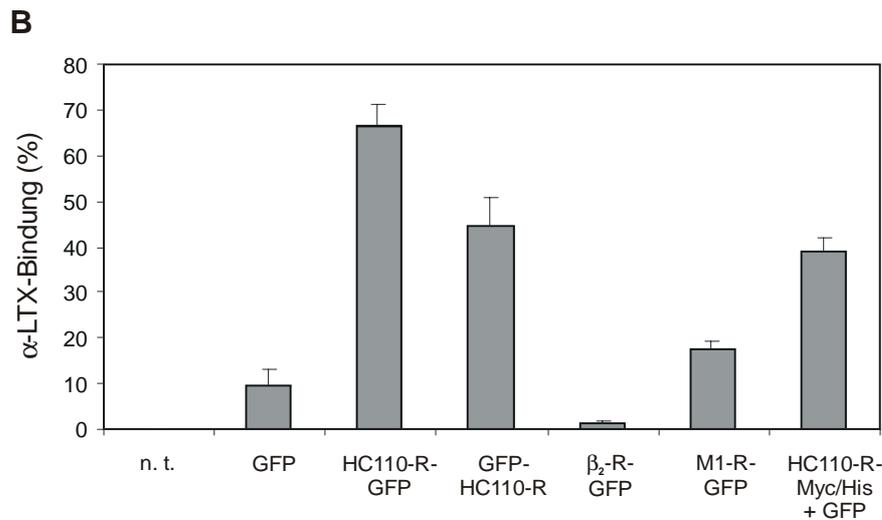


Abb. 22. Nachweis der α -LTX-Bindung an HC110-R transfizierte HEK-293-Zellen.

Je 5×10^5 nicht transfizierte, transient mit GFP, HC110-R-GFP, GFP-HC110-R, β_2 -R-GFP und M1-R-GFP transfizierte sowie mit HC110-R-Myc/His und GFP kotransfizierte HEK-293-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit α -LTX (15 nM), einem Kaninchen-anti- α -LTX IgG-Primär- (1:5000) und einem Ziege-anti-Kaninchen IgG-TRITC-Sekundärantikörper (1:80) inkubiert und anschließend fixiert. Als Negativkontrollen wurden HC110-R-GFP transfizierte Zellen erstens mit dem Primär- und Sekundärantikörper, zweitens mit α -LTX und dem Sekundärantikörper und drittens nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

- (A) Die linke Spalte stellt den prozentualen Anteil der GFP-fluoreszierenden Zellen (grün), die rechte Spalte den prozentualen Anteil der TRITC-fluoreszierenden Zellen nach α -LTX-Bindung (rot) graphisch dar: Die relative Zellzahl (Ordinate) wurde gegen die GFP-Fluoreszenz-Intensität (linke Spalte) oder TRITC-Fluoreszenz-Intensität (rechte Spalte) aufgetragen (Abszisse). Die Autofluoreszenz der HEK-293-Zellen betrug 4,4 % (nicht transfiziert); dagegen fluoreszierten 20,4 % der GFP transfizierten Zellen (GFP) und 14,0 % der HC110-R-GFP transfizierten Zellen (HC110-R-GFP). 3,5 % der nicht transfizierten Zellen (nicht transfiziert), 5,1 % der GFP transfizierten Zellen (GFP) und 9,9 % der HC110-R-GFP transfizierten Zellen (HC110-R-GFP) waren nach α -LTX-Bindung aufgrund des TRITC-Sekundärantikörpers rotfluoreszierend. Dabei betrug die reine TRITC-Fluoreszenz des Sekundärantikörpers 3,4 % (nicht gezeigt).
- (B) Nach Abzug der Autofluoreszenz im Grünkanal und der unspezifischen Färbung durch den TRITC-Sekundärantikörper im Rotkanal von allen Zellen wurde der prozentuale Anteil der GFP-fluoreszierenden Zellen (GFP, HC110-R-GFP, GFP-HC110-R, β_2 -R-GFP, M1-R-GFP und HC110-R-Myc/His + GFP) ermittelt, die α -LTX gebunden hatten (α -LTX-Bindung in %). Die Standardabweichung ergab sich durch die Bestimmung der Mittelwerte von Dreifach-Ansätzen.

Berechnete man den prozentualen Anteil der grünfluoreszierenden Zellen, die gleichzeitig auch rotfluoreszierend waren, nach Abzug der Autofluoreszenz bzw. der unspezifischen Rotfärbung durch den Sekundärantikörper, so konnte eine signifikante α -LTX-Bindung von 66,5 % an HC110-R-GFP nachgewiesen werden. Für GFP-HC110-R betrug diese Bindung 44,6 % und für HC110-R-Myc/His 38,8 %; diese banden α -LTX damit quantitativ immer noch stärker als GFP oder die beiden GPCRs, β_2 -R-GFP und M1-R-GFP (Abb. 22B).

3.6.1 HC110-R vermittelte α -LTX Signaltransduktion

α -LTX ist bekannt für seine Toxizität auf das zentrale Nervensystem von Vertebraten, bei der es durch die Erhöhung der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) und die Stimulation der unkontrollierten Exocytose von Neurotransmittern die Depolarisation von Neuronen auslöst. Nach erfolgtem Nachweis der Bindung von α -LTX an den HC110-R, sollte die Frage geklärt werden, ob α -LTX auch funktional Änderungen in einer HC110-R exprimierenden Zelllinie hervorruft.

Ein solches Verfahren zur Detektion von mit HC110-R interagierenden Substanzen stellt das Calcium-Imaging dar. Calcium spielt eine vitale Rolle als intrazellulärer, sekundärer Botenstoff und ist für eine Vielzahl von Stimulus-abhängigen Antworten ausschlaggebend. Dabei dient Fura-2 als Calcium-Indikator, mit dessen Hilfe Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einzeln ausgewählter Zellen, z. B. transient oder stabil transfizierter Zellen, detektiert werden können. Bindet ein Agonist an seinen Rezeptor, kommt es bei einem Calcium-Einstrom bzw. bei der Freisetzung intrazellulären Calciums zu einer Änderung der Absorption in Abhängigkeit von der Calciumbeladung des Indikators. Ein Antagonist läßt sich in einem derartigen System durch die vollständige oder teilweise Unterdrückung des von dem Agonisten (z.B. α -LTX) induzierten Calciumsignals erkennen.

Durchschnittlich wurden je 5-7 transient transfizierte und nicht transfizierte oder aber bis zu 13 stabil transfizierte Zellen durch das Setzen einer ROI ('region of interest') ausgewählt. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm (Calcium-gebundenes Fura-2) und 380 nm (freies Fura-2), die Messung der Emission bei 510 nm. Für die Auswertung wurden die Fluoreszenzintensitäten von 340:510 nm sowie 380:510 nm bestimmt und der Quotient aus 340/380 nm ('background corrected images') als eine Funktion des zugefügten Agens gebildet.

Hierzu wurden je 2×10^5 COS-7- und HEK-293-Zellen transient mit HC110-R-GFP transfiziert und 48 h später mit 1 μM Fura-2/AM beladen. Stimulierte man HC110-R-GFP transfizierte COS-7-Zellen mit 7,5 nM α -LTX, so erfolgte keine Änderung des Quotienten aus 340/380 nm (Abb. 23A). Die Zugabe von 30 nM α -LTX führte unmittelbar nach der Zugabe zu einer leichten ersten Erhöhung von 0,75 auf maximal 0,98 nach 14 min, die nach 22 min wieder ihren Ausgangswert erreicht hatte; nach 25 min kam es zu einem zweiten steileren Anstieg auf 0,96, der wenige Minuten später wieder auf 0,89 absank und dort ein Plateau erreichte (Abb. 23A). Die Zugabe von 75 nM α -LTX zeigte einen vergleichbaren Verlauf: Unmittelbar nach α -LTX-Zugabe kam es zu einer ersten, aber rascheren Erhöhung des Quotienten aus 340/380 nm von 0,75 auf maximal 1,05 nach 12 min und über weitere 15 min; dieser Wert sank dann wieder auf einen Quotienten von 0,94 ab, bevor es nach 21 min zu einer zweiten schnellen Erhöhung auf 1,13 kam, der nach 3 min erneut auf 1,04 absank und dort ein Plateau erreichte (Abb. 23A). Nicht transfizierte sowie mit GFP oder dem β_2 -R-GFP

transient transfizierte COS-7-Zellen zeigten keine Veränderung des Quotienten aus 340/380 nm bei Stimulation der Zellen mit 75 nM α -LTX (Abb. 23B).

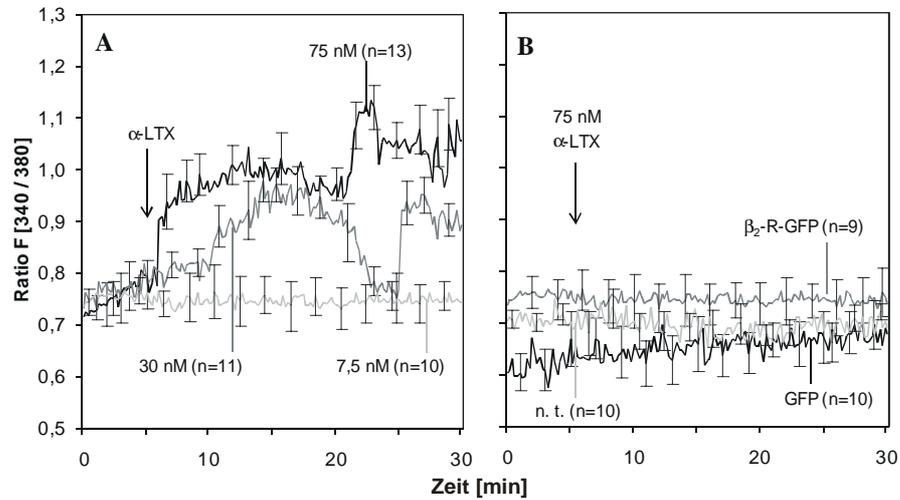


Abb. 23. HC110-R vermittelte Signaltransduktion durch α -LTX in COS-7-Zellen.

COS-7-Zellen wurden 48 h nach der transienten Transfektion mit HC110-R-GFP, GFP oder β_2 -R-GFP für 30 min mit 1 μ M Fura-2/AM beladen. Die Stimulation der Zellen erfolgte 6 min nach Beginn der Messung mit α -LTX für weitere 24 min. Gemessen wurde der Quotient aus 340/380 nm (Ratio) in Abhängigkeit von der Zeit in min. n gibt die Anzahl der ausgewählten Zellen an.

- (A) HC110-R-GFP exprimierende Zellen wurden mit 7,5 nM (hellgraue Linie), 30 nM (dunkelgraue Linie) oder 75 nM α -LTX (schwarze Linie) stimuliert.
- (B) Nicht transfizierte (n. t., hellgraue Linie) sowie GFP (schwarze Linie) oder β_2 -R-GFP (dunkelgraue Linie) exprimierende COS-7-Zellen wurden zur Kontrolle mit 75 nM α -LTX stimuliert.

Stimulierte man HC110-R-GFP transfizierte HEK-293-Zellen mit 75 nM α -LTX, so kam es ebenfalls zu einer biphasischen Antwort: einem sofortigen und sehr kleinen ersten Anstieg des Quotienten aus 340/380 nm von 0,54 auf 0,67 2 min nach α -LTX-Zugabe, der nach weiteren 10 min wieder seinen Ausgangswert erreichte und einem stärkeren zweiten Anstieg nach 22 min auf maximal 1,76 bei 29 min, der nach 44 min auf 0,6 absank (Abb. 24A).

Um nun aber ausrechnen zu können, wie groß die jeweilige $[Ca^{2+}]_i$ war, wurden die für das Ca^{2+} -Imaging offensichtlich besser geeigneten HEK-293-Zellen nach dem Protokoll von McCormack und Cobbold [1991] für die Messung von Einzelzellen kalibriert (Abb. 25A, B). Hierzu wurden Fura-2 beladene HEK-293-Zellen in die Anlage gebracht und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,6 ml Na^+ -HBS/min umspült. Die Zellen wurden nun über mehrere Minuten mit einer Ca^{2+} -freien, Ionophor-haltigen R_{min} -Lösung und anschließend mit einer Ca^{2+} -gesättigten, Ionophor-haltigen R_{max} -Lösung umspült. Zum Schluß quenchte eine 10 mM $MnCl_2$ -Lösung die Fluoreszenz bis auf die Autofluoreszenz der Zellen.

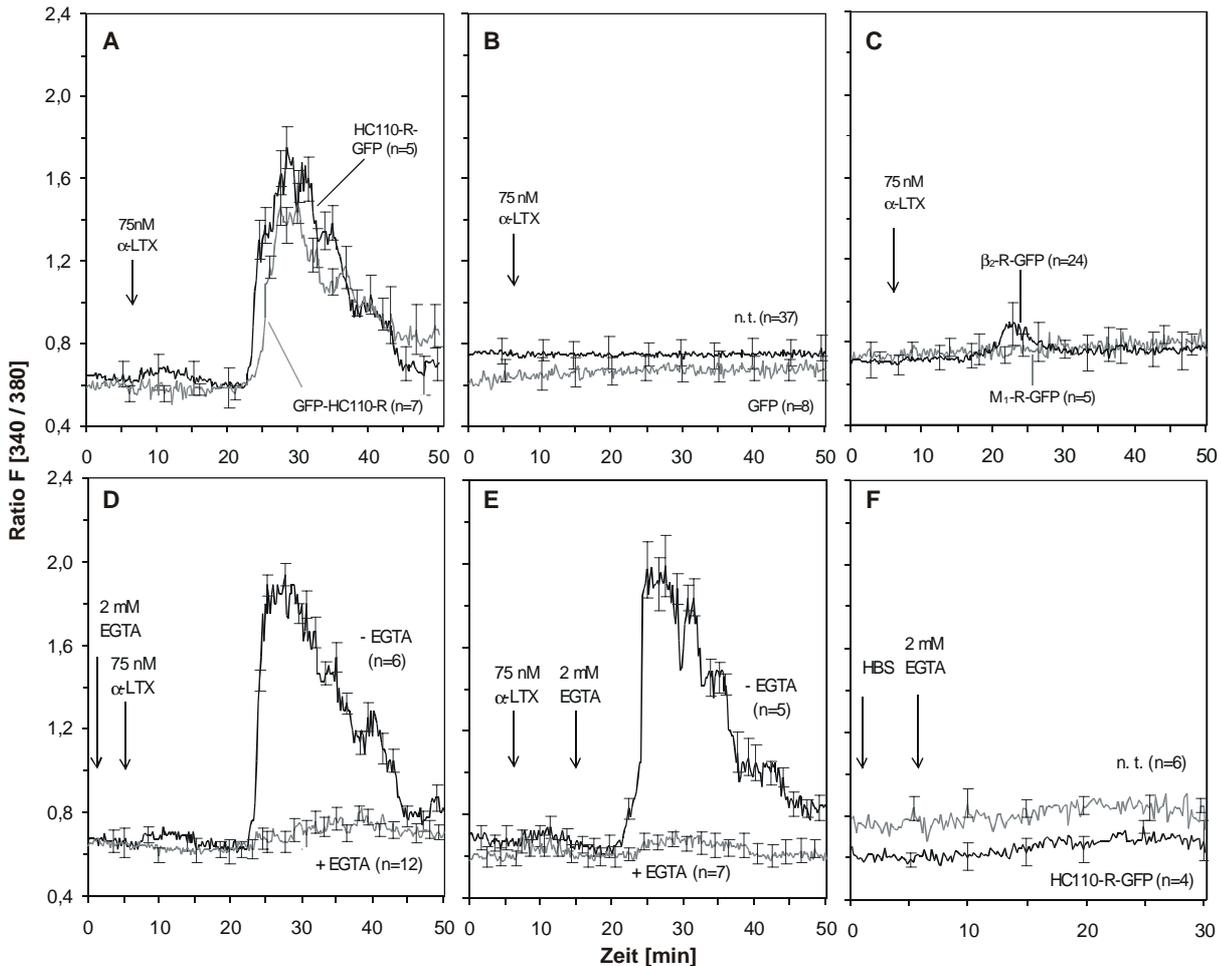


Abb. 24. HC110-R vermittelter Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ durch α -LTX in HEK-293-Zellen.

HEK-293-Zellen wurden 48 h nach der transienten Transfektion mit HC110-R-GFP, GFP-HC110-R, GFP oder den beiden GPCRs, M1-R-GFP und β_2 -R-GFP, für 30 min mit $1 \mu\text{M}$ Fura-2/AM beladen. Die Stimulation der Zellen erfolgte 6 min nach Beginn der Messung mit 75 nM α -LTX für weitere 44 min. Gemessen wurde der Quotient aus 340/380 nm (Ratio) in Abhängigkeit von der Zeit. n gibt die Anzahl der ausgewählten Zellen an.

- (A) C-terminal (HC110-R-GFP, schwarze Linie) und N-terminal mit GFP fusioniertes HC110-R (GFP-HC110-R, graue Linie) wurde mit 75 nM α -LTX stimuliert.
- (B) Nicht transfizierte (n. t., schwarze Linie) und mit GFP transfizierte (graue Linie) Zellen wurden zur Kontrolle mit 75 nM α -LTX stimuliert.
- (C) Die beiden C-terminal GFP-fusionierten GPCRs, M1-R (M1-R-GFP, graue Linie) und β_2 -R (β_2 -R-GFP, schwarze Linie), wurden ebenfalls zur Kontrolle mit 75 nM α -LTX stimuliert.
- (D) HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden zu Beginn der Messung mit 2 mM EGTA und nach 6 min mit 75 nM α -LTX versetzt (+EGTA, graue Linie). Zur Kontrolle wurden HC110-R-GFP exprimierende Zellen ohne EGTA nur mit α -LTX stimuliert (-EGTA, schwarze Linie).
- (E) Wie (D), nur daß 75 nM α -LTX nach 6 min und 2 mM EGTA erst 10 min später zugesetzt wurden, nachdem der erste Peak HC110-R-GFP transfizierter Zellen wieder den Ausgangswert erreicht hatte.
- (F) Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte (n. t., graue Linie) und HC110-R-GFP exprimierende Zellen (HC110-R-GFP, schwarze Linie) zunächst mit Na^+ -HBS-Puffer und nach 6 min mit 2 mM EGTA versetzt.

Die Anregung erfolgte bei den Wellenlängen 340 nm (Abb. 25A) und 380 nm (Abb. 25B). Vor der Ermittlung von $R_{\min} = A_1/A_2 = 13,584 / 29,013 = 0,468$ und $R_{\max} = B_1/B_2 = 50,465 / 9,477 = 5,325$ sowie vor der Bildung des Quotienten aus $S_{f380}/S_{b380} = A_2/B_2 = 29,013 / 9,477 = 3,061$ wurde der Autofluoreszenzwert von allen Kalibrierungswerten abgezogen. Nach Gryniewicz *et al.* [1985] beträgt die Dissoziationskonstante K_d für Ca^{2+} bei 37 °C 224 nM. Dabei ist R der jeweils ermittelte Meßwert einer Probe zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für HEK-293-Zellen errechnet sich nach Gryniewicz *et al.* [1985] wie folgt:

$$\begin{aligned} [\text{Ca}^{2+}]_i &= K_d \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \times S_{f380}/S_{b380} \\ &= 224 \times (R - 0,468) / (5,325 - R) \times 3,06 \end{aligned}$$

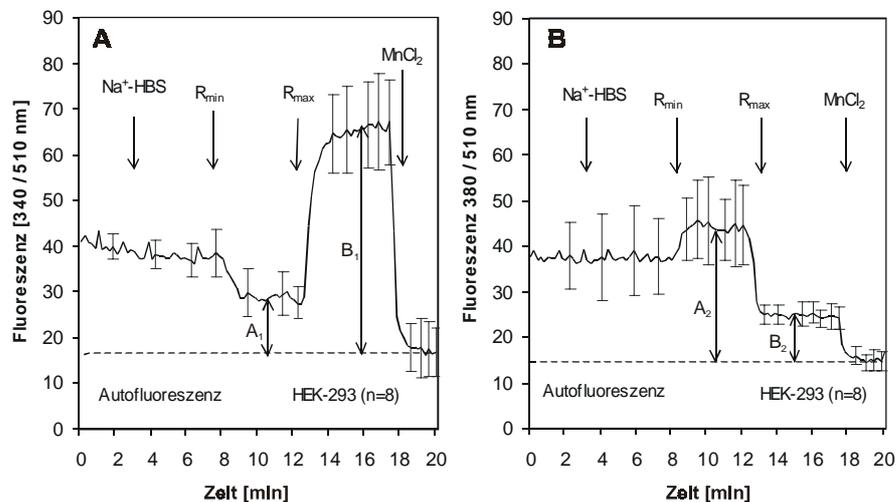


Abb. 25. Kalibrierung der HEK-293-Zellen.

- (A) Zur Kalibrierung von nicht transfizierten und HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen nach McCormack und Cobbold [1991] wurden die Zellen zuerst mit einer Ca^{2+} -freien R_{\min} - und anschließend mit einer Ca^{2+} -gesättigten R_{\max} -Lösung umspült. Eine 10 mM MnCl_2 -Lösung quenchte die Fluoreszenz bei 340:510 nm bis auf die Autofluoreszenz der Zellen (gestrichelte Linie). Subtrahierte man den Wert für die Autofluoreszenz von dem minimalen Fluoreszenzwert nach R_{\min} -Zugabe, denn Fura-2 gebundenes Ca^{2+} war hier minimal, so erhielt man A_1 oder von dem maximalen Fluoreszenzwert nach R_{\max} -Zugabe, wenn Fura-2 maximale Mengen Ca^{2+} gebunden hatte, erhielt man B_1 für die Berechnung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Gryniewicz *et al.* [1985].
- (B) Wie in (A) quenchte eine 10 mM MnCl_2 -Lösung die Fluoreszenz bei 380:510 nm bis auf die Autofluoreszenz der Zellen (gestrichelte Linie). Subtrahierte man den Wert für die Autofluoreszenz von dem maximalen Fluoreszenzwert bei 380:510 nm nach R_{\min} -Zugabe, wenn also vorwiegend Ca^{2+} -freies Fura-2 vorlag, so erhielt man A_2 oder von dem minimalen Fluoreszenzwert nach R_{\max} -Zugabe, wenn nur noch minimale Mengen Ca^{2+} -freies Fura-2 in der Zelle vorhanden waren, erhielt man B_2 für die Berechnung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Gryniewicz *et al.* [1985].

Folglich betrug der erste Ca^{2+} -Anstieg HC110-R-GFP transfizierter HEK-293-Zellen 2 min nach der Zugabe von 75 nM α -LTX nur $5 \pm 0,2$ nM, der zweite verzögerte dagegen $220 \pm 14,9$ nM Ca^{2+} nach 22 min (HC110-R-GFP, schwarze Linie, Abb. 24A). GFP-HC110-R führte bei Stimulation mit 75 nM α -LTX zu einem vergleichbaren Verlauf, dessen 2. Peak lediglich um 13 % reduziert war (Abb. 24A). Das heißt, daß das

N- bzw. C-terminale Anfügen eines immerhin 27 kDa großen GFP-Tags nur geringfügige, wenn überhaupt, Einflüsse auf die α -LTX-Bindung und die sich anschließende Signaltransduktion durch HC110-R hatte.

Der bei α -LTX beobachtete komplexe Ca^{2+} -Anstieg in den Zellen war die Folge einer durch HC110-R vermittelten Signaltransduktion, da nicht transfizierte Zellen oder Zellen, die nur mit GFP transient transfiziert worden waren, keine Reaktion auf 75 nM α -LTX zeigten (Abb. 24B). Die Spezifität des HC110-R vermittelten α -LTX-‘Signalling‘ wurde ferner durch transiente Transfektionen von HEK-293-Zellen mit anderen C-terminal GFP-fusionierten GPCRs, wie dem humanen muscarinischen M1-Acetylcholin-Rezeptor (M1-R-GFP) oder dem murinen β_2 -adrenergen Rezeptor (β_2 -R-GFP) bestätigt, denn diese Rezeptoren führten nach Stimulation mit 75 nM α -LTX zu keinem oder im Falle von β_2 -R-GFP nur zu einer geringen Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um $30 \pm 3,4$ nM Ca^{2+} nach 20 min (Abb. 24C). Der durch α -LTX ausgelöste Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte durch einen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} und/oder den Ausstrom von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Kompartimenten hervorgerufen worden sein. Daher wurde dem extrazellulären Milieu Ca^{2+} einmal vor (Abb. 24D) und einmal nach der Zugabe von α -LTX (Abb. 24E) durch 2 mM EGTA entzogen. Der frühe erste Peak verschwand, wenn EGTA 6 min vor der Stimulation mit 75 nM α -LTX zugegeben wurde (Abb. 24D). Die in Ca^{2+} -haltigen Medium durch Zugabe von 75 nM α -LTX freigesetzte zweite große Ca^{2+} -Menge in HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen reduzierte sich in Ca^{2+} -freiem Medium um 94 % (Abb. 24D, E). Daraus wurde ersichtlich, daß α -LTX in erster Linie einen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} verursachte. Lediglich die kleine verzögerte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um $13 \pm 1,3$ nM Ca^{2+} nach 24 min konnte auf eine Mobilisierung aus intrazellulären Kompartimenten, wie z. B. dem ER, zurückgeführt werden. Das Zusetzen von 2 mM EGTA 6 min nach der Zugabe von Na^+ -HBS anstelle von α -LTX zu transfizierten, wie nicht transfizierten HEK-293-Zellen über einen Zeitraum von 30 min führte zu keiner Beeinträchtigung der Vitalität der Zellen; die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ blieb während der gesamten Versuche konstant (Abb. 24F). D. h., daß der durch α -LTX induzierte Ca^{2+} -Einstrom in HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen nicht auf einfacher Diffusion basierte, sondern mit Hilfe von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran erfolgte.

Die Ca^{2+} -Antwort von HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen zeigte mit seinem biphasischen Verlauf eine komplexe Dosisabhängigkeit für α -LTX: Bei niedrigen Konzentrationen um 7,5 nM war noch keine bzw. bei 25 nM nur eine leichte zweite α -LTX-vermittelte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um $4,3 \pm 1,3$ nM Ca^{2+} festzustellen (Abb. 26A). Bei 50 nM α -LTX kam es beim ersten Peak zu einer Erhöhung um $11,8 \pm 1,8$ nM Ca^{2+} und beim zweiten Peak um $47,9 \pm 5,3$ nM Ca^{2+} (Abb. 26B). Bei 75 nM α -LTX kam es zunächst nur noch zu einer ersten Erhöhung um $5 \pm 0,2$ nM Ca^{2+} , dafür erhöhte der zweite Peak sein Maximum um $220 \pm 14,9$ nM Ca^{2+} (Abb. 26B). 90 nM α -LTX führten dagegen zu einer Erhöhung des ersten Peaks um $121,9 \pm 9,0$ nM Ca^{2+} und einem zweiten reduzierten Anstieg um $52,23 \pm 7,4$ nM Ca^{2+} (Abb. 26C). Bei 120 nM α -LTX nahm der

erste Peak nur geringfügig um $135,8 \pm 8,8$ nM Ca^{2+} zu und der zweite Peak reduzierte sich um $46,37 \pm 6,3$ nM Ca^{2+} (Abb. 26C). Der erste Ca^{2+} -Peak erhöhte sich mit steigender α -LTX-Konzentration und glich einem Sättigungsverlauf der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktions-Kapazität von α -LTX (Abb. 26D). Dabei führten höhere Konzentrationen als 120 nM α -LTX zu einem von den Zellen nicht mehr kompensierbaren schlagartigen Ca^{2+} -Anstieg und als Konsequenz daraus zum Zelltod (nicht dargestellt). Zeitlich konnte außerdem gezeigt werden, daß bei steigender α -LTX-Konzentration die maximale Erhöhung immer früher eintrat (Abb. 26B, C). Die beiden höheren α -LTX-Konzentrationen 90 nM und 120 nM unterschieden sich in ihrem Signal-vermittelten Verlauf nur geringfügig. Bei 120 nM α -LTX jedoch wurde der höchste Ca^{2+} -Peak bereits unmittelbar nach α -LTX Zugabe erreicht (Abb. 26C). Der zweite verzögerte Peak vergrößerte sich zunächst mit steigender α -LTX-Konzentration von 25-75 nM, wurde dann aber, einer Optimumsreaktion gleich, bei 90 nM und 120 nM wieder kleiner (Abb. 26D).

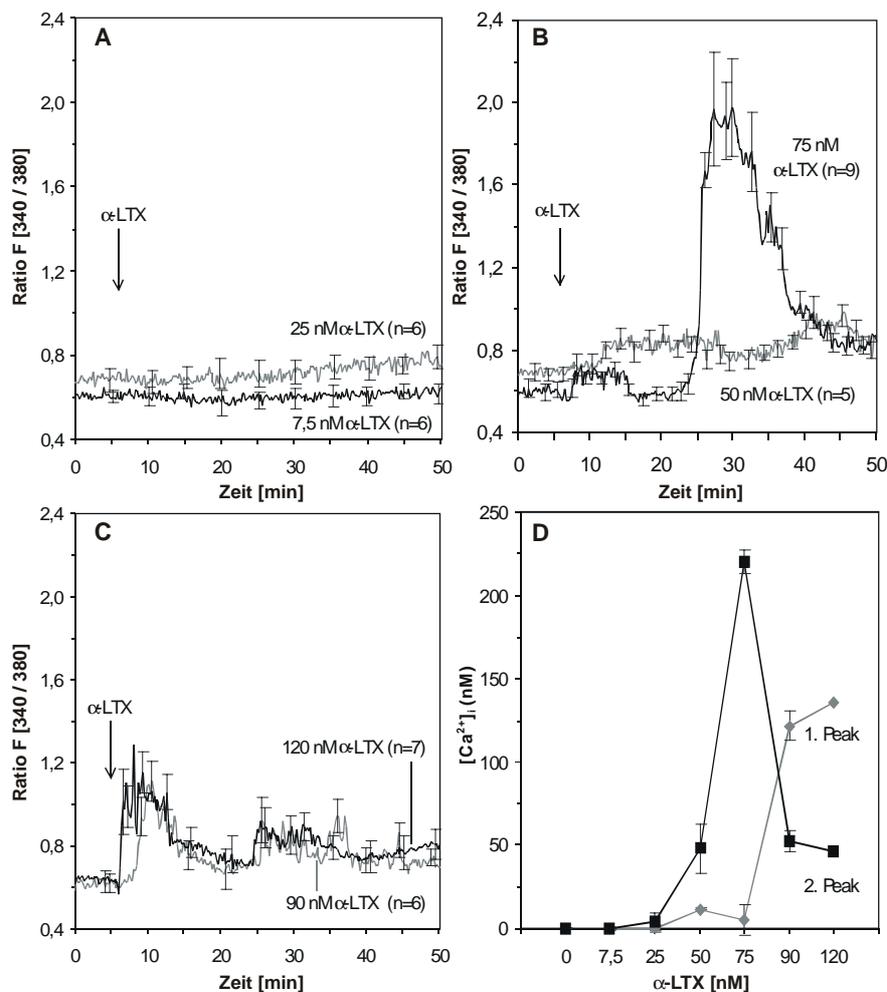


Abb. 26. Dosisabhängigkeit von α -LTX auf das HC110-R vermittelte ' Ca^{2+} -Signalling'.

