



*Friedrich-Schiller-Universität Jena*  
*-Universitätsklinikum Jena-*

***Agonist-selektive Phosphorylierung und Dephosphorylierung des humanen Somatostatinrezeptors 5***

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Dipl.-Biochem. Aline Petrich**

**geboren am 07.02.1981 in Sebnitz**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Schulz am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena angefertigt.

*Für*

*Lisbeth Schade und Helmut Petrich*

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Stefan Schulz für die Möglichkeit in seiner Gruppe meine Doktorarbeit anfertigen zu können, bedanken sowie für seine Flexibilität in der Wahl dieses interessanten Projektes. Besonders für seine fachliche Unterstützung sowie seinen unerschöpflichen, motivierenden Optimismus danke ich ihm sehr. Auch ermöglichte er es, dass ich in dieser Zeit ein Postgradualstudium absolvieren konnte, wofür ich ihm auf ewig dankbar bin, da es mein Leben immens bereichert hat und es nicht selbstverständlich ist, so von seinem Chef unterstützt zu werden.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Heike Stadtler für die sehr gute fachliche Assistenz bedanken, ohne ihre sehr gute Arbeit bei der Antikörperaufreinigung wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Ein weiteres herzliches Dankeschön gilt meinen lieben Kollegen und Doktoranden, die eine tolle Arbeitsatmosphäre und auch privat sehr viel Freude bereitet haben.

Ein riesiges Dankeschön gilt Frau PD Dr. Amelie Lupp, die diese Arbeit korrigiert hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Soviel Pasta kann ich gar nicht kochen, wie diese Frau als Dank verdient hätte.

Bei Frau PD Dr. Brigitte Kaiser möchte ich mich für die entgegengebrachte Sympathie und Hilfestellung ganz herzlich bedanken. Ich konnte von ihr sehr viel lernen und ich schätze sie sehr als Kollegin und vor allem als Person. Unsere Gespräche werde ich sehr vermissen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner ganzen Familie, die mich immer unterstützt und motiviert haben, meiner Mutter, die meine persönliche Heldin ist und mein Vater, der mir beibrachte, immer hart für das zu arbeiten, was man erreichen möchte, an sich zu glauben und nie aufzugeben. Julia Richter gilt mein besonderer Dank, da sie nicht nur eine tolle Freundin, sondern auch eine exzellente Lehrerin ist, sie fand einfach jedes Komma, dass ich falsch gesetzt habe und hatte immer ein offenes Ohr für mich.

Auch meinen Freunden und besonders meinen Mädels möchte ich für die tolle Zeit in meinem geliebten Jena danken.

# Inhalt

<b><u>INHALT .....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u></b>	<b><u>4</u></b>
<b><u>1 EINLEITUNG .....</u></b>	<b><u>5</u></b>
<b>1.1 G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 STRUKTUR UND FUNKTION VON G-PROTEINEN UND „SECOND MESSENGER “GENERIERUNG .....	6
1.1.2 SIGNALTRANSDUKTION G-PROTEIN-GEKOPPELTER REZEPTOREN .....	9
1.1.3 DIE BEDEUTUNG DER PHOSPHORYLIERUNG UND DEPHOSPHORYLIERUNG FÜR DIE SIGNALTRANSDUKTION G-PROTEIN-GEKOPPELTER REZEPTOREN .....	11
<b>1.2 SOMATOSTATIN.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 SOMATOSTATINREZEPTOREN .....</b>	<b>16</b>
1.3.1 DER SOMATOSTATINREZEPTOR 2 UND SEINE BEDEUTUNG FÜR NEUROENDOKRINE TUMOREN .....	20
1.3.2 DER SOMATOSTATINREZEPTOR 5 UND SEINE BEDEUTUNG FÜR NEUROENDOKRINE TUMOREN .....	22
<b>1.4 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT.....</b>	<b>25</b>
<b><u>2 MATERIAL UND METHODEN.....</u></b>	<b><u>26</u></b>
<b>2.1 MATERIAL .....</b>	<b>26</b>
2.1.1 CHEMIKALIEN .....	26
2.1.2 ANTIKÖRPER .....	26
<b>2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....</b>	<b>27</b>
2.2.1 RESTRIKTION VON DNA.....	27
2.2.2 AGAROSE-GELEKTROPHORESE UND ELUTION VON DNA AUS AGAROSE-GELLEN.....	28
2.2.3 KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN IN LINEARISIERTE PLASMIDVEKTOREN .....	28
2.2.4 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN UND HITZESCHOCK-TRANSFORMATION.....	28
2.2.5 PLASMID-DNA-AMPLIFIKATION UND -PRÄPARATION .....	29
<b>2.3 BIOCHEMISCHE METHODEN .....</b>	<b>29</b>
2.3.1 PROTEINBESTIMMUNG .....	29
2.3.2 NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHESE (SDS-PAGE) .....	30
2.3.3 WESTERN-BLOT-ANALYSE UND IMMUNDETEKTION.....	30
2.3.4 DOT-BLOT-ANALYSE .....	31
2.3.5 ANREICHERUNG DER REZEPTORPROTEINE MITTELS WEIZENKEIM-LEKTIN .....	31
<b>2.4 ZELLKULTUR .....</b>	<b>32</b>
2.4.1 KULTIVIERUNG UND TRANSIENTE TRANSFEKTION VON HEK293-ZELLEN .....	32

2.4.2 STABILE TRANSFEKTION VON HEK-ZELLEN.....	32
2.4.3 TRANSFEKTION MIT SMALL INTERFERING RNA (siRNA).....	33
2.4.4 ZELLBEHANDLUNG, ZELLAUFARBEITUNG UND ZELLYSE.....	33
2.4.5 IMMUNCYTOCHEMIE .....	33
2.4.6 KONFOKALE LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE .....	34
2.4.7 DATENAUSWERTUNG .....	34
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 UNTERSUCHUNGEN ZUM PHOSPHORYLIERUNGSVERHALTEN VON T333 UND T347 .....</b>	<b>35</b>
3.1.1 CHARAKTERISIERUNG DER PHOSPHOSPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER T333 UND T347 .....	35
3.1.2 AGONIST-INDUZIERBARE REZEPTORINTERNALISIERUNG .....	37
3.1.3 KONZENTRATIONSABHÄNGIGE PHOSPHORYLIERUNG DES HSST <sub>5</sub> AM T333 .....	37
3.1.4 AGONISTEN-SELEKTIVE PHOSPHORYLIERUNG AM THREONIN 333 .....	39
3.1.5 AGONISTENSELEKTIVE INTERNALISIERUNG DES HUMANEN SOMATOSTATINREZEPTORS 5 .....	40
<b>3.2 VERGLEICH DER ZEITABHÄNGIGEN PHOSPHORYLIERUNG VON HSST<sub>5</sub> UND HSST<sub>2</sub> .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3 VERGLEICH DER ZEITABHÄNGIGEN DEPHOSPHORYLIERUNG VON HSST<sub>5</sub> UND HSST<sub>2</sub>.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4 IDENTIFIZIERUNG DER FÜR DIE PHOSPHORYLIERUNG AM T333 DES HSST<sub>5</sub> VERANTWORTLICHE KINASE .....</b>	<b>46</b>
<b>3.5 IDENTIFIKATION DER FÜR DIE DEPHOSPHORYLIERUNG AM T333 DES HSST<sub>5</sub> VERANTWORTLICHEN PHOSPHATASE .....</b>	<b>47</b>
3.5.1 INHIBITORSTUDIEN MIT CALYCVLIN A UND OKADASÄURE ZUR UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER PHOSPHATASE 1 UND 2 AUF DIE PHOSPHORYLIERUNG AM T333 DES HSST <sub>5</sub> .....	48
3.5.2 IDENTIFIZIERUNG DER FÜR DIE DEPHOSPHORYLIERUNG AM T333 VERANTWORTLICHEN PP1- ISOFORM.....	49
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 AGONIST-SELEKTIVE PHOSPHORYLIERUNG DES HUMANEN SOMATOSTATIN-REZEPTORS 5 . .....</b>	<b>50</b>
4.1.1 INTERNALISIERUNGSVERHALTEN DES HUMANEN SOMATOSTATINREZEPTORS 5 NACH AGONISTENSTIMULATION .....	53
<b>4.2 DEPHOSPORYLIERUNG AM HUMANEN SOMATOSTATINREZEPTOR 5 .....</b>	<b>55</b>
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>59</b>
<b>6 ANHANG .....</b>	<b>75</b>
<b>6.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>75</b>

<b>6.2</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>76</b>
<b>6.3</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>77</b>
<b>6.4</b>	<b>ANTIKÖRPER .....</b>	<b>79</b>
6.4.1	PRIMÄRE ANTIKÖRPER .....	79
6.4.2	SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER .....	79
<b>6.5</b>	<b>CDNA-EXPRESSIONSKONSTRUKTE .....</b>	<b>80</b>
<b>6.6</b>	<b>SIRNA-KONSTRUKTE .....</b>	<b>80</b>
<b>6.7</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>81</b>
<b>6.8</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNG .....</b>	<b>81</b>
<b>6.9</b>	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>82</b>

### Zusammenfassung

Die Gruppe der Somatostatinrezeptoren, die aus fünf Subtypen besteht und zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, bildet für die Diagnose und Therapie von neuroendokrinen Tumoren eine der wichtigsten pharmazeutischen Ziele. Besonders dem Somatostatinrezeptor 2 ( $sst_2$ ) kommt eine große Bedeutung als Zielstruktur bei der Therapie von Akromegalie-Patienten zu. Da der natürliche Ligand Somatostatin durch seine kurze Halbwertszeit als therapeutisches Mittel limitiert ist, wurden in den vergangenen Jahrzehnten Somatostatinanaloga entwickelt, die zum Teil eine höhere Affinität und ein besseres Wirkprofil am Rezeptor aufweisen als der natürliche Ligand. In den vergangenen Jahren zeigte sich jedoch, dass es häufig nach Langzeittherapien zu einem Wirkungsverlust von z.B. Octreotid auf die Karzinoide oder Hypophysenadenome kommen kann, was eng mit einem Verlust der  $sst_2$ -Dichte auf den Zellen einhergeht. Da der Somatostatinrezeptor 5 ( $sst_5$ ) häufig mit dem  $sst_2$  auf diesen Tumoren koexprimiert wird, wurden neue Somatostatinanaloga wie Pasireotid (SOM230) entwickelt, die über ein breiteres Wirkspektrum und Bindungsprofil verfügen als Octreotid. Im Gegensatz zum sehr gut untersuchten molekularen Wirkmechanismen des  $sst_2$  ist nur sehr wenig über die Regulierung des  $sst_5$  bekannt. Deshalb wurden in dieser Arbeit phosphorylierungsspezifische Antikörper generiert und charakterisiert, die zur Aufklärung der Regulierung des  $sst_5$  nach Stimulierung mit verschiedenen Agonisten, wie SS-14, Octreotid oder Pasireotid, beitragen sollten. Es wurden durch Inhibitor- und siRNA-*Knockdown*-Untersuchungen sowie durch Western Blot und immunzytochemische Studien gezeigt, dass SS-14, den stärksten, Pasireotid und L817,818 ( $sst_5$ -Agonist) einen partiellen und Octreotid und KE108 gar keinen Effekt auf die Phosphorylierung der zwei untersuchten Threonine an den Positionen 333 und 347 des C-Terminus sowie auf das Internalisierungsverhalten des  $sst_5$  haben. Erstmals konnte für den  $sst_5$  nachgewiesen werden, dass er homolog durch die GRK2 an der agonisten-induzierbaren Stelle T333 phosphoryliert wird, während die Position T347 konstitutiv phosphoryliert war. Auch konnte gezeigt werden, dass es beim  $sst_5$  im Vergleich zum  $sst_2$  sowohl zu einer schnelleren Phosphorylierung als auch zu einer rascheren Dephosphorylierung nach Agonistengabe kam. Es konnte in dieser Arbeit auch das verantwortliche dephosphorylierende Enzym und die zugehörige katalytische Untereinheit, die PP1 $\gamma$ , identifiziert werden.

# 1 Einleitung

## 1.1 *G-Protein-gekoppelte Rezeptoren*

Die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) wird von mehr als 800 Genen kodiert (Hill 2006) und in über 100 Subfamilien unterteilt. Sie stellt damit die größte und vielfältigste Gruppe von membranständigen Rezeptoren dar. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind von großer pharmakologischer Relevanz. Mit einem Anteil von über 30% auf dem pharmazeutischen Markt zielt eine der größten Arzneimittelgruppen auf die GPCRs als Zielstrukturen ab (Jacoby et al. 2006, Goddard und Watts 2012). Generell sind GPCRs aus sieben  $\alpha$ -helikalen transmembranären Domänen aufgebaut, die durch drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind und einen extrazellulären Amino (N)-Terminus und einen intrazellulären Carboxyl (C)-Terminus besitzen (Heilker et al. 2009). Nach Bindung des Agonisten am N-Terminus der Rezeptoren wird intrazellulär ein Guanidindiphosphat (GDP) durch ein Guanidintriphosphat (GTP) an einem heterotrimeren G-Protein, bestehend aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit, ausgetauscht. Anschließend dissoziieren diese G-Protein-Untereinheiten, vermittelt durch eine GTPase-Aktivität, voneinander und lösen in der Zelle je nach Art der  $G\alpha$ - bzw.  $G\beta\gamma$ -Untereinheit unterschiedliche Signalwege aus. Die Liganden der GPCRs stellen wie die Rezeptoren selbst eine große und diverse Gruppe von biogenen Aminen, Aminosäuren, Peptiden, Proteinen, Prostanoiden, Phospholipiden, Fettsäuren, Nukleosiden und Nukleotiden sowie  $Ca^{2+}$ -Ionen, Odorantien (Duftmoleküle) und Protonen dar (Jacoby et al. 2006).

Die GPCRs der Säugetiere werden klassischerweise in drei große Familien eingeteilt: A, B und C (Kolakowski 1994). Zur rhodopsinähnlichen A-Familie der GPCRs gehören sowohl Aminerge als auch einige peptiderge GPCRs. Nukleotide, Lipide und andere klein molekulare Verbindungen bilden die Ligandengruppe dieser Rezeptoren. Diese A-Familie der GPCRs stellt die größte und bestuntersuchte Gruppe hinsichtlich ihrer Struktur und Funktionalität der Rezeptoren dar. Zur sekretinähnlichen B-Familie der GPCRs gehören hauptsächlich peptiderge Rezeptoren, die verschiedene Neuropeptide binden und die dritte Familie der GPCRs (Familie C) bilden vor allem die

metabotropen Glutamatrezeptoren und die Ca<sup>2+</sup>-sensorischen Rezeptoren (Jacoby et al. 2006).

### 1.1.1 Struktur und Funktion von G-Proteinen und „second messenger“ Generierung

Die G-Proteine stellen einen heterotrimeren Komplex aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit dar. Von diesen G-Protein-Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  gibt es verschiedene Isoformen, die nach Aktivierung des Rezeptors von diesem dissoziieren. Dabei leiten sie unabhängig voneinander in der Zelle unterschiedliche Signalwege ein. Der Signalweg, der über die G $\alpha$ -Untereinheit bzw. das Dimer  $\beta\gamma$  ausgelöst wird, ist abhängig von deren Isoformen.

In Tabelle 1 ist eine Übersicht über Vorkommen und Funktion der verschiedenen G-Protein-Untereinheiten dargestellt.

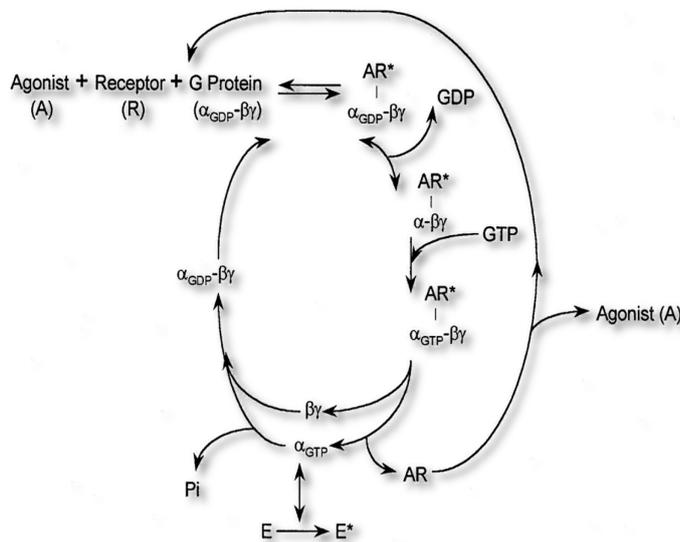
Klasse	G-Untereinheit	Vorkommen	Signalweg
<b>G<sub>s</sub></b> (Choleratoxin-sensitiv)	G $\alpha_s$	weit verbreitet	Aktivierung AC
	G $\alpha_{olf}$	olfaktorisches System	Aktivierung Ca <sup>2+</sup> -Na <sup>+</sup> -Kanäle
<b>G<sub>i</sub></b> (Pertussistoxin-sensitiv)	G $\alpha_i$ , G $\alpha_{i2}$ , G $\alpha_{i3}$	weit verbreitet	Inhibierung AC Hemmung der Ca <sup>2+</sup> -Kanäle
	G $\alpha_{oA,B}$	Gehirn	Aktivierung der K <sup>+</sup> -Kanäle
	G $\alpha_z$	Gehirn, Nebenniere	Aktivierung der PLC, PLA2, PI3K $\gamma$
<b>G<sub>q/11</sub></b>	G $\alpha_q$ , G $\alpha_{11}$ , G $\alpha_{14}$ , G $\alpha_{15}$ , G $\alpha_{16}$	weit verbreitet hämatopoetisch	Aktivierung PLC
	<b>G<sub>12/13</sub></b>	G $\alpha_{12}$ , G $\alpha_{13}$	weit verbreitet
<b>G<math>\beta</math></b>	G $\beta_1$ , $\beta_2$ , $\beta_3$ , $\beta_4$	weit verbreitet	PLC- $\beta$ , PI3K, GRK
	G $\beta_5$	Retina, neural	Src-Familien Kinasen Rho-GTPasen,
<b>G<math>\gamma</math></b>	G $\gamma_1$ , $\gamma_2$ , $\gamma_3$	Retina/ Gehirn	Adenylatcyclasen
	G $\gamma_4$ , $\gamma_5$ , $\gamma_7$		Phoduzin, Btk-Kinasen,
	G $\gamma_6$	weit verbreitet	K <sup>+</sup> -, Ca <sup>2+</sup> -, Na <sup>+</sup> -Kanäle

**Tabelle 1:** Übersicht der Klassen und G-Protein-Untereinheiten. Die G $\alpha$ -Untereinheiten werden in 4 Klassen nach ihren funktionellen Eigenschaften eingeteilt. AC: Adenylatcyclase, Btk-Kinasen: Bruton's Tyrosinkinase, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, PI3K: Phosphoinositol-3-Kinase, PLA und C: Phospholipase A/C, Rho-GDP: kleines G-Protein, Src-Kinase: (zusammengesetztes Akronym aus cellular und sarcoma) Tyrosinkinase

Bisher sind 16 Gene bekannt, die für insgesamt 23  $G\alpha$ -Untereinheiten kodieren, die nach Sequenzhomologie und Funktion in 4 Klassen eingeteilt werden (Simon et al. 1991, Thennes und Mehta 2012). Während die  $G\alpha$ -Untereinheiten als Monomere die oben aufgeführten Signalwege aktivieren oder inhibieren, fungieren die  $G\beta$ - und die  $G\gamma$ -Untereinheit als Dimer. Es sind bisher beim Menschen 5  $G\beta$ - und 12  $G\gamma$ -Gene bekannt, die eine große Anzahl unterschiedlicher  $G\beta\gamma$ -Heterodimere bilden können (Hurowitz et al. 2000).

Für die Signaltransduktion nach Ligandenbindung ist vor allem die  $G\alpha$ -Untereinheit verantwortlich. Im basalen, nicht-aktivierten Stadium der GPCRs sind die heterotrimeren G-Proteine auf der cytosolischen Seite des Rezeptors angelagert, wobei die  $G\alpha$ -Untereinheit ein GDP gebunden hat. Dieser Komplex ist verantwortlich für die Lokalisation an der Membran und verhindert gleichzeitig das spontane Dissoziieren des GDPs von der  $G\alpha$ -Untereinheit (Brandt und Ross 1985, Higashijima et al. 1987, Robillard et al. 2000, Evanko et al. 2001). Nach Aktivierung des Rezeptors durch einen Agonisten erfährt dieser eine Konformationsänderung, in deren Folge GDP gegen das in größerer Menge vorkommende GTP ausgetauscht wird. Dabei wird auch die Konformation des heterotrimeren G-Proteins verändert und es kommt zur Auflösung des Komplexes in die  $G\alpha$ - und die  $G\beta\gamma$ -Untereinheit (Sprang 1997, Oldham und Hamm 2006).

Aktiviert  $G\alpha$ -Untereinheiten können unterschiedliche Signalwege auslösen wie Stimulation oder Inhibierung der Adenylatcyclase sowie Interaktionen mit Phospholipase C-Isoformen oder auch Ionenkanälen (Rhee 2001, Kostenis et al. 2005, Lutz et al. 2007).



**Abb. 1:** Aktivierung des G-Protein-Zyklus. Nach Binden der Agonisten an die GPCRs kommt es durch Konformationsänderung der Rezeptoren zu deren Aktivierung (\*). Daraus resultieren Konformationsänderungen auch am heterotrimeren G-Proteinkomplex mit nachfolgender Dissoziation des Komplexes in die  $G\alpha$ -Untereinheit ( $\alpha$ ) und das Dimer  $G\beta\gamma$  ( $\beta\gamma$ ), die wiederum mit anderen Effektorproteinen (E) wie z.B. Enzymen wie Adenylatcyclase oder Phospholipase C-Isoformen interagieren. Beendet wird dieser Mechanismus durch die endogene GTPase-Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheit, die das GTP zu GDP und anorganischem Phosphat (Pi)

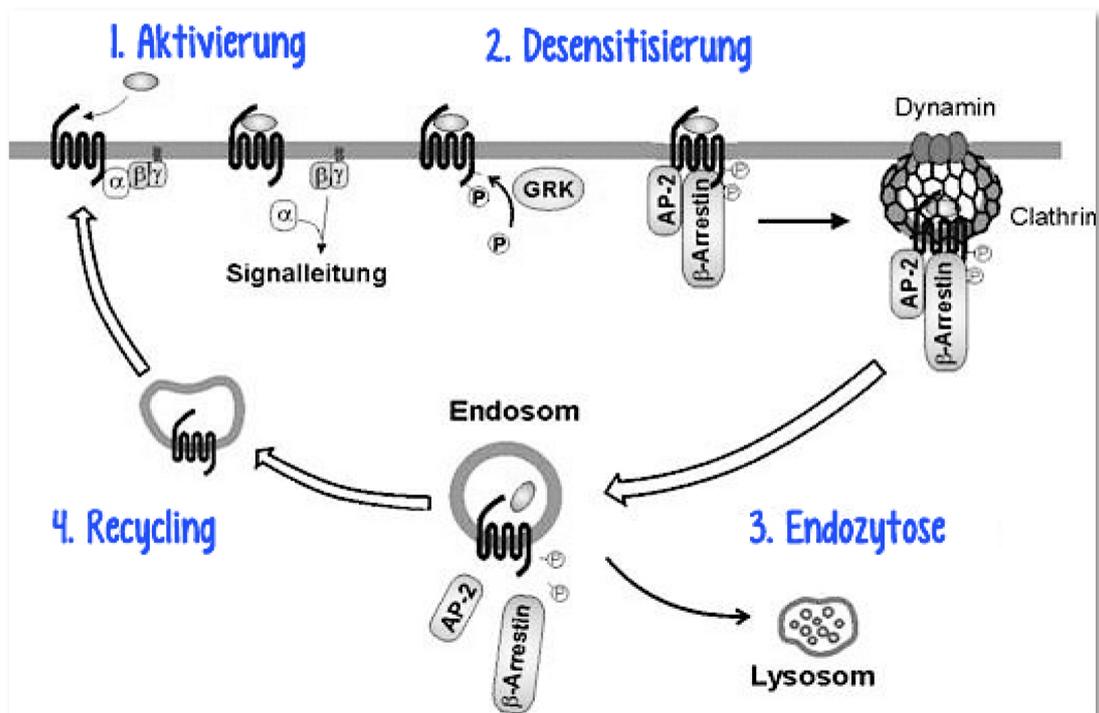
spaltet. Der  $G\alpha$ /GDP-Komplex reassoziiert wieder mit der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit und beide bilden im Anschluss wieder das heterotrimere G-Protein.

Quelle: Quock 1999.

Durch die endogene GTPase-Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheit wird GTP in GDP und anorganisches Phosphat gespalten, die Untereinheiten des G-Proteins reassoziieren und der Zyklus kann erneut beginnen (Abb.1). Gegenwärtig gibt es zwei Modelle für das Zusammenspiel zwischen G-Protein und Rezeptor. Das „collision model“ beschreibt die Interaktion zwischen heterotrimeren G-Protein und GPCR als zufälliges Ereignis. Beide Proteinkomplexe können frei in der Membran diffundieren, wobei nach Aktivierung eines GPCRs das G-Protein in räumlicher Nähe zum Rezeptor bindet und die Signalkaskade beginnt (Lefkowitz et al. 1981, Levitzki 1981). Das „precoupling model“ hingegen beschreibt die Interaktion von G-Protein, Rezeptor und interagierenden, regulatorischen Proteinen als präformierten Komplex, der bereits vor Bindung des Rezeptors durch den Liganden an die Membran assoziiert ist und die G-Proteine nicht erst nach Aktivierung des Rezeptors mit diesem interagieren (Tian und Deth 1993, Gales et al. 2006).

