

Aus dem Institut für klinische und experimentelle
Pharmakologie und Toxikologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. M. Schwaninger

Funktionelle Charakterisierung einer neuen Orexin-
Typ-2-Rezeptor-Splicevariante

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Cordula Knopp
aus Aalen

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Frank Noack
3. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Peters

Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2013

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.05.2013

Promotionskommission der Sektion Medizin

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die Entdeckung der Orexine und ihrer Rezeptoren.....	1
1.2 Physiologische und pathophysiologische Funktionen des Orexinsystems.....	2
1.3 Signalübertragung der Orexinrezeptoren.....	3
1.4 Splicevarianten des OX ₂ -Rezeptors.....	5
1.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Dimerisierung.....	7
1.5.1 Veränderte Ligandenaffinität durch Dimerisierung.....	9
1.5.2 Veränderte Signaltransduktion durch Dimerisierung.....	9
1.5.3 Veränderte Internalisierung und Veränderung G-Protein-unabhängiger Signalkaskaden durch Dimerisierung.....	10
1.5.4 Veränderter Rezeptortransport zur Zelloberfläche durch Dimerisierung.....	11
1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	12
2 Methoden	13
2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	13
2.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	13
2.1.2 DNA-Fällung.....	13
2.1.3 RNA-Fällung.....	13
2.1.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	14
2.1.5 Messung der RNA-Konzentration.....	14
2.2 Subklonierung.....	14
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	14
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	16
2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	16
2.2.4 Restriktionsverdau von DNA.....	16
2.2.5 Auffüllen von 5'-Überhängen.....	17
2.2.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels alkalischer Phosphatase.....	17
2.2.6 Ligation.....	18
2.2.7 Ligation mit dem „TOPO TA Cloning® Kit“.....	18
2.2.8 Transformation von E. coli.....	19
2.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA.....	19
2.3 RNA-Gewinnung und quantitative real-time-Polymerase-Kettenreaktion.....	21
2.3.1 RNA-Isolation aus NCI-H295R-Zellen.....	21
2.3.2 Reverse Transkription.....	21
2.3.3 Quantitative real-time-Polymerase-Kettenreaktion.....	22
2.4 Zellkultur.....	24
2.4.1 Verwendete Zelllinien.....	24
2.4.2 Kultivierung und Subkultivierung von CHO- und NCI-H295R-Zellen.....	24
2.4.3 Aussaat von CHO- und NCI-H295R-Zellen.....	25
2.5 Transiente Transfektion.....	26
2.6 Intrazelluläre Calcium-Messungen mit Fluo-4-AM.....	27

2.7 Konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie.....	28
2.8 Elektrophysiologische Messungen an Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	29
2.8.1 Haltung und Fütterung der Frösche.....	29
2.8.2 Das Oozytenexpressionssystem	29
2.8.3 RNA-Synthese durch in-vitro-Transkription	30
2.8.4 Isolierung und Selektion der Oozyten.....	31
2.8.5 Herstellung der Injektionspipetten	32
2.8.6 RNA-Injektion.....	32
2.8.7 Aufbau des Messplatzes	33
2.8.8 Herstellung der Messpipetten.....	33
2.8.9 Prinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	34
2.8.10 Elektrophysiologische Messungen.....	34
2.8.11 Ionenselektivität	37
2.9 Statistische Analyse	37
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Nachweis der mRNA des hOX ₂ R-Wildtyps und der hOX ₂ R-Splicevariante in humanen Organen sowie in NCI-H295R-Zellen	39
3.2 Subklonierung des hOX ₂ R-Wildtyps und der hOX ₂ R-Splicevariante in verschiedene Vektoren.....	41
3.3 Intrazelluläre Lokalisierung des hOX ₂ R-Wildtyps und der hOX ₂ R-Splicevariante in CHO-Zellen.....	44
3.4 Voltage-Clamp-Messungen an <i>Xenopus</i> -Oozyten, die hOX ₂ -Rezeptorvarianten exprimieren	46
3.4.1 Charakterisierung Orexin-A-induzierter Ströme in <i>Xenopus</i> -Oozyten	46
3.4.2 Koexpression des hOX ₂ R-Wildtyps und der hOX ₂ R-Splicevariante in <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	48
3.5 Intrazelluläre Calciummessungen mittels Fluo-4-AM	52
3.5.1 Intrazelluläre Calciummessungen in NCI-H295R-Zellen.....	52
3.5.2 Intrazelluläre Calciummessungen in CHO-Zellen.....	53
4 Diskussion	55
4.1 Funktionelle Charakterisierung von hOX ₂ R-Splicevarianten.....	55
4.2 Nachweis der mRNA der hOX ₂ R-Splicevariante im Gehirn und in peripheren Organen.....	58
4.3 Ist das Fehlen eines ER-Exportmotivs für die Retention der hOX ₂ R-Splicevariante im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich?.....	61
4.4 Dominant-negativer Effekt der hOX ₂ R-Splicevariante auf den hOX ₂ R-Wildtyp	63
4.5 Ausblick	66
5 Zusammenfassung	68
6 Literaturverzeichnis.....	69

7 Anhang	83
7.1 Material	83
7.1.1 Geräte	83
7.1.2 Software	84
7.1.3 Verbrauchsmaterialien	85
7.1.4 Chemikalien	86
7.1.5 Antibiotika.....	86
7.1.6 Enzyme.....	87
7.1.7 Kits (kommerzielle Reagenziensätze).....	87
7.1.8 Standards	88
7.1.9 Für die Sequenzierung verwendete Primer	88
7.1.10 Puffer, Lösungen und Nährmedien	88
7.1.11 Vektoren.....	92
7.2 Abbildungsverzeichnis	98
7.3 Tabellenverzeichnis.....	99
8 Danksagung	100
9 Curriculum vitae	101

1 Einleitung

1.1 Die Entdeckung der Orexine und ihrer Rezeptoren

Auf der Suche nach endogenen Liganden für G-Protein-gekoppelte Orphan-Rezeptoren identifizierten Sakurai et al. 1998 ein Paar von Neuropeptiden (Sakurai et al., 1998). Sie nannten sie Orexin A und Orexin B (*orexins*, gr. Appetit, Verlangen), da ihre intraventrikuläre Applikation bei Ratten die Nahrungsaufnahme stimulierte. Durch Homologie-Screening wurde neben dem ursprünglichen Orphan-Rezeptor ein weiterer Rezeptor kloniert, so dass die beiden Rezeptoren, die über eine Aminosäuren-Sequenzhomologie von 64 % verfügen, als Orexin-Typ-1- (OX₁-Rezeptor) und Orexin-Typ-2-Rezeptor (OX₂-Rezeptor) bezeichnet wurden. Orexin A und Orexin B werden von einem einzelnen beim Menschen auf Chromosom 17q21 lokalisierten Gen kodiert und post-translationell durch proteolytische Spaltung aus dem gemeinsamen Vorläuferprotein Präpro-Orexin gebildet. Orexin A besteht aus 33 Aminosäuren mit zwei intramolekularen Disulfidbrücken, Orexin B besitzt 28 Aminosäuren und zeigt eine 48 %ige Sequenzhomologie mit Orexin A.

Nahezu zeitgleich zur Isolierung der Orexine durch Sakurai et al. identifizierten de Lecea et al. in Ratten eine Hypothalamus-spezifische mRNA, die Präpro-Hypocretin genannt wurde (de Lecea et al., 1998). Wie sich wenig später herausstellte, ist diese mit Präpro-Orexin identisch.

Im ZNS sind Orexin-produzierende Neurone nahezu ausschließlich im posterolateralen Hypothalamus lokalisiert, doch projizieren Orexin-immunopositive Fasern praktisch in das gesamte Zentralnervensystem und das Rückenmark, darunter zu zahlreichen Kernen, die an der Regulation der Nahrungsaufnahme, des Schlaf-Wach-Verhaltens, neuroendokriner sowie autonomer Funktionen beteiligt sind (Peyron et al., 1998; Cutler et al., 1999; Date et al., 1999; Nambu et al., 1999). Die Verteilung der Orexinrezeptoren in den verschiedenen Hirnregionen deckt sich im Wesentlichen mit der Innervation durch orexinerge Fasern (Trivedi et al., 1998; Hervieu et al., 2001; Marcus et al., 2001; Cluderay et al., 2002). Allerdings finden sich in den einzelnen Hirnkernen der Ratte deutliche Unterschiede bezüglich der Kopienzahl an OX₁- und OX₂-Rezeptor-mRNA (Herlyn, 2005).

Darüber hinaus wurden Orexine und ihre Rezeptoren nicht nur im ZNS, sondern auch in peripheren Organen wie Nebenniere (Jöhren et al., 2001; Spinazzi et al., 2005a), Niere

(Takahashi et al., 2006), Pankreas (Nowak et al., 2005), Hoden (Karteris et al., 2004) und Ovarien (Silveyra et al., 2007), im enterischen Nervensystem und in endokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes (Kirchgessner und Liu, 1999) sowie im Fettgewebe (Digby et al., 2006) nachgewiesen. In der Lunge der Ratte fand sich OX₂-, nicht jedoch OX₁-Rezeptor-mRNA (Jöhren et al., 2001). Es ist daher anzunehmen, dass dem Orexinsystem neben seiner bedeutenden Rolle im ZNS auch in der Peripherie eine wichtige Aufgabe zukommt, die allerdings in den verschiedenen Geweben meist noch unvollständig geklärt ist (Heinonen et al., 2008).

1.2 Physiologische und pathophysiologische Funktionen des Orexinsystems

Die Lokalisierung der Orexin-produzierenden Neurone im lateralen Hypothalamus, der eine wesentliche Rolle bei der Steuerung der Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase spielt, ließ schon die Entdecker der Orexine eine Beteiligung des Orexinsystems an der Nahrungsaufnahme vermuten. Sie und andere Arbeitsgruppen wiesen nach, dass nach intraventrikulärer Injektion von Orexinen die Nahrungsaufnahme kurzfristig erhöht wurde, während durch Fasten die mRNA-Spiegel des Präpro-Orexins im Hypothalamus anstiegen (Sakurai et al., 1998; Haynes et al., 1999; Dube et al., 2000; Yamanaka et al., 2000). Über einen längeren Zeitraum betrachtet erhöhen Orexine die absolute Nahrungsaufnahme jedoch nicht (Haynes et al., 1999; Ida et al., 1999) und bewirken sogar eine Zunahme des Stoffwechselumsatzes (Lubkin und Stricker-Krongrad, 1998). Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass Orexine eher an einer kurzfristigen Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind und Verhaltensweisen und physiologische Funktionen hervorrufen, die für die Nahrungssuche eines fastenden Tieres wichtig sind (Sakurai, 2006).

Durch Tiermodelle wurde die Bedeutung des Orexinsystems in der Pathophysiologie der Narkolepsie, die klinisch durch 1.) Tagesschläfrigkeit mit erhöhter Einschlafneigung, 2.) Kataplexien und 3.) REM-Schlafphänomene wie z. B. Schlafparalysen und einschlaf- oder aufwachbezogene Halluzinationen imponiert, erkannt. So zeigen sowohl Orexin-*knock-out*-Mäuse als auch Dobermänner mit einem Defekt des OX₂-Rezeptorgens Symptome der humanen Narkolepsie (Chemelli et al., 1999; Lin et al., 1999). Bei Narkolepsiepatienten fand sich im Liquor ein erniedrigter oder fehlender Orexin-A-Spiegel und in *post-mortem*-Untersuchungen eine stark verminderte Zahl orexinhaltiger Neurone im lateralen Hypothalamus (Nishino et al., 2000; Peyron et al., 2000; Thannickal et al., 2000; Da-

lal et al., 2001). Abgesehen von wenigen Ausnahmen scheint die humane Narkolepsie jedoch nicht mit einem direkten Defekt des Orexins oder der Orexinrezeptorgene einherzugehen (Bourgin et al., 2006).

Der zwischen der Narkolepsie und Defekten im orexinergen System erkannte Zusammenhang ließ auf eine wichtige Rolle des Orexinsystems in der Regulation des Schlaf-Wachzyklus schließen. Die intrazerebroventrikuläre Injektion von Orexin A und B führte bei Ratten zu einer Zunahme der wach verbrachten Zeit und zu verstärkter motorischer Aktivität, während die Dauer der REM- und Non-REM-Schlafphasen reduziert wurde (Hagan et al., 1999; Piper et al., 2000; España et al., 2001; Jones et al., 2001). Durch elektrophysiologische Messungen wurde gezeigt, dass Orexinneurone während REM- und Non-REM-Schlafphasen eine sehr niedrige Entladungsrate aufwiesen, während aufmerksame Wachheit mit einer hohen Entladungsrate verbunden war (Lee et al., 2005; Milevskiy et al., 2005). Zum jetzigen Zeitpunkt wird davon ausgegangen, dass exzitatorische Einflüsse orexinergischer Neurone auf die monoaminergen Kerne des Hirnstamms und die cholinergen Neurone des basalen Vorderhirns den Wachheitszustand des Organismus fördern und diesen über Rückkopplungsschleifen zwischen den monoaminergen und orexinergen Neuronen aufrecht erhalten (Sakurai, 2007). Darüber hinaus werden Orexinneurone durch Orexin direkt und indirekt OX₂-Rezeptor-vermittelt aktiviert und könnten dadurch während Phasen der Wachheit über einen positiven Rückkopplungsmechanismus ihre eigene Aktivität auf einem hohen Niveau halten (Yamanaka et al., 2010).

In den letzten Jahren konnte eine Beteiligung des Orexinsystems an der Entstehung von Sucht und Abhängigkeit, die aufgrund von Projektionen orexinergischer Neurone zu mit dem Belohnungssystem assoziierten Hirnregionen vermutet wurde, gezeigt werden (Georgescu et al., 2003; Harris et al., 2005; Borgland et al., 2006; Narita et al., 2006). Außerdem ist das Orexinsystem auch an der zentralen Regulation autonomer Funktionen wie Blutdruck und Herzfrequenz (Samson et al., 1999; Shirasaka et al., 1999) beteiligt und beeinflusst neuroendokrine Funktionen wie die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse auf zentralem und peripherem Wege (Jöhren et al., 2004; Spinazzi et al., 2006).

1.3 Signalübertragung der Orexinrezeptoren

Die Signalübertragung der Orexinrezeptoren ist vielseitig und trotz zahlreicher Studien nur unvollständig geklärt. Für beide Rezeptoren wurde eine Kopplung an G_{q/11}-, G_s- und/oder

$G_{i/o}$ -Proteine beschrieben, wobei die Aktivierung einer bestimmten G-Proteinvariante vom untersuchten Zelltyp abhängig zu sein scheint (Karteris et al., 2001; Randeva et al., 2001; Holmqvist et al., 2005; Karteris et al., 2005; Magga et al., 2006). Sie ist in der menschlichen Nebenniere außerdem abhängig vom Entwicklungsstadium (Karteris et al., 2001; Randeva et al., 2001) und wird durch den Energiezustand des Organismus (Karteris et al., 2005) oder die auf die Zellen einwirkende Orexin-Konzentration (Holmqvist et al., 2005) beeinflusst. Als genereller Mechanismus der Signaltransduktion wird eine über Orexinrezeptoren vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration angesehen. Sie wurde in nativen Neuronen (van den Pol et al., 1998; Uramura et al., 2001) und in den endokrinen Zelllinien STC-1 (Larsson et al., 2003) und NCI-H295R (Wenzel et al., 2009), die sowohl OX_1 - als auch OX_2 -Rezeptoren endogen exprimieren, gefunden. Auch in CHO-Zellen (Sakurai et al., 1998; Smart et al., 1999; Lund et al., 2000; Ammoun et al., 2003) oder Neuronen-ähnlichen Zelllinien (Holmqvist et al., 2002; Zhu et al., 2003), die Orexinrezeptoren rekombinant exprimierten, ist eine über Orexinrezeptoren vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bekannt. In den beiden zuletzt genannten Zelllinien sind Orexin A und Orexin B in Bezug auf die intrazelluläre Erhöhung der Calciumkonzentration am OX_2 -Rezeptor gleich wirksam, während Orexin A am OX_1 -Rezeptor eine zehn- bis hundertfach höhere Wirksamkeit als Orexin B aufweist (Sakurai et al., 1998; Smart et al., 1999; Holmqvist et al., 2002; Ammoun et al., 2003; Zhu et al., 2003). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der in Ligandenbindungsstudien gefundenen Selektivität des OX_1 -Rezeptors für Orexin A (Sakurai et al., 1998).

Der über Orexinrezeptoren vermittelten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration liegen unterschiedliche Signaltransduktionsmechanismen zugrunde. Klassischerweise wird Calcium, nach Aktivierung von G_q und der Phospholipase C, Inositol-1,4,5-trisphosphat- (IP_3) -vermittelt aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Eine Rechtsverschiebung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) bei niedriger [140 nM] extrazellulärer Calciumkonzentration ließ jedoch vermuten, dass die Aktivierung von OX_1 - oder OX_2 -Rezeptoren zusätzlich einen Calciumeinstrom über die Plasmamembran induziert (Lund et al., 2000; Holmqvist et al., 2002; Ammoun et al., 2003). Dieser Calciumeinstrom wird bei niedrigen (subnanomolaren) Orexin-Konzentrationen aktiviert, während die Phospholipase C in Abwesenheit des Calciumeinstroms erst bei höheren Orexin-Konzentrationen [1 μ M] aktiviert wird (Lund et al., 2000). In CHO- und IMR-32-Neuroblastomzellen, die OX_1 -Rezeptoren exprimieren, erfolgt er über Diacylglycerol (DAG)-aktivierte nichtselektive Kationenkanäle (TRPC-Kanäle) (Larsson et al., 2005;

Näsman et al., 2006). Johansson et al. konnten 2008 zeigen, dass bei sehr niedrigen Orexin-A-Konzentrationen in OX₁-Rezeptoren-exprimierenden CHO-Zellen DAG durch Aktivierung der Phospholipase D gebildet wird, während es erst bei sehr viel höheren Orexinkonzentrationen zur Phospholipase-C-vermittelten IP₃-Bildung kommt (Johansson et al., 2008).

Darüber hinaus scheinen Orexinrezeptoren auch an der Regulation der Zellproliferation beteiligt zu sein. Sowohl nach Aktivierung des OX₁- als auch nach Aktivierung des OX₂-Rezeptors kommt es durch Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Kinasen ERK1/2 und p38 zu deren Aktivierung (Spinazzi et al., 2005b; Ammoun et al., 2006a; Ammoun et al., 2006b; Ekholm et al., 2007; Tang et al., 2008). Eine über OX₁-Rezeptoren vermittelte ERK1/2-Aktivierung scheint dabei proliferativ und protektiv gegen Apoptose zu wirken. Im Gegensatz dazu ist eine Aktivierung von p38 über beide Rezeptoren möglich, wirkt antiproliferativ und führt zum programmierten Zelltod (Spinazzi et al., 2005b; Ammoun et al., 2006b).

1.4 Splicevarianten des OX₂-Rezeptors

Alternatives Spleißen der Primärtranskripte ist ein weit verbreiteter Mechanismus, durch Bildung verschiedener struktureller Isoformen von einem Gen die Variabilität der eukaryontischen Genexpression zu erhöhen (Keren et al., 2010).

Bisher sind für den OX₂-Rezeptor der Maus zwei Splicevarianten, deren mRNA sowohl in peripheren Organen als auch in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen wurde, bekannt (Chen und Randeva, 2004; Chen et al., 2006). Die murinen OX₂-Splicevarianten unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz des C-terminalen Endes. Dies führt jedoch zu keinen Veränderungen in den sieben Transmembrandomänen und in Bindungsstudien mit Orexin A und Orexin B konnte zwischen den beiden Splicevarianten kein Unterschied festgestellt werden.

Für den humanen OX₂-Rezeptor (hOX₂-Rezeptor) wurden in der Literatur bislang vier verschiedene Splicevarianten beschrieben (Chen und Randeva, 2010). Da die neu entdeckten Exons des hOX₂-Rezeptors für die 5'-untranslationierte Region kodieren, resultieren aus ihnen jedoch keine unterschiedlichen hOX₂-Rezeptorproteine. Die mRNA dieser hOX₂-Splicevarianten wird in verschiedenen Geweben unterschiedlich hoch exprimiert und ihre Translationseffizienz möglicherweise durch die unterschiedlichen 5'-untranslationierten Regionen beeinflusst.

Am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck konnte durch Klonierung eine neue Splicevariante (hOX₂R-Splicevariante) des hOX₂-Rezeptors (im Weiteren als hOX₂R-Wildtyp bezeichnet) isoliert werden (Knopp et al., 2008). Das hOX₂R-Gen besteht aus acht Exons und sieben Introns (Abb. 1-1). Die Primärtranskripte der beiden hOX₂-Rezeptorvarianten verfügen über identische 5'-untranslatierte Regionen und bis zum fünften Exon über einen identischen offenen Leserahmen. Anders als der hOX₂R-Wildtyp wird die hOX₂R-Splicevariante am Ende des fünften Exons nicht gespleißt, sondern der offene Leserahmen der hOX₂R-Splicevariante erstreckt sich 294 bp in das fünfte Intron des hOX₂R-Gens. Die an das fünfte Exon anschließende Sequenz besteht aus 96 kodierenden Nukleotiden gefolgt von einem Stoppcodon zur Beendigung der Translation und einer 3'-untranslatierten Region (198 bp), die die Polyadenylierungsstelle (AATAAA) enthält. Die cDNA der neu isolierten Splicevariante des hOX₂-Rezeptors kodiert für 285 Aminosäuren. Das gebildete Protein enthält im Vergleich mit dem aus 444 Aminosäuren bestehenden Protein des hOX₂R-Wildtyps am C-terminalen Ende 31 sequenzspezifische Aminosäuren und verfügt wahrscheinlich über sechs Transmembrandomänen (Abb. 1-2).

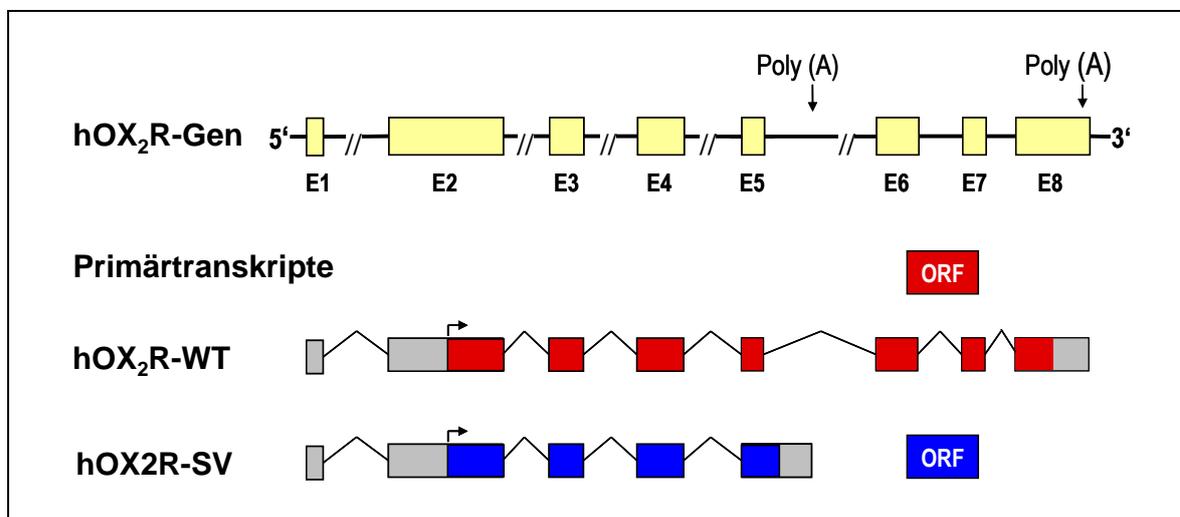


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung der Genstruktur sowie der Primärtranskripte des humanen OX₂-Rezeptors (hOX₂). Die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen sind grau, die kodierende Region des hOX₂R-Wildtyps (hOX₂R-WT; 1332 bp) ist rot und die der hOX₂R-Splicevariante (hOX₂R-SV; 755 bp) blau dargestellt. ORF Offener Leserahmen; Poly A Polyadenylierungsstelle

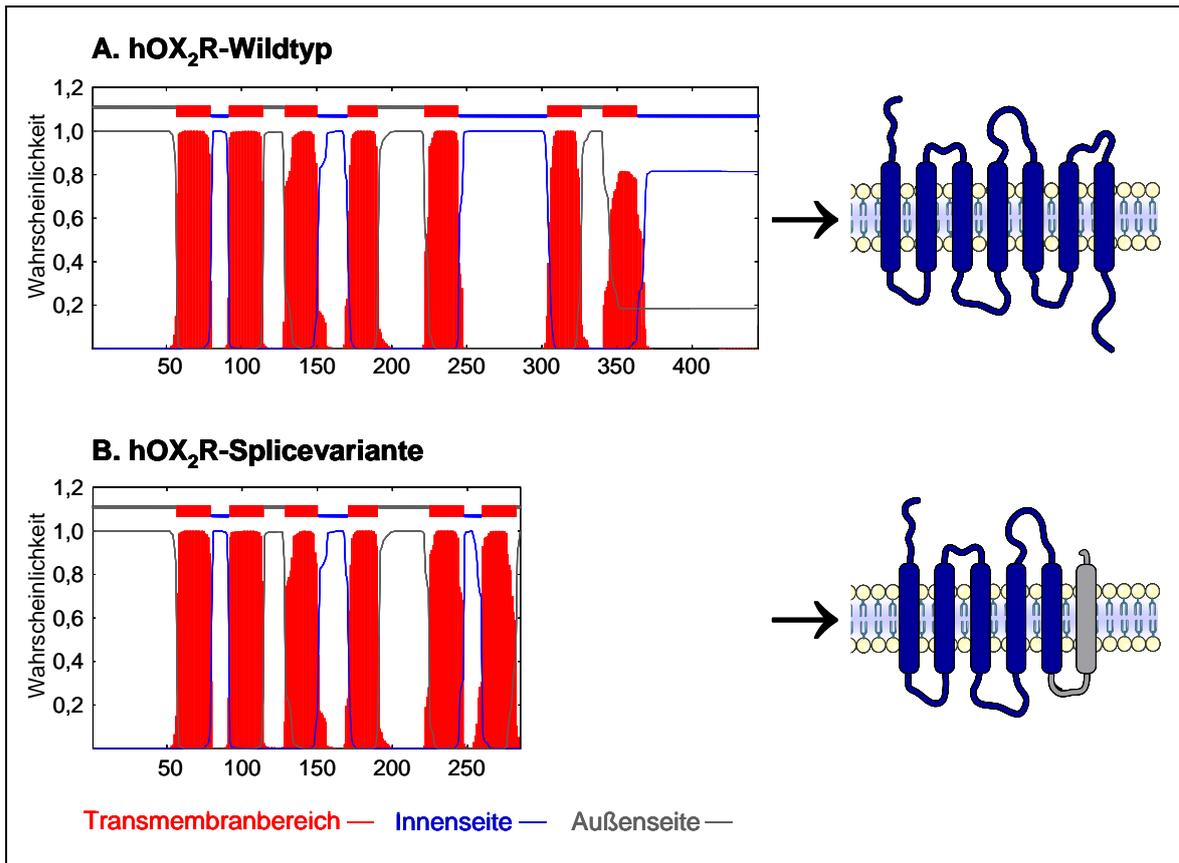


Abbildung 1-2 Vorhersage der Transmembranhelices des hOX₂R-Wildtyps (A) und der hOX₂R-Splicevariante (B) unter Verwendung des TMHMM-Servers Version 2.0 (Center for Biological Sequence, Lyngby, Dänemark). Im Vergleich mit dem hOX₂R-Wildtyp fehlt der neu entdeckten hOX₂R-Splicevariante die sechste und siebte Transmembrandomäne des hOX₂R-Wildtyps und sie verfügt über eine alternative, nichthomologe sechste Transmembrandomäne.

1.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Dimerisierung

Die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bildet die größte Familie der an der Zelloberfläche lokalisierten Rezeptoren. Ihre Signaltransduktion erfolgt in der Regel über die Aktivierung heterotrimerer G-Proteine. Zusätzlich sind jedoch G-Protein-unabhängige Signalkaskaden bekannt (Sun et al., 2007; DeFea, 2008). Alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bestehen aus sieben membrandurchspannenden α -Helices, die über drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der N-terminale Anfang befindet sich extrazellulär, das C-terminale Ende ist intrazellulär lokalisiert (Kobilka, 2007). Aufgrund von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in drei verschiedene Hauptklassen eingeteilt (Foord et al., 2005).

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als Monomere vorkommen. Im Zusammenhang mit Gedächtnis und synaptischer Plastizität wurden Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen in Form von Rezeptormosaiken erstmals von Agnati et al. Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts postuliert (Agnati et al., 1982). In den letzten Jahren konnte mit unterschiedlichen Methoden nicht nur gezeigt werden, dass zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren Homo- oder Heterodimere bilden, sondern auch, dass die Dimer- bzw. Oligomerbildung eine wichtige Rolle hinsichtlich der Rezeptorfunktion spielen kann (Terrillon und Bouvier, 2004; Maggio et al., 2005; Prinster et al., 2005). Im Folgenden soll mit ausgewählten Beispielen auf Rezeptoreigenschaften und -funktionen, von denen bekannt ist, dass sie durch Dimer- bzw. Oligomerbildung beeinflusst und verändert werden können (Abb. 1-3), näher eingegangen werden. Dabei wird der Begriff Dimer verwendet, da dies die kleinste Einheit eines Oligomers darstellt und es erst seit jüngster Vergangenheit mit neu entwickelten Methoden möglich ist, zwischen Heterodimeren und Oligomeren zu unterscheiden (Fuxe et al., 2008).

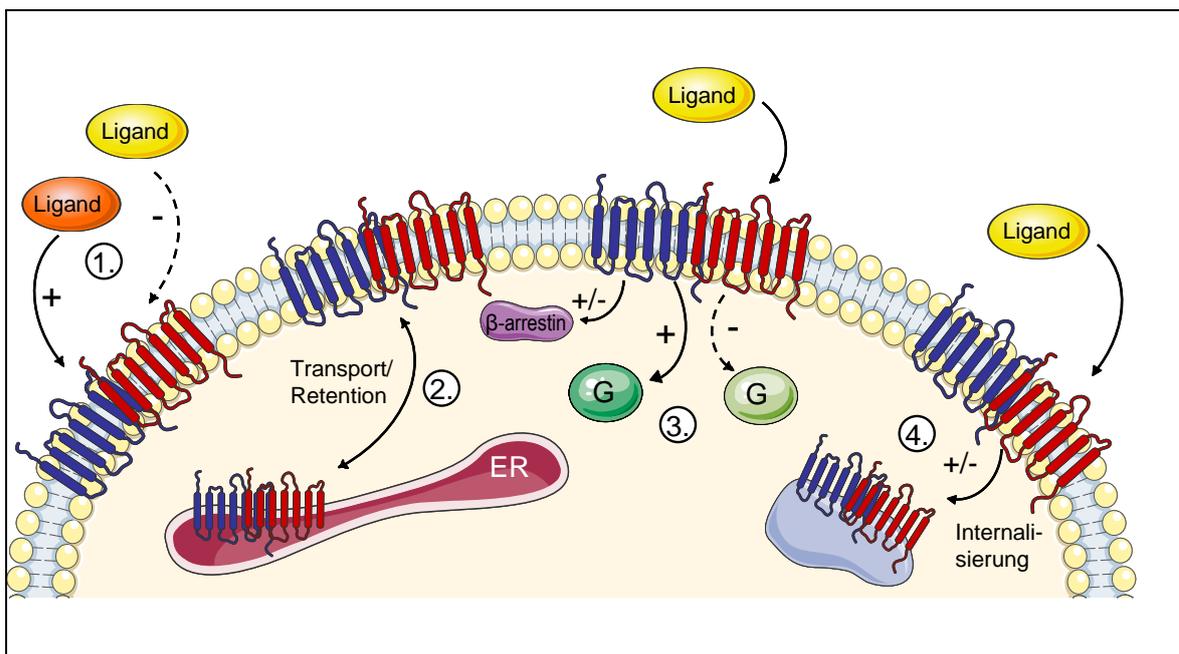


Abbildung 1-3 Bisher bekannte Rezeptorfunktionen, die durch Heterodimerbildung beeinflusst werden können. 1.) Dimerisierung führt bei manchen Rezeptoren zu einer veränderten Ligandenaffinität. 2.) Der Transport eines Rezeptors zur Plasmamembran bzw. die Retention eines Rezeptors im ER kann durch Heterodimerisierung beeinflusst werden. 3.) Heterodimerbildung kann durch geänderte Selektivität in der Aktivierung verschiedener G-Proteinvarianten oder veränderte Bindung von Arrestin zu Veränderungen in der Signaltransduktion führen. 4.) Die Internalisierungseigenschaften eines Rezeptors können sich durch Heterodimerisierung ändern.

1.5.1 Veränderte Ligandenaffinität durch Dimerisierung

Jordan und Devi gelang es 1999 erstmals nachzuweisen, dass die pharmakologischen Eigenschaften eines Opioidrezeptorsubtyps (κ_2 -Rezeptor), für den trotz intensiver Forschung von verschiedenen Arbeitsgruppen keine cDNA kloniert werden konnte, durch Heterodimerbildung erklärbar ist (Jordan und Devi, 1999). Sie zeigten, dass κ - δ -Heterodimere genau wie der κ_2 -Rezeptor weder für κ -selektive noch für δ -selektive Agonisten oder Antagonisten eine signifikante Affinität besaßen, für partiell selektive Liganden jedoch eine starke Affinität aufwiesen. Mit den genannten Erkenntnissen im Einklang wurde 2005 für das κ - δ -Heterodimer ein selektiver Agonist entdeckt (Waldhoer et al., 2005).

Eine veränderte Ligandenaffinität wurde für einige weitere Heterodimere (George et al., 2000; Xu et al., 2003; Levoye et al., 2006), darunter auch für ein Heterodimer aus dem humanen Somatoliberin-Rezeptor (GHRH-Rezeptor) und einer C-terminal-verkürzten Splicevariante des GHRH-Rezeptors (McElvaine und Mayo, 2006), beschrieben. Die Dimerisierung des GHRH-Rezeptors mit seiner Splicevariante führt zu einer verminderten Bindung von Somatoliberin an den GHRH-Rezeptor.

1.5.2 Veränderte Signaltransduktion durch Dimerisierung

Heterodimerbildung kann durch geänderte Selektivität in der Aktivierung verschiedener G-Proteinvarianten zu Veränderungen in der Signaltransduktion führen (George et al., 2000; Mellado et al., 2001; Charles et al., 2003; Hansen et al., 2004; McGraw et al., 2006; Rashid et al., 2007; González-Maeso et al., 2008). Wegen ihrer pharmakologischen und physiologischen Bedeutung soll exemplarisch auf das D_1 - D_2 -Dopaminrezeptor-Heterodimer sowie auf die vor kurzem gefundene Heterodimerbildung des HT_{2A} -Serotoninrezeptors mit dem metabotropen Glutamatrezeptor näher eingegangen werden.

Das Besondere am D_1 - D_2 -Dopaminrezeptor-Heterodimer ist, dass für dieses Heterodimer ein selektiver Agonist (SKF83959), der zudem einen alternativen Signaltransduktionsweg aktiviert, gefunden wurde. Während D_1 -Dopaminrezeptoren G_s - und D_2 -Dopaminrezeptoren $G_{i/o}$ -Proteine aktivieren, werden bei gleichzeitiger Aktivierung beider Rezeptoren des D_1 - D_2 -Dopaminrezeptor-Heterodimers $G_{q/11}$ -Proteine aktiviert. Der selektive Agonist SKF83959 führt am Heterodimer zur Aktivierung von G_q und Phospholipase C, gefolgt von einer intrazellulären Calciumfreisetzung, indem er als selektiver Agonist am D_1 -Dopaminrezeptor und als partiell selektiver Agonist am D_2 -Dopaminrezeptor wirkt.

Eine Aktivierung von D₁- oder D₂-Dopaminrezeptor-Homodimeren ist durch SKF83959 nicht möglich (Rashid et al., 2007).