HEK-293-Zellen wurden 48 h nach der transienten Transfektion mit HC110-R-GFP für 30 min mit $1 \mu\text{M}$ Fura-2/AM beladen. Die Stimulation der Zellen erfolgte 6 min nach Beginn der Messung mit unterschiedlichen α -LTX-Konzentrationen für weitere 44 min. Gemessen wurde der Quotient aus 340/380 nm (Ratio) in Abhängigkeit von der Zeit. n gibt die Anzahl der ausgewählten Zellen an.

- (A) HC110-R-GFP exprimierende Zellen wurden mit 7,5 nM (schwarze Linie) oder 25 nM α -LTX (graue Linie) stimuliert.
- (B) HC110-R-GFP exprimierenden Zellen wurde 50 nM (graue Linie) oder 75 nM α -LTX (schwarze Linie) zugesetzt.
- (C) HC110-R-GFP exprimierende Zellen wurden mit 90 nM (graue Linie) oder 120 nM α -LTX (schwarze Linie) stimuliert.
- (D) Auf der Abszisse ist die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in nM, auf der Ordinate sind die zur Stimulation von HC110-R-GFP exprimierenden HEK-293-Zellen eingesetzten α -LTX-Konzentrationen (0, 7,5, 25, 50, 75, 90 und 120 nM) für den ersten schnellen Peak (1. Peak, graue Linie) und den zweiten verzögerten Peak (2. Peak, schwarze Linie) aufgetragen.

Die durch α -LTX-vermittelte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HC110-R-GFP exprimierenden Zellen ließ sich mit steigenden Konzentrationen des Ca^{2+} -Kanal-Blockers Cadmium inhibieren: Cadmium ($10 \mu\text{M}$) führte ohne vorherige α -LTX-Zugabe zu keiner Beeinflussung des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes von nicht transfizierten und HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen (Abb. 27A). Bei $1 \mu\text{M}$ Cd^{2+} wurde eine teilweise und bei $10 \mu\text{M}$ Cd^{2+} eine im Vergleich ohne Cadmium nahezu vollständige Hemmung des α -LTX induzierten Ca^{2+} -Einstroms in HC110-R-GFP exprimierenden HEK-293-Zellen erreicht (Abb. 27B). Für $10 \mu\text{M}$ Cd^{2+} ist bekannt, daß sie Ca^{2+} -Kanäle komplett blockieren [Shafer, 1998]. Bei einem Großteil der Ca^{2+} -Kanäle, die am Ca^{2+} -Einstrom HC110-R-GFP transfizierter Zellen beteiligt waren, handelte es sich um solche des L-Typs, da $15 \mu\text{M}$ Nifedipin bereits ausreichten, den durch α -LTX induzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signifikant zu unterdrücken. Dabei wurde der erste Anstieg vollständig inhibiert und der zweite Anstieg sank von $267 \pm 12,7 \text{ nM}$ Ca^{2+} auf $30 \pm 5,4 \text{ nM}$ Ca^{2+} , wurde also um 89 % reduziert und zusätzlich um 5 min verzögert (Abb. 27D). Die Kontrolle zeigte, daß $15 \mu\text{M}$ Nifedipin allein keine Auswirkungen auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von nicht transfizierten oder HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen hatte (Abb. 27C). Wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung durch $1 \mu\text{M}$ des direkten Phospholipase C-Inhibitors U-73122 [Bleasdale *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990; Smallridge *et al.*, 1992] vor der Zugabe von 75 nM α -LTX gehemmt, traten - verglichen mit dem biphasischen Verlauf bei Stimulation mit 75 nM α -LTX ohne U-73122 - folgende Veränderungen auf: Es kam zu einem ersten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach 10 min mit einer maximalen Erhöhung um $105 \pm 10,5 \text{ nM}$ Ca^{2+} nach 16 min und zu einem zweiten Ca^{2+} -Anstieg von $82 \pm 9,7 \text{ nM}$ nach 32 min (Abb. 27F). Damit erhöhte sich der erste Peak gegenüber der α -LTX vermittelten Antwort um das 5fache, wohingegen sich der zweite Peak neben einer zeitlichen Verzögerung um den Faktor 4 verringerte. Da U-73122 das Freisetzen von intrazellulärem Ca^{2+} inhibiert, müßten die beobachteten Ca^{2+} -Einströme von extrazellulär erfolgt sein. Das chemisch unwirksame Analogon zu U-73122, U-73343 [Bleasdale *et al.*, 1990], zeigte nach α -LTX Zugabe bei dieser Konzentration einen mit U-73122 vergleichbaren ersten Ca^{2+} -Anstieg von $107 \pm 8,2 \text{ nM}$ nach 16 min und einen zweiten erhöhten von $204 \pm 12,5 \text{ nM}$ nach 30 min,

der 15 min später wieder nahezu auf das Ausgangsniveau absank (Abb. 27F). Damit veränderte das chemisch unwirksame Analogon zu U-73122 die HC110-R vermittelte Signaltransduktion durch α -LTX, indem es den ersten kleinen Peak - wie auch U-73122 - um 79 % erhöhte, den zweiten Peak in seiner Höhe und seinem Verlauf jedoch nicht beeinflusste, sondern lediglich um 8 min verzögerte. Die alleinige Zugabe von 1 μ M U-73122 oder U-73343 zu HC110-R-GFP transfizierten Zellen führte zu keiner Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 27E).

Auch die den HC110-R-Myc/His-Rezeptor stabil exprimierende HEK-293-Zelllinie reagierte dosisabhängig auf α -LTX: 7,5 nM α -LTX waren auch hier noch zu gering, um eine α -LTX-induzierte Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in HC110-R-Myc/His transfizierten Zellen zu erzeugen (Abb. 27G). Aber bereits 25 nM α -LTX waren ausreichend, um eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um $106 \pm 38,0$ nM nach 2 min zu erzeugen (Abb. 27G). Bei Zugabe von 75 nM α -LTX kam es ebenfalls 2 min nach α -LTX-Zugabe zu einem starken Ca^{2+} -Anstieg von $267 \pm 45,8$ nM Ca^{2+} , der erst nach 27 min wieder seinen ursprünglichen Ca^{2+} -Gehalt erreichte (Abb. 27G). Dieser Ca^{2+} -Anstieg glich dem zweiten verzögerten Ca^{2+} -Peak HC110-R-GFP transfizierter HEK-293-Zellen bei gleicher α -LTX Konzentration (75 nM) sowohl in der Höhe des Signals, als auch in seinem Verlauf (Abb. 24A und Abb. 26B), die Antwort erfolgte nur - wie auch bei höheren Konzentrationen (90 nM und 120 nM) HC110-R-GFP transfizierter Zellen (Abb. 26C) - unmittelbar nach α -LTX-Zugabe.

Um abzuschätzen zu können, in welchem Konzentrationsbereich Zellen, die einen natürlichen endogenen Latrophilin-Rezeptor besitzen, in dem hier verwendeten Calcium-Imaging-Meßsystem auf das von uns verwendete aufgereinigte, natürliche α -LTX reagieren, wurden nicht transfizierte bovine chromaffine Nebennierenmarkszellen, von denen man seit kurzem weiß, daß sie einen endogenen natürlichen Latrophilin-Rezeptor besitzen [Kobayashi *et al.*, 1986; Krasnoperov *et al.*, 1997; Bittner *et al.*, 1998], mit 7,5 nM, 25 nM und 75 nM α -LTX stimuliert (Abb. 27H). Bei Zugabe von 7,5 nM α -LTX zeigten chromaffine Zellen - wie auch mit HC110-R-GFP transfizierte HEK-293-Zellen (Abb. 26A) - noch keine Veränderung des Quotienten aus 340/380 nm. Bei Zugabe von 25 nM α -LTX kam es bei den chromaffinen Zellen zu einer um 18 min verzögerten Zunahme des Quotienten aus 340/380 nm von 0,7 auf 2,9, die der Antwort in HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen nach Stimulation mit 75 nM α -LTX entsprach (Abb. 24A und Abb. 26B). Jedoch konnte die massive Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in den chromaffinen Zellen innerhalb von 50 min nicht mehr kompensiert werden und die Zellen starben. Bei Zugabe von 75 nM α -LTX zu den chromaffinen Zellen kam es nach 5 min zunächst zu einer kleineren Erhöhung des Quotienten aus 340/380 nm von 0,8 auf 1,28 und nach 11 min zu einem - verglichen mit der Stimulierung durch 75 nM α -LTX auf HC110-R-GFP transfizierte HEK-293-Zellen (Abb. 24A und Abb. 26B) - fast doppelt so starken Anstieg von 1,2 auf 3,22, der dazu führte, daß die chromaffinen Zellen infolge des massiven Ca^{2+} -Einstroms, wie bereits bei 25 nM α -LTX, starben (Abb. 27H).

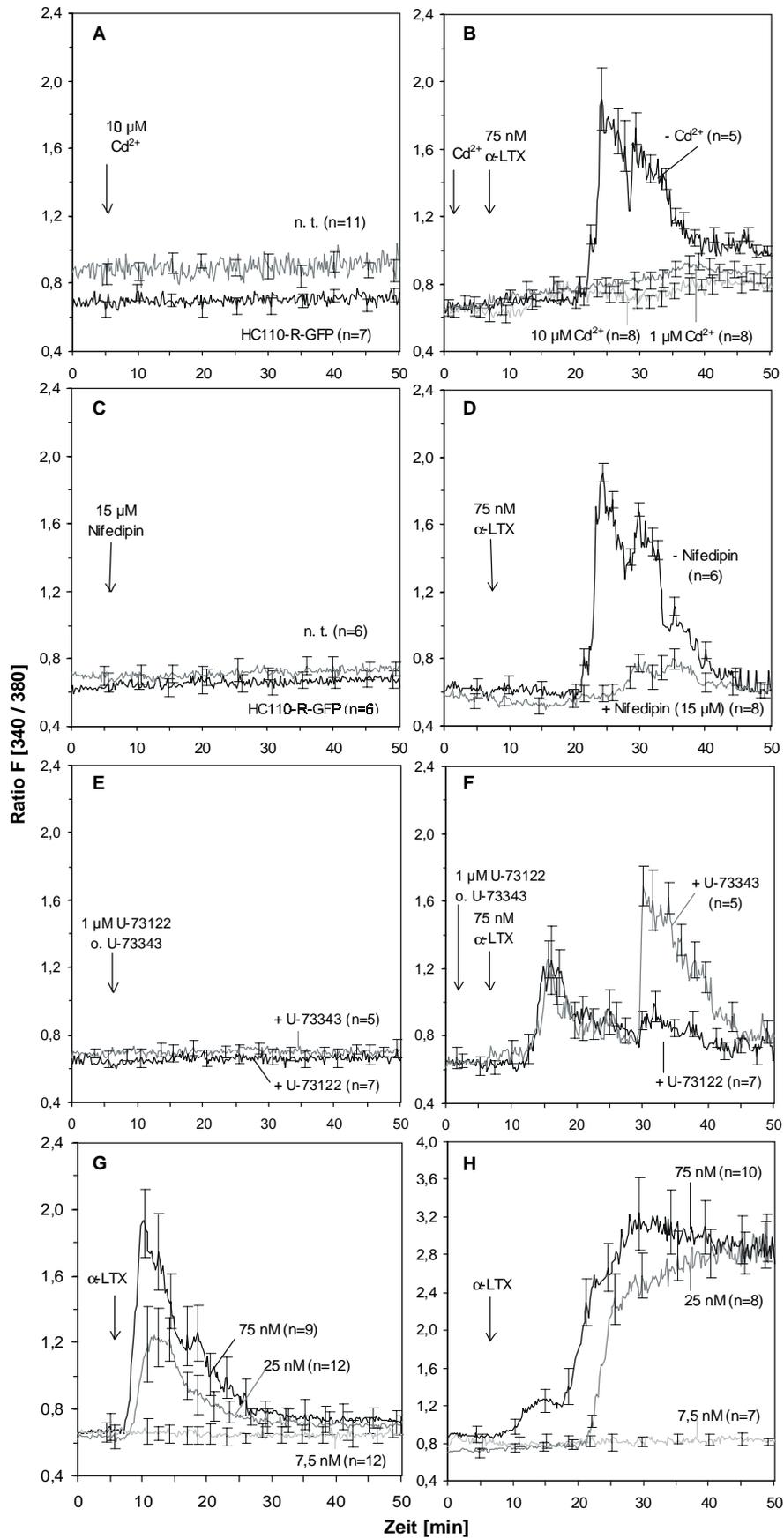


Abb. 27. Untersuchung der HC110-R vermittelten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und Einfluß von α -LTX auf stabil HC110-R oder Latrophilin exprimierende Zellen.

HC110-R-GFP exprimierende Zellen wurden 48 h nach der transienten Transfektion für 30 min mit 1 μ M Fura-2/AM beladen; die Beladung stabil HC110-R-Myc/His transfizierter HEK-293-Zellen erfolgte stets nach der 6.-7. Passage. Gemessen wurde der Quotient aus 340/380 nm (Ratio) in Abhängigkeit von der Zeit. n gibt die Anzahl der ausgewählten Zellen an.

- (A) Nicht transfizierten (n. t., graue Linie) und transient HC110-R-GFP exprimierenden Zellen (HC110-R-GFP, schwarze Linie) wurde nach 6 min 10 μ M Cd^{2+} für 44 min zur Kontrolle zugesetzt, um zeigen zu können, daß Cd^{2+} in dieser Konzentration keinen Einfluß auf die Vitalität der Zellen hat.
- (B) HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden zur Untersuchung auf spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle 6 min vor der Stimulation mit 75 nM α -LTX mit 1 μ M (1 μ M Cd^{2+} , dunkelgraue Linie) oder 10 μ M Cd^{2+} (10 μ M Cd^{2+} , hellgraue Linie) versetzt. Zur Kontrolle wurden die transfizierten Zellen nur mit 75 nM α -LTX stimuliert (- Cd^{2+} , schwarze Linie).
- (C) Nicht transfizierte (n. t., graue Linie) und transient HC110-R-GFP exprimierende Zellen (HC110-R-GFP, schwarze Linie) wurden zur Kontrolle nach 6 min mit 15 μ M Nifedipin inkubiert, um zeigen zu können, daß Nifedipin in dieser Konzentration keinen Einfluß auf die Vitalität der Zellen hat.
- (D) HC110-R-GFP exprimierenden Zellen wurde zur Untersuchung auf spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ 6 min vor der Stimulation mit 75 nM α -LTX 15 μ M Nifedipin zugesetzt (+Nifedipin, graue Linie). Im Kontrollversuch erhielten die transfizierten Zellen kein Nifedipin (-Nifedipin, schwarze Linie).
- (E) Um zeigen zu können, daß weder 1 μ M des Phospholipase C-Hemmers U-73122, noch des chemisch unwirksamen Analogons U-73343 einen Einfluß auf die Vitalität der Zellen haben, wurden HC110-R-GFP transfizierte Zellen mit 1 μ M U-73122 (schwarze Linie) oder U-73343 (graue Linie) versetzt.
- (F) HC110-R-GFP exprimierenden Zellen wurde zur Untersuchung der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern 6 min vor der Stimulation mit α -LTX 1 μ M U-73122 oder U-73343 zugefügt.
- (G) Die HC110-R-Myc/His stabil exprimierenden HEK-293-Zellen wurden nach 6 min mit 7,5 nM (hellgraue Linie), 25 nM (dunkelgraue Linie) oder 75 nM α -LTX (schwarze Linie) stimuliert.
- (H) Die den Latrophilin-Rezeptor endogen exprimierenden, bovinen chromaffinen Zellen wurden, wie in (G), mit 7,5 nM (hellgraue Linie), 25 nM (dunkelgraue Linie) oder 75 nM α -LTX (schwarze Linie) stimuliert.

3.7 Bindung von PF1022A an HC110-R

Im folgenden sollte die Bindung von PF1022A und dem Morpholin-Derivat BAY44-4400 an HC110-R durch SDS-PAGE, Liganden-Präzipitation und analytische Durchflußcytometrie nachgewiesen werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob PF1022A und seine Derivate - ähnlich wie α -LTX - zu Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen führen oder aber das HC110-R vermittelte α -LTX-‘Signalling‘ beeinflussen.

Gelegentlich zeigen Antikörper oder Proteine, die in der Immunfluoreszenz deutliche Signale geben, keine Reaktion bei der Anwendung des Immunoblot-Verfahrens. Da zur Durchführung der SDS-PAGE eine Denaturierung der Proteine notwendig ist, kommt es gegebenenfalls zu einer Zerstörung konformationsabhängiger Epitope. Antikörper oder Proteine, die spezifisch solche Epitope erkennen, können deshalb nicht mehr binden. So konnte auch weder mit dem biotinylierten Wirkstoff PF1022A, noch mit dem im Vergleich zum PF1022A besser löslichen Morpholin-Derivat BAY44-4400 eine HC110-R spezifische Bindung im Western Blot ausgemacht werden (nicht gezeigt). BAY44-4400 unterscheidet sich von PF1022A durch 2 Morpholin-Reste, die kovalent an die Phenylringe der beiden D-Phenylactyl-Reste von PF1022A gebunden sind

[Nishiyama *et al.*, 1998]. Renaturierte man die Proteine im SDS-Trenngel jedoch mit Hilfe von Harnstoff, der durch Aufhebung hydrophober Wechselwirkungen eine partielle Entfernung des SDS bewirkt [Lee *et al.*, 1982], so konnte im Western Blot eine HC110-R spezifische Bindung nachgewiesen werden (Abb. 28A, B). Hierzu wurde Gesamtprotein aus nicht transfizierten (Abb. 28A, Spur 1), aus HC110-R-Myc/His stabil exprimierenden HEK-293-Zellen (Abb. 28A, Spur 2) sowie aus dem in *E. coli* exprimierten 54 kDa großen N- (Abb. 28A, Spur 3) und dem 21 kDa großen C-Terminus von HC110-R (Abb. 28A, Spur 4) durch SDS-PAGE aufgetrennt, renaturiert und wie gewohnt geblottet. Die Immundetektion erfolgte nach der Inkubation mit dem Liganden BAY44-4400, mit einem Kaninchen-anti-PF1022A-KLH-Immunsereum [Saeger, 1996] und einem Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Antikörper. Ferner wurde ein partiell renaturiertes SDS-Polyacrylamidgel mit den Proteinfractionen nicht transfizierter (Abb. 28B, Spur 1), HC110-R-Myc/His stabil transfizierter HEK-293-Zellen (Abb. 28B, Spur 2) sowie dem in *E. coli* exprimierten N-Terminus von HC110-R (Abb. 28B, Spur 3) und Gesamtprotein aus *H. contortus* (Abb. 28B, Spur 4) geblottet, mit PF1022A-Biotin inkubiert und über Streptavidin-HRP detektiert. Beide Blots (Abb. 28A, B) wiesen je eine distinkte 116 kDa große Bande in den HC110-R-Myc/His stabil exprimierenden HEK-293-Zellen auf, wohingegen die Spuren mit nicht transfizierten Zellen keine Bande in dieser Höhe aufwiesen. Ferner banden sowohl das Morpholinderivat BAY44-4400, als auch das biotinylierte PF1022A an den 54 kDa großen N-Terminus von HC110-R (Abb. 28A, B, jeweils Spur 3), der 21 kDa große C-Terminus zeigte keine spezifische PF1022A-Bindung (Abb. 28A, Spur 4). Durch das biotinylierte PF1022A konnten in der Gesamt-Proteinfraktion adulter *H. contortus* Nematoden insgesamt 2 Banden detektiert werden: Eine 110 kDa große Bande und eine weitere ca. 88 kDa große Bande (Abb. 28B, Spur 4). Bei letzterer handelte es sich höchstwahrscheinlich um ein biotinyliertes Protein, wie es bereits für den Nematoden *Heterakis spumosa* mit 83 kDa beschrieben wurde [Pfaff, 1993], zumal es im Gegensatz zu der 110 kDa großen Bande selbst dann detektiert wurde, als der Nachweis ausschließlich über Streptavidin-HRP erfolgte (Abb. 28C, Spur 2). HC110-R-Myc/His stabil transfizierte HEK-293-Zellen wiesen dagegen allein unter Streptavidin-HRP keine 116 kDa große Bande mehr auf (Abb. 28C, Spur 1). Des weiteren konnte ausgeschlossen werden, daß der in Abb. 28A verwendete Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Sekundärantikörper allein unspezifische Signale verursachte (nicht gezeigt).

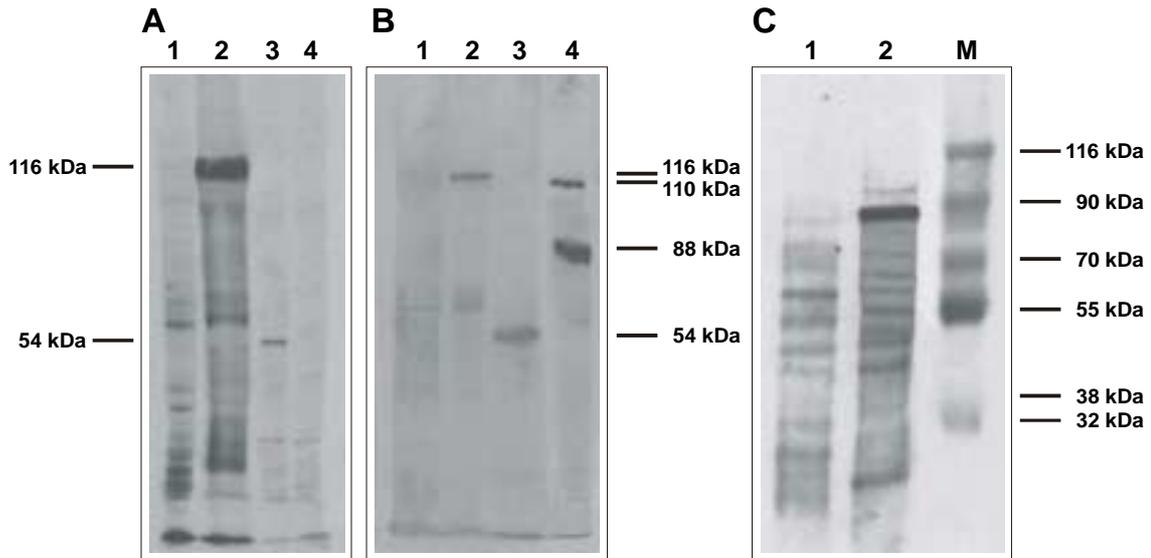


Abb. 28. Nachweis der PF1022A/BAY44-4400-Bindung an HC110-R.

Die in 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine (je 30 μ g) wurden mit Harnstoffhaltigem Renaturierungspuffer partiell renaturiert, geblottet und geblockt.

- (A) Gesamtprotein nicht transfizierter (1) und HC110-R-Myc/His stabil transfizierter HEK-293-Zellen (2) sowie des in *E. coli* exprimierten N- (3) und C-Terminus (4) von HC110-R wurden mit dem Liganden BAY44-4400 (20 μ g/ml) inkubiert und BAY44-4400-gebundene Proteine mit einem Kaninchen-anti-PF1022A-KLH-Immunsereum (1:1000) und einem Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRP-Antikörper (1:25000) detektiert.
- (B) Gesamtprotein nicht transfizierter (1) und HC110-R-Myc/His stabil transfizierter HEK-293-Zellen (2) sowie des in *E. coli* exprimierten N-Terminus von HC110-R (3) und adulter *H. contortus* Nematoden (4) wurden mit dem Liganden PF1022A-Biotin (500 μ g/ml) inkubiert und PF1022A-gebundene Proteine über Streptavidin-HRP (1:3000) detektiert.
- (C) Gesamtprotein HC110-R-Myc/His stabil transfizierter HEK-293-Zellen (1) und adulter *H. contortus* Würmer (2) wurde zur Kontrolle nur mit Streptavidin-HRP (1:3000) inkubiert. SDS-Marker-Banden (M) zur Größenabschätzung liegen bei 116, 90, 70, 55, 38 und 32 kDa.

Um diese Ergebnisse weiter zu verifizieren, wurde folgende Liganden-Präzipitation durchgeführt (Abb. 29): Je 2 mg und 4 mg magnetische Dynal M-280-Streptavidin-gekoppelte Beads wurden mit 500 μ g biotinyliertem PF1022A versetzt. Einem Kontrollansatz mit 4 mg Dynal-Beads wurde TST-Puffer anstelle von PF1022A zugesetzt. Überschüssiges PF1022A-Biotin wurde durch magnetische Separation entfernt, bevor ein Gemisch aus den in *E. coli* exprimierten und zuvor über Affinitätschromatographie aufgereinigten HC110-R N- und C-Terminus (Abb. 29, Spur 5) zugegeben wurde. Nach erneuter magnetischer Separation zur Abtrennung nicht gebundener HC110-R-Fragmente wurde je ein Aliquot ausgehend von 2 mg und 4 mg Dynal-Beads über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Detektion des Präzipitates erfolgte über das N-terminal fusionierte His-Tag mit einem Maus-anti-His IgG- und einem Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP-Antikörper. Abb. 29 zeigt, daß nur die N-terminale 54 kDa große Region von HC110-R durch PF1022A präzipitiert wurde (Spuren 1-4), also folglich der nicht an PF1022A gebundene C-Terminus von HC110-R zuvor durch magnetische Separation entfernt worden war. Unspezifische Bindungen des N- oder C-Terminus von HC110-R an die Streptavidin-gekoppelten Beads wurden

ausgeschlossen, indem einem Reaktionsansatz kein biotinyliertes PF1022A zugesetzt wurde (Abb. 29, Spur 6).

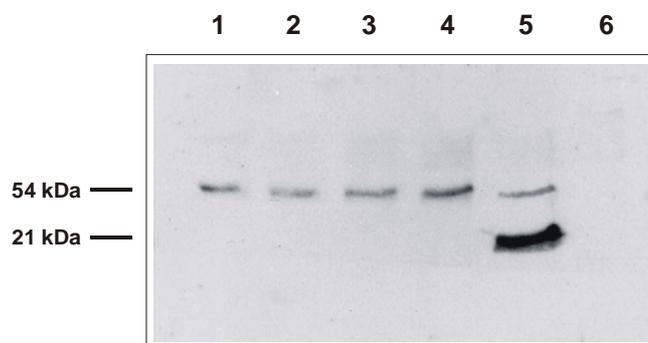


Abb. 29. Liganden-Präzipitation des N- und C-Terminus von HC110-R durch PF1022A-Biotin und Streptavidin-Beads.

Doppeltansätze zu je 2 mg (1 und 2) und 4 mg (3 und 4) magnetische Dynal M-280-Streptavidin-Beads wurden mit je 500 µg PF1022A-Biotin; ein Kontrollansatz mit 4 mg Dynal M-280-Streptavidin-Beads wurde ohne PF1022A-Biotin nur in TST-Puffer (6) für 30 min bei RT inkubiert. Jeder Ansatz wurde mit einem Gemisch aus dem in *E. coli* exprimierten und über Affinitätschromatographie aufgereinigten N- (40 µg) und C-Terminus von HC110-R (60 µg) versetzt, für 1 h bei 4 °C inkubiert und in den Magneten gebracht. Nach der magnetischen Separation wurde jeweils ein halber Reaktionsansatz (1-4 und 6) sowie ein Aliquot des HC110-R Gemisches aus dem N- und C-Terminus vor der magnetischen Separation (5) in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und mit einem Maus-anti-His IgG- (0,1 µg/ml) und einem Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP-Antikörper (1:25000) detektiert.

Die Bindung des Liganden PF1022A *in vivo* an HC110-R wurde außerdem mit Hilfe der FACS-Analyse überprüft (Abb. 30). Hierzu wurden in Dreifach-Ansätzen HEK-293-Zellen transient mit HC110-R-GFP oder GFP-HC110-R transfiziert oder aber transient mit HC110-R-Myc/His und GFP kotransfiziert. Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte sowie transient mit dem β_2 -R-GFP oder dem M1-R-GFP transfizierte HEK-293-Zellen eingesetzt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit biotinyliertem PF1022A inkubiert und PF1022A-gebundene Zellen über Streptavidin-Phycoerythrin detektiert und abschließend fixiert. Eine Negativkontrolle HC110-R-GFP transfizierter Zellen wurde ohne PF1022A-Biotin nur mit Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert.

Die Fluoreszenzanalyse von je 10000 HEK-293-Zellen erfolgte mit dem FACScan bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm hinsichtlich ihrer Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzfärbung. Phycoerythrin besitzt - wie auch TRITC - ein mit EGFP überlappendes Absorptionsspektrum bei ausreichend getrennten Emissionsspektren, so daß beide Fluorochrome bei nur einer Wellenlänge angeregt werden können. Zelltrümmer wurden durch das Setzen eines 'Gate' auf die Haupt-Zellpopulation von der Messung der Fluoreszenzintensität ausgeschlossen. Zur quantitativen Auswertung wurden die Grenzen für negative, ungefärbte und positive, GFP-fluoreszierende Zellen anhand der nicht transfizierten und mit GFP transfizierten Zellen festgelegt. Die 4,6 % grünfluoreszierenden, nicht transfizierten HEK-293-Zellen (Autofluoreszenz) wurden

von den anderen GFP-fluoreszierenden Proben abgezogen; und der Wert für die unspezifische Färbung der Zellen durch das mit Phycoerythrin gekoppelte Streptavidin (5,4 %) wurde von allen rotfluoreszierenden Zellen abgezogen (Tab. 9).

Plasmid	GFP-Fluoreszenz	Phycoerythrin-Fluoreszenz
nicht transfiziert	0 ± 0 %	0 ± 0 %
GFP	17,0 ± 0,5 %	1,3 ± 0,4 %
HC110-R-GFP	10,9 ± 0,2 %	4,5 ± 0,4 %
GFP-HC110-R	9,4 ± 2,5 %	2,5 ± 0,3 %
β ₂ -R-GFP	7,6 ± 0,4 %	0,8 ± 0,1 %
M1-R-GFP	8,2 ± 0,7 %	1,6 ± 0,1 %
HC110-R-Myc/His + GFP	23,1 ± 2,3 %	10,3 ± 0,7 %

Tab. 9. Nachweis der PF1022A-Bindung an HC110-R transfizierte HEK-293-Zellen durch FACScan.

Die 4,6 % aufgrund der Autofluoreszenz der Zellen grünfluoreszierenden, nicht transfizierten Zellen wurden von allen GFP-fluoreszierenden Zellen subtrahiert. Ebenso wurde die unspezifische Färbung durch Streptavidin-Phycoerythrin von 4,4 % von allen rot-fluoreszierenden Versuchsansätzen abgezogen.

Berechnete man den prozentualen Anteil der grünfluoreszierenden Zellen, die nach Abzug der Autofluoreszenz bzw. der unspezifischen Rotfärbung durch Streptavidin-Phycoerythrin auch rotfluoreszierend waren, so banden 41,2 % der HC110-R-GFP exprimierenden Zellen, 26,8 % der GFP-HC110-R exprimierenden Zellen sowie 44,5 % der mit HC110-R-Myc/His und GFP kotransfizierten Zellen PF1022A, dagegen banden nur 7,5 % der GFP exprimierenden Zellen, 9,9 % der β₂-R-GFP exprimierenden Zellen und 19,2 % der M1-R-GFP exprimierenden Zellen PF1022A (Abb. 30).

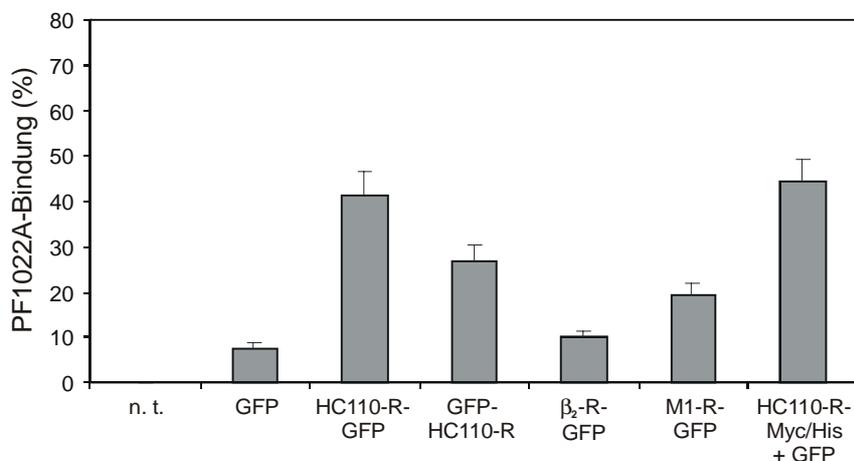


Abb. 30. Nachweis der PF1022A-Bindung an HC110-R transfizierte HEK-293-Zellen durch FACScan.

Je 5×10^5 nicht transfizierte, transient mit GFP, HC110-R-GFP, GFP-HC110-R, β_2 -R-GFP und M1-R-GFP transfizierte sowie transient mit HC110-R-Myc/His und GFP kotransfizierte HEK-293-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ PF1022A-Biotin und Streptavidin-Phycoerythrin (1:300) inkubiert und anschließend fixiert. Als Negativkontrolle wurden HC110-R-GFP transfizierte Zellen ohne PF1022A-Biotin nur mit Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert. Nach Abzug der Autofluoreszenz, d. h. der 4,6 % nicht transfizierten Zellen (n. t.) im Grünkanal von allen grün-fluoreszierenden Zellen und der durch Streptavidin-Phycoerythrin bedingten 4,4 % unspezifischen Färbung im Rotkanal wurde der prozentuale Anteil der GFP-fluoreszierenden Zellen (GFP, HC110-R-GFP, GFP-HC110-R, β_2 -R-GFP, M1-R-GFP und HC110-R-Myc/His + GFP) ermittelt, die PF1022A gebunden haben (PF1022A-Bindung in %). Die Standardabweichung ergibt sich durch die Bestimmung der Mittelwerte von Dreifach-Ansätzen.

3.7.1 Wechselwirkungen von PF1022A-Derivaten mit HC110-R vermittelter α -LTX Signaltransduktion

PF1022A zeigt neuropharmakologische *in vitro* Aktivität zwischen 10^{-9} - 10^{-3} mg/ml je nach Nematodenart [Terada, 1992]. Um eine mögliche Interferenz von PF1022A und seiner Derivate mit HC110-R und dem durch HC110-R vermittelten α -LTX-‘Signalling‘ festzustellen, wurde mit Hilfe der Ca^{2+} -Imaging-Methode der Einfluß von BAY44-4400, einer besser löslichen Morpholin-Variante von PF1022A [Nishiyama *et al.*, 1998], auf HC110-R transient oder stabil exprimierende HEK-293-Zellen untersucht. Zur Kontrolle wurde der *in vitro* wie *in vivo* mehr als 100fach weniger wirksame optische Antipode zu PF1022A [Pleiss *et al.*, 1995; Geßner *et al.*, 1996], PF1022-001 [Ohyama *et al.*, 1994], eingesetzt. BAY44-4400 und PF1022-001 wurden aufgrund ihrer Hydrophobizität zunächst in reinem DMSO gelöst. Die Stammkonzentration wurde dabei so gewählt, daß im Versuchsansatz stets nur 0,1 % DMSO gegenwärtig waren. Für DMSO-Konzentrationen bis einschließlich 0,1 % konnte in Kontrollversuchen ausgeschlossen werden, daß sie in nicht transfizierten wie HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen zu einer Beeinträchtigung der Versuchsergebnisse führten (Abb. 31A). Fura-2 beladene nicht transfizierte sowie mit HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden zum einen mit 100, 300 oder 400 ng/ml sowie 1 oder 10 $\mu\text{g/ml}$ BAY44-4400 und zum anderen mit den gleichen Konzentrationen PF1022-001 stimuliert. Bei keiner Konzentration konnte über den gesamten Zeitraum von 50 min eine Ca^{2+} -vermittelte Antwort festgestellt werden. Abb. 31B und C zeigen exemplarisch die Stimulation HC110-R-GFP und M1-R-GFP transfizierter Zellen mit 400 ng/ml BAY44-4400 und PF1022-001. Da die PF1022A-Derivate möglicherweise auch von den Zellen aufgenommen werden und damit sekundär in Signaltransduktionswege eingreifen können und weil die PF1022A-Derivate je nach Parasit längere Zeit im Wurm verweilen [Conder *et al.*, 1995], wurden die Zellen in einigen Versuchen für 90 min mit den Derivaten vorinkubiert. Zellen, die für 90 min mit 4 ng/ml (nicht gezeigt) oder 400 ng/ml BAY44-4400 oder PF1022-001 vorinkubiert wurden, zeigten keine Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 31D). Bei direkter Zugabe von Konzentrationen ab 300 ng/ml BAY44-4400 konnte - im Gegensatz zu dem optischen Antipoden - eine leichte, aber innerhalb weniger Minuten reversible

Zellschwellung als unmittelbare Wirkung auf das Anthelminthikum in HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen auf einem Monitor, der die Zellen 40fach vergrößert darstellte, beobachtet werden.

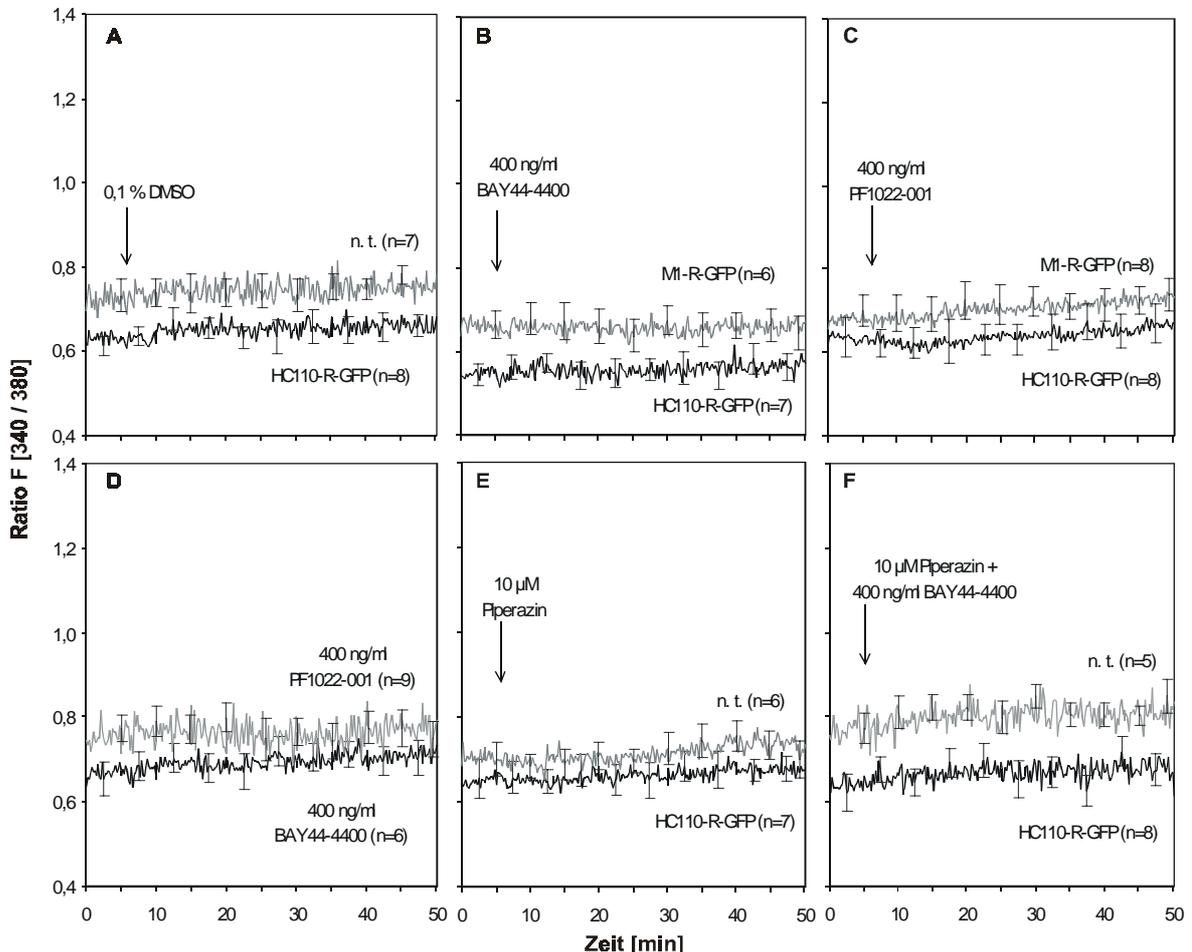


Abb. 31. Einfluß von BAY44-4400 und dem optischen Antipoden PF1022-001 auf das HC110-R vermittelte Ca^{2+} -‘Signalling‘.

Die Beladung der Zellen mit 1 μM Fura-2/AM erfolgte in nicht transfizierten HEK-293-Zellen sowie 48 h nach der transienten Transfektion mit HC110-R-GFP oder M1-R-GFP. Gemessen wurde der Quotient aus 340/380 nm (Ratio) in Abhängigkeit von der Zeit. n gibt die Anzahl der ausgewählten Zellen an.

- Nicht transfizierte (n. t., graue Linie) und HC110-R-GFP transfizierte (HC110-R-GFP, schwarze Linie) Zellen wurden zur Kontrolle nach 6 min mit 0,1 % des Lösungsmittels DMSO in Na^+ -HBS-Puffer versetzt.
- HC110-R-GFP (schwarze Linie) und M1-R-GFP (graue Linie) transfizierte Zellen wurden nach 6 min mit 400 ng/ml BAY44-4400 stimuliert.
- Wie (B), HC110-R-GFP (schwarze Linie) und M1-R-GFP (graue Linie) transfizierte Zellen wurden nach 6 min mit 400 ng/ml PF1022-001 stimuliert.
- HC110-R-GFP exprimierende Zellen wurden für 90 min mit 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) vorinkubiert und nicht gebundene Substanzen vor der Messung gewaschen.
- Nicht transfizierten (n. t., graue Linie) und HC110-R-GFP exprimierenden Zellen (HC110-R-GFP, schwarze Linie) wurde nach 6 min 10 μM Piperazin zugesetzt.
- Wie (E), nur wurde nicht transfizierten (n. t., graue Linie) und HC110-R-GFP exprimierenden Zellen (HC110-R-GFP, schwarze Linie) nach 6 min ein Gemisch aus 10 μM Piperazin und 400 ng/ml BAY44-4400 verabreicht.

Von Piperazin weiß man neuesten Versuchen zufolge, daß es die Wirkung von PF1022A/BAY44-4400 in *in vitro*- wie *in vivo*-Versuchen mit *Heterakis spumosa* synergistisch verstärkt [persönliche Mitteilung Dr. Dr. A. Harder]. Bei gleichzeitiger Gabe von 400 ng/ml BAY44-4400 mit 1 oder 10 μM Piperazin (Abb. 31F) konnte weder in nicht transfizierten, noch in HC110-R-GFP transient transfizierten HEK-293-Zellen eine Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ festgestellt werden. Der Kontrollansatz mit 10 μM Piperazin führte ebenfalls in nicht transfizierten und HC110-R-GFP transfizierten Zellen zu keiner Veränderung des Ca^{2+} -Haushaltes (Abb. 31E).

Im Gegensatz dazu beeinflussten sowohl BAY44-4400, als auch der optische Antipode PF1022-001, in Anwesenheit von 75 nM α -LTX die α -LTX-induzierte Signaltransduktion von HC110-R-GFP exprimierenden HEK-293-Zellen, wenngleich auch in unterschiedlichem Ausmaß (Abb. 31B-E). In einem Kontrollexperiment, in dem man HC110-R-GFP oder M1-R-GFP transfizierten Zellen 6 min vor der Stimulation mit 75 nM α -LTX 0,1 % DMSO zusetzte, konnte ausgeschlossen werden, daß das für BAY44-4400 und auch PF1022-001 verwendete Lösungsmittel in dieser Konzentration einen Einfluß auf die durch α -LTX induzierte Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausübte. HC110-R-GFP exprimierende Zellen zeigten im Gegensatz zu den M1-R-GFP exprimierenden Zellen nach α -LTX-Zugabe den bereits in Kap. 3.6.1 beschriebenen biphasischen Verlauf mit vergleichbaren Werten für $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 32A). Inkubierte man HC110-R-GFP exprimierende Zellen 6 min vor der α -LTX-Zugabe mit 4 ng/ml BAY44-4400, so verringerte sich der in Kap. 3.6.1 beschriebene Einfluß des α -LTX auf die Ca^{2+} -Konzentration: Der durch α -LTX induzierte erste kleine Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verschwand und der zweite verzögerte Peak wurde 14 min nach der α -LTX-Zugabe auf $44 \pm 6,0$ nM Ca^{2+} reduziert (Abb. 32B). In Anwesenheit von 4 ng/ml PF1022-001 - die Zugabe erfolgte 6 min vor der Stimulation mit α -LTX - kam es zu einem schnellen sofortigen Anstieg von $103 \pm 11,5$ nM Ca^{2+} (Abb. 32B). Wurde HC110-R-GFP exprimierenden Zellen 6 min vor der α -LTX-Zugabe 400 ng/ml BAY44-4400 zugesetzt, kam es - ähnlich wie bei 4 ng/ml BAY44-4400 (Abb. 32B) - zu einer verzögerten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um $49 \pm 4,2$ nM nach 23 min, die 8 min später auf ein verglichen mit den Ausgangswerten um $11 \pm 1,4$ nM leicht erhöhtes Plateau absank (Abb. 32C). Setzte man 400 ng/ml PF1022-001 6 min vor der Inkubation mit 75 nM α -LTX zu, so kam es zu einer schnellen Ca^{2+} -Erhöhung um $112 \pm 14,3$ nM Ca^{2+} (Abb. 32C), wie sie bereits bei Zugabe von 4 ng/ml PF1022-001 beobachtet werden konnte (Abb. 32B). In einem anderen Versuchsansatz wurden HC110-R-GFP exprimierende HEK-293-Zellen jeweils mit 4 ng/ml (Abb. 32D) oder 400 ng/ml BAY44-4400 bzw. PF1022-001 (Abb. 32E) für 90 min vorinkubiert. Nicht gebundener oder aufgenommener Wirkstoff wurde nach der Inkubation und Beladung der Zellen mit Fura-2/AM sorgfältig gewaschen, bevor die Zellen mit 75 nM α -LTX stimuliert wurden. Mit dem optischen Antipoden PF1022-001 vorinkubierte HC110-R transfizierte Zellen zeigten bei 4 ng/ml PF1022-001 eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um $102 \pm 6,4$ nM (Abb. 32D) und bei 400 ng/ml eine vergleichbare Erhöhung um

109±8,4 nM Ca²⁺ (Abb. 32E). Dieser bereits wenige Minuten nach α-LTX-Zugabe beobachtete Ca²⁺-Anstieg glich den bereits in Abb. 32B und C beobachteten schnellen Veränderungen der [Ca²⁺]_i, als PF1022-001 unmittelbar vor der Stimulation mit α-LTX zugegeben wurde. BAY44-4400 dagegen zeigte unterschiedliche Antworten bezüglich des α-LTX induzierten Ca²⁺-Einstroms: Wurden HC110-R-GFP exprimierende Zellen mit 4 ng/ml BAY44-4400 für 90 min vorinkubiert, kam es durch α-LTX-Induktion zu einer maximalen Erhöhung der [Ca²⁺]_i um 95±20,5 nM bei 10 min, bevor sie auf ein um 23±2,6 nM Ca²⁺ erhöhtes ausgedehntes Plateau absank (Abb. 32D). Bei Vorinkubation mit 400 ng/ml BAY44-4400 kam es nach α-LTX-Stimulation zu einer Ca²⁺-Erhöhung der [Ca²⁺]_i um maximal 65±7,5 nM (Abb. 32D), die zudem noch 12 min verzögert gegenüber der Vorinkubation mit 4 ng/ml BAY44-4400 auftrat (Abb. 32C).

Setzte man stabil HC110-R-Myc/His exprimierenden HEK-293-Zellen 6 min vor der α-LTX-Zugabe 400 ng/ml BAY44-4400 zu, so wurde die bereits in Kap. 3.6.1 beobachtete direkte Erhöhung der [Ca²⁺]_i um 267±45,8 nM (Abb. 27G) komplett inhibiert (Abb. 32F). Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von 400 ng/ml PF1022-001 mit einer Ca²⁺-Erhöhung um 209±33,4 nM Ca²⁺ zu keiner signifikanten Veränderung der [Ca²⁺]_i (Abb. 32F).

Um den spezifischen Einfluß von BAY44-4400 auf das α-LTX vermittelte Ca²⁺-‘Signalling’ in HC110-R exprimierenden Zellen zu zeigen, wurden folgende Kontrollexperimente durchgeführt: Zunächst wurden nicht transfizierte HEK-293-Zellen mit 1 mM Carbamylcholin-Chlorid (Carbachol), einem Liganden für muscarinische Acetylcholin-Rezeptoren, unter An- und Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400 stimuliert (Abb. 32G). In beiden Fällen kam es zu einer vergleichbaren sofortigen Erhöhung der [Ca²⁺]_i durch endogene, natürliche muscarinische Acetylcholin-Rezeptoren um 58±8,1 nM Ca²⁺ für HEK-293-Zellen bei Anwesenheit von BAY44-4400 und um 53±6,8 nM Ca²⁺ bei Abwesenheit des Anthelminthikums. Die zusätzliche transiente Transfektion von HEK-293-Zellen mit dem C-terminal GFP-fusionierten, humanen muscarinischen M1-Acetylcholin-Rezeptor (M1-R-GFP) führte zu einer gegenüber nicht transfizierten Zellen (Abb. 32G) leichten Erhöhung der [Ca²⁺]_i um 89±5,5 nM bei An- und um 85±6,1 nM Ca²⁺ bei Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400 (Abb. 32H). Auch konnte kein signifikanter Einfluß von BAY44-4400 auf den M1-R-GPCR beobachtet werden. Stimulierte man in nicht transfizierten HEK-293-Zellen die endogen vorhandenen natürlichen β₂-adrenergen Rezeptoren mit 1 mM Isoproterenol oder die nicotinischen Rezeptoren mit 1 mM Arecolin - wie bereits für Carbachol beschrieben - unter An- und Abwesenheit von 400 ng/ml BAY44-4400, so kam es auch hier zu keinem signifikanten Unterschied der [Ca²⁺]_i (Abb. 32I). Isoproterenol induzierte einen Anstieg der [Ca²⁺]_i von 45±4,7 nM in An- und eine Zunahme von 48±5,7 nM Ca²⁺ in Abwesenheit von BAY44-4400. Infolge der Arecolin-Stimulation kam es in Anwesenheit von BAY44-4400 zu einer Erhöhung um 28±4,1 nM Ca²⁺, in Abwesenheit des Wirkstoffes um 27±3,5 nM Ca²⁺ (Abb. 32I).

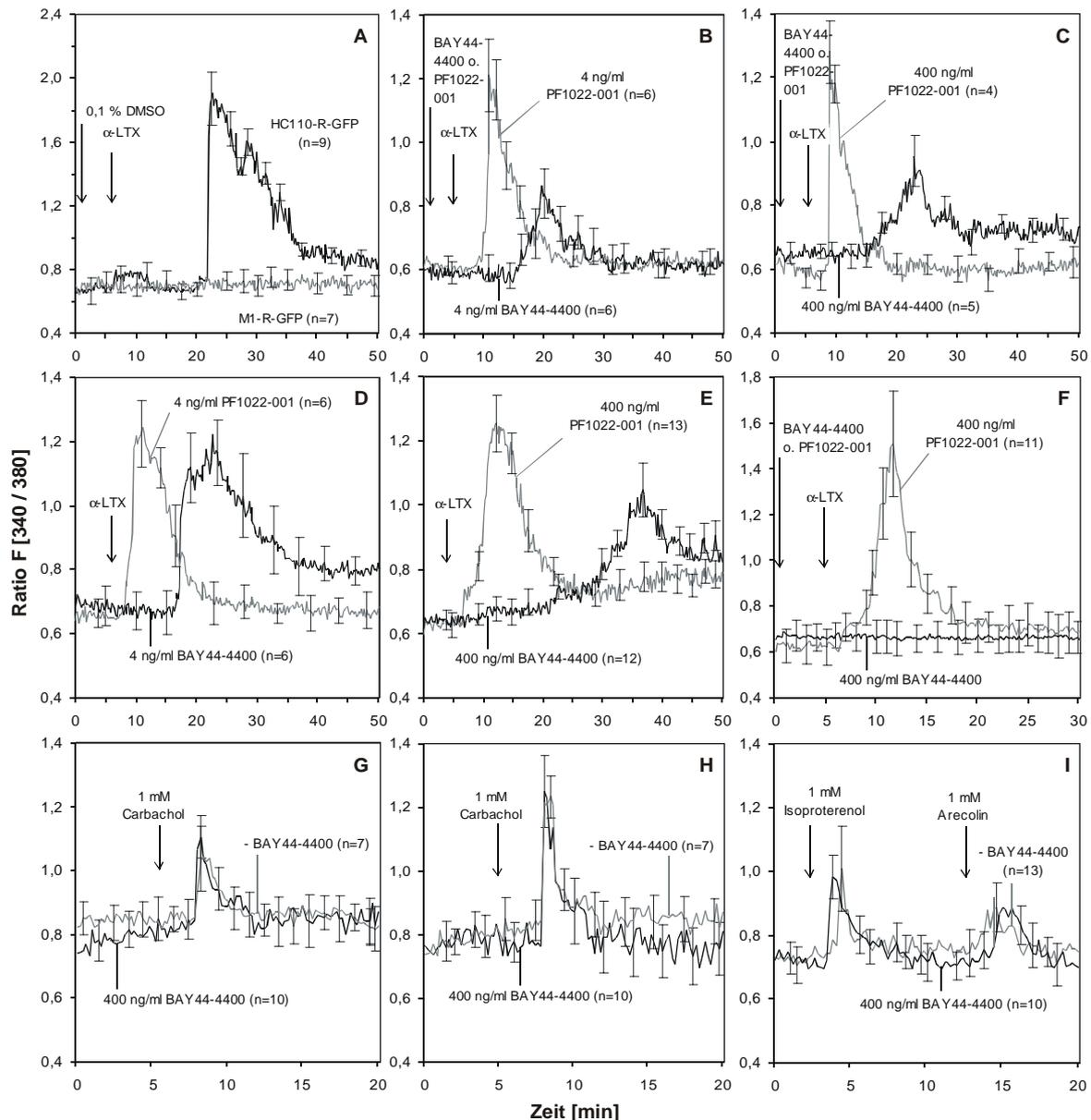


Abb. 32. Wechselwirkungen des HC110-R vermittelten α -LTX-‘Signalling‘ durch PF1022A-Derivate.

Die Beladung der Zellen mit 1 μ M Fura-2/AM erfolgte in nicht transfizierten HEK-293-Zellen sowie 48 h nach der transienten Transfektion mit HC110-R-GFP oder M1-R-GFP. Die eingesetzte α -LTX-Menge betrug stets 75 nM. Für die Versuche mit den Kontrollsubstanzen wurden die Zellen mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,6 ml Na⁺-HBS/min umspült. Gemessen wurde der Quotient aus 340/380 nm (Ratio) in Abhängigkeit von der Zeit. n gibt die Anzahl der ausgewählten Zellen an.

- (A) HC110-R-GFP (schwarze Linie) und M1-R-GFP (graue Linie) exprimierende Zellen wurden 6 min vor der α -LTX-Stimulation mit 0,1 % DMSO versetzt, um auszuschließen, daß DMSO Einfluß auf α -LTX induzierte Veränderungen der [Ca²⁺]_i nimmt.
- (B) HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden 6 min vor der α -LTX Zugabe mit 4 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) versetzt.
- (C) Wie (B), nur wurde HC110-R-GFP exprimierenden Zellen 6 min vor der Stimulation mit α -LTX 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) zugegeben.
- (D) HC110-R-GFP transfizierte Zellen wurden für 90 min mit 4 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) vorinkubiert und nicht gebundene Substanzen vor der Messung entfernt. Die Stimulation der Zellen erfolgte nach 6 min mit α -LTX.

- (E) Wie (D), nur wurden HC110-R-GFP transfizierte Zellen für 90 min mit 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) vorinkubiert, nicht gebundene Substanzen vor der Messung entfernt und die Zellen nach 6 min mit α -LTX stimuliert.
- (F) HC110-R-Myc/His stabil exprimierende Zellen wurden 6 min vor der Zugabe von α -LTX mit 400 ng/ml BAY44-4400 (schwarze Linie) oder PF1022-001 (graue Linie) versetzt.
- (G) Zur Kontrolle wurde nicht transfizierten Zellen in An- (400 ng/ml BAY44-4400, schwarze Linie) oder Abwesenheit (-BAY44-4400, graue Linie) von 400 ng/ml BAY44-4400 nach 6 min 1 mM Carbamylcholin-Chlorid (Carbachol) für 100 s zugesetzt und wieder mit Na^+ -HBS ausgewaschen.
- (H) Wie (G), nur wurden M1-R-GFP transfizierte Zellen in An- (400 ng/ml BAY44-4400, schwarze Linie) oder Abwesenheit (-BAY44-4400, graue Linie) von 400 ng/ml BAY44-4400 nach 6 min mit 1 mM Carbachol für 100 s stimuliert und wieder mit Na^+ -HBS ausgewaschen.
- (I) Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen in An- (400 ng/ml BAY44-4400, schwarze Linie) oder Abwesenheit (-BAY44-4400, graue Linie) von 400 ng/ml BAY44-4400 nach 3 min für 100 s mit 1 mM Isoproterenol und nach 12 min für 100 s mit 1 mM Arecolin stimuliert. Die Substanzen wurden nach den 100 s wieder mit Na^+ -HBS ausgewaschen.

4 Diskussion

Diese Arbeit zeigt, daß der in einem Liganden-Immunscreening aus einer *H. contortus* cDNA-Expressionsbibliothek isolierte 110 kDa große heptahelikale Transmembran-Rezeptor HC110-R ein neues 'Target'-Protein für das erst vor wenigen Jahren aus dem Pilz *Mycelia sterilia* entdeckte anthelminthisch hochwirksame Cyclodepsipeptid PF1022A darstellt [Sasaki *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994; Kachi *et al.*, 1995]. Die Bindung von PF1022A an den N-Terminus von HC110-R beeinflusst antagonistisch die HC110-R vermittelte α -LTX Signaltransduktion.

4.1 Charakterisierung des heptahelikalen Transmembran-Rezeptors HC110-R

Die HC110-R-Proteinsequenz weist eine 38-52 %ige Ähnlichkeit zu Vertretern der GPCR-Familie auf. Die GPCRs stellen eine vielfältige Membranproteinfamilie dar, die untereinander nur zu 20-40 % ähnlich sind [Brann, 1992]. Sequenzähnlichkeiten mit bis zu 50-70 % bestehen erst innerhalb der GPCR-Unterfamilien, wie bspw. der Sekretin-Unterfamilie. Diese weisen charakteristische 'Fingerprint'-Motive auf, mit denen eine Abgrenzung von anderen integralen Membranproteinen möglich wird [Attwood und Findlay, 1994]. Abgesehen von Sequenz-spezifischen Variationen unterscheiden sich die einzelnen GPCR-Unterfamilien in der Länge und Funktion ihrer N-terminalen extrazellulären Domäne, ihrer C-terminalen intrazellulären Domäne und ihren intra- und extrazellulären Schleifen [Bockaert und Pin, 1999].

Die Zuordnung von HC110-R zu der GPCR-Unterfamilie der großen Sekretin-artigen Rezeptoren ist aufgrund der hohen Übereinstimmung im Bereich der sieben Transmembran-Domänen sowie konservierter Proteinmotive in dem 59 kDa großen extrazellulären N-Terminus (535 AS) und dem 24 kDa großen intrazellulären C-Terminus (214 AS) sehr wahrscheinlich [Segre und Goldring, 1993]. Zu dieser Familie gehören u. a. die durchschnittlich 337 kDa großen Cadherin-Rezeptoren [Hadjantonakis *et al.*, 1998], 210 kDa großen Latrophilin-Rezeptoren [Davletov *et al.*, 1996; Krasnoperov *et al.*, 1997; Lelianova *et al.*, 1997; Ichtchenko *et al.*, 1998; Sugita *et al.*, 1998; Matsushita *et al.*, 1999], 100 kDa großen EMR1-Hormon-Rezeptoren [Baud *et al.*, 1995; McKnight *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1997] und die 90 kDa großen CD97-Rezeptoren [Hamann *et al.*, 1995; 1996].