### **1.1.2 Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren**

Wie bereits erwähnt, erfährt der G-Protein-gekoppelte Rezeptor nach Bindung des Liganden eine Konformationsänderung, die zur Bindung von GTP an die  $G\alpha$ -Untereinheit führt. Daraufhin dissoziiert der heterotrimere Komplex und löst unterschiedliche Signalwege in der Zelle aus. In der Regel wird der vom Liganden aktivierte Rezeptor am C-Terminus phosphoryliert. Der C-Terminus gilt als wichtiger Interaktionspartner für regulatorische Proteine, die entweder den Membrantransport neu synthetisierter Rezeptoren steuern, die Rezeptoren in der Membran verankern oder nach Ligandenbindung Prozesse wie Rezeptor-Desensibilisierung, -Internalisierung und -Degradation regulieren (Csaba et al. 2011). Im Wesentlichen sind am Internalisierungs- und Desensibilisierungsprozess zwei Familien von Proteinen essentiell beteiligt, die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRK) und die  $\beta$ -Arrestine (Drake et al 2006). In Abbildung 2 sind diese Wege zusammenfassend dargestellt. Die Phosphorylierung ist hierbei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Bindung von  $\beta$ -Arrestin an den Rezeptor und damit auch für die Internalisierung (Kohout und Lefkowitz 2003). Auf die Bedeutung der Phosphorylierung und der Dephosphorylierung für GPCRs wird im Folgenden noch genauer eingegangen.



**Abb.2:** Rezeptor-Internalisierung, -Desensibilisierung und -Recycling (GPCR-Trafficking). Nach Aktivierung des Rezeptors durch einen Liganden (1) erfährt dieser eine Konformationsänderung, die zur Dissoziation des heterotrimeren G-Protein-Komplexes führt. Unabhängig vom G-Protein-Signalweg kann der GPCR entweder homolog durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs) oder heterolog durch Proteinkinasen A oder C phosphoryliert werden und so die Rekrutierung von β-Arrestin und anderen Proteinen initiieren (2), die den Rezeptor über clathrin-assoziierte Proteinkomplexe in die Zelle internalisieren (3) und entweder dem lysosomalen Abbauweg oder dem endosomalen Recyclingweg (4) zuführen.

Quelle: modifiziert nach <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/droese-jana-2005-07-15/HTML/image005.jpg>

Nach der Phosphorylierung des Rezeptors durch GRKs, bindet β-Arrestin an die β2-Adaptin-Untereinheit des Clathrin-Adapter Komplexes 2 (AP-2), an die schwere Kette des Clathrins und an Phosphoinositide der Zellmembran und bildet so den heterotetrameren AP-2-Komplex (Goodman et al. 1996, Laporte et al. 1999). Durch die GTPase Dynamin können sich die mit Clathrin beschichteten Vesikel abschnüren und den Rezeptor ins Zellinnere transportieren (Conner et al. 2003). Dieser Vorgang ist als Internalisierung bekannt. Gleichzeitig kommt es dadurch auch zu einem Prozess, der als Desensibilisierung der Rezeptoren bezeichnet wird, da der Rezeptor nicht länger für die Bindung von Liganden an der Membran zur Verfügung steht. Durch den Prozess der Desensibilisierung und damit der Unterbindung der Kopplung weiterer G-Proteine an den Rezeptor wurde eine Abnahme der Signaltransduktion um bis zu 80% beobachtet (Attramadal et al. 1992, Lohse et al. 1992). Die β-Arrestine, von denen bisher 4 bekannt sind, steuern sowohl den Prozess der Internalisierung als auch der Desensibilisierung (Kohout und Lefkowitz 2003). Sie können aber auch G-

Protein-unabhängige Signalkaskaden auslösen und fungieren hierbei als Gerüstproteine, um die räumliche Nähe von z.B. Erk, JNK, p38 und PI3-Kinase zu den GRKs sicherzustellen (Guo und Whitmarsh 2008, Bianchi und Ferrari 2009, Meng et al. 2009, DeFea 2011). Nach der Internalisierung gibt es zwei Möglichkeiten, wie mit dem Rezeptor verfahren wird. Zum einen kann der Rezeptor dem endosomalen Weg zugeführt werden, was mit der Dissoziation des Liganden, der Abspaltung der Phosphatreste im sauren Milieu und dem anschließenden Recycling zurück zur Zellmembran assoziiert ist. Danach steht der Rezeptor wieder der Bindung von Liganden zur Verfügung, weshalb auch von einer Resensibilisierung gesprochen wird. Zum anderen kann der Rezeptor aber auch den lysosomalen Weg beschreiten und dabei zunächst ubiquitiniert und anschließend abgebaut werden. Ubiquitinierung wird durch 3 Enzyme vermittelt. Die ersten beiden Enzyme E1 und E2 sind für die Aktivierung und Rekrutierung von Ubiquitin zum GPCR verantwortlich. Das dritte Enzym E3, eine Ubiquitin-Ligase, erkennt zeitabhängig ihr Protein-Substrat (GPCR) und vermittelt die Bindung von Ubiquitin an den Rezeptor (Hershko und Ciechanover 1998). Welcher Weg nach der Internalisierung von GPCRs in die Zelle eingeschlagen wird, kann davon abhängen, welche E3-Ubiquitin-Ligase am  $\beta$ -Arrestin bindet (Shenoy et al. 2001). Wenn die E3-Ligase Mdm2 an  $\beta$ -Arrestin bindet, kann der Rezeptor zur Zellmembran zurückkehren (Luttrell und Gesty-Palmer 2010). Es sei noch erwähnt, dass GPCRs auch ohne clathrin-beschichtete Vesikel ins Zellinnere transportiert werden können. Internalisierung findet auch durch andere pinozytische Mechanismen und vor allem durch Caveolenbildung der Membran statt, eine Art Abschnürung der Zellmembran, die auch dynamin-abhängig ist (Conner und Schmid 2003, Gaborik und Hunyady 2004, Maxfield und Graw 2004).

### **1.1.3 Die Bedeutung der Phosphorylierung und Dephosphorylierung für die Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren**

Die Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wird durch einen „Zwei-Schritt“-Mechanismus beendet. Eine G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase (GRK) phosphoryliert den aktiven Rezeptor und erhöht somit die Bindungsaffinität von  $\beta$ -Arrestin zum Rezeptor. Dieses wiederum verhindert auf der zytoplasmatischen Seite die Bindung weiterer G-Proteine an den Rezeptor, womit die G-Protein-induzierte Signaltransduktion nicht mehr möglich ist (Wilden 1995, Krupnick et al. 1997). Dieser

Vorgang wird als Desensibilisierung bezeichnet. Bereits 1972 wurde erstmals eine Phosphorylierung an durch Licht aktiviertem Rhodopsin beobachtet (Bownds et al. 1972). Nur kurz danach wurde die für die Phosphorylierung verantwortliche „Opsin-Kinase“ (heute als GRK1 bezeichnet) beschrieben (Weller et al. 1975). Wenige Jahre später konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Rhodopsins für die schnelle Deaktivierung des durch Licht aktivierten GPCR-Prototyps verantwortlich ist. Es stellte sich die Frage, ob andere durch Hormone aktivierbare GPCRs ähnlich reguliert werden (Liebman und Pugh 1980). Es sind gegenwärtig 7 GRKs bekannt, die alle zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen gehören und in drei Subklassen eingeteilt werden. Die GRK1 (früher als Opsin-Kinase bezeichnet) und die GRK7 (Zapfen-Opsin-Kinase) bilden eine Subklasse (visuelle GRK-Familie). Beide sind hauptsächlich in den Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren von Vertebraten exprimiert, finden sich aber auch in den neuroendokrinen Zellen (Pinealozyten) der Zirbeldrüse (Somers und Klein 1984, Zhao et al. 1997, 1999, Pugh und Lamb 2000). Die GRK 2 und 3 bilden aufgrund struktureller Ähnlichkeit die GRK2-Gruppe ( $\beta$ -adrenerge Rezeptorkinasen) und die GRK 4, 5 und 6 werden als GRK4-Gruppe zusammengefasst. Die letzteren beiden GRK-Gruppen werden ubiquitär exprimiert (Gurevich et al. 2012). Alle GRKs besitzen einen kurzen N-Terminus, der funktionell mit der GPCR-Bindung assoziiert ist, eine *Regulator of G protein Signaling* (RGS)-homologe Domäne (RH) und eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne (KD), die eine starke Homologie zu anderen AGC-Proteinkinasen (cAMP-dependent protein kinase A/cGMP-dependent protein kinase G/protein kinase C), wie PKA, PKB und PKC aufweist (Siderovski et al. 1996). Der C-Terminus der GRKs besitzt zusätzliche strukturelle Elemente, die verantwortlich für die Membranassoziation der GRKs sind und innerhalb der 3 Gruppen divergieren. Die visuellen GRKs 1 und 7 haben kurze carboxylterminale Prenylierungssequenzen, während die GRK2 und GRK3 eine Pleckstrin-homologe Domäne besitzen (PH-Domäne), über die sie mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine in Wechselwirkung treten können (Touhara et al. 1994). Die GRK 4 und 6 besitzen Palmitoylsequenzen (Premont et al. 1996), während die GRK5 im C-Terminus positiv geladene Lipid-Bindeelemente enthält (Jiang et al. 2007). Der C-Terminus der GRK weist gegenüber anderen AGC-Kinasen eine Besonderheit in der Kinasedomäne auf, bei der sich beide Flügel der KD in einer „offenen“ Orientierung befinden und sich die „nucleotide gate“-Region im C-Terminus

der Kinase ungeachtet der Anwesenheit eines ATP-Analogs oder einer G-Protein-Untereinheit ungeordnet darstellt (Lodowski et al. 2006). Dies deutet darauf hin, dass die Kinase zur Aktivierung eine durch die Bindung von aktivierten GPCRs induzierte strukturelle Umsortierung benötigt (Chen et al. 1993). Besonders die GRKs 2, 3, 5 und 6 sind im Organismus breit exprimiert und werden als Kinasen für GPCRs diskutiert (Drake et al. 2006). Die GRK2 und 3 sind bei Abwesenheit von Agonisten im Cytosol lokalisiert und werden nach Aktivierung der Rezeptoren an die Membran rekrutiert. Dieser Prozess wird durch die Bindung der PH-Domäne im C-Terminus der GRK2 an die  $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine sowie der Interaktion der PH-Domäne mit den Membranphospholipiden Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP) und Inositol-1,4,5,-triphosphat ( $IP_3$ ) vermittelt (Pitcher et al. 1992, Lemmon et al. 1996, Daaka et al. 1997). Die GRK 5 und 6 wiederum sind konstitutiv mit der Plasmamembran assoziiert, was mit der Palmitoylsequenz im C-Terminus der GRK6 und mit elektrostatischen Wechselwirkungen des stark basischen C-Terminus der GRK 5 mit den Phospholipiden der Membran erklärt werden kann (Stoffel et al. 1994). Als einzige GRK-Isoform ist die Splicevariante GRK4 $\alpha$  bekannt, die konstitutiv aktiviert ist und somit auch unstimulierte GPCRs phosphorylieren kann (Rankin et al. 2006). Allerdings ist der genaue Mechanismus der Aktivierung der GRKs letztlich noch immer ungeklärt.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden nicht ausschließlich durch GRKs phosphoryliert, sondern andere Kinasen wie die PKC oder die PKA und auch die Src-Kinase sind ebenfalls in der Lage, durch Phosphorylierung eine Desensibilisierung der GPCRs auszulösen (Benovic et al. 1985, Roth et al. 1991, Pitcher et al. 1992, Fan et al. 2001). Hierbei handelt es sich um einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem die durch die aktivierten Rezeptoren generierten *second messenger* in der Lage sind, ihrerseits wiederum Kinasen wie die PKA oder die PKC zu aktivieren und damit sehr rasch eine Reduzierung ihrer eigenen Bildung zu erzielen. Dieser Prozess der Rezeptor-Desensibilisierung wird auch als heterologe Desensibilisierung bezeichnet, da nicht wie bei der homologen Desensibilisierung der Agonist selbst durch Bindung an den Rezeptor und das Zusammenspiel von GRK und  $\beta$ -Arrestin die Desensibilisierung der GPCRs bewirkt. Durch die Generierung phosphorylierungsspezifischer Antikörper konnte am  $\mu$ -Opioidrezeptor gezeigt werden, dass verschiedene Agonisten unterschiedliche Phosphorylierungsmuster am C-Terminus des Rezeptors auslösen

und dass dieser Vorgang durch unterschiedliche GRKs vermittelt wird (Doll et al. 2011).

Während die Bedeutung der Phosphorylierung nach agonisten-induzierter Aktivierung der Rezeptoren bereits früh erkannt wurde und intensiv untersucht worden ist, wurde dem Prozess der Dephosphorylierung nur wenig wissenschaftliche Aufmerksamkeit geschenkt. Bereits Anfang der 1990er Jahre wurde in *Drosophila melanogaster* eine Phosphatase identifiziert, die die Dephosphorylierung von Rhodopsin katalysiert. Die katalytische Untereinheit dieser *retinal-degeneration-C*-Phosphatase (RDGC) besitzt starke Sequenzhomologien zu den Serin/Threonin-Phosphatasen PP1, PP2 und PP3 (Steele et al. 1992, Byk et al. 1993, Vinos et al. 1997). Der Verlust der RDGC-Aktivität führt zu einem völligen Ausbleiben der lichtabhängigen Signaltransduktion und resultiert schließlich im Abbau der Retina, mit nachfolgender Erblindung (Vinos et al. 1997). Im gleichen Zeitraum wurde eine Phosphatase 2 identifiziert, die in der Lage ist, den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor zu dephosphorylieren (Pitcher et al. 1995, Krueger et al. 1997). Die als GRP (*G protein related phosphatase*) bezeichnete Phosphatase 2A wurde zunächst in engen Zusammenhang mit dem Internalisierungsprozess gebracht, da sie an die Membran von Vesikeln gebunden ist und eine Dephosphorylierung des Rezeptors nur im sauren Milieu eines Endosoms katalysieren sollte (Pitcher et al. 1995, Krueger et al. 1997). Später wurden diese Postulate widerlegt, da gezeigt werden konnte, dass die Dephosphorylierung nicht von der Internalisierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors abhängig ist. Die Beteiligung der PP2A am Prozess der Resensibilisierung des Rezeptors und seiner Rückkehr an die Plasmamembran wurde jedoch nachgewiesen (Krueger et al. 1997, Rockman et al. 2002, Vasudevan et al. 2011). Inhibitorstudien mit Okadasäure und Calyculin A an verschiedenen Rezeptoren wie dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor, dem D1-Dopaminrezeptor, dem Thromboxan-A-Rezeptor und dem Vasopressinrezeptor 1 zeigten, dass die Dephosphorylierung möglicherweise von der PP1, PP2 oder verwandten Phosphatasen abhängig ist, jedoch konnten bisher keine Isoformen dieser Enzyme als eindeutig an diesen Prozessen beteiligt identifiziert werden (Innamorati et al. 1998, Gardner et al. 2001, Spurney 2001, Chauvin et al. 2002, Tran et al. 2007). Doll und Mitarbeitern gelang es, den Dephosphorylierungsprozess am  $\mu$ -Opioidrezeptor nach Agonistengabe dahingehend zu entschlüsseln, dass zwei PP1-Isoformen (PP1 $\alpha$  und hauptsächlich PP1 $\gamma$ )

identifiziert werden konnten, die die Dephosphorylierung des  $\mu$ -Opioidrezeptors katalysieren (Doll et al. 2011). Für die in dieser Arbeit behandelten Somatostatinrezeptoren konnten Pöll und Mitarbeiter die PP1 $\beta$  als hauptsächlich verantwortliche Phosphatase für die Dephosphorylierung am Somatostatinrezeptor 2A (sst<sub>2A</sub>) identifizieren (Pöll et al. 2011).

## **1.2 Somatostatin**

In den frühen 1970er Jahren wurde zum ersten Mal das 14 Aminosäuren umfassende Peptid Somatostatin (SS-14) als neuroendokrines Hormon im Hypothalamus identifiziert. Es ist in der Lage die Ausschüttung nicht jedoch die Bildung von Somatotropin aus der Adenohypophyse zu hemmen (Brazeau et al. 1973). Das Somatostatin der Säugetiere geht aus einem 92 Aminosäuren langen Prosomatostatinpeptid hervor, das vorwiegend C-terminal prozessiert wird. Im Wesentlichen gehen aus der Prozessierung des Prosomatostatins 2 bioaktive Formen hervor. Das SS-14, das ursprünglich aus dem Hypothalamus identifiziert wurde und das SS-28, eine um 14 Aminosäuren N-terminal verlängerte Form des SS-14 (Pradayrol et al. 1980). Beides sind zyklische Peptide, die in unterschiedlichen Verhältnissen von verschiedenen Somatostatin produzierenden Zellen sekretiert werden können. Sie können als Neurotransmitter, auto- oder parakrine Regulatoren fungieren oder aber auch diverse physiologische Prozesse regulieren wie Zellsekretion, Neuromodulation, Kontraktilität glatter Muskelzellen, Nährstoffaufnahme und Zellwachstum (Reichlin 1983, Patel et al. 1999). Somatostatin produzierende Zellen befinden sich in großer Dichte im zentralen und peripheren Nervensystem, im Pankreas, im Darm sowie in kleinerer Zahl auch in der Schilddrüse, den Nebennieren, Submandibulardrüsen, Niere, Prostata und Plazenta (Reichlin 1983, Patel et al. 1999). Die Wirkung von Somatostatin in so vielen unterschiedlichen Geweben kann auf zwei Schlüsselprozesse in den Zellen zurückgeführt werden: Hemmung der Zellproliferation und der Zellsekretion. Als Neurotransmitter im Gehirn besitzt Somatostatin Auswirkungen auf die kognitive Leistung und das lokomotorische Verhalten sowie auf sensorische und autonome Funktionen des Gehirns (Reichlin 1983, Epelbaum et al. 1994, Patel et al. 1999). Es hemmt die Ausschüttung von Dopamin im Mittelhirn und von Noradrenalin, *Thyroid-releasing hormone* (TRH), *Corticotropin-releasing hormone* (CRH) und endogenem

SS-14 aus dem Hypothalamus. Es inhibiert sowohl die basale wie die stimulierte GH-Sekretion und die Freisetzung des Thyroid-stimulierendes Hormons (TSH), hat aber keinen Effekt auf die Hormone LH (luteinisierendes Hormon), FSH (Follikelstimulierendes Hormon) oder ACTH (adenocorticotropes Hormon) im gesunden Gewebe (Reichlin 1983, Epelbaum et al. 1994, Patel et al. 1999). Jedoch kann Somatostatin zu einer Erniedrigung erhöhter ACTH-Spiegel beim Morbus Addison (eine seltene Ursache für eine Nebennierenrindeninsuffizienz) sowie bei ACTH-produzierenden Tumoren beitragen. Außerdem ist SS-14 in der Lage, die TRH-stimulierte Ausschüttung von Prolactin in vitro zu hemmen, genauso wie erhöhte Spiegel von Prolactin in Akromegalie-Patienten.

Es sei noch erwähnt, dass Somatostatin in geringen Mengen auch aus Immun- und Entzündungszellen freigesetzt werden kann und so in der Lage ist, die Ausschüttung von Zytokinen wie Interleukin 6 und Interferon  $\gamma$  zu hemmen (Blum et al. 1992, Hayry et al. 1993, Elliott et al. 1998).

Somatostatin vermittelt seine breite Wirkung durch eine Interaktion mit einer Familie aus fünf G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die im Folgenden näher beschrieben werden.

### **1.3 Somatostatinrezeptoren**

Exakt 20 Jahre nach der Entdeckung von Somatostatin wurde durch molekulares Klonen die Struktur des ersten Somatostatinrezeptors (sst) aufgeklärt (Yamada et al. 1992). Gegenwärtig sind fünf humane Somatostatinrezeptoren (hsst<sub>1-5</sub>) kloniert und charakterisiert worden (Moller et al. 2003). Die Gene, die für die sst<sub>1</sub>, <sub>3</sub>, <sub>4</sub> und <sub>5</sub> kodieren, enthalten keine Introns, während das Gen, das den sst<sub>2</sub> kodiert, am 3'-Ende der kodierenden Sequenz ein Intron besitzt. Das Transkript des Genes für sst<sub>2</sub> kann in zwei Splice-Varianten auftreten, als sst<sub>2A</sub> (369 AS) und als am C-Terminus um 38 Aminosäuren verkürzte Form (sst<sub>2B</sub>). Diese Splice-Varianten wurden in Mäusen und Ratten nachgewiesen (Kluxen et al. 1992, Vanetti et al. 1992, Schindler et al. 1998). Im Menschen konnte bisher nur die längere Form des Somatostatinrezeptors 2A gezeigt werden (Fischer et al. 2008, Liu et al. 2008). Bei allen Somatostatinrezeptoren, die bisher sowohl beim Menschen als auch in anderen Spezies nachgewiesen werden konnten, war eine Aminosäure-Sequenz (YANSCANPI/VLY) in der siebten Transmembrandomäne hoch konserviert. Sie gilt als

eine Art Signatur für ssts (Patel et al. 1999). Die fünf humanen ssts besitzen eine bis vier mögliche Glykosylierungsstellen innerhalb des N-Terminus und in der zweiten extrazellulären Schleife und können so posttranslational modifiziert werden (Patel et al. 1999). Das erklärt die unterschiedlichen Molekulargewichtsangaben, die je nach Spezies und Gewebe der ssts variieren können. In den Transmembrandomänen III-VII und in der zweiten extrazellulären Schleife wird die Ligandenbindung an die Rezeptoren vermittelt. Die ssts weisen weiterhin alle im C-terminalen Bereich sowie in der zweiten und dritten intrazellulären Schleife drei bis acht putative Erkennungssequenzen für Kinasen wie PKA, PKC und Calmodulin-Kinase II auf. Alle humanen ssts, bis auf  $sst_3$ , besitzen 12 Aminosäuren entfernt von der 7. Transmembrandomäne einen konservierten Cysteinrest, der über Palmitoylanker die Bindung an die Plasmamembran vermittelt, wie es es bei vielen GPCRs der Fall ist. Der  $sst_3$  verfügt hingegen über einen längeren C-Terminus als die anderen ssts. Insgesamt zeigen die humanen Somatostatinrezeptoren zu den ssts anderer Spezies (Maus und Ratte) eine starke Sequenzhomologie von 82-99% je nach Rezeptor-Subtyp und Spezies (Patel et al. 1999, Moller et al. 2003). Alle humanen ssts binden hochaffin SS-14, SS-28 und das dem Somatostatin ähnliche, im cerebralen Cortex exprimierte, Corticostatin (Broglia et al. 2007). Allein der  $sst_5$  besitzt eine stärkere Bindungsaffinität zu SS-28 als zu SS-14. Im Dünn- und Dickdarm beispielsweise vermittelt der  $sst_5$  seine inhibitorische Wirkung auf das GLP-1 (*glukagon like peptide 1*) über SS-28 nicht jedoch über SS-14 (Chisolm und Greenberg 2002). In Tabelle 2 sind die fünf humanen Somatostatinrezeptoren anhand ihrer Charakteristika zusammenfassend dargestellt.

sst-Subtyp	sst <sub>1</sub>	sst <sub>2</sub>	sst <sub>3</sub>	sst <sub>4</sub>	sst <sub>5</sub>
Molekulargewicht (kDa)	42,7	41,3	45,8	42,0	39,2
Aminosäurenlänge	391	369	418	388	364
Gewebeverteilung	Gehirn, Hypophyse, Inselzellen, Magen, Leber und Nieren	Gehirn, Hypophyse, Inselzellen, Lymphozyten, Magen und Nieren	Gehirn, Hypophyse, T-Zellen, Inselzellen und Magen	Gehirn, Inselzellen, Magen, Lunge und Plazenta	Gehirn, Hypophyse, Lymphozyten, Inselzellen und Magen
Glykosylierungsstellen	3	4	2	1	3

**Tabelle 2:** Gegenüberstellung der fünf humanen Somatostatinrezeptoren. **Alle fünf ssts besitzen ein ähnliches Molekulargewicht, wobei der sst<sub>3</sub> der größte und der sst<sub>5</sub> der kleinste der Gruppe ist. Aufgrund ihrer unterschiedlichen posttranslationalen Modifizierung je nach Gewebe, können diese Angaben abweichen. Der sst<sub>3</sub> besitzt als einziger keinen Palmitoylanker, hat aber einen längeren C-Terminus als die anderen ssts (nach Weckbecker et al. 2003).**

Trotz der starken Sequenzhomologie der ssts zwischen den verschiedenen Spezies gibt es große Unterschiede was die physiologische Regulation der Rezeptoren nach Stimulation mit Agonisten betrifft. Zwar koppeln alle Somatostatinrezeptoren an pertussistoxin-sensitive  $G\alpha_{i1-3}$ -Proteine, wodurch die Adenylatzyklase und damit auch die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) gehemmt wird, jedoch kann ihr agonisten-abhängiges Signalverhalten sehr verschieden sein (Lahlou et al. 2004, Schonbrunn 2008). Das sich anschließende Rezeptor-Trafficking ist dabei abhängig von der Spezies, dem Subtyp, dem Agonisten und dem untersuchten Zelltyp. So kann der in Ratten exprimierte sst<sub>1</sub> nach Bindung des Agonisten ohne  $\beta$ -Arrestin internalisieren, wozu der humane sst<sub>1</sub> nicht in der Lage ist (Tulipano et al. 2004, Tulipano und Schulz 2007). Der sst<sub>2</sub> ist der bestuntersuchte Somatostatinrezeptor. Er ist von allen fünf Subtypen in normalem und tumorösen Gewebe am weitesten verbreitet (Liu et al. 2005). Als logische Konsequenz wurden für die Diagnosefindung der neuroendokrinen Tumore radioaktive Liganden-Screening-Verfahren (Octreoscan) entwickelt, die durch den Nachweis der Expression des sst<sub>2</sub> in der Lage sind, diese Tumore darzustellen (Weckbecker et al. 2003). Die an der Regulierung nach Agonistenbindung des humanen sst<sub>2</sub> beteiligten Phosphorylierungsstellen (insgesamt zwei Serine und vier Threonine) befinden sich im C-Terminus und werden agonist-selektiv phosphoryliert (Nagel et al. 2011). Nach

der Bindung eines Agonisten dissoziieren die selbstassoziierten humanen sst<sub>2</sub>-Homodimere in Monomere und es kommt zu einer stabilen Bindung von  $\beta$ -Arrestin an die Rezeptoren, die als Komplexe auch in den selben endozytotischen Vesikeln internalisieren (Tulipano und Schulz 2007). Damit können die humanen sst<sub>2</sub>-Rezeptoren den Klasse-B-GPCRs zugeordnet werden. Auch der in Ratten exprimierte sst<sub>2</sub> ist in der Lage, agonist-selektiv aktiviert und phosphoryliert zu werden, an  $\beta$ -Arrestin zu binden, als Komplex in clathrin-beschichtete Vesikel verpackt und internalisiert zu werden, um anschließend durch Recycling an die Membran zurück zu kehren (Lesche et al. 2009, Liu et al. 2009, Pöll et al. 2010, Csaba et al. 2012). In HEK (*human embryonal kidney*)-Zellen kann der Ratten-sst<sub>3</sub> nur transient an beide nicht visuellen  $\beta$ -Arrestine binden, weshalb er zu den Klasse A-GPCRs gezählt werden kann, die nur lockere Komplexe zwischen Rezeptoren und  $\beta$ -Arrestinen zulassen (Tulipano et al. 2004). Im Gegensatz zum sst<sub>2</sub> und sst<sub>5</sub> zeigen sowohl der humane als auch der Ratten-sst<sub>3</sub> keinen effektiven Recycling-Prozess nach Agonisten-Stimulation, obwohl auch der sst<sub>3</sub> C-terminal phosphoryliert werden kann (Stroh et al. 2000, Tulipano et al. 2004, Lesche et al. 2009). Ein großer Teil des internalisierten sst<sub>3</sub> wird ubiquitiniert und dem lysosomalen Abbauweg zugeführt (Tulipano et al. 2004, Jacobs und Schulz 2008). Der sst<sub>4</sub> nimmt eine Sonderstellung innerhalb der fünf ssts ein. Er ist als einziger der fünf Rezeptoren nicht in der Hypophyse exprimiert und seine Aktivierung durch Agonisten resultiert in einem vom Internalisierungsprozess unabhängigen Signalweg. Es konnte am sst<sub>4</sub> das erste Mal gezeigt werden, dass eine Rezeptoraktivierung unabhängig von seiner Desensibilisierung sein kann (Smalley et al. 1998, Engström et al. 2006, Schonbrunn 2008). Der humane sst<sub>5</sub> (hsst<sub>5</sub>) in CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen ist in der Lage, nach Agonistbindung zu desensibilisieren (Wilkinson et al. 1997, Hukovic et al. 1998). In HEK-Zellen, die stabil den Ratten-sst<sub>5</sub> (rsst<sub>5</sub>) exprimierten, konnte eine Translokation von  $\beta$ -Arrestin-2, nicht aber von  $\beta$ -Arrestin-1 nach Stimulierung des Rezeptors nachgewiesen werden (Tulipano und Schulz 2007). Seine nur schwache Bindung an  $\beta$ -Arrestine und die schnelle Rückkehr an die Membran nach Stimulierung mit Agonisten lassen den rsst<sub>5</sub> eher der Klasse A-GPCRs zu ordnen (Tulipano und Schulz 2007). Auch eine Stimulierung mit hochaffinen Agonisten wie mit L817,818, BIM-23244 oder KE108 konnte keine Internalisierung des sst<sub>5</sub> in HEK-Zellen auslösen (Cescato et al. 2006). Sowohl in COS-7 (*color odor sapor*)-Zellen als auch endogen in

AtT20 (neuroendokrine Maus)-Zellen konnte gezeigt werden, dass der  $sst_5$  aus intrazellulären Speichern an die Membran rekrutiert wird, nachdem er durch Agonisten stimuliert wurde (Stroh et al. 2000, Tulipano und Schulz 2007).

Nicht nur die Regulation der ssts ist unterschiedlich und variiert je nach Zelltyp, Spezies und Agonist, sondern auch die Expression der ssts kann variieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich die Expression abhängig vom Alter des Organismus verändern kann. Während der embryonalen Entwicklung sind die Somatostatinrezeptoren in vielen Geweben nachweisbar, im Erwachsenenalter aber sind sie hauptsächlich im Gehirn und in den neuroendokrinen Zellen des Dünndarms sowie in der Bauchspeicheldrüse exprimiert (Boy et al. 2011). Besonders zwei der fünf ssts, der  $sst_2$  und der  $sst_5$ , sind im Bezug auf ihr Vorkommen in neuroendokrinen Zellen für die Tumorcharakterisierung und -therapie von großer Bedeutung.

### **1.3.1 Der Somatostatinrezeptor 2 und seine Bedeutung für neuroendokrine Tumoren**

Neuroendokrine Tumore (NETs) bilden eine heterogene Gruppe von Tumoren, die langsam wachsen und aus einer Drüse (Hypophyse, Nebenniere oder Nebenschilddrüse) oder aus endokrinen Gewebe wie dem Pankreas oder dem Magen-Darm-Trakt heraus entstehen können (Virgolini et al. 2010, Oberg und Castellano 2011). Die gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumore (GEP-NETs) machen 2/3 der gesamten NETs aus (Modlin et al. 2003). Die Inzidenz dieser seltenen Tumore liegt bei 1,2-5 Betroffenen/100000 Personen (Modlin et al. 2003, Ramage et al. 2005). 90% aller GEP-NETs produzieren selbst keine Hormone und zählen damit zu den nicht-funktionell aktiven Tumoren, weshalb die Diagnosestellung oft zu spät erfolgt und erst wenn Symptome erkennbar sind. Oft haben diese relativ kleinen Tumore dann bereits metastasiert, häufig in der Leber (Appetecchia und Baldelli 2010). Statistisch liegt für Betroffene die mittlere Überlebenszeit bei 1-2 Jahren. Die Hauptzielstrukturen für die Diagnose und die Therapie der GEP-NETs stellen die ssts dar, da diese in unterschiedlicher Verteilung in bis zu 80% der Fälle auf der Plasmamembran dieser Tumore überexprimiert werden (de Herder et al. 2003). Der häufigste sst-Vertreter auf den Tumoren ist der  $sst_2$ . Er kann nahezu auf jedem GEP-NET nachgewiesen werden, dicht gefolgt vom  $sst_5$ , dem  $sst_3$  und dem  $sst_1$  (Papotti et al. 2002). Aufgrund seiner sehr kurzen Halbwertszeit von unter 3 Minuten

eignet sich SS-14 selbst nicht für therapeutische Zwecke. Deshalb wurde in den frühen 1980er Jahren eine Reihe von synthetischen Somatostatinanaloga (SSA), wie Octreotid (SMS201-995), Vapreotid (RC-160) und Lanreotid (BIM 23014) entwickelt (Appetecchia und Baldelli 2010). Unter therapeutischen Gesichtspunkten sind Somatostatinanaloga die derzeit beste Option für funktionell aktive NETs, das heißt für solche, die selbst Hormone sezernieren. Die SSA sind in der Lage, die hormonell bedingten Symptome zu lindern und sie verfügen über einen antiproliferativen Effekt auf die Tumore (Oberg et al. 2010, Oberg und Castellano 2011). Octreotid, das das Mittel der Wahl bei Akromegalie und bei der Behandlung von GEP-NETs ist, verfügt über eine dreifach höhere Hemmwirkung auf die Insulinausschüttung nach Glukosestimulation und über einen 19fach stärkeren inhibitorischen Effekt auf die GH-Freisetzung als natürliches SS-14 (Bauer et al. 1982). Durch seine molekulare Struktur besitzt es eine längere Halbwertszeit (circa 2 Stunden), jedoch wurde zur Verbesserung der Lebensqualität an immer neuen Formulierungen gearbeitet, so dass heute der Patient sich nicht mehr täglich spritzen muss, sondern bis zu 4 Wochen weitestgehend beschwerdefrei leben kann ohne sich erneut das Mittel applizieren zu müssen (Modlin et al. 2009). Wie das Octreotid besitzt auch das Lanreotid starke Bindungsaffinitäten für  $sst_2$  und  $sst_5$ , mittlere Bindungsaffinitäten für  $sst_3$  und nur geringe für  $sst_1$  und  $sst_4$  (Bruns et al. 1994). Lanreotid ist eine Langzeitformulierung auf der Basis von Octreotid, da erkannt wurde, dass der therapeutische Nutzen größer ist, wenn Dosisspitzen, wie sie bei mehrmaligem Spritzen pro Tag vorkommen, ausbleiben (Christensen et al. 1987, Oberg et al. 2004, van Thiel et al. 2004). Mehr noch, bei der Behandlung von Patienten mit SSA-Langzeitformulierungen konnte gezeigt werden, dass das Tumorwachstum über einen längeren Zeitraum stabilisiert werden kann und dass dabei nur geringe Nebeneffekte zu erwarten sind (Welin et al. 2004).

Auch die Diagnoseverfahren haben sich seit der Entwicklung der ersten radioaktiven Somatostatinanaloga stark verbessert (Waldherr et al. 2002). Die funktionelle Expression von  $sst_2$  und  $sst_5$  in GEP-NETs kann durch eine Injektion von  $^{111}\text{In}$ -Diethylentriamino-Penta-Essigsäure- $(^{111}\text{In-DTPA}^0)$ -Octreotid mit anschließender Szintigraphie (*somatostatin receptor scintigraphy*, SRS) sichtbar gemacht werden. Diese als Octreoscan® bezeichnete Methode ist der Goldstandard für die Diagnose von GEP-NETs, besitzt aber auch Nachteile (Fazio et al. 2010). So dauert es nach der

Injektion 4-24 Stunden, bevor mit der Untersuchung begonnen werden kann und die Sensitivität liegt je nach Tumorart bei 57-77% bei nicht-Insulinomen und nur bei circa 25% bei Insulinomen, da diese tendentiell weniger  $sst_2$  exprimieren (Anderson et al. 2000). Neuere bildgebende Verfahren wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ermöglichen es, noch effektiver NETs zu identifizieren. Auch kann bereits eine Stunde nach der Injektion mit der Aufzeichnung begonnen werden, was einen großen Vorteil gegenüber der bisher üblichen SRS-SPECT (*single photon emission computer tomography*) darstellt. Nachteilig bei dieser Methode ist die relativ schwere Verfügbarkeit des dafür notwendigen Radioliganden [68Ga-DOTA]-D-Phe(1)-Tyr(3)-Octreotid. Dennoch ist damit zu rechnen, dass die  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Octreotid-PET in naher Zukunft die SRS-SPECT in der Diagnose ersetzen wird (Obergruber und Castellano 2011).

### **1.3.2 Der Somatostatinrezeptor 5 und seine Bedeutung für neuroendokrine Tumoren**

Während Octreotid und Lanreotid gute therapeutische Ergebnisse bei der Behandlung von Patienten mit Akromegalie und anderen GH-übersezernierenden Tumoren erzielen, sind sie weitestgehend unwirksam bei Patienten, in denen der  $sst_2$  nicht auf den NETs präsentiert ist, da die Wirkung von Octreotid und Lanreotid abhängig von der  $sst_2$ -Expression ist (Fougner et al. 2008, Casarini et al. 2009). Auch wurde gezeigt, dass eine lange Gabe von Octreotid in einer Reduktion der  $sst_2$ -Dichte resultiert bzw. bei Akromegalie-Patienten kann es auch zu einer Octreotidresistenzentwicklung kommen, da der  $sst_2$  nicht mehr auf den Tumoren exprimiert wird, während der  $sst_5$  in großer Dichte weiterhin auf den Tumoren präsent ist (Plöckinger et al. 2008). Mehr noch, Octreotid hat keinen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung von ACTH-produzierenden Hypophysenadenomen (z.B. Morbus Chushing), bei denen hauptsächlich der  $sst_5$  exprimiert wird (Arnaldi et al. 2005, Theodoropoulou et al. 2010). Bei Carcinoid-Patienten ist Octreotid zwar anfänglich in der Lage die Symptome zu lindern, jedoch sprechen etwa 50% der Patienten nach einem Jahr nicht mehr auf die Behandlung mit Octreotid an (Obergruber et al. 2005, Asnacios et al. 2008).

Diese Beobachtungen führten dazu, dass der  $sst_5$  immer mehr in den Fokus für die Entwicklung neuer SSA mit einem breiteren Wirkspektrum rückt, wie beispielsweise

das Pasireotid (SOM230). Dieses metabolisch stabile, zyklische Hexapeptid zeigt hohe Bindungsaffinitäten für  $sst_{1-3}$  und eine 30- bis 40-fach höhere Bindungsaffinität für  $sst_5$  und  $sst_1$  als Octreotide und Lanreotid (Bruns et al. 2002). Dieses SSA mit seinem Multi-Rezeptor-Bindungsprofil, das dem Wirkungsprofil von endogenem SS-14 sehr ähnlich ist, war in der Lage eine 158-fach stärkere funktionelle Aktivität des  $sst_5$  auszulösen als Octreotid, wobei es außerdem über längere Halbwertszeiten verfügt als Octreotid und Lanreotid (Ben-Shlomo und Melmed 2007, Schmid et al. 2008). In Phase II und III klinischer Studien zeigte Pasireotid gute Ergebnisse bei der Inhibierung der GH-Sekretion von Hypophysentumoren, die mit metastasierenden NETs assoziiert waren, und eine signifikante Hemmung der ACTH-Ausschüttung bei Morbus Chushing-Patienten, die mit den bisher im klinischem Gebrauch verwendeten SSA nicht erzielt werden konnten (Ben-Shlomo und Melmed 2007, Colao et al. 2012). Außer vielversprechenden SSA Pasireotid, das hauptsächlich über den  $sst_5$  seine Wirkung vermittelt, gibt es Bestrebungen SSA zu entwickeln, die die Eigenschaft der Hetero-Oligomerisierung besonders vom  $sst_5$  einbeziehen. Dieser ist in der Lage neben Homodimeren auch Heterodimere aus  $sst_2$  und  $sst_5$  sowie  $sst_5$  und dem Dopamin-2-Rezeptor ( $D_2R$ ) zu bilden. Damit ergeben sich neue Rezeptoreigenschaften, die eine andere Funktionalität besitzen können (Rocheville et al. 2000) und sich in ihrem Bindungs-, Signaltransduktions- und Trafficking-Eigenschaften vom Verhalten der Monomere unterscheiden (Baragli et al. 2007, Sharif et al. 2007). Deshalb wurden in den vergangenen Jahren neue SSA entwickelt, die entweder  $sst$ -selektiv, bi-spezifisch oder Chimären aus Somatostatin-Analoga und Dopamin-Analoga (Dopastatine) sind (Ferone et al. 2005, Modlin et al. 2010). Ihre Wirksamkeit wurde bis jetzt in einigen tierischen und humanen Zelllinien sowie einigen Primärkulturen von menschlichen Tumoren getestet. In humanen Hypophysenadenomzellen konnte eine stärkere Hemmung der Sekretion von GH, ACTH und Prolactin festgestellt werden, wenn SSA verwendet wurden, die beide  $sst_2$  und  $sst_5$  ansprechen, als solche, die nur selektiv für den  $sst_2$  waren (Modlin et al. 2010). Auch die Dopastatine zeigten in verschiedenen Zelllinien stärkere Effekte als die Analoga, die spezifisch entweder  $D_2R$  oder  $sst_2$  und  $sst_5$  ansprechen (Kidd et al. 2007). In einer erst kürzlich erschienenen Arbeit von Arvigo und Mitarbeitern konnte das erste Mal ein direkter, signifikanter Zusammenhang von liganden-induzierten  $sst_5/D_2$ -Dimeren und einem antiproliferativen Effekt in zwei nicht-endokrinen

Zelllinien gezeigt werden (Arvigo et al. 2010). Da besonders der  $5\text{-HT}_1$  und der Dopaminrezeptor  $D_2R$  in fast allen NETs coexprimiert werden, sind diese Dopastatine möglicherweise künftig die Mittel der Wahl für die Behandlung von NETs, es wird aber noch viel Forschungsarbeit nötig sein, um diese sehr neuen medikamentösen Ansätze zur Marktreife zu bringen.

### **1.4 Zielstellung der Arbeit**

Der humane Somatostatinrezeptor 2A ist als pharmazeutisches Target von großer therapeutischer Relevanz für Patienten mit neuroendokrinen bzw. neuroendokrinen-gastrointestinalen Tumoren sowie solchen, die an Akromegalie erkrankt sind. Hinsichtlich seiner molekularen Regulation im C-Terminus und seinem agonistabhängigem Verhalten ist er der Somatostatinrezeptor der am bestuntersuchten seiner Familie. Jedoch zeigen neuere Studien, dass gerade bei Langzeittherapie-Patienten es zu einer Resistenzentwicklung der Medikamente kommt, da der Rezeptor nicht wie bei Beginn der Therapie in großer Zahl auf den Zellen exprimiert wird. Allerdings ist der  $sst_5$ , der Subtyp, der am häufigsten mit dem  $sst_2$  coexprimiert wird, immer noch auf den Zellen präsent. Deshalb rückt in den letzten Jahren bei der Entwicklung neuer Somatostatinanaloga der  $sst_5$  als Target immer mehr in den Fokus der wissenschaftlichen Bemühungen. Gerade auch deshalb, da bis heute noch keine befriedigende Therapie für Morbus Cushing Patienten zur Verfügung steht und gezeigt werden konnte, dass Pasireotid ein Somatostatinanalog, das auf den  $sst_5$  abzielt, zu einer Verminderung der ACTH-Ausschüttung und den damit zusammenhängenden Symptomen führt. Bisher ist jedoch noch recht wenig über dessen Regulation und Verhalten nach Agonistenstimulation bekannt. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, die agonistenselektive Regulation des  $sst_5$  mithilfe von phosphorylierungsspezifischen Antikörpern zu untersuchen, die in Analogie zum  $sst_2$  in der C-terminalen Region des  $sst_5$  spezifisch zwei Threonine erkennen sollten, wenn diese phosphoryliert werden. Dabei sollte in einer vergleichenden Untersuchung von  $sst_5$  und  $sst_2$  die zeitabhängige Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsverhalten gegenüber gestellt werden, sowie dessen Einfluss auf Internalisierung und Recycling der Rezeptoren nach Stimulierung mit SS-14. Um zeigen zu können, ob die Stellen T333 und T347 des  $sst_5$  im C-Terminus kritisch für die Internalisierung des Rezeptors sind, ähnlich wie die Serin- und Threoninreste des  $sst_2$  im C-Terminus, wurde eine Doppelmutante erzeugt, bei der beide Threonine durch die nicht-phosphorylierbaren Alanine ausgetauscht waren. Desweiteren sollte untersucht werden, welche Kinasen für die Phosphorylierung und welche Phosphatasen für die Dephosphorylierung verantwortlich sind.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 *Material*

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Applichem, Biozym, Boehringer/Roche, Clontech, Gibco, Invitrogen, Roth, Sigma-Aldrich und VWR. Sie wurden in der Qualität pro analysi (p.a.) eingesetzt. Spezielle Chemikalien und verwendete Lösungen werden bei den jeweiligen Methodenbeschreibungen angegeben. Die Lösungen wurden mit deionisiertem und zusätzlich autoklaviertem Wasser (Milli-Q<sup>®</sup>, Millipore), (Laboclav<sup>®</sup>, SHP Steriltechnik), hergestellt, das für molekularbiologische Arbeiten geeignet ist.

SOM230 und Octreotid wurden von Dr. Herbert Schmid (Novartis), Ke108 von der Firma Bachem (Schweiz), Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) und Forskolin von der Firma Sigma Aldrich (St. Louis, USA) und L-817,818 von Dr. Susan Rohrer (Merck) bereitgestellt.

#### 2.1.2 Antikörper

Zur Generierung phosphospezifischer Antikörper gegen das phosphorylierte Threonin an der carboxyterminalen Position 333 des Somatostatinrezeptors 5 wurde folgende Sequenz benutzt: KDATA(pT)EPRPD. Diese Sequenz entspricht den Aminosäuren 328-338 des carboxylterminalen Bereichs des humanen sst<sub>5</sub>-Rezeptors. Zur Generierung phosphospezifischer Antikörper gegen das phosphorylierte Threonin an der carboxyterminalen Stelle 347 des Somatostatinrezeptors 5 wurde folgende Sequenz benutzt: QQEA(pT)PPAHR. Diese Sequenz entspricht den Aminosäuren 343-352 des carboxylterminalen Bereichs des humanen sst<sub>5</sub> Rezeptors. Die Peptide wurden über HPLC Säulen gereinigt und an das Hämocyanin der Großen Kalifornischen Schlüssellocknapfschnecke gekoppelt. Die Konjugate wurden 1:1 mit Freund's Adjuvanz gemischt und in eine Gruppe von vier Kaninchen {3567-3570} zur Erzeugung der pT333-Antikörper injiziert. Für den pT347-Antikörper wurde genauso verfahren. Die Konjugate wurden in eine Gruppe von drei Kaninchen {3563-3565} injiziert. Die Tiere wurden in vierwöchigem Intervall immunisiert und die Seren

zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung gewonnen. Die Spezifität der Antisera wurde zunächst im Dot-Blot getestet. Zur weiteren Analyse wurden die Antikörper-Seren gegen das Peptid, das zur Immunisierung der Kaninchen verwendet worden war und auch gegen die nicht phosphorylierte Form des Peptides mittels SulfoLink-Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL) affinitätsgereinigt. Zur Überprüfung der Proteinbeladung der Gele im Western Blot wurde der phosphorylierungsunabhängige Antikörper {UMB-4} verwendet, dessen Generierung und Aufreinigung bereits in (Lupp et al. 2011) beschrieben wurde. Die in dieser Arbeit verwendeten anti psst2A-Antikörper TQRT, TTE und Ser 341/343 sowie der für den humanen SST2 Rezeptor phosphorylierungsunabhängige Antikörper {UMB-1} wurden in vorangegangenen Arbeiten ausführlich beschrieben. (Fischer et al. 2008, Gosh und Schonbrunn 2010, Nagel et al. 2011)

### **2.2 Molekularbiologische Methoden**

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden entsprechend den ausführlich in der Fachliteratur beschriebenen Standardmethoden durchgeführt. Als Beispiel sei die Methoden-Sammlung *Short Protocols in Molecular Biology* erwähnt (Ausubel 2002). Bei der Anwendung von Kits wurde den Angaben des Herstellers gefolgt. Im Folgenden werden die Methoden und insbesondere deren Modifizierungen beschrieben.

#### **2.2.1 Restriktion von DNA**

Zum Verdau von DNA-Plasmiden und DNA-Fragmenten wurden verschiedene Restriktionsenzyme von Fermentas und NEB nach Angaben der Hersteller eingesetzt. Alle durchgeführten Verdau von Plasmiden oder DNA-Fragmenten wurden bei 37 °C für 1-3 h inkubiert. Diese Technik wurde zu Subklonierungen bei Vektoren mit identischen Schnittstellen angewandt oder auch um die DNA, beispielsweise nach einer Plasmid-Präparation, in einem analytischen Gel zu überprüfen.

### **2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA aus Agarose-Gelen**

Zur Trennung und Größenbestimmung von linearisierter DNA für analytische und präparative Zwecke wurde mittels Agarosegelelektrophorese mit 0,8%- bis 1,5%igen (Gew. %) Agarose-Gelen mithilfe von Ethidiumbromid (0,07 Vol. %) und vorherigem Mischen mit 5-fach konzentriertem DNA-Probenpuffer die Probe geladen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1-fach TAE-Puffer (50 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) verwendet. An die Gelelektrophorese-Kammern DNA Sub Cell™ (Bio-Rad) wurde durch das Power Pac HC (Bio-Rad) eine Spannung von bis zu 100 mV angelegt. Die DNA wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels des peqGOLD® Gel Extraction Kits (Peqlab) gemäß den Herstellerangaben eluiert.

### **2.2.3 Klonierung von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmidvektoren**

Das DNA-Fragment und der Vektor wurden wie unter 2.2.2 beschrieben geschnitten und aus einem präparativen Agarose-Gel eluiert. Für die Ligation wurden 2,5 U der T4-DNA-Ligase (Invitrogen) auf 10 µl Reaktionsansatz gegeben. Der Reaktionsansatz enthielt Vektor und Insert in einem Verhältnis von annähernd 1:3 (bezogen auf die Molekülzahl). Die Inkubation erfolgte für 12 – 14 h bei 18 °C.

### **2.2.4 Herstellung kompetenter Bakterien und Hitzeschock-Transformation**

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden 4ml-Übernachtskulturen angeimpft, diese mit 400 ml LB-Medium verdünnt und ca. 2 Stunden, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,6 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Danach wurde die Kultur 5 min in Eiswasser abgekühlt, bei 4000x g in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C 10 min zentrifugiert und das Pellet wurde mit eiskaltem Puffer (100 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert, nachdem der Überstand verworfen worden war. Die Suspension wurde anschließend 30 min auf Eis inkubiert und wiederum bei 4000x g bei 4 °C 10 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 4 ml eiskaltem Calciumchlorid-Puffer (100 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 Vol. % Glycerol) resuspendiert. Die Zelllösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Hitzeschocktransformation wurden 50 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1 µg Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte durch einminütiges Erwärmen im Wasserbad auf 42 °C. Danach folgten nochmals 2 min Inkubationszeit auf Eis. Je nach Selektionsantibiotikum wurden die E. coli-Bakterien unmittelbar danach auf Agarplatten (LB Agar, Invitrogen) mit 100 µg Ampicillin pro ml Agar ausgestrichen. Bei Plasmiden mit Kanamycin-Resistenz wurden die Bakterien vor dem Ausstreichen auf Agarplatten mit 50 µg Kanamycin pro ml Agar bei 37 °C 1 h in LB-Medium ohne Antibiotikum bei 210 rpm geschüttelt.