Die physiologische Relevanz der Heterodimerbildung wird eindrucksvoll durch die Heterodimerbildung des HT_{2A}-Serotoninrezeptors mit dem metabotropen Glutamatrezeptor gezeigt. Die Heterodimerbildung ermöglicht es dem HT_{2A}-Serotoninrezeptor nach Bindung des Agonisten LSD neben G_{q/11}-Proteinen zusätzlich G_{i/o}-Proteine zu binden (González-Maeso et al., 2008). Die Aktivierung von G_{i/o}-Proteinen ist für die durch LSD hervorgerufenen halluzinogenen Effekte erforderlich, da Agonisten, die nicht zur Aktivierung von G_{i/o}-Proteinen führen, keine halluzinogene Wirkung haben (González-Maeso et al., 2007).

1.5.3 Veränderte Internalisierung und Veränderung G-Protein-unabhängiger Signalkaskaden durch Dimerisierung

Ein wichtiger Mechanismus um die Signalübertragung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zu beenden, besteht in der Phosphorylierung C-terminaler Domänen der Rezeptoren. Dies ermöglicht die Bindung von β -Arrestin an die aktivierten und phosphorylierten Rezeptoren und hat zur Folge, dass eine weitere Aktivierung von G-Proteinen verhindert wird (Reiter und Lefkowitz, 2006). Außerdem kann β -Arrestin die Internalisierung der Rezeptoren in *Clathrin-Coated-Vesikel* einleiten oder weitere G-Protein-unabhängige Signalkaskaden wie zum Beispiel die Phosphorylierung Mitogen-aktivierter Kinasen (Sun et al., 2007; De-Fea, 2008) aktivieren.

Für verschiedene Rezeptorheteromere (Jordan et al., 2001; Pfeiffer et al., 2002; Stanasila et al., 2003; Xu et al., 2003; Terrillon et al., 2004; So et al., 2005) konnte gezeigt werden, dass Stimulation des einen Rezeptors ausreichend ist, um die Kointernalisierung beider Rezeptoren des Heterodimers zu verursachen. Andererseits können Rezeptoren, die keiner Liganden-induzierten Endozytose unterliegen, in einem Heterodimer die Internalisierung ihres Partners, der normalerweise nach Ligandenbindung internalisiert wird, verhindern (Jordan und Devi, 1999; Breit et al., 2004).

Für den OX₁-Rezeptor ist beschrieben, dass dieser im OX₁-Rezeptor-CB1-Cannabinoidrezeptor-Heterodimer die Internalisierungseigenschaften des CB1-Cannabinoidrezeptors zeigt und spontan und ligandenunabhängig internalisiert wird, während seine Internalisierung bei alleiniger Expression durch Orexin A induziert wird (Ellis et al., 2006).

Darüber hinaus kann Heterodimerisierung eine verringerte (Lavoie et al., 2002) oder verstärkte Phosphorylierung (Rozenfeld und Devi, 2007) der Mitogen-aktivierten Kinasen ERK1/2 zur Folge haben, was durch eine veränderte Bindung von β -Arrestin an das Heterodimer erklärt wird.

1.5.4 Veränderter Rezeptortransport zur Zelloberfläche durch Dimerisierung

Die Dimerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren spielt während der Biosynthese und Reifung der Rezeptoren eine wichtige Rolle und kann darüber entscheiden, ob ein Rezeptor an die Zelloberfläche transportiert oder im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten und abgebaut wird (Bulenger et al., 2005).

In diesem Zusammenhang wurde der GABA_B-Rezeptor intensiv untersucht. Die Expression funktionsfähiger GABA_B-Rezeptoren auf der Zelloberfläche erfordert die Koexpression von GABA_{B1}- und GABA_{B2}-Rezeptoren. Allein exprimiert wird der GABA_{B1}-Rezeptor im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und nicht an die Zelloberfläche transportiert. Der GABA_{B2}-Rezeptor hingegen wird zur Plasmamembran transportiert, ist aber unfähig GABA zu binden und das Signal in die Zelle weiterzuleiten. Erst die Koexpression beider Rezeptorisoformenten ermöglicht ihre Heterodimerisierung, wodurch ein ER-Retentionssignal am C-terminalen Ende des GABA_{B1}-Rezeptor maskiert und die Voraussetzungen für den Transport des Heterodimers an die Zelloberfläche geschaffen werden (Angers et al., 2002). Auch der α_{1D} -adrenerge-Rezeptor wird erst durch Heterodimerisierung entweder mit dem α_{1B} -adrenergen-Rezeptor oder dem β_2 -adrenergen-Rezeptor zur Plasmamembran transportiert (Hague et al., 2004; Uberti et al., 2005).

Im Gegensatz dazu sind verschiedene C-terminal-verkürzte Splicevarianten wie die des V₂-Vasopressinrezeptors (Sarmiento et al., 2004), des H₃-Histaminrezeptors der Ratte (Bakker et al., 2006), des humanen H₄-Histaminrezeptors (van Rijn et al., 2008), des Calcitoninrezeptors (Seck et al., 2003) und einige weitere bekannt, die die Expression des Wildtyps an der Zelloberfläche verringern. Als Ursache dieses dominant-negativen Effekts der Splicevarianten auf den entsprechenden Rezeptorwildtyp wird angenommen, dass die Heterodimerbildung der beiden Rezeptorvarianten im endoplasmatischen Retikulum einen verminderten Transport des Wildtyps an die Zelloberfläche zur Folge hat.

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Für viele Gene, die für verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kodieren, konnte gezeigt werden, dass ihre Primärtranskripte alternativ gespleißt werden. Splicevarianten eines Gens können nahezu identische pharmakologische Eigenschaften zeigen, aber auch unterschiedliche funktionelle Eigenschaften aufweisen (Kilpatrick et al., 1999; Minneman, 2001; Markovic und Challiss, 2009) oder – wie zuvor beschrieben – durch Heterodimerisierung funktionell miteinander agieren (Sarmiento et al., 2004; Bakker et al., 2006; McElvaine und Mayo, 2006; van Rijn et al., 2008).

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression, zelluläre Lokalisierung und mögliche Funktion einer neuen Splicevariante des hOX₂-Rezeptors (hOX₂R-Splicevariante) näher zu charakterisieren.

Zunächst sollte die mRNA-Expression der hOX₂R-Splicevariante mittels PCR im menschlichen Gehirn und in peripheren Organen untersucht und Aussagen über das Verhältnis der beiden hOX₂-Rezeptorvarianten getroffen werden. Außerdem sollte als erster Schritt im Hinblick auf eine mögliche Heterodimerisierung des hOX₂R-Wildtyps und der hOX₂R-Splicevariante durch Markierung der hOX₂-Rezeptorvarianten mit Fluoreszenzproteinen ihre zelluläre Lokalisierung untersucht werden.

Die Funktion der hOX₂R-Splicevariante und eine mögliche Beeinflussung der Funktion des hOX₂R-Wildtyps durch die hOX₂R-Splicevariante sollten in verschiedenen Expressionssystemen (CHO-Zellen, NCI-H295R-Zellen und Oozyten von *Xenopus laevis*) charakterisiert werden. Dazu sollte zunächst untersucht werden, ob beide Rezeptorvarianten nach ihrer Aktivierung in den ausgewählten Expressionssystemen eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration hervorrufen, wie dies für den heterolog in CHO-Zellen exprimierten hOX₂R-Wildtyp bekannt ist (Smart et al., 1999). Die intrazelluläre Calciumkonzentration lässt sich in CHO- und NCI-H295R-Zellen mit Hilfe eines fluoreszierenden Calciumindikators direkt quantifizieren. In *Xenopus-laevis*-Oozyten ist eine Quantifizierung indirekt möglich, da durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ein Calcium-aktivierter Chloridstrom induziert wird, der sich mit der *Voltage-Clamp*-Methode messen lässt. Durch Vergleich der Calciumantworten sollten mögliche Unterschiede zwischen den beiden Rezeptorvarianten aufgedeckt und durch Koexpression des hOX₂R-Wildtyps und der hOX₂R-Splicevariante ein möglicher Effekt der hOX₂R-Splicevariante auf die Funktion des hOX₂R-Wildtyps untersucht werden.

2 Methoden

2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion kann sowohl DNA als auch RNA von Proteinen gereinigt werden. In einem Reaktionsgefäß (1,5 mL) wurde zu einem Volumen Nukleinsäure in wässriger Lösung dasselbe Volumen Phenol-Chloroform gegeben. Die beiden Phasen wurden gemischt und anschließend eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Nukleinsäuren blieben in der oberen, wässrigen Phase gelöst, während sich Proteine in der Interphase zwischen Phenol-Chloroform und wässriger Lösung ansammelten. Die obere Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Um sie von Phenolresten zu säubern, wurde der Vorgang mit Chloroform statt Phenol-Chloroform wiederholt.

2.1.2 DNA-Fällung

Die in der Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnene wässrige Phase wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung und 2,5 Volumen Ethanol (99,9 %) versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die präzipitierte DNA 30 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 mL Ethanol (70 %) gewaschen. Die alkoholhaltige Lösung wurde 15 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet zum Trocknen stehen gelassen. Anschließend wurde es in 20 µL DEPC-Wasser resuspendiert.

2.1.3 RNA-Fällung

Die in der Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnene wässrige Phase wurde 1:1 mit Isoopropanol versetzt, 30 min bei -20 °C inkubiert und anschließend 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet in 20 µL DEPC-Wasser resuspendiert.

2.1.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/mL}] = \text{OD}_{260} \times V \times 50 \mu\text{g/mL}$$

OD_{260} = Absorption bei 260 nm, V = Verdünnungsfaktor

Um eine Verunreinigung der DNA-Probe mit Proteinen abzuschätzen, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Der Quotient A_{260} und A_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

2.1.5 Messung der RNA-Konzentration

Die Quantifizierung der RNA erfolgte mit dem „Quant-IT RiboGreen RNA Assay Kit“ (Invitrogen) in einem Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerät (FLUOstar OPTIMA). Es wurde die Fluoreszenz des an RNA bindenden Farbstoffes RiboGreen gemessen, die RNA-Konzentration wurde durch den Vergleich mit einer Verdünnungsreihe aus RNA-Standards (16S und 23S rRNA aus *E. coli*) ermittelt.

2.2 Subklonierung

Um Wildtyp und Splicevariante des hOX₂-Rezeptors in CHO- und NCI-H295R-Zellen exprimieren zu können, wurde ihre cDNA in verschiedene Expressionsvektoren (7.1.11) subkloniert. Für die *in-vitro*-Transkription (2.8.3) wurde der offene Leserahmen der beiden Rezeptorvarianten in den Vektor pSGEM subkloniert, der als Startpunkt für die T7-RNA-Polymerase über einen T7-Promotor verfügt.

Die rekombinante Plasmid-DNA wurde in *E. coli* vervielfältigt und anschließend isoliert (2.2.9). Die einzelnen Teilschritte der Subklonierung werden im Folgenden näher beschrieben.

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Als Matrize für die Amplifizierung des offenen Leserahmens des hOX₂R-Wildtyps und der hOX₂R-Splicevariante dienten die am Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck vorliegenden Plasmide hOX₂R-WT-

pCR4-TOPO und hOX₂R-SV-pCR4-TOPO. Um neue Restriktionsschnittstellen einzufügen, wurde die PCR mit Primern, die an ihren 5'-Enden die gewünschten Restriktionsschnittstellen enthielten, durchgeführt. Durch die Verwendung entsprechend konstruierter Primersequenzen wurde im selben Schritt zusätzlich das Stoppcodon der Rezeptorsequenzen mutiert, um C-terminal im richtigen Leserahmen mit den Rezeptorsequenzen ein Fluoreszenzprotein zu fusionieren (Tab. 2-1).

Tabelle 2-1 Primer für die Klonierung. Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer Express von Applied Biosystems basierend auf den veröffentlichten (www.ncbi.nlm.nih.gov) bzw. im Labor klonierten cDNA-Sequenzen entworfen und von Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Die Sequenz der Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen, das für die Mutation des Stoppcodons veränderte Basentriplett grau unterlegt. Die rechte Spalte zeigt die Vektoren, in die die amplifizierten Fragmente subkloniert wurden.

Primer	Primersequenz 5' → 3'	Vektor
hOX ₂ XbaI F	CTAGTCTAGATTGAGCCCGTGATGTCCGG	
hOX ₂ -WT HindIII R	ACGAAGCTTCTACCAGTTTTGAAGTGGTCCTGC	pSGEM
hOX ₂ -SV HindIII R	ACGAAGCTTCTAAAAAAAAAAGCACAGACAAAATATTGG	
hOX ₂ Hind III F	CTCAAGCTTTGATGTCCGGCACCAAATTGG	pCR [®] 4-
hOX ₂ -WT BamHI R	GTGGATCCTCCAGTTTTGAAGTGGTCCTGCTC	TOPO [®]
hOX ₂ -SV BamHI R	GTGGATCCTCAAAAAAAAAAAGCACAGACAAAATATTTG	

Die PCR erfolgte unter Verwendung der „Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity“ (Invitrogen) und den beigefügten dNTPs und Puffern. Ein 50 µL PCR-Ansatz enthielt:

- 0,2 µL Taq-DNA-Polymerase (5 U/µL)
- 50 ng Plasmid-DNA
- 0,5 µL dNTP-Mix (10 mM)
- 2 µL MgSO₄ (50 mM)
- 2 µL 1x High Fidelity PCR-Puffer
- ad 50 µL DEPC-Wasser

Um die Taq-DNA-Polymerase zu aktivieren, wurde der PCR-Ansatz im Thermocycler (Biometra) zunächst 2 min auf 94 °C erhitzt. Danach wurde der folgende Zyklus elffach wiederholt: Denaturierung über 30 s bei 94 °C, Anlagerung (*Annealing*) über 30 s bei 52 °C, Elongation über 2 min bei 68 °C. Zum Abschluss erfolgte eine siebenminütige finale Elongation bei 68 °C.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten zur Charakterisierung von PCR- oder Restriktionsprodukten sowie zu präparativen Zwecken erfolgte mittels Elektrophorese auf Agarosegelen. Je nach Länge der zu erwartenden Fragmente wurden 1-2 %ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst, nach kurzem Auskühlen mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,02 µg/mL) versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde nach ca. 30 min in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer überführt. Die im Verhältnis 6:1 mit Ladepuffer versetzten Proben wurden in die Auftragstaschen des Gels pipettiert, als DNA-Längenstandard wurden die Marker X oder XIV (Roche) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte über 45-60 min bei einer Spannung von 10 V je cm Gel. Unter UV-Licht konnten die Banden sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera (Phase) aufgenommen werden.

2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren wurde das „UltraClean™ 15 DNA Purification Kit“ (Mo Bio Laboratories) verwendet. Die gewünschten DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten, die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Kit beruht auf der von Vogelstein und Gillespie 1979 beschriebenen Methode, dass DNA nach Schmelzen der Agarose in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen reversibel an Partikel einer Anionenaustauschersilikat-Suspension bindet (Vogelstein und Gillespie, 1979). Nach Zentrifugation und Waschen mit einem ethanolhaltigen Puffer konnten die DNA-Fragmente in DEPC-Wasser eluiert werden, die Suspension wurde durch Zentrifugation entfernt.

2.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Ein Restriktionsverdau wurde im Rahmen einer Subklonierung, zur Überprüfung der Identität neu generierter Plasmide und zur Linearisierung der Plasmid-DNA vor der *in-vitro*-Transkription durchgeführt.

Je Restriktionsansatz wurden 1-1,5 µg Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkt mit geeigneten Restriktionsenzymen (Endkonzentration 1 U je µg eingesetzter DNA) und dazugehörigen Puffern in einem Volumen von 20-50 µL bei 37 °C 1-2 h im Thermocycler inkubiert. Die meisten Restriktionsenzyme wurden durch anschließende Inkubation bei 65-80 °C über

20 min inaktiviert. Um die Aktivität der Restriktionsenzyme zu erhöhen, wurde 1 μL Restriktionsansatz gegebenenfalls 0,1 μg bovines Serumalbumin (BSA) zugesetzt.

Erfolgte ein Doppelverdau mit Enzymen, die unterschiedliche Puffermilieus benötigten, so wurde die DNA zunächst mit einem Enzym verdaut. Anschließend wurden die Pufferbedingungen geändert und das zweite Enzym hinzugegeben.

Nach der Restriktion wurden die erzeugten Fragmente mittels Gelelektrophorese (2.2.2) aufgetrennt und analysiert. Wurde eine Subklonierung durchgeführt, so wurden Plasmid- und *Insert*-DNA, die miteinander ligiert werden sollten, aus dem Gel ausgeschnitten und gemeinsam aufgereinigt (2.2.3).

2.2.5 Auffüllen von 5'-Überhängen

Von den verwendeten Restriktionsenzymen erzeugen *EcoRI*, *XbaI*, *HindIII*, *BamHI* und *NheI* überhängende Enden, während *EcoRV* glatte Enden erzeugt.

Sollte ein *Insert* mit überhängenden Enden in einen mit *EcoRV* verdauten Vektor kloniert werden, wurde das *Insert* vor der Ligation mit dem „Blunt-IT™ Repair Kit“ (USB) behandelt. Dieses Kit enthält das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, das 5'-Überhänge mit dNTPs auffüllt. Im Anschluss an die Restriktion wurden zu einem 50 μL Restriktionsansatz 2,5 μL *Blunt-IT* Klenow-Enzym und 2,5 μL dNTP-Mix (2 mM) gegeben. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 1 μL Stopplösung beendet.

2.2.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels alkalischer Phosphatase

Um nach einfacher Restriktion die Selbstligation eines Vektors oder nach Doppelverdau eines Vektors mit zwei verschiedenen Enzymen die Ligation der Vektoren untereinander zu vermeiden, wurde die Phosphatgruppe an den 5'-Enden der DNA mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (SAP, USB) oder Kälberdarm (CIP, NEB) entfernt.

Zu 20 μL Restriktionsansatz wurden 2 μL 10x SAP-Reaktionspuffer und 1 μL SAP (1 U/ μL) gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C im Thermocycler inkubiert und das Enzym anschließend durch 15-minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert.

Bei der Verwendung von CIP wurde pro μg DNA 1 U CIP eingesetzt, der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert und CIP anschließend durch Phenol-Chloroform-Aufreinigung (2.1.1) entfernt.

2.2.6 Ligation

Für die Ligation wurde folgender Ansatz über Nacht bei 16 °C inkubiert:

8-12 µL	aus dem Gel aufgereinigtes Eluat
2 µL	T4-Puffer
1 µL	T4-Ligase
ad 20 µL	DEPC-Wasser

Das *Insert* lag im Vergleich zum Plasmid in ca. 1,5-fachen molaren Überschuss vor.

Im Anschluss an die Ligation erfolgte vor der Transformation in manchen Fällen eine Aufreinigung der Ligationsprodukte mittels Phenol-Chloroformextraktion (2.1.1).

2.2.7 Ligation mit dem „TOPO TA Cloning® Kit“

Da Restriktionsenzyme an den Enden von PCR-Produkten häufig nicht erfolgreich schneiden (Kaufman und Evans, 1990), bietet die direkte Ligation der PCR-Produkte in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor (Invitrogen) eine Alternative zur Subklonierung mit Restriktionsenzymen und T4-Ligase. Der linearisierte pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor besitzt an seinen 3'-Enden jeweils einen Desoxythymidin-Überhang, an denen die Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Mit der *Taq*-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte verfügen an ihren 3'-Enden über freie Desoxyadenosin-Überhänge. Unter Freisetzung der Topoisomerase I und der daraus gewonnenen Energie werden Vektor und PCR-Produkt zirkulär verknüpft (Shuman 1994).

Der Ligationsansatz bestand aus 4 µL PCR-Produkt, 1 µL *Salt Solution* und 1 µL pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor und wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die für die PCR verwendete „Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity“ enthält neben der *Taq*-Polymerase eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion (3'-5'-Exonuklease-Aktivität), die die von der *Taq*-Polymerase angehängten 3'-Desoxyadenosin-Überhänge entfernt. PCR-Produkte wurden deshalb vor der Ligation in den Vektor pCR[®]4-TOPO[®] mittels Gelaufreinigung von Enzymrückständen befreit und anschließend 3'-Desoxyadenosin-Überhänge angefügt. Ein Reaktionsansatz bestand aus:

12 µL	aus dem Gel aufgereinigtes Eluat
1,25 µL	HiFi-Puffer
0,25 µL	dNTP-Mix

0,5 μL MgSO_4
0,2 μL Dynazyme™ II DNA-Polymerase

und wurde 30 min bei 72 °C inkubiert.

2.2.8 Transformation von *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation in elektrokompente *E. coli*-Zellen (One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli*, Invitrogen) transformiert. Die Bakterien wurden einem elektrischen Feld hoher Stärke ausgesetzt, wodurch sich transiente Poren in ihrer äußeren Membran bildeten, über die die gewünschte Plasmid-DNA aufgenommen werden konnte (Calvin und Hanawalt, 1988; Dower et al., 1988).

Auf Eis wurde zu 50 μL elektrokompenten Zellen (One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli*, Invitrogen) 1,5-3 μL Ligationsprodukt gegeben und die Zellsuspension in gekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation wurde bei 1,8 kV/25 μF und 200 Ω im Gene Pulser™ II (BIO-Rad) durchgeführt. Nach erfolgter Elektroporation wurden sofort 250 μL auf 37 °C vorgewärmtes S.O.C.-Medium in die Küvette gegeben und die Zellsuspension bei 200 rpm und 37 °C 1 h im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf einer vorgewärmten Selektiv-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Platten wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Als Vorbereitung auf die Plasmid-Isolierung wurden am Vortag mit einem sterilen Zahnstocher Einzelkolonien von einer Agarplatte entnommen und damit 3 bzw. 50 mL Nährmedium, das ein Antibiotikum zur Selektion enthielt, angeimpft. Das Medium wurde über Nacht 16 h im Schüttelinkubator (GFL) bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Vor der Isolierung von Plasmid-DNA aus 3 mL Kulturen wurden Glycerol-Stocks hergestellt. Dazu wurden 200 μL Glycerol und 200 μL der über Nacht inkubierten Bakteriensuspension in Plastikröhrchen mit Schraubverschluss (Cryo S, Greiner Bio-one) gegeben, gemischt und bei -80 °C eingefroren. Aus den Glycerol-Stocks konnten bei Bedarf Einzelkolonien der gewünschten Klone für die Plasmid-Isolierung in großem Maßstab gewonnen werden.

Isolierung aus 3-mL-Kulturen

Um nach erfolgreicher Transformation die gesuchten Klone identifizieren zu können, wurde eine Plasmid-DNA-Präparation in kleinem Maßstab mit Hilfe des Kits „Nucleo Spin® Plasmid QuickPure“ (Macherey-Nagel) durchgeführt.

Die am Tag zuvor angeimpfte Bakterienkultur wurde 10 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 250 µL RNase-haltigem A1-Puffer aufgenommen und sukzessive 250 µL A2-Puffer und 300 µL A3-Puffer hinzugegeben. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 11000 g wurde der Überstand auf eine Silikatsäule aufgetragen, diese zentrifugiert und mit 450 µL ethanolhaltigem AQ-Puffer gewaschen. Die DNA wurde in 50 µL DEPC-Wasser eluiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

Im Anschluss an die Isolierung wurde ein Restriktionsverdau (2.2.4) durchgeführt, die Restriktionsprodukte auf ein Agarosegel aufgetragen und die gesuchten Klone identifiziert. Durch Sequenzierung (Seqlab, Göttingen) wurde die Identität der Plasmid-DNA ausgewählter Klone bestätigt.

Isolierung aus 50-mL-Kulturen

Sollten für die transiente Transfektion größere Mengen Plasmid-DNA gewonnen werden, wurde eine Plasmid-DNA-Präparation in großem Maßstab durchgeführt. Zur Plasmid-Isolierung wurde das „Plasmid DNA Purification NucleoBond® PC 500 Kit“ (Macherey-Nagel) mit dem Protokoll für *high-copy*-Plasmide verwendet. Die Konzentrierung und Entsalzung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte direkt im Anschluss mit Hilfe des „Plasmid DNA Purification NucleoBond® Finalizer Plus Kit“ (Macherey-Nagel).

Die am Tag zuvor angeimpfte Bakterienkultur wurde 20 min bei 4500 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 12 mL RNase-A-haltigem S1-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 12 mL S2-Puffer und dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 12 mL gekühltem S3-Puffer und eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Die Suspension wurde filtriert, das Filtrat auf eine mit 6 mL N2-Puffer equilibrierte Säule gegeben, die Säule mit 32 mL N3-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 15 mL N5-Puffer eluiert. Das Eluat wurde mit 10,5 mL Isopropanol gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die in Isopropanol präzipitierte DNA wurde an die Silikatmembran eines Filters, durch den sie mit Hilfe einer Spritze hindurchgepresst wurde, gebunden, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 600 µL TE-

Puffer eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (2.1.4) und die Integrität der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2) kontrolliert.

2.3 RNA-Gewinnung und quantitative real-time-PCR

2.3.1 RNA-Isolation aus NCI-H295R-Zellen

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus NCI-H295R-Zellen wurden diese wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben in einer 24-Well-Platte ausgesät. Am fünften Tag nach der Aussaat wurde das Medium abgesaugt und je Well 500 μL Lysepuffer auf die Zellen pipettiert. Das Zelllysat wurde auf ein Säulensystem aufgetragen und die RNA mit Hilfe des „ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation“ nach dem Protokoll „Isolation of Total RNA from Cultured Cells“ von Applied Biosystems über verschiedene Wasch- und Eluationsschritte isoliert. Die RNA-Konzentration wurde bestimmt (2.1.5) und die RNA bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.3.2 Reverse Transkription

Mittels Reverser Transkription wurde aus mRNA Erststrang-cDNA gewonnen. Zur cDNA-Synthese wurde die aus NCI-H295R-Zellen isolierte Gesamt-RNA sowie menschliche Gesamt-RNA aus Gehirn, Nebenniere und Lunge (Applied Biosystems) eingesetzt. Die RNA aus Lunge und Gehirn stammte von einem männlichen Spender, während die RNA aus der Nebenniere von einer weiblichen Person stammte.

Die Erststrang-cDNA wurde mittels Reverser Transkriptase aus dem *avian myoblastosis virus* in Gegenwart eines Oligo(dT)₂₀-Primers synthetisiert (Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit, Invitrogen).

Je Probe bestand ein Ansatz aus:

- 9 μL Gesamt-RNA
- 1 μL Oligo(dT)₂₀-Primer (50 μM)
- 2 μL dNTP-Mix (10 mM)

und wurde zum Aufschmelzen von Sekundärstrukturen der RNA 5 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Thermocycler T Gradient (Biometra) inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis gekühlt und jeder Ansatz mit:

- 4 µL cDNA-Synthesepuffer
- 1 µL DTT (0,1 M)
- 1 µL RNaseOUT (40 U/µL)
- 1 µL DEPC-Wasser
- 1 µL Cloned AMV RT (15 U/µL)

versetzt. Die Proben wurden 1 h bei 50 °C inkubiert und zum Schluss zur Inaktivierung der RNA-Polymerase 5 min auf 85 °C erhitzt. Die gewonnene Erststrang-cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.3 Quantitative real-time-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde mit dem „ABI Prism 7000 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems) unter Verwendung exonspezifischer Sense- und Antisense-Primer für den hOX₂R-Wildtyp und die hOX₂R-Splicevariante (Tab. 2-2) durchgeführt.

Tabelle 2-2 Primer für die quantitative *real-time*-PCR. Die Primer wurden mit Hilfe des Programms „Primer Express“ von Applied Biosystems basierend auf den veröffentlichten (www.ncbi.nlm.nih.gov) bzw. im Labor klonierten cDNA-Sequenzen entworfen und von Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

Primer	Orien- tierung	Primersequenz 5'→ 3'	PCR-Pro- dukt (bp)	GenBank Nummer
hOX ₂ -SV	Sense 51 F	ATGGCACCACCTGTGTCTCATG	109	
	Antisense 159 R	TGTGTGGAGGAATAATGCACG		
hOX ₂ -WT	Sense 1220 F	CGACAGATCCCTGGAACATCA	128	AFO41246
	Antisense 1347 R	TGCTTTATTTTCAGCCGCCAC		

Die Detektion der DNA erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I, der in doppelsträngige DNA (dsDNA) interkaliert und nur in diesem Zustand nach Anregung bei 497 nm Licht der Wellenlänge 520 nm emittiert (Morrison et al., 1998).

Zur Quantifizierung der mRNA-Mengen wurde die Zyklus-Schwellenwert-Methode (*cycle threshold method*) herangezogen (Higuchi et al., 1993). Dabei wird nach jedem PCR-

Zyklus die Fluoreszenzintensität gemessen, die von Zyklus zu Zyklus proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produktes zunimmt. In der exponentiellen Phase der PCR wird ein Fluoreszenz-Schwellenwert festgelegt, der sich gerade von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Die Zyklusanzahl, die nötig ist, um dieses Fluoreszenzniveau zu erreichen, wird als C_T -Wert bezeichnet.

Um von einem C_T -Wert einer Probe auf die ursprünglich eingesetzte Erststrang-cDNA-Menge schließen zu können, wurde durch Verdünnung einer bekannten Menge cDNA (10^8 Kopien) mit TE-Puffer für jedes Primerpaar eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 im Bereich von 10^7 - 10^3 Kopien erstellt und gemeinsam mit den Proben amplifiziert. Mit Hilfe der Software (ABI Prism 7000 Sequence Detection System) wurden die C_T -Werte der Standards gegen den Logarithmus der anfangs eingesetzten cDNA-Kopienzahl aufgetragen, eine Standardkurve erstellt und die ursprünglich eingesetzte Erststrang-cDNA-Kopienzahl der Proben sowie die Effizienz der PCR ermittelt.

Zur Amplifizierung der DNA-Fragmente wurde das „Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG with ROX Kit“ (Invitrogen) verwendet. Die Durchführung der PCR erfolgte in Dreifachbestimmung und unter Mitführung von Negativkontrollen, die statt cDNA DEPC-Wasser enthielten. Ein 25 μ L Ansatz setzte sich zusammen aus:

2 μ L	cDNA bzw. H ₂ O
0,75 μ L	Sense-Primer (10 pmol/ μ L)
0,75 μ L	Antisense-Primer (10 pmol/ μ L)
12,5 μ L	SuperMix
9 μ L	DEPC-Wasser

Nach zweiminütiger Inkubation bei 50 °C und genauso langer Aktivierung der Platinum® *Taq*-Polymerase bei 95 °C wurde der folgende Zyklus 40-fach wiederholt: Denaturierung über 15 s bei 95 °C, *Annealing* und *Elongation* über 1 min bei 60 °C.

Zum Abschluss der quantitativen *real-time*-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Ririe et al., 1997). Dazu wurden die PCR-Produkte über den Schmelzpunkt hinaus graduell erhitzt und die emittierte Fluoreszenz gemessen.

Zur Auswertung wurde das arithmetische Mittel aus der Dreifachbestimmung gebildet. Für jedes untersuchte Organ sowie die NCI-H295R-Zellen wurde die ermittelte mRNA-Kopienzahl der hOX₂R-Splicevariante zur mRNA-Kopienzahl des hOX₂R-Wildtyps ins Verhältnis gesetzt, wodurch eine Normalisierung auf einen endogenen Standard nicht notwendig war.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Verwendete Zelllinien

NCI-H295R-Zellen

Die Zelllinie NCI-H295R wurde freundlicherweise von Frau Dr. rer. nat. M. Ehrhart-Bornstein (Medizinische Klinik und Poliklinik III des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie NCI-H295 wurde 1980 aus einem Nebennierenrindenzarzinom einer 48-jährigen Frau generiert (Gazdar et al., 1990). Sie exprimiert Enzyme aus jeder der drei Zonen der menschlichen Nebenniere und produziert in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen alle drei Klassen von Steroiden (Mineralkortikoide, Glukokortikoide, C19-Steroide) (Rainey et al., 2004). Die Zellen des Substammes NCI-H295R wachsen im Gegensatz zum Elternstamm NCI-H295 als adhärenter Monolayer und ihre Verdoppelungszeit ist mit 2 statt 5 Tagen deutlich kürzer (Rainey et al., 2004). In NCI-H295R-Zellen wurde ungefähr 200-fach mehr OX₂R-mRNA als OX₁R-mRNA nachgewiesen (Wenzel et al., 2009).

Chinesische Hamsterovarialzellen (CHO-Zellen)

Die CHO-Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. med. E. Metzgen (Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt.

CHO-Zellen wurden 1958 aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters etabliert. Sie wachsen in adhärennten Monolayern und besitzen eine Populationsverdoppelungszeit von 24 h. Ihre Verwendung für die Expression und Charakterisierung von Orexinrezeptoren ist in der Literatur vielfach beschrieben (Sakurai et al., 1998; Smart et al., 1999; Lund et al., 2000; Johansson et al., 2008).

2.4.2 Kultivierung und Subkultivierung von CHO- und NCI-H295R-Zellen

CHO- und NCI-H295R-Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus Instruments) bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm² Kulturflaschen kultiviert. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer „Laminar Flow Werkbank“ (BHA48, Faster). Glaswaren wurden bei 140 °C 4 h im Heißluftschrank (Heraeus Instruments) sterilisiert.

Subkultivierung von CHO-Zellen

Die CHO-Zellen wurden alle 3-4 Tage subkultiviert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 10 mL PBS gespült. Anschließend wurde 1 mL Trypsin (0,5 mg/mL) auf die Zellen gegeben, die Zellen 1 min bei 37 °C inkubiert, das Trypsin abgesaugt und die Zellen nochmals 1 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch leichtes Beklopfen der Flasche vom Boden abgelöst, in ca. 8 mL CHO-Komplettmedium resuspendiert und 0,5 bzw. 1 mL der Zellsuspension in jeweils eine neue Kulturflasche gegeben, in der 13 mL CHO-Komplettmedium vorgelegt waren.

Subkultivierung von NCI-H295R-Zellen

Die NCI-H295R-Zellen wurden einmal wöchentlich subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit jeweils 10 mL PBS gespült und anschließend mit 5 mL Accutase 5 min bei 37 °C inkubiert. Die durch leichtes Beklopfen der Flasche abgelösten Zellen wurden in einem Falconröhrchen 6 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand über dem Zellpellet abgesaugt und die Zellen zur Vereinzelnung 5 min bei 37 °C mit 1 mL Accumax behandelt. Dann wurden die Zellen in ca. 8 mL NCI-H295R-Komplettmedium mit Antibiotika resuspendiert und 0,5 bzw. 1 mL der Zellsuspension in jeweils eine neue Kulturflasche gegeben, in der 13 mL NCI-H295R-Komplettmedium vorgelegt waren. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

2.4.3 Aussaat von CHO- und NCI-H295R-Zellen

CHO- und NCI-H295R-Zellen wurden für die Transfektion, RNA-Gewinnung, Analyse unter dem Konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop und für Calciummessungen in 96- oder 24-Well-Platten und 8-Well-Objektträgern ausgesät. Die Zellen wurden wie in den beiden Abschnitten zuvor beschrieben abgelöst, jedoch in NCI-H295R- bzw. CHO-Komplettmedium ohne Antibiotika resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit dem entsprechenden Medium ohne Antibiotika verdünnt, bis die in Tabelle 2-3 angegebene Zellzahl pro mL Zellsuspension erreicht wurde. Die Zellzahl der Zellsuspension wurde in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (Tiefe 0,2 mm, Fläche eines Kleinquadrats: 0,0625 mm²) nach folgender Gleichung bestimmt:

Zellen/mL= gezählte Zellen/(ausgezählte Fläche [mm²] x Kammertiefe [mm]) x 1000

Anschließend wurde die Zellsuspension in einem Volumen wie in Tabelle 2-3 angegeben in die *Wells* der gewünschten Platte pipettiert. In Abhängigkeit vom jeweiligen Experiment wurden die ausgesäten Zellen 1-5 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, ein Mediumwechsel wurde alle 2 Tage ausgeführt.

Tabelle 2-3 Für die Aussaat von NCI-H295R- und CHO-Zellen verwendete Kulturplatten sowie Zellzahl und Volumen der eingesetzten Zellsuspension.

Zelllinie	Platte	Zellzahl/mL Zellsuspension	Zellsuspension [μ L] je Well
NCI-H295R	24-Well	$3,0 \times 10^5$	500
	96-Well	$2,5 \times 10^5$	100
CHO	8-Well	$2,8 \times 10^5$	200
	96-Well	$3,0 \times 10^5$	100

2.5 Transiente Transfektion

Die Transfektion von CHO- und NCI-H295R-Zellen erfolgte mit dem Verfahren der Lipofektion. Es wurden kationische Lipide (Lipofectamin 2000, Invitrogen) eingesetzt, die in wässrigem Milieu Liposomen bilden. Die DNA komplexiert damit zu Lipoplexen und kann von den Zellen mittels Endozytose aufgenommen werden (Felgner et al., 1987).