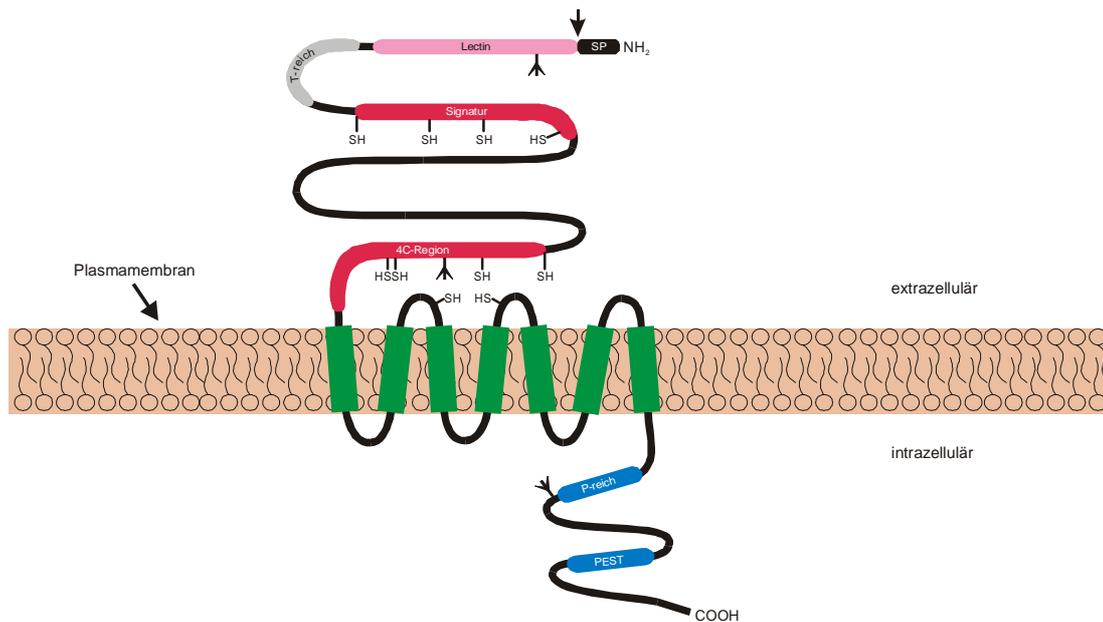


Abb. 33. Graphische Darstellung von HC110-R und seiner charakteristischen Protein-Motive.

Die strukturellen Motive sind wie folgt gekennzeichnet: N-terminales Signalpeptid (SP, Pos. 1-21, schwarz); Lectin-ähnliche Sequenz (Lectin, Pos. 22-125, pink); Thr-reiche Region (T-reich, Pos. 128-147, grau); Cys-reiche Signatur (Signatur, Pos. 166-221, rot); 4-Cys-Region (4 C-Region, Pos. 478-524, rot); sieben Transmembran-Domänen (zwischen Pos. 536-772, grün); Pro-reiche Region (P-reich, Pos. 845-861, blau); PEST-Region (PEST, Pos. 915-933, blau); 3 N-Glykosylierungsstellen (Pos. 26, 499 und 862, Verzweigung); und die unter den Sekretin-GPCRs hochkonservierten Cystein-Reste (-SH).

Für HC110-R besteht eine 48 %ige Sequenzidentität und 76 %ige Ähnlichkeit zu einer deduzierten Aminosäuresequenz aus dem nicht näher charakterisierten *C. elegans* Cosmidklon B0457 [Wilson *et al.*, 1994]. Die höchste Sequenzidentität (62 %) und Ähnlichkeit (90 %) liegt in den sieben Transmembran-Regionen, wobei die Sequenzidentität für den N-Terminus mit 44 % und den C-Terminus mit 50 % immer noch sehr hoch ist. Außerdem zeigt HC110-R mit einer 31 %igen Identität hohe strukturelle Ähnlichkeiten zu dem bereits erwähnten 210 kDa großen Latrophilin/CIRL-Rezeptor in Vertebraten.

HC110-R, B0457 und Latrophilin verfügen neben der heptahelikalen Struktur über einige gemeinsame hochkonservierte Protein-Motive, wie sie in Abb. 33 für HC110-R dargestellt sind. Auf ein abspaltbares hydrophobes Signalpeptid folgt ein Cys-reicher Bereich mit starker Ähnlichkeit zu einem D-Galactose-bindenden Lectin aus Seeigeleiern [Ozeki *et al.*, 1991]. Dieses Lectin liegt sonst als Homodimer vor und ist an der Entwicklung des Seeigels und an der Hämagglutination von Erythrozyten beteiligt. Alle Vertebraten synthetisieren lösliche Galactose-bindende Lectine [Barondes *et al.*, 1988]. Endogene tierische Lectine kommen auch als Dimere und Multimere in der extrazellulären Matrix, in Zellmembranen, im Cytoplasma und im Zellkern vor [Barondes, 1984; Schmitt-Wrede *et al.*, 2000], und, obwohl ihre physiologischen

Funktionen noch nicht gut verstanden sind, scheinen sie die Entwicklung (Zellerkennung, Gewebeverteilung) zu regulieren und eine wichtige Rolle in der molekularen Erkennung und Interaktion mit den Zuckerketten von Glykoproteinen oder Glykolipiden zu spielen [Barondes *et al.*, 1988; Hirabayashi und Kasai, 1988; Sharon und Lis, 1989]. Die bereits bekannten Galactose-bindenden Lectine, wie bspw. aus dem elektrischen Aal (Electrolectin, Congerin), dem Huhn oder aus einer Vielzahl anderer Säuger, sind in der Regel zwischen 130-140 Aminosäuren (14-16 kDa) groß [Hirabayashi und Kasai, 1988; Muramoto und Kamiya, 1992]. Der Lectin-ähnlichen Struktur schließt sich bei HC110-R und B0457 ein „Thr-Stretch“ aus 19 bzw. 13 Thr-Resten an, der jeweils nur durch einen Ser-Rest unterbrochen wird. Anstelle dieses Thr-Restes weist Latrophilin eine größere Region mit Ähnlichkeit zu dem löslichen neuronalen Olfactomedin auf [Karnik *et al.*, 1993; Yokoe und Anholt, 1993]. Olfactomedin ist ein 57 kDa großes, glykosyliertes, extrazelluläres Matrix-Protein, das von Bowman'schen Drüsen und sustentakulären Zellen im olfaktorischen Neuroepithel des Ochsenfrosches (*Rana catesbeiana*) exprimiert wird, Dimere und Multimere ausbildet und das Wachstum und die Differenzierung chemosensorischer Cilien beeinflusst [Yokoe und Anholt, 1993]. Die im Latrophilin auf die Olfactomedin-Region folgende Pro-Thr-reiche Region mit Ähnlichkeit zu Mucin und anderen Pro-reichen Proteinen, wie bspw. Collagen oder Extensin [Cyster *et al.*, 1991; Gum *et al.*, 1994], ist in dieser Form zwar weder in HC110-R, noch in B0457 zu finden, aber entspricht möglicherweise funktional dem 'Thr-Stretch'. Alle 3 Proteine verfügen aber wieder über eine Cys-reiche Signatur mit je 4 alternierenden Cys- und Trp-Resten und eine weitere hochkonservierte 4-Cys-reiche Region unmittelbar vor den sieben Transmembran-Domänen. Letzteres 4-Cys-Motiv wurde vor kurzem von den Latrophilinen [Krasnoperov *et al.*, 1999] und vom CD97-Rezeptor [Gray *et al.*, 1996] als GPS-Motiv (GPCR proteolytische Stelle) vorgeschlagen. Dabei ist die CXC-Signatur (X stellt hier eine beliebige Aminosäure dar), die von 2 Trp- und 2 weiteren Cys-Resten flankiert wird, das charakteristische Kennzeichen der endogenen GPS-Domäne [Lelianova *et al.*, 1997; Ichtchenko *et al.*, 1999; Krasnoperov *et al.*, 1999]. Ob auch alle anderen Vertreter der großen Sekretin-artigen Rezeptoren ähnliche posttranslationale Modifikationen aufweisen, ist noch nicht geklärt. Innerhalb der ersten und zweiten extrazellulären Schleifenregion, also zwischen den Transmembran-Domänen II und III sowie IV und V, liegen zwei hochkonservierte Cys-Reste, von denen angenommen wird, daß sie eine Disulfid-Bindung ausbilden. Diese Disulfid-Bindung ist höchstwahrscheinlich wichtig für die dreidimensionale Struktur und die Stabilisierung der sieben Transmembran-Region und ihrer extrazellulären Domänen [Krauss, 1997; Bockaert und Pin, 1999]. Für die Bindung und Aktivierung ihrer assoziierten G-Proteine scheinen basische Aminosäuren (Arg, His und Lys) in den intrazellulären Schleifen 1 und 3 und im C-Terminus sowie eine ausgedehnte 3. intrazelluläre Schleife mit durchschnittlich 18-29 Aminosäuren essentiell zu sein [Baldwyn, 1993]. Der C-Terminus weist eine bis mehrere PEST- bzw. Pro-reiche Regionen auf. Rogers *et al.*

[1986] konnten zeigen, daß eukaryotische Proteine mit intrazellulären Halbwertzeiten von weniger als 2 h eine bis mehrere Regionen zwischen 12-45 Aminosäuren enthalten, die reich an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S), Threonin (T) und zu einem geringeren Gehalt auch an Aspartatsäure (D) sind. So setzt sich die aus 19 Aminosäuren bestehende PEST-Region von HC110-R (Pos. 915-933) aus 10 Pro-, 2 Ser-, 2 Thr-, 1 Asp- und 4 anderen Aminosäureresten zusammen. Solche PEST-Regionen sind im allgemeinen noch von positiven Aminosäuren flankiert und kommen sowohl in onkogenen Proteinen (*myc*, *fos*, *myb*), Casein, als auch in Enzymen (z. B. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase; pankreatische BSDL-Lipase), diversen Kinasen und Steroid-Rezeptoren vor, wo sie als proteolytische Signale fungieren [Rechsteiner *et al.*, 1996; Bruneau *et al.*, 1997]. Prolin- und Glutamin-reiche Abschnitte sind oftmals mit Transkriptionsfaktoren, wie z. B. CTF/NF-1 [Santoro *et al.*, 1988; Mermoud *et al.*, 1989] oder OTF-2 [Gerster *et al.*, 1990] assoziiert, bei denen diese Abschnitte als Aktivator-Domäne fungieren. Gerber *et al.* [1994] konnten in Zell-Transfektionsversuchen zeigen, daß 10 Proline oder 10-30 Glutamine eine optimale Aktivität ermöglichen, wenn diese an die DNA-bindende Domäne des Gal4-Faktors fusioniert sind. Viele Spleiß-Faktoren, wie z. B. PSF [Patton *et al.*, 1993], SF3a66 [Bennet und Reed, 1993] und SF3a120 [Krämer, 1995] sowie RNA-bindende Proteine [Swanson, 1995] enthalten Prolin-, und Glutamin-reiche Abschnitte, über die es dann zu Protein/Protein-Interaktionen kommen kann [Swanson, 1995; Siomi und Dreyfuss, 1997]. So vermitteln bspw. Proteine mit einer Src homologen 3-Domäne (SH3) nach Bindung an einen Pro-reichen Abschnitt Protein/Protein-Wechselwirkungen, die für die Verknüpfung von zellulären Proteinen, die an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind, notwendig ist [Feng *et al.*, 1994; Weng *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1994]. Diese SH3-Domäne kommt in Tyrosinkinase der Src-Familie vor (Src, Fyn und Lyn), aber auch in Tyrosinkinase des „nicht“ Rezeptor-Typs, wie Abl, Fps, Syk und Zap [Cicchetti *et al.*, 1992; Weng *et al.*, 1994]. Mittlerweile sind auch noch andere Domänen bekannt, die ähnliche Bindungseigenschaften wie die SH3-Domäne besitzen, aber strukturell verändert sind [Sudol, 1996]. So erkennt bspw. die in einer Vielzahl von cytoskeletalen und Signalübertragenden Proteinen vorkommende WW-Domäne die Aminosäure-Motive XPPXY und PPLP, während die SH3-Domäne das Motiv PXXP erkennt [Sudol, 1996; Bedford *et al.*, 1997]. Der aus 17 Aminosäuren bestehende Pro-reiche Abschnitt von HC110-R (Pos. 845-861) verfügt sogar über zwei entsprechende PQQP-Motive. Charakteristisch für Sekretin-Rezeptoren besitzen HC110-R, B0457 und Latrophilin außerdem mehrere Glykosylierungsstellen und zahlreiche Phosphorylierungsstellen in den 3 abgeleiteten, intrazellulären Schleifen und dem C-Terminus, die neben einem Prolin-reichen Carboxy-Ende entscheidende Motive für eine mögliche Beteiligung an einer Signaltransduktion darstellen. Phosphorylierungsstellen spielen unter physiologischen Bedingungen eine Rolle bei der Desensitivierung von Rezeptoren mit ihren endogenen Liganden [Krauss, 1997; Misteli und Spector, 1997]. Eine Möglichkeit, wie HC110-R an der Signaltransduktion beteiligt sein könnte, wäre demnach die Interaktion mit

Proteinen (z. B. Proteinkinasen), die an HC110-R binden und das Protein bspw. phosphorylieren oder dephosphorylieren.

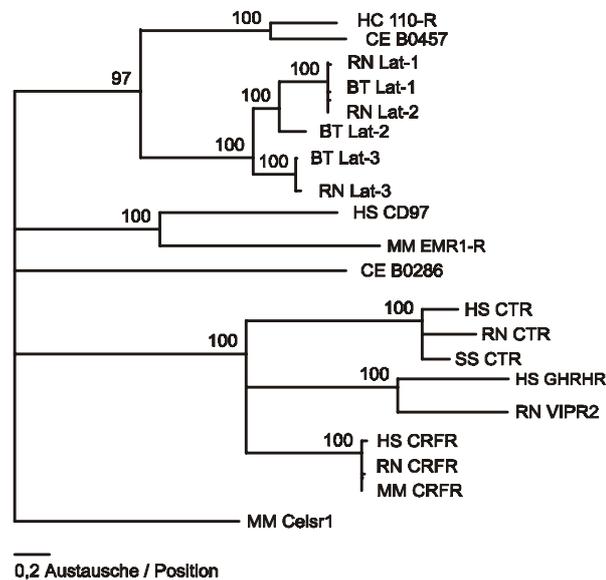


Abb. 34. Dendrogramm zur Bestimmung der phylogenetischen Position von HC110-R innerhalb der GPCR-Familie.

Durch die 'Maximum Likelihood' Methode [Felsenstein, 1973] wurde das phylogenetische Verhältnis zwischen HC110-R und 19 zu HC110-R ähnlichen GPCR-Vertretern der Sekretin-Unterfamilie mit den Programmen PROTML und NJDIST nach Adachi und Hasegawa [1992] durch 'Bootstrapping' mit 1000 Replikationen ermittelt. Der daraus kalkulierte skalierte Baum basiert auf der Matrix von Jones *et al.* [1992] und Dayhoff *et al.* [1978] und reduzierte sich, indem Äste mit 'Bootstrap'-Werten unter 90 % in dem endgültigen Dendrogramm zusammengefaßt wurden. Der Balken gibt den phylogenetischen Abstand von 0,2 Austauschen pro Position an. RN Lat-1 (AC: U72487): *Rattus norvegicus* Latrophilin-1; BT Lat-1 (AC: AF111098): *Bos taurus* Latrophilin-1; RN Lat-2 (AC: AF063102): *R. norvegicus* Latrophilin-2; BT Lat-2 (AC: AF111078): *B. taurus* Latrophilin-2; BT Lat-3 (AC: AF111085): *B. taurus* Latrophilin-3; RN Lat-3 (AC: U72487): *R. norvegicus* Latrophilin-3; HS CD97 (AC: X84700): *Homo sapiens* CD97; MM EMR1-R (AC: X93328): *Mus musculus* EMR1 Hormonrezeptor (F4/80 Glykoprotein); CE B0286 (AC: PIR T15308): *Caenorhabditis elegans* hypothetisches Protein B0286.2; HS CTR (AC: L00587): *H. sapiens* Calcitonin-Rezeptor; RN CTR (AC: X70658): *R. norvegicus* Calcitonin-artiger Rezeptor; SS CTR (AC: M74420): *Sus scrofa* Calcitonin-Rezeptor; HS GHRHR (AC: L01406): *H. sapiens* Wachstumshormone freisetzender Hormonrezeptor; RN VIPR2 (AC: Z25885): *R. norvegicus* vasoaktiver intestinaler Polypeptidrezeptor 2; HS CRFR (AC: L23333): *H. sapiens* Corticotropin freisetzender Rezeptor; RN CRFR (AC: L25438): *R. norvegicus* Corticotropin freisetzender Rezeptor; MM CRFR (AC: X72305): *M. musculus* Corticotropin freisetzender Rezeptor; MM Celsr1 (AC: AF031572): *M. musculus* neuraler sieben Transmembran-Rezeptor.

Um die phylogenetische Position von HC110-R innerhalb der GPCR-Familie einzuordnen, wurden die durch FASTA ermittelten Proteinsequenzen mit den höchsten Sequenzähnlichkeiten einem 'Alignment' basierend auf dem CLUSTAL W-Algorithmus [Thompson *et al.*, 1994] unterzogen. Das resultierende Dendrogramm (Abb. 34) enthält mehrere hoch-signifikante Gruppen: Neben der Familie der Latrophiline bestehen auch Gruppen zwischen dem EMR1-Rezeptor und einem abgeleiteten B0286.2-Protein aus *C. elegans* sowie zwischen Calcitonin-, GHRH-, VIPR2- und Corticotropin-Rezeptoren mit 'Bootstrap'-Werten von 100 %. Auffällig ist,

daß HC110-R eine hoch signifikante Gruppe mit dem *C. elegans* B0457-Protein bildet. Berücksichtigt man darüber hinaus, daß das *C. elegans*-Genom komplett sequenziert ist [Ainscough *et al.*, 1998], so kann daraus geschlossen werden, daß B0457 wirklich das homologe Gen zu HC110-R ist. Des weiteren bilden HC110-R, B0457 und die Säuger-Latrophiline eine hoch-signifikante monophyletische Unterfamilie innerhalb der Sekretin-Rezeptorfamilie. Die charakteristischen Protein-Motive von HC110-R, die in dieser Form nur bei den GPCRs vorkommen, die Datenbankvergleiche, bei denen die größten Sequenzähnlichkeiten zu Vertretern der Sekretin-Unterfamilie der GPCRs bestehen, und die Betrachtungen der phylogenetischen Position weisen darauf hin, daß mit HC110-R erstmals ein neues Mitglied der großen Sekretin-Rezeptoren aus dem gastrointestinalen Nematoden *H. contortus* isoliert werden konnte.

4.2 Zelluläre Lokalisation von HC110-R

Die rekombinante Expression von Rezeptoren aus Nematoden hat sich bis heute als schwierig erwiesen. Bislang konnten GPCRs aus Nematoden noch nicht derart exprimiert werden, daß ihre funktionalen Eigenschaften, wie z. B. ihre Sensitivität auf den endogenen Liganden denen natürlicher Rezeptoren entspricht [Brann, 1992; Zhang *et al.*, 1997]. Kürzlich konnte ein neuer Serotonin-Rezeptor (5HT-2Ce) aus *C. elegans* kloniert werden, der hohe Sequenzähnlichkeiten zu 5-HT₂-Rezeptoren anderer Spezies aufweist und durch Bindung des Liganden 5-HT eine Ca²⁺-vermittelte Signaltransduktion aktiviert. Jedoch zeigt dieser Rezeptor bei transienter Transfektion in COS-7-Zellen pharmakologische Unterschiede in Bezug auf andere 5HT-Rezeptoren (z. B. unterschiedliche mRNA-Expression, Spleiß-Variationen) [Hamdan *et al.*, 1999]. Es ist daher von großer praktischer Bedeutung für die Suche nach neuen Wirkstoffen und die Erforschung solcher Anthelminthika oder Arthropodiziden, Rezeptoren aus Invertebraten in eukaryotischen Systemen funktional zu exprimieren.

Durch *in vitro* Transkription und Translation konnte zunächst die Integrität der HC110-R-cDNA bestätigt werden, indem das erwartete Produkt von 110 kDa *in vitro* translatiert wurde. Im folgenden wurde HC110-R sowie sein N- und C-Terminus konstitutiv in *E. coli* exprimiert, um ausreichende Proteinmengen zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern und zur Ansequenzierung des HC110-R-Proteins zu erzeugen. Von dem 114 kDa großen HC110-R-Fusionsprotein mit N-terminalem 6x His-Tag (Pos. 1-986) wurden nur geringe Mengen in *E. coli* exprimiert. Eine Erklärung dafür wäre, daß (i) die Basalexpression von HC110-R bereits die dauerhafte Erhaltung des Plasmids in der Zelle verhinderte, (ii) die Größe des Proteins die Ursache für die niedrige Expressionsrate war oder (iii) das 114 kDa große HC110-R-Protein toxisch auf die *E. coli*-Zellen wirkte. Hingegen konnten ausreichende Proteinmengen des N-Terminus (Pos. 1-445) und des C-Terminus (Pos. 797-986) von HC110-R exprimiert werden. Wegen des N-terminalen His-Tags wurde der aufgereinigte C-Terminus von HC110-R C-terminal sequenziert und nach tryptischen Verdau wurden

weitere 4 Peptide N-terminal ansequenziert. Die Bestimmung der beiden letzten Aminosäurereste sowie die Abfolge von 4 Peptidfraktionen bestätigte die von der HC110-R-cDNA deduzierte Aminosäuresequenz.

Für die Untersuchung, ob HC110-R der zelluläre Rezeptor und damit das 'Target'-Protein für PF1022A ist, wurde ein geeignetes *in vivo* Expressionsmodell für HC110-R etabliert. Da aber bislang keine Zellkulturlinien von *H. contortus* und anderen Nematoden zur Verfügung stehen, wurde HC110-R transient und stabil in verschiedenen Säuger-Zellkulturlinien exprimiert. Für Transfektionen von GPCRs und physiologische Studien der Signaltransduktion haben sich insbesondere die humane embryonale Nieren-Zelllinie HEK-293 und die Affennieren-Zelllinie COS-7 als gut geeignet erwiesen [Lutz *et al.*, 1993; Schipani *et al.*, 1993; Reagan, 1994]. So konnte beispielsweise eine Untereinheit des Glutamat-Rezeptors mit C-terminalem GFP-Tag, die in HEK-293-Zellen transfiziert wurde, an der Oberfläche lokalisiert werden und erwies sich als funktionaler Glutamat-gesteuerter Ionenkanal [Marshall *et al.*, 1995]. Transiente Transfektionen von Latrophilin-Konstrukten wurden bereits in HEK-293- und chromaffinen Zellen [Bittner *et al.*, 1998; Ichtchenko *et al.*, 1999], als auch in COS-7-Zellen [Lelianova *et al.*, 1997] durchgeführt und waren funktional. Auch der CD97-Rezeptor [Hamann *et al.*, 1995] sowie 2 humane VIP-Sekretin-Rezeptoren [Couvineau *et al.*, 1994] wurden heterolog in COS-7-Zellen exprimiert und banden nach wie vor ihren endogenen Liganden. Von den HEK-293-Zellen ist außerdem bekannt, daß sie im Gegensatz zu chromaffinen Zellen keinen endogenen Latrophilin-Rezeptor besitzen [Bittner *et al.*, 1998].

Zur Überprüfung der Expression von HC110-R wurde der Rezeptor N- bzw. C-terminal mit GFP markiert [Chalfie *et al.*, 1994; Tarasova *et al.*, 1997]. In den HC110-R transfizierten Säugerzelllinien CHO-K1, Hep-G2, COS-7 und HEK-293 konnte die HC110-R-mRNA durch RT-PCR nachgewiesen werden. Durch FACScan wurde der prozentuale Anteil HC110-R-GFP und GFP-HC110-R exprimierender Zellen 24 h und 48 h nach der Transfektion ermittelt. In CHO-K1-Zellen fluoreszierten nach 24 h etwa 23-35 % der HC110-R transfizierten Zellen, nach 48 h fluoreszierten möglicherweise wegen einer für die Zellen toxischen Überexpression des Konstruktes nur noch 13-16 %. Dagegen hat sich die Transfektionsrate in HC110-R transfizierten HepG2-, COS-7- und HEK-293-Zellen innerhalb von 24 h verdoppelt.

Bei zwei Mitgliedern der Sekretin-Unterfamilie von GPCRs, dem Latrophilin [Krasnoperov *et al.*, 1997; 1999] und dem CD97-Rezeptor [Gray *et al.*, 1996], wurde kürzlich eine GPCR Proteolyse-Stelle beschrieben. Danach wird der mehrfach glykosylierte 210 kDa große Latrophilin-Rezeptor ca. 23 AS oberhalb der Transmembran-Domäne I und zwischen den Aminosäuren SH↓LT gespalten. Die beiden resultierenden Untereinheiten, p120 (93 kDa) und p85 (70 kDa), bleiben nach der posttranslationalen Modifikation nicht-kovalent miteinander verbunden [Krasnoperov *et al.*, 1997; 1999]. Geht man davon aus, daß auch der 110 kDa große

HC110-R an dieser leicht veränderten Stelle (SH↓MT, Pos. 508-511) 26 AS vor der Transmembran-Domäne I proteolytisch gespalten wird, so würden daraus ein 57 kDa großes N-terminales und ein 53 kDa großes heptahelikales, C-terminales HC110-R-Proteinfragment hervorgehen. Durch Western Blot-Analyse dürfte dann jeweils nur das heptahelikale, C-terminale mit einem Marker fusionierte HC110-R-Proteinfragment erkannt werden. Da aber für HC110-R-GFP ein 137 kDa großes, für HC110-R-His ein 114 kDa großes und für HC110-R-Myc/His ein 116 kDa großes Protein detektiert wurden, erfolgte zumindest im Säuger-Expressionsmodell keine Spaltung des Rezeptors. Auch die Antiseren gegen den N- und C-Terminus von HC110-R erkannten jeweils eine 110 kDa große Bande, aber keine zusätzliche 57 kDa oder 53 kDa große Bande. Damit konnte für HC110-R offensichtlich gezeigt werden, daß es nicht proteolytisch gespalten wird.

Von zahlreichen in der Plasmamembran assoziierten GPCRs ist bekannt, daß sie sequestriert werden können. So konnte bspw. für endogene β_2 -adrenerge Rezeptoren in einer humanen A431- oder HEK-293-Zelllinie gezeigt werden, daß sie nach der Behandlung mit einem Agonisten, wie Epinephrin oder Isoproterenol, durch Enzyme wie die Proteinkinase A phosphoryliert, desensitiviert und sequestriert werden [von Zastrow und Kobilka, 1992]. Es handelt sich bei der Sequestrierung um einen Mechanismus zur Regulation der Rezeptoraktivität und der Signaltransduktion [Yu *et al.*, 1993; von Zastrow und Kobilka, 1994; Pippig *et al.*, 1995; Koenig und Edwardson, 1997]. Werden GPCRs über einen längeren Zeitraum oder in hohen Konzentrationen mit Hormonen, Neurotransmittern oder sensorischen Signalen stimuliert, wird zum einen die Rezeptordichte durch die Hemmung der Rezeptor-Neusynthese reduziert und zum anderen können die Rezeptoren zur Abschwächung der Signalübertragung in einem Zeitraum von 30 min bis 24 h herunterreguliert werden. Bei dieser Translokation wird der Rezeptor funktional durch Phosphorylierung von seinem G_s -Protein entkoppelt und in interne Kompartimente (Endosomen und saure Lysosomen) sequestriert [von Zastrow und Kobilka, 1992]. Man vermutet, daß mit der Internalisierung eine durch Agonisten hervorgerufene Desensitivierung einhergeht, die von den in der Plasmamembran zurückbleibenden G_s -Proteinen wegführt [Pippig *et al.*, 1995]. Entfernt man den Agonisten, so wird der Rezeptor wieder an die Oberfläche gebracht ('Recycling'), dephosphoryliert und er zeigt wieder seine volle Rezeptorfunktion [Krauss, 1997; Palczewski, 1997].

HC110-R konnte ebenfalls durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie in CHO-K1-, HepG2-, COS-7 und HEK-293-Zellen in unterschiedlichem Ausmaß an der Plasmamembran und in Vesikeln nachgewiesen werden. N- und C-terminal mit GFP fusioniertes HC110-R wurde vorwiegend in Vesikeln und partiell in der Plasmamembran exprimiert. Einige dieser Vesikel bildeten größere Cluster in der Nähe des Zellkerns aus. Durch Kolokalisationsstudien konnte gezeigt werden, daß es sich bei den HC110-R exprimierenden Vesikeln primär ebenfalls um saure Lysosomen handelt. Lysosomen sind in Säugerzellen verantwortlich für die Degradation fremden Materials,

von Liganden oder Membran-Komponenten, die durch Endocytose internalisiert wurden oder von intrazellulärem Material, die durch Autophagocytose in die Lysosomen gelangten [Fukuda, 1991; Storrie und Desjardins, 1996; Wattiaux und Wattiaux-De Coninck, 1996]. Die Größe und die Dichte von Lysosomen kann durch Aufnahme von Substanzen, Molekülen oder Lipiden variieren. So akkumulieren bspw. Moleküle in den Lysosomen, wenn diese nicht durch lysosomale saure Hydrolasen degradiert werden können [Wattiaux und Wattiaux-De Coninck, 1996]. Daher ist es denkbar, daß HC110-R zunächst an der Plasmamembran exprimiert wurde, dann aber wieder internalisiert wurde und schließlich in die Lysosomen gelangte. Für diese Hypothese spricht, daß 64-76 % der HC110-R-GFP exprimierenden HepG2-, COS-7- und HEK-293-Zellen bereits 24 h nach der Transfektion HC110-R ausschließlich in den Vesikeln aufweisen und sich dieser Anteil nach 48 h auf ca. 84 % erhöht. Somit reduziert sich der Anteil der Zellen, die HC110-R-GFP in der Plasmamembran exprimieren, von 24-36 % nach 24 h auf ca. 16 % nach 48 h. Der C-terminal mit einem GFP-Marker fusionierte 78 kDa große humane muscarinische Acetylcholin-Rezeptor 1 (M1-R-GFP) wurde anders als HC110-R-GFP sowohl 24 h als auch 48 h nach der transienten Transfektion nahezu ausschließlich an der Membran exprimiert und nur zu einem Prozentanteil von 1-4 % in Vesikeln beobachtet. Der 74 kDa große, C-terminal mit GFP fusionierte β_2 -adrenerge Rezeptor (β_2 -R-GFP) dagegen wurde - ähnlich wie HC110-R-GFP - sowohl in der Plasmamembran als auch in Vesikeln exprimiert. Anders als bei HC110-R-GFP konnte β_2 -R-GFP zwar als Folge einer Sequestrierung [von Zastrow und Kobilka, 1992] in den Lysosomen, aber zusätzlich auch im ER detektiert werden. In Übereinstimmung damit wurde der β_2 -R-GFP nach 24 h zu 60-79 % in den Vesikeln exprimiert und nach 48 h nur noch zu 54-65 %.