### **2.2.5 Plasmid-DNA-Amplifikation und -Präparation**

Zur Vorbereitung der Plasmid-DNA-Amplifikation wird von jeder Kolonie eine 2 ml-Übernachtskultur angelegt. Sie besteht aus antibiotikum-haltigem LB-Medium und wird bei 210 rpm bei 37°C geschüttelt. Die Präparation der DNA wurde nach einem modifizierten Protokoll auf Basis alkalischer Lyse durchgeführt (Birnboim und Doly 1979): Nach Pelletieren der Bakterien wurden diese in 300 µl P1-Puffer resuspendiert und anschließend mit P2-Puffer versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Neutralisation mit 300 µl P3-Puffer folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis und darauf folgend eine zehnminütige Zentrifugation der Probe bei 13000xg. Der Überstand wurde mit Isopropanol im Verhältnis 1:0,75 versetzt und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die gefällte DNA bei 13000x g für 15 Minuten zentrifugiert. Das so entstandene DNA-Pellet wurde vorsichtig mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Zur Größen- und Reinheitsbestimmung wurde die DNA in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, gelöst.

Um größere Mengen DNA aufzuarbeiten und um eine bessere Reinheit zu erzielen, wurde der PureLink® Maxiprep Kit (Invitrogen) verwendet. Dazu wurde eine 300-ml-Übernachtskultur benutzt.

## **2.3 Biochemische Methoden**

### **2.3.1 Proteinbestimmung**

Zur Normalisierung der Proteinmengen wurden die Proteinkonzentrationen mit der Bicinchoninsäure-Methode mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) bestimmt. Zusätzlich wurde eine Kalibrierungskurve mit

Rinderserumalbumin, wie vom Hersteller angegeben, erstellt. Die Proben wurden bei einem Absorptionsmaximum des gebildeten Farbkomplexes von 562 nm spektralphotometrisch bestimmt.

### **2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht wurde mittels des Mini-PROTEAN<sup>®</sup>-Tetra-Systems (Bio-Rad Laboratories) eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese in einem Tris-HCl-Puffersystem durchgeführt. Die Proteinproben wurden im SDS-Ladepuffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 Vol. % SDS, 20 Vol. % Glycerol, 100 mM Dithiothreitol, 0,005 Vol. % Bromphenolblau) erhitzt und auf Trenngele mit einem Acrylamid-Anteil von 7,5 Vol. % (Rezeptornachweis) oder 10 Vol. % (alle anderen Proteine) aufgetragen. In die Taschen des Sammelgels (4 Vol. %) wurden zwischen 15 – 20 µl Proben sowie 3 µl eines Molekulargewichts-Markers (Prestained PageRuler, Fermentas) gegeben. Zunächst wurde für 10 Minuten eine Spannung von 90 V angelegt, damit die Proben sich im Sammelgel verdichten können, danach wurden die Proben bei 130 V im Trenngel aufgetrennt, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

### **2.3.3 Western-Blot-Analyse und Immundetektion**

Nach erfolgreich Gelelektrophorese wurden die Polyacrylamid-Gele mit den nach Größen aufgetrennten Proteinen in Blot-Puffer (25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % Methanol, pH 8,3) für 10 min vorinkubiert. Als Vorbereitung für das Blotverfahren wurde die Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) in 100%igem Methanol aktiviert. Anschließend wurden die Proteine vom Proteingel, zwischen Blotpuffer-durchtränkte Whatman-Papiere gelegt, im Trans-Blot<sup>®</sup> Semi-Dry (Bio-Rad) für 1 Stunde bei 0,2 mA auf die Membran übertragen. Danach wurden die unspezifischen Bindungsmöglichkeiten auf der Membran durch 5 Gew. % BSA in TBS-T (TBS mit 0,1 Vol. % Tween 20) für mindestens 45 min bei Raumtemperatur blockiert. Die Membranen wurden im Anschluss daran mit dem Primär-Antikörper in 5 Gew. % BSA in TBS-T für 14-16 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Verdünnungen der Primärantikörper sind im Anhang aufgelistet. Nachdem die Antikörperlösung entfernt und der Blot dreimal mit TBS-T gewaschen worden war, folgte eine zweistündige

Inkubation in dem Meerrettichperoxidase- (HRP-) gekoppelten Sekundär-Antikörpers bei Raumtemperatur. Der sekundäre Antikörper wurde, wie im Anhang angegeben, in TBS-T mit 5 Gew. % BSA verdünnt. Auch hier wurde nach Entfernung der Antikörperlösung der Blot dreimal mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss folgte die Chemilumineszenz-Reaktion mittels SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate von Pierce nach Angaben des Herstellers. Detektiert wurden die auf der Membran befindlichen Proteine über chemilumineszenz-sensitive Röntgenfilme (T-Mat Plus DG Film, Kodak). Für die Entwicklung der Röntgenfilme wurde die automatische Entwicklermaschine Cawomat 2000 (Cawo) verwendet.

### **2.3.4 Dot-Blot-Analyse**

Diese Methode wurde zur Überprüfung der Spezifität der erzeugten Antikörper verwandt. Dazu wurden die PVDF-Membranen, Whatman-Papiere und das Minifold-I-Vakuumfiltrationssystem (Schleicher & Schuell) verwendet. Vor dem Auftragen der Peptidlösung und dem Einbau in die Apparatur wurden die Whatman-Papiere und eine PVDF-Membran 30 min im Blot-Puffer inkubiert. Es wurde einmal mit Blot-Puffer gespült, bevor 100 µl je Peptid-Verdünnung aufgetragen wurden. Danach wurde die Apparatur bei 30 min bei RT inkubiert, die Flüssigkeit abgesaugt und mit Blot-Puffer gespült, bevor die PVDF-Membran ausgebaut wurde. Diese wurde 2 h in TBS-T mit 5 Gew. % Milchpulver blockiert. Die Immundetektion wurde, wie für die Western-Blot-Analyse beschrieben, durchgeführt.

### **2.3.5 Anreicherung der Rezeptorproteine mittels Weizenkeim-Lektin**

Um den  $hsst_5$  mittels Western-Blot-Analyse detektieren zu können, mussten die Rezeptoren im Vorfeld angereichert werden. Dazu wurden 6-cm-Zellkulturschalen verwendet, die bis zu 80% Konfluenz zeigten, was ca. 3 Millionen Zellen entspricht. Nachdem die Zellen ihrer jeweiligen Behandlung unterzogen worden waren, wurden diese einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 0,8 ml RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 Vol. % Igepal, 0,5 Vol. % Natriumdesoxycholat, 0,1 Vol. % SDS) mit Protease-Inhibitoren (Complete-Mini<sup>®</sup> EDTA-free, Roche) und Phosphatase-Inhibitoren (PHOSStop<sup>®</sup>, Roche) für 10 Minuten auf Eis inkubiert und lysiert. Im Anschluss wurde das Zelllysate vom Boden mittels

eines Zellschabers gelöst, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und anschließend eine halbe Stunde bei 4°C und 14000x g zentrifugiert. Ausschließlich der Überstand wurde weiter verwendet; dieser wurde auf 30 µl Weizenkeim-Lektin-Agarose-Kügelchen, die alle N-glykosylierten Proteine binden, gegeben. Die Proben wurden anschließend 2 Stunden bei 4 °C auf einem Rotationsgerät inkubiert. Danach werden die Beads dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen. Nach letztmaligem Waschen wurde von den Agarose-Beads alle Flüssigkeit mit Hilfe einer 0,2-mm-Spritze abgezogen und die Probe mit 60 µl 1x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proteine wurden bei 47°C und 20 min eluiert, bevor zur Western-Blot-Analyse übergegangen wurde.

### **2.4 Zellkultur**

#### **2.4.1 Kultivierung und transiente Transfektion von HEK293-Zellen**

Die in dieser Arbeit verwendete humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 (im Folgenden nur HEK genannt) stammt vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). Die HEK-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), versetzt mit 10 Vol. % fetalem Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin, kultiviert. Die transiente Transfektion erfolgte mit Turbofect® (Fermentas) nach Herstellerangaben.

#### **2.4.2 Stabile Transfektion von HEK-Zellen**

Zur Integration der Rezeptor-DNA in das Genom von HEK-Zellen, wurden diese in 10-cm-Zellkulturschalen ausgesät und mittels Turbofect® mit der entsprechenden DNA transfiziert. Nach 48 Stunden wurden dem Medium als Selektionsantibiotikum 400 µg/ml Geneticinsulfat (G-418) zugesetzt und in der Folge wurde über eine Woche mehrmals der Zellrasen abgeklopft. Die verbleibenden Kolonien wurden in Anwesenheit von 400 µg/ml G-418 weiter kultiviert und die Expression des Rezeptors wurde mittels Immunocytochemie verifiziert. Es empfahl sich, im Anschluss an die erfolgreiche stabile Transfektion Kryostock-Kulturen anzulegen.

### 2.4.3 Transfektion mit small interfering RNA (siRNA)

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetisierten doppelsträngigen siRNA-Oligomere mit Poly-Thymin (dTdT)-Überhang am 3'-Ende wurden wie das siRNA-Transfektionsmittel HiPerFect<sup>®</sup> von Qiagen bezogen. Es wurden pro Ansatz 750.000-1 Million stabil mit dem *hsst5* transfizierte Zellen ausgesät. Direkt im Anschluss wurden die siRNA-Duplexe mit einer Endkonzentration von 200 nM laut Herstellerprotokoll transfiziert. Nach 72 Stunden folgte die weitere Behandlung und Weiterverarbeitung der Zellen. Die Verminderung der Expression der *hsst5*-Rezeptoren (*Knockdown*) wurde durch Western-Blot-Analyse überprüft.

Eine Auflistung der zum Einsatz gekommenen Zielsequenzen ist im Anhang unter 6.6 zu finden.

### 2.4.4 Zellbehandlung, Zellaufarbeitung und Zellyse

Die Behandlung der Zellen mit Rezeptoragonisten bzw. -antagonisten erfolgte in den zur Kultivierung verwendeten Medien. Vor der Lyse wurden die Zellen 1-3 mal mit kaltem PBS gewaschen, bevor sie entweder für die Rezeptoranreicherung (s. 2.3.5) mit RIPA-Puffer oder für die direkte Western-Blot-Analyse mit 1-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer bei 95 °C versetzt und 5 min gekocht wurden, bevor sie auf das SDS-PAGE geladen wurden.

### 2.4.5 Immuncytochemie

Stabil transfizierte HEK-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern in 24-Well-Platten ausgesät und für 16-24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor sie weiterbehandelt wurden. Im Anschluss an die Behandlung der Zellen wurden sie für 30 Minuten in 4 % Paraformaldehyd mit 0,2 % Pikrinsäure in Phosphatpuffer, pH 6,9, bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen permeabilisiert und in 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit 0,1 Vol. % Triton X-100 und 3 Vol. % Ziegen Serum in einem Schritt für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem primären Antikörper in dem oben aufgeführten Puffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Antikörperlösung entfernt worden war und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen worden waren, folgte die Inkubation mit einem Alexa-488-gekoppelten

Sekundärantikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde erneut mit PBS-Puffer gewaschen und die Deckgläschen mit den so angefärbten Zellen mit einem Tropfen Fluoromount-G<sup>®</sup> (SouthernBiotech) auf den Objektträgern fixiert.

### **2.4.6 Konfokale Laser-scanning-Mikroskopie**

Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit einem Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5) unter der Anwendung der Software Leica Application Suite analysiert und die Färbungsergebnisse dokumentiert. Für die Aufnahmen zu einer Serie blieben alle Einstellungen unverändert.

### **2.4.7 Datenauswertung**

Zur Quantifizierung der Intensität von Röntgenfilmsignalen wurde ImageJ 1.39s verwendet. Alle statistischen Analysen wurden mittels des Programms GraphPad Prism 4.0 durchgeführt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop CS2 ,die Abbildungen wurden mit Adobe InDesign CS2 erstellt.

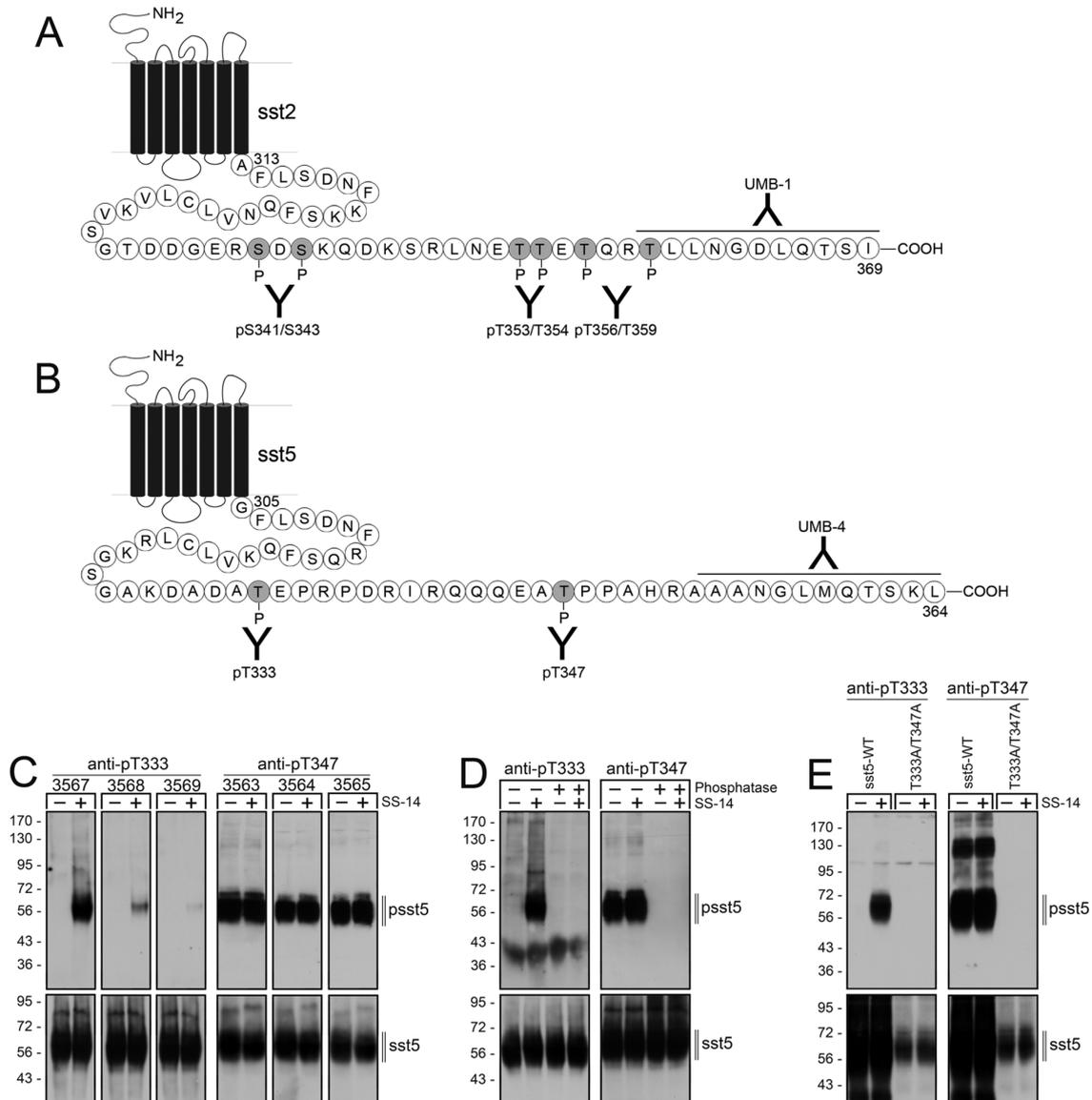
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchungen zum Phosphorylierungsverhalten von T333 und T347

#### 3.1.1 Charakterisierung der phosphospezifischen Antikörper T333 und T347

In vorangegangenen Untersuchungen wurde die agonistenabhängige Phosphorylierung am carboxylterminalen Teil des Somatostatinrezeptors 2A durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen gezeigt (Pöll et. al. 2008, Schönbrunn et. al. 2009). Am  $ss_{2A}$  gehören die Aminosäuren 347-369 des Carboxylterminus zu der Region, die für die Internalisierung und das Recycling des Rezeptors verantwortlich ist. Um zu untersuchen, ob sich diese Befunde auch auf die Regulierung des humanen  $ss_5$  übertragen lassen, wurden entsprechende phosphospezifische Antikörper generiert, die an den carboxylterminalen Positionen 333 und 347 des  $ss_5$  phosphorylierte Threoninreste erkennen sollen (Abb.3A,B). Die anti-pT333 Antikörper {3567}, {3568} und {3569} detektierten ausschließlich die T333-phosphorylierte Form des humanen  $ss_5$ -Rezeptors in mit 1  $\mu$ M SS-14 stimulierten HEK293 Zellen, während in unbehandelten Zellen kein Signal nachgewiesen werden konnte. In ersten Untersuchungen zeigte der pT333 Antikörper {3567} das stärkste Signal und den geringsten Hintergrund, weshalb in allen Folgeexperimenten ausschließlich dieser Antikörper zum Einsatz kam (Abb.3C). Die anti-pT347 Antikörper {3563}, {3564} und {3565} detektierten die T347-phosphorylierte Form des humanen  $ss_5$ -Rezeptors in sowohl mit 1  $\mu$ M SS-14 stimulierten wie auch in unstimulierten HEK293 Zellen. Alle drei zeigten ein gleichstarkes Signal ohne störenden Hintergrund. Für die Folgeexperimente wurde schließlich der anti-pT347 Antikörper {3564} ausgewählt (Abb.3C). Um zu untersuchen, ob es sich bei der Detektion des phosphorylierten Threonins 347 um eine agonistenunabhängige Phosphorylierung handelt und ob beide Antikörper pT333 sowie pT347 spezifisch detektieren können, wurden die Zelllysate im Vorfeld mit Lambdaphosphatase inkubiert und anschließend entweder mit 1  $\mu$ M SS-14 stimuliert oder unstimuliert aufgearbeitet. Wie in Abb.3D zu sehen ist, ist mit beiden Antikörpern nach vorheriger Lambdaphosphatase-Behandlung kein Signal mehr detektierbar. Die Phosphorylierung am Threonin 333 ist somit durch Stimulation induzierbar, während das Threonin an der Stelle 347 offensichtlich konstitutiv phosphoryliert ist. Zur weiteren Charakterisierung der Antikörper und zur

Untersuchung der Abhängigkeit der Internalisierung des  $hsst_5$  von der Phosphorylierung der beiden Threonine, wurde eine Doppelmutante generiert, bei der an den Positionen T333 und T347 im carboxylterminalen Teil des  $hsst_5$  Alanin statt der Threoninereste enthält. Es konnte gezeigt werden, dass beide Antikörper spezifisch die Phosphorylierung am T333 und T347 detektieren, da in den HEK293-Zellen der  $sst_5$ -Mutante weder nach Stimulation mit SS-14 noch in den Kontrollen ein Signal detektierbar war (Abb.3E).

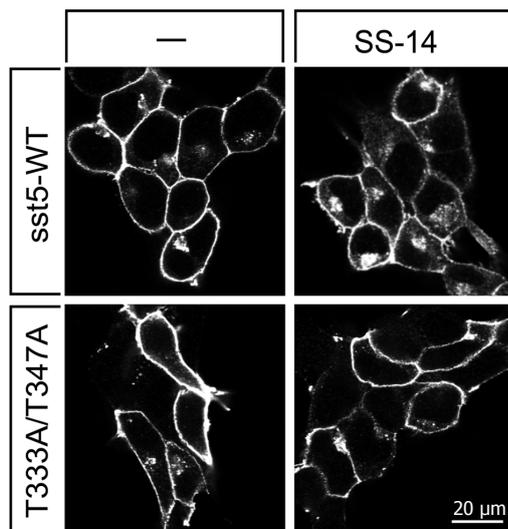


**Abb. 3:** Die Charakterisierung der beiden phosphospezifischen Antikörper am  $hsst_5$ . (A, B) In Analogie zur hochregulativen Region des  $sst_2$  Rezeptors lagen im  $hsst_5$  nur zwei Threoninreste an den Positionen 333 und 347 vor, gegen die im phosphorylierten Zustand spezifische Antikörper generiert wurden. Die phosphounabhängigen Antikörper UMB-1 und UMB-4 wurden zur Kontrolle der Proteinladung der Gele genutzt. (C) linke Spalte: Der anti-pT333 {3567} zeigt das stärkste Signal ohne erkennbaren Hintergrund. Er wurde immer in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  in 5% iger BSA/TBS-Tween-Lösung verwendet. Alle drei anti-pT347 Antikörper (rechte Spalte) zeigten ein robustes Signal ohne nennenswerten Hintergrund. Der verwendete pT347 {3564} Antikörper wurde immer in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  in 5% iger BSA/TBS-Tween-Lösung eingesetzt. (D) linke Spalte: Nach Behandlung mit Lambdaphosphatase war bei beiden Antikörpern kein Signal mehr detektierbar. (E) auch die Doppelmutante des  $hsst_5$  Rezeptors zeigt trotz Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  SS-14 keine Signale, da hier die Threonine durch nicht phosphorylierbare Alanine ausgetauscht worden waren. Somit sind beide pT333-bzw. pT347-Antikörper spezifisch und selektiv.

Insgesamt kann gesagt werden, dass beide phosphoabhängigen Antikörper spezifisch die Phosphorylierung an den beiden Threoninresten detektieren konnten. Während die Phosphorylierung des Threonins an Position 333 durch Agonisten induziert zu werden scheint, schien das Threonin an Position 347 auch in Abwesenheit eines Agonisten phosphoryliert zu sein.

### 3.1.2 Agonist-induzierbare Rezeptorinternalisierung

Zur Untersuchung der agonisten-induzierten subzellulären Lokalisation des  $hsst_5$  wurden stabil  $hsst_5$ -transfizierte Wildtyp-HEK293-Zellen und stabil  $hsst_5$ -T333A/T347A-transfizierte HEK293-Zellen verwendet, bei denen wie in Abb. 4 zu sehen ist, in unstimulierten Zustand der Hauptteil der Rezeptoren an der Zellmembran lokalisiert ist. Nach halbstündiger Inkubation mit  $1 \mu\text{M}$  SS-14 war, im Vergleich zu den Zellen des Wildtyps, bei den Zellen der T333A/T347A-Mutante des  $hsst_5$  kaum eine Internalisierung feststellbar.



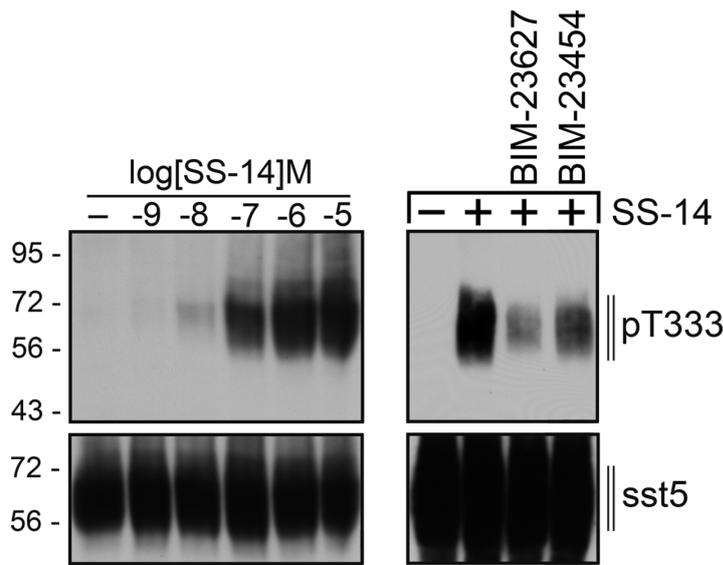
**Abb. 4:** Die Phosphorylierung des Threonins 333 ist für die Rezeptor-Internalisierung des  $hsst_5$  notwendig. Die  $hsst_5$ -Lokalisation wurde durch den phosphorylierungsunabhängigen Antikörper UMB-4 detektiert. Obere Spalte, der Wildtyp Rezeptor ist nach halbstündiger Inkubation mit  $1 \mu\text{M}$  SS-14 zum größten Teil internalisiert, währenddessen die Doppelmutante des  $hsst_5$  nur eine sehr geringe Internalisierung nach gleicher Behandlung zeigte.

Da das Threonin an der Stelle 347 im C-Terminus konstitutiv und damit agonisten-unabhängig phosphoryliert war, schien die Phosphorylierung des Threonins 333 eine Schlüsselrolle in der Regulation der Internalisierung des  $hsst_5$  zu spielen.

### 3.1.3 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung des $hsst_5$ am T333

Da das Threonin an Position 333 des carboxylterminalen Teils des  $hsst_5$  agonisten-abhängig phosphoryliert wurde, wurde im Anschluss die Abhängigkeit der Phosphorylierungsstärke von der SS-14-Konzentration untersucht. Hierzu wurden die mit dem  $hsst_5$  stabil transfizierten HEK293-Zellen fünf Minuten

konzentrationsabhängig mit SS-14 ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$   $\mu$ M), bei Raumtemperatur stimuliert. Es wurde als Kontrolle eine unstimulierte Probe mitgeführt. Bereits bei fünfminütiger Exposition mit 10 nM SS-14 war ein schwaches Phosphorylierungssignal detektierbar. Die volle Phosphorylierungsstärke war bei einer Konzentration von  $1\mu$ M SS-14 erreicht. (Abb. 5) Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente mit dieser Konzentration durchgeführt.



**Abb. 5:** Konzentrationsabhängige Phosphorylierung des carboxylterminalen Threoninsrestes 333. Linke Spalte: Bereits 10 nM SS-14 bewirkten eine, wenn auch nur leichte, Phosphorylierung am T333, die mit steigender Konzentration des Somatostatins stärker wurde, bis sie bei  $1\mu$ M SS-14 ihr Maximum erreicht hatte. Rechte Spalte: Nach 10 minütiger Vorinkubation mit beiden  $ss_2$ -Antagonisten, BIM-23627 und BIM-23454, und anschließender Inkubation mit  $1\mu$ M SS-14, war eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung am T333 nachweisbar, wobei erstere Substanz hierbei stärker wirksam schien.

Beide Antagonisten konnten die Phosphorylierung jedoch nicht gänzlich unterdrücken. Zur Kontrolle der Proteinbeladung des Gels wurde in beiden Experimenten der phosphorylierungs-unabhängige Antikörper UMB-4 verwendet.

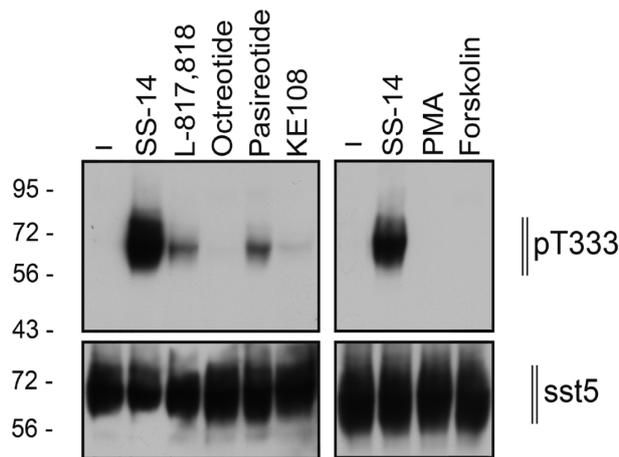
Um zu überprüfen, ob die Phosphorylierung auch verhindert werden kann, wurden zwei Antagonisten (BIM-23627 und BIM-23454) verwendet, die zwar als Inhibitoren am  $ss_2$  bekannt sind, aber auch eine Bindungsaffinität für den  $hsst_5$  besitzen (Tulipano et al. 2002). Die mit dem  $hsst_5$  stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden, mit Ausnahme der Kontrolle (links), ohne bzw. mit  $10\mu$ M BIM-23627 bzw.  $1\mu$ M BIM-23454 für 10 Minuten vorinkubiert, bevor sie für weitere 5 Minuten ohne (Kontrolle) bzw. mit  $1\mu$ M SS-14 stimuliert wurden. In beiden Fällen ließ sich die SS-14-induzierte Phosphorylierung durch die Vorinkubation mit den beiden  $ss_2$ -Antagonisten unterdrücken. Durch die schwachen Bindungsaffinitäten der  $ss_2$ -Antagonisten zum  $hsst_5$  ist es zu erklären, dass das Signal nicht vollständig unterdrückt wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Phosphorylierung am T333 eine sehr sensitive Reaktion auf die Stimulation mit dem natürlichen Agonisten SS-14 war. Obwohl eine Blockierung der Phosphorylierung durch die BIM-Substanzen 23627 und

23454 nur zum Teil möglich war, kann von einer agonistenselektiven Phosphorylierung ausgegangen werden.

#### **3.1.4 Agonisten-selektive Phosphorylierung am Threonin 333**

Da Somatostatin nicht die einzige Substanz ist, die den  $hsst_5$  stimulieren kann, wurden weitere Agonisten hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Phosphorylierung am T333 des  $hsst_5$  untersucht. Alle Substanzen wurden analog zum SS-14 in einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  eingesetzt. Die  $hsst_5$  exprimierenden HEK293-Zellen wurden jeweils für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit den Substanzen SS-14, L-817,818, Octreotid, Pasireotid oder Ke108 stimuliert. PMA und Forskolin sind Agonisten der heterologen Proteinkinasen PKC und PKA. PMA wurde aufgrund seiner hohen Zelltoxizität mit der maximal tolerierbaren Konzentration von  $100\text{nM}$  eingesetzt, während Forskolin äquimolar zum Somatostatin in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  verwendet wurde. Um sicher zu stellen, dass genügend Zeit für eine mögliche heterologe Phosphorylierung an der Stelle T333 blieb, wurden die stabil mit dem  $hsst_5$  transfizierten HEK293-Zellen mit jeweils beiden Substanzen für 30 Minuten inkubiert. Pasireotid und L-817, 818 konnten, im Vergleich zum SS-14, ein schwaches, aber klares Phosphorylierungssignal auslösen, während sich für die Substanzen Octreotid, ein  $sst_2$ -selektiver Agonist, Ke108 sowie die für die Agonisten der PKC (PMA) und der PKA (Forskolin) keine Phosphorylierung an dieser Stelle nachweisen ließ. (Abb.6)

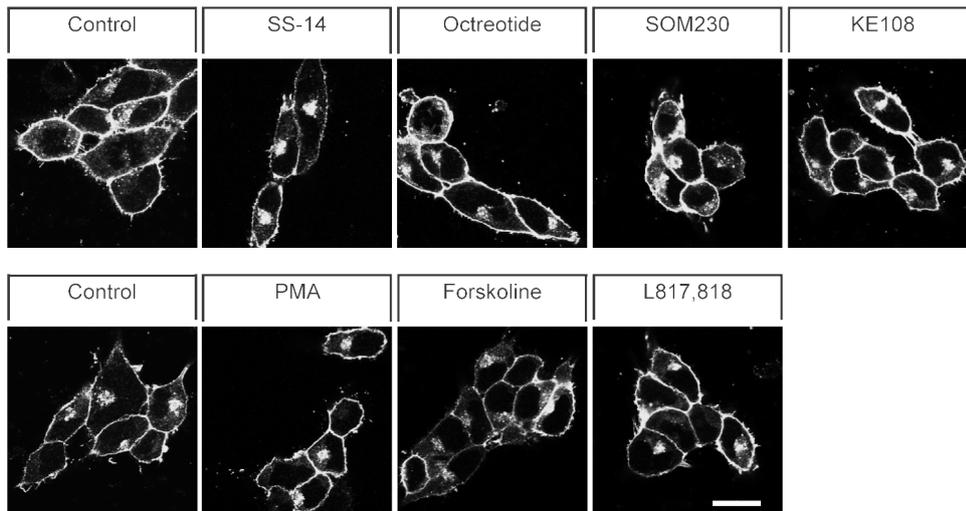


*Abb. 6: Agonisten-selektive Phosphorylierung von T333 des  $hsst_5$ . HEK-293-Zellen, die stabil den  $hsst_5$  exprimieren, wurden entweder ohne oder mit  $1\mu M$  SS-14, L-817,818, Octeotid, Pasireotid, Ke108 oder  $0,1\mu M$  PMA oder  $10\mu M$  Forskolin stimuliert. Die Inkubationszeit war bei allen Proben 5 Minuten, bis auf die Proben mit PMA und Forskolin. Hier wurden die Zellen eine halbe Stunde mit den Substanzen inkubiert. Zur Sicherstellung, dass alle Proben über die gleiche Proteinmenge verfügten, wurde, nachdem die Membran gestriipt worden war, der phosphorylierungsunabhängige Antikörper UMB-4 eingesetzt.*

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Threonin 333 agonistenselektiv phosphoryliert wird, wobei der natürliche Agonist das stärkste Phosphorylierungssignal auslöst. Die als spezifischer Agonist bekannte Substanz L-817,818 zeigte wie Pasireotid ein vergleichsweise schwaches, wenn auch klares Signal. Das könnte darauf hindeuten, dass sich beide Substanzen wie Partialagonisten an dieser Phosphorylierungsstelle verhalten haben. Octreotid und Ke108 sowie die Aktivatoren der Proteinkinasen C und A, PMA und Forskolin, waren nicht in der Lage, eine Phosphorylierung am T333 des  $hsst_5$  auszulösen, womit bei letzterem ausgeschlossen werden konnte, dass dieser Bereich am C-Terminus heterolog phosphoryliert wird.

### 3.1.5 Agonistenselektive Internalisierung des humanen Somatostatinrezeptors 5

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung des T333, die im Western Blot detektiert wurde, mit dem Internalisierungsverhalten des  $hsst_5$  korreliert, wurden HEK293-Zellen, die mit dem  $hsst_5$  stabil transfiziert worden sind, 0 und 30 Minuten mit den Agonisten SS-14, Octreotid, SOM230, L-817,818 und KE108 (alle  $1\mu M$ ) sowie den PKA- und PKC-Aktivatoren Forskolin ( $10\mu M$ ) und PMA ( $0,1\mu M$ ) stimuliert. Wie in Abb.7 im oberen Abschnitt gezeigt, konnte zwar auch in der unstimulierten Kontrolle eine gewisse Grundinternalisierung festgestellt werden, jedoch zeigten die Zellen nach Behandlung mit  $1\mu M$  SS-14 eine deutliche Steigerung der Internalisierungstärke, während nach Behandlung mit  $1\mu M$  Octreotid keine Unterschiede im Internalisierungsverhalten des  $hsst_5$  zur unstimulierten Kontrolle festgestellt werden konnten.



**Abb. 7:** Agonistenselektive Internalisierung des *hsst<sub>5</sub>*. HEK-293-Zellen, die stabil den *hsst<sub>5</sub>* exprimieren, wurden entweder ohne oder mit  $1\mu\text{M}$  SS-14, L-817,818, Octeotid, Pasireotid, Ke108 oder  $0,1\mu\text{M}$  PMA oder  $10\mu\text{M}$  Forskolin für 30 Minuten stimuliert. Zur Detektion des Rezeptors, wurde der phosphorylierungsunabhängige Antikörper UMB-4 eingesetzt. Maßstab:  $20\mu\text{m}$

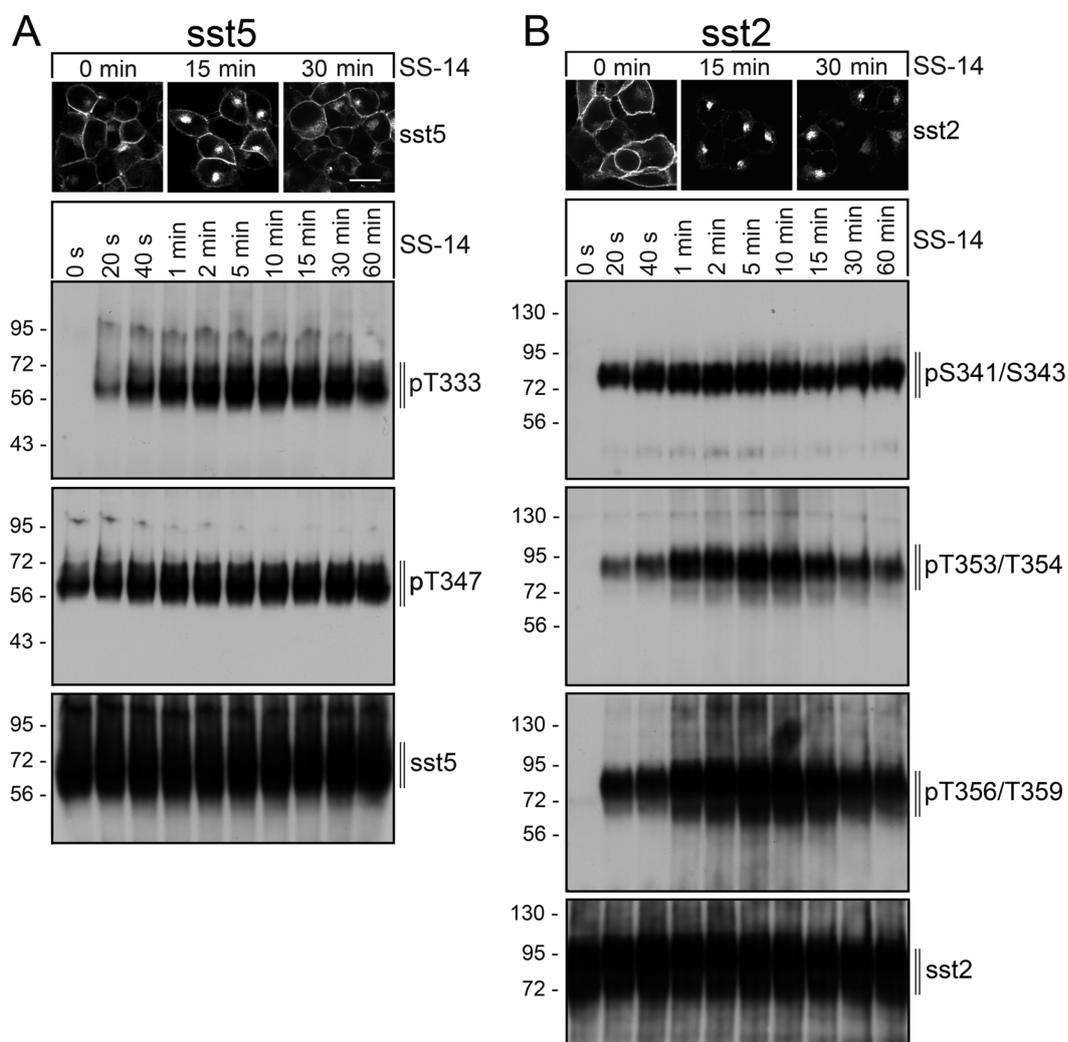
Auch die Agonisten L-817,818 und SOM230 konnten zwar eine verstärkte Internalisierung des *hsst<sub>5</sub>* im Vergleich zur Kontrolle auslösen, jedoch nicht in dem Ausmaß wie es SS-14 vermochte. PMA, Forskolin und KE108 konnten keine vermehrte Internalisierung des *hsst<sub>5</sub>* im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bewirken (untere Leiste). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass allein SS-14 eine robuste Internalisierung des *hsst<sub>5</sub>* erzeugen konnte, während SOM230 und L-817,818 nur eine leicht verstärkte Internalisierung und KE108, PMA und Forskolin nicht in der Lage waren, eine vermehrte Verlagerung des Rezeptors in das Zellinnere auszulösen. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den Daten aus den Phosphorylierungsstudien nach Agonistenstimulation (vergl. Kapitel 3.1.4) und könnte darauf hin deuten, dass die Phosphorylierungsstärke am T333 in engem Zusammenhang mit der Internalisierung des Rezeptors steht.

### 3.2 Vergleich der zeitabhängigen Phosphorylierung von *hsst<sub>5</sub>* und *hsst<sub>2</sub>*

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung bzw. die Dephosphorylierung der beiden Somatostatinrezeptoren *hsst<sub>5</sub>* und *hsst<sub>2</sub>* unterschiedlich schnell ablaufen. Initiale Untersuchungen zeigten, dass die Phosphorylierung am *hsst<sub>5</sub>* und *hsst<sub>2</sub>* sehr schnell, d.h. innerhalb von Sekunden, nach Agonistenstimulation geschieht. Um die Zeitabhängigkeit der Phosphorylierung der beiden Rezeptoren im Detail zu untersuchen, wurden alle Inkubationen mit SS-14

nicht bei der physiologischen Temperatur von 37°C sondern bei 22°C durchgeführt, um eine Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen.

Wie in Abbildung 8A gezeigt, erfolgte bei Stimulation des *hsst*<sub>5</sub> mit SS-14 (1µM) auch bei erniedrigter Inkubationstemperatur innerhalb von 20 Sekunden eine Phosphorylierung an der Position T333 detektierbar, die ihr Maximum nach 5 Minuten erreicht hatte. Im Gegensatz dazu war am Threonin 347 bereits ohne Zugabe des Agonisten eine Phosphorylierung nachweisbar, die sich auch unter dem Einfluss von SS-14 nicht sonderlich veränderte, somit konnte hier keine Zeitabhängigkeit erfasst werden.



**Abb.8:** Vergleich der zeitabhängigen carboxyl-terminalen Phosphorylierung des *hsst*<sub>5</sub> und des *hsst*<sub>2</sub>. (A) obere Leiste: HEK293-Zellen, die stabil den *hsst*<sub>5</sub> exprimieren, wurden bei Raumtemperatur mit 1µM SS-14 zeitabhängig inkubiert. Nach Fixierung und Färbung durch den phosphorylierungsunabhängigen Antikörper UMB-4 wurden Bilder mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. HEK293-Zellen, die stabil den *hsst*<sub>5</sub> exprimieren, wurden bei Raumtemperatur mit 1µM SS-14 zeitabhängig inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und im Immunoblot durch die phospho-spezifischen Antikörper pT333 {3567} und pT347 {3564} detektiert. Die Blots wurden gestrippt und erneut mit dem phosphorylierungsunabhängigen Antikörper UMB-4 inkubiert, um gleiche Ladeverhältnisse der Proben sicher zu stellen. (B) obere Leiste: HEK-293-Zellen, die stabil den *hsst*<sub>2</sub>

*exprimieren, wurden bei Raumtemperatur mit 1µM SS-14 zeitabhängig inkubiert. Nach Fixierung und Färbung durch den phosphorylierungsunabhängigen Antikörper UMB-1 wurden Bilder mit dem Konfokalmikroskop aufgenommen. HEK293-Zellen, die stabil den *hsst<sub>2</sub>* exprimieren, wurden bei Raumtemperatur mit 1µM SS-14 zeitabhängig inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und im Immunoblot durch die phospho-spezifischen Antikörper pS341/S343 {3157}, oder pT353/T354 {0521} und pT356/T359 {0522} detektiert. Die Blots wurden gestrippt und erneut mit dem phosphorylierungsunabhängigen Antikörper UMB-1 inkubiert, um gleiche Ladeverhältnisse der Proben sicher zu stellen. Maßstab:A=B=20 µm*

Unter gleichen Bedingungen durchgeführte immunzytochemische Untersuchungen konnten eine klare Internalisierung des *hsst<sub>5</sub>* nach 15-30 Minuten nachweisen (Abb. 8A). Allerdings befanden sich auch nach 30 Minuten Exposition mit SS-14 Rezeptoren an der Membran. Dieser Befund lässt sich auf unterschiedliche Weise erklären. Möglich wäre, dass der *hsst<sub>5</sub>* schnell recycelt wird und es zur Einstellung eines Fließgleichgewicht zwischen Internalisierung und Recycling kam. Es ist aber auch nicht ausgeschlossen, dass die konstitutive Phosphorylierung des T347 damit in Zusammenhang gebracht werden kann, weshalb der Rezeptor nie vollständig internalisiert.

Wie schon erwartet, war auch an allen untersuchten Phosphorylierungsstellen des *hsst<sub>2</sub>* eine Phosphorylierung nach 20 Sekunden nachweisbar (Abb. 8B). Im Unterschied zum *hsst<sub>5</sub>* wurden jedoch alle untersuchten Phosphorylierungsstellen des *hsst<sub>2</sub>* agonist-induziert phosphoryliert. Wie in Abbildung 8B gezeigt, wich das Internalisierungsverhalten des *hsst<sub>2</sub>* von dem des *hsst<sub>5</sub>* ab. Bereits nach 15 Minuten war die Internalisierung des *hsst<sub>2</sub>* vollständig, was unter der Wirkung von SS-14 auch über die gesamte Dauer des Experiments so blieb.

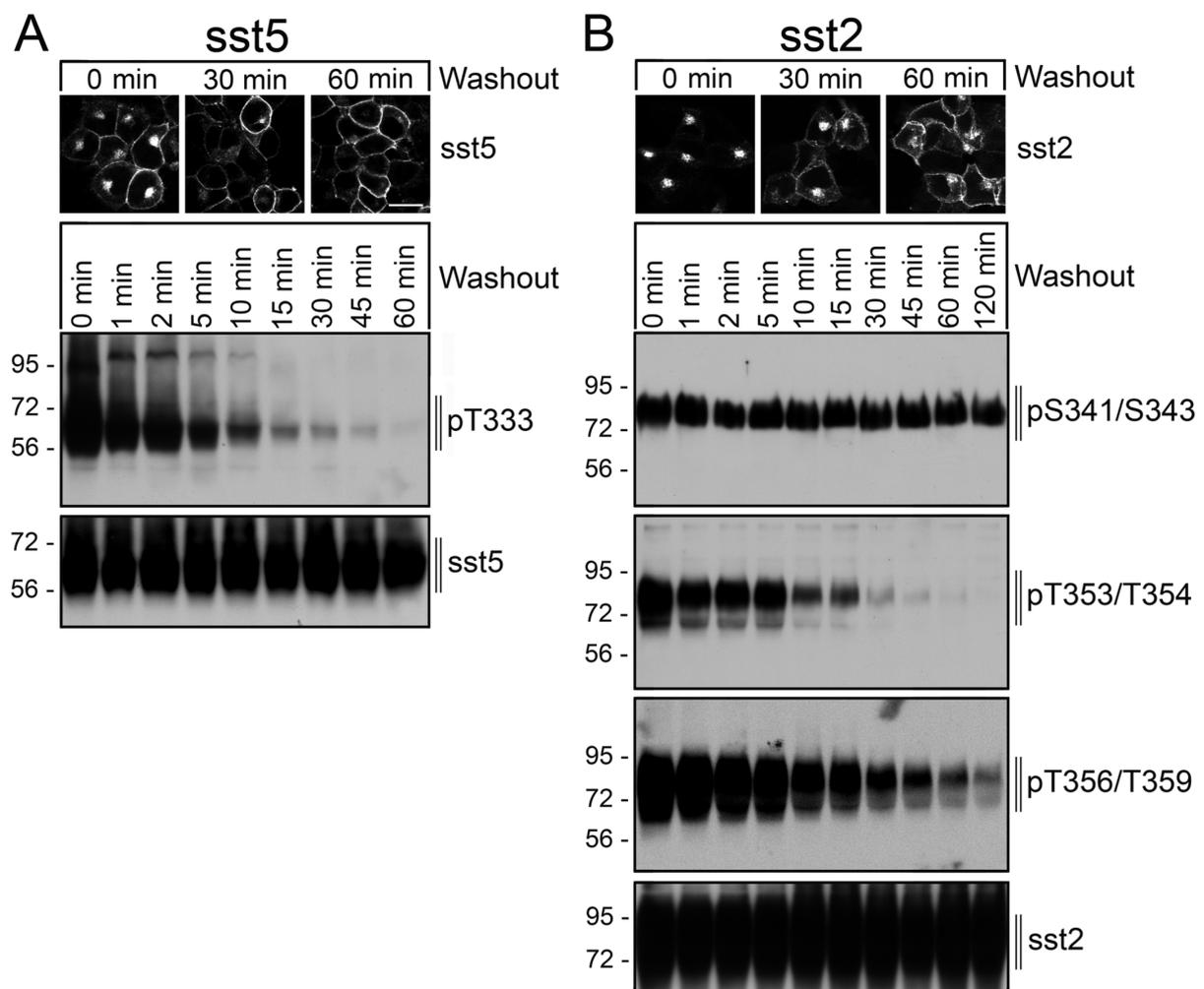
### **3.3 Vergleich der zeitabhängigen Dephosphorylierung von *hsst<sub>5</sub>* und *hsst<sub>2</sub>***

Das unterschiedliche Internalisierungsverhalten der beiden Rezeptoren ließ auf eine unterschiedliche Regulation nach Bindung eines Agonisten schließen. Da beide Rezeptoren innerhalb von wenigen Sekunden phosphoryliert werden, stellte sich die Frage, ob sie in unterschiedlicher Weise dephosphoryliert werden.

Immunzytochemische Untersuchungen zum Recycling der humanen Somatostatin-Rezeptoren 5 und 2 zeigten, dass der *hsst<sub>5</sub>* im Vergleich zum *hsst<sub>2</sub>* schneller zur Membran recycelt, wenn er nicht mehr unter dem Einfluss von SS-14 steht (Abb.9 obere Leiste). Während der *hsst<sub>5</sub>* bereits innerhalb von 30 Minuten nahezu vollständig an die Membran zurück gekehrt war, befand sich der *hsst<sub>2</sub>* selbst nach

einer Stunde im agonistfreiem Medium immer noch zum großen Teil im Zellinneren. Dies lässt den Schluss zu, dass bei der Dephosphorylierung der beiden Rezeptoren Unterschiede bestehen.

In Abbildung 9 ist dargestellt, dass das tatsächlich der Fall ist. Interessanterweise, während der  $hsst_5$  sehr rasch bereits nach 15 Minuten im agonistfreien Medium nahezu vollständig dephosphoryliert wurde, war das Dephosphorylierungsmuster des  $hsst_2$  von den untersuchten Phosphorylierungsstellen abhängig.

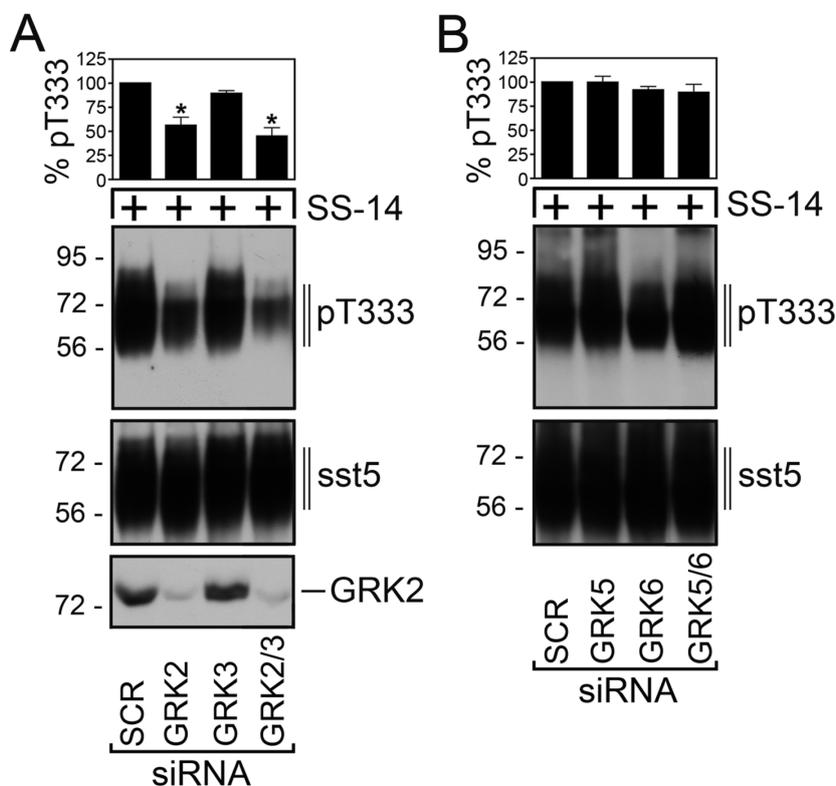


**Abb.9:** Vergleich der zeitabhängigen Dephosphorylierung der  $hsst$ -Rezeptoren 5 und 2. **(A)** Mit dem  $hsst_5$  Rezeptor stabil-transfizierte HEK293-Zellen wurden für 5 Minuten mit  $1\mu\text{M}$  SS-14 inkubiert, anschließend dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und zeitabhängig agonistfreiem Medium ausgesetzt. Innerhalb einer Viertelstunde lag der Großteil der Rezeptoren am Threonin 333 dephosphoryliert vor. **(B)** Im Vergleich dazu wurden alle untersuchten Phosphorylierungsstellen am  $hsst_2$  langsamer dephosphoryliert. Nachdem die Blots mit den phosphospezifischen Antikörpern detektiert worden waren, wurden sie gestrippt und mit dem phosphorylierungsunabhängigen Antikörper UMB-4 ( $hsst_5$ ) bzw. UMB-1 ( $hsst_2$ ) inkubiert und detektiert, um gleiche Ladeverhältnisse der Proben sicher zu stellen. Maßstab A=B=20  $\mu\text{m}$

Die Threonin-Reste an Position 353 und 354 des C-Terminus des  $hsst_2$  wurden von allen untersuchten Phosphorylierungsstellen am schnellsten dephosphoryliert, waren aber im Vergleich zum T333 des  $hsst_5$  dennoch erst nach einer halben Stunde im agonistfreiem Medium der gleichen Stärke dephosphoryliert. Während die Threonine an Position 356 und 359 des C-Terminus des  $hsst_2$  erst nach 120 Minuten eine deutliche Reduktion der Phosphorylierungsstärke aufwiesen, wurden die Serin-Reste 341 und 343 selbst nach 2 Stunden nicht dephosphoryliert. Dies könnte eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Recycling der beiden Rezeptoren sein. Insgesamt könnte es so sein, dass je schneller ein Rezeptor an den regulativen Stellen dephosphoryliert wird, desto schneller wird er auch zur Plasmamembran recycelt.

### 3.4 Identifizierung der für die Phosphorylierung am T333 des *hsst*<sub>5</sub> verantwortliche Kinase

Nachdem gezeigt wurde, dass das Threonin an Position 333 des carboxylterminalen Teils des *hsst*<sub>5</sub> nicht heterolog durch die Proteinkinasen A und C phosphoryliert wurde (siehe 3.1.4), lag es nahe, die G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinasen (GRK) durch siRNA Experimente zu untersuchen, um möglicherweise eine oder mehrere GRKs zu identifizieren, die für die Phosphorylierung des T333 verantwortlich sein könnten.



**Abb.10:** Die GRK2 ist verantwortlich für die agonist-induzierte Phosphorylierung am T333. (A,B) HEK293-Zellen, die stabil den *hsst*<sub>5</sub> exprimieren, wurden für 72 Std. mit einer siRNA transfiziert, die gegen die RNA von GRK2, 3, 5 oder 6 gerichtet war sowie einer non-silencing RNA (SCR) als Kontrolle. Danach wurden sie für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 1  $\mu$ M SS-14 inkubiert, anschließend lysiert und im Western Blot untersucht. Dafür wurde der pT333-Antikörper {3567} verwendet sowie nach Strippen der Membranen der phosphorylierungsunabhängige Antikörper UMB-4 zur Kontrolle gleichmäßiger Ladung der Proben auf die Gele. Die Blots wurden

quantifiziert, ausgedrückt als 100% Phosphorylierung der SCR-Proben. Der GRK2-Knockdown wurde im Western Blot nachgewiesen.

Hierfür wurden die stabil den *hsst*<sub>5</sub> exprimierenden HEK293-Zellen mit siRNA gegen die GRK2, 3, 5 oder 6, sowie gegen die Kombinationen GRK2/3 oder GRK5/6 für 72 Stunden transfiziert. Wie in Abb. 10A gezeigt, resultierte der Knockdown der GRK2, aber nicht der der sehr ähnlichen GRK3, in einem deutlich reduzierten Phosphorylierungssignal nach fünfminütiger Stimulation mit 1  $\mu$ M SS-14. Keine Unterschiede in der Phosphorylierungsstärke waren hingegen bei dem Knockdown der GRK5 und 6 zu beobachten (Abb. 10B). Aufgrund der relativ starken strukturellen Ähnlichkeit der GRK2 und 3 sowie der GRK 5 und 6, war es wichtig, auch in Kombination eine Downregulierung der Expression zu erzwingen, da sie sich

gegenseitig ersetzen können (Pöll et al. 2010). Nach quantitativer Auswertung der Blots mittels two-way-ANOVA-Analyse und anschließendem Bonferroni-Posttest (\*,  $p < 0,05$ ) ergab sich, dass die Signalstärke der Phosphorylierung beim Knockdown der GRK2 signifikant um cirka 40 % reduziert ist. Beim kombinierten GRK2/3-Knockdown war die Phosphorylierung sogar um ca. 50% vermindert.

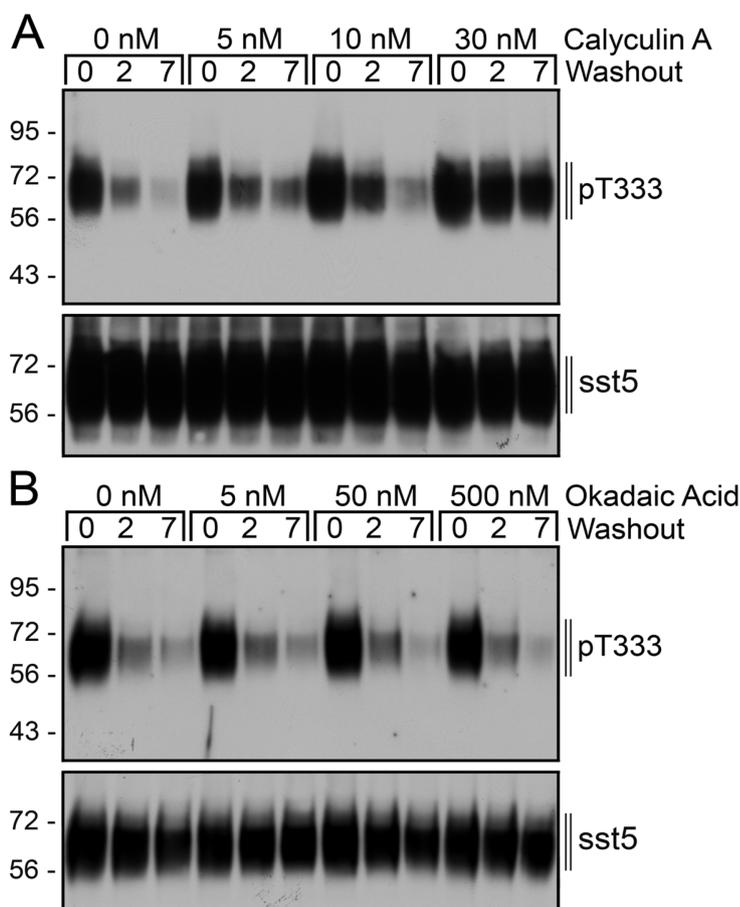
Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die GRK2 nahezu alleine für die Agonist-induzierte Phosphorylierung am T333 des *hsst*<sub>5</sub> verantwortlich ist.

### ***3.5 Identifikation der für die Dephosphorylierung am T333 des *hsst*<sub>5</sub> verantwortlichen Phosphatase***

Wie bereits in den immunzytochemischen Untersuchungen und in den Ergebnissen der wash-out-Versuche dargestellt wurde, ging die schnelle Dephosphorylierung des Threonins an der Position 333 des C-Terminus mit einem schnellen Recycling des Rezeptors an die Zellmembran einher. Die Phosphatasen, die für die Dephosphorylierung des *hsst*<sub>2</sub> verantwortlich waren, wurden bereits in vorangegangenen Studien identifiziert (Pöll et al. 2011). In Analogie zu diesen Untersuchungen wurde mit dem *hsst*<sub>5</sub> methodisch ähnlich verfahren.

### 3.5.1 Inhibitorstudien mit Calyculin A und Okadasäure zur Untersuchung des Einflusses der Phosphatase 1 und 2 auf die Phosphorylierung am T333 des $hsst_5$

Calyculin A und die Okadasäure sind in der Lage, selektiv die Phosphatasen (PP) 2, 4, und 5 zu blockieren. Zusätzlich hemmt Calyculin A auch selektiv die PP1 (Honkanen und Golden 2002). Die mit  $hsst_5$  stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden für 10 Minuten mit drei unterschiedlichen Konzentrationen der Phosphatase-Inhibitoren vorinkubiert und anschließend zusätzlich für weitere 5 Minuten mit 1  $\mu$ M SS-14 stimuliert. Abbildung 11 zeigt, dass allein Calyculin A in der Lage war, die Dephosphorylierung im anschließenden wash-out-Experiment zu verzögern. Dieses Ergebnis ließ den Schluss zu, dass eine oder mehrere Isoformen der PP1 für die Dephosphorylierung des T333 nach Agoniststimulation verantwortlich waren.



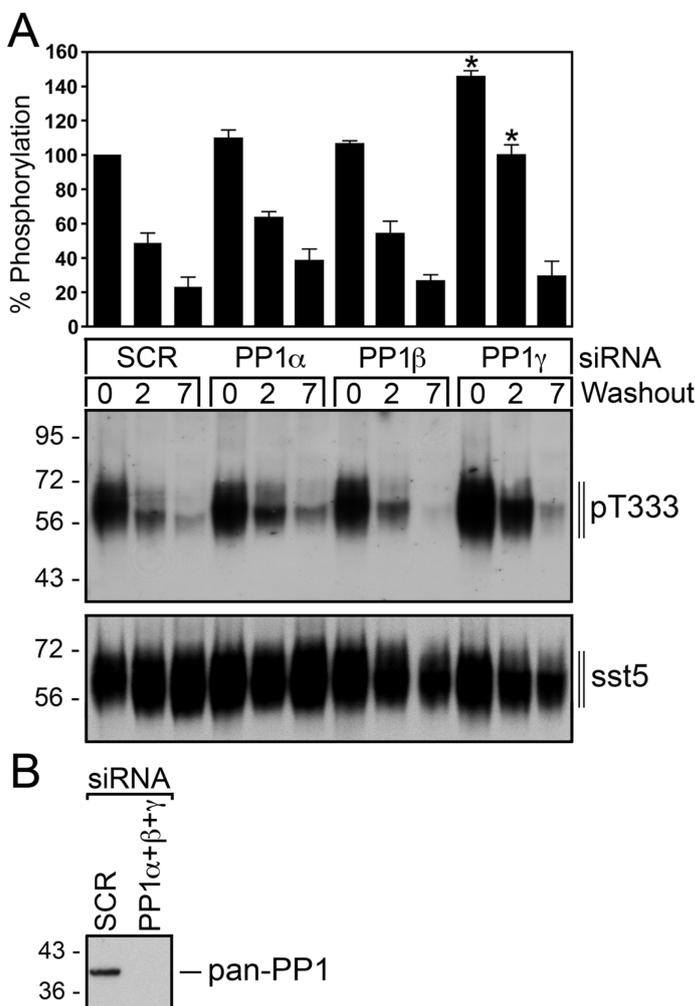
**Abb.11:** Calyculin A aber nicht die Okadasäure kann die Dephosphorylierung am T333 des  $hsst_5$  verzögern. Die stabil den  $hsst_5$  exprimierende HEK293-Zellen wurden mit den in der Abbildung aufgeführten Konzentrationen an entweder Calyculin A (A) oder Okadasäure (B) für 10 min behandelt, bevor sie zusätzlich für weitere 5 Minuten mit 1  $\mu$ M SS-14 stimuliert wurden. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 0, 2 oder 7 Minuten in agonistfreiem Medium inkubiert. Die Signalstärke der Phosphorylierung sowie die Gesamtrezeptordichte wurde mittels Western-Blot analysiert. Dazu wurden der pT333-Antikörper {3567} sowie der phosphorylierungs-unabhängige Antikörper UMB-4 verwendet.

Es ist deutlich zu sehen, dass Calyculin A in der Konzentration von 30nM die Dephosphorylierung am T333 des Rezeptors am stärksten verhindert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Calyculin A bei einer Konzentration von 30nM die Dephosphorylierung am stärksten verhinderte, was ein starkes Indiz für die Beteiligung der PP1 am Dephosphorylierungsprozess von T333 des  $hsst_5$  darstellt.

### 3.5.2 Identifizierung der für die Dephosphorylierung am T333 verantwortlichen PP1-Isoform

Durch das Phosphatase-Inhibitor-Experiment (siehe 3.5.1) konnte der Kreis der für die Dephosphorylierung am *hsst*<sub>5</sub> verantwortlichen Phosphatasen stark eingrenzt werden. Die Phosphatase 1 verfügt über drei Isoformen,  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Um die PP1-Isoform zu identifizieren, die die Schlüsselrolle im Dephosphorylierungsprozess am Threonin 333 des *hsst*<sub>5</sub> spielte, wurden erneut siRNA-Experimente durchgeführt, die einen Knockdown der einzelnen Isoformen erzielen und sich im anschließendem wash-out-Experiment die für die Dephosphorylierung verantwortliche Isoform aufdecken sollten.



**Abb.12:** Die *PP1 $\gamma$*  katalysiert die Dephosphorylierung am T333 des *hsst*<sub>5</sub>. **(A)** HEK-293-Zellen, die stabil den *hsst*<sub>5</sub> exprimieren, wurden 72 Std. mit siRNA transfiziert, die gegen die RNA von PP1  $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\gamma$  gerichtet war oder mit einer non-silencing RNA (SCR) als Kontrolle. Im Anschluss folgte eine fünfminütige Inkubation mit 1  $\mu$ M SS-14. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, bevor sie für die angegebenen Zeiten agonistfreiem Medium ausgesetzt wurden. Die Zellen wurden lysiert und mit dem pT333-Antikörper {3567} sowie dem anti *sst*<sub>5</sub>-Antikörper UMB-4 immunogelblottet. Die T333-Phosphorylierung wurde als Prozent maximaler Phosphorylierung, bezogen auf die SCR-Probe angegeben. Die Ergebnisse wurden durch eine two-way-ANOVA, gefolgt von einem Bonferroni-Posttest ausgewertet (\*,  $p < 0,05$ ).

**(B)** der siRNA-Knockdown der PP1 wurde durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen, indem ein Pan-PP1-Antikörper benutzt wurde.

Wie in Abb.12 gezeigt, war vermutlich die PP1 $\gamma$  Isoform hauptsächlich für die Dephosphorylierung des T333 verantwortlich, denn ihr Knockdown resultierte in einer erhöhten Grundphosphorylierung des T333 um circa 50 % und in einer zeitlich signifikant verzögerten Dephosphorylierung dieser Phosphorylierungsstelle.

## 4 Diskussion

### 4.1 *Agonist-selektive Phosphorylierung des humanen Somatostatinrezeptors 5*

Der humane sst<sub>5</sub> ist das Hauptziel für die Entwicklung neuer Somatostatinanaloge. Im Vergleich zu dem sehr gut untersuchten sst<sub>2</sub> ist bis jetzt nur sehr wenig über die Regulation des sst<sub>5</sub> nach Agonistenbindung bekannt. Dass die Regulation des Rezeptortrafficking des sst<sub>2</sub> selektiv vom jeweiligen Agonisten abhängt, was durch die unterschiedliche Phosphorylierung von zwei Serinen und drei Threoninen in der C-terminalen Region vermittelt wird, wurde bereits mehrfach beschrieben (Liu et al. 2009, Pöll et al. 2010, Nagel et al. 2011). Korrespondierend zum C-Terminus des sst<sub>2</sub> konnten zwei putative Phosphorylierungsstellen im C-Terminus des sst<sub>5</sub> ermittelt werden. Es wurden gegen das Threonin an Position 333 (T333) und das Threonin an Position 347 (T347) phosphorylierungsspezifische Antikörper generiert, die es ermöglichen, selektiv den Rezeptor in seiner jeweiligen phosphorylierten Form zu detektieren. Dabei stellte sich heraus, dass die sst<sub>5</sub>-Phosphorylierung nach Agonistenstimulation einer unterschiedlichen Regulation unterliegt: SS-14 löste eine starke Phosphorylierung am T333 aus, während Pasireotid (SOM230), das mit einer viel stärkeren Affinität zu sst<sub>5</sub> bindet, nur eine vergleichsweise schwache Phosphorylierung bewirkt. SS-14 bindet an sst<sub>5</sub> mit einer Affinität von 0,88nM. Im Vergleich dazu bindet Pasireotid mit einer Affinität von 0,16nM und Octreotid nur mit einer Bindungsstärke von 7nM an sst<sub>5</sub> (Grozinsky-Glasberg 2008). Die Bindungsaffinitäten dieser Agonisten zum sst<sub>2</sub> unterscheiden sich von denen des sst<sub>5</sub>. SS-14 bindet mit 0,23nM, Octreotid mit 0,56nM und Pasireotid mit 1nM am sst<sub>2</sub>. Zielgerichtete Mutationstudien im C-Terminus des rsst<sub>2A</sub> ergaben, dass vier Threonine für die agonisten-selektive Phosphorylierung verantwortlich sind. Dieses <sup>356</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv ist auch im C-Terminus des hsst<sub>2</sub> zu finden und wird dort auch agonistenselektiv und konzentrationsabhängig phosphoryliert (Pöll et al. 2010, Nagel et al. 2011). Die in dieser Arbeit verwendeten phosphospezifischen Antikörper gegen die Threonine 353 und 354, 356 und 359 sowie die beiden Serine 341 und 343 des C-Terminus des sst<sub>2</sub> wurden in vorangegangenen Arbeiten bereits ausführlich charakterisiert (Liu et al. 2009, Pöll et al. 2010).

Auch wenn Pasireotid vergleichsweise stark an beide untersuchten sst bindet, löst es bei beiden Rezeptoren nur eine schwache Phosphorylierung aus. Der humane sst<sub>2</sub> wird nur an den Serinen 341 und 343 des C-Terminus phosphoryliert, wenn der Rezeptor mit Pasireotid stimuliert wurde (Nagel et al. 2011). Der rsst<sub>2</sub> wird nur nach Überexpression der GRK2 bei Stimulierung durch Pasireotid an den Threoninen 356 und 359 des <sup>356</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs phosphoryliert, während zusätzlich und unabhängig von der Überexpression der GRK 2 und der GRK3, die Threonine an den Positionen 353 und 354 sowie die Serine an den Positionen 341 und 343 durch die Agonisten SS-14 und Octreotid phosphoryliert werden (Pöll et al. 2010). Diese Überexpressions- sowie siRNA-*Knockdown*-Experimente ergaben, dass beim sst<sub>2</sub> vor allem die GRK2 die agonistenselektive Phosphorylierung katalysiert. Bei der Phosphorylierung handelt es sich um ein redundantes System, da die strukturverwandte GRK3 im Fall der Downregulierung der GRK2 die Threonine und Serine des C-Terminus am sst<sub>2</sub> phosphoryliert, denn wenn beide GRKs herunter reguliert wurden, war die Phosphorylierung noch schwächer ausgeprägt.

PMA und Forskolin konnten das <sup>356</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv des sst<sub>2</sub> nicht phosphorylieren, was somit ausschließt, dass diese Threonine Ziele für die heterologe Phosphorylierung durch PKA oder PKC sind. Die gleichen Untersuchungen am sst<sub>5</sub> in dieser Arbeit ergaben, dass auch das Threonin an Position 333 des C-Terminus nicht Ziel für die heterologe Phosphorylierung sein kann. Deshalb wurden auch hier die gleichen siRNA-*Knockdown*-Experimente durchgeführt, um zu ermitteln, welche GRK die Phosphorylierung nach SS-14 Stimulierung katalysiert. Wie beim sst<sub>2</sub> wird auch der sst<sub>5</sub> nach SS-14-Bindung konzentrationsabhängig und hauptsächlich durch die GRK2 phosphoryliert. Dies konnte so für den sst<sub>5</sub> noch nicht gezeigt werden. Allgemein bekannt ist, dass GPCRs unterschiedliche Konformationen einnehmen können, nachdem sie durch verschiedene Agonisten stimuliert wurden. Damit könnte die vergleichsweise schwache Phosphorylierung, die durch Pasireotid am sst<sub>5</sub> ausgelöst wurde, erklärt werden. Wenn SS-14 an den N-Terminus des Rezeptors bindet, nimmt dieser eine Konformation ein, die den C-Terminus sterisch so präsentiert, dass die GRK2 das Threonin an Position 333 verstärkt phosphorylieren kann, während Pasireotid eine Konformation des sst<sub>5</sub> erzwingt, die nicht ausreichend für die volle Phosphorylierungsstärke an dieser Stelle ist. Das würde gut mit den bereits beschriebenen Beobachtungen am sst<sub>2</sub> nach Pasireotid-Bindung

übereinstimmen, wobei nur zwei der vier Threonine durch die GRK2 und 3 phosphoryliert werden können.

In vergleichenden Phosphorylierungsstudien in denen der  $sst_2$  und der  $sst_5$  zeitabhängig mit SS-14 stimuliert wurden, zeigten beide eine sehr schnelle Phosphorylierung. Sogar bei verringerter Reaktionstemperatur war bei beiden Rezeptoren eine Phosphorylierung bereits nach 20 Sekunden nachweisbar. Da alle untersuchten C-terminalen Phosphorylierungsstellen des  $sst_2$  und die in dieser Arbeit charakterisierte Phosphorylierungsstelle T333 des  $sst_5$  hauptsächlich durch die GRK2 phosphoryliert wurden, war die ähnlich verlaufende Zeitabhängigkeit der Reaktion beider  $ssts$  nicht überraschend. Diese sehr schnelle Reaktion der GRKs konnte auch in anderen GPCRs gezeigt werden. Am  $\mu$ -Opioidrezeptor (MOR) konnte agonistselektiv eine schnelle DAMGO-induzierte Phosphorylierung, vermittelt durch die GRKs 2 und 3, gezeigt werden (Doll et al. 2011). Bei diesem Rezeptor rekrutiert Morphin, ein Partialagonist, allerdings die GRKs 5 und 6, während DAMGO, ein Vollagonist, die GRK2 und 3 zur Zellmembran rekrutiert. Dieses selektive Rekrutieren, das auch am CCR7 gezeigt werden konnte (Zidar et al. 2009), wurde bisher weder beim  $sst_2$  noch beim  $sst_5$  beschrieben.

Wie beim MOR, konnte auch am C-Terminus des  $sst_5$  eine konstitutive Phosphorylierung gezeigt werden. Das Threonin an Position 347 des C-Terminus war nur durch Vorbehandlung mit einer Phosphatase nicht phosphoryliert, was auch ein gutes Charakterisierungsmerkmal für die Spezifität der verwendeten phosphorylierungs-spezifischen Antikörper war. Auch die zusätzliche Stimulierung durch SS-14 konnte keinen klaren Anstieg der Phosphorylierung an dieser Stelle bewirken. Feng und Mitarbeiter konnten kürzlich in *in vitro*-Studien zeigen, dass die konstitutive Phosphorylierung am MOR PKC-abhängig sein kann (Feng et al. 2011). PKC-Inhibitor-Studien mit Staurosporin und anschließenden siRNA-*Knockdown* Experimenten, die zur *Down*-Regulierung der PKC führen, könnten Aufschluss darüber bringen, ob und inwieweit der Einfluss der PKC auch auf die konstitutive Phosphorylierung von T347 des  $sst_5$  zutrifft.

#### 4.1.1 Internalisierungsverhalten des humanen Somatostatinrezeptors 5 nach Agonistenstimulation

Die Phosphorylierung des C-Terminus von GPCRs gilt schon seit einigen Jahren als Vorbedingung für die Einleitung des Membrantransportes durch die nicht visuellen  $\beta$ -Arrestine und das sich daran anschließende Signalverhalten des Rezeptors (Kohout und Lefkowitz 2003, Ahn et al. 2004). Dabei binden die  $\beta$ -Arrestine an die Phosphatcluster der C-terminalen Region des Rezeptors. An einer Mutante des  $rsst_2$  konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ -Arrestinbindung ausbleibt, wenn der C-terminale Phosphat-Cluster so mutiert ist, dass keine Phosphorylierung mehr stattfinden kann (Tulipano et al. 2004). Es wurde auch bewiesen, dass auf die agonistinduzierte Phosphorylierung des  $^{356}TTETQRT^{359}$ -Motivs die Internalisierung des  $rsst_2$  folgte (Tulipano et al. 2004). Jedoch wurde die These widerlegt, in der die Phosphorylierung des C-Terminus allein Bedingung für die Internalisierung, vermittelt durch eine  $\beta$ -Arrestinbindung, ist (Pöll et al. 2010). Bei Mutanten des  $rsst_2$ , die entweder verkürzte C-Termini besaßen oder deren Serin- und Threoninreste durch Alanine ersetzt worden waren, konnte, wenn auch sehr verlangsamt, eine Internalisierung des Rezeptors nachgewiesen werden (Schwarkop et al. 1999, Liu et al. 2008). Somit muss es auch eine  $\beta$ -arrestinunabhängige Internalisierung von GPCRs geben, bei der andere regulatorische Proteine beteiligt sind oder die über einen anderen, langsameren Prozess gesteuert wird. Auch das Internalisierungsverhalten des  $sst_2$  nach Stimulierung mit verschiedenen Agonisten wurde in unserer Arbeitsgruppe in voran gegangenen Studien untersucht. Pasireotid löste im Vergleich zu der sehr robusten Internalisierung nach SS-14-Stimulierung nur eine geringere Endozytose des Rezeptors aus. Pasireotid war auch im Hinblick auf die Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin-2 weniger potent als das bereits in der klinischen Praxis verwendete Octreotid (Lesche et al. 2009). Es konnte aber am  $hsst_2$  gezeigt werden, dass Pasireotid, wenn auch im Vergleich zur Stimulierung mit SS-14 vermindert, eine Internalisierung des Rezeptors auslöst (Nagel et al. 2011). Dies könnte durch die nach Pasireotidstimulierung ausschließlich an den Serinresten (S341 und S343) des C-Terminus ausgelösten Phosphorylierung erklärt werden. Deshalb gilt Pasireotid auch als partieller Agonist am  $sst_2$ .

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ähnlich wie der  $sst_2$  auch der  $sst_5$  nur schwach durch Pasireotid phosphoryliert wurde, obwohl es eine höhere Affinität zu

diesem Rezeptor besitzt als der endogene Ligand SS-14. Desweiteren zeigten immunzytochemische Untersuchungen, dass die Phosphorylierungsstärke an T333 mit dem Internalisierungsverhalten des  $sst_5$  sehr gut korreliert. Der natürliche Ligand SS-14, der die stärkste Phosphorylierung auslöste, zeigt auch in den Internalisierungsstudien den deutlichsten Effekt auf den  $sst_5$ . Der  $sst_2$ -Agonist Octreotid sowie KE108 und die Aktivatoren für die heterologe Phosphorylierung, PMA und Forskolin, die alle keine Phosphorylierung des T333 am  $sst_5$  auslösten, konnten auch keine Internalisierung des Rezeptors bewirken. Hingegen konnte nach Stimulierung des  $sst_5$  mit der nicht-peptidischen Substanz L-817, 818, ähnlich wie bei Pasireotid, eine leichte Internalisierungsverstärkung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Da es sich bei den Phosphorylierungsstellen des  $sst_5$  nicht um Cluster handelt, die phosphoryliert werden können, sondern sich die Phosphorylierung im Wesentlichen auf einen Threoninrest reduziert, ist es bemerkenswert, wie gut die Ergebnisse von Phosphorylierung und Internalisierung der beiden untersuchten Somatostatinrezeptoren übereinstimmen. Wahrscheinlich ist, dass die Rezeptoren nach Bindung solcher Partialagonisten wie Pasireotid oder im Falle des  $sst_5$  zusätzlich L-817,818 in eine Konformation gezwungen werden, die es der GRK2 sehr schwierig macht, effektiv die entscheidenden Reste der C-Termini ausreichend zu phosphorylieren. Hierdurch wird dann eine effektive Bindung von  $\beta$ -Arrestin verhindert und so der Internalisierungsprozess deutlich verlangsamt, bzw. er läuft nur unzureichend ab. Ähnliches konnte auch an anderen Rezeptoren gezeigt werden. So wird der MOR nach Stimulierung mit Morphin, das als Partialagonist gilt, durch die GRK5 ausschließlich an einem Serinrest an Position 375 des C-Terminus phosphoryliert. Für eine  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung und einer damit verbundenen Internalisierung ist diese Phosphorylierung ungenügend, während bei einer Stimulation mit dem Vollagonisten DAMGO zusätzlich zum S375 auch das T370 phosphoryliert wird (vermittelt durch die GRK2 und 3), was zu einer robusten Rezeptorinternalisierung führt (Doll et al. 2011). Im Unterschied zum  $sst_2$ , der nur nach Agonistenbindung internalisiert, besteht beim  $sst_5$  immer eine gewisse Grundinternalisierung. Diese ließ sich wie die agonisteninduzierte Internalisierung jedoch fast vollständig blockieren, wenn beide untersuchten Threonine durch Alanin ausgetauscht worden waren. Diese Doppelmutante (T333A/T347A) ermöglichte es uns somit nicht nur, die von uns generierten phosphorylierungsspezifischen

Antikörper auf ihre Spezifität hin zu charakterisieren, sondern zeigte auch, dass diese beiden Stellen womöglich verantwortlich für die Internalisierung des Rezeptors nach Agonistenstimulierung sind. Die konstitutive Phosphorylierung des T347 und das Ausbleiben der Internalisierung bei der Doppelmutante (T333A/T347A) könnte ein Erklärungsansatz für den Effekt der Grundinternalisierung am  $sst_5$  sein. Peverelli und Mitarbeiter postulierten widersprüchliche Ergebnisse zu denen dieser Arbeit, indem sie davon ausgingen, dass die Internalisierung des  $sst_5$  nach Stimulierung mit SS-28 abhängig von drei Resten in der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors sei (Peverelli et al. 2008).

Die Generierung weiterer Mutanten, bei denen entweder das T333 oder das T347 durch Alanin ersetzt worden ist, wird notwendig sein, die initialen Ergebnisse dieser Arbeit zu festigen und weiter zu untersuchen, gerade auch im Hinblick auf die  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung am  $sst_5$ .

Generell lässt sich sagen, dass Pasireotid ähnlich wie am  $sst_2$  auch am  $sst_5$  keine vergleichbar starke Internalisierung des Rezeptors wie SS-14 auslöst, was den Einsatz als Mittel für die Bildgebung bei der Identifizierung von NETs wahrscheinlich schwierig macht. Deshalb ist es umso bemerkenswerter, dass klinische Studien so gute funktionelle Ergebnisse unter Pasireotidgabe bei Patienten vor allem mit Morbus-Cushing erzielen konnten. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass trotz dieser limitierten Internalisierung die Signaltransduktion des  $sst_5$ , wie beispielsweise die ERK-Aktivierung, durch Pasireotid, aber auch durch die Substanz L-817, 818 im subnanomolaren Konzentrationsbereich stattfindet (Cescato et al. 2006, Lesche et al. 2009). Diese Eigenschaften kommen besonders Patienten mit Octreotid-resistenten Tumoren zu Gute oder solchen, die durch Langzeittherapie nicht mehr so gut auf die bisher in der Klinik verwendeten SSA ansprechen.

### **4.2 Dephosphorylierung am humanen Somatostatinrezeptor 5**

Während der Prozess der Phosphorylierung von GPCRs großes wissenschaftliches Interesse in den vergangenen Jahren geschenkt wurde, galt die Hypothese, dass die Dephosphorylierung ein eher passiver Prozess ist, der nach der Stimulierung durch den Agonisten und der  $\beta$ -Arrestinbindung an den Rezeptoren in den clathrin-beschichteten endozytotischen Vesikel geschieht und für das Recycling des GPCRs notwendig ist. Das wurde für viele GPCRs postuliert, unter anderem für den MOR

(Moore et al. 2007, Koch und Holtt 2008). Jedoch konnte in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe durch die Verwendung phosphospezifischer Antikörper sowohl für den MOR, wie auch für den  $sst_2$  diese Hypothese widerlegt werden. Denn zum einen wurden durch Auswaschversuche des Agonisten von den Rezeptoren klar belegt, dass die Dephosphorylierung viel schneller geschieht als die Internalisierung der Rezeptoren und zum anderen konnten Internalisierungsinhibitoren wie Concanavalin A die Dephosphorylierung nicht unterbinden. Viel mehr schien es so, als ob die Dephosphorylierung der Rezeptoren in Membrannähe stattgefunden haben musste (Pöll et al. 2011, Doll et al. 2011). In dieser Arbeit wurden deshalb auch zunächst Auswaschversuche von SS-14 am  $sst_5$  und  $sst_2$  durchgeführt, die möglicherweise Unterschiede zwischen den Dephosphorylierungsgeschwindigkeiten aufzeigen sollten. In der Tat war das der Fall. Die Dephosphorylierung an der Stelle T333 begann nach Entfernen von SS-14 innerhalb von 5-10 Minuten und war bereits nach 15 Minuten abgeschlossen. Dagegen folgte die Dephosphorylierung des  $sst_2$  einem spezifischen Muster. So konnte die Phosphorylierung an den untersuchten Serinresten 341 und 343 selbst nach 2 Stunden unter SS-14-freien Bedingungen nicht eliminiert werden, während die Threoninreste 356 und 359 nach 2 Stunden und die Threoninreste 353 und 354 nach 45 Minuten dephosphoryliert waren. Dies korrelierte sehr gut mit den immunzytochemischen Untersuchungen, wonach der  $sst_5$  bereits nach einer halben Stunde unter agonistfreien Bedingungen nahezu vollständig wieder an der Membran präsent war, während beim  $sst_2$  selbst nach einer Stunde zwar eine gewisse Menge an Rezeptoren an die Membran zurück transportiert worden war, sich aber auch noch klar internalisierter Rezeptor nachweisen ließ. Dies lässt sich womöglich dadurch erklären, dass der  $sst_2$  im Gegensatz zum  $sst_5$  stabile Komplexe aus  $\beta$ -Arrestin und Rezeptor bildet, während der  $sst_5$ , ähnlich wie der MOR, nur locker mit  $\beta$ -Arrestin interagiert und damit möglicherweise schneller resensitisiert. Somit könnte eine schnellere Dephosphorylierung die Auflösung des  $\beta$ -Arrestin-Rezeptorkomplexes bedingen, die aber voraussetzt, dass der Ligand, der den Rezeptor in einer für den Dephosphorylierungsprozess ungünstigen Konformation hält, entfernt wurde. Diese membrannahe Dephosphorylierung wurde in jüngster Zeit auch für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor und den Thyrotropin-*releasing-hormon*-Rezeptor beschrieben (Iyer et al. 2006, Tran et al. 2007, Gehret und Hinkle 2010). Da bereits bekannt war, dass der  $sst_2$  durch die Phosphatase PP1 $\beta$

dephosphoryliert wird (Pöll et al. 2011), wurden zunächst die gleichen Inhibitorstudien mit Calyculin A, einem PP1- und PP2-Hemmer sowie mit der Okadasäure, einem PP2-Inhibitor, durchgeführt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass auch am  $sst_5$  die Dephosphorylierung durch eine PP1-Isoform katalysiert wird, da nur Calyculin A die Dephosphorylierung am T333 des C-Terminus blockieren konnte. Durch weiterführende siRNA-*Knockdown*-Untersuchungen konnte das erste Mal für den  $sst_5$  nicht nur die für die Dephosphorylierung verantwortliche Phosphatase identifiziert werden, sondern es gelang auch die Identifizierung der katalytischen Untereinheit PP1 $\gamma$ . Dieser Befund besitzt hohen Neuigkeitswert, da nur für den  $sst_2$  und den MOR, jedoch bisher für noch keinen anderen GPCR die entsprechenden Phosphatasen identifiziert wurden. Interessanterweise katalysiert diese Isoform der PP1 auch die Dephosphorylierung des MORs (Doll et al. 2011), weshalb auch darüber spekuliert werden könnte, ob es Dephosphorylierungsmuster in Abhängigkeit der jeweiligen Phosphatase-Isoform geben könnte. Ein nächster Schritt in der Aufklärung der Dephosphorylierung ist es, die regulatorischen Untereinheiten der Phosphatasen zu identifizieren, da mindestens eine Variante dieser Untereinheit an diesem Prozess beteiligt sein muss. Höchstwahrscheinlich besitzt sie die Eigenschaft, das Enzym an die Membran zu rekrutieren oder direkt die Interaktion mit dem  $sst_5$  zu vermitteln. Ein möglicher Kandidat hierfür ist Spinophilin, ein Multidomänenprotein, das sowohl eine regulatorische Untereinheit der PP1 darstellt, wie auch über ein F-Actin-Bindemotiv und eine PDZ-Proteinbindedomäne verfügt, mit dem es mit  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren sowie mit dem Dopamin-2-Rezeptor interagieren kann. Es wurde allerdings an diesen beiden letzteren GPCRs keine Phosphataseaktivität der PP1 festgestellt (Wang et al. 2004, Wang et al. 2008). An AMPA- und NMDA-Rezeptoren wird der Phosphorylierungsstatus durch diesen Proteinkomplex gesteuert, wobei dem Spinophilin eine Gerüst- und Lokalisationsfunktion zukommt, bei der die PP1 in die dendritischen Dornen transferiert und aktiviert wird (Hu et al. 2007, Kelker et al. 2007). Für den  $sst_5$  ist jedoch viel wahrscheinlicher, dass das  $\beta$ -Arrestin bei der Rekrutierung der PP1 $\gamma$  eine entscheidende Rolle spielt. Wie bereits erwähnt, geht der  $sst_5$  (wie auch der MOR) nur lockere Komplexe mit  $\beta$ -Arrestin ein. Erst kürzlich in unserer Arbeitsgruppe gemachte siRNA-*Knockdown*-Untersuchungen mit  $\beta$ -Arrestin und den PP1-Isoformen zeigten, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Dephosphorylierung und der  $\beta$ -Arrestinbindung an die Rezeptoren bestehen könnte

(unveröffentlichte Daten). Weitere dahingende Untersuchungen werden nötig sein, um den komplexen Dephosphorylierungsmechanismus des  $sst_5$  gänzlich zu verstehen. Auch sollte es ein nächster Schritt sein, mit den einzelnen Phosphorylierungsmutanten, die zum Teil bereits in Arbeit sind, vergleichend zum  $sst_5$ -Wildtyp, funktionelle Untersuchungen durchzuführen, um eine mögliche Korrelation zwischen der Phosphorylierung von T333 und T347 und der Signaltransduktion nach Agonistbindung herzustellen. Um zu entschlüsseln, welcher Phosphorylierungsmechanismus hinter der konstitutiven Phosphorylierung des T347 am  $sst_5$  steckt, sollten Inhibitorstudien mit Staurosporin, sowie siRNA-Knockdown-Experimente unternommen werden, um einen möglichen Zusammenhang zu einer PKC-vermittelten, agonistunabhängigen Phosphorylierung herzustellen, wie sie schon für andere GPCRs postuliert wurde (Feng et al. 2011). Durch doppelt-stabil mit dem  $sst_2$  und dem  $sst_5$ -transfizierten HEK293-Zellen, den sehr gut charakterisierten phosphorylierungsspezifischen Antikörpern und einer Reihe von funktionellen Assays, wie ERK-Aktivierung und cAMP-Assay, könnte künftig die Frage geklärt werden, warum die agonistenselektive induzierte Zellantwort um ein vielfaches stärker abläuft, wenn beide Rezeptoren coexprimiert sind, als wenn einer von beiden allein exprimiert wird. Es gibt Arbeiten, die davon ausgehen, dass eine funktionelle Verbindung zwischen dem  $sst_2$  und dem  $sst_5$  in endokrinen Zellen besteht (Ren et al. 2003, Sharif et al. 2007).

## 5 Literaturverzeichnis

- Ahn S, Shenoy SK, Wei H, Lefkowitz RJ (2004) Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem* 279(34): 35518-35525.
- Anderson MA, Carpenter S, Thompson NW, Nostrant TT, Elta GH et al. (2000) Endoscopic ultrasound is highly accurate and directs management in patients with neuroendocrine tumors of the pancreas. *Am J Gastroenterol* 95(9): 2271-2277.
- Appetecchia M, Baldelli R (2010) Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours, current aspects and new perspectives. *J Exp Clin Cancer Res* 29: 19.
- Arnaldi G, Polenta B, Cardinaletti M, Boscaro M (2005) Potential indications for somatostatin analogs in Cushing's syndrome. *J Endocrinol Invest* 28(11 Suppl International): 106-110.
- Arvigo M, Gatto F, Ruscica M, Ameri P, Dozio E et al. (2010) Somatostatin and dopamine receptor interaction in prostate and lung cancer cell lines. *J Endocrinol* 207(3): 309-317.
- Asnacios A, Courbon F, Rochaix P, Bauvin E, Cances-Lauwers V et al. (2008) Indium-111-pentetreotide scintigraphy and somatostatin receptor subtype 2 expression: new prognostic factors for malignant well-differentiated endocrine tumors. *J Clin Oncol* 26(6): 963-970.
- Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J et al. (1992) Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* 267(25): 17882-17890.
- Ausubel, F.M. (2002). *Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology*. New York, Wiley
- Baragli A, Alturaihi H, Watt HL, Abdallah A, Kumar U (2007) Heterooligomerization of human dopamine receptor 2 and somatostatin receptor 2 Co-immunoprecipitation and fluorescence resonance energy transfer analysis. *Cell Signal* 19(11): 2304-2316.

- Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R et al. (1982) SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* 31(11): 1133-1140.
- Ben-Shlomo A, Melmed S (2007) Pasireotide--a somatostatin analog for the potential treatment of acromegaly, neuroendocrine tumors and Cushing's disease. *IDrugs* 10(12): 885-895.
- Benovic JL, Pike LJ, Cerione RA, Staniszewski C, Yoshimasa T et al. (1985) Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* 260(11): 7094-7101.
- Bianchi EN, Ferrari SL (2009) Beta-arrestin2 regulates parathyroid hormone effects on a p38 MAPK and NFkappaB gene expression network in osteoblasts. *Bone* 45(4): 716-725.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.
- Blum AM, Metwali A, Mathew RC, Cook G, Elliott D et al. (1992) Granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis mansoni have somatostatin receptors and respond to somatostatin with decreased IFN-gamma secretion. *J Immunol* 149(11): 3621-3626.
- Bownds D, Dawes J, Miller J, Stahlman M (1972) Phosphorylation of frog photoreceptor membranes induced by light. *Nat New Biol* 237(73): 125-127.
- Boy C, Heusner TA, Poeppel TD, Redmann-Bischofs A, Unger N et al. 68Ga-DOTATOC PET/CT and somatostatin receptor (sst1-sst5) expression in normal human tissue: correlation of sst2 mRNA and SUVmax. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38(7): 1224-1236.
- Brandt DR, Ross EM (1985) GTPase activity of the stimulatory GTP-binding regulatory protein of adenylate cyclase, Gs. Accumulation and turnover of enzyme-nucleotide intermediates. *J Biol Chem* 260(1): 266-272.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M et al. (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179(4068): 77-79.

- Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Ghigo E (2007) Brain-gut communication: cortistatin, somatostatin and ghrelin. *Trends Endocrinol Metab* 18(6): 246-251.
- Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G (2002) SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antiseecretory profile. *Eur J Endocrinol* 146(5): 707-716.
- Bruns C, Weckbecker G, Raulf F, Kaupmann K, Schoeffter P et al. (1994) Molecular pharmacology of somatostatin-receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 733: 138-146.
- Byk T, Bar-Yaacov M, Doza YN, Minke B, Selinger Z (1993) Regulatory arrestin cycle secures the fidelity and maintenance of the fly photoreceptor cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5): 1907-1911.
- Casarini AP, Jallad RS, Pinto EM, Soares IC, Nonogaki S et al. (2009) Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. *Pituitary* 12(4): 297-303.
- Cescato R, Schulz S, Waser B, Eltschinger V, Rivier JE et al. (2006) Internalization of sst2, sst3, and sst5 receptors: effects of somatostatin agonists and antagonists. *J Nucl Med* 47(3): 502-511.
- Chauvin S, Bencsik M, Bambino T, Nissenson RA (2002) Parathyroid hormone receptor recycling: role of receptor dephosphorylation and beta-arrestin. *Mol Endocrinol* 16(12): 2720-2732.
- Chen CY, Dion SB, Kim CM, Benovic JL (1993) Beta-adrenergic receptor kinase. Agonist-dependent receptor binding promotes kinase activation. *J Biol Chem* 268(11): 7825-7831.
- Chisholm C, Greenberg GR (2002) Somatostatin-28 regulates GLP-1 secretion via somatostatin receptor subtype 5 in rat intestinal cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(2): E311-317.
- Christensen SE, Weeke J, Orskov H, Moller N, Flyvbjerg A et al. (1987) Continuous subcutaneous pump infusion of somatostatin analogue SMS 201-995 versus subcutaneous injection schedule in acromegalic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 27(3): 297-306.

- Colao A, Petersenn S, Newell-Price J, Findling JW, Gu F et al. (2012) A 12-month phase 3 study of pasireotide in Cushing's disease. *N Engl J Med* 366(10): 914-924.
- Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927): 37-44.
- Csaba Z, Peineau S, Dournaud P (2011) Molecular mechanisms of somatostatin receptor trafficking. *J Mol Endocrinol* 48(1): R1-12.
- Daaka Y, Pitcher JA, Richardson M, Stoffel RH, Robishaw JD et al. (1997) Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2180-2185.
- de Herder WW, Hofland LJ, van der Lely AJ, Lamberts SW (2003) Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 10(4): 451-458.
- DeFea KA (2011) Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: how do they determine what to scaffold? *Cell Signal* 23(4): 621-629.
- Doll C, Konietzko J, Poll F, Koch T, Hollt V et al. (2011) Agonist-selective patterns of micro-opioid receptor phosphorylation revealed by phosphosite-specific antibodies. *Br J Pharmacol* 164(2): 298-307.
- Drake MT, Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2006) Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res* 99(6): 570-582.
- Elliott DE, Blum AM, Li J, Metwali A, Weinstock JV (1998) Preprosomatostatin messenger RNA is expressed by inflammatory cells and induced by inflammatory mediators and cytokines. *J Immunol* 160(8): 3997-4003.
- Engstrom M, Savola JM, Wurster S (2006) Differential efficacies of somatostatin receptor agonists for G-protein activation and desensitization of somatostatin receptor subtype 4-mediated responses. *J Pharmacol Exp Ther* 316(3): 1262-1268.
- Epelbaum J, Dournaud P, Fodor M, Viollet C (1994) The neurobiology of somatostatin. *Crit Rev Neurobiol* 8(1-2): 25-44.
- Evanko DS, Thiyagarajan MM, Siderovski DP, Wedegaertner PB (2001) Gbeta gamma isoforms selectively rescue plasma membrane localization and palmitoylation of mutant Galphas and Galphaq. *J Biol Chem* 276(26): 23945-23953.

- Fan G, Shumay E, Malbon CC, Wang H (2001) c-Src tyrosine kinase binds the beta 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization. *J Biol Chem* 276(16): 13240-13247.
- Fazio N, Cinieri S, Lorizzo K, Squadroni M, Orlando L et al. (2010) Biological targeted therapies in patients with advanced enteropancreatic neuroendocrine carcinomas. *Cancer Treat Rev* 36 Suppl 3: S87-94.
- Feng B, Li Z, Wang JB (2011) Protein kinase C-mediated phosphorylation of the mu-opioid receptor and its effects on receptor signaling. *Mol Pharmacol* 79(4): 768-775.
- Ferone D, Arvigo M, Semino C, Jaquet P, Saveanu A et al. (2005) Somatostatin and dopamine receptor expression in lung carcinoma cells and effects of chimeric somatostatin-dopamine molecules on cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(6): E1044-1050.
- Fischer T, Doll C, Jacobs S, Kolodziej A, Stumm R et al. (2008) Reassessment of sst2 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11): 4519-4524.
- Fougner SL, Borota OC, Berg JP, Hald JK, Ramm-Pettersen J et al. (2008) The clinical response to somatostatin analogues in acromegaly correlates to the somatostatin receptor subtype 2a protein expression of the adenoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68(3): 458-465.
- Gaborik Z, Hunyady L (2004) Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 15(6): 286-293.
- Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y et al. (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13(9): 778-786.
- Gardner B, Liu ZF, Jiang D, Sibley DR (2001) The role of phosphorylation/dephosphorylation in agonist-induced desensitization of D1 dopamine receptor function: evidence for a novel pathway for receptor dephosphorylation. *Mol Pharmacol* 59(2): 310-321.

- Gehret AU, Hinkle PM (2010) Importance of regions outside the cytoplasmic tail of G-protein-coupled receptors for phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem J* 428(2): 235-245.
- Ghosh M, Schonbrunn A (2010) Differential temporal and spatial regulation of somatostatin receptor phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 286(15): 13561-13573.
- Goddard AD, Watts A (2012) Regulation of G protein-coupled receptors by palmitoylation and cholesterol. *BMC Biol* 10: 27.
- Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB et al. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383(6599): 447-450.
- Grozinsky-Glasberg S, Shimon I, Korbonits M, Grossman AB (2008) Somatostatin analogues in the control of neuroendocrine tumours: efficacy and mechanisms. *Endocr Relat Cancer* 15(3): 701-720.
- Guo C, Whitmarsh AJ (2008) The beta-arrestin-2 scaffold protein promotes c-Jun N-terminal kinase-3 activation by binding to its nonconserved N terminus. *J Biol Chem* 283(23): 15903-15911.
- Gurevich EV, Tesmer JJ, Mushegian A, Gurevich VV (2012) G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol Ther* 133(1): 40-69.
- Hayry P, Raisanen A, Ustinov J, Mennander A, Paavonen T (1993) Somatostatin analog lanreotide inhibits myocyte replication and several growth factors in allograft arteriosclerosis. *Faseb J* 7(11): 1055-1060.
- Heilker R, Wolff M, Tautermann CS, Bieler M (2009) G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach. *Drug Discov Today* 14(5-6): 231-240.
- Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.
- Higashijima T, Ferguson KM, Sternweis PC, Smigel MD, Gilman AG (1987) Effects of Mg<sup>2+</sup> and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *J Biol Chem* 262(2): 762-766.
- Hill SJ (2006) G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S27-37.

- Honkanen RE, Golden T (2002) Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? *Curr Med Chem* 9(22): 2055-2075.
- Hu XD, Huang Q, Yang X, Xia H (2007) Differential regulation of AMPA receptor trafficking by neurabin-targeted synaptic protein phosphatase-1 in synaptic transmission and long-term depression in hippocampus. *J Neurosci* 27(17): 4674-4686.
- Hukovic N, Panetta R, Kumar U, Rocheville M, Patel YC (1998) The cytoplasmic tail of the human somatostatin receptor type 5 is crucial for interaction with adenylyl cyclase and in mediating desensitization and internalization. *J Biol Chem* 273(33): 21416-21422.
- Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kouros-Mehr H, Simon MI et al. (2000) Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA Res* 7(2): 111-120.
- Innamorati G, Sadeghi H, Birnbaumer M (1998) Transient phosphorylation of the V1a vasopressin receptor. *J Biol Chem* 273(12): 7155-7161.
- Iyer V, Tran TM, Foster E, Dai W, Clark RB et al. (2006) Differential phosphorylation and dephosphorylation of beta2-adrenoceptor sites Ser262 and Ser355,356. *Br J Pharmacol* 147(3): 249-259.
- Jacobs S, Schulz S (2008) Intracellular trafficking of somatostatin receptors. *Mol Cell Endocrinol* 286(1-2): 58-62.
- Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K (2006) The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* 1(8): 761-782.
- Jiang X, Benovic JL, Wedegaertner PB (2007) Plasma membrane and nuclear localization of G protein coupled receptor kinase 6A. *Mol Biol Cell* 18(8): 2960-2969.
- Kelker MS, Dancheck B, Ju T, Kessler RP, Hudak J et al. (2007) Structural basis for spinophilin-neurabin receptor interaction. *Biochemistry* 46(9): 2333-2344.
- Kidd M, Modlin IM, Black JW, Boyce M, Culler M (2007) A comparison of the effects of gastrin, somatostatin and dopamine receptor ligands on rat gastric enterochromaffin-like cell secretion and proliferation. *Regul Pept* 143(1-3): 109-117.
- Kluxen FW, Bruns C, Lubbert H (1992) Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10): 4618-4622.

- Koch T, Hollt V (2008) Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacol Ther* 117(2): 199-206.
- Kohout TA, Lefkowitz RJ (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* 63(1): 9-18.
- Kolakowski LF, Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2(1): 1-7.
- Kostenis E, Waelbroeck M, Milligan G (2005) Techniques: promiscuous G $\alpha$  proteins in basic research and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 26(11): 595-602.
- Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem* 272(1): 5-8.
- Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL (1997) Mechanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin. *J Biol Chem* 272(29): 18125-18131.
- Lahlou H, Guillermet J, Hortala M, Vernejoul F, Pyronnet S et al. (2004) Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1014: 121-131.
- Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS et al. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7): 3712-3717.
- Lefkowitz RJ, De Lean A, Hoffman BB, Stadel JM, Kent R et al. (1981) Molecular pharmacology of adenylate cyclase-coupled alpha- and beta-adrenergic receptors. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 14: 145-161.
- Lemmon MA, Ferguson KM, Schlessinger J (1996) PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 85(5): 621-624.
- Lesche S, Lehmann D, Nagel F, Schmid HA, Schulz S (2009) Differential effects of octreotide and pasireotide on somatostatin receptor internalization and trafficking in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 94(2): 654-661.
- Levitzki A (1981) The beta-adrenergic receptor and its mode of coupling to adenylate cyclase. *CRC Crit Rev Biochem* 10(2): 81-112.

- Liebman PA, Pugh EN, Jr. (1980) ATP mediates rapid reversal of cyclic GMP phosphodiesterase activation in visual receptor membranes. *Nature* 287(5784): 734-736.
- Liu Q, Bee MS, Schonbrunn A (2009) Site specificity of agonist and second messenger-activated kinases for somatostatin receptor subtype 2A (Sst2A) phosphorylation. *Mol Pharmacol* 76(1): 68-80.
- Liu Q, Dewi DA, Liu W, Bee MS, Schonbrunn A (2008) Distinct phosphorylation sites in the SST2A somatostatin receptor control internalization, desensitization, and arrestin binding. *Mol Pharmacol* 73(2): 292-304.
- Liu Q, Cescato R, Dewi DA, Rivier J, Reubi JC et al. (2005) Receptor signaling and endocytosis are differentially regulated by somatostatin analogs. *Mol Pharmacol* 68(1): 90-101.
- Lodowski DT, Tesmer VM, Benovic JL, Tesmer JJ (2006) The structure of G protein-coupled receptor kinase (GRK)-6 defines a second lineage of GRKs. *J Biol Chem* 281(24): 16785-16793.
- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J et al. (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem* 267(12): 8558-8564.
- Lupp A, Hunder A, Petrich A, Nagel F, Doll C et al. (2011) Reassessment of sst(5) somatostatin receptor expression in normal and neoplastic human tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-4. *Neuroendocrinology* 94(3): 255-264.
- Luttrell LM, Gesty-Palmer D (2010) Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev* 62(2): 305-330.
- Lutz S, Shankaranarayanan A, Coco C, Ridilla M, Nance MR et al. (2007) Structure of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science* 318(5858): 1923-1927.
- Maxfield FR, McGraw TE (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2): 121-132.
- Meng D, Lynch MJ, Huston E, Beyermann M, Eichhorst J et al. (2009) MEK1 binds directly to betaarrestin1, influencing both its phosphorylation by ERK and the

- timing of its isoprenaline-stimulated internalization. *J Biol Chem* 284(17): 11425-11435.
- Modlin IM, Lye KD, Kidd M (2003) A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 97(4): 934-959.
- Modlin IM, Pavel M, Kidd M, Gustafsson BI (2009) Review article: somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours. *Aliment Pharmacol Ther* 31(2): 169-188.
- Moller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ (2003) Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1616(1): 1-84.
- Moore CA, Milano SK, Benovic JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69: 451-482.
- Nagel F, Doll C, Poll F, Kliewer A, Schroder H et al. (2011) Structural determinants of agonist-selective signaling at the sst(2A) somatostatin receptor. *Mol Endocrinol* 25(5): 859-866.
- Oberg K (2005) Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract: recent advances in molecular genetics, diagnosis, and treatment. *Curr Opin Oncol* 17(4): 386-391.
- Oberg K, Castellano D (2011) Current knowledge on diagnosis and staging of neuroendocrine tumors. *Cancer Metastasis Rev* 30 Suppl 1: 3-7.
- Oberg K, Kvols L, Caplin M, Delle Fave G, de Herder W et al. (2004) Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *Ann Oncol* 15(6): 966-973.
- Oberg KE, Reubi JC, Kwekkeboom DJ, Krenning EP (2010) Role of somatostatins in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor development and therapy. *Gastroenterology* 139(3): 742-753, 753 e741.
- Oldham WM, Hamm HE (2006) Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys* 39(2): 117-166.
- Papotti M, Bongiovanni M, Volante M, Allia E, Landolfi S et al. (2002) Expression of somatostatin receptor types 1-5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Virchows Arch* 440(5): 461-475.

- Patel YC (1999) Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 20(3): 157-198.
- Peverelli E, Mantovani G, Calebiro D, Doni A, Bondioni S et al. (2008) The third intracellular loop of the human somatostatin receptor 5 is crucial for arrestin binding and receptor internalization after somatostatin stimulation. *Mol Endocrinol* 22(3): 676-688.
- Pitcher JA, Payne ES, Csontos C, DePaoli-Roach AA, Lefkowitz RJ (1995) The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(18): 8343-8347.
- Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ et al. (1992) Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 257(5074): 1264-1267.
- Plockinger U, Albrecht S, Mawrin C, Saeger W, Buchfelder M et al. (2008) Selective loss of somatostatin receptor 2 in octreotide-resistant growth hormone-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 93(4): 1203-1210.
- Poll F, Doll C, Schulz S (2011) Rapid dephosphorylation of G protein-coupled receptors by protein phosphatase 1beta is required for termination of beta-arrestin-dependent signaling. *J Biol Chem* 286(38): 32931-32936.
- Poll F, Lehmann D, Illing S, Ginja M, Jacobs S et al. (2010) Pasireotide and octreotide stimulate distinct patterns of sst2A somatostatin receptor phosphorylation. *Mol Endocrinol* 24(2): 436-446.
- Pradayrol L, Jornvall H, Mutt V, Ribet A (1980) N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett* 109(1): 55-58.
- Premont RT, Macrae AD, Stoffel RH, Chung N, Pitcher JA et al. (1996) Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J Biol Chem* 271(11): 6403-6410.
- Pugh EN Jr & Lamb TD (2000). Phototransduction in vertebrate rods and cones: molecular mechanisms of amplification, recovery and light adaptation. In *Handbook of Biological Physics*, vol.3, *Molecular Mechanisms of Visual Transduction*, chap. 5, pp. 183-255.

- Quock RM, Burkey TH, Varga E, Hosohata Y, Hosohata K et al. (1999) The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. *Pharmacol Rev* 51(3): 503-532.
- Ramage JK, Davies AH, Ardill J, Bax N, Caplin M et al. (2005) Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours. *Gut* 54 Suppl 4: iv1-16.
- Rankin ML, Marinec PS, Cabrera DM, Wang Z, Jose PA et al. (2006) The D1 dopamine receptor is constitutively phosphorylated by G protein-coupled receptor kinase 4. *Mol Pharmacol* 69(3): 759-769.
- Reichlin S (1983) Somatostatin. *N Engl J Med* 309(24): 1495-1501.
- Ren SG, Taylor J, Dong J, Yu R, Culler MD et al. (2003) Functional association of somatostatin receptor subtypes 2 and 5 in inhibiting human growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 88(9): 4239-4245.
- Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70: 281-312.
- Robillard L, Ethier N, Lachance M, Hebert TE (2000) Gbetagamma subunit combinations differentially modulate receptor and effector coupling in vivo. *Cell Signal* 12(9-10): 673-682.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC et al. (2000) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 288(5463): 154-157.
- Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415(6868): 206-212.
- Roth NS, Campbell PT, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lohse MJ (1991) Comparative rates of desensitization of beta-adrenergic receptors by the beta-adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(14): 6201-6204.
- Schindler M, Kidd EJ, Carruthers AM, Wyatt MA, Jarvie EM et al. (1998) Molecular cloning and functional characterization of a rat somatostatin sst2(b) receptor splice variant. *Br J Pharmacol* 125(1): 209-217.
- Schmid HA (2008) Pasireotide (SOM230): development, mechanism of action and potential applications. *Mol Cell Endocrinol* 286(1-2): 69-74.

- Schonbrunn A (2008) Selective agonism in somatostatin receptor signaling and regulation. *Mol Cell Endocrinol* 286(1-2): 35-39.
- Schwartzkop CP, Kreienkamp HJ, Richter D (1999) Agonist-independent internalization and activity of a C-terminally truncated somatostatin receptor subtype 2 (delta349). *J Neurochem* 72(3): 1275-1282.
- Sharif N, Gendron L, Wowchuk J, Sarret P, Mazella J et al. (2007) Coexpression of somatostatin receptor subtype 5 affects internalization and trafficking of somatostatin receptor subtype 2. *Endocrinology* 148(5): 2095-2105.
- Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294(5545): 1307-1313.
- Siderovski DP, Hessel A, Chung S, Mak TW, Tyers M (1996) A new family of regulators of G-protein-coupled receptors? *Curr Biol* 6(2): 211-212.
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252(5007): 802-808.
- Smalley KS, Feniuk W, Humphrey PP (1998) Differential agonist activity of somatostatin and L-362855 at human recombinant sst4 receptors. *Br J Pharmacol* 125(4): 833-841.
- Somers RL, Klein DC (1984) Rhodopsin kinase activity in the mammalian pineal gland and other tissues. *Science* 226(4671): 182-184.
- Sprang SR (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* 66: 639-678.
- Spurney RF (2001) Regulation of thromboxane receptor (TP) phosphorylation by protein phosphatase 1 (PP1) and PP2A. *J Pharmacol Exp Ther* 296(2): 592-599.
- Steele FR, Washburn T, Rieger R, O'Tousa JE (1992) Drosophila retinal degeneration C (rdgC) encodes a novel serine/threonine protein phosphatase. *Cell* 69(4): 669-676.
- Stoffel RH, Randall RR, Premont RT, Lefkowitz RJ, Inglese J (1994) Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family. *J Biol Chem* 269(45): 27791-27794.
- Stroh T, Jackson AC, Sarret P, Dal Farra C, Vincent JP et al. (2000) Intracellular dynamics of sst5 receptors in transfected COS-7 cells: maintenance of cell

- surface receptors during ligand-induced endocytosis. *Endocrinology* 141(1): 354-365.
- Thennes T, Mehta D (2012) Heterotrimeric G proteins, focal adhesion kinase, and endothelial barrier function. *Microvasc Res* 83(1): 31-44.
- Theodoropoulou M, Labeur M, Paez Pereda M, Haedo M, Perone MJ et al. (2010) Novel medical therapies for pituitary tumors. *Front Horm Res* 38: 158-164.
- Tian WN, Deth RC (1993) Precoupling of Gi/G(o)-linked receptors and its allosteric regulation by monovalent cations. *Life Sci* 52(24): 1899-1907.
- Touhara K, Inglese J, Pitcher JA, Shaw G, Lefkowitz RJ (1994) Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 269(14): 10217-10220.
- Tran TM, Friedman J, Baameur F, Knoll BJ, Moore RH et al. (2007) Characterization of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation: Comparison with the rate of resensitization. *Mol Pharmacol* 71(1): 47-60.
- Tulipano G, Schulz S (2007) Novel insights in somatostatin receptor physiology. *Eur J Endocrinol* 156 Suppl 1: S3-11.
- Tulipano G, Stumm R, Pfeiffer M, Kreienkamp HJ, Holtt V et al. (2004) Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes. *J Biol Chem* 279(20): 21374-21382.
- Tulipano G, Soldi D, Bagnasco M, Culler MD, Taylor JE et al. (2002) Characterization of new selective somatostatin receptor subtype-2 (sst2) antagonists, BIM-23627 and BIM-23454. Effects of BIM-23627 on GH release in anesthetized male rats after short-term high-dose dexamethasone treatment. *Endocrinology* 143(4): 1218-1224.
- van Thiel SW, Romijn JA, Biermasz NR, Ballieux BE, Frolich M et al. (2004) Octreotide long-acting repeatable and lanreotide Autogel are equally effective in controlling growth hormone secretion in acromegalic patients. *Eur J Endocrinol* 150(4): 489-495.
- Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Holtt V (1992) Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *FEBS Lett* 311(3): 290-294.
- Vasudevan NT, Mohan ML, Gupta MK, Hussain AK, Naga Prasad SV (2011) Inhibition of protein phosphatase 2A activity by PI3Kgamma regulates beta-adrenergic receptor function. *Mol Cell* 41(6): 636-648.

- Vinos J, Jalink K, Hardy RW, Britt SG, Zuker CS (1997) A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function. *Science* 277(5326): 687-690.
- Virgolini I, Ambrosini V, Bomanji JB, Baum RP, Fanti S et al. (2010) Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with <sup>68</sup>Ga-DOTA-conjugated peptides: <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC, <sup>68</sup>Ga-DOTA-NOC, <sup>68</sup>Ga-DOTA-TATE. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37(10): 2004-2010.
- Waldherr C, Pless M, Maecke HR, Schumacher T, Crazzolara A et al. (2002) Tumor response and clinical benefit in neuroendocrine tumors after 7.4 GBq (90)Y-DOTATOC. *J Nucl Med* 43(5): 610-616.
- Wang Q, Zhao J, Brady AE, Feng J, Allen PB et al. (2004) Spinophilin blocks arrestin actions in vitro and in vivo at G protein-coupled receptors. *Science* 304(5679): 1940-1944.
- Wang Y, De Arcangelis V, Gao X, Ramani B, Jung YS et al. (2008) Norepinephrine- and epinephrine-induced distinct beta2-adrenoceptor signaling is dictated by GRK2 phosphorylation in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 283(4): 1799-1807.
- Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D et al. (2003) Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov* 2(12): 999-1017.
- Welin SV, Janson ET, Sundin A, Stridsberg M, Lavenius E et al. (2004) High-dose treatment with a long-acting somatostatin analogue in patients with advanced midgut carcinoid tumours. *Eur J Endocrinol* 151(1): 107-112.
- Weller M, Virmaux N, Mandel P (1975) Light-stimulated phosphorylation of rhodopsin in the retina: the presence of a protein kinase that is specific for photobleached rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(1): 381-385.
- Wilden U (1995) Duration and amplitude of the light-induced cGMP hydrolysis in vertebrate photoreceptors are regulated by multiple phosphorylation of rhodopsin and by arrestin binding. *Biochemistry* 34(4): 1446-1454.
- Wilkinson GF, Feniuk W, Humphrey PP (1997) Homologous and heterologous desensitisation of somatostatin-induced increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> and inositol 1,4,5-trisphosphate in CHO-K1 cells expressing human recombinant somatostatin sst5 receptors. *Eur J Pharmacol* 340(2-3): 277-285.
- Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI et al. (1992) Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors

expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. Proc Natl Acad Sci U S A 89(1): 251-255.

Zhao X, Yokoyama K, Whitten ME, Huang J, Gelb MH et al. (1999) A novel form of rhodopsin kinase from chicken retina and pineal gland. FEBS Lett 454(1-2): 115-121.

Zidar DA, Violin JD, Whalen EJ, Lefkowitz RJ (2009) Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. Proc Natl Acad Sci U S A 106(24): 9649-9654.

## 6 Anhang

### 6.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abb. 1	Aktivierung des G-Protein-Zyklus	08
Abb. 2	Rezeptor-Internalisierung,-Desensitisierung und –Recycling (GPCR-Trafficking)	10
Abb. 3	Charakterisierung der beiden phosphospezifischen Antikörper am hsst <sub>5</sub>	36
Abb. 4	Die Phosphorylierung des Threonins 333 ist für die Rezeptor- Internalisierung des hsst <sub>5</sub> notwendig	37
Abb. 5	Konzentrationsabhängige Phosphorylierung des carboxyl- terminalen Threoninrestes 333	38
Abb. 6	Agonist-selektive Phosphorylierung von T333 des hsst <sub>5</sub>	40
Abb. 7	Agonistenselektive Internalisierung des hsst <sub>5</sub>	41
Abb. 8	Vergleich der zeitabhängigen carboxyl-terminalen Phosphorylierung des hsst <sub>5</sub> und des hsst <sub>2</sub>	42
Abb. 9	Vergleich der zeitabhängigen Dephosphorylierung der hsst- Rezeptoren 5 und 2	44
Abb. 10	Die GRK2 ist verantwortlich für die agonist-induzierte Phosphorylierung am T333	46
Abb. 11	Calyculin A aber nicht die Okadasäure kann die Dephosphorylierung am T333 des hsst <sub>5</sub> verzögern.	48
Abb. 12	Die PP1 <sub>γ</sub> katalysiert die Dephosphorylierung am T333 des hsst <sub>5</sub>	49

**6.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Übersicht der Klassen von G-Protein-Untereinheiten	6
Tabelle 2	Gegenüberstellung der fünf humanen Somatostatinrezeptoren	18

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AP-2	Adapter-Protein-2
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> , Zelllinie aus den Ovarien des chinesischen Hamsters
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
D2R	Dopaminrezeptor 2
dh.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	Escherischia coli
FKS	Fötale Kälberserum
G418	Geniticinsulfat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GH	<i>Growth hormone</i> , Wachstumshormon
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosin-5'-triphosphat-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase(n)
GRP	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Phosphatase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HCl	Salzsäure
HEK293	humane embryonale Nieren-293-Zellen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase

---

JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertoni
min	Minute(n)
MOR	$\mu$ -Opioid-Rezeptor
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
NEB	New England Biolabs
OA	Okadainsäure, <i>okadaic acid</i>
OD	optische Dichte
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	Postsynaptische Dichte 95/Discs large/Zonula occludentes-1
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP	Phosphoprotein-Phosphatasen
PVDF	Polyvinylidenfluorid-Membran
RDGC	<i>retinal degeneration C</i> , retinale Degeneration C
RGS	<i>Regulators of G protein signalling</i> , Regulatoren der G-Protein-Signalweitergabe
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small Interfering ribonucleic acid</i> , kleine interferierende Ribonukleinsäure
SOM230	Pasireotid
SS-14 (-28)	Somatostatin-14 (-28)
sst	Somatostatin-Rezeptor
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TP	Thromboxan-Rezeptor
Tris	Tris-hydroxymethylendiamin

## 6.4 Antikörper

### 6.4.1 Primäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies, Generierung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller, Quelle</i>
anti-GRK2	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1500	Santa Cruz
anti-PP1-pan	Maus, monoklonal	WB: 1:2000	Santa Cruz
anti-psst2A (Ser341/Ser343)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:250	Affinitätsreinigung anti-psst2A
anti-psst2A (Thr353/Thr354)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:500	Affinitätsreinigung anti-psst2A
anti-psst2A (Thr356/Thr359)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:500	Affinitätsreinigung anti-psst2A
anti-psst5 (T333)	Kaninchen monoklonal	WB: 0,1 µg/ml	Affinitätsreinigung anti-psst5
anti-psst5 (T347)	Kaninchen monoklonal	WB: 0,1 µg/ml	Affinitätsreinigung anti-psst5
anti-sst2A	Kaninchen, monoklonal	ICC: 1:100 WB: 1:200	UMB-1 (Fischer et al. 2008)
anti-sst5	Kaninchen, monoklonal	ICC: 1:100 WB: 1:200	UMB-4 (Lupp et al. 2011)

**Verwendete primäre Antikörper.** IF: Immunfluoreszenz, WB: Western-Blot.

### 6.4.2 Sekundäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller, Quelle</i>
anti-Kaninchen Alexa488-gekoppelt	Ziege	IF: 1:1000	Invitrogen
anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	Ziege	WB: 1:5000	Amersham
anti-Maus HRP-gekoppelt	Ziege	WB: 1:5000	Amersham
anti-Ziege HRP-gekoppelt	Ziege	WB: 1:5000	Santa Cruz

**Verwendete sekundäre Antikörper.** IF: Immunfluoreszenz, WB: Western-Blot.

### 6.5 cDNA-Expressionskonstrukte

Konstrukt	Vektor	Verwendung
Leervektor	pcDNA3.1	Kontroll-Transfektion
hsst5-TA(T/A)EP...EA(T/A)PP	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression
hsst2A-T7	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression
hsst5-T7	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression

**Verwendete cDNA-Expressionskonstrukte.** Der pcDNA3.1 wurde bei Invitrogen erworben.

### 6.6 siRNA-Konstrukte

Bezeichnung	Humanes Zielprotein	mRNA-Zielsequenz
GRK2	GRK2	5'-CGGGAGAUCUUCGACUCAUA-3'
GRK3	GRK3	5'-AAGCAAGCUGUAGAACACGUA-3'
GRK5	GRK5	5'-AAGCAAGCUGUAGAACACGUA-3'
GRK6	GRK6	5'- AACACCUUCAGGCAAUACCGA-3'
PPP1CA	PP1 katalytische UE $\alpha$	5'- AAGAGACGCUACAACAUCAAA-3'
PPP1CB	PP1 katalytische UE $\beta$	5'-UACGAGGAUGUCGUCCAGGAA-3'
PPP1CC	PP1 katalytische UE $\gamma$	5'-AACAU CGACAGCAUUAUCCAA-3'
Nichtbindende Kontrolle	-	5'- GCUUAGGAGCAUUAUAGUAAA-3'

**Verwendete siRNA-Oligos.** Alle Sequenzen sind gegen humane mRNAs gerichtet.

## 6.7 Lebenslauf

- 07.02.1981 Geboren in Sebnitz
- 1987-1989 Grundschule in Sebnitz
- 1989-1990 Grundschule in Großenlöder
- 1991-1996 Hauptschule Lüdertal in Großenlöder mit dem Hauptschulabschluss beendet
- 1996-1998 Eduard-Stieler-Schule in Fulda mit dem Realschulabschluss beendet
- 1998-2001 Eduard-Stieler-Schule in Fulda mit dem Abitur beendet
- 2001-2006 Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 2006-2007 Diplomarbeit im Pflanzenschutzzentrum Monheim, Bayer AG
- Sept. 2007 Abschluss Diplom im Fach Biochemie/Molekularbiologie
- 2007-2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Verein Polymet Jena e.V.
- 01.10.2008 Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Institutsdirektor Prof. Dr. Stefan Schulz
- Sept.2008 Postgradualstudium Toxikologie und Umweltschutz an der Universität Leipzig
- Juni 2012 Abschluss Postgradualstudium Toxikologie und Umweltschutz an der Universität Leipzig

## 6.8 Veröffentlichung

Lupp A, Hunder A, Petrich A, Nagel F, Doll C et al. (2011) *Neuroendocrinology* **94**(3): 255-264.

Kliwer, A., Mann, A., Petrich, A., Pöll F. and Schulz, S. (2012) *PLoS One*. **7**(6):e39458

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeiten wurden zur Publikation für *Molecular Endocrinology* eingereicht:

Aline Petrich, Falko Nagel, Anne Strigli, Anika Mann, Andrea Kliewer, Florian Poll and Stefan Schulz, *Phosphorylation of carboxyl-terminal threonine 333 rapid internalization and recycling of the human somatostatin receptor 5*, Molecular Endocrinology

### **6.9 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Jena, Juni 2012