Vor der Transfektion wurden die CHO-Zellen 24 h, die NCI-H295R-Zellen 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Eine sequentielle Transfektion wurde im Abstand von 24 h durchgeführt. Die für die Transfektion eingesetzte DNA-Menge wurde durch die Verwendung leerer Plasmide oder Plasmide, die die hOX₂R-Splicevariante in umgekehrter Orientierung enthielten, in jedem Versuch konstant gehalten.

Die für die Transfektion in Abhängigkeit von der verwendeten Zellkulturplatte/-flasche eingesetzten Volumina an Transfektionsreagenzien können Tabelle 2-4 entnommen werden. Lipofectamin wurde mit Opti-MEM[®] gemischt und bei Raumtemperatur mindestens 5 min inkubiert. Währenddessen wurde die DNA mit Opti-MEM[®] verdünnt. Anschließend wurden Lipofectaminkomplex und DNA im Verhältnis 1:1 gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und durch das jeweilige Komplettmedium (7.1.10.2) ohne Antibiotika ersetzt. Der Lipofectamin-DNA-Komplex wurde auf die Zellen

gegeben und die Zellen 4-6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung abgesaugt und bei den NCI-H295R-Zellen durch NCI-H295R-Medium mit hoher Glucosekonzentration und bei den CHO-Zellen durch CHO-Komplettmedium ersetzt.

Tabelle 2-4 Transfektionsbedingungen für verschiedene Zellkulturplatten. Lipofectamin und DNA wurden jeweils mit Opti-MEM[®] verdünnt, so dass beide Verdünnungen das gleiche Volumen aufwiesen. Auf die Zellen in den Zellkulturplatten wurde Lipofectamin-DNA-Komplex und Kulturmedium im Verhältnis 1:1 gegeben, für die Transfektion in einer Zellkulturflasche war das Verhältnis zugunsten des Kulturmediums verschoben. Alle Angaben beziehen sich auf die Transfektion eines *Wells* bzw. einer Flasche.

Zellkultur- platte/-flasche	Lipofectamin und Opti-MEM [®]	DNA in Opti-MEM [®]	Transfektions- volumen	Kultur- medium
96-Well-Platte	0,5 µL + 24,5 µL	0,2-0,9 µg in 25 µL	2 x 25 µL	50 µL
8-Well-Platte	1 µL + 49 µL	0,1-0,4 µg in 25 µL	2 x 50 µL	100 µL
25-cm ² -Flasche	25 µL + 625 µL	2 µg in 650 µL	2 x 650 µL	4,7 mL

2.6 Intrazelluläre Calcium-Messungen mit Fluo-4-AM

Die Messung intrazellulärer Calciumkonzentrationen in NCI-H295R- und CHO-Zellen erfolgte mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4-Acetomethylester (Fluo-4-AM) in einem Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerät (Anregung bei 485 nm und Emission bei 520 nm) 24 h nach der Transfektion. Nach Anregung mit einer Wellenlänge von 494 nm emittiert Fluo-4 ausschließlich in calciumgebundenem Zustand Licht bei einer Wellenlänge von 516 nm (Gee et al., 2000). Die emittierte Fluoreszenz steigt mit Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration.

Aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften kann Fluo-4 die Zellmembran nicht durchdringen. Deswegen wird seine mit Acetomethyl (AM) veresterte, membrangängige Form verwendet. Intrazellulär wird die AM-Gruppe durch Esterasen abgespalten, so dass Fluo-4 die Zelle nicht mehr verlassen kann (Tsien, 1981). Die Zugabe von Probenicid sollte zusätzlich den Auswärtstransport von Fluo-4 über Anionenkanäle hemmen (Di Virgilio et al., 1990).

Das Fluo-4-Farbstoffgemisch (Fluo-4 NW Calcium Assay Kit, Invitrogen) wurde nach Angaben des Herstellers am Tag des Versuchs frisch angesetzt. Die Zellen in der 96-Well-Zellkulturplatte wurden mit 100 µL Farbstofflösung je *Well* lichtgeschützt 1 h bei 37 °C

und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Farbstofflösung von den Zellen abgesaugt und 250 μL HBSS mit Probenicid (Endkonzentration 2,5 mM) je *Well* auf die Zellen gegeben. Ein möglichst hohes Volumen HBSS im *Well* war wichtig, um die durch die automatische Injektion von Orexin A verursachten Strömungen am Boden des *Wells* möglichst gering zu halten.

Die Fluoreszenz wurde bei Raumtemperatur über 3 min einmal pro Sekunde gemessen, nach 20 Sekunden erfolgte die Injektion von 50 μL Orexin A, so dass die Endkonzentration im jeweiligen *Well* 10 nM bzw. 1 μM betrug. Um Unterschiede in der Hintergrundfluoreszenz in den verschiedenen *Wells* auszugleichen, wurde für die Auswertung von jedem Messwert die Ausgangsfluoreszenz vor Orexin-A-Gabe abgezogen.

2.7 Konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie

Die konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, fluoreszierende Fusionsproteine in lebenden Zellen zu betrachten. Die Zellen werden mit einem fokussierten Laserstrahl rasterförmig abgetastet und das emittierte Licht einer einzigen Ebene gesammelt, während das nicht aus der Fokusebene stammende Emissionslicht ausgeblendet wird.

Für die Experimente wurde ein konfokales Laserfluoreszenzmikroskop (TCS SP5, Leica, Wetzlar) mit einem Wasserimmersionsobjektiv (HCX PL APO CS 63x, numerische Apertur 1.2, Leica) verwendet. Der Scan erfolgte mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln und einer Scangeschwindigkeit von 400 Hz. Zur Verringerung des Rauschens wurde für jedes Pixel der Mittelwert aus 4 Scans gebildet. Die Blende (*Pinhole*) wurde bei allen verwendeten Wellenlängen automatisch so eingestellt, dass ihre Größe einer Airy-Einheit entsprach.

Um bei der Verwendung verschiedener Fluorophore ein Signalübersprechen (*cross talk*) zu vermeiden, wurden die Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Argon- bzw. Helium-Neon-Laser sequentiell angeregt und detektiert (Tab. 2-5).

Tabelle 2-5 Absorptions- und Emissionsmaxima der eingesetzten Fluoreszenzproteine. Angegeben sind die eingesetzten Fluoreszenzproteine, die ihnen in den Bildern zugewiesenen Farben sowie ihre Absorptions- und Emissionsmaxima. Die beiden rechten Spalten zeigen die Wellenlängen der verwendeten Argon-(Ar) und Helium-Neon-(HeNe) Laserlinien und die zur Detektion verwendeten Emissionsspektren.

Protein	Farbe	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Laserlinie [nm]	Emissionsspektrum [nm]
EYFP	Gelb	513	527	514 (Ar)	523-571
DsRed-Monomer	Rot	557	585	543 (HeNe)	581-650
DsRed2	Rot	558	583	543 (HeNe)	581-650

2.8 Elektrophysiologische Messungen an Oozyten von *Xenopus laevis*

2.8.1 Haltung und Fütterung der Frösche

Es wurden Oozyten des in Südafrika beheimateten Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) verwendet. Die Frösche (Lab-Bred *Xenopus laevis* 9+ cm, pigmentiert) wurden von Nasco, USA bezogen. Sie wurden in Gruppen von 4-5 Fröschen in 80 x 50 x 30 cm großen Glasaquarien bei einer Wassertemperatur von 16 °C und einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Frösche wurden zweimal wöchentlich mit Teichfischfutter (TetraPondSticks, Tetra GmbH, Melle) gefüttert, das Aquariumwasser einmal wöchentlich durch abgestandenes Leitungswasser ausgetauscht.

Die Tierversuche wurden beim Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft, Schleswig Holstein beantragt und genehmigt. Die universitätsinterne Tierversuchsnummer ist: 9/A52/05.

2.8.2 Das Oozytenexpressionssystem

Die Verwendung von aus *Xenopus laevis* gewonnenen Oozyten als heterologes Expressionssystem wurde erstmalig 1971 von Gurdon et al. beschrieben, die zeigten, dass *Xenopus*-Oozyten Hämoglobin synthetisieren konnten, wenn ihnen die entsprechende mRNA injiziert wurde (Gurdon et al., 1971). Darüber hinaus werden Rezeptorproteine nach mRNA-

Injektion nicht nur synthetisiert, sondern auch funktionell exprimiert (Barnard et al., 1982; Miledi et al., 1982). Eine Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die an G_q-Proteine koppeln und über eine Aktivierung der Phospholipase C β eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bedingen, führt in *Xenopus-laevis*-Oozyten zur Öffnung endogen exprimierter Calcium-aktivierter Chloridkanäle. Der Chloridstrom über die Plasmamembran lässt sich mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme messen (Hansen und Bräuner-Osborne, 2009). Oberhalb des Chlorid-Umkehrpotentials wird der Einstrom von Chloridionen durch diese Kanäle, deren molekulare Identität vor kurzem identifiziert werden konnte (Caputo et al., 2008; Schroeder et al., 2008; Yang et al., 2008), durch 2 mM Anthrazen-9-Carbonsäure blockiert (Boton et al., 1989; Saitou et al., 2000).

Die einzelnen Schritte von der RNA-Synthese über die Oozytenpräparation und RNA-Injektion bis zu den elektrophysiologischen Messungen werden im Folgenden näher beschrieben.

2.8.3 RNA-Synthese durch in-vitro-Transkription

Durch *in-vitro*-Transkription kann mit Hilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus doppelsträngiger DNA eine dazu komplementäre cRNA-Sequenz synthetisiert werden (Krieg und Melton, 1984).

Vor der Transkription wurden die Plasmide hOX₂R-SV-pSGEM bzw. hOX₂R-WT-pSGEM mit *NheI* an der dafür vorgesehenen Linearisierungsschnittstelle geschnitten (2.2.4), um heterogene RNA-Transkripte durch mehrmaliges Umlaufen der RNA-Polymerase zu verhindern. Der Erfolg der Linearisierung wurde anhand eines Agarose-Kontrollgels (2.2.3) überprüft. Der Restriktionsansatz wurde im Anschluss an die Linearisierung durch Phenol-Chloroform-Extraktion (2.1.1) gereinigt, die Plasmid-DNA gefällt (2.1.2) und ihre Konzentration photometrisch bestimmt (2.1.4).

Für die *in-vitro*-Transkription wurde das „mMessage mMachine T7 Kit“ (Ambion) verwendet, folgender Ansatz wurde bei 37 °C 2 h im Thermocycler (Biometra) inkubiert:

10 μ L	2x NTP/CAP
2 μ L	10x Puffer
1 μ g	linearisierte Plasmid-DNA
2 μ L	Enzymmix (enthält die RNA-Polymerase des T7-Phagen)
ad 20 μ L	DEPC-Wasser

Durch Zugabe der DNase I und 15-minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Hydrolyse der cDNA gestoppt.

Das Kit enthält neben den eigentlichen Ribonukleotiden ein 7-Methylguanosin-Cap-Analogon [$m^7G(5')ppp(5')G$] in vierfachem Überschuss, das aufgrund seiner Struktur jedoch nur in das 5'-Ende des mRNA-Transkripts eingebaut wird und eine höhere Stabilität der injizierten cRNA sowie eine größere Translationseffizienz bewirkt (Drummond et al., 1985).

Die cRNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (2.1.1) gereinigt, mit Isopropanol gefällt (2.1.3) und in 20 μ L DEPC-Wasser resuspendiert. Die cRNA-Konzentration wurde gemessen (2.1.5) und die cRNA bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.8.4 Isolierung und Selektion der Oozyten

Der Frosch wurde zur Betäubung für ca. 20 min in ein Plastikgefäß gelegt, das mit 1 L Tricaine-Lösung gefüllt war und von außen mit Eis gekühlt wurde.

Während der Oozytenentnahme wurde das Tier auf eine mit Eis gefüllte Schale gelegt und die Extremitäten mit Eis bedeckt. Mit einer spitzen Pinzette wurde die Haut ca. 2 cm kranial der Leiste von der darunter liegenden Muskelschicht abgehoben und mit einer Schere eröffnet, so dass ein ca. 1 cm großer Hautschnitt entstand. Die Muskelschicht wurde auf dieselbe Weise durchtrennt, wobei darauf geachtet wurde, dass Haut- und Muskelschnitt möglichst auf gleicher Höhe lagen, um das spätere Zunähen zu erleichtern.

Die nun sichtbaren Oozytensäckchen wurden mit einer Pinzette gefasst, vorsichtig mit kreisenden Bewegungen herausgezogen und mit einer Schere abgeschnitten. Sie wurden in eine mit Barth-Medium ohne Calcium (Tab. 7-4) gefüllte Petrischale gelegt.

Die Muskelschicht und Muskelfaszie sowie die Hautschicht wurden nacheinander mit jeweils 2-3 Einzelknopfnähten mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Der Frosch wurde mit kaltem Leitungswasser abgespült und in ein mit Leitungswasser gefülltes Aufwachbecken gesetzt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Nasenlöcher des Frosches während der Aufwachphase aus dem Wasser herauschauten.

Die Oozytensäckchen wurden in kleinere Oozytenpakete à 5-15 Oozyten geschnitten und in einen Erlenmeyerkolben, der 10 mL Kollagenase-Lösung enthielt, gegeben.

Nach zweistündiger Inkubation in einem $17,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperierten Schüttelwasserbad wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob sich die Oozyten leicht aus den Oozytensäckchen befreien ließen. War dies der Fall, so wurde der Kollagenaseverdau durch mehrmaliges Spü-

len mit Barth-Medium mit Calcium (Tab. 7-3) gestoppt und die Oozyten bei 17,4 °C im Inkubator aufbewahrt.

Da die Follikelmembran der Oozyten durch die Kollagenase-Lösung meist nicht vollständig entfernt wurde, wurden Follikelmembranreste mit zwei feinen Pinzetten unter dem Stereomikroskop (Stereomikroskop SV 6 und Kaltlichtquelle KL 1500 LCD, Zeiss) entfernt und Oozyten, die zur Injektion verwendet werden sollten, selektiert. Es wurden nur Oozyten der Entwicklungsstadien V und VI verwendet (Dumont, 1972), bei denen die Pigmentierung des animalen und vegetativen Pols klar voneinander abgegrenzt war und deren Membran intakt erschien.

2.8.5 Herstellung der Injektionspipetten

Für die RNA-Injektion wurden spezielle Injektionspipetten benötigt, die mit Hilfe eines Elektrodenziehgerätes (PIP 5, Heka) hergestellt wurden. Die Spitze einer Borosilikatpipette wurde unter dem Mikroskop an einem Draht abgebrochen (MicroForge MF-900, Narishige), so dass ihr Außendurchmesser 10-20 µm betrug. Anschließend wurde der Draht erhitzt, die Pipettenspitze durch kurzes Antippen des Drahtes geglättet und in Form einer Injektionskanüle zugespitzt.

2.8.6 RNA-Injektion

Die Injektion der RNA erfolgte bis zu 24 h nach Oozytenentnahme mit Hilfe eines Injektors (Nanoject II, Drummond Scientific Company) oder manuell. Für die Injektion mit Injektor wurde die Injektionspipette luftblasenfrei mit Mineralöl gefüllt, auf den Injektor aufgesetzt und die RNA aus einer Kapillare in die Injektionspipette gesaugt. Die Einstellung des Injektors war so gewählt, dass 50,6 nL (46 nL/s) RNA je Oocyte injiziert wurden. Für die manuelle Injektion wurde die Injektionspipette auf einen Silikonschlauch gesteckt, der an eine 10-mL-Spritze gekoppelt war. Das Ansaugen der RNA und die Injektion wurden durch vorsichtiges Bewegen des Spritzkolbens gesteuert.

Zur Injektion wurden jeweils 5-7 Oozyten in eine Injektionskammer aus Plexiglas gelegt und die RNA unter dem Mikroskop (Stemi 2000-C, Zeiss und Kaltlichtquelle Typ KL 1500, Schott) injiziert. Die cRNA des hOX₂R-WT wurde sowohl bei alleiniger als auch bei Koinjektion mit der cRNA der hOX₂R-SV in 1:5-, 1:10- und 1:20-facher Verdünnung, die cRNA der hOX₂R-SV in unverdünnter Konzentration injiziert.

Die injizierten Oozyten wurden bei 17,4 °C in Barth-Medium mit Calcium in Petrischalen bis zur elektrophysiologischen Messung, die am 1. und 2. Tag nach der Injektion stattfand, aufbewahrt.

2.8.7 Aufbau des Messplatzes

Der Messplatz befand sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch und war zur Abschirmung gegen elektrische Störungen von außen von einem Faradaykäfig umgeben. Metallische Teile waren zusätzlich geerdet. Auf dem schwingungsgedämpften Tisch befand sich ein inverses Mikroskop, in dessen Objektstisch eine Halterung für die Oozytenmesskammer eingebaut war. Hinter dem Mikroskop standen zwei Säulen, an denen jeweils ein schwenkbarer Arm befestigt war. An ihren Enden waren die beiden Mikromanipulatoren mit den Vorverstärkern und Pipettenhaltern angebracht.

Der Flüssigkeitsspiegel in der Messkammer konnte über ein Drucksensor-System mit angeschlossener Pumpe (Lorenz Messgerätebau) konstant gehalten werden.

Für die Datenspeicherung und die Erstellung von Spannungsprotokollen wurde die Software Pulse/PulseFit (HEKA, Lamprecht) verwendet. Die elektrische Stimulation und Registrierung der Ströme erfolgte mit Hilfe eines ITC-16 AD/DA-Wandlers (integriert im EPC9-Patch-Clamp-Messgerät, HEKA). Alle Datenpunkte wurden mit einem Tiefpassfilter 1,3 kHz gefiltert und mit einer Samplingrate von 500 Hz in einem Power Mac G4 aufgenommen.

2.8.8 Herstellung der Messpipetten

Die Messpipetten wurden mit Hilfe des Elektrodenziehgerätes (PIP 5, Heka) aus Borosilikatglaskapillaren mit Filament hergestellt. Um die Kapazität der Messelektroden zu verringern, wurden sie von der Schulter bis ungefähr 200 µm distal der Spitze mit RTV-Silikon-Kautschuk (RTV 615, GE Bayer Silicone) überzogen, der mit Heißluft gehärtet wurde (Stühmer und Parekh, 1995).

Anschließend wurden die Pipetten mit 3 M KCl befüllt und der Rand am Ende der Messpipetten mit einer dünnen Schicht Wachs überzogen. In der Elektrolytlösung der Messpipetten befanden sich chlorierte Silberdrähte, die den elektrischen Kontakt zum Rückkopplungsverstärker herstellten. Durch Abbrechen der Messpipetten auf dem Boden der Messkammer wurde ihr Widerstand zwischen 0,5 und 1,6 MΩ eingestellt.

2.8.9 Prinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (*Voltage-Clamp*) ermöglicht es, das Membranpotential auf einem gewünschten Wert festzuklemmen, um so Ströme, die durch Ionenkanäle in der Membran fließen, messen zu können.

In die Oozyte werden zwei Elektroden eingestochen. Die Potentialelektrode erfasst zusammen mit der in die Badlösung eintauchenden Elektrode (Badeelektrode) das Membranpotential. Sie ist mit einem Rückkopplungsverstärker verbunden, der die gemessene Spannung mit der von einem Generator vorgegebenen Spannung vergleicht und die Spannungsunterschiede verstärkt. Unterscheiden sich die beiden Spannungswerte voneinander, so wird der für die Aufrechterhaltung des gewünschten Potentials erforderliche Strom mittels der zweiten intrazellulären Elektrode (Stromelektrode) appliziert. Die Höhe des applizierten Stromes wird gemessen und entspricht dem Betrag nach der gesuchten Größe, dem über die Membran fließenden Strom (Hille, 1992; Wagner et al., 2000).

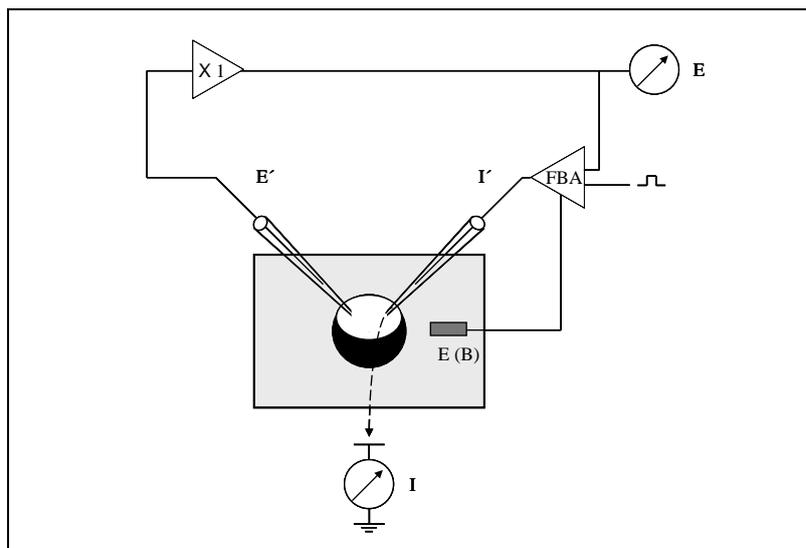


Abbildung 2-1 Prinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme: mit Hilfe der intrazellulären Spannungselektrode (E') wird das Membranpotential erfasst und mit dem vorgegebenen Kommandopotential verglichen. Über die Stromelektrode wird der Strom, der notwendig ist, um das gewünschte Membranpotential aufrecht zu erhalten, appliziert. FBA Rückkopplungsverstärker, $E(B)$ Badeelektrode, $X1$ Folgeverstärker (nach Wagner et al., 2000)

2.8.10 Elektrophysiologische Messungen

Als Vorbereitung auf die *Voltage-Clamp*-Messungen wurden die Oozyten von ihrer Vitellinmembran befreit. Sie wurden 8-12 min in eine hypertone Häutungslösung gelegt, bis die Vitellinmembran unter dem Stereomikroskop als feines Häutchen sichtbar wurde

und mit zwei Pinzetten vorsichtig entfernt werden konnte. Anschließend wurden die Oozyten mit Standard-Ringerlösung (NFR, Tab. 7-6) gespült und in die Messkammer, die mit ca. 1,3 mL NFR gefüllt war, überführt. Jeglicher Kontakt der Oozyten mit Luft musste strikt gemieden werden, da die gehäuteten Oozyten nur noch von einer Lipiddoppelmembran umgeben waren und ohne den hydrostatischen Druck von außen sofort zerfielen.

Bevor die Elektroden in die Oozyte eingestochen wurden, wurden sie in die Badlösung getaucht. Eventuell auftretende Offsetpotentiale, d. h. Spannungen, die nicht von der Oozyte selbst oder dem vorgegebenen Haltepotential herrühren, sondern an den Übergängen innerhalb der Messkette Silberdraht-Pipettenlösung-Badlösung-Erdung entstehen (Numberger und Draguhn, 1996), wurden korrigiert und der Widerstand der Messpipetten kontrolliert. Nach dem Einstechen der Elektroden wurden die Oozyten auf ein Membranpotential von -20 mV geklemmt und einige Minuten gewartet, um der Membran Zeit zu geben, das durch den Einstich erzeugte Loch wieder abzudichten.

Zur Messung von Strom-Spannungsbeziehungen wurden die in Abbildung 2-2 dargestellten, als Rampe und inverse Rampe bezeichneten, Spannungsprotokolle (Parekh et al., 1993b) durchgeführt.

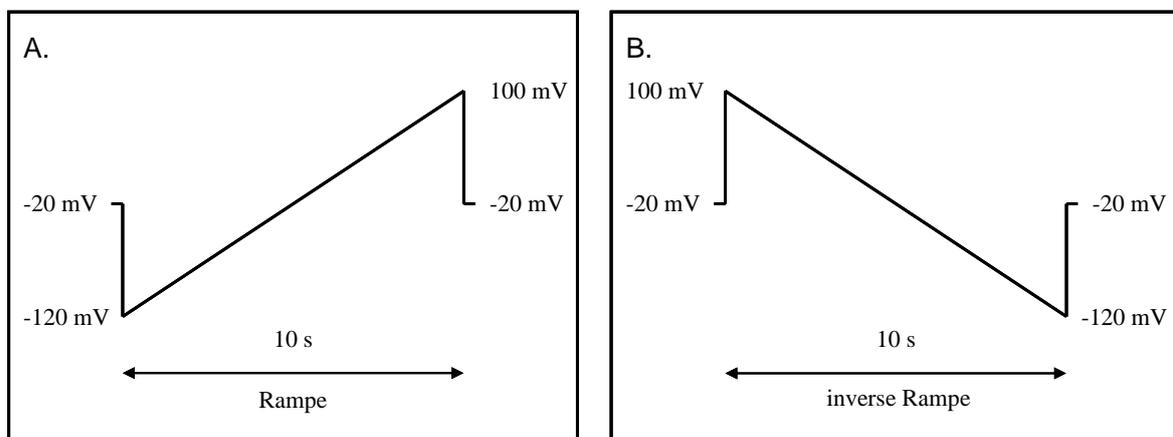


Abbildung 2-2 A. Rampe: die Membran der Oozyte wurde innerhalb 1 ms vom Haltepotential (-20 mV) auf -120 mV hyperpolarisiert, dann im Verlauf von 10 s kontinuierlich auf +100 mV depolarisiert und schließlich innerhalb 1 ms das Haltepotential wieder eingestellt. **B. inverse Rampe:** ausgehend vom Haltepotential wurde die Membran innerhalb 1ms auf +100 mV depolarisiert, während 10 s kontinuierlich auf -120 mV hyperpolarisiert und innerhalb 1 ms wieder zum Haltepotential zurückgeführt.

Die zeitliche Reihenfolge von Orexin-A-Applikation und der daran anschließenden Messungen von Rampe und inverser Rampe an einer Oozyte kann Abbildung 2-3 entnommen

werden. NFR bzw. Orexin-A-Lösung wurden in der angegebenen Konzentration in einem Volumen von 2 mL seitlich in die Badlösung pipettiert. Die NFR-Gabe zu Beginn jeder Messung diente einerseits der Festlegung eines Basiswertes, hervorgerufen durch unspezifisch geöffnete Kanäle der Oozytenmembran, und andererseits der Beurteilung des Leckstroms. Oozyten, die nach der zweiten NFR-Gabe einen Leckstrom größer als $1,5 \mu\text{A}$ aufwiesen, wurden verworfen.

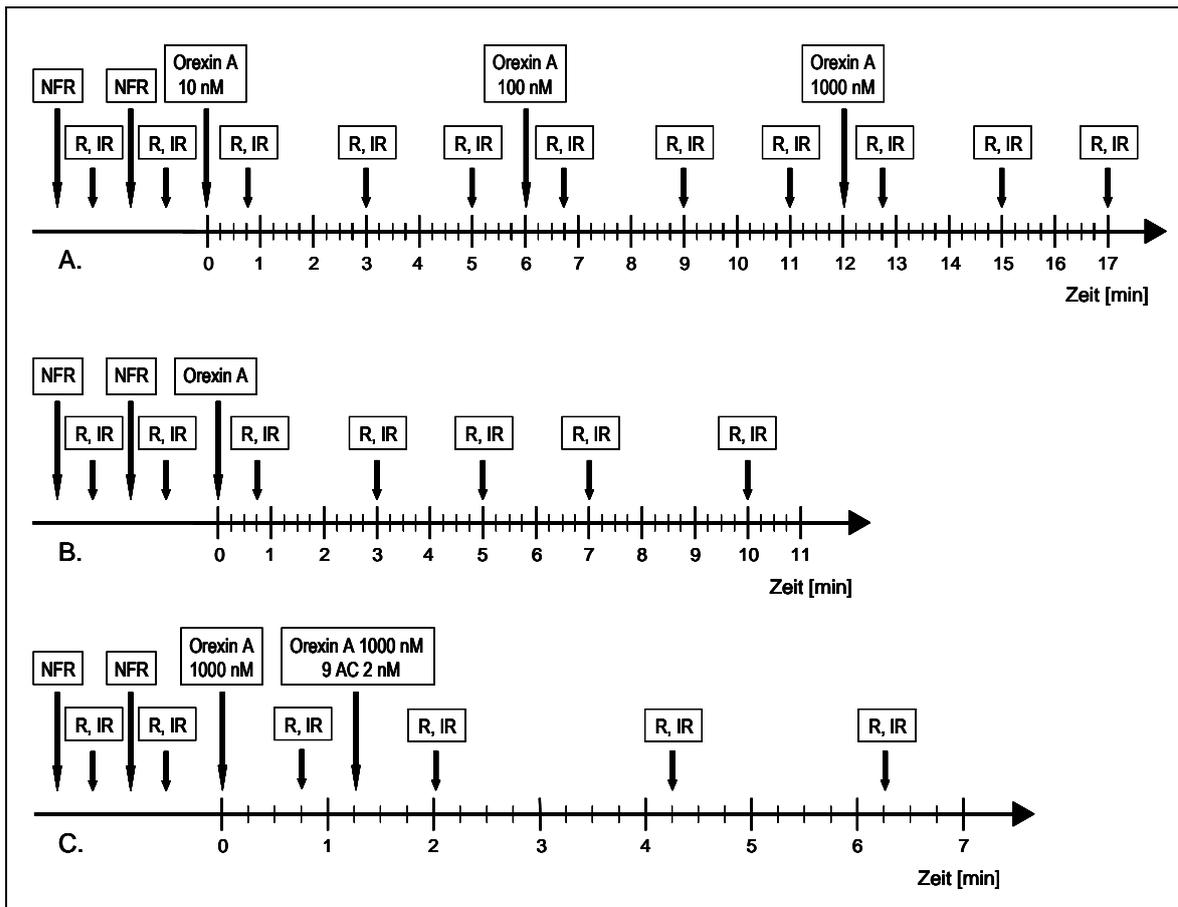


Abbildung 2-3 Zeitlicher Ablauf eines Versuchs an einer Oozyte:

- A) Es wurden Orexin-A-Lösungen in ansteigender Konzentration verwendet. Die Messung wurde vor Gabe der nächst höheren Orexingabe beendet, wenn eine Reaktion der Oozyte auf Orexin A zu beobachten war.
- B) Es wurde nur eine Orexin-A-Konzentration verwendet (100 nM oder 1000 nM)
- C) Es wurde Orexin A zusammen mit Anthrazen-9-Carbonsäure (9-AC), die Chloridkanäle blockiert, gegeben. R Rampe, IR inverse Rampe

Zur Auswertung wurde der bei einer Klemmspannung von 80 mV gemessene Strom (Mittelwert des Zeitraumes 9500-9510 ms) herangezogen. Die Höhe des gemessenen Stromes nach Applikation von Orexin A wurde zur Höhe des Stromes vor Orexingabe ins Verhält-

nis gesetzt, um vergleichbare, d.h. von der Höhe endogener Ströme unabhängige Werte zu erhalten.

2.8.11 Ionenselektivität

Um unterscheiden zu können, ob die beobachteten Ströme hauptsächlich durch Kaliumionen oder durch Chloridionen getragen wurden, wurden die Messungen zusätzlich mit Kalium-Ringerlösung (KFR, Tab. 7-7), in der die Natriumionen durch Kaliumionen ersetzt waren, als Badlösung durchgeführt. Die Osmolarität war in beiden Lösungen gleich. Der Ablauf eines Versuchs entsprach Abbildung 2-3 B, allerdings wurde KFR statt NFR auf die Oozyten pipettiert und zur Herstellung der Orexin-A-Lösung wurde ebenfalls KFR verwendet. Würde der Strom hauptsächlich von Kaliumionen getragen, so verschöbe sich das Umkehrpotential bei 20 °C gemäß der nachfolgend beschriebenen Nernst-Gleichung zu deutlich positiveren Werten:

$$E_x = (R \times T/F) \times \ln ([K_{ex}]/K_{in}) \quad \Rightarrow \quad E_x = 58 \times \log ([K_{ex}]/K_{in})$$

E_x = **Umkehrpotential**, R = allgemeine Gaskonstante, T = absolute Temperatur, hier 20 °C, F = Faradaykonstante, $[K_{ex}]$ = Kaliumkonzentration der extrazellulären Lösung, $[K_{in}]$ = Kaliumkonzentration der intrazellulären Lösung

Bei einer 50-fach höheren Kaliumkonzentration wäre das Umkehrpotential um etwa 100 mV höher. Handelte es sich hauptsächlich um einen Chloridstrom, so bliebe das Umkehrpotential von einem Austausch von Natrium durch Kalium weitgehend unbeeinflusst.

2.9 Statistische Analyse

Zur Auswertung der intrazellulären Calciummessungen in CHO- und NCI-H295R-Zellen wurde für jede Einzelmessung die Fläche unter der Kurve (AUC) der relativen Fluoreszenz berechnet. Die Flächen unter der Kurve der verschiedenen Transfektionsbedingungen wurden mittels einfaktorieller ANOVA (*Analysis of Variance*) miteinander verglichen und mit dem Dunnett-Test gegen die *mock*-transfizierte (NCI-H295R-Zellen) bzw. nur mit dem hOX₂R-WT transfizierte Kontrollgruppe (CHO-Zellen) auf Signifikanz der beobachteten Unterschiede getestet.

Zur statistischen Analyse der elektrophysiologischen Messungen an *Xenopus*-Oozyten wurde ein nichtparametrisches Testverfahren genutzt, da im Komogorov-Smirnov-Test das

Kriterium der Normalverteilung nicht erfüllt wurde. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test als Post-Test angewendet.

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism (Version 5.0 für Windows, Graph Pad Software, USA).

In den Abbildungen sind die Daten als Mittelwerte \pm SEM bzw. als Mittelwert \pm SD angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert unter 0,05 angenommen. In den Abbildungen steht * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der mRNA des hOX₂R-Wildtyps und der hOX₂R-Splicevariante in humanen Organen sowie in NCI-H295R-Zellen

Die mRNA-Expression des hOX₂R-Wildtyps und der hOX₂R-Splicevariante wurde in humanem Gehirn, Lunge und Nebenniere sowie in NCI-H295R-Zellen mittels quantitativer *real-time*-PCR untersucht.

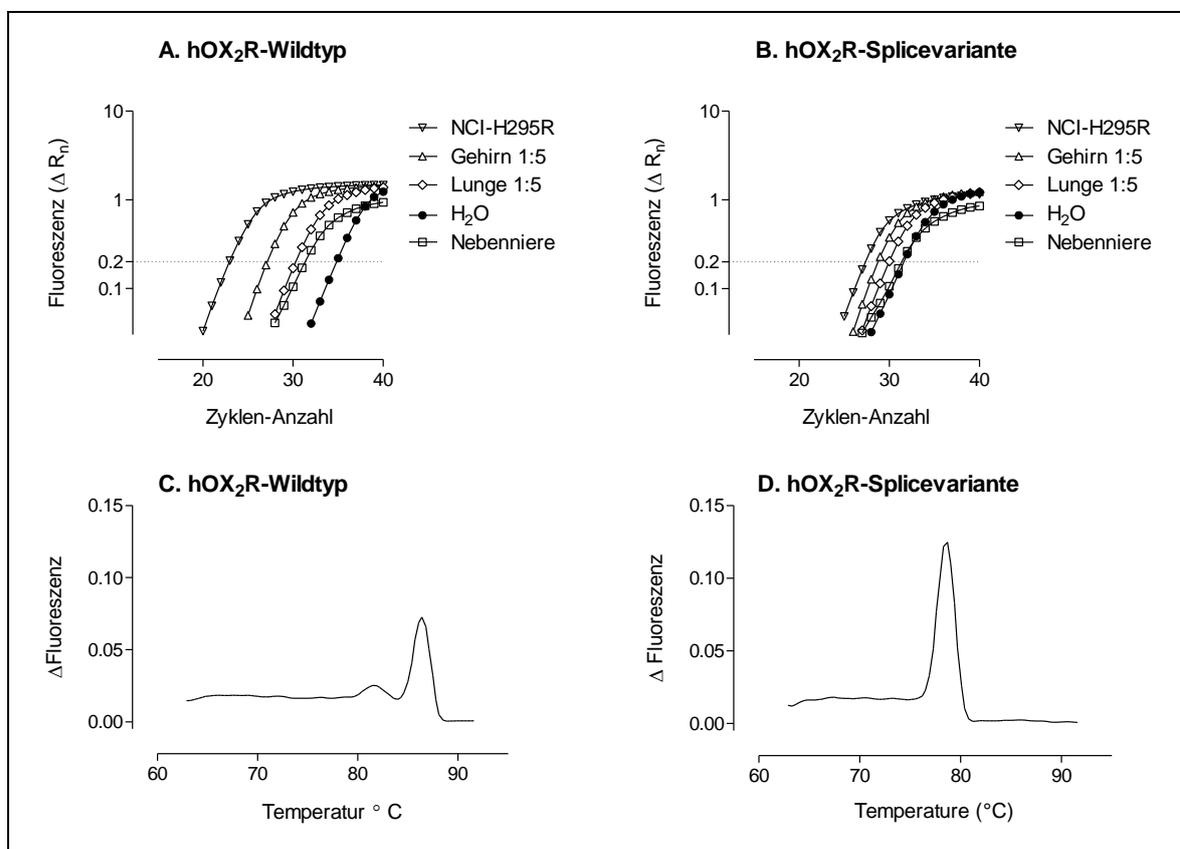


Abbildung 3-1 (A+B) Amplifikationsgraphen für die cDNA des hOX₂R-Wildtyps und der hOX₂R-Splicevariante in humanem Gehirn, Lunge, Nebenniere sowie in NCI-H295R-Zellen. Die cDNA von Gehirn und Lunge wurde als 1:5-Verdünnung in die quantitative *real-time*-PCR eingesetzt. Als Kontrolle war Wasser (H₂O) zugegeben. Der der Quantifikation zugrunde liegende Fluoreszenz-Schwellenwert (ΔR_n) = 0,2 liegt bei allen Graphen im exponentiellen Bereich der PCR-Reaktion. **(C+D)** Die Schmelzkurve für die DNA des hOX₂R-Wildtyps weist eine Spitze bei 78,7 °C auf, die der hOX₂R-Splicevariante eine bei 86,4 °C.

Der Fluoreszenz-Schwellenwert (ΔR_n) wurde in den mitgeführten Negativkontrollen bei über 31 (Primerpaar für die hOX₂R-Splicevariante) bzw. bei über 34 Zyklen (Primerpaar

für den hOX₂R-Wildtyp) erreicht (Abb. 3-1). Deswegen wurden mRNA-Kopienzahlen, deren korrespondierende C_T-Werte größer oder gleich der genannten Zyklenzahl waren, als nicht signifikant betrachtet. In humanem Gehirn, Lunge und NCI-H295R-Zellen konnte sowohl mRNA des hOX₂R-Wildtyps als auch mRNA der hOX₂R-Splicevariante nachgewiesen werden. In der Nebenniere konnte mRNA des hOX₂R-Wildtyps, jedoch keine mRNA der hOX₂R-Splicevariante nachgewiesen werden, da der Fluoreszenz-Schwellenwert im Falle der hOX₂R-Splicevariante erst nach mehr als 31 Zyklen erreicht und somit nicht signifikant war. Die absoluten mRNA-Kopienzahlen der hOX₂R-Splicevariante und des hOX₂R-Wildtyps wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt (Abb. 3-2). Im Gehirn fand sich 0,4-, in der Lunge 1,3- und in NCI-H295R-Zellen 0,08-fach soviel mRNA der hOX₂R-Splicevariante wie mRNA des hOX₂R-Wildtyps.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde mittels Schmelzkurvenanalyse verifiziert. Das Vorhandensein eines scharf begrenzten Gipfels bei einer für das jeweilige Fragment charakteristischen Temperatur ließ darauf schließen, dass nur ein spezifisches PCR-Produkt entstanden war (Abb. 3-1).

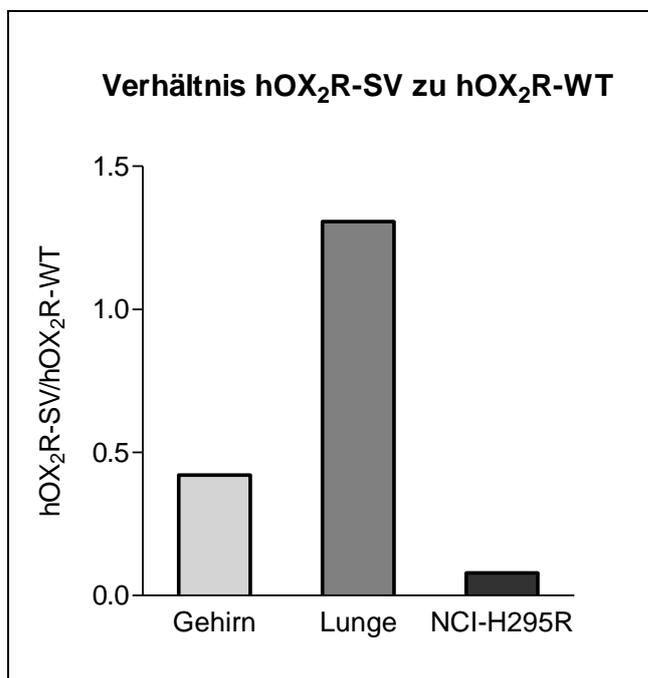


Abbildung 3-2 Verhältnis der mRNA-Kopienzahl der hOX₂R-Splicevariante (hOX₂R-SV) zur mRNA-Kopienzahl des hOX₂R-Wildtyps (hOX₂R-WT) in Gehirn, Lunge und NCI-H295R-Zellen.

3.2 Subklonierung des hOX₂R-Wildtyps und der hOX₂R-Splicevariante in verschiedene Vektoren

Die offenen Leserahmen des hOX₂R-Wildtyps sowie der hOX₂R-Splicevariante wurden mittels PCR mit sequenzspezifischen Primern (Tab. 2-1) amplifiziert und dabei für die gerichtete Klonierung die Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Hind*III eingeführt. Die Subklonierung der PCR-Produkte in den Vektor pSGEM erfolgte unter Verwendung der neu generierten Restriktionsschnittstellen (Abb. 7-1).

Die *Inserts* der neu erzeugten Klone hOX₂R-SV-pSGEM und hOX₂R-WT-pSGEM wurden für die Subklonierung in den Vektor pTracerTM-CMV/Bsd mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hind*III herausgeschnitten. Ihre Enden wurden mittels 5'-Auffüllreaktion geglättet, wodurch sie in den mit *Eco*RV linearisierten Vektor pTracerTM-CMV/Bsd eingefügt werden konnten. Von beiden hOX₂-Rezeptorvarianten wurden Klone in richtiger (*sense*) und umgekehrter (*antisense*) Orientierung erzeugt (Abb. 7-2).

Die im Anschluss an die Subklonierung mit geeigneten Restriktionsenzymen durchgeführte Restriktion zeigte für die ausgewählten rekombinanten Plasmide die erwarteten Fragmentlängen (Abb. 3-3).

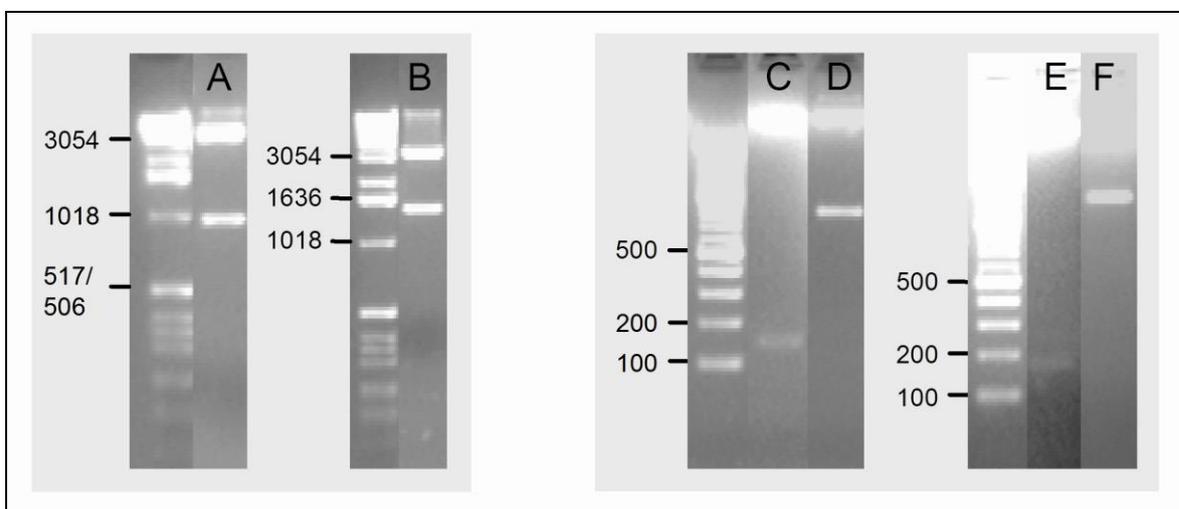


Abbildung 3-3 Restriktion neu generierter Plasmide im Anschluss an die Subklonierung. Je Spur wurden 20 μ L Restriktionsprodukt auf das Agarosegel aufgetragen.

Die Spuren A und B zeigen den Restriktionsverdau des Vektors pSGEM, der als *Insert* die cDNA-Sequenz der hOX₂R-Splicevariante (Abb. 3-3 A, erwartete Größen 875 bp und

3076 bp) bzw. des hOX₂R-Wildtyps (Abb. 3-3 B, erwartete Größen 1352 bp und 3076 bp) enthielt. Als Restriktionsenzyme wurden *Xba*I und *Hind*III verwendet.

Die Spuren C-F zeigen den Restriktionsverdau des Vektors pTracerTM-CMV/Bsd mit *Eco*RI. Spur C zeigt das Restriktionsprodukt eines Klons, der die cDNA-Sequenz der hOX₂R-Splicevariante in richtiger Orientierung (Abb. 3-3 C, erwartete Größen 140 bp und 6787 bp), Spur D das Restriktionsprodukt eines Klons, der die cDNA-Sequenz der hOX₂R-Splicevariante in umgekehrter Orientierung (Abb. 3-3 D, 759 bp und 6168 bp) enthielt. Spur E zeigt das Restriktionsprodukt eines Klons, der die cDNA-Sequenz des hOX₂R-Wildtyps in richtiger Orientierung (Abb. 3-3 E, 140 bp und 7264 bp), Spur F das Restriktionsprodukt eines Klons, der die cDNA-Sequenz des hOX₂R-Wildtyps in umgekehrter Orientierung (Abb. 3-3 F, 1236 bp und 6168 bp) enthielt.

Für die Erzeugung der Fusionsproteine hOX₂R-WT-EYFP-N1 und hOX₂R-SV-EYFP-N1 wurde mittels PCR unter Verwendung entsprechend konstruierter Primersequenzen (Tab. 2-1) das Stoppcodon mutiert und die Schnittstelle *Hind*III stromaufwärts und die Schnittstelle *Bam*HI stromabwärts des offenen Leserahmens der beiden Rezeptorvarianten eingeführt. Die PCR-Produkte wurden zuerst in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor ligiert (Abb. 7-3) und von dort unter Verwendung der neu generierten Schnittstellen in pEYFP-N1 (Abb. 7-4) umkloniert. Die Subklonierung der beiden Rezeptorvarianten in den Vektor pcDNA3.1 (Abb. 7-5) erfolgte ausgehend vom neu generierten pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor auf die gleiche Weise wie die Subklonierung der beiden EYFP-Fusionsproteine. Die im Anschluss an die Subklonierung mit geeigneten Restriktionsenzymen durchgeführte Restriktion zeigte für die ausgewählten rekombinanten Plasmide die erwarteten Fragmentlängen (Abb. 3-4).

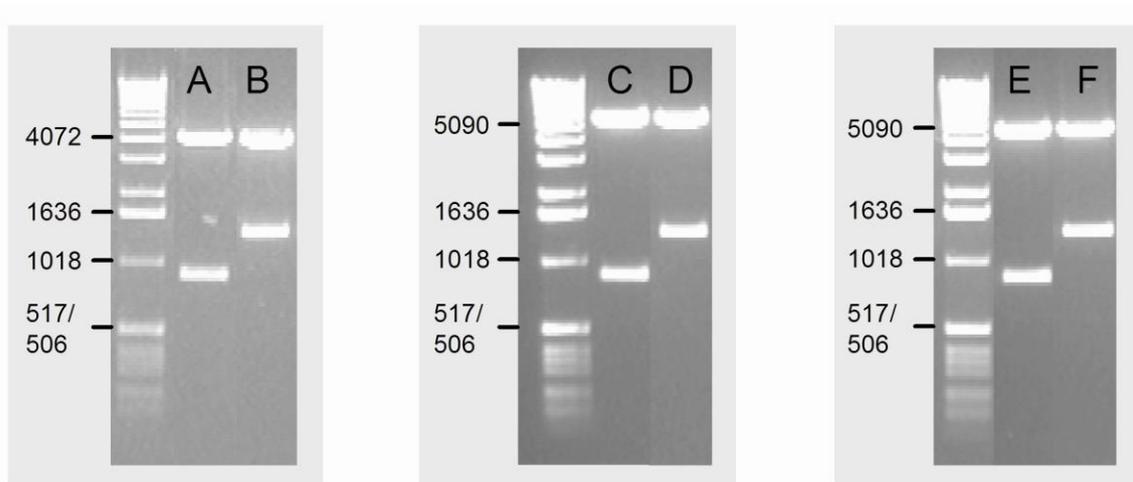


Abbildung 3-4 Restriktionsverdau mit *Hind*III und *Bam*HI im Anschluss an die Subklonierung. Je Spur wurden 20 μ L Restriktionsprodukt auf das Agarosegel aufgetragen.

Die Spuren A und B zeigen den Restriktionsverdau des Vektors pCR[®]4-TOPO[®], der als *Insert* die cDNA-Sequenz der hOX₂R-Splicevariante (Abb. 3-4 A, erwartete Größe 865 bp und 3968 bp) bzw. des hOX₂R-Wildtyps (Abb. 3-4 B, erwartete Größe 1342 bp und 3968 bp) enthielt. Die Spuren C und D zeigen den Restriktionsverdau des Vektors pcDNA3.1, der als *Insert* die cDNA-Sequenz der hOX₂R-Splicevariante (Abb. 3-4 C, erwartete Größe 865 bp und 5410 bp) bzw. des hOX₂R-Wildtyps (Abb. 3-4 D, erwartete Größe 1342 bp und 5410 bp) enthielt. Die Spuren E und F zeigen den Restriktionsverdau des Vektors pEYFP-N1, der als *Insert* die cDNA-Sequenz der hOX₂R-Splicevariante (Abb. 3-4 E, erwartete Größe 865 bp und 4695 bp) bzw. des hOX₂R-Wildtyps (Abb. 3-4 F, erwartete Größe 1342 bp und 4695 bp) enthielt.

Die Identität aller neu generierten Plasmide wurde durch Sequenzierung (Seqlab Göttingen) bestätigt. Eine Zusammenstellung der Vektorkarten findet sich in Abschnitt 7.1.11.

3.3 Intrazelluläre Lokalisierung des hOX₂R-Wildtyps und der hOX₂R-Splicevariante in CHO-Zellen

Für die intrazelluläre Lokalisierung der beiden hOX₂-Rezeptorvarianten wurden fluoreszierende hOX₂-Rezeptorvarianten, an die C-terminal das gelb-fluoreszierende Protein EYFP fusioniert war, eingesetzt. CHO-Zellen, die entweder das fluoreszierende Fusionsprotein hOX₂R-WT-EYFP-N1 oder das fluoreszierende Fusionsprotein hOX₂R-SV-EYFP-N1 exprimierten, wurden mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von 48 h betrachtet. Das hOX₂R-WT-EYFP-Fusionsprotein war ab der fünften Stunde nach Transfektion überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 3-5 A), während das hOX₂R-SV-EYFP-Fusionsprotein zu jedem untersuchten Zeitpunkt innerhalb der Zelle (Abb. 3-5 B), jedoch nicht im Bereich des Zellkerns zu finden war. CHO-Zellen, die mit dem pEYFP-N1-Vektor, welcher ausschließlich EYFP exprimiert, transfiziert waren, zeigten eine homogene Färbung des gesamten Zytoplasmas einschließlich des Zellkerns (Abb. 3-5 C).

Bei Calciummessungen mit Fluo-4-AM in CHO-Zellen zeigten die Fusionsproteine hOX₂R-WT-EYFP-N1 und hOX₂R-SV-EYFP-N1 im Vergleich zu den entsprechenden nicht fusionierten Rezeptoren (hOX₂R-WT-pcDNA3.1 und hOX₂R-SV-pcDNA3.1) keinen funktionellen Unterschied.

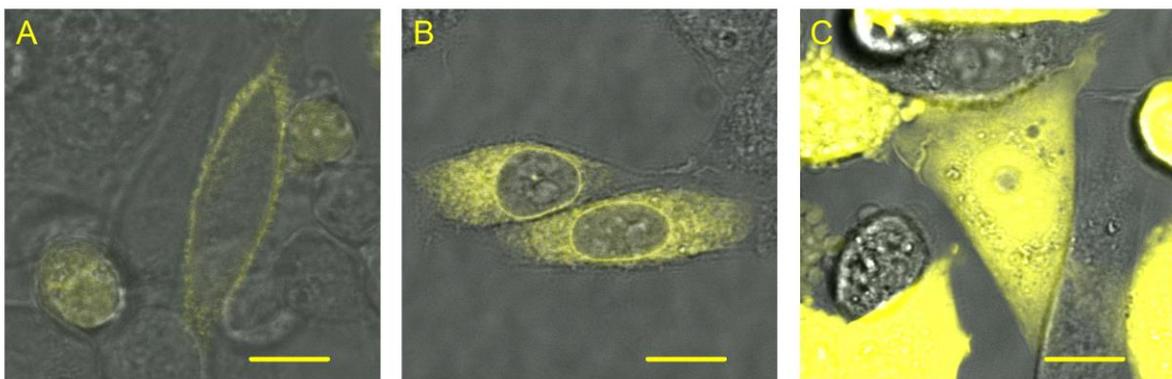


Abbildung 3-5 Intrazelluläre Lokalisierung der Fusionsproteine hOX₂R-WT-EYFP-N1 (A) und hOX₂R-SV-EYFP-N1 (B) sowie von EYFP-N1 (C) ca. 22 h nach Transfektion in lebenden CHO-Zellen. Die Bilder wurden nach Anregung bei 514 nm aufgenommen. Die Ergebnisse konnten in einem unabhängigen Versuch bestätigt werden. Der gelbe Balken entspricht 10 μ m.

Die Koexpression des hOX₂R-WT-EYFP-Fusionsproteins mit einem rot-fluoreszierenden DsRed/Plasmamembran-Markierungsprotein zeigte deutlich die Kollokalisierung der

EYFP- und DsRed-Fluoreszenz in der Plasmamembran der CHO-Zellen (Abb. 3-6, A-C). In CHO-Zellen, die das hOX₂R-SV-EYFP-Fusionsprotein und ein rot-fluoreszierendes DsRed/ER-Markierungsprotein koexprimierten, zeigte sich die Kolokalisierung der EYFP- und DsRed-Fluoreszenz im endoplasmatischen Retikulum (Abb. 3-6, D-E).

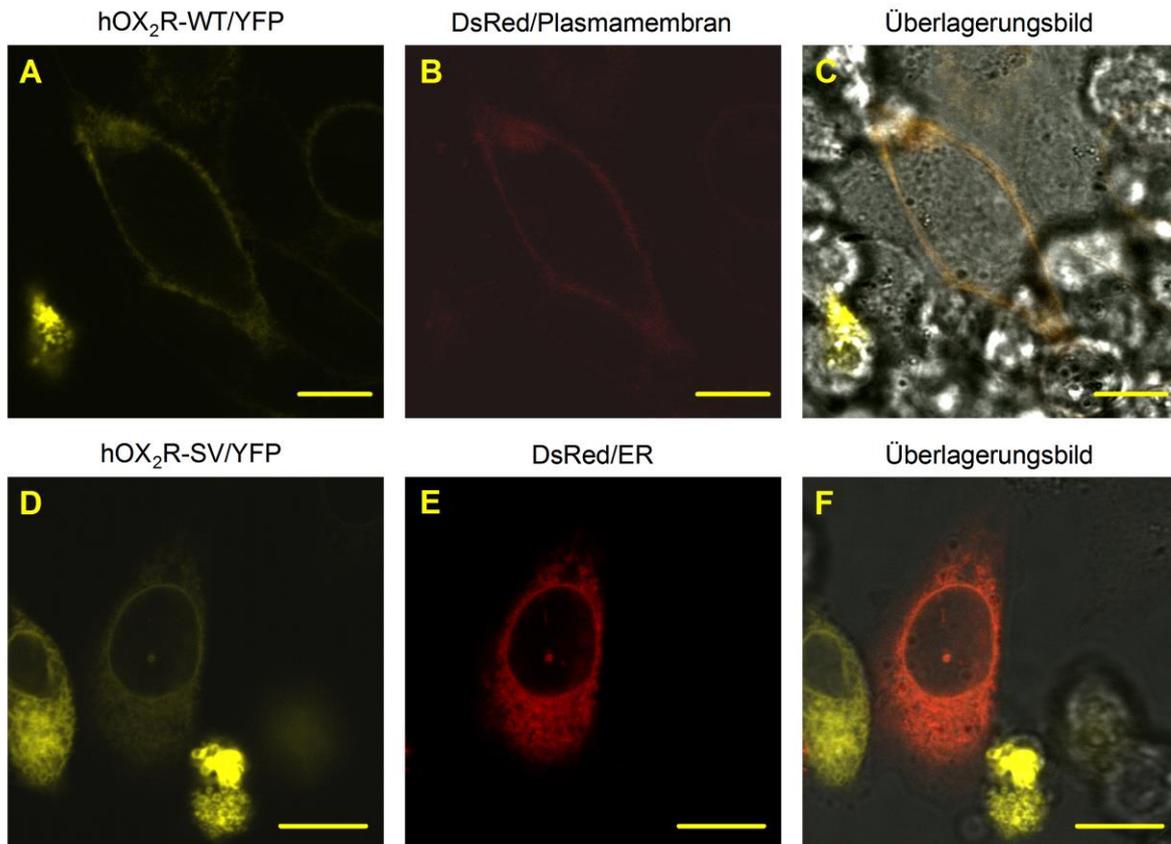


Abbildung 3-6 (A-C) Intrazelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins hOX₂R-WT-EYFP-N1 und der Plasmamembran in lebenden CHO-Zellen. Zur Lokalisation der Plasmamembran wurden die CHO-Zellen mit einer DsRed-Variante, die über eine Signalpeptidsequenz für die Plasmamembran (DsRed/Plasmamembran) verfügt, kotransfiziert.

(D-E) Intrazelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins hOX₂R-SV-EYFP-N1 und des endoplasmatischen Retikulums in lebenden CHO-Zellen. Zur Lokalisation des endoplasmatischen Retikulums wurden die CHO-Zellen mit einer DsRed-Variante, die über eine Signalpeptidsequenz sowie eine Retentionssequenz für das endoplasmatische Retikulum verfügt (DsRed/ER), kotransfiziert.

Alle Bilder wurden 21 h nach Transfektion von hOX₂R-WT-pEYFP-N1, hOX₂R-SV-pEYFP-N1 und pDsRed-Monomer-Membran und 45 h nach Transfektion von pDsRed2-ER nach sequentieller Anregung bei 514 nm (pEYFP) bzw. 543 nm (DsRed) aufgenommen. Der gelbe Balken entspricht 10 µm.

3.4 Voltage-Clamp-Messungen an *Xenopus*-Oozyten, die hOX₂-Rezeptorvarianten exprimieren

3.4.1 Charakterisierung Orexin-A-induzierter Ströme in *Xenopus*-Oozyten

In Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp exprimierten, wurden nach Applikation von 100 nM Orexin-A-Lösung während einer rampenförmigen Änderung des Membranpotentials von -120 auf +100 mV Ströme variabler Höhe gemessen (Abb. 3-7). Ähnliche Ströme wurden während einer rampenförmigen Änderung des Membranpotentials von +100 auf -120 mV beobachtet, in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt.

In einigen Oozyten waren die Ströme noch 20 min nach Orexin-A-Applikation messbar, in anderen waren sie nur über einen kurzen Zeitraum von einigen Sekunden bis wenigen Minuten messbar. Nach Superfusion der Injektionskammer mit frischer NFR-Lösung waren keine Ströme mehr messbar, d. h. der durch Orexin A hervorgerufene Effekt war auswaschbar.

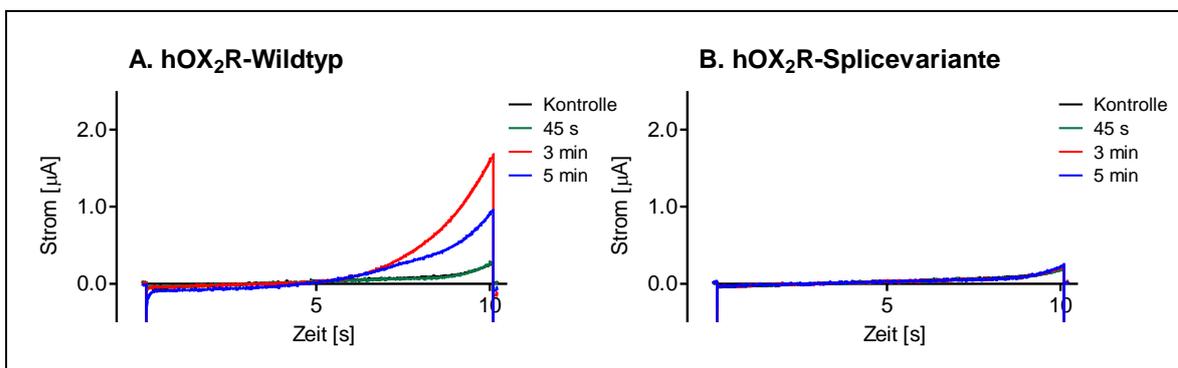


Abbildung 3-7 Voltage-Clamp-Messungen an Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp (A) bzw. die hOX₂R-Splicevariante (B) exprimierten, 2 Tage nach Injektion der entsprechenden cRNA. Vor Gabe (Kontrolle) sowie 45 s, 3 min und 5 min nach Gabe einer 100 nM Orexin-A-Lösung wurde das Membranpotential im Verlauf von 10 s ausgehend von -120 mV auf 100 mV depolarisiert (Rampe) und die dazu notwendige Stromapplikation gemessen (Abb. 2-3 B).

Die gemessenen Ströme waren besonders ausgeprägt im Bereich der Rampe, in dem das Membranpotential der Oozyte auf hohe Spannungswerte geklemmt war, weswegen für die Auswertung Ströme, die bei +80 mV gemessen wurden, herangezogen wurden. Nach Applikation einer 100 nM oder 1 µM Orexin-A-Lösung konnten häufig auch Ströme im Bereich der Rampe, in dem das Membranpotential auf negative Werte geklemmt war, gemessen werden (Abb. 3-8). Diese nahmen normalerweise mit zunehmender Dauer der Orexin-

A-Inkubation an Höhe zu, wurden in seltenen Fällen jedoch auch schon vor Orexin-A-Applikation gemessen und deshalb nicht in die Auswertung einbezogen. In Oozyten, die die hOX₂R-Splicevariante exprimierten, wurden nach Applikation einer 100 nM Orexin-A-Lösung während einer rampenförmigen Änderung des Membranpotentials von -120 auf +100 mV niemals Ströme (n=16, 10 Frösche) gemessen. Auch nach der Applikation einer 1 µM Orexin-A- (n=13, 8 Frösche) oder 1 µM Orexin-B-Lösung (n=3, 1 Frosch) konnten keine Ströme gemessen werden, während diese bei Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp exprimierten, in beiden Fällen gemessen wurden.

Um die Frage zu beantworten, ob die beobachteten Ströme durch Aktivierung endogener Calcium-aktivierter Chloridkanäle zustande kamen, wurde zum einen ein Antagonist an Calcium-aktivierten Chloridkanälen in *Xenopus*-Oozyten (Anthrazen-9-Carbonsäure) eingesetzt (Abb. 3-8) und zum anderen die Natriumionen der extrazellulären Badlösung durch Kaliumionen ersetzt (Abb. 3-9). Die Applikation einer Lösung, die 1 µM Orexin A und 2 µM Anthrazen-9-Carbonsäure enthielt, führte bei positivem Membranpotential in *Xenopus*-Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp exprimierten, zur vollständigen Hemmung des durch die Applikation einer 1 µM Orexin-A-Lösung induzierten Stromes (n=3, 1 Frosch).

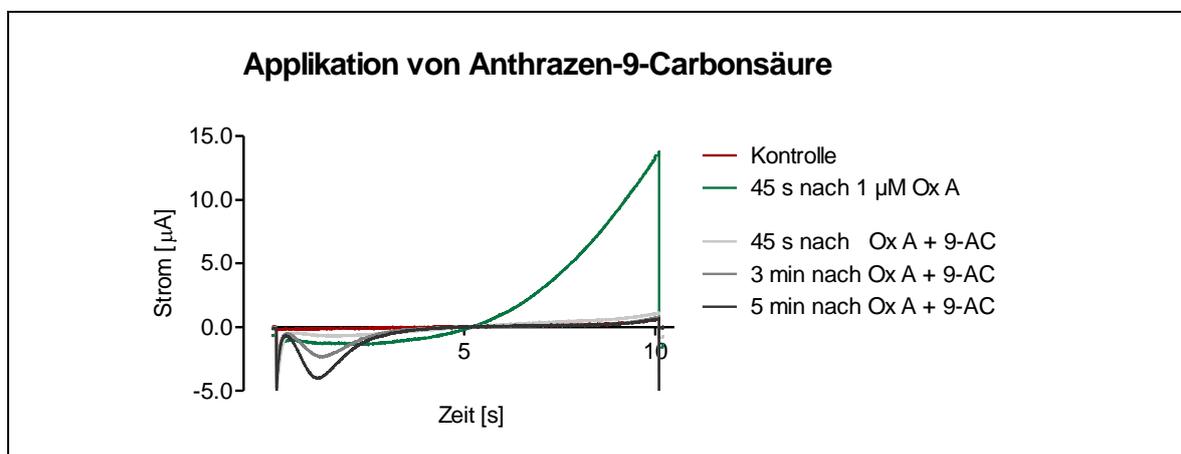


Abbildung 3-8 Voltage-Clamp-Messungen an Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp exprimierten, 3 Tage nach der cRNA-Injektion.

Die Rampe wurde 45 s vor und 45 s nach Gabe einer 1 µM Orexin-A-Lösung (Ox A) gemessen. Direkt im Anschluss an die beiden Messungen wurde eine Lösung appliziert, die 1 µM Orexin A und 2 µM Anthrazen-9-Carbonsäure (Ox A + 9-AC) enthielt und die Rampe 45 s, 3 und 5 min nach Gabe der Lösung gemessen (Abb. 2-3 C).

Die Verwendung von KFR statt NFR als extrazelluläre Badlösung führte nach Applikation einer 1 μM Orexin-A-Lösung in *Xenopus*-Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp exprimierten, zu einer sehr geringen Änderung des Umkehrpotentials (n=3, 1 Frosch). Dies spricht gegen einen von Kalium- und für einen von Chloridionen getragenen Strom. Zusammenfassend ergibt sich aus beiden Versuchen, dass es sich bei den bei positivem Membranpotential gemessenen Strömen überwiegend um einen Chloridionen-Einstrom handelt.

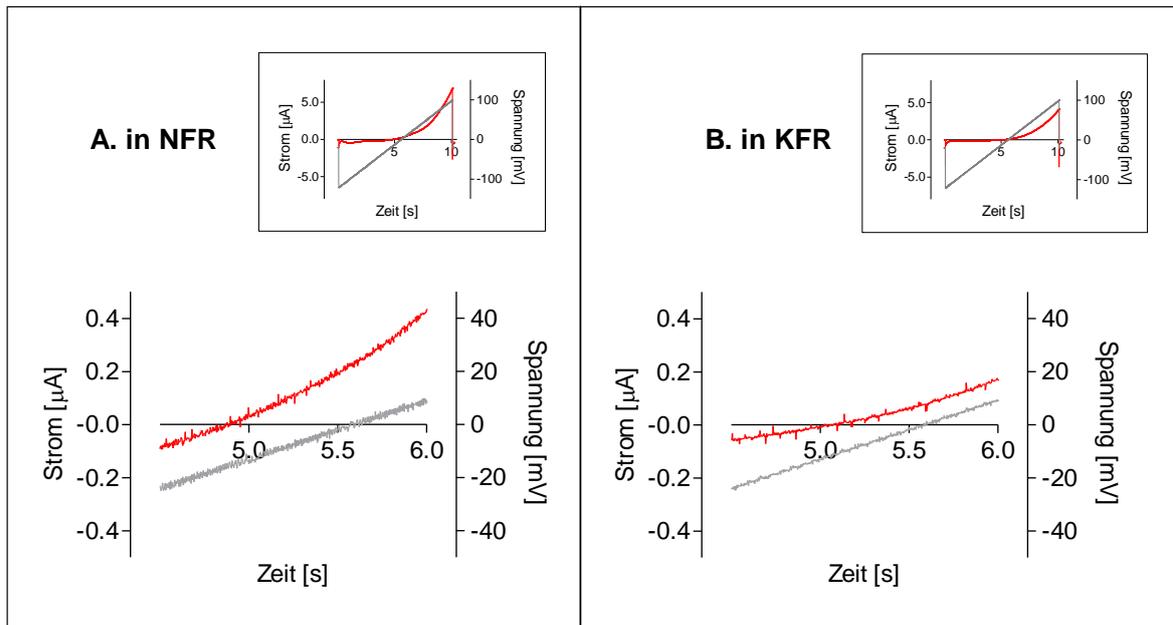


Abbildung 3-9 Strom-Spannungskurven, gemessen 3 min nach Gabe einer 100 nM Orexin-A-Lösung an *Xenopus*-Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp exprimierten. Als extrazelluläre Badlösung wurde NFR (A) und KFR (B) eingesetzt. Die Stromstärke ist rot, die parallel dazu aufgenommene Spannung grau dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sind Stromstärke und Spannung im Bereich des Umkehrpotentials gezeigt, zur Orientierung ist als Einschub der gesamte Spannungsbereich dargestellt. Die Ströme wurden während einer rampenförmigen Änderung des Membranpotentials von -120 bis +100 mV von 10 s Dauer gemessen und gegen das Membranpotential aufgetragen.

3.4.2 Koexpression des hOX₂R-Wildtyps und der hOX₂R-Splicevariante in *Xenopus*-Oozyten

Durch Koexpression beider hOX₂-Rezeptorvarianten in einer Oozyte sollte eine mögliche Beeinflussung des hOX₂R-Wildtyps durch die hOX₂R-Splicevariante untersucht werden.

Zunächst wurde an einer Oozyte, die entweder den hOX₂R-Wildtyp, die hOX₂R-Splicevariante oder beide Rezeptorvarianten exprimierte, Orexin A in ansteigenden Konzentrationen appliziert (Abb. 2-3 A). Die nächst höher konzentrierte Orexin-A-Lösung wurde nur dann appliziert, wenn zu den Zeitpunkten 45 s, 3 min und 5 min der gemessene

Strom nicht höher war als nach alleiniger Gabe von NFR. In 9 von 15 Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp exprimierten, konnte nach Gabe einer 100 nM Orexin-A-Lösung ein Chloridstrom gemessen werden, in 6 von 15 Oozyten wurde dieser erst nach Erhöhung der Orexin-A-Konzentration auf 1 µM gemessen. Von 9 Oozyten, die beide hOX₂-Rezeptorvarianten exprimierten, konnte nach Gabe einer 100 nM Orexin-A-Lösung in keiner Oozyte ein Chloridstrom gemessen werden. Nach Gabe einer 1 µM Orexin-A-Lösung konnte in 5 der 9 Oozyten ein Chloridstrom und in 4 Oozyten kein Chloridstrom gemessen werden. In 6 Oozyten, die die hOX₂R-Splicevariante exprimierten, wurde nach Gabe einer 1 µM Orexin-A-Lösung nie ein Strom gemessen (Abb. 3-10).

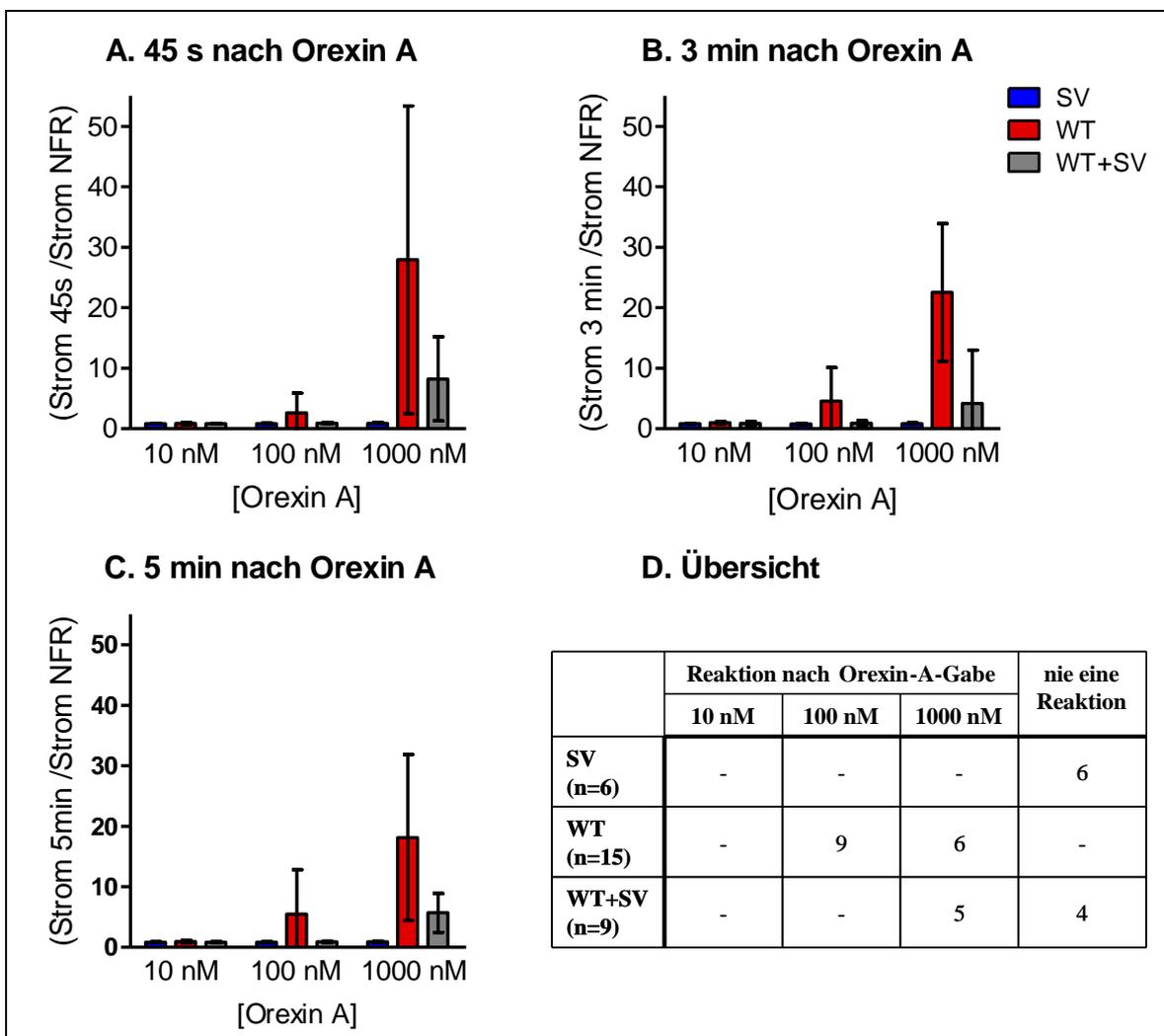


Abbildung 3-10 Voltage-Clamp-Messungen an Oozyten, denen die cRNA des hOX₂R-Wildtyps (WT), der hOX₂R-Splicevariante (SV) oder beider Rezeptorvarianten (WT + SV) injiziert worden war. Orexin A wurde in ansteigender Konzentration (10 nM, 100 nM und 1 µM) appliziert, bis erstmalig ein Chloridstrom messbar war. Die Höhe des nach Gabe von Orexin A bei einem Membranpotential von 80 mV gemessenen Stromes wurde durch die Höhe bei einem Membranpotential von 80 mV gemessenen Stroms vor Orexin-A-Gabe dividiert (MW ± SD).

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Oozyten, die beide hOX₂-Rezeptorvarianten exprimieren, zur Aktivierung Calcium-aktivierter Chloridströme höhere Orexin-A-Konzentrationen notwendig sind als in Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp exprimieren.

In weiteren Versuchen wurde entweder eine 100 nM oder eine 1 µM Orexin-A-Lösung appliziert und für diese beiden Konzentrationen untersucht, ob zu bestimmten Zeitpunkten (45 s, 3 min und 5 min nach Orexin-A-Gabe, Abb. 2-3 A) für die verschiedenen Expressionsbedingungen Unterschiede in der Höhe der gemessenen Ströme zu finden waren (Abb. 3-11).

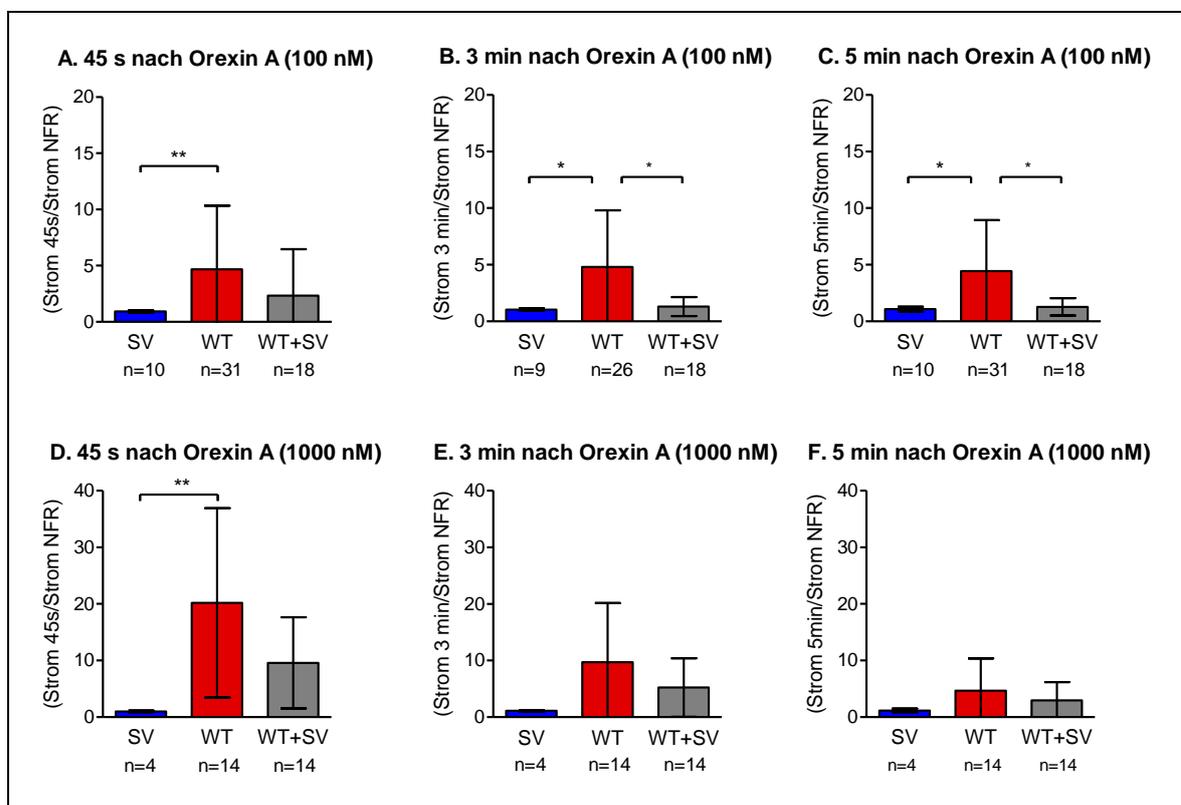


Abbildung 3-11 Vergleich der nach Gabe einer 100 nM (A-C) bzw. einer 1 µM (D-F) Orexin-A-Lösung induzierten Ströme in Oozyten, die die hOX₂R-Splicevariante (SV), den hOX₂R-Wildtyp (WT) oder beide Rezeptorvarianten (WT + SV) exprimierten, 45 s, 3 min und 5 min nach Applikation von Orexin A. Die nach Gabe von Orexin A bei einem Membranpotential von 80 mV gemessenen Stromwerte wurden durch die bei einem Membranpotential von 80 mV gemessenen Stromwerte vor Orexin-A-Gabe dividiert (MW ± SD).

Die 3 und 5 min nach Applikation einer 100 nM Orexin-A-Lösung in Oozyten, die beide hOX₂-Rezeptorvarianten exprimierten, gemessenen Chloridströme waren signifikant ge-

ringer als die Ströme, die in Oozyten gemessen wurden, die den hOX₂R-Wildtyp allein exprimierten. Nach Applikation einer 100 nM Orexin-A-Lösung waren die gemessenen Chloridströme zu allen untersuchten Zeitpunkten in Oozyten, die die hOX₂R-Splicevariante exprimierten, geringer als in Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp exprimierten (Abb. 3-11).

Nach Applikation einer 1 µM Orexin-A-Lösung waren die gemessenen Ströme in Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp oder beide Rezeptorvarianten exprimierten, höher als nach Gabe einer 100 nM Orexin-A-Lösung. Zu keinem untersuchten Zeitpunkt wurde nach Applikation einer 1 µM Orexin-A-Lösung ein signifikanter Unterschied zwischen Oozyten, die beide hOX₂-Rezeptorvarianten und Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp exprimierten, festgestellt (Abb. 3-11).

3.5 Intrazelluläre Calciummessungen mittels Fluo-4-AM

3.5.1 Intrazelluläre Calciummessungen in NCI-H295R-Zellen

In untransfizierten NCI-H295R-Zellen, die beide hOX_2 -Rezeptorvarianten endogen exprimierten, führte die Applikation einer Orexin-A-Lösung zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die mittels Fluo-4-AM gemessen wurde (Abb. 3-12, Wenzel et al., 2009).

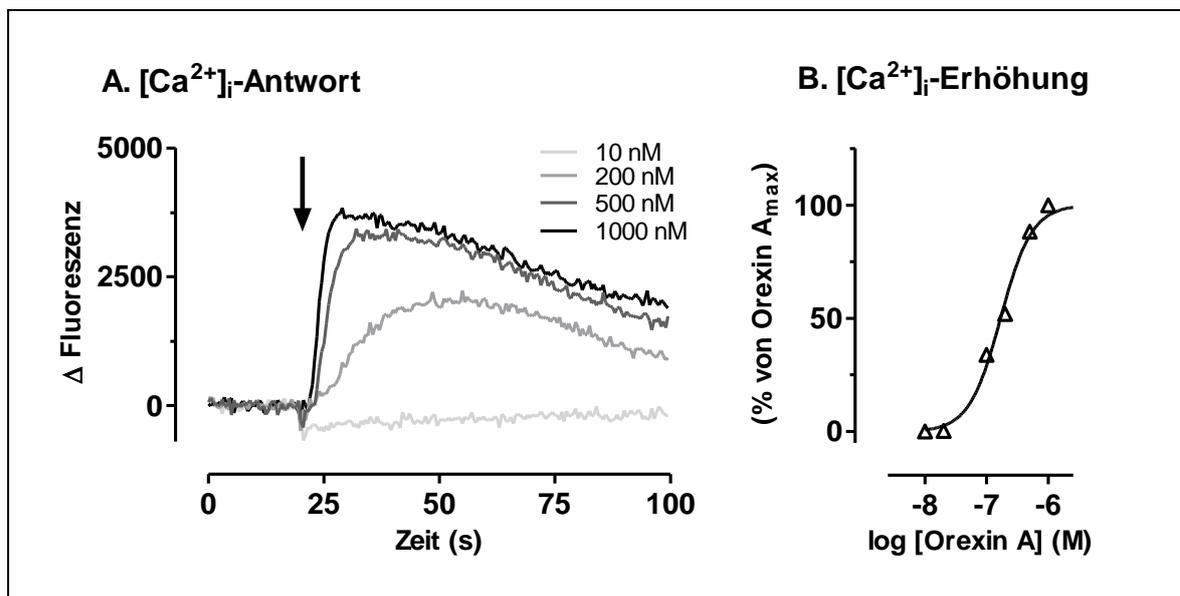


Abbildung 3-12 In NCI-H295R-Zellen führte die Applikation einer Orexin-A-Lösung (Pfeil) zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (A). Aus Dosis-Wirkungs-Kurven wurde eine EC_{50} von $1,5 \times 10^{-7}$ M berechnet (B). Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus drei unabhängigen Versuchen.

Nach Applikation einer 1 μ M Orexin-A-Lösung (Endkonzentration im *Well*) kam es in untransfizierten NCI-H295R-Zellen zu einem raschen Anstieg der Fluoreszenzintensität, gefolgt von einer langsamen Abnahme über 180 s, bis annähernd das Ausgangsniveau wieder erreicht wurde (Abb. 3-13).

In mit DNA der hOX_2 R-Splicevariante transfizierten NCI-H295R-Zellen war die Calciumantwort nach Gabe einer 1 μ M Orexin-A-Lösung um so geringer, je mehr hOX_2 R-Splicevarianten-DNA zur Transfektion eingesetzt wurde. Im Vergleich zu untransfizierten NCI-H295R-Zellen wurde die Calciumantwort um bis zu 47,3 % reduziert.

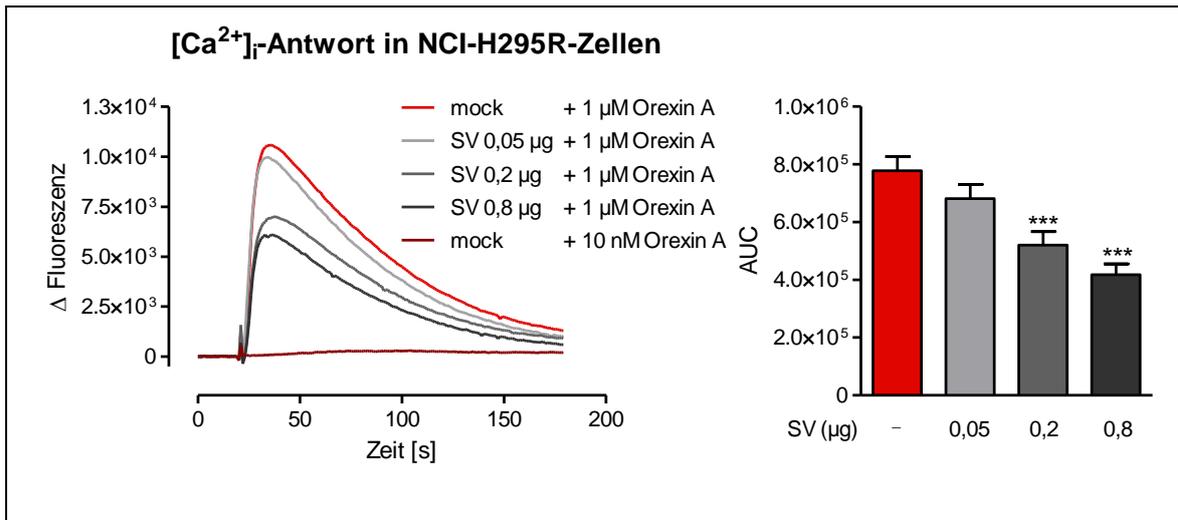


Abbildung 3-13 Intrazelluläre Calciummessungen in NCI-H295R-Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerätes und dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4-AM. Zur Quantifizierung der Calciumantwort wurde für die einzelnen Transfektionsbedingungen die Fläche unter der Kurve (AUC) bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus drei unabhängigen Versuchen. Als Expressionsvektor wurde pTracerTM-CMV/Bsd verwendet, die erfolgreiche Transfektion vor Versuchsbeginn mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. *Mock*-transfizierte Zellen wurden mit pTracerTM-CMV/Bsd, der die cDNA der hOX₂R-Splicevariante in umgekehrter Orientierung enthielt, transfiziert. Die Menge an transfizierter Plasmid-DNA je *Well* wurde für die verschiedenen Bedingungen konstant gehalten (n = 9-12, MW ± SEM; WT: hOX₂R-WT-pTracer-CMV/Bsd, SV: hOX₂R-SV-pTracer-CMV/Bsd).

3.5.2 Intrazelluläre Calciummessungen in CHO-Zellen

In CHO-Zellen, die mit der DNA des hOX₂R-Wildtyps transfiziert waren, führte die Applikation einer Orexin-A-Lösung zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4-AM in einem Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen wurde. Nach Gabe einer 1 μM Orexin-A-Lösung (Endkonzentration im *Well*) zeigte sich eine rasche Zunahme der Fluoreszenzintensität (2500-3000 Einheiten), gefolgt von einem langsamen Abfall über mindestens 180 s (Abb. 3-14).

In CHO-Zellen, die mit DNA der hOX₂R-Splicevariante transfiziert waren, kam es im Vergleich zu der Applikation einer Pufferlösung (HBSS) nach Applikation einer 1 μM Orexin-A-Lösung zu keiner signifikanten Fluoreszenzänderung.

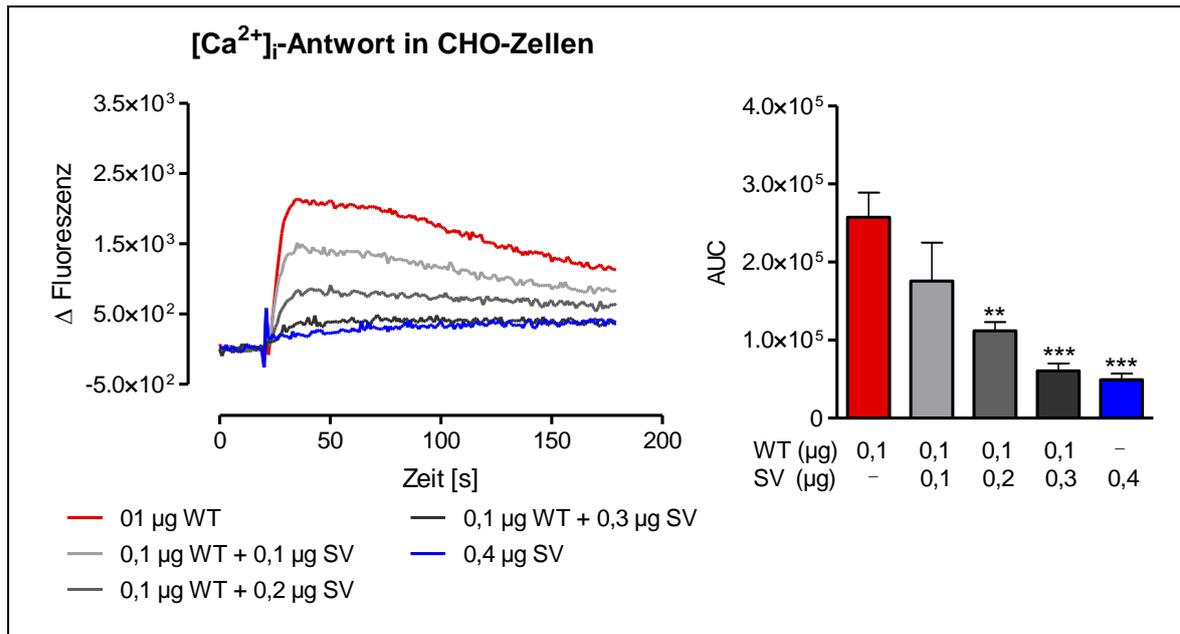


Abbildung 3-14 Intrazelluläre Calciummessungen in CHO-Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerätes und dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4-AM 24 h nach Transfektion. Zur Quantifizierung der Calciumantwort wurde für die einzelnen Transfektionsbedingungen die Fläche unter der Kurve (AUC) bestimmt.

Als Expressionsvektor wurde pcDNA3.1 verwendet. Durch Kotransfektion von 0,02 μg pDsRed2-Mito konnte die erfolgreiche Transfektion vor Versuchsbeginn unter dem konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop kontrolliert werden. Die Menge an transfizierter Plasmid-DNA wurde für die verschiedenen Bedingungen konstant gehalten (n=6, MW ± SEM; WT: hOX₂R-WT-pcDNA3.1, SV: hOX₂R-SV-pcDNA3.1).

Der nach Gabe einer 1 μM Orexin-A-Lösung beobachtete Fluoreszenzanstieg in CHO-Zellen, die beide hOX₂-Rezeptorvarianten exprimierten, war im Vergleich zu CHO-Zellen, die nur den hOX₂R-Wildtyp exprimierten, signifikant geringer. Unter Konstanthaltung der transfizierten Menge hOX₂R-Wildtyp-DNA verringerte sich die Calciumantwort mit zunehmender Menge transfizierter hOX₂R-Splicevarianten-DNA. Bei der Kotransfektion von hOX₂R-Wildtyp-DNA und hOX₂R-Splicevarianten-DNA im Verhältnis 1:3 wurde der Fluoreszenzanstieg nach Gabe einer 1 μM Orexin-A-Lösung so stark reduziert, dass dieser dem Fluoreszenzanstieg in CHO-Zellen, die nur die hOX₂R-Splicevariante exprimierten, nahezu identisch war.

Die Ergebnisse konnten in mindestens drei unabhängigen Versuchen bestätigt werden, wobei die Verwendung von pcDNA3.1 oder pTracerTM-CMV/Bsd als Expressionsvektoren zu ähnlichen Ergebnissen führten.

4 Diskussion

Durch Klonierung konnte am Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck aus NCI-H295R-Zellen eine Splicevariante des humanen OX₂-Rezeptors isoliert werden (Knopp et al., 2008). Im Vergleich mit dem hOX₂R-Wildtyp fehlt der neu entdeckten hOX₂R-Splicevariante die sechste und siebte Transmembrandomäne des hOX₂R-Wildtyps und sie verfügt über eine alternative, nicht-homologe sechste Transmembrandomäne. In der vorliegenden Arbeit konnte die mRNA der hOX₂R-Splicevariante sowohl im Gehirn als auch peripher nachgewiesen werden. Im Unterschied zum hOX₂R-Wildtyp vermittelt die hOX₂R-Splicevariante nach Orexin-Applikation keine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, wahrscheinlich weil sie im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und nicht an der Zelloberfläche exprimiert wird. Durch Koexpression der hOX₂R-Splicevariante mit dem hOX₂R-Wildtyp konnte mit verschiedenen Methoden in drei unterschiedlichen Expressionssystemen gezeigt werden, dass die hOX₂R-Splicevariante einen dominant-negativen Effekt auf den hOX₂R-Wildtyp ausübt.

4.1 Funktionelle Charakterisierung von hOX₂R-Splicevarianten

In den letzten Jahren konnte mit einer großen Bandbreite unterschiedlicher Methoden die Heterodimerisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren gezeigt werden. Viele der verwendeten Methoden wie Koimmunopräzipitation, BRET (Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer) oder FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) ermöglichen jedoch nur den Nachweis der Dimerisierung, während Aussagen über die funktionellen Auswirkungen auf die Rezeptorfunktion nur in geringem Ausmaß getroffen werden können. Ein großer Vorteil der in der vorliegenden Arbeit zur funktionellen Charakterisierung von hOX₂-Rezeptorvarianten verwendeten Methoden (*Voltage-Clamp*-Technik und Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mit Hilfe eines fluoreszierenden Calciumindikators) ist, dass zunächst alle bisher bekannten Effekte der Dimerisierung auf die Rezeptorfunktion wie Änderungen der Ligandenaffinität, der Signaltransduktion, der Internalisierung sowie des Transports der Rezeptoren an die Zelloberfläche (vgl. Kapitel 1.5) von beiden Me-

thoden erfasst werden. Die Kombination dieser Methoden erwies sich aus mehreren Gründen als vorteilhaft.

In *Xenopus-laevis*-Oozyten wurden verschiedene Splicevarianten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, denen nach Ligandenbindung eine Inositol-1,4,5-trisphosphat-(IP₃)-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration gemeinsam ist, näher charakterisiert (Pin et al., 1992; Anthony et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Ströme ließen sich mit Anthrazen-9-Carbonsäure blockieren und der Austausch der natriumreichen extrazellulären Badlösung gegen eine kaliumreiche führte nur zu einer unwesentlichen Änderung des Umkehrpotentials. In Analogie zu bisher charakterisierten Rezeptoren (de la Peña et al., 1992; Pin et al., 1992; Parekh et al., 1993a; Anthony et al., 2002) lässt sich daraus schließen, dass der hOX₂R-Wildtyp in *Xenopus*-Oozyten ebenfalls an G_q-Proteine koppelt und über eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zur Öffnung endogen exprimierter Calcium-aktivierter Chloridkanäle führt. Da die Antwort des G-Protein-gekoppelten Rezeptors auf den Liganden durch die Chloridkanalaktivierung verstärkt wird, ist nur eine geringe Menge an cRNA notwendig, um eine detektierbare Expression zu erreichen. Das Risiko von Wechselwirkungen der heterolog exprimierten hOX₂-Rezeptorvarianten mit endogenen Proteinen oder unspezifischer Interaktionen durch Überexpression wurde dadurch reduziert. Durch Injektion der cRNA in einzelne Oozyten unter optischer Kontrolle konnte außerdem davon ausgegangen werden, dass nahezu jede untersuchte Oozyte die gewünschte cRNA enthielt, während durch transiente Transfektion in den verwendeten Zelllinien keine Transfektion aller vorhandenen Zellen erreicht werden konnte.

Eine Schwäche der *Voltage-Clamp*-Methode zeigte sich in Messungen, in denen Orexin A in ansteigenden Konzentrationen gegeben wurde (Abb. 2-3 und Abb. 3-10). Durch die in Kapitel 3.4.2 näher beschriebene Vorgehensweise sollten erste Hinweise gewonnen werden, ob mittels *Voltage-Clamp*-Messungen die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven an Oozyten, die entweder den hOX₂R-Wildtyp, die hOX₂R-Splicevariante oder beide hOX₂-Rezeptorvarianten exprimierten, möglich wäre. Es zeigte sich jedoch sowohl in Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp, als auch in Oozyten, die beide hOX₂-Rezeptorvarianten exprimierten, eine sehr hohe Variabilität der gemessenen Chloridströme. In der Literatur wird von Parekh et al., die 5-Hydroxytryptaminrezeptoren mittels *Voltage-Clamp*-Technik untersuchten, ebenfalls eine hohe Variabilität dieser Ströme beschrieben (Parekh et al., 1993a). Ihnen zufolge könnte eine in verschiedenen Oozyten unterschiedlich hohe Expression der Einzelkomponenten der Signalkaskade, die die Rezeptoraktivierung mit der Akti-

vierung der Ionenkanäle verbindet, die zugrunde liegende Ursache sein. Die ursprünglich geplante Erstellung von Dosis-Wirkungskurven mit Applikation verschiedener Orexin-A-Konzentrationen und unter Verwendung unterschiedlicher Oozyten für jede Orexin-A-Konzentration wurde deswegen nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurden die verwendeten Orexinkonzentrationen auf 100 nM und 1 μ M begrenzt und diese in voneinander unabhängigen Versuchen appliziert. Nach Gabe einer 100 nM Orexin-A-Lösung waren die gemessenen Chloridströme zu allen untersuchten Zeitpunkten in Oozyten, die die hOX₂R-Splicevariante und den hOX₂R-Wildtyp gemeinsam exprimierten, geringer als in Oozyten, die den hOX₂R-Wildtyp allein exprimierten. Dies lässt sich durch einen dominant-negativen Effekt der hOX₂R-Splicevariante auf den hOX₂R-Wildtyp erklären.

Da posttranslationale Modifikation (Stühmer und Parekh, 1995), der Einbau von Membranproteinen (Drumm et al., 1991; Yasui et al., 1999) oder die Signaltransduktion (Wagner et al., 1996) in Oozyten anders verlaufen können als in Zellen von Säugetieren, wurde der Einfluss der hOX₂R-Splicevariante auf den hOX₂R-Wildtyp zudem in NCI-H295R- und CHO-Zellen untersucht. Nicht nur die Untersuchung mit verschiedenen Methoden, sondern auch die Verwendung unterschiedlicher, gut charakterisierter Zelllinien war speziell beim Orexinsystem von großer Bedeutung, da zellabhängige Signaltransduktionswege (vgl. Kapitel 1.3) bekannt sind. So wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, eine mögliche Beeinflussung der Signaltransduktion durch die hOX₂R-Splicevariante zu erkennen. Ein Vorteil der NCI-H295R-Zellen im Vergleich zu CHO-Zellen ist ihre endogene Expression beider hOX₂-Rezeptorvarianten. Dadurch war eine Untersuchung der hOX₂-Rezeptorvarianten in einer natürlichen Umgebung, in der davon ausgegangen werden konnte, dass alle für eine korrekte Expression oder Signaltransduktion relevanten Faktoren vorhanden waren, gewährleistet. Im Gegensatz zu CHO-Zellen, bei denen eine Transfektion der Zellen mit DNA der hOX₂R-Splicevariante in dreifachem Überschuss ausreichend war, um eine nahezu vollständige Unterdrückung der Orexin-vermittelten Calciumantwort des hOX₂R-Wildtyps hervorzurufen, wurde in NCI-H295R-Zellen durch Transfektion der DNA der hOX₂R-Splicevariante eine Reduktion der Orexin-vermittelten Calciumantwort des hOX₂R-Wildtyps um bis zu 47 % erreicht. Dieser Unterschied erklärt sich dadurch, dass durch transiente Transfektion keine Transfektion aller Zellen erreicht werden kann und bei Fluoreszenzmessungen mit NCI-H295R-Zellen immer auch untransfizierte Zellen zur Gesamtfluoreszenz beitragen. In untransfizierten CHO-Zellen führt Orexin A nicht zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und folglich kommt es zu keiner Beeinflussung der Gesamtfluoreszenz durch untransfizierte Zellen. Da die Calciumantwort

nach Gabe von Orexin A in beiden Zelllinien mit zunehmender Menge transfizierter hOX₂R-Splicevarianten-DNA abnimmt, kann man von einer Expressions-abhängigen, dominant-negativen Wirkung der hOX₂R-Splicevariante ausgehen. Eine Sättigung des Expressionssystems, die eventuell ähnliche Effekte verursachen könnte, konnte durch Transfektion konstanter DNA-Mengen ausgeschlossen werden.

Im Vergleich zur *Voltage-Clamp*-Methode bestand eine besondere Stärke der Calciummessungen in einem Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerät darin, dass damit ein hoher Durchsatz und die automatische Messung vieler Zellen mit im Vergleich zur *Voltage-Clamp*-Methode relativ geringem Aufwand möglich war. Die Verwendung des Expressionsvektors pTracerTM-CMV/Bsd ermöglichte eine Kontrolle der Transfektionseffizienz vor Versuchsbeginn. Eine Beeinflussung der Fluoreszenzmessung mittels Fluo-4-AM durch die Fluoreszenz der GFP-Variante konnte in den durchgeführten Versuchen nicht festgestellt werden, da die Verwendung des nicht fluoreszierenden Expressionsvektors pcDNA3.1 zu ähnlichen Ergebnissen wie die des Expressionsvektors pTracerTM-CMV/Bsd führte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bei alleiniger Expression der hOX₂R-Splicevariante nach Gabe von Orexin A in keinem der verwendeten Expressionssysteme zu einer Calcium-vermittelten Reaktion kommt. Bei Koexpression der hOX₂R-Splicevariante mit dem hOX₂R-Wildtyp übt sie sowohl in Oozyten von *Xenopus laevis* als auch in NCI-H295R- und CHO-Zellen eine dominant-negative Wirkung auf den hOX₂R-Wildtyp aus.

4.2 Nachweis der mRNA der hOX₂R-Splicevariante im Gehirn und in peripheren Organen

Durch quantitative *real-time*-PCR konnte in dieser Arbeit die mRNA der neu entdeckten hOX₂R-Splicevariante beim Menschen sowohl im Gehirn als auch in der Lunge nachgewiesen werden. Erstmals gelang damit der Nachweis der mRNA des hOX₂R-Wildtyps in der menschlichen Lunge, deren Vorhandensein bisher nur in der Lunge von Ratten gezeigt worden war (Jöhren et al., 2001).

Das mRNA-Verhältnis hOX₂R-Splicevariante zu hOX₂R-Wildtyp war in NCI-H295R-Zellen, aus denen die hOX₂R-Splicevariante erstmalig isoliert wurde, mit 0,08 gering. Das niedrige Verhältnis könnte erklären, warum bei Calciummessungen in dieser Zelllinie nach siRNA-Suppression der hOX₂-Splicevariante im Vergleich zu unbehandelten NCI-H295R-Zellen keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden (unveröffentlichte Ergebnisse).

Im Gehirn fand sich ungefähr halb so viel mRNA der hOXR₂-Splicevariante wie mRNA des hOXR₂-Wildtyps und in der Lunge überwog interessanterweise die mRNA der hOX₂R-Splicevariante. Die physiologische Funktion von hOX₂-Rezeptoren in der Lunge ist ungeklärt, eine Beteiligung des Orexinsystems an der zentralen Steuerung der Atmung ist jedoch beschrieben (Young et al., 2005; Nakamura et al., 2007; Williams et al., 2007). Über die Regulation des mRNA-Verhältnisses der beiden hOX₂-Rezeptorvarianten ist bislang nichts bekannt, doch erscheint aufgrund der besonderen Struktur des fünften Exons des hOX₂R-Gens eine genauere Betrachtung einzelner Aspekte der Regulationsmöglichkeiten des Spleißens sowie der Polyadenylierung lohnenswert. Nach der von Edwalds-Gilbert et al. 1997 eingeführten Nomenklatur (Edwalds-Gilbert et al., 1997) handelt es sich beim fünften Exon des hOX₂R-Gens um ein zusammengesetztes (*composite*) Exon, dessen 5'-Ende in beiden hOX₂-Rezeptorvarianten vorhanden ist. Sein 3'-Ende wird im hOX₂R-Wildtyp von einer *Splice-donor-site* und in der hOX₂R-Splicevariante von einer Polyadenylierungsstelle gebildet (Abb. 1-1). In Genen mit zusammengesetzten Exons wird die Polyadenylierungsstelle des zusammengesetzten Exons als „Polyadenylierungsstelle des zusammengesetzten Exons“, die weiter stromabwärts gelegene als „Polyadenylierungsstelle des 3'-terminalen Exons“ bezeichnet (Tian et al., 2007).

Traditionell wurden Spleißen und Polyadenylierung des 3'-Endes als posttranskriptionelle Prozesse angesehen. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch, dass sie kotranskriptional erfolgen und Transkription und mRNA-Prozessierung sich gegenseitig beeinflussen (Proudfoot et al., 2002). Bei den hOX₂-Rezeptorvarianten muss die Regulation des Spleißens und der Polyadenylierung des 3'-Endes allein auf der Struktur des fünften Exons des hOX₂R-Gens begründet kotranskriptional erfolgen. Diese besondere Form des alternativen Spleißens verbunden mit alternativer Polyadenylierung wird auch als Typ-III-alternative-Polyadenylierung bezeichnet (Lutz, 2008).

Tian et al. untersuchten neun Gene, die durch Typ-III-alternative-Polyadenylierung charakterisiert waren, in zwei unterschiedlichen Zelllinien. Das Verhältnis der mRNA-Variante, die die Polyadenylierungsstelle des zusammengesetzten Exons enthielt, zu der mRNA-Variante, die die Polyadenylierungsstelle des 3'-terminalen Exons enthielt, war für die meisten Gene in diesen beiden Zelllinien verschieden (Tian et al., 2007). Die Zelllinien repräsentierten unterschiedliche Entwicklungsstufen der myeloischen Reihe und die Autoren gehen davon aus, dass die Wahl der Polyadenylierungsstelle von in der Zelle vorherrschenden Bedingungen abhängig war. Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend zeigte die bioinformatische Analyse von *expressed sequence tag (EST)* Daten, dass bei der Transkrip-

tion von Genen, die zusammengesetzte Exons enthalten, in der Lunge, dem Blut und der Prostata eher eine promotornahe Polyadenylierungsstelle verwendet wird, während im Großhirn häufiger die Polyadenylierungsstelle des 3'-terminalen Exons Verwendung findet (Zhang et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit fand sich für den hOX₂R-Wildtyp eine höhere Expression im Gehirn, die hOX₂R-Splicevariante war in der Lunge höher exprimiert. Aufgrund der gewebespezifischen Bevorzugung promotorproximaler oder promotordistaler Polyadenylierungsstellen vermuten Zhang et al. statt einer gen- eher eine gewebespezifische Form der Regulation der Polyadenylierung, der folglich auch hOX₂-Rezeptorvarianten unterworfen sein könnten.

Über diese allgemeine Hypothese hinausgehend konnte eine außergewöhnliche Form der Regulation des Spleißens zusammengesetzter Exons vor kurzem in neuronalen Zellen gezeigt werden. Polyadenylierung und Spleißen des postsynaptischen Faltungsproteins vesl-1/homer, dessen Gen als fünftes Exon ein zusammengesetztes Exon enthält, erfolgen in neuronalen Zellen in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität (Bottai et al., 2002; Niibori et al., 2007). Durch einen noch unbekanntem Mechanismus fördert neuronale Aktivität während der Transkription die Spaltung des Primärtranskriptes an der promotorproximalen Polyadenylierungsstelle. Dadurch wird die Bildung eines Transkriptes, das an der distalen Polyadenylierungsstelle endet, verhindert. Bei fehlender neuronaler Erregung dagegen wird die Polyadenylierungsstelle durch Spleißen entfernt und es entsteht ein längeres Transkript, das an der distalen Polyadenylierungsstelle endet. In neuronalen Zellen wäre demnach auch eine Regulation des mRNA-Verhältnisses von hOX₂R-Splicevariante zu hOX₂R-Wildtyp in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität denkbar.

Zusammenfassend eröffnen die erörterten Regulationsmechanismen neben der bisher bekannten, eher schnell wirksamen OX₂-Rezeptor-vermittelten Aktivierung orexinergere Neurone im Sinne einer positiven Rückkopplung (Yamanaka et al., 2010) neue, durch Regulation des mRNA-Verhältnisses zeitlich eher mittelfristig wirksame Kontrollmöglichkeiten hOX₂-Rezeptor-vermittelter Funktionen. Darüber hinaus könnten die das Verhältnis von hOX₂R-Splicevariante zu hOX₂R-Wildtyp regulierenden Mechanismen eine Rolle in der Pathophysiologie der Narkolepsie spielen, da das Krankheitsbild bei Patienten ohne erniedrigte Liquor-Orexinspiegel möglicherweise durch eine zu hohe Expression der hOX₂R-Splicevariante erklärt werden könnte.

4.3 Ist das Fehlen eines ER-Exportmotivs für die Retention der hOX₂R-Splicevariante im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich?

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das fluoreszierende Fusionsprotein des hOX₂R-Wildtyps (hOX₂R-WT-EYFP-Fusionsprotein) überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert war, während das fluoreszierende Fusionsprotein der hOX₂R-Splicevariante (hOX₂R-SV-EYFP-Fusionsprotein) im endoplasmatischen Retikulum exprimiert wurde. Diese Ergebnisse wurden durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen in CHO-Zellen, die beide Rezeptorvarianten in ihrer nativen Form exprimierten, bestätigt (Kühl, 2008). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass sich die hOX₂R-Fusionsproteine hinsichtlich ihrer intrazellulären Lokalisierung von den nativen hOX₂R-Proteinen nicht unterscheiden. Die fehlende Expression der hOX₂R-Splicevariante in der Plasmamembran erklärt darüber hinaus die ausbleibende Calciumantwort nach Applikation einer Orexin-A-Lösung in CHO-Zellen oder *Xenopus*-Oozyten, die nur die hOX₂R-Splicevariante exprimierten.

Interessanterweise sind bei narkoleptischen Hunden zwei verschiedene *Exon-skipping* OX₂-Rezeptormutanten bekannt (Lin et al., 1999), die bei Expression in HEK-293-Zellen ebenfalls nicht in der Plasmamembran, sondern überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert sind und nach Applikation von Orexin A oder B keine Calciumantwort zeigen (Hungs et al., 2001). Das Protein der in Dobermännern identifizierten OX₂-Rezeptormutante besteht wahrscheinlich aus vier Transmembrandomänen, während die in Labradoren gefundene Rezeptormutante für ein verkürztes OX₂-Rezeptorprotein mit sechs Transmembrandomänen kodiert. Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse bestätigen, dass wie von Hungs et al. für den OX₂-Rezeptor des Hundes vorgeschlagen, auch beim humanen OX₂-Rezeptor Sequenzen in der letzten extrazellulären Schleife, der siebten Transmembrandomäne oder der C-terminalen Region für den Export des hOX₂-Rezeptorproteins an die Zelloberfläche notwendig sind.

Insbesondere dem intrazellulären C-Terminus kommt auch bei anderen Mitgliedern der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Rezeptorexportes aus dem endoplasmatischen Retikulum zu. Verkürzungen im Bereich des C-Terminus unter Beteiligung des membranproximalen Anteils führten unter anderem zur intrazellulären Retention des A₁-Adenosinrezeptors (Pankevych et al., 2003), des LH-Rezeptors (Rodriguez et al., 1992), des α_{2B} -adrenergen-Rezeptors und des Angio-

tensin-II-Typ-1A-Rezeptors der Ratte (Duvernay et al., 2004; Duvernay et al., 2009) sowie zur intrazellulären Retention des humanen V_2 -Vasopressinrezeptors (Oksche et al., 1998). Mit Hilfe von Mutagenesestudien ließen sich im membranproximalen Anteil des C-Terminus G-Protein-gekoppelter Rezeptoren verschiedene ER-Exportmotive identifizieren (Schülein et al., 1998; Bermak et al., 2001; Duvernay et al., 2004; Robert et al., 2005), die innerhalb der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren teilweise hoch konserviert sind (Probst et al., 1992; Schülein et al., 1998; Krause et al., 2000; Duvernay et al., 2004). Mutationen innerhalb dieser Motive führten zu einem hochgradig im endoplasmatischen Retikulum retinierten und funktionsunfähigen Rezeptor, wobei die der Retention zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch unvollständig geklärt sind. Während das im C-Terminus des V_2 -Vasopressinrezeptors lokalisierte $E(x_3)LL$ -Motiv direkt an der korrekten Faltung der Vasopressinrezeptoren im endoplasmatischen Retikulum beteiligt ist und dadurch ihren ER-Export ermöglicht, scheinen andere Exportmotive wie das $F(X)_3F(X)_3F$ -Motiv, das $FN(x_2)LL(x_3)L$ -Motiv oder das $F(x_6)LL$ -Motiv eher als unabhängige ER-Exportsignale zu wirken, da sich ihre Exporteigenschaften auf Proteine, die normalerweise im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten werden, übertragen lassen (Bermak et al., 2001; Duvernay et al., 2004; Robert et al., 2005).

Für das erstmals in D_1 -Dopaminrezeptoren näher charakterisierte Tripel-Phenylalanin- $[F(X)_3F(X)_3F]$ -ER-Exportsignal konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der ER-Export der D_1 -Dopaminrezeptorproteine durch Bindung des Exportmotivs an das in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisierte Chaperonprotein DRIP-78 (*dopamine-receptor-interacting protein of 78 kDa*) reguliert wird. Die Mutation eines einzelnen Phenylalaninrestes des $[F(X)_3F(X)_3F]$ -Motivs führt zu Verlust der Bindung an DRIP-78 und verhindert durch Retention der D_1 -Dopaminrezeptoren im endoplasmatischen Retikulum ihre Expression an der Plasmamembran nahezu vollständig (Bermak et al., 2001). Wie durch zunehmende Verkürzung des C-Terminus des A_1 -Adenosinrezeptors gezeigt werden konnte, scheint das $F(X)_3F(X)_3F$ -ER-Exportmotiv in leicht modifizierter Form ($F(X)_3F(X)_3W$ oder $F(X)_3W(X)_3F$) auch bei diesem Rezeptor den ER-Export zu ermöglichen (Pankevych et al., 2003).

Interessanterweise findet sich das Tripel-Phenylalanin- $[F(X)_3F(X)_3F]$ -ER-Exportsignal in der Aminosäuresequenz des hOX_2R -Wildtyps an Position 370-378, während es in der Aminosäuresequenz der hOX_2R -Splicevariante nicht vorhanden ist (Abb. 4-1). In Analogie zum D_1 -Dopamin- sowie zum A_1 -Adenosinrezeptor wäre es deshalb vorstellbar, dass bei OX_2 -Rezeptoren das Fehlen des Tripel-Phenylalanin- $[F(X)_3F(X)_3F]$ -ER-Exportmotivs

in der hOX₂R-Splicevariante für ihre Retention im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich sein könnte.

		251		300
Zebrafisch	(250)	LWCQQIPGSSSVLQRQWKSLQCSAHAVGSGESVKVRTSTVSAEAKQVKAR		
Rind	(250)	LWCRQIPGTSSVVQRKWKALQPLSQPRGPGQQTKSRISAVAAEIKQIRAR		
Schwein	(250)	LWCRQIPGTSSVVQRKWKPLQPVSQPRGPGQQTKSRISAVAAEIKQIRAR		
Maus	(250)	LWCRQIPGTSSVVQRKWKQQQPVSQPRGSGQQSKARISAVAAEIKQIRAR		
Hund	(250)	LWCRQIPGTSSVVQRKWKPLQPASQPRGPGQQTKSRISAVAAEIKQIRAR		
Mensch (hOX ₂ R-WT)	(250)	LWCRQIPGTSSVVQRKWKPLQPVSQPRGPGQQTKSRMSAVAAEIKQIRAR		
Mensch (hOX ₂ R-SV)	(250)	LWCRQVYSFKYFACIIPPHIICYLLFLPNILSVLFF-----		
		301		350
Zebrafisch	(300)	RKTARMLMVLLVFVFCALCYLPISILNIMKRVFAGFKNTGNRETVYAWFTFS		
Rind	(300)	RKTARMLMVLLVFAICYLPISILNVLKRVFGMFTHTEDRETVYAWFTFA		
Schwein	(300)	RKTARMLMVLLVFAICYLPISILNVLKRVFGMFTHTEDRETVYAWFTFS		
Maus	(300)	RKTARMLMVLLVFAICYLPISILNVLKRVFGMFTHTEDRETVYAWFTFS		
Hund	(300)	RKTARMLMVLLVFAICYLPISILNVLKRVFGMFTHTEDRETVYAWFTFS		
Mensch (hOX ₂ R-WT)	(300)	RKTARMLMVLLVFAICYLPISILNVLKRVFGMFAHTEDRETVYAWFTFS		
Mensch (hOX ₂ R-SV)	(286)	-----		
		351		400
Zebrafisch	(350)	HWLIYANSAANPIIYNFLSGK FREEFKAAF ICQCSGRGETHKQR- ARGRT -/-		
Rind	(350)	HWLVIYANSAANPIIYNFLSGK FREEFKAAF SCCCLGVHHRQEDRLA RGRT -/-		
Schwein	(350)	HWLVIYANSAANPIIYNFLSGK FREEFKAAF SCCCLGVHHRQEDRLA RGRT -/-		
Maus	(350)	HWLVIYANSAANPIIYNFLSGK FREEFKAAF S-CCLGVHHRQGDRLA RGRT -/-		
Hund	(350)	HWLVIYANSAANPIIYNFLSGK FREEFKAAF SCCCLGVHHRQEDRLT RGRT -/-		
Mensch (hOX ₂ R-WT)	(350)	HWLVIYANSAANPIIYNFLSGK FREEFKAAF SCCCLGVHHRQEDRLT RGRT -/-		
Mensch (hOX ₂ R-SV)	(286)	-----		

Abbildung 4-1 Das Tripel-Phenylalanin-[F(X)₃F(X)₃F]-ER-Exportmotiv und das RXR-ER-Rentionsmotiv sind in der Aminosäuresequenz des OX₂-Rezeptors verschiedener Spezies hoch konserviert. In der Aminosäuresequenz der hOX₂R-Splicevariante sind beide Motive nicht vorhanden, da die Aminosäuresequenz der hOX₂R-Splicevariante an Position 286 endet.

4.4 Dominant-negativer Effekt der hOX₂R-Splicevariante auf den hOX₂R-Wildtyp

Die Calciumantwort nach Orexin-A-Applikation war bei Koexpression der beiden hOX₂-Rezeptorvarianten in allen drei Expressionssystemen signifikant geringer als bei alleiniger Expression des hOX₂R-Wildtyps. Dies lässt sich durch eine dominant-negative Wirkung der hOX₂R-Splicevariante auf den hOX₂R-Wildtyp erklären. Inzwischen wurde mittels

BRET für den hOX₂R-Wildtyp Homodimerisierung nachgewiesen (Kühl, 2008), so dass Heterodimerisierung des hOX₂R-Wildtyps mit der hOX₂R-Splicevariante ebenfalls möglich erscheint und in ersten Versuchen bereits gezeigt wurde (Theil und Jöhren, unveröffentlichte Ergebnisse). Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, kann Heterodimerisierung zu Veränderungen der Ligandenbindung, der Signaltransduktion, den Internalisierungseigenschaften oder des Rezeptortransports vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran führen. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass die hOX₂R-Splicevariante nicht in der Plasmamembran exprimiert wird, ist es kaum vorstellbar, dass der dominant-negative Effekt durch veränderte Ligandenaffinität oder eine veränderte Signaltransduktion eines Heterodimers aus hOX₂R-Splicevariante und hOX₂R-Wildtyp zustande kommt. Auch die Möglichkeit, dass die beiden Rezeptorvarianten als Monomere unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren, die sich gegenseitig beeinflussen, ist durch die fehlende Expression der Splicevariante an der Zelloberfläche nahezu ausgeschlossen. Wie für andere C-terminal-verkürzte Splicevarianten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren bekannt (Seck et al., 2003; Bakker et al., 2006; van Rijn et al., 2008), wäre es jedoch denkbar, dass die hOX₂R-Splicevariante den hOX₂R-Wildtyp im endoplasmatischen Retikulum zurückhält. Die bei Koexpression der beiden hOX₂-Rezeptorvarianten verringerte Calciumantwort käme folglich durch eine verminderte Expression des hOX₂R-Wildtyps in der Plasmamembran zustande.

Prinzipiell kann die Retention von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Apparat auf inkorrekt gefalteter Proteinfaltung (Ellgaard und Helenius, 2003; Dong et al., 2007), dem Fehlen eines Exportmotivs (vgl. Kapitel 4.3) und bei Heterodimeren zusätzlich auf fehlender Maskierung eines Retentionsmotivs (Margeta-Mitrovic et al., 2000) beruhen. Interessanterweise konnte für verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bei Koexpression des Rezeptorwildtyps mit einer Rezeptormutante, deren C-terminales Exportmotiv mutiert wurde, ein dominant-negativer Effekt der Rezeptormutante auf die Expression des Rezeptorwildtyps an der Zelloberfläche gefunden werden (Salahpour et al., 2004; Zhou et al., 2006; Zhang et al., 2009). Als Ursache dieser dominant-negativen Wirkung wurde von allen drei Arbeitsgruppen Heterodimerbildung zwischen Rezeptorwildtyp und Rezeptormutante gefunden. Unter den verschiedenen bisher identifizierten ER-Retentionsmotiven wurde das in ATP-sensitiven Kaliumkanälen erstmals charakterisierte, auf Arginin basierende RXR(R)-ER-Retentionsmotiv (Zerangue et al., 1999) am intensivsten in GABA_B-Rezeptoren untersucht. Es befindet sich als RSRR-Motiv im intrazellulären C-Terminus des GABA_{B1}-Rezeptors und bewirkt die Retention

des GABA_{B1}-Rezeptors im endoplasmatischen Retikulum (Margeta-Mitrovic et al., 2000; Pagano et al., 2001). Der GABA_{B1}-Rezeptor wird nur als Heterodimer mit dem GABA_{B2}-Rezeptor an die Zelloberfläche transportiert. Die der Maskierung des Retentionsmotivs zugrunde liegenden molekularen Mechanismen durch den GABA_{B2}-Rezeptor sind jedoch nur unvollständig geklärt (Pagano et al., 2001; Gassmann et al., 2005).

Beide Prinzipien der Retention, sowohl Exposition eines ER-Retentionsmotivs als auch Mutation eines ER-Exportmotivs, konnten von Salahpour et al. in β -Rezeptoren gezeigt werden (Salahpour et al., 2004). β -Rezeptormutanten, deren C-terminales Ende durch das des GABA_{B1}-Rezeptors ersetzt wurde, aber auch β -Rezeptormutanten, deren intrinsisches Tripel-Phenylalanin-ER-Exportmotiv mutiert wurde, werden nicht an die Plasmamembran transportiert. Koexpression des β -Rezeptorwildtyps mit jeweils einer der beiden Rezeptormutanten führte in beiden Fällen zur intrazellulären Retention des β -Rezeptorwildtyps. Dieser Effekt wird von Salahpour et al. durch Heterodimerisierung des β -Rezeptorwildtyps mit den β -Rezeptormutanten, die mittels BRET gezeigt wurde, erklärt. Übereinstimmend mit dieser Interpretation beeinträchtigt die Unterbrechung eines Glycophorin-ähnlichen Dimerisierungsmotivs [276G(X)₃G(X)₃284L] sowohl die Dimerisierung des β -Rezeptors als auch seine Expression an der Zelloberfläche.

Der hOX₂R-Wildtyp enthält neben dem bereits erwähnten Tripel-Phenylalanin-[F(X)₃F(X)₃F]-ER-Exportsignal an Position 370-378 auch ein RXR-ER-Retentionsmotiv (RGR) an Position 396-398, das in der hOX₂R-Splicevariante ebenfalls nicht vorhanden ist (Abb. 4-1). In Analogie zum β -Rezeptor und seinen beiden Mutanten wäre es deshalb vorstellbar, dass diesen Motiven eine wichtige Rolle in der Regulation des hOX₂-Rezeptortransportes an die Plasmamembran zukommt. Während durch das Vorhandensein des RXR-ER-Retentionssignals in der Aminosäuresequenz des hOX₂R-Wildtyps sowohl die Expression des hOX₂-WT-Homodimers (das Retentionssignal wäre maskiert) als auch die Retention des hOX₂-WT-SV-Heterodimers (das Retentionssignal wäre demaskiert) erklärt werden könnte, ist dieses Modell allein nicht ausreichend, die Retention der hOX₂R-SV-Homodimere (kein Retentionssignal vorhanden) zu erklären. Wie in Abbildung 4-1 erläutert und für Heterodimere aus β -Rezeptorwildtyp und β -Rezeptormutante mit mutiertem Tripel-Phenylalanin-ER-Exportmotiv gezeigt, könnte jedoch das Fehlen des Tripel-Phenylalanin-ER-Exportmotivs in der Aminosäuresequenz der hOX₂R-Splicevariante alle drei verschiedenen Expressionsmuster erklären und sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

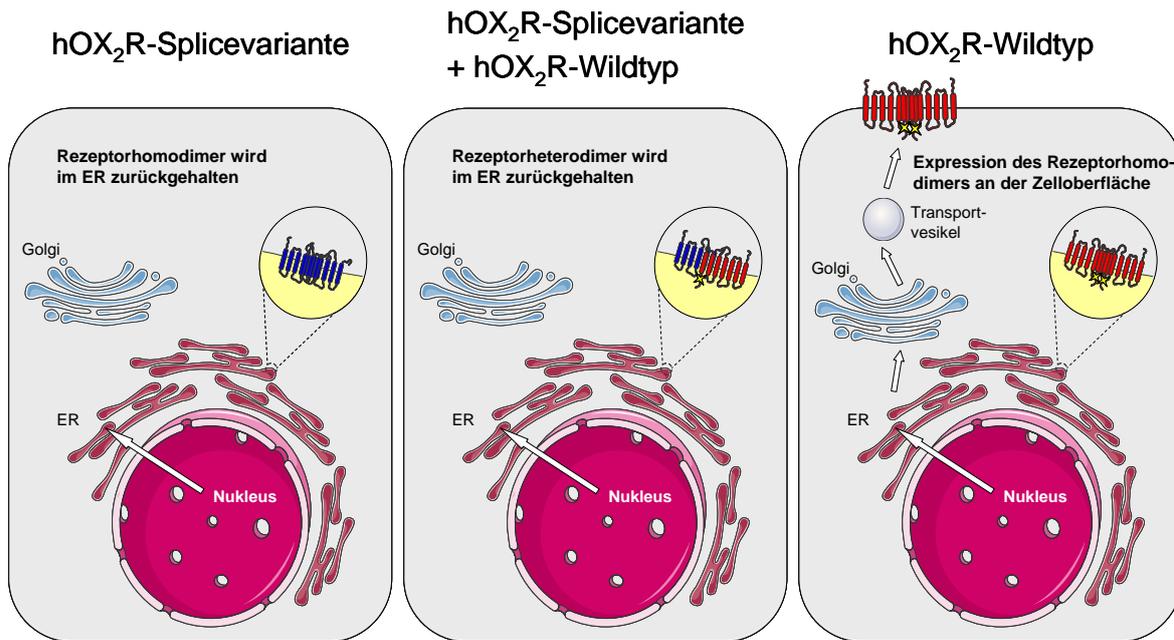


Abbildung 4-2 Dominant-negativer Effekt der hOX₂R-Splicevariante. Wenn die hOX₂R-Splicevariante allein exprimiert wird, so wird sie im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten. Bei Koexpression mit dem hOX₂R-Wildtyp übt sie einen dominant-negativen Effekt auf diesen aus. Dieser Effekt könnte durch Heterodimerisierung und dadurch bedingte Retention des hOX₂R-Wildtyps im ER zustande kommen. Bei alleiniger Expression wird der hOX₂R-Wildtyp als Homodimer an der Zelloberfläche exprimiert (nach Bouvier, 2001).

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals eine dominant-negative Wirkung der vor kurzem isolierten hOX₂R-Splicevariante auf den hOX₂R-Wildtyp nachgewiesen werden. In Analogie zu anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptorvarianten legen 1.) Homodimerisierung des hOX₂-Rezeptorwildtyps (Kühl, 2008), 2.) die ausschließliche Lokalisation der hOX₂R-Splicevariante im endoplasmatischen Retikulum sowie 3.) das Fehlen eines ER-Exportmotivs in der Aminosäuresequenz der hOX₂R-Splicevariante die Vermutung nahe, dass der dominant-negative Effekt auf einer Heterodimerisierung der beiden Rezeptorvarianten, die zu einer Retention des hOX₂-Rezeptorwildtyps im endoplasmatischen Retikulum führt, beruhen könnte.

Erste Versuche mit unterschiedlich fluoreszierenden Fusionsproteinen der hOX₂R-Splicevariante und des hOX₂R-Wildtyps deuten darauf hin, dass die hOX₂R-Splicevariante bei Koexpression mit dem hOX₂R-Wildtyp tatsächlich eine verringerte Expression des hOX₂R-Wildtyps an der Zelloberfläche zur Folge hat. Die einfache Betrachtung der fluoreszierenden Fusionsproteine mittels konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie erlaubt jedoch nur eine qualitative Aussage. Zur Quantifizierung des beobachteten Effektes sollten

deshalb weitere Methoden, wie zum Beispiel eine quantitative Bestimmung der in der Plasmamembran exprimierten hOX₂-Rezeptorvarianten mit einem Plasmamembran-*Sheet-Assay* (Knight und Olson, 2003), herangezogen werden. Zum Nachweis der Heterodimerisierung der hOX₂R-Splicevariante mit dem hOX₂R-Wildtyp wären Koimmunopräzipitation in Kombination mit FRET oder BRET geeignete und anerkannte Methoden (Milligan und Bouvier, 2005). Mutagenesestudien würden darüber hinaus Aussagen über die funktionelle Bedeutung der in der Aminosäuresequenz der hOX₂-Rezeptorvarianten identifizierten Export- und Retentionsmotive erlauben. Für die Anerkennung als hOX₂R-WT-SV-Heterodimer nach den Kriterien der NC-IUPHAR müsste in weiteren Experimenten außerdem der Nachweis der Dimerisierung und des dominant-negativen Effektes in nativem Gewebe erbracht werden (Pin et al., 2007).

Da Heterodimerisierung zwischen dem OX₂- und dem OX₁-Rezeptor beschrieben wurde (Dalrymple et al., 2003), könnte mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden untersucht werden, ob die hOX₂R-Splicevariante bei Koexpression mit dem hOX₁-Rezeptor dessen Funktion ebenfalls beeinflusst.

Des Weiteren wäre es interessant, das Verhältnis von hOX₂R-Splicevariante und hOX₂R-Wildtyp in verschiedenen Hirnregionen, anderen Zelllinien und in weiteren peripheren Organen auch in Hinblick auf eine mögliche pathophysiologische Relevanz bei der Narkolepsie zu quantifizieren. Calciummessungen in NCI-H295R-Zellen nach siRNA-Suppression der hOX₂R-Splicevariante zeigten im Vergleich zu unbehandelten NCI-H295R-Zellen wahrscheinlich aufgrund einer zu geringen Expression der hOX₂R-Splicevariante keine signifikanten Unterschiede und sollten in Zellen, die ein höheres Verhältnis von hOX₂R-Splicevariante zu hOX₂R-Wildtyp aufweisen, wiederholt werden. Von besonderem Interesse sind natürlich die das Verhältnis von hOX₂R-Splicevariante und hOX₂R-Wildtyp regulierenden Mechanismen, da Kenntnisse hierüber zum Verständnis der physiologischen Funktion der hOX₂R-Splicevariante beitragen könnten.

5 Zusammenfassung

Orexin A und B sind Neuropeptid-Hormone, die eine Rolle bei der Regulation des Essverhaltens, des Schlaf- und Wachverhaltens, neuroendokriner Funktionen und des autonomen Nervensystems spielen. Sie werden im Hypothalamus aus dem gemeinsamen Vorläufer Präpro-Orexin gebildet und führen nach Bindung an die G_q-Protein-gekoppelten Rezeptoren OX₁- und OX₂-Rezeptor zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.

Durch Klonierung wurde am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck vor kurzem eine neue Splice-Variante (hOX₂R-Splicevariante) des humanen OX₂-Rezeptors (hOX₂R-Wildtyp) isoliert, die eine alternative, nicht homologe sechste und keine siebte Transmembrandomäne besitzt.

In der vorliegenden Arbeit konnte die mRNA dieser neu entdeckten hOX₂R-Splicevariante mittels quantitativer *real-time*-PCR erstmalig beim Menschen in Gehirn und Lunge nachgewiesen werden. Mit Hilfe konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie zeigte sich, dass der hOX₂R-Wildtyp überwiegend in der Plasmamembran exprimiert wurde, während die hOX₂R-Splicevariante ausschließlich im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert war.

Beide hOX₂-Rezeptorvarianten wurden in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert und mit Hilfe der *Voltage-Clamp*-Methode untersucht. Koexpression des hOX₂R-Wildtyps und der hOX₂R-Splicevariante führte im Vergleich zu alleiniger Expression des hOX₂R-Wildtyps zu einer signifikanten Reduktion Orexin-A-induzierter Chloridströme. Eine ähnliche Wirkung der hOX₂R-Splicevariante auf den hOX₂R-Wildtyp zeigte sich in NCI-H295R- und CHO-Zellen, bei denen die intrazelluläre Calciumkonzentration mit Hilfe eines fluoreszierenden Calciumindikators gemessen wurde. Die Calciumantwort nach Gabe von Orexin A wurde abhängig von der Höhe der Expression der hOX₂R-Splicevariante in NCI-H295R-Zellen um bis zu 47 % reduziert und in CHO-Zellen nahezu vollständig supprimiert.

Damit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig mit unterschiedlichen Methoden in drei verschiedenen Expressionssystemen ein dominant-negativer Effekt der hOX₂R-Splicevariante auf den hOX₂R-Wildtyp nachgewiesen werden. Das Fehlen eines Triphenylalanin-ER-Exportmotivs in der Aminosäuresequenz der hOX₂R-Splicevariante könnte für die Retention der hOX₂R-Splicevariante im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich sein und unter der Annahme von Heterodimerbildung auch den dominant-negativen Effekt der hOX₂R-Splicevariante auf den hOX₂R-Wildtyp erklären.

6 Literaturverzeichnis

Agnati, L. F., Fuxe, K., Zoli, M., Rondanini, C., Ogren, S. O. (1982). New vistas on synaptic plasticity: the receptor mosaic hypothesis of the engram. *Med Biol* 60, 183-90.

Ammoun, S., Holmqvist, T., Shariatmadari, R., Oonk, H. B., Detheux, M., Parmentier, M., Akerman, K. E., Kukkonen, J. P. (2003). Distinct recognition of OX1 and OX2 receptors by orexin peptides. *J Pharmacol Exp Ther* 305, 507-14.

Ammoun, S., Johansson, L., Ekholm, M. E., Holmqvist, T., Danis, A. S., Korhonen, L., Sergeeva, O. A., Haas, H. L., Akerman, K. E., Kukkonen, J. P. (2006a). OX1 orexin receptors activate extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells via multiple mechanisms: the role of Ca²⁺ influx in OX1 receptor signaling. *Mol Endocrinol* 20, 80-99.

Ammoun, S., Lindholm, D., Wootz, H., Akerman, K. E., Kukkonen, J. P. (2006b). G-protein-coupled OX1 orexin/hcrtr-1 hypocretin receptors induce caspase-dependent and -independent cell death through p38 mitogen-/stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 281, 834-42.

Angers, S., Salahpour, A., Bouvier, M. (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 409-35.

Anthony, T. L., Fujino, H., Pierce, K. L., Yool, A. J., Regan, J. W. (2002). Differential regulation of Ca(2+)-dependent Cl⁻ currents by FP prostanoid receptor isoforms in *Xenopus* oocytes. *Biochem Pharmacol* 63, 1797-806.

Bakker, R. A., Lozada, A. F., van Marle, A., Shenton, F. C., Drutel, G., Karlstedt, K., Hoffmann, M., Lintunen, M., Yamamoto, Y., van Rijn, R. M., Chazot, P. L., Panula, P., Leurs, R. (2006). Discovery of naturally occurring splice variants of the rat histamine H3 receptor that act as dominant-negative isoforms. *Mol Pharmacol* 69, 1194-206.

Barnard, E. A., Miledi, R., Sumikawa, K. (1982). Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 215, 241-6.

Bermak, J. C., Li, M., Bullock, C., Zhou, Q. Y. (2001). Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol* 3, 492-8.

Borgland, S. L., Taha, S. A., Sarti, F., Fields, H. L., Bonci, A. (2006). Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron* 49, 589-601.

Boton, R., Dascal, N., Gillo, B., Lass, Y. (1989). Two calcium-activated chloride conductances in *Xenopus laevis* oocytes permeabilized with the ionophore A23187. *J Physiol* 408, 511-34.

Bottai, D., Guzowski, J. F., Schwarz, M. K., Kang, S. H., Xiao, B., Lanahan, A., Worley, P. F., Seeburg, P. H. (2002). Synaptic activity-induced conversion of intronic to exonic sequence in Homer 1 immediate early gene expression. *J Neurosci* 22, 167-75.

- Bourgin, P., Zeitzer, J. M., Mignot, E. (2006).** Hypocretin Deficiency in Human Narcolepsy: Mutation Screening, Neuropathology, and CSF Hypocretin-1 Level. In: *The Orexin-Hypocretin System - Physiology and Pathophysiology*, pp. 269-286. Edited by S. Nishino and T. Sakurai. Humana, Totowa, 2006.
- Bouvier, M. (2001).** Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2, 274-86.
- Breit, A., Lagace, M., Bouvier, M. (2004).** Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties. *J Biol Chem* 279, 28756-65.
- Bulenger, S., Marullo, S., Bouvier, M. (2005).** Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* 26, 131-7.
- Calvin, N. M., Hanawalt, P. C. (1988).** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170, 2796-801.
- Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., Galletta, L. J. (2008).** TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322, 590-4.
- Charles, A. C., Mostovskaya, N., Asas, K., Evans, C. J., Dankovich, M. L., Hales, T. G. (2003).** Coexpression of delta-opioid receptors with micro receptors in GH3 cells changes the functional response to micro agonists from inhibitory to excitatory. *Mol Pharmacol* 63, 89-95.
- Chemelli, R. M., Willie, J. T., Sinton, C. M., Elmquist, J. K., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J. A., Williams, S. C., Xiong, Y., Kisanuki, Y., Fitch, T. E., Nakazato, M., Hammer, R. E., Saper, C. B., Yanagisawa, M. (1999).** Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98, 437-51.
- Chen, J., Karteris, E., Collins, D., Randeve, H. S. (2006).** Differential expression of mouse orexin receptor type-2 (OX2R) variants in the mouse brain. *Brain Res* 1103, 20-4.
- Chen, J., Randeve, H. S. (2004).** Genomic organization of mouse orexin receptors: characterization of two novel tissue-specific splice variants. *Mol Endocrinol* 18, 2790-804.
- Chen, J., Randeve, H. S. (2010).** Genomic organization and regulation of the human orexin (hypocretin) receptor 2 gene: identification of alternative promoters. *Biochem J* 427, 377-90.
- Cluderay, J. E., Harrison, D. C., Hervieu, G. J. (2002).** Protein distribution of the orexin-2 receptor in the rat central nervous system. *Regul Pept* 104, 131-44.
- Cutler, D. J., Morris, R., Sheridhar, V., Wattam, T. A., Holmes, S., Patel, S., Arch, J. R., Wilson, S., Buckingham, R. E., Evans, M. L., Leslie, R. A., Williams, G. (1999).** Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides* 20, 1455-70.
- Dalal, M. A., Schuld, A., Haack, M., Uhr, M., Geisler, P., Eisensehr, I., Noachtar, S., Pollmacher, T. (2001).** Normal plasma levels of orexin A (hypocretin-1) in narcoleptic patients. *Neurology* 56, 1749-51.

- Dalrymple, M., Kroeger, K., Seeber, R., Edine, K. (2003).** Use of BRET analysis to determine arrestin interactions, homo- and hetero-dimerisation between G protein-coupled receptors orexin type I and II. 85th Annual Endocrine Meeting. Poster P1-66.
- Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Nakazato, M. (1999).** Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 748-53.
- de la Peña, P., Delgado, L. M., del Camino, D., Barros, F. (1992).** Cloning and expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH3 rat anterior pituitary cells. *Biochem J* 284 (Pt 3), 891-9.
- de Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L., Gautvik, V. T., Bartlett, F. S., 2nd, Frankel, W. N., van den Pol, A. N., Bloom, F. E., Gautvik, K. M., Sutcliffe, J. G. (1998).** The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 322-7.
- DeFea, K. (2008).** Beta-arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1, S298-309.
- Di Virgilio, F., Steinberg, T. H., Silverstein, S. C. (1990).** Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers. *Cell Calcium* 11, 57-62.
- Digby, J. E., Chen, J., Tang, J. Y., Lehnert, H., Matthews, R. N., Randevara, H. S. (2006).** Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B. *J Endocrinol* 191, 129-36.
- Dong, C., Filipeanu, C. M., Duvernay, M. T., Wu, G. (2007).** Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1768, 853-70.
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. (1988).** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127-45.
- Drumm, M. L., Wilkinson, D. J., Smit, L. S., Worrell, R. T., Strong, T. V., Frizzell, R. A., Dawson, D. C., Collins, F. S. (1991).** Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* 254, 1797-9.
- Drummond, D. R., Armstrong, J., Colman, A. (1985).** The effect of capping and polyadenylation on the stability, movement and translation of synthetic messenger RNAs in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res* 13, 7375-94.
- Dube, M. G., Horvath, T. L., Kalra, P. S., Kalra, S. P. (2000).** Evidence of NPY Y5 receptor involvement in food intake elicited by orexin A in sated rats. *Peptides* 21, 1557-60.
- Dumont, J. N. (1972).** Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136, 153-79.
- Duvernay, M. T., Dong, C., Zhang, X., Zhou, F., Nichols, C. D., Wu, G. (2009).** Anterograde trafficking of G protein-coupled receptors: function of the C-terminal F(X)6LL motif in export from the endoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol* 75, 751-61.
- Duvernay, M. T., Zhou, F., Wu, G. (2004).** A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J Biol Chem* 279, 30741-50.

- Edwards-Gilbert, G., Veraldi, K. L., Milcarek, C. (1997).** Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res* 25, 2547-61.
- Ekholm, M. E., Johansson, L., Kukkonen, J. P. (2007).** IP3-independent signalling of OX1 orexin/hypocretin receptors to Ca²⁺ influx and ERK. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 475-80.
- Ellgaard, L., Helenius, A. (2003).** Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-91.
- Ellis, J., Pediani, J. D., Canals, M., Milasta, S., Milligan, G. (2006).** Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J Biol Chem* 281, 38812-24.
- España, R. A., Baldo, B. A., Kelley, A. E., Berridge, C. W. (2001).** Wake-promoting and sleep-suppressing actions of hypocretin (orexin): basal forebrain sites of action. *Neuroscience* 106, 699-715.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987).** Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7.
- Foord, S. M., Bonner, T. I., Neubig, R. R., Rosser, E. M., Pin, J. P., Davenport, A. P., Spedding, M., Harmar, A. J. (2005).** International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* 57, 279-88.
- Fuxe, K., Marcellino, D., Guidolin, D., Woods, A. S., Agnati, L. F. (2008).** Heterodimers and receptor mosaics of different types of G-protein-coupled receptors. *Physiology (Bethesda)* 23, 322-32.
- Gassmann, M., Haller, C., Stoll, Y., Aziz, S. A., Biermann, B., Mosbacher, J., Kaupmann, K., Bettler, B. (2005).** The RXR-type endoplasmic reticulum-retention/retrieval signal of GABAB1 requires distant spacing from the membrane to function. *Mol Pharmacol* 68, 137-44.
- Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A., La Rocca, R. V. (1990).** Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* 50, 5488-96.
- Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W. N., Bishop-Stewart, J., Gray, D., Johnson, I. (2000).** Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 27, 97-106.
- George, S. R., Fan, T., Xie, Z., Tse, R., Tam, V., Varghese, G., O'Dowd, B. F. (2000).** Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* 275, 26128-35.
- Georgescu, D., Zachariou, V., Barrot, M., Mieda, M., Willie, J. T., Eisch, A. J., Yanagisawa, M., Nestler, E. J., DiLeone, R. J. (2003).** Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *J Neurosci* 23, 3106-11.
- González-Maeso, J., Ang, R. L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N. V., Lopez-Gimenez, J. F., Zhou, M., Okawa, Y., Callado, L. F., Milligan, G., Gingrich, J. A., Filizola, M., Meana, J. J., Sealfon, S. C. (2008).** Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* 452, 93-7.

- González-Maeso, J., Weisstaub, N. V., Zhou, M., Chan, P., Ivic, L., Ang, R., Lira, A., Bradley-Moore, M., Ge, Y., Zhou, Q., Sealfon, S. C., Gingrich, J. A. (2007).** Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron* 53, 439-52.
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R., Marbaix, G. (1971).** Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233, 177-82.
- Hagan, J. J., Leslie, R. A., Patel, S., Evans, M. L., Wattam, T. A., Holmes, S., Benham, C. D., Taylor, S. G., Routledge, C., Hemmati, P., Munton, R. P., Ashmeade, T. E., Shah, A. S., Hatcher, J. P., Hatcher, P. D., Jones, D. N., Smith, M. I., Piper, D. C., Hunter, A. J., Porter, R. A., Upton, N. (1999).** Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10911-6.
- Hague, C., Uberti, M. A., Chen, Z., Hall, R. A., Minneman, K. P. (2004).** Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 279, 15541-9.
- Hansen, J. L., Theilade, J., Haunso, S., Sheikh, S. P. (2004).** Oligomerization of wild type and nonfunctional mutant angiotensin II type I receptors inhibits galphaq protein signaling but not ERK activation. *J Biol Chem* 279, 24108-15.
- Hansen, K. B., Bräuner-Osborne, H. (2009).** Xenopus oocyte electrophysiology in GPCR drug discovery. *Methods Mol Biol* 552, 343-57.
- Harris, G. C., Wimmer, M., Aston-Jones, G. (2005).** A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437, 556-9.
- Haynes, A. C., Jackson, B., Overend, P., Buckingham, R. E., Wilson, S., Tadayyon, M., Arch, J. R. (1999).** Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20, 1099-105.
- Heinonen, M. V., Purhonen, A. K., Makela, K. A., Herzig, K. H. (2008).** Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta Physiol (Oxf)* 192, 471-85.
- Herlyn, P. (2005).** Quantifizierung von Orexinrezeptoren in definierten Hirnkernen sowie Aktivierung einzelner Neurone nach Orexin-Injektion in den Locus coeruleus der Ratte. *Med. Diss., Lübeck*.
- Hervieu, G. J., Cluderay, J. E., Harrison, D. C., Roberts, J. C., Leslie, R. A. (2001).** Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 103, 777-97.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993).** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11, 1026-30.
- Hille, B. (1992).** Chapter 2 Classical Biophysics of the Squid Giant Axon. In: *Ion Channels of Excitable Membranes*, pp. 25-59. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 1992.
- Holmqvist, T., Akerman, K. E., Kukkonen, J. P. (2002).** Orexin signaling in recombinant neuron-like cells. *FEBS Lett* 526, 11-4.

- Holmqvist, T., Johansson, L., Ostman, M., Ammoun, S., Akerman, K. E., Kukkonen, J. P. (2005).** OX1 orexin receptors couple to adenylyl cyclase regulation via multiple mechanisms. *J Biol Chem* 280, 6570-9.
- Hungs, M., Fan, J., Lin, L., Lin, X., Maki, R. A., Mignot, E. (2001).** Identification and functional analysis of mutations in the hypocretin (orexin) genes of narcoleptic canines. *Genome Res* 11, 531-9.
- Ida, T., Nakahara, K., Katayama, T., Murakami, N., Nakazato, M. (1999).** Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats. *Brain Res* 821, 526-9.
- Johansson, L., Ekholm, M. E., Kukkonen, J. P. (2008).** Multiple phospholipase activation by OX(1) orexin/hypocretin receptors. *Cell Mol Life Sci* 65, 1948-56.
- Jöhren, O., Bruggemann, N., Dominiak, P. (2004).** Orexins (hypocretins) and adrenal function. *Horm Metab Res* 36, 370-5.
- Jöhren, O., Neidert, S. J., Kummer, M., Dendorfer, A., Dominiak, P. (2001).** Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142, 3324-31.
- Jones, D. N., Gartlon, J., Parker, F., Taylor, S. G., Routledge, C., Hemmati, P., Munton, R. P., Ashmeade, T. E., Hatcher, J. P., Johns, A., Porter, R. A., Hagan, J. J., Hunter, A. J., Upton, N. (2001).** Effects of centrally administered orexin-B and orexin-A: a role for orexin-1 receptors in orexin-B-induced hyperactivity. *Psychopharmacology (Berl)* 153, 210-8.
- Jordan, B. A., Devi, L. A. (1999).** G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399, 697-700.
- Jordan, B. A., Trapaidze, N., Gomes, I., Nivarthi, R., Devi, L. A. (2001).** Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 343-8.
- Karteris, E., Chen, J., Randeva, H. S. (2004).** Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1957-62.
- Karteris, E., Machado, R. J., Chen, J., Zervou, S., Hillhouse, E. W., Randeva, H. S. (2005).** Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E1089-100.
- Karteris, E., Randeva, H. S., Grammatopoulos, D. K., Jaffe, R. B., Hillhouse, E. W. (2001).** Expression and coupling characteristics of the CRH and orexin type 2 receptors in human fetal adrenals. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4512-9.
- Kaufman, D. L., Evans, G. A. (1990).** Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *Biotechniques* 9, 304-6.
- Keren, H., Lev-Maor, G., Ast, G. (2010).** Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet* 11, 345-55.
- Kilpatrick, G. J., Dautzenberg, F. M., Martin, G. R., Eglen, R. M. (1999).** 7TM receptors: the splicing on the cake. *Trends Pharmacol Sci* 20, 294-301.

- Kirchgessner, A. L., Liu, M. (1999).** Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 24, 941-51.
- Knight, J. B., Olson, A. L. (2003).** Visualization and quantitation of integral membrane proteins using a plasma membrane sheet assay. *Methods Mol Med* 83, 113-8.
- Knopp, C. A., Dendorfer, A., Wenzel, J., Terlau, H., Dominiak, P., Jöhren, O. (2008).** Isolierung und Charakterisierung einer neuen dominant-negativen Splice-Variante des humanen Orexin-Typ-2-Rezeptors. 49. Jahrestagung der DGPT. Poster A 37.
- Kobilka, B. K. (2007).** G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 1768, 794-807.
- Krause, G., Hermosilla, R., Oksche, A., Rutz, C., Rosenthal, W., Schulein, R. (2000).** Molecular and conformational features of a transport-relevant domain in the C-terminal tail of the vasopressin V(2) receptor. *Mol Pharmacol* 57, 232-42.
- Krieg, P. A., Melton, D. A. (1984).** Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res* 12, 7057-70.
- Kühl, A. (2008).** Analysis of human orexin receptor 2 homodimerization. Master's thesis, Lübeck.
- Larsson, K. P., Akerman, K. E., Magga, J., Uotila, S., Kukkonen, J. P., Nasman, J., Herzig, K. H. (2003).** The STC-1 cells express functional orexin-A receptors coupled to CCK release. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 209-16.
- Larsson, K. P., Peltonen, H. M., Bart, G., Louhivuori, L. M., Penttonen, A., Antikainen, M., Kukkonen, J. P., Akerman, K. E. (2005).** Orexin-A-induced Ca²⁺ entry: evidence for involvement of trpc channels and protein kinase C regulation. *J Biol Chem* 280, 1771-81.
- Lavoie, C., Mercier, J. F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L. R., Zhu, W. Z., Xiao, R. P., Lakatta, E. G., Bouvier, M., Hebert, T. E. (2002).** Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem* 277, 35402-10.
- Lee, M. G., Hassani, O. K., Jones, B. E. (2005).** Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 25, 6716-20.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., Guillaume, J. L., Couturier, C., Delagrangé, P., Jockers, R. (2006).** The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *Embo J* 25, 3012-23.
- Liman, E. R., Tytgat, J., Hess, P. (1992).** Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9, 861-71.
- Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., Qiu, X., de Jong, P. J., Nishino, S., Mignot, E. (1999).** The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98, 365-76.
- Lubkin, M., Stricker-Krongrad, A. (1998).** Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 241-5.
- Lund, P. E., Shariatmadari, R., Uustare, A., Detheux, M., Parmentier, M., Kukkonen, J. P., Akerman, K. E. (2000).** The orexin OX1 receptor activates a novel Ca²⁺ influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J Biol Chem* 275, 30806-12.

- Lutz, C. S. (2008).** Alternative polyadenylation: a twist on mRNA 3' end formation. *ACS Chem Biol* 3, 609-17.
- Magga, J., Bart, G., Oker-Blom, C., Kukkonen, J. P., Akerman, K. E., Nasman, J. (2006).** Agonist potency differentiates G protein activation and Ca²⁺ signalling by the orexin receptor type 1. *Biochem Pharmacol* 71, 827-36.
- Maggio, R., Novi, F., Scarselli, M., Corsini, G. U. (2005).** The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology. *Febs J* 272, 2939-46.
- Marcus, J. N., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Chemelli, R. M., Saper, C. B., Yanagisawa, M., Elmquist, J. K. (2001).** Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435, 6-25.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (2000).** A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27, 97-106.
- Markovic, D., Challiss, R. A. (2009).** Alternative splicing of G protein-coupled receptors: physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci* 66, 3337-52.
- McElvaine, A. T., Mayo, K. E. (2006).** A dominant-negative human growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor splice variant inhibits GHRH binding. *Endocrinology* 147, 1884-94.
- McGraw, D. W., Mihlbachler, K. A., Schwarb, M. R., Rahman, F. F., Small, K. M., Almoosa, K. F., Liggett, S. B. (2006).** Airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate beta2-adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex. *J Clin Invest* 116, 1400-9.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., Fernandez, S., Martin de Ana, A., Jones, D. R., Toran, J. L., Martinez, A. C. (2001).** Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *Embo J* 20, 2497-507.
- Miledi, R., Parker, I., Sumikawa, K. (1982).** Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 216, 509-15.
- Mileykovskiy, B. Y., Kiyashchenko, L. I., Siegel, J. M. (2005).** Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron* 46, 787-98.
- Milligan, G., Bouvier, M. (2005).** Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors. *Febs J* 272, 2914-25.
- Minneman, K. P. (2001).** Splice variants of G protein-coupled receptors. *Mol Interv* 1, 108-16.
- Morrison, T. B., Weis, J. J., Wittwer, C. T. (1998).** Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954-62.
- Nakamura, A., Zhang, W., Yanagisawa, M., Fukuda, Y., Kuwaki, T. (2007).** Vigilance state-dependent attenuation of hypercapnic chemoreflex and exaggerated sleep apnea in orexin knockout mice. *J Appl Physiol* 102, 241-8.
- Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., Goto, K. (1999).** Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827, 243-60.

- Narita, M., Nagumo, Y., Hashimoto, S., Narita, M., Khotib, J., Miyatake, M., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Nakamachi, T., Shioda, S., Suzuki, T. (2006).** Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci* 26, 398-405.
- Näsman, J., Bart, G., Larsson, K., Louhivuori, L., Peltonen, H., Akerman, K. E. (2006).** The orexin OX1 receptor regulates Ca²⁺ entry via diacylglycerol-activated channels in differentiated neuroblastoma cells. *J Neurosci* 26, 10658-66.
- Niibori, Y., Hayashi, F., Hirai, K., Matsui, M., Inokuchi, K. (2007).** Alternative poly(A) site-selection regulates the production of alternatively spliced vesl-1/homer1 isoforms that encode postsynaptic scaffolding proteins. *Neurosci Res* 57, 399-410.
- Nishino, S., Ripley, B., Overeem, S., Lammers, G. J., Mignot, E. (2000).** Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355, 39-40.
- Nowak, K. W., Strowski, M. Z., Switonska, M. M., Kaczmarek, P., Singh, V., Fabis, M., Mackowiak, P., Nowak, M., Malendowicz, L. K. (2005).** Evidence that orexins A and B stimulate insulin secretion from rat pancreatic islets via both receptor subtypes. *Int J Mol Med* 15, 969-72.
- Numberger, M., Draguhn, A. (1996).** Patch Clamp Technik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996.
- Oksche, A., Dehe, M., Schulein, R., Wiesner, B., Rosenthal, W. (1998).** Folding and cell surface expression of the vasopressin V2 receptor: requirement of the intracellular C-terminus. *FEBS Lett* 424, 57-62.
- Pagano, A., Rovelli, G., Mosbacher, J., Lohmann, T., Duthey, B., Stauffer, D., Ristig, D., Schuler, V., Meigel, I., Lampert, C., Stein, T., Prezeau, L., Blahos, J., Pin, J., Froestl, W., Kuhn, R., Heid, J., Kaupmann, K., Bettler, B. (2001).** C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J Neurosci* 21, 1189-202.
- Pankevyh, H., Korkhov, V., Freissmuth, M., Nanoff, C. (2003).** Truncation of the A1 adenosine receptor reveals distinct roles of the membrane-proximal carboxyl terminus in receptor folding and G protein coupling. *J Biol Chem* 278, 30283-93.
- Parekh, A. B., Foguet, M., Lubbert, H., Stuhmer, W. (1993a).** Ca²⁺ oscillations and Ca²⁺ influx in *Xenopus* oocytes expressing a novel 5-hydroxytryptamine receptor. *J Physiol* 469, 653-71.
- Parekh, A. B., Terlau, H., Stuhmer, W. (1993b).** Depletion of InsP3 stores activates a Ca²⁺ and K⁺ current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature* 364, 814-8.
- Peyron, C., Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y., Nevsimalova, S., Aldrich, M., Reynolds, D., Albin, R., Li, R., Hungs, M., Pedrazzoli, M., Padigaru, M., Kucherlapati, M., Fan, J., Maki, R., Lammers, G. J., Bouras, C., Kucherlapati, R., Nishino, S., Mignot, E. (2000).** A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 6, 991-7.
- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., Kilduff, T. S. (1998).** Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18, 9996-10015.

- Pfeiffer, M., Koch, T., Schroder, H., Laugsch, M., Holtt, V., Schulz, S. (2002).** Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem* 277, 19762-72.
- Pin, J. P., Neubig, R., Bouvier, M., Devi, L., Filizola, M., Javitch, J. A., Lohse, M. J., Milligan, G., Palczewski, K., Parmentier, M., Spedding, M. (2007).** International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol Rev* 59, 5-13.
- Pin, J. P., Waeber, C., Prezeau, L., Bockaert, J., Heinemann, S. F. (1992).** Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10331-5.
- Piper, D. C., Upton, N., Smith, M. I., Hunter, A. J. (2000).** The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep-wake cycle of rats. *Eur J Neurosci* 12, 726-30.
- Prinster, S. C., Hague, C., Hall, R. A. (2005).** Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev* 57, 289-98.
- Probst, W. C., Snyder, L. A., Schuster, D. I., Brosius, J., Sealfon, S. C. (1992).** Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 11, 1-20.
- Proudfoot, N. J., Furger, A., Dye, M. J. (2002).** Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501-12.
- Rainey, W. E., Saner, K., Schimmer, B. P. (2004).** Adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 228, 23-38.
- Randeva, H. S., Karteris, E., Grammatopoulos, D., Hillhouse, E. W. (2001).** Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4808-13.
- Rashid, A. J., So, C. H., Kong, M. M., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O'Dowd, B. F., George, S. R. (2007).** D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 654-9.
- Reiter, E., Lefkowitz, R. J. (2006).** GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 17, 159-65.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Wittwer, C. T. (1997).** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245, 154-60.
- Robert, J., Clauser, E., Petit, P. X., Ventura, M. A. (2005).** A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane. *J Biol Chem* 280, 2300-8.
- Rodriguez, M. C., Xie, Y. B., Wang, H., Collison, K., Segaloff, D. L. (1992).** Effects of truncations of the cytoplasmic tail of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor on receptor-mediated hormone internalization. *Mol Endocrinol* 6, 327-36.
- Rozenfeld, R., Devi, L. A. (2007).** Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *Faseb J* 21, 2455-65.

- Saitou, T., Ishikawa, T., Obara, K., Nakayama, K. (2000).** Characterization of whole-cell currents elicited by mechanical stimulation of *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 440, 858-65.
- Sakurai, T. (2006).** Orexin System and Feeding Behavior. In: *The Orexin-Hypocretin System - Physiology and Pathophysiology* pp. 99-106. Edited by S. Nishino and T. Sakurai. Humana, Totowa, 2006.
- Sakurai, T. (2007).** The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci* 8, 171-81.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., Arch, J. R., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., Bergsma, D. J., Yanagisawa, M. (1998).** Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573-85.
- Salahpour, A., Angers, S., Mercier, J. F., Lagace, M., Marullo, S., Bouvier, M. (2004).** Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J Biol Chem* 279, 33390-7.
- Samson, W. K., Gosnell, B., Chang, J. K., Resch, Z. T., Murphy, T. C. (1999).** Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain Res* 831, 248-53.
- Sarmiento, J. M., Anazco, C. C., Campos, D. M., Prado, G. N., Navarro, J., Gonzalez, C. B. (2004).** Novel down-regulatory mechanism of the surface expression of the vasopressin V2 receptor by an alternative splice receptor variant. *J Biol Chem* 279, 47017-23.
- Schroeder, B. C., Cheng, T., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (2008).** Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134, 1019-29.
- Schüle, R., Hermosilla, R., Oksche, A., Dehe, M., Wiesner, B., Krause, G., Rosenthal, W. (1998).** A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells. *Mol Pharmacol* 54, 525-35.
- Seck, T., Baron, R., Horne, W. C. (2003).** The alternatively spliced deltae13 transcript of the rabbit calcitonin receptor dimerizes with the C1a isoform and inhibits its surface expression. *J Biol Chem* 278, 23085-93.
- Shirasaka, T., Nakazato, M., Matsukura, S., Takasaki, M., Kannan, H. (1999).** Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am J Physiol* 277, R1780-5.
- Silveyra, P., Lux-Lantos, V., Libertun, C. (2007).** Both orexin receptors are expressed in rat ovaries and fluctuate with the estrous cycle: effects of orexin receptor antagonists on gonadotropins and ovulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E977-85.
- Smart, D., Jerman, J. C., Brough, S. J., Rushton, S. L., Murdock, P. R., Jewitt, F., Elshourbagy, N. A., Ellis, C. E., Middlemiss, D. N., Brown, F. (1999).** Characterization of recombinant human orexin receptor pharmacology in a Chinese hamster ovary cell-line using FLIPR. *Br J Pharmacol* 128, 1-3.
- So, C. H., Varghese, G., Curley, K. J., Kong, M. M., Alijaniam, M., Ji, X., Nguyen, T., O'Dowd, B. F., George, S. R. (2005).** D1 and D2 dopamine receptors form heterooligomers and cointernalize after selective activation of either receptor. *Mol Pharmacol* 68, 568-78.

- Spinazzi, R., Andreis, P. G., Rossi, G. P., Nussdorfer, G. G. (2006).** Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol Rev* 58, 46-57.
- Spinazzi, R., Rucinski, M., Neri, G., Malendowicz, L. K., Nussdorfer, G. G. (2005a).** Pre-proorexin and orexin receptors are expressed in cortisol-secreting adrenocortical adenomas, and orexins stimulate in vitro cortisol secretion and growth of tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 3544-9.
- Spinazzi, R., Ziolkowska, A., Neri, G., Nowak, M., Rebuffat, P., Nussdorfer, G. G., Andreis, P. G., Malendowicz, L. K. (2005b).** Orexins modulate the growth of cultured rat adrenocortical cells, acting through type 1 and type 2 receptors coupled to the MAPK p42/p44- and p38-dependent cascades. *Int J Mol Med* 15, 847-52.
- Stanasila, L., Perez, J. B., Vogel, H., Cotecchia, S. (2003).** Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization. *J Biol Chem* 278, 40239-51.
- Stühmer, W., Parekh, A. (1995).** Chapter 15 Electrophysiological Recordings from *Xenopus* Oocytes. In: *Single-channel Recording*, pp. 341-355. Edited by B. Sakman and E. Neher. Plenum Press, New York, 1995.
- Sun, Y., McGarrigle, D., Huang, X. Y. (2007).** When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Mol Biosyst* 3, 849-54.
- Takahashi, K., Arihara, Z., Suzuki, T., Sone, M., Kikuchi, K., Sasano, H., Murakami, O., Totsune, K. (2006).** Expression of orexin-A and orexin receptors in the kidney and the presence of orexin-A-like immunoreactivity in human urine. *Peptides* 27, 871-7.
- Tang, J., Chen, J., Ramanjaneya, M., Punn, A., Conner, A. C., Randevara, H. S. (2008).** The signalling profile of recombinant human orexin-2 receptor. *Cell Signal* 20, 1651-61.
- Terrillon, S., Barberis, C., Bouvier, M. (2004).** Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1548-53.
- Terrillon, S., Bouvier, M. (2004).** Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 5, 30-4.
- Thannickal, T. C., Moore, R. Y., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Aldrich, M., Cornford, M., Siegel, J. M. (2000).** Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27, 469-74.
- Tian, B., Pan, Z., Lee, J. Y. (2007).** Widespread mRNA polyadenylation events in introns indicate dynamic interplay between polyadenylation and splicing. *Genome Res* 17, 156-65.
- Trivedi, P., Yu, H., MacNeil, D. J., Van der Ploeg, L. H., Guan, X. M. (1998).** Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438, 71-5.
- Tsien, R. Y. (1981).** A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290, 527-8.
- Uberti, M. A., Hague, C., Oller, H., Minneman, K. P., Hall, R. A. (2005).** Heterodimerization with beta2-adrenergic receptors promotes surface expression and functional activity of alpha1D-adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 313, 16-23.

- Uramura, K., Funahashi, H., Muroya, S., Shioda, S., Takigawa, M., Yada, T. (2001).** Orexin-a activates phospholipase C- and protein kinase C-mediated Ca²⁺ signaling in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroreport* 12, 1885-9.
- van den Pol, A. N., Gao, X. B., Obrietan, K., Kilduff, T. S., Belousov, A. B. (1998).** Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J Neurosci* 18, 7962-71.
- van Rijn, R. M., van Marle, A., Chazot, P. L., Langemeijer, E., Qin, Y., Shenton, F. C., Lim, H. D., Zuiderveld, O. P., Sansuk, K., Dy, M., Smit, M. J., Tensen, C. P., Bakker, R. A., Leurs, R. (2008).** Cloning and characterization of dominant negative splice variants of the human histamine H4 receptor. *Biochem J* 414, 121-31.
- Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 615-9.
- Wagner, C. A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, F., Broer, S. (2000).** The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* 10, 1-12.
- Wagner, C. A., Raber, G., Waldegger, S., Osswald, H., Biber, J., Murer, H., Busch, A. E., Lang, F. (1996).** Regulation of the Human Brush Border Na⁺/Phosphate Cotransporter (NaPi-3) Expressed in *Xenopus* Oocytes by Intracellular Calcium and Protein Kinase C. *Cell Physiol Biochem* 6, 105-111.
- Waldhoer, M., Fong, J., Jones, R. M., Lunzer, M. M., Sharma, S. K., Kostenis, E., Portoghesse, P. S., Whistler, J. L. (2005).** A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9050-5.
- Wenzel, J., Grabinski, N., Knopp, C. A., Dendorfer, A., Ramanjaneya, M., Randeva, H. S., Ehrhart-Bornstein, M., Dominiak, P., Jöhren, O. (2009).** Hypocretin/orexin increases the expression of steroidogenic enzymes in human adrenocortical NCI H295R cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297, R1601-9.
- Williams, R. H., Jensen, L. T., Verkhratsky, A., Fugger, L., Burdakov, D. (2007).** Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10685-90.
- Xu, J., He, J., Castleberry, A. M., Balasubramanian, S., Lau, A. G., Hall, R. A. (2003).** Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 278, 10770-7.
- Yamanaka, A., Kunii, K., Nambu, T., Tsujino, N., Sakai, A., Matsuzaki, I., Miwa, Y., Goto, K., Sakurai, T. (2000).** Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res* 859, 404-9.
- Yamanaka, A., Tabuchi, S., Tsunematsu, T., Fukazawa, Y., Tominaga, M. (2010).** Orexin directly excites orexin neurons through orexin 2 receptor. *J Neurosci* 30, 12642-52.
- Yang, Y. D., Cho, H., Koo, J. Y., Tak, M. H., Cho, Y., Shim, W. S., Park, S. P., Lee, J., Lee, B., Kim, B. M., Raouf, R., Shin, Y. K., Oh, U. (2008).** TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455, 1210-5.
- Yasui, M., Hazama, A., Kwon, T. H., Nielsen, S., Guggino, W. B., Agre, P. (1999).** Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 402, 184-7.

Young, J. K., Wu, M., Manaye, K. F., Kc, P., Allard, J. S., Mack, S. O., Haxhiu, M. A. (2005). Orexin stimulates breathing via medullary and spinal pathways. *J Appl Physiol* 98, 1387-95.

Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22, 537-48.

Zhang, X., Wang, G., Dupre, D. J., Feng, Y., Robitaille, M., Lazartigues, E., Feng, Y. H., Hebert, T. E., Wu, G. (2009). Rab1 GTPase and dimerization in the cell surface expression of angiotensin II type 2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 330, 109-17.

Zhou, F., Filipeanu, C. M., Duvernay, M. T., Wu, G. (2006). Cell-surface targeting of alpha2-adrenergic receptors - Inhibition by a transport deficient mutant through dimerization. *Cell Signal* 18, 318-27.

Zhu, Y., Miwa, Y., Yamanaka, A., Yada, T., Shibahara, M., Abe, Y., Sakurai, T., Goto, K. (2003). Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci* 92, 259-66.

7 Anhang

7.1 Material

7.1.1 Geräte

Apple G 4 Power Mac	Apple, USA
ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Autoklav 3870 ELV	Tuttnauer Systec, Wettenberg
Brutschrank	Haeraeus Instruments, Osterode
Capacitance Extender PLUS	Bio-Rad, München
CCD-Kamera <i>CellCam</i>	Phase, Lübeck
Drucksensor-System mit angeschlossener Pumpe (MPCU3)	Lorenz Messgerätebau, Katlenburg, Lindau
Elektrophorese Kammer (Sub-Cell [®] GT)	Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät Gene Pulser [™] II	Bio-Rad, München
Feinwaage BP 210 D	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerät FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech, Offenbach
Fuchs-Rosenthal-Kammer	Hecht-Assistent, Sondheim
Gasbrenner flammy S	Schütt, Göttingen
Heizblock Schutron Thermoshaker	CLF, Emersacker
Injektionskammer aus Plexiglas	Eigenbau Feinmechanikwerkstatt MPI für Experimentelle Medizin Göttingen
Injektor Nanoject II	Drummond Scientific Company, USA
Inverses Mikroskop Axiovert S100	Zeiss, Oberkochen
Inverses Mikroskop IM 35	Zeiss, Oberkochen
ITC 16 AD/DA-Wandler (integriert im EPC9-Patch-Clamp-Messgerät)	HEKA, Lambrecht
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Zeiss, Oberkochen
Kaltlichtquelle KL 1500	Schott, Mainz
Kühlbrutschrank IC P400	Memmert, Schwabach

Konfokales Laserfluoreszenzmikroskop TCS SP5	Leica, Solms
MicroForge MF-900	Narishige Scientific Instruments, Japan
Mikroschere	KLS Martin, Tuttlingen
Nadelhalter	FST, Heidelberg
Photometer SmartSpec™ 3000	Bio-Rad, München
Pinzette nach Dumont	Merck, Dortmund
Pinzette stumpf	KLS Martin, Tuttlingen
Power Supply (PowerPac 300)	Bio-Rad, München
Pulse Controller PLUS	BIO-Rad, München
Schüttelinkubator	GFL, Burgwedel
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel
Schwingungsgedämpfter Tisch	Physics-Instruments, Karlsruhe
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Oberkochen
Stereomikroskop SV 6	Zeiss, Oberkochen
Sterile Werkbank BHA48	Faster, Italien
Sterilisator	Haeraeus Instruments, Osterode
Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen
Turbo TEC 10 C/D Verstärker	NPI-Electronics, Tamm
UV-Transilluminator	Phase, Lübeck
Vortexer Reax top	Heildolph Instruments, Schwabach
Wärmeschrank	Haeraeus Instruments, Osterode
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge GR 412	Jouan, Unterhaching
Zentrifuge Mikro 200	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge Omnifuge 2. ORS	Haeraeus Instruments, Osterode

7.1.2 Software

ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, USA
Pulse/PulseFit 8.0	HEKA, Lambrecht
Primer Express® Software	Applied Biosystems, Darmstadt
Video Control Center for <i>CellCam</i>	Phase, Lübeck

7.1.3 Verbrauchsmaterialien

24-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-one, Frickenhausen
96-Multiplay-PCR-Platte	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well-PS-Mikroplatte	Greiner Bio-one, Frickenhausen
96-Well-Zellkulturplatten, schwarz, Kaminform	Greiner Bio-one, Frickenhausen
96-Well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
Cryo S	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Elektrodendraht: Silberdraht 0,2 mm	Advent Research Materials, UK
Elektroporationsküvetten	Molecular Bio Products, USA
Falconröhrchen 15 und 50 mL	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Minisart® Spritzenfilter	Sartorius, Frankreich
Glaspipetten 230 mm	VWR, Darmstadt
Injektionspipetten:	
Flared Glass 90 MM	Drummond, USA
Borosilikat-Glaskapillaren, Ø 2mm	Hilgenberg, Malsfeld
Transferpettor Caps	Brand, Wertheim
Klebefolie	Sarstedt, Nümbrecht
Lab-Tek™ Chambered Coverglass	Nunc, Langenselbold
Messpipetten: Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament, Ø 2 mm	Hilgenberg, Malsfeld
Nadel zur Befüllung der Messpipetten Microfil™	World Precision Instruments, USA -
Nahtmaterial: Monofilament Polyglyconate Synthetic Absorbable Suture	Surgalloy Syneture, USA
Pasteurpipetten 150 mm	Brand, Wertheim
Petrischalen Cellstar®	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Petrischalen, 60 x 15 mm	Falcon, USA
Pipetten 5, 10 und 25 mL	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Splash Guard	Applied Biosystems, Darmstadt
Spritzen 10 und 30 mL	HSW, Tuttlingen
Total RNA Purification Tray	Applied Biosystems, Darmstadt
Zellkulturflaschen 75 und 25 cm ²	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen Durchmesser 40 mm	Nunc, Langenselbold

7.1.4 Chemikalien

Nicht aufgeführte Standardchemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad *pro analysi* und wurden von den Firmen Merck und Sigma bezogen.

3-Aminobenzoessäure-Ethylester	Sigma, München
Accumax	PAA, Pasching
Accutase	PAA, Pasching
Agarose	Roth, Karlsruhe
Anthracen-9-Carbonsäure (9-AC)	Sigma, München
Apo-Transferrin	Sigma, München
Chloroform	Merck, Dortmund
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, München
Ethanol 99,9 %	Merck, Dortmund
Ethidiumbromid	Bio-Rad, München
Fötale Bovines Serum (FBS)	Biochrom, Berlin
Glaswachs	Harvard Dental, Berlin
Glycerol	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Biomol, Hamburg
Hydrocortison	Sigma, München
Insulin	Sigma, München
LB Agar	Invitrogen, Karlsruhe
LB Broth Base	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Orexin A	Bachem, Schweiz
Phenol-Chloroform	Merck, Dortmund
RTV 615	GE Bayer Silicone, Niederlande
Natriumselenit	Sigma, München
Tris-HCl (1 M)	Sigma, München
β-Östradiol	Sigma, München

7.1.5 Antibiotika

Ampicillin	Stratagene, USA
Cefuroxim	Delta Select, Pfullingen
Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching

7.1.6 Enzyme

Restriktionsenzyme

Die in Tabelle 7-1 angegebenen Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main) bezogen und zusammen mit den jeweils empfohlenen Puffern verwendet.

Tabelle 7-1 Angegeben sind der Name und die Erkennungssequenz der verwendeten Restriktionsenzyme.

Name	Erkennungssequenz
<i>EcoRI</i>	G↓AATCC
<i>XbaI</i>	T↓CTAGA
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT
<i>BamHI</i>	G↓GATCC
<i>EcoRV</i>	GAT↓ATC
<i>NheI</i>	G↓CTAGC

Sonstige Enzyme

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (10 U/μL)	NEB, Frankfurt am Main
Kollagenase Typ II (249 U/mg)	Worthington Biochemical Corporation, USA
DyNAzyme™ II DNA Polymerase (2 U/μL)	Finnzymes, Finnland
Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (5U/μL)	Invitrogen, Karlsruhe
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/μL)	USB, Staufeu
T4-Ligase (440 U/μL)	NEB, Frankfurt am Main

7.1.7 Kits (kommerzielle Reagenziensätze)

Blunt-IT™ Repair Kit	USB, Staufeu
Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Fluo-4 NW Calcium Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe
mMessage mMachiu T7 Kit	Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt
Nucleo Spin® Plasmid Quick Pure	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond® Finalizer Plus	Macherey-Nagel, Düren

NucleoBond® PC 500	Macherey-Nagel, Düren
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX	Invitrogen, Karlsruhe
Quant-IT™ RiboGreen® RNA Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe
UltraClean™ 15 DNA Purification Kit	Mo Bio Laboratories, Kanada

7.1.8 Standards

DNA-Längenstandard Marker XIV	Roche Applied Science, Schweiz
DNA-Längenstandard Marker X	Roche Applied Science, Schweiz

7.1.9 Für die Sequenzierung verwendete Primer

T7-Promotor-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
EGFP-N-R-Primer zur Sequenzierung	Clontech, Heidelberg

7.1.10 Puffer, Lösungen und Nährmedien

7.1.10.1 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2)	Sigma, München
Acid Purification Elution Solution	Applied Biosystems, Darmstadt
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (1x Dulbecco's phosphate buffered saline, PBS)	PAA, Pasching
RNA Purification Wash Solution 1 und 2	Applied Biosystems, Darmstadt

DEPC-Wasser

1 L deionisiertes Wasser wurde mit 1 mL DEPC versetzt, kräftig geschüttelt und über Nacht mit geöffnetem Deckel unter dem Abzug inkubiert. Der Ansatz wurde bei 121 °C 15 min autoklaviert.

Lyse-Puffer

„2x Nucleic Acid Purification Lysis Solution“ von Applied Biosystems (Darmstadt) wurde direkt vor Gebrauch 1:1 mit PBS gemischt.

TAE-Puffer (1x)

UltraPure™ 10x TAE-Puffer wurde von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und mit 9 Teilen deionisiertem Wasser verdünnt.

1x TE-Puffer

1 % 1 M Tris (pH 7,4) und 0,2 % 0,5 M EDTA (pH 8,0) in DEPC-Wasser

DNA-Ladepuffer

33 % Glycerol (v/v) in DEPC-Wasser

7.1.10.2 Lösungen für die Zellkultur

1x Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM [®] (1x)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate-Buffered Saline, PBS)	PAA, Pasching
Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 mg/mL)	PAA, Pasching

NCI-H295R-Komplettmedium

Für die Kultivierung der NCI-H295R-Zellen wurde DMEM/Ham's F-12 Medium mit L-Glutamin (PAA, Pasching) verwendet, das mit den in Tabelle 7-2 genannten Zusätzen versetzt war.

Tabelle 7-2 Zusätze zum DMEM/Ham's F-12 Medium

Zusätze	Endkonzentration
Hydrocortison	3,623 µg/mL
Apo-Transferrin	1 µg/mL
Natriumselenit	5 ng/mL
β-Östradiol	2,724 ng/mL
Insulin	0,379 µg/mL
Fötale Rinderserum (FBS)	2 %
Penicillin/Streptomycin	100 µg/mL

NCI-H295R-Komplettmedium ohne Antibiotika

DMEM/Ham's F-12 Medium mit L-Glutamin enthielt die in Tabelle 7-2 genannten Zusätze, jedoch kein Penicillin/Streptomycin.

NCI-H295R-Medium mit hoher Glucosekonzentration

DMEM high glucose Medium (PAA, Pasching) enthielt 4,5 g/L Glucose und 10 % FBS.

Komplettmedium für CHO-Zellen

Für die Kultivierung von CHO-Zellen wurde DMEM/Ham's F-12 Medium mit Glutamin verwendet, das 5 % Fötale Rinderserum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin enthielt.

Komplettmedium für CHO-Zellen ohne Antibiotikum

DMEM/Ham's F-12 Medium mit Glutamin enthielt 5 % Fötale Rinderserum (FBS).

Orexin-A-Lösung

In DEPC-Wasser wurde eine 100 µM Orexin-A-Stammlösung hergestellt und bei -20 °C eingefroren. Vor Versuchsbeginn wurde durch Verdünnung mit HBBS eine Lösung der gewünschten Konzentration hergestellt.

7.1.10.3 Nährmedien für Bakterien

S.O.C.-Medium

Invitrogen, Karlsruhe

LB-Medium (Luria Broth)

Für 1 L Medium wurden 20 g LB Broth Base in 1 L deionisiertem Wasser gelöst. Zur Sterilisation wurde die Lösung bei 121 °C 15 min autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 55 °C mit Kanamycin (Endkonzentration 30 µg/mL) oder Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/mL) versetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

LB-Agarplatten

Für 1 L Medium wurden 32 g LB Agar in 1 L deionisiertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde bei 121 °C 15 min autoklaviert, nach Abkühlen auf 55 °C mit Kanamycin (Endkonzentration 30 µg/mL) oder Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/mL) versetzt und in sterile Petrischalen gefüllt. Die Agarplatten wurden nach der Polymerisation unter der Werkbank getrocknet und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

7.1.10.4 Lösungen für die Elektrophysiologie

Tabelle 7-3 Barth-Medium mit Calcium. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Substanz	Konzentration
NaCl	88 mM
KCl	1 mM
NaHCO ₃	2,4 mM
MgSO ₄	0,82 mM
Tris-HCl	7,5 mM
Ca(NO ₃) ₂	0,33 mM
CaCl ₂	0,41 mM
Penicillin/Streptomycin	0,1 mg/mL
Cefuroxim	4 ng/mL

Tabelle 7-4 Barth-Medium ohne Calcium. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Substanz	Konzentration
NaCl	88 mM
KCl	1 mM
NaHCO	1,8 mM
MgSO ₄	0,82 mM
Tris-HCl	7,5 mM

Tabelle 7-5 Hypertone Häutungslösung. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Substanz	Konzentration
L-Aspartic Acid	200 mM
KCl	20 mM
MgCl ₂	1 mM
EGTA	10 mM
HEPES	10 mM

Tabelle 7-6 Standard-Ringerlösung (NFR). Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Substanz	Konzentration
NaCl	115 mM
KCl	2,5 mM
CaCl ₂	1,8 mM
HEPES	10 mM

Tabelle 7-7 Kalium-Ringerlösung (KFR). Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,4 eingestellt.

Substanz	Konzentration
KCl	117,5 mM
CaCl ₂	1,8 mM
HEPES	10 mM
MgSO ₄	0,82 mM

Kollagenase-Lösung

In 10 mL Barth-Medium ohne Calcium wurden 21-22 mg Kollagenase Typ II gelöst.

Tricaine-Lösung

1,25 g 3-Aminobenzoesäure-Ethylester wurden in etwas Aquariumwasser gelöst, der pH-Wert mit 0,5 mM NaHCO₃ auf 7 eingestellt und das Volumen mit Aquariumwasser auf 1 L aufgefüllt. Die Tricaine-Lösung wurde bei 4 °C gelagert und konnte mehrmals verwendet werden.

Orexin-A-Lösung

In DEPC-Wasser wurde eine 100 µM Stammlösung hergestellt. Mit NFR oder KFR wurden Verdünnungsreihen (2 µM, 1 µM, 100 nM und 10 nM) hergestellt und bei -20 °C eingefroren.

Anthrazen-9-Carbonsäure-Lösung

Am Tag des Versuchs wurde eine 0,2 M Anthrazen-9-Carbonsäure- (9-AC) Stammlösung in 1 N NaOH hergestellt. Diese wurde mit NFR auf eine Konzentration von 4 mM verdünnt und der pH-Wert mit HCl (32 %) auf 7,2 eingestellt. Direkt vor dem Versuch wurde die hergestellte Verdünnung 1:1 mit einer 2 µM Orexin-A-Lösung gemischt.

7.1.11 Vektoren**7.1.11.1 Bezugsquelle der Vektoren**

pcDNA3.1 (+)	Invitrogen, Karlsruhe
pCR [®] 4-TOPO [®]	Invitrogen, Karlsruhe
pDsRed2-ER	Clontech Laboratories, Heidelberg
pDsRed2-Mito	Clontech Laboratories, Heidelberg
pDsRed-Monomer-Membrane	Clontech Laboratories, Heidelberg
pEYFP-N1	Clontech Laboratories, Heidelberg
pSGEM	Professor Dr. Hollmann, Bochum
pTracer [™] -CMV/Bsd	Invitrogen, Karlsruhe

7.1.11.2 Vektorkarten der Klonierungs- und Expressionsvektoren

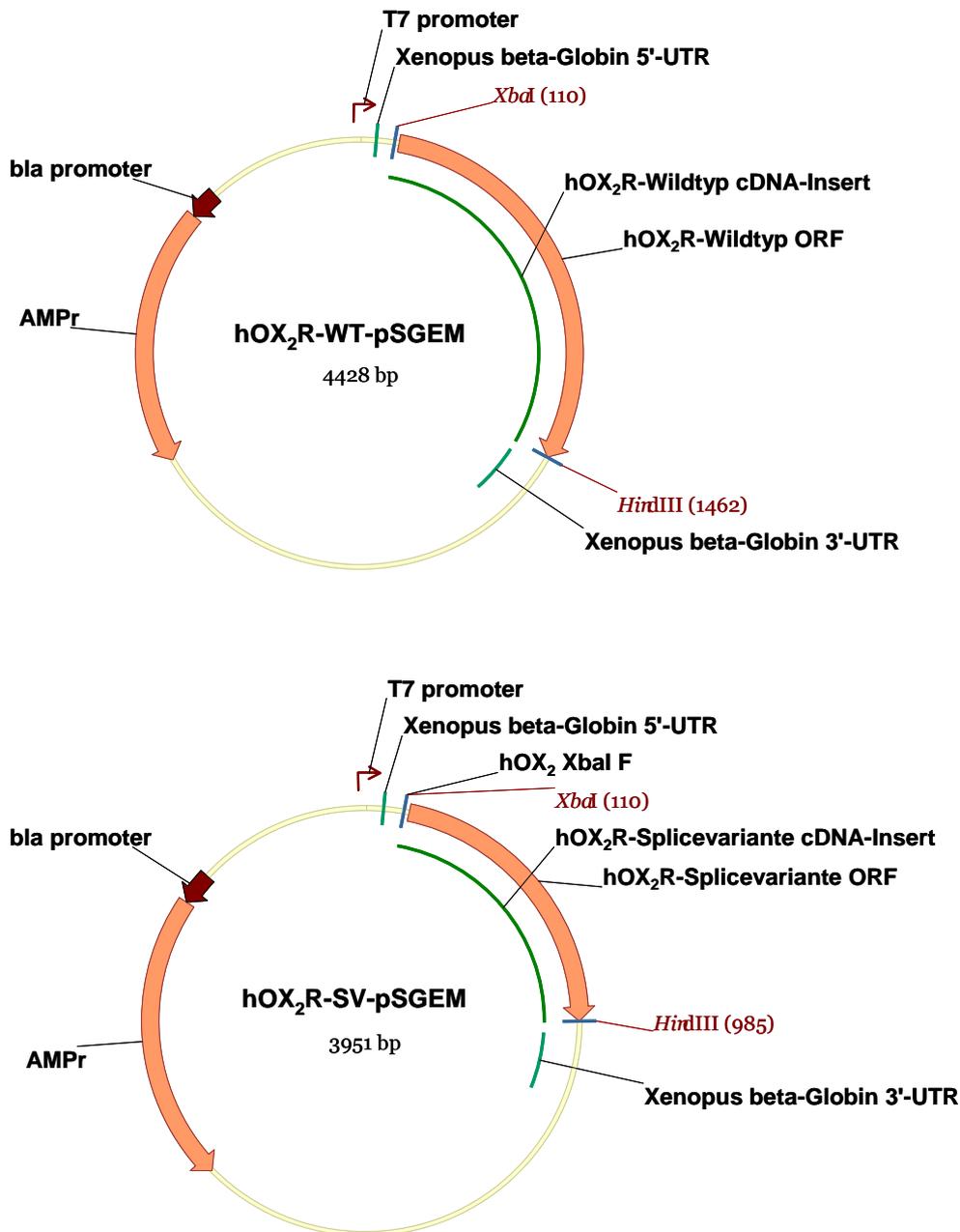


Abbildung 7-1 Vektorkarten hOX₂R-WT-pSGEM und hOX₂R-SV-pSGEM

Das Plasmid pSGEM wurde freundlicherweise von Herrn Professor M. Hollmann, Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt. Die multiple Klonierungsstelle von pSGEM wird von den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTR) des *Xenopus*- β -Globingens flankiert, wodurch in *Xenopus*-Oozyten eine hohe Translationsrate der in die multiple Klonierungsstelle eingefügten Sequenzen gewährleistet wird (Liman et al., 1992).

Stromaufwärts der 5'-UTR befindet sich die Promotorsequenz der T7-RNA-Polymerase für die *in-vitro*-Transkription, stromabwärts der 3'-UTR eine Linearisierungsschnittstelle. Die cDNA der hOX₂R-Splicevariante bzw. des hOX₂R-Wildtyps wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Hind*III in die multiple Klonierungsstelle eingefügt. Ein Ampicillin-Resistenzgen ermöglichte die Selektion in *E. coli*.

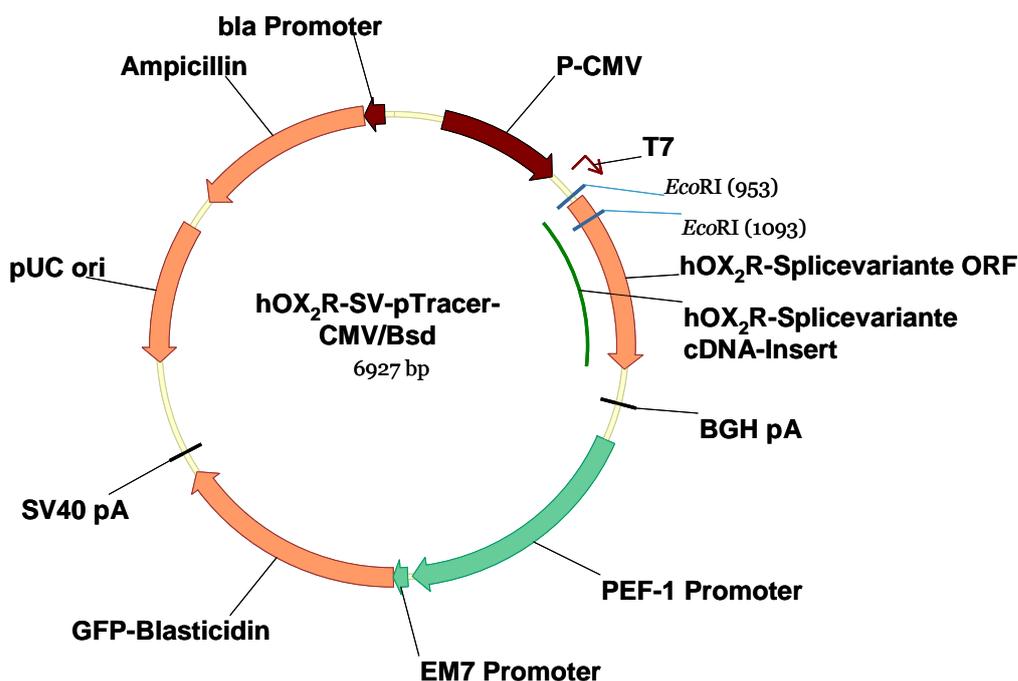
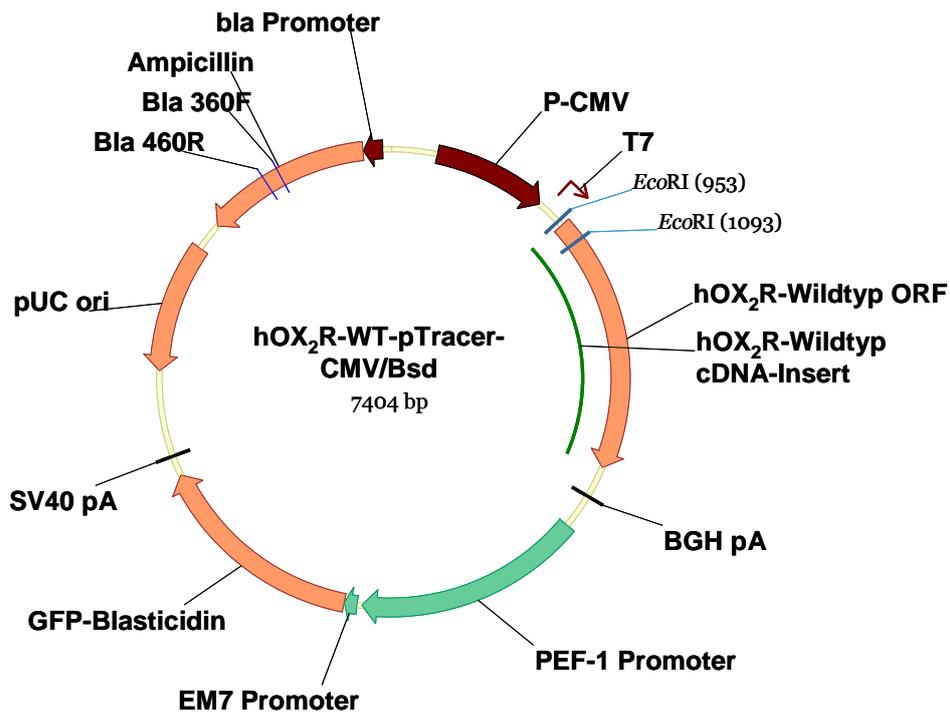


Abbildung 7-2 Vektorkarten hOX₂R-WT-pTracer-CMV/Bsd und hOX₂R-SV-pTracer-CMV/Bsd. Der pTracerTM-CMV/Bsd-Vektor ermöglicht die Expression rekombinanter Proteine in eukaryontischen Zellen. Er enthält eine Genvariante des aus der Qualle *Aequorea victoria* stammenden grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Dies ermöglicht die Kontrolle der Transfektionseffizienz 24-48 h nach Transfektion mit Hilfe des Konfokalen Laserfluoreszenzmikroskops (Exzitation bei 395 und 478 nm, Emission bei 507 nm). Die cDNA der hOX₂R-Splicevariante bzw. des hOX₂R-Wildtyps wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstelle *EcoRV* in die multiple Klonierungsstelle des Vektors ligiert. Das Ampicillin-Resistenzgen diente der Selektion transformierter *E. coli*.

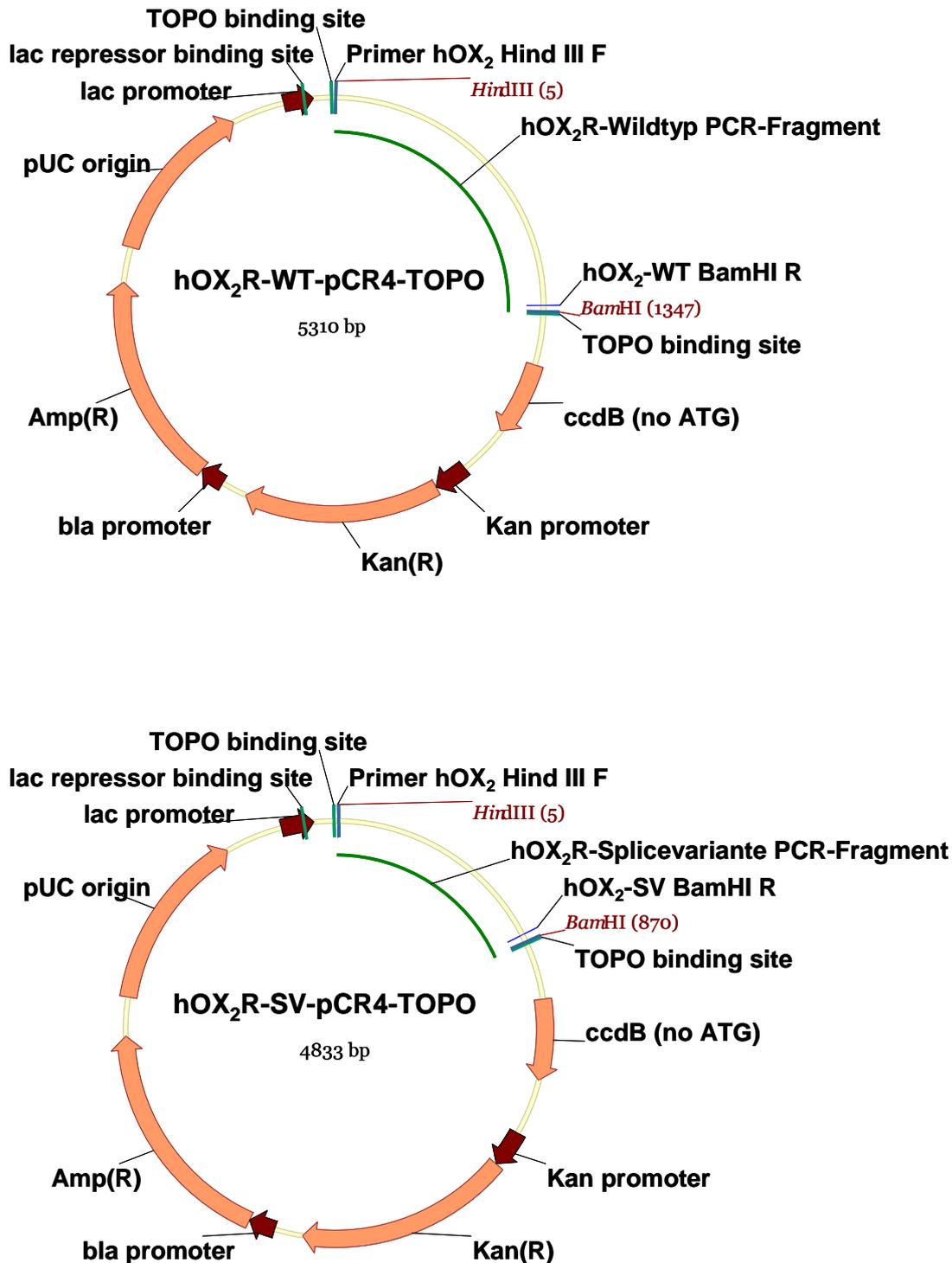


Abbildung 7-3 Vektorkarten hOX₂R-WT-pCR4-TOPO und hOX₂R-SV-pCR4-TOPO
 Der pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor ist ein linearisierter TA-Klonierungsvektor. Er besitzt an seinen 3'-Enden jeweils einen Desoxythymidinüberhang, an den die Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Mit der *Taq*-Polymerase amplifizierte Produkte können direkt in den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor hinein ligiert werden. Nach der Transformation überleben nur die positiven Rekombinanten, da bei ihnen das für *E. coli* letale *ccdB*-Gen unterbrochen wird. Ein Ampicillin- sowie ein Kanamycin-Resistenzgen ermöglichten die Selektion in *E. coli*.

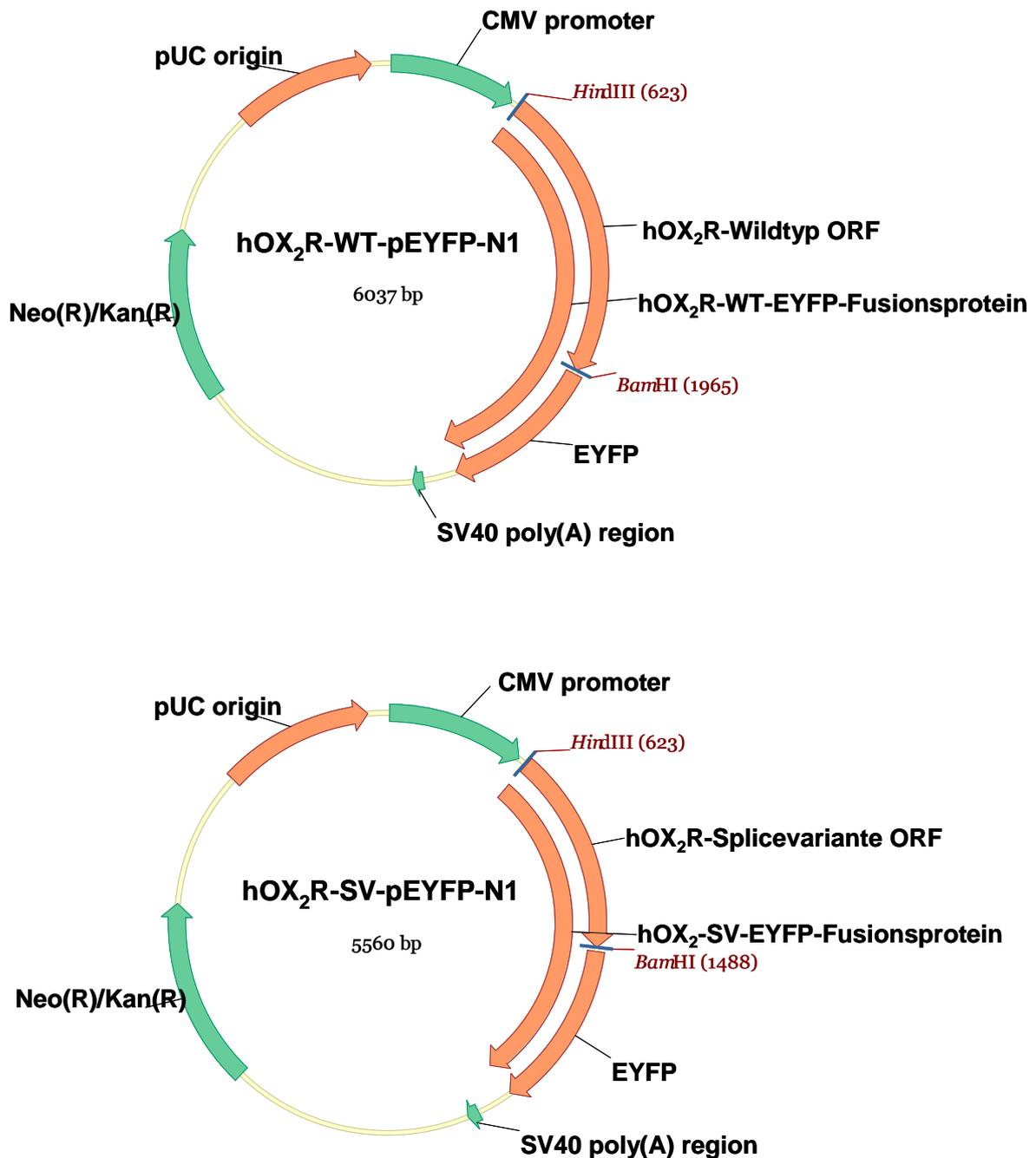


Abbildung 7-4 Vektorkarten hOX₂R-WT-pEYFP-N1 und hOX₂R-SV-pEYFP-N1
 pEYFP-N1 kodiert für eine gelb-fluoreszierende (Exzitation: 513 nm; Emission: 527 nm) Variante des aus der Qualle *Aequorea victoria* stammenden grün fluoreszierenden Proteins. Die rekombinanten pEYFP-Vektoren eignen sich zur Transfektion von Säugetierzellen und ermöglichen die zelluläre Lokalisation der eingefügten Rezeptorproteine.
 Der kodierende Bereich der cDNA der hOX₂R-Splicevariante bzw. des hOX₂R-Wildtyps wurde mit den flankierenden Schnittstellen *Xba*I und *Bam*HI in die multiple Klonierungsstelle stromaufwärts der codierenden Sequenz von pEYFP eingefügt. Das Stoppcodon des hOX₂R-Wildtyps bzw. der hOX₂R-Splicevariante wurde mutiert und eine kurze Verbindungssequenz ergänzt, so dass ein Fusionsprotein aus N-terminalem Rezeptorprotein und C-terminalem EYFP (Fusionsprotein hOX₂R-WT-EYFP-N1 bzw. hOX₂R-SV-EYFP-N1) entstand. Ein Kanamycin-Resistenzgen ermöglichte die Selektion in *E. coli*.

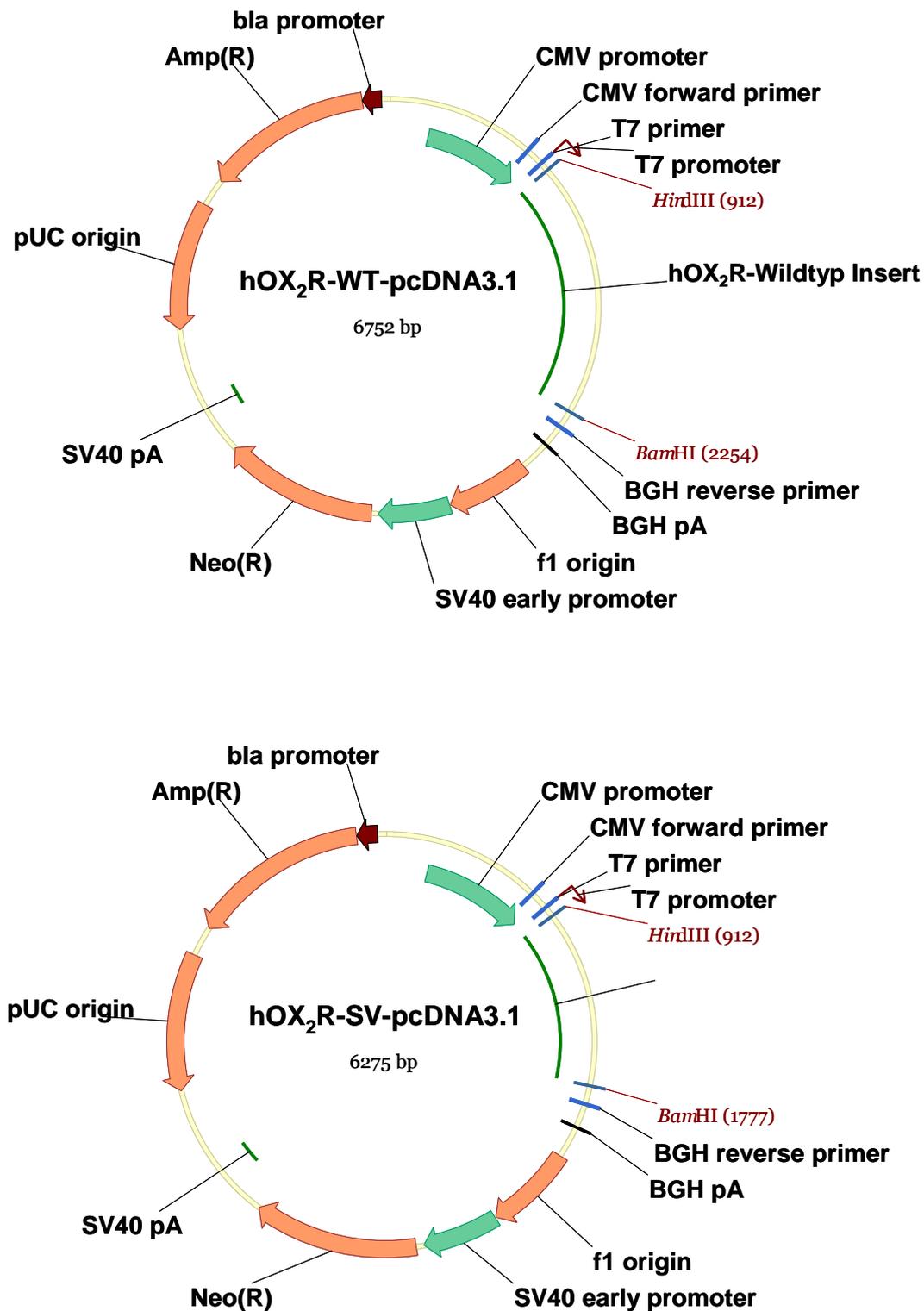


Abbildung 7-5 Vektorkarten hOX₂R-WT-pcDNA3.1 und hOX₂R-SV-pcDNA3.1
pcDNA3.1 (+) ist ein Expressionsvektor für eukaryontische Zellen. Die cDNA der hOX₂R-Splicevariante bzw. des hOX₂R-Wildtyps wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Hind*III in die multiple Klonierungsstelle eingefügt. Das Ampicillin-Resistenzgen diente der Selektion transformierter *E. coli*.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Schematische Darstellung der Genstruktur sowie der Primärtranskripte des humanen OX ₂ -Rezeptors	6
Abb. 1-2	Transmembranhelices des hOX ₂ R-Wildtyps und der hOX ₂ R-Splicevariante	7
Abb. 1-3	Rezeptorfunktionen, die durch Heterodimerbildung beeinflusst werden.....	8
Abb. 2-1	Prinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.....	34
Abb. 2-2	Spannungsprotokolle: Rampe und inverse Rampe.....	35
Abb. 2-3	Zeitlicher Ablauf eines Versuchs an einer Oozyte	36
Abb. 3-1	Amplifikationsgraphen für die cDNA des hOX ₂ R-Wildtyps und der hOX ₂ R-Splicevariante	39
Abb.3-2	Verhältnis der mRNA-Kopienzahl der hOX ₂ R-Splicevariante zur mRNA-Kopienzahl des hOX ₂ R-Wildtyps in Gehirn, Lunge und NCI-H295R-Zellen	40
Abb. 3-3	Restriktion neu generierter Plasmide.....	41
Abb. 3-4	Restriktion neu generierter Plasmide.....	43
Abb. 3-5	Intrazelluläre Lokalisierung der Fusionsproteine hOX ₂ R-WT-EYFP-N1 und hOX ₂ R-SV-EYFP-N1.....	44
Abb. 3-6	Intrazelluläre Lokalisierung der Fusionsproteine hOX ₂ R-WT-EYFP-N1 und hOX ₂ R-SV-EYFP-N1 zusammen mit Markern des endoplasmatischen Retikulums und der Plasmamembran.....	45
Abb. 3-7	Beispiel einer Voltage-Clamp-Messung an Oozyten, die den hOX ₂ R-Wildtyp bzw. die hOX ₂ R-Splicevariante exprimierten	46
Abb. 3-8	Beispiel einer Voltage-Clamp-Messung an einer Oozyte, die den hOX ₂ R-Wildtyp exprimierte, nach Gabe von Anthrazen-9-Carbonsäure	47
Abb. 3-9	Voltage-Clamp-Messungen an Oozyten in verschiedenen extrazellulären Badlösungen	48
Abb. 3-10	Vergleich der nach Gabe einer Orexin-A-Lösung induzierten Ströme in Oozyten, die die hOX ₂ R-Splicevariante, den hOX ₂ R-Wildtyp oder beide Rezeptorvarianten exprimierten	49
Abb. 3-11	statistische Auswertung der nach Gabe einer 100 nM bzw. einer 1 µM Orexin-A-Lösung induzierten Ströme in Oozyten, die die hOX ₂ R-Splicevariante, den hOX ₂ R-Wildtyp oder beide Rezeptorvarianten exprimierten.....	50
Abb. 3-12	Dosis-Wirkungskurven von Orexin A in NCI-H295R-Zellen	52

Abb. 3-13	Intrazelluläre Calciummessungen in NCI-H295R-Zellen	53
Abb. 3-14	Intrazelluläre Calciummessungen in CHO-Zellen	54
Abb. 4-1	Das Tripel-Phenylalanin-[F(X) ₃ F(X) ₃ F]-ER-Exportmotiv und das RXR-ER-Retentionsmotiv in der Aminosäuresequenz des hOX ₂ -Rezeptors.....	63
Abb. 4-1	Dominant-negativer Effekt der hOX ₂ R-Splicevariante	66
Abb. 7-1	Vektorkarten hOX ₂ R-WT-pSGEM und hOX ₂ R-SV-pSGEM.....	93
Abb. 7-2	Vektorkarten hOX ₂ R-WT-pTracer-CMV/Bsd und hOX ₂ R-SV-pTracer-CMV/Bsd.....	94
Abb. 7-3	Vektorkarten hOX ₂ R-WT-pCR4-TOPO und hOX ₂ R-SV-pCR4-TOPO.....	95
Abb. 7-4	Vektorkarten hOX ₂ R-WT-pEYFP-N1 und hOX ₂ R-SV-pEYFP-N1	96
Abb. 7-5	Vektorkarten hOX ₂ R-WT-pcDNA3.1 und hOX ₂ R-SV-pcDNA3.1	97

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1	Primer für die Klonierung	15
Tabelle 2-2	Primer für die real-time-PCR.	22
Tabelle 2-3	Aussaatbedingungen für NCI-H295R- und CHO-Zellen	26
Tabelle 2-4	Transfektionsbedingungen für verschiedene Zellkulturplatten	27
Tabelle 2-5	Absorptions- und Emissionsmaxima der eingesetzten Fluoreszenzproteine... ..	29
Tabelle 7-1	Name und Erkennungssequenz der verwendeten Restriktionsenzyme	87
Tabelle 7-2	Zusätze zum DMEM/Ham's F-12 Medium	89
Tabelle 7-3	Barth-Medium mit Calcium	91
Tabelle 7-4	Barth-Medium ohne Calcium	91
Tabelle 7-5	Hypertone Häutungslösung	91
Tabelle 7-6	Standard-Ringerlösung (NFR).....	91
Tabelle 7-7	Kalium-Ringerlösung (KFR).....	91

8 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, seine Unterstützung und seine hervorragende Betreuung bedanken. Seine stetige Diskussionsbereitschaft und konstruktiven Denkanstöße haben mir im Verlauf der Experimente und bei der schriftlichen Niederlegung der Arbeit sehr geholfen.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Dominiak für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz am Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck verpflichtet.

Auch bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Heinrich Terlau möchte ich mich bedanken, der mich in sämtliche in der Arbeit vorkommende Techniken im Zusammenhang mit den Voltage-Clamp-Messungen einwies und mir bei der Interpretation der Daten hilfreich zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Dendorfer danke ich für die Hilfestellung bei der Durchführung von Untersuchungen am konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop.

Des weiteren gilt mein Dank Frau Christine Eichholz und Frau Marie Luise Stolte für ihre Unterstützung während des experimentellen Teils der Arbeit sowie allen Mitarbeitern des Instituts für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, die für meine Fragen stets ein offenes Ohr hatten und mir bei der Lösung vieler Probleme halfen.

Der Universität zu Lübeck möchte ich für das Promotionsstipendium danken.

Abschließend bedanke ich mich bei allen anderen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen, insbesondere bei Fabian, Friederike, Philipp und bei meinen Eltern.

9 Curriculum vitae

An dieser Stelle erscheint in der gedruckten Version der Lebenslauf.

Veröffentlichungen

Wenzel J, Grabinski N, Knopp CA, Dendorfer A, Ramanjaneya M, Randeve HS, Ehrhart-Bornstein M, Dominiak P, Jöhren O. Hypocretin/orexin increases the expression of steroidogenic enzymes in human adrenocortical NCI H295R cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009 Nov; 297(5): R1601-9.

Posterpräsentationen

2008	49. Jahrestagung der Gesellschaft für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Mainz
2009	Eighth Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society
2010	Seventh Forum of European Neuroscience, Amsterdam