Da der endogene Ligand für HC110-R noch nicht bekannt ist, stellt sich die Frage, ob und wie eine Sequestrierung von HC110-R in die Endosomen und von dort via 'Recycling' zurück zur Plasmamembran gelangt oder aber durch 'Sorting' in den Lysosomen herunterreguliert und abgebaut wird. Der Prozeß der Rezeptor-vermittelten Endocytose erfordert zelluläres ATP und ist temperaturabhängig, wie bereits für den Transferrin-Rezeptor in intakten HeLa-, K562- und HepG2-Zellen gezeigt werden konnte [Ciechanover *et al.*, 1983; Balch *et al.*, 1986; Persson *et al.*, 1988; Schmid und Carter, 1990]. Natriumazid reduziert in Abwesenheit von Glukose den intrazellulären ATP-Gehalt, so daß die Sequestrierung von Rezeptoren nach Stimulation durch ihren Agonisten ausbleibt [Schmid und Carter, 1990]. Um nun zu überprüfen, ob auch HC110-R als Mitglied der GPCR-Sekretin-Familie energieabhängig von der Plasmamembran zu den Endosomen bzw. sauren Lysosomen transportiert wird, wurde intrazelluläres ATP in HC110-R-GFP und GFP transfizierten COS-7-Zellen nach von Zastrow und Kobilka [1992; 1994] durch Natriumazid partiell depletiert. Wurden die Zellen mit Natriumazid behandelt, konnte HC110-R durch Erniedrigung des intrazellulären ATP-Gehaltes verstärkt in der Plasmamembran lokalisiert werden.

Im Vergleich zu unbehandelten HC110-R transfizierten COS-7-Zellen wurde entsprechend weniger HC110-R in den Vesikeln nachgewiesen.

4.3 Interaktionen von PF1022A und α -LTX mit HC110-R

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen HC110-R und Latrophilin sowie deren Zugehörigkeit zu der gleichen monophyletischen Unterfamilie wurde überprüft, ob neben Latrophilin auch HC110-R α -LTX als artifiziellen Liganden bindet und zu Veränderungen des Calcium-Haushaltes in der Zelle führt. Ferner wurde die Bindung von PF1022A und seiner Derivate an HC110-R sowie dessen Funktionalität *in vivo* untersucht.

Der 210 kDa große Latrophilin-Rezeptor-1 wurde erstmals durch Affinitätschromatographie aus dem Gehirn von Säugern isoliert [Davletov *et al.*, 1996; Krasnoperov *et al.*, 1996]. Sein endogener Ligand ist noch unbekannt [Ichtchenko *et al.*, 1999]. Vor kurzem wurden außerdem zwei enge Homologe zu dem ausschließlich im Gehirn und endocrinen Zellen vorkommenden Latrophilin-1 identifiziert, Latrophilin-2 und Latrophilin-3 [Rosenthal und Meldolesi, 1989; Ichtchenko *et al.*, 1999; Matsushita *et al.*, 1999]. Latrophilin-2 wird von Säugern ubiquitär mit einer Präferenz für Plazenta, Niere, Milz, Ovarien, Herz, Lunge und Pankreas exprimiert. Geringere Mengen kommen auch in Gehirn, Leber und Testis vor. Latrophilin-3 wird, wie auch Latrophilin-1, vorwiegend im Gehirn und zudem noch in kleineren Mengen im Herz, in der Plazenta, im Pankreas, in der Niere und der Testis von Säugern exprimiert [Sugita *et al.*, 1998; Ichtchenko *et al.*, 1999]. Die Latrophiline sind an der Exocytose endogener Hormone oder Neuropeptide beteiligt [Holz und Habener, 1998]. Man nimmt ferner an, daß sie als physiologische Regulatoren der Sekretion agieren, da bspw. eine Überexpression von Latrophilin-1 und -2 eine durch Ca^{2+} ausgelöste Sekretion hemmen konnte [Bittner *et al.*, 1998; Ichtchenko *et al.*, 1999]. Trotz hoher Sequenzähnlichkeiten untereinander geht man davon aus, daß die drei Latrophiline unterschiedliche Funktionen haben und daher auch verschiedene endogene Liganden binden [Matsushita *et al.*, 1999]. Vor kurzem fand man heraus, daß Latrophilin-1 an mehrere G-Proteine koppeln kann. Latrophilin interagiert sowohl mit $\text{G}\alpha_{q/11}$ als auch mit $\text{G}\alpha_0$ und ist damit an der IP_3 -Regulierung und der Ca^{2+} -Mobilisierung aus intrazellulären Speichern beteiligt. Die Bindung dieser G-Proteine an Latrophilin ist in Anwesenheit von GDP stabil, bei GTP dissoziiert das G-Protein wieder ab. Damit wäre die Bindung des G-Proteins an Latrophilin funktional. Eine Kopplung der $\text{G}\alpha_s$ -, $\text{G}\alpha_i$ - oder $\text{G}\alpha_z$ -Proteine an Latrophilin konnte ausgeschlossen werden [Rahman *et al.*, 1999].

Die hohe Toxizität des Vertebraten-spezifischen, präsynaptisch wirkenden Neurotoxins α -LTX aus der schwarzen Witwe *Latrodectus spec.* beruht mitunter auf dessen Fähigkeit, mit den Latrophilinen zu interagieren [Rahman *et al.*, 1999]. α -LTX bindet mit hoher Affinität Latrophilin-1 und -2, wenngleich die Bindung an Latrophilin-2 auch bis zu 14mal weniger sensitiv als Latrophilin-1 ist [Ichtchenko *et al.*, 1999].

Mit radioaktivem α -LTX konnte bislang noch keine spezifische Bindung an Latrophilin-3 nachgewiesen werden [Ichtchenko *et al.*, 1999; Matsushita *et al.*, 1999]. Sekretorische Granula können - sofern vorhanden - auch in nicht-neuronalen Zellen eine α -LTX abhängige Exocytose durchlaufen, wie sie bereits für chromaffine und β -pankreatische Zellen gezeigt werden konnte [Ichtchenko *et al.*, 1999]. Es wird angenommen, daß α -LTX nach Bindung an Latrophilin-1 oder -2 die Bildung Kationen-selektiver Poren mit hoher Leitfähigkeit induziert [Filippov *et al.*, 1990].

Infolge einer durch α -LTX ausgelösten Depolarisation der Plasmamembran werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geöffnet, so daß Ca^{2+} ins Cytoplasma der Zellen bzw. Nervenendigungen einströmt. Ein durch α -LTX vermittelter rascher Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} ist in der Lage, eine Neuroexocytose auszulösen [Pashkov *et al.*, 1993]. Latrophilin-1 transfizierte COS-7-Zellen führen im Gegensatz zu nicht transfizierten Zellen bei Zugabe von 10 nM α -LTX und in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} zu einer Verdopplung des cAMP- und IP_3 -Gehaltes [Lelianova *et al.*, 1997]. Auch in PC12-Zellen konnte α -LTX die Ca^{2+} -abhängige IP_3 -Produktion stimulieren [Vicentini und Meldolesi, 1984]. Dennoch scheinen diese wichtigen sekundären Botenstoffe die Exocytose der synaptischen Vesikel nicht zu kontrollieren [Lelianova *et al.*, 1997; Davletov *et al.*, 1998]. Unklar bleibt auch, ob der Einstrom anderer Kationen als Ca^{2+} mitverantwortlich für die Freisetzung von Neurotransmittern ist [Misler und Falke, 1987; Rosenthal *et al.*, 1990; Adam-Vizi *et al.*, 1993; Hurlbut *et al.*, 1994]. Die Folgen einer spontanen und unkontrollierten Ausschüttung von Neurotransmittern können von der Blockade von Synapsen bis hin zur Degenerierung der Nervenenden reichen, die schließlich zu allgemeiner Cytotoxizität und Muskelparalyse führen können [Filippov *et al.*, 1990; Henkel und Sankaranarayanan, 1999; Ichtchenko *et al.*, 1999]. α -LTX stimuliert aber nicht nur die Exocytose von Neurotransmitter-enthaltenden kleinen sekretorischen Vesikeln (SSV), sondern auch die von Insulin-haltigen LDCVs ('large dense core vesicles') in neuroendocrinen Zellen [Meldolesi *et al.*, 1986; Barnett *et al.*, 1996], die daraufhin das Peptid-Hormon Insulin aus den LDCVs freisetzen [Wollheim *et al.*, 1996; Lang *et al.*, 1998].

Es spricht viel dafür, daß in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen mehrere funktionale exocytotische Wege unabhängig voneinander existieren, die α -LTX nutzen kann [Henkel und Sankaranarayanan, 1999]. Dabei besitzt α -LTX weder enzymatische oder proteolytische, noch lipolytische Aktivität [Rosenthal und Meldolesi, 1989]. Neben der spezifischen Bindung von α -LTX an den Latrophilin-Rezeptor, die in An- und Abwesenheit von Calcium erfolgen kann, geht man davon aus, daß α -LTX in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} mit hoher Affinität auch an neuronale Zelloberflächenproteine, die Neurexine, bindet [Petrenko *et al.*, 1990; Ushkaryov *et al.*, 1992]. Dabei bindet der extrazelluläre N-Terminus mit Sequenzähnlichkeiten zu Matrixproteinen wie Laminin und Agrin an α -LTX, der intrazelluläre C-Terminus zudem an die cytoplasmatische Domäne des synaptischen Vesikelmembranproteins Synaptotagmin, an Neurexophilin und an das intrazelluläre Signalmolekül CASK.

Dadurch wird ein bislang noch ungeklärter Signaltransduktionsprozeß ausgelöst [Ushkaryov *et al.*, 1992; Hata *et al.*, 1996]. Bei der CASK handelt es sich um ein cytosolisches Protein mit einer Calcium-Calmodulin-Kinase- und einer Guanylat-Kinase-Domäne [Hata *et al.*, 1999]. Niedrige α -LTX-Konzentrationen (im pM-nM-Bereich) sprechen für eine Rezeptor-Bindung von α -LTX. Dabei bindet α -LTX bis zu 8mal effizienter an Latrophilin-1 als an Neurexin I α [Henkel und Sankaranarayanan, 1999]. Man vermutet, α -LTX benötigt einen Rezeptor, um gezielt die Membranen von Nervenzellen anzusteuern. Das Toxin öffnet dann bestehende Kanäle oder induziert Poren in die Plasmamembran, wie es bereits in künstlichen Phospholipid-Doppelmembranen gezeigt werden konnte [Finkelstein *et al.*, 1976], und verursacht einen Ca^{2+} -Einstrom ins Cytoplasma [Nicholls *et al.*, 1982; Grasso *et al.*, 1980]. Hohe α -LTX-Konzentrationen führen einem dritten Mechanismus zufolge dazu, daß α -LTX selbst einen Kanal in der Plasmamembran bildet. Hierfür lagern sich mehrere α -LTX-Proteine in die Lipid-Doppelschicht ein und bilden eine Kanal-artige, permanent für Kationen geöffnete Pore [Finkelstein *et al.*, 1976; Nicholls *et al.*, 1982; Robello *et al.*, 1987; Hurlbut *et al.*, 1994]. Durch die Passage von Kationen depolarisiert die Membran [Henkel und Sankaranarayanan, 1999]. Die These, daß α -LTX Poren induziert oder selbst erzeugt, wurde bestätigt, nachdem der Farbstoff FITC aber hingegen nicht das Konjugat aus FITC und Dextran nach α -LTX-Stimulation und in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} spezifisch in die Zelle eindringen konnte [Hurlbut *et al.*, 1994; Davletov *et al.*, 1996; Rahman *et al.*, 1999]. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Endplatte von Nervenzellen wiesen diese nach α -LTX-Gabe einen signifikant geschwollenen Terminus, beschädigte und aufgequollene Mitochondrien sowie vollständig entleerte synaptische Vesikel auf, die man auf den starken Ca^{2+} -Einstrom zurückführte [Frontali *et al.*, 1976; Rosenthal und Meldolesi, 1989]. Viele Neurotoxine beeinträchtigen die Funktion der Nervenenden. Das Botulinus B-Neurotoxin bspw. wirkt wie α -LTX präsynaptisch. Aber anders als α -LTX spalten das Botulinus B- und auch das Tetanus-Toxin in Anwesenheit von Ca^{2+} die an der synaptischen Vesikel-Exocytose beteiligten Proteine SNAP-25, Syntaxin und Synaptobrevin proteolytisch und reduzieren die α -LTX stimulierte Neurosekretion von Norepinephrin aus den Synaptosomen um 90-100 % [Schiavo *et al.*, 1992; Rahman *et al.*, 1999]. Concanavalin A (ConA) hemmt die durch α -LTX stimulierte Freisetzung von Transmittern. Dabei ist noch unklar, ob ConA die Bindungsstelle von α -LTX blockiert oder verändert, oder aber in das Verhältnis zwischen cytoplasmatischen Mikrofilamenten und Mikrotubuli eingreift [Grasso *et al.*, 1980]. Rosenthal und Meldolesi [1989] nehmen an, daß ConA die α -LTX-Bindung an seinen Rezeptor sterisch hindert, indem es an zahlreiche Zelloberflächen-Glykoproteine bindet oder zu einer Neuverteilung von Zelloberflächen-Komponenten führt.

Viele Mitglieder der Sekretin-GPCR-Unterfamilie binden biologisch aktive Peptide am großen extrazellulären N-Terminus [Fernandez und Puett, 1996; Wollheim *et al.*, 1996] und regulieren verschiedene sekretorische Prozesse [Lin *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993].

Auch α -LTX bindet an das extrazelluläre Ende von Latrophilin und damit an die p120-UE [Krasnoperov *et al.*, 1997; 1999; Lelianova *et al.*, 1997]. Für die optimale Bindung von α -LTX ist zusätzlich die 1. Transmembran-Domäne der Latrophiline erforderlich, wohingegen die zu Lectin, Olfactomedin und Mucin ähnlichen Regionen nicht beteiligt sind, wie extrazelluläre Deletionsmutanten in COS-7-Zellen ergaben [Lelianova *et al.* 1997; Krasnoperov *et al.*, 1999]. Fehlt jedoch das Cys-reiche Motiv unmittelbar vor den 7 Transmembran-Domänen, so wird kein α -LTX mehr gebunden [Krasnoperov *et al.*, 1999]. In transient und stabil HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen wurde *in vivo* durch FACS-Analyse eine spezifische α -LTX-Bindung nachgewiesen. Durch Western Blot-Analyse mit α -LTX als Liganden und einem anti- α -LTX-Antikörper wurde die Bindung von α -LTX an den in *E. coli* exprimierten 54 kDa großen N-Terminus von HC110-R bestätigt. Anders als bei Latrophilin-1 sind die 1. Transmembran-Domäne sowie die vorangehende 4 Cys-Region für die α -LTX-Bindung nicht zwingend erforderlich. Für effiziente *in vivo* Wechselwirkungen und zur Stabilisierung könnte die 1. Transmembran-Domäne aber dennoch von Bedeutung sein.

Calcium spielt eine vitale Rolle als intrazellulärer sekundärer Botenstoff und ist für eine Vielzahl von Stimulus-abhängigen Antworten verantwortlich. Intrazelluläres Calcium liegt in ruhenden Zellen in geringen Konzentrationen (< 100 nM) vor, darunter auch sequestriert in Kompartimenten wie dem ER, dem SR oder gebunden an intrazelluläre Ca^{2+} -bindende Proteine. Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann die Folge einer erhöhten Permeabilität der Plasmamembran sein, so daß Ca^{2+} über selektiv geöffnete Ca^{2+} -Kanäle in das zelluläre Cytoplasma über einen elektrochemischen Gradienten passieren kann. Das Öffnen von Calcium-Kanälen kann über 3 Wege erfolgen: (i) über G-Protein-gekoppelte Kanäle, (ii) spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle des T- (transiente), N- (neuronal) oder L-Typs (lang anhaltende Ströme mit langsamer Inaktivierung) oder (iii) über intrazellulär aktivierbare Ca^{2+} -selektive Kanäle [Nowycky *et al.*, 1985; Brown, 1991]. Zu letzterem gehören die Ca^{2+} -freisetzenden Kanäle des SR, v. a. der hierfür verantwortliche Ryanodin-Rezeptor, und der dem Ryanodin-Rezeptor strukturell ähnliche und durch intrazelluläres IP_3 stimulierbare IP_3 -Rezeptor, der auf dem ER und zu einem geringeren Anteil auch auf anderen intrazellulären Membranen, wie der Kernmembran vorkommt [Taylor und Marshall, 1992]. Die α -LTX-Bindung an HC110-R wie auch an Latrophilin-1 verursacht Ca^{2+} -Veränderungen in transfizierten HEK-293- und COS-7-Zellen. Dennoch bestehen Unterschiede zwischen der HC110-R- und der Latrophilin-vermittelten Ca^{2+} -Signaltransduktion. Wurden HEK-293-Zellen transient mit Latrophilin-1 oder -2 transfiziert, induzierten bereits 50 pM α -LTX in einem radioaktiven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme-Assay eine schnelle Ca^{2+} -Erhöhung [Ichtchenko *et al.*, 1999; Krasnoperov *et al.*, 1999]. Die durch α -LTX induzierte agonistische Ca^{2+} -Antwort in transient mit HC110-R-GFP oder GFP-HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen dagegen war komplexer, wie durch Ca^{2+} -Imaging gezeigt werden konnte. 75 nM α -LTX induzierten in transient HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen wiederholt einen frühen und sehr langsamen kleinen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von $5 \pm 0,2$ nM

Ca^{2+} nach 3 min und einen verzögerten größeren Anstieg von $220 \pm 14,9$ nM Ca^{2+} nach 22 min. Stabil mit HC110-R-Myc/His transfizierte HEK-293-Zellen lösten unmittelbar nach α -LTX-Zugabe einen schnellen und hohen Ca^{2+} -Anstieg aus, der erst nach ca. 25 min wieder sein Ausgangsniveau erreichte. 25 nM α -LTX führten in stabil transfizierten Zellen zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um 106 ± 38 nM Ca^{2+} , 75 nM α -LTX zu einem Ca^{2+} -Anstieg von 267 ± 46 nM. Obwohl die Gründe für diese duale α -LTX-Antwort in transient transfizierten Zellen nicht klar sind, so ist die Antwort doch spezifisch: Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist für transient wie stabil HC110-R transfizierte Zellen dosisabhängig und reversibel. Nach einem erfolgten Ca^{2+} -Einstrom, setzt unmittelbar der Prozeß ein, in dem das Ca^{2+} zum einen über Ca^{2+} -Pumpen, wie dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher oder den Ca^{2+} -ATPasen (PMCAs) in das Extrazellulärmedium, und zum anderen über SR/ER Ca^{2+} -ATPasen (SERCA) in die intrazellulären Kompartimente zurückgeschleust wird [Krauss, 1997]. Aber auch Ca^{2+} -bindende Proteine (z. B. Parvalbumin, Calretinin, Calsequestrin, Calreticulin und Calbindin) können Ca^{2+} wegfangen [Neher und Augustine, 1992]. 75 nM α -LTX zeigten bei transient wie bei stabil HC110-R exprimierenden Zellen eine maximale Ca^{2+} -Veränderung. Der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beruhte zu großen Teilen auf dem Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} und blieb aus, wenn extrazelluläres Ca^{2+} durch EGTA entzogen wurde. Inkubierte man nicht transfizierte oder mit Latrophilin-1 transfizierte HEK-293-Zellen für 4 min mit 0,25-1 nM α -LTX in Ca^{2+} -freiem Medium mit EGTA und überführte sie anschließend für 6 min in Ca^{2+} -haltiges Medium, so erfolgte ausschließlich in transfizierten Zellen eine α -LTX induzierte Ca^{2+} -Aufnahme mit resultierender Sekretion [Bittner *et al.*, 1998]. Der Eintritt von Ca^{2+} aktiviert die Phospholipase C (PLC) und erhöht die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration [Kozawa *et al.*, 1987; Finch *et al.*, 1991]. Die PLC spaltet PIP_2 und erzeugt IP_3 , das wiederum die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern reguliert. Daher benötigt α -LTX zur Exocytose von Neurotransmittern die Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} sowie intakte intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher [Rahman *et al.*, 1999]. Auch Thapsigargin hemmt die Sekretion von Neurotransmittern, indem es die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher entleert und damit die α -LTX stimulierte Sekretion in Anwesenheit von 10 mM extrazellulärem Ca^{2+} inhibiert [Thastrup *et al.*, 1990]. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung bspw. aus dem ER läßt sich teilweise durch den PLC-Inhibitor U-73122 unterdrücken, so daß beobachtete Ca^{2+} -Einströme von extrazellulär erfolgt sein müßten [Bleasdale *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990; Smallridge *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 1994]. Das Aminosteroid U-73122 hemmt die Kopplung von G-Proteinen an die PLC, blockiert die Ca^{2+} -abhängige Wirkung des Toxins und damit die Freisetzung von Neurotransmittern aus den Synaptosomen [Thompson *et al.*, 1991]. Die Zugabe von 1 μM U-73122 vor der Stimulation durch 75 nM α -LTX führte in HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen zu einem um das 5fache erhöhten ersten Ca^{2+} -Peak und einem um den Faktor 4 verminderten zweiten Ca^{2+} -Peak. Wurde 1 μM des zu U-73122 chemisch unwirksamen Analogons U-73343 [Bleasdale *et al.*, 1990] vor der α -LTX-Stimulation zugesetzt, kam

es zu einem vergleichbaren erhöhten ersten Ca^{2+} -Anstieg und einem unverändert hohen zweiten Ca^{2+} -Peak. Damit dürfte die erste schnelle Ca^{2+} -Antwort primär auf einen extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom zurückzuführen sein, wohingegen die zweite Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sowohl von extra- als auch von intrazellulär erfolgt sein dürfte.

Weder in nicht transfizierten Zellen noch in transient mit dem humanen muscarinischen Acetylcholin-Rezeptor 1 oder dem β_2 -adrenergen Rezeptor aus der Maus transfizierten HEK-293-Zellen kam es zu einer durch α -LTX bedingten Ca^{2+} -Erhöhung. Da HEK-293-Zellen über keine endogenen Latrophiline verfügen [Bittner *et al.*, 1998], sprechen diese Ergebnisse dafür, daß der durch α -LTX induzierte Ca^{2+} -Anstieg nicht auf einfacher Diffusion basierte, sondern offenbar nach Bindung von α -LTX an HC110-R durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran erfolgte, die dosisabhängig durch Cd^{2+} geblockt werden konnten [Shafer, 1998; Toselli *et al.*, 1999]. Durch Nifedipin ließ sich der Ca^{2+} -Anstieg um 89 % reduzieren, so daß wahrscheinlich ein Großteil der beteiligten spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ sind [Mulvaney *et al.*, 1999]. Von den L-Typ-Kanälen sind zahlreiche UE (α_1 , α_2 , β , γ , δ) und Isoformen bekannt [Tanabe *et al.*, 1987]. Solche Kanäle mit hoher Ionen-Leitfähigkeit (25 pS) kommen vorwiegend in glatten Muskelzellen und in der Herzmuskulatur vor. Sie werden durch entsprechend hohe Membranpotentiale aktiviert und nur langsam durch Ca^{2+} -abhängige Mechanismen inaktiviert [Nowycky *et al.*, 1985]. Selektive Calcium-Kanal-Blocker des L-Typs sind neben den 1,4-Dihydropyridin-Derivaten, wie Nifedipin und Nivaldipin, auch die Benzoacetonitrile (z. B. Verapamil), die Benzothiazepinone (z. B. Diltiazem) und die 1,3-Diphosphonate (z. B. Belfosodil) [Bacon *et al.*, 1989].

Von den chromaffinen Zellen weiß man, daß sie über einen natürlichen endogenen Latrophilin-Rezeptor verfügen [Kobayashi *et al.*, 1986; Surkova, 1994; Barnett *et al.*, 1996; Krasnoperov *et al.*, 1997; Bittner *et al.*, 1998]. Von jungen (8-10 Tage alten) primären *in vitro*-Kulturen chromaffiner Rattenzellen ist bekannt, daß sie auf α -LTX dosisabhängig mit massiver Freisetzung von Catecholaminen (u. a. Norepinephrin) reagieren [Kobayashi *et al.*, 1986; Bittner *et al.*, 1998]. Es kommt jedoch nur in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} zur Exocytose [Krasnoperov *et al.*, 1997; Henkel und Sankaranarayanan, 1999]. Wurden bovine chromaffine Zellen zusätzlich transient mit dem Latrophilin-Rezeptor aus dem Rattengehirn transfiziert, kam es durch die erhöhte Anzahl von α -LTX-Bindungsstellen sogar noch bei 10fach erniedrigten α -LTX-Konzentrationen um 2,5-20 pM zu einer Catecholamin-Freisetzung [Bittner *et al.*, 1998; Krasnoperov *et al.*, 1999]. Nicht transfizierte chromaffine Zellen führten bei Inkubation mit 260 pM α -LTX zu einer durchschnittlichen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 395 ± 204 nM Ca^{2+} . Bei Latrophilin transfizierten Zellen betrug diese 766 ± 121 nM Ca^{2+} , ohne die maximale sekretorische Antwort weiter zu steigern [Bittner *et al.*, 1998]. In beiden Fällen erfolgte der extrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom mit einer Verzögerung von 2–4 min. Ergebnisse mit Digitonin behandelten Zellmembranen, die nunmehr frei permeabel für Ca^{2+} waren, zeigten, daß die Kanal-bildenden Fähigkeiten von α -LTX nicht den Effekt der Sekretion

von Neurotransmittern erklären konnten, sondern vielmehr die entsprechenden Rezeptoren für α -LTX ausschlaggebend waren [Bittner *et al.*, 1998].

Die Leitfähigkeit der durch α -LTX induzierten Kationen-selektiven Ionenkanäle ist sowohl abhängig von der Zusammensetzung der jeweiligen Phospholipid-Doppelmembran (100-1100 pS), als auch von der Reinheit des α -LTX [Sabirov *et al.*, 1993]. α -LTX-Konzentrationen von 2,5-20 pM sind ausreichend, um in Latrophilin transfizierten chromaffinen Zellen eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zu messen; in nicht transfizierten chromaffinen Zellen liegt die erforderliche α -LTX-Konzentration um den Faktor 10 höher [Bittner *et al.*, 1998; Krasnoperov *et al.*, 1999]. Transfizierte man HEK-293-Zellen mit Latrophilin-1 oder deren Deletionsklonen, so reichten α -LTX-Konzentrationen bis 50 pM für eine Ca^{2+} -Freisetzung aus [Ichtchenko *et al.*, 1999; Krasnoperov *et al.*, 1999]. Für Latrophilin-1 exprimierende COS-7-Zellen liegt die erforderliche α -LTX-Menge im pM-nM Bereich [Henkel und Sankaranarayanan, 1999]. Diese Arbeitsgruppen verwendeten hochaufgereinigtes α -LTX, daß entweder über eine Kombination aus Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie und Dialyse [Frontali *et al.*, 1976; Grasso, 1976] oder durch Immunitätschromatographie [Pashkov *et al.*, 1989] gewonnen wurde. Das von uns verwendete α -LTX wurde von der Firma RBI/Sigma bezogen und enthält keine Angaben über die Art der Aufreinigung und die Reinheit des Toxins. Im SDS-Gel konnte eine Bande von 130 kDa ausgemacht werden. Da aber die von uns ermittelte optimale α -LTX-Konzentration für transient wie für stabil mit HC110-R transfizierte HEK-293-Zellen mit 75 nM in etwa um den Faktor 150 über den Werten der anderen Arbeitsgruppen für Latrophilin-1 transfizierte Zellen liegt, wurden bovine chromaffine Nebennierenmarkszellen zum Vergleich mit unterschiedlichen α -LTX-Konzentrationen stimuliert. Bei diesen Versuchen zeigten α -LTX-Konzentrationen bis einschließlich 7,5 nM noch keine signifikante Reaktion. Konzentrationen ab 25 nM α -LTX führten 15 min nach Zugabe zu einem für die Zellen toxischen Ca^{2+} -Einstrom. Daraus resultiert für chromaffine Zellen eine in etwa um den Faktor 75 erhöhte α -LTX-Konzentration. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß das von uns verwendete α -LTX offenbar weniger rein und daher weniger sensitiv ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die α -LTX-Interaktion mit den Latrophilinen oder HC110-R offenbar in zwei Schritten abläuft: Zum einen bindet α -LTX an die extrazelluläre Region von Latrophilin-1/p120-UE oder HC110-R. Nach dieser Bindung interagiert α -LTX mit der 1. Transmembran-Domäne von Latrophilin-1 [Krasnoperov *et al.*, 1999]. Diese sowie die vorausgehende 4-Cys-Region ist für die α -LTX-Bindung an HC110-R nicht zwingend erforderlich. Möglich ist auch der Kontakt mit Membranlipiden, so daß das Toxin in die Lipid-Doppelschicht penetrieren kann [Krasnoperov *et al.*, 1999]. Dieser zweite Schritt erhöht die Affinität der Interaktion und erfordert einen längeren Zeitraum, der die Verzögerung des α -LTX-Effektes nach seiner Zugabe zu erklären vermag. Es ist denkbar, daß die Toxin-Bindung an die Latrophiline oder an HC110-R zu unterschiedlichen Effekten führt. Durch Zelladhäsions-Domänen, wie den zu Lectin, Olfactomedin oder Mucin ähnlichen Regionen, ist ein direkter

Zellkontakt mit anderen endogenen Liganden, wie bspw. extrazellulären Matrix- oder Membranproteinen, möglich [Krasnoperov *et al.*, 1997; 1999], so daß HC110-R und die Latrophiline durchaus unterschiedliche endogene Liganden binden können. HC110-R und die Latrophiline verfügen sowohl über charakteristische Merkmale von GPCRs, insbesondere der Sekretin-Familie, als auch von Zelladhäsions- und extrazellulären Matrixproteinen. Sie könnten daher eine duale Funktion haben, indem sie einerseits unter Beteiligung von G-Proteinen als Signalrezeptor und andererseits als Zelladhäsionsprotein (z. B. über die Assoziation mit dem Plasmamembranprotein Syntaxin 1A) agieren [Ichtchenko *et al.*, 1999]. Mit HC110-R wurde erstmals ein den Latrophilinen ähnlicher Rezeptor in Invertebraten charakterisiert, der *in situ* α -LTX N-terminal bindet und zu einer durch α -LTX vermittelten Ca^{2+} -Signaltransduktion führt.

Mit biotinyliertem PF1022A und auch mit dem Morpholin-Derivat BAY44-4400 als Liganden konnte durch Western Blot-Analyse und Ligandenpräzipitation *in vitro* eine Bindung an den in *E. coli* exprimierten 54 kDa großen N-Terminus von HC110-R nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß PF1022A/BAY44-4400 nur dann an HC110-R banden, wenn die Proteine zuvor wieder partiell renaturiert worden waren, spricht dafür, daß die Bindungsstelle von HC110-R nicht allein auf der Abfolge bestimmter Aminosäuren beruht, sondern ein spezielles Konformationsepitop aufweisen muß. Die Spezifität dieser Bindung konnte darüber hinaus auch *in vivo* durch FACS-Analysen bestätigt werden. Stereoisomere Substanzen wie der optische Antipode PF1022-001, in denen die einzelnen Atome zwar gegenseitig gleich verknüpft, aber andersartig räumlich angeordnet sind, besitzen eine unterschiedliche Komplementarität zu Wirkorten und damit andere pharmakologische Eigenschaften. Befindet sich das asymmetrische Zentrum eines Wirkstoff-Moleküls in dem Bereich, der sich an den Rezeptor anlagert, so zeigt auch nur ein Wirkstoff die volle Wirkung. Die sterische Anordnung der Seitenketten von PF1022A scheint daher ausschlaggebend für seine anthelminthische Aktivität zu sein [Ohyama *et al.*, 1994]. Dies könnte auch die stereo-spezifische Wirkung von PF1022A erklären, da PF1022-001 mit den gleichen alternierenden Resten wie PF1022A, aber umgekehrter D- und L-Konfiguration in Nematoden *in vitro* wie *in vivo* mehr als 100fach weniger wirksam ist [Ohyama *et al.*, 1994; Pleiss *et al.*, 1995; Geßner *et al.*, 1996]. So zeigt PF1022A im Gegensatz zu seinem optischen Antipoden *in vitro* bereits in niedrigen Konzentrationen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sehr gute anthelminthische Aktivität (irreversible Paralyse) gegen *Nippostrongylus brasiliensis*, *Heterakis spumosa* und sogar gegen *Trichinella spiralis*, und man geht daher von einer spezifischen Bindungsstelle für PF1022A aus [Geßner *et al.*, 1996].

PF1022A agiert möglicherweise ähnlich wie α -LTX als Neurotoxin, indem es die GABAergen Mechanismen stimuliert und die cholinergen Mechanismen inhibiert [Terada, 1992; Chen *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1996; Martin, 1997]. Der GABA_A-Rezeptor weist fünf zylindrische Untereinheiten auf. Jede Untereinheit endet am Aminoende in einer langen hydrophilen und glykosylierten Region, die in den Zellaußenraum ragt sowie vier hydrophoben Segmenten M1-M4, die die Membran

durchspannen [Schofield *et al.*, 1987]. Die Aktivierung eines GABA_A-Rezeptors (Bicucullin-sensitiv) erhöht die Leitfähigkeit für Chlorid-Ionen und öffnet letztendlich Chlorid-Ionenkanäle. Es kommt zur Hyperpolarisation; eine Depolarisation der Zelle wird dadurch erschwert. Die Hyperpolarisation führt zur Muskelentspannung und damit zu einer schlaffen Paralyse [Stephenson, 1988; Chen *et al.*, 1996]. Der GABA_B-Subtyp (Bicucullin-resistent, Baclofen-sensitiv) ist als Autorezeptor bekannt, der K⁺- und Ca²⁺-Ionenkanäle über Pertussis-sensitive GTP-bindende Proteine reguliert [Davies *et al.*, 1991]. Auf Invertebraten ist das Schema mit den zwei GABA-Subtypen nicht ohne weiteres übertragbar. In der *Ascaris*-Muskulatur scheint nur der GABA_A-Rezeptor vorhanden zu sein [Holden-Dye *et al.*, 1989; Laughton *et al.*, 1994]. Die Arbeitsgruppe von Chen und Terada untersuchte den Einfluß von PF1022A auf GABA-Rezeptoren in isolierten somatischen Muskelzell-Membranfraktionen des Nematoden *Ascaris suum* mithilfe der Radioliganden Bicucullin und Baclofen. Bicucullin blockiert als spezifischer Antagonist den GABA_A-Rezeptor, wohingegen er durch Baclofen stimuliert wird. Sie konnten zeigen, daß PF1022A einen agonistischen Einfluß auf den GABA_A-Rezeptor ausübt, indem es konzentrationsabhängig (0,1 nM - 10 µM) die Bindung von [2,3-³H(N)]-GABA und [methyl-³H]-Bicucullin an den GABA_A-Rezeptor in isolierten somatischen *A. suum* Muskeln ersetzt, und die Bindung von [butyl-4-³H]-Baclofen in höheren Konzentrationen reduziert [Chen *et al.*, 1996]. Burt und Kamatchi [1991] vermuteten jedoch, daß es noch Subtypen des GABA_A-Rezeptors gibt. Dies mag erklären, warum für PF1022A und Piperazin um den Faktor 10 höhere Konzentrationen erforderlich sind, um anstelle von GABA den Radioliganden Bicucullin zu ersetzen [Chen *et al.*, 1996]. GABAerge Antagonisten wie Picrotoxin, Bicucullin und N-Methylcytisin können in Verbindung mit Ca²⁺ die durch PF1022A hervorgerufene Lähmung der adulten Würmer zum großen Teil wieder aufheben. Die Paralyse adulter *Angiostrongylus cantonensis* Würmer in Ratten ließ sich bspw. durch Zugabe von Ca²⁺ und den GABA-Antagonisten Bicucullin oder Picrotoxin aufheben [Akyol *et al.*, 1993]. Terada [1992] vermutet daher eine Art GABAergen Mechanismus hinsichtlich der Wirkung von PF1022A, z. B. in Form einer Stimulation der Freigabe von GABA und/oder einer Verstärkung der Bindung des Transmitters an seinen Rezeptor. Die physiologische Funktion der extrasynaptischen GABA-Rezeptoren ist aber noch unbekannt. Es wird in Betracht gezogen, daß sie durch Anthelminthika aktivierbar sein könnten [Martin, 1993], so wie auch die anthelminthisch wirksamen Avermectine mit neuromuskulären GABA-Rezeptoren von Nematoden interagieren [Laughton *et al.*, 1994]. PF1022A könnte theoretisch an der präsynaptischen Seite der Membran angreifen und somit eine Hemmung der Muskulatur direkt durch eine Wirkung auf den cholinergen Mechanismus induzieren, und zwar über einen Angriff auf die Freigabe von Acetylcholin [Terada, 1992]. Da PF1022A jedoch nicht die Wirkung von Levamisol als nicotinischer Agonist beeinflusst, agiert er auch nicht als nicotinischer Antagonist zu Levamisol [Martin *et al.*, 1996]. Diethylcarbamazine und die makrozyklischen Lactone mit Vertretern der Milbemycine und Avermectine wirken dagegen als GABA-

Antagonisten, indem geringe Konzentrationen den GABA-Mechanismus und hohe Konzentrationen den Cholin-Mechanismus stimulieren.

Der klassischen Vorstellung zufolge führt ein Agonist - hier α -LTX - zur Aktivierung des Rezeptorproteins, indem seine Bindung das Rezeptorprotein in eine andere Konformation überführt. Ein Antagonist - hier PF1022A/BAY44-4400 - dagegen bindet sich reversibel an denselben Rezeptor, ohne eine Konformationsänderung auszulösen und blockiert damit kompetitiv und konzentrationsabhängig einen Teil der Rezeptoren, so daß der Agonist an Wirksamkeit verliert. Für GPCRs gibt es Hinweise, daß der molekulare Wirkungsmechanismus von Agonisten und Antagonisten auch komplexer sein könnte. Neben den reinen Agonisten und den reinen Antagonisten gibt es Substanzen, die nur eine schwache Aktivität besitzen und je nach den Bedingungen partielle agonistische oder antagonistische Eigenschaften aufweisen [Lüllmann und Mohr, 1999]. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, daß PF1022A nicht nur - wie auch α -LTX - an den N-Terminus von HC110-R bindet, sondern darüber hinaus auch die durch α -LTX vermittelte Ca^{2+} -Signaltransduktion von HC110-R antagonistisch beeinflußt, indem es dosisabhängig den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle erniedrigt bis vollständig unterdrückt. Diese Interaktionen könnten auch durch eine Aufnahme von PF1022A in das Zellinnere, eine Interkalation des Wirkstoffes in die Plasmamembran von HEK-293-Zellen und/oder durch die ionophore Aktivität von PF1022A mitverursacht worden sein, so wie es bereits für andere Depsipeptide, wie Beauvericin und Enniatin beschrieben wurde [Shemyakin *et al.*, 1969; Stark *et al.*, 1971; Burgermeister *et al.*, 1977; Benz *et al.*, 1978; Läger *et al.*, 1981; Geßner *et al.*, 1996]. Für die Einlagerung in Zellmembranen ist keine besondere Paßform erforderlich, so daß hier beide Formen gleichermaßen die Membran passieren können. Der optische Antipode PF1022-001 ist also pharmakologisch durchaus nicht inert, sondern kann auch zu Nebeneffekten führen [Lüllmann und Mohr, 1999]. Und tatsächlich veränderte PF1022-001 die α -LTX vermittelte Ca^{2+} -Signaltransduktion in HC110-R transfizierten Zellen. Aber anders als bei der verzögerten und dosisabhängigen PF1022A-Antwort kam es zu einem zeitlich schnelleren und dabei um ca. 45 % reduzierten α -LTX vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in HC110-R transfizierten Zellen. Diese Wechselwirkung zeigte sich zudem unbeeinflusst von der eingesetzten Konzentration. Es wurden aber keine Ca^{2+} -Ströme in nicht transfizierten Zellen gemessen, so daß eine ionophore Aktivität als Ursache ausgeschlossen werden kann. Elektrophysiologische Untersuchungen des Membranpotentials und der Ionenleitfähigkeit somatischer Muskelzellen von *Ascaris suum* führten bei PF1022A-Gabe zu einer kurzen, Zeitabhängigen Erhöhung der Leitfähigkeit für Cl^- -Ionen, ohne das Membranpotential zu verändern. Bei zusätzlicher Verabreichung hoher Ca^{2+} -Konzentrationen wurden dagegen keine Ca^{2+} -aktivierbaren Cl^- -Kanäle stimuliert, so daß PF1022A offenbar nicht als Calcium-Ionophor agiert [Terada, 1992; Martin *et al.*, 1996]. Hierin unterscheidet sich PF1022A von Piperazin. Beide wirken neuropharmakologisch, indem sie vermutlich den GABAergen Mechanismus agonistisch stimulieren und den cholinergen

Mechanismus inhibieren [Terada, 1992; Chen *et al.*, 1996]. Dennoch verursacht die Verabreichung von Piperazin eine deutliche Erhöhung der Leitfähigkeit über die Membran von *Ascaris suum* Muskelzellen. Diese führt zur Öffnung von Cl⁻-Kanälen und zu einer raschen Hyperpolarisation. Außerdem lähmt Piperazin die Nematoden reversibel, wohingegen PF1022A irreversible Lähmungserscheinungen zur Folge hat [Martin *et al.*, 1997]. Piperazin soll die Wirkung von PF1022A/BAY44-4400 in *in vitro* wie *in vivo* Versuchen mit *Heterakis spumosa* synergistisch verstärken [persönliche Mitteilung, Dr. Dr. A. Harder]. Die gleichzeitige Gabe von 0,1-10 µg/ml BAY44-4400 mit 1 oder 10 µM Piperazin führten jedoch zu keiner Veränderung der [Ca²⁺]_i. Da aber weder die alleinige Verabreichung von 0,1-10 µg/ml PF1022A noch von PF1022-001 in HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen eine Ca²⁺-Erhöhung induzierte, muß sich eine synergistische Wirkung in diesem System auch nicht unbedingt bemerkbar machen. Möglicherweise sind andere Kationen oder Anionen betroffen. Um auszuschließen, daß PF1022A/BAY44-4400 Einfluß nimmt auf die Ca²⁺-Signaltransduktion anderer natürlicher Rezeptoren, wurden endogene β₂-adrenerge Rezeptoren durch Isoproterenol, muscarinische Acetylcholin-Rezeptoren M1 durch Carbachol und nicotinische Rezeptoren durch Arecolin stimuliert. Diese Versuche wurden zum einen in Anwesenheit von BAY44-4400 und zum anderen in Abwesenheit des Depsipeptids durchgeführt. Die Tatsache, daß es in keinem der Fälle zu einer veränderten Ca²⁺-Antwort kam, läßt den Schluß zu, daß PF1022A/BAY44-4400 spezifisch in die über α-LTX vermittelte Ca²⁺-Signaltransduktion von HC110-R eingreift. Die in dem für Säugerzellen etablierten HC110-R-Expressionsmodell durchgeführten Untersuchungen der Ca²⁺-Signaltransduktion lassen vermuten, daß PF1022A/BAY44-4400 möglicherweise auch *in vivo* über HC110-R Einfluß auf den Ca²⁺-Metabolismus in der Zelle nimmt und damit HC110-R auch in *H. contortus* ein Target für PF1022A ist.

Laughton *et al.* [1997] vermuteten, daß der Pharynx der Hauptwirkungsort des makrozyklischen Lactons Avermectin ist. Von den Avermectinen weiß man, daß sie durch das Öffnen von Chlorid-Kanälen einen paralyisierenden Effekt auf die Muskulatur ausüben [Martin und Pennington, 1989; Arena *et al.*, 1991]. Erst kürzlich wurde die β-Untereinheit des Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals (Glu-Cl) in transgenen *C. elegans* untersucht [Laughton *et al.*, 1997]. Dabei stellte sich heraus, daß beim Glu-Cl-Rezeptor die glutamaterge Hemmung der Pharynx-Muskulatur über die inhibitorischen motorischen Neuronen M3 erfolgt und zu einer Blockierung der Funktionen des Pharynx führt. Diese M3 Pharynx-Muskelzellen sind für die Entspannung der Muskulatur, für das Pumpen und die Nahrungsweiterleitung erforderlich [Raizen und Avery, 1994]. Es konnte ferner gezeigt werden, daß das Pumpen des Pharynx in *C. elegans* sehr empfindlich auf Avermectin reagiert [Avery und Horvitz, 1990]. Bereits Avermectin-Konzentrationen zwischen 0,1-1 nmol/l lähmten den Pharynx von *H. contortus* [Geary *et al.* 1993] und reduzierten bei *Trichostrongylus colubriformis* drastisch die Nahrungsaufnahme [Bottjer und Bone, 1985]. Für eine *in vivo* Lokalisation von HC110-R bot sich das zu HC110-R homologe

B0457-Protein aus *C. elegans* an. B0457 konnte durch die sich gegen den N- oder C-Terminus von HC110-R richtenden Antiseren spezifisch im Pharynx, insbesondere in dem Pro- und Metacarpus sowie dem terminalen Bulbus von *C. elegans*, lokalisiert werden, wie optische Schnittserien durch den *C. elegans* Embryo im konfokalen Laserscanning-Mikroskop zeigten. Der Isthmus, der den Metacarpus mit dem terminalen Bulbus verbindet, schien dagegen kein B0457-Protein zu exprimieren. Richtet sich nun ein Wirkstoff, wie bspw. Avermectin, gegen einen spezifisch im Pharynx exprimierten Rezeptor und führt zu dessen Lähmung, so kommt es infolge einer verringerten Nahrungsaufnahme und unzureichenden Weiterleitung zu Störungen der Entwicklung und zum Hungertod parasitischer Nematoden [Gill *et al.*, 1995]. Viele gastrointestinale Nematoden, wie z. B. *H. contortus*, nehmen ihre Nährstoffe aber auch über die Cuticula auf [Ho *et al.*, 1990; Geary *et al.*, 1993]. Daher läßt sich nicht ausschließen, daß Avermectin über die Pharynx-Muskulatur auch andere vitale Funktionen, wie bspw. die Regulation des Turgordruckes, beeinflusst. Dafür spricht, daß Avermectin keine anthelminthische Wirkung bei Makrofilarien zeigt, die ihre Nährstoffe ausschließlich transcuticulär aufnehmen [Howells, 1980]. Auch Levamisol, daß äußerst wirksam gegen die im Blut zirkulierenden Mikrofilarien ist, zeigt nur moderate Effekte gegen adulte *Acanthocheilonema viteae* und *Brugia pahangi* und ist sogar unwirksam gegen *Brugia malayi* [Lämmler *et al.*, 1971; Zahner und Schares, 1993]. Die Effizienz von PF1022A gegen Filarien erwies sich im Nagermodell bei *Mastomys coucha* ebenfalls als nur mäßig und beschränkte sich auf die Mikrofilarien. So zeigte es nur begrenzte antifilariale Effizienz gegen *A. viteae* und keine Wirksamkeit gegen *B. malayi* und *Litomosoides sigmodontis* [Zahner *et al.*, 2000a]. Das semisynthetische PF1022A-Derivat BAY44-4400 dagegen wirkt unterschiedlich sensitiv auf larvale, präadulte und adulte Stadien verschiedener Spezies. BAY44-4400 beeinflusst die Entwicklung intrauteriner Stadien von *A. viteae*, *B. malayi* und *L. sigmodontis*, zeigt aber in Adulten nur bei *A. viteae* signifikante Effekte (86-100 %) [Zahner *et al.*, 2000b]. Dabei wurden keine Unterschiede im Geschlecht der Adulten festgestellt [Zahner *et al.*, 2000a]. Die Beobachtung, daß männliche *Angiostrongylus cantonensis* resistenter auf PF1022A reagieren als weibliche [Kachi *et al.*, 1994], sind offensichtlich auf diesen Parasit beschränkt. Adulte *L. sigmodontis* zeigen erst nach mehrfacher Verabreichung hoher BAY44-4400-Konzentrationen (5x 100 mg/kg) eine Wirkung. Bei *B. malayi* konnten selbst bei wiederholter Behandlung keine Effekte beobachtet werden [Zahner *et al.*, 2000b].

Geht man davon aus, daß das *C. elegans* B0457-Protein das homologe Protein zu HC110-R in *H. contortus* ist, so bietet sich zur weiteren Charakterisierung die Generierung und phänotypische Untersuchung von B0457 'Knock-Out'-Tieren an. Der hermaphrodite Lebenszyklus von *C. elegans* läßt die Reproduktion vieler Mutantenklassen zu, so daß auch diverse Defekte in der Signaltransduktion, die in anderen Tieren bislang letal waren, in diesem Nematoden untersucht werden können [Silva und Plasterk, 1990]. Durch Erzeugung von N- und C-terminal verkürzten

HC110-R-Deletionsklonen sowie durch Austausch einzelner Aminosäuren läßt sich die Bindungsstelle von PF1022A und α -LTX noch genauer ermitteln.

Die Identifizierung des natürlichen Liganden und auch des G-Proteins zu HC110-R wird in Zukunft zeigen, in welche physiologischen Signaltransduktionswege PF1022A in *H. contortus* und anderen parasitischen Nematoden eingreift.

5 Zusammenfassung

Infektionen des Gastrointestinaltraktes mit parasitischen Nematoden führen bei Mensch und Tier zu erheblichen gesundheitlichen und ökonomischen Schäden. Weltweit stark zunehmende Anthelminthika-Resistenzen bei Nutztieren erfordern die Suche nach neuen, wirkungsvolleren Anthelminthika. Ein vielversprechendes Breitspektrum-Anthelminthikum ist das erst vor wenigen Jahren entdeckte Cyclopeptide PF1022A. Ziel dieser Arbeit war ein mögliches „Target“-Protein für den Wirkstoff PF1022A in dem gastrointestinalen Nematoden *Haemonchus contortus* zu finden.

Mittels Liganden-Immunscreening einer *Haemonchus contortus* cDNA-Expressionsbibliothek wurde ein 3539 bp großer cDNA-Klon identifiziert. Dieser kodiert für das neue 110 kDa große heptahelikale Transmembranprotein HC110-R. Hohe Sequenzähnlichkeiten existieren im Bereich der sieben Transmembran-Domänen und konservierte Proteinmotive in dem 59 kDa großen extrazellulären N-Terminus und dem 24 kDa großen intrazellulären C-Terminus von HC110-R mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Sekretin-Unterfamilie, insbesondere mit dem 210 kDa großen Latrophilin aus Säugern.

Durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde HC110-R in transient und stabil transfizierten HEK-293- und COS-7-Zellen an der Plasmamembran und in sauren Lysosomen lokalisiert. Das 130 kDa große Vertebraten-spezifische Neurotoxin α -Latrotoxin zeigte als artifizieller Ligand im Western Blot eine spezifische Bindung an die N-Termini von HC110-R und Latrophilin. In HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen führte α -Latrotoxin dosisabhängig zu einer Erhöhung der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration. Dabei erfolgte durch 75 nM α -Latrotoxin ein maximaler Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} über Cadmium und Nifedipin inhibierbare Kanäle. Die agonistische Wirkung von α -Latrotoxin auf HC110-R erwies sich als spezifisch, da das Neurotoxin weder Veränderungen in nicht transfizierten HEK-293-Zellen, noch in Zellen, die mit einem β_2 -adrenergen Rezeptor oder einem muscarinischen Acetylcholin-Rezeptor 1 transfiziert worden waren, hervorrief.

Durch Liganden-Präzipitation und Western Blot-Analyse mit biotinyliertem PF1022A wurde eine spezifische Bindung an den N-Terminus von HC110-R nachgewiesen. PF1022A beeinflusste die durch α -Latrotoxin vermittelte Ca^{2+} -Signaltransduktion von HC110-R antagonistisch, indem es dosisabhängig den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle erniedrigte bis vollständig unterdrückte. Der anthelminthisch nahezu unwirksame optische Antipode PF1022-001 zeigte dagegen keinen Effekt. Weder PF1022A noch PF1022-001 induzierten in HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen eine Veränderung der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration oder beeinflussten die Liganden-induzierte Ca^{2+} -Erhöhung, die durch endogene β_2 -adrenerge, muscarinische oder nicotinsche Rezeptoren vermittelt wurde. Die Wechselwirkung von PF1022A mit HC110-R war spezifisch. Offenbar ist HC110-R ein zelluläres „Target“-Protein für PF1022A.

Die Aufklärung der zellulären Funktionen von HC110-R in *H. contortus* und die Identifizierung seines natürlichen Liganden können dazu beitragen, die anthelminthische Wirkungskette von PF1022A *in vivo* näher zu verstehen.

6 Literatur

- Adachi, J. und Hasegawa, M.**, 1992. Computer Science Monographs, No. 27. MOLPHY: Programs for molecular phylogenetics I - PROTML: maximum likelihood inference of protein phylogeny. *Institute of Statistical Mathematics, Tokyo.*
- Adams, D. B. und Beh, K. J.**, 1981. Immunity acquired by sheep from an experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* **11**: 381 - 386
- Adam-Vizi, V., Deri, Z., Bors, P. und Tretter, L.**, 1993. Lack of involvement of $[Ca^{2+}]_i$ in the external Ca^{2+} -independent release of acetylcholine evoked by veratridine, ouabain and alpha-latrotoxin: possible role of $[Na^+]_i$. *J. Physiol. Paris* **87**: 43 - 50
- Aidley, D. J.**, 1998. The physiology of excitable cells. 4th ed., *Cambridge University Press, Cambridge*
- Ainscough, R. et al.**, 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**: 2012 - 2018
- Akhavan-Tafti, H., Schaap, A. P., Arghavani, Z., DeSilva, R., Eickholt, R. A., Handley, R. S., Schoenfelner, B. A., Sugioka, K. und Sugioka, Y.**, 1994. CCD camera imaging for the chemiluminescent detection of enzymes using new ultrasensitive reagent. *J. Biolumin. Chemilumin.* **9**: 155 - 164
- Akyol, C., Kino, H. und Terada, M.**, 1993. Effects of PF1022A, a newly developed gabergic anthelmintic, on adult stage of *Angiostrongylus cantonensis* in rats. *Jpn. J. Parasitol.* **42**: 220 - 226
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D.**, 1990. Molekularbiologie der Zelle. 2. Aufl., *VCH Verlag, Weinheim*
- Alexander, L., Lee, H., Rosenzweig, M., Jung, J. U. und Desrosiers, R. C.**, 1997. EGFP-containing vector system that facilitates stable and transient expression assays. *BioTechniques* **23**: 64 - 66
- Allard, W. J., Sigal, I. S. und Dixon, R. A. F.**, 1987. Sequence of the gene encoding the human M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Nucleic Acids Res.* **24**: 10604
- Altschul, S. F. und Lipman, D. J.**, 1990. Protein database searches for multiple alignments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 5509 - 5513
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.**, 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403 - 410
- Andreev, I. M., Malenkov, G. G., Shkrob, A. M. und Shemyakin, M. M.**, 1971. Conductometric investigations on complexes formed by cyclic depsipeptides and peptides with alkali metal ions. *Molekulyarnaya Biologiya* **5**: 614 - 623
- Appel, R. D., Bairoch, A. und Hochstrasser, D. F.**, 1994. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExpASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 258 - 260
- Arena, J. P., Liu, K. K., Paress, P. S. und Cully, D. F.**, 1991. Avermectin-sensitive chloride currents induced by *Caenorhabditis elegans* RNA in *Xenopus* oocytes. *Molec. Pharmacol.* **40**: 368 - 374.
- Arena, J. P., Liu, K. K., Paress, P. S., Frazier, E. G., Cully, D. F., Mrozik, H. und Schaeffer, J. M.**, 1995. The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: Correlation between

- activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. *J. Parasitol.* **8**: 286 - 294
- Armour, J. und Duncan, M.**, 1987. Arrested larval development in cattle nematodes. *Parasitol. Today* **3**: 171 - 176
- Attwood, T. K. und Findlay, J. B. C.**, 1994. Fingerprinting G protein-coupled receptors. *Protein Eng.* **7**: 195 - 203
- Avery, L. und Horvitz, H. R.**, 1990. Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool.* **253**: 263 - 270
- Aviv, H. und Leder, P.**, 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**: 1408 - 1412
- Bacon, K. B., Westwick, J. und Camp, R. D.**, 1989. Potent and specific inhibition of IL-8-, IL-1 alpha- and IL-1 beta-induced *in vitro* human lymphocyte migration by calcium channel antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**: 349 - 354
- Balch, W. E., Elliott, M. M. und Keller, D. S.**, 1986. ATP-coupled transport of vesicular stomatitis virus G protein between the endoplasmic reticulum and the Golgi. *J. Biol. Chem.* **261**: 14681 - 14689
- Baldwyn, J. M.**, 1993. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **12**: 1693 - 1703
- Baralle, F. E.**, 1983. The functional significance of leader and trailer sequences in eukaryotic mRNAs. *Int. Rev. Cytol.* **81**: 71 - 106
- Bargmann, C.**, 1997. Olfactory receptors, vomeronasal receptors and the organization of olfactory information. *Cell* **90**: 585 - 587
- Bargmann, C.**, 1998. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* **282**: 2028 - 2033
- Barnard, E. A.**, 1992. Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 368 - 374
- Barnett, D. W., Liu, J. und Mislser, S.**, 1996. Single-cell measurements of quantal secretion induced by α -latrotoxin from rat adrenal chromaffin cells: dependence on extracellular Ca^{2+} . *Pflügers Arch.* **432**: 1039 - 1046
- Barondes, S. H.**, 1984. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. *Science* **223**: 1259 - 1264
- Barondes, S. H., Gitt, M. A., Leffler, H. und Cooper, D. N.**, 1988. Multiple soluble vertebrate galactoside-binding lectins. *Biochimie* **70**: 1627 - 1632
- Baud, V., Chisoe, S. L., Viegas-Péquignot, E., Diriong, S., N'Guyen, V. C., Roe, B. A. und Lipinski, M.**, 1995. EMR1, an unusual member in the family of hormone receptors with seven transmembrane segments. *Genomics* **26**: 334 - 344
- Bedford, M. T., Chan, D. C. und Leder, P.**, 1997. FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *EMBO J.* **16**: 2376 - 2383
- Bennet, M. und Reed, R.**, 1993. Correspondence between a mammalian spliceosome component and an essential yeast splicing factor. *Science* **262**: 105 - 108
- Benz, R.**, 1978. Alkali ion transport through lipid bilayer membranes mediated by enniatin A and B and beauvericin. *J. Membrane Biol.* **43**: 367 - 394
- Birnboim, H. C.**, 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**: 243 - 255

- Birnstiel, M. L., Busslinger, M. und Strub, K.,** 1985. Transcription termination and 3' processing: The end is in site! *Cell* **41**: 349 - 359
- Bittner, M. A., Krasnoperov, V. G., Stuenkel, E. L., Petrenko, A. G. und Holz, R. W.,** 1998. A Ca²⁺-independent receptor for α -latrotoxin, CIRL, mediates effects on secretion via multiple mechanisms. *J. Neurosci.* **18**: 2914 – 2922
- Bjerrum, O. J. und Schafer-Nielsen, C.,** 1986. Gel electrophoresis of proteins. In: Dunn, M. J. (ed.). Electrophoresis. *WCH, Weinheim*: 315 - 327
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. und Gotschlich, E. C.,** 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Anal. Biochem.* **136**: 175 - 179
- Bleasdale, J. E., Thakur, N. R., Gremban, R. S., Bundy, G. L., Fitzpatrick, F. A., Smith, R. J. und Bunting, S.,** 1990. Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**: 756 – 768
- Boch, J. und Supperer, R.,** 1983. Veterinärmedizinische Parasitologie. 3. Aufl., *Paul Parey Verlag, Berlin*
- Bockaert, J. und Pin, J. P.,** 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**: 1723 - 1729
- Bokman, S. H. und Ward, W. W.,** 1981. Renaturation of *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**: 1372 – 1380
- Bonin, A. L., Gossen, M. und Bujard, H.,** 1994. *Photinus pyralis* luciferase: vectors that contain a modified luc coding sequence allowing convenient transfer into other systems. *Gene* **141**: 75 - 77
- Bottjer, K. P. und Bone, L. W.,** 1985. *Trichostrongylus colubriformis*: Effect of anthelmintics on ingestion and oviposition. *Int. J. Parasitol.* **15**: 501 - 503
- Boyd, V. L., Bozzini, M., Zon, G., Noble, R. L. und Mattaliano, R. J.,** 1992. Sequencing of peptides and proteins from the carboxy terminus. *Anal. Biochem.* **206**: 344 - 352
- Bradford, M.,** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248 - 252
- Brann, M. R.,** 1992. Molecular biology of G protein-coupled receptors. Applications of molecular genetics to pharmacology. *Birkhäuser-Verlag, Boston*
- Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I. R., Blaisdell, B. E. und Karlin, S.,** 1992. Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 2002 - 2006
- Brown, A. M.,** 1991. A cellular logic for G protein-coupled ion channel pathways. *FASEB J.* **5**: 2175 - 2179
- Brown, A. M. und Birnbaumer, L.,** 1988. Direct G protein gating of ion channels. *Am. J. Physiol.* **254**: H401 - H410
- Bruneau, N., Nganga, A., Fisher, E. A. und Lombardo, D.,** 1997. O-Glycosylation of C-terminal tandem-repeated sequences regulates the secretion of rat pancreatic bile salt-dependent lipase. *J. Biol. Chem.* **272**: 27353 - 27361

- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M.,** 1987. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376
- Burgermeister, W. und Winkler-Oswatitsch, R.,** 1977. Complex formation of monovalent cations with biofunctional ligands. *Top. Curr. Chem.* **69**: 91 - 196
- Burt, D. R. und Kamatchi, G. L.,** 1991. GABA_A receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J.* **5**: 2916 - 2923
- Butz, S., Rawer, S., Rapp, W. und Birsner U.,** 1994. Immunization and affinity purification of antibodies using resin-immobilized lysine-branched synthetic peptides. *Peptide Res.* **7**: 20 - 23
- Capogna, M., Gähwiler, B. H. und Thompson, S. M.,** 1996a. Calcium-independent actions of α -latrotoxin on spontaneous and evoked synaptic transmission in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* **76**: 3149 - 3158
- Capogna, M., Gähwiler, B. H. und Thompson, S. M.,** 1996b. Presynaptic inhibition of calcium-dependent and -independent release elicited with ionomycin, gadolinium and α -latrotoxin in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* **75**: 2017 - 2028
- Carman, C., Som, T., Kim, C. und Benovic, J.,** 1998. Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* **273**: 20308 - 20316
- Castro, G. A.,** 1989. Immunophysiology of enteric parasitism. *Parasitol. Today* **5**: 11 - 19
- Ceccarelli, B. und Hurlbut, W. P.,** 1980. Ca²⁺-dependent recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* **87**: 297 - 303
- Celis, J. E.,** 1998. Cell Biology: A Laboratory Handbook. 2nd ed., Vol. 4, Academic Press, San Diego, U.S.A.: 149 - 252
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. und Prasher, D. C.,** 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802 - 805
- Chamberlain, J. P.,** 1979. Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Anal. Biochem.* **98**: 132 - 135
- Chang, C. P., Pearse, R. V. II., O'Connell, S. und Rosenfeld, M. G.,** 1993. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron* **11**: 1187 - 1195
- Chen, R., Lewis, K. A., Perrin, M. H. und Vale, W. W.,** 1993. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 8967 - 8971
- Chen, W., Terada, M. und Cheng, J. T.,** 1996. Characterization of subtypes of gamma-aminobutyric acid receptors in an *Ascaris* muscle preparation by binding assay and binding of PF1022A, a new anthelmintic, on the receptors. *Parasitol. Res.* **82**: 97 - 101
- Cheng, J. T., Chen, W., Terada, M. und Sano, M.,** 1995. Effect of PF1022A on the central nervous functions in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **67** (Suppl. 1): 160
- Chomczynski, P.,** 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* **15**: 532 - 537
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.,** 1987. Single-step method of RNA-isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156 - 159
- Cicchetti, P., Mayer, B., Thiel, G. und Baltimore, D.,** 1992. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science* **257**: 803 - 806

- Ciechanover, A., Schwartz, A. L., Dautry-Varsat, A. und Lodish, H. F.,** 1983. Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. *J. Biol. Chem.* **256**: 9681 - 9689
- Clapham, D. E.,** 1994. Direct G protein activation of ion channels? *Annu. Rev. Neurosci.* **17**: 441 - 464
- Clark, J. M.,** 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **15**: 9677 - 9686
- Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. und Ward, W. W.,** 1993. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochemistry* **32**: 1212 - 1218
- Compton, S. J. und Jones, C. G.,** 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **151**: 369 - 374
- Conder, G. A., Johnson, S. S., Nowakowski, D. S., Troy, E. B., Dutton, F. E., Nelson, S. J., Thomas, E. M., Davis, J. P. und Thompson, D. P.,** 1995. Anthelmintic profile of the cyclodepsipeptide PF1022A in *in vitro* and *in vivo* models. *J. Antibiotics* **48**: 820 - 823
- Coombs, L. M., Pigott, D., Proctor, A., Eydmann, M., Denner, J. und Knowles, M. A.,** 1990. Simultaneous isolation of DNA, RNA, and antigenic protein exhibiting kinase activity from small tumor samples using guanidine isothiocyanate. *Anal. Biochem.* **188**: 338 - 343
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. und Falkow, S.,** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33 - 38
- Coronado, R., Mortissette, J., Sukhareva, M. und Vaughan, D. M.,** 1994. Structure and function of ryanodine receptors. *Am. J. Physiol.* **266**: C1485 - C1504
- Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Darmoul, D., Maoret, J.-J., Carrero, I., Ogier-Denis, E. und Laburthe, M.,** 1994. Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**: 269 - 776
- Croll, N. A. und Matthews, B. E.,** 1977. Biology of Nematodes. *Blackie, London*
- Cully, D. F., Vassilatis, D. K., Liu, K. K., Paress, P. S., Van der Ploeg, L. H. T., Schaeffer, J. M. und Arena, J. P.,** 1994. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **371**: 707 - 711.
- Cyster, J. G., Shotton, D. M. und Williams, A. F.,** 1991. The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *EMBO J.* **10**: 893 - 902
- Dautzenberg, F. M., Dietrich, K., Palchaudhuri, M. R. und Spiess, J.,** 1997. Identification of two corticotropin-releasing factor receptors from *Xenopus laevis* with high ligand selectivity: unusual pharmacology of the type 1 receptor. *J. Neurochem.* **69**: 1640 - 1649
- Davies, C. H., Starkey, S. J., Pozza, M. F. und Collingridge, G. L.,** 1991. GABA_B autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature* **349**: 609 - 611
- Davletov, B. A., Krasnoperov, V., Hata, Y., Petrenko, A. G. und Südhof, T. C.,** 1995. High affinity binding of α -latrotoxin to recombinant neurexin I α . *J. Biol. Chem.* **270**: 23903 - 23905
- Davletov, B. A., Shamotienko, O. G., Lelianova, V. G., Grishin, E. V. und Ushkaryov, Y. A.,** 1996. Isolation and biochemical characterization of a Ca²⁺-independent α -latrotoxin-binding protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 23239 - 23245

- Davletov, B. A., Meunier, F. A., Ashton, A. C., Matsushita, H., Hirst, W. D., Lelianova, V. G., Wilkon, G. P., Dolly, J. O. und Ushkaryov, Y. A., 1998.** Vesicle exocytosis stimulated by α -latrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and stored Ca^{2+} . *EMBO J.* **17**: 3909 – 3920
- Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M. und Orcutt, B. C., 1978.** A model of evolutionary change in proteins. In: Dayhoff, M. O. (ed.), Atlas of protein sequence and structure, Vol. 5, suppl. 3, *Washington DC*: 345 - 352
- Delgado, M., Martinez, C., Johnson, M. C., Gomariz, R. P. und Ganea, D., 1996.** Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* **68**: 27 - 38
- Devereux, J., Haeblerli, P. und Smithies, O., 1984.** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**: 387 - 395
- Drexler, H. G., Dirks, W., MacLeod R. A. F., Quentmeier, H. und Steube, K., 1995.** DSM Catalogue of Human and Animal Cell Lines. 5th ed., *Braunschweig*
- Dutton, F. E. und Nelson, S. J., 1994.** Synthesis of PF1022A, an anthelmintic cyclodepsipeptide. *J. Antibiotics* **47**: 1322 - 1327
- Eckert, W. A. und Kartenbeck, J., 1997.** Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie, *Springer Verlag, Berlin*
- Elson, C. O., Kagnoff, M., Fiocchi, C., Befus, D. und Targan, S., 1986.** Intestinal immunity and inflammation: recent progress. *Gastroenterol.* **91**: 746 - 768
- Felsenstein, J., 1973.** Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters. *Am. J. Hum. Genet.* **25**: 471 - 492
- Feng, S., Chen, J. K., Yu, H., Simon, J. A. und Schreiber, S. L., 1994.** Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: Development of a general model for SH3-ligand interaction. *Science* **266**: 1241 - 1247
- Fernandez, L. M. und Puett, D., 1996.** Lys 583 in the third extracellular loop of the lutropin/choriogonadotropin receptor is critical for signaling. *J. Biol. Chem.* **271**: 925 - 930
- Filippov, A. K., Kobrinsky, E. M., Tsurupa, G. P., Pashkov, V. N. und Grishin, E. V., 1990.** Expression of receptor for α -latrotoxin in *Xenopus* oocytes after injection of mRNA from rat brain. *Neurosci.* **39**: 809 – 814
- Finch, E. A., Turner, T. J. und Goldin, S. M., 1991.** Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science* **252**: 443 - 446
- Finkelstein, A., Rubin, L. L. und Tzeng, M. C., 1976.** Black widow spider venom: effect of purified toxin on lipid bilayer membranes. *Science* **193**: 1009 - 1011
- Frontali, N., Ceccarelli, B., Gorio, A., Mauro, A., Siekevitz, P., Tzeng, M. C. und Hurlbut, W. P., 1976.** Purification from black widow spider venom of a protein factor causing the depletion of synaptic vesicles at neuromuscular junctions. *J. Cell Biol.* **68**: 462 - 479
- Fukashe, T., Koike, T., Chinone, S., Akihama, S., Itgaki, H., Takagi, M., Shimizu, T., Yaguchi, T., Sasaki, T. und Okada, T., 1990.** Anthelmintic effects of PF1022, a new cyclic depsipeptide, on intestinal parasitic nematodes in dogs and cats (in Japanese). *Proc. of the 110th meeting of the Japanese Society of Vet. Sci., 16.-18.10.1992*: 122
- Fukuda, M., 1991.** Lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 21327 - 21330

- Garbers, D. L.**, 1992. Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine and autocrine ligands. *Cell* **71**: 1 - 4
- Gaylann, B. D., Harrison, J. K., Zysk, J. R., Lyons, C. E., Lynch, K. R. und Thorner, M. O.**, 1993. Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol. Endocrinol.* **7**: 77 - 84
- Geary, T. G., Sims, S. M., Thomas, E. M., Vanover, L., Davis, J. P., Winterrowd, C. A., Klein, R. D., Ho, N. F. H. und Thompson, D. P.**, 1993. *Haemonchus contortus*: Ivermectin-induced paralysis of the pharynx. *Exp. Parasitol.* **77**: 88 - 96
- Gerber, H.-P., Seipel, K., Georgiev, O., Höfferer, M., Hug, M., Rusconi, S. und Schaffner, W.**, 1994. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* **263**: 808 - 811
- Gerster, T., Balmaceda, C.-G. und Roeder, R. G.**, 1990. The cell type-specific octamer transcription factor OTF-2 has two domains required for the activation of transcription. *EMBO J.* **9**: 1635 - 1643
- Gertsch, W. J.**, 1979. American spiders. 2nd ed., *Van Nostrand Reinhold Company, New York, U.S.A.*: 235 - 241
- Geßner, G., Meder, S., Rink, T., Boheim, G., Harder, A., Jeschke, P., Scherkenbeck, J. und Londershausen, M.**, 1996. Ionophore and anthelmintic activity of PF1022A, a cyclooctadepsipeptide, are not related. *Pestic Sci.* **48**: 399 - 407
- Gill, J. H., Redwin, J. M., Van Wyk, J. A. und Lacey, E.**, 1995. Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus* - Effects of ivermectin resistance. *Int. J. Parasitol.* **25**: 463 - 470
- Gonzales, S., De La Cabada, F. J.**, 1987. Parasitic infections of the colon and rectum. *Baillieres Clinical Gastroenterol.* **1**: 447 - 467
- Grasso, A.**, 1976. Preparation and properties of a neurotoxin purified from the venom of black widow spider (*Latrodectus mactans tredecimguttatus*). *Biochim. Biophys. Acta* **439**: 406 - 412
- Grasso, A., Alema, S., Rufini, S. und Senni, M. I.**, 1980. Black widow spider toxin-induced calcium fluxes and transmitter release in a neurosecretory cell line. *Nature* **283**: 774 - 776
- Grasso, A. und Mercanti Ciotti, M. T.**, 1993. The secretion of amino acid transmitters from cerebellar primary cultures probed by α -latrotoxin. *Neurosci.* **54**: 595 - 604
- Gray, J. X., Haino, M., Roth, M. J., Maguire, J. E., Jensen, P. N., Yarme, A., Stetler-Stevenson, M. A., Siebenlist, U. und Kelly, K.**, 1996. CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J. Immunol.* **157**: 5438 - 5447
- Grishin, E. V.**, 1998. Black widow spider toxins: The present and the future. *Toxicon* **36**: 1693 - 1701
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. M. und Tsien, R. Y.**, 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440 - 3450
- Gull, K., Hussey, P. J., Sasse, R., Schneider, A., Seebeck, T. und Sherwin, T.**, 1986. Tubulin isotypes: generation of diversity in cells and microtubular organelles. *J. Cell Sci. Suppl.* **5**: 243 - 255
- Gum, J. R. Jr., Hicks, J. W., Toribara, N. W., Siddiki, B. und Kim, Y. S.**, 1994. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. *J. Biol. Chem.* **269**: 2440 - 2446
- Hadjantonakis, A. K., Formstone, C. J. und Little, P. F. R.**, 1998. MCelsr1 is an evolutionarily conserved seven-pass transmembrane receptor and is expressed during mouse embryonic development. *Mech. Development* **78**: 91 - 95

- Hamann, J., Eichler, W., Hamann, D., Kerstens, H. M. J., Poddighe, P. J., Hoovers, J. M. N., Hartmann, E., Strauss, M. und van Lier, R. A. W.,** 1995. Expression cloning and chromosomal mapping of the leukocyte activation antigen CD97, a new seven-span transmembrane molecule of the secretion receptor superfamily with an unusual extracellular domain. *J. Immunol.* **155**: 1942 - 1950
- Hamann, J., Hartmann, E. und van Lier, R. A. W.,** 1996. Structure of the human CD97 gene: exon shuffling has generated a new type of seven-span transmembrane molecule related to the secretin receptor superfamily. *Genomics* **32**: 144 - 147
- Hamdan, F. F., Ungrin, M. D., Abramovitz, M. und Ribeiro, P.,** 1999. Characterization of a novel serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*: cloning and expression of two splice variants. *J. Neurochem.* **72**: 1372 - 1383
- Hanahan, D.,** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557 - 580
- Hanahan, D.,** 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. DNA cloning, a practical approach 1. In: Glover, D. M. (ed.). *IRL Press, Oxford, GB*
- Harder, A. und Wunderlich, F.,** 1991. Darmnematoden des Menschen. *BIUZ* **1**: 37 - 44
- Harder, A., Londershausen, M. und Mehlhorn, H.,** 1997. The four larval stages and the adults of *Heterakis spumosa* are impaired by the anthelmintic cyclodepsipeptide PF1022A. *Zbl. Bakteriol.* **286**: 212
- Harder, A., Scherkenbeck, J., Jeschke, P., Wunderlich, F., Schmitt-Wrede, H. P. und Saeger, B.,** 1998. Proteine, dafür kodierende DNA-Sequenzen, dagegen spezifische Antikörper und ihre Verwendung zum Auffinden nematizider Wirkstoffe. *Patent DE 197 04 024 A*
- Hata, Y., Butz, S. und Südhof, T. C.,** 1996. Cask - a novel dlg/psd 95 homolog with a N-terminal Calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuexins. *J. Neurosci.* **16**: 2488 - 2494
- Hay, B. und Short, J. M.,** 1992. ExAssist™ helper phage and SOLR™ cells for lambda ZAP® II excisions. *Strategies* **5**: 16 - 18.
- Haynes, J. R., McCabe, D. E., Swain, W. F., Widera, G. und Fuller, J. T.,** 1996. Particle-mediated nucleic acid immunization. *J. Biotechnol.* **44**: 37 - 42
- Heldin, C. H. und Purton, M.,** 1996. Signal Transduction. *Chapman & Hall, London, GB*
- Henkel, A. W. und Sankaranarayanan, S.,** 1999. Mechanisms of α -latrotoxin action. *Cell Tissue Res.* **296**: 229 - 233
- Hepler, J. R. und Gilman, A. G.,** 1992. G Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 383 - 387
- Hirabayashi, J. und Kasai, K.,** 1988. Complete amino acid sequence of a beta-galactoside-binding lectin from human placenta. *J. Biochem. Tokyo* **104**: 1 - 4
- Ho, N. F. H., Geary, T. G., Raub, T. J., Barsuhn, C. L. und Thompson, D. P.,** 1990. Biophysical transport properties of the cuticle of *Ascaris suum*. *Molec. Biochem. Parasitol.* **41**: 153 - 166
- Holden-Dye, L., Krogsgaard-Larsen, P., Nielsen, L. und Walker, R. J.,** 1989. GABA receptors on the somatic muscle cells of the parasitic nematode, *Ascaris suum*: stereoselectivity indicates similarity to a GABA_A-type agonist recognition site. *Br. J. Pharmacol.* **98**: 841 - 850
- Holton, T. A. und Graham, M. W.,** 1991. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1156

- Holz, G. G. und Habener, J. F.**, 1998. Black widow spider alpha-latrotoxin: a presynaptic neurotoxin that shares structural homology with the glucagon-like peptide-1 family of insulin secretagogic hormones. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **121**: 177 - 184
- Hopp, T. P. und Woods, K.**, 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 3824 - 3828
- Horn, F., Weare, J., Beukers, M. W., Hörsch, S., Bairoch, A., Chen, W., Edvardsen, Ø., Campagne, F. und Vriend, G.**, 1998. GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* **26**: 275 - 279
- Horton, R. J.**, 1990. Benzimidazoles in a wormy world. *Parasitol. Today* **6**: 106
- Howells, R.E.**, 1980. Filariae: Dynamics of the surface. In: Vanden-Bossche, J. (ed.). *The Host-Invader Interplay. Elsevier, Biomedical Press, Amsterdam, NL*: 69 - 84
- Hunkapiller, M. W., Hewick, R. M., Dreyer, W. J. und Hood, L. E.**, 1983. High sensitivity sequencing with a gas phase sequenator. *Meth. Enzymol.* **91**: 399 - 413
- Hurlbut, W. P., Chieragatti, E., Valtorta, F. und Haimann, C.**, 1994. Alpha-latrotoxin channels in neuroblastoma cells. *J. Membr. Biol.* **138**: 91 - 102
- Ichtchenko, K., Khvotchev, M., Kiyatkin, N., Simpson, L., Sugita, S. und Südhof, T. C.**, 1998. α -Latrotoxin action probed with recombinant toxin: receptors recruit α -latrotoxin but do not transduce an exocytotic signal. *EMBO J.* **17**: 6188 - 6199
- Ichtchenko, K., Bittner, M. A., Krasnoperov, V., Little, A. R., Chepurny, O., Holz, R. W. und Petrenko, A. G.**, 1999. A novel ubiquitously expressed α -latrotoxin receptor is a member of the CIRL family of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **274**: 5491 - 5498
- Inagaki, N., Yoshida, H., Mizuta, M., Mizuno, N., Fujii, Y., Gono, T., Miyazaki, J. und Seino, S.**, 1994. Cloning and functional characterization of a third pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor subtype expressed in insulin-secreting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 2679 - 2683
- Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K. und Nagata, S.**, 1992. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* **8**: 811 - 819
- Ishii, A. I., Terada, M., Kino, H. und Sano, M.**, 1983. Studies on chemotherapy of parasitic helminths: effects of avermectin B_{1a} on *Angiostrongylus cantonensis* in rats. *Intern. J. Parasitol.* **13**: 491 - 498
- Ishii, A. I., Terada, M. und Sano, M.**, 1985. Studies on chemotherapy of parasitic helminths. Effects of ivermectin on *Angiostrongylus cantonensis* in rats. *Jpn. J. Parasitol.* **34**: 411 - 417
- Jackson, R. J. und Hunt, T.**, 1983. Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Methods in Enzymol.* **96**: 50 - 74
- Jackson, R. J., Howell, M. T. und Kaminski, A.**, 1990. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 477 - 483
- Jacobs, H. J., Wiltshire, C., Ashman, K. und Meeusen, E. N. T.**, 1999. Vaccination against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. *Vaccine* **17**: 362 - 368
- Jang, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C. und Wimmer, E.**, 1988. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. *J. Virol.* **62**: 2636 - 2643

- Jansen, G., Thijssen, K. L., Werner, P., van der Horst, M., Hazendonk, E. und Plasterk, R. H. A., 1999. The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics* **21**: 414 - 419
- Jasmer, D. P., Wescott, R. B. und Crane, J. W., 1986. Influence of cold temperatures upon development and survival of eggs of Washington isolates of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta*. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* **53**: 244 - 247
- Jerpseth, B., Greener, A., Short, J. M., Viola, J. und Kretz, P. L., 1992. XL1-Blue MRF⁻ *E. coli* cells: McrA⁻, McrCB⁻, McrF⁻, Mrr⁻, HsdR⁻ derivative of XL1-Blue cells. *Strategies* **5**: 81 - 83
- Jin, W., Lo, T. M., Loh, H. H. und Thayer, S. A., 1994. U73122 inhibits phospholipase C-dependent calcium mobilization in neuronal cells. *Brain Res.* **642**: 237 - 243
- Jones, D. T., Taylor, W. R. und Thornton, J. M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **8**: 275 - 282
- Jüppner, H., Abou-Samra, A. B., Freeman, M., Kong, X. F., Schipani, E., Richards, J., Kolakowski, L. F. Jr., Hock, J., Potts, J. T. Jr., Kronenberg, H. M. und Segre, G. V., 1991. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* **254**: 1024 - 1026
- Kachi, S., Ishih, A. und Terada, M., 1994. Effects of PF1022A on *Angiostrongylus cantonensis* staying in the central nervous system of rats and mice. *Jpn. J. Parasitol.* **43**: 483 - 488
- Kachi, S., Ishih, A. und Terada, M., 1995. Effects of PF1022A on adult *Angiostrongylus cantonensis* in the pulmonary arteries and larvae migrating into the central nervous system of rats. *Parasitol. Res.* **81**: 631 - 637
- Kachi, S., Terada, M. und Hashimoto, H., 1997. Influence of PF1022A on the motility of *Angiostrongylus cantonensis* *in vitro*. *Parasitol. Res.* **83**: 578 - 582
- Kachi, S., Terada, M. und Hashimoto, H., 1998. Effects of armorphous and polymorphs of PF1022A, a new antinematode drug, on *Angiostrongylus costaricensis* in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **77**: 235 - 245
- Karnik, S. S., Ridge, K. D., Bhattacharya, S. und Khorana, H. G., 1993. Palmitoylation of bovine opsin and its cysteine mutants in COS cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 40 - 44
- Kawasaki, E. S., 1991. Amplification of RNA. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. und White, T. J. (eds.). PCR protocols, a guide to methods and applications. *Academic Press Inc., San Diego, CA*: 21 - 27
- Kayes, S. G., 1997. Human toxocariasis and the visceral larva migrans syndrome: correlative immunopathology. *Chem. Immunol.* **66**: 99 - 124
- Klein, P., Kanehisa, M. und De Lisi, C., 1985. The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **815**: 468 - 476
- Kobayashi, H., Izumi, F. und Meldolesi, L., 1986. Rat adrenal chromaffin cells become sensitive to alpha-latrotoxin when cultured *in vitro*: the effect of nerve growth factor. *Neurosci. Lett.* **65**: 114 - 118
- Koenig, J. A. und Edwardson, J. M., 1997. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **18**: 276 - 287
- Kozak, M., 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283 - 292
- Kozak, M., 1989. The scanning model for translation: An update. *J. Cell Biol.* **108**: 229 - 241

- Kozawa, O., Hoshijima, M., Tanimoto, T., Ohmori, T. und Takai, Y.,** 1987. Similar physical and kinetic properties of rat brain synaptic membrane and cytosol phosphoinositide phospholipases C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**: 218 - 227
- Krämer, A.,** 1995. The biochemistry of pre-mRNA splicing. In: Lammond, A. I. (ed.). Pre-mRNA processing; *Springer-Verlag, Heidelberg*: 35 - 64
- Krasnoperov, V. G., Beavis, R., Chepurny, O., Little, A. R., Plotnikov, A. N. und Petrenko, A. G.,** 1996. The calcium-independent receptor of α -latrotoxin is not a neurexin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**: 868 - 875
- Krasnoperov, V. G., Bittner, M. A., Beavis, R., Kuang, Y., Salnikow, K. V., Chepurny, O. G., Little, A. R., Plotnikov, A. N., Wu, D., Holz, R. W. und Petrenko, A. G.,** 1997. α -Latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G protein-coupled receptor. *Neuron* **18**: 925 - 937
- Krasnoperov, V. G., Bittner, M. A., Holz, R. W., Chepurny, O. und Petrenko, A. G.,** 1999. Structural requirements for α -latrotoxin binding and α -latrotoxin-stimulated secretion. *J. Biol. Chem.* **274**: 3590 - 3596
- Krauss, G.,** 1997. Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. *Wiley-VCH Verlag, Weinheim*
- Kuestner, R. E., Elrod, R. D., Grant, F. J., Hagen, F. S., Kuijper, J. L., Matthewes, S. L., O'Hara, P. J., Sheppard, P. O., Stroop, S. D., Thompson, D. L., Whitmore, T. E., Findlay, D. M., Houssami, S., Sexton, P. M. und Moore, E. E.,** 1994. Cloning and characterization of an abundant subtype of the human calcitonin receptor. *Mol. Pharmacol.* **46**: 246 - 255
- Kurachi, S., Sze, L. und Kurachi, K.,** 1998. Improved Transfection of HepG2 Cells using FuGENE™ 6 Transfection Reagent. *Biochemica* **3**: 43 - 44
- Kyhse-Anderson, J.,** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**: 203 - 209
- Kyte, J. und Doolittle, R. F.,** 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105 - 132
- Lacey, E.,** 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* **28**: 885 - 936
- Lämmler, G., Herzog, H. und Schütze, H.-R.,** 1971. Chemotherapeutic studies on *Litomosoides carinii* infection of *Mastomys natalensis*. The activity of drugs against microfilariae. *Bull. WHO* **44**: 757 - 763
- Lämmler, U. K.,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227**: 680 - 685
- Läuger, P., Benz, R., Stark, G., Bamberg, E., Jordan, P. C., Fahr, A. und Brock, W.,** 1981. Relaxation studies of ion transport systems in lipid bilayer membranes. *Q. Rev. Biophys.* **14**: 513 - 598
- Lang, J., Ushkaryov, Y., Grasso, A. und Wollheim, C. B.,** 1998. Ca^{2+} -independent insulin exocytosis induced by α -latrotoxin requires latrophilin, a G protein-coupled receptor. *EMBO J.* **17**: 648 - 657
- Laughton, D. L., Amar, M., Thomas, P., Towner, P., Harris, P., Lunt, G. G. und Wolstenholme, A. J.,** 1994. Cloning of a putative inhibitory amino acid receptor subunit from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Recept. Channels* **2**: 155 - 163

- Laughton, D. L., Lunt, G. G. und Wolstenholme, A. J.,** 1997. Reporter gene constructs suggest that the *Caenorhabditis elegans* avermectin receptor β -subunit is expressed solely in the pharynx. *J. Exp. Biol.* **200**: 1509 - 1514
- Lee, C. Y. G., Huang, Y. S., Hu, P. C., Gomel, V. und Menge, A. C.,** 1982. Analysis of sperm antigens by sodium-dodecyl sulfate gel/protein blot radioimmunoblotting method. *Anal. Biochem.* **123**: 14 - 22
- Lelianova, V. G., Davletov, B. A., Sterling, A., Rahman, M. A., Grishin, E. V., Totty, N. F. und Ushkaryov, Y. A.,** 1997. α -Latrotoxin receptor, Latrophilin, is a novel member of the secretin family of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **272**: 21504 – 21508
- Lin, H. Y., Harris, T. L., Flannery, M. S., Aruffo, A., Kaji, E. H., Gorn, A., Kolakowski, L. F. Jr., Lodish, H. F., Goldring, S. R.,** 1991. Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science* **254**: 1022 - 1024
- Lin, C., Lin, S. C., Chang, C. P. und Rosenfeld, M. G.,** 1992. Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* **360**: 765 - 768
- Lin, S. C., Lin, C. R., Gukovsky, I., Lusic, A. J., Sawchenko, P. E. und Rosenfeld, M. G.,** 1993. Molecular basis of the little mouse phenotype and implications for cell type-specific growth. *Nature* **364**: 208 - 213
- Lin, H. H., Stubbs, L. J. und Mucenski, M. L.,** 1997. Identification and characterization of a seven transmembrane hormone receptor using differential display. *Genomics* **41**: 301 - 308
- Lipman, D. J. und Pearson, W. R.,** 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* **227**: 1435 - 1441
- Liscovitch, M.,** 1992. Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 393 - 400
- Lloyd, S. und Soulsby, E. J. L.,** 1987. Immunology of gastrointestinal nematodes of ruminants. In: Soulsby, E. J. L. (ed.). Immune responses in parasitic infections. Immunology, immunopathology and immunoprophylaxis, Vol. 1, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A.
- Longenecker, H. E., Hurlbut, W. P., Mauro, A. und Clark, A. W.,** 1970. Effects of black widow spider venom on the frog neuromuscular junction. *Nature* **225**: 701 - 703
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall R. J.,** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265 - 275
- Lüllmann, H. und Mohr, K.,** 1999. Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen. 14. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Lutz, E. M., Sheward, W. J., West, K. M., Morrow, J. A., Fink, G. und Harmar, A. J.,** 1993. The VIP₂ receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett.* **334**: 3 - 8
- Ma, H.-T., Patterson, R. L., Rossum, D. B. van, Birnbaumer, L., Mikoshiba, K. und Gill, D. L.,** 2000. Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science* **287**: 1647 - 1651
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. und Collins, F. S.,** 1991. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1154
- Maretic, Z.,** 1983. Latrotoxicism: variations in clinical manifestations provoked by *Latrodectus* species of spiders. *Toxicon* **21**: 457 - 466

