

**Der Latrophilin-ähnliche Rezeptor HC110-R aus
Haemonchus contortus:
Charakterisierung von Rezeptor-Liganden-Interaktionen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Stefanie Mühlfeld
aus Moers

Düsseldorf, August 2007

Aus der Abteilung für Molekulare Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Koreferent: Prof. Dr. Dr. A. Harder

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Latrophiline	9
1.2 Das Anthelminthikum Emodepsid als Ligand des Rezeptors HC110-R	16
1.3 Neuropeptide in Nematoden	18
1.4 Zielsetzung	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien, Enzyme und ‚Reaktionskits‘	25
2.2 Lösungen und Puffer	27
2.3 Medien und Zusätze	30
2.3.1 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	30
2.3.2 Medien zur Anzucht von <i>C. elegans</i>	30
2.3.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur	30
2.4 Versuchstiere	31
2.4.1 Kultivierung von <i>C. elegans</i>	31
2.4.2 Ernten von <i>C. elegans</i> -Flüssigkulturen	31
2.5 Bakterien- und Zellkulturstämme	32
2.5.1 <i>E. coli</i> -Stämme	32
2.5.2 Zellkulturstämme	32
2.6 Oligonukleotide und Plasmide	33
2.6.1 Synthetische Oligonukleotide	33
2.6.2 Plasmide	33
2.7 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren	33
2.7.1 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
2.7.2 Kryokonservierung von Bakterienstämmen	34
2.7.3 Enzymatische Modifikation von DNA	34
2.7.4 Elektrophorese von DNA	34
2.7.5 Isolierung von DNA-Fragmenten und Plasmiden aus Agarosegelen	34
2.7.6 Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren	35
2.7.7 Präzipitation von DNA	35
2.7.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.7.9 Klonierung von PCR-Fragmenten	35
2.7.10 Transformation von <i>E. coli</i>	36
2.7.11 DNA-Sequenzanalyse	36
2.7.12 Computeranalyse von Sequenzdaten	37
2.8 Analyse von Proteinen	37
2.8.1 Antikörper, Liganden und Neuropeptide	37
2.8.2 Proteinextrakte aus <i>C. elegans</i>	38
2.8.3 Proteinextrakte aus <i>E. coli</i>	38
2.8.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	38
2.8.5 Entsalzung, Umpufferung und Konzentrierung von Proteinen	39
2.8.6 Präzipitation von Proteinen	40
2.8.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.8.8 Färbung von Polyacrylamidgelen	42
2.8.9 Renaturierung von Proteinen	43
2.8.10 Isoelektrische Fokussierung	43
2.8.11 Massenspektroskopische Analyse von Proteinen	43
2.8.12 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen	44
2.8.13 Färbung von Nitrozellulosemembranen	44
2.8.14 Immundetektion	44
2.8.15 Bindungsexperimente an Nitrozellulosemembranen	45
2.8.16 Kopplung von Proteinen an Magnetpartikel	45
2.8.17 Bindungsexperimente an Magnetpartikeln	46

2.8.18	„Reversed Phase“-HPLC.....	47
2.9	Heterologe Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	47
2.9.1	Expression der Fusionsproteine der Klone pASK4-HCΔ22-535 und pASK44-HCΔ22-535	47
2.9.2	Expression der Fusionsproteine der Klone pRSET-HCΔ1-445 und pRSET-HCΔ797-986	48
2.9.3	Expression des Fusionsproteins des Klons pET-DAFΔ1-702	48
2.9.4	Zellaufschluss der Expressionskulturen	48
2.9.5	Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatographie.....	49
2.9.6	Proteinaufreinigung durch Metallaffinitätschromatographie (IMAC)	49
2.10	Heterologe Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen	50
2.10.1	Auftauen von HEK-293-Zellen	50
2.10.2	Kultivierung von HEK-293-Zellen.....	50
2.10.3	Kryokonservierung von HEK-293-Zellen	50
2.10.4	Detektion des HC110-R-Fusionsproteins in HEK-293-Zellen mittels Immunfluoreszenz.....	51
2.10.5	Konfokale „Laserscanning“-Mikroskopie.....	51
2.11	Fluoreszenzspektroskopie	51
2.12	Bindungsanalysen mittels eines Oberflächenplasmonresonanz-Biosensors (BIAcore)	53
2.12.1	Aminkopplung des Fusionsproteins des Klons pRSET-HCΔ1-445 an einen CM5-Chip.....	55
2.12.2	Bindungsanalysen mit Neuropeptiden.....	55
2.12.3	Bindungsanalysen mit dem Fusionsprotein des Klons pET-DAFΔ1-702.....	56
2.12.4	Auswertung der Bindungsanalysen	56
3.	Ergebnisse	59
3.1	Heterologe Expression von HC110-R in <i>E. coli</i>	59
3.2	Ligandenscreening des Rezeptors HC110-R mit <i>C. elegans</i> -Proteinextrakt.....	62
3.2.1	Bindungsexperimente an Nitrozellulosemembranen.....	63
3.2.2	2D-Bindungsexperimente und Massenspektrometrie.....	64
3.2.3	Bindungsexperimente an Magnetpartikeln.....	66
3.3	Heterologe Expression von Daf-21 in <i>E. coli</i>	66
3.3.1	Daf-21 als potentieller Ligand des Rezeptors HC110-R.....	67
3.4	Potentielle Liganden des Rezeptors HC110-R.....	69
3.4.1	Kopplungseffizienz des HC110-R Fusionsproteins an den CM5-Sensorchip.....	69
3.4.2	Bindung der Neuropeptide PF1, PF2, AF11 (<i>flp-1</i>)	70
3.4.3	Bindung des Neuropeptids AF5 (<i>flp-4</i>)	74
3.4.4	Bindung des Neuropeptids PF3 (<i>flp-6</i>).....	76
3.4.5	Bindung des Neuropeptids AF1 (<i>flp-8</i>)	79
3.4.6	Bindung des Neuropeptids AF19 (<i>flp-13</i>) und des synthetischen Kontrollpeptids AF19random ..	82
3.4.7	Bindung des Neuropeptids AF2 (<i>flp-14</i>)	84
3.4.8	Bindung der Neuropeptide AF4, AF10, AF12 (<i>flp-18</i>)	85
3.4.9	Vergleich der Bindungsgrenzen der Neuropeptide	91
3.4.10	Bindung von Daf-21	94
3.5	Liganden-induzierte Ca ²⁺ -Ausschüttung in stabil HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen	95
3.5.1	HC110-R vermittelte α-LTX Signaltransduktion	96
3.5.2	Funktionelle Analysen verschiedener Neuropeptide.....	98
3.5.3	Einfluss verschiedener Neuropeptide auf die HC110-R vermittelte α-LTX-Signaltransduktion ..	100
3.5.4	Funktionelle Analysen von Daf-21	107
4.	Diskussion.....	110
4.1	Neuropeptide der <i>flp</i> -Familie als potentielle, native Liganden von HC110-R.....	111
4.1.1	Kinetik der Interaktionen zwischen Neuropeptiden und HC110-R.....	113
4.1.2	Neuropeptide und die α-LTX-induzierte HC110-R-vermittelte Ca ²⁺ -Signaltransduktion	118
4.2	Wechselwirkungen von <i>C. elegans</i> -Proteinen mit HC110-R.....	125
4.2.1	Daf-21 als potentieller Interaktionspartner von HC110-R	126
4.3	Ausblick	131
5.	Zusammenfassung	133

6.	Abstract	134
7.	Literaturverzeichnis	135
8.	Abkürzungsverzeichnis	146
9.	Anhang	148
9.1	Theorie kinetischer Bindungen	148

1. Einleitung

Das hoch wirksame Breitspektrum-Anthelminthikum Emodepsid, aus der Klasse der zyklischen Octadepsipeptide, ein natürliches Produkt mit niedriger Toxizität für Tiere (Jeschke *et al.*, 2005), ist wirksam gegen eine Vielzahl von gastrointestinalen Nematoden (Harder *et al.*, 2005). Schon vor einigen Jahren konnte der orphan Rezeptor HC110-R (Saeger *et al.*, 2001) als ‚Target‘ des Medikaments identifiziert und charakterisiert werden. Dabei handelt es sich um einen präsynaptischen Latrophilin-ähnlichen Rezeptor aus dem parasitischen Nematoden *Haemonchus contortus*. Aufgrund seiner strukturellen Merkmale ist er nach Kristiansen (2004) der Unterfamilie B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zuzuordnen. Ungefähr 30 % aller Medikamente auf dem Markt entfalten ihre Wirkung über GPCR. Historisch bildet diese Klasse von Proteinen somit die erfolgreichste Familie therapeutischer Angriffspunkte. Die Analyse des humanen Genoms führte zur Identifizierung einer großen Anzahl neuer Mitglieder mit unbekannter physiologischer Funktion, die nun im Fokus verschiedener Programme zur Entwicklung neuer Medikamente stehen. Moderne Ansätze zur Identifizierung neuer, gegen GPCR gerichteter Medikamente, schließen das Design kombinatorischer Bibliotheken, strukturelle Biologie, molekulare Informatik und fortschrittliche ‚Screening‘-Technologien mit ein. Auf diese Weise werden neue Komponenten identifiziert, die GPCR-spezifisch inhibieren oder aktivieren. Zusätzlich eröffnet auch die Grundlagenforschung Perspektiven zur Entwicklung neuer Medikamente. Mechanismen der Signalweiterleitung und Regulation der GPCR führen zur Entdeckung neuer, mit GPCR interagierender, Proteine. Eine Schlüsselrolle spielt zudem die Identifizierung nativer Liganden von bisher orphanen Rezeptoren in der reversen molekularen Pharmakologie. Die Identifizierung von Rezeptor-Agonisten führt meist zu einer schnellen Aufklärung der physiologischen Rolle beider Partner. Strategien zur Identifizierung nativer Liganden orphaner GPCR beruhen auf biologischen ‚Screenings‘ mit in spezifischen rekombinanten Expressionssystemen (z.B. immortalisierte Säugerzellen oder Hefen) exprimierten orphanen Rezeptoren (Jacoby *et al.*, 2006).

Die GPCR bilden eine Familie integraler Membranproteine mit hunderten von verschiedenen Rezeptoren. Darunter befinden sich Rezeptoren für alle Arten chemischer Botenstoffe, wie beispielsweise die Schlüsselmoleküle der sensorischen Systeme, bioaktive Amine, Peptidhormone, Neurotransmitter und sogar Proteine (Eckard, 2000). Sie bilden die größte Familie von Membranrezeptoren mit der größten Diversität (Joost und Methner, 2002). Ihre Dysfunktion führt beim Menschen zu Krankheiten. Mitglieder dieser Familie teilen eine gemeinsame Membrantopologie. Sie besitzen einen extrazellulären, NH₂-terminalen Bereich, sieben mit Schleifenregionen verbundene Transmembranhelices und einen cytoplasmatischen C-terminalen Bereich. Nicht alle Rezeptoren dieser Familie benutzen heterotrimere G-Proteine zur Signalweiterleitung. Einige besitzen zusätzlich cytoplasmatische Proteine als Überträger. Aus diesem Grund bevorzugen manche Autoren andere Bezeichnungen für diese Familie der Rezeptoren, wie z.B. 7-Transmembranrezeptoren oder heptahelikale Rezeptoren. Eine Unterteilung der Familie erfolgte anhand ihrer nativen Liganden, phylogenetischer

Analysen ihrer Aminosäuresequenzen, ‚Cluster‘-Analysen der Gene des humanen Genoms sowie der Analyse globulärer Domänen und Motiven in den NH₂-terminalen Bereichen. Kolakowski bildete 1994 sechs Unterfamilien mit einer jeweils mehr als 20%igen Identität der Aminosäuresequenzen der sieben Transmembrandomänen. In Metazoen existieren nur drei dieser sechs Unterfamilien (A, B und C). Mittlerweile sind zusätzlich noch weitere Unterfamilien in Säugetieren identifiziert worden, wie beispielsweise die LBN-7TM-Rezeptoren (Kristiansen, 2004).

Die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor führt zur Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins. Dieses steht mit einem aktivierenden oder inhibierenden Signalweg eines sekundären Botenstoffs in Verbindung. Es kommt zu einer Änderung der Konzentration dieses Botenstoffs, die zu weiteren Effektormechanismen innerhalb des Signalweges führt. Häufig handelt es sich hierbei um die Aktivierung von Proteinkinasen. In vielen Fällen kann ein einzelner Rezeptor mehrere G-Proteine aktivieren und auf diese Weise verschiedene Signalwege induzieren. Andererseits können jedoch auch mehrere Rezeptoren ein G-Protein steuern, welches in der Lage ist, mehrere Signale zu generieren. Stimulation eines einzelnen GPCR kann zudem nach der Aktivierung eines einzelnen Signalweges zu einer Interaktion mit Signalwegen anderer GPCR führen (Liebmann und Böhmer, 2000). Alle heterotrimeren G-Proteine folgen prinzipiell demselben Aktivierungs-/Deaktivierungszyklus und erlauben auf diese Weise eine reversible und spezifische Signalweiterleitung ins Innere einer Zelle. In GDP-gebundener Form bildet die α -Untereinheit eines G-Proteins ein inaktives Heterotrimer mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit. In Anwesenheit der $\beta\gamma$ -Untereinheit bindet die GDP-gebundene α -Untereinheit mit erhöhter Affinität an den Rezeptor. Durch Bindung eines Agonisten kommt es zur Aktivierung des Rezeptors und dadurch zu einer Konformationsänderung. Diese erhöht die Affinität des Rezeptors zu dem G-Protein und führt dadurch zu einer schnellen Freisetzung des GDP von seiner Bindungsstelle an der α -Untereinheit. Unter physiologischen Bedingungen wird das GDP sofort durch GTP ersetzt, da dieses in höherer Konzentration vorliegt. Es kommt nun durch diesen Austausch zu einer erniedrigten Affinität der α -Untereinheit zum $\beta\gamma$ -Komplex und einer funktionalen Dissoziation des Heterotrimers. Die dissoziierten Untereinheiten können nun eine Reihe von Effektorproteinen aktivieren oder inhibieren. Zu diesen Effektorproteinen gehören z.B. AC1-9, Phospholipase C β 1-4 (PLC β 1-4), Phospholipase A₂, Tyrosinkinasen, Phosphodiesterasen (PDE), Phosphoinosit-3-Kinasen (PI₃K), GPCR-Kinasen (GRK), Ionenkanäle, Phosducin und Moleküle des Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Signalweges (MAPK). Sie führen zu einer Vielfalt von zellulären Funktionen. Einige werden direkt durch eine G-Protein-Untereinheit aktiviert, andere Effektoren hingegen werden weiter unten in der Signalkaskade durch spezifische sekundäre Botenstoffe aktiviert oder inhibiert. Der aktivierte Zustand hält an, bis durch eine intrinsische GTPase der α -Untereinheit GTP zu GDP hydrolysiert wird. Auch GTPase aktivierende Proteine (GAP) können die G-Proteine inaktivieren. Sobald GTP zu GDP umgesetzt ist, assoziieren die α -Untereinheit und der $\beta\gamma$ -Komplex wieder zu einem inaktiven Heterotrimer. Die Effektoren, die als GAP fungieren, sind cGMP, PDE und PLC β . Einige Regulatoren der G-Protein-Signalgebung (RGS) wurden als GAP für die α -Untereinheit der G_i-Proteine

nachgewiesen. Neben der G-Protein-Inhibierung können einige von ihnen auch die G-Protein-Aktivierung verstärken, als Effektoren fungieren oder als Gerüstproteine Rezeptoren, G-Proteine, Effektoren oder andere regulierende Proteine zusammenführen. Auch Desensibilisierung, Wiederaufnahme von Neurotransmittern oder ihren Vorläufern in die Nervenendigungen mittels Transporterproteinen (z.B. Dopamin, Serotonin, Norepinephrin, GABA und der Glutamattransporter) und extrazelluläre Degradierungen (z.B. von Acetylcholin durch die Acetylcholinesterase oder von Neuropeptiden durch Zelloberflächenproteasen) sowie andere Prozesse spielen eine Rolle, um den Signalweg wieder abzuschalten (Kristiansen, 2004).

1.1 Latrophiline

Der GPCR Latrophilin wird auch als C_{IRL} (Ca²⁺- Independent Receptor of α-Latrotoxin) bezeichnet. Er wurde ursprünglich durch Affinitätschromatographie aus einem Säugerhirn isoliert (Davletov *et al.*, 1996). In Säugetieren existieren zwei weitere bekannte Isoformen des Latrophilins: Latrophilin-2 und Latrophilin-3. Während Latrophilin-3, ähnlich wie Latrophilin-1, vorwiegend im Gehirn lokalisiert ist, findet man Latrophilin-2 in verschiedenen Geweben, wie beispielsweise der Placenta, der Niere, der Milz, den Ovarien, dem Herzen und der Lunge (Matsushita *et al.*, 1999). Die Latrophiline sind an der Exocytose endogener Hormone und Neuropeptide beteiligt (Holz und Habener, 1998). Eine weitere Rolle scheinen sie als physiologische Regulatoren der Sekretion von beispielsweise Catecholamin und hGH (‘human Growth Hormone’) aus chromaffinen Zellen zu spielen (Bittner *et al.*, 1998; Ichtchenko *et al.*, 1999). Der Latrophilin-Rezeptor hat ein Molekulargewicht von 210 kDa und wird posttranslational 18 Aminosäuren vor der ersten Transmembrandomäne in zwei Untereinheiten gespalten (Lelianova *et al.*, 1997). Die proteolytische Prozessierung des Vorläuferproteins erfolgt im endoplasmatischen Retikulum und ist konstitutiv und somit nicht, wie im Fall der Protease-aktivierten GPCR, durch einen Agonisten induziert. Die Schnittstelle ist in einer Cystein- und Tryptophan-reichen Region des NH₂-terminalen Bereichs lokalisiert. Sie wird auch als GPS (‘G protein-coupled receptor Proteolysis Site’) bezeichnet (Krasnoperov *et al.*, 2002b). Die p120-Untereinheit beinhaltet den extrazellulären, hydrophilen NH₂-Terminus des Rezeptors, die p85-Untereinheit die 7 Transmembrandomänen und den intrazellulären C-Terminus des Latrophilins (Krasnoperov *et al.*, 1999). Bei dem Latrophilin-Rezeptor handelt es sich um ein Hybridmolekül zwischen einem Zell-Adhäsionsmolekül (p120-Untereinheit) und einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (p85-Untereinheit), zur Übertragung von Zellkontakten in intrazelluläre Signale (Krasnoperov *et al.*, 2002b). Eine Bindung des α-Latrotoxins an den NH₂-terminalen, extrazellulären Teil des Latrophilins konnte nachgewiesen werden (Krasnoperov *et al.*, 1997). Bisher ist der Grund für die intrazelluläre Spaltung des Rezeptors und die hypothetisch konstante Interaktion der Fragmente an der Zelloberfläche noch ungeklärt. Die Spaltung des Rezeptors scheint für den Transport an die Oberfläche notwendig zu sein. Auch wenn beide Fragmente im Falle einer Solubilisierung fest assoziiert vorliegen, verhalten sie sich an der Zelloberfläche wie zwei unabhängige Proteine. Die Bindung eines Agonisten an die p120-

Untereinheit induziert die Reassoziierung der Fragmente und ruft eine Signalweiterleitung über die p85-Untereinheit hervor (Volynski *et al.*, 2004).

Die Hauptkomponente des Giftes der Schwarzen Witwe (*Latrodectus spec.*), α -Latrotoxin (α -LTX), ein Mitglied der Latrotoxine, bindet als artifizieller Ligand an die Latrophiline der Säugetiere (Krasnoperov *et al.*, 1997; Lelianova *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2005). Die Latrotoxine wurden in den letzten 30 Jahren zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Neurosekretion in Vertebraten, Insekten und Crustaceen verwendet (Ushkaryov *et al.*, 2004). Bei α -Latrotoxin handelt es sich um ein Vertebraten-spezifisches Neurotoxin mit einem Molekulargewicht von 130 kDa (Rahman *et al.*, 1999). Seine LD₅₀ in Mäusen beträgt 20 bis 40 μ g/kg Körpergewicht (Ushkarev und Grishin, 1986). Alle Latrotoxine wirken ausschließlich auf neuronale Zellen (Ushkaryov *et al.* 2004). In nicht-neuronalen Geweben aus Säugetieren (Meldolesi, 1982; Ushkarev und Grishin, 1986) oder Zellkulturen (Davletov *et al.*, 1998; Volynski *et al.*, 2000) kommt es in biologisch aktiver Konzentration jedoch zu keiner Bindung. In α -Latrotoxin konnten, ähnlich wie bei den anderen Latrotoxinen, vier Domänen identifiziert werden (Kiyatkin *et al.*, 1990, 1993). Das Vorläuferprotein beginnt mit einer kurzen hydrophilen Sequenz und einer Ansammlung von basischen Aminosäuren, ähnlich der Erkennungsstelle von Furin. Furin ist ein Subtilisin-ähnliches, proteolytisches Enzym, das in die Prozessierung vieler Proteinvorläufer involviert ist. Bei der Aktivierung von α -LTX hydrolysiert eine Furin-ähnliche Protease das Vorläuferprotein (Volynski *et al.*, 1999). Massenspektroskopische Analysen konnten zudem die posttranslationale Abspaltung einer relativ kurzen C-terminalen Region nachweisen (Dulubova *et al.*, 1996). Auch hier wurden potentielle Bindungsstellen für Furin-ähnliche Proteasen identifiziert (Ushkaryov *et al.*, 2004). Das fertige Protein besteht aus einer konservierten NH₂-terminalen Region mit 3 invarianten Cystein-Resten und einer Domäne mit 22 Ankyrin-ähnlichen Wiederholungen, die C-terminal zwei Drittel des Proteins ausmachen (Dulubova *et al.*, 1996; Ushkaryov *et al.*, 2004).

Es existieren zwei oligomere Formen von α -LTX. In EDTA formt es Dimere, in Anwesenheit von divalenten Kationen oder amphipatischen Molekülen Tetramere (Orlova *et al.*, 2000; Ushkaryov *et al.*, 2004). Die Bildung von Dimeren verleiht dem Protein mehr Stabilität. Verantwortlich hierfür sind wahrscheinlich die C-terminalen Ankyrin-, 'Repeats', da bekannt ist, dass diese Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Ushkaryov *et al.*, 2004). Die Tetramere repräsentieren hingegen die aktive Form des α -Latrotoxins. Sie besitzen einen axialen Kanal und können mit der hydrophoben Unterseite in die Membran inserieren. Auf diese Weise kommt es zur Bildung von Kationenkanälen (Orlova *et al.*, 2000). In Abwesenheit von Zelloberflächenrezeptoren ist die Porenbildung von hochreinem α -LTX jedoch nur sehr ineffizient. Nur Konzentrationen weit über der normalen aktiven Konzentration führen zur Insertion in die Membran (Volynski *et al.*, 2000). Durch die Bindung an Membranproteine, die in der Lage sind, mit dem Toxin zu interagieren, kann die Porenbildung unterstützt werden. Dies kann durch die starke Erhöhung der Konzentration in der Nähe der Membran oder die Ausrichtung der Tetramere erklärt werden (Volynski *et al.*, 2000; Hlubek *et al.*, 2000; Van Renterghem *et al.*, 2000). Zu einer α -LTX-bedingten

Exocytose kommt es nur durch Bindung an neuronale Rezeptoren (Ushkaryov *et al.*, 2004). α -LTX interagiert mit drei strukturell sehr unterschiedliche und funktionell unabhängige Rezeptoren: Neurexin1 α , die Protein-Tyrosin Phosphatase- σ und Latrophilin. Zwischen ihren Sequenzen kann keine offensichtliche Homologie festgestellt werden. Ihre funktionalen und strukturellen Charakteristika weisen darauf hin, dass sie eine Familie neuronaler Membranrezeptoren darstellen, die als Regulatoren von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen wirken (Krasnoperov *et al.*, 2002a). Mittels Gendelektionsexperimenten wurde die Funktion und relative Rolle der drei Rezeptoren von Tobaben *et al.* (2002) untersucht. Versuche mit ‚Knockout‘-Mäusen, denen sowohl die Gene für Latrophilin-1 als auch Neurexin1 α fehlten, zeigten, dass es sich bei diesen beiden Rezeptoren um die Hauptrezeptoren für α -LTX im Gehirn handeln muss. α -LTX zeigte in den doppelten ‚Knockout‘-Mäusen nur noch eine minimale Aktivität. Diese Restaktivität kann jedoch nicht alleine auf die Protein-Tyrosin Phosphatase- σ zurückgeführt werden, sondern zudem noch auf die Rezeptoren Latrophilin-2 und 3 sowie die Neurexine I β , II α , II β , III α und III β .

Neurexin1 α gehört zu einer großen Familie von Zell-Adhäsionsproteinen (Ushkaryov *et al.*, 1992). Es hat eine einzelne Transmembrandomäne und eine große extrazelluläre Region, die sechs Laminin G- und drei EGF (‚Epidermal Growth Factor‘)-Domänen aufweist (Volynski *et al.*, 2000). Basierend auf seinen Laminin G-Domänen und seiner Lokalisation wurde die Beteiligung an transsynaptischen Interaktionen postuliert. Zusätzlich ist bekannt, dass Neurexin1 α mit Synaptotagmin und Neurexophilin interagiert (Hlubek *et al.*, 2003). Neurexine sind, bedingt durch extensives alternatives Spleißen und zwei verschiedene Promotoren, sehr polymorph. Jedes der drei Neurexin-Gene generiert nicht nur α -Neurexine, sondern auch β -Neurexine, die einen eigenständigen NH₂-Terminus, aber die gleiche C-terminale Sequenz wie die α -Neurexine aufweisen. α -LTX bindet Neurexin1 α mit hoher Affinität, jedoch nur in Anwesenheit mikromolarer Konzentrationen von Ca²⁺. An Neurexin gebundenes α -LTX löst sich durch Entfernung des Ca²⁺ vom Rezeptor, während es jedoch weiter in der Membran inseriert bleibt (Volynski *et al.*, 2000). Mit rekombinantem Neurexin1 α konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors erfolgt und reversibel ist (Davletov *et al.*, 1995).

Ein weiterer funktioneller Rezeptor des α -LTX ist die Protein-Tyrosin Phosphatase- σ (PTP- σ). Genetische Studien an Maus und *Drosophila melanogaster* identifizierten die PTP- σ als ein Protein, das für die neuronale Entwicklung und die Wegfindung der Axone essentiell ist. α -Latrotoxin bindet Ca²⁺-unabhängig an die extrazelluläre Domäne, die eine Zell-Adhäsions-Domäne darstellt. Diese Bindung führt zur Ausschüttung von Neurotransmittern. Die intrazellulären katalytischen Domänen des Rezeptors sind jedoch für Bindung und Stimulation der Exocytose nicht essentiell (Krasnoperov *et al.*, 2002a).

α -LTX induziert eine massive Exocytose von synaptischen Vesikeln und Vesikeln mit großen, elektronendichten Kernen. Diese Eigenschaft wurde extensiv genutzt, um den molekularen Mechanismus dieser Exocytose zu untersuchen (Lajus *et al.*, 2006). Obwohl die Wirkung von α -LTX komplex ist, kann sie in zwei Hauptsignalwege unterteilt werden. Nach

Bindung an die spezifischen, neuronalen Rezeptoren kann α -LTX einerseits in die Membran inserieren, Poren bilden und möglicherweise noch weitere Effekte induzieren. Andererseits kann es zur Aktivierung des Rezeptors und somit zu einer intrazellulären Signalweiterleitung kommen. Beide Signalwege können zu der Ausschüttung von Neurotransmittern führen, allerdings mit unterschiedlichen Mechanismen. Zusätzlich kann zwischen einem Ca^{2+} -unabhängigen und einem Ca^{2+} -abhängigen Signalweg unterschieden werden (Ushkaryov *et al.*, 2004). Der Ca^{2+} -unabhängige Signalweg scheint hauptsächlich mit der Insertion des Toxins in die Membran, der darauf folgenden Porenbildung und anderen Effekten assoziiert zu sein (Khvotchev und Südhof, 2000; Ashton *et al.*, 2001). Die Rezeptor-vermittelten Signalwege scheinen hingegen extrazelluläres Ca^{2+} zu benötigen (Ashton *et al.*, 2001; Capogna *et al.*, 2003; Volynski *et al.*, 2003). Influx von extrazellulärem Ca^{2+} in das Cytosol erregbarer Zellen kann die Exocytose direkt und effizient stimulieren. Der Kationen-Einstrom ist proportional zu der Zahl gebundener Toxinmoleküle und abhängig von der Anzahl der Oberflächenrezeptoren (Ushkaryov *et al.*, 2004). Es gibt zudem Hinweise, dass unter normalen Bedingungen der Haupteffekt des α -Latrotoxins auf dem Ca^{2+} -Influx durch die gebildeten Membranporen beruht. Zusätzlich unterstützt Ca^{2+} die Bildung von α -LTX-Tetrameren und somit die Porenbildung (Ashton *et al.*, 2000). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die gebildeten Poren einen massiven Ausstrom kleiner Neurotransmitter aus dem ‚Transmitterpool‘ des Cytosols zulassen (McMahon *et al.*, 1990; Adam-Vizi *et al.*, 1993; Davletov *et al.*, 1998; Ashton *et al.*, 2000, 2001). Dies ist von extrazellulärem Ca^{2+} unabhängig und biochemisch schwer von der echten Ca^{2+} -unabhängigen Exocytose zu unterscheiden (Davletov *et al.*, 1998; Ashton *et al.*, 2001). Für die Rezeptor-vermittelte Antwort auf α -Latrotoxin wird folgender Wirkmechanismus vorgeschlagen: das Toxin stimuliert einen präsynaptischen Rezeptor, wahrscheinlich Latrophilin. Latrophilin ist mit dem Protein $\text{G}\alpha_{q/11}$ verbunden. Dieses Protein aktiviert die Phospholipase C (PLC), die wiederum die cytosolische Konzentration von IP_3 erhöht. Dadurch kommt es zu einer Ca^{2+} -Ausschüttung aus intrazellulären Speichern. Diese Freisetzung spielt wahrscheinlich in der Signalweiterleitung eine entscheidende Rolle. Der Ca^{2+} -unabhängige Wirkmechanismus von α -LTX scheint durch die Membraninsertion und die dadurch bedingte Porenbildung initiiert zu werden. Es ist bisher noch unklar, ob Exocytose durch den Ein- oder Ausstrom von Kationen oder durch eine Membrandepolarisation bedingt ist (Ushkaryov *et al.*, 2004).

Auch in anderen Spezies existieren Latrophilin-ähnliche Rezeptoren. Im Jahr 2001 konnte der Rezeptor HC110-R aus dem parasitischen Nematoden *Haemonchus contortus* charakterisiert werden. Der heptahelikale Rezeptor wurde durch ‚Screening‘ einer cDNA-Bank als putativer Angriffspunkt des Anthelminthikums PF1022A identifiziert (Saeger *et al.*, 2001). Der Rezeptor besteht aus 986 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 110 kDa auf. Seine vollständige cDNA-Sequenz umfasst 3569 bp. In der Familie der GPCR wird er der Unterfamilie B zugeordnet. Diese Rezeptoren besitzen eine extrazelluläre, NH_2 -terminale Hormonbindungsdomäne (bestehend aus ~ 120 Aminosäuren).

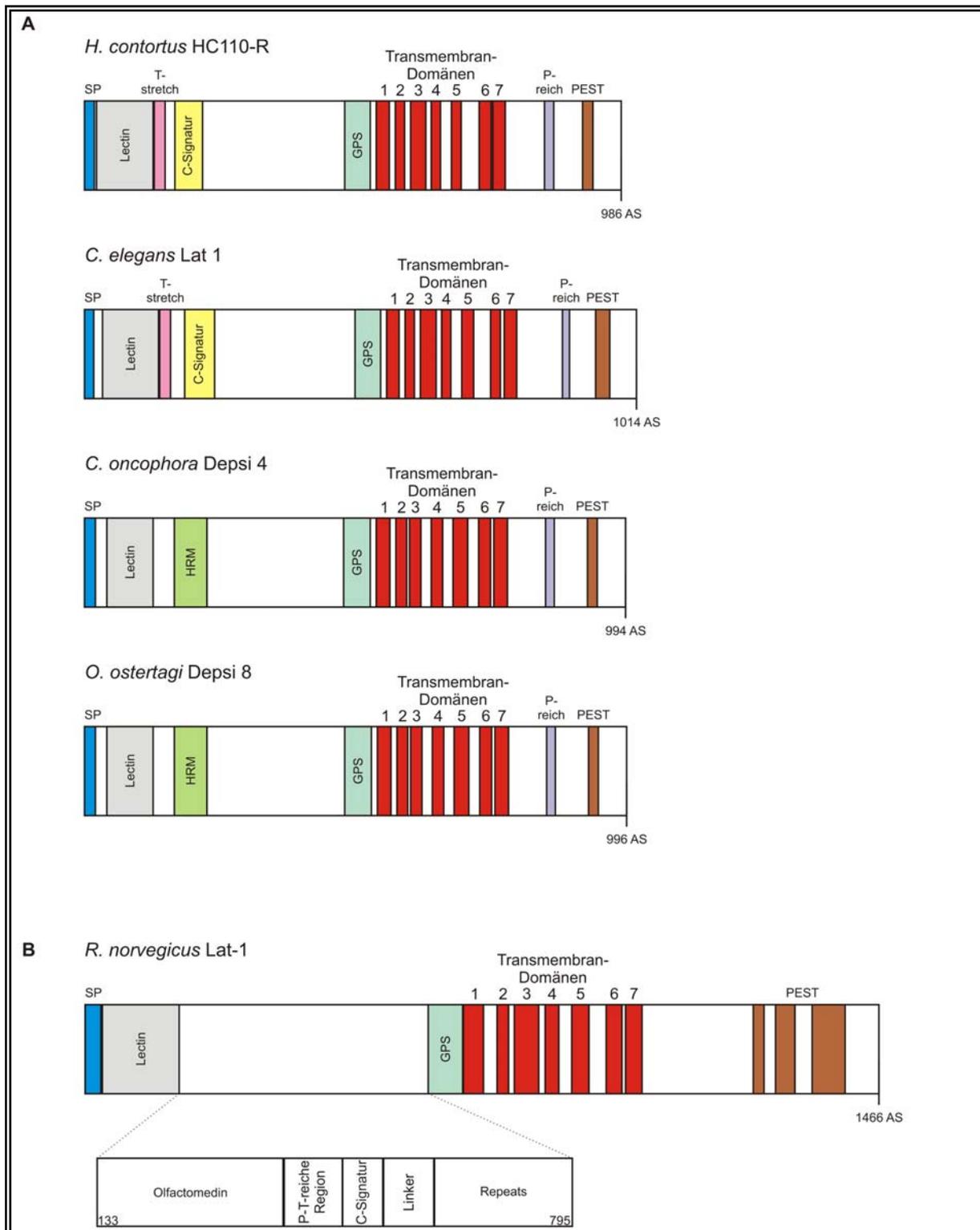


Abb. 1.1: Vergleichende Strukturmodelle von *Haemonchus contortus* HC110-R, *Caenorhabditis elegans* Latrophilin-1, *Cooperia oncophora* Depsiphilin-4, *Ostertagia ostertagi* Depsiphilin-8 und *Rattus norvegicus* Latrophilin-1. (A) Schematische Darstellung der charakteristischen Motive der Proteinstruktur von HC110-R, Lat-1 (Saeger *et al.*, 2000), Depsi-4 und Depsi-8 (Welz *et al.*, 2005): Signalsequenz (SP, blau), Lectin-ähnliche Sequenz (Lectin, grau), Threonin-reiche Region (T-stretch, rosa), Cystein-reiche Signatur (C-Signatur, gelb), Hormonrezeptor-Domäne (HRM, grün), GPS-Motiv (GPS, dunkelgrün), 7 Transmembrandomänen (Transmembrandomänen 1-7, rot), Prolin-reiche Domäne (P-reich, violett) und PEST-Region (PEST, braun). (B) Protein-Struktur von Lat-1 (Saeger *et al.*, 2000). Zu HC110-R orthologe Motive sind wie in (A) dargestellt. Latrophilin-1 aus der Ratte verfügt über folgende zusätzliche Motive: ein Olfactomedin Bindemotiv (Olfactomedin), eine Pro-Thr-reiche Region (P-T-reiche Region), eine ‚Linker‘-Domäne (‚Linker‘) und eine ausgedehnte Region mit mehreren ‚Repeats‘ (‚Repeats‘).

Versuche mit Rezeptoren der Unterfamilie B weisen darauf hin, dass die Bindungsstelle der Peptidliganden diskontinuierlich ist und aus verschiedenen Kontaktpunkten des extrazellulären NH₂-Terminus und der extrazellulären Schleifenregionen besteht (Kristiansen, 2004). Vergleiche der Aminosäuresequenzen zeigten eine 31%ige Identität zwischen HC110-R und sowohl dem humanen Latrophilin-Rezeptor als auch den Latrophilin-Rezeptoren aus Ratte und Rind. Latrophilin besitzt jedoch mit 210 kDa ein deutlich höheres Molekulargewicht. Gemeinsame Strukturmerkmale sind die Lektin-ähnliche Region, die Cystein-reiche Signatur, das GPS-Motiv, die PEST- und die Prolin-reiche Region. Unterschiede bestehen in der in HC110-R nicht vorhandenen Olfaktomedin- und der Prolin/Threonin-Region des Latrophilins. Latrophilin fehlt dagegen die Threonin-reiche Region (Abbildung 1.1). Eine weitere Ähnlichkeit zwischen HC110-R und Latrophilin besteht in ihrer zellulären Lokalisation in transfizierten HEK-293-Zellen. GFP-markiertes HC110-R konnte in der Plasmamembran und in cytoplasmatischen Kompartimenten lokalisiert werden. Bei den cytoplasmatischen Kompartimenten handelt es sich um saure Vesikel (Saeger *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse entsprechen den Angaben für Latrophilin aus der Literatur (Krasnoperov *et al.*, 1997).

Der Orphanrezeptor HC110-R zeigt zudem strukturelle Ähnlichkeiten zu GPCR anderer Nematoden (Abbildung 1.2). Jüngste Untersuchungen ergaben, dass die größte Ähnlichkeit zu den orthologen Sequenzen zweier Rezeptoren aus den parasitischen Nematoden *Cooperia oncophora* (Co depsi 4) und *Ostertagia ostertagi* (Oo depsi 8) besteht. Ihre Aminosäuresequenzen zeigen eine Identität von 89 % zu HC110-R. Des Weiteren wurde eine enge Verwandtschaft zu den beiden in *Caenorhabditis elegans* identifizierten Latrophilin-ähnlichen Proteinen 1 und 2 (Ce Lat-1A, Ce Lat-1B und Ce Lat-2) festgestellt. Auch in *Caenorhabditis briggsae* wurden zwei orthologe hypothetische Proteine (Cb hyp 1: hypothetisches Protein CBG03206; Cb hyp 2: hypothetisches Protein CBG03673) vorhergesagt (Welz *et al.*, 2005). Im Jahr 2000 konnten von Saeger mit embryonierten *C. elegans*-Eiern und einem Antiserum gegen den NH₂-terminalen Teil des Rezeptors HC110-R erste Hinweise auf die Lokalisation der orthologen Latrophilin-ähnlichen Proteine erhalten werden. Es zeigte sich eine Anfärbung des Pharynxbereiches der Embryonen. Dieses wurde 2004 von Willson *et al.* bestätigt. Die Expression des Proteins Lat-1 in Larvenstadien erfolgte am Pharynx der Würmer. In adulten Wurmern konnte eine Expression, sowohl im Pharynxbereich als auch außerhalb, in anterioren Neuronen nachgewiesen werden. Die Expression erfolgte vorwiegend in Neuronen und nicht in Muskeln. Experimente mit *C. elegans* Deletionsmutanten des Gens *lat-1* zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine verlangsamte Pumpaktivität des Pharynx.

In Experimenten an dem Latrophilin-ähnlichen Rezeptor HC110-R konnte gezeigt werden, dass α -LTX diesen als funktionellen, artifiziellen Liganden bindet. Die Bindung des α -LTX an das 54 kDa große NH₂-terminale Fragment von HC110-R konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden. Den C-terminalen, intrazellulären Teil des Rezeptors bindet es nicht (Saeger *et al.*, 2001). Untersuchungen mittels Phagen Display ergaben eine weitere Eingrenzung der Binderegion auf die Aminosäuren 161 bis 261.

CoDepsi4	-----EELPAQNS---SIVVCEGGTAEVLCVPRGMVISIALANYGRYSARVCYDN	47
OoDepsi8	-----EESPAQNS---SIVVCEGGTAEVLCVPRGMVISIALANYGRYSARVCYEN	47
HC110-R	-----PAQNS---SIVVCEGGTAELECPHGMVISIALANYGRYSARVCYEN	44
CeLat1A	CLLTVPPTFASNKPTTDESHTISHTICDGEAAELSCPAGKVISIVLGNRYGRFSVAVCLPD	60
	: .: * .:*:* :*** ** * ****.*.***:*. ** :	
CoDepsi4	EELDDVVP-MTQCHNPRMPTLRKSCDGRRECNFVVGNDFFVHDPGPKVKKYLEVTTYLCV	106
OoDepsi8	EELDDVVP-MTQCHNPRMPTLRKSCDGRRECHFVVGNDFFIHDPCPGVKKYLEVTTYMCS	106
HC110-R	EELDDVVP-MTQCHNPKMPTLRKSCDGRRECHFVVGNDFFVHDPGPKVKKYLEVTTYLCV	103
CeLat1A	--NDIVPSNINCNHKTKSILEKCKNGDSMCYFTVDKKTFTEDPCPNTPKYLEVKYNCV	117
	::*:* *:*:* * . *.*:* * * * . . . * . * . * . * . * . * . * . *	
CoDepsi4	VEVTTTTTTTTTTTTTTTTTTSTTTEVEDDVKKD--MSVKPAPST-----CAVTSRRGIEW	158
OoDepsi8	VEVTTTTTTTTTTTTTTTTTTSTTSTTTEVEDDVKKDFSMSVKSAPLT-----CAVTSRRGIEW	160
HC110-R	ADVTTTTTTTTTTTTTTTTTTSTTTEVEDDVKKD--MSAKSAPST-----CASTRRGIEW	155
CeLat1A	VPATTTTTTTTTTTTSSLIIVDEEEEAQKDALNSDVIKPVKKEDVFCSAFNRRGVNW	177
	. . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
CoDepsi4	PATVAGTTVNRPCPEGRGTSSWRCSAEGWSEPGPNTMECRSDWTIQRHDALEETIKDQ	218
OoDepsi8	PATVAGTTVNRPCPEGRGTSPWRCSAEGWSEPGPNTLECRSDWTIQRHDALEETIKDQ	220
HC110-R	PATISGTTVNRPCPEGRGTSSWKCSAEGWSEPGPNTIECRSDWTIQRQDALEETIKDQ	215
CeLat1A	QNTKSGTTSSAPCEGSSGKQLWACTEQQWLTFFPNSAGCESNWISSRNSVLGSGVISE	237
	* : * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
CoDepsi4	DASGIPELLRAMTSDTRRPMVAGDLPKLLNILDIVQEVVSREVWAKSSQKLVNQLIVNVI	278
OoDepsi8	DASGIPELLRAMTSDTRRPMVAGDLPKLLNILDIVQDVVGRELWAKSSQKLVNQLIVNVV	280
HC110-R	DASGIPELLRAMTSDTRRPMVAGDLPKLLNILDIVQDVVGREVWAKSSQKLVNQLIVNVV	275
CeLat1A	DVSGLEPFLRNLGSETRRPMVGGDLPKVLHLEKTVNVAEESWAYQHLPLSNKGAPEVM	297
	* . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
CoDepsi4	HNTLRKEMWQNWPLMKRQTFATRILTCVERAMTSASTTVHSEN---YVQPLVMAEMSE	335
OoDepsi8	HNTLRKEMWQNWPSMKRHTFATRLLTSSVERAMTSASTTVHSEN---YVQPLVMTSEMSE	337
HC110-R	HNALRAKEMWQNWPSVKRQTFATRLLLNGVERAMTSSSTTVYSSEN---YVQPLVMTSEMSE	332
CeLat1A	NYMLRNQEIWGSWDVTKRKEFASRFILAAEKAMVASAKGMMTSAESNVIVQPAITVEISH	357
	: * * : * : * . * * * : * : * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
CoDepsi4	SIRTSSQPSNYFLFPSMALWAGENNVDSDVPKEALELTGLDRARVYASFANIGEEMEP	395
OoDepsi8	SIRTSSQPSNYFLFPSMALWAGENNVDSDIPEALELTGLDRARVYASFANIGDEMSE	397
HC110-R	SIRTSSQPSNYFLFPSMALWAGENNVDSDVPREALEMTGLDRARVYASFANIGEEMEP	392
CeLat1A	KIKMSSQPTDYILFSAALWNGQN-VDNVNI PRDAILKINKDETQVFFSSFDNLGAQMT	416
	. * : * * * . * : *	
CoDepsi4	PVETLPSSEEQPSGVERRRRVSRVVAASIVLDGKTIKLPVLPKPLIITFHHPYPEALRRM	455
OoDepsi8	PVEKLPVSEQLPTGGERRRRVSRVVAASIVLDGKTIKLPVLPKPVIIITFHHPYPEALRRM	457
HC110-R	PVEISAGSEQKPTGLERRRRVSRVVAASIVLDGKVIKLPVLPKPIIITFHHPYPEALRRM	452
CeLat1A	SDVTVAIAGTDQT-EVRKRRVSRIVGASLIENKERRVENLTQPVRIITFYHKESSVRHL	475
	. . . : : * : * * * * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
CoDepsi4	TSPECSWWDNDMKWSTSGCALQSHNSTHTVCACSHMTHFAVLMDYVGHEISSDNQLLT	515
OoDepsi8	TSPECSWWDTEEMKWSTSGCALQSHNSTHTVCACNHMTHYAVLMDYVGHEISTDNQLLT	517
HC110-R	SSPECSWWDTEEMKWSTSGCALQSHNSTHTVCACSHMTHFAVLMDYVGHEISSDNQLLT	512
CeLat1A	SNPTCVWNNHHLKWKPSGCKLSYHNKMTSCTDCHLTHFAVLMDVGRHDLNIDQTLT	535
	. * * * * : . : * * * . * . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
CoDepsi4	FLTYAGCTLSIVCLTLTFLCFVIVKGGGDRVFIHKNLCASLGLAEVFLAGIWRTEEFK	575
OoDepsi8	FLTYAGCTLSIVCLTLTFLCFVFFVKGGGDRVFIHKNLCASLGLAEVFLAGIWRTEEFK	577
HC110-R	FLTYTGCTLSIVCLTLTFFCFVVFVKGGGDRVFIHKNLCASLGLAEVFLAGIWRTEEFK	572
CeLat1A	LLTYVGCIIISIIICLLLTFFAYLIFSRGGDRVFIHENLCLSLAIAEITFLAGITRTEDSL	595
	: * * . * * * * : * * : * * * * * * . * . * . * . * . * . * . * . *	
CoDepsi4	ECGM	579
OoDepsi8	ECGM	581
HC110-R	ECGM	576
CeLat1A	QCGI	599
	: * * :	

Abb. 1.2: ‚Alignment‘ der Aminosäuresequenzen der NH₂-Termini der Latrophilin-ähnlichen Proteine aus *Haemonchus contortus*, *Cooperia oncophora*, *Ostertagia ostertagi* und *Caenorhabditis elegans* unter Verwendung des Computerprogrammes ‚CLUSTAL W‘. Die Sequenzen der Signalpeptide wurden vorher entfernt. Dies geschah im Falle der Sequenz von HC110-R nach den Angaben von Saeger *et al.*, 2001, für die Sequenz des Lat-1A aus *C. elegans* nach Ergebnissen des Programms ‚Prosit‘ (20.1) und für die Sequenzen der Rezeptoren aus *C. oncophora* und *O. ostertagi* nach Angaben von Welz *et al.*, 2005.

Diese Region enthält als Strukturelement die Cystein-reiche Signatur (Mühlfeld, 2003). Durch Bindung von α -Latrotoxin wurden funktionale Antworten in transient transfizierten HEK293-Zellen beobachtet. Nach Zugabe von α -Latrotoxin konnte nach 2 min eine frühe, kleine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von $5 \pm 0,2$ nM, gefolgt von einer großen Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von $220 \pm 14,9$ nM nach ca. 22 min beobachtet werden. Die Antwort auf α -LTX erwies sich als spezifisch und konzentrationsabhängig. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgt vorwiegend durch Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} über Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs in die Zelle (Saeger *et al.*, 2001).

1.2 Das Anthelminthikum Emodepsid als Ligand des Rezeptors HC110-R

Die Klasse der Cyclooctadepsipeptide beinhaltet Substanzen mit einer breiten anthelminthischen Aktivität (Saeger *et al.*, 2001). Die Untersuchungen der Cyclooctadepsipeptide begannen Anfang der 90er Jahre mit der Substanz PF1022A, einem natürlichen sekundären Metaboliten des Pilzes *Mycelia sterilia*. Dieser ist ein Teil der Mikroflora der Blätter von *Camellia japonica* (Harder *et al.*, 2005). Der systematische Name der Substanz PF1022A lautet Cyclo-(D-lactyl-L-N-methylleucyl-D-3-phenyllactyl-L-N-methylleucyl-D-lactyl-L-N-methylleucyl-D-3-phenyllactyl-L-N-methylleucyl) (Ohyama *et al.*, 1994). Bei dem Anthelminthikum Emodepsid handelt es sich um ein semisynthetisches Derivat mit einem Morphinring in para-Position der beiden D-Phenyllactylsäuren.

Der Wirkmechanismus des Breitspektrum-Anthelminthikums Emodepsid unterscheidet sich sehr von denen anderer bekannter Anthelminthika, wie z.B. der Benzimidazole, der Imidazothiazole, der Tetrahydropyrimidine und der makrozyklischen Lactone (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002). Untersuchungen an *C. elegans* ergaben, dass Emodepsid durch Paralyse der Körperwandmuskulatur und des Pharynx die Lokomotion respektive Nahrungsaufnahme inhibiert. Zudem konnte in neueren Studien gezeigt werden, dass der Muskel des Eiablage-Apparates paralytisiert wird und somit die Würmer nicht mehr in der Lage sind, Eier abzulegen. Des Weiteren kommt es zu einer Verlangsamung der Entwicklung (Bull *et al.*, 2007; Guest *et al.*, 2007). Seit 1996 wurde mit biochemischen, elektrophysiologischen und molekularbiologischen Techniken an der Aufklärung des Wirkmechanismus gearbeitet. 2005 postulierten Harder *et al.* ein Modell: Experimente mit *C. elegans*-Mutanten weisen darauf hin, dass Emodepsid einen Latrophilin-ähnlichen Rezeptor aktiviert, der über das G-Protein $G_{q\alpha}$ einen Phospholipase-C β -(PLC β)-Signalweg in Gang setzt. PLC β bewirkt die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerin (DAG). Dieser Prozess wird durch den Effekt von $G_{O\alpha}$ auf die DAG-Kinase negativ reguliert. DAG wiederum interagiert mit der C1-Domäne von UNC-13, einem wichtigen präsynaptischen Rezeptor, der für die Neurotransmitterausschüttung über synaptische Vesikel in *Drosophila melanogaster*, Säugetieren und *C. elegans* essentiell ist. Eine Aktivierung von UNC-13 führt durch Förderung der offenen Konfiguration von Syntaxin, einem präsynaptischen Membranprotein, zur Erleichterung der Vesikel-vermittelten Neurotransmitter-Ausschüttung. Dadurch bildet

Syntaxin einen Komplex mit Synaptobrevin (einem an Vesikeln lokalisierten Protein) und SNAP-25. Auf diese Weise kommt es zur Ausschüttung von Transmittern (Willson *et al.*, 2004). Diese Transmitter relaxieren den pharyngealen und den somatischen Muskel der Körperwand, wodurch es zu einer Paralyse des Nematoden kommt. Welcher Transmitter ausgeschüttet wird, ist noch nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise aus Untersuchungen an *Ascaris suum*, dass es sich um ein Neuropeptid handelt. Ergebnisse von Studien an *C. elegans* weisen darauf hin, dass Emodepsid primär über den Lat-1 Rezeptor am pharyngealen Muskel und über den Lat-2 Rezeptor an Körperwandmuskeln agiert. Der Transmitter könnte außerdem auch an anderen Stellen ausgeschüttet werden und die Aktivität anderer physiologischer Prozesse, wie z.B. die Eiablage, beeinflussen (Harder *et al.*, 2005). Neuere Studien zeigen jedoch, dass der Wirkmechanismus von Emodepsid noch weitaus komplexer zu sein scheint. Guest *et al.* untersuchten *slo-1*-Mutanten des Nematoden *C. elegans*. SLO-1, ein Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanal, scheint essentiell für die Wirkung des Anthelminthikums zu sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Mutanten gegen den Effekt von Emodepsid auf Lokomotion und Nahrungsaufnahme resistent sind. Bei *lat-1*- und *lat-2*-Doppelmutanten hingegen konnte die Lokomotion, wie bei wildtypischen Tieren, mit Hilfe von Emodepsid inhibiert werden. Emodepsid scheint folglich die Nahrungsaufnahme, unterstützt von Lat-1, durch einen neuronalen, SLO-1-abhängigen Signalweg zu inhibieren. Die Hemmung der Lokomotion scheint jedoch Latrophilin-unabhängig zu sein und über einen SLO-1-abhängigen Signalweg in Neuronen oder im Muskel der Körperwand zu wirken. Es wäre denkbar, dass Latrophilin mittels der oben beschriebenen G-Protein-vermittelten Phospholipase C- β -Kaskade die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht und auf diese Weise die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von SLO-1 unterstützt.

Sowohl das Depsipeptid PF1022A als auch Emodepsid binden *in vitro* an den 54 kDa großen NH_2 -terminalen Teil von HC110-R. Auch unter Verwendung von Proteinextrakten aus adulten Würmern (*H. contortus*) konnte die Bindung von sowohl α -LTX als auch PF1022A an ein 110 kDa großes Protein nachgewiesen werden. Weder die Bindung von PF1022A/Emodepsid noch die Bindung des optischen Antipoden PF1022-001 rufen allerdings eine Ca^{2+} -Antwort in HC110-R transfizierten HEK-293 Zellen hervor. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass PF1022A/Emodepsid die α -LTX induzierte HC110-R vermittelte Ca^{2+} -Antwort antagonistisch beeinflusst, indem es dosisabhängig den Ca^{2+} -Einstrom erniedrigt oder gar vollständig unterdrückt. In Gegenwart von 4 ng/ml Emodepsid kam es nach etwa 14 min nur zu einer kleinen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von $44 \pm 6,0$ nM. Die 100fache Konzentration führte zu keiner weiteren Erniedrigung der Ca^{2+} -Antwort, jedoch zu einem länger anhaltenden Plateau. Nach Vorinkubation der Zellen mit 4 ng/ml Emodepsid für 90 min kam es nur zu einem leicht erniedrigten Ca^{2+} -Anstieg von $95 \pm 20,5$ nM nach 22 min mit einem anhaltenden Plateau. Eine erhöhte Emodepsid-Konzentration von 400 ng/ml führte zu einer erniedrigten Ca^{2+} -Antwort von $65 \pm 7,5$ nM und einer Verzögerung um 14 min (Saeger *et al.*, 2001).

1.3 Neuropeptide in Nematoden

Die physiologische Rolle der Latrophilin-ähnlichen Proteine in Nematoden ist bisher nicht verstanden. Sie scheinen jedoch an der Ausschüttung von Neurotransmittern beteiligt zu sein (Willson *et al.*, 2004). Aufschluss über die physiologische Funktion dieser Rezeptoren könnte die Identifizierung ihrer natürlichen Liganden geben (Joost und Methner, 2002). Bisher ist bekannt, dass das Anthelminthikum Emodepsid in Nematoden an Latrophilin-ähnliche Proteine bindet und zu einer Ausschüttung von Muskel-relaxierenden Neurotransmittern führt (Harder *et al.*, 2005). In Untersuchungen mit Emodepsid an somatischen Muskelpräparationen des Nematoden *Ascaris suum* konnte gezeigt werden, dass durch Acetylcholin oder das Neuropeptid AF2 stimulierte Muskelkontraktionen durch Zugabe von Emodepsid inhibiert werden. Das Anthelminthikum führte zudem zu einer schnellen Relaxierung Acetylcholin induzierter, tonischer Muskelkontraktionen. In denervierten Muskeln wurde die inhibitorische Wirkung von Emodepsid auf eine von Acetylcholin induzierte Antwort jedoch nicht mehr beobachtet. Die Nervenstränge scheinen somit am Wirkmechanismus beteiligt zu sein. Elektrophysiologische Messungen zeigten zudem, dass Emodepsid eine Ca^{2+} -abhängige Hyperpolarisation der Muskelzellen bewirkt. Zusätzlich ist die Wirkung von Emodepsid, ähnlich wie bei den inhibitorischen Neuropeptiden PF1 und PF2, von extrazellulärem K^+ abhängig. Diese Ergebnisse lassen somit die Schlussfolgerung zu, dass Emodepsid den Wirkmechanismus inhibitorischer Neuropeptide an neuromuskulären Verbindungsstellen nachahmt und die Freisetzung von Neuropeptiden an inhibitorischen Nervenendigungen stimuliert. Neuropeptide als natürliche Liganden der Latrophilin-ähnlichen Rezeptoren wären folglich durchaus denkbar (Willson *et al.*, 2003). Die Aufklärung der physiologischen Funktion der Latrophilin-ähnlichen Proteine in Nematoden setzt demnach Kenntnisse über das Nervensystem der Nematoden und seine Signalmoleküle voraus.

Kein Nervensystem ist zur Zeit so gut untersucht wie das Nervensystem der Nematoden (Davis und Stretton, 1996). Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts lenkte seine einfache Struktur die Aufmerksamkeit verschiedener Neuroanatomen auf sich. Richard Goldschmidt untersuchte Serienschritte des parasitischen Nematoden *A. suum*. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie war es White *et al.* 1986 möglich, die Ergebnisse ihrer Arbeit an Serienschritten adulter Hermaphroditen des frei lebenden Nematoden *C. elegans* zu präsentieren. Auf diese Weise konnte das gesamte Nervensystem rekonstruiert werden. Mit insgesamt nur 302 Neuronen ist es klein und einfach strukturiert. Die Morphologie der Neuronen ist durch wenige oder gar keine Verzweigungen gekennzeichnet (White *et al.*, 1986). Zum größten Teil liegt das Nervensystem der Nematoden in der Epidermis. Das Gehirn besteht aus einem Schlundring, der den Pharynx umschließt. Er dient als Kommissur für zwei oder mehr dicht anliegende Ganglienknotten. Von diesem Nervenring zieht als Hauptnerv mit sensorischer und motorischer Funktion ein anfangs gegabelter, dann unpaarig verlaufender, ventraler Markstrang ans Hinterende des Wurms. Er enthält Neuronen, die in mehreren gangliösen Zentren angehäuft sind. In der Enddarmregion bildet er ein manchmal paarig verlaufendes Analganglion. Zusätzlich gibt es einen dorsalen und zwei laterale Markstränge. In der Nähe des Analganglions treten in jedem lateralen Markstrang mehrere

Nervenzellen zu einem Lumbalganglion zusammen. Alle Längsnerven verlaufen in den entsprechenden Epidermiszellen. Besonders der ventrale und der dorsale Markstrang, aber auch die anderen Nervenstränge, sind in unregelmäßigen Abständen durch halbseitige Kommissuren verbunden (Hartwich, 1984). Eine Besonderheit des Nervensystems der Nematoden sind die neuromuskulären Verbindungen. Die Muskelzellen bilden Fortsätze, so genannte Muskelarme, die sich verzweigen, und Synapsen, so genannte Muskelfinger, ausbilden. Auf diese Weise kommen sie mit den Motoneuronen der Nervenstränge in Kontakt. Sie bilden die Verbindung zwischen dem kontraktilen Bereich des Muskels und dem Nerv (Maule 1996). In *C. elegans* wurden ca. 2000 neuromuskuläre Verbindungen, 5000 chemische Synapsen zwischen Neuronen und 700 ‚Gap Junctions‘ beschrieben (White *et al.*, 1986). Zudem gibt es bei adulten Hermaphroditen mindestens 39 Klassen von sensorischen, mindestens 21 Klassen von motorischen Neuronen und bis zu 58 Klassen von Interneuronen (Li, 1999).

Diesem morphologisch einfach strukturierten und einheitlichen Nervensystem liegt jedoch eine große Diversität an putativen Signalmolekülen zugrunde. Die meisten Untersuchungen neuromuskulärer Funktionen der Nematoden wurden an *A. suum* durchgeführt (Maule, 1996). Die grundlegende Struktur des Nervensystems von *A. suum* entspricht der des Nervensystems von *C. elegans*. Aufgrund seiner Größe bietet *A. suum* jedoch einen großen Vorteil und ermöglicht elektrophysiologische und chemische Untersuchungen (Davis und Stretton, 1996). Del Castillo und Stretton waren die Pioniere auf diesem Gebiet. Vorwiegend wurden die klassischen Neurotransmitter GABA und Acetylcholin untersucht, da die so genannte ‚Peptidrevolution‘ noch bevorstand (Maule, 1996). Seit den späten 80er Jahren wurden immunocytochemische Studien mit Antiseren durchgeführt. Diese Studien zeigten, dass Nematoden eine peptiderge Komponente des Nervensystems besitzen, die hinsichtlich der Anzahl putativer Transmittermoleküle über die der klassischen Neurotransmitter dominiert. 75 % der Nervenzellen in *A. suum* konnten mit Antiseren angefärbt werden (Brownlee, 1996). Erste Untersuchungen an Gewebeproben aus Nematoden beschäftigten sich mit der Struktur und den physiologischen Effekten dieser Neuropeptide. Zusätzlich wurden Gen-Deletionsexperimente durchgeführt. Signifikante Fortschritte wurden besonders in den letzten 5 bis 6 Jahren bei der Kartierung ihrer Expression und der Biologie ihrer Rezeptoren gemacht. Dies ist fast vollständig mit der Vollendung des Genomprojektes des frei lebenden Nematoden *C. elegans* zu begründen (McVeigh *et al.*, 2006). *C. elegans* bietet zudem für molekulare und zelluläre Analysen der Funktion von Neuropeptiden einige Vorteile. Wie oben beschrieben sind Position, Morphologie, Muster und synaptische Partner aller Neuronen elektronenmikroskopisch untersucht worden. *C. elegans* fungiert aus diesem Grund als Modell für parasitische Nematoden und das Nervensystem der Vertebraten (Li, 1999). Im Gegensatz dazu gibt es nur ein vergleichbares Genomprojekt eines parasitischen Nematoden, *Brugia malayi*. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass in der näheren Zukunft für Parasiten eine ähnliche Menge an Informationen erlangt werden kann (McVeigh *et al.*, 2006).

Nematoden besitzen eine Reihe von klassischen Neurotransmittern, wie z.B. Acetylcholin, 5-Hydroxytryptamin (5-HT), Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Glutamat und Gammaaminobutylsäure (GABA). Zusätzlich verfügen sie über ein peptiderges Nervensystem, welches mit dem endokrinen System in Verbindung steht. Sie teilen sich die gleichen Botenstoffe. Bei diesen handelt es sich meist um Peptide mit einer Größe von 3 bis 100 (oder mehr) Aminosäuren. Sie werden als Neuro- oder regulatorische Peptide bezeichnet, agieren als Neurotransmitter oder Neuromodulatoren und kommen in allen Geweben vor. Als Neurotransmitter werden Substanzen bezeichnet, die an einem Nervenende ausgeschüttet werden und auf eine benachbarte Zielzelle einwirken. Hingegen bezeichnet man Substanzen als Neuromodulatoren, die eine Neurotransmission modulieren. Hormone werden an einer Stelle ausgeschüttet und gelangen über den Kreislauf, bei Nematoden das Pseudocoel, an den Wirkort. Nematoden haben weder Hormondrüsen noch einen funktionalen Kreislauf. Neurosekretorische Zellen liegen bei ihnen im vorderen Teil des Körpers.

Die klassischen Neurotransmitter können in exzitatorisch und inhibitorisch wirkende Transmitter unterteilt werden. Zu den exzitatorischen Neurotransmittern zählt Acetylcholin. Es wird somit nur in erregenden und nicht in inhibitorischen Motoneuronen gefunden. Sowohl die Acetylcholinesterase als auch die Cholinacetyltransferase konnten nachgewiesen werden. 5-HT stimuliert zum einen das Eierlegen und den pharyngealen Pumpmechanismus, zum anderen inhibiert es die Lokomotion und die Ausscheidung. Ein Rezeptor für 5-HT wurde identifiziert und im Körpermuskel, im Ovar und im Pharynx nachgewiesen. Zu den inhibitorischen Transmittern gehört GABA, das in inhibitorischen Motoneuronen vorkommt. Außerdem enthalten zehn cephal und ein dorsorektales Ganglionneuron GABA. Ein weiterer inhibitorisch wirksamer Neurotransmitter ist die Glutaminsäure. Injektionen von Glutaminsäure in *A. suum* bewirkten eine Paralyse und bewiesen somit die Existenz eines Glutamatrezeptors und seinen Einfluss auf die Lokomotion. Da die Körpermuskulatur nicht direkt auf Glutamat reagiert, spricht dies dafür, dass Glutamat präsynaptisch auf Endigungen von Motoneuronen wirkt. Dopamin ist das wichtigste Catecholamin in Nematoden. Hohe Konzentrationen wurden im Reproduktionsteil von Nematoden gefunden. Es gibt Hinweise auf Effekte von Dopamin auf Motoneuronen und den pharyngealen Muskel. Es ist in der Lage, das pharyngeale Pumpen zu inhibieren, ist aber weit weniger wirksam als GABA und Glutamat (Brownlee *et al.*, 2000).

Im Jahre 2005 waren in *C. elegans* mittlerweile 109 Neuropeptid-Gene bekannt. Sie lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Zum einen gibt es die *ins*-Gene, die für Insulin-ähnliche Peptide kodieren, zum anderen die *flp*-Gene, welche für die FMRFamide-ähnlichen Peptide (FLP, 'FMRFamide-like Peptides') kodieren. Ferner gibt es noch die *nlp*-Gene. Dieser Gruppe werden alle Peptid-Gene zugeordnet, die nicht in eine der anderen Gruppen gehören. Mit fortschreitenden Genom- und Proteomprojekten parasitischer Nematoden fällt auf, dass es für viele, wenn nicht alle, Neuropeptid-Gene aus *C. elegans* Gegenstücke in parasitischen Nematoden gibt. Die isolierten und kodierten Neuropeptidsequenzen sind sehr ähnlich, wenn auch nicht identisch mit den *C. elegans*-Peptiden (Li, 2005).

Tab. 1.1 fasst die wichtigsten Informationen einiger ausgewählter Neuropeptide zusammen. Soweit nicht anders vermerkt, sind die Daten der Arbeit von McVeigh (2006) entnommen.

Peptid	Gen	Effekt auf das Verhalten	Antworttyp des Körpermuskels von <i>A. suum</i>	Ovijector-Antwort-Typ bei <i>A. suum</i>	Effekte auf den Pharynx
		Verhaltensanalyse in Folge einer Injektion ins Pseudocoel bei adulten <i>A. suum</i>	Typ 1: langsam inhibitorisch Typ 2: schnell inhibitorisch Typ 3: exzitatorisch Typ 4: biphasisch	Typ 1: inhibitorisch Typ 2: exzitatorisch Typ 3: transiente Kontraktion Typ 4: transiente Kontraktion, gefolgt von spastischer Lähmung Typ 5: Relaxation, gefolgt von erhöhter Aktivität	Effekte auf das mit 5-HT-stimulierte pharyngeale Pumpen bei <i>A. suum</i> bzw. die Effekte auf die Frequenz des pharyngealen Aktionspotentials bei <i>C. elegans</i>
AF11	<i>flp-1</i>	keine Bewegung	Typ 1: langsam inhibitorisch		
PF1	<i>flp-1</i>		Typ 1: langsam inhibitorisch	Typ 1: inhibitorisch	Verringerung bei <i>C. elegans</i> und bei <i>A. suum</i>
PF2	<i>flp-1</i>		Typ 1: langsam inhibitorisch (Willson <i>et al.</i> , 2003)	Typ 1: inhibitorisch	Verringerung bei <i>C. elegans</i> und bei <i>A. suum</i>
AF5	<i>flp-4</i>	verringerte Bewegung	Typ 3: exzitatorisch		
PF3/AF8	<i>flp-6</i>	keine Bewegung mehr, ventrales Aufrollen	ventral Typ 3: exzitatorisch dorsal Typ 1: langsam inhibitorisch	Typ 1: inhibitorisch	Erhöhung bei <i>C. elegans</i> und Verringerung bei <i>A. suum</i>
AF1	<i>flp-8</i>	verringerte Bewegung	Typ 4: biphasisch	Typ 4: transiente Kontraktion, gefolgt von spastischer Lähmung	Erhöhung bei <i>C. elegans</i> und Verringerung bei <i>A. suum</i>
AF19	<i>flp-13</i>	keine Bewegung			
AF2/PF5	<i>flp-14</i>	vermehrte Bewegung	Typ 4: biphasisch	Typ 1: inhibitorisch	Erhöhung bei <i>C. elegans</i> und kein Effekt bei <i>A. suum</i>
AF4	<i>flp-18</i>		Typ 3: exzitatorisch	Typ 2: exzitatorisch	Kein Effekt bei <i>A. suum</i>
AF10	<i>flp-18</i>		Typ 3: exzitatorisch		

Die *flp*-Gene in anderen Spezies werden als sequelog bezeichnet. Dieser Begriff beschreibt eine Sequenzähnlichkeit, die jedoch nicht auf einen evolutionären oder funktionalen Zusammenhang zwischen den Sequenzen hinweist. Die Begriffe homolog und ortholog sind in diesem Fall nicht gerechtfertigt, da es keine gesicherten Hinweise für ihre Richtigkeit gibt (McVeigh, 2006). FLP bilden die größte Gruppe der bisher bekannten Neuropeptide. Sie zeigen Ähnlichkeit zu FMRFamid, einem cardioaktiven Tetrapeptid, welches aus der Klaffmuschel (*Macrocallista nimbosa*) isoliert wurde. Einige ausgewählte Vertreter der FLP sind in Tabelle 1.1 mit den wichtigsten Ergebnissen bisheriger Untersuchungen zusammengestellt. Sowohl bei den Invertebraten als auch bei verschiedenen Vertebraten konnten Neuropeptide identifiziert werden. Nematoden zeigen jedoch eine ungewöhnliche Komplexität (McVeigh *et al.*, 2006).

Das erste Neuropeptid-Gen stammte aus *C. elegans* und wurde als *flp-1* bezeichnet. Es kodiert für sieben FLP. Durch alternatives Spleißen werden zwei Transkripte gebildet. Wie in anderen *flp*-Genen entstehen die Peptide aus einem Vorläuferprotein, das mehrere Peptide beinhaltet. Dadurch kommt es zu einer großen Diversität (Brownlee und Fairweather, 1999). Wie andere Neuropeptide entstehen FLP aus Präproteinen, die sowohl ein NH₂-terminales Signalpeptid als auch mehrere Schnittstellen für Endoproteasen enthalten (Li, 1999). Sie erhalten oft noch posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Amidierungen, Glykosylierungen oder NH₂-terminale Acetylierungen (Brownlee, 2000). Ein Gen kann sowohl mehrere Peptide der gleichen als auch unterschiedlicher Sequenz enthalten. In Invertebraten können verschiedene Neuropeptide, die von einem Neuron ausgeschüttet werden, ähnliche oder auch unterschiedliche Effekte auf postsynaptische Zellen haben. Da mehrere Neuropeptid-Gene häufig von einzelnen Neuronen exprimiert werden können und die Expression der Gene sowohl auf der Ebene des Spleißens als auch auf der Ebene der Transkription reguliert werden können, ist die Komplexität der Signalgebung durch Neuropeptide sehr groß (Li, 1999). Mittlerweile sind mindestens 32 *flp*-Gene bei Nematoden beschrieben. In *C. elegans* konnten bisher 29 *flp*-Gene identifiziert werden, die mindestens 68 verschiedene FLP kodieren. Jedes *flp*-Gen kodiert für bestimmte, charakteristische Variationen des C-terminalen Tetrapeptid-Motivs x-x₀-Arg-Phe-NH₂. Dabei steht x für eine beliebige Aminosäure, mit Ausnahme von Cystein, und x₀ für eine hydrophobe Aminosäure, mit Ausnahme von Cystein. Die Aminosäure Cystein kommt bisher noch in keinem FLP vor. Die strukturelle Diversität spiegelt sich auch in der Fülle von FLP-induzierten physiologischen Antworten wieder. Sie zeigen unterschiedliche Effekte auf Motoneuronen, Verhalten und sensorische Fähigkeiten. Das Tetrapeptid-Motiv schließt Peptide mit ein, die vorher nicht zu dieser Gruppe gerechnet wurden. Ein Beispiel hierfür sind viele Neuropeptide aus Vertebraten, die auf den Aminosäuren RFamid enden. Diese Betrachtungsweise spiegelt die evolutionären Verhältnisse der FLP jedoch besser wider. FLP spielen im Nervensystem der Nematoden eine sehr große, bei den Vertebraten dagegen nur eine untergeordnete Rolle (McVeigh *et al.*, 2006). Im Nervensystem der Säugetiere haben Neuropeptide in erster Linie die Aufgabe, die Synapsenaktivität zu modulieren, wobei sie die Aktivität primärer Neurotransmitter, wie z.B. der klassischen Neurotransmitter, beeinflussen. Im Gegensatz dazu fungieren Neuropeptide in Invertebraten auch als primäre Transmitter.

Die biologische Aktivität der Neuropeptide wurde in *A. suum* untersucht, da dieser Parasit für elektrophysiologische Techniken am besten geeignet ist. Im Allgemeinen ist die Wirkung vieler Peptide mindestens zweimal so stark wie die der klassischen Neurotransmitter Acetylcholin und GABA (Brownlee und Fairweather, 1999). Neuropeptide wirken sehr spezifisch und vermitteln durch Rezeptoren eine Vielzahl von zellulären und molekularen Aktivitäten. Mittels G-Proteinen werden sekundäre Botenstoffsysteme aktiviert oder der Ionenfluss über die Membran verändert. Eine Ausnahme bilden Kationenkanäle, die mittels FLP reguliert werden. Zusätzlich können Neuropeptide als Neuromodulatoren die Wirkung anderer Substanzen beeinflussen. Die Wirkung von Neuropeptiden ist im Allgemeinen langanhaltender als die Wirkung der klassischen Neurotransmitter. Sie sind an der Signalweiterleitung an den Synapsen beteiligt und werden anschließend an der

postsynaptischen Membran enzymatisch abgebaut. Im Gegensatz zu der schnellen, anhaltenden Signalgebung der klassischen Neurotransmitter wirken die größeren Neuropeptide langsamer und sind in die Vermittlung und Modulation dieser Signale involviert. Zusätzlich kontrollieren sie als Wachstumshormone oder Morphogene eine große Vielfalt physiologischer Prozesse durch Induktion lang anhaltender Effekte. Es ist auch möglich, dass ein oder zwei Neuropeptide gleichzeitig mit einem klassischen Neurotransmitter oder mehreren Neuropeptiden zusammen ausgeschüttet werden. Die Neuropeptide werden in synaptischen Vesikeln an präsynaptischen Endigungen gespeichert. Ihre Ausschüttung ist, wie bei den klassischen Neurotransmitter, Ca^{2+} -abhängig und wird durch Depolarisation der Membran der Nervenendigungen initiiert. Daraus ergibt sich jedoch die Frage, wie die Ausschüttung der verschiedenen Transmittersubstanzen reguliert wird. Dieses kann durch unterschiedliche Arten von Vesikeln geschehen oder durch die Ausschüttung an verschiedenen Stellen eines Neurons, wenn diese durch Verzweigungen voneinander getrennt sind. Die Botenstoffe werden in drei Arten von Vesikeln gespeichert. Acetylcholin findet man in kleinen, runden oder ovalen, transparenten Vesikeln mit einem Durchmesser von 20 bis 50 nm. Weiterhin findet man Vesikel mit einem dichten Inneren und einem transparenten Hof. Sie haben einen Durchmesser von 40 bis 100 nm und enthalten klassische Neurotransmitter, wie z.B. Serotonin oder Noradrenalin. Neuropeptide findet man in Vesikeln, die ein charakteristisches dichtes Inneres mit einem engen, peripheren Hof aufweisen. Es können zwei Arten dieser Vesikel unterschieden werden. Die einen haben einen Durchmesser von 60 bis 100 nm, die anderen einen Durchmesser von 100 bis 160 nm (Brownlee, 2000).

1.4 Zielsetzung

Die physiologische Funktion der Latrophiline und Latrophilin-ähnlichen Proteine ist bis *dato* nicht verstanden. Vertreter dieser Gruppe sind sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten zu finden. Aufschluss über die Rolle dieser Rezeptoren in der Natur sollte die Identifikation nativer Liganden des Rezeptors HC110-R geben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit der löslichen Fraktion eines Proteinextraktes des frei lebenden Nematoden *C. elegans* mit unterschiedlichen Verfahren nach HC110-R-bindenden Proteinen oder Peptiden gesucht werden. Grundlage bildete die erfolgreiche heterologe Expression verschiedener Teile des Rezeptors in *E. coli* und die chromatographische Aufreinigung der resultierenden Fusionsproteine. Potentielle Kandidaten sollten *in vitro* und *in vivo* auf eine Interaktion mit dem Latrophilin-ähnlichen Rezeptor HC110-R untersucht und diese charakterisiert werden. Ferner sollten verschiedene Neuropeptide aus Nematoden mit Hilfe eines Oberflächenplasmonresonanz-Biosensors auf eine Bindung an ein 54 kDa großes, aminoterminales Fusionsprotein von HC110-R untersucht werden. Interaktionen wurden hinsichtlich ihrer Kinetik und Affinität charakterisiert und untereinander verglichen. Es ist bekannt, dass durch Bindung des artifiziellen Liganden α -LTX an Latrophilin und HC110-R Änderungen der Ca^{2+} -Signaltransduktion hervorgerufen werden. Mit Hilfe einer stabil mit HC110-R-Myc/6×His transfizierten HEK-293-Zelllinie sollte mittels Fluoreszenzspektroskopie ein System zur funktionalen Analyse potentieller, nativer Liganden von HC110-R etabliert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und ‚Reaktionskits‘

Acrylamid M-Bis 29:1, 30 % Stock Solution (GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg)
Adenosin-5'-Triphosphorsäure, Dinatriumsalz (AppliChem GmbH, Darmstadt)
Agar (GIBCO BRL, Karlsruhe)
Agarase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
6 x Agarosegel Ladungspuffer (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
Amicon® Ultra Centrifugal Filter Devices, 100000 MWCO (Millipore GmbH, Schwalbach)
Amine Coupling Kit (BIACORE, Freiburg)
Ammoniumperoxodisulfat (MERCK KGaA, Darmstadt)
Ampicillin, Natriumsalz (Roth, Karlsruhe)
Anhydrotetracyclinhydrochlorid (IBA GmbH, Göttingen)
Bacto™ Hefeextrakt (Difco, Sparks, MD, USA)
Biacore Maintenance Kit for BIACORE J, X, 1000, 2000, 3000 (BIACORE, Freiburg)
Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (BIO-RAD, München)
Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
BugBuster® Master Mix (Novagen, Madison, WI, USA)
Carbenicillin, Natriumsalz (GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg)
CB-X™ Protein Assay (GenoTechnology, Inc., St. Louis, MO, USA)
Centrex® UF-2 Centrifugal Ultrafilters, 10 K MWCO unit (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel)
Centricon® Centrifugal Filter Devices, YM-3 (3000 MWCO) (Millipore GmbH, Schwalbach)
Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
Chloramphenicol (GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg)
Column PROTEIN Concentrate™ Kit (GenoTechnology, Inc., St. Louis, MO, USA)
Complete Mini Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
CycloReader™ Auto DNA Sequencing Kit (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
D-19-Entwickler (Kodak GmbH, Stuttgart)
D-Desthiobiotin (IBA GmbH, Göttingen)
Digitonin (Sigma, Deisenhofen)
DNase I, 1 U/μl (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid (DynaL Biotech GmbH, Hamburg)
ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)
ECL Hyperfilm (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)
ECL Western Blot Detection Reagents (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)
ECL Western Blotting Substrate (Pierce, Bonn)
Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
Filterpapier (Whatman Ltd., Maidstone, England)
FOCUS FastSilver (GenoTechnology, Inc., St. Louis, MO, USA)
Fount India, schwarze Tusche (Pelikan Vertriebsgesellschaft mbH, Hannover)
Fura-2/Acetoxymethylester (Fura-2/AM), 1mg (Sigma, Deisenhofen)

G 418 sulfate, sterile-filtered aqueous solution, cell culture tested (Calbiochem, San Diego, CA, USA)

GelCode® Blue Stain Reagent (Pierce, Bonn)

Glasfaser Rundfilter, GF 52, Ø 25 mm (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel)

Gravity flow Strep-Tactin® Sepharose® Column (IBA GmbH, Göttingen)

Größenstandards λ-DNA (EcoRI, Hind III-restringiert) Marker 3, pUC-Mix Marker 8 (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Hefeextrakt (Difco, Sparks, MD, USA)

His-Select™ Magnetic Agarose Beads (Sigma, Deisenhofen)

Hyperfilm™ MP ECL (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)

Isopropyl-β,D-thiogalactopyranoside (GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg; MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

LabSafe GEL Blue™ (GenoTechnology, Inc., St.Louis, MO, USA)

Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD, München)

α-Latrotoxin, 40 µg, lyophilisiert (Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel)

Long Ranger® Gel Solution (Cambrex Bio Sciences, Rockland, USA)

Lysozyme from hen egg white, 97940 U/mg (Fluka, Neu Ulm)

Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kits (Pierce, Bonn)

Mira cloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA)

Mowiol (Polyscience Inc., Niles, IL, USA)

Nucleobond® Ax PC100 Kit (Macherey-Nagel, Düren)

NucleoSpin® Extract 2 in 1 Kit (Macherey-Nagel, Düren)

NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren)

Oligonucleotide (MWG, Ebersberg)

OrgoSol PROTEIN Concentrate™ Kit (GenoTechnology, Inc., St. Louis, MO, USA)

PageBlue™ Protein Staining Solution (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

PCR Nukleotid (dNTP) Mix (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

PD-10 Desalting column (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)

Pefabloc SC Plus (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe)

PlusOne™ Silver Staining Kit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)

Prestained Protein Molecular Weight Marker (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Protino® Ni 1000 preppacked columns kit (Macherey-Nagel, Düren)

Protran Nitrozellulose Membran BA 85 (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel)

PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Heidelberg)

Restriktionsenzyme und dazugehörige 10 x Puffer (MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; New England BioLabs GmbH, Frankfurt)

RotiBlock-Lösung (10 x) (Roth, Karlsruhe)

RotiLoad-Ladungspuffer (4 x) (Roth, Karlsruhe)

Roti®Mark 10-150 (Roth, Karlsruhe)

Sensor Chip CM5, research grade (BIA CORE, Freiburg)

Serva Blue G (Serva, Heidelberg)

Silicone solution Serva, in isopropanol (Serva, Heidelberg)

Slide-A-Lyzer™ 10 K Dialysis Cassettes, 0,5-3.0 ml (Pierce, Bonn)
Spin-Out™ GT-1200 Medi (GenoTechnology, Inc., St.Louis, MO, USA)
Strep-Tactin Regeneration Buffer (10 x Buffer R, HABA Solution) (IBA GmbH, Göttingen)
Strep-Tactin® Sepharose® (IBA GmbH, Göttingen)
Strep-Tag® Starter Kit (IBA GmbH, Göttingen)
Strep/His Starter Kit (IBA GmbH, Göttingen)
Sterilfilter (Nunc, Wiesbaden)
Surfactant P20 (Biacore, Freiburg)
T4 DNA Ligase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon- Rot)
TALON® CellThru (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA)
TALONspin™ Columns (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA)
Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)
TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega, Heidelberg)
Transcend™ tRNA (Promega, Heidelberg)
Transformation Aid™ Bacterial Transformation Kit (MBI Fermentas GmbH, St. Leon- Rot)
Triple Master PCR System (Eppendorf, Hamburg)
Trypton Pepton (pankreatischer Verdau von Casein) (Difco, Sparks, MD, USA)
Visualizer™ Western Blot Detection Kit, mouse (Upstate, Charlottesville, VI, USA)
Vivaspin 15 R Concentrator, 5.000 MWCO HY (Sartorius AG, Göttingen)
Vivaspin 15 R Concentrator, 10.000 MWCO HY (Sartorius AG, Göttingen)
Vivaspin Concentrator, 100.000 MWCO PES (Sartorius AG, Göttingen)
Wasser für die Molekularbiologie, filtriert mit 0,2 µm Membranfilter, DEPC behandelt (Fluka, Neu Ulm)

Enzyme und Chemikalien für die Molekularbiologie: AppliChem GmbH, Darmstadt; Biozym, Hess. Oldendorf; Difco, Sparks, MD, USA; Fluka, Neu Ulm; GeneCraft, Münster; GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg; GIBCO BRL, Karlsruhe; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; MERCK KGaA, Darmstadt; Invitrogen GmbH, Karlsruhe; Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg; Promega, Heidelberg; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen; Stratagene, Heidelberg; USB, Bad Homburg; Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande.

2.2 Lösungen und Puffer

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden ausschließlich mit Wasser aus der Aufbereitungsanlage Direct-Q™ (Millipore GmbH, Schwalbach; im Folgenden bezeichnet als dH₂O) angesetzt und für Arbeiten mit DNA, Proteinen und für Kulturmedien durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Die Zusammensetzung folgender Lösungen und Puffer wird im Text nicht näher erläutert:

Äquibrierungspuffer (IEF-Streifen): 50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin in dH₂O; vor Gebrauch 1 % DTT hinzugeben

Anodenpuffer (Schägger und v. Jagow): 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9 in dH₂O

APS: 10 % (w/v) in dH₂O

ATP-Lösung: 10 mM in dH₂O

Biacore-Puffer I: 50 mM Hepes, pH 7,4; 0,005 % Surfactant P20 (v/v) in dH₂O; sterilfiltriert 0,22 µm, entgast

Biacore-Puffer II: 50 mM Hepes, pH 7,4; 300 mM Natriumchlorid, 0,005 % Surfactant P20 (v/v) in dH₂O; sterilfiltriert 0,22 µm, entgast

Blocklösung (Immunfluoreszenz): 1 % BSA (w/v) in PBS⁻

Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung: 0,1 % Coomassie G250 (w/v), 25 % Isopropanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v) in dH₂O

Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung (Kang): 0,02 % Coomassie Brilliant Blau G250 (w/v), 2 % Phosphorsäure (w/v), 5 % Aluminiumsulfat × 14 – 18 H₂O, 10 % Ethanol (v/v) in dH₂O

Coomassie Brilliant Blau-Entfärbelösung: 25 % Isopropanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v) in dH₂O

Digitonin-Lösung: 1,7 mM in 5 % DMSO (v/v), 95 % dH₂O (v/v)

EGTA: 400 mM in dH₂O

Elutionspuffer (IBA): 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin in dH₂O

Elutionspuffer (IB): 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM Natriumchlorid, 5 M Guanidin-HCl, 250 mM Imidazol in dH₂O

Elutionspuffer (Macherey-Nagel): 100 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 600 mM Natriumchlorid, 500 mM Imidazol in dH₂O

Elutionspuffer Pull-Down Assay I: 50 mM Natriumcitrat; pH 4,5; 50 mM Natriumchlorid in dH₂O

Elutionspuffer Pull-Down Assay II: 50 mM Natriumcitrat; pH 1,8; 50 mM Natriumchlorid in dH₂O

Elutionslösung Pull-Down Assay III: 8 M Harnstoff, 20 mM DTT, 0,5 % Triton X-100 (v/v) in dH₂O

Entfärbelösung (Schägger und v. Jagow): 10 % Essigsäure (v/v) in dH₂O

Entwicklerlösung: D-19-Entwickler (Kodak GmbH, Stuttgart), 1 Dose ad 15 l (37°C) dH₂O

Färbelösung (Schägger und v. Jagow): 0,025 % Serva Blue G (w/v), 10 % Essigsäure (v/v) in dH₂O

Fixierlösung: 2,8 kg Thiosulfat, 280 g Natrium-Kalium-Disulfid, ad 14 l dH₂O

Fixierlösung (Immunfluoreszenz): 99,8 % Methanol p.a.; vorgekühlt auf –20 °C

Fixierlösung (Kang): 30 % Ethanol (v/v), 2 % Phosphorsäure (w/v) in dH₂O

Fixierlösung (Schägger und v. Jagow): 50 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v) in dH₂O

Gelpuffer (Schägger und v. Jagow): 3 M Tris-HCl, pH 8,45; 0,3 % SDS (w/v) in dH₂O

Homogenisierungspuffer: 300 mM Natriumchlorid, 20 mM Hepes, pH 7,6 in dH₂O

HPLC-Lösung A: 0,1 % Trifluoressigsäure (w/v) in dH₂O; sterilfiltriert 0,45 µm, entgast

HPLC-Lösung B: 100 % Acetonitril (w/v), 0,1 % Trifluoressigsäure (w/v) in dH₂O; sterilfiltriert 0,45 µm, entgast

HPLC-Lösung C: 25 % Acetonitril (w/v), 0,1 % Trifluoressigsäure (w/v) in dH₂O; sterilfiltriert 0,45 µm, entgast

HPLC-Lösung D: 75 % Acetonitril (w/v), 0,1 % Trifluoressigsäure (w/v) in dH₂O; sterilfiltriert 0,45 µm, entgast

Inclusionbody-Waschpuffer I: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100 (v/v) in dH₂O; vor Gebrauch 1 mM DTT hinzugeben

Inclusionbody-Waschpuffer II: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, 5 mM EDTA in dH₂O; vor Gebrauch 1 mM DTT hinzugeben

Inclusionbody-Puffer I: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM NaCl, 6 M Guanidin-HCl, 0,1 % Triton X-100 (v/v), 10 mM Imidazol in dH₂O, vor Gebrauch 10 mM β-Mercaptoethanol hinzugeben

Inclusionbody-Puffer II: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM Natriumchlorid, 6 M Guanidin-HCl, 0,1 % TritonX-100 (v/v), 10 mM Imidazol in dH₂O

Kathodenpuffer (Schägger und v. Jagow): 0,1 M Tris-HCl, pH 8,25; 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS (w/v) in dH₂O

Kolloidale Coomassie-Lösung (Neuhoff):

Lösung A: 20 g 85%ige Phosphorsäure, 100 g (NH₄)₂SO₄, dH₂O ad 980 ml

Lösung B: 5 % Coomassie-Brilliant-Blau G250 (w/v) in dH₂O

Lösung C: 98 % Lösung A (v/v), 2 % Lösung B (v/v)

Färbelösung (Neuhoff): 80 % Lösung C (v/v), 20 % Methanol (v/v)

Kontrastlösung (Kang): 10 % Ethanol (v/v), 2 % Phosphorsäure (w/v) in dH₂O

MES-Puffer: 10 mM, pH 5,0 in dH₂O

Mowiol-Einbettmedium: 6 g Glycerin, 2,4 g Mowiol, 6 ml dH₂O; für 2 h bei Raumtemperatur schütteln; 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5 hinzugeben, bei 53 °C über Nacht schütteln; Zentrifugation zur Entfernung unlöslicher Partikel; Zusatz von 2 % DABCO; aliquotieren und Lagerung bei -20 °C

Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS (w/v) in dH₂O

LEW-Puffer (Macherey-Nagel): 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM Natriumchlorid in dH₂O

LEW-Puffer I (Macherey-Nagel): 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM Natriumchlorid, 5 mM Imidazol in dH₂O; vor Gebrauch 30 mM β-Mercaptoethanol hinzugeben

LEW-Puffer II (Macherey-Nagel): 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM Natriumchlorid, 10 mM Imidazol in dH₂O; vor Gebrauch 30 mM β-Mercaptoethanol hinzugeben

LEW-Puffer III (Macherey-Nagel): 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM Natriumchlorid, 15 mM Imidazol in dH₂O; vor Gebrauch 30 mM β-Mercaptoethanol hinzugeben

LEW-Puffer IV (Macherey-Nagel): 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM Natriumchlorid, 20 mM Imidazol in dH₂O; vor Gebrauch 30 mM β-Mercaptoethanol hinzugeben

LEW-Puffer V (Macherey-Nagel): 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 600 mM Natriumchlorid, 40 mM Imidazol in dH₂O; vor Gebrauch 30 mM β-Mercaptoethanol hinzugeben

Phosphatpuffer (PBS): 8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 0,15 g NaH₂PO₄ × H₂O, 0,2 g KH₂PO₄ ad 1 l H₂O, pH 7,4 in dH₂O

Ponceau S: 0,5 % Ponceau S (w/v), 1 % Essigsäure (v/v) in dH₂O

Renaturierungspuffer: 4 M Harnstoff, 50 mM Natriumchlorid, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 in dH₂O; vor Gebrauch 0,2 mM DTT hinzufügen

Sammelgelpuffer (4 ×): 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS (w/v) in dH₂O

Sequenziergellösung: 6 M Harnstoff, 100 ml 5 × TBE-Puffer, 60 ml Long Ranger Gel Mix ad 500 ml dH₂O

TAE-Puffer (40 ×): 1,6 M Tris-HCl, pH 8,0; 1,33 M Natriumacetat, 0,04 M EDTA in dH₂O

TBE-Puffer (5 ×): 0,445 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,445 M Borsäure; 0,01 M EDTA in dH₂O

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5-8,0; 1 mM EDTA in dH₂O

Transferpuffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 190 mM Glycin; 20 % Methanol (v/v) in dH₂O

Trenngelpuffer (4 ×): 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS (w/v) in dH₂O

TST-Waschpuffer: 0,15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,05 % Tween 20 (v/v) in dH₂O

Waschpuffer (IBA): 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA in dH₂O

2.3 Medien und Zusätze

2.3.1 Medien zur Anzucht von *E. coli*

LB-Medium: 1 % Natriumchlorid; 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt in dH₂O, pH 7,5

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5 % Agar

NZY-Medium: 5 g Natriumchlorid; 2 g MgSO₄ × 7 H₂O; 5 g Hefeextrakt; 10 g NZ-Amin ad 1 l dH₂O

TB-Medium: 12 g Trypton, 24 g Hefe-Extrakt, 4 ml Glycerol, dH₂O ad 900 ml, autoklavieren, bis auf ≤ 60 °C abkühlen lassen und 100 ml TB-Phosphatlösung hinzufügen.

TB-Phosphatlösung: 0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄ in dH₂O

Die Selektion von *E. coli* erfolgte durch Zugabe von Ampicillin auf eine Konzentration von 50 µg/ml. Alternativ wurde Carbenicillin in einer Konzentration von 60 µg/ml hinzugegeben. Klone, die zusätzlich eine Chloramphenicolresistenz enthielten, standen außerdem unter einem Selektionsdruck von 35 µg/ml Chloramphenicol.

2.3.2 Medien zur Anzucht von *C. elegans*

S-Medium: 1 l S-Basal, 10 ml 1 M KCO₃, 10 ml Trace Metals Solution, 3 ml 1 M Calciumchlorid, 3 ml 1 M MgSO₄

S-Basal: 5,85 g Natriumchlorid, 1,1 g K₂HPO₄, 5,9 g KH₂PO₄, 5 mg Cholesterin (5 mg/ml in Ethanol) ad 1 l dH₂O

Trace Metals' Solution: 1,9 g EDTA, 0,7 g FeSO₄ × 7 H₂O, 0,2 g MnCl₂ × 4 H₂O, 0,2 g ZnSO₄ × H₂O, 0,025 g CuSO₄ × 5 H₂O, ad 1 l dH₂O; im Dunkeln lagern

NGM-Agar: 3 g Natriumchlorid, 2,5 g Trypton, 5 mg Cholesterin (5 mg/ml in Ethanol), 17 g Agar ad 975 ml dH₂O, autoklavieren und 1 ml 1 M Calciumchlorid, 1 ml 1 M MgSO₄, 25 ml 1 M KH₂PO₄, pH 6,0 hinzugeben

2.3.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit 1000 mg/l Glukose, L-Glutamin, Pyruvat (Gibco BRL, Karlsruhe)

Hank's BSS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)

Fötales Kälberserum (FCS) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)

2.4 Versuchstiere

Zur Herstellung eines Gesamtproteinextraktes wurde der frei lebende Nematode *C. elegans* kultiviert. Die Versuchstiere des Wildtypstammes N2 stammten aus dem Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.4.1 Kultivierung von *C. elegans*

Die Nematoden wurden über einen längeren Zeitraum auf NGM-Agarplatten bei Raumtemperatur gehalten. Die Agarplatten wurden nach der Herstellung mit 10 Tropfen einer *E. coli* OP50 Übernachtskultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Bakterienrasen diente als Nahrung für die Würmer. Bei den verwendeten *E. coli* OP50-Zellen handelt es sich um einen Uracil auxotrophen Stamm, der in Abwesenheit von Uracil nur sehr langsam wächst, so dass ein übermäßiges Wachstum des Bakterienrasens verhindert wird (Brenner *et al.*, 1974). Die Animpfung der Agarplatten mit *C. elegans* erfolgte von einer Stammpatte. Ein kleines Agarstück wurde zu diesem Zweck mit einem sterilen Spatel herausgeschnitten und mit der Oberseite nach unten auf die frische Agarplatte aufgebracht. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur.

Zur Kultivierung größerer Mengen des Nematoden wurden *E. coli* OP50-Zellen aus zwei Litern einer statischen Kultur durch Zentrifugation bei 2700 g (Avanti™ J-25, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) geerntet und in einem Liter S-Medium resuspendiert. Die Würmer einer Agarplatte wurden mit S-Medium abgespült und damit die Flüssigkultur in einem 2 l-Kolben angeimpft. Die Inkubation erfolgte für ca. 7 Tage bei Raumtemperatur und 160 rpm auf einem Schüttler, bis die Würmer mit bloßem Auge in großer Anzahl in der Kultur sichtbar waren.

2.4.2 Ernten von *C. elegans*-Flüssigkulturen

Eine 1 Liter-Flüssigkultur des Nematoden *C. elegans* (Kapitel 2.4.1) wurde für 60 min auf Eis inkubiert, damit die Würmer auf den Boden sinken konnten. Der Überstand wurde abgenommen und die Würmer in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (BDBiosciences, Heidelberg) überführt. Nach einer Zentrifugation von 3 min bei $140 \times g$ (Multifuge® 3L-R, Heraeus Holding GmbH, Hanau) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Würmer bei $140 \times g$ für 3 min mit 0,1 M NaCl gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die *C. elegans* mittels Saccharose an die Oberfläche gebracht. Zu diesem Zweck wurden sie im Verhältnis 1:1 in 0,1 M NaCl und 60%iger eiskalter Saccharoselösung (w/v) resuspendiert und für 5 min bei $140 \times g$ zentrifugiert. Die an der Oberfläche schwimmenden Würmer wurden in ein anderes Gefäß überführt und zweimal mit 0,1 M NaCl gewaschen. Mit Hilfe eines Zweifach-Vakuum-Filtrationsgeräts (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) und Glasfaser Rundfiltern (GF 52, Ø 25 mm; Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) wurde die restliche Flüssigkeit entfernt und die Pellets bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.5 Bakterien- und Zellkulturstämme

2.5.1 *E. coli*-Stämme

Tab. 2.1: Im Rahmen dieser Arbeit für Klonierungen verwendete *E. coli*-Stämme:

Stamm	Genotyp	Quelle	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i>	Hanahan, 1983; Woodcock <i>et al.</i> , 1989	Novagen, Darmstadt
<i>E. coli</i> BL21 Star™ (DE3)	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm rne131 (DE3)</i>		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R)</i>		Stratagen, Amsterdam, Niederlande
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F⁻ ϕ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan, 1983	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>E. coli</i> DH5α T1R	<i>F⁻ ϕ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA tonA</i>	Jones <i>et al.</i> , 2002	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>E. coli</i> TOP10F'	<i>F['] {lacI^q, Tn10(Tet^R)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>E. coli</i> SCS110	<i>RpsL (Str^f) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44D (lac-proAB) [F[']traD36 proAB lacI^qZΔM15]</i>		Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<i>E. coli</i> TG1	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mrcB-hsdSM)5 (r_k⁻ m_k⁻) [F[']tra36 proAB lacI^qZΔM15]</i>		Stratagene, Amsterdam, Niederlande

2.5.2 Zellkulturstämme

Tab. 2.2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendeter Zellkultur-Stamm:

Stamm	ATCC-Nummer	Organismus	Gewebe	Zelltyp
HEK-293	CRL-1573	<i>Homo sapiens</i> , embryonal	Niere	Epithelzelle

2.6 Oligonukleotide und Plasmide

2.6.1 Synthetische Oligonukleotide

Alle PCR-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersbach) synthetisiert. Oligonukleotide für die Sequenzierung wurden am 5'-Ende mit IRDye™-800 modifiziert. Zusätzlich wurden für die Sequenzierung IRDye™-800 modifizierte Standardoligonukleotide verwendet (LI-COR Biosciences, Bad Homburg).

Tab. 2.3: Im Rahmen dieser Arbeit für die PCR verwendete synthetischen Oligonukleotide.

Name	Nukeotidsequenz	T _M
pASK-for	5'-ATG GTA GGT CTC AGC GCC CCA GCT CAA TCA AAC AGT TCC ATT-3'	74,3 °C
pASK-rev	5'-ATG GTA GGT CTC ATA TCA GAG AAA TGT AAG AAG CTG ATT ATC C-3'	69,4 °C
ASK44rev	5'-ATG GTA GGT CTC AGG CCG AGA AAT GTA AGA AGC TGA TTA TCC-3'	72,4 °C
pET100-DAF21-for	5'-CACCTCCGAGAACGCCGAAACCTTCGC -3'	71,0 °C
pET100-DAF21-rev	5'-TTATTAGTCGACCTCCTCCATGCGGGA -3'	66,5 °C

Tab. 2.4: Synthetische mit 5'-IRDye™ 800 modifizierte Oligonukleotide für die Sequenzierung.

Name	Nukleotidsequenz
Ask forw	5'-GAG TTA TTT TAC CAC TCC CT-3'
Ask rev	5'-CGC AGT AGC GGT AAA CG-3'
T7-Promotor	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

2.6.2 Plasmide

Tab. 2.5: Verwendete Plasmide.

Name	Selektionsmarker	Beschreibung	Bezugsquelle
pcDNA3.1 (+/-)	Amp ^R	eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pASK-IBA4	Amp ^R	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA44	Amp ^R	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor	IBA GmbH, Göttingen
pIRES1neo	Neo ^R	eukaryotischer Expressionsvektor	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pRSET B	Amp ^R	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pET100/D-TOPO	Amp ^R	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.7 Präparation, Konstruktion und Analyse von Nukleinsäuren

2.7.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte aus stationären 5 ml bzw. 100 ml Kulturen von *E. coli*-TOP10- oder *E. coli*-DH5 α -Zellen. Mit einer Einzelkolonie wurde LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 280 rpm schüttelnd inkubiert. Zur Plasmid-Isolation wurden das ‚NucleoSpin Plasmid Kit‘ (Macherey-Nagel, Düren), das ‚Plasmid Purification Midi Kit‘ (Qiagen, Hilden), das ‚Nucleobond Ax PC100 Kit‘ (Macherey-Nagel, Düren) bzw. das ‚PureYield™ Plasmid Midiprep System‘

(Promega, Heidelberg) verwendet. Sie basieren auf der modifizierten alkalischen Lyse nach Birnboim (1983). Die Plasmid-DNA-Isolationen erfolgte gemäß den Angaben des jeweiligen Herstellers.

2.7.2 Kryokonservierung von Bakterienstämmen

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienstämmen wurden ‚Glycerinstocks‘ in sterilen Kryoröhrchen (Mikro-Schraubröhre, 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht) angelegt. Dazu wurden 500 µl Bakteriensuspension mit 500 µl sterilem Glycerin 1 h auf dem Schüttler durchmischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 2 h auf Eis. Die fertigen ‚Glycerinstocks‘ wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

2.7.3 Enzymatische Modifikation von DNA

Die Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde gemäß den Herstellerangaben und im für das jeweilige Enzym empfohlenen Puffer durchgeführt. In der Regel betrug die Inkubationszeit 3 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Ligation von DNA-Molekülen in 50 ng eines modifizierten Vektors erfolgte mit Hilfe der T4 DNA Ligase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon- Rot) und 1 x Ligationspuffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl über Nacht bei $16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jeweils 1 µl der Ligationsansätze wurde für die Transformation in *E. coli* (Kapitel 2.7.10) eingesetzt.

2.7.4 Elektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989) in einer horizontalen Flachbettkammer. Dafür wurden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet, die mit $0,5 \times$ TBE- oder $1 \times$ TAE-Puffer und unter Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gegossen wurden. Die DNA wurde mit $6 \times$ Ladungspuffer versetzt und bei 10 V/cm aufgetrennt. Anschließend wurden die durch Ethidiumbromid angefärbten DNA-Moleküle auf dem Transilluminator (UVT-20 S, Herolab GmbH, Heidelberg) mit parallel aufgetrennten DNA-Längenstandards verglichen. Für Fragmente $< 1\text{ kb}$ wurde 1 µg pUC-Mix Marker 8 (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), für größere Fragmente 1 µg λ -DNA (EcoRI, Hind III-restringiert) Marker 3 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

2.7.5 Isolierung von DNA-Fragmenten und Plasmiden aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte entweder mittels Agarase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) durch den Verdau von ‚low melting point‘-Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf), die als Fenstergel in gleichprozentiges TAE-Agarosegel gegossen wurde oder mittels des ‚NucleoSpin Extract Kits‘ (Macherey-Nagel, Düren). In beiden Fällen wurde das gewünschte Fragment unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und gemäß der Angaben der Hersteller isoliert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1/10 des Probenvolumens anschließend in einem Kontrollgel aufgetrennt und im Vergleich zum DNA-Längenstandard abgeschätzt.

2.7.6 Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch Messung der Absorption im Bereich von 260 nm, 280 nm und 320 nm mit einem DU 640 Spektralphotometer (Beckman, München). 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 pro ml, für RNA genau 40 µg RNA pro ml. Alternativ wurde eine Mengenabschätzung von DNA-Fragmenten oder Plasmiden in einem TBE-Agarosegel durch den Vergleich mit 1 µg pUC-Mix Marker 8 bzw. λ-DNA (EcoRI, Hind III-restringiert) Marker 3 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt.

2.7.7 Präzipitation von DNA

DNA wurde durch Zugabe von 1/10 3 M Natriumacetat und dem zweifachen Volumen gekühlten Isopropanols 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ präzipitiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $20.000 \times g$ (Biofuge Primo R, Heraeus Holding GmbH, Hanau) erfolgte ein Waschschriff mit 70%igem Ethanol.

2.7.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Sämtliche PCR wurden in einem PTC-200 Gradientencycler oder PTC-150 MiniCycler der Firma MJ Research (Biozym, Hess. Oldendorf) durchgeführt. Die PCR von DNA-Sequenzen erfolgte mittels sequenzspezifischer Oligonukleotide (Tabelle 2.3). Für die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl 35 bis 50 ng Plasmid-DNA als Templat eingesetzt. Zur Amplifikation wurden folgende PCR Systeme bei jeweils $0,4\text{ }\mu\text{M}$ der beiden sequenzspezifischen Oligonukleotide gemäß den Herstellerangaben verwendet: ‚Triple Master PCR System‘ (Eppendorf, Hamburg), ‚Platinum Pfx DNA Polymerase‘ (Invitrogen, Karlsruhe) und ‚High Fidelity PCR System‘ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Der initialen Denaturierung für 2 min bei $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, folgten 35 Zyklen bestehend aus 15 s Denaturierung bei $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s ‚Annealing‘ bei einer um 5-6 $^{\circ}\text{C}$ reduzierten Schmelztemperatur (TM) der entsprechenden Oligonukleotide (Tabelle 2.3), und 90 s Kettenverlängerung bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Eine terminale Elongation für 10 min bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ beendete die Reaktion. 1/5 dieser Reaktion wurde zur Kontrolle in einem entsprechend prozentigen TBE-Agarosegel aufgetrennt.

2.7.9 Klonierung von PCR-Fragmenten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurden die Vektoren pASK-IBA4 bzw. pASK-IBA44 (IBA GmbH, Göttingen) oder das ‚Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit‘ (Invitrogen, Karlsruhe) benutzt. Sollten PCR-Fragmente kloniert werden, denen über die Oligonukleotidsequenz beidseitig eine Restriktionsschnittstelle eingefügt worden war, wurden diese zuerst über ein Agarosegel aufgetrennt, die Bande ausgeschnitten und isoliert (Kapitel 2.7.5) oder mittels des ‚NucleoSpin Extract Kits‘ (Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. Anschließend wurden sie mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease geschnitten (Kapitel 2.7.3) und erneut aufgereinigt. Die modifizierten DNA-Fragmente wurden in den

entsprechend restringierten Vektor ligiert und 1/10 des Ligationsansatzes in chemokompetente *E. coli*-TOP10- oder DH5 α -Zellen transformiert (Kapitel 2.7.10). Die Klonierung der PCR-Fragmente in den pET100/D-TOPO-Vektor erfolgte nach Herstellerangaben. Die Überprüfung der Klonierung bzw. des richtigen und durchgängigen Leserasters erfolgte durch Sequenzanalyse.

2.7.10 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen mit rekombinanten Plasmiden wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach dem Ausplattieren der transformierten Zellen auf Selektionsagar und Inkubation über Nacht bei 37 °C konnten Transformanden isoliert und im Restriktionsverdau analysiert werden.

2.7.11 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von klonierter DNA erfolgte nicht-radioaktiv nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit Hilfe des automatischen DNA-Sequenzierers LI-COR 4000 der Firma MWG Biotech (Ebersbach). Sequenziert wurde mit 5'-IRD-800-gekoppelten Oligonukleotiden (MWG Biotech, Ebersberg) sowie mit 5'-IRD-800-gekoppelten Standardoligonukleotiden (LI-COR Bioscience, Bad Homburg) (Tabelle 2.4).

Für die Sequenzreaktion wurden das ‚Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit‘ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) oder das ‚CycloReader™ Auto DNA Sequencing Kit‘ (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Pro Reaktion wurden dabei 1,5 μ g Plasmid-DNA und 2–4 pmol 5'-IRDye™-800-gekoppelter Oligonukleotide eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Sequenzreaktion wurde ein PTC 100 Thermocycler (MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf) eingesetzt. Dabei folgten auf eine 2-minütige Denaturierung bei 94 °C 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung (94 °C für 30 s), ‚Annealing‘ (55 °C für 30 s) und Strangsynthese (72 °C für 1,5 min). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 6 μ l Formamid-Ladungspuffer abgestoppt. Unmittelbar vor dem Auftragen der Sequenzreaktion auf das Sequenziergel wurden die Reaktionsansätze für 3 min bei 72 °C denaturiert und sofort danach lichtgeschützt auf Eis gelagert. Die fluoreszenzmarkierten Kettenabbruch-Fragmente wurden in 40 cm langen, 0,25 mm dünnen, 6%igen Gelen aus modifiziertem Polyacrylamid (Long Ranger® Gel Solution; Cambrex Bio Sciences, Rockland, USA) mit 8 M Harnstoff in 1 \times TBE-Puffer bei 1.500 V und 50 °C aufgetrennt und in Echtzeit über eine Laser-Photomultiplier-Einheit detektiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software ‚Base ImagIR 4.0‘ von LI-COR (MWG Biotech, Ebersbach). In einigen Fällen wurden Proben zur Sequenzanalyse an die Firma SEQLAB (Göttingen) geschickt.

2.7.12 Computeranalyse von Sequenzdaten

Die durch Sequenzanalyse erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des Programms ‚BLAST 2 sequences‘ (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tatusova und Madden, 1999) mit Sequenzen verglichen, die unter Verwendung des Programms ‚Clone Manager 7.01‘ am Computer geplant wurden.

2.8 Analyse von Proteinen

2.8.1 Antikörper, Liganden und Neuropeptide

Tab. 2.6: Für die Immundetektion eingesetzte Antikörper und die eingesetzten Endkonzentrationen.

Primärantikörper	Stammlösung	Konzentration für den Western Blot	Konzentration für die Immunfluoreszenz	Firma
Maus-anti-His ₆ , monoklonal	100 µg/ml	0,05 µg/ml	4 µg/ml	(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
Anti-Xpress™, konjugiert mit Peroxidase, monoklonal	250 µg/ml	0,05 µg/ml		(Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
Anti-Strep-Tactin, konjugiert mit Peroxidase	1000 µg/ml	0,25 µg/ml		(IBA, Göttingen)
Maus-anti-Hsp90, monoklonal	1000 µg/ml	1 µg/ml		Stressgen Bioreagents, Victoria, BC, Canada
Maus-anti-c-Myc 9E10- SC-40, monoklonal	200 µg/ml		4 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg)
Sekundärantikörper				
Ziege-anti-Maus IgG, konjugiert mit Peroxidase	800 µg/ml	0,08 bis 0,4 µg/ml		(Dianova, Hamburg)
Ziege-anti-Maus IgG, konjugiert mit Peroxidase	1000 µg/ml	0,5 µg/ml		(Upstate, Lake Placid, NY, USA)
Hase-anti-Maus IgG, konjugiert mit Peroxidase	800 µg/ml	0,4 µg/ml		(Dianova, Hamburg)
Esel-anti-Kaninchen IgG, konjugiert mit Peroxydase	800 µg/ml	0,4 µg/ml		(Dianova, Hamburg)
Alexa Flour 488, F(ab') ₂ Fragment Kaninchen-anti-Maus IgG (H+L)	2000 µg/ml		20 µg/ml	(Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
Ligand				
α-Latrotoxin	40-160 µg/ml			(RBI, Natick; Sigma, Deisenhoven)

Tab. 2.7 zeigt die für Bindungsstudien eingesetzten Neuropeptide, das kodierende Gen aus *C. elegans*, die Aminosäuresequenz und ihr Molekulargewicht. Die Synthese der Peptide erfolgte durch die Firma ‚JPT Peptide Technologies GmbH‘ (Berlin).

Neuropeptid	Gen	Sequenz	Molekulargewicht
PF1	<i>flp-1</i>	SDPNFLRFamid	993 g/mol
PF2	<i>flp-1</i>	SADPNFLRFamid	1064 g/mol
AF11	<i>flp-1</i>	SDIGISEPNFLRFamid	1492 g/mol
AF5	<i>flp-4</i>	SGKPTFIRFamid	1050 g/mol
AF8/PF3	<i>flp-6</i>	KSAYMRFamid	900 g/mol
AF1	<i>flp-8</i>	KNEFIRFamid	951 g/mol
AF19	<i>flp-13</i>	AEGLSSPLIRFamid	1187 g/mol
AF2	<i>flp-14</i>	KHEYLRFamid	990 g/mol
AF4	<i>flp-18</i>	GDVPGVLRFamid	951 g/mol
AF10	<i>flp-18</i>	GFGDEMSMPGVLRFamid	1540 g/mol
AF12	<i>flp-18</i>	FGDEMSMPGVLRFamid	1483 g/mol
AF19random		SPGSLIRLFEAamid	1187 g/mol

2.8.2 Proteinextrakte aus *C. elegans*

5 g bei -80 °C gefrorener *C. elegans*-Würmer wurden in einem vorgekühlten Mörser unter häufiger Zugabe von flüssigem Stickstoff pulverisiert. Das Pulver wurde anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und in 5 Volumen Homogenisierungspuffer (einschließlich Complete Mini Protease-Inhibitor-Cocktail, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) aufgenommen. Nach einer Ultraschallbehandlung zur Fragmentierung genomischer DNA wurde der Proteinextrakt für 60 min bei $100.000 \times g$ mit einem 70 Ti-Rotor in einer L7-65 Zentrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) zentrifugiert. Die opake obere Phase wurde verworfen und der übrige Überstand erneut bei $100.000 \times g$ für 30 min zentrifugiert. Die Pellets wurden in jeweils 2 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand durch ein Filtrationsmaterial mit einer Porengröße von 22-25 μm (Miracloth, Calbiochem, San Diego, CA, USA) filtriert, in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.8.3 Proteinextrakte aus *E. coli*

2 ml einer stationären *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert, einmal mit dH_2O gewaschen und in 150-300 μl dH_2O resuspendiert. Die entsprechende Menge 4 \times RotiLoad-Ladungspuffer (Roth, Karlsruhe) wurde hinzugegeben und die Probe für 5 min in kochendem Wasser denaturiert. Anschließend wurde die genomische DNA im Ansatz durch eine kurze Ultraschall-Behandlung fragmentiert und jeweils 10-20 μl dieser Probe auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.8.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des ‚BioRad Protein Assays‘ (BioRad, München) nach Bradford (1976). Für die Messung wurde die Probe mit dH_2O auf ein Volumen von 800 μl aufgefüllt, mit 200 μl Bradfordreagenz in einer Einwegküvette

gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm in einem DU 64 Spektralphotometer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) die Extinktion gemessen und durch Vergleich mit einer BSA-Eichgeraden die Proteinkonzentration ermittelt. Des Weiteren erfolgte eine Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des ‚CB-X™ Protein Assays‘ (Geno Technology, Inc., St. Louis, MO, USA). Diese Methode bietet den Vorteil, dass sie mit Detergenzien kompatibel ist. Für die Proteinbestimmung wurden 5-100 μ l der zu testenden Probe in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt, 1 ml auf -20 °C vorgekühltes ‚CB-X Reagenz‘ hinzugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 21.000 g (Biofuge Primo R, Heraeus Holding GmbH, Hanau) zentrifugiert und anschließend, ohne das Pellet zu zerstören, der gesamte Überstand abgenommen. Die Proteine wurden in 50 μ l ‚Solubilization Buffer I‘ und 50 μ l ‚Solubilization Buffer II‘ aufgenommen, vollständig resuspendiert, anschließend mit 1 ml ‚CB-X Assay Dye‘ versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde gegen dH₂O bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm bestimmt. Die entsprechende Proteinkonzentration konnte dann der vom Hersteller beigelegten Tabelle entnommen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Proteinbestimmung Detergenz-haltiger Lösungen bestand in der Verwendung des ‚Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kits‘ (Pierce, Bonn). Für die Messung wurden 250 μ l ‚Micro BCA™ Reagent MA‘ mit 240 μ l ‚Micro BCA™ Reagent MB‘ und 10 μ l ‚Micro BCA™ Reagent MC‘ vermischt, die Proteinprobe zugegeben und mit dH₂O auf ein Volumen von 1000 μ l aufgefüllt. Nach einer Inkubation für 60 min bei 60 °C wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm in einem DU 64 Spektralphotometer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) die Extinktion gemessen. Durch den Vergleich mit einer BSA-Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

2.8.5 Entsalzung, Umpufferung und Konzentrierung von Proteinen

Proben bis zu einem Volumen von 2,5 ml konnten durch eine Ausschlusschromatographie unter Verwendung der ‚PD-10 Desalting columns‘ (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) entsalzt werden. Für Probenvolumina zwischen 20 μ l und 500 μ l wurden zur Entsalzung ‚Spin-Out™ GT-1200 Medi‘-Säulen (GenoTechnology, Inc., St. Louis, MO, USA) verwendet. Sie sind geeignet für Proteine mit einem Molekulargewicht > 12.000 Da. Je nach Probenvolumen und Molekulargewicht des zu entsalzenden oder umzupuffernden Proteins wurden außerdem verschiedene Ultrazentrifugalfilter verwendet: ‚Centricon® Centrifugal Filter Devices, YM-3 (3000 MWCO)‘ (Millipore GmbH, Schwalbach), ‚Vivaspin 15 R Concentrator, 5000 MWCO HY‘ (Sartorius AG, Göttingen), ‚Vivaspin 15 R Concentrator 10000 MWCO HY‘ (Sartorius AG, Göttingen), ‚Centrex® UF-2 Centrifugal Ultrafilters, 10 K MWCO unit‘ (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel), ‚Vivaspin Concentrator, 100000 MWCO PES‘ (Sartorius AG, Göttingen), ‚Amicon® Ultra Centrifugal Filter Devices, 100000 MWCO‘ (Millipore GmbH, Schwalbach). Des Weiteren wurden ‚Slide-A-Lyzer™ 10 K Dialysis Cassettes‘ (Pierce, Bonn) zur Dialyse von Proben eines

Volumens von 0,5 bis 3 ml verwendet. Zur Konzentrierung von Proteinproben wurde das ‚Column PROTEIN Concentrate™ Kit‘ (GenoTechnology, Inc., St.Louis, MO, USA) verwendet. Es handelt sich hierbei um Säulen, die alle Proteine in Puffern mit niedriger Salzkonzentration mit einem pH-Wert zwischen 2 und 12 binden. Die Anwendung erfolgte jeweils nach Angaben der Hersteller.

2.8.6 Präzipitation von Proteinen

Je nach Verwendung der Proteinproben kamen verschiedene Präzipitationsmethoden zur Anwendung. Eine Präzipitation mit Methanol und Chloroform erfolgte zur Entfernung von Salzen und Detergenzien. Hierzu wurden der Probe vier Volumen Methanol und ein Volumen Chloroform zugesetzt und intensiv gemischt. Als nächstes wurden drei Probenvolumen dH₂O hinzugegeben, gevortext und bei 14.000 × g eine Minute zentrifugiert (Biofuge Primo R, Heraeus Holding GmbH, Hanau). Die obere, wässrige Schicht wurde entfernt, während die Proteine sich in der Interphase befanden. Erneut wurden drei Ausgangsvolumen Methanol zugesetzt und gut gemischt. Nach einer Zentrifugation von zwei Minuten bei 14.000 × g (Biofuge Primo R, Heraeus Holding GmbH, Hanau) wurde der gesamte Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Für eine Präzipitation mit Aceton wurde einem Probenvolumen vier Volumen eiskaltes Aceton hinzugefügt und für 10 min bei –80 °C oder für mindestens 90 min bei –20 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Probe für 15 min bei 4 °C und 15.000 × g (Biofuge Primo R, Heraeus Holding GmbH, Hanau) zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet getrocknet. Eine weitere Methode bestand in der Verwendung von Trichloressigsäure. Die zu fällenden Proben wurden mit Hilfe einer TCA-Stammlösung auf eine Konzentration von 6 % eingestellt und für 60 min bei 4 °C inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation bei 15.000 × g und 4 °C (Biofuge Primo R, Heraeus Holding GmbH, Hanau) für 45 min; der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl dH₂O resuspendiert und mit vier Volumen Aceton erneut für 10 min bei –80 °C oder für mindestens 90 min bei –20 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 15.000 × g (Biofuge Primo R, Heraeus Holding GmbH, Hanau) wurde der Überstand entfernt und das Pellet getrocknet. Zur Erhaltung der nativen Struktur der Proteine bei der Fällung wurde das ‚OrgoSol PROTEIN Concentrate™ Kit‘ (GenoTechnology, Inc., St. Louis, MO, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

2.8.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach der Methode von Lämmli (1970). Die Proben wurden in 1 × RotiLoad-Ladungspuffer (Roth, Karlsruhe) aufgenommen und für 5 min bei 100 °C im Wasserbad denaturiert. Die Prozentigkeit der verwendeten PAA-Gele wurde je nach Größe der aufzutrennenden Proteine variiert (Tabelle 2.8 und 2.9). Als Größenstandards wurden ‚Roti®Mark 10–150‘ (Roth, Karlsruhe), ‚PageRuler™ Prestained Protein Ladder‘ (Fermentas, St. Leon-Roth) oder ‚Prestained Protein Molecular Weight Marker‘ (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Die Gele wurden entweder in einer ‚Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell‘- (8 × 10 × 0,1 cm; BioRad, München) oder in einer ‚2001

Vertical Electrophoresis Unit²-Gelkammer (16 × 18 × 0,15 cm; LKB Produkter AK, Bromma, Schweden) gegossen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 1-3 h in einer vertikalen Flachgelapparatur in Laufpuffer. Zum besseren Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde zunächst eine Spannung von 8 V/cm angelegt und diese anschließend auf 15 V/cm erhöht.

Für die Auftrennung von Proteinen über einen großen Molekulargewichtsbereich, wurden Gradientengele verwendet, die deutlich schärfere Banden ergeben. Diese Gradientengele wurden mit Hilfe einer Gradientenmischapparatur hergestellt. Dafür wurde der Gradientenmischer auf einem Magnetrührer oberhalb des Gießstandes platziert, so dass die Acrylamidlösung ohne Probleme in die darunterliegende Gelapparatur fließen konnte. Die verschiedenen Gellösungen wurden vorab vorbereitet (Tabelle 2.10 und 2.11). Zunächst wurde das hintere Reservoir mit der Acrylamidmischung mit niedrigerer Konzentration befüllt, dann der Kanal zwischen beiden Kammern durch das Öffnen des Verbindungshahns geflutet und anschließend die schwerere Acrylamidlösung höherer Konzentration in die vordere Kammer gegeben. Diese schwere Lösung, welche mit einer Spatelspitze Brilliantblau gefärbt war, wurde mit Hilfe eines Rührfisches konstant gemischt. Bevor Verbindungskanal und Auslass endgültig geöffnet wurden, wurden beide Lösungen mit APS versetzt.

Gemische aus Proteinen mit sehr kleinem Molekulargewicht wurden mit Hilfe des Tricin-Gelsystems nach Schägger und von Jagow (1987) aufgetrennt (Tabelle 2.12). Dieses ist dem klassischen Glycin-System besonders in einem Bereich von 5 bis 20 kDa stark überlegen. Das zusätzliche ‚Spacergel‘ zwischen Trenn- und Sammelgel bewirkt, dass die Proteine vor Einlauf in das Sammelgel zu einem Stapel sehr dünner Proteinbanden konzentriert werden. Für die Elektrophorese wurden die entsprechenden Laufpuffer (Kathodenpuffer und Anodenpuffer) eingesetzt. Die Gele wurden nach der von Schägger und von Jagow (1987) empfohlenen Methode gefärbt (Kapitel 2.8.8).

Tab. 2.8: Zusammensetzung der Gellösung für zwei 8 × 10 × 0,1 cm große Gele

Trenngel	15 %	12,5 %	10 %	7,5 %	Sammelgel	5 %
Acrylamid-Stock	5,0 ml	4,2 ml	3,3 ml	2,5 ml	Acrylamid-Stock	0,75 ml
dH ₂ O	2,5 ml	3,3 ml	4,2 ml	5,0 ml	dH ₂ O	3 ml
4×Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	4×Sammelgelpuffer	1,25 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	TEMED	10 µl
APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	APS	20 µl

Tab. 2.9: Zusammensetzung der Gellösung für ein 16 × 18 × 0,15 cm großes Gel

Trenngel	15 %	12,5 %	10 %	7,5 %	Sammelgel	5 %
Acrylamid-Stock	15,0 ml	12,6 ml	9,9 ml	7,5 ml	Acrylamid-Stock	2,25 ml
dH ₂ O	7,5 ml	9,9 ml	12,6 ml	15 ml	dH ₂ O	9 ml
4×Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	4×Sammelgelpuffer	3,75 ml
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	TEMED	30 µl
APS	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	APS	60 µl

Tab. 2.10: Zusammensetzung der leichten Acrylamidlösung für ein Gradientengel von 16 × 18 × 0,15 cm.

Stammlösungen	5 %	6 %	7 %	8 %	9 %	10 %
Acrylamid-Bis (30 % T)	2,5 ml	3 ml	3,5 ml	4 ml	4,5 ml	5 ml
4xTrenngelpuffer	3,75 ml					
dH ₂ O	8,7 ml	8,2 ml	7,7 ml	7,2 ml	6,7 ml	6,2 ml
APS (10 %)	150 µl					
TEMED	15 µl					

Tab. 2.11: Zusammensetzung der schweren Acrylamidlösung für ein Gradientengel von 16 × 18 × 0,15 cm.

Stammlösungen	10 %	12 %	14 %	16 %	18 %	20 %
Acrylamid-Bis (30 % T)	5 ml	6 ml	7 ml	8 ml	9 ml	10 ml
4xTrenngelpuffer	3,75 ml					
dH ₂ O	5 ml	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml	0 ml
Saccharose (50 %)	2,25 ml					
APS (10 %)	150 µl					
TEMED	15 µl					

Tab. 2.12: Zusammensetzung der Acrylamidlösung für ein 16 × 18 × 0,15 cm großes Gel nach Schagger und von Jagow (1987):

Trenngel	16,5 %	„Spacergel“	9,6 %	Sammelgel	3,84 %
Acrylamid-Stock	13,75 ml	Acrylamid-Stock	3,2 ml	Acrylamid-Stock	1,3 ml
dH ₂ O	0,5 ml	dH ₂ O	3,5 ml	dH ₂ O	6,2 ml
Gelpuffer	8,3 ml	Gelpuffer	3,3 ml	Gelpuffer	2,5 ml
Glycerin	2,5 ml				
TEMED	30 µl	TEMED	20 µl	TEMED	20 µl
APS	300 µl	APS	100 µl	APS	100 µl

2.8.8 Färbung von Polyacrylamidgelen

Je nach gewünschter Sensitivität der PAA-Gelfärbungen wurden unterschiedliche Methoden eingesetzt. Folgende Färbelösungen und Kits wurden nach Herstellerangaben angewendet: ‚PlusOne™ Silver Staining Kit‘ (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg; Detektionsgrenze: 0,2-0,6 ng), ‚FOCUS FastSilver‘ (GenoTechnology, Inc., St.Louis, MO, USA; Detektionsgrenze: <1 ng), ‚LabSafe GEL Blue™‘ (GenoTechnology, Inc., St.Louis, MO, USA; Detektionsgrenze: 4 ng), ‚PageBlue™ Protein Staining Solution‘ (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; Detektionsgrenze: 5 ng), und ‚GelCode® Blue Stain Reagent‘ (Pierce, Bonn; Detektionsgrenze: 8 ng). Des Weiteren wurde die klassische Coomassie-Färbung mit Coomassie Brilliantblau R-250 eingesetzt (Detektionsgrenze: 0,3–1 µg). Die Gele wurden für mindestens 2 Stunden in der Coomassie Brilliantblau-Färbelösung inkubiert und anschließend in der Coomassie Brilliantblau-Entfärbelösung entfärbt, bis die Hintergrundfärbung vollständig entfernt war. Coomassie Brilliantblau G-250 ist eine, im Vergleich zu R-250, methylsubstituierte Form und besitzt deshalb eine reduzierte Löslichkeit. Der Farbstoff kann daher unter sauren Bedingungen hauptsächlich als kolloidale Dispersion auf das Gel aufgebracht werden. Der gelöste Anteil führt zur Anfärbung der Proteine, während die Hauptmasse des kolloidalen Farbstoffes nicht in das Gel eindringen kann. Dies führt zu einer beinahe hintergrundfreien Färbung der Proteine, wodurch ein extensives Auswaschen von überschüssigem Farbstoff überflüssig ist (Neuhoff *et al.*, 1988; Detektionsgrenze: 10 ng).

Zum Färben der Proteine nach beschriebener Methode wurden die Gele zunächst für 1 h mit 12%iger TCA fixiert, anschließend für mindestens 8 h in der kolloidalen Coomassie-Lösung inkubiert und schließlich mit 25 % Methanol gespült. Die Gele wurden zur Fixierung und Stabilisierung in 20 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aufbewahrt. Für die kolloidale Coomassie Brilliantblau-Färbung nach Kang *et al.* (2002; Detektionsgrenze: 1 ng) wurde das Gel für 30 min in Fixierlösung (Kang) fixiert, für mindestens 2 h in Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung (Kang) gefärbt und zur Erhöhung der Kontraste in Kontrastlösung gewaschen. Gele des Gelsystems nach Schägger und von Jagow (1987) wurden mit der empfohlenen Färbemethode gefärbt. Nach einer 60 minütigen Inkubation in Fixierlösung (Schägger und von Jagow) wurden die Gele für 1 bis 2 Stunden in Färbelösung (Schägger und von Jagow) inkubiert und für mindestens 2 Stunden oder über Nacht der Hintergrund mit Entfärbelösung (Schägger und von Jagow) entfärbt.

2.8.9 Renaturierung von Proteinen

Die Renaturierung der Proteine nach Lee *et al.* (1982) erfolgte nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Ein harnstoffhaltiger Renaturierungspuffer bewirkt durch Aufhebung hydrophober Wechselwirkungen eine partielle Entfernung des SDS (Eckert und Kartenbeck, 1997). Die Membran wurde hierzu nach Beendigung des Proteintransfers für 30 min bei Raumtemperatur in Renaturierungspuffer inkubiert, 10 min mit TST-Waschpuffer gewaschen, bevor mit der Immundetektion fortgefahren wurde (Kapitel 2.8.14).

2.8.10 Isoelektrische Fokussierung

Für die Isoelektrische Fokussierung wurde *C. elegans*-Proteinextrakt (200 µg, 300 µg, 400 µg oder 1200 µg) mit Trichloressigsäure präzipitiert (Kapitel 2.8.6) und die zu analysierenden Proben an die Firma IBA (Göttingen) geschickt. Dort wurden die Proben in einen 8 M Harnstoff enthaltenden Puffer aufgenommen und gegebenenfalls mit Hilfe eines ‚Vortex‘ bzw. mit Ultraschall resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurden die so aufgearbeiteten Proteine auf 13 cm lange IEF-Streifen bei 140000 Vh in einem pH-Bereich von ca. pH 3–9 bzw. 10 fokussiert und eingefroren. Vor der Auftrennung über SDS-PAGE wurde der jeweilige Streifen 10 min lang in Äquilibrierungspuffer mit 1 % DTT (w/v) inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 5 bis 12%igen Gradientengelen.

2.8.11 Massenspektroskopische Analyse von Proteinen

Gewünschte Protein-, ‚Spots‘ bzw. -banden wurden vorsichtig mit einem Skalpell aus dem PAA-Gel ausgeschnitten, dreimal je 5 min mit dH_2O gewaschen und getrocknet (SpeedVac® SPD111V, Refrigerated Vapor Trap RUT400, Vakuumpumpe VLP80 ValuPump, Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA). Proben aus Gelen, die mit dem ‚FOCUS FastSilver Kit‘ (GenoTechnology, Inc., St.Louis, MO, USA) gefärbt waren, wurden nach Anleitung des Herstellers für die Massenspektroskopie vorbereitet und getrocknet (SpeedVac® SPD111V, Refrigerated Vapor Trap RUT400, Vakuumpumpe VLP80 ValuPump, Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA). Danach wurden die Proben zur massenspektroskopischen Analyse an das Analytische Zentrallabor des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums

(BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität oder an die Firma IBA (Göttingen) weitergegeben. Dort wurden die Proteine aus der Gelmatrix isoliert und enzymatisch mit selektiv spaltenden Proteasen (hier Trypsin) für 7-16 h bei 37 °C verdaut. Die Molekülmassen der Spaltfragmente wurden in einem ESI-QqTOF Massenspektrometer bestimmt und mit entsprechenden Datenbanken verglichen.

2.8.12 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach der ‚Semi-Dry‘-Methode (Kyhse-Anderson, 1984) auf eine ‚Protran BA 85 Nitrozellulosemembran‘ (Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert. Dabei wurde ein kontinuierliches Puffer-System (Lihme *et al.*, 1986) verwendet, bei dem nur die in Transferpuffer getränkten Lagen Filterpapier (Whatman Ltd., Maidstone, England) zwischen zwei Graphitplatten (Biometra Fast Blot, Göttingen) als Pufferreservoir dienen. Zwischen diesen Graphitplatten wurde ein homogenes elektrisches Feld erzeugt, worin die Proteine bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² für 1 h aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran übertragen wurden.

2.8.13 Färbung von Nitrozellulosemembranen

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Western Blot reversibel mit Ponceau S angefärbt und mit dH₂O wieder entfärbt. Die Nitrozellulosemembranen der 2D-Experimente wurden nach der Immundetektion mit schwarzer Tusche (Fount India, Pelikan Vertriebsgesellschaft mbH, Hannover) angefärbt. Zu diesem Zweck wurden 20 ml Tusche mit 20 ml PBS/0,05 % Tween 20 vermischt und die Lösung filtriert. Die Membran wurde dreimal für jeweils 10 min in PBS/0,05 % Tween 20 geschwenkt, bevor sie für mindestens 3 h oder über Nacht mit der Färbelösung inkubiert wurde. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte durch mehrfache Waschschrte in PBS/0,05 % Tween 20.

2.8.14 Immundetektion

Die Nitrozellulosemembran wurde für 1 h mit 1×RotiBlock-Lösung (Roth, Karlsruhe) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde diese Blockierungslösung gegen den in 1×RotiBlock-Lösung (Roth, Karlsruhe) verdünnten Primärantikörper (Tabelle 2.6) ausgetauscht. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran dreimal für insgesamt 30 min mit TST-Waschpuffer gewaschen, um den nicht gebundenen Überschuss an Primärantikörper zu entfernen. Dann wurde der in 1 × RotiBlock-Lösung (Roth, Karlsruhe) verdünnte Sekundärantikörper (Tabelle 2.6) für 1 h bei Raumtemperatur hinzugegeben. Erneut wurde dreimal für insgesamt 30 min mit TST-Waschpuffer gewaschen. Als Sekundärantikörper dienten Meerrettich-Peroxidasegekoppelte Antikörper. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte nun durch die Erzeugung von Chemilumineszenz mit Hilfe des ‚ECL Western Blotting Detektionssystem‘ (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg), des ‚ECL Advance Western Blotting Detection Kit‘ (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg), des ‚Visualizer™ Western Blot Detection Kit, mouse‘ (Upstate, Charlottesville, VI, USA) oder des ‚ECL Western

Blotting Substrate' (Pierce, Bonn) in Anlehnung an Roswell und White (1978). Die Anwendung erfolgte nach Angaben der Hersteller. Anschließend wurden die Membranen luftblasenfrei zwischen zwei Overheadfolien und in eine Filmkassette gelegt. Die Exposition erfolgte auf ‚ECL Hyperfilm‘ (Amersham Pharmacia, Freiburg) für 30 s bis über Nacht bei Raumtemperatur. Zum Entwickeln wurde der Film für 1 bis 5 min in Entwicklerlösung überführt. Nach einem kurzen Wässerungsschritt in einem VE-Wasserbad wurde der Film in Fixierlösung so lange fixiert, bis ein klarer Hintergrund zu erkennen war. Abschließend folgte ein weiterer gründlicher Wässerungsschritt, bevor der Film zum Trocknen aufgehängt wurde.

2.8.15 Bindungsexperimente an Nitrozellulosemembranen

Für die Detektion HC110-R-bindender Proteine aus *C. elegans*-Proteinextrakten wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Proteintransfer zunächst für 30 min in Renaturierungspuffer inkubiert und anschließend 60 min in $1 \times$ RotiBlock-Lösung (Roth, Karlsruhe) geschüttelt. Daraufhin folgte unter Schütteln ein zweistündiger Inkubationsschritt mit dem in TST-Puffer verdünnten Liganden (das Fusionsprotein des Klons pASK44-HC Δ 22-535 bzw. des Klons pRSET-HC Δ 1-445; Konzentration mehrere μ g/ 20 ml). Der Ligandenlösung war entweder 1 mM des Proteaseinhibitors PMSF oder nach Herstellerangaben ‚Pefabloc SC Plus‘ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) hinzugesetzt. Nach dreimaligem Waschen der Membran für insgesamt 30 min mit TST-Waschpuffer, erfolgte die Immundetektion gegen die ‚Tags‘ der Fusionsproteine. Die Immundetektion wurde, wie in Kapitel 2.8.14 beschrieben, durchgeführt.

Alternativ wurden Bindungsexperimente zur Überprüfung der Bindung des Fusionsprotein des Klons pET-DAF Δ 1-702 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HC Δ 1-445 durchgeführt. Der Gesamtproteinextrakt einer *E. coli*-Expressionskultur des 54 kDa großen Fusionsproteins des Klons pRSET-HC Δ 1-445 wurde auf einem PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mit dieser wurde verfahren, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Es erfolgte jedoch keine Renaturierung der Proteine auf der Membran. Inkubiert wurde die Membran mit dem in TST-Puffer verdünnten Fusionsprotein des Klons pET-DAF Δ 1-702. Die Immundetektion zum Nachweis einer Bindung erfolgte mit einem Maus-anti-Hsp90-Antikörper (Tabelle 2.6) nach dem in Kapitel 2.8.14 beschriebenen Protokoll.

2.8.16 Kopplung von Proteinen an Magnetpartikel

Für Bindungsexperimente wurden das Fusionsprotein des Klons pRSET-HC Δ 1-445 bzw. des Klons pASK44-HC Δ 22-535 kovalent an ‚Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid‘ (DynaL Biotech GmbH, Hamburg) gebunden. Eingesetzt wurden mindestens 1×10^7 Magnetpartikel pro 3 μ g des Liganden. Aufgrund der ungünstigen Eigenschaften der Magnetpartikel nach der Aktivierung wurden nur silikonisierte (Silicone solution Serva, in isopropanol; Serva, Heidelberg) Reaktionsgefäße verwendet. Die Magnetpartikel wurden nach der Entnahme in einem ersten Schritt zweimal für 5 min mit 10 mM NaOH gewaschen. Darauf folgten drei Waschschrte mit dH₂O, bevor zur Aktivierung der Oberfläche mindestens 100 μ l bis 200 μ l

EDC (75 mg/ml) pro 2×10^8 Magnetpartikel zugegeben wurden. Die Inkubation erfolgte für 30 min rotierend bei Raumtemperatur. Die aktivierten Partikel wurden dann möglichst schnell zweimal mit dH₂O gewaschen, damit es nicht zu einer Hydrolyse der funktionellen Gruppen kommen konnte. Zur Immobilisierung wurde als nächstes der in 10 mM MES-Puffer (pH 5,0) verdünnte Ligand hinzugegeben und für zwei Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Probe einer entsprechenden Menge Magnetpartikel in 10 mM MES-Puffer (pH 5,0) ohne Protein inkubiert. Zur Überprüfung des Kopplungserfolgs wurde die Proteinkonzentration des Überstands nach der Reaktion bestimmt (Kapitel 2.8.4). Eine Deaktivierung der Oberfläche erfolgte für 15 min mit 50 mM Tris (pH 7,4) bei Raumtemperatur, gefolgt von einem viermaligen Waschen mit PBS⁻/0,1 % BSA.

Alternativ erfolgte eine Kopplung über das 6×His-,Tag' des Fusionsproteins des Klons pASK44-HCΔ22-535 an 'His-Select™ Magnetic Agarose Beads' (Sigma, Deisenhofen). Eingesetzt wurden 10 µl Magnetpartikelsuspension zur Bindung von 75 µg Protein. Vor Zugabe des Liganden wurden die Magnetpartikel zweimal mit LEW-Puffer gewaschen. Dann wurde der Ligand hinzugegeben und für zwei Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein entsprechendes Aliquot Partikel nur mit Puffer inkubiert. Nach der Bindereaktion erfolgte eine Erfolgskontrolle durch Bestimmung der Proteinkonzentration des Überstandes (Kapitel 2.8.4). In einem letzten Schritt wurden die Partikel erneut fünfmal mit LEW-Puffer gewaschen.

2.8.17 Bindungsexperimente an Magnetpartikeln

Für die Bindungsexperimente an Magnetpartikeln wurde, wie in Kapitel 2.8.16 beschrieben, das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCΔ1-445 bzw. des Klons pASK44-HCΔ22-535 an Magnetpartikel gebunden und diese für Bindungsassays eingesetzt. Die Partikel wurden zur Suche potentieller Bindungspartner des Rezeptors HC110-R mit 3,5 bis 12,4 mg *C. elegans*-Proteinextrakt (Kapitel 2.8.2) über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben achtmal mit Homogenisierungspuffer gewaschen und gebundene Proteine zweimal mit Elutionslösung Pull-Down Assay III bzw. einmal mit Elutionspuffer Pull-Down Assay I und zweimal mit Elutionspuffer Pull-Down Assay II für 10 min bei 4 °C eluiert. Die Eluatfraktionen wurden vereinigt, mit Trichloressigsäure präzipitiert (Kapitel 2.8.6) oder mit Hilfe einer 'Spin-Out™ GT-1200 Medi'-Säule (GenoTechnology, Inc., St.Louis, MO, USA; Kapitel 2.8.5) entsalzt und getrocknet (SpeedVac® SPD111V, Refrigerated Vapor Trap RUT400, Vakuumpumpe VLP80 ValuPump, Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA). Die Auftrennung erfolgte in Polyacrylamid-Gradientengelen oder auf PAA-Gelen nach Schägger und von Jagow (1987; Kapitel 2.8.7).

Alternativ wurde *C. elegans*-Proteinextrakt mittels eines Vivaspin 15 R Concentrators, 10000 MWCO HY (Sartorius AG, Göttingen) fraktioniert und die Proteinfraction >10 kDa für Bindungsexperimente mit Magnetpartikeln eingesetzt. Ein Aliquot mit dem Fusionsprotein des Klons pRSET-HCΔ1-445 gekoppelter Magnetpartikel wurde mit 40 µg bis 160 µg des Proteinextraktes sukzessive rotierend bei 4 °C inkubiert. Es folgte fünfmaliges Waschen mit PBS⁻ und eine Elution mit 100 µl dH₂O für 10 min bei 75 °C. Das Eluat wurde zur

massenspektroskopischen Analyse an das Analytischen Zentrallabor des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität weitergegeben.

Für die Überprüfung der Bindung des Fusionsproteins des Klons pET-DAFΔ1-702 an den Aminoterminus des Rezeptors HC110-R wurde einer der Bindungspartner chemisch an Magnetpartikel gebunden (Kapitel 2.8.16) und der zweite Bindungspartner im mindestens äquimolaren Verhältnis hinzugegeben. Eine Inkubation erfolgte bei 4 °C rotierend über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Proben zehnmal mit PBS⁻ gewaschen, 1 × RotiLoad (Roth, Karlsruhe) hinzugefügt, die Proteine für 5 min bei 100 °C denaturiert und in Polyacrylamid-Gradientengelen aufgetrennt (Kapitel 2.8.7).

2.8.18 ‚Reversed Phase‘-HPLC

Die Reinheit der in *E. coli* exprimierten und chromatographisch aufgereinigten Fusionsproteine (Kapitel 2.9.5, 2.9.6) wurde mittels einer ‚Reversed Phase‘-HPLC überprüft. Verwendet wurde das ‚Beckman System Gold‘ (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) mit dem Pumpenmodul ‚Beckman System Gold 125 mit Rheodyne-Probenventil 7725i‘ und 20 µl Probenschleife. Die Detektion erfolgte mit dem UV-Detektor ‚Beckman System Gold 166‘. Gesteuert wurde das System mit der Computersoftware ‚Beckman Gold V712‘ (1993). Zum Schutz der Hauptsäule wurde dieser eine weitere Säule vorgeschaltet (Supelco Discovery BIO WidePore C5, Guard Column, 2 cm × 4 mm, 3 µm, Supelco Bellefonte, PA, USA); die Auftrennung der Probenproteine erfolgte mittels einer zweiten Säule (Supelco Discovery BIO WidePore C5, 15 cm × 4,6 mm, 5 µm, Supelco Bellefonte, PA, USA). Detektiert wurde die Absorption der Aromaten bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Flussrate betrug immer 1 ml pro min, zum Einsatz kamen jedoch verschiedene Elutionsprogramme (Tabelle 2.13).

Tab. 2.13: Elutionsprogramme der HPLC-Analyse

Programm	Lösungen	Elutionsgradient	Laufzeit
1	HPLC-Lösung A, HPLC-Lösung B	0 % B bis 100 % B	60 min
2	HPLC-Lösung C, HPLC-Lösung D	35 % D bis 100 % D	30 min
3	HPLC-Lösung A, HPLC-Lösung D	0 % D bis 100 % D	30 min

2.9 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

2.9.1 Expression der Fusionsproteine der Klone pASK4-HCA22-535 und pASK44-HCA22-535

Die Vektoren pASK-IBA4 und pASK-IBA44 (IBA, Göttingen) wurden für die Expression eines den gesamten Aminoterminus des Rezeptors umfassenden Fusionsproteins (AS 22-535) verwendet. Die Amplifikation der Fragmente erfolgte mit Hilfe der Oligonukleotide pASK-for und pASK-rev bzw. pASK-for und pASK44rev (Kapitel 2.7.8). Die PCR-Produkte wurden mit dem Restriktionsenzym Bsa I restringiert und gerichtet in den ebenfalls mit Bsa I linearisierten Expressionsvektor pASK-IBA4 bzw. pASK-IBA44 ligiert (Kapitel 2.7.9). Zur Expression der Fusionsproteine wurden die Klone in *E. coli* BL21-Zellen transformiert. Eine Einzelkolonie mit dem gewünschten HC110-R-Plasmid wurde zum Animpfen einer

Übernachtskultur mit 50 µg/ml Ampicillin (oder Carbenicillin) verwendet und diese bei 280 rpm und 37 °C inkubiert. Nach der Transformation wurden die Zellen der Stammpalte nur maximal eine Woche verwendet. Aus diesen Vorkulturen wurden 20 ml bis 500 ml große Expressionskulturen unter gleichem Selektionsdruck inokuliert und bei 37 °C und 280 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ inkubiert. Vor der Induktion wurde eine Probe der Kultur von 2 ml als nicht-induzierte Negativkontrolle abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Zugabe des Induktors Anhydrotetracyclin (0,2 µg/ml) induziert und die Kultur für weitere 3 bis 4 h bei 37 °C und 280 rpm inkubiert. Der Erfolg der Expression wurde durch Auftrennung der Gesamtproteinextrakte der Expressionskulturen und der nicht induzierten Kontrolle in einem PAA-Gel (Kapitel 2.8.7) überprüft.

2.9.2 Expression der Fusionsproteine der Klone pRSET-HCΔ1-445 und pRSET-HCΔ797-986

Die Klone pRSET-HCΔ1-445 und pRSET-HCΔ797-986 (Saeger, 2001), im Expressionsvektor pRSET B, umfassen die Aminosäuren 1-445 bzw. 797-986. Die Expression erfolgte wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben, jedoch wurde zur Induktion der Expression 4 mM IPTG eingesetzt.

2.9.3 Expression des Fusionsproteins des Klons pET-DAFΔ1-702

Der Klon pET-DAFΔ1-702 beinhaltet das gesamte Protein Daf-21 (AS 1-702). Zur Amplifikation wurden die Oligonukleotide pET100-DAF21-for und pET100-DAF21-rev verwendet und das Produkt mit Hilfe des ‚Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits‘ (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben in den Expressionsvektor pET100/D-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Die Expression erfolgte wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben. Es wurden jedoch für die Induktion 1 mM IPTG eingesetzt.

2.9.4 Zellaufschluss der Expressionskulturen

Die Expressionskulturen wurden nach der Inkubation durch Zentrifugation bei $2700 \times g$ (Avanti™ J-25, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) geerntet und die Zellen aufgeschlossen. Dies erfolgte mit Hilfe verschiedener Methoden je nach Verwendung. Zum einen wurde das nicht denaturierend wirkende Reagenz ‚BugBuster® Master Mix‘ (Novagen, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben verwendet, zum anderen wurde das Zellpellet in LEW-Puffer (Macherey-Nagel) oder Waschpuffer (IBA) resuspendiert und die Zellen durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C, gefolgt von einer Ultraschallbehandlung, aufgeschlossen. Eine dritte Variante war die Zugabe von Lysozym (Lysozyme from hen egg white, 97940 U/mg; Fluka, Neu Ulm; ca. 30 mg/Pellet einer 500 ml-Kultur) und DNase I (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; ca. 15 U/Pellet einer 500 ml-Kultur) zu einem in LEW-Puffer (Macherey-Nagel) oder Waschpuffer (IBA) resuspendierten Zellpellet und nachfolgender Ultraschallbehandlung. Nach vollständigem Aufschluss der Zellen erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei $27.000 \times g$ unter Verwendung eines JA20-

Rotors (Avanti™ J-25, Beckman Coulter GmbH, Krefeld). Mittels SDS-PAGE wurde nun untersucht, ob sich das exprimierte Protein in löslicher Form im Überstand (Klone pRSET-HCA797-986 und pET-DAFΔ1-702) oder als Inklusionskörper im Pellet (Klone pRSET-HCA1-445, pASK44-HCA22-535 und pASK4-HCA22-535) befand. Die Proteine im Überstand wurden je nach fusioniertem ‚Tag‘ mittels Affinitätschromatographie bzw. Metallaffinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt.

Um die Inklusionskörper zu waschen, wurde das Pellet erneut in Inclusionbody-Waschpuffer I resuspendiert und für 15 min bei $27.000 \times g$ unter Verwendung eines JA20-Rotors (Avanti™ J-25, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Inclusionbody-Waschpuffer II aufgenommen und für 15 min bei $27.000 \times g$ zentrifugiert. Nach diesen drei Waschschrritten erfolgte die Denaturierung der Inklusionskörper mit einem 6 M Guanidin-haltigen Puffer (Inclusionbody Puffer I). Unlösliche Bestandteile wurden für 30 min bei $27.000 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand für die Chromatographie eingesetzt.

2.9.5 Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatographie

Für die Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie wurde das ‚Strep-Tag® Starter Kit‘ (IBA GmbH, Göttingen) bzw. das ‚Strep/His Starter Kit‘ (IBA GmbH, Göttingen) verwendet. Die Säulen mit einer Strep-Tactin® Matrix wurden mit zwei Säulenvolumen Waschpuffer (IBA) äquilibriert, bevor das Lysat des Zellaufschlusses hinzugegeben wurde. Nach der Beladung der Säule erfolgte das Waschen mit mindestens 10 Säulenvolumen Waschpuffer (IBA). Eluiert wurde in sechs 0,5 Säulenvolumen-Fractionen mit Elutionspuffer (IBA). Die Reinheit der Aufreinigung wurde elektrophoretisch (Kapitel 2.8.7) überprüft. Zu diesem Zweck wurde ein Aliquot der Elution durch Präzipitation (Kapitel 2.8.6) oder mit Hilfe des ‚Spin-Out™ GT-1200 Medi‘ (GenoTechnology, Inc., St.Louis, MO, USA) nach Herstellerangaben entsalzt.

2.9.6 Proteinaufreinigung durch Metallaffinitätschromatographie (IMAC)

Die Aufreinigung mittels IMAC erfolgte mit Hilfe des ‚Protino® Ni 1000 prepacked columns kits‘ (Macherey-Nagel, Düren) oder der ‚TALONspin™ Columns‘ (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA). Aufreinigungen löslicher Proteine erfolgten durch Äquilibrieren der Säule mit zwei Säulenvolumen LEW-Puffer (Macherey-Nagel), gefolgt von der Zugabe des Lysats des Zellaufschlusses und dem Waschen mit einem Imidazolgradienten zur Minimierung unspezifischer Bindungen. Sukzessive wurde mit je 15 Säulenvolumen der LEW-Puffer I bis V (Macherey-Nagel) gewaschen. Eluiert wurde mit Elutionspuffer (Macherey-Nagel) in sechs Fractionen des 1,5fachen Säulenvolumens. Für die Aufreinigung der denaturierten Inklusionskörper wurde die Säule zuerst mit 2 Säulenvolumen Inclusionbody-Puffer II äquilibriert, die Proteinprobe aufgetragen und die Säule mit 20 Säulenvolumen Inclusionbody-Puffer II gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (IB) in sechs Fractionen des 1,5fachen Säulenvolumens.

2.10 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen

2.10.1 Auftauen von HEK-293-Zellen

Zum Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen der immortalisierten Zelllinie HEK-293 (Tabelle 2.2) wurden die Kryoröhrchen unmittelbar nach Entnahme in ein 37 °C-Wasserbad überführt. Die aufgetauten Zellen wurden mit einer sterilen Glaspipette in 10 ml auf 37 °C vorgewärmtes DMEM-Medium mit 10 % FCS transferiert, für 10 min bei 170 × g (Multifuge® 3L-R, Heraeus Holding GmbH, Hanau) pelletiert und schließlich in 10 ml frischem DMEM-Medium mit 20 % FCS aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in eine 100 mm/20 mm Gewebekulturschale (Cellstar®, Greiner Bio-One, Solingen) überführt und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Model 740, Hotpack, Warnminster, PA, USA) inkubiert.

2.10.2 Kultivierung von HEK-293-Zellen

Die Kultivierung der adhärenenten HEK-293-Zellen erfolgte in 100 mm/20 mm Gewebekulturschalen (Cellstar®, Greiner Bio-One, Solingen) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Model 740, Hotpack, Warnminster, PA, USA). Alle zwei bis drei Tage wurde die Konfluenz und die generelle Morphologie der Zellen unter dem Inversmikroskop (Modell IM 35, Zeiss, Oberkochen) kontrolliert und die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 subkultiviert. Dazu wurden diese mit Hilfe des Pipettenstrahls vom Boden der Kulturschalen gelöst und durch Auf- und Abpipettieren mit einer Glaspipette resuspendiert, um Zellkonglomerate aufzulösen. Das entsprechende Volumen dieser Suspension wurde mit frischem DMEM-Medium mit 10 % FCS wieder auf 10 ml aufgefüllt.

Stabil mit einem 116 kDa großen HC110-RMyc/6×His-Konstrukt in einem pIRES1*neo*-Vektor (Clontech, Palo Alto, USA) (Saeger, 2001) transfizierte HEK-293-Zellen wurden aufgetaut (Kapitel 2.10.1) und kultiviert. Eine Selektion erfolgte mit 1 mg/ml G 418 (G 418 sulfate, sterile-filtered aqueous solution, cell culture tested (Calbiochem, San Diego, CA, USA).

2.10.3 Kryokonservierung von HEK-293-Zellen

Zur Kryokonservierung wurden nur Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Sie wurden zunächst von der Gewebekulturschale gelöst (Kapitel 2.10.2) und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 10 min bei 170 g (Multifuge® 3L-R, Heraeus Holding GmbH, Hanau) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde dann in 70 % Medium und 20 % FCS resuspendiert, 10 % DMSO hinzugegeben und je 1 ml in ein Kryoröhrchen (Mikro-Schraubröhre, 2 ml, Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert. Die Proben wurden in einem bei 4 °C vorgekühlten ‚Stratacooler‘ (Stratagene, Heidelberg) bei –80 °C über Nacht gelagert. Diese Methode soll gewährleisten, dass die Zellen langsam abkühlen (ca. 1 °C pro min). Nach 24 h wurden die Kryogefäße in flüssigen Stickstoff überführt.

2.10.4 Detektion des HC110-R-Fusionsproteins in HEK-293-Zellen mittels Immunfluoreszenz

Zum Nachweis der heterologen Expression des 116 kDa großen HC110-R-Myc/6×His-Fusionsproteins (Saeger, 2000; Kapitel 2.10.2) in stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden für die Immunfluoreszenz ca. $0,5-1,5 \times 10^5$ Zellen auf ein steriles, mit 1 % Gelatine beschichtetes Deckgläschen in einer kleinen Gewebekulturschalen (35 mm) ausgebracht. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit über Nacht kultiviert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen dann vorsichtig zweimal mit PBS⁻ gewaschen und in Fixierlösung (Immunfluoreszenz) 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS⁻ wurden die Zellen für 10 min in 0,5 % Tween80/PBS⁻ inkubiert, zweimal mit PBS⁻ gewaschen und anschließend 30 min in Blocklösung (Immunfluoreszenz) inkubiert. Die Primärantikörperinkubation zum Nachweis eines der beiden ‚Tags‘ des Fusionsproteins (monoklonaler Maus-anti-His₆- oder monoklonaler Maus-anti-c Myc-Antikörper) (Tabelle 2.6), verdünnt in Blocklösung, erfolgte für 1-2 h bei RT. Um ein Austrocknen der Antikörperlösung zu verhindern, wurde in den Deckel der Platten ein nasses Filterpapier (Whatman Ltd., Maidstone, England) gelegt und die Schalen mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI USA) verschlossen. Nach drei weiteren Waschschriften mit PBS⁻ folgte die Inkubation mit dem polyklonalen Sekundärantikörper Alexa Flour 488, Kaninchen-anti-Maus (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Tabelle 2.6) für 45 min im Brutschrank (Model 740, Hotpack, Warnminster, PA, USA). Nach drei abschließenden Waschschriften mit PBS⁻ wurden die Proben auf Objektträgern in 20 µl Mowiol (Polyscience, Niles, IL, USA) mit 2 % DABCO (Merck, Darmstadt) versetzt eingebettet. Bis zur Aushärtung des Einbettmediums und somit zur Sichtung der Proben am konfokalen ‚Laserscanning‘ Mikroskop wurden sie über Nacht bei Raumtemperatur oder 4 °C, vor Licht geschützt, aufbewahrt.

2.10.5 Konfokale ‚Laserscanning‘-Mikroskopie

Zur Betrachtung der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zellen wurde ein Leica CLSM (‚Confocal Laserscanning Microscope‘) TCS NT, Version 1.5.451 (Leica Lasertechnik, Heidelberg) verwendet. Die Fluoreszenz des Alexa® 488-gekoppelten Sekundärantikörpers wurde durch einen Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Es wurde eine Auflösung von 1024 x 1024 Pixel gewählt. Die Analyse der Bilder erfolgte anschließend mit Hilfe der ‚AVS Software‘ (Advanced Visual Systems Inc., Waltham, MA, USA) und Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

2.11 Fluoreszenzspektroskopie

Mittels Lumineszenzspektroskopie wurde die intrazelluläre freie Ca²⁺-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) einer Zellsuspension bestimmt. Ein Ca²⁺-bindender Fluoreszenzfarbstoff wurde bei den Wellenlängen 340 nm bzw. 380 nm angeregt und die Emission bei 510 nm gemessen und aufgezeichnet. Die Messungen wurden mit dem Lumineszenzspektrometer ‚LS-55‘ (Perkin

Elmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim) und der dazugehörigen Software ‚FL Winlab 4.0‘ durchgeführt. Pro Messung wurden 1×10^6 wildtypisch bzw. stabil mit einem HC110-R-Myc/6xHis-Konstrukt transfizierte HEK-293-Zellen in einem Gesamtvolumen von 1,8 ml oder 2 ml Hank’s BSS eingesetzt. Für die Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurden die adhärennten Zellen zweimal vorsichtig mit Hank’s BSS gewaschen, anschließend für 30 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit mit 1 µM Fura-2/Acetoxymethylester (Fura-2/AM; 1 mM in DMSO; Sigma, Deisenhofen) in Hank’s BSS inkubiert und erneut einmal mit Hank’s BSS gewaschen. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 1×10^6 pro 2 ml mit Hank’s BSS eingestellt. Gemessen wurde bei 37 °C unter leichtem Rühren der Zellsuspension. 100 s nach Beginn der Messung erfolgte die Zugabe der ersten Substanz. Wurde noch eine zweite Substanz hinzugefügt, geschah dies nach 400 s. Die Messdauer betrug zwischen 10 und 20 min. Am Ende jeder Messung erfolgte eine Eichung der Probe. Zu diesem Zweck wurde für die Berechnung der absoluten $[Ca^{2+}]_i$ der R_{\min} -Wert und der R_{\max} -Wert bestimmt. Durch Zugabe von 25 µM Digitonin wurde der Farbstoff vollständig mit Ca^{2+} gesättigt (R_{\max} -Wert). Der R_{\min} -Wert konnte durch Entfernen des freien Ca^{2+} in der Zelle mit 4 mM EGTA bestimmt werden. Der pH-Wert in der Messküvette wurde durch gleichzeitige Zugabe von 70 µl 2 M Tris-Puffer auf pH 8,3 eingestellt (Lieberherr und Grosse, 1994). Unter Zuhilfenahme der Formel nach Grynkiewicz *et al.* (1985) war es möglich, nach jeder Messung quantitative Aussagen über die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ zu machen.

$$[Ca^{2+}]_i = f \cdot K_d \frac{R_t - R_{\min}}{R_{\max} - R_t} \quad (2.1)$$

Der R_{\max} -Wert gibt den Wert des Ca^{2+} -gesättigten Fluoreszenzfarbstoffes an, der R_{\min} -Wert den des ungebundenen Indikators, wenn sich demnach kein freies Ca^{2+} mehr in der Zelle befindet. Der Faktor f gilt als Maß für die Effektivität der Messung. Dazu wird bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm sowohl die Fluoreszenzemission des gesättigten Indikators gemessen als auch des freien Fura-2. Das daraus resultierende Verhältnis beschreibt den f-Wert. Nach Grynkiewicz *et al.* (1985) beträgt die Dissoziationskonstante K_d für Ca^{2+} bei 37 °C 224 nM. R_t beschreibt den Quotienten der Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm zum Zeitpunkt t. Die Bindung von Fura-2 an Ca^{2+} führt nicht nur zu einer Veränderung der Fluoreszenz, sondern auch zu einer Verschiebung der effektivsten Anregungswellenlänge von 365 nm auf 340 nm. Es existiert hierbei ein isobestischer Punkt bei 361 nm, der vollkommen unabhängig von der vorhandenen Ca^{2+} -Konzentration ist. Für quantitative Ca^{2+} -Analysen verwendet man am besten zwei Wellenlängen im gleichen Abstand zum isobestischen Punkt und mit den größten Netto-Unterschieden in Bezug zur Fluoreszenz bei einer Ca^{2+} -Beladung. Dies sind 340 nm für gebundenes Fura-2 und 380 nm für freies Fura-2.

Die Datenreihen wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm ‚Excel 2000‘ bzw. ‚Sigma Plot 9.0‘ importiert und ausgewertet.

2.12 Bindungsanalysen mittels eines Oberflächenplasmonresonanz-Biosensors (BIAcore)

Die Entwicklung von Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Biosensoren machte kinetische Analysen der meisten biomolekularen Interaktionen zugänglich (Karlsson, 2004). Das erste System der Firma Biacore AB (Freiburg) wurde 1990 vorgestellt und konnte zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen verwendet werden (Karlsson *et al.*, 1991). Seither wurde die Sensitivität der Messgeräte um das 20fache gesteigert (Karlsson, 2004). Die Systeme sind mittlerweile zu universell anwendbaren Forschungsgeräten geworden. Gleichzeitig ist die Anzahl der Sensoroberflächen gestiegen. Die 1990 eingeführte carboxymethylierte Dextran-Oberfläche (Löfas und Johnsson, 1990) wurde durch andere Oberflächen ergänzt (Karlsson und Löfas, 2002). Der CM5-Sensorchip (carboxymethylierte Dextran-Oberfläche) ist jedoch bis heute der vielseitigste und am weitesten verbreitete Sensorchip. Kovalent können Peptide oder Proteine über Aminkopplung (-NH₂), Thiolsulfidkopplung (-SH) oder Aldehydkopplung (-CHO) gebunden werden. Des Weiteren gibt es SA-Sensorchips mit immobilisiertem Streptavidin oder NTA-Sensorchips zur Immobilisierung rekombinanter Proteine über 6×His-, Tags'. Ein Vorteil dieses Sensorchips ist die Möglichkeit, die sterische Orientierung der Liganden zur optimalen Exposition zu kontrollieren. Eine korrekte sterische Orientierung kann ebenfalls erreicht werden, indem monoklonale Antikörper an einen CM5-Sensorchip gekoppelt und die Liganden auf diese Weise an die Oberfläche gebunden werden. Mittlerweile sind auch hydrophobe (HPA-Sensorchip) und lipophile (L1-Sensorchip) Sensorchips erhältlich. Aufgrund seiner hohen chemischen Stabilität und geringen unspezifischen Bindungen kann die Oberfläche eines Sensorchips, abhängig von der Art des immobilisierten Liganden, für zahlreiche Zyklen (durchschnittlich 100) wiederverwendet werden.

SPR-Biosensor Analysen sind mittlerweile als Methode zur Messung molekularer Interaktionen fest etabliert. SPR-Biosensoren finden für die Untersuchung der Interaktionen biologischer Systeme von Proteinen, Oligonukleotiden, Oligosacchariden, Lipiden, kleinen Molekülen, Phagen, viralen Partikeln und Zellen Anwendung (Rich und Myszka, 2000). Es besteht somit die Möglichkeit, Bindungsreaktionen in Echtzeit und ohne zusätzliche Markierungen der Bindungspartner zu charakterisieren. SPR-Biosensoren werden für eine Vielzahl von Fragestellungen bei der Untersuchung von biomolekularen Interaktionen angewendet. Die SPR-Technologie liefert sowohl qualitative Informationen, wie die Identifizierung von Bindungspartnern, Untersuchungen von Bindungsspezifitäten oder ‚Epitop mapping‘, als auch quantitative Informationen, wie die Messung von Reaktionskinetiken, Affinitätskonstanten und Konzentrationsanalysen (Torreri *et al.*, 2005). Bei sorgfältiger Durchführung der Experimente können Biosensoren zur Bestimmung der Stöchiometrie und des Reaktionsmechanismus verwendet werden (Rich und Myszka, 2000).

SPR-Biosensoren verwenden eine hochspezialisierte optische Technik, um Veränderungen des Brechungsindex der flüssigen Phase in der Nähe der Matrixoberfläche aufzunehmen. Das Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz tritt genau dann auf, wenn im Falle einer vollständigen Reflexion polarisiertes Licht eine Goldschicht an der Interphase zwischen einer

festen Trägerphase und einer flüssigen Phase bricht. Die beiden Phasen unterscheiden sich in ihrem Brechungsindex. Das Glas der Sensoroberfläche besitzt einen hohen und der Puffer einen niedrigen Brechungsindex. Einer der Bindungspartner, der so genannten Ligand, wird auf der Oberfläche immobilisiert und die Interaktion mit dem in der flüssigen Phase vorliegenden zweiten Bindungspartner, dem so genannte Analyten, aufgezeichnet (Abbildung 2.1). Das Messinstrument umfasst einen SPR-Detektor, einen Sensorchip und ein integriertes System zur Manipulation von Flüssigkeiten zum exakten Transport der Probe zum Ort der Absorption und Detektion.

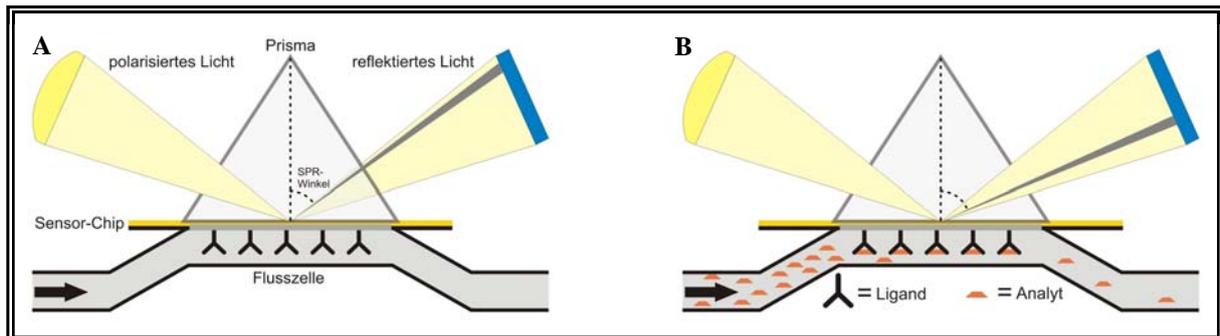


Abb. 2.1: SPR detektiert Veränderungen des Brechungsindex an der Grenzfläche zwischen einer Lösung und der Matrix eines Sensorchips. (A) Das Phänomen der SPR tritt in Form einer erniedrigten Intensität des reflektierten Lichtes in einem Winkel, abhängig vom Brechungsindex in der flüssigen Phase an der Oberfläche des Sensorchips, auf. (B) Binden Biomoleküle an die Oberfläche, ändert sich der Brechungsindex der Oberflächenschicht und es wird ein anderer SPR-Winkel gemessen. Vorlage gezeichnet nach ‚Biotechnology Handbook‘, Version AB, 1998, Biacore, Freiburg.

Der Sensorchip besteht aus einem Glasträger mit einem dünnen Goldfilm und einer Matrixschicht. Die Probe des Analyten wird mit Hilfe des Systems in einem kontinuierlichen und kontrollierten Fluss über die Oberfläche des Sensorchips geleitet. Eine gleichbleibende Konzentration des Analyten wird somit gewährleistet. Die Flusszellen sind für Probenvolumina $\geq 5 \mu\text{l}$ geeignet. Bei Bindung des Analyten an die Oberfläche steigt die Masse und nimmt bei der Dissoziation wieder ab. Dadurch kommt es zu Veränderungen des Brechungsindex an der Oberfläche. Dies wird in Form eines veränderten SPR-Signals detektiert und als Resonanzsignal aufgenommen. Ein so genanntes Sensorgramm stellt die Veränderungen des Resonanzsignals (RU = resonance unit; $1 \text{ RU} = 1 \text{ pg Protein pro mm}^2$, ‚Biotechnology Handbook‘, Version AB, 1998, Biacore, Freiburg) als eine Funktion der Zeit (s) dar. Der Fluss des Laufpuffers bildet die Basislinie. Bei Injektion einer Probe zeigt die Steigung der Kurve die Assoziation des Analyten an den immobilisierten Liganden an (Komplexbildung). Zur vollständigen Ablösung des Analyten wird eine Regenerierungslösung injiziert bis die Basislinie wieder erreicht ist. Die aufgezeichneten ‚Response Units‘ korrelieren direkt mit dem gebundenen Analyten (Torreri *et al.*, 2005).

Die in diesem Kapitel beschriebenen Messungen erfolgten an einem BIACORE 1000-Messgerät mit der ‚BIACORE 1000 Control Software 2.3‘ der Firma Biacore, Freiburg. Für die Auswertungen wurde die Software ‚BIAevaluation 4.1‘ verwendet.

2.12.1 Aminkopplung des Fusionsproteins des Klons pRSET-HCA1-445 an einen CM5-Chip

Ein Aliquot des Fusionsproteins des Klons pRSET-HCA1-445 wurde auf 11 µg pro ml und eine Konzentration von 10 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,5) eingestellt. Die Kopplung erfolgte mit Hilfe des ‚Amine Coupling Kits‘ (Biacore, Freiburg) an einen ‚CM5-Sensorchip‘ (Biacore, Freiburg). Bei einer Flussrate von 5 µl pro Minute wurde die Chipoberfläche mit 35 µl eines 1:1-Gemisches EDC (75 mg/ml) und NHS (115 mg/ml) aktiviert, gefolgt von einer Injektion von 100 µl des Fusionsproteins. Unbesetzte Bindungsstellen wurden mittels einer Injektion von 35 µl 1 M Ethanolamin abgesättigt. Die Ligandendichte nach der Beladung lag, abhängig vom Molekulargewicht des jeweiligen Peptids, bei 1000 bis 14000 RU. Die Kopplungsreaktion und alle folgenden Messungen wurden bei einer konstanten Temperatur des Systems von 25 °C durchgeführt.

2.12.2 Bindungsanalysen mit Neuropeptiden

Die für die Bindungsanalysen eingesetzten Neuropeptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin) synthetisiert. Es erfolgte eine Überprüfung der Synthese der Peptide durch die Firma mittels Massenspektrometrie und HPLC. Die verwendeten Peptide sind in Tabelle 2.7 zusammengefasst. Die lyophilisierten Peptide wurden in dH₂O resuspendiert, aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

Für Bindungsanalysen der Neuropeptide wurde der Ligand, das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445, an einen CM5-Sensorchip gekoppelt (Kapitel 2.12.1). Als Laufpuffer wurde der Biacore-Puffer I bzw. Biacore-Puffer II verwendet. Verschiedene Verdünnungen der Neuropeptide (zwischen 500 nM und 400 µM) in Biacore-Puffer I bzw. Biacore-Puffer II wurden bei einer Flussrate von 30 µl/min unter Verwendung der ‚Kinject‘-Funktion des Programms für 3 min injiziert. Daraufhin folgte eine Dissoziationsphase von weiteren 3 min und eine Regenerierung bei einer Flussrate von 50 µl/min mit 50 µl 4 M NaCl oder mit 10 µl 50 mM NaOH. Als Kontrolle diente eine mit 0 RU beladene Flusszelle eines ‚CM5-Sensorchips‘. Da das Messgerät ‚BIACORE 1000‘ nicht über die Funktion verfügt, eine Probe nacheinander über mehrere Flusszellen zu leiten und die Daten aufzuzeichnen, erfolgte die Referenzmessung zeitlich versetzt. In Kontrollexperimenten wurde gezeigt, dass Pufferkomponenten über die Injektionsnadel von einem Gefäß in das nächste verschleppt werden und es so zu unterschiedlichen Puffereffekten (Sprunghafter Anstieg bzw. Abfall der Kurve zu Beginn und am Ende der Probeninjektion) in verschiedenen Messungen ein und derselben Probe kommt. Dies bereitet große Schwierigkeiten bei der Auswertung der Daten. Zur Verhinderung einer Verschleppung von Salzen an der Injektionsnadel in nachfolgende Proben, wurde vor der Injektion der Probe die ‚Predip‘-Funktion verwendet und die Nadel in einem Gefäß mit dH₂O gespült. Zudem wurde die Funktion ‚Extraclean‘ benutzt, um die Nadel nach der Injektion mit Puffer zu säubern. Die Verdünnungen wurden für jede Messung frisch angesetzt und dem Gefäß des zum jeweiligen Zeitpunkt verwendeten Laufpuffers entnommen. Dann wurde jede Probe auf zwei Gefäße aufgeteilt, von denen eines für die Kontrollmessung verwendet wurde. Die Proben wurden bis zur Injektion auf Eis gelagert. Auf

diese Weise sollten Fehler durch unterschiedliche Puffereffekte der Probe und Kontrolle durch die Verschleppung von Salzen durch die Injektionsnadel vermindert werden.

2.12.3 Bindungsanalysen mit dem Fusionsprotein des Klons pET-DAF Δ 1-702

Die Kopplung des Liganden des Fusionsproteins des Klons pRSET-HCA1-445 an einen CM5-Chip erfolgte wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben. Als Laufpuffer wurde der Biacore-Puffer I verwendet. Das Fusionsprotein des Klons pET-DAF Δ 1-702 wurde in verschiedenen Verdünnungen (zwischen 100 nM und 18 μ M) bei einer Flussrate von 30 μ l/min unter Verwendung der ‚Kinject‘-Funktion des Programms für 3 min injiziert. Daraufhin folgte eine Dissoziationsphase von weiteren 3 min und eine Regenerierung bei einer Flussrate von 50 μ l/min mit 10 μ l 50 mM NaOH. Als Kontrolle eine mit 0 RU beladene Flusszelle eines ‚CM5-Sensorchips‘. Für die Injektionen wurden die Funktionen ‚Predip‘ und ‚Extraclean‘ verwendet (Kapitel 2.12.2). Die Verdünnungen wurden für jede Messung frisch angesetzt und dem Gefäß des zum jeweiligen Zeitpunkt verwendeten Laufpuffers entnommen. Dann wurde jede Verdünnung auf zwei Gefäße aufgeteilt, von denen eines für die Kontrolle verwendet wurde. Die Proben wurden bis zur Injektion auf Eis gelagert.

2.12.4 Auswertung der Bindungsanalysen

Die Auswertung der SPR-Bindungsanalysen wird im Folgenden anhand einer Messserie des Neuropeptids PF2 erläutert. Eingesetzt wurden die Analyten-Konzentrationen 400 μ M, 200 μ M, 130 μ M, 100 μ M, 80 μ M, 70 μ M, 60 μ M, 50 μ M und 40 μ M. Der Liganden-Bindungslevel betrug 6294 RU. Abbildung 2.2 zeigt die Sensorgramme der gemessenen Konzentrationen des Analyten und das Sensorgramm der Kontrollexperimente. Als Referenzoberfläche diente eine Flusszelle, die einer Kopplungsreaktion ohne Zugabe des Fusionsproteins unterzogen wurde. Die Beladung betrug somit 0 RU. Durch Verwendung der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘ (Biacore, Freiburg) konnten die Sensorgramme nach Abschluss der Messungen bearbeitet werden. In einem ersten Schritt wurden die einzelnen Messkurven ausgeschnitten und in Form einzelner Dateien in einem Projektfenster des Programms gespeichert. Dies geschah entsprechend für die Kontrollmessungen. Die Kurven jeder gemessenen Konzentration wurden mit der entsprechenden Kontrolle in einem Fenster übereinandergelegt und die Basislinie gleich Null gesetzt. Die Startpunkte der Assoziation und Dissoziation wurden exakt angeglichen. Abbildung 2.3 (A) zeigt dies am Beispiel einer Konzentration von 400 μ M des Analyten PF2. Als nächster Schritt erfolgte die Subtraktion der Referenzkurven von den entsprechenden Bindungskurven. Dies ist nötig, um den durch Pufferbestandteile hervorgerufenen Puffereffekt zu minimieren und eventuelle unspezifische Bindungen an die Dextranoberfläche nicht in die Auswertung mit einfließen zu lassen. Bei den so genannten Puffereffekten handelt es sich um Unterschiede im Brechungsindex zwischen Probe und Laufpuffer, die nicht durch eine Bindung zustande kommen. Dadurch kommt es zu einem sprunghaften Anstieg bzw. Abfall zu Beginn der Injektion, gefolgt von einem Abfall bzw. Anstieg am Ende der Injektion auf Niveau der Basislinie. Das Resultat dieses Auswertungsschrittes wurde in einem Fenster übereinandergelegt und optisch auf eine Eignung für die Auswertung untersucht.

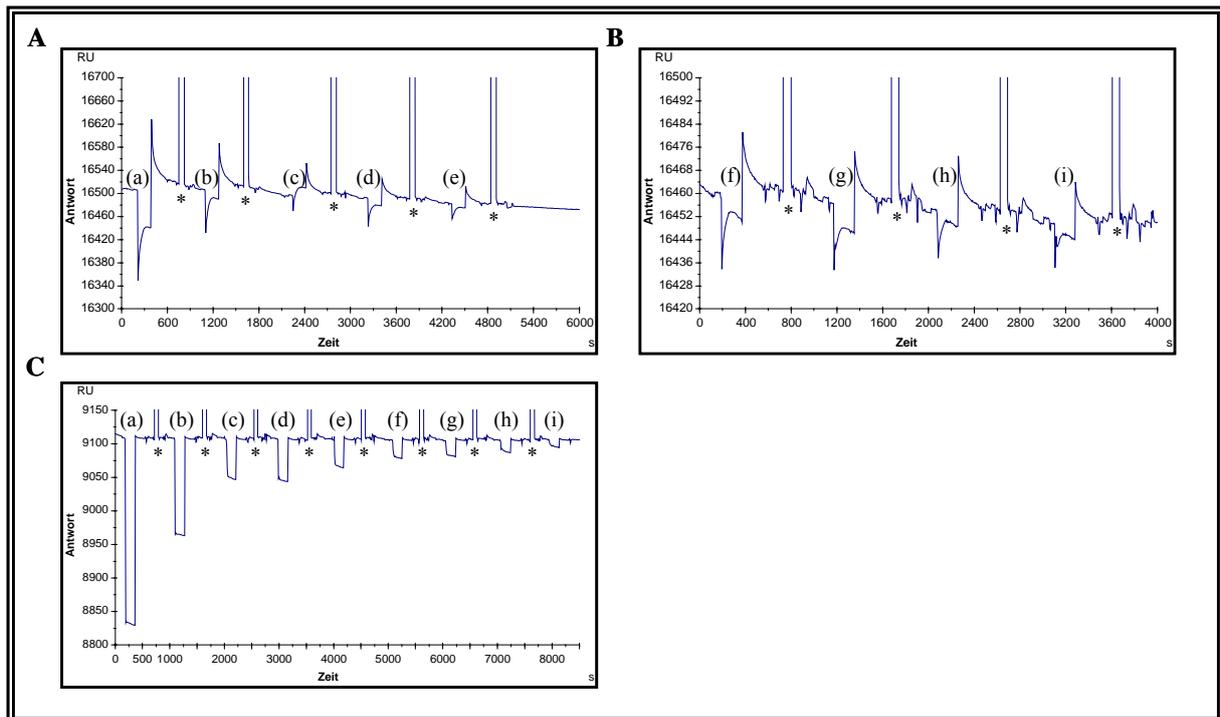


Abb. 2.2: Bindung des Neuropeptids PF2 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445. Eine Flusszelle eines CM5-Sensorchips wurde mit Hilfe einer Aminkopplung mit 6294 RU des Fusionsproteins des Klons pRSET-HCA1-445 beladen. Das Neuropeptid PF2 wurde in verschiedenen Konzentrationen bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ für je 3 min injiziert, gefolgt von einer Dissoziationszeit von weiteren 3 min. Die Renaturierung der Chipoberfläche erfolgte mit 4 M NaCl. Abbildung (A) zeigt die Messungen der Konzentrationen (a) 400 μM , (b) 200 μM , (c) 130 μM , (d) 100 μM und (e) 80 μM , Abbildung (B) die Konzentrationen (f) 70 μM , (g) 60 μM , (h) 50 μM und (i) 40 μM . Zu den mit * gekennzeichneten Zeitpunkten erfolgte die Injektion der Regenerierungslösung 4 M NaOH. Abbildung (C) zeigt die Kontrollmessungen obiger Konzentrationen mit einer ungekoppelten Flusszelle eines CM5-Sensorchips.

Fehlerhafte Messungen, die den Erfolg der Auswertung beeinträchtigen könnten, wurden nicht berücksichtigt und wieder entfernt. Abbildung 2.3 (B) zeigt die Auswahl der Bindungskurven, die in die Auswertung mit eingingen.

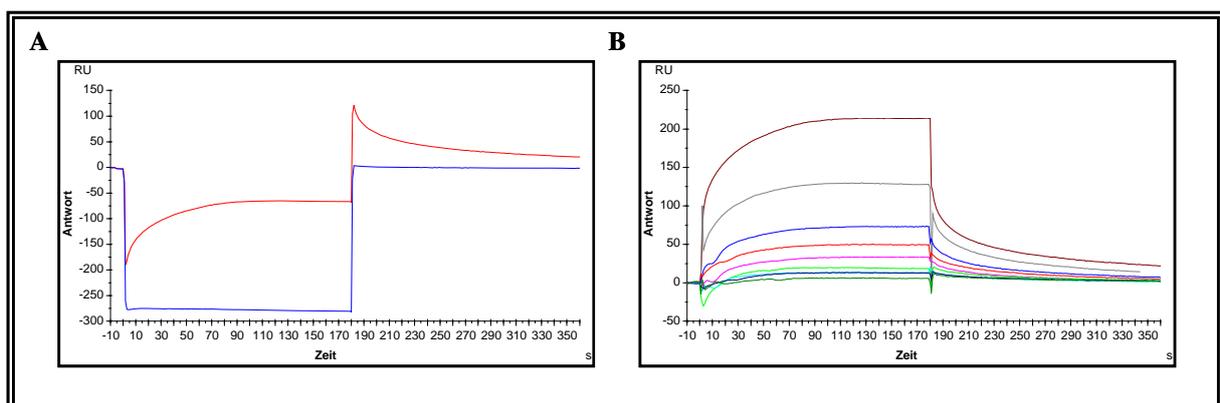


Abb. 2.3: Bindung der Neuropeptids PF2 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445. (A) Die Bindungskurven der Messung einer Injektion von 400 μM der Neuropeptids PF2 wurden mit Hilfe der Auswertungssoftware „BIAevaluation 4.1“ mit der entsprechenden Referenzmessung übereinandergelegt, die Basislinie gleich Null gesetzt und die Startpunkte der Assoziation und der Dissoziation angeglichen. Die rote Kurve zeigt die Bindung des Neuropeptids an das 54 kDa große Fusionsprotein, die blaue Kurve die Messung an der Referenzoberfläche. (B) Die Referenzmessungen wurden von den entsprechenden Bindungskurven der Proben subtrahiert und alle exakt in einem Fenster übereinandergelegt. 400 μM (dunkelrot), 200 μM (grau), 130 μM (blau), 100 μM (rot), 80 μM (rosa), 70 μM (grün), 60 μM (türkis), 50 μM (dunkelblau), 40 μM (dunkelgrün).

Die Software verfügt über Funktionen zur Berechnung der Kinetik und der Affinität einer Bindung. Auf die vorliegenden korrigierten Bindungskurven wurde nun die Funktion ‚Fit Kinetics Simultaneous k_a/k_d ‘ angewendet. In mehreren Schritten erfolgte die Vorgabe des Injektionsstarts, der Assoziationsphase, des Injektionsendes und der Dissoziationsphase. Des Weiteren wurde den Kurven die entsprechende Konzentration des Analyten zugeordnet. Das Programm errechnete nun selbständig ein passendes Bindungsmodell unter Annahme einer Bindereaktion mit einer Stöchiometrie von 1:1 (Abbildung 3.11 A). Das Modell wurde abschließend anhand verschiedener graphischer und numerischer Hilfen bewertet. Dieser Schritt ist essentiell, da auch vermeintlich gute Modelle unrealistische Werte hervorbringen können. Begonnen wurde mit einer visuellen Kontrolle. Besonders Kurven eines Modells, welche in ihrer Form einen systematischen Unterschied zu den Sensorgrammen zeigen, weisen darauf hin, dass das Modell nicht geeignet ist. Man kann auf diese Weise keine verlässlichen kinetischen Konstanten ableiten. Eine weitere visuelle Hilfe bietet der so genannte ‚Residual Plot‘ (Abbildung 3.11 B), der die Differenz der experimentellen Datenpunkte zu den errechneten Datenpunkten des Modells angibt. Zusätzlich gibt es statistische Indikatoren zur Bewertung der Anpassung eines Modells. Der χ^2 -Test ist ein Maß für die Qualität der Anpassung. Er gibt die durchschnittliche Abweichung der experimentellen Daten vom errechneten Modell an. Niedrige Werte sind ein Hinweis für eine gute Anpassung. Ein Richtwert für eine gute Anpassung ist ein Wert von ca. 1 % des R_{\max} -Wertes (persönliche Mitteilung Dr. Uwe Bierfreund, Applikationsspezialist, Biacore, Göttingen). Meist ist jedoch die visuelle Kontrolle aussagekräftiger. Als weiterer Indikator gibt der Standardfehler einen Hinweis auf die Verlässlichkeit der Parameter. Je kleiner der Standardfehler, desto verlässlicher ist ein Wert. Beim T-Wert handelt es sich um den Quotienten aus Wert und Standardfehler. Hohe T-Werte (>10) weisen somit auf signifikante Werte hin. Die RI-Werte, die für jede Kurve angegeben werden, zeigen den Puffersprung an, der durch Unterschiede im Brechungsindex zwischen Probenpuffer und Laufpuffer zustande kommt. Kurven, die durch Subtraktion einer Referenz zustande gekommen sind, sollten niedrige RI-Werte vorweisen. Aufgrund der Bauart des für die Messungen verwendeten Gerätes (BIACORE 1000) konnte auch durch Subtraktion der Referenzen keine vollständige Eliminierung der Puffereffekte erreicht werden (Kapitel 2.12.2). Kritisch für die Anpassung eines aussagekräftigen Modells ist die richtige Bestimmung des Puffersprungs durch die Auswertungssoftware, die vom Benutzer nur unzureichend beeinflusst werden kann. Abschließend sollte die Analytenbindungskapazität (R_{\max}) betrachtet werden. Ist dieser Wert ungewöhnlich hoch, dann kann dies auf unspezifische Bindungen, Aggregationen des Analyten auf der Oberfläche oder auf mehrere Bindungsstellen für den Analyten zurückzuführen sein. Ist dieser Wert ungewöhnlich niedrig, steht dies für einen Verlust der Ligandenaktivität. Als Richtwert gilt die theoretische Analytenbindungskapazität. Sie kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$R_{\max} = \text{Bindungsstöchiometrie} \cdot \frac{MW_{\text{Analyt}}}{MW_{\text{Ligand}}} \cdot \text{Ligandenlevel} \quad (2.2)$$

3. Ergebnisse

3.1 Heterologe Expression von HC110-R in *E. coli*

Für Bindungsstudien und die Suche nach potentiellen, nativen Liganden des Rezeptors HC110-R wurden verschiedene Konstrukte für die heterologe Proteinexpression in *E. coli* erzeugt. *E. coli* bietet durch seine sehr gut untersuchte Genetik und Physiologie, kurze Generationszeiten und eine einfache Handhabung als Wirtssystem viele Vorteile. Zudem können rekombinante Proteine in *E. coli* auf mehr als 20 % des gesamten zellulären Proteins angereichert werden (Voedisch *et al.*, 2005). Die für die Proteinexpression erzeugten Konstrukte sind in Tabelle 3.1 aufgeführt und beschrieben.

Tab. 3.1: Konstrukte zur heterologen Expression von HC110-R-Fragmenten in *E. coli*

Bezeichnung des Konstrukts	Vektor	Oligonukleotide	Position des Fragments in der HC110-R-cDNA/Protein		Größe des Fusionsproteins
			Nt	AS	
pASK4-HCΔ22-535	pASK-IBA4 (IBA, Göttingen)	pASK-for pASK-rev	163-1704	22-535	60 kDa
pASK44-HCΔ22-535	pASK-IBA44 (IBA, Göttingen)	pASK-for pASK-44rev	163-1704	22-535	62 kDa
pRSET-HCΔ1-445	pRSET B (Invitrogen, Karlsruhe)		100-1434	1-445	54 kDa
pRSET-HCΔ797-986	pRSET B (Invitrogen, Karlsruhe)		2509-3060	797-986	21 kDa

Die vollständige cDNA-Sequenz (Pos. 83-3057) des Rezeptors HC110-R weist eine Länge von 3539 bp auf (Saeger *et al.*, 2001). Das längste offene Leseraster beginnt mit einem ATG-Startcodon in Position 100 und endet mit dem TGA-Stopcodon in Position 3058. Aus diesem Leseraster ergibt sich eine Rezeptorgröße von 986 Aminosäuren und ein resultierendes Molekulargewicht von 110 kDa. Der gesamte Aminoterminus bis zur ersten Transmembrandomäne besteht aus 535 Aminosäuren.

Als Templat für die Amplifikationen aller Fragmente diente das Plasmidkonstrukt HC110-R-pEGFP (Saeger *et al.*, 2000). Mit Hilfe der Oligonukleotide pASK-for und pASK-rev respektive pASK-for und pASK-44rev wurden zwei Fragmente amplifiziert, die von den Erkennungssequenzen des Restriktionsenzym BsaI flankiert waren. BsaI gehört zu den Typ IIS Restriktionsenzymen, die doppelsträngige DNA außerhalb ihrer Erkennungssequenzen schneiden. Auf diese Weise konnten bei einer Restriktionsendonukleolyse mit einem einzigen Restriktionsenzym zwei unterschiedliche 5'-Überhänge mit 4 Basen erzeugt und das Fragment gerichtet in den Vektor kloniert werden. Die 1541 bp umfassenden Produkte wurden in den Vektor pASK-IBA4 (IBA, Göttingen) bzw. pASK-IBA44 (IBA, Göttingen) ligiert. Die Fragmente kodieren für den gesamten extrazellulären Aminoterminus des Rezeptors (AS 22-535, Tabelle 3.1), mit Ausnahme des Signalpeptids. Somit kam es unter

Beachtung des Leserasters zu einer aminoterminalen Fusion des Amplifikationsprodukts mit einem StrepII-,Tag' bzw., im Falle des Vektors pASK-IBA44 (IBA, Göttingen), noch zusätzlich zu einer carboxyterminalen Fusion mit einem 6×His-,Tag'. Der Vorteil der verwendeten Vektoren besteht darin, dass sie eine präzise Fusion des Strukturgens mit den funktionalen Elementen des Vektors, ohne zusätzliche Aminosäuren, erlauben. Die Überprüfung des Leserasters erfolgte anhand einer Sequenzierung mit sequenzspezifischen 5'-IRD-800-gekoppelten Oligonukleotiden. Mittels der beschriebenen HC110-R-Konstrukte (pASK4-HCΔ22-535, pASK44-HCΔ22-535) war die Expression eines 60 kDa-Fusionsproteins bzw. eines 62 kDa großen Fusionsproteins des Aminoterminus des Rezeptors möglich (Tabelle 3.1). Die Expressionsvektoren pASK-IBA4 und pASK-IBA44 (IBA, Göttingen) werden über die Promotor/Operator-Region des tetA-Resistenzgens reguliert. Eine vollständige Expression erfolgte durch die Zugabe des Induktors Anhydrotetracyclin in der nicht antibiotisch wirksamen Konzentration von 200 ng/ml. Die konstitutive Expression des tet-Repressorgens, welches ebenfalls auf dem Expressionsplasmid kodiert ist, garantiert die Repression des Promotors in Abwesenheit des Induktors. In diesem Fall wurden für die Expression *E. coli* BL21-Zellen verwendet, da sie für die Proteasen Lon und OmpT defizient sind und somit die Möglichkeit der Degradation der Fusionsproteine durch *E. coli*-eigene Proteasen minimiert wird.

Nach der Gewinnung der *E. coli*-Gesamtproteine wurde die Expression der Fusionsproteine mittels SDS-PAGE überprüft. Sowohl das 60 kDa große Fusionsprotein des Klons pASK4-HCΔ22-535 als auch das 62 kDa große Fusionsprotein des Klons pASK44-HCΔ22-535 konnten in ausreichender Konzentration exprimiert werden (Abbildung 3.1 A-C). Bei beiden Fusionsproteinen handelte es sich um periplasmatische Proteine. Dafür sorgt die Sequenz eines OmpA-Signalpeptids, die bei der Synthese aminoterminal an die Fusionsproteine angehängt wird. Mit Hilfe des Signalpeptids erfolgt die Sekretion in den periplasmatischen Raum, zwischen die innere und die äußere Membran der Bakterienzellen. Dort wird das Signalpeptid mittels einer *E. coli*-eigenen Protease wieder abgespalten. Die Aufreinigung der Fusionsproteine erwies sich jedoch dennoch als problematisch, da die Fusionsproteine trotz der Signalsequenz überwiegend im Cytoplasma in Form von Inklusionskörpern vorlagen. Aus diesem Grund konnte das 60 kDa große Fusionsprotein nur in sehr geringen Mengen in löslicher Form isoliert und mittels Affinitätschromatographie über das Strep II-,Tag' aufgereinigt werden. Inklusionskörper können nur unter stark denaturierenden Bedingungen, z. B. mit 6 M Guanidin- oder 8 M Harnstoff-haltigen Puffern, in Lösung gebracht werden. Diese Bedingungen eignen sich aber nicht für eine Chromatographie mit einer Strep-Tactin-Säule (IBA, Göttingen). Bei der Chromatographie ist maximal eine Konzentration von 1 M Guanidin bzw. Harnstoff möglich. Da das Fusionsprotein des Klons pASK44-HCΔ22-535 zusätzlich ein 6×His-,Tag' besitzt, konnte hier die Aufreinigung mittels einer Metallaffinitätschromatographie erfolgen. Diese Matrix lässt auch denaturierende Bedingungen von 6 M Guanidin bzw. 8 M Harnstoff zu. Auf diese Weise konnte das 62 kDa große Fusionsprotein in großer Reinheit isoliert werden. Eine Kontrolle erfolgte elektrophoretisch und mit Hilfe einer RP-HPLC (Abbildung 3.1 D, E).

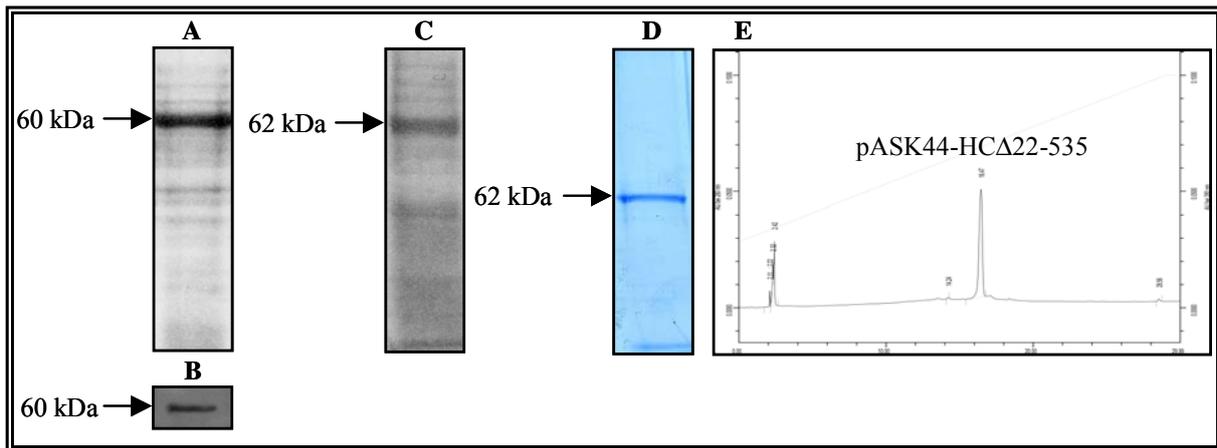


Abb. 3.1: Expression des Fusionsproteins des Klons pASK4-HCA22-535. (A) Expression des Fusionsproteins des Klons pASK4-HCA22-535. SDS-Page eines 10%igen Gels mit *E. coli*-Gesamtproteinen einer mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin induzierten Expressionskultur des 60 kDa Fusionsproteins. (B) Immundetektion der Expression des Fusionsproteins des Klons pASK4-HCA22-535 mit einem Anti-Strep-Antikörper. *E. coli*-Gesamtproteine einer Expressionskultur des 60 kDa Fusionsproteins wurden elektrophoretisch auf einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und das Strep-,Tag' mit einem mit Peroxidase konjugierten Anti-Strep-Tactin-Antikörper (0,25 µg/ml) detektiert. (C) Expression des Fusionsproteins des Klons pASK44-HCA22-535. SDS-Page eines 10%igen Gels mit *E. coli*-Gesamtproteinen einer mit 200 ng/ml Anhydrotetracyclin induzierten Expressionskultur des 62 kDa Fusionsproteins. (D) Metallaffinitätschromatographisch aufgereinigtes und entsalztes Eluat (5 µg) des 62 kDa großen Fusionsproteins des Klons pASK44-HCA22-535. (E) RP-HPLC-Analyse des metallaffinitätschromatographisch aufgereinigten Fusionsproteins des Klons pASK44-HCA22-535

Des Weiteren wurden schon bestehende Konstrukte von Saeger (2000) verwendet. Dabei handelt es sich um die Klone pRSET-HCA1-445 und pRSET-HCA797-986. Der erste Klon umfasst den Aminoterminus des Rezeptors bis vor das 4-Cystein-Motiv (AS 1-445), der zweite Klon den Carboxyterminus, beginnend hinter der 7. Transmembrandomäne (AS 797-986). Die exprimierten Fusionsproteine haben eine Größe von 54 kDa bzw. 21 kDa und besitzen beide ein aminoterminalen 6×His-,Tag' und ein Xpress-,Tag' (Invitrogen, Karlsruhe; Tabelle 3.1). Die Fusionsproteine beinhalten durch die strukturellen Elemente 38 zusätzliche AS. Der pRSET B-Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe) wird über einen viralen Promotor des Bakteriophagen T7 kontrolliert. Für die Expression wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS verwendet. Dieser verfügt zusätzlich über das Plasmid pACYC184, welches durch eine Chloramphenicolresistenz stabilisiert ist und in geringen Mengen das T7-Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase, exprimiert. Da der pRSET B-Vektor unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht, erfolgte die Expression durch Zugabe des Induktors IPTG. Sowohl das aminoterminalen 54 kDa große Fusionsprotein als auch das 21 kDa große carboxyterminale Fusionsprotein konnten erfolgreich exprimiert werden (Abbildung 3.2 A+D). Das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445 wurde unter denaturierenden Bedingungen durch mehrfaches Waschen der Inklusionskörper gereinigt und über eine Metallaffinitätschromatographie mit hoher Reinheit isoliert (Abbildung 3.2 B+C). Das lösliche, 21 kDa große, carboxyterminale Fusionsprotein wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen mittels einer Metallaffinitätschromatographie mit zufriedenstellender Reinheit aufgereinigt (Abbildung 3.2 E).

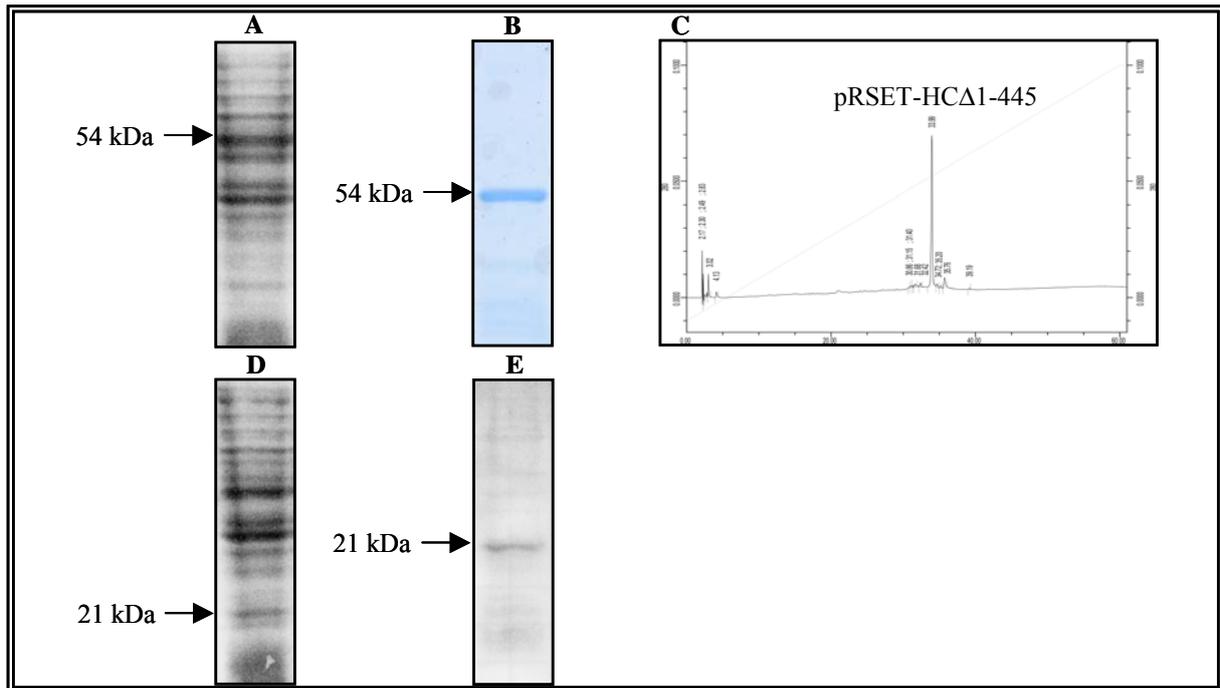


Abb. 3.2: Expression der Fusionsproteine des Klons pRSET-HC Δ 1-445 bzw. des Klons pRSET-HC Δ 797-986. (A) Expression des Fusionsproteins des Klons pRSET-HC Δ 1-445 (Saeger, 2000). SDS-Page eines 10%igen Gels mit *E. coli*-Gesamtproteinen einer mit 4 mM IPTG induzierten Expressionskultur des 54 kDa Fusionsproteins. (B) Metallaffinitätschromatographisch aufgereinigtes und entsalztes Eluat (5 μ g) des 54 kDa großen Fusionsproteins des Klons pRSET-HC Δ 1-445. (C) RP-HPLC-Analyse des metallaffinitätschromatographisch aufgereinigten Fusionsproteins des Klons pRSET-HC Δ 1-445. (D) Expression des Fusionsproteins des Klons pRSET-HC Δ 797-986 (Saeger 2000). SDS-Page eines 12,5%igen Gels mit *E. coli*-Gesamtproteinen einer mit 4 mM IPTG induzierten Expressionskultur des 21 kDa Fusionsproteins. (E) Metallaffinitätschromatographisch aufgereinigtes und entsalztes Eluat (5 μ g) des 21 kDa großen Fusionsproteins des Klons pRSET-HC Δ 797-986.

3.2 Ligandenscreening des Rezeptors HC110-R mit *C. elegans*-Proteinextrakt

Das Genomprojekt des frei lebenden Nematoden *C. elegans* wurde als erstes Projekt eines multizellulären Organismus 1998 abgeschlossen („The *C. elegans* Sequencing Consortium“, 1998). Die vollständigen Datenbanken erlauben schnell und einfach jedes identifizierte Protein durch Sequenzvergleiche zuzuordnen und auf bestehende Informationen zuzugreifen. Für *H. contortus* fehlt diese Möglichkeit und ein „Screening“ nach potentiellen Bindungspartnern ist in dieser Form nicht möglich. Der Modellorganismus *C. elegans* besitzt zudem weitere Vorteile. Er hat nur eine geringe Größe (Adulte sind nur ca. 1 mm lang), ist im Labor leicht auf Bakterien besiedelten Agarplatten zu kultivieren und hat einen geringen Platzbedarf. Zudem bietet sich die Verwendung von *C. elegans* zur Beantwortung der gegebenen Fragestellung an, da die orthologen Latrophilin-ähnlichen Proteine 1 und 2 (Ce Lat-1A, Ce Lat-1B und Ce Lat-2) eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu HC110-R aufweisen (Welz *et al.*, 2005).

3.2.1 Bindungsexperimente an Nitrozellulosemembranen

C. elegans wurden in Flüssigkulturen kultiviert, geerntet und die Proteine extrahiert. Die löslichen Proteine des Extraktes wurden für die Suche potentieller Liganden des Rezeptors HC110-R eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Mengen des Extraktes mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 3.3 A) und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Nitrozellulosemembran wurde renaturiert und mit dem Fusionsprotein des Klons pASK44-HCΔ22-535 oder des Klons pRSET-HCΔ1-445 inkubiert. Bindungen konnten durch Immundetektionen mit Antikörpern gegen eines der ‚Tags‘ der Proteine nachgewiesen werden. Die Experimente zeigten durch Bindung des aminoterminalen 54 kDa bzw. 62 kDa großen Fusionsproteins an *C. elegans*-Proteine reproduzierbar zwei Banden mit einem geschätzten Molekulargewicht von 85 kDa bzw. 150 kDa (Abbildung 3.3 B).

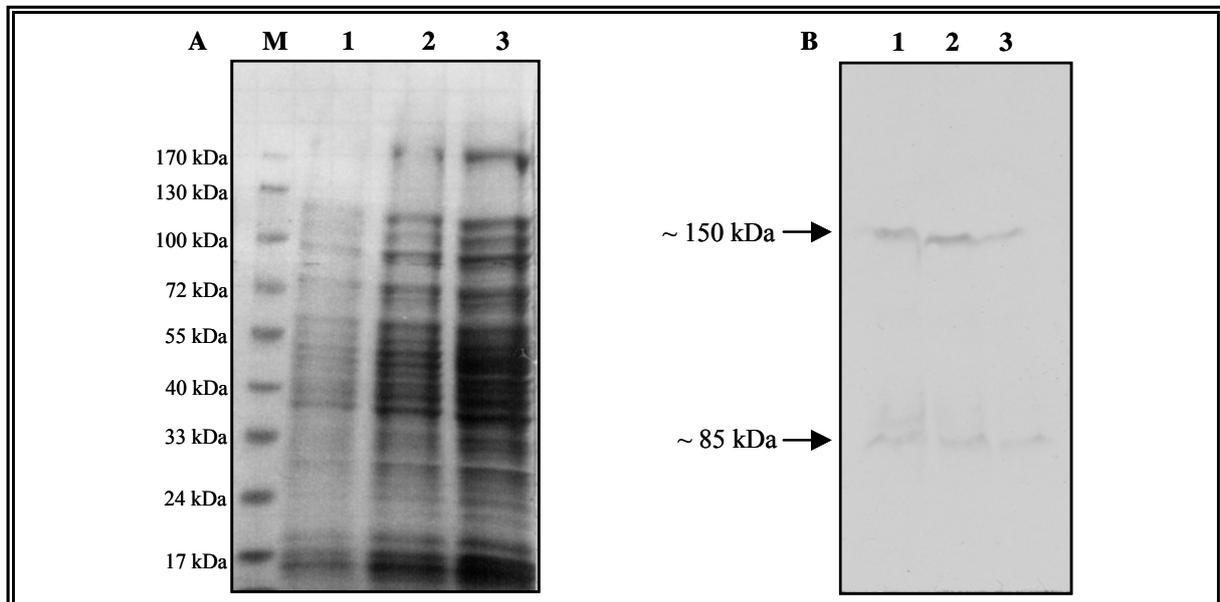


Abb. 3.3: Detektion spezifischer HC110-R-bindender Proteine auf einer Nitrozellulosemembran. (A) 7 bis 16%iges PAA-Gradientengel mit *C. elegans*-Proteinextrakt. (1) 25 µg (2) 50 µg (3) 100 µg. Als Größenstandard wurde der Marker PageRuler™ (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet (M). (B) Auftrennung unterschiedlicher Mengen *C. elegans*-Proteinextrakt [25 µg (1), 50 µg (2), 100 µg (3)] auf einem 7,5%igen PAA-Gel, Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, Renaturierung der Proteine und Inkubation mit dem 54 kDa großen Fusionsprotein des Klons pRSET-HCΔ1-445. Immundetektion mit einem monoklonalen Maus-anti-6×His Primärantikörper (0,05 µg/ml) und einem Ziege-anti-Maus IgG Sekundärantikörper, konjugiert mit Peroxidase (0,08-0,5 µg/ml). Detektiert werden konnte eine ca. 150 kDa große und eine ca. 85 kDa große Bande.

Kontrollexperimente ergaben jedoch, dass es sich bei der 85 kDa-Bande um die unspezifische Bindung des Primärantikörpers (monoklonaler Maus-anti-6×His-Antikörper) an ein Protein aus *C. elegans* handeln muss. Eine Inkubation mit dem 21 kDa großen carboxyterminalen Fusionsprotein ergab die Detektion dieser ca. 85 kDa großen Bande. Da es sich bei dem carboxyterminalen Teil um den intrazellulären Teil des Rezeptors handelt, sollte dieses Experiment als Kontrolle dienen (Abbildung 3.4 A). In einem weiteren Versuch wurde die Membran nach der Renaturierung direkt mit dem Primärantikörper inkubiert, um zu überprüfen, ob es sich bei der 85 kDa großen Bande um eine unspezifische Bindung des

Antikörpers an ein *C. elegans*-Protein handelt. Dies konnte bestätigt werden (Abbildung 3.4 B).

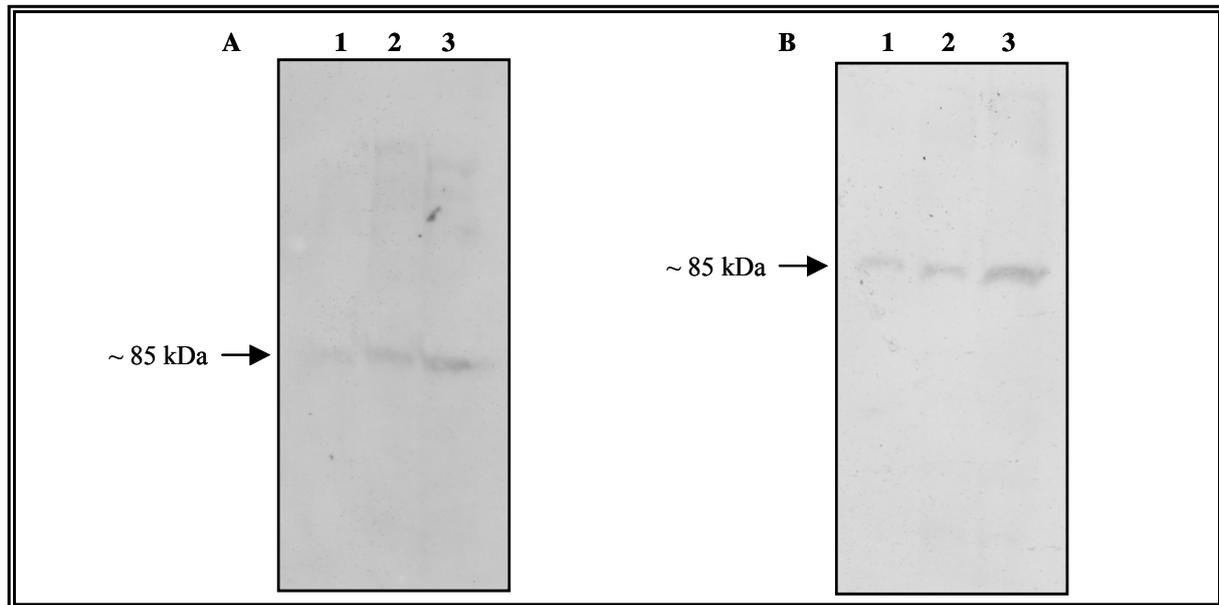


Abb. 3.4: Detektion spezifischer HC110-R-bindender Proteine auf einer Nitrozellulosemembran. (A) Auftrennung verschiedener Mengen *C. elegans*-Proteinextraktes [25 µg (1), 50 µg (2), 100 µg (3)] auf einem 7,5%igen PAA-Gel, Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, Renaturierung der Proteine und Inkubation mit dem 21 kDa großen Fusionsprotein des Klons pRSET-HCΔ797-986 als Negativkontrolle. Immundetektion mit einem monoklonalen Maus-anti-6×His Primärantikörper (0,05 µg/ml) und einem Ziege-anti-Maus IgG Sekundärantikörper, konjugiert mit Peroxidase (0,08-0,5 µg/ml). Detektiert werden konnte eine ca. 85 kDa große Bande. (B) Auftrennung unterschiedlicher Mengen von *C. elegans*-Proteinextrakt [25 µg (1), 50 µg (2), 100 µg (3)] auf einem 7,5%igen PAA-Gel, Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, Renaturierung der Proteine. Immundetektion mit einem monoklonalen Maus-anti-6×His Primärantikörper (0,05 µg/ml) und einem Ziege-anti-Maus IgG Sekundärantikörper, konjugiert mit Peroxidase (0,08-0,5 µg/ml) zur Überprüfung unspezifischer Bindungen des Primärantikörpers. Detektiert werden konnte eine ca. 85 kDa große Bande.

3.2.2 2D-Bindungsexperimente und Massenspektrometrie

In weiteren Experimenten wurden unterschiedliche Mengen *C. elegans*-Proteinextrakt präzipitiert und eine 2D-Elektrophorese durchgeführt. Die zweite Dimension erfolgt unter Verwendung von Gradientengelen, gefolgt von einem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Die Membranen wurden renaturiert und mit dem 62 kDa großen Fusionsprotein des Klons pASK44-HCΔ22-535 inkubiert. Bindungen an *C. elegans*-Proteine wurden durch Immundetektion mit einem Anti-Strep-Tactin-Antikörper bzw. einem Anti-6×His-Antikörper nachgewiesen. Mit beiden Antikörpern konnten reproduzierbar zwei Protein-,Spots' mit einem ungefähren Molekulargewicht von 70 kDa nachgewiesen werden. Die beiden Protein-,Spots' (Abbildung 3.5 A+B; ‚Spot 1‘ und ‚Spot 2‘) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektroskopisch analysiert. Die Daten konnten eindeutig durch Abgleich mit der gesamten Sequenzdatenbank des NCBI (‚National Center of Biotechnology Information‘, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>) identifiziert werden. Bei ‚Spot 1‘ handelte es sich um Vit-6 (‚yolk protein vittologenin structural gene‘) aus *C. elegans* mit einem pI von 6,8 und einem Molekulargewicht von 193,2 kDa.

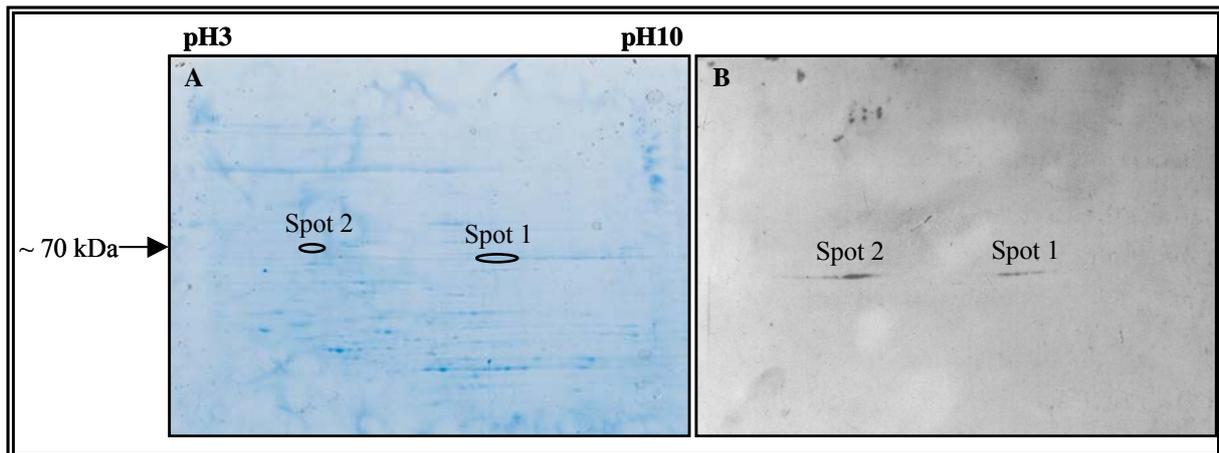


Abb. 3.5: Detektion spezifischer HC110-R-bindender Proteine auf einer Nitrozellulosemembran einer 2D-Elektrophorese. (A) Mit einer kolloidalen Coomassie-Färbung (Neuhoff *et al.*, 1988) gefärbtes 5 bis 12%iges Gradientengel. 2-D-Auftrennung von 400 µg *C. elegans*-Proteinextrakt. Markiert sind ‚Spot 1‘ und ‚Spot 2‘, die zur massenspektroskopischen Analyse ausgeschnitten, gewaschen und getrocknet wurden. (B) 2-D-Auftrennung von 400 µg *C. elegans*-Proteinextrakt, Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, Renaturierung und Inkubation mit dem 62 kDa großen Fusionsprotein des Klons pRSET-HCΔ1-445. Immundetektion mit einem monoklonalen Maus-anti-Strep-Tactin Primärantikörper (0,25 µg/ml) und einem Ziege-anti-Maus IgG Sekundärantikörper, konjugiert mit Peroxidase (0,08-0,5 µg/ml). Detektiert werden konnten zwei ca. 70 kDa große Protein-‚Spots‘ (‚Spot 1‘ und ‚Spot 2‘).

Es bildet die zwei Spaltprodukte yp115 und yp88. Detektiert wurde das 88 kDa große Spaltprodukt yp88. ‚Spot 2‘ wurde als Daf-21 (‚heat shock protein, abnormal Dauer formation‘) identifiziert. Daf-21 hat einen pI von 5,0 und ein Molekulargewicht von 80,3 kDa. In einigen Versuchen konnte zusätzlich noch ein weiterer Protein-‚Spot‘ auf der gleichen Höhe, sowohl mit einem Maus-anti-6×His-Antikörper als auch mit einem Maus-anti-Strep-Tactin-Antikörper, detektiert werden (Abbildung 3.6 A+B; ‚Spot 13‘).

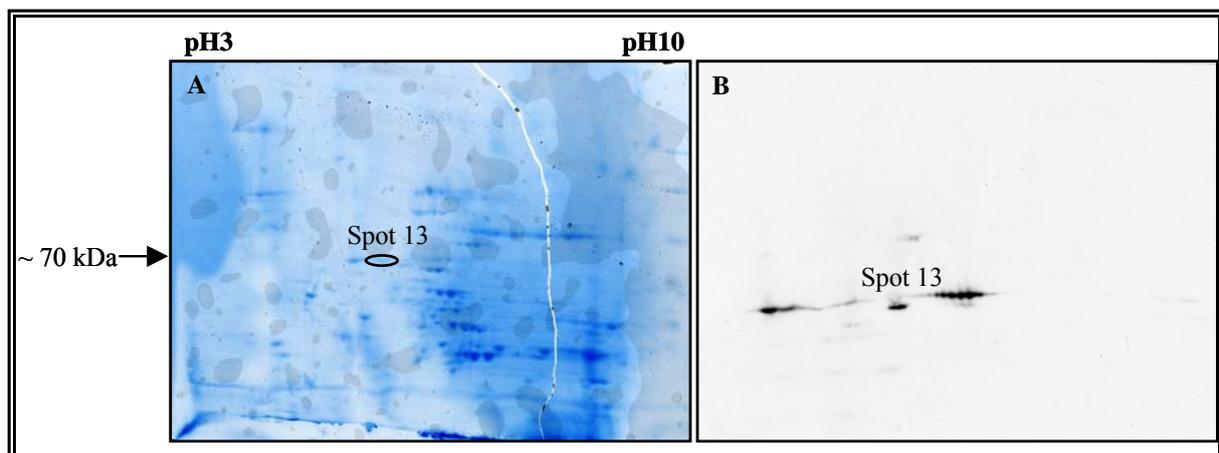


Abb. 3.6: Detektion spezifischer HC110-R-bindender Proteine auf einer Nitrozellulosemembran einer 2D-Elektrophorese. (A) Mit einer kolloidalen Coomassie-Färbung (Neuhoff *et al.*, 1988) gefärbtes 5 bis 12%iges Gradientengel. 2-D-Auftrennung von 600 µg *C. elegans*-Proteinextrakt. Markiert ist der Protein-‚Spot‘ ‚Spot 13‘, der zur massenspektroskopischen Analyse ausgeschnitten, gewaschen und getrocknet wurde. (B) 2-D-Auftrennung von 600 µg *C. elegans*-Proteinextrakt, Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, Renaturierung und Inkubation mit dem 62 kDa großen Fusionsprotein des Klons pRSET-HCΔ1-445. Immundetektion mit einem monoklonalen Maus-anti-Strep-Tactin (0,25 µg/ml) und einem Ziege-anti-Maus IgG Sekundärantikörper, konjugiert mit Peroxidase (0,08-0,5 µg/ml). Detektiert werden konnte ein ca. 70 kDa großer Protein-‚Spot‘ (‚Spot 13‘).

Die massenspektroskopische Analyse ergab eindeutig, dass die sequenzierten Peptide eine hohe Homologie zu einer cytosolischen Komponente der Familie der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase aus *C. elegans* aufweisen. Das Protein weist einen pI von 5,8 auf und hat ein Molekulargewicht von 73,4 kDa.

3.2.3 Bindungsexperimente an Magnetpartikeln

Neben Bindungsexperimenten an Nitrozellulosemembranen wurden auch Bindungsversuche an Magnetpartikeln durchgeführt, um potentielle Bindungspartner des Rezeptors HC110-R zu identifizieren. Das Fusionsprotein des Klons pASK44-HCΔ22-535 wurde chemisch (200 bis 250 µg) oder mittels seines 6×His-,Tags' (200 bis 250 µg) an Magnetpartikel gebunden, mit 3,5 bis 12,4 mg *C. elegans*-Proteinextrakt inkubiert, gewaschen und gebundene Proteine wurden eluiert. Als Negativkontrolle fungierten ungebundene Magnetpartikel. Die Eluate wurden entsalzt und mit Hilfe eines Gradientengels oder einer SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow (1988) elektrophoretisch aufgetrennt (nicht gezeigt). Die Gele wurden einer Silberfärbung unterzogen und mehrere Banden massenspektroskopisch analysiert. Sicher nachgewiesen werden konnte jedoch bei jeder Analyse nur humanes Keratin. Nach Eliminierung aller gemessenen Keratinmassen konnten die übrigen Daten keinem *C. elegans*-Protein eindeutig zugeordnet werden. Da mit Silberfärbungen noch geringe Proteinmengen von <1 ng nachgewiesen werden können, stößt man eventuell hier an die Nachweisgrenzen der Massenspektroskopie.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden 10 bis 20 µg des Fusionsproteins des Klons pRSET-HCΔ1-445 chemisch an Magnetpartikel gebunden und lediglich Proteine des *C. elegans*-Proteinextrakts <10 kDa (60 bis 160 µg) für Bindungsexperimente eingesetzt. Die Eluate wurden vollständig massenspektroskopisch analysiert. Es war jedoch auch in diesem Versuchsansatz nicht möglich, Bindungspartner des aminoterminalen Teils des Rezeptors HC110-R zu identifizieren. Die Eluate enthielten keine ausreichende Menge an Proteinen oder Peptiden für einen Nachweis.

3.3 Heterologe Expression von Daf-21 in *E. coli*

Die Bindung des Hitzeschockproteins Daf-21 an den aminoterminalen Teil des Rezeptors HC110-R wurde in verschiedenen Versuchsansätzen überprüft. Zu diesem Zweck wurde Daf-21 in einen *E. coli*-Expressionsvektor kloniert, exprimiert und mittels Metallaffinitätschromatographie aufgereinigt. Die Klonierung erfolgte mit Hilfe eines Klonierungssystems der Firma Invitrogen (Karlsruhe) unter Verwendung des Vektors pET100/D-TOPO. Das benötigte Fragment wurde unter Verwendung eines Templats der Arbeitsgruppe David *et al.* (2003; Tabelle 3.2) mit dem Oligonukleotidpaar pET100-DAF21-for/pET100-DAF21-rev amplifiziert und das 2113 bp große Fragment gerichtet in den Vektor kloniert. Die Ligation des PCR-Fragments im richtigen Leseraster in den Vektor resultierte in einer Fusion mit einem aminoterminalen 6×His-,Tag' und einem Xpress-,Tag'. Der pET100/D-TOPO-Vektor steht unter der Kontrolle eines T7lac-Promotors. Die T7 RNA-

Polymerase, die spezifisch den Promotor erkennt, wird durch den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) bereitgestellt und kann mittels IPTG induziert werden.

Tab. 3.2: Konstrukte zur heterologen Expression von Daf-21 in *E. coli*

Bezeichnung des Konstrukts	Vektor	Oligonukleotide	Position des Fragments in der HC110-R-cDNA/Protein		Größe des Fusionsproteins	Bezugsquelle
			Nt	AS		
pcDNA-DAFΔ1-702	pcDNA3.1 (+/-)					David <i>et al.</i> , 2003
pET-DAFΔ1-702	pET100/D-TOPO	pET100-DAF21-for/ pET100-DAF21-rev	405-2401	1-702	84 kDa	

Das Fusionsprotein des Klons pET-DAFΔ1-702 konnte erfolgreich exprimiert werden (Abbildung 3.7 A). Die Expression wurde mit einer Immundetektion mit einem Maus-anti-Hsp90 Primärantikörper und einem Ziege-anti-Maus Sekundärantikörper bestätigt (Abbildung 3.7 B). Die Aufreinigung des löslichen Fusionsproteins erfolgte unter nicht denaturierenden Bedingungen mit Hilfe einer Metallaffinitätschromatographie. Die Reinheit wurde mittels einer SDS-PAGE überprüft (Abbildung 3.7 C).

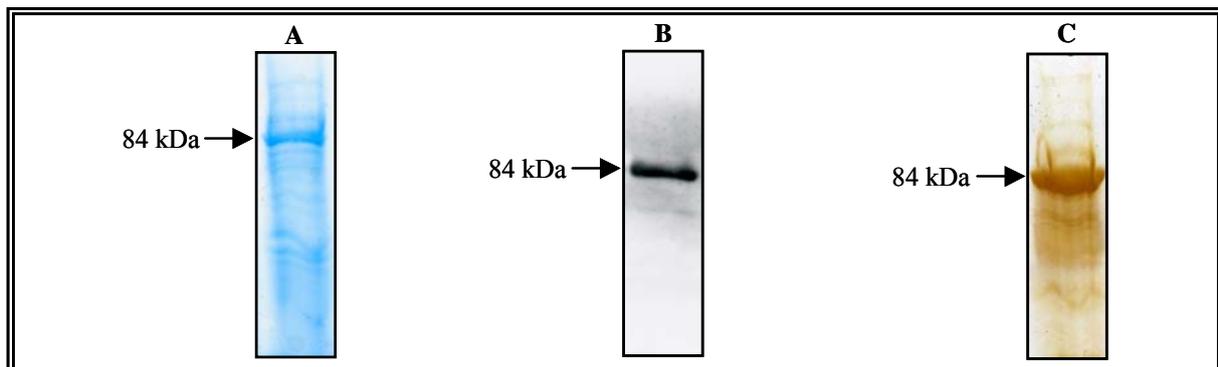


Abb. 3.7: Expression des Fusionsproteins des Klons pET-DAFΔ1-702. (A) Expression des Fusionsproteins des Klons pET-DAFΔ1-702. SDS-Page eines 10%igen Gels mit *E. coli*-Gesamtproteinen einer mit 1 mM IPTG induzierten Expressionskultur des 84 kDa Fusionsproteins. (B) Immundetektion der Expression des Fusionsproteins des Klons pET-DAFΔ1-702 mit einem Anti-Hsp-90-Antikörper. *E. coli*-Gesamtproteine einer Expressionskultur des 84 kDa Fusionsproteins wurden elektrophoretisch auf einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und das Fusionsprotein mit einem monoklonalen Maus-anti-Hsp90 Primärantikörper (1 µg/ml) und einem Ziege-anti-Maus IgG Sekundärantikörper, konjugiert mit Peroxidase (0,08-0,5 µg/ml), detektiert. (C) Metallaffinitätschromatographisch aufgereinigtes und entsalztes Eluat (5 µg) des 84 kDa großen Fusionsproteins des Klons pET-DAFΔ1-702.

3.3.1 Daf-21 als potentieller Ligand des Rezeptors HC110-R

Das in *E. coli* exprimierte und chromatographisch aufgereinigte Fusionsprotein des Klons pET-DAFΔ1-702 wurde *in vitro* auf eine Bindung an den aminoterminalen Teil des Rezeptors HC110-R untersucht. In einem Bindungsexperiment mit Magnetpartikeln wurden 10 µg metallaffinitätschromatographisch gereinigtes Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445 chemisch an Carboxyl-Magnetpartikel gebunden und diese im mindestens äquimolaren

Verhältnis mit dem aufgereinigten Fusionsprotein des Klons pET-DAFΔ1-702 inkubiert. Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis dieses Versuchsansatzes.

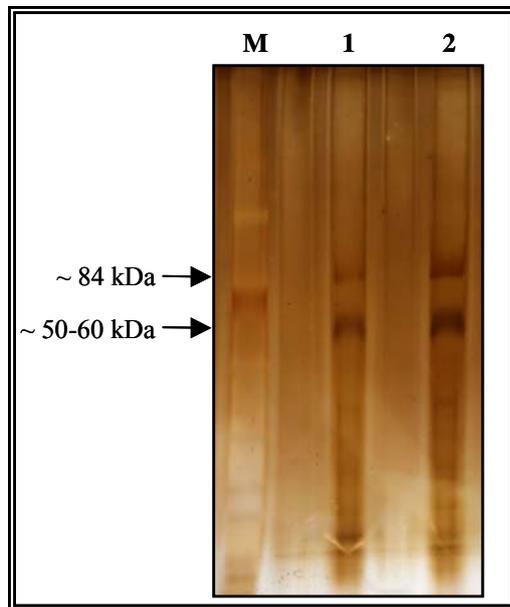


Abb. 3.8: Bindungsexperimente des Fusionsproteins des Klons pET-DAFΔ1-702 an den aminoterminalen Teil des Rezeptors HC110-R. 10 µg des Fusionsproteins des Klons pRSET-HCA1-445 wurden chemisch an Magnetpartikel gekoppelt und diese über Nacht mit einer äquimolaren Menge des Fusionsproteins des Klons pET-DAFΔ1-702 bei 4 °C inkubiert (1). Als Kontrolle wurde ein entsprechendes Aliquot ungekoppelter Magnetpartikel eingesetzt (2). Eluiert wurde mit 1 × RotiLoad-Ladungspuffer (Roth, Karlsruhe) bei einer 5 minütigen Inkubation bei 100 °C. Elektrophoretische Auftrennung auf einem 5 bis 16%igen Gradientengel. Als Größenstandard diente der Marker PageRuler™ (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) (M).

Das Fusionsprotein des Klons pET-DAFΔ1-702 zeigt eine starke unspezifische Wechselwirkung mit der Oberfläche der Magnetpartikel, da auch die Kontrolle (Magnetpartikel ohne Fusionsprotein) eine Bande in Höhe des Fusionsproteins aufweist. Die Banden beider Proben scheinen ungefähr die gleiche Proteinmenge zu enthalten. Eine zweite kleinere Bande (ca. 50-60 kDa) erscheint außerdem in beiden Proben. Es könnte sich um ein Degradationsprodukt des 84 kDa-Fusionsproteins handeln. Ebenso wäre denkbar, dass diese Bande durch eines der verunreinigenden Proteine der Aufreinigung des Fusionsproteins zu Stande gekommen ist, welches stark unspezifisch an die Oberfläche der Magnetpartikel bindet. Da auch bei der Immundetektion mit einem Maus-anti-Hsp90-Antikörper der Gesamtproteine einer *E. coli*-Expressionskultur des 84 kDa-Fusionsproteins eine schwache Bande in dieser Größe zu sehen war, kann dies auf ein Degradationsprodukt hinweisen. Es wäre auch möglich, dass es sich um BSA handelt. Dieses wurde zur Blockierung verwendet und hat eine Größe von ca. 60 kDa. Aufgrund der starken unspezifischen Bindung des Fusionsproteins an die Matrix der Magnetpartikel ist dieser Ansatz für die gegebene Fragestellung nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen auf eine sensitivere Methode zurückgegriffen, die eine Unterscheidung der spezifischen von der unspezifischen Komponente der Bindung ermöglichte. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Technologie konnte eine spezifische Interaktion von Daf-21 und HC110-R *in vitro* bestätigt werden (Kapitel 3.4.10).

3.4 Potentielle Liganden des Rezeptors HC110-R

Die Methode der Oberflächenplasmonresonanz bietet für Bindungsstudien einige Vorteile. Bindungsreaktionen können in Echtzeit verfolgt werden, die Detektion benötigt keine zusätzlichen Markierungen und die Sensorchips können wiederverwendet werden. Zusätzlich ist ein flexibles experimentelles Design und eine schnelle Durchführbarkeit und Analyse gewährleistet.

3.4.1 Kopplungseffizienz des HC110-R Fusionsproteins an den CM5-Sensorchip

Das 54 kDa große Fusionsproteins des Klons pRSET-HCA1-445 wurde kovalent mit Hilfe einer Aminkopplung an einen CM5-Sensorchip gebunden. Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch die Beladung der Flusszelle des Sensorchips mit 6580 RU (6580 pg Protein pro mm², da 1 RU = 1 pg Protein pro mm²; „Biatechnology Handbook“, Version AB, 1998, Biacore, Freiburg) des Fusionsproteins. Der Ligandenbindungslevel lag je nach Experiment zwischen 1000 und 14000 RU. Einmal beladene Sensorchips wurden zum Teil an aufeinander folgenden Messtagen mehrfach verwendet. Zu diesem Zweck wurde der Sensorchip unter kontinuierlichem Pufferfluss, bei geringer Fließgeschwindigkeit und einer Temperatur von 25 °C über Nacht im Messgerät gelagert. Die Qualität des Liganden litt nachweislich nicht unter dieser Lagerung.

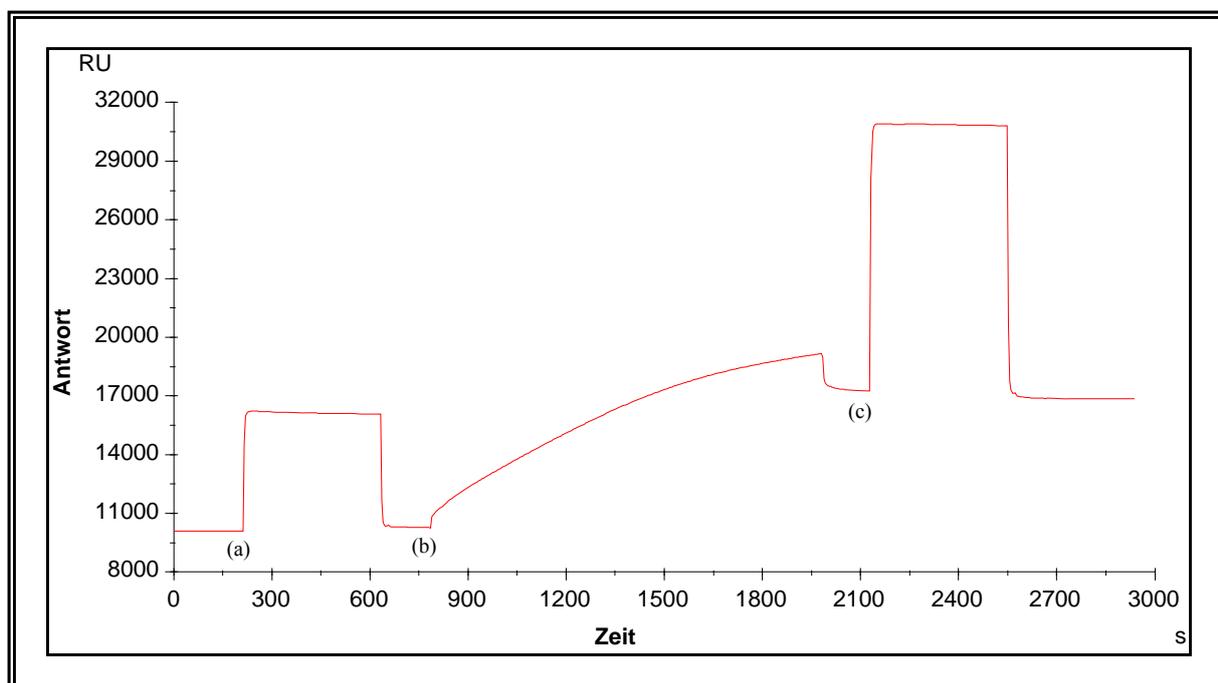


Abb. 3.9: Aminkopplung des Fusionsproteins des Klons pRSET-HCA1-445 an einen CM5-Sensorchip: Die Aktivierung der Oberfläche erfolgte durch Zugabe eines 1:1-Gemisches von EDC (75 mg/ml) und NHS (115 mg/ml) (a), gefolgt von der Injektion des 54 kDa großen Fusionsproteins (b). Eine Inaktivierung erfolgte mit Ethanolamin (c). Die Flussrate betrug während der gesamten Bindereaktion 5 µl/min. Es gelang eine Beladung des Sensorchips mit 6580 RU.

3.4.2 Bindung der Neuropeptide PF1, PF2, AF11 (*flp-1*)

Mit dem Fusionsprotein des Klons pRSET-HCΔ1-445 beladene CM5-Sensorchips wurden für Bindungsanalysen mit verschiedenen Neuropeptiden aus Nematoden eingesetzt. Die Neuropeptide wurden als Analyt in Lösung über die Chipoberfläche geleitet und ihre Assoziation und Dissoziation an den aminoterminalen Teil des Rezeptors HC110-R (Ligand) für jeweils 3 min, in Echtzeit, verfolgt. Die Konzentration des Analyten wurde variiert. Jede Messserie wurde mindestens dreimal an unterschiedlichen Messtagen und unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Die Vorgehensweise bei der Auswertung der Messserien wurde im Kapitel 2.12.4 anhand der Bindung des Neuropeptids PF2 ausführlich erläutert. Sofern ein Bindungsmodell angepasst und somit kinetische Parameter der Bindereaktion ermittelt werden konnten, wird dieses für die entsprechenden Peptide in den folgenden Kapiteln gezeigt und bewertet. Im Anhang dieser Arbeit sind die wichtigsten Grundlagen über Bindungskinetiken zusammengefasst und erläutert.

Das Neuropeptid PF2 wird in *C. elegans* von dem als *flp-1* bekannten Gen kodiert. Anhand unterschiedlicher Messserien konnte gezeigt werden, dass bei einem Ligandenbindungslevel von 3000 RU noch bei einer Analytenkonzentration von 5 μM eine Bindung von PF2 an den Rezeptor nachgewiesen werden kann. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Abbildungen 3.10 (A) bis (D) zusammengefasst. Abbildung 3.10 (A) zeigt die Bindung von 400 μM PF2 an eine mit 3180 RU beladene Oberfläche (rot) bzw. die Kontrollmessung an einer ungekoppelten Oberfläche (blau). In Abbildung 3.10 (B) ist die Bindungskurve nach Subtraktion der Referenz wiedergegeben. Entsprechend zeigen die Abbildung 3.10 (C) und (D) die Bindung von 5 μM PF2 unter den gegebenen Bedingungen. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass bei einem Ligandenbindungslevel im Bereich von 8000 RU auch bei Injektion des Analyten von 500 nM noch eine Bindung detektiert werden konnte. Zusammengefasst sind die Ergebnisse der Bindung von PF2 an eine mit 7735 RU beladene Oberfläche in den Abbildung 3.10 (E) bis (H). Die Abbildung 3.10 (E) und (F) zeigen die Bindung von 400 μM PF2 an das 54 kDa große Fusionsprotein. In den Abbildung 3.10 (G) und (H) sind die Daten der Bindung von 500 nM des Analyten unter diesen Bedingungen gezeigt.

Für die Bindung des Neuropeptids PF2 an das 54 kDa große Fusionsprotein von HC110-R konnte mit Hilfe der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘ zudem ein Bindungsmodell angepasst und kinetische Parameter ermittelt werden. Verwendet wurde eine Messserie mit den Analyten-Konzentrationen 400 μM , 200 μM , 130 μM , 100 μM , 80 μM , 70 μM , 60 μM , 50 μM und 40 μM . Die Auswertung der Daten und die Bewertung des Modells wurden ausführlich in Kapitel 2.12.4 beschrieben. Das an die Messwerte angepasste Modell (Abbildung 3.11 A) wurde in mehreren Schritten visuell und numerisch bewertet. Die visuelle Kontrolle zeigte keine systematischen Fehler. Abbildung 3.11 (B), eine graphische Darstellung zur visuellen Bewertung des Modells, verdeutlicht, dass das angepasste Modell in einigen Datenpunkten bis zu 25 RU von den Messwerten abweicht. Für die vorliegenden Messungen ist das angepasste Modell somit zufriedenstellend, jedoch nicht optimal.

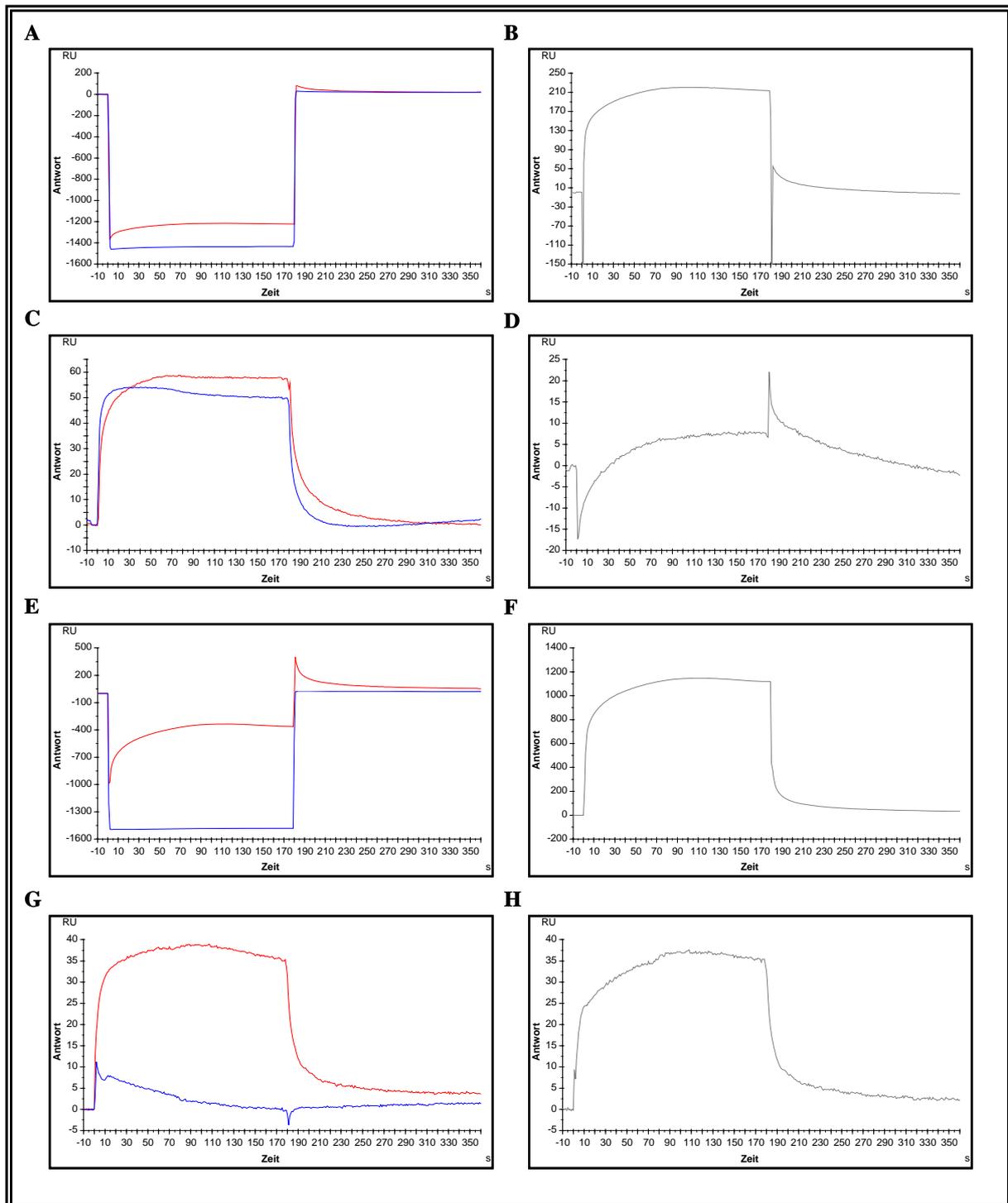


Abb. 3.10: Bindung des Neuropeptids PF2 an das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445. Das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden (3180 RU A-D; 7735 RU E-H) und Konzentrationen zwischen 400 μM und 500 nM des Analyten PF2 im Laufpuffer BIACORE-Puffer I gemessen. Der theoretische R_{max} -Wert beträgt 62 RU (A-D) bzw. 143 RU (E-H). Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Alle Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Abbildung (A) zeigt die Bindung von 400 μM PF2 an das Fusionsprotein (rot). Die Kontrolle ist in blau dargestellt. Abbildung (B) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. In Abbildung (C) und (D) wird entsprechend die Bindung von 5 μM PF2 an das 54 kDa große Fusionsprotein wiedergegeben. Abbildung (E) zeigt die Bindung von 400 μM PF2 an eine Flusszelle mit einem Ligandenbindungslevel von 7735 RU (rot) und die entsprechende Kontrolle (blau). Dargestellt ist zudem die durch Abzug der Kontrolle korrigierte Bindungskurve (F). Abbildungen (G) und (H) zeigen entsprechend die Bindung von 500 nM PF2.

Tabellen 3.3 fasst die angepassten bzw. berechneten Parameter des Modells zusammen. Der χ^2 -Wert für den vorliegenden Fall liegt mit 11 deutlich über dem optimalen Wert von höchstens 2. Er kann aber als akzeptabel beurteilt werden.

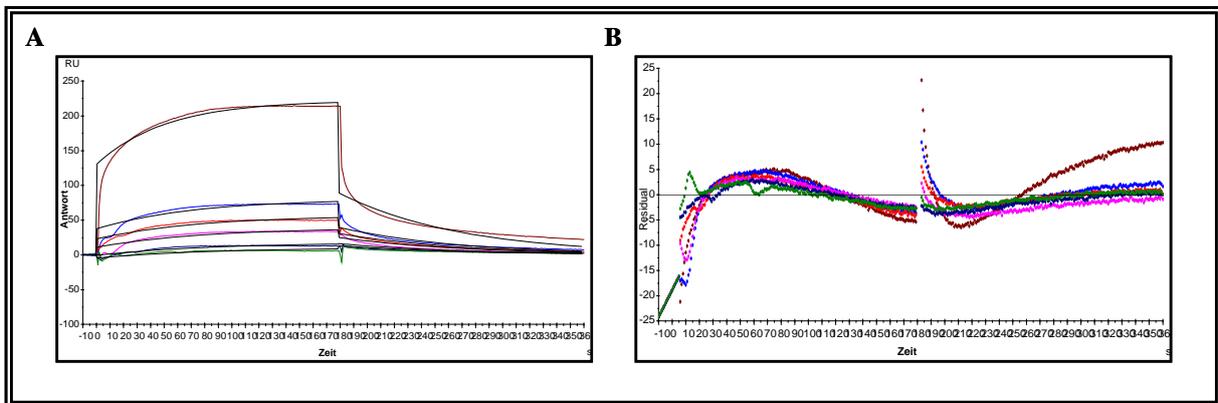


Abb. 3.11: Bindung des Neuropeptids PF2 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445. (A) Die durch Subtraktion der Kontrollkurven korrigierten Bindungskurven wurden für die Berechnung eines Bindungsmodells mit Hilfe der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘, mit einer Bindungsstöchiometrie von 1:1, verwendet. Die schwarzen Kurven stellen das angepasste Modell dar. 400 μM (dunkelrot), 133 μM (blau), 100 μM (rot), 80 μM (rosa), 50 μM (dunkelblau) und 40 μM (dunkelgrün). Abbildung (B) zeigt die Differenz der experimentellen Datenpunkte zu den errechneten Datenpunkten. Die Graphik wird in der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘ als optische Hilfe zur Bewertung der Qualität einer Anpassung als ‚Residual Plot‘ berechnet.

Der theoretische R_{max} -Wert für die hier vorliegende Messung beträgt 122 RU. Der durch Anpassung des Modells bestimmte Wert von 214 RU überschreitet diesen Wert um 75 %. Die Betrachtung der Standardfehler und T-Werte im vorliegenden Fall sprechen für signifikante und somit verlässliche Werte.

Tab. 3.3: Bindung des Neuropeptids PF2 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445. Die Tabelle zeigt die zu obigem Modell (Abbildung 3.11 A) von der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘ berechneten bzw. angepassten Parameter und die dazugehörigen Werte des T-Tests (T) und die Standardfehler (SE).

Konzentration Analyt	RI (RU)	T (RI)	SE (RI)
400 μM	130	220	0,6
133 μM	37,4	100	0,4
100 μM	22,9	68	0,3
80 μM	10,9	34,7	0,3
50 μM	-0,8	-2,8	0,2
40 μM	-4,6	-16,9	0,3
k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	R_{max} (RU)	K_A (M^{-1})
21	0,01	214	$1,9 \times 10^3$
T (k_a)	T (k_d)	T (R_{max})	K_D (M)
33,2	95	44,6	$5,3 \times 10^{-4}$
SE (k_a)	SE (k_d)	SE (R_{max})	χ^2
0,6	$1,2 \times 10^{-4}$	4,8	11

Die Assoziationsratenkonstante von $21 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ beschreibt eine sehr langsame Komplexbildung zwischen Ligand und Analyt. Die Dissoziationsratenkonstante von $0,01 \text{ s}^{-1}$ beschreibt eine sehr schnelle Dissoziation. Abschließend wurden die errechneten K_D -Wert des Modells betrachtet. Der K_D -Wert ist ein Maß für die Affinität der Bindung. Er sollte nicht größer als

die Hälfte der höchsten Konzentration (hier: 2×10^{-4} M) sein. Dies ist im vorliegenden Fall, mit einem K_D -Wert von $5,3 \times 10^{-4}$ M, jedoch nicht gegeben. Es kann somit anhand der ermittelten Daten abgeleitet werden, dass es sich um eine sehr schwache Bindung des Neuropeptids PF2 an das aminoterminal Fusionsprotein des Rezeptors HC110-R handelt.

Das Neuropeptid PF1, mit einem Molekulargewicht von 993 Da, zeigte ebenfalls eine deutliche Bindung an das 54 kDa große Fusionsprotein. Gemessen wurden die Konzentrationen 400 μ M, 125 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 800 nM und 500 nM. Bei Messungen im Bereich eines Ligandenbindungslevels von 9000 bis 10000 RU, und somit einem theoretischen R_{\max} -Wert zwischen 165 und 183 RU, kam es auch bei einer Analytenkonzentration von 500 nM noch zu einer messbaren Bindung.

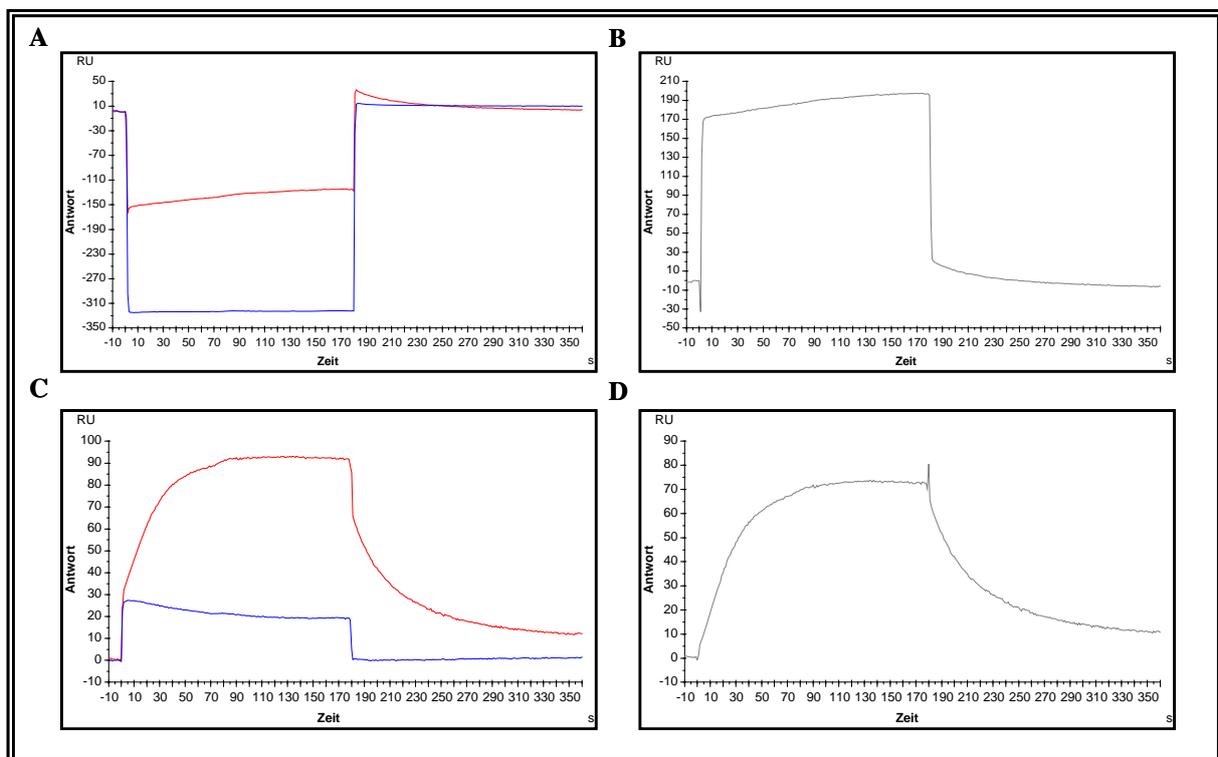


Abb. 3.12: Bindung des Neuropeptids PF1 an das Fusionsprotein des Klon pRSET-HC Δ 1-445. Das Fusionsprotein des Klon pRSET-HC Δ 1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden und Konzentrationen des Analyten PF1 zwischen 400 μ M und 500 nM im Laufpuffer BIACORE-Puffer I gemessen. Der theoretische R_{\max} -Wert beträgt 180 RU. Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Alle Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Abbildung (A) zeigt die Bindung von 400 μ M PF1 an das Fusionsprotein (rot). Die Kontrolle ist in blau dargestellt. Abbildung (B) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. In Abbildung (C) und (D) wird entsprechend die Bindung von 500 nM PF1 an das 54 kDa große Fusionsprotein wiedergegeben.

Abbildung 3.12 (A) zeigt die Injektion von 400 μ M des Neuropeptids PF1 über eine mit 9721 RU beladene Flusszelle (rot) bzw. über die unbeladene Referenzoberfläche (blau). Abbildung 3.12 (B) zeigt die durch Subtraktion der Kontrolle korrigierte Messkurve. Der theoretische R_{\max} -Wert dieser Messserie wurde nach obiger Gleichung ermittelt und beträgt 180 RU. Der Analyt zeigte auch noch mit einer Konzentration von 500 nM eine deutliche Bindung an das aminoterminal Fusionsprotein des Rezeptors. Abbildung 3.12 (C) zeigt im Vergleich zu der

Referenzkurve (blau) eine Assoziation (rot). Auch die Dissoziationsphase unterscheidet sich bei einer Konzentration von 500 nM noch eindeutig von der Referenz.

Das 1492 Da große Neuropeptid AF11 zeigte bei allen gemessenen Konzentrationen (400 μ M, 125 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 800 nM und 500 nM) eine Bindung an das 54 kDa große Fusionsprotein von HC110-R. Messungen fanden in einem Bereich des Ligandenbindungslevels zwischen 5500 und 11000 RU (theoretischer R_{\max} 152 bis 305 RU) statt. In Abbildung 3.13 sind einige repräsentative Messdaten zusammengestellt. Abbildung 3.13 (A) zeigt die Bindung von 400 μ M AF11 an eine mit 10699 RU beladene Flusszelle (rot) und die dazugehörige Kontrolle (blau). In Abbildung 3.13 (B) wird das Ergebnis der Subtraktion der Referenz von der Bindungskurve wiedergegeben. Entsprechend zeigen die Abbildung 3.13 (C) und (D) die Bindung von 500 nM des Neuropeptids an die mit dem Fusionsprotein beladene Oberfläche (rot), die Kontrolle (blau) und die korrigierte Bindungskurve.

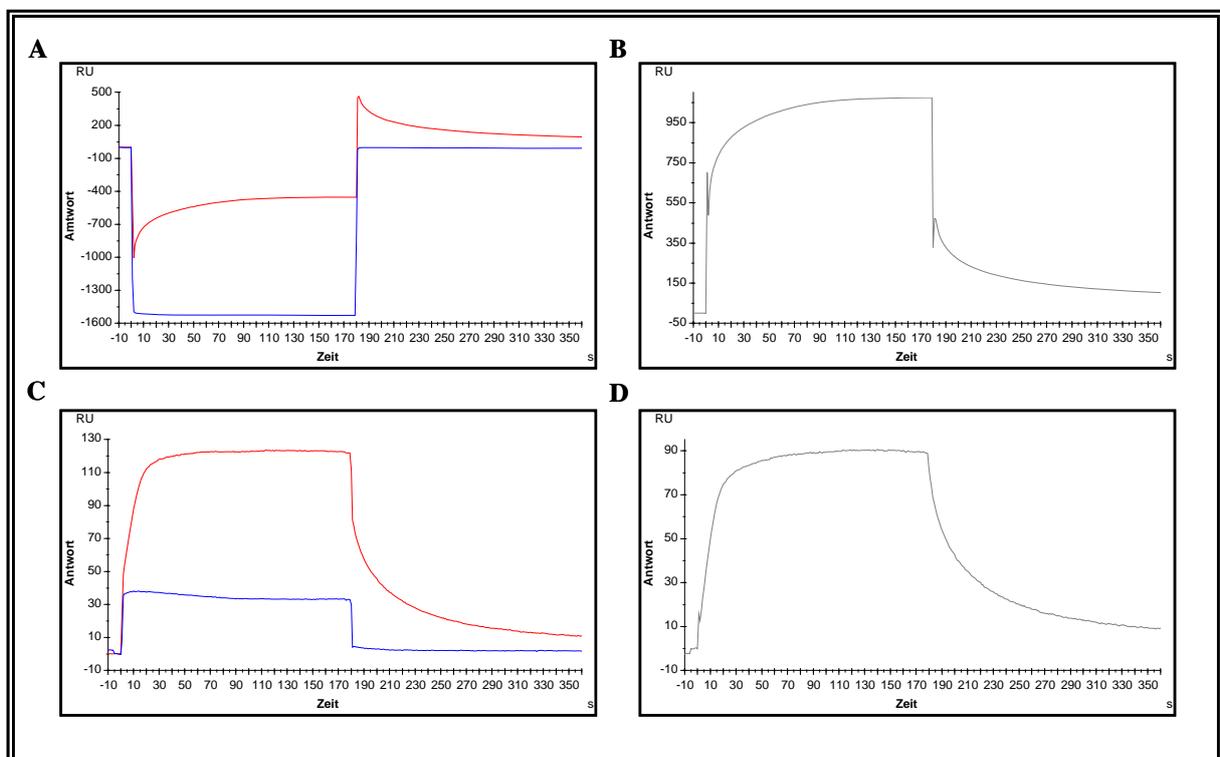


Abb. 3.13: Bindung des Neuropeptids AF11 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HC Δ 1-445. Das Fusionsprotein des Klons pRSET-HC Δ 1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden (10699 RU) und Konzentrationen des Analyten AF11 zwischen 400 μ M und 500 nM im Laufpuffer BIACORE-Puffer I gemessen. Der theoretische R_{\max} -Wert beträgt 111 RU. Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Alle Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Abbildung (A) zeigt die Bindung von 400 μ M AF11 an das Fusionsprotein (rote Kurve). Die Kontrolle ist in blau dargestellt. Abbildung (B) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. In Abbildung (C) und (D) wird entsprechend die Bindung von 500 nM AF11 an das 54 kDa große Fusionsprotein wiedergegeben.

3.4.3 Bindung des Neuropeptids AF5 (*flp-4*)

Das Neuropeptid AF5 (*flp-4*) hat ein Molekulargewicht von 1050 Da. Bindungsstudien zeigten bei Verwendung des Laufpuffers BIACORE-Puffer I eine starke unspezifische Bindung an die Matrix des Sensorchips.

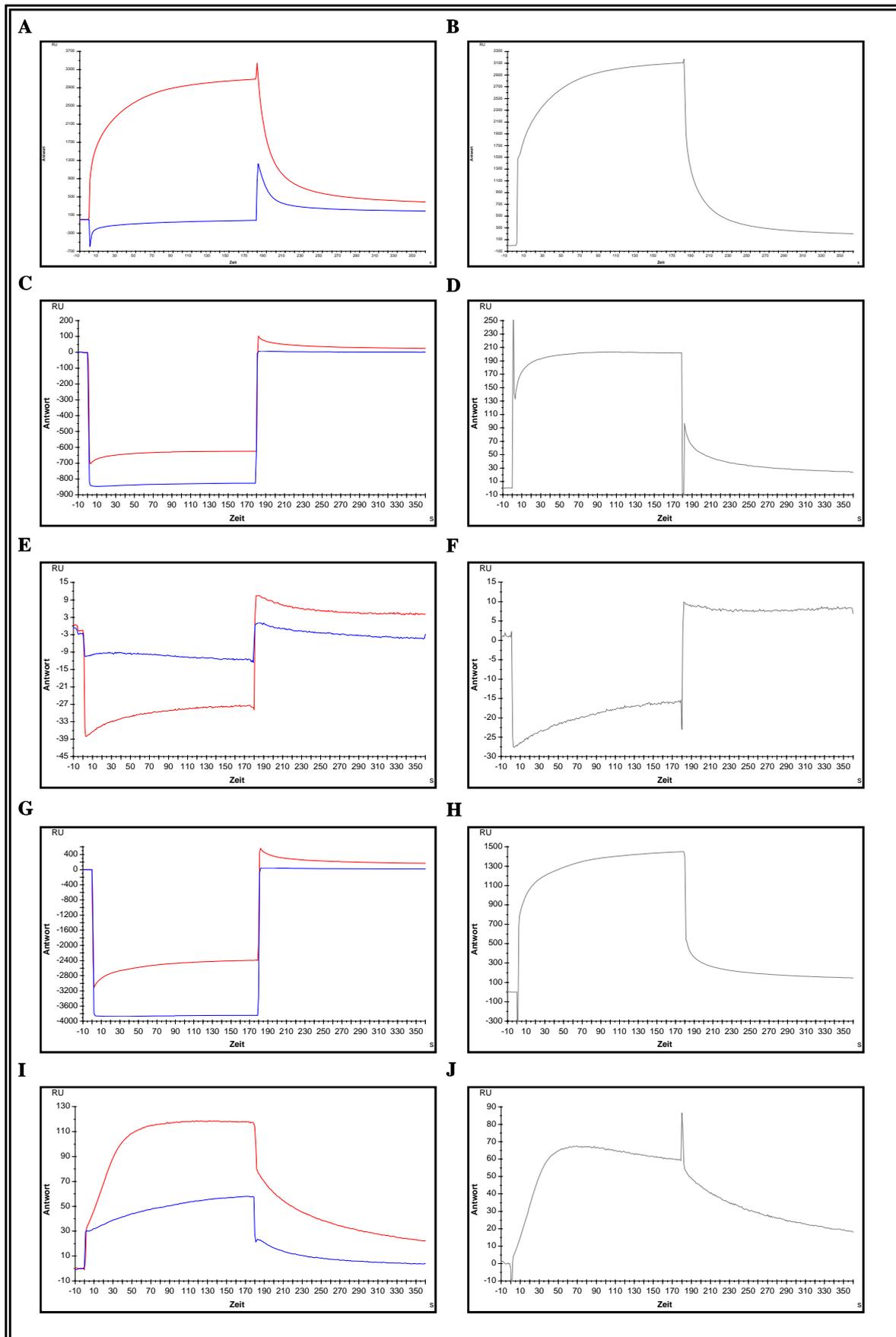


Abb. 3.14: Bindung des Neuropeptids AF5 an das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445. Das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden (3240 RU A+B; 4278 RU C-F; 10439 RU G-J) und Konzentrationen des Analyten AF5 zwischen 400 μ M und 500 nM im Laufpuffer BIACORE-Puffer I bzw. BIACORE-Puffer II gemessen. Die

theoretischen R_{\max} -Werte betragen 63 RU (A-B), 83 RU (C-F) und 202 RU (G-J). Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Alle Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Abbildung (A) zeigt, dass das Neuropeptid AF5 in einem Laufpuffer ohne NaCl (BIACORE-Puffer I) eine starke unspezifische Bindung an die Referenzoberfläche aufweist. Die rote Bindungskurve zeigt die Bindung von 400 μM AF5 an das Fusionsprotein unter diesen Bedingungen. In blau dargestellt ist die unspezifische Bindung an die ungekoppelte Oberfläche. Abbildung (B) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. Aus diesem Grund wurde für die Bindungsanalyse des Peptids AF5 ein Laufpuffer mit 300 mM NaCl verwendet (BIACORE-Puffer II). Die Abbildungen C-J zeigen die Ergebnisse dieser Messungen. Abbildung (C) gibt die Bindung von 400 μM AF5 an das Fusionsprotein wieder (rote Kurve). Die Kontrolle ist in blau dargestellt. Abbildung (D) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. In Abbildung (E) und (F) wird entsprechend die Bindung von 20 μM AF5 an das 54 kDa große Fusionsprotein wiedergegeben. Abbildung (G) zeigt die Bindung von 400 μM AF5 an eine Flusszelle mit einem Ligandenbindungslevel von 10439 RU (rot) und die entsprechende Kontrolle (blau). Dargestellt ist zudem die durch Abzug der Kontrolle korrigierte Bindungskurve (H). Abbildungen (I) und (J) zeigen entsprechend die Bindung von 500 nM AF5.

Unter diesen Pufferbedingungen waren die Messungen nicht auswertbar. Abbildung 3.14 (A) zeigt die Bindung von 400 μM AF5 an das 54 kDa große Fusionsprotein unter diesen Pufferbedingungen. In rot dargestellt ist die Bindung an eine mit 3240 RU beladene Oberfläche, in blau die Kontrolle. Zur Minimierung der unspezifischen Bindung, wurde deshalb dem Laufpuffer 300 mM Natriumchlorid hinzugesetzt (BIACORE-Puffer II). Die Ergebnisse dieser Messungen lassen sich somit nicht direkt mit den Ergebnissen der anderen Neuropeptide vergleichen. Die Konzentration des Analyten lag zwischen 400 μM und 500 nM. Bei Messungen mit einem Ligandenbindungslevel im Bereich von 4000 RU konnte bis zu einer Konzentration von 20 μM eine Bindung des Neuropeptids an das Fusionsprotein festgestellt werden. Dieses ist in den Abbildungen 3.14 (C) bis (F) wiedergegeben. Die Abbildungen 3.14 (C) und (D) zeigen die Bindung von 400 μM AF5 an eine mit 4278 RU beladene Oberfläche und die Referenz. Entsprechend stellen die Abbildungen 3.14 (E) und (F) die Bindung von 20 μM des Neuropeptids unter diesen Bedingungen dar. Mit einem Ligandenbindungslevel im Bereich von 10000 bis 10500 RU kam es sogar noch mit einer Konzentration von nur 500 nM AF5 zu einer deutlich messbaren Bindung. In Abbildungen 3.14 (G) und (H) ist die Bindung von 400 μM AF5 an eine mit 10439 RU beladene Oberfläche und die gemessene Kontrolle respektive die korrigierte Bindungskurve gezeigt. Die Abbildungen 3.14 (I) und (J) stellen die deutliche Bindung von 500 nM AF5 und die entsprechende Referenz dar.

3.4.4 Bindung des Neuropeptids PF3 (*flp-6*)

Das von dem Gen *flp-6* kodierte Neuropeptid PF3 (900 Da) wurde ebenfalls mit Konzentrationen zwischen 400 μM und 500 nM auf eine Bindung an den aminoterminalen Teil von HC110-R überprüft. Bei Untersuchungen in einem Bereich des Ligandenbindungslevels von 3500 bis 5000 RU kam es bis zu einer Konzentration von 20 μM zu einer Bindung zwischen Analyt und Ligand. In niedrigeren Konzentrationsbereichen konnte eine Bindung unter den gegebenen Konditionen nicht mehr detektiert werden. In Abbildung 3.15 sind einige der Originaldaten der Messungen dargestellt. Für die gezeigten Messergebnisse konnte der theoretischer R_{\max} -Wert von 86 RU berechnet werden.

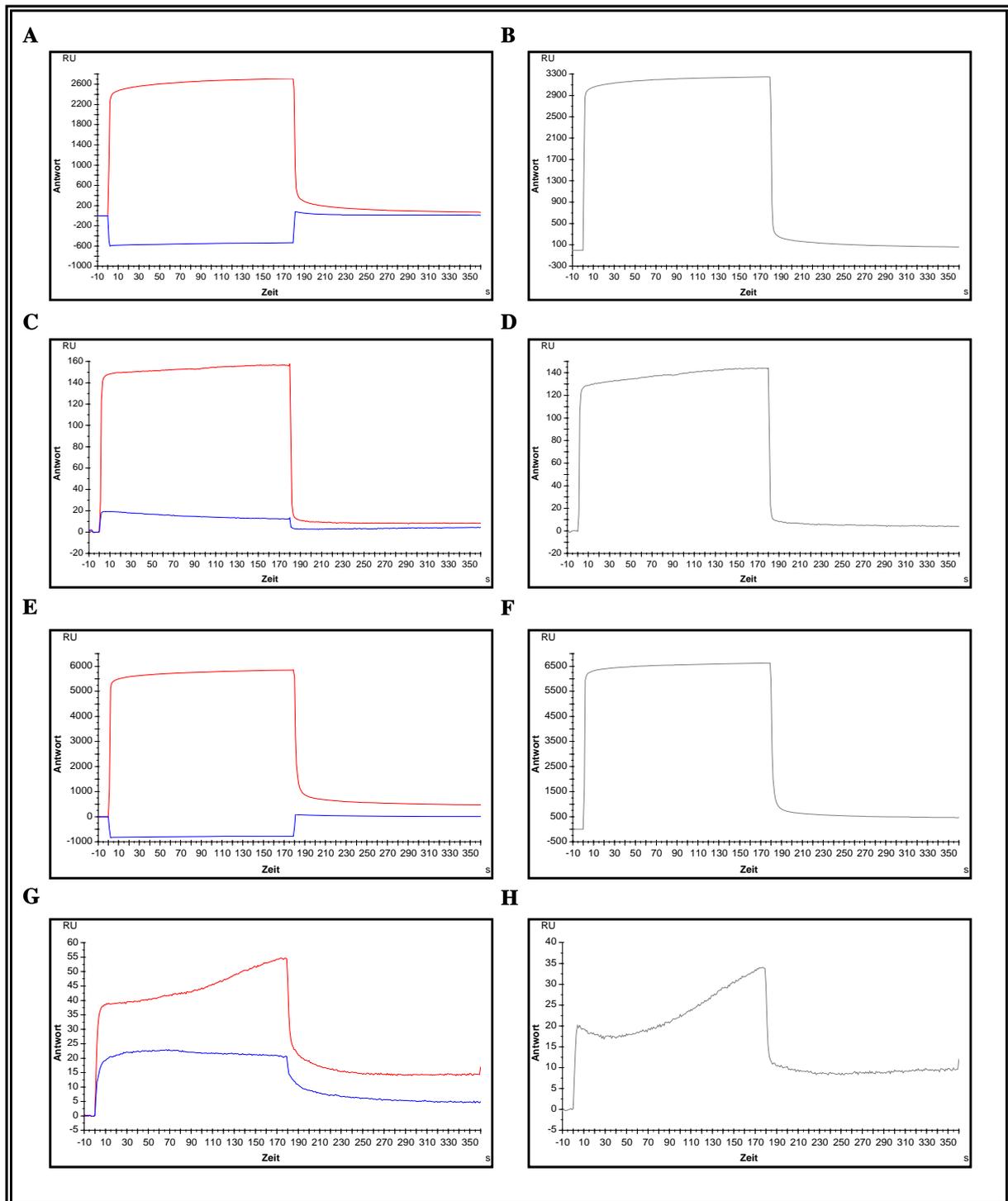


Abb. 3.15: Bindung des Neuropeptids PF3 an das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445. Das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden (5165 RU A-D; 14299 RU E-H) und Konzentrationen des Analyten PF3 zwischen 400 μM und 500 nM im Laufpuffer BIACORE-Puffer I gemessen. Der theoretische R_{max} -Wert beträgt 86 RU (A-D) bzw. 238 RU (E-H). Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Alle Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Abbildung (A) zeigt die Bindung von 400 μM PF3 an das Fusionsprotein (rot). Die Kontrolle ist in blau dargestellt. Abbildung (B) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. In den Abbildungen (C) und (D) wird entsprechend die Bindung von 20 μM PF3 an das 54 kDa große Fusionsprotein wiedergegeben. Abbildung (E) zeigt die Bindung von 400 μM PF3 an eine Flusszelle mit einem Ligandenbindungslevel von 14299 RU (rot) und die entsprechende Kontrolle (blau). Gezeigt wird zudem die durch Abzug der Kontrolle korrigierte Bindungskurve (F). Abbildungen (G) und (H) stellen entsprechend die Bindung von 1 μM PF3 dar.

Abbildung 3.15 (A) zeigt die Bindung von 400 μM des Fusionsproteins PF3 an den 54 kDa großen Liganden (rot) bzw. an die Referenzerfläche (blau). PF3 zeigt eine unspezifische Bindung an die Referenzerfläche, die jedoch durch Subtraktion der Kontrollkurve von der Bindungskurve eliminiert werden konnte (Abbildung 3.15 B). Abbildung 3.15 (C) zeigt die Bindung bei einer Konzentration von 20 μM (rot) mit der entsprechenden Kontrolle (blau). Die korrigierte Bindungskurve ist in Abbildung 3.15 (D) dargestellt. In weiteren Messungen konnte gezeigt werden, dass mit einem Ligandenbindungslevel von etwa 14000 RU sogar noch bei einer Konzentration von 1 μM eine Bindung nachgewiesen werden konnte. In den Abbildungen 3.15 (E) bis (H) sind die Ergebnisse aus einer Messserie mit einem Ligandenbindungslevel von 14299 RU zusammengefasst. Dabei zeigen die Abbildungen (E) und (F) die Bindung von 400 μM des Analyten an die beschriebene Oberfläche und die dazugehörigen Kontrollen. Die Abbildungen 3.15 (G) und (H) zeigen die Bindung von 1 μM PF3 an das 54 kDa große Fusionsprotein.

Mit den Messdaten des Neuropeptids PF3 war es möglich mittels der Auswertungssoftware, unter Annahme einer Bindungsstöchiometrie von 1:1, ein Bindungsmodell anzupassen. Vorgegangen wurde wie anhand des Neuropeptides PF2 im vorherigen Kapitel beschrieben. In die Auswertung eingegangen sind die Bindungskurven der Konzentrationen 100 μM , 50 μM , 20 μM , 10 μM und 5 μM . Die Abbildung 3.16 (A) zeigt die ausgewählten Bindungskurven und das angepasste Bindungsmodell (schwarz). Die visuelle Kontrolle des Modells zeigt keine systematischen Fehler. Bei Betrachtung des ‚Residual Plots‘ (Abbildung 3.16 B) wird deutlich, dass das Modell in den meisten Datenpunkten nicht mehr als 8 RU von den Messwerten abweicht. Die Anpassung kann somit in dieser Hinsicht als zufriedenstellend betrachtet werden.

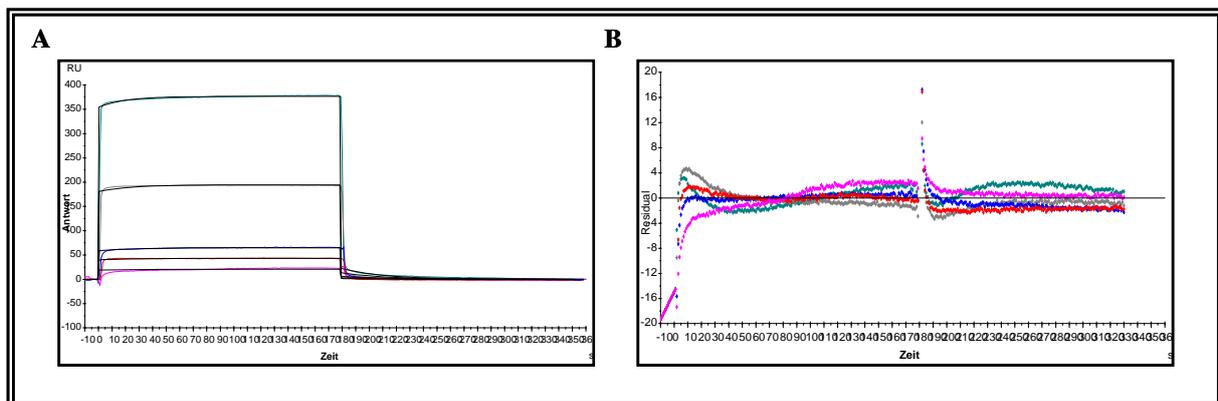


Abb. 3.16: Bindung des Neuropeptids PF3 an das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445. (A) Die durch Subtraktion der Kontrollkurven korrigierten Bindungskurven wurden für die Berechnung eines Bindungsmodells mit Hilfe der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘, mit einer Bindungsstöchiometrie von 1:1, verwendet. Die schwarzen Kurven stellen das angepasste Modell dar. 100 μM (dunkelgrün), 50 μM (grau), 20 μM (blau), 10 μM (rot), 5 μM (rosa). Abbildung (B) zeigt die Differenz der experimentellen Datenpunkte zu den errechneten Datenpunkten. Die Graphik wird in der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘ als optische Hilfe zur Bewertung der Qualität einer Anpassung als ‚Residual Plot‘ berechnet.

Die angepassten bzw. errechneten Parameter des Modells sind in der Tabelle 3.4 zusammengefasst. Der χ^2 -Test zeigt ebenfalls, mit einem Wert von 3,9 und somit ca. 6 % des R_{max} -Wertes, ein akzeptables Ergebnis. Bei der Entscheidung über die Verlässlichkeit der angepassten bzw. errechneten Werte hilft die Betrachtung der Resultate des T-Tests und des

Standardfehlers für jeden einzelnen Wert. Dabei fällt auf, dass diese für alle Werte nach den oben genannten Kriterien signifikant sind, jedoch die Assoziationsratenkonstante (k_a) kritisch bewertet werden sollte. Es handelt sich mit einem Wert von $190 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ um eine sehr langsame Assoziation. Die Dissoziationsratenkonstante (k_d) beschreibt mit $0,03 \text{ s}^{-1}$ eine relativ schnelle Dissoziation. Der theoretisch anhand obiger Formel berechnete R_{max} -Wert beträgt 60 RU und entspricht somit ungefähr dem mit 61,7 RU angegebenen Wert des Auswertungsprogrammes. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D kann für dieses Modell nicht bewertet werden, da sie sich aus dem Quotienten der Dissoziationsratenkonstante k_d und der Assoziationsratenkonstante k_a ergibt. Da in diesem Fall der k_a -Wert nicht als signifikant bewertet werden konnte, lässt sich somit auch keine verlässliche Gleichgewichtsdissoziationskonstante bestimmen.

Tab. 3.4: Bindung des Neuropeptids PF3 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCΔ1-445. Die Tabelle zeigt die zu obigem Modell (Abbildung 3.16) von der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘ berechneten bzw. angepassten Parameter und die dazugehörigen Werte des T-Tests (T) und die Standardfehler (SE).

Konzentration Analyt	RI (RU)	T (RI)	SE (RI)
100 μM	354	632	0,6
50 μM	180	466	0,4
20 μM	58,6	237	0,2
10 μM	39,8	214	0,2
5 μM	18,8	118	0,2
$k_a (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_d (\text{s}^{-1})$	$R_{\text{max}} (\text{RU})$	Chi^2
190	0,03	61,7	3,9
T (k_a)	T (k_d)	T (R_{max})	
9,4	$2,9 \times 10^1$	12,5	
SE (k_a)	SE (k_d)	SE (R_{max})	
20,2	$1,1 \times 10^{-3}$	4,9	

3.4.5 Bindung des Neuropeptids AF1 (*flp-8*)

Das Neuropeptid AF1, mit einem Molekulargewicht von 951 Da, wurde ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen (zwischen 500 nM und 400 μM) über eine mit dem 54 kDa großen Fusionsprotein beladene Flusszelle geleitet und auf eine Bindung untersucht. Bei einem Ligandenbindungslevel von 3000 bis 4000 RU kommt es noch bis zu einer Konzentration des Analyten von 1 μM zu einer Bindung. Zusammengefasst sind die Ergebnisse in Abbildung 3.17 (A) bis (D). Wie in Abbildung 3.17 (A) zu sehen ist, kommt es auch bei einer Konzentration von 400 μM nicht zu einer unspezifischen Bindung des Neuropeptids an die Kontrolloberfläche (blau). Abbildung 3.17 (B) zeigt die Bindungskurve nach Subtraktion der Kontrolle. Des Weiteren ist in Abbildung 3.17 (C) und (D) entsprechend die Bindung bei einer Konzentration des Analyten von 1 μM zusammengestellt. Die Abbildungen 3.17 (E) bis (H) zeigen einen weiteren Versuch mit einem deutlich höheren theoretischen R_{max} -Wert von 188 RU. Gezeigt wird auch hier die Bindereaktion bei einer Analytenkonzentration von 400 μM (rot) an die mit dem Fusionsprotein beladene Oberfläche mit der entsprechenden Referenz (blau) (E) und der korrigierten Bindungskurve in Abbildung 3.17 (F). Zu einer Bindung kommt es bei einem Ligandenbindungslevel von 10699 RU auch noch bei einer Konzentration von 500 nM (Abbildung 3.17 G + H).

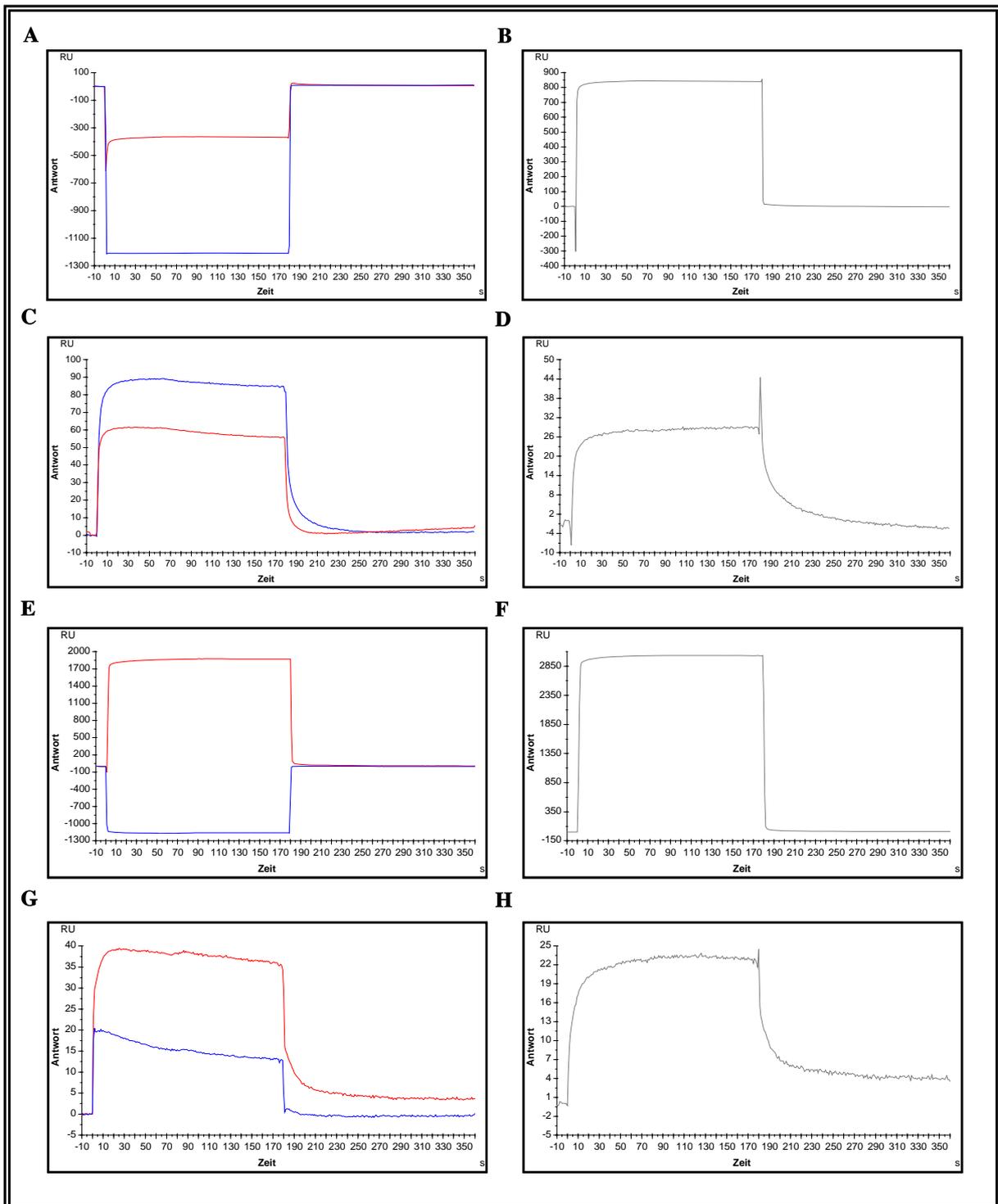


Abb. 3.17: Bindung des Neuropeptids AF1 an das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445. Das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden (3380 RU A-D; 10699 RU E-H) und Konzentrationen des Analyten AF1 zwischen 400 μ M und 500 nM im Laufpuffer BIACORE-Puffer I gemessen. Der theoretische R_{\max} -Wert beträgt 60 RU (A-D) bzw. 188 RU (E-H). Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Alle Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Abbildung (A) zeigt die Bindung von 400 μ M AF1 an das Fusionsprotein (rot). Die Kontrolle ist in blau dargestellt. Abbildung (B) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. In Abbildung (C) und (D) wird entsprechend die Bindung von 1 μ M AF1 an das 54 kDa große Fusionsprotein wiedergegeben. Abbildung (E) zeigt die Bindung von 400 μ M AF1 an eine Flusszelle mit einem Ligandenbindungslevel von 10699 RU (rot) und die entsprechende Kontrolle (blau). Gezeigt wird zudem die durch Subtraktion der Kontrolle korrigierte Bindungskurve (F). Abbildungen (G) und (H) zeigen entsprechend die Bindung von 500 nM AF1.

Die Auswertung der Bindungsdaten mittels der Auswertungssoftware machte zusätzlich die Anpassung eines Bindungsmodells möglich. Die für die Anpassung verwendeten Bindungskurven (125 μM , 100 μM , 50 μM , 20 μM und 5 μM) und das Modell sind in Abbildung 3.18 (A) wiedergegeben. Zudem zeigt die Abbildung 3.18 (B) den ‚Residual Plot‘ zur visuellen Beurteilung des Modells. Das Modell weicht nur in sehr wenigen Datenpunkten mehr als 10 RU von den Messpunkten ab und enthält keine größeren systematischen Fehler.

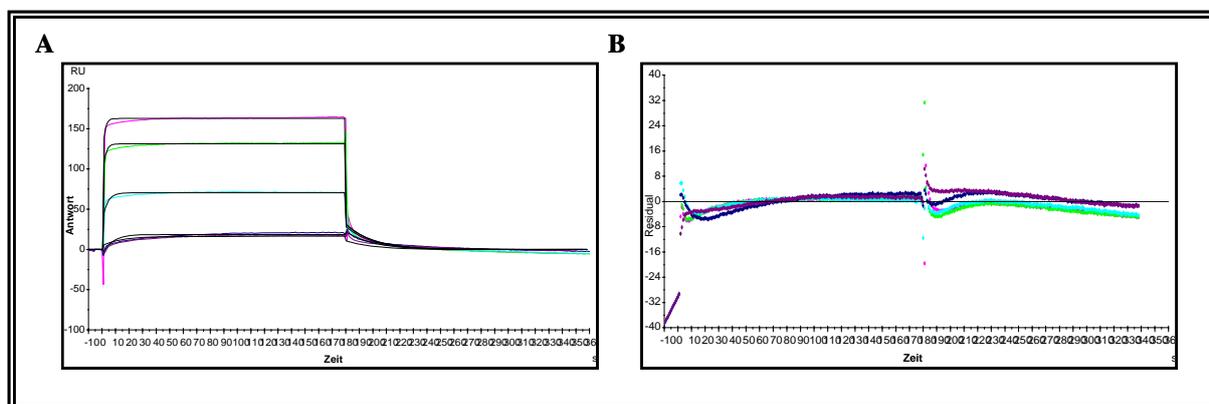


Abb. 3.18: Bindung des Neuropeptids AF1 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445. (A) Die durch Subtraktion der Kontrollkurven korrigierten Bindungskurven wurden für die Berechnung eines Bindungsmodells mit Hilfe der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘, mit einer Bindungsstöchiometrie von 1:1, verwendet. Die schwarzen Kurven stellen das angepasste Modell dar. 125 μM (grün), 100 μM (türkis), 50 μM (dunkelblau), 20 μM (dunkelrot), 5 μM (dunkelgrün). Abbildung (B) zeigt die Differenz der experimentellen Datenpunkte zu den errechneten Datenpunkten. Die Graphik wird in der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘ als optische Hilfe zur Bewertung der Qualität einer Anpassung als ‚Residual Plot‘ berechnet.

Die angepassten bzw. errechneten Parameter des Modells sind in Tabelle 3.5 zusammengestellt. Als Ergebnis des χ^2 -Tests ist in der Tabelle der Wert 5,9 angegeben. Dies entspricht etwa 17 % des angegebenen R_{max} -Wertes von 34,9 RU. Er liegt damit für eine sehr gute Anpassung deutlich über dem Richtwert von einem Prozent des R_{max} -Wertes.

Tab. 3.5: Bindung des Neuropeptids AF1 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445. Die Tabelle zeigt die zu obigem Modell (Abbildung 3.18) von der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘ berechneten bzw. angepassten Parameter und die dazugehörigen Werte des T-Tests (T) und die Standardfehler (SE).

Konzentration Analyt	RI (RU)	T (RI)	SE (RI)
125 μM	131	202	0,6
100 μM	99,7	159	0,6
50 μM	41,9	74,6	0,6
20 μM	-3,9	-7,7	0,5
5 μM	5,4	13,7	0,4
k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	R_{max} (RU)	K_A (M^{-1})
$4,6 \times 10^3$	0,05	34,8	$9,2 \times 10^4$
T (k_a)	T (k_d)	T (R_{max})	K_D (M)
18,2	$3,8 \times 10^1$	47	$1,1 \times 10^{-5}$
SE (k_a)	SE (k_d)	SE (R_{max})	χ^2
251	$1,3 \times 10^{-3}$	0,7	5,9

Die statistischen Verfahren zur Beurteilung der Signifikanz der Parameter, der T-Test und der Standardfehler, bestätigen die Werte des Modells. Auch in diesem Fall beschreiben der k_a - und

k_d -Wert eine sehr langsame Assoziation und eine schnelle Dissoziation. Der in der Tabelle angegebene R_{max} -Wert von 34,8 RU liegt 47 % unter dem errechneten R_{max} von 65 RU. Liegt der gemessene Wert unter dem theoretischen Wert ist dies durchaus realistisch, da eine 100%ige Sättigung der Bindungsstellen meist nicht erreicht wird. Abschließend zeigt die Betrachtung des K_D -Wertes, dass dieser mit $1,1 \times 10^{-5}$ M kleiner als die Hälfte der höchsten Konzentration ($0,6 \times 10^{-4}$ M) und somit durchaus realistisch ist. Er beschreibt jedoch eine Reaktion mit sehr niedriger Affinität.

3.4.6 Bindung des Neuropeptids AF19 (*flp-13*) und des synthetischen Kontrollpeptids AF19random

Das Neuropeptid AF19, des *C. elegans*-Gens *flp-13*, hat ein Molekulargewicht von 1187 Da. Seine Bindung an das 54 kDa große aminoterminale Ende des Rezeptors HC110-R wurde in einer Reihe von Messungen untersucht. Es konnte dabei festgestellt werden, dass bei einem theoretischen R_{max} -Wert zwischen 133 und 222 RU unter den gegebenen Bedingungen noch bei einer Konzentration von 500 nM AF19 eine deutliche Bindung detektiert werden konnte. Messungen dieser Messserie sind exemplarisch in Abbildung 3.19 (A) bis (D) zusammengestellt.

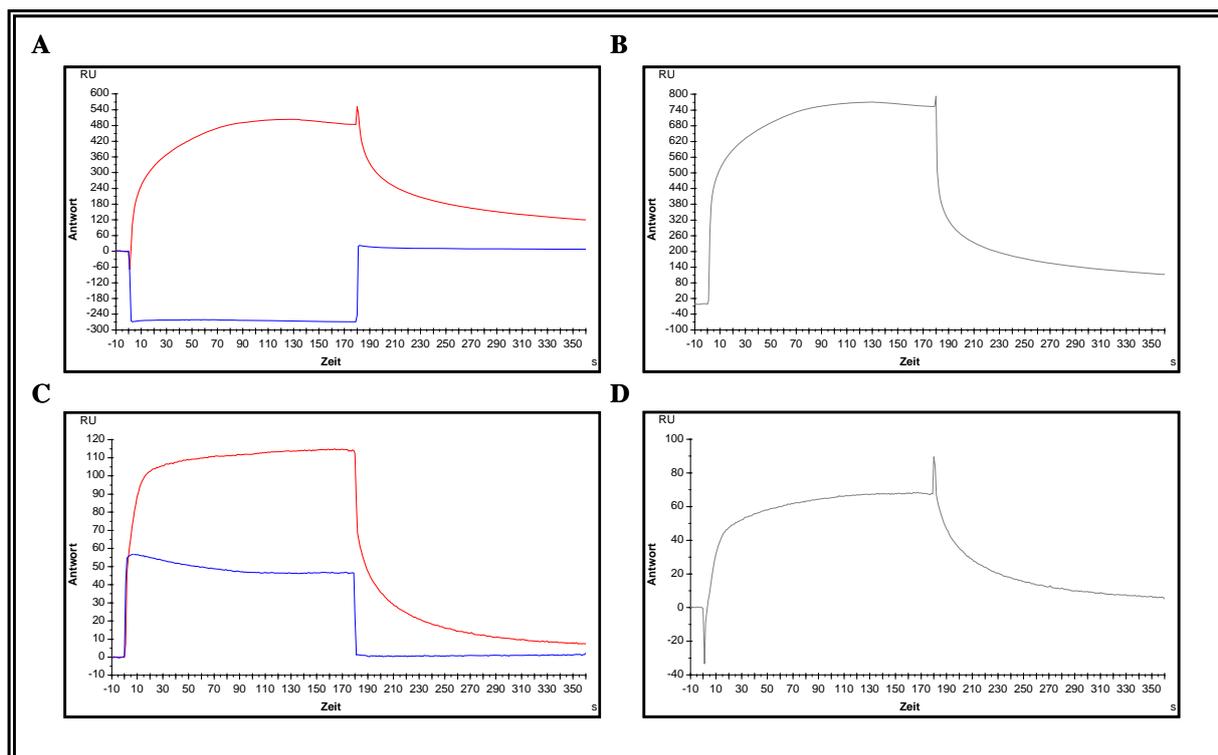


Abb. 3.19: Bindung des Neuropeptids AF19 an das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445. Das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden (5567 RU) und Konzentrationen des Analyten AF19 zwischen 400 µM und 500 nM im Laufpuffer BIACORE-Puffer I gemessen. Der theoretische R_{max} -Wert beträgt 180 RU. Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Alle Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Abbildung (A) zeigt die Bindung von 400 µM AF19 an das Fusionsprotein (rot). Die Kontrolle ist in blau dargestellt. Abbildung (B) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. In den Abbildungen (C) und (D) wird entsprechend die Bindung von 500 nM AF19 an das 54 kDa große Fusionsprotein wiedergegeben.

Abbildung 3.19 (A) zeigt in rot die Bindungskurve von 400 μM AF19 an die mit 6113 RU des Liganden beladene Oberfläche und in blau die entsprechende Referenzkurve. In Abbildung 3.19 (C) ist die Bindungskurve nach Subtraktion der Kontrollkurve dargestellt. In den weiteren Abbildungen ist die Bindung von 500 nM AF19 (rot) und die dazugehörige Kontrolle (blau) zu erkennen. Korrigiert wurde die Bindungskurve ebenfalls durch Subtraktion der Referenzkurve (D).

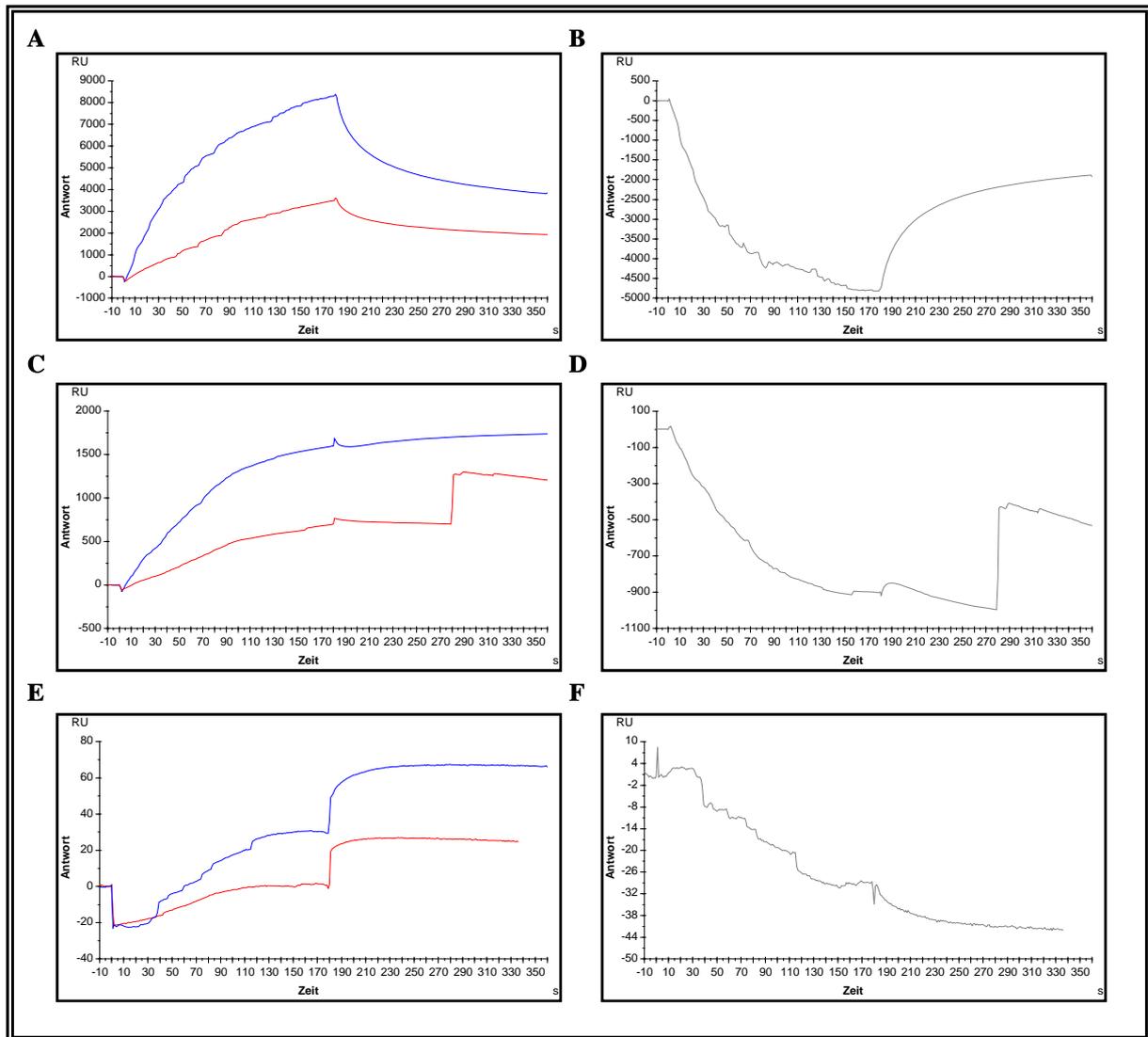


Abb. 3.20: Bindung des synthetischen Kontrollpeptids AF19random an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445. Das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden (5763 RU) und Konzentrationen des Analyten AF19random zwischen 400 μM und 30 μM im Laufpuffer BIACORE-Puffer I gemessen. Der theoretische R_{max} -Wert beträgt 128 RU. Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Alle Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Das Kontrollpeptid zeigte in allen Konzentrationen eine starke unspezifische, jedoch keine spezifische Bindung an das Fusionsprotein und die Kontrolloberfläche. Abbildung (A) zeigt die Bindung von 400 μM AF19random an das Fusionsprotein (rot). Die Kontrolle ist in blau dargestellt. Abbildung (B) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. In den Abbildungen (C) und (D) wird entsprechend die Bindung von 200 μM AF19random an das 54 kDa große Fusionsprotein wiedergegeben. Abbildung (E) zeigt die Bindung von 30 μM AF19random (rot) und die entsprechende Kontrolle (blau). Gezeigt wird zudem die durch Subtraktion der Kontrolle korrigierte Bindungskurve (F).

In einem Kontrollexperiment wurde die Bindung eines synthetischen Peptids an das 54 kDa große aminoternale Fusionsprotein des Rezeptors HC110-R untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Aminosäuren des Neuropeptids AF19 in eine willkürliche Reihenfolge gebracht und das künstlich erzeugte Peptid (AF19random) in unterschiedlichen Konzentrationen (400 μ M bis 30 μ M) auf eine Bindung untersucht. Die Messungen zeigten eindeutig, dass das künstlich erzeugte Peptid eine sehr starke unspezifische Bindung an das Fusionsprotein und die Kontrolloberfläche zeigte. Eine spezifische Bindung konnte nicht beobachtet werden. Die Abbildungen 3.20 (A) bis (F) geben die Ergebnisse einer Messung mit einem theoretischen R_{\max} -Wert von 128 RU wieder. Abbildung 3.20 (A) zeigt die unspezifische Bindung von 400 μ M AF19random an das Fusionsprotein (rot) bzw. die Kontrolloberfläche (blau). In Abbildung 3.20 (B) ist die Bindungskurve nach Subtraktion der Kontrolle dargestellt. Eine Bindung ist nicht zu erkennen. Die Abbildungen 3.20 (C) bis (F) zeigen entsprechend die Bindung von 200 μ M respektive 30 μ M des synthetischen Peptids AF19random. Auch in diesen Konzentrationen konnte keine spezifische Bindung des Peptids AF19random an das 54 kDa große Fusionsprotein detektiert werden.

3.4.7 Bindung des Neuropeptids AF2 (*flp-14*)

Das Neuropeptid AF2 des Gens *flp-14* hat ein Molekulargewicht von 990 Da. Untersucht wurde seine Bindung an das aminoternale Ende des Rezeptors HC110-R mit einem Bindungslevel des Liganden zwischen 3000 und 7000 RU. Die Abbildung 3.21 (A) zeigt exemplarisch die Bindung von 400 μ M AF2 an das 54 kDa große Fusionsprotein (rot) und die dazugehörige Kontrolle (blau). In Abbildung 3.21 (B) ist die durch Subtraktion der Kontrolle korrigierte Bindungskurve zu erkennen. Auch 500 nM AF2 führten zu einer, unter den gegebenen Umständen, noch messbaren Bindung an HC110-R (Abbildung 3.21 C+D). Der theoretische R_{\max} dieser Messung beträgt 103 RU.

Das an die Messdaten angepasste Bindungsmodell ist in Abbildung 3.22 (A) wiedergegeben. Gezeigt werden die in die Auswertung eingegangenen Bindungskurven der gemessenen Konzentrationen 125 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M und 5 μ M. Die schwarzen Kurven geben das Bindungsmodell wieder. Die visuelle Bewertung des Modells ist zufriedenstellend. Im ‚Residual Plot‘ (Abbildung 3.22 B) wird erkennbar, dass die Abweichungen des Modells von den Messpunkten nur in sehr wenigen Fällen 15 RU überschreiten. Die Messdaten enthalten aufgrund der Subtraktion der Kontrollen einige größere Abweichungen, wodurch die Qualität der Anpassung zusätzlich negativ beeinflusst wird. In Tabelle 3.6 sind die ermittelten Parameter des Modells zusammengefasst. Der χ^2 -Test zur weiteren Beurteilung der Anpassung des Modells ergab einen Wert von 70,7 und liegt somit über dem R_{\max} -Wert von 40,1 RU und ist deutlich zu hoch. Es sollte im Zweifel jedoch immer der visuellen Kontrolle des Modells mehr Gewicht gegeben werden. Diese wurde als zufriedenstellend bewertet. Die Betrachtung der T-Werte und Standardfehler in der Tabelle lässt den Schluss zu, dass nach obigen Kriterien die Parameter signifikant sind.

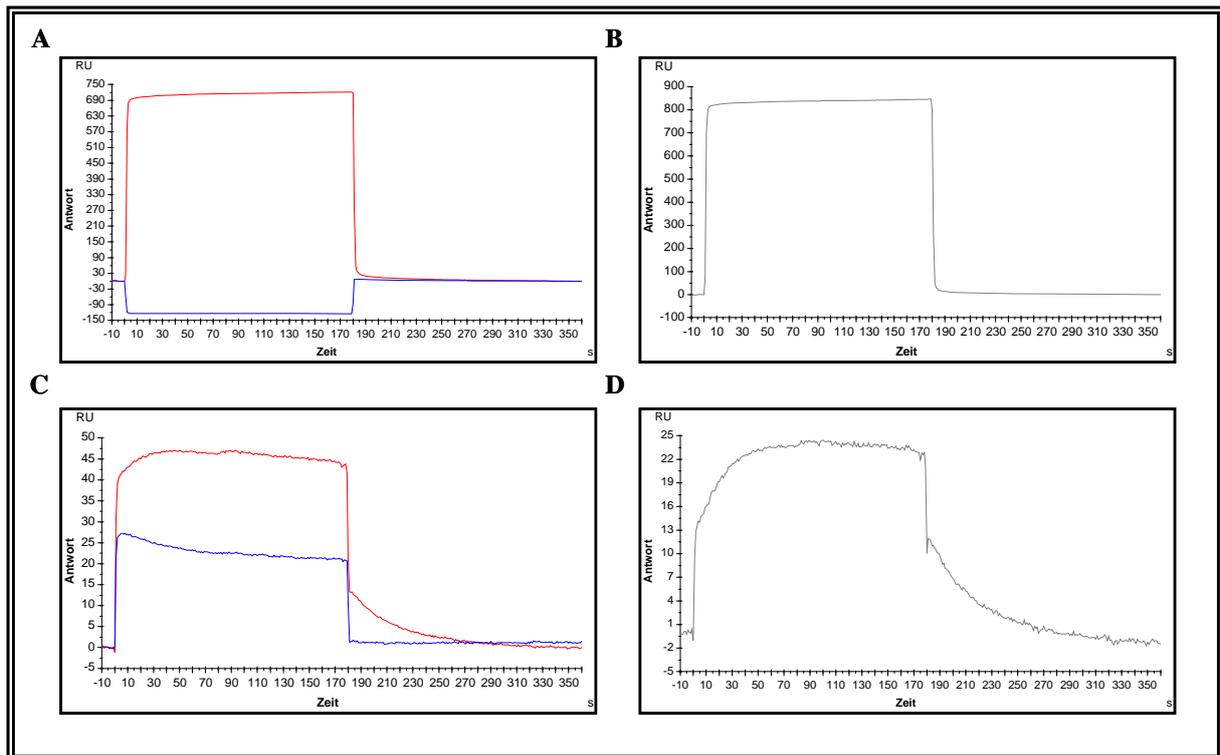


Abb. 3.21: Bindung des Neuropeptids AF2 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445. Das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden (5567 RU) und Konzentrationen des Analyten AF2 zwischen 400 μM und 500 nM im Laufpuffer BIACORE-Puffer I gemessen. Der theoretische R_{max} -Wert beträgt 103 RU. Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Alle Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Abbildung (A) zeigt die Bindung von 400 μM AF2 an das Fusionsprotein (rot). Die Kontrolle ist in blau dargestellt. Abbildung (B) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. In Abbildung (C) und (D) wird entsprechend die Bindung von 500 nM AF2 an das 54 kDa große Fusionsprotein wiedergegeben.

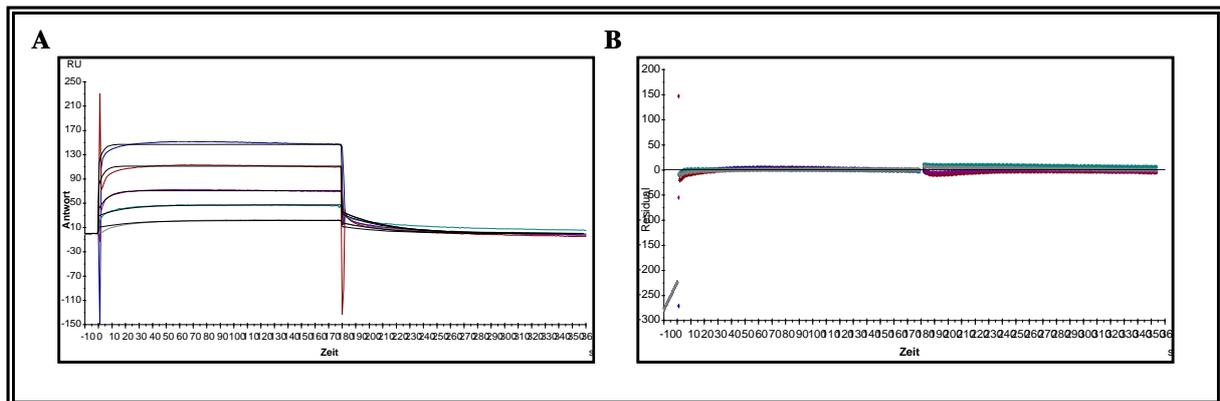


Abb. 3.22: Bindung des Neuropeptids AF2 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445. (A) Die durch Subtraktion der Kontrollkurven korrigierten Bindungskurven wurden für die Berechnung eines Bindungsmodells mit Hilfe der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘, mit einer Bindungsstöchiometrie von 1:1, verwendet. Die schwarzen Kurven stellen das angepasste Modell dar. 125 μM (dunkelblau), 100 μM (dunkelrot), 50 μM (magenta), 10 μM (dunkelgrün), 5 μM (grau). Abbildung (B) zeigt die Differenz der experimentellen Datenpunkte zu den errechneten Datenpunkten. Die Graphik wird in der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘ als optische Hilfe zur Bewertung der Qualität einer Anpassung als ‚Residual Plot‘ berechnet.

Tab. 3.6: Bindung des Neuropeptids AF2 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445. Die Tabelle zeigt die zu obigem Modell (Abbildung 3.22) von der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘ berechneten bzw. angepassten Parameter und die dazugehörigen Werte des T-Tests (T) und die Standardfehler (SE).

Konzentration Analyt	RI (RU)	T (RI)	SE (RI)
125 μM	110	59,1	1,9
100 μM	75,4	41,7	1,8
50 μM	38,5	23,7	1,6
10 μM	29	22,2	1,3
5 μM	9,9	9,3	1,1
k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	R_{max} (RU)	K_A (M^{-1})
$2,4 \times 10^3$	0,03	40,1	$8,1 \times 10^4$
T (k_a)	T (k_d)	T (R_{max})	K_D (M)
7,8	15,5	18,8	$1,2 \times 10^{-5}$
SE (k_a)	SE (k_d)	SE (R_{max})	Chi^2
312	$1,9 \times 10^{-3}$	2,1	70,7

Jedoch trifft dies in diesem Fall nicht auf den k_a -Wert zu, da der T-Wert kleiner als 10 ist. Die Assoziationsratenkonstante kann unter Berufung auf die Statistik nicht als signifikant eingestuft werden. Der k_d -Wert kann hingegen als verlässlich bewertet werden und beschreibt eine schnelle Dissoziation. Der theoretische R_{max} -Wert für die vorliegende Reaktion liegt mit 61 RU etwa 35 % über dem ermittelten Wert. Er ist somit realistisch, da es meist nicht zu einer 100%igen Sättigung aller Bindungsstellen der Oberfläche kommt. Der K_D -Wert lässt sich auch in diesem Fall, aufgrund der als nicht verlässlich bewerteten Assoziationsratenkonstante, nicht bestimmen.

3.4.8 Bindung der Neuropeptide AF4, AF10, AF12 (*flp-18*)

Bindungsstudien mit dem 951 Da großen Neuropeptid AF4 ergaben in einem Bereich des Ligandenbindungslevels zwischen 3000 und 12000 RU nur eine detektierbare Bindung mit einer Analytenkonzentration von mindestens 50 μM . Exemplarisch zeigt die Abbildung 3.23 (A) die Bindung von 400 μM an eine Oberfläche mit einem Ligandenbindungslevel von 3524 RU (rot) und die dazugehörige Kontrolle (blau). Abbildung 3.23 (B) zeigt die durch Subtraktion der Kontrolle korrigierte Bindungskurve. Entsprechend ist in den Abbildungen 3.23 (C) und (D) die Bindung von 50 μM wiedergegeben.

Das Neuropeptid AF10 ist mit einem Molekulargewicht von 1540 Da das größte in dieser Studie untersuchte Peptid. Für Bindungsexperimente mittels Oberflächenplasmonresonanz wurden Konzentrationen zwischen 400 μM und 500 nM eingesetzt. Die Bindung wurde an Oberflächen mit einem Ligandenbindungslevel von 4000 bis 6000 RU untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass es bis zu einer Konzentration von 1 μM unter den gegebenen Bedingungen zu einer Bindung kommt. Abbildung 3.24 (A) zeigt die Bindung von 400 μM des Neuropeptids AF10 an das 54 kDa große Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445 (rot) und die Kontrolle (blau). Abbildung 3.24 (B) zeigt die durch Subtraktion der Kontrolle korrigierte Bindungskurve. Des Weiteren wird in den Abbildungen 3.24 (C) und (D) entsprechend die Bindung bei einer Analytenkonzentration von 1 μM gezeigt. In weiteren Bindungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass unter den gegebenen Bedingungen bei

einem Ligandenbindungslevel im Bereich von 12000 RU auch im nanomolaren Bereich noch Bindungen messbar waren. Die Ergebnisse einer Messserie an einer mit 12250 RU beladenen Oberfläche sind in den Abbildungen 3.24 (E) bis (H) zusammengestellt. Die Abbildungen 3.24 (E) und (F) zeigen die Bindung von 400 μM AF10 an das 54 kDa große Fusionsprotein. Des Weiteren zeigen die Abbildungen (G) und (H), dass es auch im nanomolaren Bereich (500 nM) noch zu einer deutlich von der Kontrolle zu unterscheidenden Bindung kommt.

Das mittels der Auswertungssoftware ermittelte Bindungsmodell für die Interaktion des Neuropeptids AF10 an das NH_2 -terminale Fusionsprotein des Rezeptors HC110-R ist in Abbildung 3.25 (A) dargestellt. Die Abbildung zeigt die Originaldaten der Konzentrationen 125 μM , 100 μM , 50 μM , 20 μM und 10 μM , nach Subtraktion der Kontrollen, und das angepasste Bindungsmodell (schwarz). Auch bei diesem Modell haben durch die Subtraktion der Kontrollkurven entstandene Fehler die Qualität der Anpassung beeinflusst. In den meisten Datenpunkten unterscheiden sich Modell und Originalmessungen jedoch nicht mehr als 30 RU von einander (Abbildung 3.25 B).

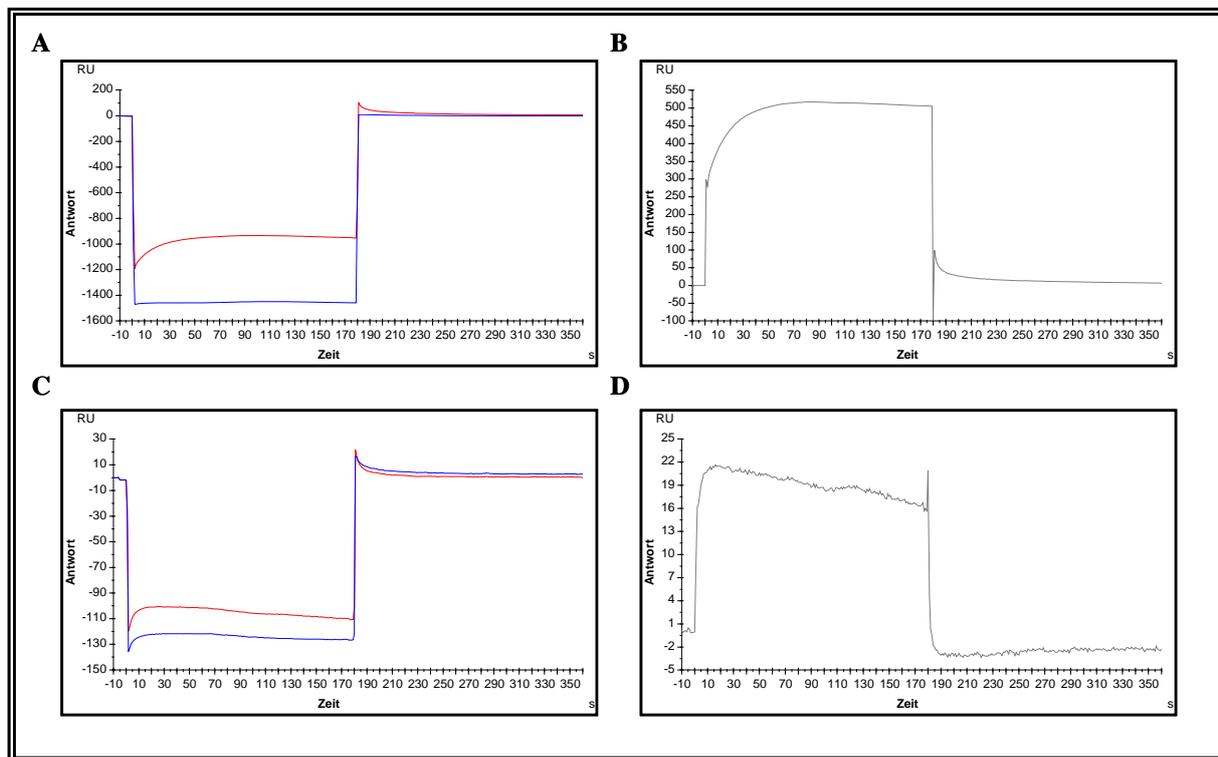


Abb. 3.23: Bindung des Neuropeptids AF4 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445. Das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden (3524 RU) und Konzentrationen des Analyten AF4 zwischen 400 μM und 500 nM im Laufpuffer BIACORE-Puffer I gemessen. Der theoretische R_{max} -Wert beträgt 62 RU. Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Alle Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Abbildung (A) zeigt die Bindung von 400 μM AF4 an das Fusionsprotein (rot). Die Kontrolle ist in blau dargestellt. Abbildung (B) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. In den Abbildungen (C) und (D) wird entsprechend die Bindung von 50 μM AF4 an das 54 kDa große Fusionsprotein wiedergegeben.

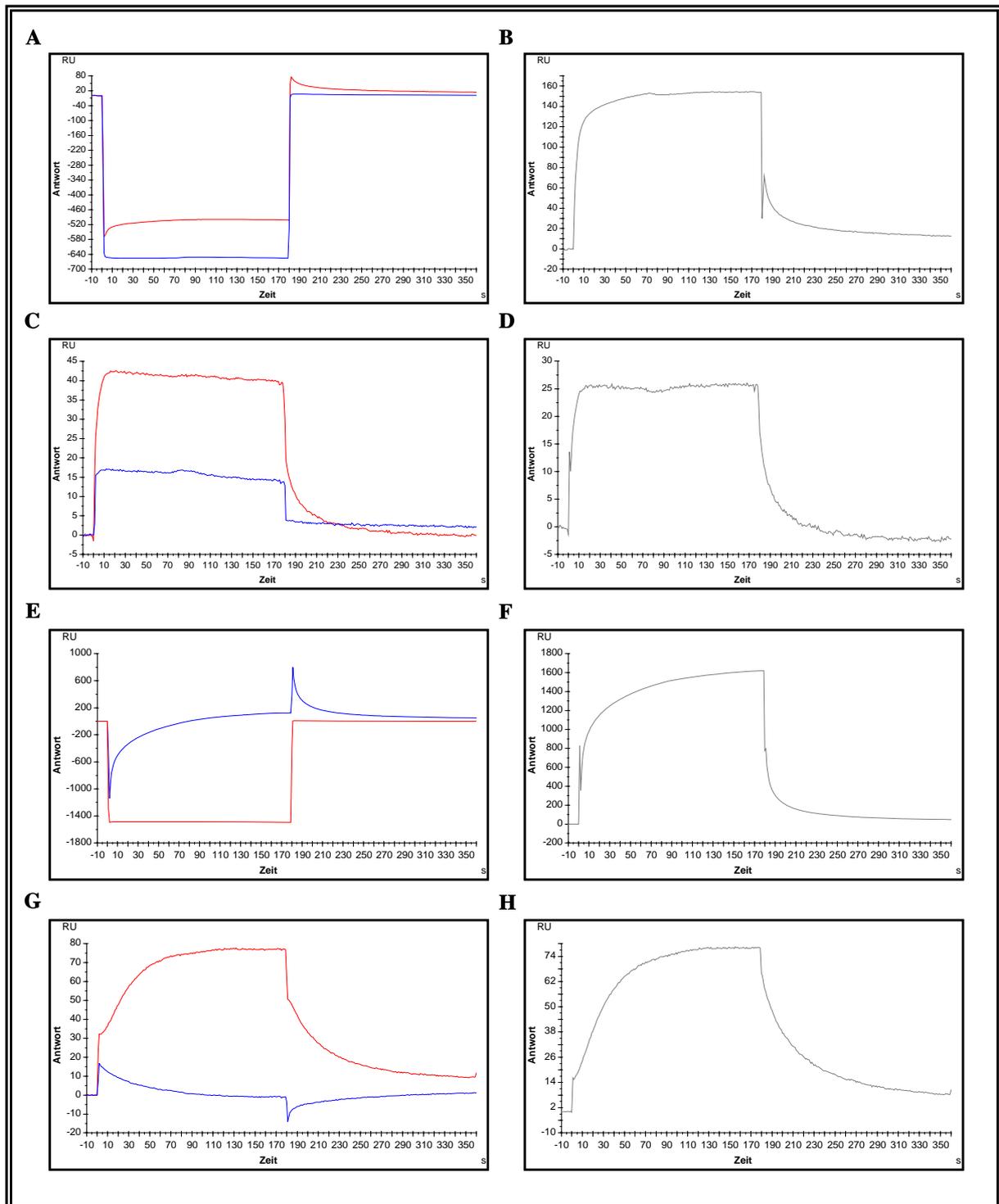


Abb. 3.24: Bindung des Neuropeptids AF10 an das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445. Das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden (3911 RU A-D; 12250 RU E-H) und Konzentrationen des Analyten AF10 zwischen 400 μM und 500 nM im Laufpuffer BIACORE-Puffer I gemessen. Der theoretische R_{max} -Wert beträgt 108 RU bzw. 340 RU. Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Alle Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Abbildung (A) zeigt die Bindung von 400 μM AF10 an das Fusionsprotein (rot). Die Kontrolle ist in blau dargestellt. Abbildung (B) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. In den Abbildungen (C) und (D) wird entsprechend die Bindung von 1 μM AF10 an das 54 kDa große Fusionsprotein wiedergegeben. Abbildung (E) zeigt die Bindung von 400 μM AF10 an eine Flusszelle mit einem Ligandenbindungslevel von 12250 RU (rot) und die entsprechende Kontrolle (blau). Gezeigt wird zudem die durch Abzug der Kontrolle korrigierte Bindungskurve (F). Abbildungen (G) und (H) zeigen entsprechend die Bindung von 500 nM AF10.

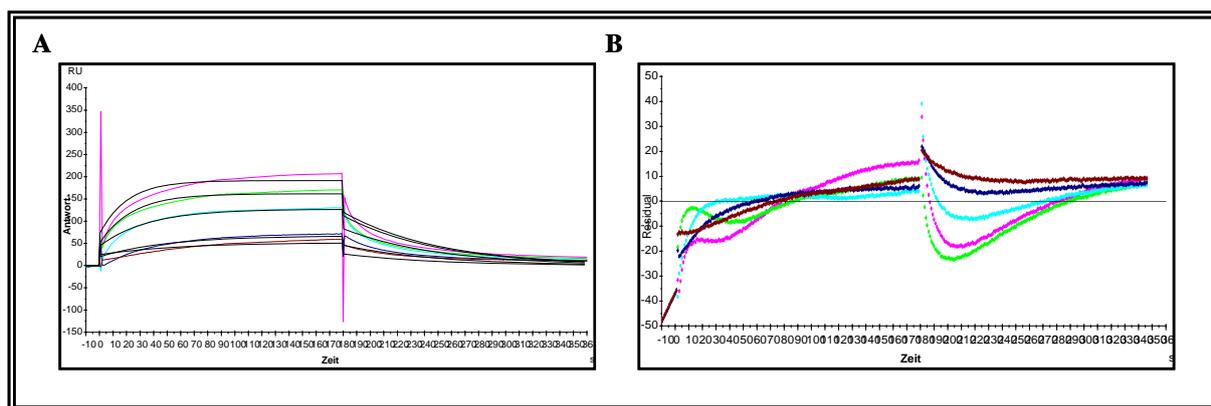


Abb. 3.25: Bindung des Neuropeptids AF10 an das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445. (A) Die durch Subtraktion der Kontrollkurven korrigierten Bindungskurven wurden für die Berechnung eines Bindungsmodells mit Hilfe der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘, mit einer Bindungsstöchiometrie von 1:1, verwendet. Die schwarzen Kurven stellen das angepasste Modell dar. 125 μM (rosa), 100 μM (grün), 50 μM (türkis), 20 μM (dunkelblau), 10 μM (dunkelrot). Abbildung (B) zeigt die Differenz der experimentellen Datenpunkte zu den errechneten Datenpunkten. Die Graphik wird in der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘ als optische Hilfe zur Bewertung der Qualität einer Anpassung als ‚Residual Plot‘ berechnet.

Die Parameter des Bindungsmodells sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst. Der Chi^2 -Wert beträgt mit 75,8 etwa 44 % des angegebenen R_{max} -Wertes. T-Test und Standardfehler zeigen, dass alle Parameter signifikant sind. Die Ratenkonstanten k_a und k_d beschreiben eine Bindereaktion mit einer sehr langsamen Assoziationsphase und einer sehr schnellen Dissoziation. Die theoretische Analytenbindungskapazität R_{max} beträgt für die vorliegende Reaktion 340 RU. Die in der Tabelle angegebene Bindungskapazität liegt mit 171 RU bei ca. 50 % und somit im Rahmen einer typischen experimentellen Sättigung der Bindungsstellen. Die Affinität der Bindung liegt mit einem K_D -Wert von $5,2 \times 10^{-5}$ M im Bereich einer sehr schwachen Bindung.

Tab. 3.7: Bindung des Neuropeptids AF10 an das Fusionsprotein des Klon pRSET-HCA1-445. Die Tabelle zeigt die zu obigem Modell (Abbildung 3.25) von der Auswertungssoftware ‚BIAevaluation 4.1‘ berechneten bzw. angepassten Parameter und die dazugehörigen Werte des T-Tests (T) und die Standardfehler (SE).

Konzentration Analyt	RI (RU)	T (RI)	SE (RI)
125 μM	70,7	51	1,4
100 μM	49,2	37,7	1,3
50 μM	43,2	37,7	1,2
20 μM	19,8	21,8	0,9
10 μM	24,5	32,1	0,8
k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	R_{max} (RU)	K_A (M^{-1})
277	0,01	171	$1,9 \times 10^4$
T (k_a)	T (k_d)	T (R_{max})	K_D (M)
30,7	$6,2 \times 10^1$	58,9	$5,2 \times 10^{-5}$
SE (k_a)	SE (k_d)	SE (R_{max})	Chi^2
9,1	$2,3 \times 10^{-4}$	2,9	75,8

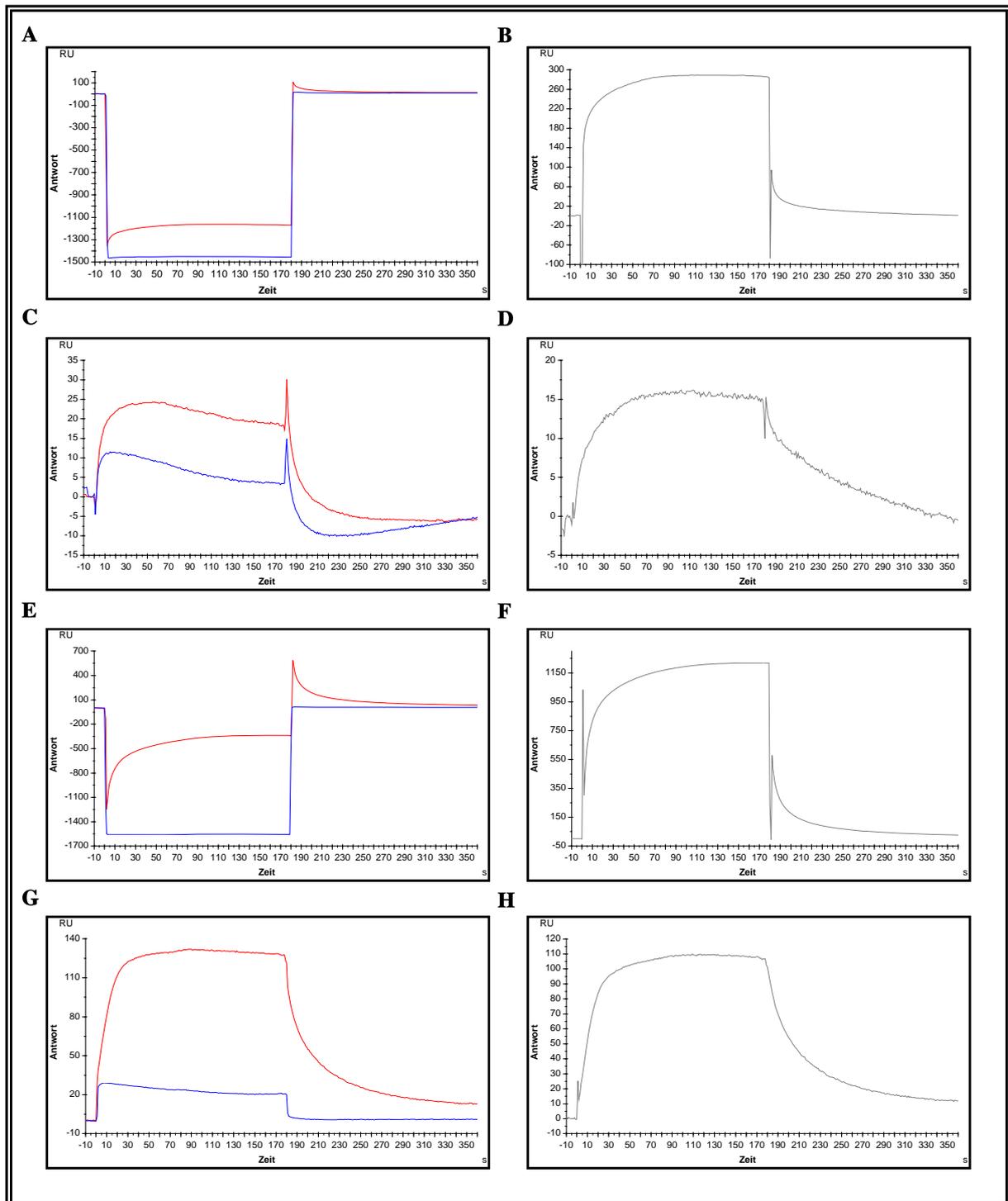


Abb. 3.26: Bindung des Neuropeptids AF12 an das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445. Das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden (3730 RU A-D; 10902 RU E-H) und Konzentrationen des Analyten AF12 zwischen 400 μ M und 500 nM im Laufpuffer BIACORE-Puffer I gemessen. Der theoretische R_{\max} -Wert beträgt 104 RU (A-D) bzw. 303 RU (E-H). Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Alle Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Abbildung (A) zeigt die Bindung von 400 μ M AF12 an das Fusionsprotein (rote Kurve). Die Kontrolle ist in blau dargestellt. Abbildung (B) zeigt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve. In den Abbildungen (C) und (D) wird entsprechend die Bindung von 10 μ M AF12 an das 54 kDa große Fusionsprotein wiedergegeben. Abbildung (E) zeigt die Bindung von 400 μ M AF12 an eine Flusszelle mit einem Ligandenbindungslevel von 10902 RU (rot) und die entsprechende Kontrolle (blau). Gezeigt wird zudem die durch Abzug der Kontrolle korrigierte Bindungskurve (F). Abbildungen (G) und (H) zeigen entsprechend die Bindung von 500 nM AF12.

Das Neuropeptid AF12 wird in *C. elegans* ebenfalls von dem Gen *flp-18* kodiert. Die Bindung des Peptids an den Liganden wurde zum einen bei einem Bindungslevel von 3000 bis 4000 RU, zum anderen bei einem Ligandenbindungslevel von 11000 RU untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass bei Messungen mit einem theoretischen R_{\max} zwischen 83 und 110 RU die minimale Konzentration, bei der eine Bindung gemessen werden konnte, 10 μM betrug. Ergebnisse dieser Messungen sind exemplarisch in Abbildung 3.26 (A) bis (D) wiedergegeben, wobei Abbildung 3.26 (A) die Bindung des Peptids bei einer Konzentration von 400 μM (rot) zeigt und die entsprechende Kontrolle (blau). Abbildung 3.26 (B) stellt die korrigierte Bindungskurve dar. Ebenso zeigen die Abbildungen 3.26 (C) und (D) die Bindung von 10 μM AF12 an die mit dem Liganden beladene Oberfläche. In den weiteren Abbildungen ist das Ergebnis einer anderen Messserie wiedergegeben. Bei einem Ligandenbindungslevel von 10902 RU konnte auch bei einer Peptid-Konzentration von 500 nM noch eine Bindung festgestellt werden (Abbildung 3.26 G und H). In den Abbildungen 3.26 (E) und (F) wird die Bindung dieser Messserie bei einer Konzentration von 400 μM AF12 gezeigt.

3.4.9 Vergleich der Bindungsgrenzen der Neuropeptide

In Tabelle 3.8 sind die in den Kapiteln 3.4.2 bis 3.4.8 beschriebenen Ergebnisse der Bindungsstudien verschiedener Neuropeptide zusammengefasst. In einer separaten Tabelle (3.9) wurden die Ergebnisse der Bindungsexperimente des Neuropeptids AF5 aufgeführt. Aufgrund seiner starken unspezifischen Bindung an die Dextranoberfläche des Sensorchips musste dem Laufpuffer 300 mM Natriumchlorid hinzugesetzt werden. Die Ergebnisse sind somit nicht direkt mit denen der anderen Peptide vergleichbar.

Die Größe des Signals eines Oberflächenplasmonresonanz-Biosensors ist direkt von der Größe des Analyten abhängig. Laut Herstellerangaben hat das Messgerät ‚Biacore 1000‘ (Biacore, Freiburg) je nach Art des Moleküls eine Detektionsgrenze von ca. 1000 Da. Alle hier gemessenen Peptide liegen somit mit ihrem Molekulargewicht an der Nachweisgrenze. Dennoch war es möglich, eine Bindung aller hier aufgeführten Neuropeptide an das aminoterminal Fusionsprotein des Rezeptors HC110-R nachzuweisen. Ein direkter Vergleich der hier aufgeführten Daten ist nur für Messungen eines vergleichbaren theoretischen R_{\max} -Wertes möglich. Dieser Wert wird bestimmt durch:

$$R_{\max} = \text{Bindungsstöchiometrie} \cdot \frac{MW_{\text{Analyt}}}{MW_{\text{Ligand}}} \cdot \text{Ligandenlevel} \quad (3.1)$$

(‚Biatechnology Handbook‘, Version AB, 1998, Biacore, Freiburg). Messungen in einem R_{\max} -Bereich von etwa 60 RU wurden mit den Peptiden PF3, AF1, AF4, AF2 und PF2 durchgeführt. Es fällt auf, dass die minimale Analytenkonzentration, bei der noch eine Bindung detektierbar war, nicht mit zunehmendem Molekulargewicht abnimmt. Die beiden Peptide AF1 und AF4 zeigen bei gleichem Molekulargewicht ein unterschiedliches Bindeverhalten. Während die Bindung des Neuropeptids AF1 bei einem R_{\max} -Wert von 60 RU noch bis zu einer Konzentration von 1 μM nachgewiesen werden konnte, war dies für das Neuropeptid AF4 nur bis zu einer Konzentration von 50 μM möglich. Ein Vergleich der

Detektionsgrenzen der aufgeführten Peptide bei einem R_{\max} -Wert von 60 RU ergibt, dass AF2 noch im nanomolaren Bereich eine Bindung zeigte, hingegen AF1 nur bis zu einer Konzentration von 1 μM , PF2 bis zu einer Konzentration von 5 μM , PF3 bis zu einer Konzentration von 20 μM und das Peptid AF4 nur bis zu einer Konzentration von 50 μM . In dieser Auswahl von Peptiden scheint also AF2 die größte Affinität zu dem hier verwendeten 54 kDa großen Liganden zu haben.

Tab. 3.8: Zusammenfassung der mittels Oberflächenplasmonresonanz ermittelten Konzentrationen der Neuropeptide, bei denen unter gegebenen Bedingungen noch eine Bindung detektiert werden konnte. Für den Bindungslevel des Liganden wurde der Bereich angegeben, in dem Messserien durchgeführt wurden. Der theoretische R_{\max} wurde nach Formel 3.1 berechnet.

Neuropeptid	MW (g/mol)	Minimale Analyten-Konzentration	Ligandenbindungslevel	theoretischer R_{\max}
PF3	900	20 μM	3500-5000 RU	58-83 RU
		1 μM	14000 RU	233 RU
AF1	951	1 μM	3000-4000 RU	52-70 RU
		< 500 nM	10500 RU	185 RU
AF4	951	50 μM	3000-12000 RU	52-211 RU
AF2	990	< 500 nM	3000-7000 RU	56-130 RU
PF1	993	< 500 nM	9000-10000 RU	165-183 RU
PF2	1064	5 μM	3000 RU	60 RU
		< 500 nM	8000 RU	156 RU
AF19	1187	< 500 nM	6000-8500 RU	133-189 RU
AF12	1483	10 μM	3000-4000 RU	83-110 RU
		< 500 nM	10000-11000 RU	278-305 RU
AF11	1492	< 500 nM	5500-11000 RU	152-305 RU
AF10	1540	1 μM	4000-6000 RU	114-172 RU
		< 500 nM	12000 RU	333 RU

Des Weiteren war es möglich, verschiedene Peptide auf ihre Detektionsgrenze bei einem R_{\max} -Wert von 100 RU zu vergleichen. Dabei konnte für das Peptid AF2 eine Detektionsgrenze von <500 nM bestimmt werden. Für AF12 lag diese Grenze deutlich höher bei 10 μM und für AF4 bei 50 μM . Auch von diesen Peptiden scheint also AF2 die höchste Affinität zum NH_2 -terminalen Fragment des Rezeptors HC110-R zu besitzen. Eine Reihe von Peptiden wurde zudem in einem Bereich von $R_{\max} = 160$ RU gemessen. Auch diese lassen sich somit direkt vergleichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Peptide PF1, PF2, AF19 und AF11 alle noch in nanomolaren Konzentrationen an das Fusionsprotein binden, das Peptid AF10 jedoch nur bis zu einer Konzentration von 1 μM , AF4 sogar nur bis zu einer Konzentration von 50 μM . Das Neuropeptid AF4 zeigt also auch in dieser Auswahl an Peptiden die geringste Affinität zum Liganden. In einem Bereich des theoretischen R_{\max} -Wertes zwischen 200 und 250 RU lassen sich die Peptide PF3, AF4 und AF11 direkt vergleichen. Dabei war für das Neuropeptid AF11 auch im nanomolaren Bereich noch eine Bindung nachweisbar, für PF3 nur bis zu einer Konzentration von 1 μM und für AF4 nur bis zu einer Konzentration von 50 μM .

Tab. 3.9: Zusammenfassung der mittels Oberflächenplasmonresonanz ermittelten Konzentration des Neuropeptids AF5, bei der unter gegebenen Bedingungen noch eine Bindung detektiert werden konnte. Für den Bindungslevel des Liganden wurde der Bereich angegeben, in dem Messserien durchgeführt wurden. Der theoretische R_{\max} wurde nach obiger Formel berechnet. Die Messungen des Neuropeptids wurden in einem Laufpuffer mit 300 mM Natriumchlorid (BIACORE-Puffer II) durchgeführt, um die unspezifische Bindung des Peptids an die Matrix des CM5-Sensorchips zu minimieren. Sie können somit nicht direkt mit den Ergebnissen der anderen Peptide verglichen werden.

Neuropeptid	MW (g/mol)	Minimale Analyten-Konzentration	Ligandenbindungslevel	theoretischer R_{\max}
AF5	1050,56	20 μM	4000 RU	78 RU
		< 500 nM	10000-10500 RU	194-204 RU

Ein Vergleich der Detektionsgrenzen der Neuropeptide lässt folglich verschiedene Schlüsse hinsichtlich ihrer Affinität an das 54 kDa große Fusionsprotein des Rezeptors HC110-R zu. Das wichtigste Resultat der vorliegenden Bindungsstudien ist, dass sich ihr Bindungsverhalten trotz ihrer sehr ähnlichen Aminosäuresequenzen deutlich unterscheidet. Des Weiteren konnte anhand des Neuropeptids AF19 und des synthetischen Peptids AF19random gezeigt werden, dass die hier detektierten Bindungen eindeutig von der Aminosäuresequenz abhängig zu sein scheinen. Während AF19 eine konzentrationsabhängige, spezifische Bindung an den aminoterminalen Teil von HC110-R zeigte, konnte mit dem synthetischen Peptid AF19random, welches die gleichen Aminosäuren in einer willkürlichen Reihenfolge enthielt, nur eine starke unspezifische Bindung an Fusionsprotein und Referenzoberfläche detektiert werden. Ferner weisen die Studien in allen Fällen auf eine nur sehr schwache Wechselwirkung mit dem aminoterminalen Fusionsprotein des Rezeptors HC110-R hin. Konnten für Messserien Bindungsmodelle angepasst werden, bestätigen die auf diese Weise bestimmten Parameter, dass es sich um Bindereaktionen mit einer sehr langsamen Assoziation und einer schnellen Dissoziation handelt. Die ermittelten K_D -Werte beschreiben alle Reaktionen mit sehr geringer Affinität. Jedoch werden auch hier Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen den verschiedenen Neuropeptiden deutlich.

Tab. 3.10: Zusammenfassung der mittels Bindungsmodellen ermittelten kinetischen Parameter. Messdaten wurden mit Hilfe der Auswertungssoftware ‚Biaevaluation 4.1‘ (Biacore, Freiburg) ausgewertet und mathematische Modelle, unter Annahme einer 1:1-Stöchiometrie, angepasst.

Neuropeptid	k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
AF1	$4,6 \times 10^3$	0,05	$1,1 \times 10^{-5}$
AF2	-	0,03	-
AF10	277	0,01	$5,2 \times 10^{-5}$
PF2	21	0,01	$5,3 \times 10^{-4}$
PF3	-	0,03	-

In Tabelle 3.10 wurden die in den vorherigen Kapiteln bestimmten kinetischen Parameter zusammengefasst. Ein Vergleich der Dissoziationsratenkonstanten (k_d) der Modelle zeigt, dass alle in einem Bereich von $1\text{-}5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ liegen. Die Assoziationsratenkonstanten (k_a) sind hingegen über einen größeren Bereich gestreut. Sie liegen zwischen 2×10^1 und $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Affinität, ausgedrückt durch die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D , berechnet sich aus dem Quotienten der Dissoziationsratenkonstante k_d und der Assoziationsratenkonstante k_a . Sie drückt die Dissoziationstendenz eines Komplexes aus. Die Werte der Neuropeptide

AF1, AF10 und PF2 geben einen Hinweis auf den Bereich, in dem die K_D -Werte aller Bindungen liegen. Mit $1,1 \times 10^{-5}$, 5×10^{-4} bis 5×10^{-5} M handelt es sich um schwache Wechselwirkungen.

3.4.10 Bindung von Daf-21

In einem Bindungsversuch mittels Oberflächenplasmonresonanz gelang es, die Bindung des 84 kDa großen Fusionsproteins Daf-21 an das 54 kDa große NH_2 -terminale Fusionsprotein des Rezeptors HC110-R nachzuweisen. Das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445 wurde zu diesem Zweck mit Hilfe einer Aminkopplung an einen CM5-Sensorchip gebunden (Kapitel 3.4.1) und das aufgereinigte Fusionsprotein des Klons pET-DAFA1-702 (Analyt) in Lösung über die Chipoberfläche geleitet. Die Assoziation und Dissoziation an den aminoterminalen Teil des Rezeptors HC110-R (Ligand) wurde für jeweils 3 min in Echtzeit verfolgt. Die Konzentration des Analyten wurde variiert (110 nM bis 11 μM). Als Kontrolle diente eine ungekoppelte Referenzoberfläche. Abbildung 3.27 (A) zeigt die Bindung von 11 μM des 84 kDa großen Fusionsproteins Daf-21 an eine mit 5636 RU beladene Oberfläche (rot) bzw. die Kontrollmessung an einer ungekoppelten Oberfläche (blau). In Abbildung 3.27 (B) ist die Bindungskurve nach Subtraktion der Referenz wiedergegeben. Die Kontrolle zeigt eine unspezifische Bindung des Fusionsproteins Daf-21 oder verunreinigender Proteine an die Matrix der Flusszelle. Abbildung 3.27 (B) macht jedoch den spezifischen Anteil der Bindung zwischen Ligand und Analyt deutlich. Im Vergleich zu den Bindungsexperimenten an Magnetpartikeln (Kapitel 3.3.1) gelang es mit der deutlich sensitiveren Methode der Oberflächenplasmonresonanz die spezifische Komponente der Bindung sichtbar zu machen.

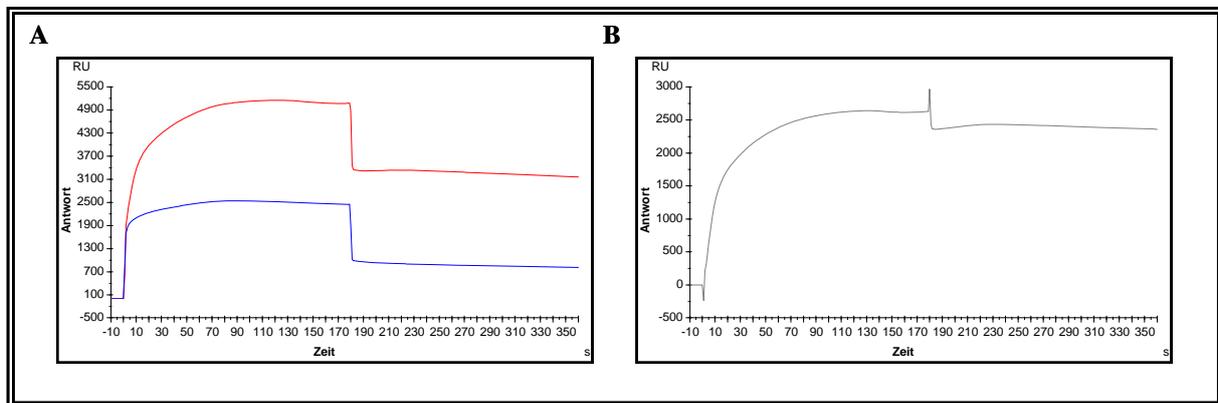


Abb. 3.27: Bindung des Fusionsproteins des Klons pET-DAFA1-702 an den aminoterminalen Teil des Rezeptors HC110-R. Das Fusionsprotein des Klons pRSET-HCA1-445 wurde mittels einer Aminkopplung kovalent an einen CM5-Sensorchip gebunden und die Konzentrationen 11 μM und 5 μM des Analyten (84 kDa Fusionsprotein des Klons pET-DAFA1-702) im Laufpuffer BIACORE-Puffer I gemessen. Der theoretische R_{max} -Wert beträgt 8767 RU. Als Referenzoberfläche diente eine ungekoppelte Flusszelle. Die Abbildungen geben die Originaldaten der Messungen wieder. Abbildung (A) zeigt die Bindung von 11 μM des Analyten an den Liganden (rot). Die Kontrolle ist in blau dargestellt und zeigt deutlich eine starke unspezifische Bindung an die ungekoppelte Oberfläche. Abbildung (B) gibt die durch Subtraktion der Referenz erhaltene Kurve wieder.

3.5 Liganden-induzierte Ca^{2+} -Ausschüttung in stabil HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen

Der universelle sekundäre Botenstoff Ca^{2+} spielt eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl Stimulus-abhängiger Antworten. Zur Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen erwiesen sich Fluoreszenzfarbstoffe als besonders geeignet. Der polycyclische Chelatbildner Fura-2 ist ein in diesem Zusammenhang häufig eingesetzter Ca^{2+} -Indikator. Bindet ein Agonist an seinen Rezeptor kommt es bei einem Ca^{2+} -Einstrom bzw. bei der Freisetzung intrazellulären Ca^{2+} zu einer Änderung der Absorption in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Beladung des Indikators. Bei der Fluoreszenzspektroskopie wird die Fluoreszenz einer großen Anzahl sich in Lösung befindlicher Zellen gemessen. Alle sich im Strahlengang befindlichen Zellen der Lösung werden mit zwei verschiedenen Wellenlängen (340 nm, Ca^{2+} -gebundenes Fura-2; 380 nm, Ca^{2+} -freies Fura-2) angeregt und die resultierenden Mittelwerte der Emission bei 510 nm aufgezeichnet. Nach Gryniewicz *et al.* (1985) ist zudem durch Bestimmung des R_{\min} - und R_{\max} -Wertes nach jeder Messung eine Eichung und somit die quantitative Bestimmung der Änderung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels möglich.

In stabil HC110-R transfizierten Säugerzellen sollte mittels Fluoreszenzspektroskopie der Einfluss verschiedener HC110-R bindender Neuropeptide auf die Signaltransduktion untersucht werden. Die mittels Oberflächenplasmonresonanz in einem *in vitro*-System beobachteten Bindungen sollten nun *in vivo* funktionell überprüft werden.

Für Untersuchungen der Signaltransduktion mittels Fluoreszenzspektroskopie hat eine stabile Expression von HC110-R in Säugerzellen gegenüber einer transienten Expression einige Vorteile. So wird gewährleistet, dass alle Zellen das gewünschte Protein dauerhaft und in gleichbleibender Qualität exprimieren. Die Zellkulturlinie HEK-293 wird in der Literatur als für Transfektionen von GPCRs und physiologische Studien der Signaltransduktion geeignet beschrieben (Marshall *et al.*, 1995). Transfektionen von Latrophilin-Konstrukten in HEK-293-Zellen wurden erfolgreich durchgeführt und waren funktional. Ebenfalls ist bekannt, dass HEK-293-Zellen im Gegensatz zu chromaffinen Zellen keinen endogenen Latrophilin-Rezeptor besitzen (Bittner *et al.*, 1998). Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurde eine stabil transfizierte Zelllinie verwendet (Saeger, 2000). Dabei handelt es sich um das Konstrukt HC110-R-Myc/6×His in HEK-293-Zellen. Die von der Zelllinie exprimierten Fusionsproteine enthalten den gesamten Rezeptor HC110-R (AS 1-986; Nt 100-3058) und haben ein carboxyterminales Myc-, 'Tag' und ein 6×His-, 'Tag'. Der bicistronische Expressionsvektor pIRES1*neo* (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA) enthält zusätzlich vor dem Start-Codon des Neomycin (G418)-Resistenzgens eine interne Ribosomen-Bindestelle (IRES) des Enzephalomyocarditis-Virus (ECMV) (Rees *et al.*, 1996). Auf diese Weise entsteht mit Hilfe des humanen Cytomegalovirus- (CMV-) Promotors aus zwei offenen Leserastern, des Rezeptors HC110-R bzw. des Antibiotika-Resistenzmarkers, eine mRNA (Jang *et al.*, 1988; Jackson *et al.*, 1990). Dadurch wird gewährleistet, dass alle Zellen mit einer Resistenz gegen das Antibiotikum auch das Fusionsprotein exprimieren.

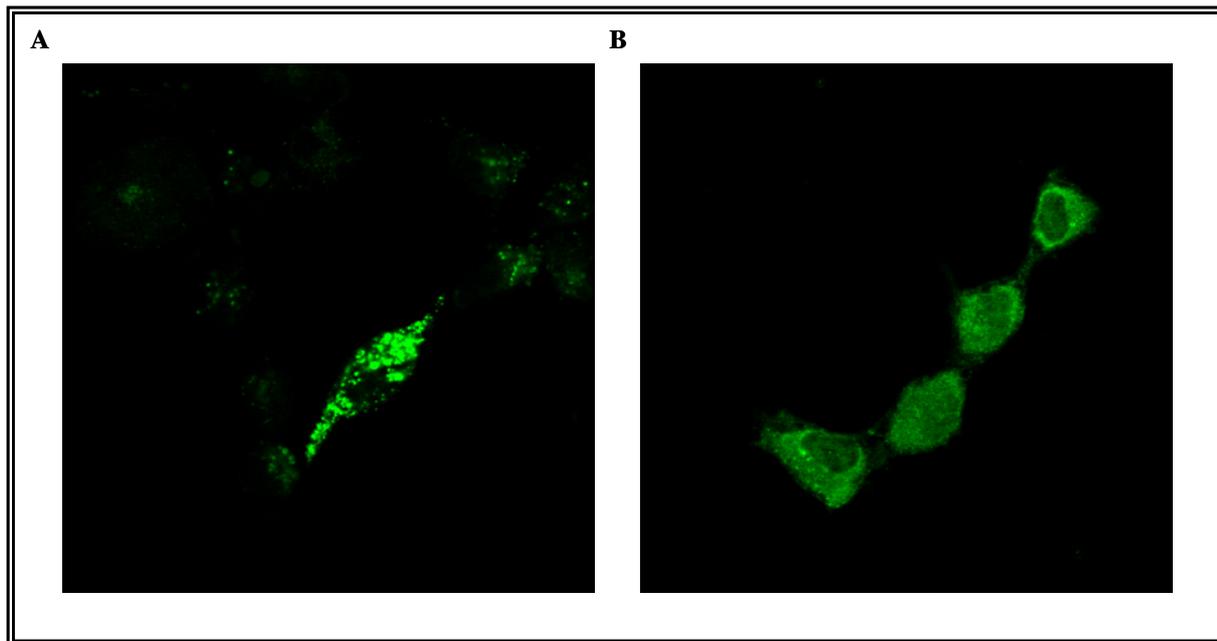


Abb. 3.28: Expression von HC110-R in stabil transfizierten Säugerzellen. Stabil mit HC110-R-Myc/6×His transfizierte HEK-293-Zellen wurden auf Glasträgern fixiert und die Expression des 116 kDa großen Fusionsproteins mittels eines monoklonalen Maus-anti-6×His-Primärantikörpers (A) bzw. eines monoklonalen Maus-anti-c-Myc- (B) und einem Anti-Maus-Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Abbildungen zeigen Schichtaufnahmen eines konfokalen ‚Laserscanning‘-Mikroskops. Die Anregung erfolgte durch einen Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm. Als Kontrolle dienten wildtypische HEK-293-Zellen (nicht gezeigt).

Der Nachweis der HC110-R-Expression in den stabil HC110-R-Myc/6×His transfizierten HEK-293-Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz erbracht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen Maus-anti-c-Myc- bzw. einem monoklonalen Maus-anti-6×His-Primärantikörper und einem Anti-Maus-Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Präparate auf Objektträgern in Mowiol eingebettet und am konfokalen ‚Laserscanning‘-Mikroskop betrachtet. Diese Methode erlaubt gegenüber der Phasenkontrastmikroskopie optische Schnittserien durch die Zelle (Celis, 1998). Abbildung 3.28 (A) zeigt anhand der Detektion mit einem Anti-6×His-Antikörper deutlich die Expression des Fusionsproteins in Vesikeln. Dies konnte mit einem Anti-c-Myc-Antikörper bestätigt werden (Abbildung 3.28 B). Des Weiteren konnte die heterologe Expression des Rezeptors HC110-R in extrahierten Membranfraktionen mittels Western Blot-Analysen als 116 kDa großes Fusionsprotein nachgewiesen werden (Horrix, 2006).

3.5.1 HC110-R vermittelte α -LTX Signaltransduktion

α -LTX, die Hauptkomponente des Giftes des Schwarzen Witwe, ist aus der Literatur als artifizierlicher Ligand des Rezeptors Latrophilin bekannt. Er ruft agonistisch eine Latrophilin-vermittelte Ca^{2+} -Antwort mit Latrophilin transfizierter Zellen hervor (Hlubek *et al.*, 2000). Auch für den Latrophilin-ähnlichen Rezeptor HC110-R konnte in der Vergangenheit nachgewiesen werden, dass es durch Stimulation mit α -LTX dosisabhängig zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt. Diese ist in erster Linie auf einen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der

Plasmamembran zurückzuführen. Dabei handelt es sich um Kanäle des L-Typs (Saeger, 2000).

Messungen mit den stabil mit HC110-R-Myc/6×His transfizierten HEK-293-Zellen ergaben, im hier etablierten System, eine konzentrationsabhängige Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Stimulation mit α -LTX. Zur Ermittlung einer geeigneten α -LTX-Konzentration wurden verschiedene Konzentrationen getestet. Eine Konzentration von 800 pM induzierte eine Ca^{2+} -Antwort von bis zu 1900 nM und auch eine Konzentration von 400 pM führte noch zu Ca^{2+} -Antworten von bis zu 1000 nM. Aus diesem Grund erwies sich eine Konzentration von 200 pM α -LTX als am besten geeignet. Die Zugabe von 200 pM α -LTX induzierte in einem Zeitraum von nur 100 sec eine Antwort von $219 \text{ nM} \pm 14 \text{ nM}$. Diese war nicht kompensierbar, d.h. sie erreichte im gemessenen Zeitraum nicht wieder das Ausgangsniveau. In den meisten Fällen erreichte die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ein Plateau, dass innerhalb einer Messzeit von 10 min nicht oder nur wenig absank. Die Messungen erfolgten innerhalb eines Zeitraumes von drei Stunden nach Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzindikator. Das Ausgangsniveau der Basislinie lag je nach Zustand der Zellen zwischen 20 und 300 nM. Eine starke Erhöhung dieses Ausgangsniveaus von einer Probe zur nächsten zeigte einen zunehmend schlechter werdenden Zustand der Zellen und somit das Ende der Messserie an. Sowohl die wildtypischen als auch die transfizierten Zellen zeigten im schlechten Zustand eine deutlich größere Ca^{2+} -Antwort nach Stimulation mit α -LTX. Es konnte zudem beobachtet werden, dass die Antwortgröße von einem Messtag zum anderen variierte. Dies war unabhängig von der Charge des verwendeten α -LTX. Zudem konnte kein direkter Zusammenhang mit der Anzahl der Passagen der verwendeten Zellen erkannt werden. Je nach Zustand der Zellen kam es zudem auch ohne Zugabe einer Substanz zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und somit zu einem ‚Drift‘ der Basislinie. Dieser setzte sich auch nach der mittels α -LTX induzierten Ca^{2+} -Antwort der Zellen fort.

Als Kontrolle wurde die Reaktion wildtypischer HEK-293-Zellen auf α -LTX untersucht. Messungen zeigten, dass auch diese mit einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reagieren. Die Antwort lag jedoch durchschnittlich 64 % unter der Antwort der mit HC110-R transfizierten Zellen. Sie betrug nach Zugabe von 200 pM α -LTX $78 \pm 11 \text{ nM}$. Abbildung 3.29 (A) zeigt die mittels 200 pM α -LTX stimulierte Ca^{2+} -Antwort stabil HC110-R-Myc/6×His transfizierter (rot) und wildtypischer HEK-293-Zellen (blau). Die Zugabe erfolgte jeweils nach 100 sec mit einer Messdauer von weiteren 600 sec. In Abbildung 3.29 (B) zeigt ein Balkendiagramm das durchschnittliche Verhältnis der Antwortgrößen stabil mit HC110-R transfizierter und wildtypischer HEK-293-Zellen nach Zugabe von 200 pM α -LTX.

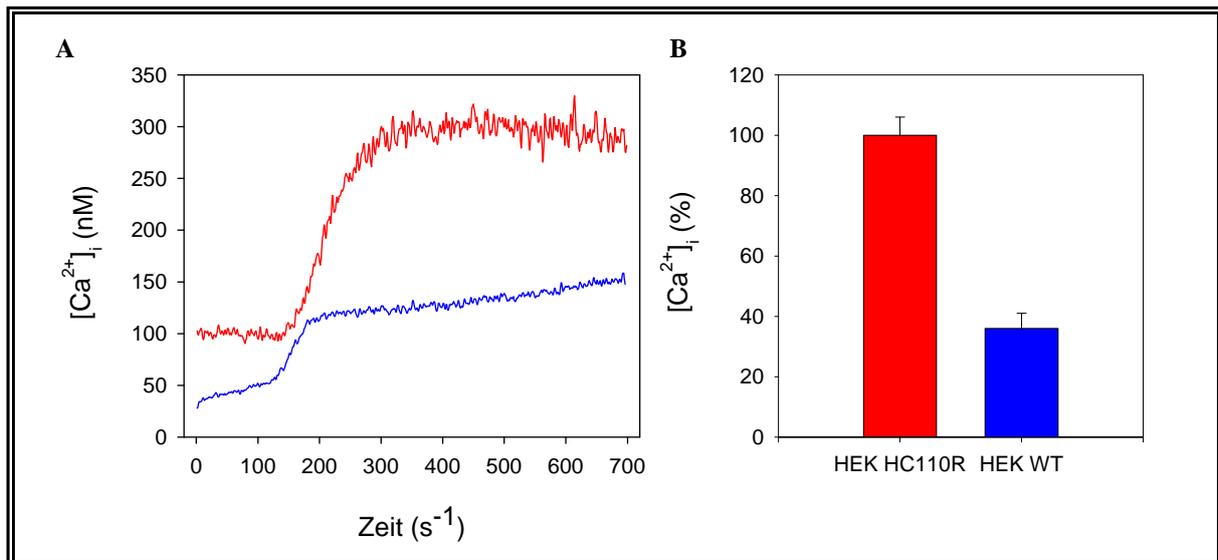


Abb. 3.29: α -LTX Stimulation stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierter bzw. wildtypischer HEK-293-Zellen. (A) Mit 1 μ M Fura-2/AM beladene stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierte (rot) bzw. wildtypische HEK-293-Zellen (blau) wurden nach einer Messzeit von 100 sec mit 200 pM α -LTX stimuliert und die $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 600 sec aufgezeichnet. (B) Das Balkendiagramm zeigt das prozentuale Verhältnis der durchschnittlichen Antwortgrößen der stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierten (rot) bzw. wildtypischen HEK-293-Zellen (blau) auf eine Stimulation mit 200 pM.

3.5.2 Funktionelle Analysen verschiedener Neuropeptide

In einer Messserie wurde die Fragestellung untersucht, ob die Neuropeptide AF1, AF2, AF4, AF5, AF10, AF11, AF12, AF19, PF1, PF2 und PF3 im gegebenen System eine HC110-R vermittelte Signaltransduktion stimulieren können. Zu diesem Zweck wurden 20 μ M des jeweiligen Neuropeptids nach 100 sec injiziert und Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ für 5 min beobachtet. Die Funktionalität der Zellen wurde dann mittels 200 pM α -LTX bestätigt. Jede der Messungen wurde mindestens dreimal an unterschiedlichen Zellpräparationen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.30 anhand ausgewählter Beispiele zusammengefasst. Die Abbildungen zeigen eindeutig, dass keines der gemessenen Neuropeptide in einer Konzentration von 20 μ M eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ hervorruft. Alle Beispiele zeigen, bedingt durch einen graduellen Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle, nur einen mehr oder weniger starken Drift der Basislinie innerhalb des aufgezeichneten Zeitraumes. Dieser Drift begann jedoch in allen Fällen schon vor Injektion des Peptids und ist somit davon unabhängig. Zudem fällt bei Betrachtung der Abbildungen 3.30 (B) und (F) eine minimale sprunghafte Erniedrigung der $[Ca^{2+}]_i$ zum Zeitpunkt der Injektion auf. Diese ist auf ein Artefakt durch zu schnelle Zugabe der Substanz zurückzuführen.

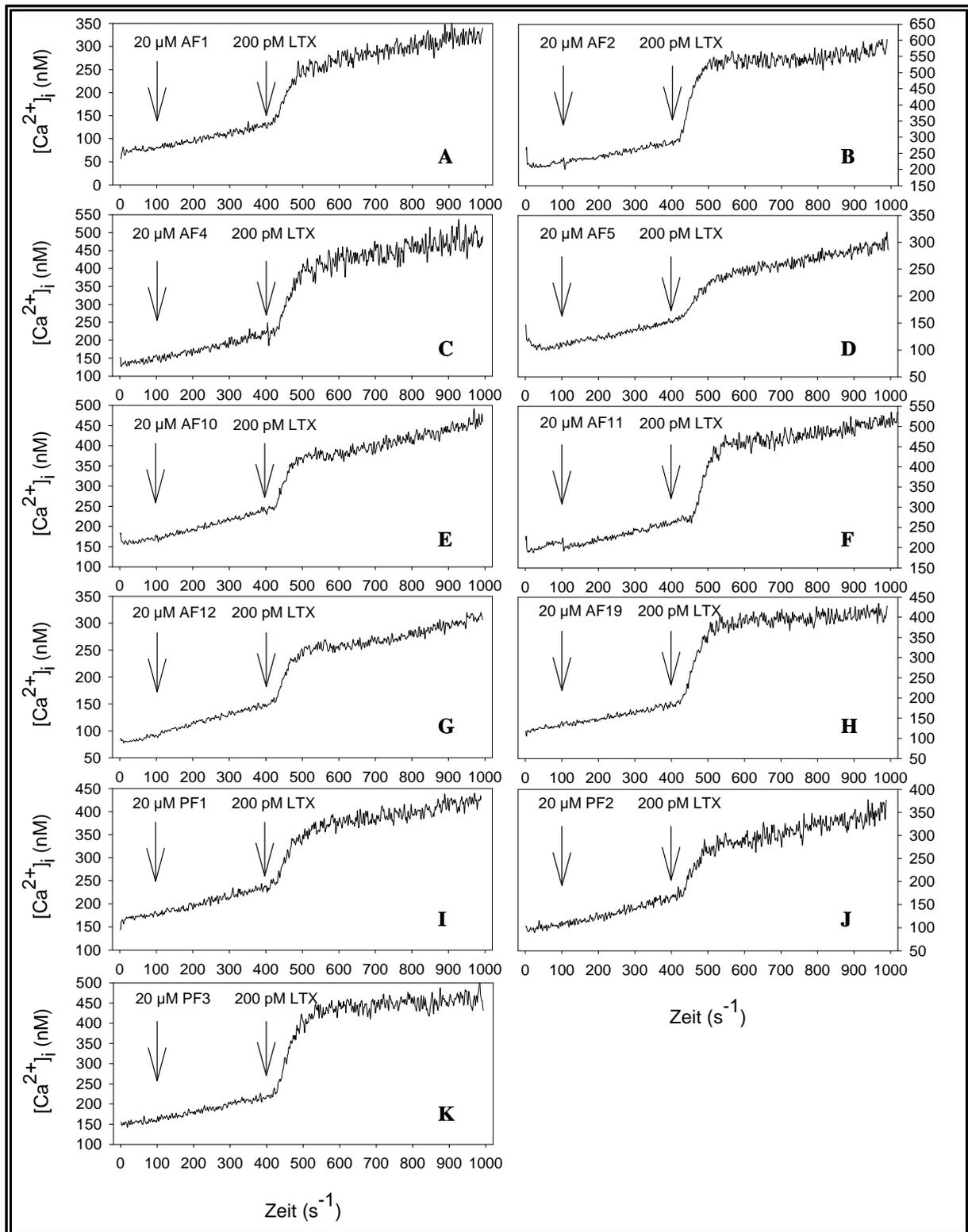


Abb. 3.30: Funktionelle Analyse verschiedener Neuropeptide an stabil mit HC110-R-Myc/6xHis transfizierten HEK-293-Zellen: Stabil mit HC110-R-Myc/6xHis transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit 1 μ M Fura-2/AM beladen und je 1×10^6 -Zellen in Lösung pro Messung eingesetzt. Fluoreszenzspektroskopisch wurde die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in nM nach Zugabe eines oder mehrerer Stimuli ermittelt. Die Zugabe der ersten Substanz (eines Neuropeptids) erfolgte nach 100 sec in einer Konzentration von 20 μ M. Nach weiteren 400 sec wurde die zweite Substanz α -LTX in einer Konzentration von 200 pM hinzugegeben und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 10 min beobachtet wurde. (A) AF1, (B) AF2, (C) AF4, (D) AF5, (E) AF10, (F) AF11, (G) AF12, (H) AF19, (I) PF1, (J) PF2, (K) PF3.

3.5.3 Einfluss verschiedener Neuropeptide auf die HC110-R vermittelte α -LTX-Signaltransduktion

Für funktionelle Analysen verschiedener HC110-R-bindender Neuropeptide wurden stabil transfizierte HEK-293-Zellen, wie bei den vorherigen Versuchen, mit 1 μ M Fura-2/AM beladen und je 1×10^6 -Zellen in Lösung pro Messung eingesetzt. Nach 100 sec erfolgte die Zugabe eines der Neuropeptide in unterschiedlichen Konzentrationen, gefolgt von der Injektion von 200 pM α -LTX nach weiteren 300 sec. Die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde für insgesamt 1000 sec aufgezeichnet. In den Abbildungen 3.31 (A) bis (J) sind exemplarisch Messergebnisse des Neuropeptids AF5 gezeigt. Stimulationen verschiedener Proben erfolgten in den Konzentrationen 100 pM (Abbildung 3.31 A), 1 nM (Abbildung 3.31 C), 10 nM (Abbildung 3.31 E), 100 nM (Abbildung 3.31 G) und 20 μ M (Abbildung 3.31 I). Jede der Messungen wurde mindestens mit drei verschiedenen Zellpräparationen durchgeführt. Als Kontrolle fungierte eine Probe, die nur mit 200 pM α -LTX stimuliert wurde. Die entsprechenden Kontrollen der hier gezeigten Messungen sind in den Abbildungen 3.31 (B), (D), (F), (H) und (J) gezeigt. In allen gemessenen Konzentrationen des Neuropeptids AF5 konnte innerhalb von 5 min keine durch das Neuropeptid induzierte Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ detektiert werden. Zudem erfolgte keine Peptid-spezifische Modifikation der durch 200 pM α -LTX stimulierten Signaltransduktion.

Der Einfluss der Neuropeptide auf die α -LTX-stimulierte, HC110-R-vermittelte Signalweiterleitung wurde in einer Reihe von Messungen für die Neuropeptide AF1, AF2, AF4, AF5, AF10, AF11, AF12, AF19, PF1, PF2 und PF3 untersucht. Jedes dieser Peptide wurde zum einen in einer Konzentration von 100 nM, zum anderen in einer Konzentration von 20 μ M eingesetzt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie am Beispiel des Peptids AF5 beschrieben. Jede dieser Messungen erfolgte mindestens dreimal mit unterschiedlichen Zellpräparationen. Die gemessenen durchschnittlichen Ca^{2+} -Antworten in nM wurden in ein prozentuales Verhältnis zu den durchschnittlich ermittelten Ca^{2+} -Antworten der Kontrollexperimente gesetzt. Dieses Verhältnis ist in den Abbildungen 3.32 für die Versuchsserie mit 100 nM der Peptide und in Abbildung 3.33 für die Versuchsserie mit 20 μ M der Peptide in Form von Balkendiagrammen zusammengefasst. Die durchschnittliche Antwortgröße der Kontrollexperimente wurde gleich 100 % gesetzt und die durchschnittliche Antwortgröße nach Zugabe des Peptides im Verhältnis hierzu dargestellt. Bei Betrachtung des Einflusses der Neuropeptide in einer Konzentration von 100 nM auf die mit 200 pM α -LTX induzierte Ca^{2+} -Antwort fällt auf, dass diese durch keines der getesteten Neuropeptide signifikant modifiziert werden konnte. Für die Neuropeptide AF4, AF5, AF10, PF1, PF2 und PF3 entsprachen die durchschnittlich gemessenen Antwortgrößen jeweils denen der Kontrollmessungen (Tabelle 3.11).

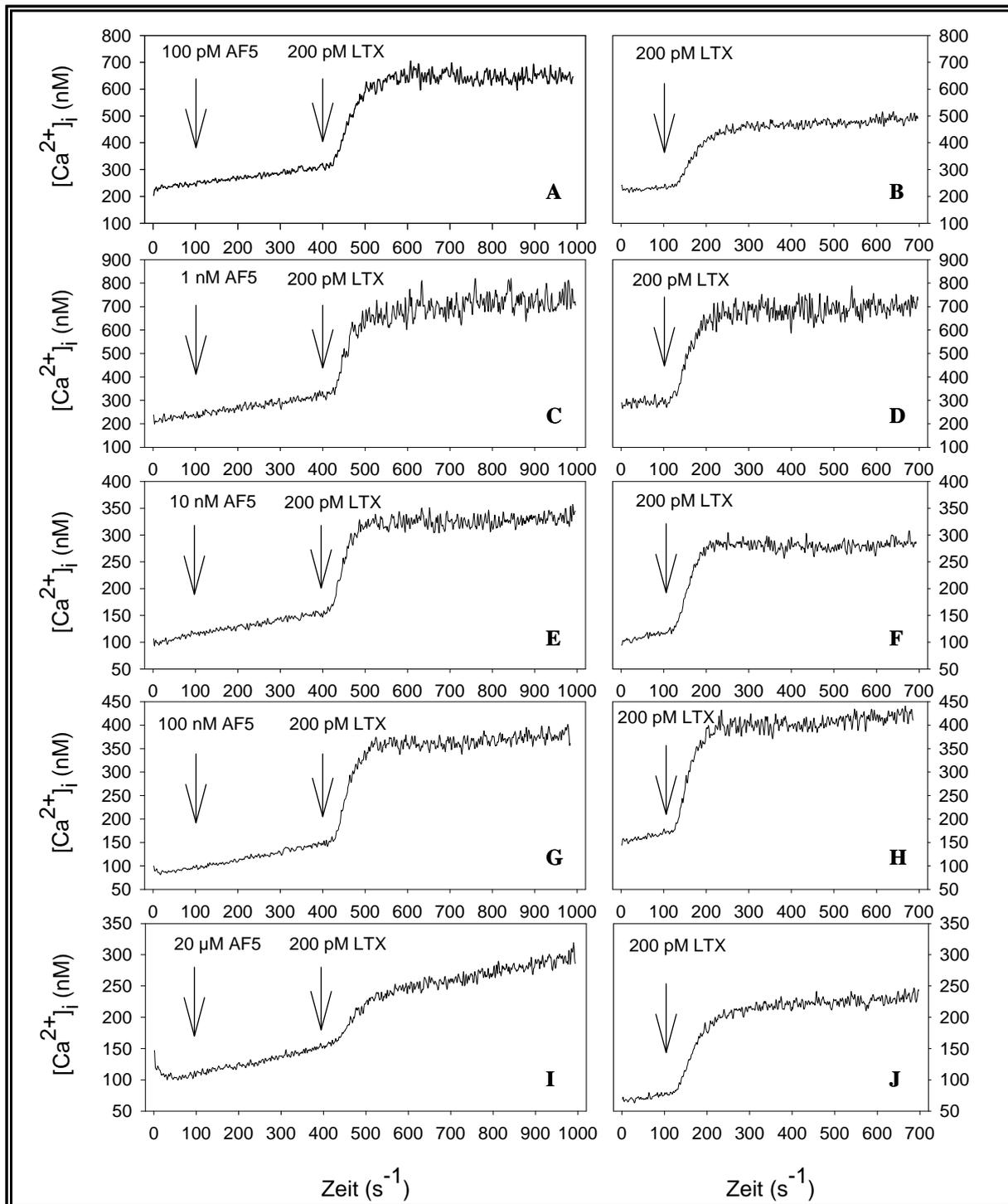


Abb. 3.31: Einfluss des Neuropeptids AF5 auf die HC110-R vermittelte α -LTX-Signaltransduktion. Stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit 1 μ M Fura-2/AM beladen und je 1×10^6 -Zellen in Lösung pro Messung eingesetzt. Fluoreszenzspektroskopisch wurde die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in nM nach Zugabe eines oder mehrerer Stimuli ermittelt. Die Zugabe der ersten Substanz (AF5) erfolgte nach 100 sec in den Konzentrationen 100 pM (A), 1 nM (C), 10 nM (E), 100 nM (G) oder 20 μ M (I). Nach weiteren 400 sec wurde die zweite Substanz (α -LTX) in einer Konzentration von 200 pM hinzugegeben und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 10 min beobachtet. Die Abbildungen (B), (D), (F), (H) und (J) zeigen die Kontrollexperimente, in denen die Zellen nach 100 sec mit 200 pM α -LTX stimuliert und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 600 sec beobachtet wurde.

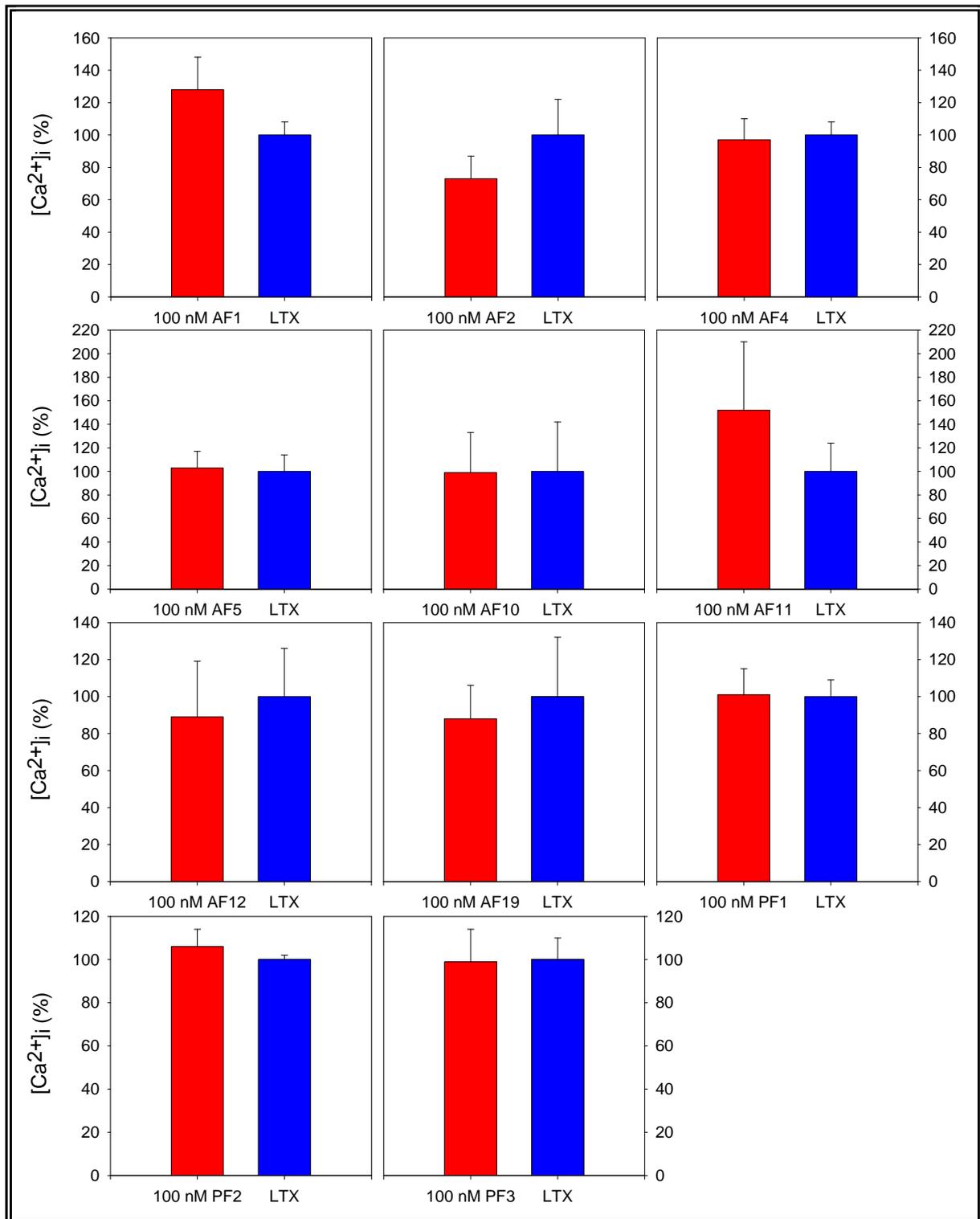


Abb. 3.32: Einfluss verschiedener Neuropeptide auf die HC110-R vermittelte α -LTX-Signaltransduktion

Stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit 1 μ M Fura-2/AM beladen und je 1×10^6 -Zellen in Lösung pro Messung eingesetzt. Fluoreszenzspektroskopisch wurde die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in nM nach Zugabe eines oder mehrerer Stimuli ermittelt. Die Zugabe der ersten Substanz (Neuropeptid) erfolgte nach 100 sec in einer Konzentration von 100 nM. Nach 300 sec wurde die zweite Substanz α -LTX in einer Konzentration von 200 pM hinzugegeben und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 10 min beobachtet. In den Kontrollexperimenten wurden die Zellen nach 100 sec mit 200 pM α -LTX stimuliert und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 600 sec beobachtet. Gezeigt sind die ermittelten prozentualen, durchschnittlichen Unterschiede (rot) zu den Kontrollexperimenten (blau). Die Kontrollen wurden gleich 100 % gesetzt.

Tab. 3.11: Einfluss verschiedener Neuropeptide auf die HC110-R-vermittelte α -LTX-Signaltransduktion. Stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit 1 μ M Fura-2/AM beladen und je 1×10^6 -Zellen in Lösung pro Messung eingesetzt. Fluoreszenzspektroskopisch wurde die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in nM nach Zugabe eines oder mehrerer Stimuli ermittelt. Die Zugabe der ersten Substanz (Neuropeptid) erfolgte nach 100 sec in einer Konzentration von 100 nM respektive 20 μ M. Nach 300 sec wurde die zweite Substanz (α -LTX) in einer Konzentration von 200 pM hinzugegeben und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 10 min beobachtet. In den Kontrolleexperimenten wurden die Zellen nach 100 sec mit 200 pM α -LTX stimuliert und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 600 sec beobachtet. Die Tabelle gibt die durchschnittlichen Ca^{2+} -Antworten in nM von mindestens drei Messungen unterschiedlicher Zellpräparationen mit der Standardabweichung (SEM) wieder.

Neuropeptid	Mittelwert \pm SEM (nM)	Neuropeptid	Mittelwert \pm SEM (nM)
100 nM AF1 + 200 pM α -LTX	310 \pm 49	20 μ M AF1 + 200 pM α -LTX	275 \pm 57
200 pM α -LTX	243 \pm 20	200 pM α -LTX	286 \pm 73
100 nM AF2 + 200 pM α -LTX	233 \pm 44	20 μ M AF2 + 200 pM α -LTX	233 \pm 69
200 pM α -LTX	320 \pm 70	200 pM α -LTX	226 \pm 17
100 nM AF4 + 200 pM α -LTX	220 \pm 30	20 μ M AF4 + 200 pM α -LTX	256 \pm 56
200 pM α -LTX	226 \pm 17	200 pM α -LTX	200 \pm 51
100 nM AF5 + 200 pM α -LTX	215 \pm 30	20 μ M AF5 + 200 pM α -LTX	145 \pm 66
200 pM α -LTX	208 \pm 29	200 pM α -LTX	123 \pm 32
100 nM AF10 + 200 pM α -LTX	150 \pm 52	20 μ M AF10 + 200 pM α -LTX	273 \pm 8
200 pM α -LTX	151 \pm 63	200 pM α -LTX	226 \pm 17
100 nM AF11 + 200 pM α -LTX	179 \pm 68	20 μ M AF11 + 200 pM α -LTX	160 \pm 23
200 pM α -LTX	118 \pm 28	200 pM α -LTX	173 \pm 31
100 nM AF12 + 200 pM α -LTX	200 \pm 68	20 μ M AF12 + 200 pM α -LTX	185 \pm 71
200 pM α -LTX	225 \pm 59	200 pM α -LTX	112 \pm 25
100 nM AF19 + 200 pM α -LTX	185 \pm 38	20 μ M AF19 + 200 pM α -LTX	158 \pm 59
200 pM α -LTX	211 \pm 68	200 pM α -LTX	163 \pm 41
100 nM PF1 + 200 pM α -LTX	317 \pm 44	20 μ M PF1 + 200 pM α -LTX	125 \pm 31
200 pM α -LTX	315 \pm 29	200 pM α -LTX	153 \pm 29
100 nM PF2 + 200 pM α -LTX	268 \pm 20	20 μ M PF2 + 200 pM α -LTX	156 \pm 32
200 pM α -LTX	252 \pm 4	200 pM α -LTX	226 \pm 53
100 nM PF3 + 200 pM α -LTX	270 \pm 40	20 μ M PF3 + 200 pM α -LTX	211 \pm 82
200 pM α -LTX	273 \pm 26	200 pM α -LTX	183 \pm 53

Zur Beurteilung der Signifikanz der für die anderen Neuropeptide beobachteten Abweichungen, ist eine Betrachtung der Einzelmessungen nötig. Die graphische Darstellung in Form von Blockdiagrammen zeigt, dass die Peptide AF1 und AF11 in einer Konzentration von 100 nM zu einer Erhöhung der α -LTX-Antwort um 28 % respektive 52 % führten (Abbildung 3.32; Tabelle 3.11). Einzelmessungen für das Neuropeptid AF1 zeigen jedoch, dass die Antwort nach Zugabe des Peptids in einem Fall, mit 230 nM unter der Kontrolle von 240 nM lag, in einem anderen Fall, mit 400 nM im Vergleich zu 210 nM, über der Kontrollmessung. Die Erhöhung der Antwort kann somit nicht auf die Wirkung des Neuropeptids zurückgeführt werden. Ähnlich verhält es sich für das Neuropeptid AF11. Auch hier gab es einen Wert, der mit 450 nM weit über dem der Kontrolle von 210 nM lag, jedoch auch ein Beispiel für einen Wert, der mit 120 nM unter der Kontrolle von 130 nM lag. Genauso argumentieren lässt sich für die Neuropeptide AF2, AF12 und AF19, die um 27 %, 11 % und 12 % durchschnittlich unter den Werten der Kontrollmessungen lagen (Abbildung 3.32; Tabelle 3.11). Eine Messung nach Zugabe von 100 nM des Neuropeptids AF12 führte

z.B. zu einer Antwort von 100 nM, im Vergleich zu einer Antwort der Kontrolle von 190 nM. In einem weiteren Fall entsprachen sich die Antworten jedoch mit je 190 nM oder die Antwort lag mit 75 nM im Vergleich zu 50 nM der Kontrolle deutlich darüber. Die durchschnittliche Erhöhung der Antwort lässt sich somit durchaus mit den üblichen Schwankungen des Messsystems erklären. Auch für das Neuropeptid AF19 lässt sich die durchschnittliche Erniedrigung der Antwort nach Zugabe des Neuropeptids durch Betrachtung der Einzelmessung als nicht signifikant beurteilen. Mit einer Antwort von 325 nM lag der Wert nach Zugabe des Peptids zwar um 32 % unter der Ca^{2+} -Antwort der Kontrolle von 475 nM, in einem weiteren Fall lag die Antwort jedoch mit 140 nM über dem Wert der Kontrolle (120 nM). Die Ergebnisse der Messungen des Neuropeptids AF2 lagen hingegen alle zwischen 20 und 30 % unter den Werten der Kontrolle. Jedoch lassen auch in diesem Fall die Werte nicht den Schluss zu, dass es sich um eine signifikante Erniedrigung handelt, da im gegebenen Messsystem Schwankungen von 30 % durchaus nicht ungewöhnlich sind. Eine zusätzliche Anwendung des T-Tests führte zur Ermittlung eines P-Wertes von 0,36. Dies bestätigt die obige Argumentation. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit der hier angewandten Messmethode, der Messung einer Vielzahl von Ereignissen in einer Küvette, mögliche kleine Einflüsse auf die α -LTX-stimulierte Ca^{2+} -Antwort nicht messbar sind.

Versuche mit einer Konzentration der Neuropeptide von 20 μM lassen eine mit den vorherigen Ergebnissen übereinstimmende Schlussfolgerung zu. Auch für diese Messserie lassen sich auf den ersten Blick anhand der Balkendiagramme (Abbildung 3.33) Peptide nennen, deren durchschnittlich gemessene Antwortgrößen jeweils denen der Kontrollmessungen (Tabelle 3.11) entsprachen. Zu diesen Peptiden zählen AF1, AF2, AF11 und AF19. Es gibt jedoch auch für diese Messungen Peptide, die durchschnittlich zu einer Erhöhung der mit 200 pM α -LTX induzierten Ca^{2+} -Antwort führten. Zu diesen Peptiden gehören, mit einer Erhöhung um 28 % AF4, mit einer Erhöhung um 18 % bzw. 21 % AF5 und AF10, mit einer Erhöhung um 115 % PF3 und das Peptid AF12 mit einer Erhöhung um 65 % (Abbildung 3.33; Tabelle 3.11). Zur Beurteilung der Signifikanz dieser Erhöhungen sollten also auch in diesem Fall die Einzelmessungen auf ungewöhnliche Werte hin untersucht werden. Die Ergebnisse der Peptide AF5, AF12 und PF3 lassen schnell die Schlussfolgerung zu, dass es sich hier nicht um einen spezifischen Anstieg der Antwort handelt. Die Ca^{2+} -Antworten lagen nach Zugabe des Peptids AF5 z.B. in einem Fall mit 100 nM unter der Antwort der Kontrollmessung von 140 nM, jedoch in einem anderen Fall mit 275 nM 62 % über der Antwort der Kontrolle (170 nM). Ähnlich verhält es sich mit den Messungen für das Neuropeptid AF12. Für diese lag die Ca^{2+} -Antwort mit 110 nM in einem Fall unter der Kontrollmessung von 140 nM, in einer weiteren Messung mit 120 nM jedoch um 100 % über der Kontrolle von 60 nM. Auch für das Peptid PF3 lag die Reaktion der Zellen auf den Stimulus α -LTX nach vorheriger Zugabe des Peptids, mit 65 nM in einem Beispiel unter der Antwort der Kontrolle von 80 nM, in einem weiteren Beispiel jedoch mit 350 nM 35 % über der Antwort der Kontrolle von 260 nM.

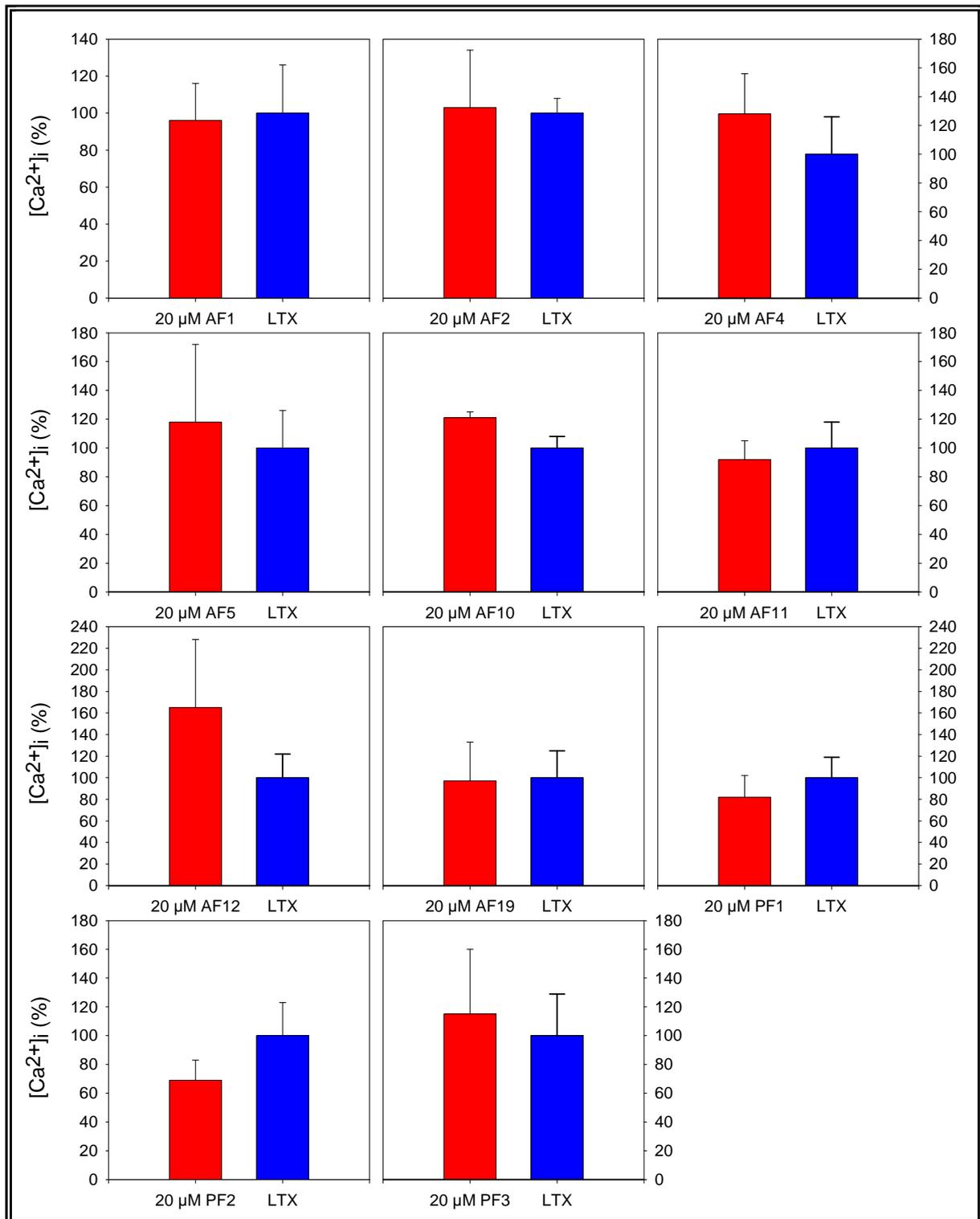


Abb. 3.33: Einfluss verschiedener Neuropeptide auf die HC110-R-vermittelte α -LTX-Signaltransduktion. Stabil mit HC110-R-Myc/6xHis transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit 1 μ M Fura-2/AM beladen und je 1×10^6 -Zellen in Lösung pro Messung eingesetzt. Fluoreszenzspektroskopisch wurde die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in nM nach Zugabe eines oder mehrerer Stimuli ermittelt. Die Zugabe der ersten Substanz (Neuropeptid) erfolgte nach 100 sec in einer Konzentration von 20 μ M. Nach 300 sec wurde die zweite Substanz (α -LTX) in einer Konzentration von 200 pM hinzugegeben und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 10 min beobachtet. In den Kontrollexperimenten wurden die Zellen nach 100 sec mit 200 pM α -LTX stimuliert und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 600 sec beobachtet. Gezeigt sind die ermittelten prozentualen, durchschnittlichen Unterschiede (rot) zu den Kontrollexperimenten (blau). Die Kontrollen wurden gleich 100 % gesetzt.

Für die Peptide AF4 und AF10 lagen die Antworten jedoch in jeder Messung über den Werten der Kontrollen. Für AF4 betrug die Erhöhung zwischen 5 und 73 %, für AF10 zwischen 12 und 35 %. Jedoch lassen sich auch diese Abweichungen nicht eindeutig auf eine spezifische Wirkung dieser Neuropeptide beziehen, da auch eine einmalige, um 73 % erhöhte Antwort im normalen Rahmen des angewandten Messsystems liegt. Die P-Werte von 0,5 für AF4 und 0,077 für AF10 bestätigen dies.

Weiterhin sollte nicht vergessen werden, die Ergebnisse der beiden Messserien untereinander zu vergleichen. Es wäre durchaus denkbar, dass sich ein Effekt, der bei einer Konzentration von 100 nM eines potentiellen Liganden beobachtet werden konnte, durch Zugabe einer 200fach höheren Konzentration dieses Liganden um ein Vielfaches verstärkt. In Tabelle 3.12 sind Unterschiede der durchschnittlichen Antwortgrößen im Vergleich zu den Kontrollen noch einmal in Form von Angaben zu den Tendenzen zusammengefasst.

Tab. 3.12: Einfluss verschiedener Neuropeptide auf die HC110-R vermittelte α -LTX-Signaltransduktion.

Stabil mit HC110-R-Myc/6xHis transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit 1 μ M Fura-2/AM beladen und je 1×10^6 -Zellen in Lösung pro Messung eingesetzt. Fluoreszenzspektroskopisch wurde die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in nM nach Zugabe eines oder mehrerer Stimuli ermittelt. Die Zugabe der ersten Substanz (Neuropeptid) erfolgte nach 100 sec in einer Konzentration von 100 nM bzw. 20 μ M. Nach 300 sec wurde die zweite Substanz (α -LTX) in einer Konzentration von 200 pM hinzugegeben und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 10 min beobachtet. In den Kontrollexperimenten wurden die Zellen nach 100 sec mit 200 pM α -LTX stimuliert und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 600 sec beobachtet. Die Tabelle fasst die Ergebnisse beider Messserien zusammen. Gezeigt sind die ermittelten durchschnittlichen Unterschiede zu den Kontrollexperimenten. \uparrow = Erhöhung der Antwortgröße, \downarrow = Erniedrigung der Antwortgröße, \leftrightarrow = kein Unterschied. Zusätzlich wurde für einige Messungen der T-Test durchgeführt und die ermittelten P-Werte angegeben.

Neuropeptid	100 nM	20 μ M
AF1	\uparrow	\leftrightarrow
AF2	\downarrow	\leftrightarrow
AF4	\leftrightarrow	\uparrow (p-Wert = 0,5)
AF5	\leftrightarrow	\uparrow (p-Wert = 0,78)
AF10	\leftrightarrow	\uparrow (p-Wert = 0,077)
AF11	\uparrow	\leftrightarrow
AF12	\downarrow	\uparrow
AF19	\downarrow	\leftrightarrow
PF1	\leftrightarrow	\downarrow (p-Wert = 0,55)
PF2	\leftrightarrow	\downarrow (p-Wert = 0,33)
PF3	\leftrightarrow	\uparrow (p-Wert = 0,79)

Für keines der Peptide wurde bei einer Konzentration von 100 nM ein Effekt gemessen, der sich bei erhöhter Konzentration verstärkte. In sechs Fällen konnte jedoch für eine niedrige Konzentration (100 nM) kein Effekt festgestellt werden, durch Zugabe einer hohen Konzentration (20 μ M) des jeweiligen Peptids kam es jedoch zu einer durchschnittlichen Zunahme (AF4, AF5, AF10 und PF3) bzw. einer Abnahme (PF1 und PF2) (Tabelle 3.12, blau). Auch diese Beobachtungen können mit Hinweis auf obige Argumentation allerdings nicht als Peptid-spezifisch angesehen werden. Zur statistischen Untermauerung wurde auf die Messwerte der genannten Peptide der T-Test angewandt und der P-Wert zur Beurteilung der Signifikanz der ermittelten Erhöhungen bzw. Erniedrigungen der Ca^{2+} -Antwort durch die

Peptide herangezogen. Unter Annahme, dass ein P-Wert $<0,05$ einen signifikanten Unterschied der Werte zu den Kontrollen angibt, folglich eine Irrtumswahrscheinlichkeit von nur 5 % vorliegt, traf dies für keine der Messserien zu. Die P-Werte wurden für die Peptide AF4, AF5, AF10, PF1, PF2 und PF3 berechnet und in Tabelle 3.12 vermerkt. Zusammenfassend konnte somit im gegebenen Messsystem gezeigt werden, dass keines der hier untersuchten Neuropeptide in einer Konzentration von 100 nM sowie einer Konzentration von 20 μM einen Einfluss auf die $\alpha\text{-LTX}$ -stimulierte Signaltransduktion an stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierten HEK-293-Zellen hat.

3.5.4 Funktionelle Analysen von Daf-21

In Untersuchungen mit dem 84 kDa großen Fusionsproteins Daf-21 an stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierten HEK-293-Zellen wurde beobachtet, ob es durch Zugabe der Substanz zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kommt. Zu diesem Zweck wurden Zellen mit 1 μM Fura-2/AM beladen und eine Zellsuspension von je 1×10^6 -Zellen in einer Küvette in einem Fluoreszenzspektrometer gemessen. Nach 100 sec erfolgte die Zugabe des 84 kDa großen Fusionsproteins in unterschiedlichen Konzentrationen, gefolgt von der Injektion von 200 pM $\alpha\text{-LTX}$ nach weiteren 300 sec. Die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde für insgesamt 1000 sec aufgezeichnet. Die Abbildungen 3.34 (A) bis (F) zeigen exemplarisch einige der Messungen. Die Stimulation verschiedener Proben erfolgte in den Konzentrationen 15 nM (A), 35 nM (C) und 100 nM (E). Als Kontrolle wurde eine Probe mit 200 pM $\alpha\text{-LTX}$ nach 100 sec stimuliert und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für weitere 600 sec beobachtet (Abbildung 3.34 B, D, F). In keiner Messung konnte in einer Messzeit von 5 min nach Injektion des Fusionsproteins eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ festgestellt werden. Abbildung 3.34 (C) zeigt nach Injektion einen kleinen ‚Peak‘, der jedoch in Kontrollexperimenten als Artefakt identifiziert werden konnte. Ähnliche kleine Erhöhungen traten auch bei Injektion einer äquivalenten Menge des Probenpuffers auf.

Weiterhin wurde die Frage untersucht, ob Daf-21 einen Einfluss auf die HC110-R-vermittelte $\alpha\text{-LTX}$ -Signaltransduktion hat. Bestimmt wurde die durchschnittliche Antwortgröße durch 200 pM $\alpha\text{-LTX}$ nach vorheriger Injektion von 100 nM des 84 kDa großen Fusionsproteins. In einer Serie von Kontrollexperimenten wurde zudem die durchschnittliche Antwort durch 200 pM $\alpha\text{-LTX}$ bestimmt und gleich 100 % gesetzt. In einem Balkendiagramm (Abbildung 3.35) ist das prozentuale Verhältnis dieser beiden Messserien gegenübergestellt. Die Experimente ergaben, dass die durchschnittliche Ca^{2+} -Antwort der Zellen nach vorheriger Zugabe des Fusionsproteins bei 87 ± 29 nM lag, die durchschnittliche Antwort der Kontrollmessungen hingegen bei 107 ± 28 nM. Die Antwort war somit durchschnittlich um 19 % erniedrigt. Die Betrachtung der Einzelmessungen zeigt jedoch, dass die Antwort sowohl mit 40 nM unter der Antwort der Kontrolle von 130 nM lag, in einem anderen Fall jedoch mit 80 nM über der Kontrollmessung mit 50 nM. Zusätzlich wurde mit Hilfe des T-Tests ein P-Wert von 0,65 ermittelt. Die Unterschiede der durchschnittlichen Antwortgrößen sind somit nicht signifikant.

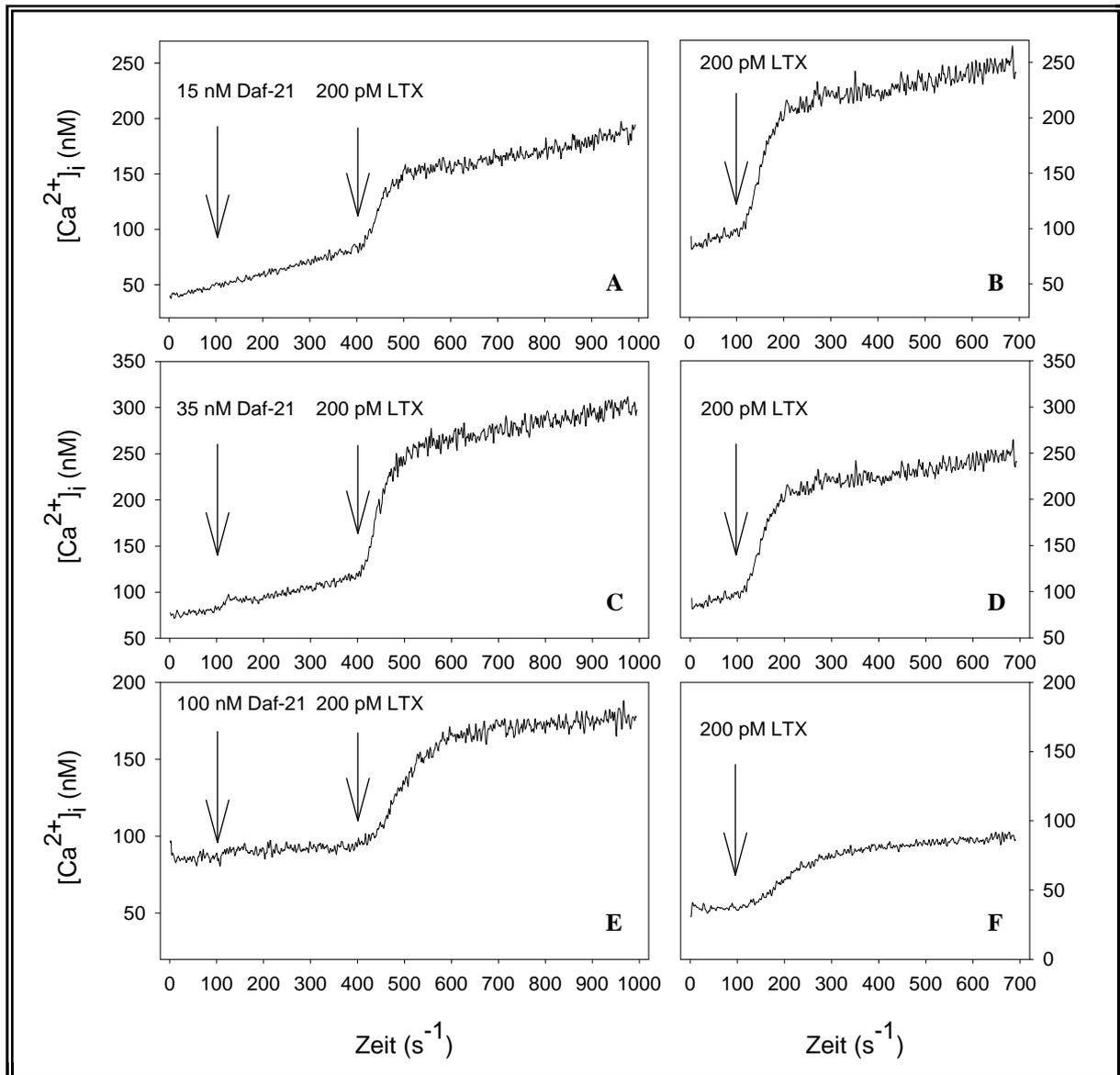


Abb. 3.34: Einfluss von Daf-21 auf die HC110-R vermittelte α -LTX-Signaltransduktion. Stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit 1 μ M Fura-2/AM beladen und je 1×10^6 -Zellen in Lösung pro Messung eingesetzt. Fluoreszenzspektroskopisch wurde die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in nM nach Zugabe eines oder mehrerer Stimuli ermittelt. Die Zugabe der ersten Substanz, das Fusionsprotein des Klons pET-DAFA1-702, erfolgte nach 100 sec in den Konzentration 15 nM (A), 35 nM (C) und 100 nM (E). Nach weiteren 400 sec wurde die zweite Substanz (α -LTX) in einer Konzentration von 200 pM hinzugegeben und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 10 min beobachtet. Die Abbildungen (B), (D) und (F) zeigen die Kontrolleexperimente, in denen die Zellen nach 100 sec mit 200 pM α -LTX stimuliert und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 600 sec beobachtet wurde.

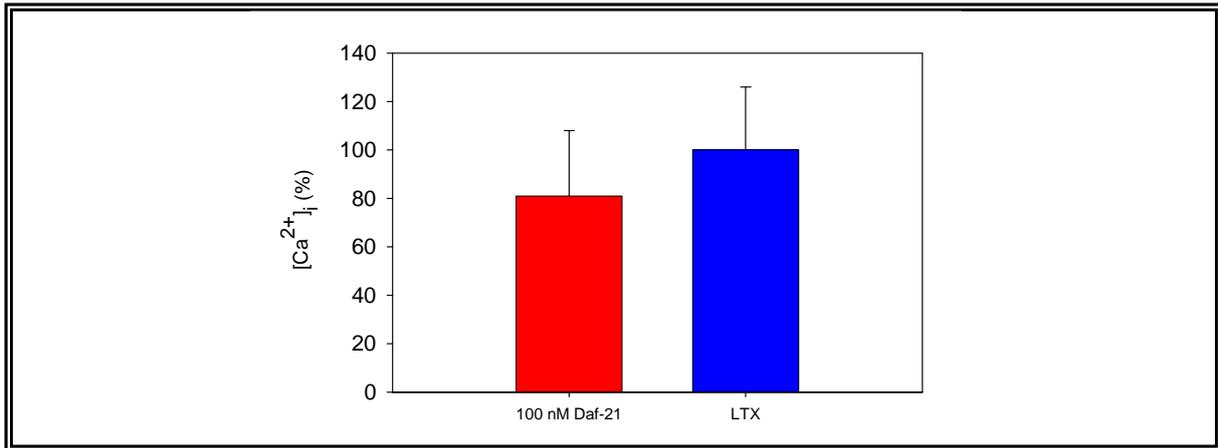


Abb. 3.35: Einfluss von Daf-21 auf die HC110-R-vermittelte α -LTX-Signaltransduktion. Stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierte HEK-293-Zellen wurden mit 1 μ M Fura-2/AM beladen und je 1×10^6 -Zellen in Lösung pro Messung eingesetzt. Fluoreszenzspektroskopisch wurde die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in nM nach Zugabe eines oder mehrerer Stimuli ermittelt. Die Zugabe der ersten Substanz, das Fusionsprotein des Klons pET-DAF Δ 1-702, erfolgte nach 100 sec in einer Konzentration von 100 nM. Nach 300 sec wurde die zweite Substanz (α -LTX) in einer Konzentration von 200 pM hinzugegeben und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 10 min beobachtet. In den Kontrolleexperimenten wurden die Zellen nach 100 sec mit 200 pM α -LTX stimuliert und die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ für weitere 600 sec beobachtet. Gezeigt sind die ermittelten prozentualen, durchschnittlichen Unterschiede (rot) zu den Kontrolleexperimenten (blau). Die Kontrollen wurden gleich 100 % gesetzt.

4. Diskussion

Der 110 kDa große Orphanrezeptor HC110-R aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurde im Rahmen eines ‚Immunscreenings‘ mit dem anthelminthisch wirksamen Medikament PF1022A, mit Hilfe einer λ ZAPII-cDNA-Expressionsbibliothek, aus dem parasitischen Nematoden *H. contortus*, identifiziert. Das ‚Screening‘ erfolgte mit einem PF1022A-KLH-Konjugat und einem Anti-PF1022A-KLH Antiserum (Saeger *et al.*, 2001). Anhand unterschiedlicher Ergebnisse aus *C. elegans* wurde ein Modell zum Wirkmechanismus des Anthelminthikums aufgestellt. Emodepsid aktiviert durch Bindung an Latrophilin eine Phospholipase- β -Kaskade und erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Auf diese Weise kommt es zur Aktivierung des K^{+} -Kanals Slo-1 und dadurch bedingt zu einer Inhibierung der pharyngealen Pumpaktivität (Harder *et al.*, 2005; Guest *et al.*, 2007). Die physiologische Funktion der Latrophiline und Latrophilin-ähnlichen Rezeptoren ist bisher nicht bekannt. Aufschluss darüber sollte die Identifizierung natürlicher Liganden des Rezeptors HC110-R geben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Proteinextrakten des frei lebenden Nematoden *C. elegans* nach nativen Liganden des Orphanrezeptors HC110-R gesucht. Ferner wurden potentielle natürliche Liganden auf ihre Bindung an ein 54 kDa großes NH_2 -terminales Fusionsprotein des Rezeptors untersucht und Funktionsanalysen bindender Peptide/Proteine an stabil mit HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen vorgenommen. Die vorliegende Arbeit stellt infolgedessen erstmals das Hitzeschickprotein Daf-21 als potentiellen Interaktionspartner des Rezeptors HC110-R vor. Zusätzlich gelang es in einem *in vitro*-System, Bindungen verschiedener Neuropeptide an den aminoterminalen Teil des Rezeptors nachzuweisen und in einigen Fällen Kinetik und Affinität dieser Bindungen zu bestimmen.

Der Orphanrezeptor HC110-R wurde aufgrund seiner 31%igen Identität zu den Latrophilinen aus Säugetieren der Familie der Latrophilin-ähnlichen Proteine zugeordnet (Saeger *et al.*, 2001). Die Latrophiline und Latrophilin-ähnlichen Proteine werden zu der Unterfamilie B der GPCR gezählt. Charakteristisch für diese Gruppe ist ein großer extrazellulärer NH_2 -Terminus mit einer Hormonbindungsdomäne (Kristiansen, 2004). Sie repräsentiert eine der größten Rezeptorfamilien für Hormone und Neuropeptide, zur Regulation unterschiedlicher sekretorischer Prozesse, die in verschiedene wichtige biologische Funktionen involviert ist (Cardoso *et al.*, 2006; Jelinek *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993). Innerhalb dieser Unterfamilie existiert eine Gruppe von Rezeptoren (LNB-TM7), die sich durch sehr große extrazelluläre Domänen mit einigen gut charakterisierten Proteinmodulen auszeichnen. Sie scheinen zusätzlich, durch Bindung an die extrazelluläre Matrix oder durch Interaktion mit Membranproteinen anderer Zellen, als Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle zu fungieren (Stacey *et al.*, 2000; Foord *et al.*, 2002) Über die physiologische Funktion der Latrophiline ist bisher wenig bekannt. Trotz hoher Sequenzähnlichkeiten untereinander wird davon ausgegangen, dass die drei Latrophiline unterschiedliche Funktionen haben und daher auch verschiedene endogene Liganden binden (Matsushita *et al.*, 1999). Unter Berücksichtigung des Expressionsmusters in den Geweben, ist eine Synapsen- oder Neuronen-spezifische Funktion

auszuschließen (Südhof, 2001). Extrazelluläre native Liganden dieser Rezeptoren wurden bis *dato* nicht beschrieben. Es wurde jedoch eine Interaktion des intrazellulären, C-terminalen Teiles von Lat-1 und Lat-2 mit hoher Affinität an die PDZ-Domäne der ProSAP/SSTRIP (Somatostatin Rezeptor interagierende Proteine)/Shank-Proteine beschrieben. Dabei handelt es sich um postsynaptisch exprimierte Proteine. Für Lat-1 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es nicht nur prä-, sondern auch postsynaptisch lokalisiert ist. Durch Assoziation mit Lat-1 bewirkt das Protein ProSAP1/Shank2 eine Anreicherung des Rezeptors an definierten prä- und/oder postsynaptischen Stellen und spielt eine wichtige Rolle in der Bildung zellulärer Kontakte an Synapsen in der neuronalen Entwicklung (Kreienkamp *et al.*, 2002).

Im humanen Genom existieren 33 Mitglieder der Gruppe der LNB-TM7-Rezeptoren. Beispiele für Mitglieder dieser Gruppe sind der CD97-Rezeptor und EMR 1 („EGF-like module containing mucin-like receptor“). Für keines dieser Mitglieder konnte bisher ein nativer Ligand identifiziert werden. Für zwei Rezeptoren wurden jedoch interagierende Proteine beschrieben, die mit hoher Affinität binden (Foord *et al.*, 2002). Der CD97-Rezeptor bindet den „Decay accelerating factor“ (DAF oder CD55), ein 312 AS langes Protein. Dieses ist über einen GPI-Anker (Glykosylphosphatidylinositol-Anker) mit der Plasmamembran verbunden (Gray *et al.*, 1996, Lin *et al.*, 2001). CD55 induziert in rekombinanten Systemen (HEK-293-Zellen und T-Lymphozyten) keine G-Protein-vermittelte Signalweiterleitung, ist jedoch durch Kostimulation an der Aktivierung der Src-verwandten Kinase p56^{lck} beteiligt. Der zweite Rezeptor dieser Gruppe, für den ein Ligand identifiziert werden konnte, ist der Latrophilin-Rezeptor. Dieser bindet mit dem Neurotoxin α -LTX einen artifiziellen Liganden, der in der Lage ist die Ausschüttung von Neurotransmittern zu stimulieren. Studien an den Rezeptoren CD97 und Latrophilin weisen darauf hin, dass die Signalweiterleitung der LNB-7TM-Rezeptoren weitaus mehr beinhaltet als die Stabilisierung des G-Protein aktivierten Zustandes (Foord *et al.*, 2002). Dies könnte auf die meisten, wenn nicht alle LNB-7TM-Rezeptoren zutreffen. Allen gemeinsam ist eine GPS-Domäne und für die meisten konnte eine Adhäsionsdomäne in ihrem NH₂-Terminus identifiziert werden (Stacey *et al.*, 2000).

4.1 Neuropeptide der *flp*-Familie als potentielle, native Liganden von HC110-R

In unterschiedlichen Versuchsansätzen wurden Neuropeptide aus dem Nematoden *C. elegans* als putative, native Liganden des Orphanrezeptors HC110-R untersucht. Zu Grunde lagen diesen Versuchen in erster Linie Ergebnisse einer Studie zum Wirkmechanismus des Anthelminthikums Emodepsid an somatischen Muskelpräparationen des Nematoden *A. suum*. Gezeigt wurde, dass Emodepsid zu einer Muskelrelaxation führt. Durch Acetylcholin oder das Neuropeptid AF2 stimulierte Muskelkontraktionen konnten zudem durch Zugabe von Emodepsid inhibiert werden. Weiterhin konnten durch Acetylcholin induzierte, tonische Muskelkontraktionen mittels Emodepsid schnell relaxiert werden. Es zeigte sich, dass die inhibitorische Wirkung von Emodepsid über den Nervenstrang vermittelt wird. Elektrophysiologische Messungen ergaben, dass Emodepsid eine Ca²⁺-abhängige Hyperpolarisation der Muskelzellen bewirkt. Zusätzlich ist die Wirkung von Emodepsid,

ähnlich wie bei den inhibitorischen Neuropeptide PF1 und PF2, von extrazellulärem K^+ abhängig. Emodepsid scheint somit den Wirkmechanismus inhibitorischer Neuropeptide an neuromuskulären Verbindungsstellen zu imitieren und die Freisetzung inhibitorischer Neurotransmitter oder Neuromodulatoren an Nervenendigungen zu stimulieren (Willson *et al.*, 2003).

Die meisten der heute zur Bekämpfung von Nematoden eingesetzten Anthelminthika wirken durch eine selektive Beeinflussung der Funktion von Neurotransmitter-Rezeptoren (Geary und Kubiak, 2005). Es konnte jedoch bis *dato* noch für kein Anthelminthikum nachgewiesen werden, dass es am neuropeptidergen System der Nematoden angreift (Maule *et al.*, 2002). In den letzten Jahren richtete sich deshalb das Interesse auf die Identifizierung und Charakterisierung von Neuropeptidrezeptoren als potentielle ‚Target‘-Proteine für eine neue Generation von Anthelminthika. Der frei lebende Nematode *C. elegans* stand, nach vollendetem Genomprojekt, im Vordergrund der Untersuchungen (Geary und Kubiak, 2005). GPCR scheinen für die Wirkung der meisten FLP (‚FMRFamid-like Peptide‘) eine große Rolle zu spielen (Maule *et al.* 2002). Die Generierung von Doppelmutanten, mit einer Deletion oder einer Überexpression im Gen *flp-1* und mit einer Mutation in einer Untereinheit eines G-Proteins, die zu einem Verlust oder einem Gewinn der Funktion führt, ergab, dass alle Mutanten mit einer einzelnen G-Protein-Mutation einen Defekt in der Lokomotion aufwiesen. Dies weist darauf hin, dass die Flp-1-Peptide einen G-Protein-vermittelten Einfluss auf die Lokomotion ausüben (Li *et al.*, 1999). Die Aktivierung von GPCR kann indirekt durch Elemente der Signalweiterleitung beobachtet werden. Dies kann beispielsweise die G-Protein-Aktivierung sein. Der Rezeptor für das Peptid Flp-14 (AF2) konnte als ein GPCR identifiziert werden, indem *in vitro* eine Bindung von radioaktiv gekoppeltem $GTP\gamma S$ über AF2/Flp-14 an Membran-Präparationen aus *A. suum* nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Prozess des GDP-GTP-Austausches in der G_{α} -Untereinheit durch Bindung von AF2/Flp-14 induziert wird. Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung eines GPCR am Wirkmechanismus eines Neuropeptids ist die Identifizierung eines sekundären Botenstoffes (McVeigh, 2006). In verschiedenen Studien konnten sekundäre Botenstoffe identifiziert werden, welche mit der Neuropeptid-induzierten, GPCR-vermittelten Signaltransduktion assoziiert sind. Ein Beispiel stellt in diesem Zusammenhang der sekundäre Botenstoff cAMP dar (Maule *et al.*, 2002).

Mehreren Arbeitsgruppen gelang es in den letzten Jahren mittels effizienter Verfahren der reversen Pharmakologie in *C. elegans* verschiedenen Rezeptoren Neuropeptidliganden zuzuordnen. Insgesamt wurden in der Literatur bis *dato* 11 FLP-Rezeptoren aus *C. elegans* beschrieben (Lowery *et al.* 2003; Kubiak *et al.*, 2003a und b; Mertens *et al.*, 2004, 2005a und b, 2006). Alle gehören der Unterfamilie A der GPCR an (McVeigh *et al.*, 2006). Untersucht wurde die Liganden-induzierte Bindung von $GTP\gamma S$ an Membranen von CHO-Zellen, die mit je einem Rezeptor und einem chimären G-Protein transfiziert waren. Auf diese Weise gelang es, die *flp-15*-Peptide als Liganden des Rezeptors C10C6.2 (Kubiak *et al.*, 2003a), die *flp-18*-Peptide als Liganden der Rezeptoren C16D6.2, F41E7.3, Y58G8a.1, C53C7.1 und C25G6.5 (Lowery *et al.*, 2003), die *flp-3*-Peptide als Liganden des Rezeptors C53C7.1 (Lowery *et al.*,

2003) und das FLP-21-Peptid als Ligand des Rezeptors C25G6.5 (Lowery *et al.*, 2003) zu identifizieren. FLP anderer Gene konnten zudem als Liganden der Rezeptoren C16D6.2 und C10C6.2 identifiziert werden (Lowery *et al.*, 2003). Durch Expression des Rezeptors C39E6.6 und einem K⁺-Kanal in *Xenopus laevis*-Oozyten gelang die Identifizierung des FLP-21-Peptids und der *flp-18*-Peptide, die in der Lage waren, den K⁺-Kanal zu aktivieren (Rogers *et al.*, 2003; Kubiak *et al.*, 2003b). Mertens *et al.* hingegen exprimierten Rezeptoren und das G-Protein G_{α16} in HEK-293- oder CHO-Zellen und untersuchten diese mit Hilfe eines Calcium-Fluoreszenzindikators auf eine Liganden-induzierte Ca²⁺-Antwort. Die Peptide der Gene *flp-7* und *flp-11* wurden daraufhin als Liganden der Rezeptoren C26F1.6 und Y59H11AL.1 (Mertens *et al.*, 2004, 2006), die FLP-2-Peptide als Liganden der beiden Isoformen des Rezeptors T16F4.1 identifiziert. Folglich scheint es sowohl möglich, dass ein Rezeptor mehrere FLP verschiedener Gene bindet, als auch, dass ein einzelnes FLP als Ligand unterschiedlicher Rezeptoren fungiert. Bisher ist noch nicht sicher, ob die Ergebnisse der *C. elegans*-Studien auf parasitische Nematoden übertragbar sind (Li *et al.*, 2005). Viele Daten sprechen jedoch dafür, dass *flp*-Gene größtenteils im gesamten Stamm vergleichbar sind (McVeigh, 2006).

4.1.1 Kinetik der Interaktionen zwischen Neuropeptiden und HC110-R

In der hier vorgestellten Studie wurde eine Auswahl an Neuropeptiden aus *C. elegans* mittels eines Oberflächenplasmonresonanz-Biosensors auf eine Bindung an ein aminotermiales Fusionsprotein des Rezeptors HC110-R untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Neuropeptide AF1, AF2, AF4, AF10, AF11, AF12, AF19, PF1, PF2 und PF3 *in vitro* an den Aminoterminus binden. Durch den Vergleich der Detektionsgrenzen dieser Neuropeptide konnte nachgewiesen werden, dass sich das Bindungsverhalten der Peptide, trotz sehr großer Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen, deutlich unterscheidet. Untersucht wurden Neuropeptide der *C. elegans*-Gene *flp-1* (AF11, PF1 und PF2), *flp-4* (AF5), *flp-6* (PF3), *flp-8* (AF1), *flp-13* (AF19), *flp-14* (AF2) und *flp-18* (AF4, AF10 und AF12). Das Neuropeptid AF5 nahm während der durchgeführten Messungen eine Sonderstellung ein. Es zeigte unter etablierten Standardbedingungen eine starke unspezifische Bindung an die Matrix der Flusszelle, so dass der Laufpuffer verändert werden musste. Erst mit einer Konzentration von 300 mM NaCl konnte eine Bindung gemessen werden.

Studien über genetische Interaktionen in *C. elegans* bestätigen die hier ermittelten Interaktionen. Es wurden Interaktomdaten, Daten zu Phänotypen, zur Genexpression und zu Funktionen aus den drei Modellorganismen *Saccharomyces cerevisiae*, *C. elegans* und *D. melanogaster* verwendet und computergestützte Vorhersagen über genetische Interaktionen in *C. elegans* gemacht. Es resultierte ein Netzwerk aus 18183 genetischen Interaktionen (Zhong und Sternberg, 2006). Recherchen in der Datenbank auf mögliche Interaktionspartner von *lat-1* ergaben potentielle Interaktion mit den Genen *flp-1*, *flp-3*, *flp-6*, *flp-7*, *flp-8*, *flp-9*, *flp-13*, *flp-14*, *flp-17* und *flp-18*. Die Vorhersage beruht auf der Information, dass alle hier genannten Gene in *C. elegans* in den gleichen biologischen Prozess involviert sind. Es gibt zusätzlich Daten aus ‚Microarrays‘, die auf eine Interaktion zwischen *flp-7*, *flp-17* und *flp-6* mit *lat-1* hinweisen (<http://tenaya.caltech.edu:8000/predict>). Für alle Neuropeptide, die in dieser Arbeit

eine Bindung an den aminoterminalen Teil des Rezeptors aufwies, wird auch in der oben beschriebenen Analyse eine Interaktion mit *lat-1* aus *C. elegans* vorhergesagt. Nur für das Gen *flp-4*, welches für das Neuropeptid AF5 kodiert, wurde keine Wechselwirkung vorhergesagt. Es fällt jedoch auf, dass es sich bei AF5 um das Peptid handelt, welches sich in seinen Bindungseigenschaften deutlich von den anderen Peptiden unterscheidet. In einer Kontrolle wurde die Aminosäuresequenz des Peptids AF19 in eine willkürliche Reihenfolge gebracht und die Bindung dieses künstlichen Peptids unter gleichen Bedingungen untersucht. Dabei zeigte dieses Peptid eine starke unspezifische Bindung, sowohl an die mit dem Fusionsprotein gekoppelte Oberfläche als auch an die Referenzoberfläche, welche die Bindung an das Fusionsprotein sogar noch überstieg. Es konnte somit eindeutig gezeigt werden, dass die Bindung des Neuropeptids AF19 an den aminoterminalen Teil des Rezeptors ausschließlich auf die spezifische Sequenz zurückzuführen ist. Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich auch bei AF5, welches sich in seinen Bindungseigenschaften ebenfalls eindeutig von den anderen Peptiden unterscheidet, nicht um einen nativen Interaktionspartner handelt. Dies wäre im Einklang mit den Vorhersagen von Zhong und Sternberg (2006).

Für die gemessenen Interaktionen der Neuropeptide AF1, AF2, AF10, PF2 und PF3 gelang es, bei der Auswertung ein Bindungsmodell anzupassen, kinetische Parameter abzuleiten und somit die Affinitäten der hier gemessenen Bindungen zu bestimmen. Die Ratenkonstanten k_a und k_d beschreiben die Geschwindigkeit der Bildung bzw. des Zerfalls eines Komplexes zwischen zwei Bindungspartnern. Die in dieser Untersuchung bestimmten Assoziationsratenkonstanten lagen in einem Bereich von 2×10^1 bis $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Sie beschreiben eine sehr langsame Assoziation der Komplexe. In der Literatur wird für typische biologische Interaktionen ein Bereich von 1×10^3 bis $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ angegeben (,Kinetics and Affinity Analysis with Biacore', Level 1, 2005; Biacore, Freiburg). Die Dissoziationsratenkonstanten hingegen lagen für alle hier bestimmten Interaktionen in einem engen Bereich zwischen 1×10^{-2} bis $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Diese Werte beschreiben eine schnelle Dissoziation der Komplexe. Ein k_d -Wert von $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ steht für einen Zerfall von 1 % der Komplexe pro Sekunde und somit einer Halbwertszeit von 69,3 s. Im Vergleich dazu beschreibt eine Dissoziationsratenkonstante von $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ einen Zerfall von 0,0001 % der Komplexe pro Sekunde. Dies entspricht einer Halbwertszeit von 8 Tagen. Biologische Reaktionen besitzen meist k_d -Werte zwischen 1×10^{-1} bis $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (,Kinetics and Affinity Analysis with Biacore', Level 1, 2005; Biacore, Freiburg). Mit Hilfe der Ratenkonstanten ist es möglich, die Affinität einer Interaktion zu bestimmen. Aus dem Quotienten des k_d - und des k_a -Wertes ergibt sich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D . Diese Konstante beschreibt die Dissoziationstendenz eines Komplexes mit einer höheren Tendenz bei steigendem Wert. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante konnte mit den ermittelten Parametern für die Neuropeptide AF1, AF10 und PF2 bestimmt werden. Es ergab sich für AF1 ein K_D -Wert von 11 μM , für AF10 ein K_D -Wert von 52 μM und für PF2 ein K_D -Wert von 530 μM . In der Literatur sind Werte von 10 μM bis 1 pM als typisch für biologische Interaktionen angegeben (,Kinetics and Affinity Analysis with Biacore', Level 1, 2005; Biacore, Freiburg). Alle hier berechneten Konstanten beschreiben Reaktionen mit niedriger

Affinität. Mit der Methode der Oberflächenplasmonresonanz ist es schon in der Vergangenheit gelungen, Bindungen mit einer sehr geringen Affinität zu charakterisieren. Niedrige Bindungsaffinitäten sind beispielsweise für die Signaltransduktion nicht ungewöhnlich (Panayotou *et al.*, 1993; Lemmon *et al.*, 1994). Bindungsaffinitäten im millimolaren Bereich sind verbreitet bei Zell-Zell-Interaktionen, Stoffwechsel-Transportprozessen, bei der immunologischen Erkennung und der Kontaktaufnahme von Viren oder Bakterien an ihre Wirtszelle. Bei Messungen mit einem schwachen Antikörper wurden K_D -Werte bis zu 1 mM beschrieben (Strandh *et al.*, 1998). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Affinität von Laktose an einen immobilisierten Antikörper mit einem K_D -Wert von 120 μ M sehr schwach ist (Malmqvist, 1999).

Aufgrund seiner sieben Transmembranhelices ist ein GPCR extrem hydrophob und benötigt ein hydrophobes Milieu, um seine native Konformation beizubehalten (Stenlund *et al.*, 2003). Einige Proteine können somit aufgrund ihrer Instabilität oder Unlöslichkeit nur schwer mittels SPR untersucht werden. In solchen Fällen kann ein Proteinfragment generiert werden, das die potentielle Bindestelle enthält und an Stelle des vollständigen Moleküls eingesetzt wird. Die heterologe Proteinexpression in *E. coli* eignet sich für diese Untersuchungen. Das rekombinante, mit einem ‚Tag‘ fusionierte Protein wird chromatographisch gereinigt und als Analyt oder Ligand eingesetzt. Vergleiche der kinetischen Parameter einer Interaktion mit einem Fragment, im Gegensatz zu einer Interaktion mit dem vollständigen Protein, können helfen, die Funktionsweise eines Moleküls besser zu verstehen. Eine höhere Bindungsaffinität der Fragmente im Vergleich zum gesamten Protein ist ungewöhnlich. Trotzdem wurde ein solches Beispiel in der Literatur beschrieben. Die Bindung von GRK1 (G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase, die in den Signalweg GPCR involviert ist) an Recoverin wurde mit der Bindung an verschiedene aminoternale Fragmente verglichen. Die Affinität der Fragmente überstieg in diesem Fall die Affinität des vollständigen Proteins (Levay *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu zeigten GST-Fusionsproteine von Phosducin-Fragmenten eine Bindung mit geringerer Affinität an $G_{\beta\gamma}$ als das vollständige Phosducin (Xu *et al.*, 1995). Fragmente von PDE_{α} banden PDE_{γ} (PDE_{γ} , eine cGMP Phosphodiesterase, ein Effektor der GPCR assoziierten Signalweiterleitung) mit einer 1000fach geringeren Affinität ($K_D = \text{ca. } 1 \mu\text{M}$) als der native $PDE_{\alpha\beta}$ -Komplex ($K_D = 1 \text{ nM}$) (Slepek, 2000). Für die Bindung des Neuropeptids AF9 an den Rezeptor NPR-1 (Neuropeptid Y-ähnlicher Rezeptor) aus *C. elegans* konnte mit Hilfe eines radioaktiven [$^{125}\text{I-Tyr}^0$]-AF9-Bindungsassays an Membranpräparationen transfizierter CHO-Zellen für beide Isoformen des Rezeptors eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante ermittelt werden. Der K_D -Wert lag für die Val-215-Isoform bei 59,5 pM und für die Phe-215-Isoform bei 227,2 pM (Kubiak *et al.*, 2003b). In Studien am CRF-Rezeptor - ein GPCR der Unterfamilie B aus Vertebraten - wurden die Bindungsaffinitäten nativer Neuropeptidliganden an den Rezeptor, isoliert aus dem Gehirn von Ratten bzw. aus dem Herzen von Mäusen, mit den Bindungsaffinitäten der in *E. coli* exprimierten NH_2 -Termini des Rezeptors nach Renaturierung verglichen. Mit Hilfe eines kompetitiven Bindungsexperiments mit $^{125}\text{I-Tyr}^0$ -markierten Neuropeptiden konnten die K_D -Werte der Interaktionen berechnet werden. Die K_D -Werte der Wechselwirkungen mit den renaturierten NH_2 -Termini lagen mit Werten zwischen 6,75 nM und 682 nM in allen Fällen deutlich über denen der vollständigen

Rezeptoren von 0,1 nM bis 60,9 nM. Sie zeigten demnach in allen Fällen eine geringere Affinität (Klose *et al.*, 2005).

Es ist möglich, dass die Konformation des Fusionsproteins für die Affinität der Peptide eine Rolle spielt. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Protein handelte es sich um ein heterolog exprimiertes Fusionsprotein. Aufgrund der Überexpression lag das rekombinante Protein in Form von unlöslichen Inklusionskörpern vor. Diese wurden solubilisiert und chromatographisch aufgereinigt. Eine Renaturierung erwies sich als unmöglich. Die Renaturierung von Inklusionskörpern ist besonders für komplexe, hydrophobe Proteine, Proteine mit mehreren Domänen, Oligomere oder Proteine mit vielen Disulfid-Brücken problematisch. Bei der *in vitro*-Faltung konkurrieren immer die inkorrekte Faltung und die Aggregation mit der nativen Form. Zu Aggregationen kann es durch hydrophobe Interaktionen von Faltungsintermediaten kommen. Ein weiteres Problem kann die, die Renaturierung begleitende Bildung von Disulfidbrückenbindungen sein. Mit der Zahl der Cysteinreste nimmt die Zahl der möglichen Disulfidbrückenbindungen drastisch zu und die Zahl der korrekt gefalteten Moleküle sinkt statistisch (Rudolph und Lilie, 1996). Für den Rezeptor HC110-R sagt das Computerprogramm ‚Disulfid‘ (Ceroni *et al.*, 2006) bis zu 5 Disulfidbrückenbindungen voraus. Verschiedene Studien mit in eukaryotischen und prokaryotischen Systemen exprimierten Aminotermini mit sechs Cysteinen verschiedener GPCR der Unterfamilie B, wie z.B. CRF₁, CRF_{2b}, PTH-1 und GLP-1 aus Säugetieren zeigten, dass die NH₂-Termini die Hauptbindungsstelle für Peptidliganden darstellen (Klose *et al.*, 2005). Zusätzlich scheint das spezifische Muster der Disulfidbrückenbindungen kritisch für die Interaktion zu sein (Qi *et al.*, 1997). Die Frage, ob zudem Glykosylierungen die Bindung beeinflussen, wird kontrovers diskutiert (Hofmann *et al.*, 2001; Assil und Abou-Samra, 2001; Pang *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 1999; Goke *et al.*, 1994; Unson *et al.*, 1995; Bisello *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2003). Für wichtige Mitglieder der Unterfamilie, wie den Glukagon-Rezeptor, den PTH/PTHrP-Rezeptor und das isolierte aminoternale Fragment des GLP-1-Rezeptors, konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass die Glykosylierung keinen Einfluss auf die Bindung der Liganden hat (Unson *et al.*, 1995; Bisello *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2003). Die niedrige Affinität der mittels Oberflächenplasmonresonanz detektierten Bindungen könnte somit auf den denaturierten Zustand des Fusionsproteins zurückzuführen sein. Denaturierte Proteine liegen möglicherweise in Form so genannter ‚random coils‘ vor. Diese beschreiben die Konformation von Molekülketten, deren Rückgrat zufällig im dreidimensionalen Raum angeordnet ist (Baldwin und Zimm, 2000). Ferner wäre es denkbar, dass eine hochaffine Bindung an den Rezeptor HC110-R erst durch Beteiligung eines weiteren Teils des Rezeptors möglich ist. Studien mit Rezeptoren der Unterfamilie B weisen darauf hin, dass die Bindungsstelle der Peptidliganden diskontinuierlich ist und aus Kontaktpunkten des NH₂-terminalen Teils und der drei extrazellulären Schleifenregionen besteht (Kristiansen, 2004). Alle Mitglieder dieser Gruppe besitzen in ihrer ersten extrazellulären Schleifenregion nahe der zweiten Transmembrandomäne einen hochkonservierten Asparaginsäurerest. In der Position davor befindet sich meist eine konservierte basische Aminosäure. Es konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um Schlüsselaminosäuren in der Ligandenbindung und der Rezeptoraktivierung handelt (Langer *et al.*, 2003). Bei Interaktionen mit Peptidliganden wird

davon ausgegangen, dass bis zu sieben der aminoterminalen Aminosäurereste der Liganden zwischen den sieben Transmembrandomänen zu liegen kommen, und der übrige Teil des Liganden mit dem NH₂-Terminus und den extrazellulären Schleifenregionen interagiert. Ein Modell besagt, dass der carboxyterminale Bereich des Peptidliganden mit niedriger Affinität mit der Hormonbindungsdomäne des Rezeptors interagiert, wodurch die Bindungsenergie für die Interaktion des aminoterminalen Teils des Liganden an die Transmembrandomänen entsteht und der Rezeptor aktiviert wird (Unson, 2002). Untersuchungen der Bindung des artifiziellen Liganden α -LTX an Latrophilin aus Säugetieren mit löslichen, heterolog in COS-7-Zellen exprimierten, aminoterminalen Teilen des Rezeptors ergaben, dass diese in Messungen mit radioaktivem ¹²⁵I- α -LTX eine geringere Affinität zu α -LTX zeigten als der endogene Rezeptor. Die Affinität der p120 Untereinheit des Latrophilins lag mit 25 nM unter der Affinität des gesamten Rezeptors ($K_D \sim 2,5$ nM). Die Untersuchungen zeigten, dass die Aminosäuren 467 bis 891 für die Bindung essentiell zu sein scheinen. Diese Region beinhaltet die erste Transmembrandomäne der p85-Untereinheit und die C-terminale Hälfte der p120-Untereinheit des Rezeptors, einschließlich der 4-Cystein Region. Durch Versuche mit der löslichen p120-Untereinheit, konnte eine α -LTX-Bindung mit geringer Affinität an die Aminosäuren-Region 467 bis 770 nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die p85-Untereinheit für die Stabilisierung des α -LTX-p120-Komplexes von Bedeutung zu sein scheint. Eine Beteiligung der extrazellulären Schleifenregionen konnte in diesem Fall ausgeschlossen werden. Der Bindevorgang könnte somit aus zwei Schritten bestehen. Im ersten Schritt bindet α -LTX mit mäßiger Affinität an den extrazellulären Teil des Rezeptors. In einem zweiten Schritt erfolgt dann eine Wechselwirkung mit der ersten Transmembrandomäne und/oder den Membran-Lipiden, wodurch es zu einer Insertion in die Membran kommt. Die Affinität der Bindung wird so noch einmal erhöht (Krasnoperov *et al.* 1999). Für den PTH₁-Rezeptor konnte ebenso gezeigt werden, dass der Aminoterminus des Liganden PTH (parathyreoides Hormon) mit der sechsten Transmembrandomäne und zusätzlich mit einer Aminosäure am Übergang zwischen aminoterminalen Teil und erster Transmembrandomäne interagiert. Zudem bindet er an die erste extrazelluläre Schleifenregion (Unison, 2002). Für den nativen Liganden Urocortin 1 des CRF-Rezeptors aus Vertebraten konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Bindung zum einen an eine Bindungsstelle des NH₂-Terminus, zum anderen an eine Bindungsstelle nahe der Membran erfolgt (Klose *et al.*, 2005).

Bei dem für die hier vorgestellten Bindungsstudien eingesetzten SPR-Messgerät liegt die Detektionsgrenze für Analyten, in Abhängigkeit von der Substanz, bei einem Molekulargewicht von 1000 Da. Schwache Interaktionen mit Analyten eines Molekulargewichts <1000 Da erfordern ein experimentelles Design mit hohen Liganden- und Analytenkonzentrationen, damit ausreichende Antwortgrößen erreicht werden können. Nachteilig wirken sich hohe Analytenkonzentrationen jedoch auf den Puffereffekt aus, der im Verhältnis zur Antwortgröße bedeutend wird (Strandh *et al.*, 1998). Aus diesem Grund lag der Ligandenbindungslevel bei allen hier durchgeführten Messungen bei mindestens 1000 RU, in den meisten Fällen jedoch zwischen 3000 und 14000 RU. Die eingesetzten Analytenkonzentrationen lagen im hohen nanomolaren bis mikromolaren Bereich und waren

somit ebenfalls sehr hoch. Der Puffereffekt lag bei einer Analytenkonzentration von 400 μM in einem Bereich von 1000 bis 1500 RU. Eine Reduzierung des Puffereffektes war nicht möglich. Zudem erfolgte die Kontrollmessung für jede Probe zeitlich versetzt, da es in einem ‚Biacore 1000‘ nicht möglich ist, eine Probe sukzessive über zwei Flusszellen zu leiten. Dadurch ergab sich häufig eine Differenz im Puffereffekt zu den Referenzmessungen und erschwerte stark die Auswertung. Dennoch gelang es in der hier vorgestellten Studie, die Methode der Oberflächenplasmonresonanz für die gegebene Fragestellung zu etablieren und reproduzierbare Bindungen einer Reihe von Neuropeptiden an den aminoterminalen Teil des Rezeptors HC110-R zu detektieren. Es gelang, Analyten mit einem Molekulargewicht an der Detektionsgrenze des Messgerätes auf Unterschiede in ihrem Bindungsverhalten hin zu untersuchen, in einigen Fällen Bindungsmodelle anzupassen und somit Kinetik und Affinität der gemessenen Bindungen zu bestimmen. Es konnte mittels der vorgestellten Messungen erfolgreich gezeigt werden, dass es sich bei den hier gemessenen Bindungen um spezifische Interaktionen der Neuropeptide mit dem Rezeptor HC110-R handelt und nicht um hydrophobe Interaktionen. Die Bindungen scheinen alleine auf die Aminosäuresequenz der Peptide zurückzuführen zu sein. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass der Rezeptor HC110-R in der Lage sein könnte, *in vivo* Neuropeptide verschiedener *flp*-Gene zu binden. Dies wäre vergleichbar mit den Ergebnissen einer Studie des Neuropeptid-Rezeptors Y59H11AL.1 aus *C. elegans*, für den gezeigt werden konnte, dass er von Peptiden der Gene *flp-1*, *flp-7*, *flp-9*, *flp-11*, *flp-13* und *flp-22* aktiviert werden kann. Insgesamt zeigten 15 der ca. 40 getesteten Peptide eine konzentrationsabhängige Aktivierung des Rezeptors. Die Aminosäuresequenz dieser Neuropeptide unterscheidet sich zum Teil sehr voneinander. Es ist nicht möglich, eine ‚Kernsequenz‘ zu identifizieren, die alle Peptide teilen. Es wäre aber denkbar, dass der Rezeptor mehr als eine Bindungsstelle für die unterschiedlichen Peptide aufweist (Mertens *et al.*, 2006). Auch die in dieser Arbeit analysierten Neuropeptide zeigen zum Teil große Unterschiede in der Aminosäuresequenz. Für das Verständnis der Hintergründe dieser Ergebnisse, sind jedoch vollständige funktionelle und pharmakologische Analysen notwendig. Neuropeptide und ihre Rezeptoren sind in Nematoden bis *dato* nur unzureichend verstanden.

4.1.2 Neuropeptide und die α -LTX-induzierte HC110-R-vermittelte Ca^{2+} -Signaltransduktion

Nach erfolgreichem Nachweis der Bindung verschiedener Neuropeptide aus *C. elegans* an das 54 kDa große, aminoterminaler Fusionsprotein von HC110-R in einem *in vitro*-Detektionssystem sollte die Funktionalität der Neuropeptide untersucht werden. Verwendet wurde eine stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierte Zelllinie, die den gesamten Rezeptor, fusioniert mit einem carboxyterminalem Myc-, ‚Tag‘ und einem 6 \times His-, ‚Tag‘, exprimiert. Zu diesem Zweck wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht, ob eines der Neuropeptide in der Lage ist, den Rezeptor HC110-R zu aktivieren und den Ca^{2+} -Haushalt in der Zelle zu verändern. Ferner wurden alle Neuropeptide auf eine Funktion als Modulatoren der α -LTX-induzierten, HC110-R-vermittelten Signalweiterleitung oder als Antagonisten des Neurotoxins analysiert.

Ca^{2+} spielt eine Schlüsselrolle als intrazellulärer, sekundärer Botenstoff und ist verantwortlich für die Regulation einer Vielzahl zellulärer Funktionen (Tiruppathi *et al.*, 2003). Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spielen eine wesentliche Rolle in den Signalwegen vieler Liganden und in der Induktion von Zelldifferenzierungen (Roe *et al.*, 1990). Für die Regulation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, und somit einer Fülle an Signalen, besitzt die Zelle eine Vielzahl von Mechanismen. An diesen Mechanismen sind viele GPCR beteiligt. Meist aktivieren diese PLC (Phospholipase C)-Enzyme und induzieren auf diese Weise die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und/oder den Einstrom von Ca^{2+} über die Membran (Werry *et al.*, 2003). Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ liegt für Zellen im Grundzustand bei Konzentrationen unter 100 nM. Ein Teil des Ca^{2+} befindet sich sequestriert in Kompartimenten, wie beispielsweise dem ER oder dem SR. Ferner liegt es in gebundener Form an intrazellulären, Ca^{2+} -bindenden Proteinen vor. Ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über einen elektrochemischen Gradienten erfolgt über selektiv geöffnete Ca^{2+} -Kanäle. Ca^{2+} -Kanäle werden zum einen über G-Protein-gekoppelte Kanäle oder spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle des T- (transiente), N- (neuronal) oder L-Typs (lang anhaltende Ströme mit langsamer Inaktivierung) gesteuert, zum anderen über intrazellulär aktivierbare Ca^{2+} -Kanäle (Nowycky *et al.*, 1985; Brown, 1991).

Latrophiline binden α -LTX mit hoher Affinität (Lelianova *et al.*, 1997). Neuroendokrine, bovine chromaffine Nebennierenmarkszellen besitzen einen endogenen natürlichen Latrophilin-Rezeptor (Kobayashi *et al.*, 1986; Krasnoperov *et al.*, 1997; Bittner *et al.*, 1998). Lat-1 oder ein nah verwandtes Protein konnte in Western Blot-Experimenten nachgewiesen werden (Bittner und Holz, 2000). Schon eine Konzentration von 75 pM α -LTX führte in chromaffinen Zellen zu einem messbaren Einstrom von radioaktiv markiertem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Bittner *et al.*, 1998). Transient mit Latrophilin transfizierte, bovine chromaffine Zellen zeigten eine 10fach erhöhte Sensitivität hinsichtlich der α -LTX-stimulierten Sekretion (Bittner *et al.*, 1998; Krasnoperov *et al.*, 1999). Fluoreszenzmessungen einzelner Fura-2 beladener chromaffiner Zellen in einem Ca^{2+} -Imaging'-System zeigten, dass schon 26 pM in transient mit Latrophilin transfizierten Zellen eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 296 ± 44 nM induzierten. Nicht transfizierte chromaffine Zellen führten erst bei einer Konzentration von 260 pM α -LTX zu einer durchschnittlichen Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 395 ± 204 nM. Bei mit Latrophilin transfizierten Zellen betrug diese, bei einer Konzentration von 260 pM α -LTX, 766 ± 121 nM Ca^{2+} (Bittner *et al.*, 1998). In beiden Fällen erfolgte der extrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom mit einer Verzögerung von etwas 1 bis 4 min. In einem radioaktiven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme-, Assay' wurden nicht transfizierte oder mit Latrophilin transfizierte HEK-293-Zellen mit 250 pM oder 1 nM α -LTX stimuliert. Nur in transfizierten Zellen induzierte α -LTX eine Ca^{2+} -Aufnahme mit resultierender Sekretion (Bittner *et al.*, 1998). Wurden HEK-293-Zellen mit Latrophilin-1 transfiziert, so reichte eine Konzentration von 50 pM für eine Ca^{2+} -Freisetzung aus (Ichtchenko *et al.*, 1999; Krasnoperov *et al.*, 1999; Hlubek *et al.*, 2000). 50 nM α -LTX führte in Fura-2 beladenen, transient transfizierten HEK-293-Zellen im Ca^{2+} -Imaging' zu einem schnellen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ innerhalb von 100 sec nach Zugabe, welche dann auf einem Plateau blieb (Hlubek *et al.*, 2000). HIT-T15-Zellen (pankreatische β -Zellen) sind unempfindlich gegen α -LTX und exprimieren Latrophilin nur in vernachlässigbarer Menge.

In transient mit Latrophilin transfizierten HIT-T15-Zellen konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass α -LTX zuerst die Repolarisierung spannungsabhängiger K^+ -Kanälen inhibiert, auf diese Weise eine Membrandepolarisation induziert und danach durch Porenbildung die $[Ca^{2+}]_i$ erhöht. Die Poren konnten als Kanäle des L-Typs identifiziert werden (Lajus *et al.*, 2006).

α -LTX bindet ebenfalls den Latrophilin-ähnlichen Rezeptor HC110-R und induziert eine HC110-R-vermittelte Ca^{2+} -Antwort in transient oder stabil transfizierten eukaryotischen Zellen. Transient mit HC110-R-GFP transfizierte HEK-293-Zellen zeigten in einem Ca^{2+} -Imaging-System nach α -LTX-Stimulation eine funktionale Antwort. 75 nM α -LTX führten nach 2 min zu einer ersten kleinen Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um etwa $5 \pm 0,2$ nM, gefolgt von einer großen Erhöhung um $220 \pm 14,9$ nM nach 22 min. Wildtypische Kontrollzellen zeigten in diesem System keine Ca^{2+} -Antwort. Transient mit dem β_2 -adrenergen Rezeptor aus der Maus oder dem humanen M1-Rezeptor (muscariner Acetylcholinrezeptor) transfizierte Zellen fungierten zudem als Kontrolle und bestätigten, dass es sich um eine spezifische HC110-R-vermittelte Antwort der Zellen handelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in erster Linie auf einen Einstrom extrazellulären Ca^{2+} zurückzuführen ist. Nur ein geringer Teil kam durch Ausschüttung intrazellulärer Speicher zustande. Ferner konnte gezeigt werden, dass der Ca^{2+} -Einstrom nicht auf einfache Diffusion, sondern auf Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran zurückzuführen ist. Der Ca^{2+} -Influx konnte fast vollständig mit $10 \mu M$ Cd^{2+} blockiert werden. Die Zugabe von Nifedipin identifizierte sie zudem größtenteils als Kanäle vom L-Typ (Saeger *et al.*, 2001). Eine stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierte HEK-293-Zelllinie zeigte dagegen einen deutlichen Unterschied hinsichtlich ihrer Reaktion auf die Stimulation mit α -LTX. Im Gegensatz zu der dualen Antwort in transient mit HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen, führte die Zugabe des Neurotoxins bei den stabil transfizierten Zellen unmittelbar nach Stimulation zu einem schnellen und hohen Ca^{2+} -Anstieg. Dieser erreichte erst nach etwa 25 min wieder sein Ausgangsniveau. 25 nM α -LTX führten in stabil transfizierten Zellen zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um 106 ± 38 nM, 75 nM α -LTX zu einem Ca^{2+} -Anstieg von 267 ± 46 nM. Stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierte HEK-293-Zellen in Suspension reagierten in einem Fluoreszenzspektrometer auf eine Stimulation mit 750 pM α -LTX, 2 min nach Zugabe, mit einer Ca^{2+} -Antwort von 440 nM. Anders als beim Ca^{2+} -Imaging war dieses Signal nicht kompensierbar, das heißt, es erreichte auch nach 30 min nicht wieder den Ausgangswert, sondern blieb auf einem Plateau (Bartl, 2001).

Für die heterologe Expression von GPCR in eukaryotischen Zellen und für physiologische Studien der Signaltransduktion erwiesen sich insbesondere die humane, embryonale Nieren-Zelllinie HEK-293 und die Nieren-Zelllinie COS-7 aus Affen als geeignet (Lutz *et al.*, 1993; Schipani *et al.*, 1993; Reagan, 1994). Transiente Transfektionen von Latrophilin-Konstrukten wurden bereits, sowohl in HEK-293- und chromaffinen Zellen (Bittner *et al.*, 1998; Hlubek *et al.*, 2000) als auch in COS-7-Zellen (Leliana *et al.*, 1997; Ichtchenko *et al.*, 1999), durchgeführt und erwiesen sich als funktional. Ferner ist von den HEK-293-Zellen bekannt, dass sie im Gegensatz zu chromaffinen Zellen keinen endogenen Latrophilin-Rezeptor

besitzen (Bittner *et al.*, 1998). Die im obigen Abschnitt vorgestellte, stabil mit HC110-RMyc/6×His transfizierte HEK-293-Zelllinie stellt somit ein etabliertes, funktionales System zur Messung von Effekten auf die $[Ca^{2+}]_i$ durch potentielle Liganden des Rezeptors, dar. Der artifizielle Ligand α -LTX fungiert in diesem System als Kontrolle der Funktionalität der Zellpräparationen. Wildtypische HEK-293-Zellen dienten in den beschriebenen Messserien als Referenz. Auch diese Zellen zeigten jedoch auf die Zugabe von 200 pM α -LTX eine Ca^{2+} -Reaktion. Von diesem Phänomen wurde schon früher berichtet (Gombert, 2002). In der Literatur konnte zudem beobachtet werden, dass Konzentrationen >50 pM in wildtypischen HEK-293-Zellen einen geringen Einstrom von radioaktivem $^{45}Ca^{2+}$ bewirken. Erklärt werden könnte diese Zunahme der Ca^{2+} -Permeabilität mit einem endogenen Zellprotein der HEK-293-Zellen, da sie durch Präinkubation der Zellen mit Concanavalin A vollständig blockiert werden konnte (Krasnoperov *et al.*, 1999). Ebenso wurde von einer Kanalbildung wildtypischer HEK-293-Zellen in ‚Patch-Clamp‘-Experimenten bei Konzentrationen von 500 pM α -LTX berichtet. Ein Antikörper gegen Latrophilin konnte in wildtypischen HEK-293-Zellen keinen Rezeptor detektieren. Dennoch wäre es denkbar, dass es zu einer Interaktion des Toxins mit einem endogenen Rezeptor kommt, der in sehr geringer Anzahl vorliegt und/oder das Toxin nur mit geringer Affinität bindet (Hlubek *et al.*, 2000). Evaluierungen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen ergaben jedoch, dass die α -LTX-Antwort der wildtypischen Zellen durchschnittlich um 64 % unter der Antwort der mit HC110-R transfizierten Zellen lag. Die HC110-R-spezifische Komponente der Antwort war somit deutlich zu erkennen. α -LTX-stimulierte, HC110-R-vermittelte Ca^{2+} -Antworten traten innerhalb der ersten 100 sec nach Zugabe des Toxins mit einer schnellen Erhöhung $[Ca^{2+}]_i$ um 219 ± 14 nM auf. Die Antwort erreichte ein Plateau und sank innerhalb einer Messzeit von 10 bis 15 min nicht wieder auf das Niveau der Basislinie ab. Nach Einstrom des Ca^{2+} setzen normalerweise Prozesse ein, welche den Ruhezustand der Zelle wieder herbeiführen. Ca^{2+} wird über Ca^{2+} -Pumpen, wie beispielsweise dem Na^+ / Ca^{2+} -Austauscher oder den Ca^{2+} -ATPasen (PMCA), aus der Zelle oder über SR/ER Ca^{2+} -ATPasen (SERCA) in die intrazellulären Kompartimente zurückgeschleust (Krauss, 1997). Ferner können Ca^{2+} -bindende Proteine, wie Parvalbumin, Calretinin, Calsequestrin, Calreticulin und Calbindin, die Konzentration des freien Ca^{2+} senken (Neher und Augustine, 1992). In der Literatur wurde jedoch ebenfalls von Einzelzellmessungen Fura-2-beladener, transient mit Latrophilin transfizierter HEK-293-Zellen berichtet, die mit 50 nM α -LTX innerhalb von 100 sec nach Stimulation zu einem schnellen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führten. Die $[Ca^{2+}]_i$ blieb auf einem Plateau (Hlubek *et al.*, 2000). Die Form dieses Signals entsprach somit den hier vorgestellten Ergebnissen mit stabil HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen. Es wird somit deutlich, dass die Irreversibilität der Antwort nicht auf das Messsystem zurückzuführen sein kann. Während in der vorliegenden Studie die durchschnittliche Ca^{2+} -Antwort von etwa 1×10^6 -Zellen betrachtet wurde, wird in den Untersuchungen von Hlubek *et al.* (2000) von Einzelzellmessungen berichtet. Kontrollversuche mit ATP zeigten, dass die Zellen auch 10 min nach Stimulation mit α -LTX noch ein normales Reaktionsverhalten zeigten.

Durch Stimulation der stabil mit HC110-R-Myc/6×His transfizierten HEK-293-Zellen mit einer Reihe von Neuropeptiden aus *C. elegans* konnte in einer Messserie gezeigt werden, dass keines der Neuropeptide in der Lage ist, in dem hier vorliegenden System eine spezifische Ca^{2+} -Antwort zu induzieren. Die Zugabe der Neuropeptide erfolgte jeweils in einer Konzentration von 20 μM . Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden über einen Zeitraum von 5 min beobachtet, bevor die Funktionalität der Zellen durch die Zugabe von 200 pM α -LTX überprüft wurde. In der Literatur wurde von Experimenten mit einer Reihe von GPCR berichtet, mit deren Hilfe Rezeptoren für Neuropeptide identifiziert werden konnten. Kotransfektion des Rezeptors C10C6.2 (ein Neuropeptid Y-ähnlicher Rezeptor aus *C. elegans*) mit G-Proteinen ($G_{\alpha q50}$, $G_{\alpha q51-2}$, $G_{\alpha q5s}$ oder $G_{\alpha q5z}$) in CHO-Zellen zeigte, dass nur Zellen mit dem Rezeptor und dem G-Protein $G_{\alpha q51-2}$ aktiviert werden konnten. Als native Liganden wurden auf diese Weise die Peptide des Gens *flp-15* identifiziert. Der EC_{50} -Wert dieser Peptide liegt bei 2,4 μM (Kubiak *et al.*, 2003a). Ebenfalls konnten die Neuropeptid-Liganden für die Rezeptoren C26F1.6, T19F4.1a/b und Y59H11AL.1 (Tachikinin-ähnlicher Rezeptor) zugeordnet werden. Die Ca^{2+} -Antworten transient transfizierter HEK-293-Zellen, kotransfiziert mit dem G-Protein $G_{\alpha 16}$, traten innerhalb von 2 min nach Zugabe des Neuropeptids auf. EC_{50} -Werte der *flp-7*-Peptide und des Flp-11-Peptids lagen für den Rezeptor C26F1.6 im Bereich zwischen 1 und 2 μM (Mertens *et al.*, 2004). Transient und stabil mit T19F4.1a bzw. T19F4.1b transfizierte CHO-Zellen (exprimierten zusätzlich stabil das humane G-Protein $G_{\alpha 16}$) konnten mit den Neuropeptiden des Gens *flp-2* aktiviert werden. Die EC_{50} -Werte betragen 53,1 nM respektive 54,4 nM (Mertens *et al.*, 2005). Transient Y59H11AL.1 transfizierte HEK-293-Zellen, kotransfiziert mit dem G-Protein $G_{\alpha 16}$, konnten mit Peptiden der Gene *flp-1*, *flp-7*, *flp-9*, *flp-11*, *flp-13* und *flp-22* aktiviert werden. Ein Peptid des Gens *flp-7* war besonders potent und besaß einen EC_{50} -Wert von 1,1 μM . Für die anderen Peptide lag der Schwellenwert für eine Aktivierung bei mindestens 100 nM und es war nicht möglich, EC_{50} -Werte zu bestimmen (Mertens *et al.*, 2006). In allen berichteten Fällen erfolgte die Ca^{2+} -Antwort in einem Zeitraum von 2 min nach Zugabe der stimulierenden Substanz. Über die Form des Signals wurde in keinem der Fälle Auskunft gegeben. Eine Messzeit von 5 min scheint hinsichtlich der in der Literatur angegebenen Messzeiten und der Reaktionszeit des Systems auf α -LTX ausreichend zu sein. Die EC_{50} -Werte der aktivierenden Neuropeptide lagen in vielen Fällen im mikromolaren Bereich. Zusätzlich wurde in einigen Fällen sogar von Mindestkonzentrationen im mikromolaren Bereich berichtet. Aus diesem Grund wurde die Konzentration für die auf eine aktivierende Wirkung des Rezeptors HC110-R untersuchten Neuropeptide mit 20 μM sehr hoch gewählt. Sie lag im Vergleich zu der für eine Aktivierung notwendigen α -LTX-Konzentration mindestens 1×10^5 fach höher. Beim Vergleich der Angaben aus der Literatur, in denen EC_{50} -Werte bestimmt wurden, wird jedoch deutlich, dass es sich bei α -LTX um einen sehr potenten Agonisten handeln muss. α -LTX-sensitive pankreatische β -Zellen aus Ratten zeigten in Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit Fura-2 eine dosisabhängige Antwort. Die EC_{50} -Konzentration betrug in diesen Experimenten etwa 0,16 nM. Der maximale Effekt wurde bei einer Konzentration von 3 nM erreicht (Liu *et al.*, 2005). Bei der Beurteilung dieser Werte sollte jedoch in Betracht gezogen werden, dass in den aus primären pankreatischen β -Zellen gewonnenen Zelllinien INS-1 und MIN-6 in Northern Blot-

Experimenten sowohl Latrophilin als auch Neurexin nachgewiesen werden konnten (Lang *et al.*, 1998). In MIN-6-Zellen konnte zudem im Western Blot gezeigt werden, dass diese Zellen auch den dritten α -LTX-Rezeptor PTP- σ exprimieren (Lajus und Lang, 2006). Die Werte sind also nicht nur auf eine Latrophilin-vermittelte Antwort zurückzuführen, sondern zusätzlich auf einen Effekt der α -LTX-bindenden Rezeptoren Neurexin und PTP- σ . Ferner konnte festgestellt werden, dass in β -Zellen eine 10 bis 15fach höhere α -LTX-Konzentration als in Neuronen benötigt wurde, um eine Exocytose hervorzurufen. Dies weist auf eine niedrigere Affinität der Toxin-Rezeptoren in β -Zellen hin. Es kann sich beispielsweise um Lat-2 handeln, für den eine geringere Affinität zu α -LTX als für Lat-1 nachgewiesen wurde (Ichtchenko *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2005). Dennoch zeigt dieser Wert, in welcher Größenordnung der EC_{50} -Wert für den Agonisten α -LTX zu liegen scheint. Vergleiche mit Neuropeptidrezeptor-Interaktionen in *C. elegans* zeigen deutlich, dass die aktivierenden Konzentrationen dieser in einem hohen nano- bzw. mikromolaren Bereich liegen und weisen darauf hin, dass Neuropeptide in Nematoden in relativ hoher Konzentration wirksam sind. Bioaktivitätsmessungen verschiedener FLP an pharyngealen Präparationen von *C. elegans* scheinen diese Ergebnisse zu bestätigen. Die aktiven Konzentrationen lagen für die verschiedenen Peptide zwischen 100 nM und 1 μ M. EC_{50} -Werte wurden für die potentesten Peptide bestimmt. Für FLP-17A lag dieser bei 189 nM, für FLP-17B bei 126 nM und für FLP-11A bei 105 nM (Papaioannou *et al.*, 2005).

Ferner wurde untersucht, ob die getesteten Neuropeptide in der Lage sind, eine durch α -LTX-stimulierte, HC110-R-vermittelte Ca^{2+} -Antwort zu modulieren. Die Neuropeptide wurden in einer Konzentration von 100 nM respektive 20 μ M auf einen Effekt hin untersucht.

Das Anthelminthikum Emodepsid konnte mittels Ca^{2+} -Messungen als Modulator der α -LTX induzierten Ca^{2+} -Antwort identifiziert werden. In transient mit HC110-R-GFP transfizierten HEK-293-Zellen führte Emodepsid in einem Ca^{2+} -„Imaging“-System in Konzentrationen bis zu 400 ng/ml (\sim 400 nM) zu keiner Ca^{2+} -Antwort. Auch eine vorherige Inkubation der Zellen mit der Substanz stimulierten keine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Emodepsid war jedoch in der Lage, die α -LTX-Signalgebung der transient transfizierten Zellen zu modulieren. In Gegenwart von 4 ng/ml (\sim 4 nM) Emodepsid kam es, im Gegensatz zu der normalen, dualen Antwort, nach 14 min zu einer verringerten Ca^{2+} -Antwort von $44 \pm 6,0$ nM. 75 nM α -LTX induzierte ohne Emodepsid nach 2 min eine kleine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um etwa $5 \pm 0,2$ nM, gefolgt von einer großen Erhöhung von $220 \pm 14,9$ nM nach 22 min. Eine Erhöhung der Emodepsid-Konzentration auf 400 ng/ml führte zu keiner weiteren Verringerung der α -LTX induzierten Ca^{2+} -Antwort (Saeger *et al.*, 2001). Emodepsid konnte auf diese Weise als Antagonist des Rezeptors identifiziert werden. Als Agonisten werden Liganden bezeichnet, die an einen Rezeptor binden, den Zustand dieses Rezeptors verändern und eine biologische Antwort induzieren. Konventionelle Agonisten verstärken die Aktivität eines Rezeptors. Vollagonisten stimulieren ein System, so dass die maximale Kapazität dieses Systems erreicht wird. Partielle Agonisten hingegen erreichen nicht die maximale Antwortkapazität. Die Bezeichnungen sind systemabhängig. Inverse Agonisten reduzieren die konstitutive, biologische Antwort. Ein nicht endogener Agonist kann an der gleichen, primären (orthosterischen) Bindungsstelle

angreifen wie ein endogener Agonist, oder an eine andere, allosterischen (allotropischen) Bindungsstelle eines Rezeptors binden. Ein Antagonist verringert die Antwort eines Agonisten. Viele Antagonisten wirken auf dasselbe Rezeptormakromolekül wie der Agonist ein. Bei einem kompetitiven Antagonismus schließen sich die Bindung von Agonist und Antagonist gegenseitig aus. Entweder konkurrieren beide Moleküle um dieselbe Bindungsstelle oder ihre Bindungsstellen liegen nah beieinander bzw. überlappen und es kommt zu einer synoptischen Interaktion. Eine dritte Möglichkeit wäre, dass zwar unterschiedliche Bindungsstellen involviert sind, aber das Rezeptormolekül in einer Weise beeinflusst wird, die eine gemeinsame Bindung unmöglich macht. Ein allosterischer (allotropischer) Modulator ist ein Ligand, der die Wirkung eines primären (orthosterischen) Agonisten oder Antagonisten durch Bindung an eine andere, allosterische (allotropische) Bindungsstelle des Makromoleküls verstärkt oder verringert (Jacoby *et al.*, 2006).

In Untersuchungen an dem hier beschriebenen Messsystem konnte gezeigt werden, dass keines der untersuchten Neuropeptide eine modulierende Aktivität auf die HC110-R vermittelte Ca^{2+} -Antwort aufweist. Weder in der Konzentration von 100 nM noch in einer deutlich höheren Konzentration von 20 μM wurde die Antwort des Agonisten α -LTX signifikant modifiziert. Durch vorherige Zugabe der Peptide änderte sich weder die Höhe des Ca^{2+} -Signals noch sein Beginn oder Verlauf. Dies kann auf diverse Weisen begründet werden. Es könnte sein, dass geringe Effekte in dem hier verwendeten Messsystem nicht detektierbar sind. Die Standardabweichung der Messungen ist hoch und zeigt eine große relative Schwankung der Antwortgrößen an. Geringe Effekte können somit nur schwer identifiziert werden. Diese Schwankungen scheinen jedoch charakteristisch für Systeme zu sein, die Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufzeichnen. Fluoreszenzmessungen chromaffiner Zellen in einem Ca^{2+} -Imaging'-System zeigten Standardabweichungen von bis zu 50 % (Bittner *et al.*, 1998). Emodepsid konnte in erster Linie aufgrund des veränderten Antwortverlaufs des LTX-Signals als Antagonist des Rezeptors identifiziert werden, denn die Standardabweichung lag auch hier bei bis zu 14 %. Weitere Antagonisten wurden bisher weder für die Latrophiline noch für die Latrophilin-ähnlichen Rezeptoren beschrieben. Auch für Rezeptoren von Neuropeptiden in Nematoden wurde bis *dato* noch von keinen Antagonisten oder Modulatoren berichtet. Der Rezeptor NPR-1 aus *C. elegans*, homolog zu der Familie der Neuropeptid Y-Rezeptoren aus Vertebraten, konnte als Rezeptor des Neuropeptids AF9 identifiziert werden. Das Neuropeptid Y wurde auf eine antagonistische Aktivität untersucht. Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden (Kubiak *et al.*, 2003b).

Ca^{2+} -Messungen mit Fluoreszenzindikatoren erwiesen sich für die Identifizierung aktivierender Liganden von Neuropeptid-Rezeptoren aus *C. elegans* nicht in allen Fällen als geeignet. Der Agonist des Rezeptors NPR-1 wurde mit Hilfe eines radioaktiven Bindungsassays mit $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ identifiziert. Es gelang mit dieser Methode, EC_{50} -Werte der Interaktion zu berechnen. Versuche zur Mobilisierung des intrazellulären Ca^{2+} durch den Agonisten AF9 führten jedoch zu keinem Ergebnis. Eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Stimulation mit AF9 konnte nicht nachgewiesen werden; es gelang somit nicht, mit transient transfizierten CHO-Zellen ein funktionsfähiges System zur Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu

etablieren (Kubiak *et al.*, 2003b). Problematisch schien für die Etablierung vor allem die Identifizierung des G-Proteins zu sein, welches für die Vermittlung des Signals verantwortlich ist. Transient C10C6.2 (ein Neuropeptid Y-ähnlicher Rezeptor aus *C. elegans*) transfizierte CHO-Zellen waren nur mit Kotransfektion des G-Proteins $G\alpha_{q51-2}$ funktionsfähig, so dass eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mittels eines Fluoreszenzindikators gemessen werden konnte (Kubiak *et al.*, 2003a). Für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete System kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass die Kotransfektion eines G-Proteins für eine erfolgreiche Aktivierung des Rezeptors durch einen Neuropeptid-Liganden notwendig ist.

Weiterhin ließen sich manche Neuropeptid-Rezeptoren zwar in eukaryotischen Zellen exprimieren, zeigten jedoch nach Stimulation eines Liganden nur eine Aktivität, wenn die Inkubationstemperatur 24 h vor der Messung auf 28 °C gesetzt wurde. Das Temperaturoptimum des frei lebenden Nematoden *C. elegans* liegt mit 15 °C bis 19°C sehr niedrig. Bei heterolog exprimierten *C. elegans*-Rezeptoren kommt es bei einer Temperatur von 37 °C wahrscheinlich zu einer Fehlfaltung und Aggregation des Rezeptors (Kubiak *et al.*, 2003a, 2003b). Eine Fehlfaltung oder Aggregation des Rezeptors HC110-R lässt sich jedoch ausschließen, da die hier verwendete stabil transfizierte HEK-293-Zelllinie eine α -LTX-stimulierte HC110-R-vermittelte Signalweiterleitung zeigte. Der Nematode *H. contortus* lebt als Parasit im Labmagen von Wiederkäuern und somit bei einer Temperatur, die der Körpertemperatur der Säugetiere entspricht. Eine Expression in eukaryotischen Zellen bei 37 °C dürfte erwartungsgemäß keine Probleme mit sich bringen.

4.2 Wechselwirkungen von *C. elegans*-Proteinen mit HC110-R

Gesamtproteinextrakt des frei lebenden Nematoden *C. elegans* wurde für die Suche nach nativen Liganden des Rezeptors HC110-R eingesetzt. Potentielle Kandidaten wurden isoliert und mit Hilfe massenspektroskopischer Analysen identifiziert. Grundlage für dieses Experiment war die heterologe Proteinexpression verschieden großer Fragmente des Rezeptors in *E. coli* und deren chromatographische Aufreinigung. Fusionsproteine des NH₂-Terminus dienten der Identifizierung potentieller Liganden des Rezeptors; ein C-terminales Fusionsprotein fungierte als Kontrolle.

Die Verwendung des frei lebenden Nematoden *C. elegans* bot gegenüber des parasitischen Organismus *H. contortus* einige Vorteile. Zwischen dem Latrophilin-ähnlichen Rezeptor HC110-R und den orthologen Proteinen Lat-1 und Lat-2 aus *C. elegans* besteht eine große Sequenzidentität. Diese beträgt zu dem Protein Lat-1A 47 %. Das *C. elegans*-Genomprojekt wurde als erstes Projekt eines multizellulären Organismus im Jahr 1998 abgeschlossen (‘The *C. elegans* Sequencing Consortium’, 1998). In *C. elegans* konnten nach vollständiger Sequenzierung mehr als 19000 Gene identifiziert werden. Mehr als 40 % der vorhergesagten Proteine sind homolog zu Proteinen anderer Organismen. Die vollständigen Datenbanken erlauben, schnell und einfach jedes identifizierte Protein durch Sequenzvergleiche zuzuordnen und auf bestehende Informationen zurückzugreifen. Für *H. contortus* fehlt diese Möglichkeit bis *dato* und ein ‘Screening’ nach potentiellen Bindungspartnern wäre in dieser Form nicht

möglich. Weiterhin besitzt der Modellorganismus *C. elegans* einen schnellen Lebenszyklus von nur 3 ½ Tagen, eine geringe Größe und ist im Labor leicht zu kultivieren.

Für die hier vorgestellte Studie wurde die lösliche Proteinfraction eines Extraktes aus *C. elegans* auf HC110-R-bindende Proteine oder Peptide hin untersucht. In Bindungsexperimenten an Nitrozellulosemembranen mit den Fusionsproteinen des Klons pASK44-HCΔ22-535 und pRSET- HCΔ1-445 konnte, sowohl bei der eindimensionalen Auftrennung als auch bei der zweidimensionalen Auftrennung der Proteine, eine Bindung der Fusionsproteine an *C. elegans*-Proteine nachgewiesen werden. Drei Protein-„Spots“ der 2D-Bindungsexperimente wurden massenspektroskopisch analysiert. Die beiden am häufigsten detektierten Proteinspots konnten als PEPCK (Phosphoenolpyruvat Carboxykinase), Vit-6 und Daf-21 identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich, kleinere HC110-R-bindende Proteine oder Peptide zu identifizieren. Der Einsatz eines Gelsystems nach Schagger und von Jagow (1987) zur Auftrennung kleiner Proteine/Peptide bis zu einem Molekulargewicht von nur 1000 Da kombiniert mit einer sehr sensitiven Färbemethode und Massenspektroskopie führte zu keinem Erfolg. Es wäre jedoch denkbar, dass es nicht möglich war, potentielle Bindungspartner in ausreichender Menge für eine massenspektroskopische Analyse anzureichern. Ferner könnte es eine Rolle gespielt haben, dass Fusionsproteine in nativer Konfiguration nicht zur Verfügung standen.

Das hypothetische Protein R11A5.4 aus *C. elegans*, auch als PEPCK bezeichnet, wird von einem Gen kodiert, welches zu der Familie der Phosphoenolpyruvat Carboxykinasen gezählt wird. Sein Molekulargewicht beträgt 73,4 kDa. Es ist im Cytoplasma lokalisiert, GTP-bindend und ein Enzym der Glukoneogenese („The *C. elegans* Sequencing Consortium“, 1998). Aufgrund seiner cytoplasmatischen Lokalisation ist eine Interaktion *in vivo* mit dem extrazellulären, aminoterminalen Anteil des Rezeptors HC110-R unwahrscheinlich. Die Vitellogenine, auch als Eidotterproteine bezeichnet, werden in *C. elegans* von einer sechs Gene umfassenden Genfamilie kodiert. Bei dem hier identifizierten Protein handelt es sich um Vit-6, ein 193,2 kDa großes Protein. Das Vorläuferprotein Vit-6 wird in die zwei Untereinheiten yp115 und yp88 gespalten (Spieth und Blumenthal, 1985). Sie werden geschlechtsspezifisch nur in Hermaphroditen, stadienspezifisch nur in der späten L4-Larve und in Adulten und gewebespezifisch im Darm exprimiert (Kimble und Sharrock, 1983; Sharrock *et al.*, 1983; Blumenthal *et al.*, 1984). Die Expression von Lat-1 konnte bei Embryonen im Pharynxbereich und bei adulten Würmern in anterioren Neuronen, im Pharynxbereich und auch außerhalb nachgewiesen werden. Die Expression erfolgt vorwiegend in Neuronen und nicht in Muskeln (Willson *et al.*, 2004). Die unterschiedliche Lokalisierung der beiden Proteine Vit-6 und Lat-1 lässt aufgrund der bisherigen Erkenntnisse eine *in vivo*-Interaktion als sehr unwahrscheinlich erscheinen. Das dritte Protein Daf-21 stellt jedoch einen vielversprechenden Kandidaten dar.

4.2.1 Daf-21 als potentieller Interaktionspartner von HC110-R

Das Hitzeschockprotein Daf-21 aus *C. elegans*, auch bezeichnet als Hsp-90, hat eine Länge von 702 AS und ein Molekulargewicht von 80,3 kDa. Es besitzt eine ATP-Binderegion, ein

ATPase-artiges Motiv, ein Hitzeschockprotein-Hsp-90-Motiv und zwei ‚coil coil stretch‘-Regionen. Hitzeschockproteine sind hoch konservierte, vielseitige molekulare Hilfsproteine, die für viele zelluläre Funktionen zuständig sind. Sie spielen z.B. eine Rolle bei der korrekten Faltung von Proteinen, der Zusammenführung von Oligomeren und der Aktivierung bzw. dem Transport von Proteinen (Eustace und Jay, 2004). Es ist zudem bekannt, dass sie in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen eine Rolle im Schutz gegen letale Verletzungen nach einer Vielzahl unterschiedlicher Stressstimuli spielen. Des Weiteren verhindern sie Aggregationen während der Proliferation und Zelldifferenzierung (Gehrmann *et al.*, 2005). In weiteren Studien wurde berichtet, dass sie direkt an spezifischen, biochemischen Signalwegen beteiligt sind, die der Apoptose zu Grunde liegen (Nollen und Morimoto, 2002; Richter und Buchner, 2001; Beere, 2001). Bei Hsp90 α und Hsp90 β handelt es sich um die humanen Orthologe zu Daf-21. Sie zeigen eine 74 respektive 76%ige Sequenzähnlichkeit zu Daf-21 (David *et al.*, 2003). Hsp-90 ist als essentielles, molekulares Hilfsprotein überall verbreitet. Es moduliert die Reifung und Funktion vieler Schlüsselproteine, welche an Regulationen in der eukaryotischen Zelle beteiligt sind (Csermely *et al.*, 1998; Pratt, 1998; Buchner, 1999). Unter physiologischen Bedingungen interagiert Hsp90 mit einer ausgewählten Gruppe von Proteinen, wie beispielsweise Kinasen und Transkriptionsfaktoren, um sie in einem metastabilen Zustand zu halten. Auf diese Weise sind sie in der Lage, auf einen Stimulus mit Aktivierung zu reagieren. Obwohl Hsp90 nicht selbst Signale weiterleiten kann, spielt es eine zentrale Rolle in der Regulation normaler Entwicklungsprozesse (Rutherford und Lindquist, 1998; Queitsch *et al.*, 2002) und neoplastischer Transformationen (Neckers *et al.*, 1999; Bagatell *et al.*, 2001). Hsp90 stellt zudem ein Schlüsselprotein in pathologisch veränderten zellulären Prozessen verschiedener humaner Krankheiten, vor allem Krebs, dar. Aus diesem Grund gab es schon viele Bemühungen, Medikamente zu entwickeln, die in der Lage sind, die Funktion von Hsp90 zu modulieren (David *et al.*, 2003). Daf-21 scheint in *C. elegans*, ebenso wie in anderen Eukaryoten (*S. cerevisiae* und *D. melanogaster*), essentiell zu sein. In *C. elegans* sind homozygote Deletionsmutanten im Larvenstadium letal (Borkovich *et al.*, 1989; Cutforth und Rubin, 1994). Ferner konnte gezeigt werden, dass es mit dem Kochaperon Unc-45 assoziiert, um die Stabilität und den Aufbau von Myosin zu regulieren. Dieses ist für Prozesse wie Zelldivision, Bewegung und Muskelkontraktion essentiell (Barral *et al.*, 2002). Eine Temperatur-sensitive ‚missense‘-Mutation, *daf(p673)* führt zu Abnormalitäten im Signalweg bei der Bildung von Dauer-Stadien. Dabei handelt es sich um ein alternatives drittes Stadium im Entwicklungszyklus von *C. elegans*, welches das Überleben unter schwierigen Umgebungsbedingungen gewährleistet (Riddle, 1988).

In den meisten bisher bekannten Fällen sind Mitglieder der Hsp-Familie in intrazelluläre Prozesse involviert und kommen im Nukleus, in Lysosomen, im ER, im Cytoplasma und in Mitochondrien vor (Eustace und Jay, 2004). Mittlerweile konnten Hitzeschockproteinen jedoch zudem wichtige extrazelluläre Funktionen zugeordnet werden (Triantafilou *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2000; Lei *et al.*, 2004; DeLeo *et al.*, 1985; Joseph *et al.*, 2002; Kakimura *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 1994). Hitzeschockproteine werden auch aktiv von der Zelle in den Extrazellulärraum sekretiert (Li *et al.*, 2007). Für Hsp90 α und Hsp70 ist bekannt, dass sie über ein Nanovesikel (30-90 nM Durchmesser)-System durch Exocytose ausgeschleust

werden (Hegmans *et al.*, 2004; Clayton *et al.*, 2005; Lancaster und Fabbraio, 2005; Yu *et al.*, 2006). Dieser Exosomen-Transportweg exportiert zelluläre Proteine, die aufgrund einer fehlenden Signalsequenz nicht über den konventionellen ER/Golgi-Transportweg sekretiert werden können (Li *et al.*, 2007). In einem extrazellulären Zusammenhang wurde Hsp90 das erste Mal im Jahr 1986 beschreiben, als es als tumorspezifisches Antigen auf der Oberfläche von Mauszellen nachgewiesen werden konnte (Ullrich *et al.*, 1986). Am besten untersucht sind die extrazellulären Funktionen von Hsp90 in der angeborenen und adaptiven Immunität. Hsp90 stellt ein Schlüsselmolekül bei der Prozessierung und Präsentation im Verlauf der Immunantwort dar (Basu *et al.*, 2000). Hsp90 α ist an einem Zellsignalegebungs-komplex beteiligt, der für eine funktionale Immunantwort auf bakterielle Lipopolysaccharide benötigt wird (Triantafilou *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde Hsp90 als essentielles Mitglied einiger pathophysiologischer Vorgänge beschrieben. Das humane Hsp90 α wurde auf der Oberfläche von HAT-1080 Fibrosarkomazellen nachgewiesen. Es fungiert dort als molekulares Hilfsprotein, welches an der Aktivierung der Matrix Metalloprotease-2 (MMP-2) beteiligt ist und damit zu einer erhöhten Invasivität des Tumors führt. Seine Funktion unterscheidet sich in diesem Fall nicht von intrazellulären Aufgaben bei der Reifung und Aktivierung von Proteinen (Eustace und Jay, 2004). Ferner wurde von der extrazellulären Interaktion von Hsp90 und Annexin II auf Endothelzellen berichtet. Dadurch kommt es zu einer Modulation der Plasminogenaktivierung. Dies könnte für Abnormalitäten bei Diabetes verantwortlich sein (Lei *et al.*, 2004). Ebenfalls ist Hsp90 an der Aktivierung des Preallikrein-Kininogen-Komplexes auf der Oberfläche von humanen vaskulären Endothelzellen beteiligt, welcher mit der pathologischen Entwicklung von Asthma in Verbindung gebracht wird (Joseph *et al.*, 2002). Die beiden letztgenannten Fälle zeigen, dass Hsp90 extrazellulär nicht nur als molekulares Hilfsprotein fungiert, sondern weisen auf eine weiter reichende Funktion von Hsp90 hin. Im Allgemeinen agiert Hsp90 intrazellulär in einem Komplex mit anderen Chaperonen, Kochaperonen und zusätzlichen Proteinen. Es gibt Hinweise dafür, dass dies auch extrazellulär der Fall ist (Eustance und Jay, 2004).

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit gelang es, das Hitzeschockprotein Daf-21 aus *C. elegans* in einen prokaryotischen Expressionsvektor zu klonieren und heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Das resultierende Fusionsprotein konnte chromatographisch in nativer Form aufgereinigt werden. Mit Hilfe der SPR-Technik konnte gezeigt werden, dass Daf-21 in einem *in vitro*-System an den aminoterminalen Teil des Rezeptors HC110-R bindet.

Interessanterweise wurde in einer genomweiten Studie an *C. elegans* eine Interaktion dieses Hitzeschockproteins mit einem anderen α -LTX-bindenden Rezeptorprotein postuliert (Zhong und Sternberg, 2006). Recherchen der Datenbank auf potentielle Interaktionspartner von Daf-21 zeigten, dass eine signifikante Interaktion mit Ptp-3 vorhergesagt werden konnte. Nicht ersichtlich ist aus der Studie, ob es sich hierbei um eine intra- oder extrazelluläre Interaktion der beiden Proteine handelt. Die Typ IIa-Rezeptorfamilie der Protein-Tyrosin Phosphatasen (RPTP) umfasst in Vertebraten den LAR (‘Leukocyte-common antigen related’)-Rezeptor und die LAR-ähnlichen Rezeptoren PTP- σ und PTP- δ . Sie sind als Zelladhäsionsmoleküle in die Regulation verschiedener Vorgänge in der Entwicklung, einschließlich der Neurogenese,

involviert (Den Hertog *et al.*, 1999; Johnson und Van Vactor, 2003; Paul und Lambroso, 2003; Ensslen-Craig und Brady-Kalnay, 2004). Der extrazelluläre Anteil der LAR-ähnlichen RPTP beinhaltet Ig-ähnliche- und Fibronectin Typ III (FNIII)-,Repeats'. Alternatives Spleißen von RPTP resultiert in Isoformen, die sich in ihrem extrazellulären Teil unterscheiden und gewebespezifisch exprimiert werden können. Deshalb scheint die extrazelluläre Domäne für die funktionale Spezifität verantwortlich zu sein (O'Grady *et al.*, 1994; Pulido *et al.*, 1995; Honkaniemi *et al.*, 1998). LAR-RPTP könnten abhängig von verschiedenen Liganden, spezifische Funktionen in der neuronalen Entwicklung haben. Das Gen *ptp-3* repräsentiert den einzigen Vertreter der Typ IIa RPTP Gene in *C. elegans*. Es kodiert für zwei Isoformen der LAR-Familie, PTP-3A und PTP-3B. LAR-ähnliche Phosphatase-Rezeptoren sind konservierte Zelladhäsionsmoleküle, die in verschiedenen Entwicklungsprozessen eine Rolle spielen. Die beiden Isoformen des Gens *ptp-3* unterscheiden sich in ihrer extrazellulären Domäne (Harrington *et al.*, 2002). Die lange Isoform PTP-3A ist spezifisch an Synapsen lokalisiert und ist dem LAR-Rezeptor der Vertebraten am ähnlichsten. Die kurze Isoform PTP-3B ist extrasynaptisch und ihr fehlen die Ig-Domäne und die ersten vier FNIII-,Repeats'. PTP-3A scheint als molekulare Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und α -Liprin in der Synaptogenese zu fungieren (Ackley *et al.*, 2005). PTP-3B reguliert die Migration der Neuroblasten in der Embryogenese (Harrington *et al.*, 2002).

Das Hitzeschockprotein Hsp-90 scheint eine Tyrosin-Phosphorylierung aufzuweisen (Brouet *et al.*, 2001; Adinolfi *et al.*, 2003). So wurde beispielsweise berichtet, dass phosphoryliertes Hsp-90 spezifisch mit dem Liganden-aktivierten Ionen-Kanal P2X7-Rezeptor-Komplex assoziiert vorliegt. Interessanterweise spielt PTP- β in diesem Zusammenhang innerhalb des Komplexes eine Rolle und reguliert die Aktivität des Hitzeschockproteins. Der Grad der Tyrosin-Phosphorylierung scheint mit Veränderungen der funktionalen Eigenschaften des Rezeptors zusammenzuhängen. Eine erhöhte Phosphorylierung des komplexierten Hsp90 ist assoziiert mit einer verringerten Funktion des P2X7-Rezeptors und *vice versa* (Adinolfi *et al.*, 2003). Bekannt sind allerdings nur Beispiele intrazellulärer Prozesse, jedoch nicht extrazellulärer Interaktionen.

In Vertebraten wurde PTP- σ als funktionaler Rezeptor für α -LTX identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass α -LTX Ca^{2+} -unabhängig an den extrazellulären Teil des Rezeptors bindet und eine Exocytose stimuliert. Die Bindungsstelle ist im C-terminalen Teil des Aminoterminus lokalisiert und schließt zwei Fibronectin Typ III-,Repeats' mit ein. Zusammen mit Neurexin und Latrophilin bildet PTP- σ eine Gruppe von Rezeptoren für das Neurotoxin α -LTX. Die Mitglieder dieser Gruppe sind strukturell sehr unterschiedlich. Zwischen ihren Sequenzen gibt es keine eindeutige Sequenzhomologie. Bei Neurexin handelt es sich um ein Zelladhäsionsprotein mit einer Transmembrandomäne, Latrophilin dagegen ist ein Hybridmolekül aus einem Zelladhäsionsmolekül und einem G-Protein gekoppelten Rezeptor. Die Affinität der drei Rezeptoren zu dem Toxin lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Rezeptoren eine physiologische Rolle teilen, die mit einer präsynaptischen Funktion verbunden ist. Die bekannten strukturellen und funktionalen Charakteristika der drei

Rezeptoren sprechen dafür, dass sie eine funktionale Familie von neuronalen Membranrezeptoren darstellen, welche komplementäre oder konvergierende Rollen in der präsynaptischen Funktion ausüben. Der Mechanismus beinhaltet Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen. Eine mögliche mechanistische Erklärung der Verbindung zwischen den Rezeptoren wäre ein endogener Ligand, den alle drei Rezeptoren gemeinsam haben und der dem Toxin ähnelt (Krasnoperov *et al.*, 2002a). Handelt es sich bei der vorhergesagten Interaktion zwischen Daf-21 und Ptp-3 um eine Wechselwirkung, die auch *in vivo* auftritt, wäre dies ein Hinweis darauf, dass es sich bei HC110-R und Daf-21 tatsächlich um Interaktionspartner handelt. Da es sich sowohl bei Latrophilin (bzw. HC110-R) als auch bei PTP- σ um Rezeptoren handelt, die den artifiziellen Liganden α -LTX extrazellulär binden, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass beide eine ähnliche Bindestelle aufweisen. Es wäre somit vorstellbar, dass diese Rezeptoren beide in der Lage sind, das Hitzeschockprotein Daf-21 an dieser Bindestelle zu binden.

Weitere Messungen beschäftigten sich mit der Fragestellung, ob es sich bei dem potentiellen, nativen Interaktionspartner Daf-21 um einen HC110-R-aktivierenden Liganden handelt. Verwendet wurde auch in diesem Fall die stabil mit HC110-R-Myc/6 \times His transfizierte HEK-293-Zelllinie. Mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde untersucht, ob Daf-21 in der Lage ist, den Rezeptor HC110-R zu aktivieren und den Ca^{2+} -Haushalt in der Zelle zu verändern. Es konnte gezeigt werden, dass weder 15 nM oder 35 nM, noch 100 nM des Hitzeschockproteins eine messbare Aktivierung des Rezeptors hervorriefen. Diese Versuche weisen somit darauf hin, dass es sich bei Daf-21 nicht um einen Agonisten des Rezeptors zu handeln scheint. Ferner wurde die Fähigkeit des Proteins untersucht, die HC110-R-vermittelte α -LTX-stimulierte Ca^{2+} -Antwort zu modulieren. Auch für diesen potentiellen Liganden konnte eine Rolle als Antagonist des Rezeptors ausgeschlossen werden. Weder Höhe der Antwort noch Beginn oder Verlauf änderten sich durch vorherige Zugabe des Fusionsproteins signifikant. Für den Ligand CD55 des Rezeptors CD97 aus der Gruppe der LNB-TM7-Rezeptoren konnte ebenfalls gezeigt werden, dass er in rekombinanten Systemen (HEK-293-Zellen und T-Lymphozyten) keine G-Protein-vermittelte Signalweiterleitung induziert (Foord *et al.*, 2002). Aus der Literatur ist bekannt, dass das humane Protein Hsp-90 selbst keine Funktion in der Signalweiterleitung besitzt (David *et al.*, 2003). Dies konnte für die Interaktion des orthologen Hitzeschockproteins Daf-21 aus *C. elegans* und den Rezeptor HC110-R bestätigt werden.

Welche Rolle Daf-21 im Zusammenhang mit den Rezeptoren PTP σ und Lat-1 spielt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Bekannt ist jedoch, dass beide Eigenschaften eines Zelladhäsionsmoleküls aufweisen. Die Latrophiline und Latrophilin-ähnlichen Proteine könnten somit, wie die RPTP (Den Hertog *et al.*, 1999; Johnson und Van Vactor, 2003; Paul und Lambroso, 2003; Ensslen-Craig und Brady-Kalnay, 2004), in die Regulation verschiedener Vorgänge in der Entwicklung involviert sein. Es wäre denkbar, dass Daf-21 durch Interaktion mit Latrophilin-ähnlichen Proteinen einen Zustand stabilisiert, in dem sie aktiviert werden und ein Signal weiterleiten können.

4.3 Ausblick

Über die Funktion und physiologische Rolle der Latrophiline und Latrophilin-ähnlichen Rezeptoren ist bisher wenig bekannt. Die Identifizierung nativer Liganden stellt einen essentiellen Schritt auf dem Weg der Aufklärung dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals potentielle, extrazelluläre Liganden des Rezeptors HC110-R charakterisiert. In der hier vorgestellten Studie konnte gezeigt werden, dass die Neuropeptide AF1, AF2, AF4, AF10, AF11, AF12, AF19, PF1, PF2 und PF3 in einem *in vitro*-System mit unterschiedlichen Eigenschaften, spezifisch an das 54 kDa große Fusionsprotein des Rezeptors HC110-R binden. Es gelang in einigen Fällen diese Bindungen näher zu charakterisieren. Zukünftige Studien sollten die hier gemessenen Bindungen durch Untersuchungen am vollständigen Rezeptor in einer hydrophoben Umgebung bestätigen. Auf diese Weise kann gewährleistet werden, dass der Rezeptor in nativer Konformation vorliegt. Eine Möglichkeit hierfür bietet die Verwendung eines L1-Sensorchips in einem SPR-Biosensor. Dieser Chip besitzt eine Carboxymethyl-Dextran-Oberfläche mit zusätzlichen Alkylgruppen, welche die Kopplung von Lipiden und somit die Nachbildung einer membranähnlichen Umgebung ermöglichen (Stenlund *et al.*, 2003). Durch Bestimmung der Affinitäten an den vollständigen Rezeptor könnte in einem Vergleich die Rolle der nativen Konfiguration und eine Beteiligung zusätzlicher Domänen des Rezeptors an der Bindung analysiert und besser verstanden werden.

Zur funktionalen Analyse potentieller Liganden des Rezeptors wurde in der hier vorliegenden Arbeit zudem ein *in vivo*-Messsystem etabliert und die Kandidaten auf eine aktivierende Wirkung hin untersucht. Eine Signalweiterleitung in Form eines Ca^{2+} -Anstiegs konnte in stabil mit HC110-R transfizierten HEK-293-Zellen jedoch für keinen der potentiellen Liganden nachgewiesen werden. Es wäre denkbar, dass das hier eingesetzte System für die untersuchten Neuropeptide nicht das für eine Signalweiterleitung notwendige G-Protein zur Verfügung stellt. Weitere Messungen sollten demnach an Zellen erfolgen, die zusätzlich ein G-Protein exprimieren. Ein weiterer Erfolg versprechender Ansatz wäre die Synthese eines chimären Rezeptors, der den NH_2 -Terminus von HC110-R kombiniert mit dem C-Terminus eines Rezeptors, für den das interagierende G-Protein bekannt ist, enthält. Denkbar wäre hier die Verwendung des Lat-1-Rezeptors aus Vertebraten, für den die Involvierung des G-Proteins $\text{G}_{q/11}$ in die α -LTX-stimulierte Signalweiterleitung nachgewiesen werden konnte. Zudem könnten radioaktive Bindungsassays Aufschluss darüber geben, ob HC110-R-bindende Proteine oder Peptide in der Lage sind, den Rezeptor zu aktivieren. Zum einen wäre dies mittels einer Liganden induzierten Bindung von $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ an Membranpräparationen transfizierter Zellen möglich, zum anderen in einem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme-, Assay' transfizierter Zellen.

Die 11 hier untersuchten Neuropeptide repräsentieren nur einen kleinen Teil der Neuropeptide aus *C. elegans*. Die Gesamtzahl aller Neuropeptide beträgt in *C. elegans* mindestens 250 (Husson, *et al.*, 2005). Zusätzlich zu den FLP sollten auch Neuropeptide der *nlp*- und *ins*-Gene untersucht werden, über deren Rezeptoren in *C. elegans* noch keine Informationen vorliegen. Eine Gesamtbeurteilung der nativen Liganden des Rezeptors ist somit erst nach

einem vollständigen ‚Screening‘ aller bekannten Neuropeptide möglich. Zu diesem Zweck ist es nötig, die hier etablierten Verfahren so zu modifizieren, dass ein weniger zeitaufwändiges ‚Screening‘ mit hohem Durchsatz erfolgen kann. Kann eine Liganden-induzierte Aktivierung des Rezeptors nachgewiesen werden, wäre der nächste Schritt eine geeignete *in vivo*-Lokalisation von Ligand und Rezeptor in *C. elegans* und der Vergleich der Phänotypen nach ‚Knockout‘ oder ‚Silencing‘ der Gene des Rezeptors bzw. der Liganden. Solche funktionalen Studien führen letztendlich zur Identifizierung individueller Ligand/Rezeptor-Paare und damit zum Verständnis ihrer Signaltransduktion und ihrer assoziierten Phänotypen.

In einem ‚Screening‘-Verfahren konnte des Weiteren das Hitzeschockprotein Daf-21 aus *C. elegans* als HC110-R-bindendes Protein identifiziert werden. *In vitro* war es möglich, diese Bindung zu bestätigen. In weiteren Untersuchungen sollte diese Wechselwirkung der beiden Proteine *in vivo* nachgewiesen werden. Ferner sollte die postulierte Interaktion von Daf-21 und PTP-3 in zukünftigen Experimenten bestätigt werden. Es wäre zudem interessant, die Frage zu beantworten, ob es sich dabei um intra- oder extrazelluläre Wechselwirkungen handelt. Für die Suche weiterer potentieller Liganden von HC110-R wäre die Technik der SPR eine gut geeignete Methode. In Kombination mit Massenspektroskopie stellt sie ein effizientes Verfahren zur Identifizierung neuer Interaktionspartner dar. Dabei könnte es sich um kleinere, lösliche Proteine oder Peptide handeln. Ferner wäre es denkbar, dass LNB-TM7-Rezeptoren nicht durch lösliche Liganden, sondern durch Zelladhäsionsmoleküle aktiviert werden. Die Anwesenheit der Lektin-ähnlichen oder Olfactomedin-ähnlichen Domänen im NH₂-Terminus des Latrophilins untermauern diese Hypothese (Kreienkamp *et al.*, 2002).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien stellen einen ersten Schritt bei der Identifizierung und Etablierung geeigneter ‚Screening‘-Verfahren zur Suche und Charakterisierung potentieller, extrazellulärer Liganden des Rezeptors HC110-R dar. Zusätzlich konnten interessante Kandidaten natürlicher Liganden vorgestellt und erste Erkenntnisse über die Komplexität der physiologischen Rolle des Latrophilin-ähnlichen Rezeptors HC110-R vermittelt werden.

5. Zusammenfassung

Der 110 kDa große, Latrophilin-ähnliche Orphanrezeptor HC110-R, aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wurde in *Haemonchus contortus* als Target des neuen Anthelminthikums Emodepsid identifiziert (Saeger *et al.*, 2001). Die Funktion der Latrophiline bzw. Latrophilin-ähnlichen Rezeptoren sowie deren native Liganden sind bisher nicht bekannt. Im Vordergrund dieser Arbeit stand deshalb die Identifizierung potentieller, natürlicher Liganden des Rezeptors HC110-R.

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Technologie gelang es ein *in vitro*-System zur Analyse potentieller Interaktionspartner der extrazellulären, aminoterminalen Region von HC110-R zu etablieren. Es konnte gezeigt werden, dass Neuropeptide aus Nematoden potentielle Liganden des Rezeptors darstellen. Die Neuropeptide AF1, AF2, AF4, AF10, AF11, AF12, AF19, PF1, PF2 und PF3 aus *C. elegans* binden mit unterschiedlichen Eigenschaften, spezifisch an ein rekombinantes Protein, das die extrazelluläre Region des Rezeptors umfasst. Bestätigt werden diese Ergebnisse von Vorhersagen über genetische Interaktionen in *C. elegans* (Zhong und Sternberg, 2006). Zudem gelang es für die Neuropeptide AF1, AF2, AF10, PF2 und PF3 die Dissoziationsratenkonstante k_d der Bindungen zu ermitteln. Diese lag in allen Fällen in einem engen Rahmen zwischen 0,01 und 0,05 s⁻¹ und beschreibt schnelle Dissoziationen. Ferner konnte für die Peptide AF1, AF10 und PF2 die Affinität der Interaktion mittels der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D bestimmt werden. Es ergab sich für AF1 ein K_D -Wert von 11 µM, für AF10 ein K_D -Wert von 52 µM und für PF2 ein K_D -Wert von 530 µM.

Weiterhin gelang es ein System zur funktionellen Analyse potentieller Liganden zu etablieren. Verwendet wurde eine stabil transfizierte HEK-293-Zelllinie, die den gesamten Rezeptor exprimiert. In der Vergangenheit konnte das Neurotoxin α -Latrotoxin als artifizieller Agonist von HC110-R identifiziert werden. Fluoreszenzspektroskopische Messungen mit dem Ca²⁺-bindenden Indikator Fura-2 zeigten, dass α -Latrotoxin spezifisch eine HC110-R-vermittelte Erhöhung der [Ca²⁺]_i von 219±14 nM induziert. Untersuchungen der HC110-R-bindenden Neuropeptide ergaben jedoch, dass unter diesen Bedingungen keines der Neuropeptide eine HC110-R vermittelte Erhöhung der [Ca²⁺]_i stimuliert. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass keines der Neuropeptide eine modulierende Wirkung auf die α -Latrotoxin-stimulierte, HC110-R-vermittelte Erhöhung der [Ca²⁺]_i hat. Es handelt sich somit nicht um Antagonisten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ferner unterschiedliche ‚Screening‘-Verfahren mit der löslichen Fraktion eines Proteinextraktes aus *C. elegans* durchgeführt. Es gelang in 2D-Bindungsexperimenten an Nitrozellulosemembranen potentielle Interaktionspartner der aminoterminalen Region von HC110-R zu detektieren. Massenspektrometrisch konnte das Hitzeschockprotein Daf-21, ein zu dem humanen Hsp90 orthologes Protein, identifiziert werden. Diese Bindung konnte mit rekombinantem Daf-21 mit Hilfe der SPR-Technologie an einem 54 kDa großen, NH₂-terminalen Fragment des Rezeptors HC110-R *in vitro* bestätigt werden. Vorhersagen über genetische Interaktionen in *C. elegans* ergaben, dass Daf-21 wahrscheinlich mit einem weiteren α -Latrotoxin-bindenden Protein, der Protein-Tyrosin Phosphatase-3 (PTP-3) interagiert (Zhong und Sternberg, 2006).

6. Abstract

The 110 kDa Latrophilin-like orphan receptor HC110-R from *Haemonchus contortus* belongs to the family of G-Protein coupled receptors and was first identified as a target for the new anthelmintic drug Emodepside (Saeger *et al.*, 2001). Both function and natural ligands of latrophilin family members are unknown to date. This study was aimed at identifying putative natural ligands of the receptor HC110-R.

Using surface plasmon resonance (SPR)-technology, an *in vitro* system for the analysis of the interaction of potential ligands with the extracellular HC110-R aminoterminal region was established. This study shows that neuropeptides of nematodes are potential ligands of HC110-R. Neuropeptides AF1, AF2, AF4, AF10, AF11, AF12, AF19, PF1, PF2 and PF3 from *C. elegans* bound specifically to a recombinant polypeptide comprising the extracellular aminoterminal region of the receptor. Genome-wide predictions of *C. elegans* genetic interactions confirmed these findings (Zhong and Sternberg, 2006). Interaction of the neuropeptides AF1, AF2, AF10, PF2 and PF3 with HC110-R revealed dissociation rate constants between 0,01 and 0,05 s⁻¹ hence describing fast dissociations. Moreover, equilibrium dissociation constants were obtained for AF1 (K_D=11 μM), AF10 (K_D=52 μM) and PF2 (K_D=530 μM).

Functional analysis of potential ligands were carried out using stable transfected HEK-293 cells expressing the entire receptor. The neurotoxin α-latrotoxin was recently identified as an artificial agonist of HC110-R. Fluorescent Ca²⁺-measurements of Fura-2 loaded cells evoked a HC110-R-specific α-latrotoxin-induced rise in intracellular Ca²⁺ by approximately 219±14 nM. Intriguingly, none of the HC110-R binding neuropeptides elicited a Ca²⁺ response. Moreover, this study confirmed that the investigated neuropeptides did not function as antagonists by modulating α-latrotoxin induced Ca²⁺ response in HC110-R transfected HEK-293 cells.

Furthermore, a screening for potential natural ligands was performed with the soluble fraction of a *C. elegans* protein extract. Two dimensional nitrocellulose binding assays combined with subsequent mass spectrometry revealed the heat shock protein Daf-21, an ortholog of Hsp-90, as a putative interaction partner of the aminoterminal region of HC110-R. This interaction was confirmed *in vitro* by using SPR-technology by the binding of a recombinant Daf-21 to a 54 kDa aminoterminal fragment of HC110-R. Predicted genetic interaction data of *C. elegans* showed, that Daf-21 might interact with another α-latrotoxin binding protein, protein-tyrosine phosphatase-3 (PTP-3) (Zhong and Sternberg, 2006).

7. Literaturverzeichnis

- Ackley, B. D. et al.** The two isoforms of the *Caenorhabditis elegans* leukocyte-common antigen related receptor tyrosine phosphatase PTP-3 function independently in axon guidance and synapse formation. *J. Neurosci.* 25, 7517-7528 (2005).
- Adam-Vizi, V. et al.** 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 (1993).
- Adinolfi, E. et al.** Tyrosine phosphorylation of HSP90 within the P2X7 receptor complex negatively regulates P2X7 receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 37344-37351 (2003).
- Ashton, A. C. et al.** α -Latrotoxin, acting via two Ca^{2+} -dependent pathways, triggers exocytosis of two pools of synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 276, 44695-44703 (2001).
- Ashton, A. C. et al.** Tetramerisation of α -latrotoxin by divalent cations is responsible for toxin-induced non-vesicular release and contributes to the Ca^{2+} -dependent vesicular exocytosis from synaptosomes. *Biochimie.* 82, 453-468 (2000).
- Assil, I. Q., Abou-Samra, A. B.** N-glycosylation of CRF receptor type 1 is important for its ligand-specific interaction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E1015-E1021 (2001).
- Bagatell, R. et al.** Destabilization of steroid receptors by heat shock protein 90-binding drugs: a ligand-independent approach to hormonal therapy of breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 2076-2084 (2001).
- Baldwin, R. L., Zimm, B. H.** Are denatured proteins ever random coils? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12391-12392 (2000).
- Barral, J. M. et al.** Role of the myosin assembly Protein UNC-45 as a molecular chaperone for myosin. *Science.* 295, 669-671 (2002).
- Bartl, M.** Molekulare Charakterisierung des Orphanrezeptors HC110R aus dem parasitischen Nematoden *Haemonchus contortus*: Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (2001).
- Basu, S., Srivastava, P. K.** Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses. *Cell Stress. Chaperones.* 5, 443-451 (2000).
- Beere, H. M.** Stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. *Sci. STKE.* 2001, RE1 (2001).
- Biotechnology Handbook**, Version AB, Biacore AB, Freiburg (1998).
- Birnboim, H. C.** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100, 243-255 (1983).
- Bisello, A. et al.** Role of glycosylation in expression and function of the human parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor. *Biochemistry* 35, 15890-15895 (1996).
- Bittner, M. A. et al.** A Ca^{2+} -independent receptor for α -latrotoxin, CIRL, mediates effects on secretion via multiple mechanisms. *J. Neurosci.* 18, 2914-2922 (1998).
- Bittner, M. A., Holz, R. W.** Latrotoxin stimulates secretion in permeabilized cells by regulating an intracellular Ca^{2+} - and ATP-dependent event: a role for protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 275, 25351-25357 (2000).
- Blumenthal, T. et al.** Cloning of a yolk protein gene family from *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 174, 1-18 (1984).

- Borkovich, K. A. et al.** Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell Biol.* 9, 3919-3930 (1989).
- Bradford, M.** 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 (1976).
- Brenner, S.** The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 77, 71-94 (1974).
- Brouet, A. et al.** Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ. Res.* 89, 866-873 (2001).
- Brown, A. M.** A cellular logic for G protein-coupled ion channel pathways. *FASEB J.* 5, 2175-2179 (1991).
- Brownlee, D. et al.** The range and biological activity of FMRFamide-related peptides and classical neurotransmitters in nematodes. *Adv. Parasitol.* 45, 109-180 (2000).
- Brownlee, D. J., Fairweather, I.** Exploring the neurotransmitter labyrinth in nematodes. *Trends Neurosci.* 22, 16-24 (1999).
- Brownlee, D. J. et al.** Nematode neuropeptides: Localization, isolation and functions. *Parasitol. Today.* 12, 343-351 (1996).
- Buchner, J.** Hsp90 & Co.-a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* 24, 136-141 (1999).
- Bull, K. et al.** Effects of the novel anthelmintic emodepside on the locomotion, egg-laying behaviour and development of *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Parasitol.* 37, 627-636 (2007).
- Capogna, M. et al.** The α -latrotoxin mutant LTX^{N4C} enhances spontaneous and evoked transmitter release in CA3 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 23, 4044-4053 (2003).
- Cardoso, J. C. et al.** Evolution of secretin family GPCR members in the metazoa. *BMC. Evol. Biol.* 6, 108 (2006).
- Celis, J. E.** Cell Biology: A Laboratory Handbook. 2nd ed., Vol. 4, Academic Press, San Diego, U.S.A. 149-252 (1998).
- Ceroni, A. et al.** DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res.* 34, W177-W181 (2006).
- Chen, R. et al.** Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8967-8971 (1993).
- Clayton, A. et al.** Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J. Cell Sci.* 118, 3631-3638 (2005).
- Csermely, P. et al.** The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 79, 129-168 (1998).
- Cutforth, T., Rubin, G. M.** Mutations in Hsp83 and cdc37 impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*. *Cell.* 77, 1027-1036 (1994).
- David, C. L. et al.** Expression of a unique drug-resistant Hsp90 ortholog by the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Stress. Chaperones.* 8, 93-104 (2003).
- Davis, R. E., Stretton, A. O.** The motornervous system of *Ascaris*: electrophysiology and anatomy of the neurons and their control by neuromodulators. *Parasitology.* 113 Suppl, S97-117 (1996).
- Davletov, B. A. et al.** Vesicle exocytosis stimulated by α -latrotoxin is mediated by latrophilin and requires both external and stored Ca²⁺. *EMBO J.* 17, 3909-3920 (1998).
- Davletov, B. A. et al.** High affinity binding of α -latrotoxin to recombinant neurexin I α . *J. Biol. Chem.* 270, 23903-23905 (1995).

- Davletov, B. A. et al.** Isolation and biochemical characterization of a Ca^{2+} -independent α -latrotoxin-binding protein. *J. Biol. Chem.* 271, 23239-23245 (1996).
- De Leo, A. B., Srivastava, P. K.** Cell surface antigens of chemically induced sarcomas of murine origin. *Cancer Surv.* 4, 21-34 (1985).
- Den Hertog, J. et al.** Receptor protein-tyrosine phosphatase signaling in development. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 723-733 (1999).
- Dulubova, I. E. et al.** Cloning and structure of delta-latroinsectotoxin, a novel insect-specific member of the latrotoxin family: functional expression requires C-terminal truncation. *J. Biol. Chem.* 271, 7535-7543 (1996).
- Eckard, C. P., Beck-Sickinger, A. G.** Characterisation of G-protein-coupled receptors by antibodies. *Curr. Med. Chem.* 7, 897-910 (2000).
- Eckert, W. A., Kartenbeck, J.** Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie. *Springer Verlag, Berlin* (1997).
- Ensslen-Craig, S. E., Brady-Kalnay, S. M.** Receptor protein tyrosine phosphatases regulate neural development and axon guidance. *Dev. Biol.* 275, 12-22 (2004).
- Eustace, B. K., Jay, D. G.** Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle.* 3, 1098-1100 (2004).
- Foord, S. M. et al.** Bioinformatics and type II G-protein-coupled receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 473-479 (2002).
- Geary, T. G., Kubiak, T. M.** Neuropeptide G-protein-coupled receptors, their cognate ligands and behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 56-58 (2005).
- Gehrmann, M. et al.** Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death. Differ.* 12, 38-51 (2005).
- Goke, R. et al.** Glycosylation of the GLP-1 receptor is a prerequisite for regular receptor function. *Peptides* 15, 675-681 (1994).
- Gombert, M.** Molekulare Eigenschaften des heptahelikalen Rezeptors HC110R aus dem parasitischen Nematoden *Haemonchus contortus*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (2002).
- Gray, J. X. et al.** CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J. Immunol.* 157, 5438-5447 (1996).
- Grynkiewicz, G. et al.** A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450 (1985).
- Guest, M. et al.** The calcium-activated potassium channel, SLO-1, is required for the action of the novel Cyclo-octadepsipeptide anthelmintic, emodepside, in *C. elegans*. *Im Druck* (2007).
- Hanahan, D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580 (1983).
- Harder, A., Samson-Himmelstjerna, G.** Cyclooctadepsipeptides-a new class of anthelmintically active compounds. *Parasitol. Res.* 88, 481-488 (2002).
- Harder, A. et al.** Mechanisms of action of emodepside. *Parasitol. Res.* 97 Suppl 1, S1-S10 (2005).
- Harrington, R. J. et al.** The *C. elegans* LAR-like receptor tyrosine phosphatase PTP-3 and the VAB-1 Eph receptor tyrosine kinase have partly redundant functions in morphogenesis. *Development* 129, 2141-2153 (2002).

- Hartwich, G.** Stamm Nematelminthes im Lehrbuch der speziellen Zoologie, Band I, 2. Teil, ed Gruner, H. E. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart* (1984).
- Hegmans, J. P. et al.** Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Am. J. Pathol.* 164, 1807-1815 (2004).
- Hlubek, M. et al.** Mechanism of α -latrotoxin action at nerve endings of neurohypophysis. *Brain Res.* 992, 30-42 (2003).
- Hlubek, M. D. et al.** Calcium-independent receptor for α -latrotoxin and neurexin 1 α facilitate toxin-induced channel formation: evidence that channel formation results from tethering of toxin to membrane. *Mol. Pharmacol.* 57, 519-528 (2000).
- Ho, H. H. et al.** Glycosylation is important for binding to human calcitonin receptors. *Biochemistry* 38, 1866-1872 (1999).
- Hofmann, B. A. et al.** Functional and protein chemical characterization of the N-terminal domain of the rat corticotropin-releasing factor receptor 1. *Protein Sci.* 10, 2050-2062 (2001).
- Holz, G. G., Habener, J. F.** Black widow spider α -latrotoxin: a presynaptic neurotoxin that shares structural homology with the glucagon-like peptide-1 family of insulin secretagogic hormones. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 121, 177-184 (1998).
- Honkaniemi, J. et al.** LAR tyrosine phosphatase receptor: proximal membrane alternative splicing is coordinated with regional expression and intraneuronal localization. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 60, 1-12 (1998).
- Horrix, C.** Suche nach Liganden für den Latrophilin-Rezeptor aus *Haemonchus contortus*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (2006).
- Husson, S. J. et al.** Discovering neuropeptides in *Caenorhabditis elegans* by two dimensional liquid chromatography and mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 76-86 (2005).
- Ichtchenko, K. et al.** 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 (1999).
- Jackson, R. J. et al.** The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem. Sci.* 15: 477-483 (1990).
- Jacoby, E. et al.** The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem.* 1, 761-782 (2006).
- Jang, S. K. et al.** 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 (1988).
- Jelinek, L. J. et al.** Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 259, 1614-1616 (1993).
- Jeschke, R. et al.** Influence of the cyclooctadepsipeptides PF1022A and PF1022E as natural products on the design of semi-synthetic anthelmintics such as emodepside. *Parasitol. Res.* 97 Suppl 1, S11-S16 (2005).
- Johnson, K. G., Van Vactor, D.** Receptor protein tyrosine phosphatases in nervous system development. *Physiol Rev.* 83, 1-24 (2003).
- Jones, P. A. et al.** *Haemophilus influenzae* type b strain A2 has multiple sialyltransferases involved in lipooligosaccharide sialylation. *J. Biol. Chem.* 277, 14598-14611 (2002).
- Joost, P., Methner, A.** Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0063 (2002).
- Joseph, K. et al.** Heat shock protein 90 catalyzes activation of the prekallikrein-kininogen complex in the absence of factor XII. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 896-900 (2002).

- Kakimura, J. et al.** Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *FASEB J.* 16, 601-603 (2002).
- Kang, D. H. et al.** Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society.* 23, 1511-1512 (2002).
- Karlsson, O. P., Löfås, S.** Flow-mediated on-surface reconstitution of G-Protein coupled receptors for application in surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* 300 (2), 132-138 (2002).
- Karlsson, R.** SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *J. Mol. Recognit.* 17, 151-161 (2004).
- Karlsson, R. et al.** Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol. Methods* 145, 229-240 (1991).
- Khvotchev, M., Sudhof, T. C.** α -latrotoxin triggers transmitter release via direct insertion into the presynaptic plasma membrane. *EMBO J.* 19, 3250-3262 (2000).
- Kimble, J., Sharrock, W. J.** Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 96, 189-196 (1983).
- Kinetics and Affinity Analysis with Biacore**, Level 1, Biacore AB, Freiburg (2005).
- Kiyatkin, N. et al.** Cloning and structural analysis of α -latroinsectotoxin cDNA. Abundance of ankyrin-like repeats. *Eur. J. Biochem.* 213:121-127 (1993).
- Kiyatkin, N. et al.** Cloning an structure of cDNA encoding α -LTX from black widow spider venom. *FEBS Lett.* 270:127-131 (1990).
- Klose, J. et al.** Impact of N-Terminal Domains for Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Receptor-Ligand Interactions. *Biochemistry* 44, 1614-1623 (2005).
- Kobayashi, H. et al.** Rat adrenal chromaffin cells become sensitive to alpha-latrotoxin when cultured *in vitro*: the effect of nerve growth factor. *Neurosci. Lett.* 65, 114-118 (1986).
- Kolakowski Jr., L. F.** GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept Channel* 2. 1-7 (1994).
- Krasnoperov, V. et al.** Post-translational proteolytic processing of the calcium-independent receptor of α -latrotoxin (CIRL), a natural chimera of the cell adhesion protein and the G protein-coupled receptor. Role of the G protein-coupled receptor proteolysis site (GPS) motif. *J. Biol. Chem.* 277, 46518-46526 (2002b).
- Krasnoperov, V. et al.** Protein-tyrosine phosphatase- σ is a novel member of the functional family of α -latrotoxin receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 35887-35895 (2002a).
- Krasnoperov, V. et al.** Structural requirements for α -latrotoxin binding and α -latrotoxin-stimulated secretion. A study with calcium-independent receptor of α -latrotoxin (CIRL) deletion mutants. *J. Biol. Chem.* 274, 3590-3596 (1999).
- Krasnoperov, V. G. et al.** α -Latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor. *Neuron.* 18, 925-937 (1997).
- Krauss, G.** Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. *Wiley-VCH Verlag, Weinheim* (1997).
- Kreienkamp, H. J. et al.** Interaction of G-protein-coupled receptors with synaptic scaffolding proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 464-468 (2002).
- Kristiansen, K.** Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol. Ther.* 103, 21-80 (2004).

- Kubiak, T. M. et al.** Differential activation of "social" and "solitary" variants of the *Caenorhabditis elegans* G protein-coupled receptor NPR-1 by its cognate ligand AF9. *J. Biol. Chem.* 278, 33724-33729 (2003b).
- Kubiak, T. M. et al.** Functional annotation of the putative orphan *Caenorhabditis elegans* G-protein-coupled receptor C10C6.2 as a FLP15 peptide receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 42115-42120 (2003a).
- Kyhse-Andersen, J.** Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 10, 203-209 (1984).
- Lajus, S. et al.** α -Latrotoxin Induces Exocytosis by Inhibition of Voltage-dependent K^+ Channels and by Stimulation of L-type Ca^{2+} Channels via Latrophilin in beta-Cells. *J. Biol. Chem.* 281, 5522-5531 (2006).
- Lajus, S., Lang, J.** Splice variant 3, but not 2 of receptor Protein-Tyrosine Phosphatase σ can mediate stimulation of insulin-secretion by α -latrotoxin. *J. Cell. Biochem.* 98, 1552-1559 (2006).
- Lämmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685 (1970).
- Lancaster, G. I., Febbraio, M. A.** Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 23349-23355 (2005).
- Lang, J. et al.** Ca^{2+} -independent insulin exocytosis induced by α -latrotoxin requires latrophilin, a G protein-coupled receptor. *EMBO J.* 17, 648-657 (1998).
- Langer, I. et al.** Lysine 195 and aspartate 196 in the first extracellular loop of the VPAC1 receptor are essential for high affinity binding of agonists but not of antagonists. *Neuropharmacology.* 44, 125-131 (2003).
- Lee, C. Y. G. et al.** Analysis of sperm antigens by sodium-dodecyl sulfate gel/protein blot radioimmunoblotting method. *Anal. Biochem.* 123, 14-22 (1982).
- Lei, H. et al.** Heat shock protein 90 α -dependent translocation of annexin II to the surface of endothelial cells modulates plasmin activity in the diabetic rat aorta. *Circ. Res.* 94, 902-909 (2004).
- Lelianova, V. G. et al.** α -latrotoxin receptor, latrophilin, is a novel member of the secretin family of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 272, 21504-21508 (1997).
- Lemmon, M. A., Ladbury, J. E.** Thermodynamic studies of tyrosyl-phosphopeptide binding to the SH2 domain of p56lck. *Biochemistry* 33, 5070-5076 (1994).
- Levy, K. et al.** Localization of the sites for Ca^{2+} -binding proteins on G protein-coupled receptor kinases. *Biochemistry* 37, 13650-13659 (1998).
- Li, C.** The ever-expanding neuropeptide gene families in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology* 131 Suppl, S109-S127 (2005).
- Li, C. et al.** Neuropeptide gene families in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 897, 239-252 (1999).
- Li, G. et al.** N-terminal insertion and C-terminal ankyrin-like repeats of α -latrotoxin are critical for Ca^{2+} -dependent exocytosis. *J. Neurosci.* 25, 10188-10197 (2005).
- Li, W. et al.** Extracellular heat shock protein-90 α : linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *EMBO J.* 26, 1221-1233 (2007).
- Liao, D. F. et al.** Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 275, 189-196 (2000).
- Lieberherr, M., Grosse, B.** Androgens increase intracellular calcium Concentration and Inositol 1,4,5-Tisphosphate an Diacylglycerol Formation via a Pertussis Toxin-sensitive G-Protein. *J. Biol. Chem.* 269: 7217-7223 (1994).

- Liebmann, C., Böhmer, F. D.** Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. *Curr. Med. Chem.* 7, 911-943 (2000).
- Lihme, A. et al.** Divinylsulphone-activated agarose. Formation of stable and non-leaking affinity matrices by immobilization of immunoglobulins and other proteins. *J. Chromatogr.* 376, 299-305 (1986).
- Lin, C. et al.** Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature.* 360, 765-768 (1992).
- Lin, H. H. et al.** Molecular analysis of the epidermal growth factor-like short consensus repeat domain-mediated protein-protein interactions: dissection of the CD97-CD55 complex. *J. Biol. Chem.* 276, 24160-24169 (2001).
- Liu, J. et al.** α -latrotoxin modulates the secretory machinery via receptor-mediated activation of protein kinase C. *Traffic.* 6, 756-765 (2005).
- Löfas, S., Johnsson, B.** A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 21, 1526-1528 (1990).
- Lopez, d. M. et al.** The isolated N-terminal domain of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor binds exendin peptides with much higher affinity than GLP-1. *J. Biol. Chem.* 278, 10195-10200 (2003).
- Lowery, D. E. et al.** Pharmacia & Upjohn Company, United States. G protein-coupled receptor-like receptors and modulators thereof. Patent. 6, 632, 621 (2003).
- Lutz, E. M et al.** The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett.* 334, 3-8 (1993).
- Malmqvist, M.** BIACORE: an affinity biosensor system for characterization of biomolecular interactions. *Biochem. Soc. Trans.* 27, 335-340 (1999).
- Marshall, J. et al.** The jellyfish green fluorescent protein: A new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* 14, 211-215 (1995).
- Matsushita, H. et al.** The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution. *FEBS Lett.* 443, 348-352 (1999).
- Maule, A.G. et al.** FMRFamide-related peptides (FaRPs) in nematodes: occurrence and neuromuscular physiology. *Parasitology* 113 Suppl, S119-S135 (1996).
- Maule, A. G. et al.** Neuropeptide signaling systems-potential drug targets for parasite and pest control. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 733-758 (2002).
- McMahon, H. T. et al.** α -latrotoxin releases both vesicular and cytoplasmic glutamate from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 55, 2039-2047 (1990).
- McVeigh, P. et al.** The FLP-side of nematodes. *Trends Parasitol.* 22, 385-396 (2006).
- Meldolesi, J.** Studies on α -latrotoxin receptors in rat brain synaptosomes: correlation between toxin binding and stimulation of transmitter release. *J. Neurochem.* 38, 1559-1569 (1982).
- Mertens, I. et al.** Characterization of an RFamide-Related Peptide Orphan GPCR in *C. elegans*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040, 410-412 (2005a).
- Mertens, I. et al.** Functional characterization of the putative orphan neuropeptide G-protein coupled receptor C26F1.6 in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* 573, 55-60 (2004).
- Mertens, I. et al.** FMRFamide related peptide ligands activate the *Caenorhabditis elegans* orphan GPCR Y59H11AL.1. *Peptides* 27, 1291-1296 (2006).
- Mertens, I. et al.** Molecular characterization of two G protein-coupled receptor splice variants as FLP2 receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 967-974 (2005b).

- Mühlfeld, S.** Bindung von α -Latrotoxin an den heptahelikalen Rezeptor HC110R aus dem parasitischen Nematoden *Haemonchus contortus*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (2003).
- Neckers, L. et al.** Hsp90 as an anti-cancer target. *Drug Resist. Updat.* 2, 165-172 (1999).
- Neher, E., Augustine, G. J.** Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 450, 273-301 (1992).
- Nieba, L. et al.** Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal. Biochem.* 234, 155-165 (1996).
- Neuhoff, V. et al.** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9, 255-262 (1988).
- Nollen, E. A., Morimoto, R. I.** Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J. Cell Sci.* 115, 2809-2816 (2002).
- Nowycky, M. C. et al.** Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature.* 316, 440-443 (1985).
- O'Grady, P. et al.** Genomic organization of the human LAR protein tyrosine phosphatase gene and alternative splicing in the extracellular fibronectin type-III domains. *J. Biol. Chem.* 269, 25193-25199 (1994).
- O'Shannessy, D. J. et al.** Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions by surface plasmon resonance. *Methods Enzymol.* 240, 323-349 (1993).
- Ohyama, M. et al.** Total Synthesis of the anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1193-1194 (1994).
- Orlova, E. V. et al.** Structure of α -latrotoxin oligomers reveals that divalent cation-dependent tetramers form membrane pores. *Nat. Struct. Biol.* 7, 48-53 (2000).
- Panayotou, G. et al.** Interactions between SH2 domains and tyrosine-phosphorylated platelet-derived growth factor beta-receptor sequences: analysis of kinetic parameters by a novel biosensor-based approach. *Mol. Cell Biol.* 13, 3567-3576 (1993).
- Pang, R. T. et al.** Role of N-linked glycosylation on the function and expression of the human secretin receptor. *Endocrinology* 140, 5102-5111 (1999).
- Papaiouannou, S. et al.** Role of a FMRFamide-like family of neuropeptides in the pharyngeal nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurobiol.* 65, 304-319 (2005).
- Paul, S., Lombroso, P. J.** Receptor and nonreceptor protein tyrosine phosphatases in the nervous system. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 2465-2482 (2003).
- Pratt, W. B.** The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217, 420-434 (1998).
- Pulido, R. et al.** The LAR/PTP delta/PTP σ subfamily of transmembrane protein-tyrosine-phosphatases: multiple human LAR, PTP δ , and PTP σ isoforms are expressed in a tissue-specific manner and associate with the LAR-interacting protein LIP.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11686-11690 (1995).
- Qi, L. J. et al.** Extracellular cysteines of the corticotropin-releasing factor receptor are critical for ligand interaction. *Biochemistry.* 36, 12442-12448 (1997).
- Queitsch, C. et al.** Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature.* 417, 618-624 (2002).
- Rahman, M. A. et al.** Norepinephrine exocytosis stimulated by alpha-latrotoxin requires both external and stored Ca^{2+} and is mediated by latrophilin, G proteins and phospholipase C. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354, 379-386 (1999).

- Reagan, J. D.** Expression cloning of an insect diuretic hormone receptor. A member of the calcitonin/secretin receptor family. *J. Biol. Chem.* 269, 9-12 (1994).
- Rees, S. et al.** Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *BioTechniques.* 20, 102-112 (1996).
- Rich, R. L., Myszka, D. G.** Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 54-61 (2000).
- Richter, K., Buchner, J.** Hsp90: chaperoning signal transduction. *J. Cell Physiol.* 188, 281-290 (2001).
- Riddle, D. L.** The dauer larva. In: The Nematode *Caenorhabditis elegans*, ed Wood E. B. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 393-412 (1988).
- Roe, M. W. et al.** Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium.* 11, 63-73 (1990).
- Rogers, C. et al.** Inhibition of *Caenorhabditis elegans* social feeding by FMRFamide-related peptide activation of NPR-1. *Nat. Neurosci.* 6, 1178-1185 (2003).
- Roswell, D. F., White, E. H.** The chemiluminescence of luminol and related hydrazides. *Methods Enzymol.* 57, 409-423 (1978).
- Rudolph, R., Lilie, H.** *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10, 49-56 (1996).
- Rutherford, S. L., Lindquist, S.** Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature.* 396, 336-342 (1998).
- Saeger, B.** Der heptahelikale Transmembran-Rezeptor HC110-R aus dem parasitischen Nematoden *Haemonchus contortus* als Target für das Breitspektrum-Anthelminthikum PF1022A. Inaugural-Dissertation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (2000).
- Saeger, B. et al.** Latrophilin-like receptor from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* as target for the anthelmintic depsipeptide PF1022A. *FASEB J.* 15, 1332-1334 (2001).
- Sambrook, J. et al.** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA (1989).
- Sanger, F. et al.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467 (1977).
- Schagger, H., von Jagow, G.** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379 (1987).
- Schipani, E. et al.** Identical complementary deoxyribonucleic acids encode a human renal and bone parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *Endocrinol.* 132, 2157-2165 (1993).
- Sharrock, W. J.** Yolk proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 96, 182-188 (1983).
- Silva, A. M. et al.** α -Latrotoxin increases spontaneous and depolarization-evoked exocytosis from pancreatic islet β -cells. *J. Physiol.* 565, 783-799 (2005).
- Slepek, V. Z.** Application of surface plasmon resonance for analysis of protein-protein interactions in the G protein-mediated signal transduction pathway. *J. Mol. Recognit.* 13, 20-26 (2000).
- Spieth, J., Blumenthal, T.** The *Caenorhabditis elegans* vitellogenin gene family includes a gene encoding a distantly related protein. *Mol. Cell Biol.* 5, 2495-2501 (1985).
- Srivastava, P. K. et al.** Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics.* 39, 93-98 (1994).

- Stacey, M. et al.** LNB-TM7, a group of seven-transmembrane proteins related to family-B G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem. Sci.* 25, 284-289 (2000).
- Stenlund, P. et al.** Capture and reconstitution of G protein-coupled receptors on a biosensor surface. *Anal. Biochem.* 316, 243-250 (2003).
- Strandh, M., et al.** Studies of interactions with weak affinities and low-molecular-weight compounds using surface plasmon resonance technology. *J. Mol. Recognit.* 11, 188-190 (1998).
- Sudhof, T. C.** α -Latrotoxin and its receptors: neurexins and CIRL/latrophilins. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 933-962 (2001).
- Tatusova, T. A., Madden, T. L.** BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 174, 247-250 (1999).
- The C. elegans Sequencing Consortium.** Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018 (1998).
- Tiruppathi, C. et al.** Role of Ca^{2+} signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul. Pharmacol.* 39, 173-185 (2003).
- Tobaben, S. et al.** Genetic analysis of α -latrotoxin receptors reveals functional interdependence of CIRL/latrophilin 1 and neurexin 1 alpha. *J. Biol. Chem.* 277, 6359-6365 (2002).
- Torreri, P. et al.** Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 41, 437-441 (2005).
- Triantafilou, K. et al.** A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat. Immunol.* 2, 338-345 (2001).
- Triantafilou, M., Triantafilou, K.** Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 23, 301-304 (2002).
- Ullrich, S. J. et al.** A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 3121-3125 (1986).
- Unson, C. G. et al.** Characterization of deletion and truncation mutants of the rat glucagon receptor. Seven transmembrane segments are necessary for receptor transport to the plasma membrane and glucagon binding. *J. Biol. Chem.* 270, 27720-27727 (1995).
- Unson, C. G.** Molecular determinants of glucagon receptor signaling. *Biopolymers.* 66, 218-235 (2002).
- Ushkaryov, Y. A. et al.** Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the α -latrotoxin receptor and laminin. *Science.* 257, 50-56 (1992).
- Ushkaryov, Y. A. et al.** The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. *Toxicon.* 43, 527-542 (2004).
- Ushkarev, I. A., Grishin, E. V.** Neurotoxin of the black widow spider and its interaction with receptors from the rat brain. *Bioorg.Khim.* 12, 71-80 (1986).
- Van Renterghem, C. et al.** α -latrotoxin forms calcium-permeable membrane pores via interactions with latrophilin or neurexin. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3953-3962 (2000).
- Voedisch, B. et al.** Heterologe Expression von rekombinanten Proteinpharmazeutika. *Laborwelt.* 6, 3, 31-35 (2005).
- Volynski, K. E. et al.** VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive functional expression of α -latrotoxin in baculovirus system. *FEBS Lett.* 442, 25-28 (1999).

- Volynski, K. E. et al.** Latrophilin fragments behave as independent proteins that associate and signal on binding of LTX^{N4C}. *EMBO J.* 1-11 (2004).
- Volynski, K. E. et al.** Latrophilin, neurexin, and their signaling-deficient mutants facilitate α -latrotoxin insertion into membranes but are not involved in pore formation. *J. Biol. Chem.* 275, 41175-41183 (2000).
- Volynski, K. E. et al.** Mutant α -latrotoxin (LTX^{N4C}) does not form pores and causes secretion by receptor stimulation: this action does not require neurexins. *J. Biol. Chem.* 278, 31058-31066 (2003).
- Welz, C. et al.** Putative G-protein-coupled receptors in parasitic nematodes-potential targets for the new anthelmintic class cyclooctadepsipeptides? *Parasitol. Res.* 97 Suppl 1, S22-S32 (2005).
- Werry, T. D. et al.** Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca²⁺. *Biochem. J.* 374, 281-296 (2003).
- White et al.** The structure of the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B 314, 1-340 (1986).
- Willson, J. et al.** Latrotoxin receptor signaling engages the UNC-13-dependent vesicle-priming pathway in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 14, 1374-1379 (2004).
- Willson, J. et al.** The effect of the anthelmintic emodepside at the neuromuscular junction of the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Parasitology.* 126, 79-86 (2003).
- Woodcock, D. M. et al.** Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 17, 3469-3478 (1989).
- Xu, J. et al.** The N-terminus of phosducin is involved in binding of beta gamma subunits of G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 2086-2090 (1995).
- Yu, X. et al.** The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* 66, 4795-4801 (2006).
- Zhong, W., Sternberg, P. W.** Genome-wide prediction of *C. elegans* genetic interactions. *Science.* 311, 1481-1484 (2006).

8. Abkürzungsverzeichnis

<i>A. suum</i>	<i>Ascaris suum</i>
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Bis, Bisacrylamid	N,N'-Methylenbisacrylamid
BMFZ	Biologisch Medizinisches Forschungszentrum, Düsseldorf
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calcium-Konzentration
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatische Retikulum
FLP	FMRFamid-ähnliches Peptid
g	Erdbeschleunigung; 9,81 m/s ²
g, mg, µg, ng, pg	Gramm, Milli-, Mikro-, Nano-, Pikogramm
G418	Geneticin 418
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
<i>H. contortus</i>	<i>Haemoncus contortus</i>
HPLC	'High pressure liquid chromatographie'
HEPES	2-[4-(2Hydroxyethyl)-1piperazinyl]-ethansulfonsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IMAC	'Immobilized Metall Affinity Chromatography'
IPTG	Isopropyl-β,D-thiogalactopyranoside
IR	Infrarot
IRD-800	Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff
K ⁺	Kalium
k _a	Assoziationsratenkonstante
k _A	Gleichgewichtsassoziationskonstante
kb	Kilobasen
k _d	Dissoziationsratenkonstante
k _D	Gleichgewichtdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Lura Bertani-Medium
LBN-7TM	'large N-terminal family B-7 transmembrane helix domain'

α -LTX	α -Latrotoxin
M, mM, μ M, nM, pM	Molar, Milli-, Mikro-, Nano-, Pikomolar
mA	Milliampere
MES	2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	'messenger' Ribonucleinsäure
MW	Molekulargewicht
Na ⁺	Natrium
NCBI	'National Center of Biotechnology Information'
Neo	Neomycin
NGM	'Nematode Growth Medium'
NHS	N-Hydroxysuccimide
nm	Nanometer
OD _{nm}	optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
ORF	'open reading frame' (offenes Leseraster)
p. a.	<i>per analysis</i>
PAA	Polyacrylamid
pI	Isoelektrischer Punkt
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R _{max}	maximale Bindungskapazität
R _{min}	minimale Bindungskapazität
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	'Response Unit'; 1 pmol Ligand pro cm ²
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylgelelektrophorese
SE	Standardfehler
SEM	Standardabweichung
sec oder s	Sekunde
SPR	'surface plasmon resonance'- Oberflächenplasmonresonanz
SR	Sarkoplasmatische Retikulum
TB	'Terrific Broth'
TAE, TBE	Tris-Acetat-EDTA- und Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethansulfonsäure
Tab.	Tabelle
TST	Tris- und Tween-20-haltiger Waschpuffer
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	'volume per volume'
w/v	'weight per volume'
z.B.	zum Beispiel
R	Resistenzgen
Ø	Durchmesser

9. Anhang

9.1 Theorie kinetischer Bindungen

Die Gleichung



beschreibt die Bildung eines Komplexes zwischen zwei Bindungspartnern. Hierbei ergibt sich die Geschwindigkeit der Reaktion aus den Konzentrationen der Bindungspartner A und B. Die Anzahl gebildeter Komplexe zu einem gegebenen Zeitpunkt t wird definiert:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [B] - k_d \cdot [AB] \quad (8.2)$$

Die beiden Ratenkonstanten k_a und k_d beschreiben die Geschwindigkeit der Reaktion. Da es sich um eine Reaktion zweiter Ordnung handelt, gibt die Assoziationskonstante k_a die Anzahl der gebildeten Komplexe in einer 1 molaren Lösung von A und B pro Sekunde an ($M^{-1}s^{-1}$). Die Werte für diese Konstante liegen normalerweise zwischen 1×10^3 und $1 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$.

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [B] \quad (8.3)$$

Die Dissoziationskonstante k_d beschreibt die Stabilität des Komplexes und somit die Anzahl der Komplexe, die pro Sekunde zerfallen (s^{-1}). In diesem Fall handelt es sich um eine Reaktion erster Ordnung. Realistische Werte liegen meist im Bereich zwischen 1×10^{-1} und $5 \times 10^{-6} s^{-1}$.

$$-\frac{d[AB]}{dt} = k_d \cdot [AB] \quad (8.4)$$

Die Gleichgewichtskonstanten K_A und K_D beschreiben hingegen die Affinität der Bindungspartner zueinander. Die Gleichgewichtsassoziationskonstante beschreibt die Stärke der Bindung. Ein hoher Wert steht für eine hohe Affinität der Bindungspartner zueinander. Die Werte für K_A , mit der Einheit M^{-1} , liegen normalerweise in einem Bereich zwischen 10^5 und $10^{12} M^{-1}$.

$$K_A = \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]} \quad [M^{-1}] \quad (8.5)$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante, mit der Einheit M, gibt hingegen die Tendenz zum Zerfall des Komplexes an. Ein hoher Wert beschreibt eine niedrige Affinität. Meist liegen die Werte in einem Bereich zwischen 10^{-5} und $10^{-12} M$.

$$K_D = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} \quad [\text{M}] \quad (8.6)$$

$$K_A = \frac{1}{K_D} \quad (8.7)$$

Die beschriebenen Gleichgewichtskonstanten und die kinetischen Ratenkonstanten stehen in Relation zueinander (8.3)(8.4). Entsprechen sich Assoziations- und Dissoziationsrate, liegt ein Gleichgewicht zwischen Komplexbildung und -zerfall vor.

$$k_a \cdot [A] \cdot [B] = k_d \cdot [AB] \quad (8.8)$$

Bei bekannten kinetischen Parametern einer Reaktion kann somit auch die Affinität bestimmt werden. Umgekehrt ist dies jedoch nicht möglich.

$$K_A = \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (8.9)$$

$$K_D = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} = \frac{k_d}{k_a} \quad (8.10)$$

Mit Hilfe der Nettoratengleichungen ist es zudem möglich, nicht nur die Ratenkonstanten zu bestimmen, sondern zudem zu jedem Zeitpunkt Aussagen über die vorliegende Bindereaktion zu treffen. Bildet der Analyt A mit dem Liganden B einen Komplex, hängt die Nettorate der Komplexbildung von den Konzentrationen der freien Bindungspartner A und B und der Stabilität des Komplexes ab. Da der Ligand B immobilisiert an der Oberfläche vorliegt, entspricht die Konzentration des gebildeten Komplexes der Konzentration des gebundenen Analyten an der Oberfläche:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A_{\text{frei}}] \cdot [B_{\text{frei}}] - k_d [AB] \quad (8.11)$$

$$B_{\text{frei}} = B_{\text{Oberfläche}} - AB \quad (8.12)$$

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A_{\text{frei}}] \cdot [B_{\text{Oberfläche}} - AB] - k_d [AB] \quad (8.13)$$

Oberflächenplasmonresonanz-Biosensoren bieten die Möglichkeit, eine Reaktion kontinuierlich und in Echtzeit zu detektieren und somit die Kinetik der Reaktion zu bestimmen. Die Gleichung (8.13) gibt diese Reaktionskinetik wieder. A beschreibt hierbei die freie Konzentration des Analyten in Lösung. Der Komplex AB wird direkt als R in Form von Response Units (RU) gemessen. $B_{\text{Oberfläche}}$ gibt den gebundenen Liganden auf der Oberfläche wieder. Seine absolute Konzentration kann in RU als maximale Bindungskapazität R_{max} ausgedrückt werden. B_{frei} , die freie Konzentration des Liganden, ergibt sich aus $R_{\text{max}} - R$,

wobei der Ausdruck $R_{\max}-R$ äquivalent zu der Anzahl freier Bindungsstellen an der Oberfläche zum Zeitpunkt t ist. Die Assoziationsratengleichung lautet somit:

$$\frac{dR}{dt} = k_a \cdot C \cdot (R_{\max} - R) - k_d \cdot R \quad (8.14)$$

C steht für die molare Konzentration des Analyten. Bei der Injektion des Analyten wird die Konzentration durch kontinuierliche Zugabe beibehalten und somit als konstant und identisch mit der Gesamtkonzentration des Analyten definiert. Für die Dissoziationsratengleichung gilt:

$$\frac{dR}{dt} = -k_d \cdot R \quad (8.15)$$

Für die Assoziation ist es günstig, eine empirische Konstante k_{obs} zu definieren. Ein Diagramm mit der Auftragung dR/dt gegen R ergibt eine Gerade mit der Steigung k_{obs} . Die Bestimmung der Konstante k_{obs} für mehrere Konzentrationen des Analyten, bietet die Möglichkeit, k_{obs} gegen die Konzentration C aufzutragen (8.16). Die Steigung dieser Geraden ergibt den Wert für die Assoziationsratenkonstante k_a ; der Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse ergibt den Wert für die Dissoziationsratenkonstante k_d .

$$k_{\text{obs}} = k_a \cdot C + k_d \quad (8.16)$$

$$\frac{dR}{dt} = k_a \cdot C \cdot R_{\max} - k_{\text{obs}} \cdot R \quad (8.17)$$

Liegt ein Gleichgewicht der Reaktion vor, entspricht die Konzentration des Analyten dem K_D -Wert. Die Hälfte aller Bindungsstellen sind besetzt. Dieser Zustand wird von R_{eq} beschrieben. Im Zustand völliger Sättigung aller Ligandenbindungsstellen R_{\max} beträgt die Konzentration des Analyten 100-mal den K_D -Wert.

$$K_D = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} = \frac{C(R_{\max} - R_{\text{eq}})}{R_{\text{eq}}} \quad (8.18)$$

Das Sensorgramm einer Messung macht die oben diskutierten Zusammenhänge deutlich (Abbildung 8.1). Die Steigung wird durch die Bildung der Bindungskomplexe mit

$$\frac{dR}{dt} = k_a \cdot C \cdot (R_{\max} - R) - k_d \cdot R \quad (8.19)$$

beschrieben. Erreicht die Reaktion ein Gleichgewicht, gilt:

$$\frac{dR}{dt} = 0 \quad (8.20)$$

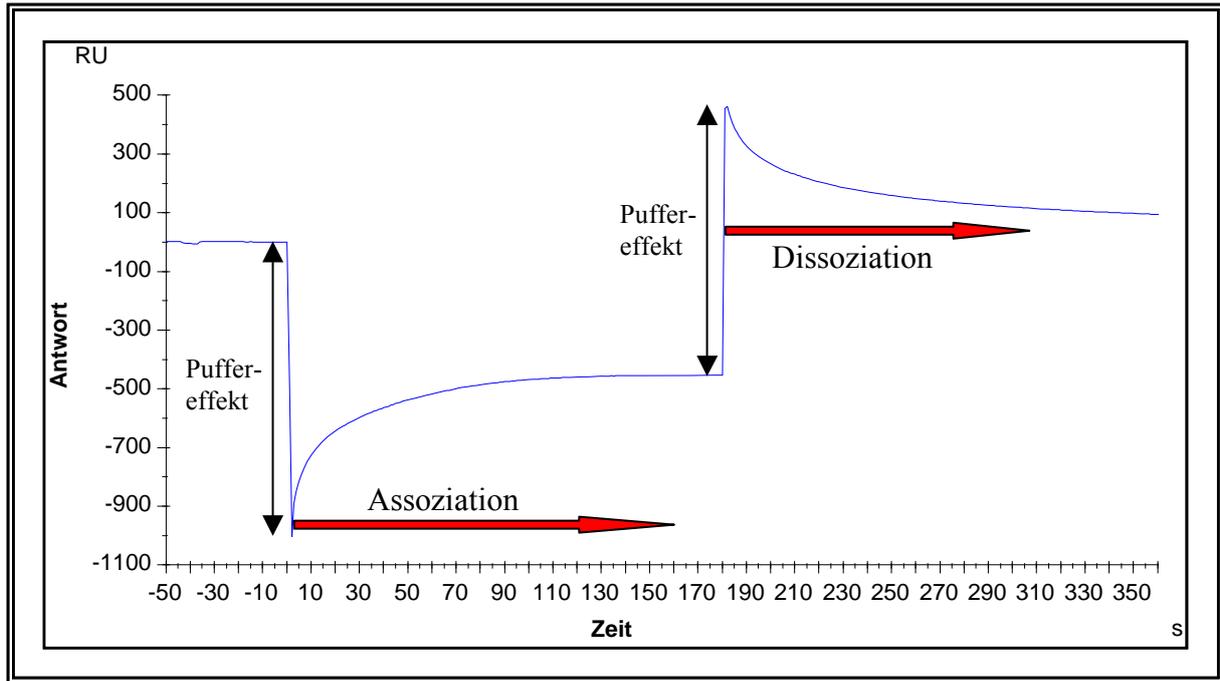


Abb. 8.1: Darstellung eines Sensorgramms. Veranschaulicht ist der Beitrag des Puffereffektes zum SPR-Signal, die Assoziations- und Dissoziationsphase einer typischen Bindung.

Die Steigung im Gleichgewicht ist Null.

$$R_{eq} = \frac{C \cdot R_{max}}{C + K_D} \quad (8.21)$$

In der Dissoziationsphase nach Ende der Injektion zerfallen die Komplexe und die Steigung ist negativ.

$$\frac{dR}{dt} = -k_d \cdot R \quad (8.22)$$

Limitationen durch Massentransporteffekte spielen eine Rolle, wenn die Bindung des Analyten schneller abläuft, als der Analyt durch Diffusion aus der Lösung an die Oberfläche gelangen kann. Ebenso führt eine langsame Diffusion bei der Dissoziation zu einer erneuten Bindungen an die Oberfläche. Zwischen dem Verbrauch des Analyten und seinem Angebot besteht ein Gleichgewicht. Daraus ergibt sich die Massentransportkonstante k_m :



Entspricht das Angebot des freien Analyten der Nachfrage, dann spielen Massentransporteffekte keine Rolle:

$$A_{bulk} = A_{Oberfläche} \quad (8.24)$$

Das Angebot des Analyten setzt sich zusammen aus der molaren Konzentration des Analyten pro Fläche und Zeiteinheit. Daraus ergibt sich die Diffusionsrate in der Lösung:

$$0.98 \cdot \sqrt[3]{\frac{D^2 \cdot f}{h^2 \cdot w \cdot l}} \cdot C = 0.98 \cdot k_m \cdot C \quad (8.25)$$

Der Verbrauch des Analyten setzt sich zusammen aus seiner molaren Konzentration pro Fläche und Zeiteinheit. Daraus ergibt sich die Bindungsrate des Liganden:

$$k_a \cdot G \cdot (R_{\max} - R_t) \cdot C \quad (8.26)$$

D=Diffusionskoeffizient

f=Flussrate

h, w, l=Dimensionen der Flusszelle

k_m =Massentransportkoeffizient

G=Umrechnungsfaktor von RU zur Konzentration

Erklärung:

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten- oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 24.8.2007

Stefanie Mühlfeld

Lebenslauf:

Persönliche Angaben:

Name: Stefanie Mühlfeld
Geburtsdatum: 1.12.1978
Geburtsort: Moers
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

08/1989 – 06/1998
Gymnasium in den Filder Benden, Moers
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10/1998 – 09/2003
Biologiestudium, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Abschluss: Diplom-Biologin

Seit 10/2003
Promotion in der Abteilung für Molekulare Parasitologie,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf