

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Vorstand: Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer

Identifizierung von Proteinen, die an die carboxyterminale zytoplasmatische Domäne
des CRF₁-Rezeptors binden, und biochemische Charakterisierung der Wechselwirkung
zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maik Engeholm

aus

Offenbach am Main

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Herms
Prof. Dr. K. Beyer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Jan Deussing

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 01.04.2004

Für Johannes

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der "Corticotropin-releasing factor"-Rezeptor 1 (CRF ₁ -Rezeptor)	1
1.1.1	Heptahelikale Rezeptoren im allgemeinen	1
1.1.1.1	Signaltransduktion heptahelikaler Rezeptoren durch Guaninnukleotid bindende Proteine	1
1.1.1.2	Transduktion mitogener Signale durch heptahelikale Rezeptoren	3
1.1.1.3	Oligomerisierung heptahelikaler Rezeptoren	7
1.1.2	Der CRF ₁ -Rezeptor im besonderen	12
1.1.2.1	Molekularbiologie und Zellbiologie	12
1.1.2.2	Modulation der synaptischen Plastizität durch CRF	13
1.2	Das Protein 95 der Postsynaptischen Densität ["postsynaptic density protein 95 (PSD-95)"]	14
1.3	Motivation und Zielrichtung der Arbeit	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Klonierungsarbeiten	25
2.1.1	Standardtechniken (Phenol/Chloroform-Extraktion, Ethanolpräzipitation, Agarosegelelektrophorese, Kultur von E.coli)	25
2.1.2	Reverse Transkription (RT) und Polymerase-Kettenreaktion ["polymerase chain reaction" (PCR)]	26
2.1.3	Verdau mit Restriktionsendonukleasen	27
2.1.3.1	Verdau von DNA-Molekülen zum Einsatz in einer Ligation	27
2.1.3.2	Verdau von in kleinem Maßstab präparierter Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken	28
2.1.4	Dephosphorylierung der 5'-Enden von mit nur einem Enzym geschnittenen Vektoren	28
2.1.5	Ligation zur Klonierung von DNA-Fragmenten	29
2.1.5.1	Ligation zur Klonierung von durch Verdau von Plasmiden oder PCR-Produkten erzeugten DNA-Fragmenten	29

2.1.5.2	Ligation zur Klonierung von durch Hybridisierung synthetisch hergestellter Oligodeoxynukleotide erzeugten kurzen doppelstängigen DNA-Fragmenten	29
2.1.6	Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	29
2.1.7	Plasmid-Präparation	30
2.1.8	Sequenzierung	31
2.2	Arbeiten mit Hefe	31
2.2.1	Kultur von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
2.2.2	Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA	
2.2.3	Charakterisierung von Nährstoffansprüchen von mit Plasmid transformierten oder aus einer Verpaarung hervorgegangener Hefen und Test auf α -Galaktosidaseaktivität	32
2.2.4	Verpaarung von Hefen in kleinem Maßstab	33
2.2.5	Verpaarung mit prätransformierten Bibliothekshefen	33
2.2.6	Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe	34
2.3	Arbeiten mit Säugerzellen und Koimmunopräzipitation	34
2.3.1	Kultur von HEK293-Zellen	34
2.3.2	Transfektion von HEK293-Zellen mit der Kalziumphosphatmethode	35
2.3.3	Herstellung von Lysaten von transfizierten HEK293-Zellen	35
2.3.4	Immunopräzipitation	36
2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), Transfer auf Nitrozellulosemembran und Immunodetektion	36
2.3.6	Fixieren von transfizierten HEK293-Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie	37
3	Ergebnisse	38
3.1	"Yeast Two-Hybrid"-Suche nach Proteinen, die mit der zytoplasmatischen Domäne des CRF ₁ -Rezeptors interagieren	38
3.1.1	Zum Prinzip des "Yeast Two-Hybrid"-Systems	38
3.1.2	Zum Prinzip der Suche nach Interaktionspartnern zu einem gegebenen Protein mit Hilfe des "Yeast Two-Hybrid"-Systems	40
3.1.2.1	Allgemeines	40
3.1.2.2	Das "Matchmaker Gal4 Two-Hybrid System 3" der Firma Clontech	41

3.1.3	Konstruktion von Vektoren zur Expression der zytoplasmatischen Domänen des CRF ₁ - und CRF ₂ -Rezeptors in Hefe	42
3.1.4	Expression der zytoplasmatischen Domänen der CRF ₁ - und CRF ₂ -Rezeptoren in Hefe	43
3.1.5	Durchsuchen einer "Yeast Two-Hybrid"-Bibliothek nach Proteinen, die an die zytoplasmatische Domäne des CRF ₁ -Rezeptors binden	45
3.1.6	Identifizierung falsch positiver Klone in der Hefe	47
3.1.7	Die durch unsere Suche gefundenen und in der Hefe als spezifische bestätigten Interaktoren	51
3.1.8	Überprüfung einer möglichen Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne des CRF ₂ -Rezeptors und PDZ-Domänen-Proteinen mit Hilfe des "Yeast Two-Hybrid"-Systems	53
3.2	Bestätigung und biochemische Analyse der durch die "Yeast Two-Hybrid"-Suche gefundenen Interaktion zwischen dem CRF ₁ -Rezeptor und PSD-95 in HEK293-Zellen	54
3.2.1	Zum Prinzip der Koimmunopräzipitation von exogen exprimierten und mit zusätzlichen Epitopen versehenen Proteinen	54
3.2.2	Konstruktion von Vektoren zur Expression des mit zusätzlichen Epitopen versehenen CRF ₁ -Rezeptors in Säugerzellen	55
3.2.3	Konstruktion von Vektoren zur Expression der in den bestätigten Hefeklonen vorkommenden Bibliotheksproteine in Säugerzellen	60
3.2.4	Interaktion zwischen dem CRF ₁ -Rezeptor und PSD-95 in HEK293-Zellen	62
3.2.5	Konstruktion von Vektoren zur Expression von CRF ₁ -Rezeptormutanten mit verändertem C-terminalen "TAV"-Motiv in Säugerzellen	63
3.2.6	Bedeutung des C-terminalen "TAV"-Motivs des CRF ₁ -Rezeptors für die Interaktion mit PSD-95	63
3.2.7	Konstruktion von pcDNA3_PSD-95_flag und Vektoren zur Expression von Deletionsmutanten von PSD-95	64
3.2.8	Bedeutung der PDZ-Domänen von PSD-95 für die Interaktion mit dem CRF ₁ -Rezeptor	66
4	Diskussion	69
5	Schrifttumverzeichnis	75

Anhang I: Sequenzen und Plasmide	84
Anhang II: Oligodeoxynucleotide	91
Anhang III: Zusammensetzung von Lösungen und Medien	92
Anhang IV: Bezugsquellennachweise	95
Zusammenfassung	100
Danksagung	101
Lebenslauf	102

1 Einleitung

1.1 Der "Corticotropin-releasing factor"-Rezeptor 1 (CRF₁-Rezeptor)

1.1.1 Heptahelikale Rezeptoren im allgemeinen

1.1.1.1 Signaltransduktion heptahelikaler Rezeptoren durch Guaninnukleotid bindende Proteine

Heptahelikale Rezeptoren sind Teil einer dreistufigen Signaltransduktionskaskade (Abbildung 1). Der durch Bindung des Liganden an seine extrazellulären Domänen aktivierte Rezeptor erfährt eine Konformationsänderung, die sich auch auf die intrazellulären Anteile des Moleküls überträgt. Diese Konformationsänderung vermittelt die Aktivierung angeschlossener heterotrimerer Guaninnukleotid bindender Proteine, kurz G-Proteine. G-Proteine sind regulatorische Proteine, die im Zuge ihrer Aktivierung durch heptahelikale Rezeptoren in eine jetzt mit Guanosintriphosphat (GTP) bestückte α -Untereinheit und ein $\beta\gamma$ -Dimer zerfallen. In diesem dissoziierten Zustand vermögen beide Komponenten regulatorisch auf verschiedene Effektormoleküle zu wirken. Dabei handelt es sich entweder um Enzyme, die - wie beispielsweise Adenylatzyklase oder Phospholipase C - intrazelluläre Botenstoffe ("second messenger") produzieren, oder um Ionenkanäle der Plasmamembran wie Ca²⁺- oder K⁺-Kanäle.

Die Wirkung des einzelnen G-Proteins ist zeitlich begrenzt durch die intrinsische Guanosintriphosphatase (GTPase)-Aktivität der α -Untereinheit: Nach erfolgter Hydrolyse von GTP zu Guanosindiphosphat (GDP) reassoziert die α -Untereinheit mit einem $\beta\gamma$ -Dimer, und für eine Reaktivierung ist ein erneuter Kontakt mit einem ligandenstimulierten Rezeptor erforderlich. Der gesamte Prozeß ist katalytischer Natur, das heißt ein durch Ligandenbindung stimulierter Rezeptor vermag, immer neue G-Proteine zu aktivieren. Daraus resultiert eine starke Amplifikation des ursprünglichen Signals (Rockman et al., 2002).

Höhere Säugetiere verfügen über mehr als 1000 verschiedene heptahelikale Rezeptoren. Die Anzahl heterotrimerer G-Proteine ist mit 15 bisher identifizierten α -Untereinheiten deutlich kleiner. Jeder heptahelikale Rezeptor wechselwirkt spezifisch nur mit einem oder wenigen ganz bestimmten G-Proteinen. Die G-Proteine besitzen wiederum eine genau definierte Wirkung auf einen bestimmten Effektor. Somit löst jedes Paar von Ligand und Rezeptor eine spezifische zelluläre Signalantwort aus: Beispielsweise stimuliert Adrenalin nach Bindung an den β_2 -

Adrenozeptor - vermittelt über die G-Proteinuntereinheit $G\alpha_s$ - die Adenylatzyklase und damit die Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP); nach Bindung an den α_1 -Adrenozeptor wird dagegen – vermittelt durch $G\alpha_q$ – Phospholipase C aktiviert und damit die Produktion von Inositol-1,4,5-trisphosphat ($InsP_3$) und Diacylglycerol (DAG) gesteigert (Rockman et al., 2002).

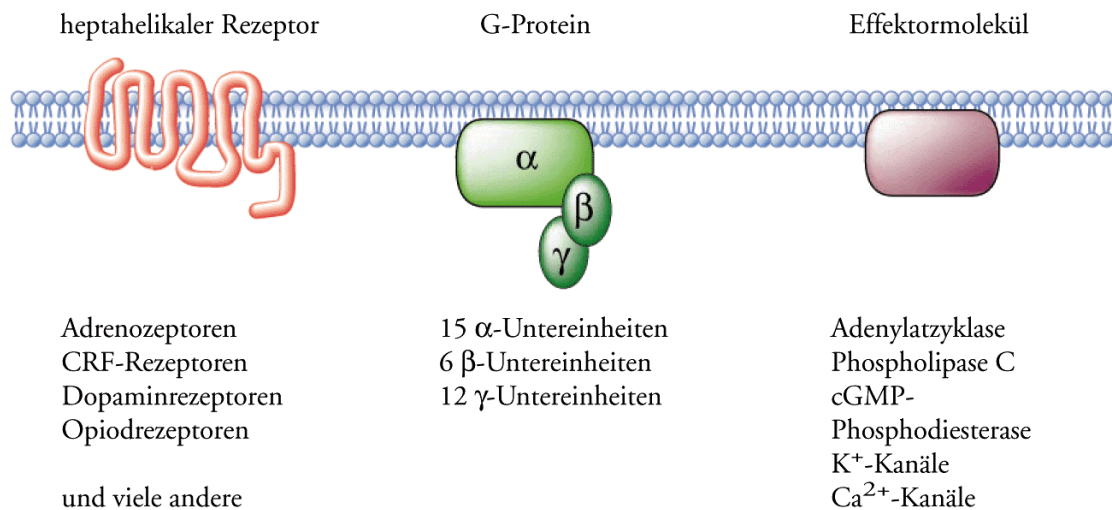


Abbildung 1 Dreistufige Signaltransduktionskaskade, bestehend aus heptahelikalem Rezeptor, Guaninnukleotid bindendem Protein und Effektormolekül. Erklärung siehe Text. Nach Rockman et al., 2002.

Eine längerandauernde oder wiederholte Stimulierung heptahelikaler Rezeptoren führt zu einer starken Abnahme der durch den Agonisten in der Zelle auslösbaren Signalantwort. Dieses Phänomen wird als Rezeptordesensibilisierung ("desensitization") bezeichnet. Desensibilisierung kann auf einer Abnahme der Anzahl von Rezeptoren in der Zelle beruhen, bedingt durch eine verminderte Neusynthese oder einen beschleunigten Abbau des Rezeptorproteins. Dieser Vorgang ist als Herabregulierung des Rezeptors ("receptor downregulation") bekannt und spielt sich in einem zeitlichen Rahmen von Stunden ab (Rockman et al., 2002).

Auf schnellerem Wege kann eine Rezeptordesensibilisierung erfolgen, indem der Rezeptor von seinen angeschlossenen G-Proteinen entkoppelt wird. Die Entkopplung wird durch eine Phosphorylierung zyttoplasmatischer Anteile des Rezeptors erreicht. Eine solche Phosphorylierung kann von Proteinkinasen ausgeführt werden, deren Aktivität durch "second messenger" wie cAMP oder DAG reguliert wird und die damit mittelbar auch unter der Kontrolle heptahelikaler Rezeptoren stehen. Beispiele dafür sind Proteinkinase A (PKA) oder Proteinkinase C (PKC). Der von diesen Kinasen phosphorylierte Rezeptor erfährt eine Konformationsänderung, die seine Affinität zu den ihm angeschlossenen G-Proteinen stark reduziert, möglicherweise aber auch eine Wechselwirkung mit einem anderen Typ G-Protein erst ermöglicht (Daaka et al., 1997). Die

Aktivität dieser Kinasen bleibt dabei nicht auf die Rezeptoren beschränkt, deren Stimulation zur Aktivierung der Kinasen beigetragen hat, sondern es werden auch ruhende Rezeptoren ungeachtet ihrer Spezifität hinsichtlich der Liganden oder der nachgeschalteten G-Proteine phosphoryliert. Man spricht hier deshalb auch von heterologer Desensibilisierung (Rockman et al., 2002).

Demgegenüber betrifft die homologe Desensibilisierung ausschließlich Rezeptoren, die mit ihrem Liganden besetzt sind. Sie beruht auf einer Phosphorylierung im Bereich des Carboxyterminus des Rezeptors durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK). Das sind Kinasen, die spezifisch den durch Bindung des Liganden in der aktivierten Konformation stabilisierten Rezeptor erkennen und phosphorylieren. Die durch GRK ausgeführte Phosphorylierung allein ist dabei nicht ausreichend, um den Rezeptor von den ihm angeschlossenen G-Proteinen abzukoppeln. Vielmehr vermittelt diese Phosphorylierung die Bindung von Mitgliedern einer Klasse regulatorischer Proteine, der Arrestine, an den Rezeptor. Arrestine sind Adaptorproteine, die eine zentrale Rolle für die Regulation der Signaltransduktion und des Stoffwechsels heptahelikaler Rezeptoren spielen. Neben dem ursprünglich identifizierten visuellen Arrestin, das in Photorezeptoren vorkommt und hier mit Rhodopsin interagiert, sind zwei β -Arrestine (β -Arrestin1 und β -Arrestin2) gefunden worden, denen ein sehr breites und größtenteils überlappendes Expressionsmuster gemeinsam ist. Innerhalb des Gehirns finden sich die höchsten Konzentrationen beider Proteine in den postsynaptischen Densitäten der Dendriten (Attramadal et al., 1992). Die Bindung eines Arrestinmoleküls an den durch GRK modifizierten Rezeptor bildet ein sterisches Hindernis für dessen Wechselwirkung mit G-Proteinen (Pierce und Lefkowitz, 2001; Rockman et al., 2002).

1.1.1.2 Transduktion mitogener Signale durch heptahelikale Rezeptoren

In vielen Fällen erschöpft sich die Desensibilisierung heptahelikaler Rezeptoren nicht in einer Entkopplung von angeschlossenen G-Proteinen, sondern die desensibilisierten Rezeptoren werden auch innerhalb der Zelle umverteilt. Dabei gelangen die Rezeptoren zunächst durch einen als Internalisierung bezeichneten Prozeß in Endosomen. Die Verweildauer in diesem Kompartiment kann sehr unterschiedlich lang sein. Hier können die Rezeptoren entweder dephosphoryliert werden und daraufhin als funktionelle Rezeptoren an die Oberflächenmembran zurückkehren – man bezeichnet das als Resensibilisierung ("resensitization") – oder sie werden in Lysosomen transportiert und dort degradiert. Letzterer Vorgang kann zur Herabregulierung von Rezeptoren beitragen (Sorkin und von Zastrow, 2002).

Der am besten untersuchte Mechanismus zur Internalisierung von Proteinen der Oberflächenmembran basiert auf einer Abschnürung von mit Clathrin bedeckten Vesikeln, die im Inneren der Zelle ihren Clathrinmantel rasch verlieren und damit zu frühen Endosomen werden (DeLuca-Flaherty et al., 1990). Sofern die Internalisierung heptahelikaler Rezeptoren nach diesem Mechanismus erfolgt, spielen Arrestine wiederum eine entscheidende Rolle. Beide β -Arrestine interagieren mit zumindest zwei Komponenten der Clathrin abhängigen Endozytosemaschinerie, nämlich der leichten Kette von Clathrin selbst sowie einer Untereinheit des AP2-Adaptorkomplexes. β -Arrestine können also die Assoziation des phosphorylierten Rezeptorproteins mit Clathrin und AP2 vermitteln und somit helfen, den zur Internalisierung bestimmten Rezeptor in mit Clathrin bedeckte Vertiefungen ("Clathrin coated pits") einzufügen. Diese sind Ausgangspunkt für die Abschnürung von mit Clathrin bedeckten Vesikeln (Pierce und Lefkowitz, 2001; Sorkin und von Zastrow, 2002).

Einige heptahelikale Rezeptoren (Klasse A Rezeptoren, zum Beispiel β_2 -Adrenozeptoren) binden nach Phosphorylierung durch GRK bevorzugt β -Arrestin2, während andere (Klasse B Rezeptoren, zum Beispiel Angiotensin AT_{1A} -Rezeptoren oder Vasopressin V_2 -Rezeptoren) gleichermaßen mit β -Arrestin1 oder β -Arrestin2 assoziieren (Oakley et al., 2000). Dieses unterschiedliche Verhalten wird vom Carboxyterminus heptahelikaler Rezeptoren bestimmt und scheint für das weitere Schicksal der Rezeptoren nach deren Internalisierung bedeutsam zu sein: Rezeptoren, die im Verbund mit β -Arrestin2 internalisieren, geben die Bindung an das regulatorische Protein sehr rasch, noch vor Erreichen des eigentlichen Endosoms, wieder auf. Solche Rezeptoren verbleiben meist nur kurze Zeit intrazellulär, werden dephosphoryliert und können bereits nach 30 Minuten wieder an der Zelloberfläche erscheinen. Dagegen scheint β -Arrestin1 eine deutlich stabilere Bindung mit den internalisierten Rezeptoren der Klasse B einzugehen. Noch 60 Minuten nach erfolgter Internalisierung lassen sich β -Arrestin1 enthaltende Rezeptorkomplexe in Assoziation mit Endosomen nachweisen (Oakley et al., 2000; Oakley et al., 2001). Diese Komplexe können für die Aussendung mitogener Signale durch heptahelikele Rezeptoren bedeutsam sein.

Heptahelikale Rezeptoren können die Aktivierung Mitogen aktivierter Proteinkinasen (MAP-Kinasen) vermitteln. Unter dem Oberbegriff MAP-Kinasen werden die durch extrazelluläre Signale regulierbaren Kinasen (ERK), die p38 Proteinkinasen sowie die c-Jun Aminoterminal Kinasen (JNK) zusammengefaßt, von denen jeweils mehrere Isoformen bekannt sind. Nach erfolgter Aktivierung im Zytoplasma translozieren diese Kinasen typischerweise in den Zellkern, um dort durch Phosphorylierung unterschiedlicher Zielproteine – häufig Transkriptionsfaktoren – spezifische Genexpressionsprogramme zu initiieren (Davis, 2000).

Eine Aktivierung von MAP-Kinasen durch heptahelikale Rezeptoren erfordert in einigen Fällen die Internalisierung des heptahelikalen Rezeptors (Daaka et al., 1998) sowie eine Tyrosinphosphorylierung der Adaptorproteine Shc und Gab1 (Cazaubon et al., 1994; Chen et al., 1996; Ohmichi et al., 1994; van Biesen et al., 1995), während die klassischen Effektorsysteme wie Adenylatzyklase oder Phospholipase C dabei nicht benötigt werden (Alblas et al., 1993; van Corven et al., 1993). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liefert der Befund, daß zum Beispiel der durch seinen Liganden stimulierte β_2 -Adrenozeptor vermittelt über β -Arrestine die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-src bindet. c-src erfährt durch die Bindung an den Rezeptor- β -Arrestin-Komplex eine Aktivierung. Weiterhin unterbindet die Überexpression einer β -Arrestin1-Mutante, die in ihrer Fähigkeit mit c-src zu assoziieren stark eingeschränkt ist, die durch den β_2 -Adrenozeptor vermittelte Stimulation von ERK1 (Luttrell et al., 1999). Die durch β -Arrestin vermittelte Rekrutierung einer Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase an den von seinen klassischen Effektorsystemen bereits entkoppelten Rezeptor kann also eine wichtige Rolle für die Transduktion mitogener Signale durch heptahelikale Rezeptoren spielen.

Möglicherweise reicht die Bedeutung der Arrestine in diesem Kontext aber noch weiter: β -Arrestine vermögen, MAP-Kinasekaskaden zu organisieren und im Zusammenspiel mit heptahelikalen Rezeptoren die Aktivität und subzelluläre Lokalisation dieser MAP-Kinasekaskaden zu kontrollieren.

Die Aktivität von MAP-Kinasen wird unmittelbar durch eine Familie übergeordneter Kinasen, sogenannter MAP-Kinasekinasen oder MAP-2-Kinasen, reguliert. Diese befinden sich wiederum unter der Kontrolle von MAP-2-Kinasekinasen oder MAP-3-Kinasen. Eine bestimmte MAP-Kinase wird dabei spezifisch nur von einer oder wenigen MAP-2-Kinasen phosphoryliert, und diese werden ihrerseits wieder nur von genau definierten MAP-3-Kinasen aktiviert. So wird zum Beispiel JNK3 durch die MAP-2-Kinase MKK4 phosphoryliert und aktiviert und die Aktivierung von MKK4 kann durch die MAP-3-Kinase ASK1 erfolgen. Analog dazu verläuft die Aktivierung von ERK1 über die MAP-2-Kinase MEK und die MAP-3-Kinase Raf. Eine Kreuzaktivierung von ERK1 durch ASK1 oder von JNK3 durch Raf wird aber nicht beobachtet. MAP-Kinase, MAP-2-Kinase und MAP-3-Kinase schließen sich also zu einem Signaltransduktionsmodul oder einer Kaskade zusammen, die jeweils durch einen bestimmten Stimulus aktiviert werden kann und daraufhin ein genau definiertes Signal generiert (Davis, 2000).

Für die Funktion solcher MAP-Kinasekaskaden spielen Adaptormoleküle, die als Gerüst für die Versammlung der verschiedenen Kinasen dienen ("scaffolds"), eine wichtige Rolle. Diese Adaptorproteine können die Interaktion funktionell zusammengehöriger Kinasen erleichtern und damit die Effizienz der Kopplung und die Spezifität innerhalb des Moduls steigern. In diesem

Sinne wirken β -Arrestine als "scaffolds" für verschiedene MAP-Kinasekaskaden. So kann β -Arrestin2 gleichzeitig mit der MAP-Kinase JNK3 und der zugehörigen MAP-3-Kinase ASK1 direkt interagieren und beide β -Arrestine können ERK1 und Raf gleichzeitig binden (Luttrell et al., 2001; McDonald et al., 2000) (Abbildung 2). Die Koexpression von β -Arrestin2 ermöglicht die Aktivierung von JNK3 durch (exogenes) ASK1, die in Abwesenheit von exogen exprimiertem β -Arrestin2 nicht beobachtet wird (McDonald et al., 2000).

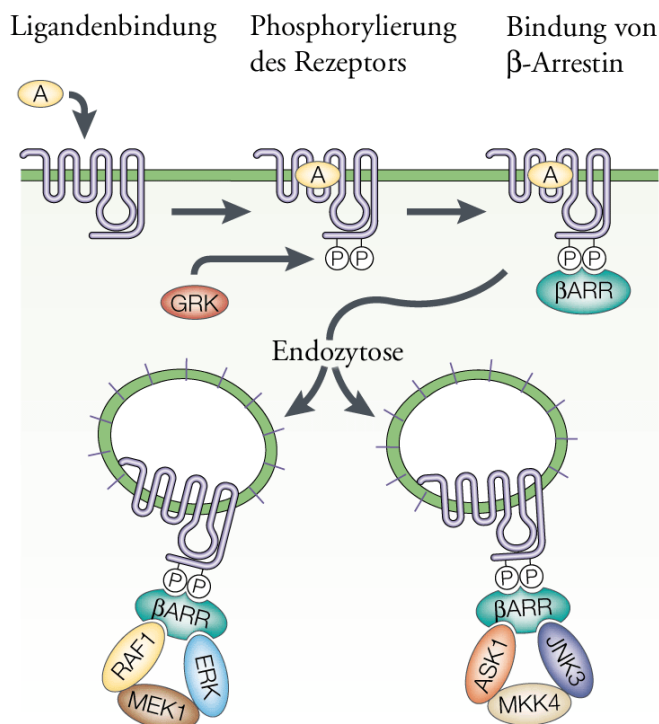


Abbildung 2 β -Arrestine als Gerüst für die Versammlung von MAP-Kinasekaskaden. Die aktivierten MAP-Kinasen verbleiben in einem Komplex mit dem internalisierten heptahelicalen Rezeptor. Näheres siehe Text. Nach Pierce and Lefkowitz, 2001.

Die Versammlung der MAP-Kinasen auf der Basis der β -Arrestine eröffnet aber noch zwei weitere äußerst wichtige Möglichkeiten: Zum einen bringen β -Arrestine die Aktivität der MAP-Kinasen letztlich unter die Kontrolle heptahelicaler Rezeptoren. So gestattet in heterologen, Angiotensin AT_{1A} -Rezeptor tragenden Zellen (in Abwesenheit von exogenem ASK1) erst die Expression von exogenem β -Arrestin2 eine meßbare Stimulation von JNK3 durch Angiotensin (McDonald et al., 2000). Zum anderen können β -Arrestine die subzelluläre Lokalisation der durch heptahelicalen Rezeptoren aktivierten MAP-Kinasen bestimmen. Die durch Stimulation mit Angiotensin aktivierten MAP-Kinasen JNK3 oder ERK2 verbleiben in einem Endosomen assoziierten Komplex mit dem internalisierten AT_{1A} -Rezeptor und β -Arrestin2 (Luttrell et al., 1999; McDonald et al., 2000) (Abbildung 2). Das erscheint vor allem deshalb bemerkenswert,

weil aktivierte MAP-Kinasen nach der herkömmlichen Vorstellung in den Kern translozieren und zytoplasmatische Substrate für diese Kinasen bisher überhaupt nicht bekannt sind.

1.1.1.3 Oligomerisierung heptahelikaler Rezeptoren

Zwei oder allgemein mehrere heptahelikale Rezeptoren können miteinander assoziieren und bilden dann oligomere Komplexe in der Membran aus. Zur Analyse solcher Komplexe sind verschiedene Methoden eingesetzt worden. Neben der Koimmunopräzipitation haben vor allem auch Techniken wie Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) und Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) Anwendung gefunden. Diese Methoden gestatten, die Dimerisierung in lebenden Zellen nachzuweisen. Dazu wird eines der Moleküle, die das Dimer ausbilden, mit einem (biolumineszierenden oder fluorszierenden) Energiedonor, das andere mit einem dazu kompatiblen, fluorszierenden Energieakzeptor versehen. Die Effizienz des beobachteten Energietransfers hängt dann unter anderem von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor ab, und eine hohe Übertragungseffizienz kann als beweisend für eine enge räumliche Nachbarschaft beider Gruppen gelten (Bouvier, 2001).

Durch Koimmunopräzipitation wurde unter anderem die Homodimerisierung des β_2 -Adrenozeptors (Hebert et al., 1996), metabotropen Glutamatrezeptors mGluR5 (Romano et al., 1996), δ -Opioidrezeptors (Jordan und Devi, 1999) sowie des M3-Muskarinrezeptors (Zeng und Wess, 1999) gezeigt; mit Hilfe der Resonanzenergietransfer-Techniken wurden Homodimere des β_2 -Adrenozeptors (Angers et al., 2000), α -Verpaarungsfaktorrezeptors (Overton und Blumer, 2000), δ -Opioidrezeptors (McVey et al., 2001) und des TSH-Rezeptors (Kroeger et al., 2001) nachgewiesen. Neben diesen Beispielen für eine Homooligomerisierung hat man auch eine Assoziation zwischen unterschiedlichen heptahelikalen Rezeptoren gefunden. Das wurde zuerst für die γ -Aminobuttersäure [" γ -aminobutyric acid" (GABA)]_{B1}- und GABA_{B2}-Rezeptoren beschrieben, die erst durch diese Heterodimerisierung einen funktionellen GABA-Rezeptor ausbilden können (Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1998; White et al., 1998). Inzwischen ist eine Heterooligomerisierung für verschiedene heptahelikale Rezeptoren gezeigt worden: Der δ -Opioidrezeptor dimerisiert sowohl mit dem κ -Opioidrezeptor (Jordan und Devi, 1999) als auch dem μ -Opioidrezeptor (George et al., 2000) (sowie des weiteren mit dem β_2 -Adrenozeptor), der Dopamin D₁-Rezeptor mit dem Adenosin A₁-Rezeptor (Gines et al., 2000), der Angiotensin AT₁-Rezeptor mit dem Bradykinin B₂-Rezeptor (AbdAlla et al., 2000) und so fort.

Der Zusammenschluß mehrerer Rezeptoren kann vermutlich auf Interaktionen zwischen unterschiedlichen Anteilen der Rezeptorproteine beruhen. Disulfidbrücken im Bereich des Rezeptoraminoterminus können zu einer Stabilisierung von Rezeptoroligomeren beitragen, in den meisten Fällen sind sie allerdings nicht alleine für eine Dimerisierung verantwortlich (Kunishima et al., 2000; Romano et al., 2001; Tsuji et al., 2000; Zhang et al., 2001). Von größerer allgemeiner Bedeutung sind wahrscheinlich hydrophobe Interaktionen zwischen den in der Membran befindlichen α -Helices heptahelikaler Rezeptoren. Ein Leucin-Glycin-Motiv innerhalb der sechsten Transmembrandomäne des β_2 -Adrenozeptors ist als wesentliche strukturelle Determinante für die Homodimerisierung dieser Rezeptoren identifiziert worden; ein sich von dieser Dimerisierungsoberfläche ableitendes Peptid unterbindet nicht nur die Dimerisierung des Rezeptors, sondern interferiert auch mit der Stimulation der Adenylatzyklase durch den Rezeptor (Hebert et al., 1996). Auch andere Transmembrandomänen gehen wahrscheinlich ähnliche Kontakte ein (Ng et al., 1996). Im Beispiel der GABA_{B1}- und GABA_{B2}-Rezeptoren beteiligt sich schließlich auch der Carboxyterminus an der Heterooligomerisierung (White et al., 1998). Beide GABA_B-Rezeptoren besitzen in dieser Region ein coiled-coil-Motiv und können durch diese Motive miteinander wechselwirken. Obwohl diese Interaktion für die Heterodimerisierung der beiden Rezeptorproteine letztlich nicht notwendig ist, spielt sie für den Transport der Rezeptordimere an die Zelloberfläche und für ihre Funktion jeweils eine entscheidende Rolle (Margeta-Mitrovic et al., 2000). Für die Oligomerisierung anderer heptahelikaler Rezeptoren, zum Beispiel von δ -Opioidrezeptoren, ist der Carboxyterminus absolut erforderlich (Cvejic und Devi, 1997).

Während strukturelle Daten zur Topologie der Rezeptoroligomere bisher fehlen, weisen einige funktionelle Untersuchungen darauf hin, daß ein Austausch von Domänen zwischen den in einem Komplex zusammengeschlossenen Rezeptormolekülen stattfindet. Ein chimärer Rezeptor, bestehend aus dem Aminoterminus und den ersten fünf Transmembrandomänen des α_2 -Adrenozeptors und den Transmembrandomänen VI und VII sowie dem Carboxyterminus des M₃-Muskarinrezeptors, bindet weder Adrenalin/Noradrenalin noch Acetylcholin und produziert nach Applikation der Liganden folglich auch keine Signalantwort. Dasselbe gilt für ein dazu komplementäres Fusionsprotein, bestehend aus den Transmembrandomänen I-V des M₃-Rezeptors und den letzten beiden Transmembrandomänen des α_2 -Adrenozeptors. Werden dagegen beide Fusionsproteine in derselben Zelle exprimiert, läßt sich eine Bindung sowohl von Acetylcholin als auch Adrenalin/Noradrenalin nachweisen, und beide Liganden rufen eine für den jeweiligen in das Fusionsprotein eingegangenen Rezeptor typische Signalantwort hervor (Maggio et al., 1993). Dieser Befund läßt sich damit erklären, daß im Zuge einer Dimerisierung

ein intermolekularer Austausch bestimmter Segmente der Rezeptormonomere stattfindet und daß nach erfolgter Dimerisierung die funktionelle Signaltransduktionseinheit aus Anteilen verschiedener, in diesem Fall unterschiedlicher Rezeptormoleküle aufgebaut ist (Abbildung 3). Man hat diesen Mechanismus auch als „domain swapping“ bezeichnet und als allgemeines Funktionsprinzip heptahelikaler Rezeptoren vorgeschlagen (Gouldson et al., 2000).

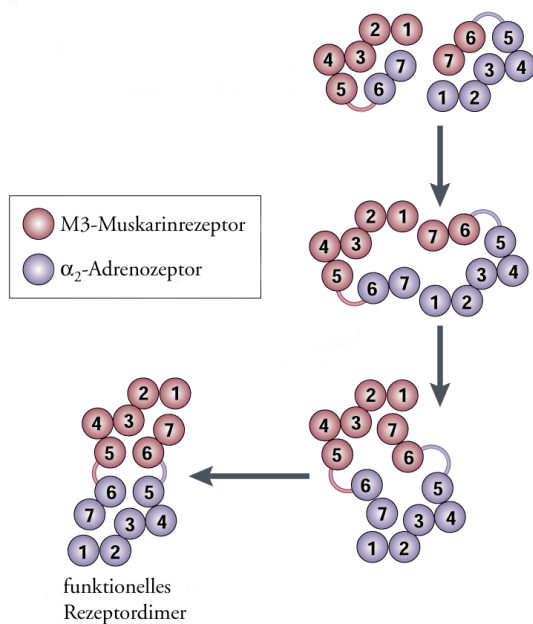


Abbildung 3 Domänen-austausch zwischen heptahelikalen Rezeptoren. Die funktionelle Signaltransduktionseinheit wird von Anteilen verschiedener Rezeptormoleküle aufgebaut. Näheres siehe Text. Nach Bouvier, 2001.

Während sich dieses Modell insoweit auf die Betrachtung künstlich geschaffener Rezeptormoleküle stützt, spielt eine Transkomplementierung durch Austausch von Segmenten unterschiedlicher Rezeptoren im Zuge einer Dimerisierung möglicherweise auch für die Ausbildung funktioneller Wildtyprezeptoren eine Rolle. Der $\text{GABA}_{\text{B}1}$ -Rezeptor bedarf der Koexpression seines Dimerisierungspartners, des $\text{GABA}_{\text{B}2}$ -Rezeptors, um als reifes Protein in die Plasmamembran zu gelangen. Durch eine geeignete genetische Manipulation läßt sich diese Notwendigkeit umgehen, und es resultiert ein mutantes $\text{GABA}_{\text{B}1}$ -Protein, das auch ohne Unterstützung von $\text{GABA}_{\text{B}2}$ die Zelloberfläche erreicht. Beide Rezeptorproteine können jetzt unabhängig voneinander in heterologen Zellen exprimiert werden. In solchen Experimenten zeigt sich, daß keines der beiden Proteine für sich einen funktionellen GABA-Rezeptor darstellt. Erst in Zellen, die beide Proteine gleichzeitig exprimieren, kann durch GABA eine Signalantwort ausgelöst werden, wozu weiterhin die funktionelle Integrität der schon erwähnten coiled-coil-Motive im Carboxyterminus erforderlich ist (Margeta-Mitrovic et al., 2000). Möglicherweise liegt also im Fall des GABA_{B} -Rezeptors die eigentliche Signaltransduktionseinheit auf zwei unterschiedliche Moleküle verteilt vor, so daß funktionell zusammengehörige Anteile erst durch einen intermolekularen Austausch von Segmenten zusammengefügt werden.

Die Oligomerisierung beeinflusst eine Vielzahl von Aspekten der Funktion heptahelikaler Rezeptoren einschließlich Reifung und Transport der Proteine an die Zelloberfläche, Ligandenbindung, Signaltransduktion, Rezeptorinternalisierung und Entstehung von Toleranz und bietet damit – zumindest theoretisch – zahlreiche Möglichkeiten zur Regulation und Modulation der Rezeptorfunktion.

Erst durch Koexpression des GABA_{B2}-Rezeptors gelangt die (wildtypische) GABA_{B1}-Rezeptoruntereinheit als terminal glykosyliertes Protein an die Zelloberfläche, während der für sich allein exprimierte GABA_{B1}-Rezeptor in einem Nicht-Oberflächen-Membran-Kompartiment zurückgehalten wird. Die Ursache für dieses Verhalten liegt in einem Signal zur Retention im endoplasmatischen Retikulum ("ER-retention signal"), das sich im Carboxyterminus des GABA_{B1}-Proteins, nicht aber des GABA_{B2}-Proteins findet. Eine frühe Heterodimerisierung der beiden Proteine bereits im endoplasmatischen Retikulum führt – vermittelt durch eine Wechselwirkung zwischen den beiden coiled-coil-Strukturen – zu einer Maskierung des "ER-retention signal", das mit dem coiled-coil-Motiv des GABA_{B1}-Carboxyterminus sogar teilweise überlappt (Margeta-Mitrovic et al., 2000). Die Heterooligomerisierung ist in diesem Fall also für die Reifung und den Oberflächentransport eines heptahelikalen Rezeptors erforderlich.

Durch Heterooligomerisierung heptahelikaler Rezeptoren können Rezeptoren mit neuartigen pharmakologischen Eigenschaften entstehen. δ - und κ -Opioidrezeptoren können heterodimerisieren. Die resultierenden Rezeptorkomplexe zeigen nur eine sehr geringe Affinität sowohl gegenüber δ -Opioidrezeptor spezifischen Agonisten/Antagonisten wie [D-Pen^{2,5}]enkephalin (DPDPE) beziehungsweise 7-benzylidenenaltrexone (BNTX) als auch gegenüber κ -selektiven Agonisten wie Dynorphin A. Nicht selektive Substanzen wie Diprenorphin binden dagegen mit viel höherer Affinität als an jeden der beiden Mutterrezeptoren alleine (Jordan und Devi, 1999). Damit besitzen die heterooligomeren δ/κ -Opioidrezeptoren ein Ligandenbindungsverhalten, das dem des κ_2 -Opioidrezeptors (Zukin et al., 1988) stark ähnelt. Dieser Rezeptortyp ist bisher nur pharmakologisch beschrieben worden, es konnte aber kein korrespondierendes Gen oder Protein identifiziert werden. Auch hinsichtlich der benutzten Signaltransduktionsmechanismen unterscheiden sich einige der bisher gefundenen Heterooligomere heptahelikaler Rezeptoren qualitativ von den einzeln untersuchten Ausgangsrezeptoren (George et al., 2000; Jordan und Devi, 1999).

Wie Rezeptorinternalisierung und Entstehung von Toleranz durch Oligomerisierung beeinflusst werden können, ist schließlich in einer beeindruckenden Arbeit am Beispiel des μ -Opioidrezeptors (MOR) gezeigt worden (He et al., 2002). Der MOR vermittelt Analgesie und ist für die Entstehung einer Opiatabhängigkeit verantwortlich. Morphin, eines der potentesten

klinisch eingesetzten Analgetika, aktiviert den MOR, löst aber im Unterschied zu anderen Agonisten weder eine Desensibilisierung noch eine Internalisierung des Rezeptors aus. Dieses Verhalten – starke Aktivierung bei fehlender Desensibilisierung des Rezeptors und die daraus resultierende prolongierte Stimulation der Zelle – ist für die bei längerfristiger Applikation bald auftretende Abschwächung der Wirkung von Morphin verantwortlich gemacht worden. Dieses Phänomen wird als Toleranz bezeichnet und läßt sich auch auf zellulärer Ebene erfassen, indem beispielsweise die basale Produktion von cAMP zur Beurteilung der Ansprechbarkeit mit Morphin herangezogen wird: Eine akute Gabe von Morphin senkt den cAMP-Spiegel in der Zelle, und in durch chronische Applikation morphintoleranten Zellen findet man erhöhte basale cAMP-Konzentrationen als Ausdruck einer kompensatorischen Superaktivierung des cAMP-Systems. Durch Austausch des Carboxyterminus des MOR gegen den des δ -Opioidrezeptors (DOR) entsteht D-MOR, eine MOR-Mutante, die nach Aktivierung durch Morphin ausgeprägt desensibilisiert und internalisiert. Tatsächlich entwickeln Zellen, die D-MOR exprimieren, eine Toleranz gegenüber Morphin nur in viel geringerem Ausmaß als Schwesterzellen, die den Wildtyp-MOR besitzen (Finn und Whistler, 2001).

Der chimäre D-MOR und der Wildtyp MOR können heterooligomerisieren. In Zellen, die beide Proteine koexprimieren, (nicht aber in Zellen, die MOR allein exprimieren) erfährt der MOR nach Stimulation mit Morphin eine ausgeprägte Internalisierung. Der Befund legt nahe, daß diese Internalisierung des MOR durch eine Wechselwirkung mit D-MOR innerhalb heterooligomerer Komplexe vermittelt wird.

Aber auch innerhalb homooligomerer MOR-Komplexe bestimmen die Korezeptoren über die Internalisierung des einzelnen Rezeptormonomers offensichtlich mit. [D-Ala²,N-methyl-Phe⁴,Gly⁵-ol]enkephalin (DAMGO) aktiviert den MOR und bewirkt eine Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors. Durch eine kombinierte Gabe von Morphin und DAMGO, so daß die MOR in einem Verhältnis von 50 : 1 mit Morphin und DAMGO besetzt und die zur Verfügung stehenden Bindungsstellen in etwa gerade eben gesättigt sind, läßt sich eine ausgeprägte Internalisierung von MOR erzielen. Die Anwesenheit von DAMGO alleine in derselben Konzentration wie zuvor – die Mehrheit der Rezeptoren bleibt jetzt also unbesetzt – bewirkt dagegen nahezu keine Internalisierung. Die Besetzung schon relativ weniger MOR-Rezeptormoleküle innerhalb eines homooligomeren Komplexes mit DAMGO bewirkt also, daß eine viel größere Zahl von Korezeptoren nach Aktivierung durch Morphin desensibilisiert und internalisiert – im Gegensatz zu dem Verhalten von MOR in Abwesenheit von DAMGO. Die molekularen Grundlagen dieses Phänomens sind noch unverstanden, aber die klinischen Konsequenzen könnten weitreichend sein. Tatsächlich kann eine Koapplikation von DAMGO in einer Dosis, die für sich alleine weder eine Rezeptorinternalisierung auslöst noch analgetisch

wirksam ist, in der Ratte die Entwicklung von Toleranz gegenüber Morphin verhindern (He et al., 2002).

1.1.2 Der CRF₁-Rezeptor im besonderen

1.1.2.1 Molekularbiologie und Zellbiologie

Der "corticotropin-releasing factor" (CRF)-Rezeptor 1 (CRF₁-Rezeptor) gehört der Familie 2 heptahelikaler Rezeptoren an (Bockaert und Pin, 1999). Der Rezeptor ist in verschiedenen Spezies vom Fisch bis zum Menschen identifiziert und kloniert worden (Arai et al., 2001; Chen et al., 1993; Dautzenberg et al., 1997; Perrin et al., 1993; Vita et al., 1993). Der in verschiedenen Säugetieren gefundene CRF₁-Rezeptor bindet mit hoher Affinität sowohl CRF und Urocortin (UCN) (Vaughan et al., 1995; Vita et al., 1993), die wahrscheinlich die endogenen Liganden in Säugetieren darstellen, als auch Urotensin I (URO) und Sauvagine (SVG), zwei vom Fisch beziehungsweise Frosch isolierte Peptide der CRF-Familie. Die unlängst im Menschen und der Maus identifizierten Neuropeptide Stresscopin (SCP)/Urocortin III (UCNIII) (Hsu und Hsueh, 2001; Lewis et al., 2001) und "stresscopin related peptide" (SRP) /Urocortin II (UCNII) (Reyes et al., 2001), die ebenfalls zur Familie der CRF-Peptide gehören, binden dagegen nicht an den CRF₁-Rezeptor.

Der CRF₁-Rezeptor kann – vermittelt über das stimulatorische G-Protein G_s – die Adenylatzyklase aktivieren und damit verschiedene cAMP-abhängige Signaltransduktionswege in Gang setzen (Dautzenberg et al., 2000). Dazu gehört eine Stimulation der Proteinkinase A, die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB und damit die Aktivierung CREB-abhängiger Genexpressionsprogramme (Hauger und Dautzenberg, 1999). Daneben kann – vermittelt durch G_q – auch eine Aktivierung der Phospholipase C erfolgen (Grammatopoulos et al., 2000). Der benutzte Signaltransduktionsweg scheint stark von dem jeweils untersuchten Zelltyp abzuhängen; in einigen Fällen, beispielsweise in kortikalen Neuronen, vermittelt der CRF₁-Rezeptor eine gleichzeitige Aktivierung der beiden Effektorsysteme (Grammatopoulos et al., 2000; Karteris et al., 2001). In heterologen Zellen, die den CRF₁-Rezeptor exogen exprimieren, können UCN und SVG, nicht aber CRF, unabhängig von PKA MAP-Kinasen aktivieren (Grammatopoulos et al., 2000; Rossant et al., 1999). Die beobachteten Unterschiede zwischen den Liganden sind auf ein unterschiedliches Ausmaß der jeweils erreichten PKC-Aktivierung zurückgeführt worden, wonach die durch CRF hervorgerufene PKC-Aktivierung einen kritischen Schwellenwert nicht überschreiten würde.

Eine prolongierte CRF-Exposition führt zu einer Abschwächung der durch CRF auslösbaren cAMP-Antwort und ACTH-Freisetzung sowohl in Primärkulturen von Hypophysenzellen als auch in der aus einem Hypophysenadenom etablierten Zelllinie AtT20 (Aguilera et al., 2001). Diese CRF-Resistenz ist von einer Herabregulierung des CRF₁-Rezeptors begleitet. In der Zelllinie Y79 löst CRF eine homologe Desensibilisierung des CRF₁-Rezeptors aus, die maßgeblich durch GRK3 vermittelt wird (Dautzenberg et al., 2001).

1.1.2.2 Modulation der synaptischen Plastizität durch CRF

Der Begriff "synaptische Plastizität" beschreibt Veränderungen der Effizienz der synaptischen Übertragung in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität. Die Effizienz der Übertragung an einer bestimmten Synapse und damit der Grad der Kopplung zwischen präsynaptischem und postsynaptischem Neuron sind dynamisch und werden durch das an dieser Synapse zuvor verzeichnete Aktivierungsmuster mitbestimmt. Jede individuelle Synapse verfügt also über ein synaptisches Gedächtnis.

Synaptische Plastizität ist am ausführlichsten an Schnittpräparationen des Hippokampus untersucht worden. Hier kann mit einem geeigneten Stimulationsprotokoll eine Zunahme oder Abnahme in der Amplitude der durch einen konstant gehaltenen Reiz auslösbaren Antwort hervorgerufen werden. Erweisen sich diese Veränderungen in einem zeitlichen Fenster von Stunden als stabil, so spricht man von einer langwährenden Potenzierung ["long term potentiation" (LTP)] beziehungsweise einer langwährenden Depression ["long term depression" (LTD)] der synaptischen Übertragung. Zur Untersuchung dieser Vorgänge betrachtet man häufig die von den Schaffer-kollateralen an den Pyramidenzellen der CA1-Region ausgebildeten Synapsen; die Stimulationselektrode wird dann über den Schaffer-kollateralen platziert, die Ableitelektrode befindet sich in der CA1-Region entweder im Stratum radiatum, der Schicht der Dendriten, oder im Stratum pyramidale, der Schicht der Zellkörper. Im letzteren Fall wird die erhaltene Signalantwort auch als "population spike" bezeichnet. In einer solchen Versuchsanordnung lässt sich LTP zum Beispiel durch Hochfrequenzstimulation (der Standardreiz wird für die Dauer einer Sekunde mit einer Frequenz von 100 Hertz dargeboten) und LTD durch Niedrigfrequenzstimulation (einige Hundert Standardreize werden mit einer Frequenz von 1 Hertz dargeboten) auslösen (Bear und Malenka, 1994).

"θ-burst stimulation" (TBS) – beispielsweise fünf 100-Hertz Pulse mit jeweils fünf Stimuli pro Puls und einem Inter-Puls-Abstand von 200 ms – stellt ein grenzwertig schwaches Protokoll zur Auslösung von LTP dar. An naiven Schnitten löst eine solche Stimulation keine

langwährende Zunahme in der Amplitude von "population spikes" aus, an Schnitten, die dagegen zuvor für 20 Minuten mit CRF inkubiert worden sind, bewirkt dasselbe Stimulationsprotokoll eine Potenzierung der Amplitude der "population spikes", die über mindestens eine Stunde anhält ["population spike-LTP" (PS-LTP)]. In ähnlicher Weise kann TBS in hippocampalen Schnitten von Tieren, die unmittelbar vor ihrer Dekapitation einem Streßparadigma unterworfen wurden, PS-LTP induzieren, während an Schnitten von Kontrolltieren wie auch von mit dem CRF-Antagonisten [Glu^{11,16}]astressin vorbehandelten, gestressten Tieren, PS-LTP unter diesen Stimulationsbedingungen nicht zu beobachten ist. Die gestressten Tiere zeigen in einem "contextual fear conditioning"-Paradigma eine bessere Lernleistung als Kontrollen. Auch dieser Effekt ist durch eine Vorbehandlung mit [Glu^{11,16}]astressin antagonisierbar (Blank et al., 2002).

Eine Vorbehandlung mit CRF *in vitro* oder akuter Streß *in vivo* versetzen also hippocampale Synapsen in einen Zustand, in dem sie auf eine schwache Reizung eher mit LTP reagieren als naive Synapsen. Dabei erfährt die Plastizität der Synapse, also die Gesetzmäßigkeit, nach der die Synapse synaptische Aktivität mit einer Zunahme oder Abnahme der Übertragungseffizienz beantwortet, eine Veränderung. Solche Veränderungen der synaptischen Plastizität an sich werden auch als Metaplastizität bezeichnet. Die Schlußfolgerung, daß die durch CRF oder akuten Streß vermittelte Modulation der synaptischen Plastizität auch dem veränderten Lernverhalten der Tiere zugrundeliegt, ist zwar nicht zwingend, liegt aber nahe.

1.2 Das Protein 95 der Postsynaptischen Densität ["postsynaptic density protein 95 (PSD-95)"]

PSD-95 ist als ein Bestandteil postsynaptischer Verdichtungen ["postsynaptic densities" (PSD)] identifiziert worden (Cho et al., 1992). Nach morphologischen Kriterien lassen sich zwei Gattungen zentralnervöser Synapsen unterscheiden, von denen eine sich durch eine elektronenoptisch sehr dicht erscheinende Struktur unmittelbar unterhalb der postsynaptischen Membran auszeichnet (Uchizono, 1965). Diese Struktur wird als PSD bezeichnet, und die entsprechenden Synapsen können mit glutamatergen, exzitatorischen Synapsen gleichgesetzt werden (Ottersen und Landsend, 1997). Die PSD kann auch als biochemisches Kompartiment aufgereinigt werden (Cho et al., 1992).

PSD-95 verfügt von N-terminal nach C-terminal über drei PDZ [für PSD-95, "discs large" (Dlg), "zonula occludens 1" (ZO-1)]-Domänen, eine SH ("Src homology")3-Domäne und

eine GK (Guanylatkinase-ähnliche)-Domäne (siehe auch Abbildung 8). Diese Domänen können jeweils Interaktionen mit einer Reihe von zum Teil sehr verschiedenartigen Proteinen vermitteln (Tabelle 1). Die Aufgabe von PSD-95 besteht vermutlich in der Organisation zumindest einiger dieser Proteine in dynamischen membranassoziierten Proteinkomplexen der Postsynapse.

"Shaker-type K ⁺ channel" (spannungsabhängiger K ⁺ -Kanal) (Kim et al., 1995)	PDZ-Domänen 1 und 2
NMDA-Rezeptoruntereinheit 2B (Kornau et al., 1995)	PDZ-Domänen 1 und 2
Neuronale NO-Synthase (Brenman et al., 1996)	PDZ-Domäne 2
SynGAP (Ras-GTPase aktivierendes Protein) (Kim et al., 1998)	PDZ-Domänen 1 bis 3
CRIP1 (Cysteinreiches Protein, das an die PDZ-Domäne 3 von PSD-95 bindet) (Niethammer et al., 1998)	PDZ-Domäne 3
Neurologin (Irie et al., 1997)	PDZ-Domäne 3
AKAP79/150 (PKA aktivierendes Protein) (Colledge et al., 2000)	GK-Domäne
MAP1A (Mikrotubulus- assoziiertes Protein 1A) (Brenman et al., 1998)	GK-Domäne
GAKIN (Guanylatkinase- assoziiertes Kinesin) (Hanada et al., 2000)	GK-Domäne
GKAP (Guanylatkinase-assoziertes Protein) (Kim et al., 1997)	GK-Domäne

Tabelle 1 Proteine, die mit verschiedenen Domänen von PSD-95 wechselwirken.

Wahrscheinlich muß PSD-95 oligomerisieren, um ein Gerüst mit hinreichend vielen Bindungswerten für den Aufbau solcher Komplexe bereitstellen zu können. Für die Oligomerisierung von PSD-95 spielt der ungewöhnliche Aufbau der SH3-Domäne des Moleküls eine entscheidende Rolle (McGee et al., 2001; Woods et al., 1996).

Bei der typischen SH3-Domäne handelt es sich um eine dreidimensionale Faltung von fünf β -Faltblattstrukturen, die in zwei Ebenen jeweils antiparallel angeordnet sind, wobei die β -Faltblätter der vorderen Ebene (A, B₁ und E) in etwa orthogonal auf denen in der hinteren Ebene (B₂, C und D) stehen ("anti-parallel β -barrel with orthogonal packing"). Die einzelnen Faltblätter werden jeweils nur durch kurze Sequenzen voneinander getrennt. Unter Beteiligung einer kurzen, zwischen den Faltblättern D und E angeordneten Helix (3₁₀-Helix) wird eine hydrophobe Interaktionsoberfläche aufgebaut, die die Wechselwirkung mit Liganden vermittelt, die über eine Polyprolin Typ II Helix verfügen (Musacchio et al., 1994).

Die SH3-Domäne in PSD-95 weicht in ihrem Aufbau radikal von kanonischen SH3-Domänen ab. Ein sechstes β -Faltblatt (Faltblatt F) lagert sich den fünf regulären Faltblättern an und trägt maßgeblich zur Stabilisierung der gesamten Faltungsdomäne bei. In Projektion auf die lineare Struktur des Proteins findet man die sechs β -Faltblätter der SH3-Domäne teilweise weit

auseinandergerissen. Zwischen den Faltblättern D und E – anstelle der erwähnten 3_{10} -Helix also – befindet sich eine große, im Kristall teils ungeordnet erscheinende Schleife, die als Scharnierregion ("hinge region") bezeichnet wird, und die Faltblätter E und F sind durch die gesamte GK-Domäne voneinander getrennt (Abbildung 4). Diese diskontinuierliche Verteilung der am Aufbau der SH3-Domäne beteiligten Faltblattstrukturen erlaubt es, zwei Abschnitte innerhalb des SH3-GK-Moduls abzugrenzen: Ein N-terminaler Abschnitt wird dabei von den ersten vier, miteinander kompakt verbundenen Faltblättern A bis D gebildet. Ein C-terminaler Abschnitt enthält die Faltblätter E und F mitsamt der eingeschobenen GK-Domäne. Beide Abschnitte werden durch die Scharnierregion voneinander getrennt. Die so definierten Abschnitte entsprechen physikalisch miteinander interagierenden Subdomänen des SH3-GK-Moduls: Ein Fragment, das die Faltblätter A bis D umfaßt, assoziiert *in vitro* mit einem zweiten Fragment, das die Faltblätter E und F mit der zwischengeschalteten GK-Domäne enthält. Beide Faltblätter E und F müssen sich dabei auf einem Fragment mit der GK-Domäne befinden und müssen die GK-Domäne flankieren. Die Anwesenheit der GK-Domäne zwischen den Faltblättern E und F ist auch für die Ausbildung einer stabilen SH3-Faltungsdomäne innerhalb des vollständigen SH3-GK-Moduls entscheidend. Da in der Kristallstruktur kaum direkte Kontakte zwischen den beiden Faltungsdomänen festzustellen sind, beruht dieser Effekt vermutlich auf einer optimalen Ausrichtung der unmittelbar angrenzenden Faltblätter E und F durch die GK-Domäne, so daß diese sich effizient mit der von den vier Faltblättern A bis D gebildeten Subdomäne zusammenlagern können (McGee et al., 2001).

Somit lassen sich innerhalb des SH3-GK-Moduls zwei unabhängige Interaktionsdomänen – im Unterschied zu den in der dreidimensionalen Struktur physikalisch von der Umgebung abgesonderten Faltungsdomänen – abgrenzen, durch deren Assoziation die SH3-Domäne von PSD-95 entsteht. Die miteinander interagierenden Domänen können sich dabei auf ein und demselben oder auch auf zwei verschiedenen Molekülen befinden. Letzteres bedeutet einen intermolekularen Austausch zueinander korrespondierender Interaktionsdomänen im Sinne eines "domain swapping" und bietet eine Möglichkeit zur Oligomerisierung. Auch höhere Oligomere können auf diese Weise gebildet werden, wenn die beiden pro Monomer vorkommenden Interaktionsdomänen mit jeweils komplementären Domänen auf zwei unterschiedlichen Partnermolekülen assoziieren. Man beachte weiterhin, daß bei dieser Form der Oligomerisierung sowohl die GK-Domänen als auch die im Zuge der Assoziation gebildeten SH3-Domänen in vollem Umfang für die Bindung anderer Proteine zur Verfügung stehen; oligomere Komplexe von PSD-95 können ihrer mutmaßlichen Aufgabe in der Organisation membranassoziierter Proteinkomplexe somit sehr gut gerecht werden (McGee et al., 2001).

In vitro wird die intramolekulare Assoziation der beiden Interaktionsdomänen gegenüber der intermolekularen deutlich bevorzugt, und das SH3-GK-Modul von PSD-95 liegt fast ausschließlich in der monomeren Form vor. Um die für eine intramolekulare Assoziation erforderliche Opposition der beiden auf demselben Molekül befindlichen Interaktionsdomänen zu ermöglichen, wird eine gewisse Flexibilität der Scharnierregion benötigt. So existiert ein mutantes SH3-GK-Modul, das anstelle der Scharnierregion ein starres Verbindungsstück besitzt, zum großen Teil als Dimer (McGee et al., 2001). *In vivo* könnte eine vergleichbare Versteifung der Scharnierregion durch eine Bindung regulatorischer Proteine in diesem Bereich erreicht werden. Tatsächlich sind Proteine identifiziert worden, die mit der Scharnierregion verschiedener Homologe von PSD-95 assoziieren, darunter auch das durch Ca^{2+} -Ionen steuerbare Calmodulin (Lue et al., 1994; Masuko et al., 1999). Ein regulierbarer Übergang zwischen einer oligomeren, hinsichtlich der Organisation von Proteinkomplexen eigentlich biologisch aktiven Form und einer in dieser Beziehung vermutlich viel weniger wirksamen, monomeren Form könnte eine Möglichkeit zur raschen und direkten Kontrolle der Funktion von PSD-95 bieten.

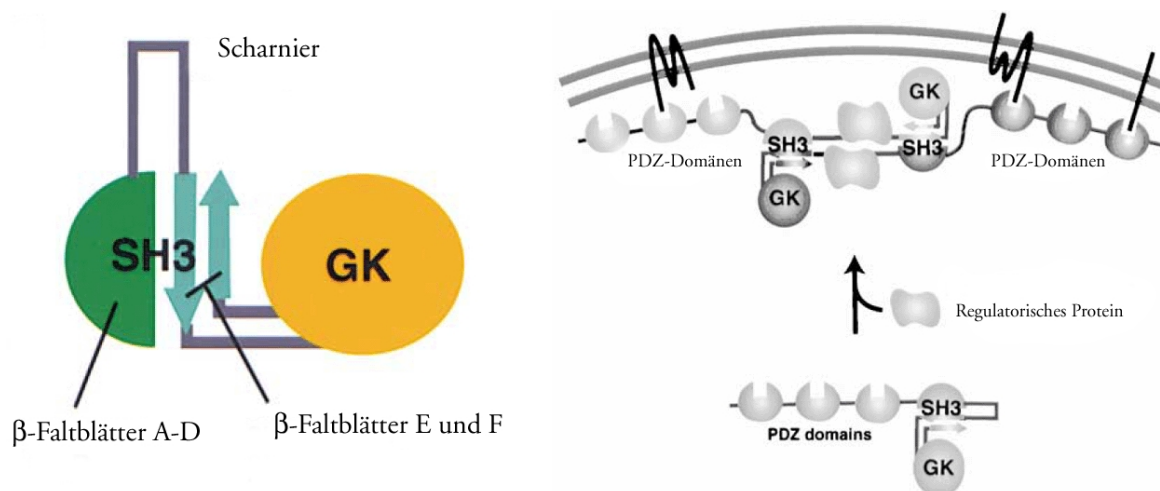


Abbildung 4 Schematisierter Aufbau des SH3-GK-Moduls von PSD-95 und vorgeschlagener Mechanismus für einen regulierbaren Übergang zwischen Monomer und Oligomer. Erklärung siehe Text. Nach McGee et al., 2001.

Die Überexpression von PSD-95 führt zu einer Zunahme der Anzahl synaptischer α -Amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolpropinat (AMPA)-Rezeptoren (El Husseini et al., 2000). AMPA-Rezeptoren sind ionotrope Glutamatrezeptoren. Die präsynaptische Freisetzung von Glutamat bewirkt einen rasch ansteigenden und ebenso rasch wieder inaktivierenden Einstrom von Kationen in die Postsynapse, der dort eine Depolarisation auslöst. Dieser Strom wird hauptsächlich von AMPA-Rezeptoren vermittelt. Die Leitfähigkeit postsynaptischer AMPA-

Rezeptoren bestimmt also das Ausmaß der postsynaptischen Erregung, mit dem die präsynaptische Freisetzung einer gegebenen Menge an Transmitter beantwortet wird, das heißt die Effizienz der synaptischen Übertragung oder den Grad der Kopplung zwischen dem präsynaptischen und postsynaptischen Neuron. Diese Parameter sind – wie bereits ausgeführt – hoch dynamisch und ihre Veränderung wird unter anderem durch eine Zunahme oder Abnahme in der Zahl synaptischer AMPA-Rezeptoren erreicht (Malinow und Malenka, 2002). AMPA-Rezeptoren in den Dendriten von Neuronen können sich zu großen Komplexen zusammenschließen, die als immunoreaktive puncta beispielsweise per Immunfluoreszenzmikroskopie mit einem gegen eine AMPA-Rezeptoruntereinheit gerichteten Antikörper dargestellt werden können. Die Mehrzahl dieser puncta kolokalisiert mit präsynaptischen Markern wie Synaptophysin und man identifiziert solche puncta mit synaptischen AMPA-Rezeptoren (Washbourne et al., 2002).

Hippokampale Neurone, die ein fluoreszenzmarkiertes PSD-95 mit der ungefähr fünf- bis zehnfachen Konzentration des endogenen Proteins exprimieren, zeigen im Vergleich zu nicht transfizierten Nachbarzellen eine durchschnittlich 2,5-fach stärkere Signalintensität synaptischer AMPA-Rezeptor puncta. Diese vermehrte Immunreaktivität geht einher mit einer Zunahme sowohl der Amplitude als auch der Frequenz von spontan zu erhaltenden erregenden postsynaptischen Strömen ["miniature excitatory postsynaptic currents" (mEPSC)] (El Husseini et al., 2000): Aus den präsynaptischen Endigungen kultivierter Neurone kann spontan Neurotransmitter (Glutamat) freigesetzt werden, wobei jeweils die gesamte in einem präsynaptischen Vesikel gespeicherte Menge an Transmitter auf einmal abgegeben wird. Ein solches Freisetzungereignis kann einen kurzen, depolarisierenden Strom in dem von der freisetzenden Präsynapse kontaktierten Neuron bewirken. Diese Ströme werden als mEPSC bezeichnet. Ihre Amplitude hängt neben der Größe des freigesetzten Transmitterquants entscheidend von der Leitfähigkeit (und damit von der Anzahl) subsynaptisch vorhandener AMPA-Rezeptoren ab. Aber auch die Frequenz der mEPSC wird sowohl von präsynaptischen Faktoren (Häufigkeit der Vesikelfreisetzung) als auch von postsynaptischen Einflüssen bestimmt: Jedes Neuron verfügt über eine gewisse Anzahl an Postsynapsen, in denen keine AMPA-Rezeptoren vorkommen, sogenannte stumme Synapsen ("silent synapses"). Diese werden erst im Verlauf der Entwicklung in Abhängigkeit von der zu verzeichnenden neuronalen Aktivität mit AMPA-Rezeptoren ausgestattet (Malinow und Malenka, 2002). Je nach Anzahl solcher stummer Synapsen wird ein bestimmter Prozentsatz von Freisetzungereignissen durch kontaktierende präsynaptische Neurone undetektiert bleiben. Eine Zunahme in der Frequenz von mEPSC kann also auch auf einer AMPAifizierung ("AMPAfication" (Malinow und Malenka, 2002)) stummer Synapsen beruhen.

Die durch Überexpression von PSD-95 bewirkte Vermehrung funktioneller synaptischer Glutamatrezeptoren betrifft dabei spezifisch AMPA-Rezeptoren. N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptoren – ebenfalls ionotrope Glutamatrezeptoren – sind unverändert (El Husseini et al., 2000). Die durch NMDA-Rezeptoren vermittelten Ströme spielen für die Depolarisation der Postsynapse und damit für die gegenwärtige Transmission nur eine untergeordnete Rolle. Vielmehr kann eine Aktivierung dieser Rezeptoren eine langfristige Änderung in der Effizienz der synaptischen Übertragung im Sinne von LTP/LTD induzieren. Die Zahl synaptischer NMDA-Rezeptoren unterliegt in viel geringerem Umfang Veränderungen als die der AMPA-Rezeptoren.

Weiterhin unterscheiden sich Neuronen, die in Gegenwart von exogenem PSD-95 in Kultur gereift sind, auch morphologisch von nicht transfizierten Zellen. So ist die Anzahl großer dendritischer Protrusionen ("spines") (Durchmesser > 1 µm) in den PSD-95 exprimierenden Neuronen etwa viermal größer und auch die Gesamtanzahl dendritischer Protrusionen ist erhöht (El Husseini et al., 2000). Die Entstehung neuer dendritischer Protrusionen und die Größenzunahme von solchen Protrusionen werden im Zuge der Reifung von Neuronen sowohl in Kultur als auch *in vivo* beobachtet und sind mit der Ausbildung und Stabilisierung synaptischer Kontakte eng verknüpft (Marrs et al., 2001). Zumindest in den in der Studie von El-Husseini erzielten, deutlich überphysiologischen Konzentrationen fördert PSD-95 diesen Reifungsprozeß.

Für die hier beobachteten Effekte von PSD-95 ist eine Palmitoylierung des Proteins erforderlich. Dabei handelt es sich um eine kovalente Lipidmodifikation, die im allgemeinen ausreicht, um Proteine in der Membran zu verankern. Eine Mutante von PSD-95, die eine solche Modifikation nicht mehr erfahren kann, zeigt eine diffuse Verteilung in Neuronen und scheint, synaptische AMPA-Rezeptorkomplexe sogar leicht zu destabilisieren (El Husseini et al., 2000). Eine andere Mutante, der die GK-Domäne (mitsamt den flankierenden, zur SH3-Domäne gehörenden Anteilen) fehlt und die folglich nach dem über die intermolekulare Vervollständigung der SH3-Domäne vermittelten Mechanismus nicht homo-oligomerisieren kann, zeigt sich zwar weniger aktiv als das Wildtypprotein, vermag die durchschnittliche Signalintensität synaptischer AMPA-Rezeptor puncta aber immer noch auf das etwa 1,8-fache zu steigern (El Husseini et al., 2000).

Eine direkte Interaktion mit PSD-95, wie sie beispielsweise für verschiedene NMDA-Rezeptoruntereinheiten gezeigt werden konnte, ist keiner der Untereinheiten von AMPA-Rezeptoren möglich. Der Befund, daß die Überexpression von PSD-95 in hippokampalen Neuronen selektiv eine vermehrte Organisation von AMPA-Rezeptoren in synaptischen Komplexen zur Folge hat, überrascht insofern zunächst. Eine mögliche Erklärung bietet das

Protein Stargazin, das als Bindeglied zwischen PSD-95 und verschiedenen AMPA-Rezeptoruntereinheiten funktionieren kann.

Bei Stargazin handelt es sich um ein integrales Membranprotein mit vier Transmembrandomänen (Letts et al., 1998). Stargazin interagiert über ein im C-Terminus vorhandenes PDZ-Domänen-Ligandenmotiv mit PSD-95 und anderen neuronalen MAGUK. Daneben kann das Protein über einen nicht näher charakterisierten Mechanismus mit verschiedenen AMPA-Rezeptoruntereinheiten assoziieren. In heterologen Zellen ermöglicht Stargazin eine Bündelung der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR1 in der Oberflächenmembran durch PSD-95 (Chen et al., 2000).

In Stargazin-defizienten Tieren erscheinen in den Körnerzellen des Kleinhirns keine funktionellen AMPA-Rezeptoren an der Zelloberfläche, obwohl die einzelnen Rezeptoruntereinheiten gebildet werden. Dieser Defekt beschränkt sich wahrscheinlich deshalb auf die Körnerzellen des Kleinhirns, weil in anderen AMPA-Rezeptor tragenden Neuronen Isoformen von Stargazin exprimiert werden. Die Expression von Stargazin in kultivierten Körnerzellen von Stargazin-defizienten Mäusen hat eine Expression synaptischer AMPA-Rezeptoren zur Folge. Durch Expression einer Mutante von Stargazin, der das PDZ-Domänen-Ligandenmotiv fehlt, gelangen AMPA-Rezeptoren zwar an die Zelloberfläche, werden aber nicht in die Postsynapse eingebaut. Diese Mutante besitzt dominant-negative Eigenschaften: Ihre Expression - beispielsweise in hippokampalen Neuronen – bewirkt einen Verlust von synaptischen, nicht aber von oberflächenständigen AMPA-Rezeptoren (Chen et al., 2000).

Die Palmitoylierung ist – ähnlich beispielsweise einer Phosphorylierung – eine reversible Proteinmodifikation (Milligan et al., 1995; Mumby, 1997). Auch die Palmitatgruppen von PSD-95 unterliegen einem ständigen Umsatz. Die Palmitoylierung und Depalmitoylierung des Proteins sind enzymatisch vermittelte Reaktionen. In kultivierten hippokampalen Neuronen findet eine konstitutive Depalmitoylierung von PSD-95 statt, und eine Inhibition der Palmitoylierung hat binnen kurzer Zeit einen vollständigen Verlust der Palmitatgruppen von PSD-95 zur Folge. Die Geschwindigkeit des Depalmitoylierungsprozesses, die sich unmittelbar in der Halbwertszeit der Palmitatmarkierung ausdrückt, wird dabei durch die Aktivität ionotroper Glutamatrezeptoren kontrolliert. Eine pharmakologische Blockade von NMDA- und/oder AMPA-Rezeptoren inhibiert die Depalmitoylierung von PSD-95. Derselbe Effekt wird durch eine künstliche Verknappung von Ca^{2+} -Ionen erzielt, wohingegen eine Aktivierung von Glutamatrezeptoren die Depalmitoylierung von PSD-95 beschleunigt (El Husseini et al., 2002).

Die Depalmitoylierung von Proteinen kann durch die Erreichbarkeit der Palmitatgruppen für depalmitoylierende Enzyme kontrolliert werden. So ist am Beispiel anderer Proteine gezeigt

worden, daß eine durch Aktivierung induzierte Konformationsänderung des palmitoylierten Proteins selbst den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Depalmitoylierungsreaktion darstellt (Wedegaertner und Bourne, 1994). Die durch eine Aktivierung ionotroper Glutamatrezeptoren verursachte Beschleunigung der Depalmitoylierung von PSD-95 beruht daher möglicherweise weniger auf einer Rekrutierung und/oder Aktivierung depalmitoylierender Enzyme, als vielmehr auf einer aktivitätsabhängigen Konformationsänderung von PSD-95, die die Palmitatgruppen gegenüber einem konstitutiv aktiven, depalmitoylierenden Enzym vermehrt exponiert. Die aktivitätsabhängige Depalmitoylierung von PSD-95 sollte jedenfalls nicht mit einem durch die Aktivierung von Glutamatrezeptoren ausgelösten, globalen Anstieg der Depalmitoylierung in der Postsynapse gleichgesetzt werden.

PSD-95 kann – ähnlich den AMPA-Rezeptoren – oligomere Komplexe ausbilden, die sich als immunoreaktive puncta darstellen lassen. Dazu ist die Palmitoylierung des Proteins Voraussetzung; eine Mutante von PSD-95, die diese Modifikation nicht erfahren kann, wird nicht in solche Komplexe miteinbezogen, sondern verteilt sich gleichmäßig im Zytoplasma (Craven et al., 1999). In kultivierten hippokampalen Neuronen führt eine Inhibition der Palmitoylierung innerhalb weniger Stunden zu einer drastischen Reduktion der Signalintensität synaptischer PSD-95-puncta. Zugleich wechselt ein erheblicher Anteil des zunächst überwiegend als membranassoziiertes Protein vorliegenden PSD-95 in das Zytoplasma der Neuronen über (El Husseini et al., 2002). Demnach können zwei Formen des zellulären PSD-95 unterschieden werden: palmitoyliertes PSD-95, das innerhalb membranassoziiierter oligomerer Komplexe vorkommt, und freies, zytoplasmatisches Protein, das nicht palmitoyliert ist. Die Palmitoylierung und Depalmitoylierung steuern den Übergang zwischen diesen beiden Formen und spielen für den Aufbau und die Aufrechterhaltung beziehungsweise den Abbau oder die Auflösung synaptischer PSD-95 Komplexe eine entscheidende Rolle. Damit steht die Stabilität dieser Komplexe auch unter der Kontrolle ionotroper Glutamatrezeptoren. Die Blockade von Glutamatrezeptoren hemmt die Depalmitoylierung von PSD-95 und schützt PSD-95-Komplexe vor dem durch eine Inhibition der Palmitoylierung induzierten Abbau (El Husseini et al., 2002).

Die durch eine Inhibition der Palmitoylierung bewirkte Auflösung synaptischer PSD-95-Komplexe geht einher mit einem Verlust synaptischer AMPA-Rezeptoren. Dieser Verlust manifestiert sich einerseits in einer Reduktion der Signalintensität synaptischer AMPA-Rezeptor-puncta, andererseits in einer Abnahme der Amplitude und vor allem der Frequenz der (durch synaptische AMPA-Rezeptoren vermittelten) mEPSC. Da diese Effekte sehr wahrscheinlich auf Veränderungen in der Postsynapse beruhen, wird offensichtlich ein großer Teil der glutamatergen Synapsen durch einen Abzug synaptischer AMPA-Rezeptoren stillgelegt, während in den ansprechbar verbleibenden Synapsen die Zahl synaptischer AMPA-Rezeptoren ebenfalls

vermindert ist. Die synaptischen NMDA-Rezeptor-puncta und die Leitfähigkeit synaptischer NMDA-Rezeptoren bleiben dagegen von dem pharmakologisch induzierten Abbau der PSD-95-Komplexe unberührt (El Husseini et al., 2002).

Oligomere Komplexe von PSD-95 können also ein dynamisches Gerüst für die Organisation synaptischer AMPA-Rezeptorkomplexe darstellen, durch dessen – hier pharmakologisch herbeigeführten – Abbau eine rasche Entfernung der synaptischen AMPA-Rezeptoren von der Zelloberfläche erreicht wird. In ähnlicher Weise könnte die durch synaptische Aktivität beschleunigte Depalmitoylierung von PSD-95 und die damit vermutlich verbundene gesteigerte Abbaurate der oligomeren Komplexe eine aktivitätsabhängige Umverteilung synaptischer AMPA-Rezeptoren vermitteln, wie sie im Zuge von LTD beobachtet wird. In kultivierten hippocampalen Neuronen bewirkt eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren - beispielsweise durch Applikation von Glutamat - eine rasche Internalisierung von AMPA-Rezeptoren, begleitet von einer Abnahme der Frequenz, nicht aber der Amplitude, von mEPSC (Beattie et al., 2000; Lissin et al., 1999). Zur Ausprägung dieser Veränderungen sind ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen sowie eine Aktivierung bestimmter Proteinphosphatasen erforderlich, die ebenfalls für die Expression von LTD benötigt werden. Aufgrund der Gemeinsamkeiten der zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen wird die glutamatinduzierte Internalisierung synaptischer AMPA-Rezeptoren in kultivierten hippocampalen Neuronen als LTD-Modell angesehen (Beattie et al., 2000). Für eine glutamatinduzierte Internalisierung von AMPA-Rezeptoren ist möglicherweise eine Depalmitoylierung von PSD-95 erforderlich. Dafür spricht der Vergleich zwischen einer Mutante von PSD-95, die unabhängig von einer Palmitoylierung in der Membran verankert wird, und dem Wildtypprotein. Die Expression jedes der beiden Proteine führt zu einer ungefähr gleichstarken Zunahme der Signalintensität synaptischer AMPA-Rezeptor-puncta in hippocampalen Neuronen. Während diese puncta in Neuronen, die das wildtypische PSD-95 überexprimieren, durch eine Inhibition der Palmitoylierung ähnlich rasch und vollständig wie in nicht transfizierten Zellen verschwinden, bleiben die durch das palmitoylierungsunabhängige PSD-95 organisierten AMPA-Rezeptorkomplexe von einer Inhibition der Palmitoylierung erwartungsgemäß unberührt. Die durch Glutamat bewirkte Internalisierung oberflächenständiger AMPA-Rezeptoren ist in den PSD-95 überexprimierenden Neuronen deutlich gesteigert entsprechend der größeren Anzahl von AMPA-Rezeptoren, die in PSD-95-abhängigen Komplexen an der Zelloberfläche zusammengefaßt sind. In Neuronen, die das palmitoylierungsunabhängige PSD-95 exprimieren, werden dagegen - trotz ebenfalls vermehrter AMPA-Rezeptorkomplexe an der Zelloberfläche – nach Applikation von Glutamat weniger AMPA-Rezeptoren in die Zelle aufgenommen als in nicht transfizierten Nachbarzellen (El Husseini et al., 2002). Die wahrscheinlichste Erklärung für

diesen Befund liegt darin, daß die Mehrzahl der AMPA-Rezeptoren in diesen Neuronen in Komplexen organisiert ist, die die für einen kontrollierten Abbau erforderliche Depalmitoylierung nicht erfahren können und ein durch Depalmitoylierung vermittelter Abbau solcher Komplexe einen wesentlichen Schritt im Zuge der aktivitätsabhängigen Internalisierung von AMPA-Rezeptoren darstellt.

In vivo spielt PSD-95 eine entscheidende Rolle für die Ausprägung verschiedener Formen von synaptischer Plastizität im Hippokampus. Das ergibt die elektrophysiologische Analyse von Mäusen, die anstelle des Wildtypproteins ein innerhalb der dritten PDZ-Domäne trunkiertes PSD-95 exprimieren, das nicht in die Postsynapse gelangt. Während die basale Transmission an den Schaffer-kollateral-CA1-Synapsen in den Mutanten nicht wesentlich vom Wildtyp abweicht, unterscheiden sich die in den beiden Genotypen durch verschiedene Stimulationsprotokolle induzierten Veränderungen in der Effizienz der synaptischen Übertragung teilweise dramatisch. So kann in PSD-95-defizienten Mäusen eine wesentlich stärkere langandauernde Potenzierung (LTP) der Übertragungseffizienz ausgelöst werden als im Wildtyp, eine Depression der synaptischen Übertragung läßt sich dagegen mit keinem der verwendeten Protokolle erzielen. Vielmehr löst eine Stimulation mit niedriger Frequenz (1 Hz), die im Wildtyp LTD bewirkt, in den Mutanten einen robusten Anstieg in der Effizienz der Transmission aus. Weiterhin wird in Abwesenheit von PSD-95 bereits mit wesentlich niedrigerer Intensität der Stimulation das maximale Niveau der Potenzierung erreicht. So führt eine Stimulation mit 5 Hz im Wildtyp zu einem schwachen Anstieg der Transmissionseffizienz, der ungefähr einem Drittel der maximal auslösbaren LTP entspricht. In den PSD-95-defizienten Tieren hat dasselbe Protokoll aber bereits eine nahezu vollständige Sättigung der LTP zur Folge (Migaud et al., 1998).

In Abwesenheit von PSD-95 wird eine normale basale Neurotransmission beobachtet; offensichtlich sind unabhängig von PSD-95 funktionelle AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran vorhanden. Demnach existiert möglicherweise neben den AMPA-Rezeptoren, die in den von PSD-95 organisierten Komplexen vorkommen, eine zweite Population synaptischer AMPA-Rezeptoren. Diese PSD-95-unabhängigen synaptischen AMPA-Rezeptoren können in den Mutanten das Fehlen der von PSD-95 abhängigen Komplexe teilweise ausgleichen, was eine normale basale Neurotransmission erlaubt. Anders als im Wildtyp kann dieses basale Niveau der synaptischen Übertragung aber nicht nach unten verändert werden. Das paßt gut zu der zuvor beschriebenen Rolle von PSD-95 als dynamisches Gerüst von AMPA-Rezeptorkomplexen, das eine rasche, aktivitätsabhängige Internalisierung von AMPA-Rezeptoren vermittelt, und läßt vermuten, daß die PSD-95-unabhängigen synaptischen AMPA-Rezeptoren dagegen nicht unmittelbar in einem durch synaptische Aktivität gesteuerten Prozeß von der

Zelloberfläche entfernt werden können. Die aktivitätsgesteuerte Rekrutierung und Entfernung synaptischer AMPA-Rezeptoren könnten demnach als zwei unabhängige, miteinander konkurrierende Vorgänge angesehen werden, die durch bestimmte Formen synaptischer Aktivität gleichzeitig, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß in Gang gesetzt werden. Das Verhältnis zwischen beiden Vorgängen bestimmt darüber, welches Ausmaß einer Potenzierung oder Depression der synaptischen Übertragung zustandekommt. Der aktivitätsgesteuerte Abbauprozess beruht auf einer Internalisierung synaptischer AMPA-Rezeptoren innerhalb PSD-95-abhängiger Komplexe und fällt damit in den PSD-95 defizienten Tieren weg. Damit ließe sich erklären, daß in diesen Mutanten (1) kein LTD exprimiert werden kann, (2) das maximal erreichbare Niveau der Potenzierung erhöht ist und (3) die für eine Sättigung der LTP benötigte Intensität der Stimulation vermindert ist.

1.3 Motivation und Zielrichtung der Arbeit

Das Neuropeptid CRF und der CRF₁-Rezeptor vermitteln umfangreiche Aspekte der Stressantwort des Säugetierorganismus. Eine fehlgesteuerte Streßantwort – bedingt zumindest teilweise durch eine pathologisch gesteigerte Freisetzung von CRF und dessen Wirkung auf den CRF₁-Rezeptor im Zentralnervensystem - spielt vermutlich eine wesentliche Rolle für die Entstehung verschiedener psychiatrischer Krankheitsbilder wie zum Beispiel der Depression. Der CRF₁-Rezeptor stellt insofern auch einen attraktiven Angriffspunkt für die psychopharmakologische Therapie dar. Um hier möglichst gezielt intervenieren zu können, ist eine umfassende Kenntnis der nachgeschalteten Signaltransduktionswege sowie der allgemeinen Biologie (wie beispielsweise des Stoffwechsels, der Rekrutierungs- und Internalisierungsmechanismen) des Rezeptorproteins von großem Nutzen. Diese verschiedenen Funktionen des Rezeptorproteins werden aller Wahrscheinlichkeit nach durch mit dem Rezeptor interagierende Proteine mitbestimmt. Aus diesen Gründen waren wir interessiert, neue Proteine zu identifizieren, die mit den zytoplasmatischen Anteilen des CRF₁-Rezeptors wechselwirken.

2 Material und Methoden

2.1 Klonierungsarbeiten

2.1.1 Standardtechniken (Phenol/Chloroform-Extraktion, Ethanolpräzipitation, Agarosegelelektrophorese, Kultur von *E.coli*)

Zur Inaktivierung von Enzymen und zur Entfernung von Proteinen wurde DNA in wässriger Lösung mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die Ansätze wurden gegebenenfalls mit ddH₂O auf ein Volumen von 200 µl gebracht, im Verhältnis 1:1 mit einem Gemisch aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und kräftig geschüttelt. Wässrige und organische Phase wurden durch Zentrifugation getrennt, die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, in einem Verhältnis von 1:1 mit einem Gemisch aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) versetzt und wiederum kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde erneut die obere, wässrige Phase abgenommen und in einer Ethanolfällung eingesetzt.

Zur Aufreinigung und Konzentrierung von DNA in wässriger Lösung wurde DNA mit Ethanol und hohen Salzkonzentrationen gefällt. Der DNA-Lösung wurde zuerst ein 0,1-faches Volumen an 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) zugesetzt; anschließend wurde ein 2,5-faches Volumen an reinem Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde durchmischt und für zehn Minuten bei -80°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation bei 4°C pelletiert, das Pellet ein- bis zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und schließlich in dem gewünschten Volumen ddH₂O resuspendiert.

DNA-Moleküle wurden zu analytischen oder präparativen Zwecken mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die als wässrige Lösung vorliegenden DNA-Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit sechsfachkonzentriertem Ladepuffer versetzt und in 0,7 bis 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die "smart-ladder" verwendet. Die Elektrophorese wurde mit einer Feldstärke von 7 bis 9 V/cm für ein bis zwei Stunden durchgeführt. Durch Interkalation von Ethidiumbromid konnten DNA-Fragmente im Gel durch Belichtung mit UV-Licht sichtbar gemacht, in einem digitalen Geldokumentationssystem photographiert oder gegebenenfalls mit dem Skalpell ausgeschnitten werden.

Plasmide wurden in dem *E. coli*-Stamm DH5α propagiert. DH5α wurde in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten bei 37°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden dabei auf einem Schüttler

mit 250 UpM bewegt. Zur Selektion auf die Anwesenheit von Plasmiden wurde Ampicilin in einer Konzentration von 50 µg/ml oder Kanamycin in einer Konzentration von 25 µg/ml dem Medium oder den Agarplatten zugesetzt.

2.1.2 Reverse Transkription (RT) und Polymerase-Kettenreaktion ["polymerase chain reaction" (PCR)]

4 µg Gesamt-RNA aus dem Gehirn adulter 129SVJ-Mäuse wurden mit 2 pmol des genspezifischen Primers PSD-95_2324_3' in einem Gesamtvolumen von 12 µl für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl "First Strand Buffer", 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl dNTP-Lösung (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, jeweils 10 mM) wurde der Ansatz zunächst für 2 Minuten bei 42°C präinkubiert. Daraufhin wurde die RT-Reaktion durch Zugabe von 1 µl "Superscript"-Reverse-Transkriptase gestartet, für weitere 50 Minuten bei 42°C inkubiert und schließlich durch fünfzehnminütige Inkubation bei 70°C beendet. Diese Reaktion wurde bei 4°C aufbewahrt und als "template" in der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt.

Die PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich zur Herstellung von Nukleinsäuren für Klonierungszwecke benutzt. Neben der konventionellen "Zwei-Primer-PCR", die eine gezielte Veränderung von Nukleinsäuren nur an den durch die beiden PCR-Primer repräsentierten Enden erlaubt, wurde auch eine als "Megaprimer-PCR" bezeichnete Methode angewandt, um eine kurze Nukleinsäuresequenz in nicht endständiger Position in eine cDNA einzufügen.

Die PCR wurde mit einem Reaktionsvolumen von jeweils 100 µl in einer "GeneAmp PCR System 9700" PCR-Maschine von Perkin Elmer durchgeführt. PCR-Ansätze enthielten in einfach konzentriertem "Herculase Reaction Buffer" 0,2 mM dNTP (das heißt jeweils 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) 2 pmol 5'-Primer, 2 pmol 3'-Primer, 10 ng Plasmid-DNA beziehungsweise 2 µl der RT-Reaktion wie unter 2.1.1.1 beschrieben als "template" und 5 Einheiten "Herculase Polymerase". PCR-Ansätze wurden auf Eis hergestellt und direkt in den auf 94°C vorgeheizten Heizblock der PCR-Maschine überführt.

Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 90 Sekunden bei 94°C wurde in 32 Zyklen PCR-amplifiziert. Jeder Zyklus bestand dabei aus 30 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 30 Sekunden "annealing" bei 55°C und (n/kb)*60 Sekunden Elongation bei 72°C, wobei n der

erwarteten Länge des jeweiligen PCR-Produkts entspricht. Die Elongationszeit wurde stets auf ein ganzzahliges Vielfaches von 30 Sekunden aufgerundet. Die Reaktion wurde mit einer zusätzlichen Elongation von 7 Minuten beendet. Jeweils 4 µl einer PCR-Reaktion wurden zu analytischen Zwecken auf ein Agarosegel aufgetragen, der Rest wurde bei 4°C aufbewahrt und weiterverarbeitet.

Bei der "Megaprimer-PCR" (Barik, 1997) handelt es sich um eine "Drei-Primer-PCR", die die Herstellung von Fusionen zwischen zwei DNA-Molekülen, die Deletion von nicht endständigen Abschnitten eines DNA-Moleküls oder die gezielte Mutagenese beziehungsweise Insertion kurzer Sequenzen an einer von den Enden weit entfernten Stelle eines DNA-Moleküls erlaubt. Wir haben diese Technik im Rahmen dieser Arbeit nur an einer Stelle benutzt, um eine 30 Nukleotide lange, für das myc-Epitop kodierende DNA-Sequenz zwischen Nukleotid 103 und 104 der CRF₁-Rezeptor-cDNA einzufügen. Das prinzipielle Vorgehen ist unter 3.2.2 erläutert; ergänzend dazu sei hier nur noch angemerkt, daß die einzelnen PCR-Amplifikationen unter exakt denselben Bedingungen wie zuvor beschrieben durchgeführt wurden; insbesondere wurden im zweiten PCR-Schritt 2 pmol des als 5'-Primer verwendeten ungefähr 450 bp langen doppelsträngigen DNA-Fragments eingesetzt. Das entspricht einer Masse von ungefähr 6 µg. Abweichenden von der Vorschrift (Barik, 1997) wurde in allen drei PCR-Reaktionen die "Herculase-Polymerase" verwendet. Dieses Polymerasengemisch enthält auch Enzyme, die über eine terminale Transferaseaktivität verfügen. Wir konnten in dem endgültigen PCR-Produkt keine Inkorporation zusätzlicher Nukleotide an der dem 3'-Ende des Megaprimers entsprechenden Stelle beobachten.

2.1.3 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

2.1.3.1 Verdau von DNA-Molekülen zum Einsatz in einer Ligation

Es wurden jeweils 10 µg Vektor-DNA oder 5 µg Insert-DNA verdaut. Zum Verdau von PCR-Produkten wurde die gesamte PCR-Reaktion wie unter 2.1.2 beschrieben - nach Entnahme von 4 µl zu analytischen Zwecken - mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und mit derselben Menge Enzym wie 5 µg DNA verdaut.

Der Verdau wurde in dem von Hersteller empfohlenen einfachkonzentrierten Reaktionspuffer mit 10 Einheiten Enzym pro Mikrogramm DNA für eine Stunde bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur durchgeführt. Der Verdau wurde durch Inkubation auf Eis

beendet, und 50 ng DNA wurden auf einem Agarosegel analysiert, um zu bestätigen, daß die DNA vollständig verdaut worden war.

Zum Verdau mit zwei unterschiedlichen Enzymen wurde zunächst mit einem der beiden Enzyme wie zuvor beschrieben verdaut. Nach Entnahme von DNA für ein analytisches Gel wurde der Reaktionsansatz mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und die DNA - wiederum wie oben beschrieben - dem Verdau mit dem zweiten Enzym unterworfen.

Vektor-DNA, die mit zwei unterschiedlichen Enzymen verdaut worden war, sowie verdaute Insert-DNA oder PCR-Produkte wurden nach dem letzten Verdau Ethanol-präzipitiert und in 10 µl einfachkonzentriertem Agarosegel-Ladepuffer aufgenommen. Die Proben wurden auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen, und die gewünschte Bande wurde nach ein- bis zweistündiger Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des "Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen isoliert und in einem Volumen von jeweils 30 µl von den Säulen eluiert. 2 µl des Eluats wurden zur Quantifizierung auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.1.3.2 Verdau von in kleinem Maßstab präparierter Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken

Es wurden 2,5 µl der in kleinem Maßstab präparierten Plasmid-DNA für eine Stunde mit 15 bis 20 Einheiten Enzym in dem empfohlenen einfachkonzentrierten Reaktionspuffer bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Jeweils 10 µl des Reaktionsansatzes wurden auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.1.4 Dephosphorylierung der 5'-Enden von mit nur einem Enzym geschnittenen Vektoren

Um die (Re)ligation zueinander kompatibler, beispielsweise mit demselben Enzym geschnittenen Enden des in einer Ligation eingesetzten Vektors zu verhindern, wurde die Vektor-DNA in solchen Fällen im Anschluß an den Verdau mit "Calf Intestinal Phosphatase" (CIP) dephosphoryliert.

Die verdaute Vektor-DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und in einem Volumen von 38 µl einfachkonzentriertem NEB-Reaktionspuffer 3 aufgenommen. Nach Zugabe von 2 µl CIP wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 37°C und anschließend für weitere 15 Minuten bei 55°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch

zehnminütige Inkubation bei 70°C beendet. Um die CIP mit Sicherheit zu inaktivieren, wurde der Ansatz zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert; die DNA wurde in 30 µl ddH₂O aufgenommen und auf einem Agarosegel quantifiziert.

2.1.5 Ligation zur Klonierung von DNA-Fragmenten

2.1.5.1 Ligation zur Klonierung von durch Verdau von Plasmiden oder PCR-Produkten erzeugten DNA-Fragmenten

30 fmol Vektor-DNA wurden mit 90 fmol Insert-DNA auf Eis gemischt, und der Ansatz wurde auf ein Gesamtvolumen von 8,5 µl gebracht. Nach Zugabe von 1 µl zehnfachkonzentriertem "T4-Ligase-Buffer" und 0,5 µl T4-Ligase wurde die Reaktion über Nacht bei 16°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Ansatz mit Ethanol präzipitiert und das Pellet in 10 µl ddH₂O aufgenommen.

2.1.5.2 Ligation zur Klonierung von durch Hybridisierung synthetisch hergestellter Oligodeoxynukleotide erzeugten kurzen doppelsträngigen DNA-Fragmenten

Die Sequenzen zweier synthetisch hergestellter Oligodeoxynukleotide wurden so gewählt, daß die beiden Moleküle unter Ausbildung kurzer einzelsträngiger Überhänge an beiden Enden miteinander hybridisieren können. So ließen sich kurze doppelsträngige DNA-Fragmente erzeugen, die in einen Vektor mit dazu kompatiblen kohäsiven Enden kloniert werden können.

Jeweils 100 pmol der beiden einzelsträngigen, synthetisch hergestellten Oligodeoxynukleotide wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und daraufhin bei Raumtemperatur langsam abgekühlt. 100 fmol des so erzeugten doppelsträngigen DNA-Fragments wurden wie unter 2.1.5.1 beschrieben mit 30 fmol Vektor in der Ligation eingesetzt.

2.1.6 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurden DH5α-Bakterien in 500 ml LB-Medium unter maximalem Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,35 bis 0,4 kultiviert. Die Bakterien

wurden pelletiert, einmal mit ddH₂O, dann zweimal mit 10% Glycerol (jeweils 500 ml, eiskalt) gewaschen, in einem Volumen von 500 µl GYT-Medium resuspendiert und zu jeweils 40 µl auf vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt. Die Bakterien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einem vorgekühlten JLA16.250-Rotor in einer Beckman-J2-MC-Zentrifuge mit 2500 bis 7000 UpM für jeweils 15 Minuten ausgeführt. Die Bakterienpellets wurden durch sehr vorsichtiges Überspülen mit der jeweiligen Resuspensionslösung aufgelöst.

Für jede geplante Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und mit der Hälfte (5 µl) des aufgereinigten Ligationsansatzes oder 0,1 ng Plasmid-DNA versetzt. Die Ansätze wurden in vorgekühlte Elektroporationsküvetten übertragen und in einem "Gene Pulser II" der Firma Biorad mit angeschlossenem "Puls Controller Plus" (Geräteeinstellungen: 2,5 kV, 25 µF und 250 kΩ) elektroporiert. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurden die Ansätze wieder in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, für 30 Minuten unter Schütteln bei 37°C inkubiert und in verschiedenen Verdünnungen auf geeignete Selektionsplatten ausgebracht.

2.1.7 Plasmid-Präparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Kulturen von *E. coli* in kleinem Maßstab wurde der "Plasmid-Minipräp"-Kit der Firma Qiagen benutzt. Bakterien wurden in 5 ml LB-Medium unter Zusatz eines geeigneten Antibiotikums über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jeweils 1,5 ml dieser Kulturen wurden abzentrifugiert und genau nach der zu dem "Plasmid-Minipräp"-Kit gegebenen Anleitung weiterverarbeitet. Die so hergestellte Plasmid-DNA wurde wie unter 2.1.3.2 beschrieben analytisch verdaut.

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Kulturen von *E. coli* in großem Maßstab wurde der "Plasmid-Midipräp"-Kit der Firma Promega benutzt. Bakterien wurden in 75 ml LB-Medium unter Zusatz eines geeigneten Antibiotikums über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 50 ml der Kultur wurden abzentrifugiert und nach der zu dem Kit gegebenen Anleitung weiterverarbeitet. Die DNA-Konzentration in diesen Plasmidpräparationen wurde photometrisch bestimmt.

2.1.8 Sequenzierung

Die Konzentration der mit Hilfe des "Plasmid-Minipräp"-Kit der Firma Qiagen hergestellten Plasmid-Präparationen wurde photometrisch bestimmt und die erforderliche Menge (2 µg pro Sequenzierungsreaktion) wurde der Firma TopLab, Martinsried, zur vollautomatisierten Sequenzierung zugeschickt. Sequenzen wurden als Textfile per e-mail erhalten.

2.2 Arbeiten mit Hefe

2.2.1 Kultur von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefestämme AH109 und Y187 wurden von der Firma Clontech gekauft und in YPDA-Medium oder auf entsprechenden Agarplatten propagiert.

Zur Selektion auf die Anwesenheit der Plasmide pGBKT7 oder pACT2 oder von Derivaten dieser Plasmide wurden die mit dem jeweiligen Plasmid transformierten Hefen in synthetisch definierten Medien ohne Tryptophan beziehungsweise ohne Leucin oder auf den jeweils entsprechenden Agarplatten kultiviert. Zur Selektion auf die Anwesenheit von zwei Plasmiden - das eine von pGBKT7, das andere von pACT2 abgeleitet - wurden die aus einer Verpaarung hervorgegangenen diploiden Hefen in synthetisch definiertem Medium ohne Tryptophan und ohne Leucin oder auf entsprechenden Agarplatten kultiviert. Diploide Hefen, die ein von pGBKT7 und ein von pACT2 abgeleitetes Plasmid beherbergen und in denen die beiden für jeweils ein Enzym der Adenin- oder der Histidinbiosynthese kodierenden Reportergene aktiv sind, wurden in synthetisch definiertem Medium ohne Tryptophan, Leucin, Adenin und Histidin selektiert. Das diesem Selektionsschema zugrundeliegende Prinzip ist im Abschnitt 3.1 ausführlich dargestellt.

Hefen wurden stets bei einer Umgebungstemperatur von 30°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden in einem Schüttler mit 250 UpM bewegt.

2.2.2 Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA

Ein geeignetes Volumen YPDA-Medium wurde mit einer Einzelkolonie AH109 oder Y187 angeimpft und die Hefen wurden unter maximalem Schütteln bis zum Erreichen einer

OD₆₀₀ von 1,0 kultiviert. Die Kultur wurde einmal bei Raumtemperatur mit ddH₂O gewaschen, und die Hefen wurden in einem Volumen von 100 µl / 5 ml Ausgangskultur an Lithiumacetat-TE-Puffer resuspendiert. Dieser Ansatz wurde für eine Stunde ohne Schütteln bei 30°C inkubiert und daraufhin im Verhältnis 1:1 mit 70 %iger Polyethylenglycol-Lösung versetzt. Hefen und PEG-Lösung wurden gründlich miteinander vermischt, und der Ansatz wurde zu jeweils 200 µl auf 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Pro Aliquot wurde 1 µg der jeweils zu transformierenden Plasmid-DNA zugegeben. Diese Ansätze wurden wiederum für eine Stunde bei 30°C inkubiert und anschließend für fünf Minuten einem Hitzeschock bei 42°C unterworfen. Die Hefen wurden einmal in ddH₂O gewaschen, in 100 µl ddH₂O resuspendiert und in verschiedenen Verdünnungen auf geeignete Selektionsplatten ausgebracht.

Zum Waschen wurden Hefen in einer Heraeus-Megafuge 1.0R für fünf Minuten bei 2400 UpM oder in einer Heraeus- Tischzentrifuge für fünfzehn Sekunden bei 13000 UpM abzentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet durch einfaches Schütteln in dem ein- bis zweifachen des Ausgangsvolumen an ddH₂O resuspendiert.

2.2.3 Charakterisierung von Nährstoffansprüchen von mit Plasmid transformierten oder aus einer Verpaarung hervorgegangener Hefen und Test auf α-Galaktosidaseaktivität

Die mit pGBKT7_R1_cytoplasmic oder pGBKT7_R2_cytoplasmic transformierten AH109-Hefen wurden direkt von der Transformationsplatte auf Agarplatten auf der Basis verschiedener synthetisch definierter Medien ausgestrichen und für mindestens vier Tage bei 30°C inkubiert. Das Auftreten von Einzelkolonien wurde als Anzeichen für Wachstum der Hefen unter den jeweiligen Bedingungen gewertet.

Zur Überprüfung auf α-Galaktosidaseaktivität wurden die Hefen auf tryptophanfreien Agarplatten ausgestrichen, die 25 mg/l "X-α-Gal" enthielten. Die Platten wurden für mindestens vier Tage bei 30°C inkubiert, der Grad der Blaufärbung der Kolonien wurde mit dem bloßen Auge abgeschätzt.

2.2.4 Verpaarung von Hefen in kleinem Maßstab

Von jedem der beiden zu verpaarenden Hefestämme wurde eine frische Einzelkolonie gewonnen, um mit diesen beiden Kolonien gemeinsam 1 ml YPDA-Medium in einem 2 ml

Eppendorf-Reaktionsgefäß anzuimpfen. Der Ansatz wurde gründlich durchmischt und unter Schütteln mit 250 UpM für 24 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Hefen wurden einmal in ddH₂O gewaschen, in 100 µl ddH₂O resuspendiert und wie unter 3.1.6 beschrieben in verschiedenen Verdünnungsstufen auf geeignete Selektionsplatten ausgebracht.

2.2.5 Verpaarung mit prätransformierten Bibliothekshefen

50 ml synthetisch definiertes Medium ohne Tryptophan wurden mit einer bezüglich ihrer Nährstoffansprüche zuvor charakterisierten Kolonie von AH109_pGBKT7_R1_cytoplasmic angeimpft und unter maximalem Schütteln bei 30°C inkubiert. Mit Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 wurden die Hefen pelletiert, in 50 ml zweifach konzentriertem YPDA-Medium resuspendiert und mit einem unmittelbar zuvor aufgetauten Aliquot der in Y187 prätransformierten cDNA-Bibliothek vereinigt. Dieser Ansatz wurde in einem 2 l-Erlenmeyerkolben unter langsamer Bewegung (30 bis 35 UpM auf einem SM25-Schüttler) für 24 Stunden bei 30°C inkubiert.

Nach Ablauf von 24 Stunden wurde der Verpaarungsansatz einmal in einfachkonzentriertem YPDA-Medium gewaschen, in 10 ml einfachkonzentriertem YPDA-Medium aufgenommen und zu jeweils 200 µl auf insgesamt 50 Agarplatten mit 15 cm Durchmesser auf der Basis von synthetisch definiertem Medium ohne Tryptophan, Leucin, Adenin und Histidin plus 25 mg/l X-α-Gal ausgebracht. Diese Platten wurden für eine Woche bei 30°C inkubiert und täglich auf das Auftreten neuer Kolonien hin überprüft.

Unmittelbar nach dem Auftauen der prätransformierten Bibliothek wurden zur Bestimmung des Bibliothekstiters (Konzentration der Bibliothekshefen) 10 µl des 1 ml-Aliquots entnommen. Davon wurden drei Verdünnungen (1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000) angelegt, und jeweils 100 µl dieser Verdünnungen wurden auf Agarplatten auf der Basis von synthetisch definiertem Medium ohne Leucin ausgestrichen. Der Bibliothekstiter wurde durch Zählen der Kolonien auf diesen Platten bestimmt.

Zur Bestimmung der Verpaarungseffizienz wurden vor dem Ausplattieren auf Selektionsplatten 10 µl des jetzt in einfach konzentriertem YPDA-Medium resuspendiertem Verpaarungsansatzes entnommen. Davon wurden drei Verdünnungen (1:100, 1:1.000, 1:10.000) in YPDA-Medium hergestellt. Jeweils 100 µl dieser Verdünnungen wurden auf leucinfreie und auf tryptophan- und leucinfreie Agarplatten ausgebracht. Die Platten wurden für zwei Tage bei 30°C inkubiert und Kolonien wurden auf den Platten der geeigneten Verdünnungsstufe gezählt. Wir definieren die Verpaarungseffizienz als den Anteil der verpaarten Bibliothekshefen an der Gesamtzahl der Bibliothekshefen einschließlich verpaarter Bibliothekshefen und ermitteln diese

Größe als den Quotienten der Anzahl auf tryptophan- und leucinfreien Platten wachsenden Kolonien durch die Anzahl auf leucinfreien Platten derselben Verdünnungsstufe wachsenden Kolonien.

2.2.6 Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe

Jeweils 2 ml Selektionsmedium (synthetisch definiertes Medium ohne Tryptophan, Leucin, Adenin und Histidin) wurden mit einer Hefekolonie angeimpft und unter maximalem Schütteln bei 30°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Hefen pelletiert und in 200 µl STES-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von ungefähr 200 µl "glass beads" wurden die Ansätze für eine Minute auf einem Minischüttler heftig geschüttelt und anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wurde in Ethanol präzipitiert und in 10 µl ddH₂O aufgenommen. 2,5 µl der DNA-Lösung wurden in der Elektroporation elektrokompetenter *E. coli* eingesetzt.

2.3 Arbeiten mit Säugerzellen und Koimmunopräzipitation

2.3.1 Kultur von HEK293-Zellen

Die Zelllinie "HEK293" ist eine stabile Zelllinie, die durch Transformation primärer embryonaler Nierenzellen des Menschen mit Adenovirus-DNA etabliert worden ist (Graham et al., 1977). HEK293-Zellen wurden in "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM), supplementiert mit 0,5 mM L-Glutamin und 10% fötalem Kalbsserum, auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser in einem Begasungsbrutschrank bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Alle 24 - 48 Stunden wurden die zu 70 - 80% konfluenten Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:4 subkultiviert.

2.3.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit der Kalziumphosphatmethode

HEK293-Zellen wurden im wesentlichen nach dem von Chen und Okayama beschriebenen Protokoll transfiziert (Chen und Okayama, 1987).

Für jede Transfektion wurden 750.000 Zellen in 2 ml Kulturmedium in einer Tasche einer Sechs-Taschen-Platte ausgesät und für zwölf Stunden bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

Jeweils 5 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA wurden mit Ampuwa-H₂O auf ein Volumen von 90 µl verdünnt und mit 10 µl einer 2,5 M Kalziumchloridlösung gemischt. Für Kotransfektionen wurden entsprechend 2,5 µg jedes der beiden zu transfizierenden Plasmide eingesetzt. Der DNA-Kalziumchloridlösung wurde ein gleiches Volumen (100 µl) zweifachkonzentrierten BBS-Puffers zugesetzt; der Ansatz wurde durch kräftiges Schütteln gemischt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und tropfenweise in das Medium der zu transfizierenden Kultur gegeben. Die Zellen wurden daraufhin sofort in eine Atmosphäre mit reduzierter CO₂-Spannung (3% CO₂) überführt; nach 24 Stunden wurde das Medium gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen wurden für weitere 12 - 36 Stunden bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

Um HEK293-Zellen, die den mit GFP markierten CRF₁-Rezeptor exprimieren, fluoreszenzmikroskopisch beurteilen zu können, wurden Zellen auf Deckgläsern ausgesät und transfiziert. Deckgläser wurden in den Taschen einer 24-Taschen-Platte für mindestens drei Stunden in einer Poly-D-Lysin-Lösung inkubiert und vor dem Aussäen der Zellen einmal mit PBS-Lösung gewaschen. Für jede Transfektion wurden 180.000 Zellen in 0,5 ml Medium auf ein Deckglas in einer Tasche einer 24-Taschen-Platte ausgesät und für zwölf Stunden bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde wie zuvor beschrieben hergestellt, und 50 µl Transfektionsansatz wurden tropfenweise in das Medium der zu transfizierenden Kultur gegeben. Die Zellen wurden in eine Atmosphäre mit reduzierter CO₂-Spannung (3% CO₂) überführt; nach 24 Stunden wurde das Medium gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen wurden für weitere 12 Stunden bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

2.3.3 Herstellung von Lysaten von transfizierten HEK293-Zellen

Die transfizierten Zellen wurden einmal mit warmer PBS-Lösung gewaschen und auf ein Eisbett übertragen. Pro Tasche wurden 200 µl eiskalter HNTG-Lyse-Puffer plus Proteaseinhibitoren (1 Tablette "complete mini" pro 10 ml Puffer) zugegeben, und die Platten wurden für 10 bis 20 Minuten unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten bei 13500 UpM und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden entweder direkt im Verhältnis 1:1 mit zweifachkonzentriertem SDS-Gelladepuffer versetzt oder in einer Immunopräzipitation eingesetzt.

2.3.4 Immunopräzipitation

Für eine Immunopräzipitation wurden jeweils drei Taschen einer Sechs-Taschen-Platte identisch transfiziert, und die aus diesen drei Taschen gewonnenen Lysate zu 600 µl Gesamtlusat vereinigt. Für die direkte Analyse wurden 100 µl Lysat entnommen und im Verhältnis 1:1 mit zweifachkonzentriertem SDS-Gelladepuffer versetzt. Die verbleibenden 500 µl wurden mit 500 µl HNTG-Puffer plus Proteaseinhibitoren (1 Tablette "complete mini" pro 10 ml Puffer) verdünnt und in der eigentlichen Immunopräzipitation eingesetzt. Dafür wurde den verdünnten Lysaten zunächst jeweils ungefähr 1 µg des präzipitierenden Antikörpers (1 µl "Monoclonal Anti-c-myc" oder 1 µl "ANTI-FLAG M2 Monoclonal") zugegeben, und die Ansätze wurden für eine Stunde auf Eis inkubiert. "Protein G-Sepharose-beads" wurden dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und entsprechend einem Bettvolumen von 20 µl jedem Ansatz zugegeben. Die Ansätze wurden unter langsamer Bewegung bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die "beads" pelletiert und dreimal in HNTG-Puffer gewaschen. Antikörper und gebundene Proteine wurden durch Zugabe von 100 µl einfachkonzentriertem SDS-Gelladepuffer von den "beads" gelöst und in der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Zum Äquilibrieren und Waschen der "beads" wurde jeweils mit 6000 UpM für eine Minute bei 4°C zentrifugiert, und der Überstand wurde durch eine mit einer Vakuumquelle verbundene 23-gauge Nadel abgenommen.

2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), Transfer auf Nitrozellulosemembran und Immunodetektion

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde mit Hilfe des Protean 3-Systems der Firma Biorad nach Standardprotokollen ausgeführt. Jeweils 10 µl Probe in einfachkonzentriertem SDS-PAGE-Ladepuffer wurden neben 5 µl des Molekulargewichtsstandards "Precision" in acht- oder zehnprozentigen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 30 mA für eine bis 1,5 Stunden durchgeführt.

Zum Transfer auf Nitrozellulosemembran wurde ein Halbtrockenverfahren verwendet. Das Gel wurde gegenüber einem deckungsgleichen Stück mit H₂O befeuchteter Nitrozellulosemembran in einem Apparat für den Halbtrockenttransfer platziert, Gel und Membran von den Elektroden jeweils durch drei Stücke in Transferpuffer getränkten Whatman-3MM-Papier getrennt. Der Proteintransfer wurde mit einem Strom vom 27,5 mA pro Gel für die Dauer einer Stunde durchgeführt.

Zur Immunodetektion wurden die Membranen kurz in PBS-Lösung gewaschen, zur Blockierung unspezifischer Bindungen der Antikörper in 5% Milchpulver in PBS-Lösung inkubiert und daraufhin für eine Stunde mit dem Primärantikörper ("Monoclonal Anti-c-myc", "ANTI-FLAG M2 Monoclonal" oder "Monoclonal Anti-PSD-95", jeweils 1:1000 verdünnt in 3% BSA in PBS-Lösung) inkubiert. Nach drei Waschschritten erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper ("Anti-Mouse IgG, Peroxidase conjugate", verdünnt 1:1000 in 5% Milchpulver in PBS-Lösung) für wiederum eine Stunde. Die Membran wurde erneut dreimal mit PBS-Lösung gewaschen und im Dunkeln für eine Minute mit einem frisch hergestellten Luminol/ Wasserstoffperoxid-Gemisch inkubiert. Mit dem erzeugten Chemilumineszenzsignal wurde ein Röntgenfilm für ungefähr 30 Sekunden belichtet. Filme wurden maschinell entwickelt.

2.3.6 Fixieren von transfizierten HEK293-Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Die transfizierten Zellen wurden einmal mit warmer PBS-Lösung gewaschen und für zehn Minuten in einer 4%-igen Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Die Reaktion wurde durch einen Waschschriff mit PBS-Lösung beendet, und die Deckgläser wurden mit der die Zellen tragenden Seite nach unten auf einen Tropfen "Fluoromount-Medium" auf einem Objektträger gesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossener Digitalkamera photographiert.

3 Ergebnisse

3.1 "Yeast Two-Hybrid"-Suche nach Proteinen, die mit der zytoplasmatischen Domäne des CRF₁-Rezeptors interagieren

3.1.1 Zum Prinzip des "Yeast Two-Hybrid"-Systems

Das "Yeast Two-Hybrid"-System dient der Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dazu nutzt das System den modularen Aufbau von Transkriptionsfaktoren aus (Bai und Elledge, 1997).

Stark vereinfachend lassen sich zwei unterschiedliche Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren definieren. Die Eigenschaft eines Transkriptionsfaktors, an spezifische Erkennungssequenzen in der DNA zu binden, wie sie zum Beispiel im Promotor bestimmter Gene vorkommen, wird als DNA-Bindungsfunktion beschrieben. Die Fähigkeit eines Transkriptionsfaktors, direkt oder indirekt Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie zu rekrutieren und damit am Promotor die Initiation der RNA-Polymerase II zu fördern, wird als Transkription-aktivierende Funktion oder kurz Aktivierungsfunktion bezeichnet. Ein funktioneller Transkriptionsfaktor muß gleichzeitig über eine DNA-Bindungsfunktion und über eine Aktivierungsfunktion verfügen, um zunächst an regulatorische Sequenzen eines Zielgens binden und nachfolgend die Transkription dieses Gens stimulieren zu können.

Transkriptionsfaktoren weisen insofern einen modularen Aufbau auf, als daß sich DNA-bindende Funktion und Transkription-aktivierende Funktion eindeutig unterschiedlichen Abschnitten des Moleküls zuordnen lassen. Diese Abschnitte können als Module oder Domänen bezeichnet werden und lassen sich auch physikalisch voneinander trennen. Die so gewonnenen DNA-Bindungsdomänen und Aktivierungsdomänen sind funktionell voneinander unabhängig. So lassen sich zum Beispiel die DNA-Bindungsdomänen und Aktivierungsdomänen unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren frei miteinander rekombinieren, wobei neue, chimäre oder Hybrid-Transkriptionsfaktoren entstehen. Diese chimären Transkriptionsfaktoren können funktionell sein: Sie binden dann an genau die DNA-Elemente, die physiologischerweise von dem Transkriptionsfaktor erkannt werden, der mit seiner DNA-Bindungsdomäne in das Hybrid eingeht, und aktivieren die Transkription über genau dieselben Mechanismen wie der Transkriptionsfaktor, der seine Aktivierungsdomäne zu dem Hybrid beisteuert. Auf diese Weise können auch Domänen von Transkriptionsfaktoren ganz unterschiedlicher Herkunft gemeinsam einen funktionellen Transkriptionsfaktor rekonstituieren (Brent und Ptashne, 1985).

Bei dem "Yeast Two-Hybrid"-System werden die DNA-Bindungsdomäne und die Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors - in unserem Fall Gal4p aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae* - jeweils mit einem dem Transkriptionsfaktor in der Regel völlig unverwandten Protein fusioniert. Dadurch entstehen zwei Hybridproteine: Eines beinhaltet die DNA-Bindungsdomäne von Gal4p, fusioniert mit einem hypothetischen Protein P1 (Gal4p-DNA-BD_P1), das zweite umfaßt die Aktivierungsdomäne von Gal4p fusioniert mit einem ebenfalls hypothetischen Protein P2 (Gal4p-AD_P2). Jedes der beiden Hybridproteine für sich besitzt im allgemeinen keine Aktivität als Transkriptionsfaktor: Gal4p-DNA-BD_P1 bindet zwar an DNA-Elemente, die auch von Gal4p erkannt werden, verfügt aber nicht über die für die Aktivierung der Transkription benötigten Anteile von Gal4p; Gal4p-AD_P2 dagegen vermag zwar mit Komponenten des basalen Transkriptionsapparates zu interagieren, kann diese aber nicht an die Promotoren von Zielgenen rekrutieren, da ihm die DNA-bindenden Eigenschaften von Gal4p fehlen. Wenn allerdings beide Hybridproteine - vermittelt durch eine Bindung zwischen der P1- und P2-Komponente - miteinander interagieren, werden die DNA-Bindungsdomäne und die Aktivierungsdomäne von Gal4p in einem heterodimeren Komplex wieder zusammengeführt. Das reicht in der Regel aus, um einen funktionellen Transkriptionsfaktor zu erzeugen, dessen Aktivität über die Stimulation geeigneter Reportergene in der Hefe erfaßt werden kann. So läßt sich die physikalische Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen P1 und P2, die als Fusionsproteine mit komplementären Anteilen des Transkriptionsfaktors Gal4p in der Hefe vorliegen, qualitativ und quantitativ über den Aktivierungszustand von Reportergenen erfassen (Bai und Elledge, 1997) (Abbildung 5).

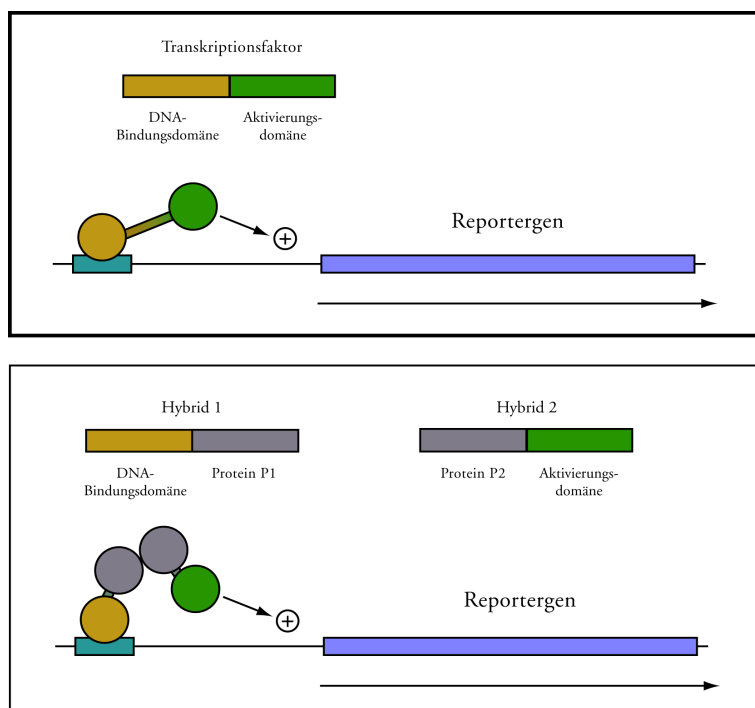


Abbildung 5 Prinzip des "Yeast Two-Hybrid"-Systems. Der modulare Aufbau von Transkriptionsfaktoren gestattet, eine DNA-Bindungsdomäne und eine Aktivierungsdomäne abzugrenzen. Die beiden Hybridmoleküle sind jeweils für sich alleine nicht in der Lage, die Transkription zu stimulieren, da ihnen dazu entweder die Aktivierungsdomäne (Hybrid 1) oder die DNA-Bindungsdomäne (Hybrid 2) fehlt. Nur wenn die Proteine P1 und P2 miteinander wechselwirken, entsteht ein (heterodimerer) funktioneller Transkriptionsfaktor, der die Reportergene aktiviert. Näheres siehe Text.

3.1.2 Zum Prinzip der Suche nach Interaktionspartnern zu einem gegebenen Protein mit Hilfe des "Yeast Two-Hybrid"-Systems

3.1.2.1 Allgemeines

Man kann das "Yeast Two-Hybrid"-System nutzen, um neue, mit einem gegebenen Protein interagierende Proteine zu identifizieren. Dazu wird das Ausgangsprotein, das als Fusion mit der DNA-Bindungsdomäne von Gal4p vorliegt, mit einer großen Anzahl von Kandidatenproteinen in Hefen koexprimiert. In einer einzelnen Hefezelle kommt dabei jeweils nur ein Kandidatenprotein neben dem Ausgangsprotein vor. Die Kandidatenproteine liegen ihrerseits als Fusion mit der Aktivierungsdomäne von Gal4p vor. Nur in Hefen, in denen Ausgangsprotein und Kandidatenprotein tatsächlich miteinander interagieren, kommt es zur Ausbildung des zuvor beschriebenen heterodimeren Komplexes zwischen den beiden Hybridproteinen und damit zur Rekonstitution eines funktionellen Gal4p-Transkriptionsfaktors. Diese Hefen lassen sich dann über die Aktivierung von Reporter genen isolieren, und das von ihnen exprimierte Kandidatenprotein kann identifiziert werden.

Die mit der Aktivierungsdomäne von Gal4p fusionierten Kandidatenproteine werden in den Hefen von Plasmiden aus exprimiert. Die Gesamtheit dieser Plasmide wird als "Yeast Two-Hybrid"-Bibliothek bezeichnet. Um eine solche Bibliothek herzustellen, wird im allgemeinen zunächst RNA aus einem Gewebe oder einer Zelllinie isoliert und in doppelsträngige cDNA überschrieben. Dieses Gemisch von cDNAs wird dann in einem "Yeast Two-Hybrid"-Bibliotheksvektor an das 3'-Ende einer für die Aktivierungsdomäne von Gal4p kodierenden cDNA angefügt. In den Hefen werden dann Fusionsproteine exprimiert, die jeweils aus der Aktivierungsdomäne von Gal4p und einem von der aus dem Gewebe oder der Zelllinie gewonnenen cDNA kodierten offenen Leserahmen ["open reading frame" (ORF)] bestehen. Die Bibliothek kann in einen Hefestamm transformiert werden, der das für das Ausgangsprotein kodierende Plasmid sowie geeignete Reportergene bereits enthält. Dabei nimmt eine Hefezelle meistens nur ein Plasmid auf, so daß in jeder einzelnen Hefezelle jeweils auch nur ein Kandidatenprotein gebildet werden kann.

Bei geschickter Wahl der Reportergene gestattet dieses Verfahren die Selektion von Hefen, in denen die beiden Hybridproteine interagieren. Dazu wird in einem Hefestamm, in dem das endogene, für ein bestimmtes Enzym des Intermediärstoffwechsels kodierende Gen deletiert ist, die entsprechende cDNA unter der Kontrolle eines Gal4p abhängigen Promotors exprimiert. Damit wird die ausgeschaltete Stoffwechselaktivität konditional - nur in Anwesenheit eines funktionellen Gal4p-Transkriptionsfaktors - restituiert. Wenn in einem solchen Stamm

auch das endogene Gal4p fehlt, sind die Hefen für das Endprodukt des betreffenden Stoffwechselweges zunächst auxotroph und nur solche Hefen, in denen durch die Interaktion der beiden Hybridproteine ein funktioneller Gal4p- Transkriptionsfaktor entsteht, können in dem entsprechenden Selektionsmedium wachsen (Bai und Elledge, 1997).

3.1.2.2 Das "Matchmaker Gal4 Two-Hybrid System 3" der Firma Clontech

Um nach Proteinen zu suchen, die mit der zytoplasmatischen Domäne des CRF₁-Rezeptors interagieren, haben wir das "Matchmaker Gal4 Two-Hybrid System 3" der Firma Clontech benutzt. Dieses System beruht - wie bereits zuvor beschrieben - auf der Rekonstitution eines funktionellen Gal4p-Transkriptionsfaktors durch zwei miteinander interagierende Hybridproteine. Ausgangsprotein und Bibliotheksproteine werden von Plasmiden exprimiert: Das für das Ausgangsprotein kodierende Plasmid leitet sich von dem Vektor pGBKT7 ab (siehe dazu auch 3.1.3); der verwendete Bibliotheksvektor ist pACT2. Die Hybridproteine werden in dem Hefestamm AH109 (James et al., 1996) exprimiert, der so mit Reportergenen ausgestattet ist, daß Hefen in denen eine Interaktion der beiden Hybride stattfindet, selektiert werden können. Das verwendete Selektionsschema ergibt sich aus dem Genotyp von AH109: Dieser Stamm ist zunächst für die Aminosäuren Tryptophan und Leucin auxotroph. Ein die jeweilige Mutation komplementierendes Gen wird als Selektionsmarker benutzt, um die sich von pGBKT7 beziehungsweise pACT2 ableitenden Plasmide in den Hefen zu etablieren. Weiterhin sind in AH109 die endogenen Loci eines für die Histidin- sowie eines für die Adenin-de-novo-Synthese benötigten Enzyms nicht funktionell; Transkriptionseinheiten, bestehend jeweils aus einem Gal4p abhängigen Promotor und einer der für diese Enzyme kodierenden cDNAs, sind aber an anderer Stelle stabil in das Genom integriert. In ähnlicher Weise wird von einem künstlich geschaffenen chromosomalen Locus aus eine α -Galaktosidase unter der Kontrolle eines Gal4p abhängigen Promotors exprimiert. Die drei verwendeten Gal4p abhängigen Promotoren unterscheiden sich dabei außerhalb der für die Bindung von Gal4p verantwortlichen Sequenzen so weit als möglich; eine unspezifische Aktivierung aller drei künstlicher Transkriptionseinheiten gleichzeitig, z.B. durch die Wechselwirkung eines Kandidatenproteins mit benachbarten Promotorelementen, wird dadurch erschwert. Schließlich ist in AH109 der endogene GAL4-Locus deletiert.

Die für unsere Suche verwendeten Hefen können sich in tryptophan- und leucinfreiem Medium also nur vermehren, solange sie ein von pGBKT7 und ein von pACT2 abgeleitetes Plasmid beherbergen. Fehlen dem Medium noch zusätzlich Histidin und/oder Adenin, dann

wachsen nur solche Hefen, in denen durch die Interaktion der Hybridproteine eine Gal4p-Aktivität entsteht, die die Reportergene aktiviert. In diesen Hefen sollte dann auch die oben erwähnte α -Galaktosidase exprimiert werden. Dieses sezernierte Enzym kann ein dem Medium zugegebenes spezielles Substrat umsetzen, wobei ein Farbniederschlag entsteht. Die betreffenden Kolonien erscheinen dann blau.

Die Eigenschaften von AH109 gestatten es weiterhin, auch eine in den Hefestamm Y187 prätransformierte "Yeast Two-Hybrid"-Bibliothek zu durchsuchen. AH109 und Y187 sind haploide Hefestämme, die aufgrund eines Defekts in dem für den Verpaarungstypwechsel erforderlichen Apparat jeweils über einen stabilen Verpaarungstyp verfügen: AH109 zeigt den Verpaarungstyp a , Y187 den Verpaarungstyp α . Zwei Hefen entgegengesetzten Verpaarungstyps können allgemein miteinander fusionieren und unter Verschmelzung ihrer Kerne eine diploide Hefezelle bilden. Werden auf diese Weise eine mit dem für das Ausgangsprotein kodierenden Plasmid transformierte AH109-Hefe und eine ein beliebiges Plasmid aus der "Yeast Two-Hybrid"-Bibliothek enthaltende Y187-Hefe verpaart, so entsteht eine diploide Hefe, in der beide Plasmide vorhanden sind und folglich die beiden Hybridproteine gleichzeitig exprimiert werden.

Y187 ist aufgrund von Mutationen in denselben Loci, die auch in AH109 nicht funktionell sind, für die Aminosäuren Tryptophan, Leucin und Histidin sowie für Adenin auxotroph. Eine Selektion auf Komplementation dieser Gene - entweder durch auf Plasmiden vorkommende Selektionsmarker oder durch konditionale, Gal4p abhängige Expression der über das AH109 Genom in die diploiden Hefen eingebrachten Reportergene - ist also auch in den aus der Verpaarung hervorgegangenen Hefen möglich.

Da die Verschmelzung zu diploiden Hefen im allgemeinen ein sehr effizienter Prozeß ist, bietet die Verpaarung mit einem prätransformierten Bibliotheksstamm die Möglichkeit, relativ hohe Raten des Plasmidtransfers in den mit einem von pGBKT7 abgeleiteten Plasmid transformierten AH109-Klon zu erreichen.

3.1.3 Konstruktion von Vektoren zur Expression der zytoplasmatischen Domänen des CRF₁- und CRF₂-Rezeptors in Hefe

Um mit Hilfe des "Yeast Two-Hybrid"-Systems Proteine zu identifizieren, die mit der zytoplasmatischen Domäne des CRF₁-Rezeptors interagieren, mußte zunächst eine cDNA hergestellt werden, die für ein Fusionsprotein, bestehend aus der DNA-Bindungsdomäne von Gal4p und der zytoplasmatischen Domäne des CRF₁-Rezeptors, kodiert. Dazu wurde der Teil der CRF₁-Rezeptor- cDNA, der für die Aminosäuren 368-415 des CRF₁-Rezeptors kodiert, in den

Vektor pGBKT7 subkloniert, so daß ein durchgängiger Leserahmen entsteht, in dem die Aminosäuren 368-415 des CRF₁-Rezeptors auf die Aminosäuren 1-147 (entsprechend der DNA-Bindungsdomäne) von Gal4p folgen. Um beiden Teilen des Hybridproteins zu gestatten, möglichst ungehindert ihre in der Zelle natürlicherweise vorkommende Konformation einzunehmen, wurde ein molekulares Schanier, bestehend aus drei Glycinresten, an der Fusionsstelle eingefügt. Die so erzeugte cDNA befindet sich im Vektor pGBKT7 unter der Kontrolle des in der Hefe konstitutiv aktiven ADH1-Promotors.

Im einzelnen wurde die für Aminosäuren 368-415 des CRF₁-Rezeptors kodierende cDNA vom Plasmid pSK_CRF₁-R mit den Primern "*EcoRI*_3xG_CRF₁-R_1131_5'" und "*Bam*HI_CRF₁-R_1279_3'" über PCR amplifiziert. Über den 5' Primer wurden 3 GGA-Kodons (Glycin) sowie eine *EcoRI*-Schnittstelle, die die Subklonierung in pGBKT7 unter Erhalt des Leserasters gestattet, angefügt. Im 3' Primer folgt auf das endogene Stoppkodon eine *Bam*HI-Schnittstelle für die Subklonierung in pGBKT7. Die jeweils fünf Nucleotide langen Sequenzen jenseits der Schnittstellen sollen die Effizienz der Restriktionsenzyme an den am Ende des PCR-Fragments vorkommenden Schnittstellen verbessern. Das mit *EcoRI* und *Bam*HI geschnittene PCR-Produkt wurde in den ebenso geschnittenen Vektor pGBKT7 subkloniert, wobei pGBKT7_CRF₁-R_cytoplasmic entsteht. Überlappende Sequenzierungen mit den im Vektorrückgrat gelegenen Primern T7 und "3'_DNA-BD-sequencing" ergaben, daß die für Aminosäuren 368-415 des CRF₁-Rezeptors kodierende cDNA fehlerfrei amplifiziert und im richtigen Leserahmen in pGBKT7 eingefügt worden war.

Analog dazu wurde eine cDNA hergestellt, die für ein Fusionsprotein, bestehend aus der DNA-Bindungsdomäne von Gal4p und der zytoplasmatischen Domäne (Aminosäuren 380-431) des CRF₂-Rezeptors, kodiert. Im einzelnen wurde dazu die für die Aminosäuren 380-431 des CRF₂-Rezeptors kodierende cDNA vom Plasmid pKS_CRF₂-R mit den Primern "*EcoRI*_3xG_CRF₂-R_1266_5'" und "*Bam*HI_CRF₂-R_1424_3'" über PCR amplifiziert und über *EcoRI* und *Bam*HI in pGBKT7 subkloniert. Das so entstandene Konstrukt, pGBKT7_CRF₂-R_cytoplasmic, wurde ebenfalls durch überlappende Sequenzierungen bestätigt.

3.1.4 Expression der zytoplasmatischen Domänen der CRF₁- und CRF₂-Rezeptoren in Hefe

Um mit Hilfe des "Yeast Two-Hybrid"-Systems nach Interaktionspartnern zu einem gegebenen Protein zu suchen, wird üblicherweise zunächst ein Hefeklon etabliert, der das Ausgangsprotein als Fusion mit der DNA-Bindungsdomäne von Gal4p stabil exprimiert.

Nachdem gezeigt worden ist, daß die Anwesenheit dieses ersten Hybridproteins für sich allein nicht zu einer Aktivierung der Reportergene führt, kann in einem zweiten Schritt die "Yeast Two-Hybrid"-Bibliothek in diesen Klon transformiert (oder durch Verpaarung eingeführt) werden.

Um einen Hefeklon herzustellen, der ein Fusionsprotein, bestehend aus der DNA-Bindungsdomäne von Gal4p und der zytoplasmatischen Domäne des CRF₁-Rezeptors, stabil exprimiert, haben wir pGBKT7_CRF₁-R_cytoplasmic mit Hilfe der LiAC-Methode in AH109 transformiert und Hefen, die das Plasmid aufgenommen haben, in tryptophanfreiem Medium selektiert. Die Anwesenheit von pGBKT7_CRF₁-R_cytoplasmic beeinträchtigt das Wachstum dieser Hefen in Vollmedium nicht. In sechs unabhängigen Klonen wurde der Aktivierungszustand der Reportergene überprüft: Keiner dieser sechs Klone zeigte Wachstum auf tryptophan- und histidin- oder tryptophan- und adeninfreien Agarplatten (Abbildung 6) und keiner der Klone bildete blaue Kolonien auf X- α -Gal haltigen Agarplatten. Den im weiteren verwendeten Klon haben wir mit AH109_pGBKT7_CRF₁-R_cytoplasmic bezeichnet.

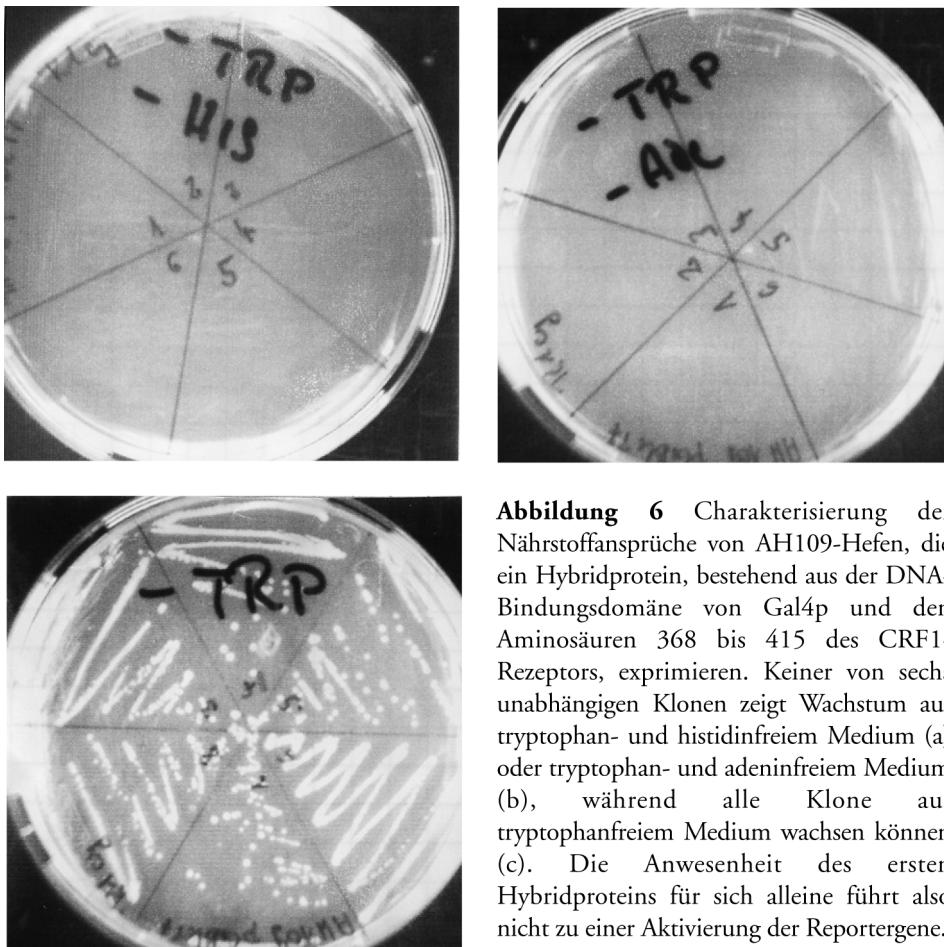


Abbildung 6 Charakterisierung der Nährstoffansprüche von AH109-Hefen, die ein Hybridprotein, bestehend aus der DNA-Bindungsdomäne von Gal4p und den Aminosäuren 368 bis 415 des CRF₁-Rezeptors, exprimieren. Keiner von sechs unabhängigen Klonen zeigt Wachstum auf tryptophan- und histidinfreiem Medium (a) oder tryptophan- und adeninfreiem Medium (b), während alle Klone auf tryptophanfreiem Medium wachsen können (c). Die Anwesenheit des ersten Hybridproteins für sich alleine führt also nicht zu einer Aktivierung der Reportergene.

Analog dazu wurde AH109_pGBKT7_CRF₂-R_cytoplasmic hergestellt, wobei die Anwesenheit des Fusionsproteins, bestehend aus der zytoplasmatischen Domäne des CRF₂-Rezeptors und der DNA-Bindungsdomäne von Gal4p, wiederum weder toxische Effekte zeigte noch eine Aktivierung der Reportergene zur Folge hatte.

3.1.5 Durchsuchen einer "Yeast Two-Hybrid"-Bibliothek nach Proteinen, die an die zytoplasmatische Domäne des CRF₁-Rezeptors binden

Die von uns verwendete "Yeast Two-Hybrid"-Bibliothek ist eine aus dem Gesamthirn der Maus hergestellte cDNA-Bibliothek in dem Vektor pACT2, die prätransformiert in Y187-Hefen vorlag. Um diese Bibliothek nach Proteinen zu durchsuchen, die an die zytoplasmatische Domäne des CRF₁-Rezeptors binden können, wurden die Bibliothekshefen mit AH109_pGBKT7_CRF₁-R_cytoplasmic verpaart, und die so gewonnenen diploiden Hefen auf die Anwesenheit von interagierenden Hybridproteinen selektiert.

AH109_pGBKT7_CRF₁-R_cytoplasmic wurde in 50 ml tryptophanfreiem Selektionsmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 kultiviert. Die Zellen wurden gewaschen, mit einem 1 ml Aliquot der in Y187 prätransformierten "Yeast Two-Hybrid"-Bibliothek vereinigt und unter sehr vorsichtigem Schütteln für 24 Stunden in 50 ml zweifach konzentriertem Vollmedium bei 30°C inkubiert. Dieser Verpaarungsansatz wurde gewaschen und auf fünfzig X-α-Gal haltige, tryptophan-, leucin-, histidin- und adeninfreie Selektionsplatten ausgebracht.

Die Bestimmung des Bibliothektiters ergab eine Gesamtanzahl von $6 \cdot 10^7$ Bibliothekshefen; die Verpaarungseffizienz lag bei ungefähr 0,2. Folglich wurden insgesamt ca. $1,2 \cdot 10^6$ Bibliothekshefen effektiv nach Proteinen durchsucht, die mit der zytoplasmatischen Domäne des CRF₁-Rezeptors interagieren.

Innerhalb von einer Woche erhielten wir auf den Selektionsplatten schätzungsweise 500 Kolonien, von denen allerdings nur ungefähr zehn Prozent eine schwache bis mittelstarke Blaufärbung zeigten. (Intensiv blaugefärbte Kolonien konnten wir nicht beobachten.) Wir haben 48 blaugefärbte Kolonien für die weitere Analyse ausgewählt.

Diese Kolonien wurden erneut jeweils auf einer Selektionsplatte ausgestrichen, und eine Einzelkolonie von jeder dieser Platten wurde in jeweils 5 ml Selektionsmedium vermehrt. Von diesen Minikulturen wurde Plasmid-DNA isoliert und in elektrokompetente E.coli-Bakterien transformiert. Da die beiden in den Hefen vorkommenden Plasmide pGBKT7 und pACT2 mit unterschiedlichen prokaryotischen Resistenzmarkern ausgestattet sind, konnten die mit

Bibliotheksplasmiden transformierten Bakterien durch Selektion auf ampicillinhaltigen Agarplatten direkt erhalten werden. Von jeder dieser 48 Transformationsplatten wurden zufällig vier Einzelkolonien ausgewählt, von denen wiederum Plasmid-DNA im kleinen Maßstab hergestellt wurde. Diese DNA wurde einem Verdau mit den für die Klonierung der cDNA-Bibliothek in pACT2 verwendeten Enzymen *EcoRI* und *XhoI* unterworfen. Dabei sollte neben einer 8,1 kb Bande, die dem Vektor pACT2 entspricht, eine zweite, dem jeweiligen Insert korrespondierende Bande zu sehen sein. Jeweils mindestens drei der vier von einer Transformationsplatte ausgewählten Kolonien beherbergten Plasmide, die ein identisches Restriktionsmuster lieferten (Abbildung 7). Eines dieser in mehreren Kolonien vorkommenden Plasmide wurde als repräsentativ für den jeweiligen Bibliotheksklon angesehen und weiter analysiert.

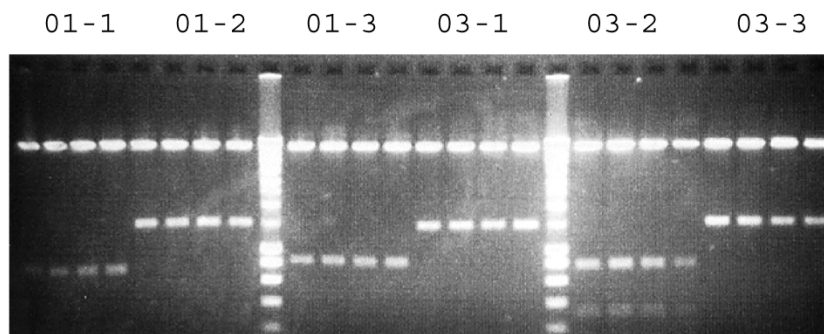


Abbildung 7 Restriktionsanalyse von Bibliotheksplasmiden durch kombinierten Verdau mit *EcoRI* und *XhoI*. Die durchgängig vorhandene Bande bei 8,1 kb entspricht dem Bibliotheksvektor pACT2, die kleineren Banden entsprechen den jeweils in pACT2 klonierten cDNAs. Plasmid-DNA aus jedem der 48 Hefeklone in Tabelle 2 wurde in *E. coli* transformiert und jeweils vier *E. coli*-Kolonien wurden analysiert. Gezeigt ist die Analyse der ersten sechs der in Tabelle 2 aufgeführten Klone. Näheres siehe Text.

Auffällig ist, daß bei ungefähr jedem sechsten der selektierten Bibliotheksplasmide, durch Verdau mit *EcoRI* und *XhoI* neben der pACT2-Bande zwei oder mehr Insertbanden entstehen. In diesen Fällen sind bei der Herstellung der Bibliothek möglicherweise zwei oder mehr unabhängige cDNAs in pACT2 kloniert worden. Solche Klone können durchaus auch tatsächliche Interaktoren repräsentieren, wenn zum Beispiel die erste von mehreren cDNAs einen nach 3' abgeschlossenen ORF beinhaltet, der dann in Fusion mit der Aktivierungsdomäne von Gal4p exprimiert wird.

3.1.6 Identifizierung falsch positiver Klone in der Hefe

Als falsch positiv werden durch eine "Yeast Two-Hybrid"-Suche identifizierte Bibliotheksproteine bezeichnet, die in der Hefe Reporter gene aktivieren, ohne mit dem in Fusion mit der DNA-Bindungsdomäne von Gal4p vorliegenden ORF des Ausgangsproteins wechselzuwirken. Häufig benötigen diese falsch positiven Bibliotheksproteine zur Aktivierung der Reporter gene durchaus ein zweites Hybridprotein, in dem die DNA-Bindungsdomäne von Gal4p vorkommt; der in diesem zweiten Hybridprotein mit dem Transkriptionsfaktor fusionierte ORF ist aber austauschbar und die Aktivierung der Reporter gene beruht folglich nicht auf einer spezifischen Interaktion zwischen den beiden Nicht-Gal4p-Anteilen der Hybride (Bai und Elledge, 1997).

Um falsch positive Klone auszuschließen, wurden die durch unsere Suche in der "Yeast Two-Hybrid"-Bibliothek identifizierten Hybridproteine jeweils gemeinsam mit einem Kontrollprotein in Hefen koexprimiert. Bei diesem Kontrollprotein handelt es sich um ein Fusionsprotein, bestehend aus der DNA-Bindungsdomäne von Gal4p und dem ORF des menschlichen Proteins Lamin C. Lamin C ist Bestandteil der nukleären Lamina und dem CRF₁-Rezeptor völlig unverwandt (Burke und Ellenberg, 2002). Durch eine Suche mit der zytoplasmatischen Domäne des CRF₁-Rezeptors identifizierte Bibliotheksproteine, die auch in Kombination mit dem Laminfusionsprotein eine Aktivierung von Reporter genen bewirken, enthalten aller Wahrscheinlichkeit nach keinen ORF, der spezifisch an die zytoplasmatische Domäne des CRF₁-Rezeptors bindet.

Wir haben diploide Hefen, die neben dem Laminprotein jeweils eines der aus unserer Suche hervorgegangenen Bibliotheksproteine enthalten, durch Verpaarung entsprechender AH109 und Y187 Klone hergestellt. Um den Aktivierungszustand der Reporter gene in diesen Hefen zu erfassen, wurde der Verpaarungsansatz jeweils aufgeteilt und zu gleichen Teilen auf tryptophan- und leucinfreie (^{-T/L}) Agarplatten und tryptophan-, leucin-, histidin- und adeninfreie (⁻⁴) Agarplatten ausgebracht. Während auf ^{-T/L} Agarplatten alle aus der Verpaarung hervorgegangenen diploiden Hefen Kolonien bilden, wachsen auf ⁻⁴ Agarplatten nur solche Hefen, in denen eine hinreichend starke Aktivierung der Reporter gene erfolgt. Entstehen beispielsweise auf einer ⁻⁴ Agarplatte genauso viele Kolonien wie auf der korrespondierenden ^{-T/L} Platte, so läßt das auf eine starke Aktivierung der Reporter gene schließen. Neben der Anzahl der gebildeten Kolonien muß aber auch der Zeitpunkt ihres Auftretens berücksichtigt werden: Je stärker die Aktivierung der Reporter gene ausfällt, desto schneller können die entsprechenden Kolonien auf den ⁻⁴ Platten wachsen, werden also früher erkennbar. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, daß der

Aktivierungszustand der Reportergene in einer großen Anzahl unabhängiger, aus der Verpaarung hervorgegangener Klone gleichzeitig erfaßt wird, die Untersuchung also nicht durch Besonderheiten eines bestimmten Einzelklons verzerrt werden kann.

Um diploide Hefen zu erhalten, die einzelne Bibliotheksproteine in Kombination mit dem Laminfusionsprotein exprimieren, wurde zunächst pGBKT7_Lamin in AH109 transformiert. Dabei entsteht AH109_pGBKT7_Lamin; die Anwesenheit des Fusionsproteins, bestehend aus der DNA-Bindungsdomäne von Gal4p und dem ORF von Lamin C, führt alleine nicht zu einer Aktivierung von Reportergenen in diesem Klon. Parallel dazu wurden die von den 48 ausgewählten Kolonien isolierten und wie zuvor beschrieben in *E.coli* vermehrten Bibliotheksplasmide in Y187-Hefen (re)transformiert. Die so hergestellten Klone wurden mit der Nummer des jeweiligen Bibliotheksplasmids bezeichnet:

Y187_13-1 enthält also das Bibliotheksplasmid, das aus der Kolonie 13-1 auf den ursprünglichen Selektionsplatten isoliert worden ist. Jeder dieser 48 Y187-Klone wurde mit AH109_pGBKT7_Lamin in kleinem Maßstab verpaart, die Verpaarungsansätze wurden jeweils aufgeteilt, zu gleichen Teilen auf ^{-T/-L}- und ⁻⁴Platten ausgesät, und Kolonien nach Zahl und Zeitpunkt ihres Auftretens erfaßt. Parallel dazu wurden die 48 Bibliotheksproteine erneut auf eine Wechselwirkung mit der zytoplasmatischen Domäne des CRF₁-Rezeptors hin untersucht. Dazu wurden die einzelnen Y187-Klone jeweils mit AH109_pGBKT7_CRF₁-R_{cytoplasmic} verpaart, und nach den oben dargestellten Kriterien wurden Anhaltspunkte für das Ausmaß der Reportergenaktivierung gewonnen. Die Ergebnisse beider Experimente sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Für die neun in Tabelle 2 markierten Klone zeigten die aus der Verpaarung mit AH109_pGBKT7_Lamin hervorgegangenen diploiden Hefen auch nach vierzehntägiger Inkubation keinerlei Wachstum auf ⁻⁴Platten, während auf den korrespondierenden ^{-T/-L}Platten bereits nach zwei Tagen jeweils mindestens 100 Kolonien vorhanden waren. Gleichzeitig ergab für diese neun Klone die Verpaarung mit AH109_pGBKT7_CRF₁-R_{cytoplasmic} diploide Hefen, die auf ⁻⁴Platten bereits am zweiten Tag zumindest kleine Kolonien bildeten. Deren Anzahl erreichte einen Tag später (Tag drei) mindestens die Hälfte der Anzahl der Kolonien auf der jeweiligen ^{-T/-L}Kontrollplatte. Diese Konstellation spricht für eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem in dem jeweiligen Klon exprimierten Bibliotheksprotein und der zytoplasmatischen Domäne des CRF₁-Rezeptors.

Klon	Verpaarung mit AH109_pGBKT7_Lamin					Verpaarung mit AH109_pGBKT7_mCRHR1_cytoplasmic						
	Wachstum auf (T ⁺)-Platten		Wachstum auf (T ⁻)-Platten			Wachstum auf (T ⁺)-Platten		Wachstum auf (T ⁻)-Platten				
	Auftreten Kolonien	erster	Anzahl der Kolonien an Tag 2 + = >100	Auftreten Kolonien	erster	relative Anzahl der Kolonien zum Zeitpunkt	Auftreten Kolonien	erster	Anzahl der Kolonien an Tag 2 + = >100	Auftreten Kolonien	erster	relative Anzahl der Kolonien zum Zeitpunkt
01-1	2		+	3		-0,2 (d3)	2		+	3		-0,2 (d3)
01-2	2		+	3			2		+	2		<0,1 (d2)
01-3	2		+				2		+			keine (d3)
03-1	2		+	2			2		+	2		
03-2	2		+	4			2		+	3		<0,2 (d3)
03-3	2		+				2		+			keine (d3)
04-1	2		+	3		-0,3 (d3)	2		+			keine (d3)
04-2	2		+				2		+	3		<0,1 (d3)
04-3	2		+	3		-0,1 (d3)	2		+	2		<0,1 (d2) >0,2 (d3)
05-1	2		+	keine (d14)			2		+	2		>0,5 (d3)
06-2	2		+				2		+	3		<0,1 (d3)
08-1	2		+				2		+	3		<0,1 (d3)
08-2	2		+	keine (d14)			2		+	2		>0,1 (d2) >0,5 (d3)
08-3	2		+	4			2		+	3		>0,1 (d3)
13-1	2		+	keine (d14)			2		+	2		-0,1 (d2) >0,5 (d3)
18-1	2		+	4		-0,5 (d4)	2		+	2		>0,1 (d2) -1 (d3)
20-1	2		+	4			2		+	3		-0,8 (d3)
21-1	2		+	keine (d14)			2		+	2		>0,1 (d2) <0,2 (d3)
21-2	2		+	keine (d14)			2		+	2-3		>0,1 (d2) >0,5 (d3)
25-1	2		+	keine (d14)			2		+	2		-1 (d3)
25-2	2		+	2			2		+	2		-0,2 (d2)
28-1	2		+	3		<0,1 (d3)	2		+	3		<0,1 (d3)
29-1	2		+				2		+			keine (d3)
33-1	2		+	keine (d14)			2		+	2		-0,1 (d2) >0,5 (d3)
33-2	2		+	4			2		+	2		>0,3 (d2)
33-3	2		+	4			2		+	3		<0,1 (d3)
33-4	2		+	keine (d14)			2		+	2		<0,1 (d2) <0,1 (d3)
34-1	2		+	2		-0,1 (d2)	2		+	2		>0,2 (d2)
36-1	2		+				2		+			keine (d3)
36-2	2		+	keine (d14)			2		+	2		>0,1 (d2) -0,8 (d3)
36-3	2		+	4			2		+	3		<0,1 (d3)
36-4	2		+	4			2		+	2		>0,1 (d2)
36-5	2		+				2		+			keine (d3)
38-1	2		+				2		+			keine (d3)
38-2	2		+	3		-0,5 (d3)	2		+			keine (d3)
38-3	2		+	keine (d14)			2		+	2		-0,1 (d2) -1 (d3)
41-1	2		+	3		<0,1	2		+	3		>0,1
41-2	2		+				2		+	3		<0,1 (d3)
43-1	2		+				2		+	3		<0,1 (d3)
43-2	2		+				2		+			keine (d3)
45-1	2		+	keine (d14)			2		+	2		<0,2 (d2) >0,5 (d3)
45-2	2		+	3			2		+	2		<0,1 (d2)
46-1	2		+	3			2		+	3		
46-2	2		+				2		+			keine (d3)
48-1	2		+	4			2		+	3		
48-2	2		+	2		>0,2 (d2)	2		+	2		>0,5 (d2)
48-3	2		+	2			2		+	2		-0,5 (d2)
49-1	2		+				2		+	3		<0,1 (d3)

Tabelle 2. Identifizierung falsch positiver Klone durch Koexpression der Bibliotheksproteine mit dem Lamin-Kontrollprotein. Die durch Retransformation der Bibliotheksplasmide in Y187 gewonnenen Klone wurden jeweils mit AH109_pGBKT7_Lamin und AH109_pGBKT7_CRF-R_cytoplasmic in kleinem Maßstab verpaart. Mehrere Verdünnungsstufen dieser Verpaarungsansätze wurden jeweils zu gleichen Teilen auf tryptophan- und leucinfreie Agarplatten (T⁺) sowie auf tryptophan-, leucin-, adenin-, und histidinfreie Agarplatten (T⁻) ausgebracht. Nach zwei Tagen wurde jeweils die am dünnsten bewachsene (T⁺)-Platte, auf der noch mehr als 100 Kolonien vorhanden waren ausgewählt. Die diesen Platten der Verdünnungsstufe nach entsprechenden, zugehörigen (T⁻)-Platten wurden für maximal 12 Tage weiter inkubiert. Ein Klon wurde nicht weiter verfolgt, wenn entweder die durch Verpaarung mit AH109_pGBKT7_Lamin entstandenen Hefen - gleichgültig zu welchem Zeitpunkt - auf (T⁻)-Platten Wachstum zeigten, oder wenn die durch Verpaarung mit AH109_pGBKT7_CRF-R_cytoplasmic erhaltenen Diploiden nach dreitägiger Inkubation auf (T⁻)-Agarplatten nicht wenigstens halbsoviele Kolonien bildeten wie auf der korrespondierenden (T⁺)-Platte.

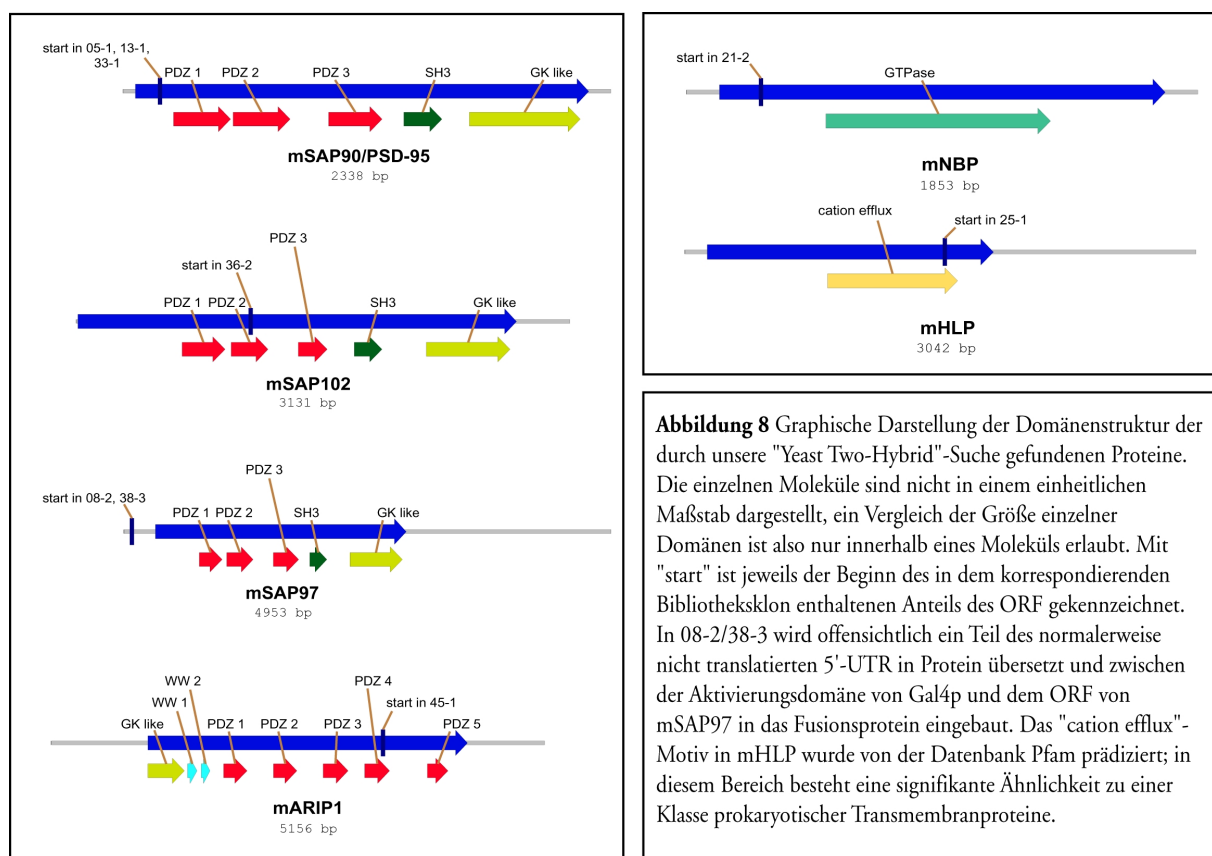
Die bereits zuvor in E.coli vermehrten Bibliotheksplasmide aus diesen neun Klonen wurden mit dem Primer "Gal4p_AD_Sequencing" sequenziert. Dieser Primer liegt zwischen der für die Aktivierungsdomäne von Gal4p kodierenden cDNA und den für die Klonierung der Bibliotheks-cDNAs verwendeten Schnittstellen in pACT2. Die so erhaltenen Sequenzen repräsentieren also den 5'-Anteil des mit der Aktivierungsdomäne von Gal4p zu dem jeweiligen Bibliotheksprotein verschmolzenen ORF. Mittels "BLAST"-Suche (Altschul et al., 1997) konnten diese Sequenzen jeweils als Teil einer bereits in der NCBI-Datenbank abgelegten Maus-cDNA identifiziert werden. Die Namen und Zugriffsnummern dieser cDNAs sind in der Tabelle 3 wiedergegeben (siehe auch Abbildung 8). Die identifizierten cDNAs stimmen mit den in der "BLAST"-Suche eingesetzten Sequenzen jeweils mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit ("expect-value") von 0,0 überein.

Klone	Name und Referenznummer der cDNA	Name und Referenznummer des Proteins
05-1, 13-1, 33-1	Mus musculus discs, large homolog 4 (Drosophila) (Dlgh4); NM_007864	Postsynaptic density protein 95 (PSD-95)/Synapse-associated protein 90 (SAP90); NP_031890
08-2, 38-3	Mus musculus discs, large homolog 3 (Drosophila) (Dlgh3); XM_125425	Synapse-associated protein 97 (SAP97); XP_125425
36-2	Mus musculus discs, large homolog 1 (Drosophila) (Dlgh1); NM_007862	Synapse-associated protein 102 (SAP102); NM_007862
45-1	Mus musculus activin receptor interacting protein 1; XM_147312	Activin receptor interacting protein 1 (ARIP1); XP_147312
21-2	Mus musculus similar to putative nucleotide binding protein, estradiol-induced (LOC218871); XM_127667	similar to putative nucleotide binding protein, estradiol-induced; XP_127667
25-1	Mus musculus similar to chromosome 4 open reading frame 1; expressed in human embryonic lung (LOC231262); XM_132037	similar to chromosome 4 open reading frame 1; XP_132037

Tabelle 3. Die durch unsere "Yeast Two-Hybrid"-Suche nach Proteinen, die mit der zytoplasmatischen Domäne des CRF₁-Rezeptors interagieren, gefundenen Klone. Die Referenznummern beziehen sich auf die entsprechenden Einträge in der NCBI-Datenbank. Eine graphische Darstellung der Domänenstruktur der einzelnen Proteine gibt Abbildung 8.

3.1.7 Die durch unsere Suche gefundenen und in der Hefe als spezifische bestätigten Interaktoren

Drei der durch unsere Suche identifizierten Proteine - PSD-95, SAP102 und SAP97 - sind untereinander und zu dem Produkt des "discs large"-Tumorsuppressorgens aus *Drosophila* hoch homolog. Vom Aminoterminal zum Carboxyterminus verfügen diese Proteine jeweils über drei PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne und eine der aus Hefe stammenden Guanylatkinase homologe Domäne (GK-Domäne). Gemeinsam mit einem vierten Protein, PSD-93, bilden sie die Familie der neuronalen membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUK).



PSD-95 wurde zuerst als ein ausschließlich im Zentralnervensystem vorkommendes Protein beschrieben, das in den postsynaptischen Densitäten von Neuronen hoch angereichert ist (Cho et al., 1992). Dieses Kompartiment beherbergt eine große Zahl von Glutamatrezeptoren, darunter sowohl NMDA- als auch AMPA-Rezeptoren. NMDA-Rezeptoren liegen *in vivo* in Form von Multiproteinkomplexen mit hohem Molekulargewicht vor, und PSD-95 ist ein Bestandteil dieser Komplexe (Husi et al., 2000). Andererseits spielt PSD-95 auch eine wichtige Rolle für die dynamische Organisation synaptischer AMPA-Rezeptorkomplexe (El Husseini et al.,

2000; El Husseini et al., 2002). Für eine ausführliche Vorstellung des Proteins sei auf die Einleitung (1.2) verwiesen.

Ähnlich wie PSD-95 kommt auch SAP102 in der postsynaptischen Densität vor. Das Protein ist ebenfalls Bestandteil der NMDA-Rezeptorkomplexe (Husi et al., 2000; Muller et al., 1996).

Auch SAP97 tritt neueren Untersuchungen zu Folge vorwiegend in postsynaptischer Lokalisation auf (Muller et al., 1995; Valtschanoff et al., 2000). Als einziges der Synapsen-assoziierten Proteine bindet SAP97 direkt an die GluR1-Untereinheit von AMPA-Rezeptoren (Leonard et al., 1998; Valtschanoff et al., 2000).

Ein weiteres durch unsere Suche identifiziertes Protein ist ARIP1. ARIP1 der Maus ist zunächst als Interaktionspartner des Activin-TypIIA-Rezeptors gefunden worden.

Aktivinrezeptoren gehören zur Familie der TGF β -Rezeptoren. Dabei handelt es sich um membranständige Serin-/Threoninkinasen, die nach Aktivierung durch den jeweiligen Liganden zytosolische "Smad"-Proteine phosphorylieren. Diese translozieren daraufhin in den Nucleus, um dort als Transkriptionsfaktoren zu wirken (Attisano und Wrana, 2002; Massague und Wotton, 2000). ARIP1 scheint die Assoziation des Activin-TypIIA-Rezeptors mit Smad3 zu vermitteln; das Protein wird vorwiegend im Gehirn und dort zum Beispiel in hippokampalen Neuronen exprimiert (Shoji et al., 2000). Unabhängig davon ist gezeigt worden, daß das homologe Protein der Ratte mit verschiedenen Komponenten der NMDA-Rezeptorkomplexe interagiert (Hirao et al., 1998; Hirao et al., 2000). ARIP1 verfügt vom Aminoterminus zum Carboxyterminus über eine GK-Domäne, zwei WW-Domänen und fünf PDZ-Domänen.

Die vier ersten der in Tabelle 3 aufgeführten Proteine besitzen also jeweils mehrere PDZ-Domänen. PDZ-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die in einer Reihe von membranassoziierten Proteinen, typischerweise im Bereich von Zell-Zellkontakten vorkommen. PDZ-Domänen können eine Bindung mit im Carboxyterminus von einigen Transmembranproteinen vorkommenden Ligandenmotiven eingehen. Als Konsensus für die Bindung an Gruppe I-PDZ-Domänen ist ein "(S/T)XV"-Motiv ermittelt worden, das im äußersten Carboxyterminus des jeweiligen Transmembranproteins auftritt (Songyang et al., 1997) ("S", "T" und "V" sind die gängigen Einbuchstabenabkürzungen für die Aminosäuren Serin, Threonin beziehungsweise Valin, und "X" bezeichnet jede beliebige Aminosäure). Die letzten drei Aminosäuren des CRF₁-Rezeptors lauten "TAV" und stimmen offensichtlich mit diesem Konsensus überein ("A" steht hier als Einbuchstabenabkürzung für Alanin).

Struktur und Funktion der beiden übrigen durch unsere Suche identifizierten Proteine sind weitaus weniger gut aufgeklärt: Die zu Klon 21-2 korrespondierende humane cDNA wurde in einer Genexpressionsstudie an Brustkrebszellen als durch Östrogene induzierbare mRNA

gefunden (Charpentier et al., 2000). Der in dieser cDNA gefundene ORF könnte für ein GTP-bindendes Protein kodieren.

Die zu Klon 25-1 entsprechende humane cDNA wurde ursprünglich aus einer humanen embryonalen Lungenzelllinie isoliert. Diese cDNA kodiert für ein als HUEL ("human embryonic lung") oder C4orf1 bezeichnetes Protein, das in Abhängigkeit vom Proliferationszustand der untersuchten Zelllinie entweder vorwiegend zytoplasmatisch/membranassoziiert oder nukleär vorkommt (Sim und Chow, 1999). Funktionellen Prädiktionen deuten darauf hin, daß eine Verwandtschaft zu Transkriptionsfaktoren, insbesondere nukleären Hormonrezeptoren, besteht. Das homologe Protein der Maus wird als "mouse HUEL like protein" (mHLP) bezeichnet.

3.1.8 Überprüfung einer möglichen Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne des CRF₂-Rezeptors und PDZ-Domänen-Proteinen mit Hilfe des "Yeast Two-Hybrid"-Systems

Die beiden CRF-Rezeptoren der Maus - CRF₁- und CRF₂-Rezeptor - sind einander sehr ähnlich. Das gilt insbesondere für die zytoplasmatischen Domänen: Hier sind 76% der Aminosäuren identisch und 89% homolog. Die letzten vier Aminosäuren des CRF₂-Rezeptors allerdings lauten TAAV, stimmen also mit dem "(S/T)XV"-Konsensus formal nicht überein.

Wir haben das "Yeast Two-Hybrid"-System benutzt, um zu überprüfen, ob die zytoplasmatische Domäne des CRF₂-Rezeptors in ähnlicher Weise wie die des CRF₁-Rezeptors mit einem PDZ-Domänen-Protein wie PSD-95 interagieren kann. Dazu wurde ein Hefestamm hergestellt, der die zytoplasmatische Domäne des CRF₂-Rezeptors, fusioniert an die DNA-Bindungsdomäne von Gal4p, mit dem in Klon 13-1 vorkommenden Bibliotheksprotein koexprimiert. Der in diesem Bibliotheksprotein mit der Aktivierungsdomäne von Gal4p fusionierte ORF enthält alle drei PDZ-Domänen von PSD-95.

AH109_pGBKT7_CRF₂-R_cytoplasmic wurde mit Y187_13-1 in kleinem Maßstab verpaart, und der Verpaarungsansatz wurde zu gleichen Teilen auf tryptophan- und leucinfreie (^{-T/L}) sowie auf tryptophan-, leucin-, histidin- und adeninfreie (⁻⁴) Agarplatten ausgebracht. Die in dieser Verpaarung erzeugten diploiden Hefen zeigten keinerlei Wachstum auf ⁻⁴Selektionsmedium, während auf einer ^{-T/L}Kontrollplatte derselben Verdünnungsstufe nach zwei Tagen mehr als 100 Kolonien vorhanden waren. Die zytoplasmatische Domäne des CRF₂-Rezeptors geht also keine mit Hilfe des "Yeast Two-Hybrid"-Systems detektierbare Wechselwirkung mit einer der PDZ-Domänen von PSD-95 ein. Trotz insgesamt hoher Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz beider Rezeptoren könnten also die unterschiedlichen

Carboxytermini der CRF₁- und CRF₂-Rezeptoren Wechselwirkungen mit Interaktionspartnern vermitteln, die jeweils einem der beiden Proteine vorbehalten sind, und damit helfen, unterschiedliche Funktionen der beiden Rezeptoren zu definieren.

3.2 Bestätigung und biochemische Analyse der durch die "Yeast Two-Hybrid"-Suche gefundenen Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95 in HEK293-Zellen

3.2.1 Zum Prinzip der Koimmunopräzipitation von exogen exprimierten und mit zusätzlichen Epitopen versehenen Proteinen

Durch eine "Yeast Two-Hybrid"-Suche gefundene Interaktionen sollten grundsätzlich mittels einer zweiten, dem "Yeast Two-Hybrid"-System möglichst unverwandten Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen bestätigt werden. Dazu bietet sich eine Koimmunopräzipitation an.

Bei der Koimmunopräzipitation wird ein Protein P1 mittels eines gegen P1 gerichteten Antikörpers präzipitiert. Andere Proteine P2, P3 und P4, die sich in der Zelle in einem Komplex mit P1 befinden, können dabei mit P1 präzipitiert, also kopräzipitiert, werden. Das Immunopräzipitat kann beispielsweise mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und "Immunoblotting" auf seine Zusammensetzung hin untersucht werden. Die auf diese Weise im Präzipitat nachgewiesenen Proteine interagieren mit einiger Wahrscheinlichkeit in der Zelle mit P1.

Die höchste Aussagekraft kommt der Koimmunopräzipitation endogener, also in der Zelle natürlicherweise vorkommender Proteine zu. Dazu benötigt man allerdings einen gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper, der sich für eine Immunopräzipitation eignet. Weiterhin kann der Nachweis einer Protein-Protein Wechselwirkung mittels Koimmunopräzipitation der endogenen Proteine sehr schwierig sein, wenn die untersuchten Proteine *in vivo* nur schwach exprimiert werden.

Eine Möglichkeit, diese Schwierigkeiten zu umgehen, bietet die Koimmunopräzipitation von exogen exprimierten und mit zusätzlichen Epitopen versehenen Proteinen. Dabei werden Proteine, für die eine Interaktion vermutet werden kann, jeweils mit einem synthetischen oder aus einem Fremdprotein stammenden Epitop ausgestattet. Man wählt dazu solche Epitope aus,

die als sehr immunogen bekannt sind und gegen die Antikörper erhältlich sind, mit denen sich eine Immunopräzipitation gut durchführen läßt. Das Anheften eines solchen nur wenige Aminosäuren langen Epitops stört die Funktion der untersuchten Proteine meistens nicht. Die verschiedenen Proteine werden mit unterschiedlichen Epitopen versehen und lassen sich über diese dann immunologisch eindeutig identifizieren (Munro und Pelham, 1984).

Die cDNAs, die für die Proteine mit angefügtem Zusatzepitop kodieren, werden in einen für die Expression in Säugerzellen geeigneten Vektor kloniert und im allgemeinen transient in eine Zelllinie transfiziert. Auf diese Weise lassen sich relativ hohe Konzentrationen der untersuchten Proteine erzielen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die für die exogen exprimierte Proteine kodierenden cDNAs gezielt modifiziert werden können. So können zum Beispiel bestimmte Abschnitte der Proteine entfernt oder ausgetauscht werden oder auch einzelne Aminosäuren verändert werden. Damit gelingt es, die für eine Protein-Protein Wechselwirkung entscheidenden Domänen oder Motive genau zu definieren.

Da die uns zur Verfügung stehenden Antikörper gegen den CRF₁-Rezeptor sowohl in der Koimmunopräzipitation als auch für die Immunodetektion nicht zufriedenstellend funktionierten, und wir an der Charakterisierung der für die Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95 wesentlichen Domänen und Motive auf Seiten beider Moleküle interessiert waren, haben wir uns entschieden, die durch die "Yeast Two-Hybrid"-Suche gefundene Interaktion zunächst mittels Koimmunopräzipitation der in HEK293 Zellen exogen exprimierte und mit zusätzlichen Epitopen versehenen Proteine zu bestätigen und in diesem System näher biochemisch zu analysieren.

3.2.2 Konstruktion von Vektoren zur Expression des mit zusätzlichen Epitopen versehenen CRF₁-Rezeptors in Säugerzellen

Ausgehend von der Vorstellung, daß zusätzliche Epitope in endständiger Position für präzipitierende Antikörper im allgemeinen besser zugänglich sind und gleichzeitig die Gesamtkonformation und damit die Funktion des Proteins weniger stören, werden solche zusätzlichen Epitope üblicherweise am Amino (N)- oder Carboxy (C)-Terminus eines Proteins angefügt.

Die letzten drei Aminosäuren des CRF₁-Rezeptors lauten "TAV". Ein sehr ähnlicher C-Terminus ("SDV") findet sich zum Beispiel in der 2B Untereinheit des NMDA-Rezeptors (NR2B), für die ebenfalls eine Interaktion mit PSD-95 beschrieben worden ist (Kornau et al., 1995). Dort und an anderer Stelle (Songyang et al., 1997) ist gezeigt worden, daß ein C-terminal

endständiges " (S/T)XV"-Motiv für die Interaktion von NR2B mit PSD-95 beziehungsweise Gruppe I PDZ-Domänen und deren Liganden im allgemeinen unbedingt erforderlich ist. Insbesondere können diese Motive nicht mehr von PDZ-Domänen gebunden werden, wenn sie als interne Sequenzen auch nur wenige Aminosäuren vom C-Terminus entfernt in einem Protein auftreten (Songyang et al., 1997). Wir mußten annehmen, daß die Wechselwirkung zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95 ebenfalls auf einer Interaktion zwischen dem C-terminalen "TAV"-Motiv und einer oder mehrerer PDZ-Domänen von PSD-95 beruht und durch das Anfügen eines zusätzlichen Epitops an den C-Terminus zerstört werden würde. Aus diesem Grund konnten wir von dieser technisch einfachen Möglichkeit keinen Gebrauch machen.

Abweichend von der Mehrheit der Sieben-Transmembran-Rezeptoren verfügen sowohl der CRF₁-Rezeptor als auch der CRF₂-Rezeptor über ein N-terminales Signalpeptid, das für die Membranlokalisierung dieser Proteine erforderlich ist (Perrin et al., 2001). Dieses umfaßt im Fall des CRF₁-Rezeptors die Aminosäuren 1 bis 23. Nach erfolgter Insertion in das endoplasmatische Retikulum wird das Signalpeptid von Signalpeptidasen abgespalten und es resultiert ein reifes CRF₁-Rezeptorprotein mit dem N-Terminus "Serin-Leucin-Glutamin" (Perrin et al., 2001). Ein N-terminal zum Initiator-Methionin positioniertes zusätzliches Epitop würde also im Fall der CRF-Rezeptoren entweder mit der Funktion des Signalpeptids und damit der Rezeptorlokalisierung interferieren oder würde mitsamt dem Signalpeptid abgespalten und wäre dann auf dem reifen Protein nicht mehr vorhanden. Damit das reife Protein N-terminal ein zusätzliches Epitop trägt und gleichzeitig in die Membran integriert, muß dieses Epitop also im Vorläuferprotein unmittelbar hinter der Spaltstelle der Signalpeptidase positioniert sein. Wir haben zwei unterschiedliche Strategien verfolgt, um dieses Konzept zu realisieren:

In einem ersten Ansatz wurde ein zusätzliches zehn Aminosäuren umfassendes myc-Epitop zwischen Serin 24 und Leucin 25 des Vorläuferproteins plaziert (Abbildung 9a). Das myc-Epitop stammt aus dem humanen c-myc Protein und ist eines der am häufigsten für diese Anwendung gebrauchten Epitope (Munro und Pelham, 1984; Sells und Chernoff, 1995).

Um ein zusätzliches Epitop an den N-Terminus des reifen Rezeptorproteins anzuschließen, haben wir das myc-Epitop zwischen Aminosäure 24 und 25 des CRF₁-Rezeptorvorläuferproteins eingefügt. Eine cDNA, die für ein solches Fusionsprotein kodiert, wurde mit Hilfe der Megaprimer-PCR Technik (Barik, 1997) hergestellt. Der Fusionsprimer "CRF₁-R (19-24)_myc_CRF₁-R (25-30)_3'" repräsentiert in "antisense"- Orientierung den Teil dieser cDNA, der für das myc-Epitop mitsamt den sich im Fusionsprotein N-terminal und C-terminal anschließenden jeweils sechs Aminosäuren kodiert. Mit diesem Fusionsprimer und dem jenseits des 5'-Endes der CRF₁-Rezeptor-cDNA im Vektorrückgrat von pSK gelegenen T7-Standardprimer wurde mittels PCR von pSK_CRF₁-R ein DNA-Fragment generiert, das einen

ORF enthält, der für Aminosäuren 1-24 des CRF₁-Rezeptors gefolgt von dem myc-Epitop, gefolgt wiederum von Aminosäuren 24-30 des CRF₁-Rezeptors kodiert. Dieses Fragment wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und in doppelsträngiger Form als 5'-Primer verwendet, um gemeinsam mit dem 3'-Primer "CRF₁-R_350_3" von pSK_CRF₁-R mittels PCR ein Fragment zu erzeugen, das jetzt einen ORF enthält, der für die Aminosäuren 1-106 des CRF₁-Rezeptors mit zusätzlichem myc-Epitop zwischen Serin 24 und Leucin 25 kodiert. Dieses Fragment wurde wiederum über ein Agarosegel aufgereinigt und in einer dritten Runde PCR mit den Primern "EcoRI_Kozak_CRF₁-R_atg_5'" und "CRF₁-R_350_3" amplifiziert. Dabei wurde über den 5'-Primer eine EcoRI-Schnittstelle und eine optimale Kozak-Sequenz (Kozak, 1987) an das 5'-Ende des ORF angefügt. Das so erzeugte Produkt wurde über die 5' angefügte EcoRI-Schnittstelle und die in der CRF₁-Rezeptor-cDNA an Position 307 vorkommende singuläre PvuII-Schnittstelle in den Klonierungsvektor pSP72 kloniert und durch überlappende Sequenzierungen von beiden Seiten als fehlerfrei amplifiziert bestätigt. Der 3'-Anteil der CRF₁-Rezeptor-cDNA wurde als PvuII-XhoI-Fragment aus pSK_CRF₁-R angefügt und die so entstandene cDNA über EcoRI und XhoI in den Expressionsvektor pcDNA3 subkloniert, wodurch pcDNA3_SP (CRF₁-R)_myc_CRF₁-R entsteht.

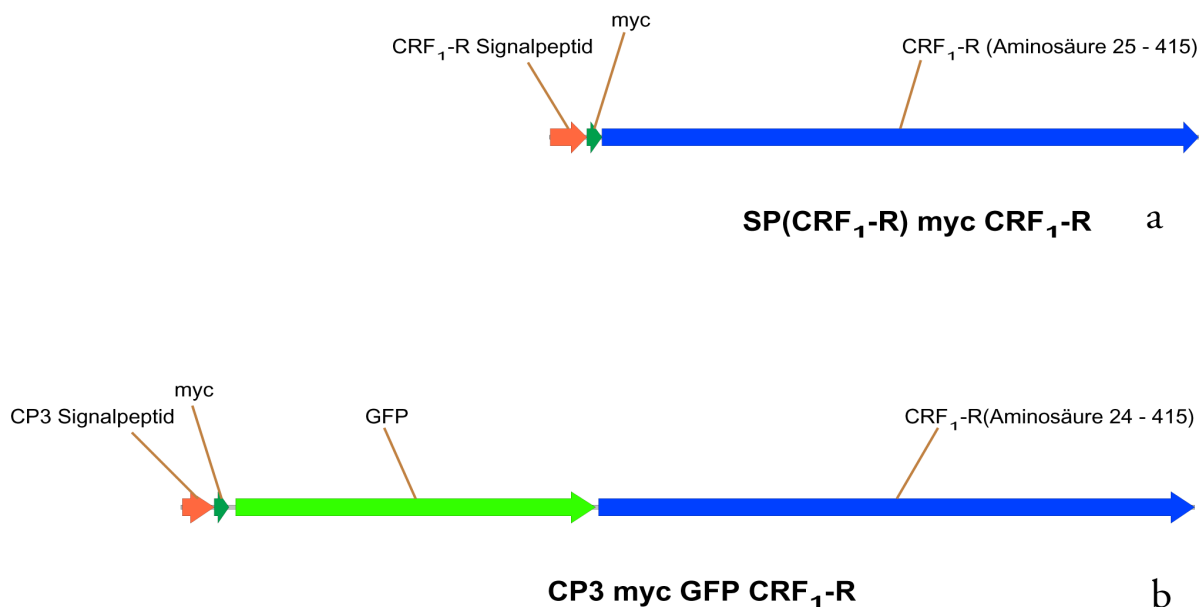


Abbildung 9 Aufbau der mit zusätzlichen Epitopen versehenen CRF₁-Rezeptor-Proteine. In a) wird das endogene, in b) das aus CLP3 entlehene Signalpeptid benutzt, um den Rezeptor in das endoplasmatische Retikulum zu dirigieren.

Der zuvor beschriebene Ansatz zeichnet sich dadurch aus, daß das Signalpeptid des CRF₁-Rezeptors selbst - das endogene Signalpeptid also - benutzt wird, um das reife Rezeptorprotein

mit N-terminal angefügtem zusätzlichem Epitop in die Membran zu dirigieren. Diese Funktion kann aber ebensogut von einem fremden, einem beliebigen Membranprotein entliehenen Signalpeptid übernommen werden. In beiden Fällen sollte das Signalpeptid unmittelbar nach erfolgter Insertion in das endoplasmatische Retikulum von dem Restprotein - beginnend mit dem N-terminalen zusätzlichen Epitop - abgespalten werden und darüberhinaus keinen Einfluß auf die Funktion des reifen Proteins besitzen. Die Verwendung eines fremden Signalpeptids bietet dabei den Vorteil, daß das Signalpeptid und ein oder mehrere zusätzliche Epitope, die an den extrazellulär positionierten N-Terminus von Transmembranproteinen angefügt werden sollen, zu einer feststehenden Einheit zusammengefaßt werden können. Eine solche Einheit kann dann anstelle des endogenen Signalpeptids an den N-Terminus eines beliebigen reifen Transmembranproteins plaziert werden. Nach Prozessierung des fremden Signalpeptids liegt dann dieses Transmembranprotein - nunmehr extrazellulär an seinem N-Terminus mit den gewünschten Zusatzepitopen versehen - in die Membran integriert vor.

Wir haben eine solche Strategie angewandt, um ein zusätzliches myc-Epitop, gefolgt von dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) von *Aequorea victoria* an den N-Terminus des reifen CRF₁-Rezeptors anzufügen. GFP wird in *A. victoria* durch die Ca²⁺-abhängige Biolumineszenz eines zweiten Proteins, Aequorin, angeregt und emittiert daraufhin grünes Licht. Das Protein läßt sich aber auch in einem breiten Spektrum von Zellen oder Organismen exprimieren, die von Natur aus kein Licht produzieren, und erfährt auch dort die für seine Funktion als Fluorophor erforderlichen posttranslationalen Modifikationen (Heim et al., 1994). So kann GFP - alleine oder als Fusion mit einem Partnerprotein - auch in Säugerzellen exprimiert werden und die so gebildeten Proteine können in der lebenden Zelle fluoreszenzmikroskopisch verfolgt werden (Marshall et al., 1995; Misteli und Spector, 1997). Auf diese Weise sind die zelluläre Lokalisation und Dynamik einer Vielzahl verschiedener Proteine *in vivo* studiert worden (Cole et al., 1996) (Olson et al., 1995; Wacker et al., 1997). Die für die Expression in Säugerzellen verwendeten cDNAs sind mittlerweile hinsichtlich der Kodonbenutzung an die Gegebenheiten dieser Systeme angepaßt worden (Zolotukhin et al., 1996). Ferner konnte durch die Einführung zweier Punktmutationen die Intensität der Emission deutlich gesteigert werden. Das dadurch gewonnene Protein GFP- (F64L)/ (S65T) wird auch als "Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)" bezeichnet (Zhang et al., 1996).

Um myc-Epitop und EGFP an den N-Terminus des reifen Rezeptorproteins anzufügen, haben wir das endogene Signalpeptid des CRF₁-Rezeptors durch das Signalpeptid von CLP3, ein Protein der Kutikula von *Drosophila melanogaster* (Snyder et al., 1982), gefolgt von einem myc-Epitop und EGFP ersetzt (Abbildung 9b). Diese Einheit von Signalpeptid und zusätzlichen Gruppen ist bereits benutzt worden, um die GluR1-Untereinheit von AMPA-Rezeptoren an dem

ebenfalls extrazellulär gelegenen N-Terminus mit einem myc-Epitop und EGFP zu versehen (Mack et al., 2001). In der Maus exprimiert, wurden die so markierten GluR1-Untereinheiten zu funktionellen (heteromeren) AMPA-Rezeptoren zusammengesetzt und in Synapsen eingebaut, was die Funktionalität des fremden Signalpeptids klar belegt (Mack et al., 2001).

Das Plasmid pRK_myc_GFP enthält eine cDNA, die für ein Fusionsprotein kodiert, das aus den Aminosäuren 1 bis 19 von CLP3, dem myc-Epitop und dem ORF von EGFP (ohne Initiator-methionin) besteht. Diese cDNA wurde über eine unmittelbar 5' des Initiator-methionins von CLP3 gelegene *EcoRI*-Schnittstelle und eine am 3'-Ende des ORF von EGFP gelegene *XbaI*-Schnittstelle in den für die Expression in eukaryotischen Zellen geeigneten Vektor pcDNA3 subkloniert, wobei pcDNA3_SP (CP3)_myc_EGFP entsteht. Der für das reife CRF₁-Rezeptorprotein (Aminosäuren 24 bis 415) kodierende Anteil der CRF₁-Rezeptor-cDNA wurde mit den Primern *XbaI*_CRF₁-R_aa24_5' und CRF₁-R_STAV_*XbaI*_3' PCR-amplifiziert und über mit den Primern angefügte *XbaI*-Schnittstellen in die *XbaI*-Schnittstelle von pcDNA3_SP (CP3)_myc_EGFP kloniert. Die *XbaI*-Schnittstelle in *XbaI*_CRF₁-R_aa24_5' ist dabei so gewählt, daß sich der Leserahmen von EGFP direkt in den des Rezeptorproteins fortsetzt. Der so entstandene Vektor wurde mit pcDNA3_SP (CP3)_myc_EGFP_CRF₁-R bezeichnet.

pcDNA3_SP (CP3)_myc_EGFP_CRF₁-R wurde zu Testzwecken in HEK293 Zellen transfiziert. Die 36 Stunden nach Transfektion an lebenden oder an formaldehydfixierten Zellen beobachtbare Fluoreszenz stimmt mit einer Membranlokalisation des Fusionsproteins gut überein (Abbildung 10). Lysate von diesen Zellen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper immunodetektiert. Neben einer Bande von ungefähr 85 kDa, die sich gut mit einem GFP-CRF₁-Rezeptor-Monomer vereinbaren läßt, konnte reproduzierbar eine zweite, ungefähr doppelt so schwere Bande nachgewiesen werden (Abbildung 10).

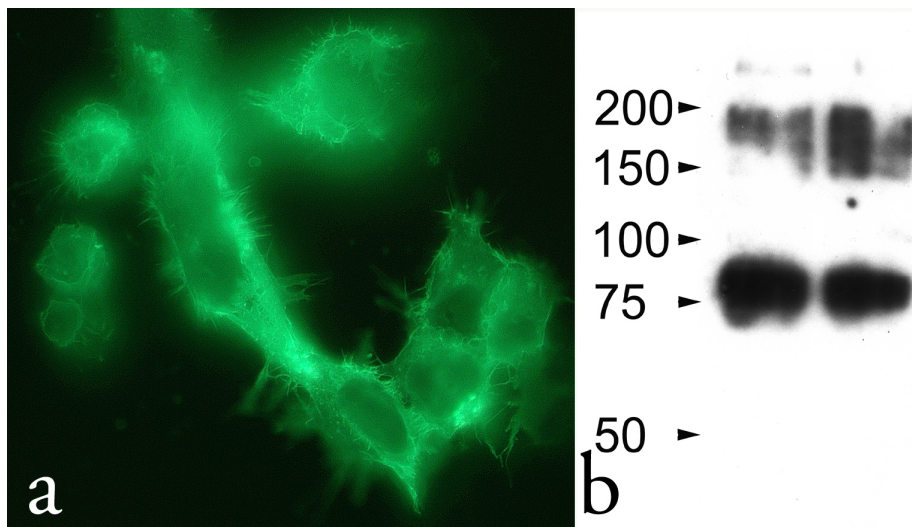


Abbildung 10 Expression des mit GFP markierten CRF₁-Rezeptors in HEK293-Zellen. a) Die mit Formaldehyd fixierten Zellen zeigen ein ringförmiges Fluoreszenzmuster, das als typisch für eine Lokalisation in oder nahe der Oberflächenmembran gilt. b) In Lysaten dieser Zellen lassen sich zwei anti-myc-immunoreaktive Banden nachweisen. Die leichtere der beiden läuft bei ungefähr 80 kDa und korrespondiert gut mit dem erwarteten Molekulargewicht des mit GFP versehenen CRF₁-Rezeptors.

3.2.3 Konstruktion von Vektoren zur Expression der in den bestätigten Hefeklonen vorkommenden Bibliotheksproteine in Säugerzellen

Um die in der Hefe gefundenen Interaktoren mittels Koimmunopräzipitation bestätigen zu können, mußten wir die in den positiven Hefeklonen als Fusion mit der Aktivierungsdomäne von Gal4p vorhandenen ORF in HEK293-Zellen exprimieren. Zu diesem Zweck wurde pcDNA3_flag hergestellt. In diesen Vektor können die in dem Bibliotheksvektor pACT2 vorhandenen cDNAs direkt subkloniert werden. Der in der Hefe als N-terminales Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne von Gal4p vorliegende ORF wird dann - ohne die Aktivierungsdomäne von Gal4p, aber mit einem N-terminalen flag-Epitop versehen - von einem CMV-Promoter aus exprimiert. Das flag-Epitop ist ein acht Aminosäuren langes, synthetisches Epitop, das häufig benutzt wird, um Proteine für eine Immunopräzipitation oder Immunoaffinitätsaufreinigung zu markieren (Hopp et al., 1988). Unsere Vorgehensweise erlaubt es, eine Reihe von mittels des "Yeast Two-Hybrid"-Systems identifizierten Interaktionen in relativ kurzer Zeit zu bestätigen, da für die einzelnen Interaktoren keine individuell unterschiedlichen Klonierungsarbeiten notwendig sind.

pcDNA3_flag wurde durch die Insertion eines kurzen doppelsträngigen DNA-Fragments in den mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnittenen pcDNA3-Vektor erzeugt. Dieses DNA-Fragment

wurde durch die Hybridisierung der beiden DNA-Oligonukleotide "*Bam*HI_Kozak_flag_*Eco*RI_sense" und "*Bam*HI_Kozak_flag_*Eco*RI_antisense" hergestellt. "*Bam*HI_Kozak_flag_*Eco*RI_sense" enthält eine optimale Kozak-Sequenz (Kozak, 1987) vor einer cDNA, die für ein Methionin-N-terminales flag-Epitop kodiert; "*Bam*HI_Kozak_flag_*Eco*RI_antisense" ist nahezu komplementär zu "*Bam*HI_Kozak_flag_*Eco*RI_sense", die beiden Oligonukleotide hybridisieren aber so, daß sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende bezogen auf "*Bam*HI_Kozak_flag_*Eco*RI_sense" 5'-überhängende Enden entstehen, die mit den mit *Bam*HI beziehungsweise *Eco*RI geschnittenen Enden von pcDNA3 ligiert werden können. In 3'-Position bezogen auf "*Bam*HI_Kozak_flag_*Eco*RI_sense" entsteht dabei eine *Eco*RI-Schnittstelle. Diese verhält sich zum Leserahmen des flag-Epitops genauso wie die *Eco*RI-Schnittstelle in pACT2 zum Leserahmen der Aktivierungsdomäne von Gal4p. Über die *Eco*RI-Schnittstelle in diese Vektoren klonierte cDNAs werden also jeweils im selben Leserahmen translatiert.

Das in dem Bibliotheksvektor pACT2 vorhandene Insert wurde jeweils über *Eco*RI und *Xho*I in pcDNA3_flag subkloniert und der so entstandene Vektor mit der jeweiligen Klonnummer bezeichnet. So enthält zum Beispiel pcDNA3_flag_13-1 den ORF aus Hefeklon 13-1.

Um zu überprüfen, ob die so hergestellten Vektoren für Fusionsproteine des zu erwartenden Molekulargewichts kodieren, wurden einzelne Vektoren mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode in HEK293-Zellen transfiziert. Lysate von diesen Zellen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, die Proteine wurden auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit einem gegen das flag-Epitop gerichteten Antikörper immunodetektiert.

Dabei ließ sich in den Lysaten von mit pcDNA3_flag_13-1 transfizierten Zellen reproduzierbar ein ungefähr 50 kDa großes, flag-immunoreaktives Protein nachweisen (Abbildung 13, rechte Spur). Der in dem Bibliotheksvektor 13-1 enthaltene Anteil der PSD-95 cDNA beginnt allerdings mit Nukleotid 175 der in der NCBI-Datenbank abgelegten Sequenz, was der Aminosäure 40 von PSD-95 entspricht. Da zur Herstellung der von uns verwendeten Bibliothek mRNA mit Hilfe eines "oligo-dT primers", also vom äußersten 3'-Ende aus, in cDNA überschrieben worden ist, sollte der 3' zu Nukleotid 175 gelegene Anteil der PSD-95 cDNA komplett in dem Bibliotheksvektor 13-1 und damit auch in pcDNA3_flag_13-1 vorhanden sein; der von pcDNA3_flag_13-1 kodierte ORF sollte daher 684 der insgesamt 724 Aminosäuren von PSD-95 umfassen, was ein Protein von annähernd 90 kDa Molekulargewicht erwarten läßt. Der beobachtete Unterschied im Molekulargewicht läßt sich am ehesten durch ein Stoppkodon in pcDNA3_flag_13-1 erklären, das zu einem vorzeitigen Abbruch des kodierten Proteins führt.

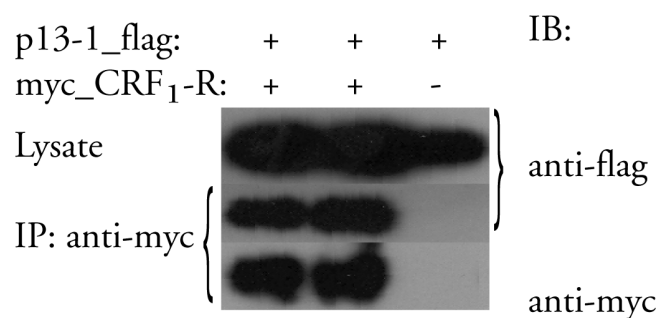
Eine Sequenzierung mit dem Primer PSD-95_1190_5' ergab, daß in pcDNA3_flag_13-1 das zu den Nukleotiden 1152-1154 der PSD-95 cDNA korrespondierende "ttg"-Triplet, das im wildtypischen Protein für Tryptophan 499 kodiert, zu "tag" mutiert ist. Der von pcDNA3_flag_13-1 kodierte ORF umfaßt also nur die Aminosäuren 40 bis 498 von PSD-95, was mit dem beobachteten Molekulargewicht von ungefähr 50 kDa gut übereinstimmt. Dieser ORF enthält alle drei PDZ-Domänen sowie die (inkomplette) SH3-Domäne, wohingegen die GK-Domäne vollständig fehlt. Wir bezeichnen das von pcDNA3_flag_13-1 kodierte Protein im folgenden mit p13-1_flag.

3.2.4 Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95 in HEK293-Zellen

Der mit einem myc-Epitop versehene CRF₁-Rezeptor (myc_CRF₁-R) und das mit einem flag-Epitop versehene Fragment von PSD-95 (p13-1_flag) wurden in HEK293-Zellen exprimiert und Lysate von diesen Zellen wurden einer Immunopräzipitation mit einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper unterworfen.

Mit diesem Antikörper läßt sich myc_CRF₁-R aus den Lysaten von Zellen, die dieses Protein exprimieren, immunopräzipitieren (Abbildung 11). Aus den Lysaten von Zellen, die neben myc_CRF₁-R auch p13-1_flag exprimieren, nicht aber aus Lysaten von Zellen, die p13-1_flag alleine (ohne myc_CRF₁-R) exprimieren, wird auch p13-1_flag mit dem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper präzipitiert (Abbildung 11). p13-1_flag wird also nur in Anwesenheit von myc_CRF₁-R präzipitiert, und man darf sich vorstellen, daß myc_CRF₁-R als Bindeglied zwischen dem präzipitierenden Antikörper und p13-1_flag vorhanden sein muß, um die (Ko-)präzipitation von p13-1_flag zu vermitteln.

Abbildung 11 Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95 in HEK293-Zellen. Das mit einem flag-Epitop versehene Fragment von PSD-95 (p13-1_flag) und der mit einem myc-Epitop versehene CRF₁-Rezeptor wurden in HEK293-Zellen transient exprimiert. Das PSD-95-Fragment läßt sich in den Lysaten mit Hilfe eines gegen das flag-Epitop gerichteten Antikörpers durchgängig detektieren (obere Zeile). Lysate wurden einer Immunopräzipitation mit einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper unterworfen (mittlere und untere Zeile): In Lysaten von Zellen, die den mit dem myc-Epitop versehenen CRF₁-Rezeptor exprimieren, läßt sich das Rezeptorprotein immunopräzipitieren (untere Zeile, Spur 1 und 2). Nur in den Immunopräzipitaten von diesen Zellen (mittlere Zeile, Spur 1 und 2), aber nicht in solchen von Kontrollzellen, die den markierten CRF₁-Rezeptor nicht exprimieren (mittlere Zeile, Spur 3) läßt sich das PSD-95-Fragment nachweisen. Die Immunopräzipitation von p13-1_flag wird also durch myc_CRF₁-R vermittelt.



3.2.5 Konstruktion von Vektoren zur Expression von CRF₁-Rezeptormutanten mit verändertem C-terminalen "TAV"-Motiv in Säugerzellen

Um zeigen zu können, daß die Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95 auf Seiten des CRF₁-Rezeptors durch das zuvor beschriebene C-terminale "TAV"-Motiv vermittelt wird, haben wir eine Serie von CRF₁-Rezeptormutanten mit verändertem C-Terminus untersucht. Dabei wurde entweder jeweils eine der letzten vier Aminosäuren (ausgenommen Alanin in Position -1) durch ein Alanin ersetzt, oder es wurde ein zusätzliches Alanin C-terminal angefügt. Damit ergeben sich für die letzten vier beziehungsweise fünf Aminosäuren der Rezeptormutanten die Sequenzen "STAA", "SAAV", "ATAV" und "STAVA". cDNAs, die für diese Rezeptormutanten kodieren, wurden mittels PCR hergestellt.

Im einzelnen wurde über den 3'-Primer die jeweilige Mutation eingeführt und unmittelbar hinter dem Stoppkodon eine *Xho*I-Schnittstelle angefügt. Die 3'-Primer "CRF₁-R_STAV_*Xho*I_3'", "CRF₁-R_STAA_*Xho*I_3'", "CRF₁-R_SAAV_ *Xho*I_3'", "CRF₁-R_ATAV_*Xho*I_3'" und "CRF₁-R_STAVA_*Xho*I_3'" wurden jeweils in Kombination mit "CRF₁-R_1132_5'" als gemeinsamem 5'-Primer in der PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden über die in der CRF₁-Rezeptor-cDNA in Position 1153 vorkommende singuläre *Bsp*EI-Schnittstelle und die in der PCR angefügte *Xho*I-Schnittstelle in pcDNA3_SP (CRF₁-R)_myc_CRF₁-R kloniert, wobei die in pcDNA3_SP (CRF₁-R)_myc_CRF₁-R vorhandenen entsprechenden Anteile der CRF₁-Rezeptor-cDNA ersetzt wurden. Die so generierten Konstrukte werden mit pcDNA3_SP (CRF₁-R)_myc_CRF₁-R_STAV, _STAA, _SAAV, _ATAV beziehungsweise _STAVA und die von diesen Vektoren kodierten Proteine mit myc_CRF₁-R_STAV, _STAA, _SAAV, _ATAV beziehungsweise _STAVA bezeichnet. Mittels PCR amplifizierte Abschnitte wurden durch Sequenzierung auf mögliche Fehler überprüft.

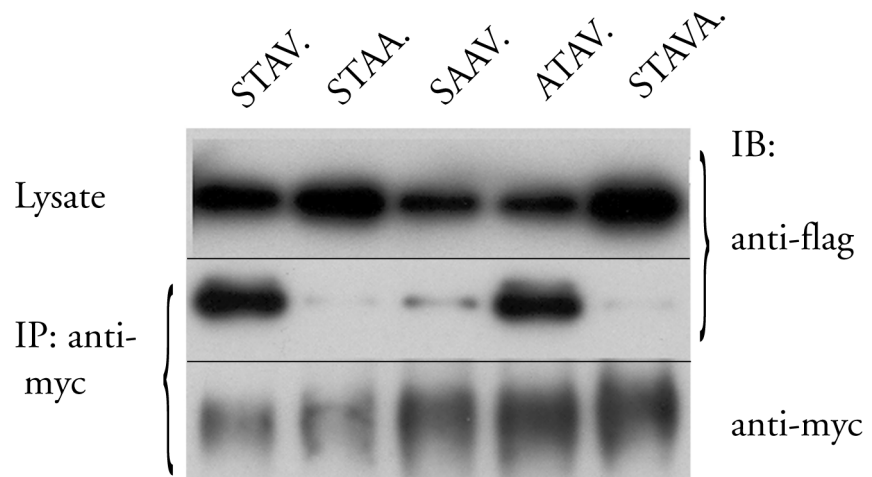
3.2.6 Bedeutung des C-terminalen "TAV"-Motivs des CRF₁-Rezeptors für die Interaktion mit PSD-95

Die mit einem myc-Epitop versehenen CRF₁-Rezeptormutanten mit verändertem C-terminalen "TAV"-Motiv wurden jeweils gemeinsam mit p13-1_flag in HEK293-Zellen koexprimiert und Lysate von diesen Zellen wurden einer Immunopräzipitation mit dem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper unterworfen. Mit diesem Antikörper lassen sich die verschiedenen CRF₁-Rezeptormutanten - ungeachtet der jeweiligen Modifikation im C-Terminus -

immunopräzipitieren (Abbildung 12). Die Mutanten CRF₁-R_STAV (Wildtyp) und CRF₁-R_ATAV, nicht aber die Mutanten CRF₁-R_STAA, CRF₁-R_SAAV und CRF₁-R_STAVA können eine Kopräzipitation des 50-kDa Fragments von PSD-95 vermitteln (Abbildung 12).

In Übereinstimmung mit den Befunden von Songyang et al., 1997 sind also die Aminosäuren in Position 0 und -2 sowie das Auftreten des "TAV"-Motivs im äußersten C-Terminus des CRF₁-Rezeptors für die Interaktion mit PSD-95 entscheidend.

Abbildung 12 Bedeutung des C-terminalen "TAV"-Motivs des CRF₁-Rezeptors für die Interaktion zwischen dem Rezeptor und PSD-95. Der mit einem myc-Epitop versehene CRF₁-Rezeptor (STAV) sowie Mutanten, in denen jeweils eine Aminosäure im C-Terminus gegen Alanin ausgetauscht ist (STAA, SAAV, ATAV)



oder ein zusätzliches Alanin C-terminal angefügt ist (STAVA), wurden in HEK293-Zellen jeweils mit dem mit einem flag-Epitop versehenen Fragment von PSD-95 koexprimiert. In den Lysaten dieser Zellen ließ sich das PSD-95-Fragment mit einem gegen das flag-Epitop gerichteten Antikörper durchgängig nachweisen (obere Zeile). Die Lysate wurden einer Immunopräzipitation mit einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper unterworfen (mittlere und untere Zeile): Unabhängig von der jeweiligen C-terminal eingeführten Mutation ließ sich das mit dem myc-Epitop versehene Rezeptorprotein präzipitieren (untere Zeile). Das Wildtypprotein (STAV) und eine der Mutanten (ATAV) vermochten das PSD-95-Fragment effektiv zu kopräzipitieren. Die Mutanten STAA, SAAV und STAVA dagegen konnten eine Kopräzipitation nicht oder nur in viel geringerem Umfang vermitteln (mittlere Zeile).

3.2.7 Konstruktion von pcDNA3_PSD-95_flag und Vektoren zur Expression von Deletionsmutanten von PSD-95

Wir haben bisher die Interaktion zwischen p13-1_flag, einem ungefähr 50 kDa schweren Fragment von PSD-95, und Wildtyp und Mutanten des CRF₁-Rezeptors untersucht. Dieses Fragment, das sich unmittelbar von dem in Hefeklon 13-1 enthaltenen Anteil der PSD-95 cDNA ableitet, und alle drei der für die Wechselwirkung mit dem CRF₁-Rezeptor potentiell bedeutsamen PDZ-Domänen enthält, eignet sich gut, um die in der Hefe gefundene Interaktion in Säugerzellen zu bestätigen und das auf Seiten des CRF₁-Rezeptors für die Interaktion

verantwortliche Motiv zu bestimmen. Dennoch handelt es sich bei p13-1_flag um einen artifiziellen Interaktionspartner des CRF₁-Rezeptors, da ein entsprechendes Protein *in vivo* wahrscheinlich nicht vorkommt. Um zusätzliche Evidenz für eine Wechselwirkung beider Partner zu schaffen, haben wir eine Koimmunopräzipitation der beiden vollständigen Proteine - jeweils mit zusätzlichen Epitopen versehen und in HEK293-Zellen exprimiert - angestrebt. Um weiterhin die Domänen von PSD-95 definieren zu können, die die Interaktion mit dem CRF₁-Rezeptor vermitteln, haben wir ausgehend von dem vollständigen PSD-95 eine Serie von Deletionsmutanten hergestellt und auf eine Assoziation mit dem CRF₁-Rezeptor hin untersucht.

PSD-95 verfügt von N-terminal nach C-terminal über drei PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne und eine GK-Domäne, ein Aufbau der allen Mitgliedern der Familie der membranassoziierten Guanylatkinasen gemeinsam ist. Da für die zytoplasmatischen Domänen verschiedener Transmembranproteine gezeigt worden ist, daß sie über ein C-terminales "(S/T)XV"-Motiv mit PDZ-Domänen von PSD-95 interagieren (Cohen et al., 1996; Irie et al., 1997; Kim et al., 1995; Kornau et al., 1995), haben wir Deletionsmutanten von PSD-95 untersucht, die von N-terminal her um eine oder mehrere der PDZ-Domänen verkürzt sind. Das wildtypische PSD-95-Protein sowie alle Deletionsmutanten wurden am C-terminus mit einem zusätzlichen flag-Epitop versehen. Das Anfügen selbst einer größeren kompakten Proteinstruktur wie zum Beispiel des "Green Fluorescent Protein" an den C-terminus von PSD-95 interferiert nicht mit der Lokalisation des Wildtypproteins in die dendritischen Protrusionen von Neuronen und beeinträchtigt nicht die Fähigkeit des Proteins, Ionenkanäle in heterologen Zellen in Form spezieller Aggregate in der Membran zu bündeln (Craven et al., 1999; El Hussein et al., 2000).

Zur Klonierung von pcDNA3_PSD-95_flag wurde der komplette ORF von PSD-95 mit den Primern PSD-95_KpnI_Kozak_atg_5' und PSD-95_flag_tga_EcoRI_3' von einer mit dem genspezifischen Primer PSD-95_2324_3' synthetisierten einzelsträngigen cDNA mittels PCR amplifiziert und über die mit den PCR-Primern angefügten Restriktionsschnittstellen in pcDNA3 eingefügt. Das zusätzliche flag-Epitop wurde über den 3'-Primer eingeführt. Sequenzierung des Konstrukts ergab, daß die cDNA fehlerfrei amplifiziert worden war. Das von diesem Konstrukt kodierte Protein wird mit PSD-95_flag bezeichnet.

Die N-terminal trunkierten Mutanten PSD-95_ΔPDZ1_flag, PSD-95_ΔPDZ1-2_flag und PSD-95_ΔPDZ1-3_flag wurden entsprechend unter Verwendung der schrittweise nach 3' versetzten 5'-Primer PSD-95_KpnI_Kozak_PDZ2_5', PSD-95_KpnI_Kozak_PDZ3_5' beziehungsweise PSD-95_KpnI_Kozak_Rest_5' kloniert. Die entsprechenden Konstrukte werden mit pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1_flag, pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1-2_flag, pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1-3_flag bezeichnet. Diese Plasmide wurden in HEK293-Zellen transfiziert. Lysate dieser Zellen wurden über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, auf

Nitrozellulosemembran übertragen und mit einem gegen das flag-Epitop oder gegen PSD-95 gerichteten Antikörper immunodetektiert. PSD-95_flag, PSD-95_ΔPDZ1_flag, PSD-95_ΔPDZ1-2_flag und PSD-95_ΔPDZ1-3_flag zeigten dabei erwartungsgemäß ein Molekulargewicht von ungefähr 90 (82) kDa, 70 (65) kDa, 45 (49) kDa beziehungsweise 35 (39) kDa (in Klammern jeweils das von Vektor-NTI prädizierte Molekulargewicht) (Abbildung 13).

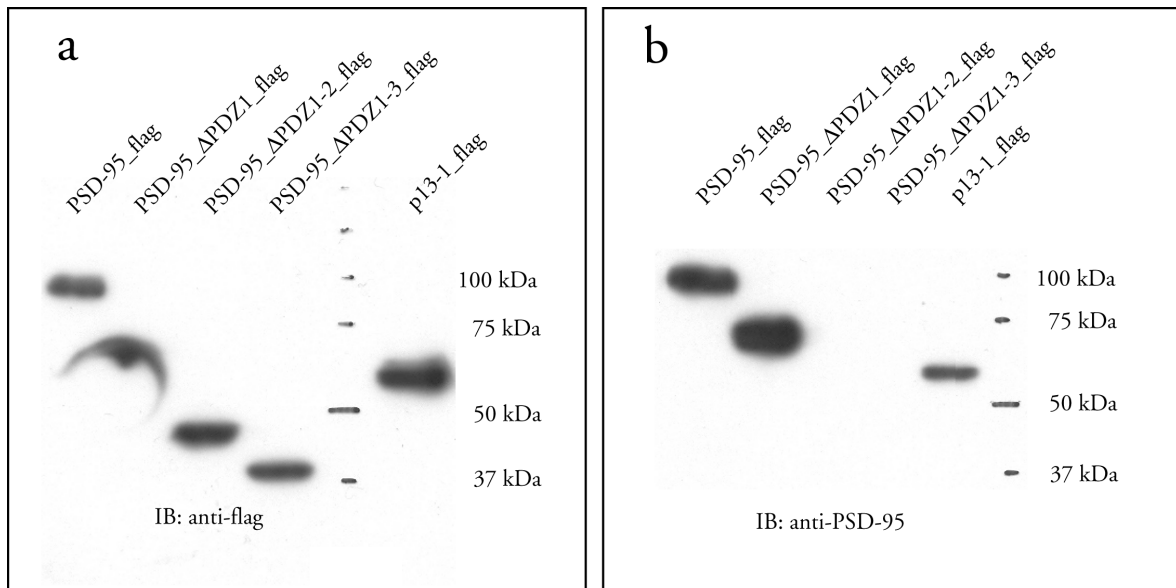


Abbildung 13 Expression des mit dem flag-Epitop markierten PSD-95, der drei Deletionsmutanten sowie von p13-1_flag in HEK293-Zellen. Alle Proteine lassen sich mit einem gegen das flag-Epitop gerichteten Antikörper nachweisen (a). Der gegen PSD-95 gerichtete monoklonale Antikörper erkennt dagegen nur PSD-95_flag, PSD-95_ΔPDZ1_flag und p13-1_flag (b). Dieser Antikörper reagiert mit einem Epitop im Aminoterminus von PSD-95, das in PSD-95_ΔPDZ1-2_flag und PSD-95_ΔPDZ1-3_flag nicht mehr vorhanden ist.

3.2.8 Bedeutung der PDZ-Domänen von PSD-95 für die Interaktion mit dem CRF₁-Rezeptor

Der mit dem myc-Epitop und dem GFP markierte CRF₁-Rezeptor (myc_GFP_CRF₁-R) wurde alleine oder zusammen mit PSD-95_flag sowie jeder der drei Deletionsmutanten in Säugerzellen exprimiert. Dazu wurde pcDNA3_SP (CP3)_myc_EGFP_CRF₁-R entweder alleine oder in Kombination mit jeweils einem der Plasmide pcDNA3_PSD-95_flag, pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1_flag, pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1-2_flag oder pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1-3_flag in HEK293-Zellen transfiziert. In Lysaten dieser Zellen läßt sich durchgehend eine anti-myc-

immunoreaktive Bande bei ungefähr 85 kDa nachweisen (Abbildung 14). Dieses Molekulargewicht paßt gut zu einem Monomer des mit dem GFP versehenen CRF₁-Rezeptors. Ebenfalls durchgängig war in diesen Lysaten eine zweite, in ihrer Intensität deutlich stärkere anti-myc-reaktive Bande bei ungefähr 170 kDa nachweisbar.

Diese Lysate wurden einer Immunopräzipitation mit einem gegen das flag-Epitop gerichteten Antikörper unterworfen. Während in den Immunopräzipitaten aus Lysaten von mit pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1_flag, pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1-2_flag oder pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1-3_flag (ko)transfizierten Zellen eine dem Molekulargewicht der jeweiligen Deletionsmutante entsprechende anti-flag-immunoreaktive Bande deutlich nachweisbar ist, fällt in dem Immunopräzipitat aus dem Lysat von mit pcDNA3_PSD-95_flag (ko)transfizierten Zellen die zu erwartende Bande bei ungefähr 90 kDa nur sehr schwach aus (Pfeil in Abbildung 14). Dagegen findet sich in diesem Immunopräzipitat eine weitaus intensivere Bande bei einem Molekulargewicht von ungefähr 170 kDa.

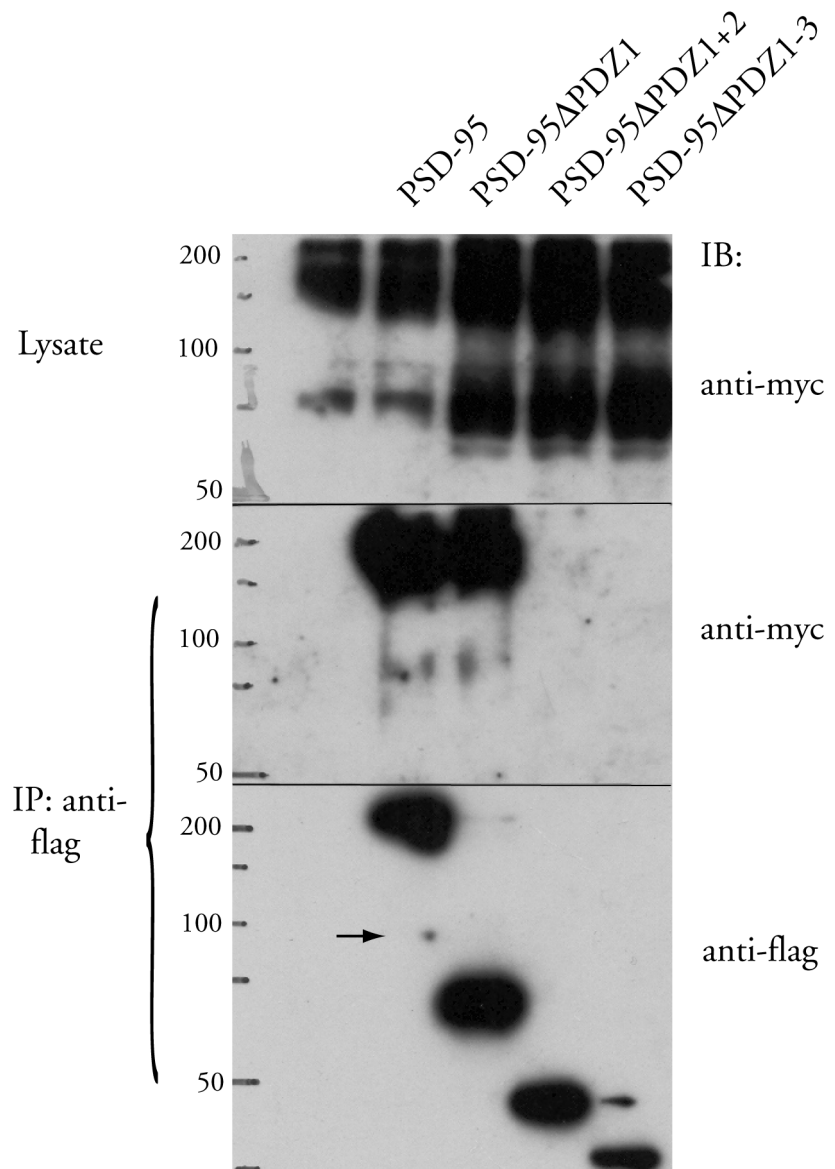
Dieselben Immunopräzipitate wurden auf die Anwesenheit von myc_GFP_CRF₁-R hin untersucht. Nur aus Lysaten von mit pcDNA3_PSD-95_flag oder pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1_flag (ko)transfizierten Zellen, nicht aber aus Lysaten von mit pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1-2_flag oder pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1-3_flag (ko)transfizierten Zellen oder Lysaten von Kontrollzellen, die mit pcDNA3_SP (CP3)_myc_EGFP_CRF₁-R alleine transfiziert worden sind, kann mit dem jeweiligen flag-markierten PSD-95-Protein der Rezeptor kopräzipitiert werden (Abbildung 14). Interessanterweise wird die in den Lysaten feststellbare schwerere der beiden anti-myc-reaktiven Banden offensichtlich bevorzugt kopräzipitiert.

Wir erklären uns diese obere Bande am ehesten als durch SDS-resistente Rezeptorhomodimere verursacht. SDS-resistente Rezeptorhomo- und heterodimere sind für verschiedene Siebentransmembranrezeptoren, beispielsweise Opiodrezeptoren, beschrieben worden (Cvejic und Devi, 1997; Jordan und Devi, 1999). Es ist gut vorstellbar, daß der dimere CRF₁-Rezeptor stabilere, netzwerkartige Komplexe mit dem ebenfalls zur Homooligomerisierung befähigten PSD-95 (McGee et al., 2001) beziehungsweise der um die erste PDZ-Domäne verkürzten Mutante ausbilden kann und deshalb bevorzugt kopräzipitiert wird. Möglicherweise ist die Verbindung mit dem vollständigen PSD-95 dann so stabil, daß letzteres Protein im SDS-Gel im Sinne eines "band-shift"-Effekts zurückgehalten wird und deshalb größtenteils ungefähr auf der Höhe des dimeren CRF₁-Rezeptors läuft.

Ohne die Natur der anti-myc-immunoreaktiven Bande bei 170 kDa hier abschließend klären zu können, stellen wir fest daß das vollständige PSD-95 sowie die um die erste PDZ-Domäne verkürzte Deletionsmutante in HEK293-Zellen mit dem CRF₁-Rezeptor interagiert, während die Mutanten, denen die PDZ-Domänen eins und zwei oder alle drei PDZ-Domänen

fehlen, dazu nicht in der Lage sind. Wir schließen daraus daß die Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95 auf Seiten von PSD-95 durch die zweite oder durch die erste und zweite PDZ-Domäne vermittelt wird.

Abbildung 14 Bedeutung der PDZ-Domänen von PSD-95 für die Interaktion mit dem CRF₁-Rezeptor. Das mit einem flag-Epitop versehene PSD-95 (PSD-95_{flag}) sowie Deletionsmutanten, die vom Aminoterminus aus um eine (PSD-95ΔPDZ1_{flag}), zwei (PSD-95ΔPDZ1-2_{flag}) oder alle drei (PSD-95ΔPDZ1-3_{flag}) PDZ-Domänen verkürzt sind, wurden in HEK293-Zellen jeweils mit dem mit einem myc-Epitop und GFP markierten CRF₁-Rezeptor (myc_GFP_CRF₁-R) koexprimiert. In den Lysaten dieser Zellen ließ sich der exogen exprimierte CRF₁-Rezeptor mit einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper durchgängig nachweisen (obere Zeile). Neben der für das Monomer des mit GFP markierten CRF₁-Rezeptors erwarteten Bande bei



ungefähr 85 kDa wurde eine zweite, deutlich stärkere Bande beobachtet, die in etwa dem Doppelten des erwarteten Molekulargewichts entspricht. Die Lysate wurden einer Immunopräzipitation mit einem gegen das flag-Epitop gerichteten Antikörper unterworfen (mittlere und untere Zeile). PSD-95_{flag} und die drei Deletionsmutanten ließen sich effektiv präzipitieren. Auffällig ist, daß das präzipitierte PSD-95_{flag} eine prominente Bande bei ungefähr 180 kDa liefert, während die erwartete Bande (vergleiche Abbildung 13, Spur 1) bei 90 kDa nur sehr schwach ausfällt (Pfeil). Das Wildtypprotein (PSD-95_{flag}) und die erste der drei Deletionsmutanten (PSD-95ΔPDZ1_{flag}) vermochten den CRF₁-Rezeptor zu kopräzipitieren. Die Mutanten PSD-95ΔPDZ1-2_{flag} und PSD-95ΔPDZ1-3_{flag}, denen jeweils zumindest die ersten beiden PDZ-Domänen fehlen, konnten eine Kopräzipitation dagegen nicht vermitteln (mittlere Zeile).

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war, Proteine zu finden, die an die carboxyterminale zytoplasmatische Domäne des CRF₁-Rezeptors binden. Zu diesem Zweck haben wir eine "Yeast Two-Hybrid"-Suche durchgeführt, die sechs verschiedene Proteine als potentielle Interaktionspartner des CRF₁-Rezeptors identifiziert hat. Drei der identifizierten Proteine, PSD-95, SAP102 und SAP97, gehören zur Familie der neuronalen membranassoziierten Guanylatkinasen, die eine zentrale Rolle für die Organisation postsynaptischer Glutamatrezeptoren spielen. Ein viertes der identifizierten Proteine, ARIP1, beteiligt sich vermutlich ebenfalls am Aufbau der PSD.

Wir haben die Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95 biochemisch näher analysiert. Der CRF₁-Rezeptor bindet an eine oder mehrere der PDZ-Domänen von PSD-95 und verhält sich wie ein typischer PDZ-Domänen-Ligand.

Der CRF₁-Rezeptor besitzt im Carboxyterminus ein Ligandenmotiv, das eine Wechselwirkung mit PDZ-Domänen der Gruppe I vermitteln kann. Diese Einteilung von PDZ-Domänen ist ursprünglich aufgrund der beobachtbaren Ligandenspezifität vorgenommen worden. So binden PDZ-Domänen der Gruppe I mit hoher Affinität an Peptide, wenn in deren äußerstem C-Terminus (Position 0) eine hydrophobe Aminosäure (bevorzugt Valin oder Isoleucin) auftritt und die vorvorletzte Aminosäure (Position -2) über eine freie Hydroxylgruppe verfügt (typischerweise Serin oder Threonin, aber auch Tyrosin) (Sheng und Sala, 2001; Songyang et al., 1997). Das CRF₁-Rezeptorprotein endet mit den Aminosäuren "Threonin-Alanin-Valin" und genügt damit offensichtlich diesen Kriterien.

Die jeweils beobachtete Ligandenspezifität korreliert mit den an verschiedenen kritischen Positionen innerhalb der PDZ-Domäne auftretenden Aminosäuren (Bezprozvanny und Maximov, 2001; Songyang et al., 1997). Aufgrund des tatsächlich beobachteten Bindungsverhaltens und/oder dieser strukturellen Determinanten können alle drei PDZ-Domänen von PSD-95 sowie der anderen beiden von uns gefundenen MAGUK der Gruppe I zugeordnet werden (Bezprozvanny und Maximov, 2001; Songyang et al., 1997). Eine Interaktion mit dem CRF₁-Rezeptor erscheint insofern plausibel. Die Ligandenspezifität einzelner PDZ-Domänen kann allerdings weit über den für die jeweilige Gruppe definierten Konsensus hinausgehen, so daß durchaus nicht jeder Gruppe-I-PDZ-Domänenligand an jede PDZ-Domäne der Gruppe I bindet (Cai et al., 2002; Leonard et al., 1998). So haben wir beispielsweise gezeigt,

daß der CRF₁-Rezeptor - ähnlich wie die NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2B - nicht mit der dritten PDZ-Domäne von PSD-95 interagiert, obwohl es sich auch bei dieser um eine PDZ-Domäne der Gruppe I handelt.

Wir haben gezeigt, daß in einem GAL4-basierten "Yeast-Two Hybrid"-System Gal4p-abhängige Reportergene aktiviert werden, wenn der Carboxyterminus des CRF₁-Rezeptors und ein Fragment von PSD-95, das alle drei PDZ-Domänen enthält, als Fusionsproteine mit der DNA-Bindungsdomäne beziehungsweise der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors vorliegen. Die beobachtete Aktivierung der Reportergene beruht auf einer spezifischen Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95. Weder konnte das CRF₁-Rezeptorfusionsprotein alleine, noch konnte das PSD-95-Fusionsprotein in Verbindung mit einem komplementären Laminfusionsprotein eine Aktivierung der Reportergene bewirken. In Verbindung mit der Beobachtung, daß der CRF₁-Rezeptor über ein PDZ-Domänen-Ligandenmotiv verfügt und PSD-95 drei PDZ-Domänen enthält, spricht dieser Befund für eine direkte Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen. Sowohl der CRF₁-Rezeptor als auch PSD-95 sind zytoplasmatische Proteine und keines von beiden besitzt offensichtliche Homologe in *S. cerevisiae*. Von daher ist es äußerst unwahrscheinlich, daß ein potentieller Vermittler der Interaktion als endogenes Protein im Nucleus der Hefe vorkommt. Dasselbe gilt für die beiden anderen von uns als Interaktionspartner identifizierten MAGUK. Zahlreiche Interaktionen zwischen PDZ-Domänen und ihren Liganden sind in verschiedenen "Yeast-Two Hybrid"-Systemen gezeigt oder gefunden worden (Kornau et al., 1995; Lu et al., 2001).

Wir konnten die Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95 auch in Säugerzellen nachweisen. Dazu haben wir uns der Koimmunopräzipitation der jeweils mit einem zusätzlichen Epitop versehenen Proteine aus Lysaten von transient transfizierten HEK293-Zellen bedient. HEK293-Zellen sind wegen der hohen erreichbaren Transfektionseffizienzen mit die gebräuchlichste Zelllinie für solche Untersuchungen.

Ein Fragment von PSD-95, das die PDZ-Domänen 1 bis 3 sowie die (unvollständige) SH3-Domäne enthält, wird mit dem CRF₁-Rezeptor kopräzipitiert. Diese Interaktion hängt von der Integrität des PDZ-Domänen-Ligandenmotivs im C-Terminus des CRF₁-Rezeptors ab. Umgekehrt wird der CRF₁-Rezeptor mit dem vollständigen PSD-95 oder einer Deletionsmutante, der die erste PDZ-Domäne fehlt, kopräzipitiert. Eine PSD-95-Mutante, der neben der ersten auch die zweite PDZ-Domäne fehlt, zeigt dagegen keine Interaktion mit dem CRF₁-Rezeptor.

Der CRF₁-Rezeptor bindet also, vermittelt über das TAV-Motiv in seinem Carboxyterminus, an die zweite, eventuell auch an die ersten beiden PDZ-Domänen von PSD-95. In letzterem Fall verhielte sich der CRF₁-Rezeptor ähnlich einer Reihe weiterer Interaktionspartner von PSD-95 - darunter auch die NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2B -, für die gut dokumentiert ist, daß die erste und zweite, nicht aber die dritte PDZ-Domäne gebunden werden (Harris und Lim, 2001).

Zumindest in einigen Fällen kann die Interaktion zwischen PDZ-Domänen der Gruppe I und deren Liganden durch eine Phosphorylierung des Serin- oder Threoninrests in der (-2)-Position des Ligandenmotivs reguliert werden. So verhindert beispielsweise die Phosphorylierung des β_2 -Adrenozeptors an dieser Stelle eine Interaktion mit regulatorischen Proteinen. Diese regulatorischen Proteine dirigieren den internalisierten Rezeptor (im Falle einer Interaktion) rasch zurück an die Zelloberfläche, während er andernfalls lysosomal degradiert wird. Sowohl GRK2 als auch GRK5 können den β_2 -Adrenozeptor im Zuge einer homologen Desensibilisierung phosphorylieren und damit auf die Internalisierung vorbereiten. GRK5, nicht aber GRK2, phosphoryliert dabei den Rezeptor auch an dem Serinrest -2 und bestimmt dadurch das Rezeptorprotein für den Abbau in Lysosomen. Je nachdem welche Kinase die den Rezeptor desaktivierende Phosphorylierung ausführt, kann der internalisierte Rezeptor also ein sehr unterschiedliches Schicksal erfahren (Cao et al., 1999).

Es ist nicht bekannt, ob eine der an der homologen Desensibilisierung des CRF₁-Rezeptors beteiligten Kinasen (GRK2 und GRK3, möglicherweise auch weitere) den Rezeptor an dem Threoninrest in der (-2)-Position phosphoryliert. Eher ungewöhnlich für einen Gruppe-I-PDZ-Domänenliganden (Songyang et al., 1997), befindet sich im CRF₁-Rezeptorprotein auch in der benachbarten (-3)-Position eine phosphorylierbare Aminosäure (Serin). Wir konnten zwar zeigen, daß dieses Serin für eine Interaktion mit den PDZ-Domänen in PSD-95 nicht erforderlich ist. Dennoch könnte eine Phosphorylierung an dieser Stelle (wie sie durch einen Austausch gegen Asparaginsäure anstelle des von uns gewählten Alanins imitiert werden würde) natürlich eine Bindung an PDZ-Domänen verhindern. Alternativ könnte eine Phosphorylierung an Serin -3 eine regulatorische Bedeutung haben, indem sie beispielsweise die Phosphorylierung des benachbarten Threoninrests verhindert und damit die Interaktion mit PDZ-Domänen begünstigt.

Sowohl PSD-95 als auch SAP102 werden in den meisten Regionen des Vorderhirns stark exprimiert. Die höchste Expressionsdichte wird in der Pyramidenzellschicht des Hippokampus, insbesondere der CA1-Region, sowie in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus erreicht.

Weitere stark exprimierende Regionen sind der Cortex cerebri, der Bulbus olfactorius, das laterale Septum, die Amygdala und das Neostriatum (Fukaya et al., 1999). Auch SAP97 zeigt eine starke Expression im Vorderhirn, vor allem im Cortex und im Hippokampus (Muller et al., 1995; Valtschanoff et al., 2000). In den meisten dieser Regionen wird der CRF₁-Rezeptor ebenfalls exprimiert. Das gilt für die CA1-Region des Hippokampus, den Gyrus dentatus, den Cortex cerebri, den Bulbus olfactorius, die Amygdala und den Nucleus caudatus-Putamen-Komplex (Van Pett et al., 2000). Das regionale Expressionsmuster des CRF₁-Rezeptors und der drei von uns als Interaktionspartner gefundenen neuronalen MAGUK zeigt also eine beträchtliche Überschneidung, und der CRF₁-Rezeptor könnte insofern mit jedem der drei MAGUK interagieren. Eine Kolokalisation der Proteine auf zellulärer und schließlich auf subzellulärer Ebene haben wir allerdings bisher nicht gezeigt. Insbesondere letzteres liefert üblicherweise den entscheidenden Hinweis auf eine Interaktion *in vivo* und könnte helfen zu klären, an welchen oder welche der potentiellen Interaktionspartner der CRF₁-Rezeptor in einem bestimmten Kontext tatsächlich bindet. Ohne einen geeigneten Antikörper gegen den CRF₁-Rezeptor konnten wir entsprechende Experimente leider nicht durchführen.

Wie unter 1.2 ausgeführt, spielen PSD-95-Komplexe eine Rolle als dynamisches Gerüst synaptischer AMPA-Rezeptoren, das auf bestimmte Formen synaptischer Aktivität hin rasch abgebaut werden kann und dadurch eine aktivitätsgesteuerte Internalisierung synaptischer AMPA-Rezeptoren ermöglicht, wie sie beispielsweise im Zuge der Expression einer LTD beobachtet wird (El Husseini et al., 2002). Es ist vorstellbar, daß die Stabilität solcher PSD-95-Komplexe verändert werden kann und daß an dieser Stelle Mechanismen zur Regulation synaptischer Plastizität angreifen. So würde beispielsweise jede Stabilisierung der PSD-95-Komplexe einer aktivitätsgesteuerten Entfernung von AMPA-Rezeptoren aus der Synapse tendenziell entgegenstehen und damit die Expression von LTD erschweren. Betrachtet man die aktivitätsabhängige Rekrutierung und Entfernung synaptischer AMPA-Rezeptoren wie unter 1.2 vorgeschlagen als voneinander unabhängige Prozesse, die nebeneinander ablaufen, so würde gleichzeitig die Expression von LTP begünstigt.

Es ist bemerkenswert, daß genau dieser Effekt beobachtet wird, wenn hippocampale Neurone mit CRF behandelt werden: Erst nach einer Präinkubation mit CRF hat eine "ζ-burst-stimulation", die an naiven Schnitten keine langwährenden Veränderungen der Effizienz der Transmission bewirkt, LTP zur Folge (Blank et al., 2002).

Es besteht also eine formale Übereinstimmung zwischen den Veränderungen der synaptischen Plastizität durch eine Vorbehandlung mit CRF einerseits und eine veränderte PSD-95-Funktion andererseits (wie sie in extremer Ausprägung in den mutanten Mäusen beobachtet

wird). Wir sehen darin einen Hinweis, daß eine Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95 *in vivo* tatsächlich stattfindet und eine physiologische Bedeutung hat.

Ein Ziel naturwissenschaftlichen Arbeitens ist, Hypothesen zu formulieren, die in Experimenten überprüft werden können. Wir finden in der Literatur einen Einfluß von CRF auf die synaptische Plastizität hippocampaler Neurone beschrieben und haben selbst eine Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und neuronalen MAGUK - Schlüssel molekülen in der Regulation synaptischer Plastizität - gezeigt. Ausgehend davon läßt sich als Hypothese formulieren, daß (1) die durch CRF bewirkten Veränderungen der synaptischen Plastizität durch den CRF₁-Rezeptor vermittelt werden und (2) eine Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und neuronalen MAGUK für die Ausprägung dieser Veränderungen wesentlich ist.

Der erste Teil der Hypothese läßt sich durch eine selektive pharmakologische Blockade des CRF₁- oder CRF₂-Rezeptors überprüfen. Auch könnte dieser Teil der Hypothese eindeutig bejaht werden, wenn CRF an hippocampalen Schnitten von CRF₁-Rezeptor-defizienten Mäusen (Timpl et al., 1998) den an Wildtypschnitten beobachteten bahrenden Effekt auf die Expression von LTP nach TBS nicht ausübte. Zur Überprüfung des zweiten Teils der Hypothese könnten die von uns hergestellten CRF₁-Rezeptormutanten mit verändertem C-terminalen PDZ-Domänen-Ligandenmotiv von Nutzen sein. Diese Mutanten binden nicht mehr an PSD-95. Vorausgesetzt der beschriebene Effekt von CRF wird durch den CRF₁-Rezeptor vermittelt, dann sollte durch exogene Expression des wildtypischen CRF₁-Rezeptors in hippocampalen Schnitten von CRF₁-Rezeptordefizienten Tieren eine entsprechende Antwort auf CRF (Bahnung von LTP nach TBS) wiederhergestellt werden. Wenn die Expression des Wildtypproteins, nicht aber die einer Mutante ohne funktionelles PDZ-Domänen-Ligandenmotiv, eine CRF-Antwort in Schnitten von CRF₁-Rezeptor-"knock-out"-Mäusen wiederherstellte, könnte daraus geschlossen werden, daß die Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und neuronalen MAGUK (oder zumindest PDZ-Domänenproteinen) für die Ausprägung eines über den CRF₁-Rezeptor vermittelten Effekts von CRF auf die synaptische Plastizität hippocampaler Neurone erforderlich ist.

Wir haben gezeigt, daß der CRF₂-Rezeptor im Unterschied zum CRF₁-Rezeptor nicht mit PSD-95 interagiert. Trotz hochgradiger Homologie zwischen den beiden Proteinen verfügt der CRF₂-Rezeptor nicht über ein typisches PDZ-Domänen-Ligandenmotiv, und es ist sehr wahrscheinlich, daß eine Interaktion mit PDZ-Domänen der Gruppe I generell nicht möglich ist.

Innerhalb des ZNS wird der CRF₂-Rezeptor am stärksten in der Amygdala, im lateralen Septum, im Hypothalamus sowie auch im Hippokampus exprimiert (Van Pett et al., 2000).

Damit ergibt sich eine partielle Überschneidung im regionalen Expressionsmuster der beiden CRF-Rezeptoren, und es ist vorstellbar, daß in den entsprechenden Regionen beide Rezeptoren in ein und demselben Neuron nebeneinander vorkommen. Die Assoziation der Carboxytermini mit unterschiedlichen regulatorischen Proteinen könnte dann eine Möglichkeit bieten, die Funktion der beiden CRF-Rezeptoren unabhängig voneinander zu regulieren. Die Identifikation von Proteinen, die an den C-Terminus des CRF₂-Rezeptors binden, sollte helfen, die Unterschiede in der Funktion beider Rezeptoren besser zu definieren.

Der in HEK293-Zellen exprimierte, mit zusätzlichen Epitopen versehene CRF₁-Rezeptor liefert in der konventionellen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eine Bande, deren Laufhöhe dem doppelten des für das Monomer zu erwartenden Molekulargewichts entspricht. Diese Beobachtung läßt sich am besten damit erklären, daß der CRF₁-Rezeptor sehr stabile Homodimere ausbildet, die auch durch eine Behandlung mit SDS nicht auseinandergerissen werden können. Zahlreiche Proteine können sich zu solchen SDS-resistenten Dimeren zusammenschließen, insbesondere wenn die intermolekulare Interaktion maßgeblich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht (Furthmayr und Marchesi, 1976). Das gilt auch für eine Reihe heptahelikaler Rezeptoren (Bouvier, 2001). So konnte auf diese Weise für den β_2 -Adrenzeptor (Hebert et al., 1996), den δ -Opioidrezeptor (Cvejic und Devi, 1997), den metabotropen Glutamatrezeptor mGluR5 (Romano et al., 1996) oder den Calciumrezeptor (Bai et al., 1998) die Bildung von Dimeren und teilweise auch von höheren Oligomeren nachgewiesen werden. Die Existenz homooligomerer CRF₁-Rezeptoren sollte in jedem Fall durch eine Komimmunopräzipitation oder - noch aussagekräftiger - mittels BRET/FRET bestätigt werden. Wir haben argumentiert, daß angesichts überlappender regionaler Expressionsmuster in einigen Neuronen möglicherweise beide CRF-Rezeptoren nebeneinander vorkommen. In solchen Neuronen könnten dann auch heterooligomere Komplexe bestehend sowohl aus CRF₁-Rezeptor- als auch CRF₂-Rezeptoruntereinheiten ausgebildet werden. Die Existenz solcher Heterodimere bleibt nachzuweisen. Da sich die beiden Rezeptoren sowohl hinsichtlich ihrer Pharmakologie als auch im Hinblick auf die durch die C-Termini vermittelten Interaktionen voneinander unterscheiden, sollte es von Interesse sein, wie sich eventuelle Heterooligomere diesbezüglich verhalten und worin ihre biologische Bedeutung liegt.

5 Schrifttumverzeichnis

1. AbdAlla,S., Lothar,H., and Quitterer,U. (2000). AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407, 94-98.
2. Aguilera,G., Rabadan-Diehl,C., and Nikodemova,M. (2001). Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors. *Peptides* 22, 769-774.
3. Alblas,J., van Corven,E.J., Hordijk,P.L., Milligan,G., and Moolenaar,W.H. (1993). Gi-mediated activation of the p21ras-mitogen-activated protein kinase pathway by alpha 2-adrenergic receptors expressed in fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 268, 22235-22238.
4. Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W., and Lipman,D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
5. Angers,S., Salahpour,A., Joly,E., Hilaret,S., Chelsky,D., Dennis,M., and Bouvier,M. (2000). Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 3684-3689.
6. Arai,M., Assil,I.Q., and Abou-Samra,A.B. (2001). Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology* 142, 446-454.
7. Attisano,L. and Wrana,J.L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296, 1646-1647.
8. Attramadal,H., Arriza,J.L., Aoki,C., Dawson,T.M., Codina,J., Kwatra,M.M., Snyder,S.H., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1992). Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J.Biol.Chem.* 267, 17882-17890.
9. Bai,C. and Elledge,S.J. (1997). Searching for Interacting Proteins with the Two-Hybrid System. In *The Yeast Two-Hybrid System*, P. L. Bartel and S. Fields, eds. Oxford University Press), pp. 11-28.
10. Bai,M., Trivedi,S., and Brown,E.M. (1998). Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J.Biol.Chem.* 273, 23605-23610.
11. Barik,S. (1997). Mutagenesis and Gene Fusion by Megaprimer PCR. In *PCR Cloning Protocols*, B. A. White, ed. (Totowa, New Jersey: Humana Press), pp. 173-183.
12. Bear,M.F. and Malenka,R.C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr.Opin.Neurobiol.* 4, 389-399.
13. Beattie,E.C., Carroll,R.C., Yu,X., Morishita,W., Yasuda,H., von Zastrow,M., and Malenka,R.C. (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat.Neurosci.* 3, 1291-1300.
14. Bezprozvanny,I. and Maximov,A. (2001). Classification of PDZ domains. *FEBS Lett.* 509, 457-462.
15. Blank,T., Nijholt,I., Eckart,K., and Spiess,J. (2002). Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotropin-releasing factor and acute stress: implications for hippocampus-dependent learning. *J.Neurosci.* 22, 3788-3794.
16. Bockaert,J. and Pin,J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723-1729.

17. Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat.Rev.Neurosci.* 2, 274-286.
18. Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C., and Brecht, D.S. (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84, 757-767.
19. Brenman, J.E., Topinka, J.R., Cooper, E.C., McGee, A.W., Rosen, J., Milroy, T., Ralston, H.J., and Brecht, D.S. (1998). Localization of postsynaptic density-93 to dendritic microtubules and interaction with microtubule-associated protein 1A. *J.Neurosci.* 18, 8805-8813.
20. Brent, R. and Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43, 729-736.
21. Burke, B. and Ellenberg, J. (2002). Remodelling the walls of the nucleus. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3, 487-497.
22. Cai, C., Coleman, S.K., Niemi, K., and Keinänen, K. (2002). Selective Binding of Synapse-associated Protein 97 to GluR-A alpha - Amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazole Propionate Receptor Subunit Is Determined by a Novel Sequence Motif. *J.Biol.Chem.* 277, 31484-31490.
23. Cao, T.T., Deacon, H.W., Reczek, D., Bretscher, A., and von Zastrow, M. (1999). A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 401, 286-290.
24. Cazaubon, S.M., Ramos-Morales, F., Fischer, S., Schweighoffer, F., Strosberg, A.D., and Couraud, P.O. (1994). Endothelin induces tyrosine phosphorylation and GRB2 association of Shc in astrocytes. *J.Biol.Chem.* 269, 24805-24809.
25. Charpentier, A.H., Bednarek, A.K., Daniel, R.L., Hawkins, K.A., Laflin, K.J., Gaddis, S., MacLeod, M.C., and Aldaz, C.M. (2000). Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Res.* 60, 5977-5983.
26. Chen, C. and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol.Cell Biol.* 7, 2745-2752.
27. Chen, L., Chetkovich, D.M., Petralia, R.S., Sweeney, N.T., Kawasaki, Y., Wenthold, R.J., Brecht, D.S., and Nicoll, R.A. (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408, 936-943.
28. Chen, R., Lewis, K.A., Perrin, M.H., and Vale, W.W. (1993). Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 8967-8971.
29. Chen, Y., Grall, D., Salcini, A.E., Pelicci, P.G., Pouyssegur, J., and Obberghen-Schilling, E. (1996). Shc adaptor proteins are key transducers of mitogenic signaling mediated by the G protein-coupled thrombin receptor. *EMBO J.* 15, 1037-1044.
30. Cho, K.O., Hunt, C.A., and Kennedy, M.B. (1992). The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9, 929-942.
31. Cohen, N.A., Brenman, J.E., Snyder, S.H., and Brecht, D.S. (1996). Binding of the inward rectifier K⁺ channel Kir 2.3 to PSD-95 is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Neuron* 17, 759-767.
32. Cole, N.B., Smith, C.L., Sciaky, N., Terasaki, M., Edidin, M., and Lippincott-Schwartz, J. (1996). Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science* 273, 797-801.
33. Colledge, M., Dean, R.A., Scott, G.K., Langeberg, L.K., Haganir, R.L., and Scott, J.D. (2000). Targeting of PKA to glutamate receptors through a MAGUK-AKAP complex. *Neuron* 27, 107-119.
34. Craven, S.E., El Husseini, A.E., and Brecht, D.S. (1999). Synaptic targeting of the postsynaptic density protein PSD-95 mediated by lipid and protein motifs. *Neuron* 22, 497-509.

35. Cvejic,S. and Devi,L.A. (1997). Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J.Biol.Chem.* *272*, 26959-26964.
36. Daaka,Y., Luttrell,L.M., Ahn,S., Della Rocca,G.J., Ferguson,S.S., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* *273*, 685-688.
37. Daaka,Y., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* *390*, 88-91.
38. Dautzenberg,F.M., Braun,S., and Hauger,R.L. (2001). GRK3 mediates desensitization of CRF1 receptors: a potential mechanism regulating stress adaptation. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* *280*, R935-R946.
39. Dautzenberg,F.M., Dietrich,K., Palchadhuri,M.R., and Spiess,J. (1997). Identification of two corticotropin-releasing factor receptors from *Xenopus laevis* with high ligand selectivity: unusual pharmacology of the type 1 receptor. *J.Neurochem.* *69*, 1640-1649.
40. Dautzenberg,F.M., Higelin,J., and Teichert,U. (2000). Functional characterization of corticotropin-releasing factor type 1 receptor endogenously expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Eur.J.Pharmacol.* *390*, 51-59.
41. Davis,R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* *103*, 239-252.
42. DeLuca-Flaherty,C., McKay,D.B., Parham,P., and Hill,B.L. (1990). Uncoating protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis. *Cell* *62*, 875-887.
43. El Husseini,A.E., Schnell,E., Chetkovich,D.M., Nicoll,R.A., and Brecht,D.S. (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* *290*, 1364-1368.
44. El Husseini,A., Schnell,E., Dakoji,S., Sweeney,N., Zhou,Q., Prange,O., Gauthier-Campbell,C., Aguilera-Moreno,A., Nicoll,R.A., and Brecht,D.S. (2002). Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell* *108*, 849-863.
45. Finn,A.K. and Whistler,J.L. (2001). Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. *Neuron* *32*, 829-839.
46. Fukaya,M., Ueda,H., Yamauchi,K., Inoue,Y., and Watanabe,M. (1999). Distinct spatiotemporal expression of mRNAs for the PSD-95/SAP90 protein family in the mouse brain. *Neurosci.Res.* *33*, 111-118.
47. Furthmayr,H. and Marchesi,V.T. (1976). Subunit structure of human erythrocyte glycophorin A. *Biochemistry* *15*, 1137-1144.
48. George,S.R., Fan,T., Xie,Z., Tse,R., Tam,V., Varghese,G., and O'Dowd,B.F. (2000). Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J.Biol.Chem.* *275*, 26128-26135.
49. Gines,S., Hillion,J., Torvinen,M., Le Crom,S., Casado,V., Canela,E.I., Rondin,S., Lew,J.Y., Watson,S., Zoli,M., Agnati,L.F., Verniera,P., Lluís,C., Ferre,S., Fuxe,K., and Franco,R. (2000). Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *97*, 8606-8611.
50. Gouldson,P.R., Higgs,C., Smith,R.E., Dean,M.K., Gkoutos,G.V., and Reynolds,C.A. (2000). Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study. *Neuropsychopharmacology* *23*, S60-S77.
51. Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., and Nairn,R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* *36*, 59-74.

52. Grammatopoulos,D.K., Randeve,H.S., Levine,M.A., Katsanou,E.S., and Hillhouse,E.W. (2000). Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated via R1alpha and R2beta CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins. *Mol.Endocrinol.* *14*, 2076-2091.
53. Hanada,T., Lin,L., Tibaldi,E.V., Reinherz,E.L., and Chishti,A.H. (2000). GAKIN, a novel kinesin-like protein associates with the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor in T lymphocytes. *J.Biol.Chem.* *275*, 28774-28784.
54. Harris,B.Z. and Lim,W.A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J.Cell Sci.* *114*, 3219-3231.
55. Hauger,R.L. and Dautzenberg,F.M. (1999). Regulation of the stress response by corticotropin-releasing factor receptors. In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, P. M. Conn and M. E. Freedman, eds. Humana Press).
56. He,L., Fong,J., von Zastrow,M., and Whistler,J.L. (2002). Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. *Cell* *108*, 271-282.
57. Hebert,T.E., Moffett,S., Morello,J.P., Loisel,T.P., Bichet,D.G., Barret,C., and Bouvier,M. (1996). A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J.Biol.Chem.* *271*, 16384-16392.
58. Heim,R., Prasher,D.C., and Tsien,R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *91*, 12501-12504.
59. Hirao,K., Hata,Y., Ide,N., Takeuchi,M., Irie,M., Yao,I., Deguchi,M., Toyoda,A., Sudhof,T.C., and Takai,Y. (1998). A novel multiple PDZ domain-containing molecule interacting with N- methyl-D-aspartate receptors and neuronal cell adhesion proteins. *J.Biol.Chem.* *273*, 21105-21110.
60. Hirao,K., Hata,Y., Yao,I., Deguchi,M., Kawabe,H., Mizoguchi,A., and Takai,Y. (2000). Three isoforms of synaptic scaffolding molecule and their characterization. Multimerization between the isoforms and their interaction with N-methyl-D-aspartate receptors and SAP90/PSD-95- associated protein. *J.Biol.Chem.* *275*, 2966-2972.
61. Hopp,T.P., Prickett,K.S., Price,V.L., Libby,R.T., March,C.J., Cerreti,D.P., Urdal,D.L., and Conlon,P.J. (1988). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology* *6*, 1204-1210.
62. Hsu,S.Y. and Hsueh,A.J. (2001). Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat.Med.* *7*, 605-611.
63. Husi,H., Ward,M.A., Choudhary,J.S., Blackstock,W.P., and Grant,S.G. (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat.Neurosci.* *3*, 661-669.
64. Irie,M., Hata,Y., Takeuchi,M., Ichtchenko,K., Toyoda,A., Hirao,K., Takai,Y., Rosahl,T.W., and Sudhof,T.C. (1997). Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* *277*, 1511-1515.
65. James,P., Halladay,J., and Craig,E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two- hybrid selection in yeast. *Genetics* *144*, 1425-1436.
66. Jones,K.A., Borowsky,B., Tamm,J.A., Craig,D.A., Durkin,M.M., Dai,M., Yao,W.J., Johnson,M., Gunwaldsen,C., Huang,L.Y., Tang,C., Shen,Q., Salon,J.A., Morse,K., Laz,T., Smith,K.E., Nagarathnam,D., Noble,S.A., Branchek,T.A., and Gerald,C. (1998). GABA (B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA (B)R1 and GABA (B)R2. *Nature* *396*, 674-679.
67. Jordan,B.A. and Devi,L.A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* *399*, 697-700.
68. Karteris,E., Grammatopoulos,D.K., Randeve,H.S., and Hillhouse,E.W. (2001). The role of corticotropin-releasing hormone receptors in placenta and fetal membranes during human pregnancy. *Mol.Genet.Metab* *72*, 287-296.

69. Kaupmann,K., Malitschek,B., Schuler,V., Heid,J., Froestl,W., Beck,P., Mosbacher,J., Bischoff,S., Kulik,A., Shigemoto,R., Karschin,A., and Bettler,B. (1998). GABA (B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396, 683-687.
70. Kim,E., Naisbitt,S., Hsueh,Y.P., Rao,A., Rothschild,A., Craig,A.M., and Sheng,M. (1997). GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase- like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J.Cell Biol.* 136, 669-678.
71. Kim,E., Niethammer,M., Rothschild,A., Jan,Y.N., and Sheng,M. (1995). Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378, 85-88.
72. Kim,J.H., Liao,D., Lau,L.F., and Huganir,R.L. (1998). SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron* 20, 683-691.
73. Kornau,H.C., Schenker,L.T., Kennedy,M.B., and Seeburg,P.H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737-1740.
74. Kozak,M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J.Mol.Biol.* 196, 947-950.
75. Kroeger,K.M., Hanyaloglu,A.C., Seeber,R.M., Miles,L.E., and Eidne,K.A. (2001). Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J.Biol.Chem.* 276, 12736-12743.
76. Kunishima,N., Shimada,Y., Tsuji,Y., Sato,T., Yamamoto,M., Kumasaka,T., Nakanishi,S., Jingami,H., and Morikawa,K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407, 971-977.
77. Leonard,A.S., Davare,M.A., Horne,M.C., Garner,C.C., and Hell,J.W. (1998). SAP97 is associated with the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4- propionic acid receptor GluR1 subunit. *J.Biol.Chem.* 273, 19518-19524.
78. Letts,V.A., Felix,R., Biddlecome,G.H., Arikath,J., Mahaffey,C.L., Valenzuela,A., Bartlett,F.S., Mori,Y., Campbell,K.P., and Frankel,W.N. (1998). The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nat.Genet.* 19, 340-347.
79. Lewis,K., Li,C., Perrin,M.H., Blount,A., Kunitake,K., Donaldson,C., Vaughan,J., Reyes,T.M., Gulyas,J., Fischer,W., Bilezikjian,L., Rivier,J., Sawchenko,P.E., and Vale,W.W. (2001). Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 7570-7575.
80. Lissin,D.V., Carroll,R.C., Nicoll,R.A., Malenka,R.C., and von Zastrow,M. (1999). Rapid, activation-induced redistribution of ionotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *J.Neurosci.* 19, 1263-1272.
81. Lu,Q., Sun,E.E., Klein,R.S., and Flanagan,J.G. (2001). Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* 105, 69-79.
82. Lue,R.A., Marfatia,S.M., Branton,D., and Chishti,A.H. (1994). Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to protein 4.1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 9818-9822.
83. Luttrell,L.M., Ferguson,S.S., Daaka,Y., Miller,W.E., Maudsley,S., Della Rocca,G.J., Lin,F., Kawakatsu,H., Owada,K., Luttrell,D.K., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655-661.
84. Luttrell,L.M., Roudabush,F.L., Choy,E.W., Miller,W.E., Field,M.E., Pierce,K.L., and Lefkowitz,R.J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 2449-2454.

85. Mack,V., Burnashev,N., Kaiser,K.M., Rozov,A., Jensen,V., Hvalby,O., Seeburg,P.H., Sakmann,B., and Sprengel,R. (2001). Conditional restoration of hippocampal synaptic potentiation in Glur-A- deficient mice. *Science* 292, 2501-2504.
86. Maggio,R., Vogel,Z., and Wess,J. (1993). Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein- linked receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 3103-3107.
87. Malinow,R. and Malenka,R.C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu.Rev.Neurosci.* 25, 103-126.
88. Margeta-Mitrovic,M., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA (B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27, 97-106.
89. Marrs,G.S., Green,S.H., and Dailey,M.E. (2001). Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nat.Neurosci.* 4, 1006-1013.
90. Marshall,J., Molloy,R., Moss,G.W., Howe,J.R., and Hughes,T.E. (1995). The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* 14, 211-215.
91. Massague,J. and Wotton,D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19, 1745-1754.
92. Masuko,N., Makino,K., Kuwahara,H., Fukunaga,K., Sudo,T., Araki,N., Yamamoto,H., Yamada,Y., Miyamoto,E., and Saya,H. (1999). Interaction of NE-dlg/SAP102, a neuronal and endocrine tissue-specific membrane-associated guanylate kinase protein, with calmodulin and PSD- 95/SAP90. A possible regulatory role in molecular clustering at synaptic sites. *J.Biol.Chem.* 274, 5782-5790.
93. McDonald,P.H., Chow,C.W., Miller,W.E., Laporte,S.A., Field,M.E., Lin,F.T., Davis,R.J., and Lefkowitz,R.J. (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290, 1574-1577.
94. McGee,A.W., Dakoji,S.R., Olsen,O., Bredt,D.S., Lim,W.A., and Prehoda,K.E. (2001). Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins. *Mol.Cell* 8, 1291-1301.
95. McVey,M., Ramsay,D., Kellett,E., Rees,S., Wilson,S., Pope,A.J., and Milligan,G. (2001). Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J.Biol.Chem.* 276, 14092-14099.
96. Migaud,M., Charlesworth,P., Dempster,M., Webster,L.C., Watabe,A.M., Makhinson,M., He,Y., Ramsay,M.F., Morris,R.G., Morrison,J.H., O'Dell,T.J., and Grant,S.G. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396, 433-439.
97. Milligan,G., Parenti,M., and Magee,A.I. (1995). The dynamic role of palmitoylation in signal transduction. *Trends Biochem.Sci.* 20, 181-187.
98. Misteli,T. and Spector,D.L. (1997). Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat.Biotechnol.* 15, 961-964.
99. Muller,B.M., Kistner,U., Kindler,S., Chung,W.J., Kuhlendahl,S., Fenster,S.D., Lau,L.F., Veh,R.W., Huganir,R.L., Gundelfinger,E.D., and Garner,C.C. (1996). SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron* 17, 255-265.
100. Muller,B.M., Kistner,U., Veh,R.W., Cases-Langhoff,C., Becker,B., Gundelfinger,E.D., and Garner,C.C. (1995). Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J.Neurosci.* 15, 2354-2366.
101. Mumby,S.M. (1997). Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 148-154.

102. Munro,S. and Pelham,H.R. (1984). Use of peptide tagging to detect proteins expressed from cloned genes: deletion mapping functional domains of *Drosophila* hsp 70. *EMBO J.* *3*, 3087-3093.
103. Musacchio,A., Wilmanns,M., and Saraste,M. (1994). Structure and function of the SH3 domain. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* *61*, 283-297.
104. Ng,G.Y., O'Dowd,B.F., Lee,S.P., Chung,H.T., Brann,M.R., Seeman,P., and George,S.R. (1996). Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* *227*, 200-204.
105. Niethammer,M., Valtschanoff,J.G., Kapoor,T.M., Allison,D.W., Weinberg,T.M., Craig,A.M., and Sheng,M. (1998). CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. *Neuron* *20*, 693-707.
106. Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Barak,L.S., and Caron,M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J.Biol.Chem.* *276*, 19452-19460.
107. Oakley,R.H., Laporte,S.A., Holt,J.A., Caron,M.G., and Barak,L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J.Biol.Chem.* *275*, 17201-17210.
108. Ohmichi,M., Sawada,T., Kanda,Y., Koike,K., Hirota,K., Miyake,A., and Saltiel,A.R. (1994). Thyrotropin-releasing hormone stimulates MAP kinase activity in GH3 cells by divergent pathways. Evidence of a role for early tyrosine phosphorylation. *J.Biol.Chem.* *269*, 3783-3788.
109. Olson,K.R., McIntosh,J.R., and Olmsted,J.B. (1995). Analysis of MAP 4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *J.Cell Biol.* *130*, 639-650.
110. Ottersen,O.P. and Landsend,A.S. (1997). Organization of glutamate receptors at the synapse. *Eur.J.Neurosci.* *9*, 2219-2224.
111. Overton,M.C. and Blumer,K.J. (2000). G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo. *Curr.Biol.* *10*, 341-344.
112. Perrin,M.H., Donaldson,C.J., Chen,R., Lewis,K.A., and Vale,W.W. (1993). Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology* *133*, 3058-3061.
113. Perrin,M.H., Fischer,W.H., Kunitake,K.S., Craig,A.G., Koerber,S.C., Cervini,L.A., Rivier,J.E., Groppe,J.C., Greenwald,J., Moller,N.S., and Vale,W.W. (2001). Expression, purification, and characterization of a soluble form of the first extracellular domain of the human type 1 corticotropin releasing factor receptor. *J.Biol.Chem.* *276*, 31528-31534.
114. Pierce,K.L. and Lefkowitz,R.J. (2001). Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat.Rev.Neurosci.* *2*, 727-733.
115. Reyes,T.M., Lewis,K., Perrin,M.H., Kunitake,K.S., Vaughan,J., Arias,C.A., Hogenesch,J.B., Gulyas,J., Rivier,J., Vale,W.W., and Sawchenko,P.E. (2001). Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *98*, 2843-2848.
116. Rockman,H.A., Koch,W.J., and Lefkowitz,R.J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* *415*, 206-212.
117. Romano,C., Miller,J.K., Hyrc,K., Dikranian,S., Mennerick,S., Takeuchi,Y., Goldberg,M.P., and O'Malley,K.L. (2001). Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Mol.Pharmacol.* *59*, 46-53.
118. Romano,C., Yang,W.L., and O'Malley,K.L. (1996). Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J.Biol.Chem.* *271*, 28612-28616.

119. Rossant,C.J., Pinnock,R.D., Hughes,J., Hall,M.D., and McNulty,S. (1999). Corticotropin-releasing factor type 1 and type 2alpha receptors regulate phosphorylation of calcium/cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* *140*, 1525-1536.
120. Sells,M.A. and Chernoff,J. (1995). Epitope-tag vectors for eukaryotic protein production. *Gene* *152*, 187-189.
121. Sheng,M. and Sala,C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu.Rev.Neurosci.* *24*, 1-29.
122. Shoji,H., Tsuchida,K., Kishi,H., Yamakawa,N., Matsuzaki,T., Liu,Z., Nakamura,T., and Sugino,H. (2000). Identification and characterization of a PDZ protein that interacts with activin type II receptors. *J.Biol.Chem.* *275*, 5485-5492.
123. Sim,D.L. and Chow,V.T. (1999). The novel human HUEL (*C4orf1*) gene maps to chromosome 4p12-p13 and encodes a nuclear protein containing the nuclear receptor interaction motif. *Genomics* *59*, 224-233.
124. Snyder,M.P., Kimbrell,D., Hunkapiller,M., Hill,R., Fristrom,J., and Davidson,N. (1982). A transposable element that splits the promoter region inactivates a *Drosophila* cuticle protein gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *79*, 7430-7434.
125. Songyang,Z., Fanning,A.S., Fu,C., Xu,J., Marfatia,S.M., Chishti,A.H., Crompton,A., Chan,A.C., Anderson,J.M., and Cantley,L.C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* *275*, 73-77.
126. Sorkin,A. and von Zastrow,M. (2002). Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* *3*, 600-614.
127. Timpl,P., Spanagel,R., Sillaber,I., Kresse,A., Reul,J.M., Stalla,G.K., Blanquet,V., Steckler,T., Holsboer,F., and Wurst,W. (1998). Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat.Genet.* *19*, 162-166.
128. Tsuji,Y., Shimada,Y., Takeshita,T., Kajimura,N., Nomura,S., Sekiyama,N., Otomo,J., Usukura,J., Nakanishi,S., and Jingami,H. (2000). Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J.Biol.Chem.* *275*, 28144-28151.
129. Uchizono,K. (1965). Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature* *207*, 642-643.
130. Valtschanoff,J.G., Burette,A., Davare,M.A., Leonard,A.S., Hell,J.W., and Weinberg,R.J. (2000). SAP97 concentrates at the postsynaptic density in cerebral cortex. *Eur.J.Neurosci.* *12*, 3605-3614.
131. van Biesen,T., Hawes,B.E., Luttrell,D.K., Krueger,K.M., Touhara,K., Porfiri,E., Sakaue,M., Luttrell,L.M., and Lefkowitz,R.J. (1995). Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* *376*, 781-784.
132. van Corven,E.J., Hordijk,P.L., Medema,R.H., Bos,J.L., and Moolenaar,W.H. (1993). Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *90*, 1257-1261.
133. Van Pett,K., Viau,V., Bittencourt,J.C., Chan,R.K., Li,H.Y., Arias,C., Prins,G.S., Perrin,M., Vale,W., and Sawchenko,P.E. (2000). Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J.Comp Neurol.* *428*, 191-212.
134. Vaughan,J., Donaldson,C., Bittencourt,J., Perrin,M.H., Lewis,K., Sutton,S., Chan,R., Turnbull,A.V., Lovejoy,D., Rivier,C., and . (1995). Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* *378*, 287-292.

135. Vita,N., Laurent,P., Lefort,S., Chalon,P., Lelias,J.M., Kaghad,M., Le Fur,G., Caput,D., and Ferrara,P. (1993). Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. *FEBS Lett.* *335*, 1-5.
136. Wacker,I., Kaether,C., Kromer,A., Migala,A., Almers,W., and Gerdes,H.H. (1997). Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J.Cell Sci.* *110 (Pt 13)*, 1453-1463.
137. Washbourne,P., Bennett,J.E., and McAllister,A.K. (2002). Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nat.Neurosci.* *5*, 751-759.
138. Wedegaertner,P.B. and Bourne,H.R. (1994). Activation and depalmitoylation of Gs alpha. *Cell* *77*, 1063-1070.
139. White,J.H., Wise,A., Main,M.J., Green,A., Fraser,N.J., Disney,G.H., Barnes,A.A., Emson,P., Foord,S.M., and Marshall,F.H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA (B) receptor. *Nature* *396*, 679-682.
140. Woods,D.F., Hough,C., Peel,D., Callaini,G., and Bryant,P.J. (1996). Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J.Cell Biol.* *134*, 1469-1482.
141. Zeng,F.Y. and Wess,J. (1999). Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. *J.Biol.Chem.* *274*, 19487-19497.
142. Zhang,G., Gurtu,V., and Kain,S.R. (1996). An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *227*, 707-711.
143. Zhang,Z., Sun,S., Quinn,S.J., Brown,E.M., and Bai,M. (2001). The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J.Biol.Chem.* *276*, 5316-5322.
144. Zolotukhin,S., Potter,M., Hauswirth,W.W., Guy,J., and Muzyczka,N. (1996). A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J.Virol.* *70*, 4646-4654.
145. Zukin,R.S., Eghbali,M., Olive,D., Unterwald,E.M., and Tempel,A. (1988). Characterization and visualization of rat and guinea pig brain kappa opioid receptors: evidence for kappa 1 and kappa 2 opioid receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *85*, 4061-4065.

Anhang I: Sequenzen und Plasmide

Die folgenden Plasmide wurden von dem jeweiligen Hersteller gekauft; die vollständige Sequenz kann über den Hersteller oder gegebenenfalls über den Eintrag in der NCBI-Datenbank erhalten werden.

Plasmid	Zugriffsnummer in der NCBI-Datenbank	Hersteller
pGBKT7	nicht abgelegt	clontech
pACT2	U29899	clontech
pGBKT7-Lam	nicht abgelegt	clontech
pcDNA3	nicht abgelegt	invitrogen
pSP72	X65332	promega

pSK_CRF₁-R wurde von Mary Stenzel-Poore, Portland, Oregon, erhalten. Eine cDNA, die für den kompletten ORF des CRF₁-Rezeptors kodiert, wie unter U19939 in der NCBI-Datenbank abgelegt, ist zwischen die *Bam*HI und *Xho*I-Schnittstelle von pBluescript_II_SK (stratagene) kloniert.

pKS_CRF₂-R wurde von Mary Stenzel-Poore, Portland, Oregon, erhalten. Eine cDNA, die für den kompletten ORF des CRF₂-Rezeptors kodiert, wie unter NM_009953 in der NCBI-Datenbank abgelegt, ist in die *Eco*RI-Schnittstelle von pBluescript_II_KS (stratagene) kloniert.

pRK_myc_GFP wurde von Rolf Sprengel, Heidelberg, erhalten. Das Plasmid ist in Mack et al., 2001 beschrieben.

Die Bibliotheksplasmide aus den Klonen 05-1, 08-2, 13-1, 21-2, 25-1, 33-1, 36-2, 38-3, 45-1 wurden jeweils mit dem Primer "Gal4p_AD_Sequencing" sequenziert. Die in pACT2 klonierten cDNAs beginnen jeweils kurz hinter der hervorgehobenen *Eco*RI-Schnittstelle. Die Sequenzen lauten:

05-1:

```
tatctattc gatgatgaagataccccacccaaacccccaaaaaaagagatctctatggcttaccatcacgatgttcca  
gattacgctagcttgggtgggtcatatggccatggaggccccggggatccgaattcgcggccgcgtcgacattgtc  
aacacggacaccctagaagccccaggatgatgagttgcaggtgaacggaacagaggggggagatggagtatgaggag  
atcacattggaaaggggtaactcaggtctgggcttcagcatcgcaggtggcaccgacaacccacacatcggtgac
```

gacccatccatctttatcaccaagatcattcctgggtggggctgcagcccaggatggccgcctcaggggtcaacgac
agcatcctgtttgtcaatgaagtggatgtccgggaggtgacccattcagctgcagtggaggccctcaaagaggcg
ggttccatcgttcgctctacgtcatgcgccgaaacccccagctgagaagatcatagagatcaagcttatcaaa
gggcctaaaggacttggcttcagcatcgcagggggcgttgggaaccagcacatccctggagataatagcatctac
gtaaccaagatcatcgaaggaggcgctgccacaaggatggcaggttgcaga

08-2 :

ctatctattcgatgatgaagataccccaccaaaccacaaaaaagagatctctatggcttaccatacgatgttcc
agattacgctagcttgggtggtcatatggccatggaggccccggggatcc**gaattc**gcggccgcgtcgaccaca
acgggagacacggagccgagcagtgctggagggggagccatgggtgccccgcagcgtgggggcagaggccccagga
cggccgccccggccccaggccccgctcagccagggcacccccacgggtgccccctccttcttggctctgagcagtg
gagtgcttagggagccccggcgggcgggcgggcggtggaaactggcgtgggctgggggggtccgagccgccccg
ggcagtgccatgcacaagcaccagcactgctgtaagtgccccgagtgctatgaggtgacccgcctggccgcctg
cggcgtcttgagcctcctggctacggggactggcaggtgccccgacccctatgggccaagtgggggcaatggggct
agctccggttatggaggctacagctcgcagaccctgccttcacaggcaggggctacccccaccctcgcaccaag
gccaagctcatccccacaggccgagatgtggggccagtgcccc

13-1 :

tatctattcgatgatgaagataccccaccaaaccacaaaaaagagatctctatggcttaccatacgatgttcca
gattacgctagcttgggtggtcatatggccatggaggccccggggatcc**gaattc**gcggccgcgtcgacattgtc
aacacggacaccctagaagccccaggatagagtgcaggtgaacggaacagaggggggagatggagtatgaggag
atcacattggaaaggggtaactcaggtctgggcttcagcatcgcaggtggcaccgacaacccacacatcgggtgac
gacccatccatctttatcaccaagatcattcctgggtggggctgcagcccaggatggccgcctcaggggtcaacgac
agcatcctgtttgtcaatgaagtggatgtccgggaggtgacccattcagctgcagtggaggccctcaaagaggcg
ggttccatcgttcgctctacgtcatgcgccgaaacccccagctgagaagatcatagagatcaagcttatcaaa
gggcctaaaggacttggcttcagcatcgcag

21-2 :

ctatctattcgatgatgaagataccccaccaaaccacaaaaaagagatctctatggcttaccatacgatgttcc
agattacgctagcttgggtggtcatatggccatggaggccccggggatcc**gaattc**gcggccgcgtcgaccacaa
tagtgctccctttaagaggctcttcttcgtgaagctgaactaaggaaacagcagcttgaagaactaaaacagca
gcagaaacttgataggcaaaaagagcaagaaagggaaagaaaacttgaagttagccctggtgatgagcagctcaa
tgtggaaactagggaggaatctgacgagcccaaaagaaagaaagccaaagcaggcaaacagaatccaaagaagtt
acattgccaggaacttaaaaaggtgattgaagcctcagacattgtgttagaagttttggatgccagagatcctct
tgggtgcaggtgctcctcagatagaagaagctgttatccagagtgggagtaagaagctgatacttgtattaaataa
gtctggtgagtacaaacactccccctttatctattt

25-1 :

ctatctattcgatgatgaagataccccaccaaaccacaaaaaagagatctctatggcttaccatacgatgttcc
agattacgctagcttgggtggtcatatggccatggaggccccggggatcc**gaattc**gcggccgcgtcgacgcaat
ccatgatgttaaagccacagatttgggattagggaaagtgcagatttaaggcagaagttgattttgatggacgagt
tgttacgagatcatatttggaaaagcaagattttgaccaaagtatgcaagaaattcaagaagtgaagactcctga
acaattagaagcctttatgcttaaacatggagaaaatattattgatactctaggagctgaagttagacagacttga
gaaagagctgaaaaaacgaaaccctgaagttcggcagctagaccttgagatcctatagataggatgagtcactcg
ggcgtggagggtgccttccctcccactgaatgggtcagtgccgtccacatgctgactctttccagggtggatggga
cgtggctttcatgtgctgagtaactgaacagggtgaaggactcaactctctcttctaataatcatgtctttgtgctt
ctgtaggacatttggctgcttaggtcaccacgggtctctcattt

33-1 :

ctatctattcgatgatgaagataccccaccaaaccacaaaaaagagatctctatggcttaccatac gatgttcc
agattacgctagcttgggtggtcatatggccatggaggccccggggatcc**gaattc**gcggccgcgctcgacattgt
caacacggacaccctagaagccccaggatgatgagttgcaggtgaacggaacagagggggagatggagtatgagga
gatcacattggaaaggggtaactcaggtctgggcttcagcatcgcaggtggcaccgacaacccacacatcggtg
cgacccatccatctttatcaccaagatcattcctgggtggggctgcagcccaggatggccgctcagggccaacga
cagcatcctgtttgtcaatgaagtggatgtccgggaggtgacccattcagctgcagtgaggccctcaaagaggc
gggttccatcgttcgcctctacgtcatgcgcggaaacccccagctgagaagatcatagagatcaagcttatcaa
agggcctaaaggacttggcttcagcatcgcagggggcggttgggaaccagcacatccctggagataatagcatcta
cgtaaccaagatcatcgaaggaggcgctgccacaaggatggcaggttgca

36-2 :

ccaaaaaagagatctctatggcttaccatac gatgttccagattacgctagcttgggtggtcatatggccatg
gaggccccggggatcc**gaattc**gcggccgcgctcgaccagattggagataagcttctagcagtgaacagtggtgtgt
ttagaagaagttactcatgaagaagcagtgactgccttaaagaatacatctgattttgtttatttgaaagtggca
aaaccaacaagtatgtatataaatgatggctatgcaaccacctgacatcactaattcttcttctcaatctgttgac
aacatgtcagcccgctcctcctgcttgggcccagacgccaacgtcaccagccaggtactcaccatcttctaaagct
gtgctcgggagatgacgagatcactagggaaacctagaaaagttgttcttcatcgtggctcaacaggacttgggtt
ttaacattgtgggaggtgaanatggagaagggatttttatctccttcatccttgctggcgacctgctgatctaa
gtggagagctcagaaaaggagatcgcatcatatcgggtgaacagtggttgacctcagagctgcaagtacgaacaag
cagcagctgcactaaagaacgcaggccaagccgctcacatcgttgcgcaata

38-3 :

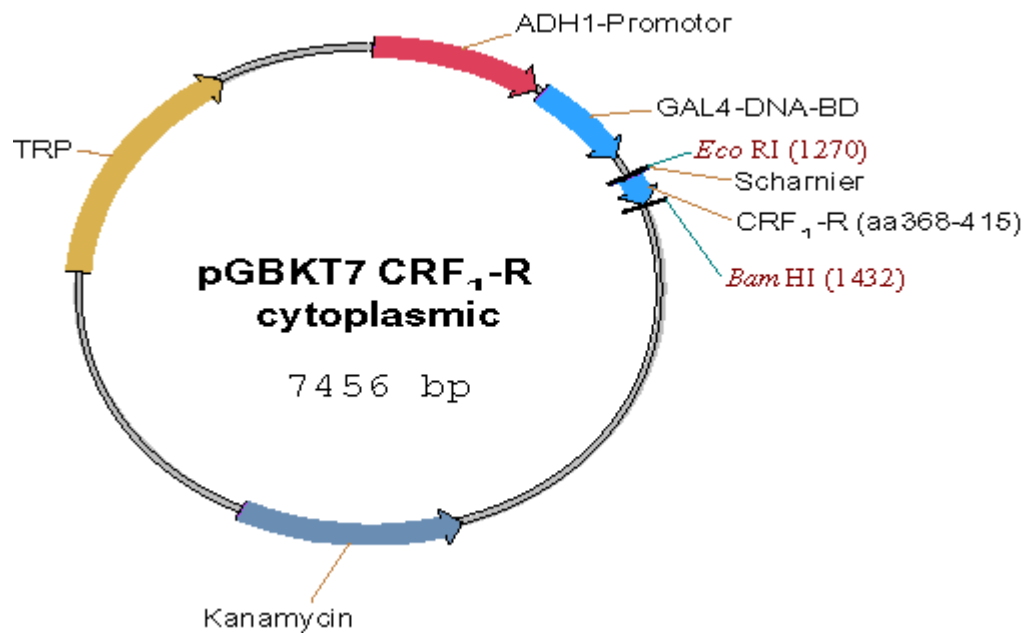
ccaaaaaagagatctctatggcttaccatac gatgttccagattacgctagcttgggtggtcatatggccatg
gaggccccggggatcc**gaattc**gcggccgcgctcgaccacaaacgggcgacacggagccgcagtgctggaggggg
agccatgggtgccccgcagcgtgggggcagagggccccaggacgcccggccccaggccccgctcagccaggg
ccccccacgggtgccccctccttcttgggtctgagcagtgcgagtgctagggagcccgggcgggcgggcggcg
gctggaactggcgtgggctgggggggtccgagccgccccggggcagtgccatgcacaagcaccagcactgctgta
agtgccccgagtgctatgaggtgacccgctggccgcccctgcccgtcttgagcctcctggctacggggactggc
aggtgcccggacccctatgggccaagtgggggcaatggggctagctccgggttatggaggctacagctcgagacc
tgcttccagggcaggggctacccccacccctcgcaccaaggccaagctcatccccacaggccgagatgtggggc
cagtgccccctaagccagtcgggcaagagcacc

45-1 :

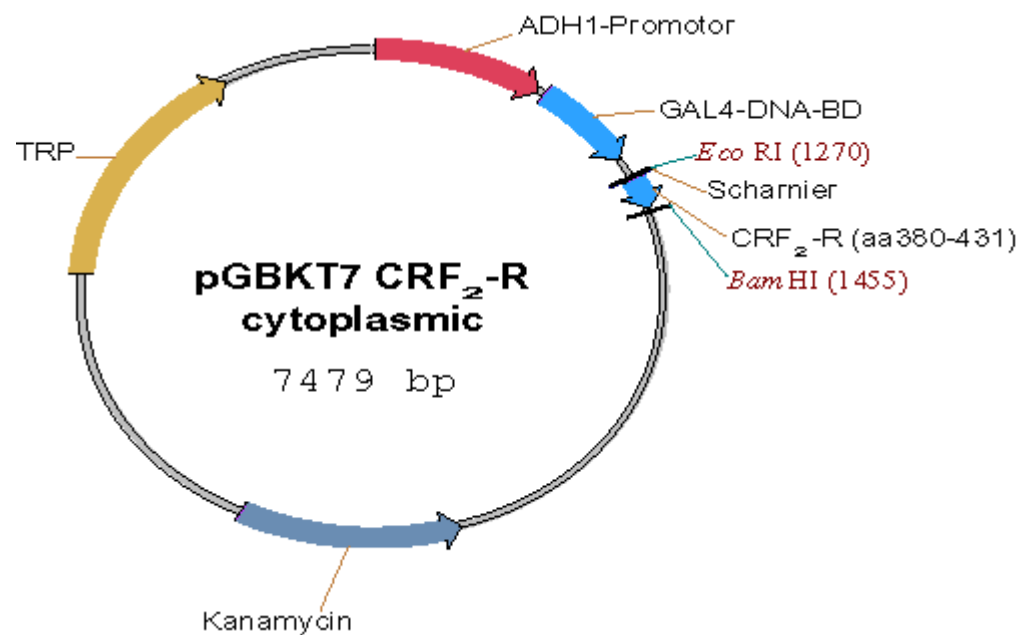
ccaaaaaagagatctctatggcttaccatac gatgttccagattacgctagcttgggtggtcatatggccatg
gaggccccggggatcc**gaattc**gcggccgcgctcgacatcaacatgcctcacgctgacattgtgaagctcatcaag
gacgcccgtctcagtgctacccttcgcatcattcctcaggaggagctcaacagccccaacatcagcaccagttca
gagaaacagagccccatggcccagcagcacagccctctggcccagcagagtcctctggcccagccaagccccgcc
acccccaacagcccagtcgcacagccagctcctccccaacctctccagctgcaaggacacgaaaaatagttacagg
tcagaagttaaagcgaggcaagatgtgaagccagacatccggcagcctcccttccagactacaggcagcccccg
atggactacaggcagccccgggaggagactactcacagcccccaaccttgggactacaggcagcactctccaga
caccangcagttacctctgtcagactacaggcaggcncaggattttgattatntcactgtggaacattggagaaa
ggaagccaaaggatttggattcancattcctggangaaggggaanacaaga

Die folgenden Plasmide wurden wie unter 3.1 oder 3.2 beschrieben konstruiert. Wir zeigen hier jeweils nur eine Plasmidkarte:

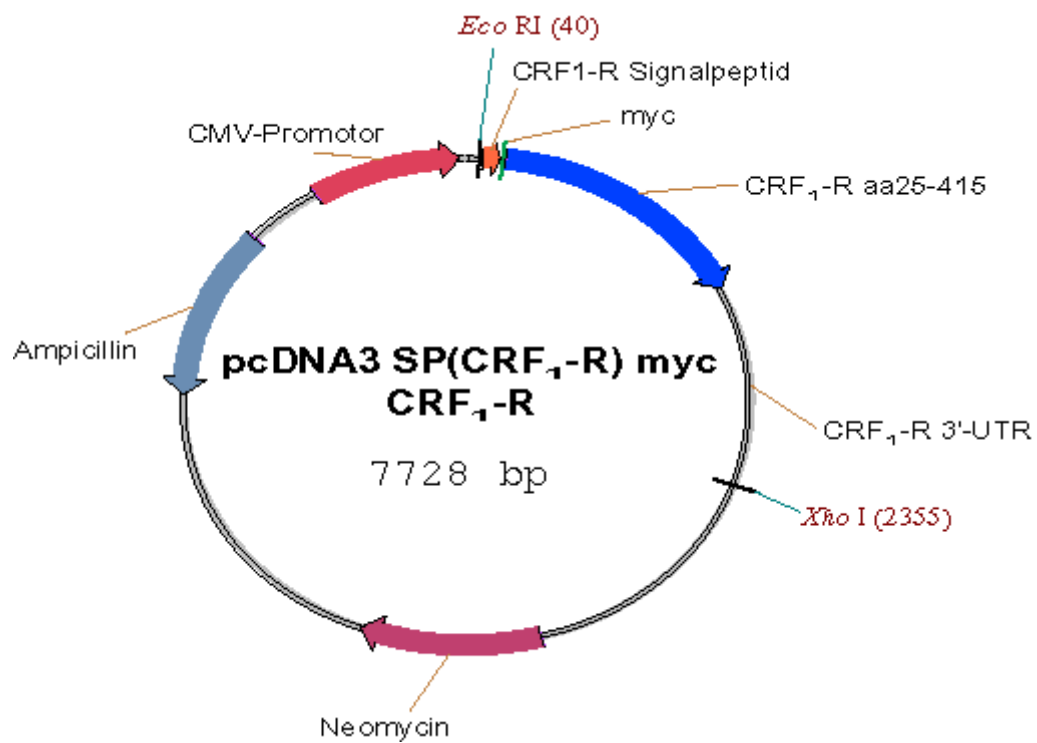
pGBKT7_CRF₁-R_cytoplasmic:



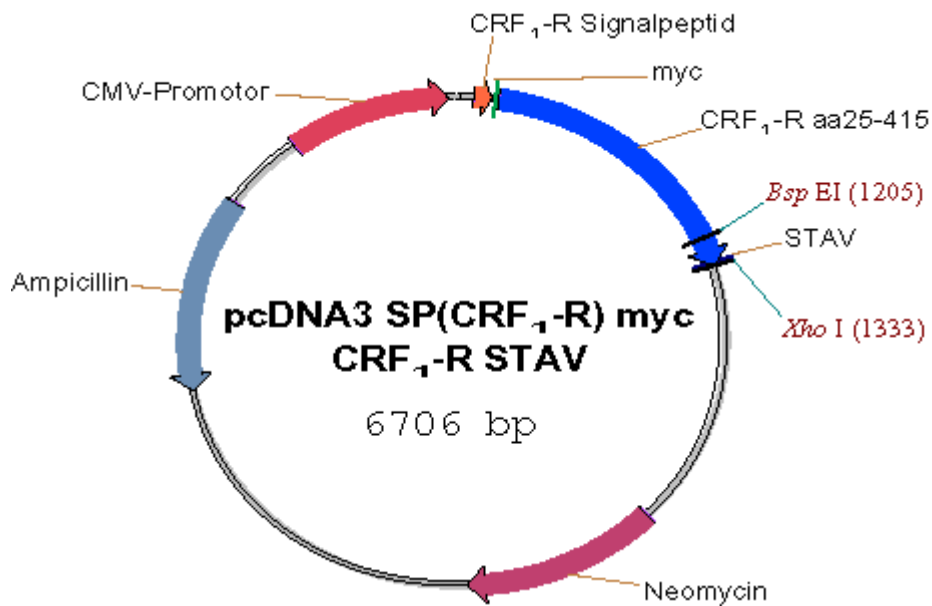
pGBKT7_CRF₂-R_cytoplasmic:



pcDNA3_SP(CRF₁-R)_myc_CRF₁-R:

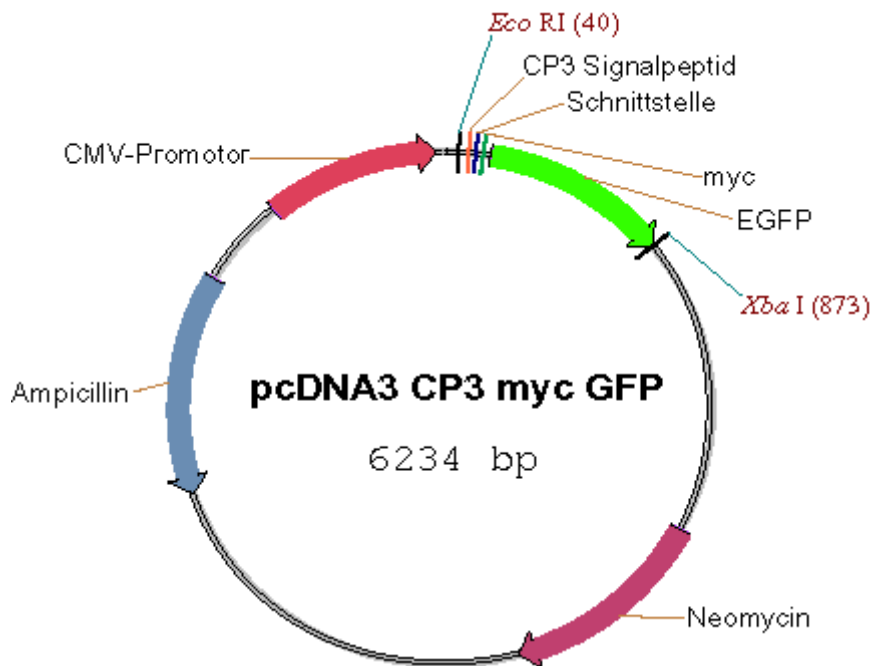


pcDNA3_SP(CRF₁-R)_myc_CRF₁-R_STAV:

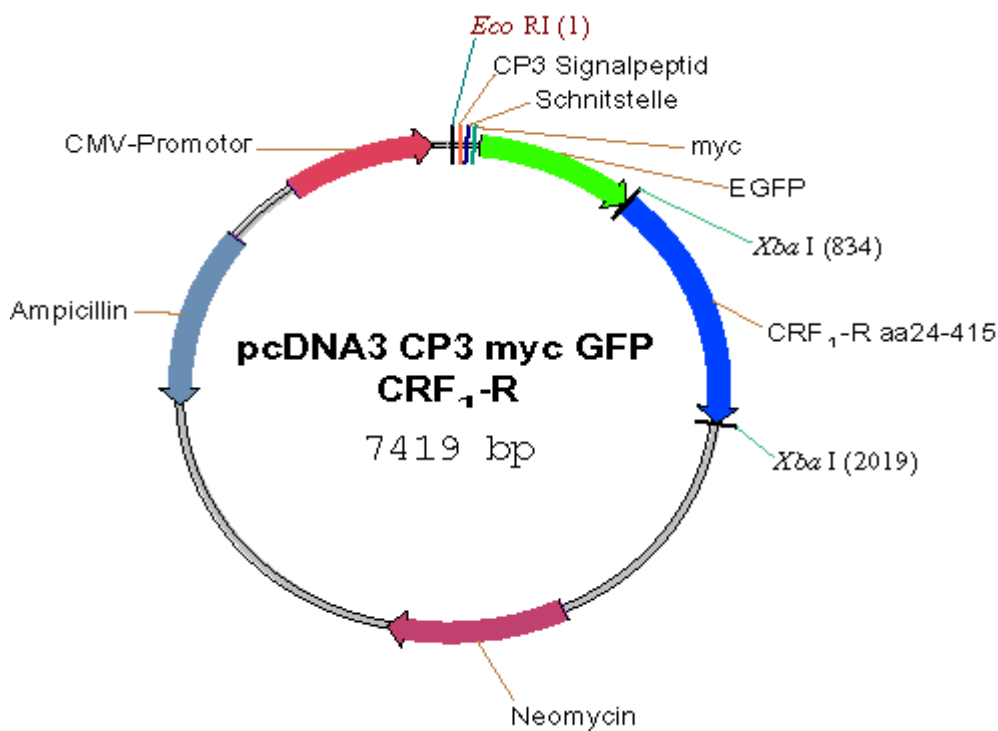


pcDNA3_SP(CRF₁-R)_myc_CRF₁-R_STAA, pcDNA3_SP(CRF₁-R)_myc_CRF₁-R_SAAV, pcDNA3_SP(CRF₁-R)_myc_CRF₁-R_ATAV und pcDNA3_SP(CRF₁-R)_myc_CRF₁-R_STAVA sind entsprechend konstruiert.

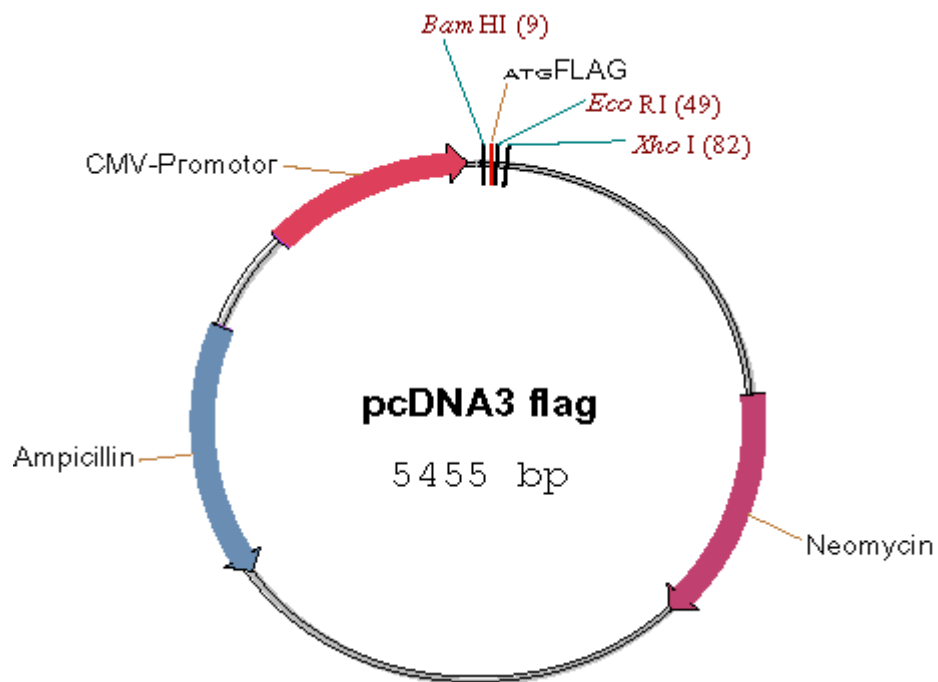
pcDNA3_SP(CP3)_myc_GFP:



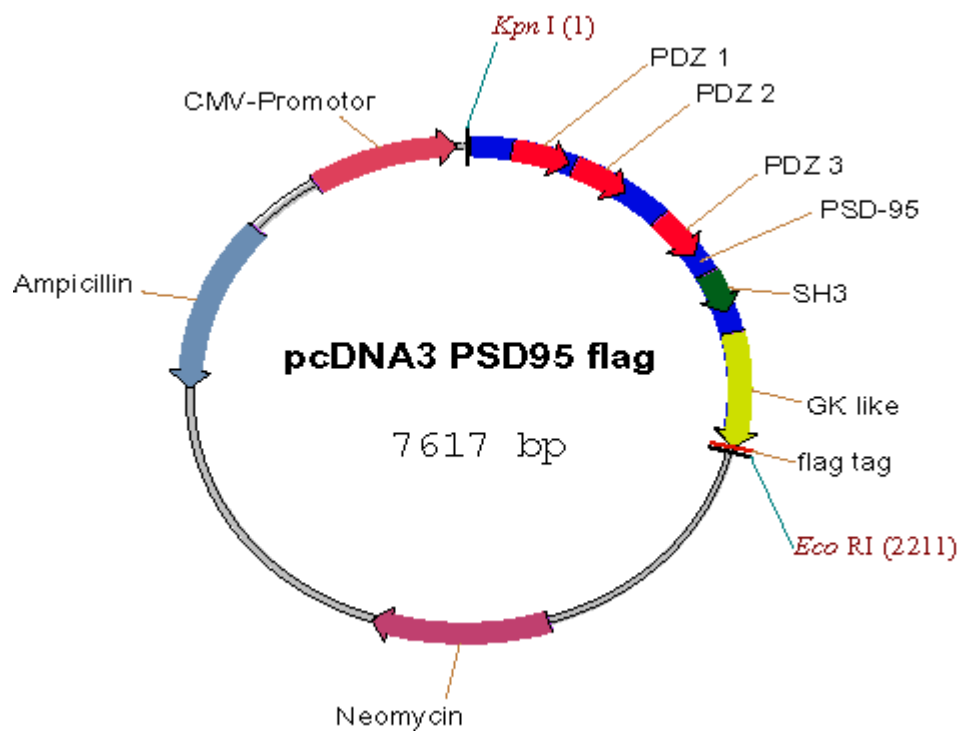
pcDNA3_SP(CP3)_myc_GFP_CRF₁-R:



pcDNA3_flag:



pcDNA3_PSD-95_flag:



pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1_flag, pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1-2_flag und pcDNA3_PSD-95_ΔPDZ1-3_flag sind entsprechend konstruiert.

Anhang II: Oligodeoxynucleotide

<i>EcoRI</i> _3xG_CRF ₁ -R_1131_5':	gccgc GAATTC GGAGGAGGc agtgagggtccgctctgc
<i>Bam</i> HI_CRF ₁ -R_1279_3':	gccgc GGATCC tcacactgctgtggactgctt
3'_DNA-BD-sequencing:	taagagtcactttaaaatttgtat
<i>EcoRI</i> _3xG_CRF ₂ -R_1266_5':	gccgc GAATTC GGAGGAGGA tgctttcttcaatggagaggtg
<i>Bam</i> HI_CRF ₂ -R_1424_3':	gccgc GGATCC gtgacagaggggtcacacagc
Gal4p_AD_Sequencing:	taccactacaatggatg
CRF1-R(19-24)_myc_mCRF ₁ -R(25-30)_3':	acactgctgatcctggag CAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTC ggaggtggagacgggggtt
CRF ₁ -R_350_3':	tgagaatctcctggcactca
<i>EcoRI</i> _Kozak_CRF ₁ -R_atg_5':	gccgc gaattc GCCGCCACCatg ggacagcgcgccgcagct
<i>Xba</i> I_CRF ₁ -R_aa24_5':	gccgc TCTAGA tccctccaggatcagcagtg
CRF ₁ -R_STAV._ <i>Xba</i> I_3':	ccgccg TCTAGA TCAcactgctgtggactg
CRF ₁ -R_STAV._ <i>Xho</i> I_3':	ccgccg ctcgag TCAcactgctgtggactg
CRF ₁ -R_STAA._ <i>Xho</i> I_3':	ccgccg ctcgag TCATGCTgctgtggactgcttga
CRF ₁ -R_SAAV._ <i>Xho</i> I_3':	ccgccg ctcgag TCAcactgcTGCggactgcttgatgctgtg
CRF ₁ -R_ATAV._ <i>Xho</i> I_3':	ccgccg ctcgag TCAcactgctgtTGCctgcttgatgctgtggaa
CRF ₁ -R_STAVA._ <i>Xho</i> I_3':	ccgccg ctcgag TCATGCCactgctgtggactgctt
CRF ₁ -R_1132_5':	cagtgagggtccgctctgc
<i>Bam</i> HI_Kozak_flag_ <i>EcoRI</i> _sense:	gatcc gccaccatg gattacaaggatgacgacgataag gg
<i>Bam</i> HI_Kozak_flag_ <i>EcoRI</i> _antisense:	aattc ccttatcgctgctcattccttgtaate catgggtggc g
PSD-95_ <i>Kpn</i> I_Kozak_atg_5:	CGCGG ggtacc GCCGCCACcatg gactgtctctgtatag
PSD-95_flag_tga_ <i>EcoRI</i> _3':	CGCCG gaattc TCA cttatcgctgctcattccttgtaate gagtctctctcgggctggga
PSD-95_2324_3':	ggggctaggggtaggggttat
PSD-95_ <i>Kpn</i> I_Kozak_PDZ2_5':	CGCGG ggtacc GCCGCCACCATG Gaacccccagctgagaagat
PSD-95_ <i>Kpn</i> I_Kozak_PDZ3_5':	CGCGG ggtacc GCCGCCACCATG Gacctgctaggggaggaaga
PSD-95_ <i>Kpn</i> I_Kozak_Rest_5':	CGCGC ggatcc GCCGCCACCATG Ggccgattcgaggccaagat
PSD-95_1190_5':	cagtataaaccagaagag
<i>Xba</i> I_CRF ₁ -R_aa24_5':	gccgc TCTAGA tccctccaggatcagcagtg
CRF ₁ -R_STAV._ <i>Xba</i> I_3':	ccgccg TCTAGA TCAcactgctgtggactg

Anhang III: Zusammensetzung von Lösungen und Medien

sechsfachkonzentrierter Agarosegelladepuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylene Cyanol 15% Ficoll
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
0,7% - 1,5% Agarosegele	0,7% - 1,5% Agarose 0,1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer
dNTP-Lösung	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
Lithiumacetat-TE-Puffer	100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA
STES-Puffer	300 mM NaCl 10 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA 0,1% SDS
zweifachkonzentrierter BBS-Puffer	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 6,80)
HNTG-Lysepuffer	50 mM HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 1% Triton X-100 10% Glycerol
HNTG-Puffer	50 mM HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 0,1% Triton X-100 10% Glycerol

PBS-Lösung	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
SDS-Polyacrylamid-Trenngel 10% oder 8%	10% bzw 8% Acrylamidmix 0,375 M Tris pH 8,8 0,1% SDS 0,1% Ammoniumpersulfat 0,04% TEMED
SDS-Polyacrylamid-Sammelgel	5% Acrylamidmix 0,125 M Tris pH 6,8 0,1% SDS 0,1% Ammoniumpersulfat 0,04% TEMED
zweifachkonzentrierter SDS-Gelladepuffer	100 mM Tris pH 6,8 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 200 mM β-Mercaptoethanol
Tris-Glycin-Elektrophorespuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% SDS
Transferpuffer	24 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol
Luminol/Peroxid-Gemisch	10% Lösung A 10% Lösung B 0,16% H ₂ O ₂
Ampicillinstammlösung	50 mg/ml Ampicillin
Kanamycinstammlösung	10 mg/ml Kanamycin
Ethidiumbromidstammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
Tris-Chlorid-Puffer	1 M Tris (pH 6,8) und 1 M Tris (pH 8,0) und 1,5 M Tris (pH 8,8)
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA (pH 8,0)
Natriumacetatlösung	3 M Natriumacetat (pH 5,2)
Kalziumchloridlösung	2,5 M Kalziumchlorid
Poly-D-Lysin-Lösung	0,1 g/l Poly-D-Lysin
Paraformaldehydlösung	4% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4)

LB-Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl
GYT-Medium	10% Glycerol 0,125% Hefeextrakt 0,25% Trypton
YPDA-Medium	50 g/l YPD Medium 0,003% Adeninhemisulfat
zweifachkonzentriertes YPDA-Medium	100 g/l YPD Medium 0,006% Adeninhemisulfat
synthetisch definierte Medien für Hefe (SD-Medien)	26,7 g/l Minimal SD-Base plus
- SD-Medium ohne Tryptophan	640 mg/l -Leu/-Trp DO Supplement 100 mg/l L-Leucin
- SD-Medium ohne Leucin	640 mg/l -Leu/-Trp Dropout Supplement 20 mg/l L-Tryptophan
- SD-Medium ohne Tryptophan und Leucin	640 mg/l -Leu/-Trp Dropout Supplement
- SD-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Histidin	600 mg/l -Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement 20 mg/l L-Adenin
- SD-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Adenin	600 mg/l -Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement 20 mg/l L-Histidin
- SD-Medium ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin	600 mg/l -Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement
Agarmedien	1,5% Bacto Agar in dem jeweiligen Flüssigmedium
X- α -Gal-Stammlösung	20 mg/ml X- α -Gal in N,N-Dimethylformamid
Adeninhemisulfatstammlösung	0,2% Adeninhemisulfat

Anhang IV: Bezugsquellennachweise

Enzyme, dazugehörige Reaktionspuffer, Molekulargewichtsstandard für DNA

Superscript II RNaseH ⁻ Reverse Transkriptase	Invitrogen (18064)
First Strand Buffer	Invitrogen (18064)
0,1 M DTT	Invitrogen (18064)
Herculase Enhanced DNA Polymerase	Stratagene (600262)
10x Reaction Buffer	Stratagene (600262)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
Calf Intestinal Phosphatase	New England Biolabs (M0290)
T4 DNA Ligase	Roche Diagnostics (481220)
10x Ligation Buffer	Roche Diagnostics (481220)
SmartLadder	Eurogentec (MW-1700-04)

Bestandteile von Medien für Bakterien und Hefe

Bacto Trypton	Becton, Dickinson and Co. (211705)
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Co. (212750)
YPD Medium	Clontech (8600-1)
Minimal SD Base	Clontech (8602-1)
-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech (8608-1)
-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech (8619-1)
L-Adeninhemisulfat	Sigma-Aldrich (A9126)
L-Histidin	Sigma-Aldrich (H9511)
L-Leucin	Sigma-Aldrich (L1512)
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich (T0254)
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Co. (214010)
X- α -Gal	Clontech (8061-1)

Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (41966-029)
L-Glutamin	Invitrogen (25030-024)
Fetal Bovine Serum (FBS); Origin: Mexican	Invitrogen (10437-028; Lot 1016785)
PBS Dulbecco's	Invitrogen (14190-094)
Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser	TPP/Peske (93100)
Sechstaschenplatten	TPP/Peske (9206)
24-Taschen-Platten	TPP/Peske (9224)
Serologische Pipetten	Sarstedt
Deckgläser (12 mm Durchmesser)	Roth (P231.1)
Objektträger Super Frost Plus	Merck (6319483)
ProTaqS Mount-Flour	Quartett Immunodiagnostics (401603095)

Antikörper, besondere Reagenzien und Materialien für die Immunpräzipitation und Immunodetektion

Monoclonal Anti-c-myc, Clone 9E10	Sigma-Aldrich (M5546)
ANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody	Sigma-Aldrich (F3165)
Monoclonal Anti-PSD-95 Antibody, Clone 6G6-1C9	Affinity (MA1-045)
Goat Anti-Mouse IgG, Peroxidase conjugate	Sigma-Aldrich (A2304)
Protein G	Sigma-Aldrich (P4691)
Complete Mini (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche Diagnostics (1836153)
Precision Protein Standards Prestained, Broad Range	BioRad (161-0372)
Nitrozellulosemembran Optitran BA-S 83	Schleicher&Schuell (10439394)
Whatman-3MM-Filterpapier	Whatman
Milchpulver	Regilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France
LumiGlo Reagent A	Cell Signalling Technologies (7003)
Peroxide Reagent B	Cell Signalling Technologies (7003)
BioMax MR Röntgenfilme	Kodak (8701502)

Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (M6250)
Agarose	Invitrogen (15510-027)
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth (8076.2)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (A9518)
Ampuwa-H ₂ O	Fresenius (1654198)
BES	Sigma-Aldrich (B4554)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (B7021)
Chloroform	Merck (1.02445)
ddH ₂ O	aus einer Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90 CN
Deoxynucleoside Triphosphate Set (PCR Grade)	Roche Diagnostics (1969064)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck (1.06586)
EDTA	Sigma-Aldrich (E5134)
Essigsäure	Merck (8.18755)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (E1510)
Ficoll	Amersham Pharmacia (17.0400)
glass beads (425-600 µm)	Sigma-Aldrich (G8772)
Glycerol	Sigma-Aldrich (G7893)
Glycin	Sigma-Aldrich (G8790)
HEPES	Sigma-Aldrich (H0891)
Isoamylalkohol	Merck (1.00979)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (1.04873)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (K0879)
Lauryl Sulfat (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich (L4509)
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich (L4158)
Methanol	Roth (4627.5)
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich (D4551)
Natriumacetat	Merck (1.01539)
Natriumchlorid	Roth (3957.2)
Natronlauge (5 mol/l)	Merck (1.09913)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (P6148)
Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth (A156.2)
Poly-D-Lysin (70.000 - 150.000)	Sigma-Aldrich (P6407)
Polyethylenglycol (3350)	Sigma-Aldrich (P3640)
Reiner Alkohol (Ethanol)	Apotheke des Krankenhauses München-Schwabing

Salzsäure 32%	Merck (1.00319)
Tris-Base	Roth (4835.3)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (T8787)
Wasserstoffperoxid (30%)	Sigma-Aldrich (H0904)
Xylene Cyanole	Sigma-Aldrich (X4126)

Geräte

Begasungsbrutschrank	Heraeus Instruments
Biofuge pico (Tischzentrifuge)	Heraeus Instruments
Elektrophoresezubehör	MWG Biotech
Elektrophoresis Power Supply EPS 200	Amersham Pharmacia
Elektroporationsküvetten (2mm)	Peqlab (71-1020)
Entwicklermaschine (XP2000)	3M / Kodak
Fluoreszenzinvertmikroskop (IMT2)	Olympus
Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossener Digitalkamera	Zeiss Axioplan 2 imaging plus AxioCam
Geldokumentationssystem BioDoc II	Biometra
Gelkammern	MWG Biotech
Gene Pulser II	Biorad
GeneAmp PCR System 9700	Perkin Elmer
Invertmikroskop (DMIL)	Leica
J2-MC-Zentrifuge	Beckman
JLA 16.250-Rotor	Beckman
Kanülen (23 gauge)	Becton, Dickinson and Co. (300700)
Kühlzentrifuge 5403	Eppendorf
Lamin Air HB2448 (Zellkultur-Arbeitsplatz)	Heraeus Instruments
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments
Mini Protean 3 PAGE-System	Biorad (165-3301/2)
Photometer Genequant II	Amersham Pharmacia
SM25-Schüttler	Edmund Bühler
Spectrophotometer DU 640	Beckman
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Biorad (170-3940)

Molekularbiologische "Kits"

QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen (28706)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (27106)
Wizard Midiprep DNA Purification System	Promega (A7640)

Mikroorganismen

<i>E. coli</i> DH5 α	Invitrogen (18265-017)
<i>S. cerevisiae</i> AH109	Clontech (MY4008AH)
<i>S. cerevisiae</i> Y187	Clontech (MY4008AH)
Pretransformed Matchmaker Library, Mouse Brain, pooled from 200 BALB/c males, ages 9-12 weeks	Clontech (MY4008AH)

HEK293-Zellen wurden von Markus Panhuysen, MPI für Psychiatrie, erhalten.

Zusammenfassung

Wir haben eine "Yeast Two-Hybrid"-Suche durchgeführt, um Proteine zu finden, die an die carboxyterminale zytoplasmatische Domäne des CRF₁-Rezeptors binden. Unsere Suche hat sechs potentielle Interaktionspartner des CRF₁-Rezeptors identifiziert. Drei der identifizierten Proteine, PSD-95, SAP102 und SAP97, gehören der Familie der neuronalen membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUK) an. Diese Moleküle spielen eine zentrale Rolle für die dynamische Organisation postsynaptischer Glutamatrezeptoren. Ein viertes der identifizierten Proteine, ARIP1, beteiligt sich vermutlich ebenfalls am Aufbau der Postsynapse.

Wir haben die Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95 als dem Prototyp neuronaler MAGUK in Säugerzellen bestätigt und biochemisch näher charakterisiert. PSD-95 läßt sich mit dem CRF₁-Rezeptor koimmunopräzipitieren. Der CRF₁-Rezeptor bindet an eine oder mehrere der PDZ-Domänen von PSD-95 und verhält sich wie ein typischer PDZ-Domänen-Ligand.

Wir finden in der Literatur einen Effekt von CRF auf die synaptische Plastizität hippocampaler Neurone beschrieben und mutmaßen, daß die Interaktion zwischen dem CRF₁-Rezeptor und PSD-95 für die Ausprägung dieses Effekts wesentlich sein könnte.

Danksagung

Ich möchte mich bei Wolfgang Wurst und Jan Deussing bedanken, die das Thema zu dieser Arbeit gestellt haben und die Arbeit durchgängig betreut haben.

Ich möchte mich weiterhin bedanken bei Stephanie Alam, Andreas Geschwind, Claudia Kühne, Jobst Landgrebe, Beat Lutz, Marianne Müller, Markus Panhuysen, Stefanie Pirrung, Philipp Schäfermeier, Jan Sitz, Daniela Vogt-Weisenhorn, Alexander von Holst, Juliane von Waldenfels und Peter Weber für Anleitung, wertvolle Diskussionen oder tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gehört Johannes Breu.

Lebenslauf

Ich bin am 13. Februar 1975 in Offenbach am Main geboren worden. Von 1981 bis 1985 habe ich die Grundschule, von 1985 bis 1994 das Leibnizgymnasium in Offenbach besucht.

Von 1994 bis 2000 habe ich an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main Humanmedizin studiert. Im Herbst 1996 bin ich in die Förderung der Studienstiftung des deutschen Volkes aufgenommen worden. Im Oktober 2000 habe ich in Frankfurt am Main die Ärztliche Prüfung abgelegt.

Von November 2000 bis September 2002 bin ich am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München als Arzt im Praktikum und als wissenschaftlicher Mitarbeiter zur Promotion beschäftigt gewesen.