- Maretic, Z. und Habermehl, G.,** 1985. Latrodektismus bei Menschen und Tieren sowie große Tierseuchen des vorigen Jahrhunderts, hervorgerufen durch *Latrodectus*. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* **92**: 270 - 273
- Marshall, J., Molloy, R., Moss, G. W. J., Howe, J. R. und Hughes, T. E.,** 1995. The jellyfish green fluorescent protein: A new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* **14**: 211 - 215
- Martin, R. J.,** 1993. Neuromuscular transmission in nematode parasites and antinematodal drug action. *Pharmacol. Ther.* **58**: 13 - 50
- Martin, R. J.,** 1997. Review: Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* **154**: 11 - 34
- Martin, R. J. und Pennington, A. J.,** 1989. A patch-clamp study of effects of dihydroavermectin on *Ascaris* muscle. *Br. J. Pharmac.* **98**: 747 - 756
- Martin, R. J., Harder, A., Londershausen, M. und Jeschke, P.,** 1996. Anthelmintic actions of the cyclic depsipeptide PF1022A and its electrophysiological effects on muscle cells of *Ascaris suum*. *Pestic. Sci.* **48**: 343 - 349
- Martin, R. J., Robertson, A. P. und Bjorn, H.,** 1997. Target sites of anthelmintics. *Parasitol.* **114**: S111 - S124
- Marxen, P., Fuhrmann, U. und Bigalke, H.,** 1989. Gangliosides mediate inhibitory effects of tetanus and botulinum A neurotoxins on exocytosis in chromaffin cells. *Toxicon* **27**: 849 - 859
- Matsushita, H., Lelianova, V. G. und Ushkaryov, Y. A.,** 1999. The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution. *FEBS Lett.* **443**: 348 - 352
- Mayo, K. E.,** 1992. Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1734 - 1744
- McCaldon, P. und Argos, P.,** 1988. Oligopeptide biases in protein sequences and their use in predicting protein coding regions in nucleotide sequences. *Proteins* **4**: 99 - 122
- McCormack, J. G. und Cobbold, P. H.,** 1991. Cellular calcium: a practical approach. *The practical approach series, IRL press, Oxford, GB*: 30 - 42
- McGadey, J.,** 1970. A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie* **23**: 180 - 184
- McKnight, A. J., Macfarlane, A. J., Dri, P., Turley, L., Willis, A. C. und Gordon, S.,** 1996. Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. *J. Biol. Chem.* **271**: 486 - 489
- McLaughlin, S. K., McKinnon, P. J. und Margolskee, R. F.,** 1992. Gustducin is a taste-cell specific G protein closely related to the transducins. *Nature* **357**: 563 - 569
- McMaster, G. K. und Carmichael, G. G.,** 1977. Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 4835 - 4838
- McPherson, P. S. und Campbell, K. P.,** 1993. The ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel. *J. Biol. Chem.* **268**: 13765 - 13768
- Mehlhorn, H.,** 1988. Parasitology in Focus. Facts and Trends. *Springer Verlag, Heidelberg*
- Mehlhorn, H., Düwel, D. und Raether, W.,** 1993. Diagnose und Therapie der Parasitosen von Haus-, Nutz- und Heimtieren. 2. Aufl., *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*

- Meldolesi, J.**, 1982. Studies on α -latrotoxin receptors in rat brain synaptosomes: correlation between toxin binding and stimulation of transmitter release. *J. Neurochem.* **38**: 1559 - 1569
- Meldolesi, J., Madeddu, L., Torda, M., Gatti, G. und Niutta, E.**, 1983. The effect of α -latrotoxin on the neurosecretory PC12 cell line: studies on toxin binding and stimulation of transmitter release. *Neurosci.* **10**: 997 - 1009
- Meldolesi, J., Huttner, W. B., Tsien, R. Y. und Pozzan, T.**, 1984. Free cytoplasmic Ca^{2+} and neurotransmitter release: studies on PC12 cells and synaptosomes exposed to α -latrotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 620 - 624
- Meldolesi, J., Scheer, H., Madeddu, L. und Wanke, E.**, 1986. Mechanism of action of α -latrotoxin: the presynaptic stimulatory toxin of the black widow spider venom. *Trends Pharmacol.* **9**: 151 - 155
- Mermod, N., O'Neill, E. A., Kelly, T. J. und Tijan, R.**, 1989. The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* **58**: 741 - 753
- Misler, S. und Falke, L. C.**, 1987. Dependence on multivalent cations of quantal release of transmitter induced by black widow spider venom. *Am. J. Physiol.* **253**: C469 - C476
- Missler, M. und Südhof, T. C.**, 1998a. Neurexins - three genes and 1001 products. *Trends Genetics* **14**: 20 - 26
- Missler, M. und Südhof, T. C.**, 1998b. Neurexophilins form a conserved family of neuropeptide-like glycoproteins. *J. Neurosci.* **18**: 3630 - 3638
- Misteli, T. und Spector, D. L.**, 1997. Protein phosphorylation and the nuclear organisation of pre-mRNA splicing. *Trends Cell Biol.* **7**: 135 - 138
- Mulvaney, J. M., Zhang, T., Fewtrell, C. und Roberson, M. S.**, 1999. Calcium influx through L-type channels is required for selective activation of extracellular signal-regulated kinase by gonadotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* **274**: 29796 - 29804
- Munn, E. A.**, 1993. Development of a vaccine against *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Today* **9**: 338 - 339
- Muramoto, K. und Kamiya, H.**, 1992. The amino-acid sequence of a lectin from conger eel, Conger myriaster, skin mucus. *Biochim. Biophys. Acta* **1116**: 129 - 136
- Nakada, M. T., Haskell, K. M., Ecker, D. J., Stadel, J. M. und Crooke, S. T.**, 1989. Genetic regulation of beta 2-adrenergic receptors in 3T3-L1 fibroblasts. *Biochem. J.* **260**: 53 - 59
- Nash, P. B., Purner, M. B., Leon, R. P., Clarke, P., Duke, R. C. und Curiel, T. J.**, 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J. Immunol.* **160**: 1824 - 1830
- Neher, E. und Augustine, G. J.**, 1992. Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* **450**: 273 - 301
- Nentwig, W.**, 1987. Ecophysiology of spiders. *Springer-Verlag, Berlin*
- Newton, S. E., Morrish, L. C., Martin, P. J., Montague, P. E. und Rolph, T. P.**, 1995. Protection against multiply drug-resistant and geographically distant strains of *Haemonchus contortus* by vaccination with H 11, a gut membrane-derived protective antigen. *Int. J. Parasitol.* **25**: 511 - 521
- Nicolay, F., Harder, A., Samson-Himmelstjerna, G. von und Mehlhorn, H.**, 2000. Synergistic action of a cyclic depsipeptide and piperazine on nematodes. *Parasitol. Res.* (im Druck)
- Nicholls, D. G., Rugolo, M., Scott, I. G. und Meldolesi, J.**, 1982. α -latrotoxin of black widow spider venom depolarizes the plasma membrane, induces massive calcium influx, and stimulates

- transmitter release in guinea pig brain synaptosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 7924 - 7928
- Nishiyama, H., Ohgaki, M. und Yamanishi, R.**, 1998. Depsipeptide derivative, process for production thereof, and novel intermediate therefor. *Patent EP19960918897 19960624*
- Njuki, F., Nicholl, C. G., Howard, A., Mak, J. C., Barnes, P. J., Girgis, S. I. und Legon, S.**, 1993. A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clin. Sci.* **85**: 385 - 388
- Nowycky, M. C., Fox, A. P. und Tsien, R. W.**, 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**: 440 - 443
- Ohyama, M., Jinuma, K., Isogai, A. und Suzuki, A.**, 1994. Total Synthesis of the anthelmintic cyclopeptide, PF1022A. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 1193 - 1194
- Overgaauw, P. A. M.**, 1997. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocarosis. *Crit. Rev. Microbiol.* **23**: 215 - 231
- Ozeki, Y., Matsui, T., Suzuki, M. und Titani, K.**, 1991. Amino acid sequence and molecular characterization of a D-galactoside-specific lectin purified from sea urchin (*Anthocardis crassispina*) eggs. *Biochemistry* **30**: 2391 - 2394
- Ozeki, Y., Yokota, Y., Kato, K. H., Titani, K. und Matsui, T.**, 1995. Developmental expression of D-galactoside-binding lectin in sea urchin (*Anthocardis crassispina*) eggs. *Exp. Cell. Res.* **216**: 318 - 324
- Palczewski, K.**, 1997. GTP-binding protein-coupled receptor kinases: Two mechanistic models. *Eur. J. Biochem.* **248**: 261 - 269
- Pashkov, V. N., Kovalevskaya, G. I., Krasnoperov, V. G. und Bulgakov, O. V.**, 1989. Isolation of α -latrotoxin from the venom of *Latrodectus mactans tredecimguttatus* by means of monoclonal antibodies. *Bioorg. Chem.* **15**: 1281 - 1283 (in Russian)
- Pashkov, V. N., Grico, N., Tsurupa, G., Storchak, L., Shatursky, O., Himmelreich, N. und Grishin, E.**, 1993. Monoclonal antibodies can uncouple the main α -latrotoxin effects: toxin-induced Ca^{2+} influx and stimulated neurotransmitter release. *Neurosci.* **56**: 695 - 701
- Patton, J. G., Porro, E. B., Galceran, J., Tempst, P. und Nadal-Ginard, B.**, 1993. Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes & Dev.* **7**: 393 - 406
- Pazin, M. J. und Williams, L. T.**, 1992. Triggering signaling cascades by receptor tyrosine kinases. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 374 - 378
- Pearson, W. R. und Lipman, D. J.**, 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **85**: 2444 - 2448
- Pelham, H. R. B. und Jackson, R. J.**, 1976. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67**: 247 - 256
- Perrin, M. H., Donaldson, C. J., Chen, R., Lewis, K. A. und Vale, W. W.**, 1993. Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinol.* **133**: 3058 - 3061
- Persson, R., Ahlstrom, E. und Fries, E.**, 1988. Differential arrest of secretory protein transport in cultured rat hepatocytes by azide treatment. *J. Cell Biol.* **107**: 2503 - 2510
- Petrenko, A. G.**, 1993. α -Latrotoxin receptor. Implications in nerve terminal function. *FEBS Lett.* **325**: 81 - 85

- Petrenko, A. G., Kovalenko, V. A., Shamotienko, O. G., Surkova, I. N., Tarasyuk, T. A., Ushkaryov, Y. A. und Grishin, E. V.**, 1990. Isolation and properties of the α -latrotoxin receptor. *EMBO J.* **9**: 2023 – 2027
- Petrenko, A. G., Lazaryeva, V. D., Geppert, M., Tarasyuk, T. A., Moomaw, C., Khokhlatchev, A. V., Ushkaryov, Y. A., Slaughter, C., Nasimov, I. V. und Südhof, T. C.**, 1993. Polypeptide composition of the α -latrotoxin receptor. *J. Biol. Chem.* **268**: 2860 – 2867
- Pfaff, T.**, 1993. Identifikation von immunogenen Klonen aus einer cDNA-Bibliothek des Darmnematoden *Heterakis spumosa*. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*
- Piekarski, G.**, 1987. Medizinische Parasitologie. 3. Aufl., *Springer-Verlag, Heidelberg*
- Pippig, S., Andexinger, S. und Lohse, M. J.**, 1995. Sequestration and recycling of β_2 -adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol. Pharmacol.* **47**: 666 - 676
- Pleiss, M., Harder, A., Turberg, A., Londershausen, M., Jinuma, K., Mencke, N., Jeschke, P. und Bonse, G.**, 1995. Synthesis of a radiolabeled cyclodepsipeptide (^3H -methyl) PF1022A. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **38**: 61 - 69
- Poynter, D.**, 1963. Parasitic bronchitis. *Adv. Parasitol.* **1**: 179 - 212
- Prichard, R. K.**, 1973. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus*, and the mode of action of some anthelmintics. *Int. J. Parasitol.* **3**: 409 - 417
- Probst, W. C., Snyder, L. A., Schuster, D. I., Brosius, J. und Sealfon, S. C.**, 1992. Sequence alignment of the G protein-coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* **11**: 1 - 20
- Pumplin, D. W. und Reese, T. S.**, 1977. Action of brown widow spider venom and botulinum toxin on the frog neuromuscular junction examined with the freeze-fracture technique. *J. Physiol. (Lond.)* **273**: 443 - 457
- Rahman, M. A., Ashton, A. C., Meunier, F. A., Davletov, B. A., Dolly, J. O. und Ushkaryov, Y. A.**, 1999. Norepinephrine exocytosis stimulated by α -latrotoxin requires both external and stored Ca^{2+} and is mediated by latrophilin, G proteins and phospholipase C. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **354**: 379 - 386
- Raizen, D. M. und Avery, L.**, 1994. Electrical activity and behaviour in the pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* **12**: 483 - 495
- Rand, K. N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P. und Cobon, G. S.**, 1989. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 9657 - 9661
- Reagan, J. D.**, 1994. Expression cloning of an insect diuretic hormone receptor. A member of the calcitonin/secretin receptor family. *J. Biol. Chem.* **269**: 9 - 12
- Rechsteiner, M. und Rogers, S. W.**, 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 267 - 271
- Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S. und Lee, M. G.**, 1996. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *BioTechniques* **20**: 102 - 112
- Reid, M. S. und Bialeski, R. L.**, 1968. A simple apparatus for vertical flat-sheet polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **22**: 374 - 381
- Robello, M., Fresia, M., Maga, L., Grasso, A. und Ciani, S.**, 1987. Permeation of divalent cations through α -latrotoxin channels in lipid bilayers: steady-state current-voltage relationships. *J. Membr. Biol.* **95**: 55 - 62

- Rogers, S., Wells, R. und Rechsteiner, M.,** 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**: 364 - 368
- Rosenthal, L. und Meldolesi, J.,** 1989. Alpha-latrotoxin and related toxins. *Pharmacol. Ther.* **42**: 115 - 134
- Rosenthal, L., Zacchetti, D., Madeddu, L. und Meldolisi, J.,** 1990. Mode of action of α -latrotoxin: role of divalent cations in Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent effects mediated by the toxin. *Mol. Pharmacol.* **38**: 917 - 923
- Roswell, D. F. und White, E. H.,** 1978. The chemiluminescence of luminol and related hydrazides. *Methods Enzymol.* **57**: 409 - 423
- Sabirov, R. Z., Krasilnikov, O. V., Ternovsky, V. I. und Merzliak, P. G.,** 1993. Relation between ionic channel conductance and conductivity of media containing different nonelectrolytes. A novel method of pore size determination. *Gen. Physiol. Biophys.* **12**: 95 - 111
- Saeger, B.,** 1996. Molekulare Charakterisierung von cDNA-Klonen aus dem parasitischen Nematoden *Haemonchus contortus*. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.,** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, U.S.A.*
- Samson-Himmelstjerna, G. von, Harder, A., Schnieder, T., Kalbe, J. und Menke, N.,** 2000. Further *in vivo* studies on the new anthelmintic depsipeptide PF1022A. *Parasitol. Res.* **86**: 194 - 199
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.,** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463 - 5467
- Santoro, C., Mermod, N., Andrews, P. C. und Tijan, R.,** 1988. A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* **224**: 218 - 224
- Sasaki, T., Takagi, M., Yaguchi, T., Miyadoh, S., Okada, T. und Koyama, M.,** 1992. A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. *J. Antibiotics* **45**: 692 - 697
- Scherkenbeck, J., Harder, A., Plant, A. und Dyker, H.,** 1998. PF1022A - A novel anthelmintic Cyclooctadepsipeptide. Modification and exchange of the N-methyl leucine residues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**: 1035 - 1040
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., de Laureto, P. P., DasGupta, B. R. und Montecucco, C.,** 1992. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* **359**: 832 - 835
- Schipani, E., Karga, H., Karaplis, A. C., Potts, J. T. Jr., Kronenberg, H. M., Segre, G. V., Abou-Samra, A. B. und Jueppner, H.,** 1993. Identical complementary deoxyribonucleic acids encode a human renal and bone parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *Endocrinol.* **132**: 2157 - 2165
- Schlack, P. und Kumpf, W.,** 1926. Über eine neue Methode zur Ermittlung der Konstitution von Peptiden. *Z. Physiol. Chemie Hoppe-Seyler* **154**: 125 - 170
- Schmid, S. L. und Carter, L. L.,** 1990. ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells. *J. Cell Biol.* **111**: 2307 - 2318
- Schmidt, G.,** 1973. Giftspinnen - auch ein Problem des Ferntourismus. *Münch. Med. Wschr.* **115**: 2237 - 2242
- Schmitt-Wrede, H. P., Saeger, B., Blasum, H., Harder, A. und Wunderlich, W.,** 2000. Proto-type galectin from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. (eingereicht)

- Schneider, H., Feyen, J. H., Seuwen, K. und Movva, N. R.**, 1993. Cloning and functional expression of a human parathyroid hormone receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **246**: 149 – 155
- Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T. A., Seeburg, P. H. und Barnard, E. A.**, 1987. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* **328**: 221 - 227
- Segre, G. V. und Goldring, S. R.**, 1993. Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagonlike peptide 1, growth hormone-releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G protein-linked receptor family. *Trends Endocrinol. Met.* **4**: 309 - 314
- Shafer, T. J.**, 1998. Effects of Cd²⁺, Pb²⁺ and CH₃Hg⁺ on high voltage-activated calcium currents in pheochromocytoma (PC12) cells: potency, reversibility, interactions with extracellular Ca²⁺ and mechanisms of block. *Toxicol. Lett.* **99**: 207 - 221
- Shapiro, H. M.**, 1988. Cell sorting. In: Liss, A. R. (ed.). Practical flow cytometry. 2nd ed., Academic Press, New York, U.S.A.
- Sharon, N. und Lis, H.**, 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science* **246**: 227 - 234
- Shemyakin, M. M., Ovchinnikov, Y. A., Ivanov, V. T., Antonov, V. K., Vinogradova, E. I., Shkrob, A. M., Malenkov, G. G., Evstatov, A. V., Laine, I. A., Melnik, E. I. und Ryabova, I. D.**, 1969. Cyclodepsipeptides as chemical tools for studying ionic transport through membranes. *J. Membrane Biol.* **1**: 402 - 430
- Shimomura, O.**, 1979. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett.* **104**: 220 - 222
- Shoop, W. L.**, 1993. Ivermectin resistance. *Parasitol. Today* **9**: 154 - 159
- Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, A. und Huse, W. D.**, 1988. λ-ZAP: A bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7583 - 7599
- Silva, I. F. und Plasterk, R. H. A.**, 1990. Characterization of a G protein α-subunit gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **215**: 483 - 487
- Siomi, H. und Dreyfuss, G.**, 1997. RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr. Opin. Gen. & Dev.* **7**: 345 - 353
- Smallridge, R. C., Kiang, J. G., Gist, I. D., Fein, H. G. und Galloway, R. J.**, 1992. U-73122, an aminosteroid phospholipase C antagonist, noncompetitively inhibits thyrotropin-releasing hormone effects in GH₃ rat pituitary cells. *Endocrinology* **131**: 1883 – 1888
- Smith, T. F. und Waterman, M. S.**, 1981. Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* **147**: 195 - 197
- Smith, R. J., Sam, L. M., Justen, J. M., Bundy, G. L., Bala, G. A. und Bleasdale, J. E.**, 1990. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**: 688 – 697
- Stark, G., Ketterer, B., Benz, R. und Lauser, P.**, 1971. The rate constants of valinomycin-mediated ion transport through thin lipid membranes. *Biophys. J.* **11**: 981 - 994
- Stephenson, F. A.**, 1988. Understanding the GABA_A receptor: a chemically gated ion channel. *Biochem. J.* **249**: 21 - 32

- Storrie, B. und Desjardins, M.**, 1996. The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *BioEssays* **18**: 895 - 903
- Sudol, M.**, 1996. Structure and function of the WW domain. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **65**: 113 - 132
- Sugita, S., Ichtchenko, K., Khvotchev, M. und Südhof, T. C.**, 1998. α -latrotoxin receptor C1RL / latrophilin 1 (CL1) defines an unusual family of ubiquitous G protein-linked receptors. *J. Biol. Chem.* **273**: 32715 - 32724
- Surkova, I.**, 1994. Can exocytosis induced by α -latrotoxin be explained solely by its channel-forming activity? *Ann. NY Acad. Sci.* **710**: 48 - 64
- Sutherland, I. H. und Campbell, W. C.**, 1990. Development, pharmacokinetics and mode of action of ivermectin. *Acta Leidensia* **59**: 161 - 168
- Svoboda, M., Tastenoy, M., van Rampelbergh, J., Goossens, J. F., DeNeef, P., Waelbroeck, M. und Robberecht, P.**, 1994. Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**: 1617 - 1624
- Swanson, M. S.**, 1995. Functions of nuclear pre-mRNA/mRNA binding proteins. In: Lammond, A. I. (ed.). Pre-mRNA processing, *Springer-Verlag, Heidelberg*: 17 - 33
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. und Numa, S.**, 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**: 313 - 318
- Tarasova, N. I., Stauber, R. H., Choi, J. K., Hudson, E. A., Czerwinski, G., Miller, J. L. und Pavlakis, G. N.**, 1997. Visualization of G protein-coupled receptor trafficking with the aid of the green fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* **272**: 14817 - 14824
- Taylor, C. W. und Marshall, I. C. B.**, 1992. Calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: a complex relationship. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 403 - 407
- Terada, M.**, 1992. Neuropharmacological mechanism of action of PF1022A, an antinematode anthelmintic with a new structure of cyclic depsipeptide, on *Angiostrongylus cantonensis* and isolated frog rectus. *Jpn. J. Parasitol.* **41**: 108 - 117
- Terada, M., Ishii, A. I., Dharejo, A. M., Hayashi, M. und Sano, M.**, 1987. Studies on chemotherapy of parasitic helminths. *In vivo* efficacy of milbemycin D against larval stages of *Angiostrongylus cantonensis* and *Angiostrongylus costaricensis*. *Jpn. J. Parasitol.* **36**: 24 - 29
- Terada, M., Ishii, A., Tungtrongchitr, A., Sano, M. und Shomura, T.**, 1993. Effects of PF1022A on developing larvae of *Angiostrongylus costaricensis* in mice, with special reference to route, dose and formulation. *Jpn. J. Parasitol.* **42**: 199 - 210
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. und Dawson, A. P.**, 1990. Thapsigargin, a tumor promoter discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 2466 - 2470
- Thompson, A. K., Mostafapour, S. P., Denlinger, L. C., Bleasdale, J. E. und Fisher, S. K.**, 1991. The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. A role for Gp in receptor compartmentation. *J. Biol. Chem.* **266**: 23856 - 23862
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J.**, 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673 - 4680

- Thorp, R. W. und Woodson, W. D.**, 1945. Black Widow, America's most poisonous spider. *Univ. North Carolina Press, Chapel Hill, U.S.A.*
- Toselli, M., Tosetti, P. und Taglietti, V.**, 1999. Kinetic study of N-type calcium current modulation by delta-opioid receptor activation in the mammalian cell line NG108-15. *Biophys. J.* **76**: 2560 - 2574
- Tu, A. T.**, 1984. Handbook of natural toxins, Vol. 2.: Insect poisons, allergens, and other invertebrate venoms, *Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A.*
- Tzeng, M. C. und Siekevitz, P.**, 1978. The effect of the purified major protein factor (α -Latrotoxin) of black widow spider venom on the release of acetylcholine and norepinephrine from mouse cerebral cortex. *Brain Res.* **139**: 190 - 196
- Usdin, T. B., Bonner, T. I. und Mezey, E.**, 1994. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinol.* **135**: 2662 - 2680
- Ushkaryov, Y. A., Petrenko, A. G., Geppert, M. und Südhof, T. C.**, 1992. Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the α -latrotoxin receptor and laminin. *Science* **257**: 50 - 56
- Valtorta, F., Madeddu, L., Meldolesi, J. und Ceccarelli, B.**, 1984. Specific localization of the α -latrotoxin receptor in the nerve terminal plasma membrane. *J. Cell Biol.* **99**: 124 - 132
- Vicentini, L. M. und Meldolesi, J.**, 1984. alpha-latrotoxin of black widow spider venom binds to a specific receptor coupled to phosphoinositide breakdown in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **121**: 538 - 544
- Vita, N., Laurent, P., Lefort, S., Chalon, P., Lelias, J.-M., Kaghad, M., Le Fur, G., Caput, D. und Ferrara, P.**, 1993. Primary structure, functional expression of mouse, pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. *FEBS Lett.* **335**: 1 - 5
- Vogelstein, B. und Gillespie, D.**, 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 615 - 619
- Wakelin, D.**, 1985. Genetic control of immunity to helminth infections. *Parasitol. Today* **1**: 17 - 23
- Waller, P. J.**, 1997. Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* **72**: 391 - 412
- Waller, P. J.**, 1999. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *Int. J. Parasitol.* **29**: 155 - 164
- Walsh, J. A.**, 1984. Tropical and Geographical Medicine. In: Warren, K. J. S und Mahmoud, A. A. F. (eds.). *Mc Graw-Hill, New York, U.S.A.*: 1073 - 1085
- Wang, M., Watanabe, N., Shomura, T. und Ohtomo, H.**, 1994. Effects of PF1022A from *Mycelia sterilia* on *Trichinella spiralis* in mice. *Jpn. J. Parasitol.* **43**: 346 - 350
- Wanke, E., Ferroni, A., Gattanini, P. und Meldolesi, I.**, 1986. α -latrotoxin of the black widow spider venom opens a small, non-closing cation channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**: 320 - 325
- Wattiaux, R. und Wattiaux-De Coninck, S.**, 1996. Lysosome pharmacology and toxicology. *Subcell. Biochem.* **27**: 387 - 409
- Wei, Y. und Mojsov, S.**, 1996. Tissue specific expression of different human receptor types for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide: implications for their role in human physiology. *J. Neuroendocrinol.* **8**: 811 - 817
- Weiss, R. H.**, 1998. G protein-coupled receptor signalling in the kidney. *Cell. Signal* **10**: 313 - 320

- Willadsen, P., Riding, G. A., McKenna, R. V., Kemp, D. H., Tellam, R. L., Nielson, J. N., Lahnstein, J., Cobon, G. S. und Gough, J. M., 1989. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J. Immunol.* **143**: 1346 - 1351
- Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., Coulson, A., Craxton, M., Dear, S., Du, Z., Durbin, R., Favello, A., Fulton, L., Gardner, A., Green, P., Hawkins, T., Hillier, L., Jier, M., Johnston, L., Jones, M., Kershaw, J., Kirsten, J., Laister, N., Latreille, P., Lightning, J., Lloyd, C., McMurray, A., Mortimore, B., O'Callaghan, M., Parsons, J., Percy, C., Rifken, L., Ropra, A., Saunders, D., Shownkeen, R., Smaldon, N., Smith, A., Sonnhammer, E., Staden, R., Sulston, J., Thierry-Mieg, J., Thomas, K., Vaudin, M., Vaughan, K., Waterston, R., Watson, A., Weinstock, L., Wilkinson-Sproat, J. und Wohldman, P., 1994. 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* **368**: 32 - 38
- Weng, Z., Thomas, S. M., Rickles, R. J., Taylor, J. A., Brauer, A. W., Seidel-Dugan, C., Michael, W. M., Dreyfuss, G. und Brugge, J. S., 1994. Identification of Src, Fyn and Lyn SH3-binding proteins: Implication for a function of SH3 domains. *Mol. Cell Biol.* **14**: 4509 - 4521
- Wollheim, C. B., Lang, J. und Regazzi, R., 1996. Regulation of exocytosis by calcium and G proteins. *Diabetes Rev.* **4**: 277 - 297
- Yamin, M., Gorn, A. H., Flannery, M. R., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Tapp, D. R., Krane, S. M. und Goldring, S. R., 1994. Cloning and characterization of a mouse brain calcitonin receptor complementary deoxyribonucleic acid and mapping of the calcitonin receptor gene. *Endocrinol.* **135**: 2635 - 1643
- Yang, F., Moss, L. G. und Phillips, G. N. Jr., 1996a. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnol.* **14**: 1246 - 1251
- Yang, T. T., Cheng, L. Z. und Kain, S. R., 1996b. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acid Res.* **24**: 4592 - 4593
- Yokoe, H. und Anholt, R. R. H., 1993. Molecular cloning of olfactomedin, an extracellular matrix protein specific to olfactory neuroepithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 4655 - 4659
- Yu, S. S., Lefkowitz, R. J. und Hausdorff, W. P., 1993. β -adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **268**: 337 - 341
- Yu, H., Chen, J. K., Feng, S., Dalgarno, D. C., Brauer, A. W. und Schreiber, S. L., 1994. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**: 933 - 945
- Zahner, H. und Schares, G., 1993. Experimental chemotherapy of filariasis: comparative evaluation of the efficacy of filaricidal compounds in *Mastomys coucha* infected with *Litomosoides carinii*, *Acanthocheilonema viteae*, *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Acta Tropica* **52**: 211 - 266
- Zahner, H., Taubert, A., Harder, A. und Samson-Himmelstjerna, G. von, 2000a. Filaricidal efficacy of members of anthelmintically active cyclodepsipeptides. (eingereicht)
- Zahner, H., Taubert, A., Harder, A. und Samson-Himmelstjerna, G. von, 2000b. Effects of BAY44-4400, a new cyclodepsipeptide, on developing stages of filariae (*Acanthocheilonema viteae*, *Brugia malayi*, *Litomosoides sigmodontis*) in the rodent *Mastomys coucha*. (eingereicht)
- Zastrow, von M. und Kobilka, B. K., 1992. Ligand-regulated internalization and recycling of human β_2 -adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J. Biol. Chem.* **267**: 3530 - 3538

Zastrow, von M. und Kobilka, B. K., 1994. Antagonist-dependent and -independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalizaion. *J. Biol. Chem.* **269**: 18448 - 18452

Zhang, Y., Chou, J. H., Bradley, J., Bargmann, C. I. und Zinn, K., 1997. The *Caenorhabditis elegans* seven-transmembrane protein ODR-10 functions as an odorant receptor in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 12162 – 12167

7 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Beate Saeger
Geburtsdatum: 16.11.1971
Geburtsort: Düsseldorf
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08 / 78 - 07 / 82 Theodor-Heuss-Grundschule, Werstener Friedhofstraße,
Düsseldorf
08 / 82 - 06 / 91 Schloßgymnasium Benrath, Wimpfener Straße,
Düsseldorf; Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10 / 91 - 12 / 96 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf; Abschluß: Diplom
seit 01 / 97 Promotionsstudium im Institut für Molekulare
Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf